

眼疾患の新規治療薬開発に向けた基盤研究：
緑内障モデルの病態研究と
角膜上皮の恒常性に関わる microRNA の同定

東京農工大学 大学院工学府
生命工学専攻

中川 あゆみ

目次

1. 緒論.....	4
1.1 眼組織.....	4
1.2 眼疾患.....	5
1.3 眼科市場.....	6
1.4 医薬品開発の課題.....	6
1.5 緑内障.....	7
1.5.1 網膜と視神経.....	7
1.5.2 緑内障の疫学及び本態.....	8
1.5.3 緑内障の治療法.....	10
1.5.4 神経保護治療.....	13
1.6 角膜上皮障害.....	15
1.6.1 角膜.....	15
1.6.2 涙液.....	15
1.6.3 角膜上皮障害.....	16
1.6.4 角膜上皮障害の治療法.....	17
1.6.5 microRNA.....	18
1.6.6 miRNA の角膜上皮障害への関与.....	20
1.7 本研究の目的.....	21
2. 結膜線維芽細胞の前房内注入によるラット慢性高眼圧モデルの確立及び病態解析.....	22
2.1 緒言.....	22
2.2 材料と方法.....	24
2.2.1 動物.....	24
2.2.2 結膜線維芽細胞の準備.....	24
2.2.3 結膜線維芽細胞の前房内注入.....	24
2.2.4 眼圧測定.....	25
2.2.5 スリットランプによる前眼部観察.....	25
2.2.6 眼球採取.....	25

2.2.7 RGC 細胞数の計測	25
2.2.8 組織学的評価	26
2.2.9 免疫組織学的評価	26
2.2.10 TUNEL 法によるアポトーシスの検出	27
2.2.11 統計学的解析	27
2.3 結果及び考察	28
2.3.1 細胞注入量の検討	28
2.3.2 眼圧測定	29
2.3.3 RGC 数の計測	30
2.3.4 RGC 細胞数と眼圧値の相関分析	32
2.3.5 眼球の組織学的評価	33
2.3.6 網膜での GFAP の免疫染色	37
2.3.7 網膜での TUNEL 染色	38
2.4 総括	40
3. 涙液に特徴的な microRNA の同定とその角膜上皮細胞に対する作用の解明	43
3.1 緒言	43
3.2 材料と方法	44
3.2.1 涙液及び血清サンプル	44
3.2.2 涙液及び血清の miRNA マイクロアレイ	44
3.2.3 miRNA のリアルタイム定量 PCR	44
3.2.4 miRNA mimic、inhibitor 及び siRNA	45
3.2.5 細胞及びトランスフェクション	45
3.2.6 Water-soluble tetrazolium salt (WST) アッセイ	46
3.2.7 HCE-T 細胞の DNA マイクロアレイ及びリアルタイム定量 PCR	46
3.2.8 miRNA のターゲット予測	46
3.2.9 デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイ	47
3.2.10 統計学的解析	47
3.3 結果及び考察	48
3.3.1 マイクロアレイ法による涙液及び血清中の miRNA の発現解析	48

3.3.2 リアルタイム定量 PCR 法による涙液及び血清中の miRNA 発現量の検証	50
3.3.3 ヒト角膜上細胞に対する miRNA の作用の検証.....	51
3.3.4 miR-203 の強制発現又は発現阻害による HCE-T 細胞における遺伝子発現変化の解析	52
3.3.5 miR-203 のターゲット mRNA の同定.....	53
3.4 総括.....	58
4. 結論.....	60
5. 参考文献.....	61
6. 研究業績.....	71
6.1 原著論文.....	71
6.2 レター論文.....	71
6.3 国際学会発表	72
6.4 特許.....	72
謝辞.....	73

1. 結論

1.1 眼組織

眼球は角膜、房水、虹彩、毛様体、水晶体及び結膜からなる前眼部と、硝子体、網膜及び脈絡膜からなる後眼部、及び角膜より後極側の最外壁を覆う強膜から構成される（Figure 1A）¹⁾。網膜の神経節細胞から出た神経線維は視神経乳頭で集まって視神経となり、視交叉を経て外側膝状体に至り、大脳後頭葉の皮質中枢（視覚野）に達する（Figure 1B）。その他、眼球付属器として眼瞼、涙器、外眼筋、眉毛、眼窩等がある。

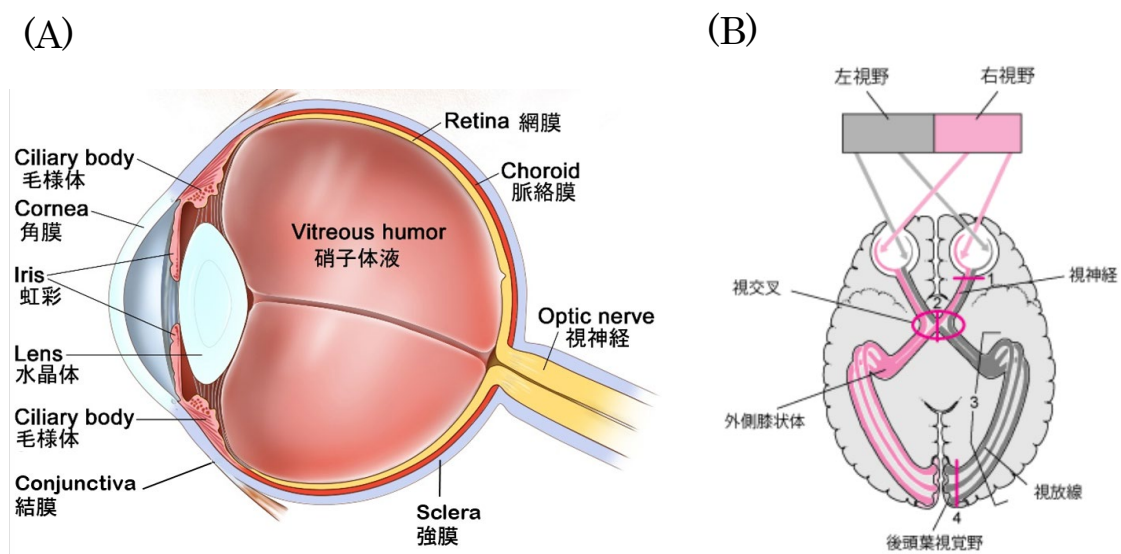


Figure 1 ヒトの眼球断面模式図及び視路

(A) 眼球を構成する主な組織を示した。眼球は前眼部（角膜、房水、虹彩、毛様体、水晶体及び結膜）と後眼部（硝子体、網膜、脈絡膜）、及び強膜で構成される。(B) 眼球から脳に至る視覚伝達経路（視路）を示した（MSD マニュアル プロフェッショナル版 17. 眼疾患／視神経疾患より引用掲載）。網膜で得られた刺激は、視神経を通過して脳に達し、視覚となる。

1.2 眼疾患

代表的な前眼部疾患として、角膜炎、角膜欠損、角膜潰瘍、角膜血管新生、結膜炎、白内障などが挙げられる。また、後眼部疾患にはぶどう膜炎（虹彩、毛様体及び脈絡膜に生じる炎症性疾患の総称）、緑内障、糖尿病網膜症、加齢黄斑変性、網膜色素変性症などがある。

Figure 2 に世界と日本の中途失明原因を示した。世界の中途失明原因の 51%を白内障が占める²⁾。白内障に対する薬剤治療法は確立されておらず、水晶体を除去して眼内レンズを挿入する白内障手術が一般的に行われる。欧米や日本では白内障手術が広く普及したため白内障による失明は激減したものの、特に発展途上国など眼科医療が未発達の国や地域では未だ白内障による失明が後を絶たない。一方で、日本では中途失明原因の第一位は緑内障であり、全体の 25.5%を占める³⁾。緑内障による視覚障害は 1988 年から 15 年間の間に 1.47 倍に増加したとの調査報告があり、今後も増加することが予想される⁴⁾。

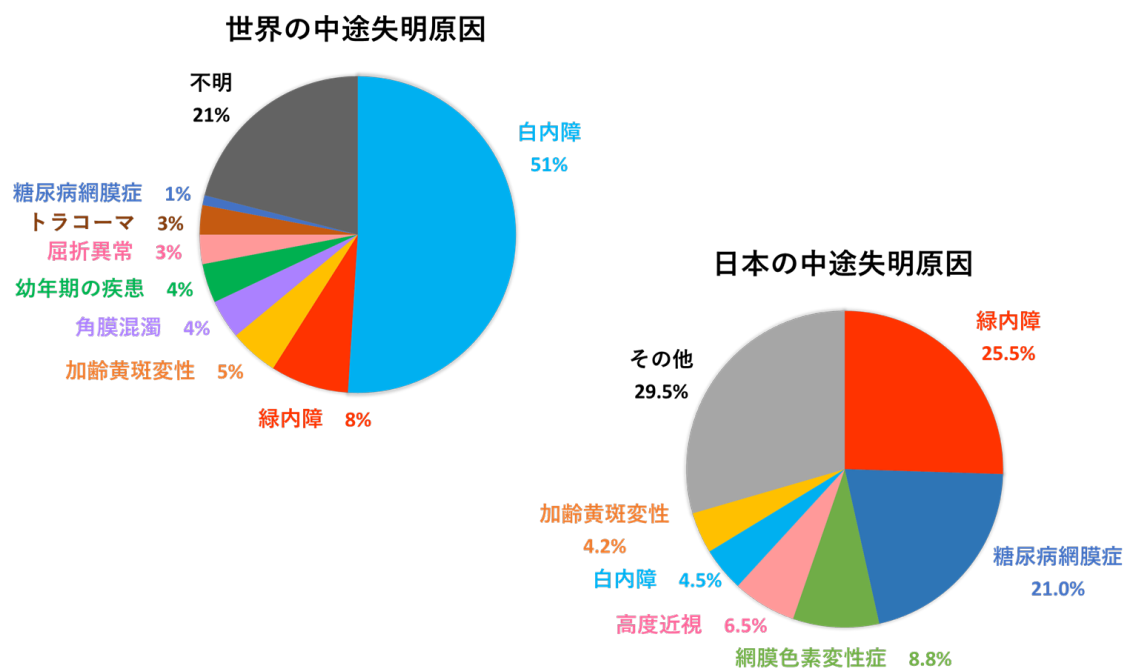


Figure 2 世界及び日本の中途失明原因

世界の中途失明原因の第一位は白内障で、全体の 51%を占める。一方、日本の失明原因としては緑内障が最も多く、全体の 25.5%となる。引用文献 2)及び 3)より作図した。

1.3 眼科市場

世界の医療用眼科薬の市場は、2016年では約270億ドルであり、2020年には313億ドルに達した^{5),6)}。そのうちの約10%を日本が占め、2020年の日本の眼科薬市場は日本円にして3,100億円にのぼった。疾患別に見ると、緑内障、網膜疾患及びドライアイの治療剤が世界の眼科薬市場の約70%を占め、2016年ではそれぞれ23%、33%及び15%であった。高齢化に伴い、特に緑内障や網膜疾患患者は増加しており、今後も眼科市場は拡大すると考えられる反面、疾患領域によっては治療満足度が不十分である。また、国によって治療方針の違いや医療費の違いがあったり、新興国での治療水準が高まったりするなど、世界の治療ニーズは多様化している。眼科医療には、こうした眼疾患治療の未充足ニーズ（アンメット・メディカル・ニーズ）に対応した新規治療法を開発し、患者の Quality of life (QOL) と Quality of vision (QOV) の向上に貢献することが求められている。

1.4 医薬品開発の課題

医薬品の研究開発には10年以上の長い期間を必要とするうえ、莫大な費用がかかる。日本の製薬企業大手10社では年間平均研究開発費が1,517億円で、対売上高比率は18.5%にもものぼる（全産業平均は3.39%）⁷⁾。それにもかかわらず、新薬発売の成功確率は2.2万分の1と極めて低い。患者に必要とされ、有効性と安全性に優れた薬を低コストで効率的に開発することは、創薬を通じ世界の医療に貢献するために重要となる。

医薬品の研究開発の初期に当たる探索研究においても、短期間で開発成功率の高い治療ターゲットの創出が求められる。しかし、細胞を使った *in vitro* 実験や動物モデルを使った *in vivo* 実験で、ヒトでの薬の反応を予測するには限界がある。そのため、ヒト外挿性が高い、つまり臨床病態を十分に模擬した評価系は、医薬品の開発成功率を高めるうえで欠かすことができない。また、慢性疾患の場合は、短期間で病態を表現する評価系であることも、医薬品開発の迅速化に重要である。

また、優れた新薬の創出には、これまで創薬の中心となってきた低分子医薬品だけでなく、抗体医薬品、核酸医薬品、遺伝子治療、細胞治療などの新たな創薬モダリティに取り組むことも重要である。近年、世界の製薬企業による、遺伝子治療薬開発の創薬基盤技術を持つスタートアップ企業の買収が目立ち、日本でも同様の買収の動きが見える。新しいモダリティへの挑戦は、従来の医薬品では解決できなかったアンメット・メディカル・ニーズに対して革新的な新薬を提供することに繋がり、医療の質の向上に貢献できる。

1.5 緑内障

1.5.1 網膜と視神経

網膜は眼球の内側にある組織で、光刺激を受容して脳に伝達する重要な役割を担う。眼球内側から内境界膜、神経線維層、神経節細胞層、内網状層、内顆粒層、外網状層、外顆粒層、外境界膜、杆体錐体層及び網膜色素上皮層の10層からなる (Figure 3) ^{1),8)}。神経線維層は網膜神経節細胞 (Retinal ganglion cell ; RGC) から出た軸索により構成され、この軸索が視神経乳頭に集合して眼球後方で眼球壁を貫通し、脳へ向かう。視神経乳頭は篩状板と呼ばれる弾性繊維やコラーゲンで形成される多孔性の組織を有し、神経線維はこの篩状板孔を通過する。

光刺激は始めに視細胞 (錐体細胞及び杆体細胞) で認識され、双極細胞、水平細胞、アマクリン細胞での制御を経て、網膜神経節細胞に伝達される。その後、神経線維を通り、視神経に至る。また、網膜には内境界膜から外境界膜の全層にわたりミュラー細胞と呼ばれるグリア細胞があり、RGCの周囲には別のグリア細胞である星状膠細胞 (アストロサイト) が存在する。

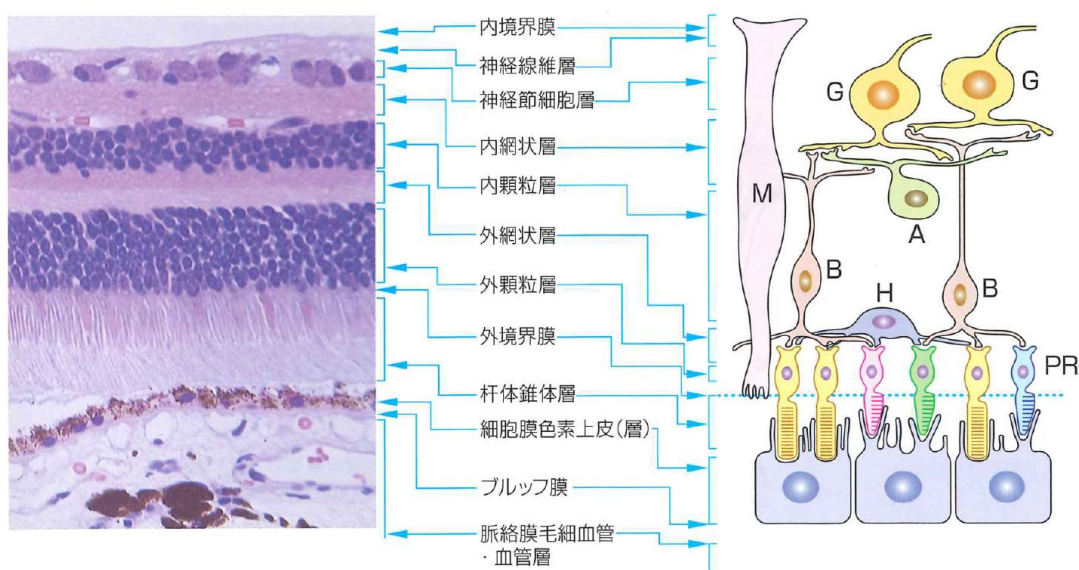


Figure 3 網膜の構造

網膜は10層で構成され、視細胞 (Photoreceptor ; PR)、水平細胞 (Horizontal cell ; H)、双極細胞 (Bipolar cell ; B)、アマクリン細胞 (Amacrine cell ; A)、神経節細胞 (Ganglion cell ; G)、ミュラー細胞 (Müller cell ; M) などを有する。

1.5.2 緑内障の疫学及び本態

緑内障は日本の中途失明原因の第一位であり³⁾、患者数は465万人と推定される⁹⁾。緑内障は、発症原因を他の疾患に求めることのできない原発性と、他の疾患や薬物使用が原因となって生じる続発性に分類される¹⁰⁾。さらに、原発性は開放隅角緑内障（Primary open-angle glaucoma ; POAG）と原発閉塞隅角緑内障（Acute primary angle closure ; APAC）に大別され、一般的な緑内障としてはPOAGを指す。緑内障の本態は進行性の網膜視神経障害及び視野欠損であり、基本的には非可逆的である（Figure 4）¹¹⁾。緑内障は患者の自覚なしに徐々に障害が進行することから、早期発見と早期治療による障害の進行抑制が視野の維持にとって重要となる。

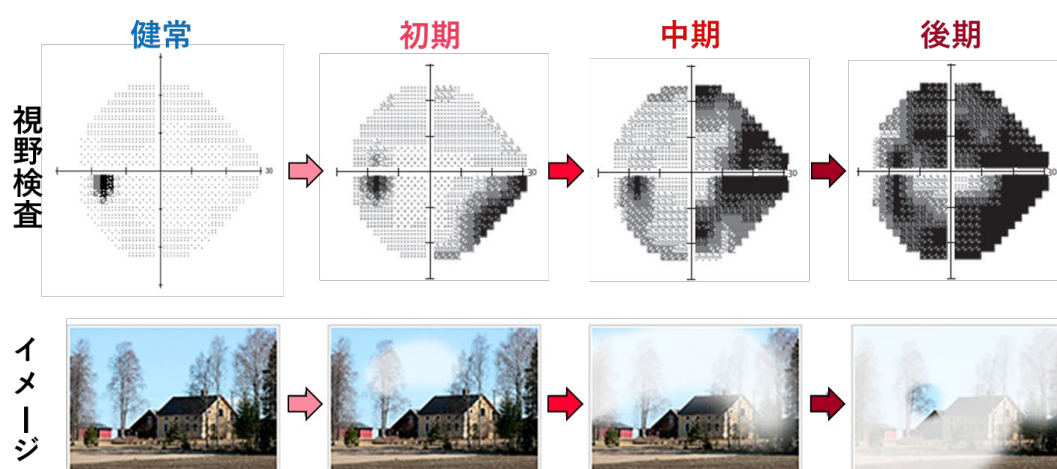


Figure 4 緑内障患者の視野欠損

緑内障患者の代表的な視野検査結果¹¹⁾と患者の視覚イメージ¹²⁾を示した。健常眼ではマリオット盲点のみに暗点が見られるが、緑内障患者眼では病態が進むにつれ特徴的な視野欠損が生じる。

緑内障の発症と進行には種々の因子が複雑に関与するとされ、代表的な危険因子の一つとして眼球の内圧、すなわち眼圧が挙げられる¹¹⁾。眼圧は、角膜と虹彩の間（前房）を満たす房水の量によって制御される。房水は毛様体で産生され、角膜と虹彩の結合部にある線維柱帯を通して、又はぶどう膜（脈絡膜、毛様体、虹彩）と強膜の間から排出される（Figure 5）。通常は房水の産生と排出が制御され眼圧は一定に保たれるが、房水循環のバランスが崩れると眼圧上昇をきたす。眼圧が上昇すると篩状板が後方に偏位・変形するため、篩状板孔を通過する視神経が機械的に圧迫されて障害を受ける。また、眼圧が正常範囲であるにも関わらず緑内障性視神経障害を呈する正常眼圧緑内障患者でも、眼圧負荷が病態進行の要因の一つであると考えられている。

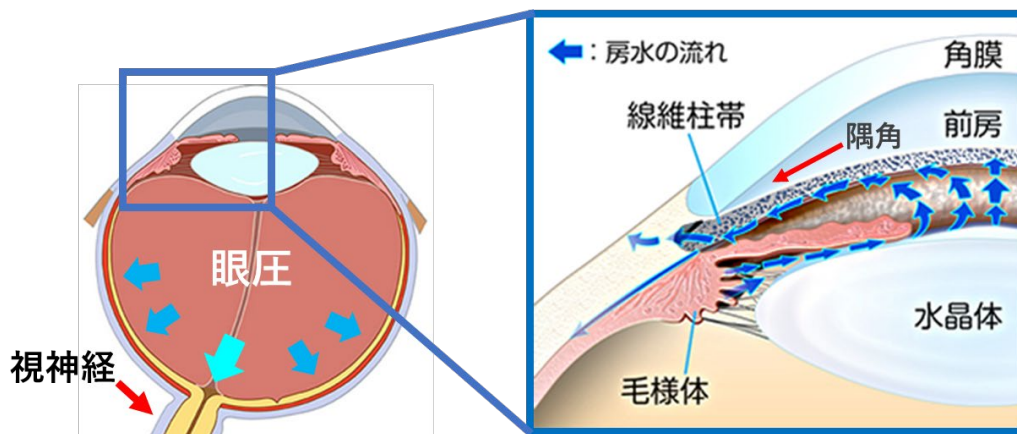


Figure 5 眼圧と房水循環

眼圧は房水量によって制御される。房水産生及び房水排出のバランスが崩れて眼圧が上昇すると、篩状板が変形して視神経を圧迫し障害をきたす。

緑内障の特徴的な形態的变化として、視神経乳頭の辺縁部の菲薄化と陥凹拡大がある (Figure 6) ¹¹⁾。網膜所見としては網膜神経繊維層 (Retinal nerve fiber layer ; RNFL) の欠損 ¹³⁾や乳頭周囲網脈絡膜萎縮が見られる (Figure 7)。これら形態学的変化は病態の進行度に関連して認められ、最終的には視神経の細胞体である網膜神経節細胞 (Retinal Ganglion Cell ; RGC) の細胞死が起こって視野欠損が生じる (Figure 8) ¹⁴⁾。

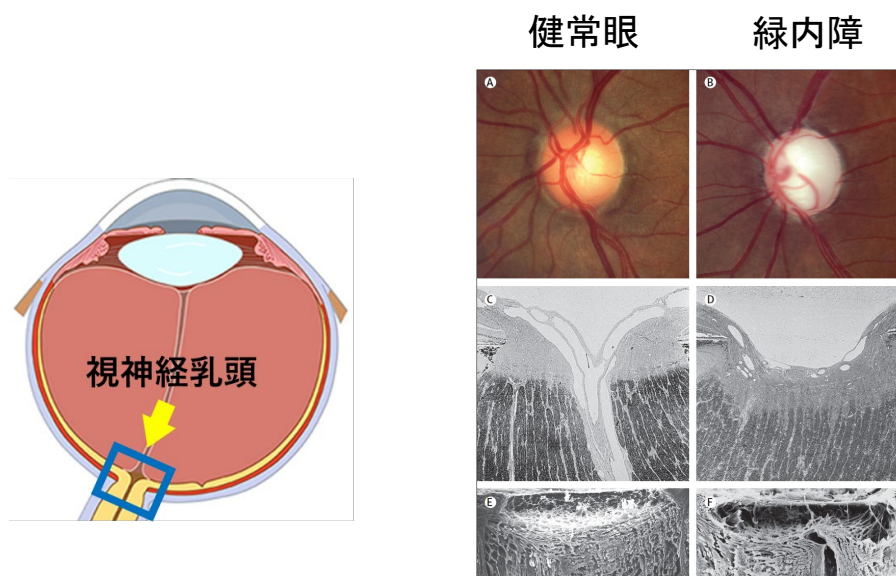


Figure 6 神経乳頭辺縁部の菲薄化と陥凹拡大

緑内障眼では視神経乳頭辺縁部が菲薄化し、眼底像 (写真上) で視神経乳頭外縁と乳頭陥凹外縁の間 (リム) が狭くなる ¹¹⁾。また、視神経乳頭の陥凹拡大が見られる (写真中及び下)。

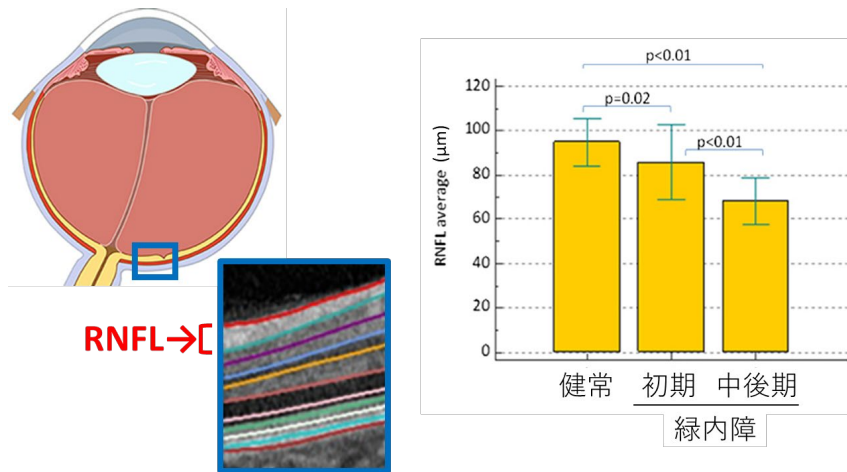


Figure 7 網膜神経繊維層の欠損

緑内障では網膜神経繊維層 (Retinal nerve fiber layer ; RNFL) の欠損が見られ、病態ステージが進むにつれ RNFL が菲薄化する¹³⁾。

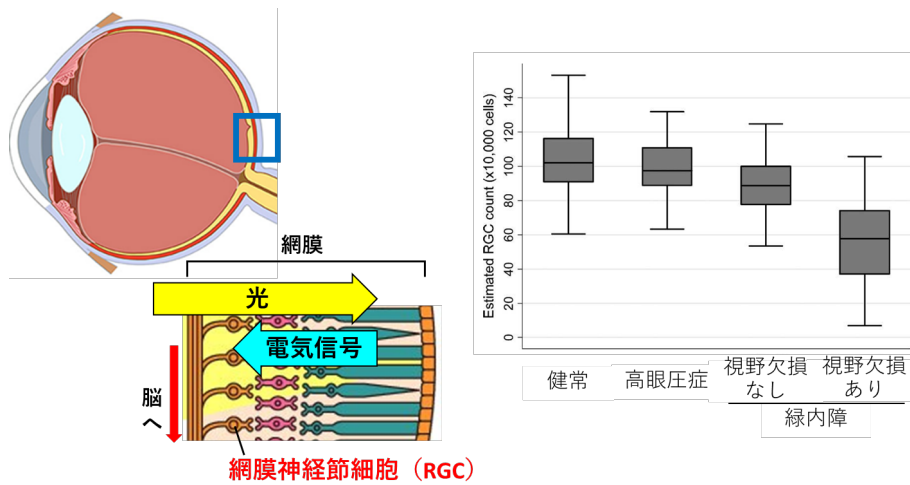


Figure 8 網膜神経節細胞の細胞数の減少

病態が進行して視野欠損が見られる緑内障眼では網膜神経節細胞 (Retinal ganglion cell ; RGC) の細胞数が減少すると考えられる¹⁴⁾。

1.5.3 緑内障の治療法

現在、緑内障の治療法として、エビデンスに基づいた唯一確実な方法は眼圧下降である¹⁰⁾。眼圧下降治療法の選択肢として、点眼薬により房水産生を抑制又は房水排出を促進する薬物治療、線維柱帯等へのレーザー照射により房水流出路を拡大するレーザー治療、観血的手

術により房水流出路を形成する手術治療がある。患者の病期や病型、重症度だけでなく、経済的負担やアドヒアランスの点も考慮して適切な治療法を選択しなければならない。

緑内障の眼圧下降治療は、基本的には点眼薬を用いる治療から開始される。眼圧下降作用を持つ点眼薬は、プロスタグランジン関連薬、 β 遮断薬、炭酸脱水酵素阻害薬、 α_2 刺激薬、Rhoキナーゼ阻害薬、 α_1 遮断薬、イオンチャネル開口薬、交感神経刺激薬、副交感神経刺激薬が上市されている (Figure 9)。例えば、 α_2 刺激薬であるブリモニジン酒石酸塩点眼液は房水産生抑制及び房水排出促進の二つの作用を持ち、点眼投与開始後 4 週でプラセボに対し有意な眼圧下降効果を示すことが確認されている (Figure 10)¹⁵⁾。点眼薬を用いた眼圧下降治療では、基本的には単剤治療を行い、効果が不十分な場合は多剤を併用する。しかし、眼圧下降薬には結膜アレルギーや結膜充血、角膜上皮障害、眼瞼色素沈着等の副作用が報告されており、多剤を併用する場合そのリスクが高まる (Table 1)¹⁰⁾。さらに、一旦障害された視機能が回復することはなく、点眼治療により十分な眼圧下降を得られた患者でも、4.4%は 7 年間の経過観察の間に視野や視神経乳頭の障害が進行したことが報告された (Figure 11)¹⁶⁾。したがって、眼圧下降に基づいた治療のみでは緑内障の進行抑制は十分とは言えない。

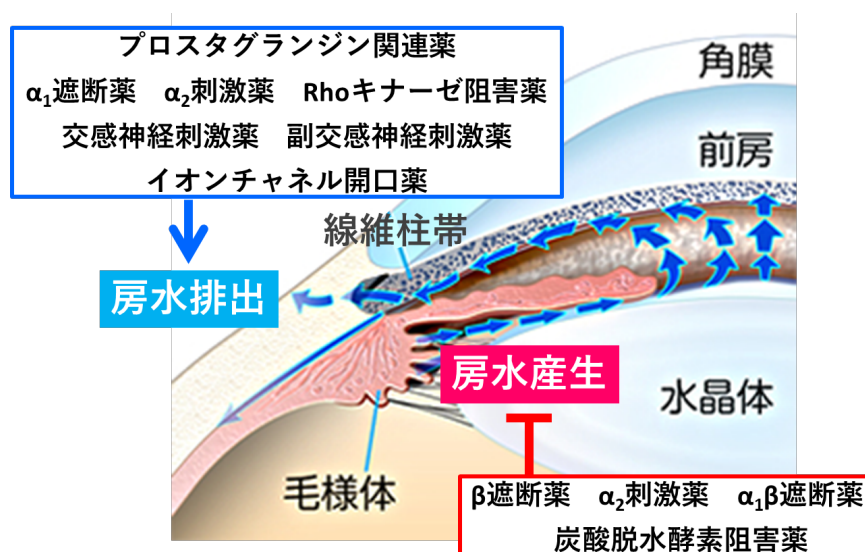


Figure 9 眼圧下降薬

現在上市されている眼圧下降薬は、房水排出促進作用又は房水産生抑制作用により眼圧下降効果を示す。そのうち α_2 刺激薬であるブリモニジン酒石酸塩点眼液は両方の作用を有する。

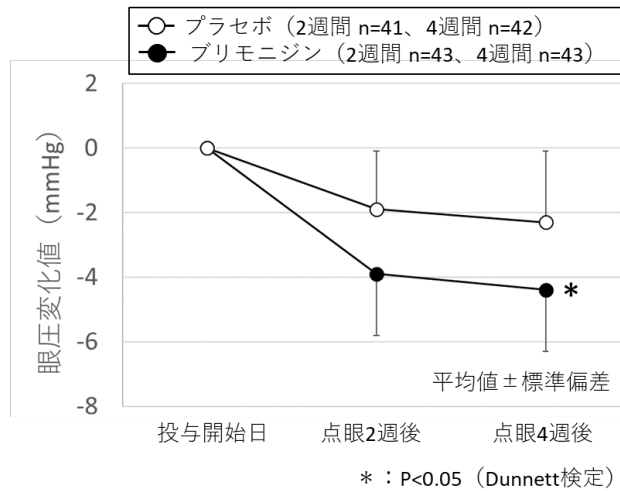
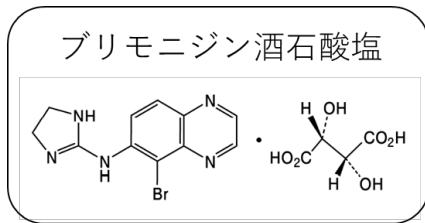


Figure 10 ブリモニジン酒石酸塩点眼液の眼圧下降作用

ブリモニジン酒石酸塩点眼液は、点眼投与開始後 4 週でプラセボに対し有意な眼圧下降効果を示す。引用文献 15)より作図した。

Table 1 眼圧下降薬の副作用

	交感神経刺激薬	β遮断薬	α ₁ β遮断薬	α ₂ 遮断薬	α ₂ 刺激薬	副交感神経刺激薬	プロスタグランジン関連薬	イオンチャネル開口薬	炭酸脱水酵素阻害薬	Rhoキナーゼ阻害薬
局所副作用										
結膜アレルギー 結膜炎	++	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
結膜充血	++	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+~++	+/-	+/-	++
角膜上皮障害	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
眼瞼炎	+	+	+	-	+	-	-	-	+	++
縮瞳	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
睫毛多毛	-	-	-	-	-	-	++	+/-	-	-
虹彩 眼瞼色素沈着	-	-	-	-	-	-	+++	+/-	-	-
上眼瞼溝深化	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
全身副作用										
徐脈	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
血圧低下	-	+	+	+/-	+	-	-	-	-	-
頻脈 血圧上昇	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
気管支収縮	-	+~++++	+++	-	-	+	-	-	-	-
血漿脂質上昇	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-

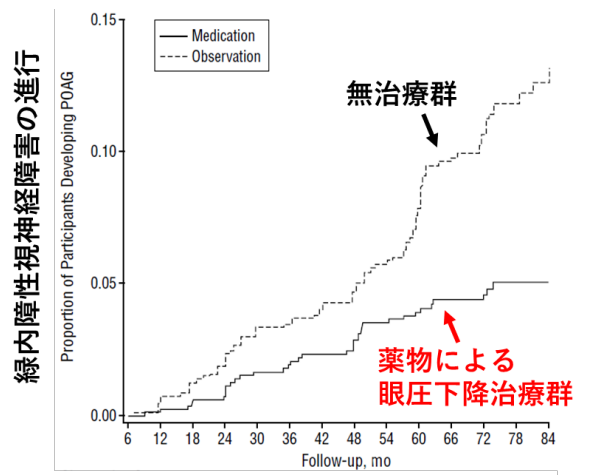


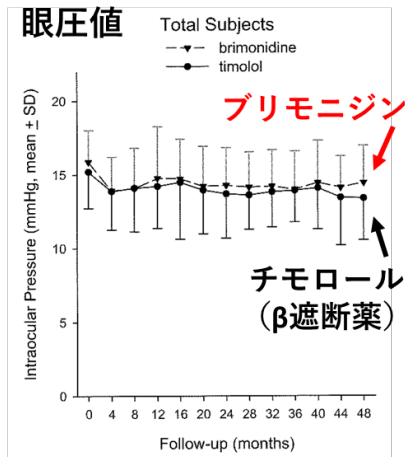
Figure 11 眼圧下降剤治療患者の緑内障性視神経障害の進行

緑内障では一旦障害された視機能が回復することはないとされており、治療により十分な眼圧下降を得られた患者でも、4.4%は7年間の経過観察の間に視野や視神経乳頭の障害が進行する¹⁶⁾。

1.5.4 神経保護治療

近年、眼圧下降治療とは異なる新たな治療法として、神経保護治療が注目されている。緑内障における RGC 細胞死はアポトーシスであると示唆されていることから^{17,18)}、アポトーシスに関わるグルタミン酸受容体、カルシウムチャネル、酸化ストレス、一酸化窒素合成酵素が治療ターゲットとされている¹⁹⁾。さらに、緑内障眼の視神経では脳からの神経栄養因子の軸索逆行輸送が阻害されることから、網膜での神経栄養因子の発現増加を狙った治療法も注目されている。

例えば、眼圧下降薬であるブリモニジン酒石酸塩は、神経栄養因子である Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) の発現増加²⁰⁾、アポトーシス抑制に関わる Bcl-2 及び Bcl-xL の発現増加²¹⁾、N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) 型グルタミン酸受容体の発現抑制²²⁾、及びアポトーシス誘導に関わる Ca²⁺の細胞内流入の抑制²³⁾の作用を持つことが報告されており、これらの作用メカニズムにより神経保護効果を示す可能性が示唆されている。臨床では、ブリモニジン酒石酸塩点眼液により眼圧下降治療を受けた患者は、β遮断薬であるチモロールマレイン酸塩点眼液と眼圧下降効果は同程度であったにも関わらず、視野維持効果はそれより高いことが報告された (Figure 12)²⁴⁾。しかし、ブリモニジン酒石酸塩点眼液の神経保護効果について、その効能効果を謳う薬剤は現時点ではない。



視野障害が増悪した患者割合

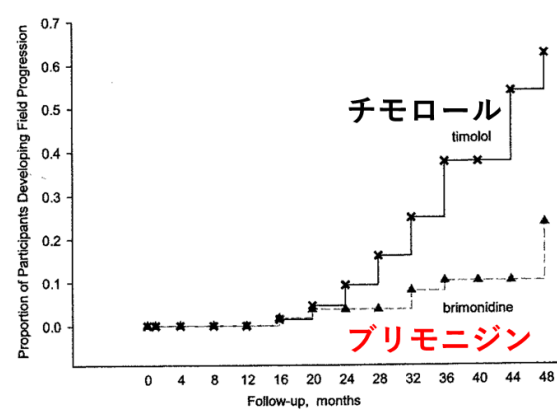


Figure 12 ブリモニジン酒石酸塩点眼液とチモロールマレイン酸塩点眼液の比較

ブリモニジン酒石酸塩点眼液とβ遮断薬であるチモロールマレイン酸塩点眼液は、眼圧下降効果は同程度であるが、視野維持効果はブリモニジン酒石酸塩点眼液が優れることが示された。

一方、NMDA型グルタミン酸受容体拮抗薬であるメマンチン塩酸塩点眼液は、サル緑内障モデルでRGCの減少を抑制したにもかかわらず (Figure 13) 25)、臨床試験では神経保護に対する有効性を示さなかった 19)、26)。この臨床試験では、緑内障においてグルタミン酸受容体を介した神経障害がどの程度、どの病態ステージで関与するかが明確でないなど、緑内障の基礎研究の課題が見つかった。

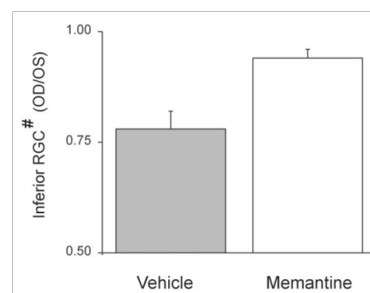
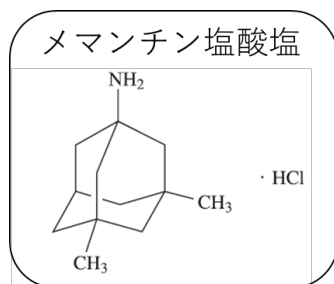


Figure 13 メマンチン塩酸塩点眼液の神経保護効果

メマンチン塩酸塩点眼液はサルレーザー誘発緑内障モデルにてRGC細胞数の減少を抑制した 25)。しかし、臨床試験ではメマンチン塩酸塩点眼液の有効性は示されなかった。

1.6 角膜上皮障害

1.6.1 角膜

角膜は外界からの光を屈折させて網膜に集束する役割を持ち、屈折力は眼球全体の約3分の2を占める⁸⁾。角膜は血管のない透明な組織であり、組織学的には表層から角膜上皮層、ボウマン膜、角膜実質層、デスメ膜、角膜内皮層の5層に分けられる (Figure 14)²⁷⁾。そのうち角膜上皮層は5~6層からなり、表層より表層細胞、翼細胞、基底細胞が存在する。角膜上皮は基底細胞が分裂して細胞が増殖し、表層部より脱落する。このターンオーバーは1~2週間で繰り返される。

角膜上皮の重要な機能の一つに、バリア機能がある。角膜上皮の表層細胞の側壁にはTight junctionが存在し、強固なバリアを形成する。これにより、細菌や真菌などの感染から角膜を守り、角膜実質への水の侵入を防ぐことができる。臨床的にも角膜上皮欠損が起こると、バリア機能が破綻して水が実質内に流入することで角膜実質浮腫を呈する。また、角膜上皮は、表層細胞を平滑にすることで視力維持にとって重要な角膜透明性を維持する機能を果たす。そのため角膜上皮が欠損すると視力低下をきたす。

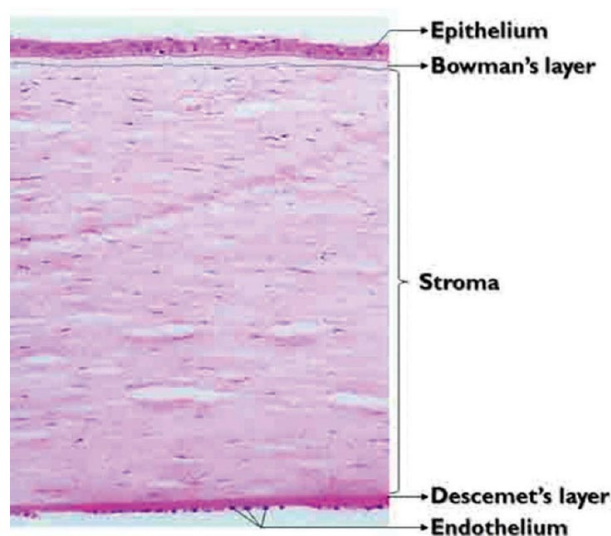


Figure 14 角膜の構造

角膜は上皮細胞層 (Epithelium)、ボウマン膜 (Bowman's layer)、角膜実質層 (Stroma)、デスメ膜 (Descemet's layer) 及び角膜内皮細胞層 (Endothelium) の5層に分けられる²⁷⁾。

1.6.2 涙液

涙液は油層、水層、ムチン層の3層構造からなり、各層の成分バランスが維持されることにより安定した涙液が保たれる (Figure 15)^{1),8)}。油層は涙液の最表面にあり、涙液の蒸発を防ぐ役割を持つ。油層はコレステロールエステル、ワックスエステル、脂肪酸などで構成

され、マイボーム腺から分泌される。水層は涙腺から分泌され、涙点を通して排出される。ムチン層は糖タンパクを主成分とするムチンが角結膜上皮細胞膜に結合した層で、角結膜上皮の表面に涙液層を保持する働きをする。また、ムチンには水層に混ざりこむ分泌型も存在する。涙液は、角膜の乾燥からの保護、異物の排出、角膜への酸素や栄養の供給、殺菌作用による微生物の侵入や感染の予防等、様々な働きを持つ。

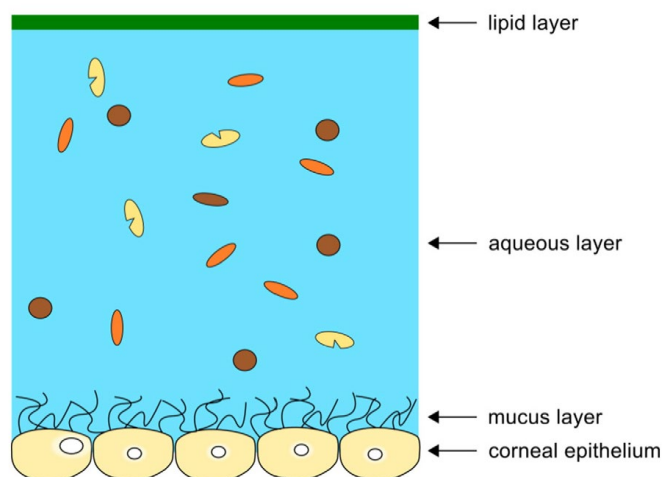


Figure 15 涙液層の構造

涙液は油層 (lipid layer)、水層 (aqueous layer)、ムチン層 (mucus layer) の3層から形成される²⁸⁾。

1.6.3 角膜上皮障害

角膜上皮障害は、主に障害の範囲に基づいて点状表層角膜症、角膜びらん及び角膜潰瘍に分類される (Figure 16)⁸⁾。点状表層角膜症では表層細胞から翼細胞までの一部を欠損し、様々な要因による角膜炎が病因となる。角膜びらんでは基底細胞を含む角膜上皮全層を欠損する。病因として外傷やコンタクトレンズ障害、ドライアイ、角膜ジストロフィ、薬剤毒性などが挙げられる。さらに角膜組織欠損が深くなり角膜実質まで病変がおよぶと、角膜潰瘍となる。角膜潰瘍には、細菌、真菌、ヘルペスなどによる感染性と、糖尿病や神経麻痺などによる非感染性のものがある。

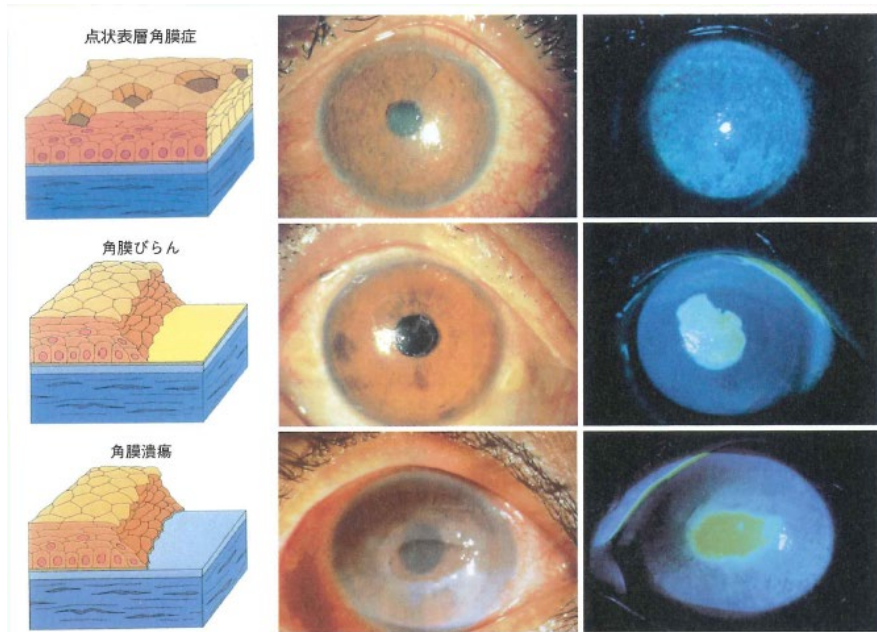


Figure 16 角膜上皮障害の分類

角膜上皮障害は、点状表層角膜症、角膜びらん及び角膜潰瘍に分類される⁸⁾。

1.6.4 角膜上皮障害の治療法

角膜上皮障害の治療は、薬剤やコンタクトレンズの誤使用が原因である場合、その原因を排除することから始まる⁸⁾。また、角膜炎を原因とする場合は眼局所へのステロイド投与、感染性の場合は抗菌作用をもつ点眼薬や内服薬等で治療を開始する。その上で、角膜上皮の保護により、創傷治癒促進を目指した治療を進める。角膜上皮保護薬としては、ヒアルロン酸ナトリウム (Hyaluronic acid sodium salt ; HA) を主成分とした点眼液が上市されている。HA 点眼液は涙液を角膜上に保持するため角膜上皮の保護と保湿に有効であり (Figure 17)²⁹⁾、細胞の遊走促進による創傷治癒促進効果を持つことも報告されている (Figure 18)³⁰⁾。しかし、角膜上皮障害には、自己免疫疾患である Sjögren 症候群など、既存の方法では治療困難な重症例も存在し³¹⁾、その場合は手術による全層又は部分的な角膜移植が必要となる。患者にとって角膜移植は、手術による身体的・精神的負担を与えることに加え、拒絶反応発症の問題が生じる場合がある。

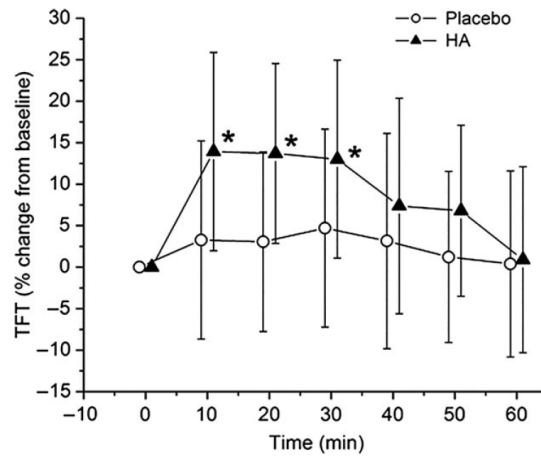


Figure 17 ヒアルロン酸ナトリウム (HA) による涙液保持効果

ヒトにおいて、プラセボに比べ HA の点眼は涙液層の厚み (Tear film thickness ; TFT) を増加させる²⁹⁾。

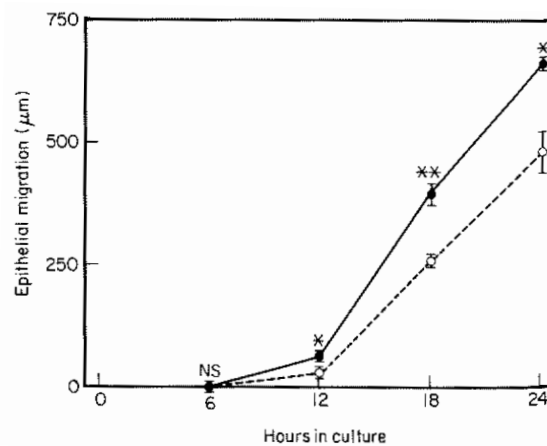


Figure 18 ヒアルロン酸ナトリウム (HA) による角膜上皮細胞遊走促進効果

プラセボ (○) に比べ HA (●) は、ウサギ培養角膜片の角膜上皮細胞の遊走を促進させる³⁰⁾。

1.6.5 microRNA

microRNA (miRNA) は 18~25 塩基の遺伝情報を持たないノンコーディング RNA で、標的とする mRNA のタンパク質翻訳を制御する。これまでに、発生、細胞増殖や細胞分化、アポトーシス、代謝など、広範な生物学的プロセスに関与することが示されてきた³²⁾⁻³⁴⁾。さらに、ヒトの遺伝子の 30%以上が miRNA に発現を制御されていると計算予測されたことから³⁵⁾、miRNA は生命の恒常性維持において重要な役割を果たすと考えられる。

miRNA の産生において、まず核内で RNA ポリメラーゼ II により miRNA 遺伝子が転写され、ヘアピン構造を持つ一次転写産物 (primary miRNA ; pri-miRNA) が生じる (Figure 19) ³⁶⁾。次に、核内で Drosha と DGCr8/Pasha からなる複合体によって pri-miRNA が切断され、中間産物である 60~70 塩基のヘアピン構造をした miRNA 前駆体 (precursor miRNA ; pre-miRNA) が産生される。Pre-miRNA は Exportin-5/Ran-GTP により核から細胞質に輸送され、RNase III である Dicer によりさらなる切断を受けて~22 塩基の二本鎖 RNA (miRNA/miRNA duplex) となる。この二本鎖 RNA は Argonaute 2 (Ago2) に積み込まれ、ガイド鎖 (成熟型 miRNA) のみが残って RNA 誘導型サイレンシング複合体 (RNA-induced silencing complex ; RISC) を形成する。RISC に取り込まれた成熟型 miRNA がガイドとなって標的 mRNA と結合し、Ago2 によって mRNA の切断又はタンパク質翻訳の抑制がなされる。miRNA は一般的に、miRNA の 5'末端側 2~8 番目の seed 領域と呼ばれる配列で、標的とする mRNA の 3'末端側非翻訳領域 (3' untranslated region ; 3' UTR) を認識して結合する ^{32),37),38)}。miRNA の seed 領域は短く、さらには標的 mRNA と部分的な相同性のみで結合することから、1つの miRNA は複数の mRNA を認識し、反対に 1つの mRNA は複数の miRNA によって認識されると考えられている ³⁵⁾。

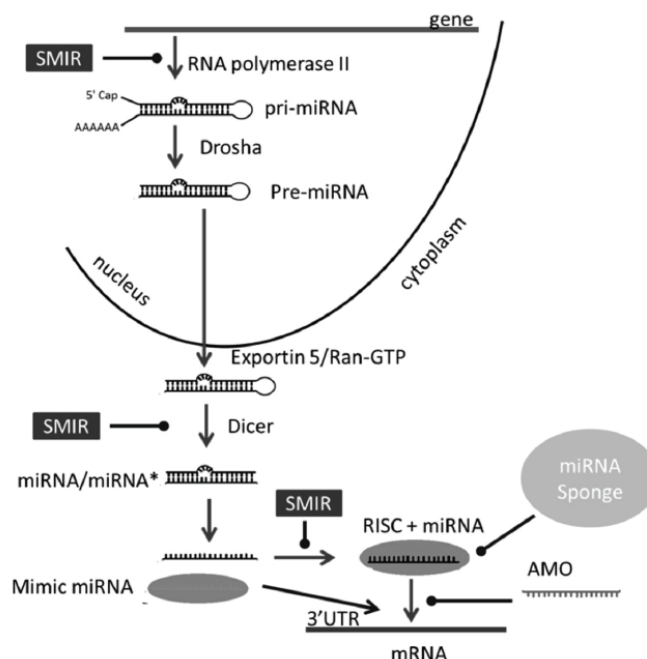


Figure 19 miRNA による遺伝子制御機構

miRNA 遺伝子は核内で RNA ポリメラーゼ II により一次転写産物 (pri-miRNA) へと転写され、さらに Drosha により切断されて miRNA 前駆体 (pre-miRNA) が産生される。Pre-miRNA は核外へ輸送され、Dicer によりさらなる切断を受けて二本鎖 RNA (miRNA/miRNA*) となる。二本鎖のうちガイド鎖のみが RNA 誘導型サイレンシング複合体 (RISC) を形成し、mRNA を阻害する。

1.6.6 miRNA の角膜上皮障害への関与

近年、角膜上皮細胞の分化、増殖、遊走に対し、miRNA が関与することが報告されてきた^{39)・41)}。Lin らは、マウス初代角膜上皮細胞にスクラッチによる障害を与えると、miRNA (miR) -205 の発現が増加することを示した⁴⁰⁾。さらに、ヒト角膜上皮細胞で miR-205 を強制発現させると細胞遊走が促進され、miR-205 の発現を阻害すると細胞遊走が抑制されることも示された。また、An らはマウスを用いて、角膜上皮全層剥離後の創傷治癒過程で、角膜上皮中の miR-204 の発現が最も強く抑制されたことを示した⁴¹⁾。不死化ヒト角膜上皮細胞に miR-204 を作用させると、細胞の増殖及び遊走が抑制された (Figure 20)。これらの知見から、いくつかの miRNA は角膜上皮障害の創傷治癒に関与する可能性が考えられた。しかし、角膜上皮障害に関与する miRNA の報告は少なく、その作用メカニズムは十分には解明されていない。

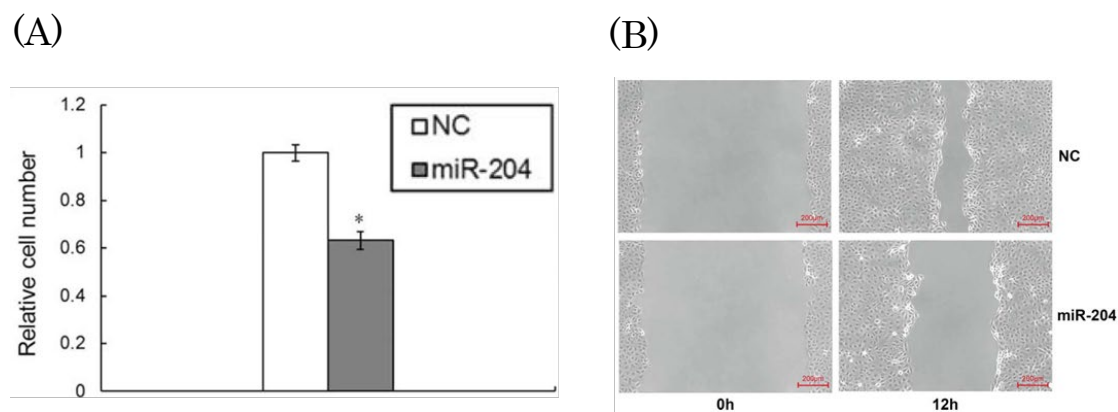


Figure 20 miR-204 によるヒト角膜上皮細胞の増殖及び遊走抑制作用

不死化ヒト角膜上皮細胞に miR-204 前駆体をトランスフェクションしたところ、ネガティブコントロール (NC) に比べ細胞増殖が有意に抑制され (A)、細胞遊走が阻害された (B)⁴¹⁾。

1.7 本研究の目的

先述の通り、緑内障は日本の中途失明原因の第一位であり、世界においても眼科医療が未発達な地を除いては最大の失明原因となっている。緑内障の本態は網膜視神経障害であるにもかかわらず、現在のところ治療法は眼圧下降に基づいた薬剤又は外科的療法のみである。眼圧下降療法では病態が進行する例もあり、緑内障による視野障害を防ぐ治療方法の開発が求められている。網膜視神経障害を直接抑制する神経保護薬の開発が進められているものの、十分な治療効果が示されていないのが現状である。神経保護薬の開発を進めるうえで、緑内障の病態メカニズムに未だ不明な点が多いことが障壁となっている。緑内障病態の理解のためには網膜や視神経における分子メカニズムの解明が不可欠だが、研究に緑内障患者の眼を用いることは容易ではないため、緑内障病態をよく模擬した評価系が必要となる。さらに、緑内障病態をよく模擬した評価系を用いて候補薬の有効性を評価することは、臨床での有効性を予測する確度を高めることを可能とする。緑内障の病態解明を進め、神経保護に関わる革新的な治療ターゲットを見出し、その効果を適切な評価系で検証することで、緑内障の神経保護治療を実現できると考える。

また、角膜上皮障害はコンタクトレンズやドライアイ、感染症等を原因とする比較的身近な眼疾患である上、発症した場合は自覚症状を感じ易いため QOL/QOV の低下に直結する。また、角膜ジストロフィや Sjögren 症候群などでは外科手術を必要とする場合があり、患者の身体的・精神的負担は小さくない。しかし、角膜上皮の創傷治癒を目指した治療薬は少なく、治療満足度は十分でない領域と言える。そのため、角膜上皮創傷治癒効果が高い新薬の創出は臨床的意義が大きい。近年、多様な創薬基盤技術を駆使した研究開発が進められ、低分子医薬品だけでなく、抗体医薬品、核酸医薬品、遺伝子治療、細胞治療といった様々な創薬モダリティを活用した医薬品が実用化されてきている。miRNA は 2000 年頃から様々な研究結果が報告され始め、生体の恒常性維持に重要な役割を果たすものとして認識されている。その多彩な機能が次々に解明され、近年ではバイオマーカーや治療標的として臨床応用を目指した研究も進められている。角膜上皮障害にも miRNA が関与することが示唆されており、新たな創薬モダリティとして有用である可能性が考えられる。新規モダリティの活用により、従来の医薬品では狙えなかった分子を創薬ターゲットとすることができ、アンメット・メディカル・ニーズに応えられる医薬品を提供できると期待する。

以上のことから、本研究では、緑内障の網膜視神経障害に対しては、新規緑内障モデルの確立とその病態研究を行い、神経保護薬開発の基盤を構築することを目的とした。また、角膜上皮障害に対しては、角膜上皮細胞の恒常性に関わる miRNA を探索し、その作用機序の解明を進めることで、新たな創薬ターゲットを見出すことを目指した。

2. 結膜線維芽細胞の前房内注入によるラット慢性高眼圧モデルの確

立及び病態解析

2.1 緒言

緑内障では、眼圧負荷により篩状板が圧縮され、視神経の軸索を機械的に絞扼することにより軸索障害が起こり、視神経の細胞体である RGC の細胞死が生じると考えられている¹⁾。しかし、篩状板の変形から RGC 細胞死に至る詳細なメカニズムや関連因子、又はその時間経過は明らかになっていない点が多い。また、RGC は形態学的及び機能的特徴によりいくつかのサブタイプに分類され、疾患ごとに障害されやすい RGC は異なるとされる^{42),43),44)}。RGC のサブタイプの機能に応じた視野計測により、緑内障を早期に検出する検査方法が開発されつつあるが、緑内障で障害を受けやすい RGC のサブタイプは明確にはなっていない。今後、緑内障での神経保護を目指した新規治療薬の創出や、早期発見のための検査方法の開発のためには、緑内障病態のさらなる解明が求められる。

緑内障病態の解明のためには、臨床病態をよく反映し、比較的短期間で病態の発症から進行を表現する動物モデルの存在が重要となる。近年、サル⁴⁵⁾⁻⁴⁷⁾、ラット⁴⁸⁾⁻⁵⁴⁾、マウス⁵⁵⁾⁻⁵⁸⁾などの様々な動物種を用いて、持続的に眼圧を上昇させることで緑内障病変を誘導する慢性高眼圧モデルが検討されている。慢性高眼圧モデルでは房水排出経路を途絶することにより眼圧上昇を惹起しており、その方法として線維柱帯、上強膜静脈又は輪部静脈に対するレーザー光凝固、ヒアルロン酸やマイクロビーズの前房内への注入による隅角（線維柱帯を中心とした角膜と虹彩の隙間）の閉塞、上強膜静脈の焼灼または結紮、上強膜静脈への高張生理食塩液の投与による癒痕化が報告されている。

サルは、眼組織の解剖学的特徴や、中枢神経系及び視覚系の発達が生人と類似していることから、動物モデルとして有用である。しかし、コストが高く、飼育施設が限られることから、十分なサンプル数を確保することが困難である。げっ歯類は比較的成本が安く取り扱いが容易であり、多くの慢性高眼圧モデルが報告されている。しかし、眼圧上昇の程度やばらつき、期間は報告によって異なり、高眼圧惹起のために特殊な装置や高度な技術を必要とするモデルが多い。我々はこれまでに、既報に倣ってラット慢性高眼圧モデルの作出を試みてきた。上強膜静脈を焼灼又は結紮により途絶させる手法では、途絶後に血管が再疎通するため十分な眼圧上昇が起こらなかった。ヒアルロン酸やマイクロビーズの前房内注入では、注入時の漏出のため十分に隅角を閉塞させることができず、安定的に高眼圧を惹起できなかった。また、上強膜静脈及び輪部静脈のレーザー光凝固では眼圧上昇が見られるものの一過的であり、3日程度で正常の眼圧値に復帰した。このように、現在報告のある手法によっては、持続的な高眼圧を安定して作出できないため、慢性高眼圧モデルの再現が難しい。

2014年、Fujishiroらにより、初めてフェレットを用いた慢性高眼圧モデルの作製方法が報告された⁵⁹⁾。このモデルでは、フェレットの前房内に同系動物から単離培養した結膜線

維芽細胞を注入する新たな方法が採用された。臨床において、内眼手術後に結膜上皮細胞が眼球内に侵入して眼内上皮増殖を引き起こし、線維柱帯を閉塞することで緑内障を発症する可能性がある。フェレットモデルの高眼圧作出はこの原理に基づいており、前房内に注入された結膜線維芽細胞が眼内で増殖し、集積して隅角を閉塞することで房水排出経路を途絶した結果、眼圧上昇が引き起こされる。このモデルでは13週間にわたる持続的な高眼圧が作出され、細胞注入後13週には視神経乳頭の陥凹拡大と視神経軸索の変性といった、臨床での緑内障病態に類似する所見が引き起こされることが示された。Fujishiroらの手法は臨床で見られる現象を模倣していることから、この手法で作製された慢性高眼圧モデルを用いることで視神経障害の発生機序のさらなる解明が期待できた。一方で、フェレットはサルと同様に汎用性が低く、緑内障研究において背景データが乏しいという課題がある。

そこで本研究では、Fujishiroらの手法をラットに応用して新規の慢性高眼圧モデルを確立することを目的とした。ラットは比較的lowコストで探索研究に使用しやすく、動物実験を実施する多くの研究機関で飼育でき、さらに多くの緑内障研究に用いられてきたため背景データが蓄積されているという点で、緑内障研究の実験材料として優れている。本研究のラットモデルの有用性を検証するため、高眼圧作出の成功率、高眼圧維持期間、RGC細胞死率、及び高眼圧に伴う病態を解析した。

さらに、ラットモデルで見られる緑内障病態の経時的な変化を追跡することで、緑内障の病態ステージとの類似性を検証した。また、これまでに報告された実験的高眼圧モデルでは、眼圧が50 mmHgを超える高眼圧を呈することがあり、この場合、網膜虚血に伴う神経障害を発症する可能性が考えられる。この症状は、急性緑内障発作とも呼ばれる急性原発閉塞隅角緑内障 (APAC) を模擬しており、慢性進行性の視神経症を伴う一般的な緑内障とは病態が異なる。そのため、本研究では、ラットモデルの網膜の組織化学的变化と眼圧上昇の程度との関係を調査し、臨床病態との相関性を評価した。

2.2 材料と方法

2.2.1 動物

Sprague-Dawley (SD) ラット (8~9 週齢、雄性) を日本チャールス・リバーから入手した。動物は室温 $23^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\%\pm 10\%$ 、12 時間点灯 (8:00~20:00) に設定した飼育室内で、3 匹ずつケージに収容して飼育した。飼料として固型飼料 (ラボ MR ストック、日本農産工業) を、飲水として限外ろ過装置を通した市水 (兵庫県神戸市) を自由に摂取させた。本研究で使用する動物は全て、Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) が定めた「Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Visual Research」及び Institute for Laboratory Animal Research が定めた「the guidelines for laboratory animal experiments」を遵守して取り扱われた。また、本研究は千寿製薬の動物実験の実施に関する規定に従い、動物実験委員会の承認を受けて実施した (承認番号: No. 20150116-01)。

2.2.2 結膜線維芽細胞の準備

5 匹の動物から結膜組織を採取し、0.2% dispase® II (Roche) を含む Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM、Invitrogen) に浸漬して 1 時間、 37°C でインキュベートした。結膜上皮細胞を機械的に除去し、残りの組織を分割して 0.1% collagenase A (Roche) により一晩、 37°C で消化した。単離された結膜線維芽細胞を栄養培地 (10% fetal bovine serum (FBS) 及び 1% penicillin/streptomycin (いずれも Invitrogen) を含む DMEM) で再懸濁し、通常条件 (5% CO_2 、 37°C 、加湿下) で培養した。結膜線維芽細胞を 70%~90% コンフルエントになるまで増殖させ、継代した。

2.2.3 結膜線維芽細胞の前房内注入

約 90% コンフルエントに達した結膜線維芽細胞を、TrypLE™ Express (Invitrogen) で剥離し、栄養培地で再懸濁して 0.3×10^7 、 1.5×10^7 及び 3.0×10^7 cells/mL の細胞懸濁液を調製した。動物に 0.5% トロピカミド・0.5% フェニレフリン塩酸塩点眼液 (ミドリン®P 点眼液、参天製薬) を点眼し散瞳させた後、ケタミン注射液 (ケタラール®筋注用 500 mg、第一三共プロファーマ) 及びキシラジン注射液 (セラクター®2%注射液、バイエル薬品) をそれぞれ 100 mg/kg 体重及び 10 mg/kg 体重となるよう腹腔内投与して全身麻酔を施した。0.4% 塩酸オキシブプロカイン点眼液 (ベノキシール®点眼液 0.4%、参天製薬) を生理食塩液 (大塚製薬工場) で 10 倍希釈したもので眼局所麻酔を施し、0.3% ガチフロキサシン点眼液 (ガチフロ®点眼液 0.3%、千寿製薬) で処置眼を抗菌した。実体顕微鏡下で、34G の注射針を装着したマイクロシリンジを用いて、5 μL の細胞懸濁液を前房内に 2~3 分かけてゆっくりと注入した (n=71)。Control 群として、別の動物の前房内に 5 μL の栄養培地を注入した (n=38)。細胞又は栄養培地の注入は片眼に対して実施し、反対眼は無処置 (正常眼)

とした。前房内注入後、0.3%オフロキサシン眼軟膏（タリビッド®眼軟膏、参天製薬）で処置眼を抗菌し、塩酸アチパメゾール（アンチセダン®、日本全薬工業）を1 mg/kg 体重となるよう腹腔内投与することで麻酔作用を拮抗し、覚醒を促した。

2.2.4 眼圧測定

前房内注入前日又は当日（ベースライン）、ならびに前房内注入後3、7、14、21及び28日に、眼圧測定を以下の通り実施した。動物にセボフルラン（セボフルラン吸入麻酔液「マイラン」、マイラン製薬）を吸入させ、全身麻酔を施した。吸入麻酔下で動物を伏臥位に置き、精製ヒアルロン酸ナトリウム点眼液（ティアバランス®点眼液0.1%）により眼部の乾燥を防いだ状態で5分間静置して麻酔深度を安定させた。TonoLab® rebound tonometer（Icare Finland）を用いて両眼の眼圧を測定した。1眼あたり連続して3回測定し、平均値を算出して個体値とした。麻酔深度による眼圧値への影響を回避するため、眼圧測定は麻酔導入後10分以内に完了させた。また、サーカディアンリズムの眼圧値への影響を回避するため、眼圧測定は9～12時に実施した。細胞注入後の各時点におけるベースラインからの眼圧変化値について、台形法により曲線下面積（Area under the curve ; AUC）を算出した。

2.2.5 スリットランプによる前眼部観察

前房内注入前日ならびに前房内注入後3、7、14、21及び28日に、動物を0.5%トロピカミド・0.5%フェニレフリン塩酸塩点眼液で散瞳させ、スリットランプ（トプコン）を用いて前眼部を観察した。

2.2.6 眼球採取

前房内注入後3、7、14及び28日に以下の通り動物を安楽死させ、眼球を採取した。動物にイソフルラン（フォーレン®吸入麻酔液、アボットジャパン）を吸入させ、全身麻酔を施した。開腹、開胸して心臓から生理食塩液を全身灌流して放血致死させた後、4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液（PFA、富士フィルム和光純薬）を全身灌流した。両眼球を摘出し、4% PFAに一晩浸漬して後固定した。

2.2.7 RGC 細胞数の計測

眼球の角膜輪部と赤道部の間を角膜輪部に沿って切開し、角膜及び水晶体を含む前眼部を切除した。カップ状の眼球から網膜を単離し、視神経乳頭に向かって放射状に4ヵ所切り込みを入れ、網膜フラットマウント標本を作製した（Figure 21）。1次抗体としてマウス抗BRN3A抗体（Mouse anti-Brn-3a monoclonal antibody, Millipore）を、2次抗体として蛍光標識された抗マウスIgG抗体（Alexa Fluor® 488 Goat Anti Mouse IgG_F(ab')₂、

Invitrogen) を用いて RGC を免疫染色した。BRN3A は神経節細胞の核内に特異的に発現する転写因子で、RGC のマーカーとなる。網膜の 4 象限について、視神経乳頭から 1 及び 2 mm の領域 (0.4 mm²) を蛍光顕微鏡 (BX51、オリンパス) で撮影した。BRN3A 陽性 RGC の細胞数を画像解析ソフトウェア (Image-Pro® Plus、日本ローパー) で計測した。1 つの網膜につき 8 領域の RGC 細胞数を平均し、個体値とした。Control 群に対する細胞注入群の RGC 細胞数の差の割合を、RGC 減少率として算出した。

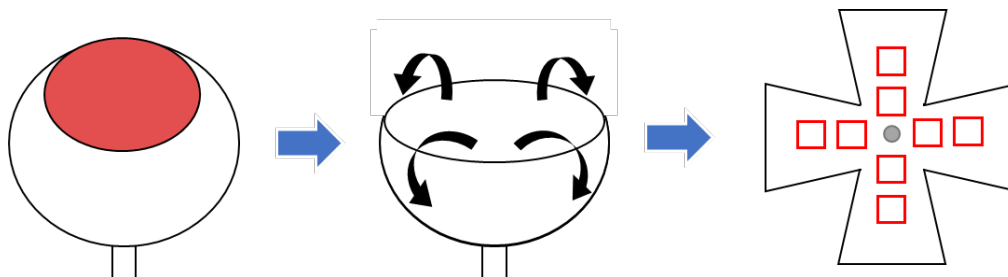


Figure 21 網膜フラットマウント作製イメージ

固定後の眼球を、角膜輪部と赤道部の間で切開し、角膜及び水晶体を含む前眼部を切除した。カップ状の眼球から網膜を単離し、視神経乳頭に向かって放射状に 4 ヶ所切り込みを入れた。1 象限につき視神経乳頭から 1 及び 2 mm の 2 領域 (1 つの網膜につき 8 領域) の蛍光顕微鏡画像を取得し、RGC 細胞数を計測した。

2.2.8 組織学的評価

眼球をパラフィン包埋し、3 µm のパラフィン切片を作製した。又は、眼球を凍結組織切片作製用包埋剤 (ティッシュ・テック O.C.T.コンパウンド、サクラファインテックジャパン) で包埋し、8 µm の凍結切片を作製した。眼球組織切片をヘマトキシリン及びエオジン (HE) 染色した。前眼部、網膜厚及び視神経乳頭陥凹について、蛍光顕微鏡 (オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X700、キーエンス) を用いて明視野観察した。

2.2.9 免疫組織学的評価

8 µm の凍結切片を作製し、10 mM リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) に浸漬した。組織切片をブロッキング液 (5%ウシ血清アルブミン (Sigma) 及び 0.1% Triton X-100 を含む 10 mM PBS) に浸漬し、室温で 20 分インキュベートすることで非特異的な結合を阻害した。1 次抗体としてウサギ抗 Glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体 (FLEX Polyclonal Rabbit Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein、Dako) を、2 次抗体として蛍光標識された抗ウサギ IgG 抗体 (Alexa Fluor® 546 goat anti-rabbit IgG) を用いて組織切片を免疫染色した。GFAP はグリア細胞の活性化マーカーであり、緑内障で神経障害が起こると発現が増加

することが知られている。核染色ができる 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を含む封入剤 (Vectashield® Mounting Media with DAPI, Vector Laboratories) で組織切片を封入し、網膜を蛍光顕微鏡 (オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X700) で撮影した。

2.2.10 TUNEL 法によるアポトーシスの検出

眼球の凍結切片を Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) 法により染色し (Click-iT® TUNEL Alexa Fluor® 488 Imaging Assay, Invitrogen)、アポトーシスの過程で見られる DNA の断片化を検出した。DAPI を含む封入剤で組織切片を封入し、網膜を蛍光顕微鏡 (オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X700) で撮影した。TUNEL 法のポジティブコントロールとして、組織切片を DNase I で処理して DNA を断片化させたものを用いた。

2.2.11 統計学的解析

眼圧値及び RGC 細胞数の個体値より、群ごとの平均値と標準偏差を求めた。各評価日の眼圧値と RGC 細胞数のそれぞれについて、細胞注入眼と Control 眼との差を Student's *t* 検定 (両側、有意水準 5%) を用いて統計解析した。個体ごとに標準化した RGC 細胞数 (無処置眼に対する細胞注入眼の RGC 細胞数の割合) と眼圧 AUC の間の相関を、Pearson の相関係数を用いた線形回帰により解析した (有意水準 5%)。

2.3 結果及び考察

2.3.1 細胞注入量の検討

はじめに、細胞注入量として低量 (1.5×10^4 cells/eye) 及び高量 (1.5×10^5 cells/eye) を検討した ($n = 2$)。低量群では、1匹は眼圧上昇が見られず、もう1匹は細胞注入後14日で眼圧上昇が見られたものの、注入後28日には正常眼圧値に戻った (Figure 22)。一方、高量群では注入後3日又は7日で眼圧上昇が示され、注入後28日まで正常眼圧より高い眼圧値が維持された。この結果から、高量の細胞注入により高眼圧を惹起できると考えられたが、高量の細胞懸濁液を調製するには細胞培養量が多く必要となり、様々な検討を予定する探索研究には不適切であった。

そこで、細胞注入量を半分に減じて高眼圧を惹起できるかを検討することとした ($n = 5 \sim 6$)。高量群の半分にあたる中量 (7.5×10^4 cells/eye) の細胞注入により、注入後3又は7日から6匹全例で眼圧上昇が見られた (Figure 23)。そのうち4匹は注入後28日まで高眼圧を維持し、残りの2匹は注入後21日まで高眼圧を示した。一方、高量群では6匹中2匹は眼圧が上昇せず、眼圧上昇を示した4匹のうち2匹は注入後14又は21日で正常眼圧値に戻った。また、中量群は高量群に比べ、眼圧変化値が大きい傾向があった。以上より、細胞注入量として中量が最適であると判断し、以降の検討では中量の細胞注入により慢性高眼圧モデルを作製した。

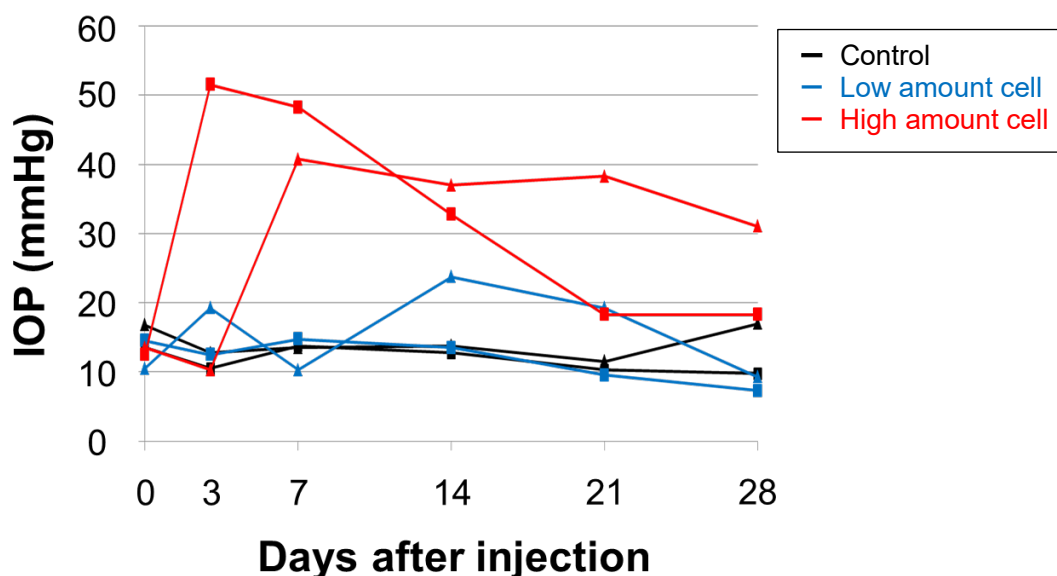


Figure 22 低量及び高量の細胞注入後の眼圧プロファイル

細胞又は栄養培地の前房内注入後28日間の眼圧プロファイルを示した ($n = 2$)。細胞低量群は、眼圧上昇が見られない、又は一過的な眼圧上昇のみが見られた。細胞高量群は、細胞注入後3又は7日に眼圧上昇が見られ、注入後28日にわたり高眼圧が持続した。

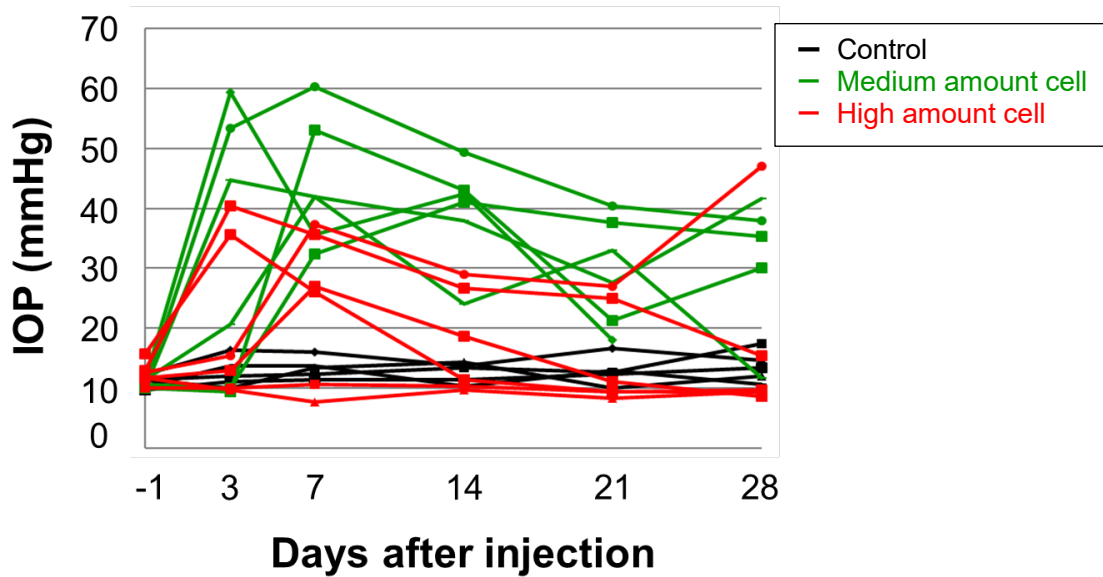


Figure 23 中量及び高量の細胞注入後の眼圧プロファイル

細胞又は栄養培地の前房内注入後 28 日間の眼圧プロファイルを示した (Control : n = 5、細胞注入群 : n = 6)。細胞中量群は、6 匹全例で眼圧上昇が見られ、注入後 21 日又は 28 日まで高眼圧を維持した。細胞高量群は、6 匹中 4 匹で眼圧上昇が示されたものの、そのうち 2 匹は注入後 14 又は 21 日に正常眼圧値に戻った。

2.3.2 眼圧測定

本研究では、眼圧値がベースラインより 10 mmHg 以上高い場合を眼圧上昇とみなし、眼圧上昇を示さなかった個体はデータ解析から除外した。Figure 24 に細胞注入後 28 日間の眼圧プロファイルを示した。注入後 3 日の眼圧平均値は、Control (栄養培地注入) 群 (n = 8) に比べ、細胞注入群 (n = 11) で統計学的に有意に高かった (27.1 ± 19.1 mmHg vs. 12.2 ± 2.0 mmHg, $p = 0.04$ 、両側 Student's *t* 検定)。細胞注入後 7 日には眼圧平均値は最大値に達し (39.7 ± 13.3 mmHg)、眼圧上昇は注入後 28 日まで維持された (26.9 ± 10.5 mmHg)。

眼圧上昇を示した 11 眼のうち、8 眼は測定期間中に 50 mmHg より低い眼圧値を示し (Under-50 群)、残りの 3 眼は測定期間中少なくとも 1 回は 50 mmHg を超える眼圧を呈した (Over-50 群)。Under-50 群の眼圧平均値は全個体の眼圧平均値と同程度であったのに対し、Over-50 群では高値を示し、細胞注入後 3、7、14、21 及び 28 日の眼圧平均値は 40.7 ± 27.3 、 49.7 ± 12.7 、 44.9 ± 3.9 、 26.6 ± 12.0 及び 33.2 ± 4.2 mmHg であった。本研究全体では、中量の細胞注入をした 55 眼のうち 70.9%にあたる 39 眼で眼圧上昇が示され、残りの 16 眼 (29.1%) では眼圧が上昇しなかった。眼圧上昇を示した 39 眼のうち、11 眼 (28.2%) は 50 mmHg を超える眼圧上昇が見られた。

細胞注入後 14 及び 28 日での眼圧曲線下面積 (AUC) は、Under-50 群ではそれぞれ 200.9

±174.0 mmHg/day (n = 3) 及び 331.6±259.4 mmHg/day (n = 9) で、Over-50 群ではそれぞれ 380.5±46.4 mmHg/day (n = 3) 及び 768.1±225.1 mmHg/day (n = 3) であった。このことから、眼圧 AUC のばらつきは大きいものの、Under-50 群に比べて Over-50 群では高い眼圧が持続的に負荷されていることが示された。

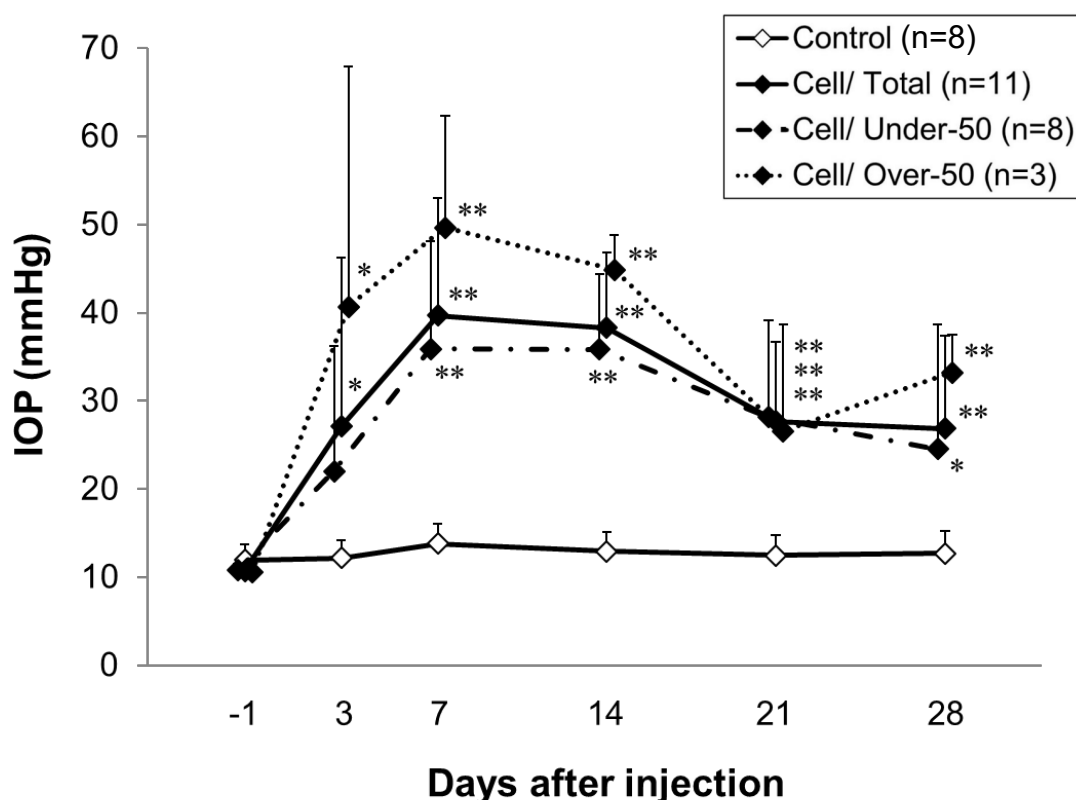


Figure 24 細胞注入群及び Control 群の眼圧プロファイル

細胞注入 (Cell) 群では、注入後 3 日から眼圧上昇が見られ、28 日まで持続した。細胞注入後 3、7、14、21 及び 28 日の眼圧平均値は、それぞれ 27.1±19.1、39.7±13.3、38.3±8.5、27.7±8.9 及び 26.9±10.5 mmHg であった (n = 11)。細胞注入群のうち 8 匹では最高眼圧値が 50 mmHg より低く (Under-50)、3 匹では 50 mmHg より高かった (Over-50)。データは眼圧平均値±標準偏差 (mmHg) で示した (* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ (Control 群 (n = 8) との比較、両側 Student's *t* 検定)。

2.3.3 RGC 数の計測

神経節細胞核の特異的マーカーである BRN3A の抗体を用いて免疫染色し、BRN3A 陽性 RGC 細胞数を計測した (Figure 25)。Under-50 群では経時的に RGC 細胞数が減少した。一方、Over-50 群では、RGC 細胞数は細胞注入後 14 日以降に顕著に減少した。細胞注入後 3、7、14 及び 28 日の RGC 数の平均は、細胞注入群全体ではそれぞれ 2790±336、2211

±286、1361±743 及び 998±764 cells/ mm² (n = 5~9) であった (Figure 26A)。一方、Control 群では、それぞれ 3128±240、2798±170、2803±160 及び 2677±110 cells/ mm² (n = 5~6) であった。細胞注入眼の RGC 細胞数は、注入後 7、14 及び 28 日で、Control 群に比べ有意な減少を示した (細胞注入後 7 日 : $p = 0.0013$ 、14 日 : $p = 0.0012$ 、28 日 : $p = 0.0009$ 、両側 Student's *t* 検定)。Control 群と比較した細胞注入群の RGC 減少率は、細胞注入後 3、7、14 及び 28 日でそれぞれ 10.8%、21.0%、51.4% 及び 62.7% であった。

細胞注入群のうち、Under-50 群の RGC 細胞数は注入後 3、7、14 及び 28 日でそれぞれ 2846±330、2158±306、1719±419 及び 1673±166 cells/ mm² であった (n = 2~7) (Figure 26B)。一方、Over-50 群ではそれぞれ 2455、2395±57、1123±896 及び 323±248 cells/ mm² であった (n = 1~3)。細胞注入後 28 日では、Over-50 群の RGC 細胞数は Under-50 群に比べ有意に減少した ($p < 0.01$ 、両側 Student's *t* 検定)。細胞注入後 3、7、14 及び 28 日の RGC 減少率は、Under-50 群でそれぞれ 9.0%、22.9%、38.7% 及び 37.5% で、Over-50 群でそれぞれ 21.5%、14.4%、59.9% 及び 88.0% であった。以上の結果より、Under-50 群では細胞注入後 14 日で RGC 減少が最大となり、注入後 28 日ではそれ以上の RGC 減少が見られないのに対し、Over-50 群では注入後 14 日から Under-50 群より RGC が減少する傾向が見られ、注入後 28 日では重度な RGC 減少が起こることが示された。

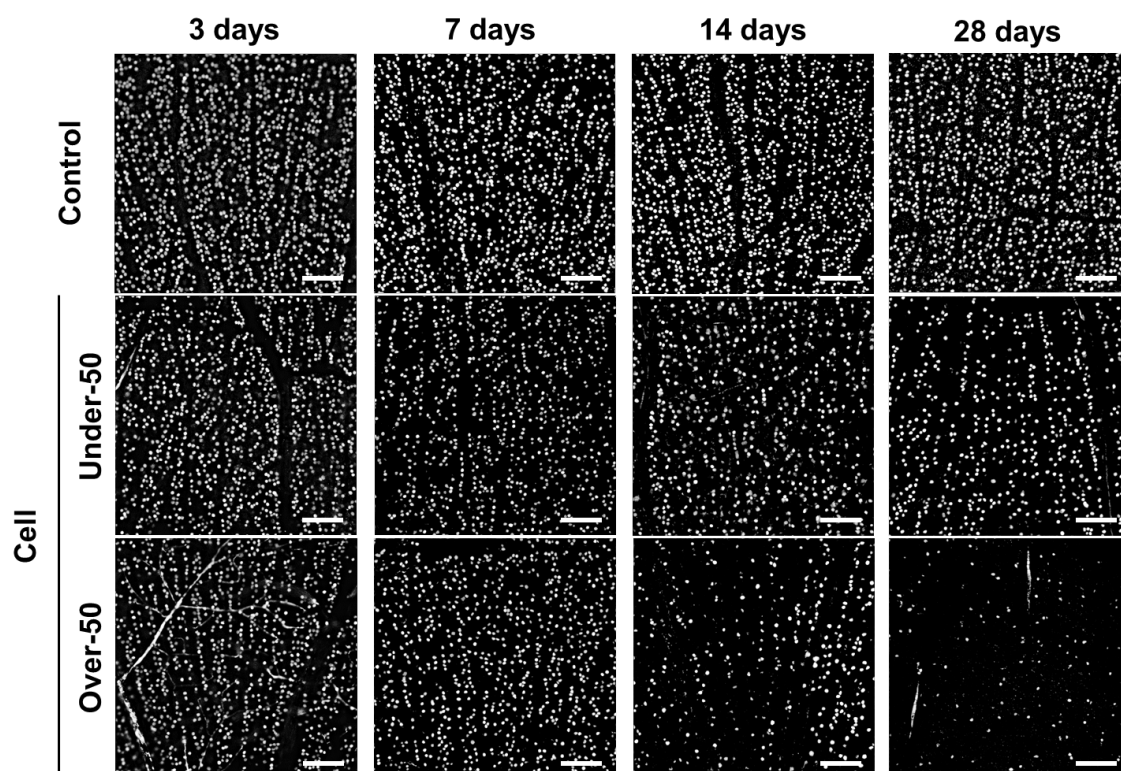


Figure 25 網膜フラットマウントの顕微鏡画像 (代表例)

視神経乳頭から 1 mm の網膜領域を示した。網膜フラットマウント上に、BRN3A 陽性 RGC を確認した。スケールバー : 100 μ m。

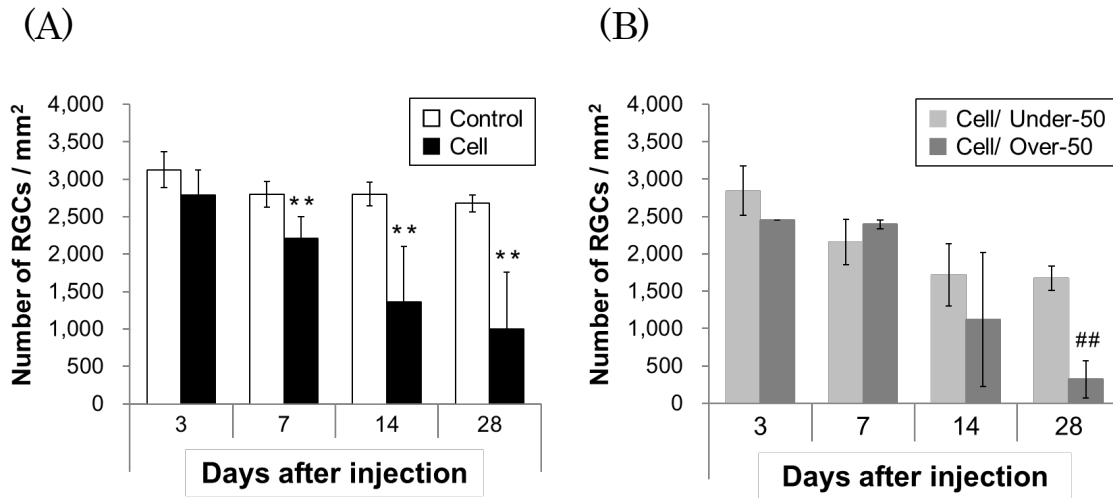


Figure 26 RGC 細胞数の計測

(A) 細胞注入群全体では、注入後 3、7、14 及び 28 日の RGC 細胞数が Control 群に比べ 10.8%、21.0%、51.4%及び 62.7%減少した ($n = 5 \sim 9$)。 (B) Under-50 群と Over-50 群に分けて RGC 細胞数を計測した。注入後 28 日で、Over-50 群は Under-50 群に比べ有意に RGC 数が減少した ($n = 1 \sim 7$)。データは RGC 細胞数の平均値±標準偏差で示した ((A) **: $p < 0.01$ (Control 群との比較)、(B) #: $p < 0.01$ (Under-50 群との比較)、いずれも両側 Student's t 検定)。

2.3.4 RGC 細胞数と眼圧値の相関分析

RGC 細胞の減少と眼圧値との相関を、Under-50 及び Over-50 のそれぞれの群について分析した (Pearson の相関係数を用いた線形回帰)。本分析では、RGC 細胞数の個体差を考慮し、個体ごとに無処置である反対眼 (正常眼) に対する細胞注入眼の RGC 細胞数の割合を算出して RGC 細胞数を標準化した。また、持続的な高眼圧負荷による RGC 細胞数への影響を加味するため、パラメーターとして評価時点での眼圧変化の曲線下面積 (眼圧 AUC) を用いた。細胞注入後 14 日では、Under-50 群及び Over-50 群とも、RGC 細胞数は眼圧 AUC と負の相関を示す傾向が見られた (Under-50 群: $n = 3$, $r = -0.8359$, $p = 0.3699$; Over-50 群: $n = 3$, $r = -0.9473$, $p = 0.2076$) (Figure 27A)。細胞注入後 28 日では、Under-50 群の RGC 細胞数と眼圧 AUC との間に強い負の相関が見られた ($n = 9$, $r = -0.9308$, $p < 0.001$) (Figure 27B)。一方、Over-50 群では、RGC 細胞数と眼圧 AUC に負の相関は見られず、RGC 細胞数は著しく減少した ($n = 3$, $r = 0.5278$, $p = 0.6460$)。以上より、Over-50 群では一般的な緑内障病態である慢性的な高眼圧に依存した RGC 細胞死だけでなく、重度の RGC 細胞死を引き起こす異なる病態が引き起こされていることが示唆された。したがって、緑内障モデルとしての病態解析のため、以降の研究では Under-50 群を採用した。

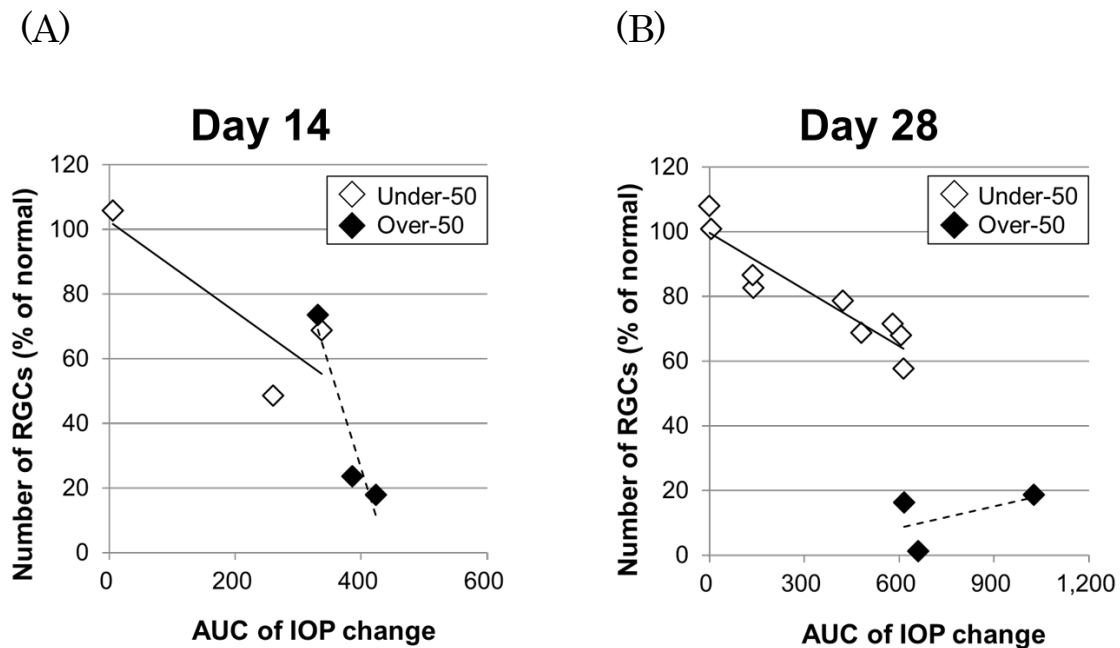


Figure 27 RGC 細胞数及び眼圧 AUC の相関分析

個体ごとに、無処置である反対眼（正常眼）に対する細胞注入眼の RGC 細胞数の割合と、各評価時点でのベースラインからの眼圧変化値 AUC（眼圧 AUC）をプロットした。回帰分析には Pearson の相関係数を用いた。(A) 細胞注入後 14 日では、Under-50 群及び Over-50 群で RGC 細胞数と眼圧 AUC に負の相関が見られる傾向が示された (Under-50 群 : $n = 3$, $r = -0.8359$, $p = 0.3699$; Over-50 群 : $n = 3$, $r = -0.9473$, $p = 0.2076$)。 (B) 細胞注入後 28 日では、Under-50 群で RGC 細胞数と眼圧 AUC に強い負の相関が見られた ($n = 9$, $r = -0.9308$, $p < 0.001$)。 Over-50 群では RGC 細胞数と眼圧 AUC との間に負の相関は見られず、著しい RGC 細胞数の減少が見られた ($n = 3$, $r = 0.5278$, $p = 0.6460$)。

2.3.5 眼球の組織学的評価

Under-50 群の組織学的評価を行った ($n = 2 \sim 3$)。スリットランプ観察により、細胞注入後 3 日から 28 日にわたって、注入した細胞の角膜内皮への集積と、虹彩の角膜前癒着が確認された (Figure 28)。Control 群及び無処置である反対眼では異常所見は見られなかった。摘出眼球の肉眼観察及び眼球組織切片の HE 染色により、細胞注入後 7 日から徐々に眼球拡大が観察された (Figure 29)。細胞注入後 3 日以降に、虹彩が角膜に接着して隅角が完全に閉塞され (Figure 30)、視神経乳頭の陥凹が拡大した (Figure 31)。細胞注入後 7 日では、神経線維層 (Nerve fiber layer ; NFL) 及び内網状層 (Inner plexiform layer ; IPL) の菲薄化が見られ、注入後 14 日及び 28 日では内顆粒層 (Inner nuclear layer ; INL) 及び外顆粒層 (Outer nuclear layer ; ONL) を含めた網膜全層の菲薄化が経時的に見られた (Figure 32)。

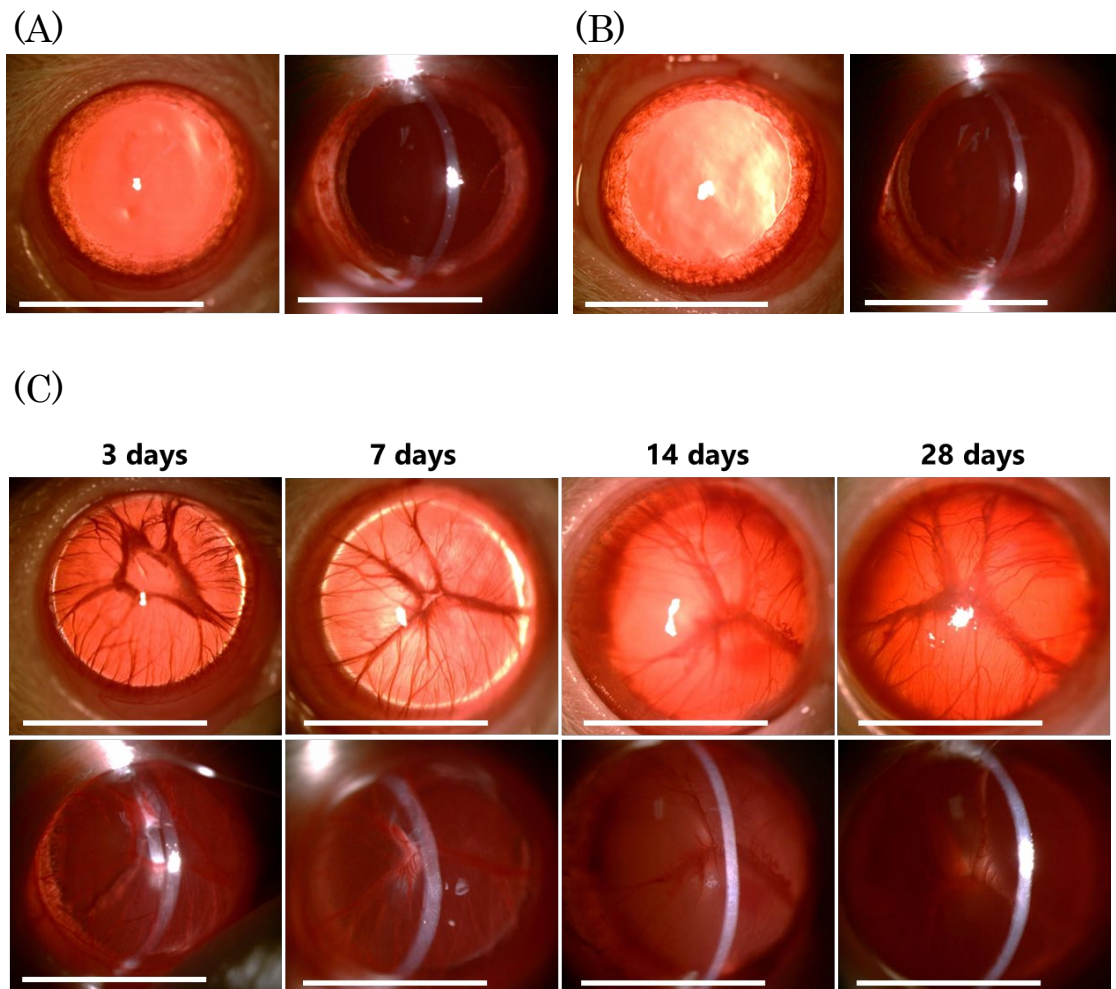


Figure 28 前眼部のスリットランプ観察像（代表例）

(A) 無処眼、(B) Control 群（注入後 28 日）、(C) 細胞注入群のスリットランプ観察像を示した。Control 群では異常所見は見られなかった。細胞注入群では、注入後 3 日から 28 日にわたり、注入細胞の角膜内皮への集積と、虹彩の角膜前癒着を認めた。スケールバー：5 mm。

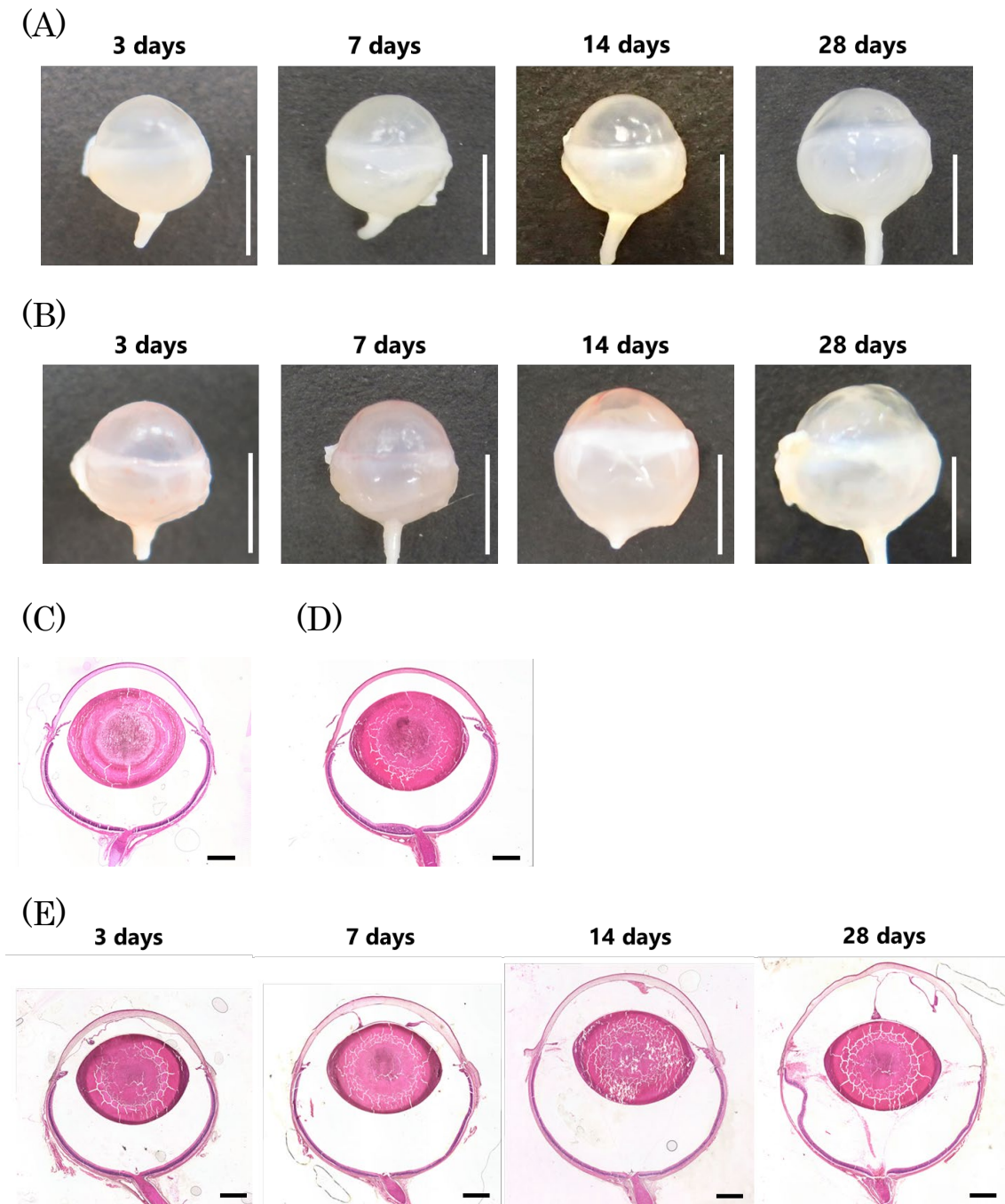


Figure 29 眼球の肉眼観察及び眼球組織切片の HE 染色像

(A) Control 群、(B) 細胞注入群の摘出眼球のデジタルカメラによる撮影像、及び (C) 無処置眼、(D) Control 群 (注入後 28 日)、(E) 細胞注入群の HE 染色像を示した。Control 眼では 28 日間で眼球サイズに変化が見られないのに対し、細胞注入群では注入後 7 日から徐々に眼球が拡大した。スケールバー：5 mm (デジタルカメラ像) 又は 1 mm (HE 染色像)。

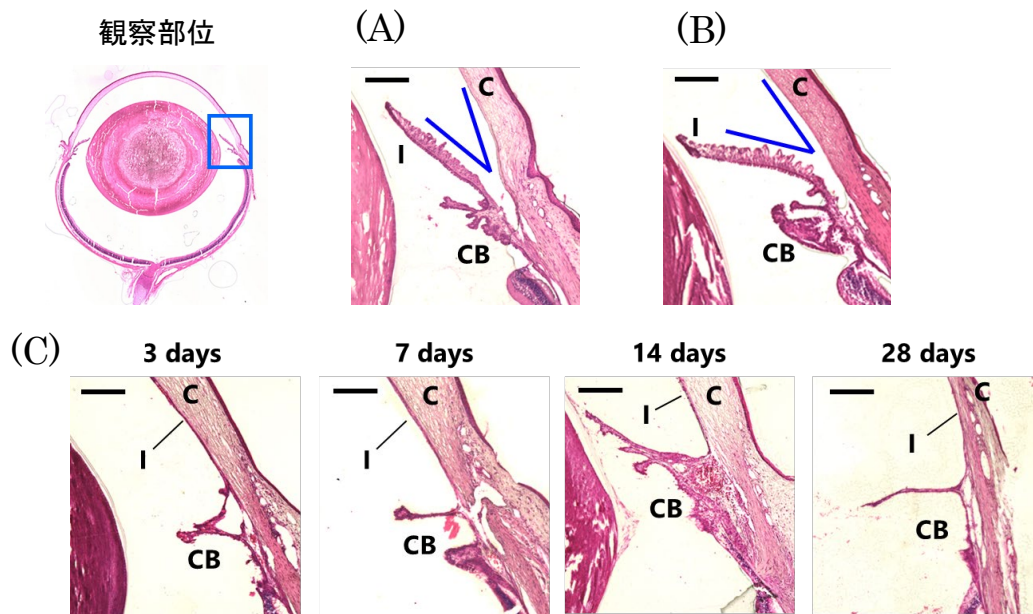


Figure 30 隅角所見 (HE 染色)

(A) 無処置眼、(B) Control 群 (注入後 28 日)、(C) 細胞注入群の隅角を示した。無処置眼及び Control 群では隅角が開放しているのに対し、細胞注入群では注入後 3 日以降に虹彩が角膜に接着して完全な隅角閉塞が見られた。C : 角膜、I : 虹彩、CB : 毛様体、スケールバー : 200 μm。

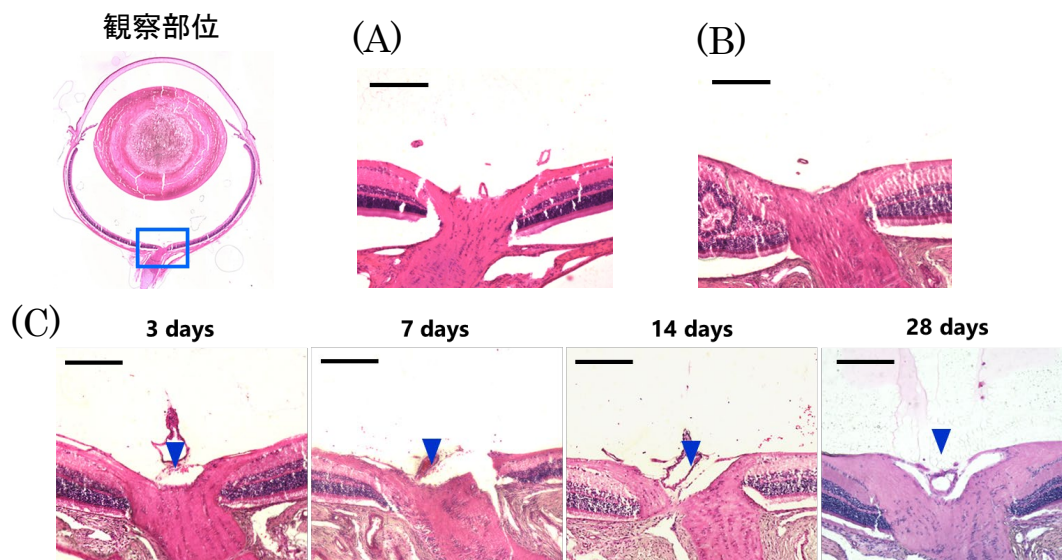


Figure 31 視神経乳頭所見 (HE 染色)

(A) 無処置眼、(B) Control 群 (注入後 28 日)、(C) 細胞注入群の視神経乳頭を示した。細胞注入群では注入後 3 日以降に視神経乳頭の陥凹が拡大した。スケールバー : 200 μm。

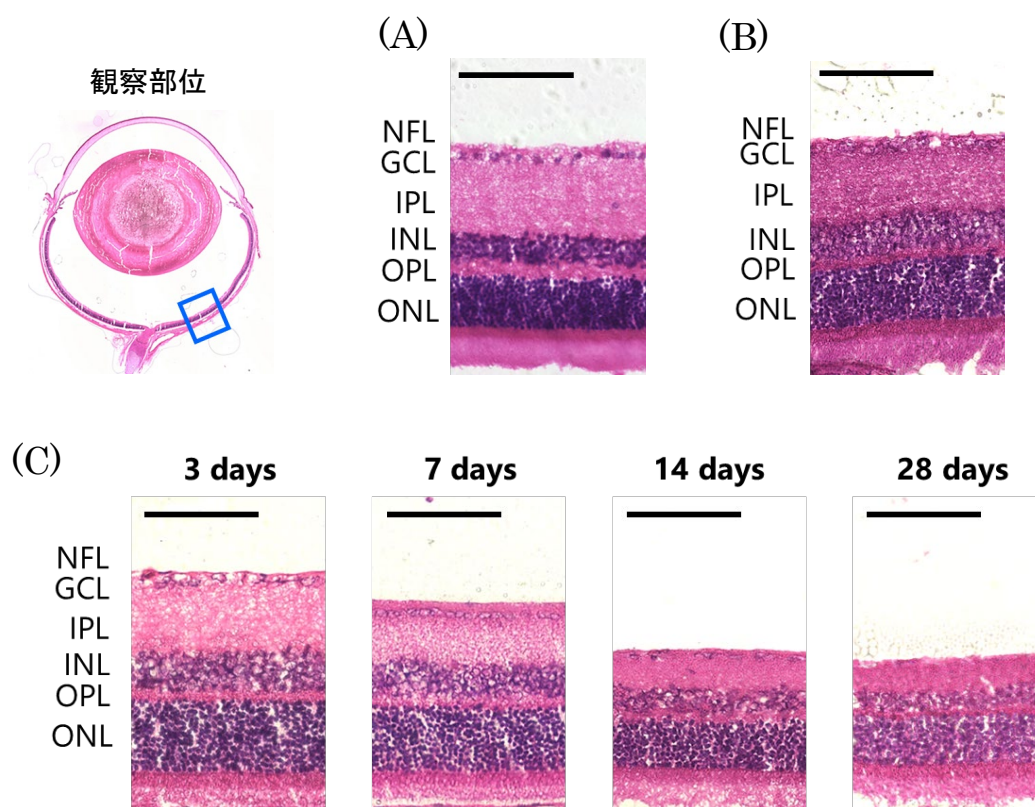


Figure 32 網膜所見 (HE 染色)

(A) 無処置眼、(B) Control 群 (注入後 28 日)、(C) 細胞注入群の網膜 (視神経乳頭から 2 mm の領域) を示した。細胞注入群では、注入後 7 日に神経線維層 (NFL) 及び内網状層 (IPL) の菲薄化が見られ、注入後 14 日及び 28 日では内顆粒層 (INL) 及び外顆粒層 (ONL) を含む網膜全層の厚みが経時的に減少した。NFL: 神経線維層、GCL: 神経節細胞層、IPL: 内網状層、INL: 内顆粒層、OPL: 外網状層、ONL: 外顆粒層、スケールバー: 100 μm 。

2.3.6 網膜での GFAP の免疫染色

緑内障性視神経障害の典型的な病変である神経節細胞の活性化を検出するため、細胞注入後の網膜中のグリア細胞繊維性酸性タンパク質 (Glial fibrillary acidic protein ; GFAP) の発現変化を評価した。Control 眼では、GFAP は星状膠細胞 (アストロサイト) が存在する神経節細胞層 (GCL) に局在した (Figure 33A)。一方、細胞注入眼では、注入後 7 日には GCL から内網状層 (IPL) 及び内顆粒層 (INL) にわたるミュラー細胞の一部で GFAP が発現した (Figure 33B)。注入後 14 日には GFAP の発現強度は最大となり、GCL から外顆粒層 (ONL) の網膜全層にわたるミュラー細胞全体で、GFAP の発現が確認された。しかし、注入後 28 日では、注入後 14 日に比べ GFAP の発現強度は減弱し、発現部位はミュラー細胞の一部に留まった。

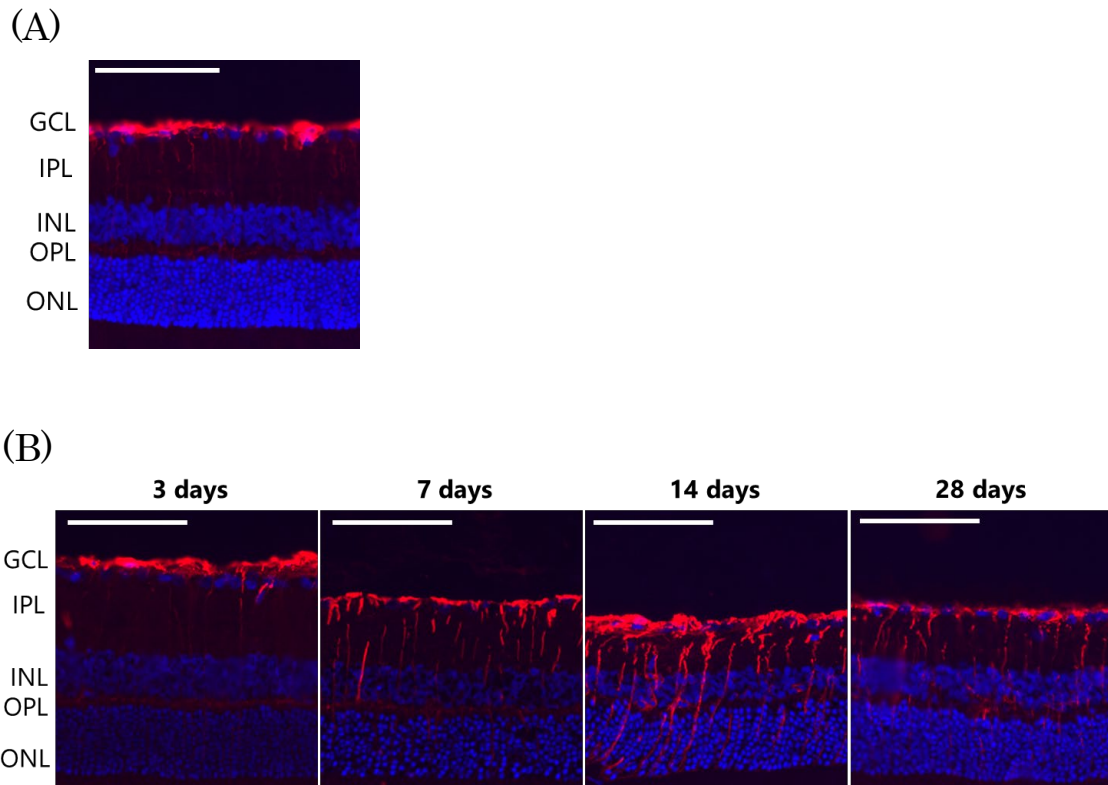


Figure 33 網膜中の GFAP 発現

(A) Control 群（注入後 28 日）、(B) 細胞注入群の網膜（視神経乳頭から 2 mm の領域）中の GFAP 免疫染色像を示した。Control 群では GFAP（赤）は GCL のみで発現が見られたが、細胞注入眼では注入後 7 日から GFAP の発現範囲が GCL から ONL に向かって広がり始め、注入後 14 日に発現強度は最大に達した。注入後 28 日では GFAP の発現は減弱した。核を DAPI（青）で染色した。GCL：神経節細胞層、IPL：内網状層、INL：内顆粒層、OPL：外網状層、ONL：外顆粒層、スケールバー：100 μm 。

2.3.7 網膜での TUNEL 染色

細胞注入による RGC 細胞数の減少の機序を明らかとするため、TUNEL 法によりアポトーシス細胞に特徴的な DNA の断片化を網膜で検出した。細胞注入後 14 日に、網膜の GCL、INL 及び ONL で TUNEL 陽性細胞が観察された (Figure 34)。しかし、注入後 28 日には TUNEL 陽性細胞数は減少した。

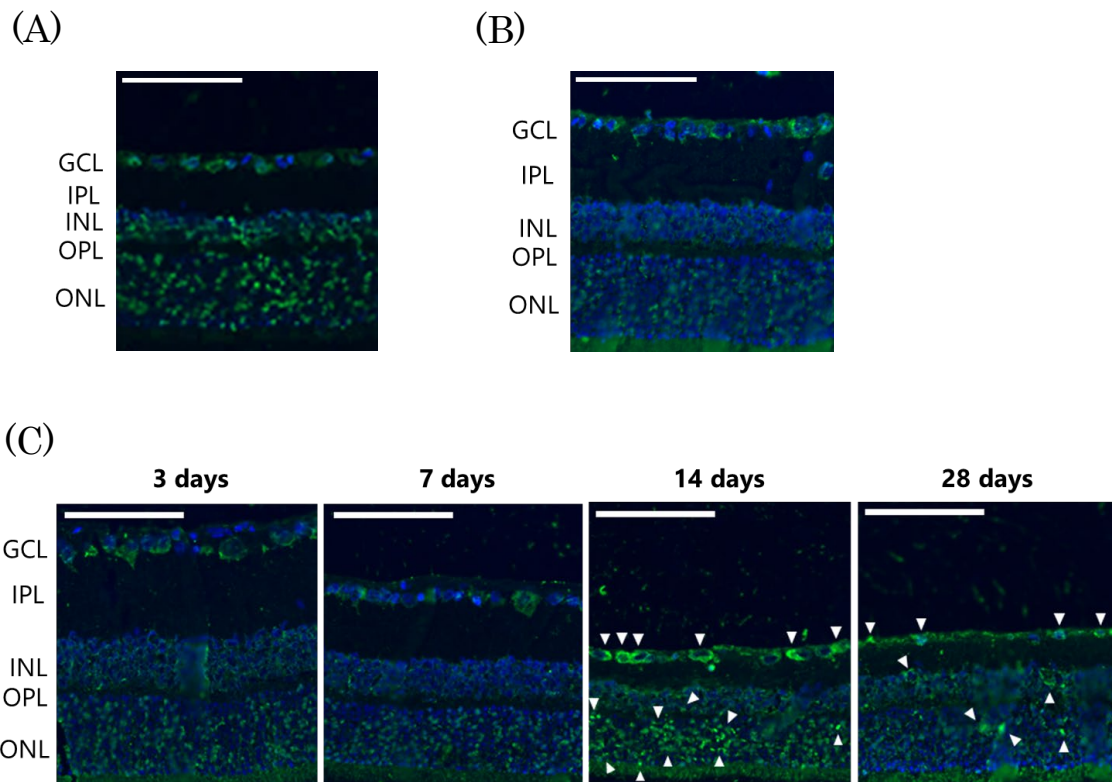


Figure 34 網膜中の TUNEL 染色

(A) 陽性対照、(B) Control 群 (注入後 28 日)、(C) 細胞注入群の網膜 (視神経乳頭から 2 mm の領域) の TUNEL 法による染色像を示した。細胞注入後 14 日に GCL、INL 及び ONL 層で TUNEL 陽性が見られたが (矢頭)、注入後 28 日には TUNEL 陽性が減少した。DNase I で DNA 断片化を誘導した網膜を陽性対照とした。核を DAPI (青) で染色した。GCL: 神経節細胞層、IPL: 内網状層、INL: 内顆粒層、OPL: 外網状層、ONL: 外顆粒層、スケールバー: 100 μm 。

2.4 総括

慢性高眼圧モデルは様々な動物種で開発されており、特にラットは探索研究においてサンプル数を得やすいことから広く使用されている。ラット慢性高眼圧モデルで用いられる手技として、上強膜静脈の焼灼や結紮⁴⁸⁾⁻⁵⁰⁾、線維柱帯又は上強膜静脈及び輪部静脈のレーザー光凝固^{51),52)}、上強膜静脈への高張生理食塩液の注入⁵³⁾、マイクロビーズの前房内注入⁵⁴⁾などが挙げられる。しかし、これらの慢性高眼圧モデルでは眼圧上昇を惹起することが技術的に困難な場合がある。また、慢性高眼圧モデルの病態の経時変化を追った知見は少ない。そのため、本研究では新規のラット慢性高眼圧モデルを確立し、さらにこのモデルの病態について経時変化を解析した。

本研究では、Fujishiro らがフェレットで確立した慢性高眼圧モデルをラットに応用した⁵⁹⁾。結膜線維芽細胞をラットの前房内に注入することにより、細胞注入後 3 日で Control 眼に比べて有意な眼圧上昇が誘導された。細胞注入後 7 日には眼圧上昇が最大に達し、その後 28 日時点まで高眼圧が持続した。本モデルでは細胞注入による眼圧上昇の惹起成功率は 70.9%であり、慢性高眼圧モデルを安定的に作製できることが示された。

スリットランプ観察により、角膜内皮への細胞集積及び虹彩の角膜前癒着が細胞注入後 3 日から確認された。また、眼球切片の HE 染色では、虹彩が角膜に接着することによる隅角の完全な閉塞が起こることが示された。このことから、注入した結膜線維芽細胞が虹彩及び角膜に接着し、虹彩-角膜間が癒着して隅角が閉塞した結果、房水の流出が障害されたことにより眼圧上昇が惹起されたと考えられた。

慢性高眼圧モデルにおいて、眼圧上昇の程度を適切に保つことは課題の一つである。我々のモデルでも、眼圧が 50 mmHg を越える例が眼圧上昇眼のうち 28.2%で見られた。本研究では最大眼圧値が 50 mmHg より低い群 (Under-50) と高い群 (Over-50) の RGC 細胞障害を比較した。相関分析の結果、細胞注入後 14 日では、Over-50 群及び Under-50 群ともに RGC の細胞数減少は眼圧値依存的に起こった。しかし、注入後 28 日では両群で異なる RGC 障害パターンが見られた。Under-50 群では RGC の細胞数減少は眼圧依存的に引き起こされた。これより、我々のモデルは慢性的な高眼圧の影響により、眼圧値に応じた RGC 細胞障害が誘導され、その結果として POAG の臨床病態を模擬した所見を示したことが示唆された。一方で、Over-50 群では、細胞注入後 28 日の時点では、眼圧値に依存しない重度の RGC 細胞障害が引き起こされた。50 mmHg を超える眼圧上昇が急激にラットで誘発されると、視神経乳頭の変形が見られた後、網膜血流速度の低下や網膜血管径の縮小が見られると報告されている⁶⁰⁾⁻⁶²⁾。臨床の急性原発閉塞隅角症 (APAC) では、眼圧が急激に上昇することで、緑内障性視神経障害と虚血性視神経障害が引き起こされ、短期間で重度の視神経障害が引き起こされる⁶³⁾。これらのことから、本モデルでも眼圧が 50 mmHg を超えた場合は、網膜虚血による神経障害が起こり、重度の RGC 細胞数減少に繋がったものと考えられた。これは、一般的に多い原発性開放隅角緑内障 (POAG) を模擬した慢性高眼圧モデルとは異なることから^{64),65)}、本モデルの病態解析には Under-50 群を採用した。

臨床では、眼圧上昇により篩状板が機械的に圧迫されて変形した結果、篩板孔を通過する網膜神経線維が絞扼され、欠損が生じると考えられている^{66,67}。これら組織学的及び形態学的変化に伴い、視神経乳頭の陥凹拡大や網膜の菲薄化が起こるとされる。我々のモデルでも、視神経乳頭の陥凹拡大（注入後3日以降）や網膜の菲薄化（注入後7日以降）といった緑内障に特徴的な形態学的変化が観察された。このことから、本モデルでは臨床と同様に、眼圧上昇による影響で視神経乳頭が圧迫され、視神経障害が引き起こされた可能性が考えられた。一方で、細胞注入眼の眼球サイズはControl眼に比べ拡大したことから、網膜全体に高い圧力がかかり、眼球が伸展したことが予想された。そのため、本モデルでは、視神経乳頭の圧迫に起因する視神経障害だけでなく、網膜全体への機械的圧迫による網膜変性も誘導された可能性が考えられた。これより、我々のモデルは一般的な臨床病態を反映していない点もあると言える。

緑内障患者や種々の慢性高眼圧モデルの網膜では、GFAPの発現上昇に特徴づけられるグリア細胞の活性化が見られ^{50,68-70}、緑内障において網膜中のグリア細胞の活性化は神経障害のマーカーと考えられている。我々のモデルでは、Control眼ではGFAPの発現はアストロサイトが局在するGCLのみに限定されたが、細胞注入眼では注入後7日よりGFAPの発現はMüller細胞の局在に沿って広がり、注入後14日には発現強度はピークに達してGCLからONLを通して発現が示された。また、Kerriganらにより、緑内障患者の網膜でTUNEL陽性細胞が増加することが報告され、アポトーシスが誘導されることが示唆されている⁷¹。我々のモデルでは、細胞注入後14日に、GCL、INL及びONLでTUNEL陽性細胞が見られたことから、RGCの細胞減少はアポトーシスによる細胞死であることが示唆された。以上のことから、本モデルでは臨床で見られる緑内障性の病態変化を呈することが示唆された。一方で、細胞注入後28日ではこれらの細胞応答はいずれも減退した。

Yuらは、上強膜静脈の結紮モデルでは高眼圧誘発後から経時的にRGC細胞数の減少が見られ、コントロール眼に比して約32%のRGC細胞死を示してからは、さらなるRGC細胞数の減少は見られないことを報告した⁵⁰。本モデルでは、Under-50群の細胞注入後14日のRGC減少率は38.7%であり、注入後28日でも37.5%と、さらなる減少は見られず、Yuらの報告とも一致した。本研究の検討結果を合わせると、本モデルでは細胞注入後3日ごろに隅角が閉塞して眼圧が上昇し、視神経乳頭の陥凹拡大が見られた結果、視神経が障害される。注入後7日ごろから網膜菲薄化が見られ、網膜神経の細胞障害応答が活性化される。この頃には約20%のRGC減少が見られる。網膜神経の細胞障害応答は細胞注入後14日ごろに最大となり、約40%のRGCで細胞死が誘導された後、細胞障害応答は減弱する。以上のことから、本モデルは眼圧上昇に起因する緑内障の発症初期から進行、網膜神経の障害に至るまで、臨床病態を模擬した病変を28日間で再現できていると考えられる（Figure 35）。

本研究で確立したラット慢性高眼圧モデルでは高眼圧の長期的な維持を達成し、眼圧値50 mmHgを境界としてPOAGとAPACの2つの型の緑内障病態を呈することが示唆され

た。眼圧値が 50 mmHg を超えない個体では、一般的な緑内障である POAG を模擬した網膜神経障害を呈することが明らかとなった。効率的に POAG モデルの例数を確保するためには、注入細胞数や注入方法の検討により眼圧上昇の程度をコントロールすることが課題となる。現在、本モデルを用いて、緑内障の発症と進行に関わる分子メカニズムの解明に取り組んでいる。本モデルは緑内障病変の初期から後期までを 28 日間で再現できていることから、本モデルの網膜中の遺伝子発現変化を細胞注入後 7、14 及び 28 日で網羅的に解析し、緑内障の各病期での関連因子を見出すことができると考えている。今後、網膜神経障害に関与する可能性があるターゲット因子を選出し、それらの RGC 細胞死に対する作用を検証することで、神経保護作用に基づく新たな緑内障治療薬の開発に繋げたい。

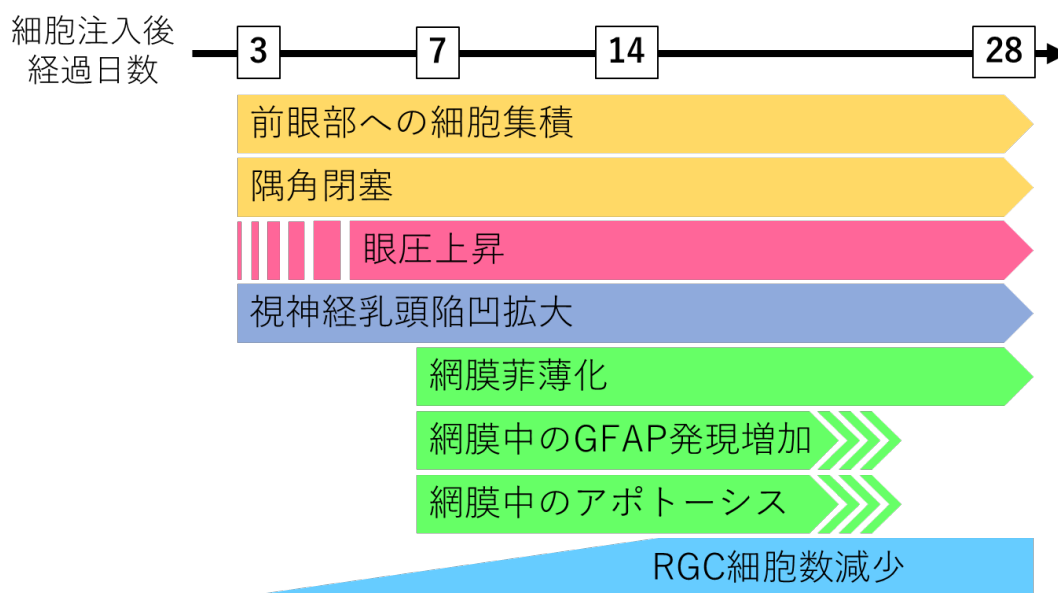


Figure 35 本モデルにおける緑内障病態進行

本モデルでは、細胞注入後 3 日ごろから細胞が集積することで隅角が閉塞して眼圧が上昇し、視神経乳頭の陥凹拡大が見られる。注入後 7 日ごろから網膜菲薄化が見られ、網膜神経の細胞障害応答が活性化され、網膜細胞のアポトーシスが起る。この時点では約 20%の RGC 減少が見られる。網膜神経の細胞障害応答は細胞注入後 14 日ごろに最大となり、約 40%の RGC 減少が誘導された後、細胞障害応答は減弱する。

3. 涙液に特徴的な microRNA の同定とその角膜上皮細胞に対する作

用の説明

3.1 緒言

いくつかの miRNA は、組織や細胞種に対し特異的に発現することが報告されている。例えば、miR-122 は肝臓に、miR-124 は脳に特異的に発現する^{72)・76)}。さらに、miRNA の発現パターンは同じ組織であっても病態や症状、進行度によって異なることも報告されている。ヒトの慢性腎臓病では miR-21 及び miR-193a の腎臓での発現が増加し、miR-23b 及び miR-26a の発現が減少するのに対し、急性腎障害では miR-21、miR-24 及び miR-146a の発現が増加する⁷⁷⁾。これらのことから、組織や細胞ごとに異なる miRNA が産生され、組織特異的な、あるいは病態特異的な作用を示すことで、生体の恒常性維持に寄与する可能性が考えられる。これらの知見から、眼組織においても特徴的な miRNA が存在し、恒常性維持に重要な役割を果たすことが予想される。

近年、miRNA は、産生された細胞内で機能するだけでなく、エクソソームなどの膜小胞体に封入されて様々な体液中に分泌され、別の細胞へ取り込まれて機能することで、細胞間の情報伝達を担うことが示唆されている^{78)・81)}。これまでに、血液、尿、唾液等の様々な体液中で miRNA の発現が報告されている^{82)・86)}。Weber らは 12 種類の体液中 miRNA の発現を解析し、体液の種類によって存在する miRNA の構成や濃度が異なることを示した⁸⁷⁾。この報告では、ヒトの涙液中にも 320 種類の miRNA が存在することが確認された。涙液中で発現量が多い上位 20 種類の miRNA のうち、miR-335*、miR-515-3p、miR-509-5p、miR-873 及び miR-616*は少なくとも 9 種類の他の体液中でも高い発現を示し、これらの miRNA は共通の起源を持つことや、全身で共通の機能を持つことが考えられた。一方、miR-637 は涙液中のみで発現が確認されたことから、miR-637 は眼組織に特異的な機能を持つ可能性が示唆された。涙液中の miRNA に関する報告は他にもあるが^{88)・92)}、いずれもアルツハイマー病、ガン、Sjögren 症候群、糖尿病網膜症や緑内障など、特定の病態での情報であり、恒常的に、あるいは特徴的に発現している miRNA の情報は少ない。また、涙液中の miRNA の機能も不明な点が多い。

そこで本研究では、サルの涙液中 miRNA の発現プロファイルを解析して涙液に特徴的な miRNA を同定し、その機能を解明することを目的とした。他の眼組織と異なり、角膜には血管が存在しないため、涙液から酸素や栄養などの物質供給を受ける。このことから、涙液中の miRNA は、角膜、特に涙液と接触する角膜上皮の恒常性維持に強く関与する可能性が考えられた。本研究では、涙液に特徴的な miRNA の角膜上皮細胞の生存への影響を検証し、そのメカニズムを探索した。

3.2 材料と方法

3.2.1 涙液及び血清サンプル

カニクイザル (*Macaca fascicularis*) (雌雄各 4 匹) の個体ごとの涙液及び血清をイブバ イオサイエンスから入手した。涙液は、50 μ L の生理食塩液 (大塚製薬工場) を片眼の鼻側 より点眼し、強制瞬目させた後に耳側より回収した。希釈涙液が全量約 600 μ L となるまで 間隔を空けて回収を繰り返した。血清は、大腿静脈から採取した約 2 mL の血液から分離し た。本研究で使用する動物は全て、Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) が定めた「Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Visual Research」 及び Institute for Laboratory Animal Research が定めた「the guidelines for laboratory animal experiments」を遵守して取り扱われた。

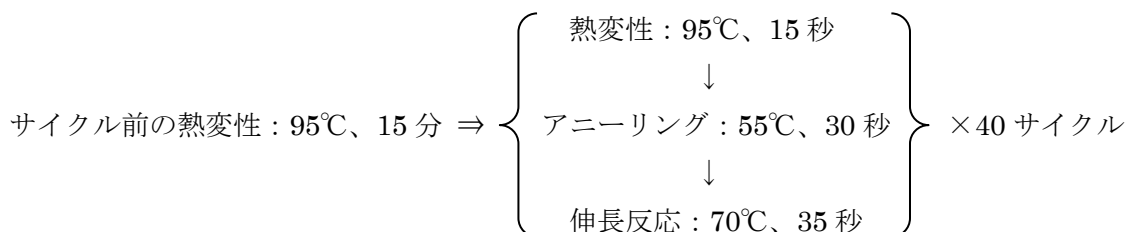
3.2.2 涙液及び血清の miRNA マイクロアレイ

300 μ L の涙液及び血清を 3,000 g で 15 分間遠心した後、上清を回収し、サンプルに混入 した細胞及び細胞片を除去した。各サンプルから Total RNA を抽出し、RNA 6000 Pico kit (Agilent Technologies) を用いて Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) に より Total RNA の品質と量を評価した。Total RNA 中の miRNA に miRCURY LNA Array miR labeling kit (Exiqon) を用いて Hy5 標識し、3D-Gene Human miRNA Oligo chip V16.1.0.0 (東レ) 上でハイブリダイゼーション反応させた。この miRNA チップには 1212 種類の検出用オリゴヌクレオチドが固定されている。シグナルを 3D-Gene Scanner (東レ) で検出した。測定値のうち、バックグラウンド値の平均値+2 標準偏差以上の測定値を採用 し、それら採用データについてバックグラウンド値の平均値を減算し、標準化した (Global normalization)。涙液中の miRNA プロファイルを血清中のものと比較した。涙液及び血清 はそれぞれ 2 サンプルを使用し、2 サンプルともに検出できた miRNA を解析に用いた。

3.2.3 miRNA のリアルタイム定量 PCR

300 μ L の涙液及び血清から、QIAzol (QIAGEN) 及び miRNeasy Serum/Plasma Kit (QIAGEN) を用いて Total RNA を抽出した (n=4~6)。スパイクインコントロールとして 0.01 fmol の合成 cel-miR-39-3p (QIAGEN) を QIAzol 添加後に添加し、実験間のばらつきの補正に用いた。抽出した Total RNA に、分解を防ぐために RNase 阻害剤 (SUPERase-In, Thermo Fisher Scientific) を加えた。RNA の品質及び量を NanoVue™ (GE Healthcare) で評価した。1.12 μ L の Total RNA を miRCURY LNA RT Kit (QIAGEN) により逆転写 し、miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit (QIAGEN) を用いてリアルタイム PCR を行 った。成熟型 (mature) miRNA の特異的な Forward primer として、hsa_miR-184 miRCURY LNA miRNA PCR Assay、hsa_miR-3616-3p miRCURY LNA miRNA PCR Assay、hsa_miR-3610 miRCURY LNA miRNA PCR Assay、hsa_miR-203a-3p miRCURY

LNA miRNA PCR Assay (いずれも QIAGEN) を使用した。相補的 DNA (complementary DNA: cDNA) の増幅及び検出は、7500 Real Time PCR system (Thermo Fisher Scientific) を用いて以下の条件で実施した。検量線法により発現量を算出し、各 miRNA 発現量を cel-miR-39-3p の発現量で補正した。



3.2.4 miRNA mimic、inhibitor 及び siRNA

miRNA の類似体 (mimic) として、完全長の合成 2 本鎖 miRNA (miScript miRNA Mimic: Syn-hsa-miR-184 及び Syn-hsa-miR-203a-3p (いずれも 22-bp、QIAGEN) を、miRNA の阻害剤 (inhibitor) として、2'-O-メチル化された完全相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチド (miScript miRNA Inhibitor: Anti-hsa-miR-184 及び Anti-hsa-miR-203a-3p (いずれも 22-mer、QIAGEN) を使用した。miRNA mimic 及び inhibitor のネガティブコントロールとして、全ての miRNA あるいはアンチセンスオリゴヌクレオチドと相同性を持たない配列 (AllStars Negative Control siRNA 及び miScript Inhibitor Negative Control (QIAGEN)) を使用した。IGFBP5 及び NUCKS1 の siRNA、及びそれらのネガティブコントロールには Silencer® Select siRNAs (Thermo Fisher Scientific) を使用した。

3.2.5 細胞及びトランスフェクション

不死化ヒト角膜上皮細胞 (Human corneal epithelial (HCE-T) cell) は独立行政法人地域医療機能推進機構 (Japan Community Health care Organization: JCHO) 星ヶ丘医療センターの佐々木香る博士から入手した。HCE-T 細胞は Short Tandem Repeat (STR) 解析により遺伝子型を解析し、細胞株が認証されたものを使用した。HCE-T 細胞を栄養培地 (5% FBS、5 µg/mL insulin (富士フィルム和光純薬)、10 ng/mL human recombinant epidermal growth factor (EGF、Invitrogen) 及び 40 µg/mL gentamycin (Invitrogen) を含む DMEM/F12 培地 (Invitrogen)) 中で、通常条件 (5% CO₂、37°C、加湿下) で培養した。約 90% コンフルエントに達した後、TrypLE™ Express で剥離して継代、もしくは細胞懸濁液を調製した。

細胞懸濁液は、5% FBS 及び 40 µg/mL gentamycin を含む DMEM/F12 培地で細胞を再懸濁して調製した。Water-soluble tetrazolium salt (WST) アッセイでは 96 ウェルプレートに 1.0 × 10³ cells/ well、デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイでは 24 ウェルプレ

ートに 4.0×10^4 cells/ well、RNA 抽出では 6 ウェルプレートに 9.0×10^4 cells/ well となるよう細胞を播種した。通常条件で 18 時間前培養した後、培地を無血清培地 (DMEM/F12) に交換した。miRNA mimic (最終濃度 20 nM) 又は miRNA inhibitor (最終濃度 50 及び 100 nM) を、HiPerFect Transfection Reagent (QIAGEN) と混合して細胞に添加し、通常条件で培養することでトランスフェクションした。siRNA (50 nM) のトランスフェクションには、Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen) を用いた。

3.2.6 Water-soluble tetrazolium salt (WST) アッセイ

miR-184 及び miR-203 mimic 及び inhibitor をトランスフェクションして 48 時間後に、WST-8 (Cell Counting Kit-8 reagent、同仁化学研究所) をウェルに添加して通常条件で 1 時間インキュベートした。450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (BioTek) により測定した。WST-8 溶液のみの吸光度をバックグラウンドとして各測定値から減算した。miRNA mimic 又は miRNA inhibitor をトランスフェクションした細胞の測定値について、ネガティブコントロールに対する比を算出し、相対的な変化値 (細胞生存率) を求めた。1 回の実験は triplicate で実施し、2~3 回繰り返した。

3.2.7 HCE-T 細胞の DNA マイクロアレイ及びリアルタイム定量 PCR

miR-203 mimic 及び inhibitor をトランスフェクションして 48 時間後に、Total RNA を TRIzol® Reagent (Invitrogen) 及び RNeasy Mini kit を用いて抽出した。Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) で RNA の品質と量を確認し、Genechip (Affymetrix) を用いてマイクロアレイ法による遺伝子発現解析を実施した (n=3)。

マイクロアレイ法による解析を、リアルタイム定量 PCR により検証した。300 ng の Total RNA を PrimeScript® RT Master Mix (Perfect Real Time) Kit (Takara Bio) を用いて逆転写し、TaqMan™ Gene Expression Master Mix を用いてリアルタイム定量 PCR を実施した。プライマーには以下の TaqMan™ Gene Expression Assay を用いた: Hs00181213_m1 (Insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5))、Hs05054673_s1 (nuclear casein kinase and cyclin dependent kinase substrate 1 (NUCKS1)) 及び Hs02786624_g1 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH))。GAPDH は内在性コントロールとして用い、検量線法により相対的な発現量を算出した。

3.2.8 miRNA のターゲット予測

DNA マイクロアレイで発現変化が見られた mRNA について、miR203 の mRNA 結合領域 (2~8 nt) に対する 3'末端側非翻訳領域 (3' untranslated region ; 3' UTR) 内の相補的配列の有無を、miRNA のターゲット予測のためのオンラインデータベース (miRDB ;

<http://www.mirdb.org/>) により調査した。

3.2.9 デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイ

50 ng のヒト IGFBP5 の 3' UTR を含むルシフェラーゼレポータープラスミド (HmiT100927-MT06、Genecopoeia) 又は pEZX-MT06 ベクターのコントロールプラスミド (CmiT000001-MT06、Genecopoeia) を、50 nM の miR-203 mimic 又はネガティブコントロールと、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて HCE-T 細胞に同時にトランスフェクションした。48 時間後、ホタルルシフェラーゼ及びウミシイタケルシフェラーゼの活性を Luc-Pair™ Duo-Luciferase Assay Kit 2.0 (Genecopoeia) を用いて測定した。ウミシイタケルシフェラーゼ活性を基に、ホタルルシフェラーゼの相対的な活性を算出した。

3.2.10 統計学的解析

リアルタイム定量 PCR、WST アッセイ及びデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイのデータについて、平均値±標準偏差を算出した。群間の差を Student's *t* 検定で統計解析した (両側、有意水準 5%)。

3.3 結果及び考察

3.3.1 マイクロアレイ法による涙液及び血清中の miRNA の発現解析

バイオアナライザにより、涙液及び血清から高純度の RNA が抽出されたことを確認した (Figure 36)。抽出された RNA には 200 nt 以下の small RNA のみが含まれ、18 S あるいは 28 S ribosomal RNA (1874 nt あるいは 4718 nt) は含まれないことが確認された。このことより、抽出された RNA には細胞由来の RNA は含まれず、体液中を循環する RNA のみが含まれることが示された。

マイクロアレイ法による涙液中及び血清中の遺伝発現解析では、それぞれ 483 及び 492 種類の miRNA が検出された。それらのうち、367 種類の miRNA は涙液及び血清の両方での発現が確認された。367 種類中、314 種類の miRNA は、涙液で血清に比べ 2 倍以上高い発現が見られた。血清に比べ涙液で発現が高い miRNA の上位 20 種類を Table 2 に示した。そのうちの上位 5 種類は、miR-184、miR-3616-3p、miR-720、miR-3610 及び miR-203 であり、涙液での血清に対する発現量比はそれぞれ 83.7、35.6、33.3、30.1 及び 28.8 倍であった。

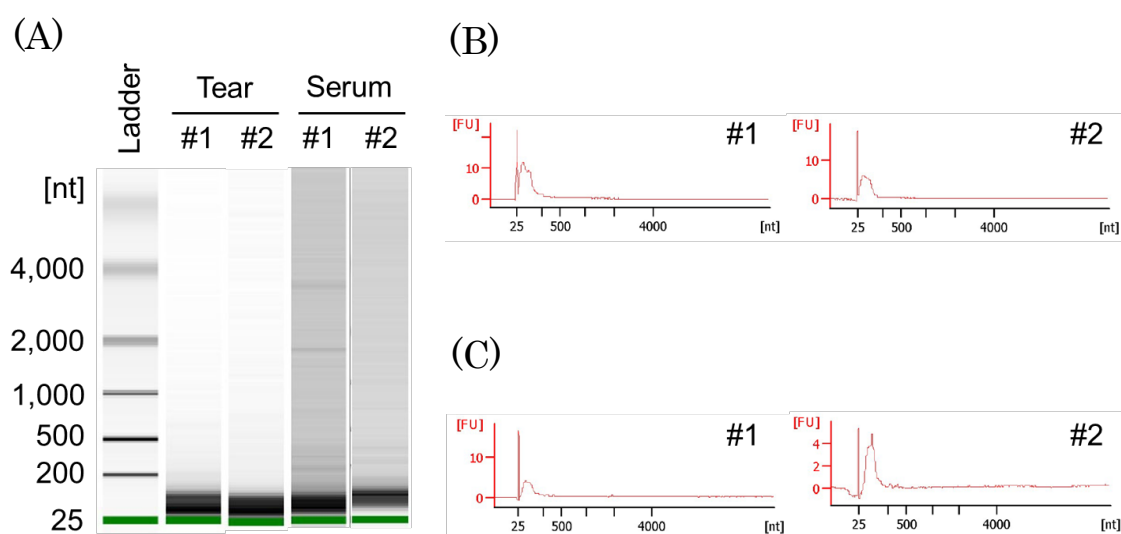


Figure 36 バイオアナライザによる抽出 RNA の品質確認

(A) 電気泳動ゲル像と、(B) 涙液及び (C) 血清のシグナル分析結果を示した。涙液及び血清から抽出した RNA にはいずれも 200 nt 以下の small RNA のみが含まれることが確認された。

Table 2 miRNA マイクロアレイ結果（血清に比べ涙液で発現が高い上位 20 種類、n = 2）

Name of miRNA	Intensities		Fold change (Tear/ Serum)
	Average (individual)		
	Tear	Serum	
hsa-miR-184	1616.7 (1173.4, 2060.0)	19.3 (21.6, 17.1)	83.7
hsa-miR-3616-3p	1123.3 (775.1, 1471.6)	31.5 (40.1, 23.0)	35.6
hsa-miR-720 [†]	7077.6 (3950.5, 10204.6)	212.3 (262.3, 162.3)	33.3
hsa-miR-3610	471.3 (562.2, 380.4)	15.7 (16.1, 15.3)	30.1
hsa-miR-203	587.3 (184.4, 990.1)	20.4 (22.1, 18.7)	28.8
hsa-miR-518c*	715.7 (1003.4, 428.1)	28.1 (35.2, 21.0)	25.5
hsa-miR-3918	896.7 (455.7, 1337.6)	37.5 (52.5, 22.4)	23.9
hsa-miR-583	351.8 (299.1, 404.4)	15.3 (13.4, 17.2)	23.0
hsa-miR-1246	5825.8 (3261.9, 8389.7)	255.4 (379.0, 131.7)	22.8
hsa-miR-3197	16785.3 (30306.9, 3263.7)	849.2 (999.8, 698.7)	19.8
hsa-miR-3679-5p	1570.5 (952.5, 2188.5)	84.2 (110.9, 57.5)	18.7
hsa-miR-1254	287.7 (338.1, 237.2)	15.4 (16.2, 14.7)	18.6
hsa-miR-3122	353.5 (334.6, 372.4)	19.0 (22.7, 15.3)	18.6
hsa-miR-4257	1411.5 (770.0, 2052.9)	77.5 (80.2, 74.9)	18.2
hsa-miR-491-5p	330.8 (411.2, 250.4)	18.4 (18.4, 0.0)	18.0
hsa-miR-3936	289.3 (404.6, 174.0)	16.1 (13.1, 19.2)	17.9
hsa-miR-614	447.6 (707.5, 187.7)	25.0 (30.1, 19.9)	17.9
hsa-miR-1908	20012.9 (15340.5, 24685.4)	1188.5 (1519.8, 857.2)	16.8
hsa-miR-4299	261.9 (302.2, 221.6)	15.6 (14.7, 16.6)	16.7
hsa-miR-3678-3p	447.7 (475.1, 420.2)	26.8 (26.8, 0.0)	16.7

[†]The sequence annotated as miR-720 is likely to be a fragment of a transfer RNA, and it has been removed from the miRBase (<https://www.mirbase.org/>).

3.3.2 リアルタイム定量 PCR 法による涙液及び血清中の miRNA 発現量の検証

血清に比べ涙液で発現が高い上位 5 種類の miRNA のうち、miR-720 は transfer RNA の断片であると報告され、miRNA のデータベース (miRBase ; <https://www.mirbase.org/>) から削除されていることから、本研究の解析から除外した。すなわち、miR-184、miR-3616-3p、miR-3610 及び miR-203 について、涙液と血清との発現量比をリアルタイム定量 PCR 法により検証した。4 種類のうち、miR-184 及び miR-203 の Ct 値は涙液で 21.3 及び 25.5、血清で 35.6 及び 33.2 であった (Figure 37A)。一方、miR-3610 の Ct 値は涙液及び血清ともに 35 以上で、涙液と血清に有意な差は見られず、miR-3616-3p は涙液及び血清ともに検出されなかった。miR-184 及び miR-203 の涙液での発現量は血清に比べ有意に高く、それぞれ 165,542.8 及び 567.8 倍であった ($p < 0.05$ 、両側 Student's *t* 検定) (Figure 37B)。

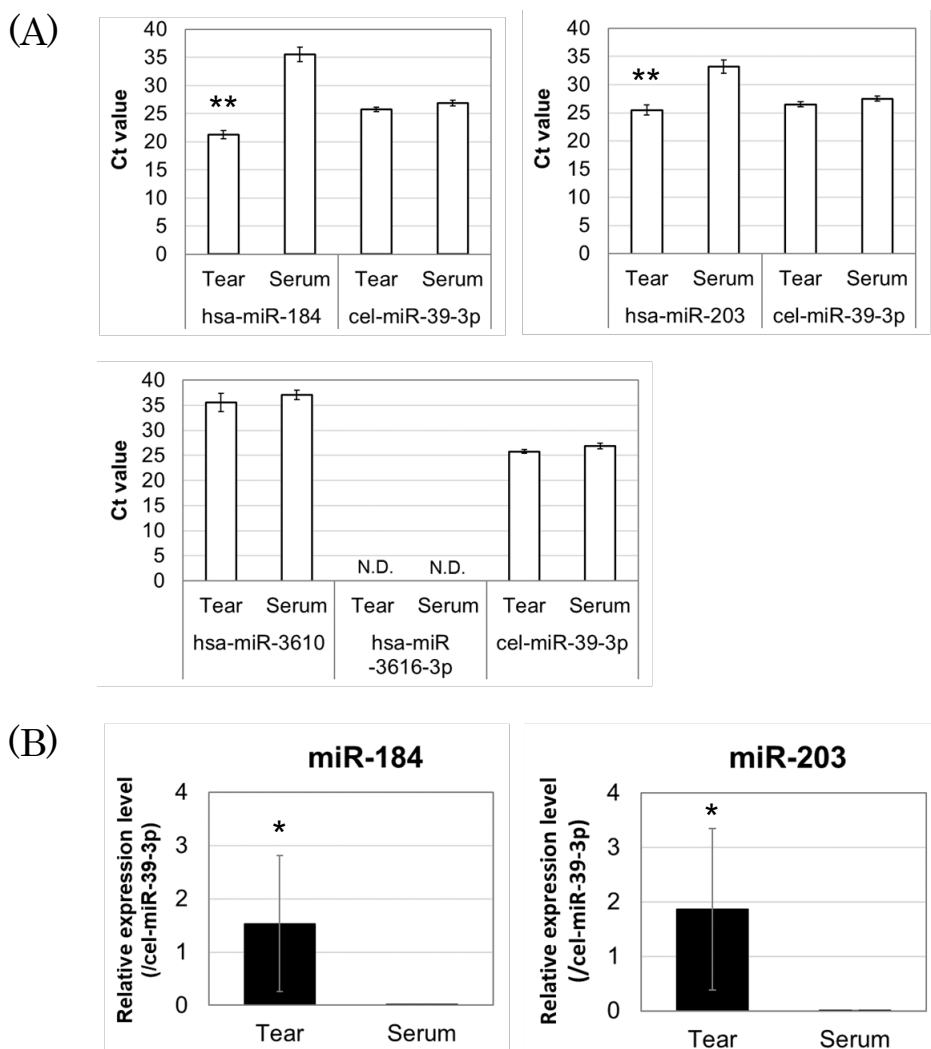


Figure 37 リアルタイム定量 PCR 法による涙液及び血清中の miRNA 発現量の検証

(A) miR-184、miR-3610、miR-203 及び cel-miR-39-3p の Ct 値を示す。miR-3610 の Ct

値は涙液と血清で有意な差は見られず、miR-3616-3p は涙液及び血清ともに検出されなかった (N.D. ; Not detected)。 (B) 涙液中の miR-184 及び miR-203 は、血清中に比べ有意に高い発現を示した。データは血清に対する涙液での相対的な miRNA 発現量の平均値±標準偏差で示した (n = 4~6、** : $p < 0.01$ 、* : $p < 0.05$ (両側 Student's *t* 検定))。

3.3.3 ヒト角膜上細胞に対する miRNA の作用の検証

血清中に比べ涙液中で発現が高い 2 種類の miRNA (miR-184 及び miR-203) の眼組織に対する機能を調査するため、ヒト角膜上皮 (HCE-T) 細胞にこれら miRNA を強制発現又は発現阻害させた場合の細胞生存率を WST アッセイにより評価した。miR-203 の類似体 (mimic) を HCE-T 細胞にトランスフェクションすると、48 時間後の細胞生存率はネガティブコントロールに比べ約 0.8 倍に減少した ($p < 0.05$ 、両側 Student's *t* 検定) (Figure 38A)。また、miR-203 の阻害剤 (inhibitor) により、HCE-T 細胞はネガティブコントロールに比べ約 1.2 倍高い細胞生存率を示した ($p < 0.05$ 、両側 Student's *t* 検定) (Figure 38B)。一方、miR-184 の mimic 及び inhibitor は、いずれも HCE-T 細胞の細胞生存率を変化させなかった (Figure 39)。

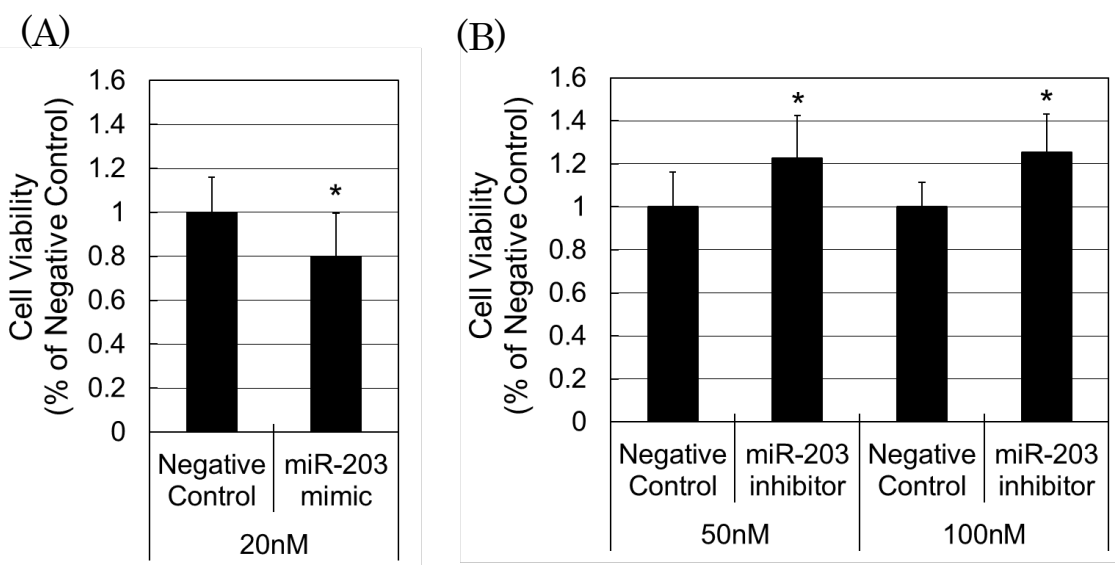


Figure 38 miR-203 の強制発現又は発現阻害による HCE-T 細胞の生存率への影響

(A) miR-203 の mimic を HCE-T 細胞にトランスフェクションして 48 時間後の細胞生存率は、ネガティブコントロールに比べ有意に減少した (n = 6)。 (B) miR-203 の inhibitor を HCE-T 細胞にトランスフェクションして 48 時間後の細胞生存率は、ネガティブコントロールに比べ有意に増加した (n = 9)。データはネガティブコントロールに対する mimic 又は inhibitor の相対的な細胞生存率の平均値±標準偏差で示した (*: $p < 0.05$ (両側 Student's *t* 検定))。

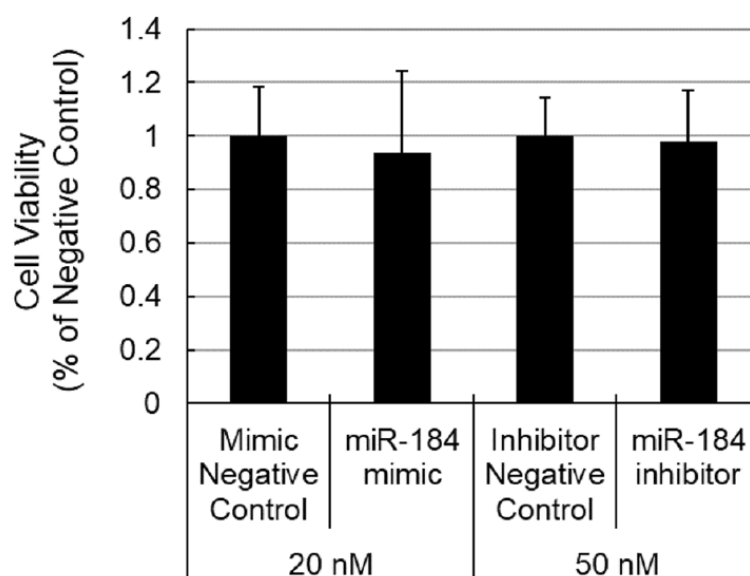


Figure 39 miR-184 の強制発現又は発現阻害による HCE-T 細胞の生存率への影響

miR-184 の mimic 又は inhibitor を HCE-T 細胞にトランスフェクションしたところ、48 時間後の細胞生存率はネガティブコントロールと差が見られなかった ($n=9$)。データはネガティブコントロールに対する mimic 又は inhibitor の相対的な細胞生存率の平均値±標準偏差で示した。

3.3.4 miR-203 の強制発現又は発現阻害による HCE-T 細胞における遺伝子発現変化の解析

miR-203 により HCE-T 細胞で発現が制御される mRNA を同定するため、miR-203 の mimic 又は inhibitor をトランスフェクションした後の HCE-T 細胞でのトランスクリプトーム解析を、DNA マイクロアレイ法により実施した。mimic 及び inhibitor のトランスフェクション後 48 時間で、HCE-T 細胞での発現量が変化する mRNA のうち、mimic と inhibitor による発現変化が相反した 10 種類を同定した (Table 3、カットオフ値：ネガティブコントロールに対する発現量比が 1.3 倍)。IGFBP5、GNAO1、CDKN2B、NUCKS1、FRAS1、TLL1 及び ARID5B は miR-203 の mimic により発現が減少し、inhibitor により発現が増加した。一方、AREG、PSTPIP2 及び NFATC2 は miR-203 の mimic により発現が増加し、inhibitor により発現が減少した。以上より、上記 10 種類の mRNA は直接あるいは間接的に miR-203 により発現が変化することが示唆された。

Table 3 miR-203 mimic 及び inhibitor により発現が変化する遺伝子 (n=3)

Gene symbol	Intensity		Fold change (/ NC)	Intensity		Fold change (/ NC)
	miR-203 Mimic	Mimic NC		miR-203 Inhibitor	Inhibitor NC	
IGFBP5	36.76	63.56	-1.72	80.45	48.50	1.66
GNAO1	38.85	72.00	-1.85	67.18	46.85	1.44
CDKN2B	58.08	95.01	-1.64	105.42	68.59	1.54
NUCKS1	48.84	83.29	-1.7	98.36	72.50	1.36
FRAS1	70.52	112.99	-1.6	126.24	90.51	1.4
TLL1	199.47	278.20	-1.39	254.23	184.82	1.37
ARID5B	120.26	160.90	-1.34	170.07	128.89	1.32
AREG	44.02	32.45	1.36	33.59	44.63	-1.33
PSTPIP2	310.83	215.27	1.45	177.29	238.86	-1.35
NFATC2	106.15	54.95	1.94	45.25	62.25	-1.38

NC: Negative control, IGFBP5: Insulin-like growth factor-binding protein 5, GNAO1: G protein subunit alpha o1, CDKN2B: Cyclin dependent kinase inhibitor 2B, NUCKS1: Nuclear casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate 1, FRAS1: Fraser extracellular matrix complex subunit 1, TLL1: Tolloid like 1, ARID5B: AT-rich interaction domain 5B, AREG: Amphiregulin, PSTPIP2: Proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 2, NFATC2: Nuclear factor of activated T cells 2

3.3.5 miR-203 のターゲット mRNA の同定

上述の DNA マイクロアレイ法の結果から、HCE-T 細胞では、miR-203 により直接あるいは間接的に 10 種類 (IGFBP5、GNAO1、CDKN2B、NUCKS1、FRAS1、TLL1、ARID5B、AREG、PSTPIP2 及び NFATC2) の mRNA の発現が変化することが明らかとなった。次に、これら 10 種類の mRNA は、miR-203 が直接結合してその発現を制御するターゲット mRNA となり得るかを、オンラインデータベースを用いて調査した。10 種類の候補ターゲット mRNA のうち、IGFBP5 及び NUCKS1 は、それぞれ 3'末端側非翻訳領域 (3' untranslated region ; 3' UTR) 内に、miR-203 の 5'末端側より 2~8 nt との相補的配列を 2 カ所保持していた (Figure 40)。

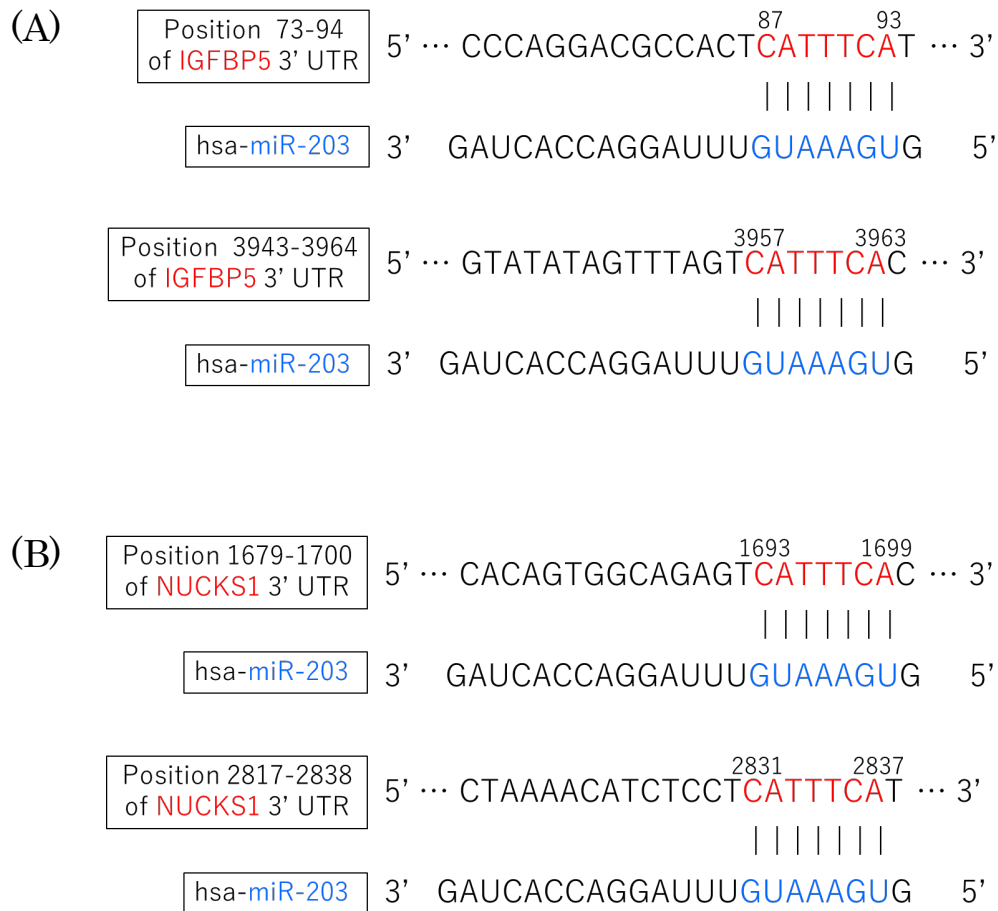


Figure 40 miR-203 と候補ターゲット mRNA との結合部位の解析

(A) IGFBP5 の 3' UTR の 87~93 bp 及び 3957~3963 bp、(B) NUCKS1 の 1693~1699 bp 及び 2831~2837 bp は、miR-203 の 5'末端側 2~8 nt と相補的な配列であることが示された (miRDB ; <http://www.mirdb.org/>)。

miR-203 mimic 及び inhibitor のトランスフェクションによる HCE-T 細胞中の IGFBP5 及び NUCKS1 の発現変化を、リアルタイム定量 PCR により解析した。トランスフェクション後 24 時間では、miR-203 mimic によりこれら 2 遺伝子の発現量はネガティブコントロールに比べ減少し、miR-203 inhibitor により発現量は増加した (Figure 41)。トランスフェクション後 48 時間では、miR-203 mimic 及び inhibitor による遺伝子発現変化量は減弱した (データ非掲載)。

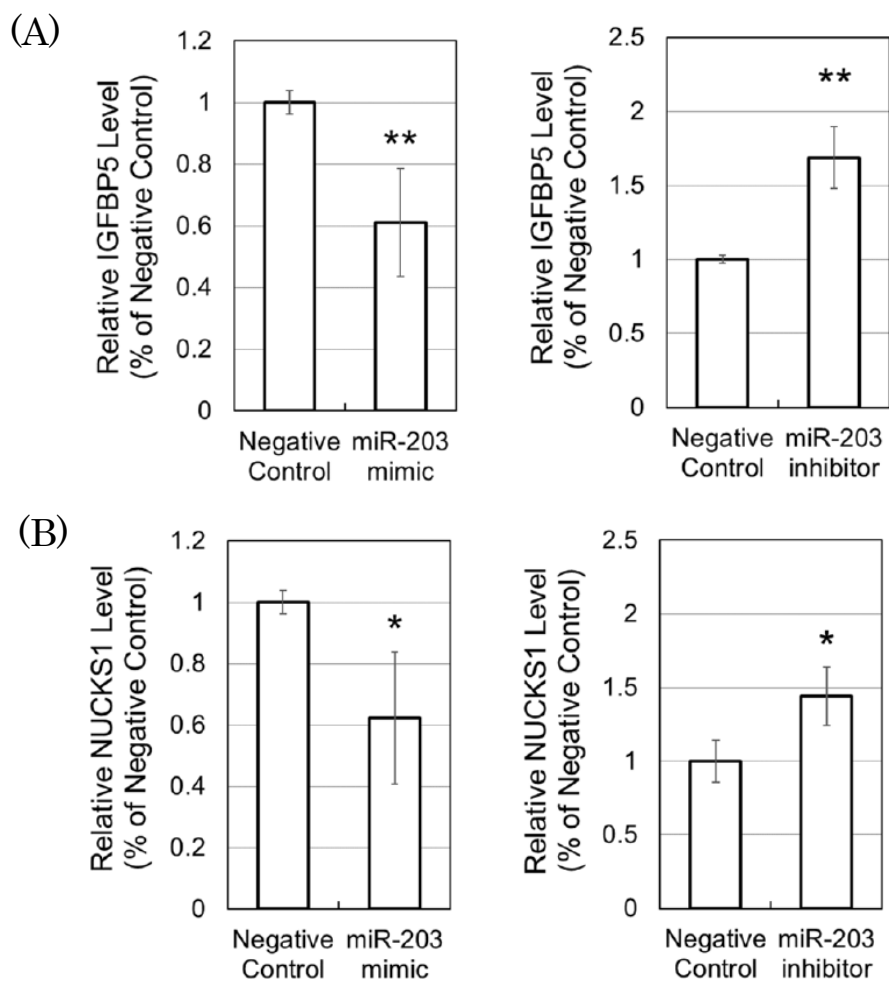


Figure 41 miR-203 mimic 及び inhibitor のトランスフェクションによる IGFBP5 及び NUCKS1 の発現変化

(A) IGFBP5 及び (B) NUCKS1 の HCE-T 細胞中の発現量は、miR-203 mimic によりネガティブコントロールに比べ有意に減少し、miR-203 inhibitor により有意に増加した。データはネガティブコントロールに対する mimic 又は inhibitor の相対的な遺伝子発現量の平均値±標準偏差で示した (n = 4、** : $p < 0.01$ 、* : $p < 0.05$ (両側 Student's t 検定))。

次に、HCE-T 細胞で IGFBP5 及び NUCKS1 をノックダウンした場合の細胞生存率への影響を評価した。IGFBP5-siRNA のトランスフェクションにより、HCE-T 細胞の細胞生存率はネガティブコントロールに比べ有意に減少した (Figure 42)。一方、NUCKS1-siRNA は細胞生存率に有意な変化をもたらさなかった。

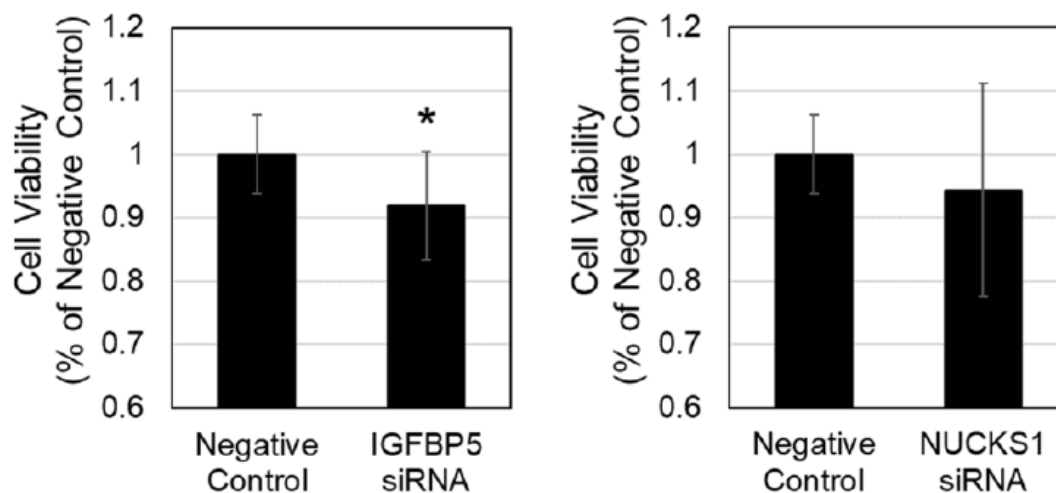


Figure 42 IGFBP5 及び NUCKS1 のノックダウンによる HCE-T 細胞の細胞生存率の変化
IGFBP5-siRNA のトランスフェクションにより、HCE-T 細胞の細胞生存率はネガティブコントロールに比べ有意に減少した。一方、NUCKS1-siRNA による細胞生存率の変化は見られなかった。データはネガティブコントロールに対する各 siRNA の相対的な細胞生存率の平均値±標準偏差で示した (n = 6、* : $p < 0.05$ (両側 Student's t 検定))。

そこで、HCE-T 細胞でのデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイにより、IGFBP5 が miR-203 の直接のターゲット遺伝子であるかを検証した。ヒト IGFBP5 の 3' UTR を含むルシフェラーゼレポータープラスミドを miR-203 mimic と同時にトランスフェクションした場合、ルシフェラーゼレポーター活性は mimic のネガティブコントロールに比べ有意に減少した (Figure 43)。このことから、miR-203 は IGFBP5 の 3' UTR に直接結合し、その発現を制御することが示された。

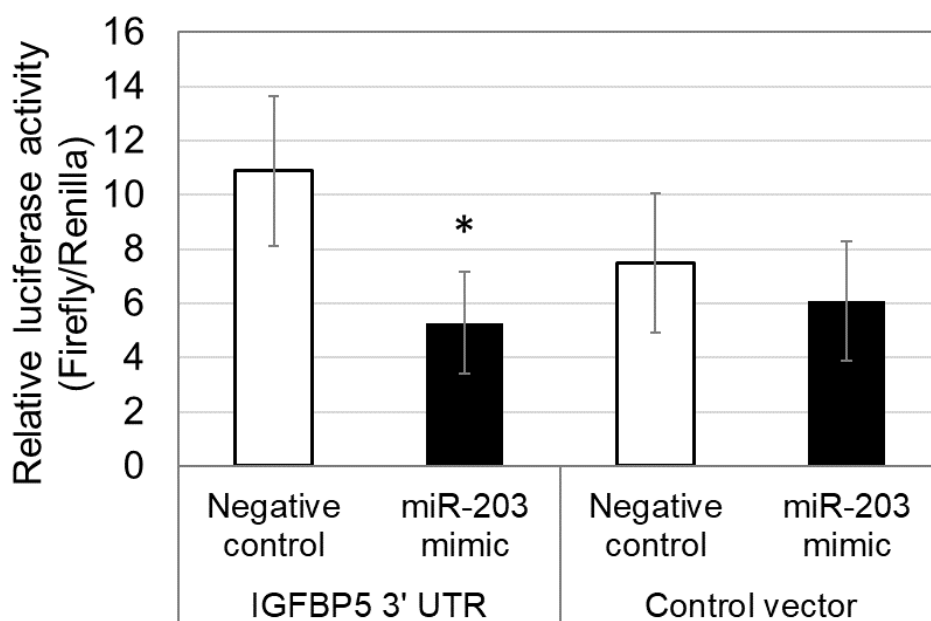


Figure 43 デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイ

ルシフェラーゼレポーター活性は、ネガティブコントロールに比べ miR-203 mimic により有意に減少した。データはウミシイタケルシフェラーゼに対するホタルルシフェラーゼの相対的なルシフェラーゼレポーター活性の平均値±標準偏差で示した (n = 3、* : $p < 0.05$ (両側 Student's t 検定))。

3.4 総括

本研究では、マイクロアレイ法により、サルの涙液中で 483 種類、血清中で 492 種類の miRNA を検出した。涙液は角膜に酸素や栄養を供給してその恒常性を維持するのに対し、血液は全身を循環して様々な器官の恒常性を維持する役割を持つ。そのため本研究では、涙液に特徴的で角膜の恒常性維持に重要な miRNA を同定するため、比較対象として血清中の miRNA プロファイルを用いた。定量 PCR 法を用いた検証により、miR-184 及び miR-203 の 2 つの miRNA は、血清に比べ涙液で高発現することが確認された。

miR-184 及び miR-203 の角膜上皮細胞との関連を調査するため、ヒト角膜上皮 (HCE-T) 細胞でそれらを強制発現又は発現阻害した。2 つの miRNA のうち、miR-203 は HCE-T 細胞の生存を制御することが示された。miR-203 の強制発現により HCE-T 細胞の生存率は約 0.8 倍に低下し、miR-203 の発現阻害により生存率は約 1.2 倍に増加した (ネガティブコントロール比)。不死化ヒト角膜上皮細胞株に標準的な増殖因子を加えた場合の増加率は約 1.5 倍であることから⁹³⁾、miR-203 inhibitor による 1.2 倍の生存率増加は意義のあるものとする。HCE-T 細胞の生存を促進する薬剤は角膜上皮創傷治癒効果を示すことから⁹⁴⁻⁹⁷⁾、miR-203 inhibitor は角膜上皮創傷に対し治療効果を示す可能性がある。

miR-203 はガン抑制因子として、また、皮膚関連 miRNA として広く知られ、様々な遺伝子を制御することで細胞増殖、分化及び転移に関わる重要な役割を持つことが報告されている⁹⁸⁾⁻¹⁰⁴⁾。皮膚においては、miR-203 は細胞の増殖能を抑制することにより、細胞の幹細胞性を抑制して表皮の分化を促進することが明らかとなっている^{102),104)}。このことから、miR-203 は角膜でも細胞増殖を抑制することで分化を制御し、増殖と分化のバランスを取ることで恒常性維持に寄与している可能性が考えられた。しかし、涙液中の miR-203 の発現レベルは血清と比較すると高いものの、他の涙液中 miRNA と比較すると高くはない。そのため、miR-203 の角膜における重要性は不明であり、更なる研究が必要である。

本研究では、HCE-T 細胞で miR-203 の発現を増加又は阻害することにより、10 種類の遺伝子発現が変動することを明らかにした。miR-203 により発現が阻害される遺伝子のうち、IGFBP5 と NUCKS1 は、それぞれの 3' UTR に miR-203 の seed 領域 (5'末端側 2~8 番目) と相同的な配列を持つことが分かった。さらに、デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイにより、IGFBP5 は miR-203 の直接のターゲット遺伝子であることが示された。IGFBP5 は、細胞増殖、遊走、又は接着に関与することが報告されている^{105),106)}。また、IGFBP5 は Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) による線維化促進機能及び前転移性の機能を阻害することで、乳腺上皮細胞の創傷治癒を促進することも報告されている¹⁰⁷⁾。本研究では、HCE-T 細胞における IGFBP5 のノックダウンにより、細胞生存率が低下することを示した。これらのことから、miR-203 は角膜上皮細胞において IGFBP5 の発現を直接制御することで細胞生存を制御することが示唆された。

一方、HCE-T 細胞における NUCKS1 のノックダウンは細胞生存率に影響しなかった。NUCKS1 は腫瘍での細胞増殖に関与することが報告されている¹⁰⁸⁾。その一方で、マウスの

角膜アルカリ障害モデルにおいて NUCKS1 の遺伝子発現を抑制すると、角膜上皮の創傷治癒が促進されることも示されている¹⁰⁹⁾。これらのことから、NUCKS1 は細胞の種類や環境によって、細胞増殖に対し異なる効果を示す可能性が考えられた。

miR-203 以外の涙液に特徴的な miRNA である miR-184 は、血清に比した涙液での発現比が miR-203 より高いにもかかわらず、HCE-T 細胞の生存率を変化させなかった。miR-184 は、角膜のリンパ脈管新生及び血管新生を抑制すると報告されている¹¹⁰⁾⁻¹¹²⁾。これらのことより、涙液中の miR-184 は炎症応答や血管新生応答を抑制することで角膜の恒常性維持に寄与する可能性が考えられた。

本研究では、正常状態の細胞に対する miR-203 の作用を評価しており、病態下での作用は不明である。Viticchie らは、マウスの表皮で創傷が起こると miR-203 の発現が抑制され、miR-203 によるターゲットの発現抑制が解除されることで、角化細胞の増殖や遊走に必要な因子の発現が増加し、創傷治癒における皮膚の再上皮化が促進されることを明らかにした¹⁰³⁾。さらに An らは、マウスの角膜上皮創傷モデルでは、角膜上皮細胞における miR-203 の発現が抑制される傾向にあることを示した⁴¹⁾。これらのことから、角膜上皮障害において miR-203 を阻害することにより、本研究で示したように角膜上皮細胞の生存が促進される可能性が示唆された。

本研究により、涙液中の miR-203 は角膜上皮細胞の生理的機能を制御する重要な因子であることを明らかにした。miR-203 inhibitor による角膜上皮細胞の細胞生存率の増加は、miR-203 の阻害が角膜上皮障害の新たな治療法となる可能性を支持し、miRNA が新たな創薬モダリティとなり得ることが期待できる。今後、miR-203 inhibitor の *in vivo* での有効性を検証することにより、miR-203 阻害による治療法の有用性を評価できると考える。さらに、体液中の miRNA は様々な疾患のバイオマーカーになり得ることが報告されている¹¹³⁾⁻¹¹⁷⁾。そのため、涙液中に特異的に、あるいは豊富に発現する miRNA は眼疾患のバイオマーカーとして有用かもしれない。今後、miR-203 以外の miRNA についても、眼組織における作用や眼疾患での発現変化を探索したい。

4. 結論

本研究では、緑内障と角膜上皮障害に対し、新たな治療薬の開発に繋げるための探索的な研究を異なるアプローチで行った。緑内障については、ラットを用いた新たな慢性高眼圧モデルを確立し、その臨床との類似性を確認した。さらに本モデルは緑内障の病態ステージを段階的に模擬していたことから、病態ステージごとに発現が増減する因子を調査することで、緑内障視神経障害の発症や進行に関わる新たな治療標的を見出せることが期待できる。角膜上皮障害については、涙液に特徴的に存在する miRNA を同定し、そのうち miR-203 は、IGFBP5 の発現を直接抑制することで角膜上皮細胞の生存を制御することを明らかにした。miR-203 inhibitor により角膜上皮細胞の生存が促進されたことから、miR-203 の阻害は角膜上皮障害の創傷治癒に有用である可能性が考えられる。

今後は、本研究を基盤として、緑内障と角膜上皮障害の治療薬開発に向けた研究を進める。緑内障では、確立した慢性高眼圧モデルを利用して網膜中の遺伝子発現変化を解析し、新たなターゲット分子を捉え、それらの緑内障神経保護に対する作用を検証する。角膜上皮障害では、miR-203 inhibitor の角膜上皮創傷治癒効果を、動物モデルを用いて検証する。以上のように本研究をさらに発展させ、眼科領域のアンメット・メディカル・ニーズに応えられる革新的な治療薬を創出し、眼科医療に貢献することを目指す。

5. 参考文献

- 1) 所 敬ら、第 1 章 解剖・発生、現代の眼科学 改訂第 12 版、金原出版、pp. 2-23 (2015).
- 2) Mariotti S. P., Global data on visual impairments 2010, World health Organization (2012).
- 3) 厚生労働省、難治性疾患克服研究事業、平成 17 年度研究報告書 (2005).
- 4) 中江 公裕ら、眼科学 日本人の視覚障害の原因 15 年前との比較、医学のあゆみ、225(8); 691-693 (2008).
- 5) 参天製薬、世界の眼科医療の概況、Annual Report 2018 (2018).
- 6) 参天製薬、眼科薬市場データ、Santen Report 2021 (2021).
- 7) 日本製薬工業協会、てきすとぶっく 2020-2021(2021).
- 8) 丸尾敏夫ら、D. 角膜、F. 緑内障、J. 網膜、K. 視神経、O. 涙腺、眼科学 第 2 版 < I >、文光堂、pp. 83-140、pp. 149-235、pp. 363-513、pp. 514-551、pp. 649-665 (2011).
- 9) Iwase A., Suzuki Y., Araie M., Yamamoto T., Abe H., Shirato S., Kuwayama Y., Mishima H. K., Shimizu H., Tomita G., Inoue Y., Kitazawa Y., Tajimi Study Group, and Japan Glaucoma Society, The Prevalence of Primary Open-Angle Glaucoma in Japanese.: The Tajimi Study, *Ophthalmol.* 111, 1641-1648 (2004).
- 10) 日本緑内障学会、緑内障診療ガイドライン第 4 版 (2018 年).
- 11) Quigley H.A., Glaucoma, *Lancet.* 377, 1367-1377 (2011).
- 12) 千寿製薬ホームページ、<http://www.senju.co.jp/>
- 13) Distanto P., Lombardo S., Vercellin A. C. V., Raimondi M., Rolando M., Tinelli C., and Milano G., Structure/Function relationship and retinal ganglion cells counts to discriminate glaucomatous damages, *BMC Ophthalmology.* 15, 185 (2015).
- 14) Medeiros F. A., Zangwill L. M., Bowd C., Mansouri K., and Weinreb R. N., The structure and function relationship in glaucoma: Implications for detection of progression and measurement of rates of change, *IOVS.* 53, 6939-6946 (2012).
- 15) 千寿製薬、アイファガン®点眼液 0.1% 医薬品インタビューフォーム第 5 版 (2016).
- 16) Kass M. A., Heuer D. K., Higginbotham E. J., Johnson C. A., Keltner J. L., Miller J. P., Parrish II R. K., Wilson M. R., and Gordon M. O., The ocular hypertension treatment study, *Arch Ophthalmol.* 120, 701-713 (2002).
- 17) Quigley H. A., Nickells R. W., Kerrigan L. A., Pease M. E., Thibault D. J., and Zack D. J., Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis, *IOVS.* 36, 774-786 (1995).
- 18) Kerrigan L. A., Zack D. J., Quigley H. A., Smith S. D., and Pease M. E., TUNEL-positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma, *Arch Ophthalmol.* 115, 1031-1035 (1997).

- 19)Doozandeh A., and Yazdani S., Neuroprotection in glaucoma, *J Ophthalmic Vis Res.* 11, 209-220 (2016).
- 20)Gao H., Qiao X., Cantor L. B., and WuDunn D., Up-regulation of brain-derived neurotrophic factor expression by brimonidine in rat retinal ganglion cells, *Arch Ophthalmol.* 120, 797-803 (2002).
- 21)Kim H. S., Chang Y. I., Kim J. H., and Park C. K., Alteration of retinal intrinsic survival signal and effect of α_2 -adrenergic receptor agonist in the retina of the chronic ocular hypertension rat, *Vis Neurosci.* 24, 127-139 (2007).
- 22)Jung K. I., Kim J. H., and Park C. K., α_2 -adrenergic modulation of the glutamate receptor and transporter function in a chronic ocular hypertension model, *Eur J Pharmacol.* 765, 274-283 (2015).
- 23)Dong C. -J., Guo Y., Agey P., Wheeler L., and Hare W. A., α_2 adrenergic modulation of NMDA receptor function as a major mechanism of RGC protection in experimental glaucoma and retinal excitotoxicity, *IOVS.* 49, 4515-4522 (2008).
- 24)Krupin T., Liebmann J. M., Greenfield D. S., Ritch R., and Gardiner S., A Randomized trial of brimonidine versus timolol in preserving visual function: Results from the low-pressure glaucoma treatment study, *Am J Ophthalmol.* 151, 671-681 (2011).
- 25)Hare W. A., WoldeMussie E., Weinreb R. N., Ton H., Ruiz G., Wijono M., Feldmann B., Zangwill L., and Wheeler L. Efficacy and safety of memantine treatment for reduction of changes associated with experimental glaucoma in monkey, II: Structural measures, *IOVS.* 45, 2640-2651 (2004).
- 26)Danesh-Meyer H. V., and Levin L. A., Perspectives neuroprotection: Extrapolating from neurologic diseases to the eye, *Am J Ophthalmol.* 148, 186-191 (2009).
- 27)Shukla S, Tavakkoli F, Singh V and Sangwan V. S., Mesenchymal stem cell therapy for corneal diseases, *Expert Opinion on Orphan Drugs.* 4, DOI:10.1080/21678707.2016.1215906 (2016).
- 28)Cwiklik L, Tear film lipid layer: A molecular level view, *Biochim Biophys Acta.* 1858, 2421-2430 (2016).
- 29)Kaya S., Schmidl D., Schmetterer L., Witkowska K. J., Unterhuber A., Aranha dos Santos V., Baar C., Garhöfer G., and Werkmeister R. M., Effect of hyaluronic acid on tear film thickness as assessed with ultra-high resolution optical coherence tomography, *Acta Ophthalmol.* 93, 439-443 (2015).
- 30)Nishida T., Nakamura M., Mishima H., and Otori T., Hyaluronan stimulates corneal epithelial migration, *Exp Eye Res.* 53, 753-758 (1991).
- 31)Tishler M., Yaron I., Shirazi I., and Yaron M., Hydroxychloroquine treatment for primary Sjögren's syndrome: its effect on salivary and serum inflammatory markers,

- Ann Rheum Dis.* 58, 253-256 (1999).
- 32) Sempere L. F., Freemantle S., Pitha-Rowe I., Moss E., Dmitrovsky E., and Ambros V., Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation, *Genome Biol.* 5, R13 (2004)
 - 33) Yuva-Aydemir Y., Simkin A., Gascon E., and Gao F. B., MicroRNA-9 Functional evolution of a conserved small regulatory RNA, *RNA Biol.* 8, 557-564 (2011).
 - 34) Guo D., Li Q., Lv Q., Wei Q., Cao S., and Gu J., MiR-27a targets sFRP1 in hFOB cells to regulate proliferation, apoptosis and differentiation, *PLoS One.* 9, e91354 (2014).
 - 35) Lewis B. P., Burge C. B., and Bartel D. P., Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets, *Cell.* 120, 15-20 (2005).
 - 36) Simonson B., and Das S., MicroRNA therapeutics: the Next Magic Bullet? *Mini Rev Med Chem.* 15, 467-474 (2015).
 - 37) Bartel D. P., MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell.* 116, 281-297 (2004).
 - 38) Ambros V., The functions of animal microRNAs, *Nature.* 431, 350-355 (2004).
 - 39) Lee S. K. -W., Teng Y., Wong H. -K., Ng T. -K., Huang L., Lei P., Choy K. -W., Liu Y., Zhang M., Lam D. S. -C., Yam G. H. -F., and Pang C. -P., MicroRNA-145 regulates human corneal epithelial differentiation, *PLoS One.* 6, e21249 (2011).
 - 40) Lin D., Halilovic A., Yue P., Bellner L., Wang K., Wang L., and Zhang C., Inhibition of miR-205 impairs the wound-healing process in human corneal epithelial cells by targeting KIR4.1 (KCNJ10), *IOVS.* 54, 6167-6178 (2013).
 - 41) An J., Chen X., Chen W., Liang R., Reinach P. S., Yan D., and Tu L., MicroRNA expression profile and the role of miR-204 in corneal wound healing, *IOVS.* 56, 3673-3683 (2015).
 - 42) Weber A. J., Kaufman P. L., and Hubbard W. C., Morphology of single ganglion cells in the glaucomatous primate retina, *IOVS.* 39, 2304-2320 (1998).
 - 43) Callaway E. M., Structure and function of parallel pathways in the primate early visual system, *J Physiol.* 566, 13-19 (2005).
 - 44) Greschner M., Shlens J., Bakolitsa C., Field G. D., Gauthier J. L., Jepson L. H., Sher A., Litke A. M., and Chichilnisky E. J., Correlated firing among major ganglion cell types in primate retina, *J Physiol.* 589, 75-86 (2011).
 - 45) Pederson, J. E. and Gaasterland, D. E., Laser-induced primate glaucoma. I. Progression of cupping, *Arch Ophthalmol.* 102, 1689-1692 (1984).
 - 46) Radius, R. L. and Pederson, J. E., Laser-induced primate glaucoma. II. Histopathology,

- Arch Ophthalmol.* 102, 1693-1698 (1984).
- 47) Hare W. A., Ton H., Ruiz G., Feldmann B., Wijono M., and WoldeMussie E., Characterization of retinal injury using ERG measures obtained with both conventional and multifocal methods in chronic ocular hypertensive primates, *IOVS.* 42, 127-136 (2001).
 - 48) Shareef S. R., Garcia-Valenzuela E., Salierno A., Walsh J., and Sharma, S. C., Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats, *Exp Eye Res.* 61, 379-382 (1995).
 - 49) Sawada A., and Neufeld A. H., Confirmation of the rat model of chronic, moderately elevated intraocular pressure, *Exp Eye Res.* 69, 525-531 (1999).
 - 50) Yu S., Tanabe T., and Yoshimura N., A rat model of glaucoma induced by episcleral vein ligation, *Exp Eye Res.* 83, 758-770 (2006).
 - 51) Ueda J., Sawaguchi S., Hanyu T., Yaoeda K., Fukuchi T., Abe H., and Ozawa H., Experimental glaucoma model in the rat induced by laser trabecular photocoagulation after an intracameral injection of india ink, *Jpn J Ophthalmol.* 42, 337-344 (1998).
 - 52) Levkovitch-Verbin H., Quigley H. A., Martin K. R., Valenta D., Baumrind L. A., and Pease M. E., Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats, *IOVS.* 43, 402-410 (2002).
 - 53) Morrison, J.C., Moore C. G., Deppmeier L. M., Gold B. G., Meshul C. K., and Johnson E. C., A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage, *Exp Eye Res.* 64, 85-96 (1997).
 - 54) Sappington R. M., Carlson B. J., Crish S. D., and Calkins D. J., The microbead occlusion model: a paradigm for induced ocular hypertension in rat and mice, *IOVS.* 51, 207-216 (2010).
 - 55) Grozdanic, S. D., Betts D. M., Sakaguchi D. S., Allbaugh R. A., Kwon Y. H., and Kardon R. H., Laser-induced mouse model of chronic ocular hypertension, *IOVS.* 44, 4337-4346 (2003).
 - 56) Mabuchi, F., Aihara, M., Mackey, M. R., Lindsey, J. D., and Weinreb, R. N., Regional optic nerve damage in experimental mouse glaucoma, *IOVS.* 45, 4352-4358 (2004).
 - 57) Chen H., Wei X., Cho K. S., Chen G., Sappington R., Calkins D. J., and Chen D. F., Optic neuropathy due to microbead-induced elevated intraocular pressure in the mouse, *IOVS.* 52, 36-44 (2011).
 - 58) Tsuruga, H., Murata, H., Araie, M. and Aihara, M., A model for the easy assessment of pressure-dependent damage to retinal ganglion cells using cyan fluorescent protein-expressing transgenic mice, *Mol Vis.* 18, 2468-2478 (2012).

- 59)Fujishiro T., Kawasaki H., Aihara M., Saeki T., Yamagishi R., Atarashi T., Mayama C., and Araie M., Establishment of an experimental ferret ocular hypertension model for the analysis of central visual pathway damage, *Sci Rep.* 4, 6501; 10.1038/srep06501 (2014).
- 60)Fortune B., Choe T. E., Reynaud J., Hardin C., Cull G. A., Burgoyne C. F., and Wang L., Deformation of the rodent optic nerve head and peripapillary structures during acute intraocular pressure elevation, *IOVS.* 52, 6651-6661 (2011).
- 61)Zhi Z., Cepurna W., Johnson E., Shen T., Morrison J., and Wang R. K., Volumetric and quantitative imaging of retinal blood flow in rats with optical microangiography, *Biomed Opt Express.* 2, 579-591 (2011).
- 62)Zhi Z., Cepurna W. O., Johnson E. C., Morrison J. C., and Wang R. K., Impact of intraocular pressure on changes of blood flow in the retina, choroid, and optic nerve head in rats investigated by optical microangiography, *Biomed Opt Express.* 3, 2220-2233 (2012).
- 63)Lee E. J., Kim T. W., Lee K. M., Lee S. H., and Kim H, Factors associated with the retinal nerve fiber layer loss after acute primary angle closure: A prospective EDI-OCT study, *PLoS One.* 12, e0168678; 10.1371/journal.pone.0168678 (2017).
- 64)Sng, C. C., See J. S., Ngo C. S., Singh M., Chan Y. H., Aquino M. C., Tan A. M., Shabana N., and Chew P. T., Changes in retinal nerve fibre layer, optic nerve head morphology, and visual field after acute primary angle closure, *Eye, (Lond).* 25, 619-625 (2011).
- 65)Liu X., Li M., Zhong Y. M., Xiao H., Huang J. J., and Kong X. Y., Damage patterns of retinal nerve fiber layer in acute and chronic intraocular pressure elevation in primary angle closure glaucoma, *Int J Ophthalmol.* 3, 152-157 (2010).
- 66)Morrison J. C., Cepurna W. O., Guo Y., and Johnson E. C., Pathophysiology of human glaucomatous optic nerve damage: insights from rodent models of glaucoma, *Exp Eye Res.* 93, 156-164 (2011).
- 67)Quigley H. A., and Addicks E. M., Regional differences in the structure of the lamina cribrosa and their relation to glaucomatous optic nerve damage, *Arch Ophthalmol.* 99, 137-143 (1981).
- 68)Wang L., Cioffi G. A., Cull G., Dong J., and Fortune B., Immunohistologic evidence for retinal glial cell changes in human glaucoma, *IOVS.* 43, 1088-1094 (2002).
- 69)Hernandez M., Rodriguez F. D., Sharma S. C., and Vecino E., Immunohistochemical changes in rat retinas at various time periods of elevated intraocular pressure, *Mol Vis.* 15, 2696-2709 (2009).
- 70)Can N., Catak O., Turgut B., Demir T., Ilhan N., Kuloglu T., and Ozercan I. H.,

- Neuroprotective and antioxidant effects of ghrelin in an experimental glaucoma model, *Drug Des Dev Ther.* 9, 2819-2829 (2015).
- 71) Kerrigan L. A., Zack D. J., Quigley H. A., Smith S. D., and Pease M. E., TUNEL-positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma, *Arch Ophthalmol.* 115, 1031-1035 (1997).
- 72) Lagos-Quintana M., Rauhut R., Yalcin A., Meyer J., Lendeckel W., and Tuschl T., Identification of tissue-specific microRNAs from mouse, *Curr Biol.* 12, 735-739 (2002).
- 73) Landgraf P., Rusu M., Sheridan R., Sewer A., Iovino N., Aravin A., Pfeffer S., Rice A., Kamphorst A. O., Landthaler M., Lin C., Socci N. D., Hermida L., Fulci V., Chiaretti S., Foà R., Schliwka J., Fuchs U., Novosel A., Müller R. U., Schermer B., Bissels U., Inman J., Phan Q., Chien M., Weir D. B., Choksi R., De Vita G., Frezzetti D., Trompeter H. I., Hornung V., Teng G., Hartmann G., Palkovits M., Di Lauro R., Wernet P., Macino G., Rogler C. E., Nagle J. W., Ju J., Papavasiliou F. N., Benzing T., Lichter P., Tam W., Brownstein M. J., Bosio A., Borkhardt A., Russo J. J., Sander C., Zavolan M., and Tuschl T., A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing, *Cell.* 129, 1401-1414 (2007).
- 74) Minami K., Uehara T., Morikawa Y., Omura K., Kanki M., Horinouchi A., Ono A., Yamada H., Ohno Y., and Urushidani T., miRNA expression atlas in male rat, *Sci Data.* 1, 140005 (2014).
- 75) Iguchi T., Sakurai K., Tamai S., and Mori K., Circulating liver-specific microRNAs in cynomolgus monkeys, *J Toxicol Pathol.* 31, 3-13 (2018).
- 76) Taniguchi K., Ito Y., Sugito N., Kumazaki M., Shinohara H., Yamada N., Nakagawa Y., Sugiyama T., Futamura M., Otsuki Y., Yoshida K., Uchiyama K., and Akao Y., Organ-specific PTB1-associated microRNAs determine expression of pyruvate kinase isoforms, *Sci Rep.* 5, 8647 (2015).
- 77) Ichii O., and Horino T., MicroRNAs associated with the development of kidney diseases in humans and animals, *J Toxicol Pathol.* 31, 23-34 (2018).
- 78) Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee J. J., and Lötvald J. O., Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells, *Nat Cell Biol.* 9, 654-659 (2007).
- 79) Inubushi S., Kawaguchi H., Mizumoto S., Kuniyama T., Baba M., Kitayama Y., Takeuchi T., Hoffman R. M., Sasaki R., Oncogenic miRNAs identified in tear exosomes from metastatic breast cancer patients, *Anticancer Res.* 40, 3091-3096 (2020).
- 80) Redis R. S., Calin S., Yang Y., You M. J., and Calin G. A., Cell-to-cell miRNA transfer: from body homeostasis to therapy, *Pharmacol Ther.* 136, 169-174 (2012).
- 81) Chen X., Liang H., Zhang J., Zen K., and Zhang C. Y., Secreted microRNAs: a new

- form of intercellular communication, *Trends Cell Biol.* 22, 125-132 (2012).
- 82)Chim S. S. C., Shing T. K. F., Hung E. C. W., Leung T., Lau T., Chiu R. W. K., and Lo Y. M. D., Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma, *Clin Chem.* 54, 482-490 (2008).
- 83)Gilad S., Meiri E., Yogevz Y., Benjamin S, Lebanony D., Yerushalmi N., Benjamin H., Kushnir M., Cholak H., Melamed N., Bentwich Z., Hod M., Goren Y., and Chajut A., Serum microRNAs are promising novel biomarkers, *PLoS One.* 3, e3148 (2008).
- 84)Park N. J., Zhou H., Elashoff D., Henson B. S., Kastratovic D. A., Abemayor E., and Wong D. T., Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection, *Clin Cancer Res.* 15, 5473-5477 (2009).
- 85)Hanke M., Hoefig K., Merz H., Feller A. C., Kausch I., Jocham D., Warnecke J. M., and Sczakiel G., A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer, *Urol Oncol.* 28, 655-661 (2010).
- 86)Zubakov D., Boersma A. W., Choi Y., van Kuijk P. F., Wiemer E. A., and Kayser M., MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation, *Int J Legal Med.* 124, 217-226 (2010).
- 87)Weber J. A., Baxter D. H., Zhang S., Huang D. