

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09793

研究課題名(和文) 緑内障視路変性における血液中エクソソーム解析による病態関連バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Discovery of pathogenesis-related biomarkers from blood exosome analysis in glaucomatous optic neuropathy

研究代表者

嶋澤 雅光 (Shimazawa, Masamitsu)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80381721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：視神経変性に伴い変動するmiRNAを血液エクソソーム中において網羅的に解析することを目的として、マウス視神経軸索挫滅モデルの血清エクソソーム中のmiRNAを網羅的に解析した。その結果、血液由来エクソソーム中に1,882種類のmiRNAを検出し、軸索挫滅後7日をピークに挫滅後1～14日間に有意(2倍以上の増減、 $p < 0.05$ )に変動した192種類のmiRNAを同定した。そのmiRNAのいくつかは緑内障(POAG)および正常眼圧緑内障患者の前房水中のmiRNAの変動と一致した。これらの変動を血液由来エクソソームにより捉えることができたことは、バイオマーカーとして応用の可能性が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

年齢差、他疾患の罹患、遺伝的・環境背景因子などの影響が少ない実験動物を用いて眼圧に依存しない視神経変性モデルにおいて、視路変性過程におけるmiRNAの変動を血液由来エクソソームにより捉えることができた。本研究は、緑内障の病態解明およびバイオマーカーの確立の可能性が期待できる成果である。

研究成果の概要(英文)：We analyzed miRNAs in the blood-derived exosomes of a mouse model of optic nerve axonal degeneration by next-generation sequencing to identify miRNAs that change with optic nerve degeneration. As a result, 1,882 miRNAs were detected in blood-derived exosomes, and 192 miRNAs were identified, with a peak at 7 days and a significant ( $>2$ -fold increase or decrease,  $p < 0.05$ ) change between 1 and 14 days after optic nerve crush. Some of the 192 miRNAs were consistent with changes in miRNAs in the aqueous humor of patients with glaucoma. The finding that these changes were detected by blood-derived exosomes may have potential as a biomarker.

研究分野：眼薬理学

キーワード：エクソソーム 網膜神経節細胞 緑内障

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

緑内障は、我が国における中途失明原因の第1位を占める失明疾患であり、緑内障の40歳以上の平均有病率は約5%、20人に1人の割合で存在する(多治見スタディー)。しかし、緑内障の発症・進行リスク因子としてエビデンスのある眼圧を標的とした眼圧下降療法以外に緑内障に対して有効な治療法は存在せず、眼圧を十分に下降しても視野障害が進行する患者が多数存在する。緑内障の発症・進行の病態機序については十分には解明されておらず、その病態解明並びに治療または診断・予後の指標となる病態関連因子を明らかにすることが望まれている。申請者は、これまで緑内障を中心とした網膜疾患の病態モデル確立し、それらを用いた病態解明を進めてきた。その病態モデルの確立にあたり、臨床への外挿性の高い非ヒト霊長類であるカニクイザルを用いて慢性高眼圧緑内障モデルならびにその評価系を確立し、陽電子放出断層撮影(PET)および磁気共鳴画像(MRI)を用いて緑内障早期より網膜・視神経の変性に伴い、網膜から大脳視覚野の中継路である外側膝状体(LGN)の変性、大脳視覚領域の脳代謝の低下および萎縮、さらにそれらを継ぐ視路に経シナプス変性が起こっていることを明らかにした。

### 2. 研究の目的

実験的緑内障モデルの視路変性において病態の発症・進行過程で細胞組織外に放出される細胞外小胞の一種であるエクソソームに着目し、視路変性により細胞外に放出される血液中エクソソームから病態関連バイオマーカーとなる因子について解析した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験的緑内障(視神経挫滅)モデルの作製

ケタミン 120 mg/kg およびキシラジン 6 mg/kg の混合麻酔液を腹腔内投与した。その後、結膜を切開し、切開した結膜の端を持ち眼球を鼻側に動かし慎重に視神経を露出させた。眼球後方約 0.5-1 mm の部位でネガティブピンセット (Dumont#7, Jura, Switzerland) を使用し、7秒間視神経を挫滅した。眼球を元の位置に戻し、感染症を防ぐために少量のタリビット眼軟膏 0.3% を塗り眼球の保護を行った。視神経挫滅 1, 3, 7, 14 日後に麻酔下に下大静脈より血液を採取し、血清を得た。

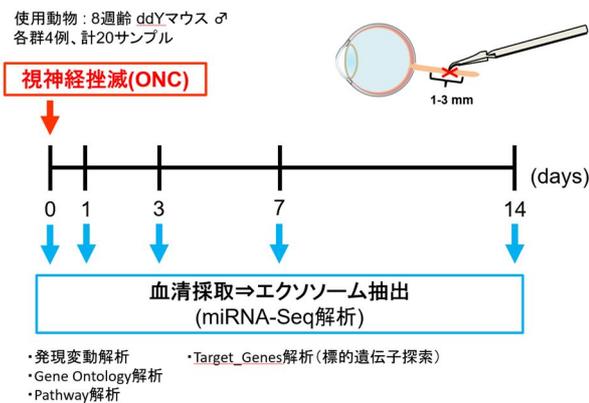


図1 マウス視神経挫滅モデル

#### (2) 血清からのエクソソームの精製および microRNA (miRNA)抽出

マウス血清 250  $\mu$ L から ExoQuick® ULTRA EV Isolation Kit for Serum and Plasma (Cat # EQUltra-20A-1; SBI) を用いてエクソソームを抽出した。単離したエクソソームは、miRNeasy Micro Kit (QIAGEN) を使用して miRNA を抽出し、クオリティチェック (QC) を実施した。

#### (3) シーケンスライブラリー調製、シーケンス、データ解析

QIaseq miRNA Library Kit (QIAGEN 社) を用いて miRNA を対象としたシーケンスライブラリーを調製した。調製したシーケンスライブラリーは QC 後、次世代シーケンサー (NextSeq 500, illumina) でシーケンスした。シーケンス後のデータは、リファレンスゲノムにアライメント (マッピング) 後、発現量を定量化 (正規化) し、定量化した。

#### 4. 研究成果

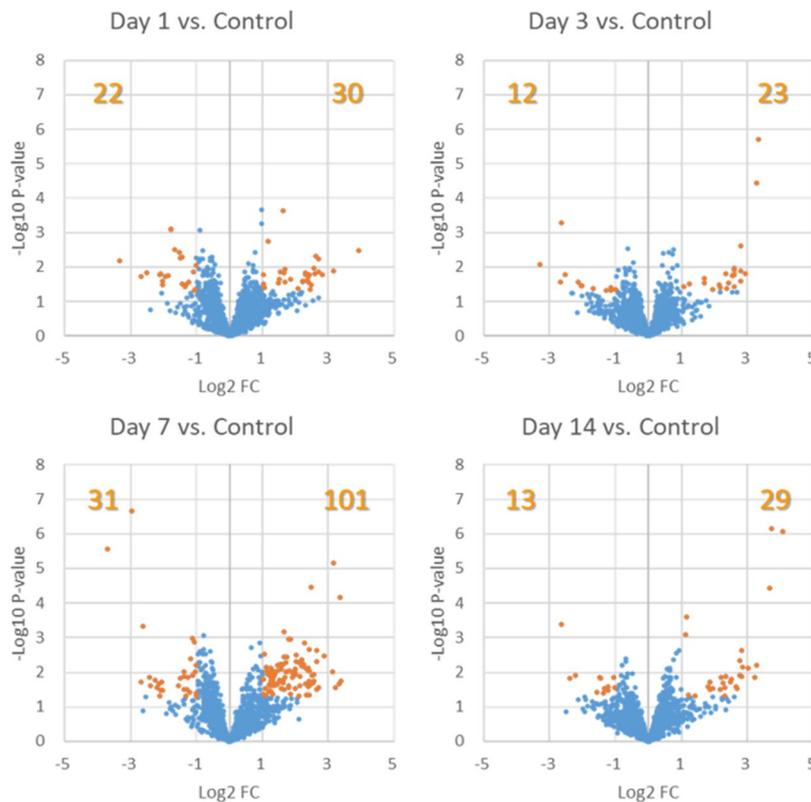
視神経変性に伴い変動する miRNA を血液エクソソーム中において網羅的に解析することを目的として、眼圧要因の介在しない視神経挫滅によるマウス網膜・視神経変性モデルにおける血清エクソソーム中の miRNA 発現変化を経時的に次世代シーケンス(NGS)により解析した(図 1)。雄性 ddY マウスの視神経をピンセットで 7 秒間圧迫挫滅させることにより視神経軸索変性モデルを作製した。視神経障害を惹起した 1, 3, 7, 14 日後に採血し、血清を得た。得られた血清から高純度のエクソソームを得た。その血液由来エクソソーム中の miRNA を次世代シーケンスにより網羅的に定量解析した。血液由来エクソソーム中に 1,882 個の miRNA (piRNA を含めて 2,041 個)を検出し(表 1)、視神経挫滅後の 7 日をピークとして有意に変動(2

