

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21791681

研究課題名（和文）実験的自己免疫性ぶどう膜炎における miRNA の発現解析

研究課題名（英文） Expression analysis of microRNA during development of murine experimental autoimmune uveoretinitis

研究代表者

橋田 徳康 (HASHIDA NORIYASU)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30456959

研究成果の概要（和文）：

ヒトぶどう膜炎のマウスモデルである実験的自己免疫性ぶどう膜炎（EAU）マウスにおける microRNA（miRNA）の発現を経時的に解析し、病態発現および消炎に関与する miRNA の同定を試みた。その結果、ペプチド免疫直後より多くの miRNA の変動を認め、炎症ピーク時に NF- κ B を制御する miR-322*や mir-465b-5p の発現低下と I- κ B を制御する mir-466b-3-3p の発現上昇がみられることを明らかにした。miRNA が NF- κ B を転写レベルで制御し様々な炎症関連遺伝子の発現変化を制御することにより、EAU の病態発現に関わっている可能性が示唆された。従って、miRNA の発現変化を捉えることは EAU の病態解明につながる可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We investigated sequential expression changes in microRNA (miRNA) during the natural course of murine experimental autoimmune uveoretinitis (EAU). Dynamic expression changes of miRNA during EAU were observed from the start of immunization. The expression of most miRNAs changed dramatically from the start of immunization. To search for miRNA that might regulate the inflammatory genes, we examined the potential target genes that might control ocular inflammation in EAU. As a result, up-regulated miR-381 and miR-466b-3-3p expressions, a candidate regulator of the *NF-kappaB inhibitor (NFKBIA)*, down-regulation of miR-322* and miR-465b-5p expression, a regulator of *NF-kappaB (NFKBA)*, occurred on days 5, 15 and 20. And also, down-regulation of let-7b* and miR-495, a regulator of *IL-10* occurred on days 20 and 30. Dynamic expression changes in miRNAs may be involved in EAU pathogenesis. Our results suggested that changes in the expression levels of specific miRNAs and their candidate target genes are involved in development and remission of EAU.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼免疫学・リボソーム・ドラッグデリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

虹彩・毛様体・脈絡膜を炎症の主座とするぶどう膜炎の原因としては、感染に伴う場合のように原因の特定が可能な症例も存在するが、多くの症例では全身の自己免疫異常が関与しており原因同定が困難である。ぶどう膜炎の程度としては、軽症型から重症型まであり、特に重症型では治療に抵抗し視力を脅かすことが多い。従って、ぶどう膜炎の発症メカニズムを解明し新たな診断方法や治療法とその予防法を本研究を通じて解明していくことは、今日の眼科学の直面する重要な課題であり、望まれていた。

2. 研究の目的

ぶどう膜炎の研究に関して、これまでの研究で免疫異常に伴う複数のサイトカインやケモカインなどの炎症関連遺伝子の関与が明らかにされている。近年、19~25個のヌクレオチドからなるノンコーディングRNAであるmicroRNA (miRNA)は標的mRNAの特異的分解や転写阻害による転写後発現調節を行い、発生・分化・自己免疫異常などにおいて重要な役割を果たすことが報告されているが、ヒトのぶどう膜炎のモデルである実験的自己免疫性ぶどう膜炎 (EAU) の発症に関与するmiRNAの検索を目的として経時的発現解析を行った。

3. 研究の方法

既報に従い、ヒト IRBP (Interphotoreceptor retinoid-binding protein) 由来ペプチドを用いて C57BL/6 マウスを免疫し EAU を発症させた。ペプチド免疫後 5, 10, 15, 20, 25, 30 日後に眼球採取し miRNA を抽出した (N=3)。cDNA 合成を行い、TaqMan Array MicroRNA Card

(Life technologies 社) を使用して 586 種類の miRNA の発現強度を包括的に real time PCR 法を用いて解析しペプチド非免疫群と比較検討した。内在性コントロール RNA に関して、最適なコントロール遺伝子の検討を行った。有意に発現変化する miRNA を日にちごとに抽出し、発現プロファイルを RQ manager 解析ソフト (Life Technologies 社) を用いて解析し、クラスター解析を行うことにより EAU に関与する可能性のある miRNA の同定を行った。

4. 研究成果

(1) 内在性コントロールの検索

通常の遺伝子の発現解析では、18S rRNA や GAPDH などの遺伝子を内在性コントロールにすることが多いが、対象が miRNA の場合、これらに代わる内在性コントロールを検索する必要がある。我々は、U6, snoRNA135, snoRNA202 などを解析し、その結果、サンプル間、個体間でばらつきの少ない snoRNA202 を内在性コントロールとして用いることとした (図 1)。

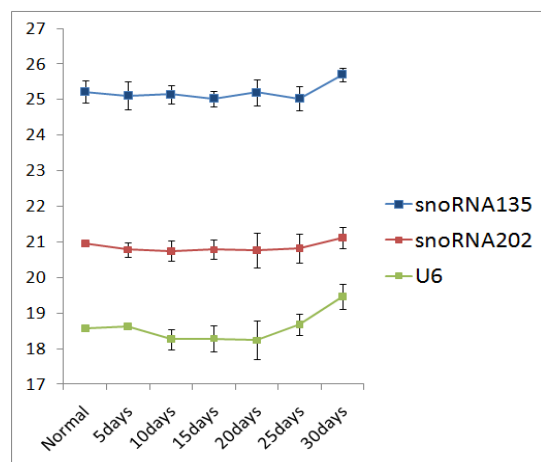


図 1. 内在性コントロールの解析

(2) 発現上昇・低下した miRNA

発現変化を認めた miRNA は、解析した 589 遺

伝子中 295 遺伝子であった。ペプチド免疫直後から、miRNA の発現上昇および発現低下を認めた。コントロールと比較して 2 倍以上有意に発現上昇および発現低下した miRNA の数を下記に示した。発現上昇した miRNA は 20 日目がピークに、発現低下した miRNA は 5 日目に一番高いピークがみられた。

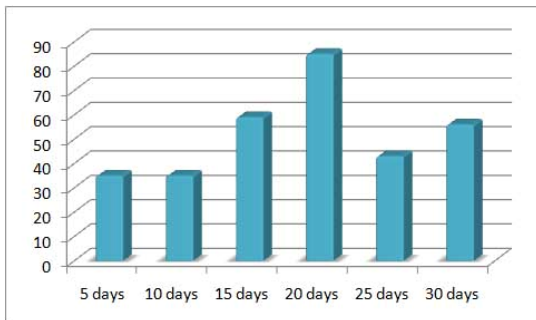


図 2a. 2 倍以上有意に発現上昇した遺伝子数

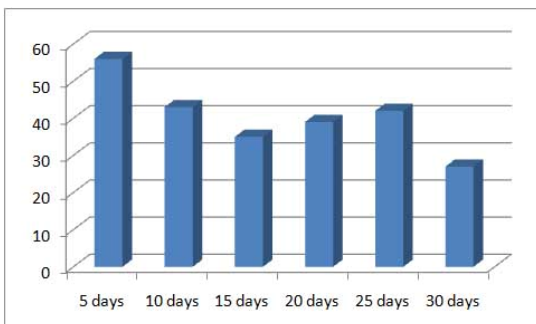


図 2b. 2 倍以上有意に発現低下した遺伝子数
(3) クラスター解析

解析の結果、得られた発現プロファイルを遺伝子ごとにクラスター解析を行った。その結果、遺伝子ごとのクラスターでは 6 つのクラスターに分類されることが明らかになった。

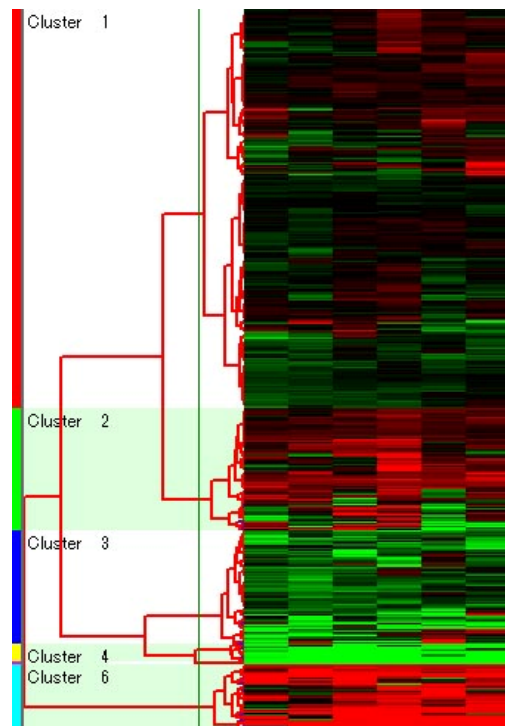


図 3a. 遺伝子ごとのクラスター解析

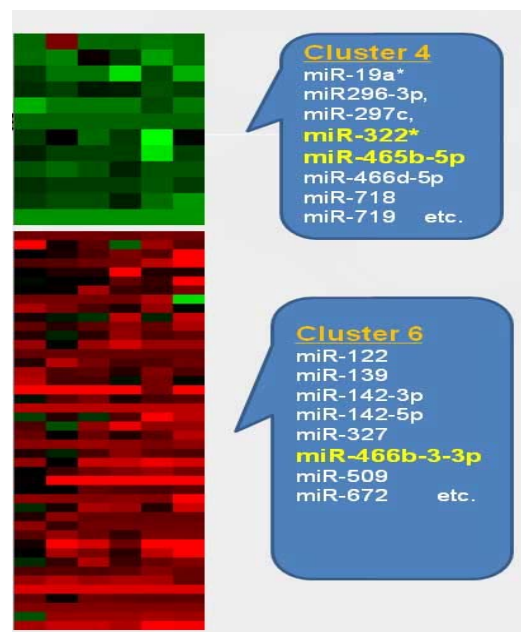


図 3b. クラスター 4 とクラスター 6 に属する遺伝子の内訳

我々は観察期間を通じて有意に発現低下を観察するクラスター 4 と、強い発現上昇を認めるクラスター 6 に注目した。その結果、クラスター 4 に属する miRNA として、miR-322* や miR-465b-5p などが、クラスター 6 に属する miRNA として miR-466b-3-3p を同定するこ

とができた。

(4) 発現上昇した遺伝子群

miRNA の発現上昇を認めた上位 20 遺伝子を日にちごとにリストアップした。クラスター解析により明らかになったクラスター 6 に属する mir-466b-3-3p の発現上昇が EAU における炎症のピーク時である day15, day20 で認められた。ターゲット解析の結果、mir-466b-3-3p は NF- κ B を制御する I- κ B を標的遺伝子の一つとして持つことが明らかになった。同じく、day5 で I- κ B を標的遺伝子の一つとしてもつ、mir-381 の発現上昇も認められた。

Upregulated miRNAs						
5 days	10 days	15 days	20 days	25 days	30 days	
1	miR-294*	miR-654-3p	miR-466b-3-3p	miR-715	miR-483*	miR-715
2	miR-139-3p	miR-715	miR-654-3p	miR-450a-3p	miR-878	miR-804
3	miR-380-3p	miR19a*	miR-598-5p	miR-675-3p	miR-147	miR-680
4	miR-199a-5p	miR-598-5p	miR-715	miR-142-5p	miR-466c-5p	miR-871
5	miR-598-5p	miR-879*	miR-511	miR-654-3p	miR-1*	miR-10a*
6	miR-345-3p	miR-327	miR-343	miR-142-3p	miR-291b-5p	miR-105
7	miR-879*	miR-801	miR-347	miR-155	miR-511	miR-488*
8	miR-511	miR-702	miR-801	miR-801	miR-20b	miR-879*
9	miR-691	miR-450a	miR-142-5p	miR-598-5p	miR-465b-5p	miR-130*
10	miR-675-3p	miR-681	miR-196b	miR-511	miR-598-5p	miR-30c-1*
11	miR-294	miR-343	miR-879*	miR-202-3p	miR-879*	miR-675-3p
12	miR-698	miR-199a-5p	miR-450a	miR-892	miR-680	miR-542-5p
13	miR-551b	miR-450b-5p	miR-139-3p	miR-680	miR-24-1*	miR-696
14	miR-122	miR-30c-2*	miR-547	miR-20b	miR-21	miR-801
15	miR-381	miR-696	miR-743a	miR-466b-3-3p	miR-509-3p	miR-466b
16	miR-302a	let-7*	miR-199a-5p	miR-467c	miR-547	miR-451
17	miR-467c	miR-878-3p	miR-466c-5p	miR-21	miR-142-3p	miR-327
18	miR-207	miR-605	miR-687	miR-346	miR-708*	miR-127*
19	miR-485	miR-142-5p	miR-878-3p	miR-450a	miR-148*	miR-547
20	miR-129-3p	miR-451	miR-298-1*	miR-466c-5p	miR-142-5p	miR-207

図 4a. 発現上昇した遺伝子群

(5) 発現低下した遺伝子群

miRNA の発現低下を認めた上位 20 遺伝子を日にちごとにリストアップしました。クラスター 4 に属する、miR-322* や mir-465b-5p の発現低下が day5, days15, および days20 で認められました。ターゲット解析の結果、これらの miRNA は転写因子である NF- κ B を制御していることが明らかになった。また、興味深いことに、消炎に向かう day30 において、IL-10 を標的部位にもつ miR-495 や miR-154 が、発現低下の上位にきていることが明らかとなった。

Top 20 downregulated miRNAs						
5days	10 days	15 days	20 days	25 days	30 days	
1	miR-465b-5p	miR-296-3p	miR-466d-5p	miR-297c	miR-466d-5p	miR-18a*
2	miR-20a*	miR-297c	miR-718	miR-190c	miR-297c	miR-718
3	miR-297b-5p	miR-802	miR-719	miR-465b-5p	miR-805-5p	miR-24-1*
4	miR-296-3p	miR-217	miR-296-3p	miR-190b	miR-496	miR-297b-5p
5	miR-138*	miR-24-1*	miR-19a*	miR-296-3p	miR-19a*	miR-865
6	miR-330*	miR-487e	miR-196c	miR-208	miR-668	miR-495
7	miR-135a*	miR-496	miR-879	miR-466d-5p	miR-871	miR-346
8	miR-540-3p	miR-698	miR-302a	miR-344-3p	miR-343	miR-99b*
9	miR-302a*	miR-325	miR-322*	miR-802	miR-670	miR-345-3p
10	miR-871	miR-322*	miR-449c	miR-666-5p	miR-682	miR-673-3p
11	miR-670	miR-704-5p	miR-496	miR-483*	miR-294*	miR-347
12	miR-483*	miR-297b-5p	miR-465b-5p	miR-322*	miR-125b-3p	miR-470*
13	miR-698	miR-409-5p	miR-297c	let-7b*	miR-347	miR-339-3p
14	miR-190c	miR-411	miR-125b*	miR-325*	miR-465a-3p	miR-217
15	miR-431	miR-10a*	miR-698	miR-465a-3p	miR-296-3p	miR-431
16	miR-718	miR-409-5p	miR-721	miR-297b-5p	miR-106b*	miR-154
17	miR-28*	miR-542-5p	miR-200c*	let-7d*	miR-330*	miR-409-5p
18	mmu-miR-743b	miR-294	miR-668a	miR-339-3p	miR-139-3p	miR-467e
19	mmu-miR-297c	miR-467d	miR-483*	miR-217	miR-346	miR-200a*
20	mmu-miR-744*	miR-582-3p	miR-294*	miR-467d	miR-449c	miR-873

図 4b. 発現低下した遺伝子群

(6) 標的遺伝子の in silico 同定

発現低下する miR-322*、miR-465b-5p や発現上昇する mir-466b-3-3p が実際標的遺伝子の標的部位とどのように結合するのか RNA hybrid ソフトウェアを用いて、その結合を推測しました。その結果、低い結合エネルギーで結合し、その標的部位も種間で保存されているなど、miRNA と標的遺伝子がかなりの確率で結合し発現制御されている可能性が考えられた。

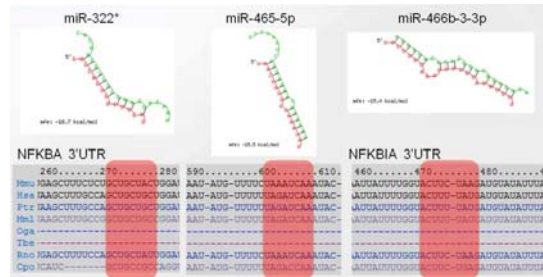


図 5. In silico identification by RNAhybrid

結果をまとめると、

- ① ペプチド免疫直後から EAU 発症の前後におけるダイナミックな miRNA の発現変化を検出することができた。
- ② 発現変化を認めた miRNA は、解析した 589 遺伝子中 295 遺伝子であった。
- ③ 炎症ピーク時の 15days と 20days に、NFKBIA (*I- κ B*) を制御する miR-466b-3-3p の強い発現上昇と NFKB (*NF- κ B*) を制御する miR-465b-5p, miR-322* の発現低下を認めた。

④ 消炎に向かう 30days に *IL-10* を制御する miR-495, miR-154, の発現低下を認めた。結果を考察すると、炎症ピーク時の miR-465b-5p (NFkB) の発現低下および、miR-322*, miR-466b-3-3p (NFkBIA) の発現上昇は最終的に NF-kB の活性化により EAU の病態形成に関わる可能性と、miR-495, miR-154, (*IL-10*) の発現低下は最終的に *IL-10* の活性化により消炎に向かわせ方向に関わる可能性が考えられた。以上の結果から、炎症関連遺伝子の発現調節はいくつかの miRNA の発現変化により引き起こされる可能性があり、miRNA の発現変化を捉えることは EAU の病態解明につながる可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Hashida N, Ohguro N, Maruyama H. Fuchs' heterochromic iridocyclitis associated with ocular toxocariasis. Jpn J Ophthalmol. 2011;55:76-78. 査読有
- ② Hashida N, Terubayashi A, Ohguro N. Anterior segment optical coherence tomography findings of presumed intraocular tuberculosis. Cutan Ocul Toxicol. 2011;30:75-77. 査読有
- ③ Sato T, Kusaka S, Hashida N, Saishin Y, Fujikado T, Tano Y. Comprehensive gene-expression profile in murine oxygen-induced retinopathy. Br J Ophthalmol 2009; 93: 96-103. 査読有
- ④ Hashida N, Ito S, Hasegawa T, Kajita T, Morifuji H, Yamazaki Y, Sakagami K, Yokotani S, Tanaka T, Endoh B, Egawa N, Inoue H, Tomimoto H, Takahashi R. Case of optic neuritis associated with cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and

leukoencephalopathy (CARASIL) Nippon Ganka Gakkai Zasshi 2009;113:505-512. 査読有

- ⑤ Hashida N, Ohguro N, Morimoto Y, Oiki E, Morisaki H, Morisaki T, Tano Y. Ultrastructure appearance of iris flocculi in association with the thoracic aortic aneurysm and dissections. Br J Ophthalmol 2009;93; 1409-1410. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① Hashida N, Ohguro N, Houki S, Nishida K. ARVO 2011 Annual meeting 平成 22 年度 5 月 3 日、Expression analysis of cytokine and chemokine genes during the natural course of murine experimental autoimmune uveoretinitis. Fort Lauderdale, USA.
- ② 橋田 徳康; 日本眼炎症学会学術奨励賞受賞講演 (炎症部位集積性リポソームを用いたドラッグデリバリーシステムの開発)、第 43 回日本眼炎症学会、平成 21 年度 7 月 11 日、大阪市
- ③ Yamazaki Y, Hashida N, Saishin Y, Ohguro N, Tano Y. Efficacy and Complication of Intravitreal Rituximab Injection for treating Primary Intraocular Lymphoma. The 10th International Ocular Inflammation Society Congress 平成 21 年度 6 月 1 日、Prague, Czech republic

[図書] (計 1 件)

橋田徳康: 眼科プラクティス 28. 眼感染症の謎を解く II. 眼感染症事典 6. 網脈絡膜炎 3) CMV; p194-195. 発刊 2009 年 7 月 27 日 文光堂

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋田 徳康 (HASHIDA NORIYASU)
大阪大学・医学部附属病院・医員
研究者番号: 30456959

(2) 研究分担者

()
なし

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

なし

研究者番号：

