

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09821

研究課題名（和文）加齢黄斑変性に関連する新規ノンコーディングRNAの機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of novel non-coding RNAs in age related macular degeneration

研究代表者

柳 靖雄（YANAGI, Yasuo）

横浜市立大学・医学研究科・客員教授

研究者番号：90376442

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）：本研究では、バイオインフォマティクスおよび臨床サンプルを用いた解析により、加齢黄斑変性における新規標的因子としてノンコーディングRNA（ncRNA）およびロングノンコーディングRNA（lncRNA）を同定した。特に、“標的A”のmiRNA mimicの投与がAMDマウスモデルにおいて脈絡膜新生血管（CNV）の形成を抑制する効果を示した。蛍光眼底造影および脈絡膜フラットマウント検査により、“標的A”群ではコントロール群に比べてCNVからの蛍光漏出が有意に低下し、CNVの大きさも有意に抑制された。これらの結果は、“標的A”がAMD治療における有望な候補となり得ることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は加齢黄斑変性における新たな治療ターゲットとして、ノンコーディングRNA（ncRNA）およびロングノンコーディングRNA（lncRNA）の役割を明らかにした。学術的には、AMDにおけるこれらncRNAの具体的な機能を初めて示し、特に“標的A”のmiRNA mimicが脈絡膜新生血管（CNV）の抑制に寄与することを発見した。これにより、AMD治療の新たな分子メカニズムが解明され、基礎研究と臨床研究において重要な進展が期待される。社会的には、既存治療に加え新規治療法の開発が患者の治療選択肢を拓ける可能性がある。

研究成果の概要（英文）：This study identified non-coding RNAs (ncRNAs) and long non-coding RNAs (lncRNAs) as novel targets for age-related macular degeneration (AMD) using bioinformatics and clinical sample analysis. We tested the therapeutic potential of a miRNA mimic targeting "Target A" in AMD mouse models. Fluorescence fundus angiography showed a significant reduction in CNV fluorescence leakage in the "Target A" group compared to controls, and choroidal flat-mounts showed significant CNV size suppression. In VLDLR knockout mice, "Target A" reduced endothelial markers PECAM-1, VEGFR1, and VEGFR2, but not VEGF-A. These findings suggest "Target A" miRNA mimic could inhibit CNV in AMD, highlighting its potential as a therapeutic candidate. Further research on ncRNAs and lncRNAs in AMD is crucial for developing new treatments.

研究分野：眼科

キーワード：加齢黄斑変性

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性(AMD: age-related macular degeneration)の罹患患者数は、社会の高齢化に伴い 2040 年までに世界中で 2 億 8000 万人に達し、中でもアジアでは 1 億 1000 万人になると推定されている(Wong *et al.*, *Lancet Glob Health* 2014)。さらに、AMD による視覚障害は、大腿骨骨折、エイズなどの重篤な全身性疾患と同程度に患者の生活の質を低下させることが知られており、社会に非常に大きな影響を及ぼすと予測される。この慢性進行性疾患である AMD は、脈絡膜新生血管(choroidal neovascularization; 以下 CNV)を特徴とするタイプである滲出型 AMD、および萎縮を特徴とする地図状萎縮という 2 つの最終段階を有するが、アジアにおいては滲出型 AMD が地図状萎縮より多く、不可逆的な視機能喪失の重要な原因である。現在の治療[抗 VEGF(vascular endothelial growth factor)療法]では、短期的な視機能改善しか得ることができず、QOL の大幅な改善にはほど遠い。このため、新たな治療の開発が急務であるが、我々はモデル動物から同定された疾患関連 ncRNA が新たな治療標的となりうると考えている。

本研究では、タンパク質をコードしないノンコーディング RNA (non-coding RNA; ncRNA) の AMD における機能を解析し、その知見に基づいてより効率的な治療法の確立を検討する。具体的には、アジア型 AMD に類似した病態を有する遺伝子改変実験動物を用いて網羅的解析を行い、病態に関連して発現変動が認められた ncRNA のうち、種を超えて保存されており、疾患に関連すると強く示唆される 3 つの ncRNA を対象に解析を進める。

2. 研究の目的

この数年で AMD の疾患感受性遺伝子の機能解明が進み、炎症、細胞外マトリックスの変化、血管新生因子などの複合的な作用が判明してきた。中でも自然免疫の役割が重要であると考えられており、特に単球・マクロファージの役割が最も集中的に研究されてきている(Reviewed in Yanagi Y *et al.*, *Eye* 2018)。マクロファージは AMD の病初期においてはドルーゼン周囲の Bruch 膜(網膜色素上皮の基底膜)に沈着し、デブリおよびコレステロールを除去する。しかしながら、同時に、破壊的な表現型へと変化し CNV の発生にも関与する。例えば、CNV 病変に動員されたマクロファージな血管因子である VEGF-A を発現し CNV を悪化させる。このため、マクロファージの保護的な表現型から破壊的な表現型への移行メカニズムの解明は AMD の病態解明の新たな鍵になると考えられる。この点につき、我々は予備的検討で、加齢に伴って単球の表現型が病的に変化すること、さらに、特定の ncRNA が単球・マクロファージの加齢に伴う表現型変化に強く関連していることを突き止めた。このような単球の ncRNA の変化が AMD におよぼす影響は不明である。

さらに現在のアジアにおける主要な AMD の課題は、アジア型 AMD の病態が明らかとなっていないことである。すなわち、臨床的な検討からアジア型 AMD は欧米型 AMD と病態が異なり、脈絡膜異常が強いことが分かってきた(柳靖雄 他: 日眼会誌, 2014 年 評議員指名講演総説)にもかかわらず、これまでほとんどの基礎研究は欧米型の AMD で生じる網膜色素上皮の機能異常の検討に向けられている。アジアの研究者が少ないことに加え、脈絡膜血管異常を認める適切な動物 AMD モデルが未だに少ないこともこの一因であり、アジア型の AMD モデルを用いた AMD の病態解明が待たれていた。

これらの問題に対応すべく、我々は、強い脈絡膜血管異常を認め、アジア型の AMD の病態を少なくとも部分的には模倣する HtrA1 トランスジェニックマウスを用いて検討を行っている。

HtrA1 は AMD 疾患感受性遺伝子であり、そのリスクアレルを有する患者で過剰発現が見られることから AMD の良い動物モデルであると考えられる。そこで、6 ヶ月、9 ヶ月および 15 ヶ月齢の HtrA1 のトランスジェニックマウスの加齢に伴う網脈絡膜における mRNA、small RNA、lncRNA の変化を次世代シーケンサーで検討したところ、100 種類以上の ncRNA の異なる制御が存在することが明らかとなった。予測された様に、このマウスには単球機能変化も認め、同時に末梢血単球由来の mRNA、長鎖ノンコーディング RNA(lincRNA)を網羅的に解析し、進化的に保存された配列を有する ncRNA の同定を行い、MIR1236(miRNA)、RNU4ATAC18P、SNORA20(ACA20:snoRNA)を疾患関連 ncRNA として同定している。これらの short RNA は進化的に保存された配列を有する ncRNA であり、AMD の疾患感受性遺伝子座に存在し、パイオインフォマティクス解析によりこれらの疾患感受性遺伝子とともに発現が調節される可能性が高い。

本研究ではこれらの ncRNA の機能を *in vitro* および *in vivo* で解析し、病態への関与を明らかにするとともに、新規創薬標的となりうるかどうかを検討する。このような観点からの AMD 創薬標的の検討はこれまでに例がなく、効果的な AMD 治療法の開発に結びつく新たな知見が期待される。

3. 研究の方法

in vitro 実験では、ATCC から購入した脈絡膜内皮細胞株 (RF6A: カタログ番号 CRL-1780)、脈絡膜内皮細胞 (HUVEC)、および網膜色素上皮細胞 (hRPE) を使用して細胞実験を行う。ncRNA は、マイクロ RNA (miRNA) と長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) に分類され、これらの *in vitro* での機能解析は以下の通りである。

miRNA の機能解析は、miRNA 過剰発現 (miRNA mimic または Pre-miRNA 発現プラスミド) または阻害剤を用いて行う。lncRNA の機能解析には、CRISPR/CAS9 系による DNA 二本鎖切断を用いる。細胞機能試験として、脈絡膜血管内皮細胞および網膜色素上皮細胞の機能を検討するために、以下の評価を行う。各実験のサンプルサイズは n=6 から 8 程度を予定している。

脈絡膜内皮細胞 (iPSC-CEC、RF6A) の場合、細胞増殖および遊走能は WST-1 アッセイとセルマイグレーションアッセイを用いて評価する。また、タイトジャンクションおよびバリア機能はタイトジャンクション関連タンパク (ZO-1、Claudin-1、VE-カドヘリン) の免疫染色と経内皮電気抵抗 (TEER) 測定によって評価される。さらに、接着分子および増殖因子、遊走因子、血管機能調整因子の発現は、eNOS、ICAM-1、VCAM-1、MCP-1 の発現を Q-PCR、Western blot、ELISA を用いて検討する。メタロプロテアーゼ活性については、ゼラチンザイモグラフィーにより MMP2 の活性を検討する。

網膜色素上皮細胞の場合、細胞増殖および遊走能は WST-1 アッセイとセルマイグレーションアッセイを用いて評価する。また、タイトジャンクションおよびバリア機能はタイトジャンクション関連タンパク (ZO-1、Claudin-1、VE-カドヘリン) の免疫染色と経上皮電気抵抗 (TEER) 測定によって評価される。

4. 研究成果

(1) 候補標的につき、さらに bioinformatics を用いた解析および検討を行ない、また、臨床サンプルを用いた解析をおこなうことで加齢黄斑変性のあらたな標的因子について明らかにした。まず、ノンコーディング RNA に加えて、新たなノンコーディング RNA 標的を同定するため、レーザー誘発性脈絡膜新生血管モデルを用いて発現量が変動しているマイクロ(mi)RNA と mRNA (口

ングノンコーディング RNA を含む)を miRNA-seq および mRNA-seq を用いて検討した。その結果、予想に反して miRNA において FDR を 0.05 に設定すると発現が有意に変動しているものは確認されなかった (各群 n=4)。このため、FDR を緩く設定し、発現変動の可能性のある miRNA を抽出し、デジタル PCR で変動を確認したが、調査した miRNA の中で発現変動を認めるものは存在しなかった。

この結果を踏まえ、レーザー誘発性新生血管モデルでは miRNA の影響は僅かであると考え、以降は miRNA ではなく lncRNA に着目して検討を行うこととした。さらに、培養系では RPE のスフェロイド培養において血清を用いることでドルーゼン様物質の沈着を確認し、それらが ApoE 陽性であることも明らかにした。

これらの結果から、AMD 研究において lncRNA の役割をさらに明らかにするための研究が重要であることが示唆された。

(2) さらに 滲出型 AMD のモデル動物であるレーザー誘発性脈絡膜新生血管モデルの網膜/網膜色素上皮(RPE)/脈絡膜組織より mRNA を抽出し、RNA sequencing(RNA seq)を行ない、レーザー誘発性脈絡膜新生血管モデルで発現の変動している因子を同定した(各群 n=4)。同時に、老齢マウスの RPE/脈絡膜組織より senescence associated beta-galactosidase の発現を元に老化細胞をフローサイトメトリーを用いて収集し、若齢マウスより同様に老化細胞を除いた細胞集団を収集した。両者を RNA seq を用いて RPE/脈絡膜での老化細胞での発現変動している因子を抽出した (各群 n=4)。これら 2 つの RNA seq で共通して変動している因子のうち、血管新生、ならびに、線維症に関連している 6 因子を同定した。これらはレーザー誘発性脈絡膜新生血管モデル、並びに、老化細胞のいずれも発現上昇が認められており、これらの加齢によるエピジェネティックな変化による発現変動が、加齢黄斑変性における脈絡膜新生血管の活動性に関連している可能性がある。