表 1 2 倍以上発現変動した miRNA 数

各群	変動遺伝子数	サンプリング	対照群	発現変化	Fold Change 閾値
軸索挫滅 1day 後	72 (27)	1day	control	down	2
	133 (40)	1day	control	up	2
軸索挫滅 3day 後	93 (16)	3day	control	down	2
	72 (27)	3day	control	up	2
軸索挫滅 7day 後	76 (40)	7day	control	down	2
	218 (105)	7day	control	up	2
軸索挫滅 14day 後	99 (19)	14day	control	down	2
	98 (35)	14day	control	up	2

カッコ内は有意に変動 ( $p < 0.05$ ) した miRNA 数, 検出された 2,041 miRNA (piRNA を含む) を解析

倍以上の変動,  $p < 0.05$ ) する 192 個の miRNA を同定した(図 2)。興味深いことに、変動が検出された miRNA の一部は正常眼圧緑内障患者および原発性開放隅角緑内障(POAG)の眼房水中の miRNA で有意な変動が報告されている最新の報告(文献 1, 2)とほぼ一致した。また、変



グラフ中の数字は変動 ( $FC > 2$  or  $< -2$ ,  $p < 0.05$ ) した miRNA 数を示す (1,882 miRNA を解析)

図 2 視神経挫滅後の血清エクソソーム解析 (Volcano plot)

動した miRNA のターゲット遺伝子の予測解析(Pathway 解析)から視路変性に関わる遺伝子群が抽出され、それらの遺伝子の経時的な変動は変性の初期の視神経の脱ミエリン化、その後の網膜神経節細胞死、グリオシスや再ミエリン化など網膜・視神経の変性過程を反映するものであった。これらの研究結果は、網膜・視路変性においてそれらの組織から血液中に放出されたエクソソーム中の miRNA の変動を捉えたものと考えられ、視神経挫滅後の網膜・視路変性の変化を反映していることが強く示唆される。

さらに、変動した miRNA の標的遺伝子を解析したところ、神経栄養因子(*Bdnf*)の発現を抑制する複数の miRNA が軸索挫滅 1~14 日にかけて増加した。さらに、その受容体である *TrkB* の発現は 3 および 14 日において減少、7 日に増加、低親和受容体である *p75NTR* は 14 日に増加するように miRNA の変動が観察された。これらの結果は、miRNA により軸索挫滅後に視神経の変性過程で神経栄養因子に対して抑制的かつ細胞死促進的な制御がおこなわれていることを示唆している。これらの変動を血液由来エクソソームにより捉えることができたことは、バイオマーカーとしての可能性が期待される。

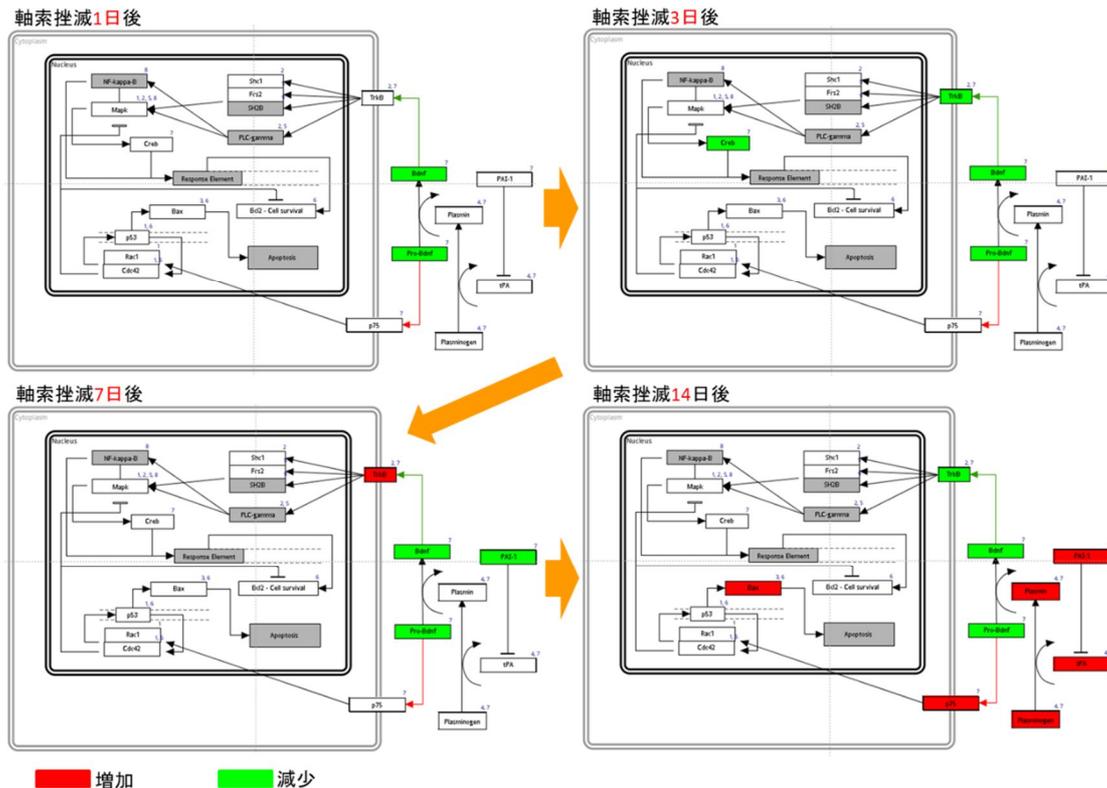


図3 miRNA 変動によるターゲット遺伝子の発現変動予測：BDNF pathway

< 引用文献 >

- 1) Seong, H., et al. Sci Rep 2021;11:19024
- 2) Hubens WHG, et al. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2021;62:24-24.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Iwata, Y. Inagaki, S. Morozumi, W. Nakamura, S. Hara, H. Shimazawa, M.	4. 巻 202
2. 論文標題 Treatment with GDF15, a TGFbeta superfamily protein, induces protective effect on retinal ganglion cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Exp Eye Res	6. 最初と最後の頁 108338
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exer.2020.108338	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 嶋澤 雅光
2. 発表標題 実験的網膜疾患モデルを用いた病態解明と創薬ターゲットの探索
3. 学会等名 第49回 日本毒性学会学術年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 嶋澤 雅光
2. 発表標題 網膜疾患の病態解明とアカデミア創薬への挑戦
3. 学会等名 第42回日本眼薬理学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 嶋澤 雅光
2. 発表標題 実験的緑内障モデルを用いた網膜・視路変性における病態関連分子の探索
3. 学会等名 第127回日本眼科学会総（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	原 英彰  (Hara Hideaki)  (20381717)	岐阜薬科大学・薬学部・学長    (23701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------