これらの因子は全身疾患では線維症と関連しているとわかっているが、眼科領域ではこれまでに機能報告がほとんどないものである。このため、これらの因子が新たな加齢黄斑変性の標的となる可能性が示唆された。

(3) 中でも"標的 A"の miRNA mimic を投与することで、標的"A"の ncRNA が加齢黄斑変性(AMD)に与える影響をさらに検討した。具体的には、マウスのレーザー誘発性モデルを使用し、最も有用と思われる標的 RNA"A"を用いて脈絡膜新生血管(CNV)の評価を行った。

その結果、蛍光眼底造影検査において、コントロール群と比較して"A"群では CNV からの蛍光漏出が有意に低下した(n=6, P<0.01)。また、脈絡膜フラットマウント検査により、"A"群において CNV の大きさが有意に抑制された(n=6, P<0.05)ことが示された。

組織学的検討の結果、新生血管部位以外には異常所見が認められず、活性化したグリア細胞のマーカーである GFAP 陽性細胞の出現も確認されなかった。さらに、網膜血管新生モデルである VLDLR ノックアウトマウスにおいて、標的"A"の効果は Q-PCR で検討したところ、血管新生因子のうち VEGF-A の発現量には変化が見られなかったが、血管内皮細胞のマーカーである PECAM-1、VEGFR1、VEGFR2 の発現はコントロールと比較して有意に減少していた。また、IL-6 については有意差は認められなかったものの減少傾向が見られた。

さらに、蛍光眼底造影検査の結果、"A"群では抗 VEGFR2 中和抗体(DC-101)と同等の血管新生抑制作用が確認された。

総じて、in vivo での実験において、"標的 A"の miRNA mimic の投与が AMD における CNV の形成と進展を抑制する可能性が示された。この成果は、"標的 A"の miRNA mimic が AMD 治療における脈絡膜新生血管の形成や進展に対して有益な効果を持つ可能性を示唆しており、治療開発にお

いて有望な候補となり得ることを示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12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 0件）

1. 著者名 Yanagi Yasuo, Yu Richard M.C., Ahamed Waseem, Yu Marco, Teo Kelvin Yi Chong, Tan Anna C.S., Cheng Ching-Yu, Wong Tien Yin, Apte Rajendra S., Cheung Chui Ming Gemmy	4. 巻 2
2. 論文標題 Serum Cholesterol Efflux Capacity in Age-Related Macular Degeneration and Polypoidal Choroidal Vasculopathy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ophthalmology Science	6. 最初と最後の頁 100142 ~ 100142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xops.2022.100142	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inoda Satoru, Takahashi Hidenori, Inoue Yuji, Tan Xue, Tampo Hironobu, Arai Yusuke, Yanagi Yasuo, Kawashima Hidetoshi	4. 巻 260
2. 論文標題 Cytokine profiles of macular neovascularization in the elderly based on a classification from a pachychoroid/drusen perspective	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 747 ~ 758
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00417-021-05445-0	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Honda Shigeru, Yanagi Yasuo, Koizumi Hideki, Chen Yirong, Tanaka Satoru, Arimoto Manami, Imai Kota	4. 巻 11
2. 論文標題 Impact of neovascular age-related macular degeneration: burden of patients receiving therapies in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-92567-4	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagura Koichi, Inoue Tatsuya, Zhou Han Peng, Obata Ryo, Asaoka Ryo, Arasaki Rei, Sato Akinori, Nakamura Kentaro, Takeuchi Masaru, Tanaka Shin, Yanagi Yasuo, Maruyama-Inoue Maiko, Kadonosono Kazuaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Association Between Retinal Artery Angle and Visual Function in Eyes With Idiopathic Epiretinal Membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Vision Science & Technology	6. 最初と最後の頁 35 ~ 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/tvst.10.9.35	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishikawa Noriko, Kawaguchi Yuriya, Konno Ami, Kitani Yuya, Takei Hidehiro, Yanagi Yasuo	4. 巻 22
2. 論文標題 Primary isolated amyloidosis in the extraocular muscle as a rare cause of ophthalmoplegia: A case report and literature review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Ophthalmology Case Reports	6. 最初と最後の頁 101052 ~ 101052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoc.2021.101052	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murase Ayaka, Asaoka Ryo, Inoue Tatsuya, Nagura Koichi, Arasaki Rei, Nakamura Kentaro, Okawa Kazuyoshi, Tanaka Shin, Yanagi Yasuo, Maruyama-Inoue Maiko, Kadonosono Kazuaki	4. 巻 62
2. 論文標題 Relationship Between Optical Coherence Tomography Parameter and Visual Function in Eyes With Epiretinal Membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 6 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.62.6.6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Teo Kelvin Yi Chong, Cheong Kai Xiong, Ong Ricardo, Hamzah Haslina, Yanagi Yasuo, Wong Tien Yin, Chakravarthy Usha, Cheung Chui Ming Gemmy	4. 巻 11
2. 論文標題 Macular neovascularization in eyes with pachydrusen	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 39 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-87083-4	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishikawa Noriko, Chua Jacqueline, Kawaguchi Yuriya, Ro-Mase Tomoko, Schmetterer Leopold, Yanagi Yasuo, Yoshida Akitoshi	4. 巻 62
2. 論文標題 Macular Microvasculature and Associated Retinal Layer Thickness in Pediatric Amblyopia: Magnification-Corrected Analyses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 39 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.62.3.39	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okawa Kazuyoshi, Inoue Tatsuya, Asaoka Ryo, Azuma Keiko, Obata Ryo, Arasaki Rei, Ikeda Shouko, Ito Arisa, Maruyama-Inoue Maiko, Yanagi Yasuo, Kadonosono Kazuaki	4. 巻 16
2. 論文標題 Correlation between choroidal structure and smoking in eyes with central serous chorioretinopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0249073 ~ 0249073
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0249073	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishikawa Noriko, Kawaguchi Yuriya, Konno Ami, Kitani Yuya, Takei Hidehiro, Yanagi Yasuo	4. 巻 22
2. 論文標題 Primary isolated amyloidosis in the extraocular muscle as a rare cause of ophthalmoplegia: A case report and literature review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Ophthalmology Case Reports	6. 最初と最後の頁 101052 ~ 101052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoc.2021.101052	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Omoto Takashi, Asahina Yuichi, Zhou Han Peng, Fujino Ryosuke, Takao Muneyuki, Obata Ryo, Inoue Tatsuya, Asaoka Ryo, Maruyama-Inoue Maiko, Yanagi Yasuo, Kadonosono Kazuaki	4. 巻 16
2. 論文標題 Visual outcomes and prognostic factors of vitrectomy for lamellar macular holes and epiretinal membrane foveoschisis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 247509 ~ 247509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0247509	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Castro-Navarro Veronica, Behar-Cohen Francine, Chang Woohyok, Joussem Antonia M., Lai Timothy Y. Y., Navarro Rafael, Pearce Ian, Yanagi Yasuo, Okada Annabelle A.	4. 巻 259
2. 論文標題 Pachychoroid: current concepts on clinical features and pathogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 1385 ~ 1400
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00417-020-04940-0	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	藤生 克仁 (Fujiu Katsuhito) (30422306)	東京大学・医学部附属病院・特任准教授 (12601)	

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
---------	---------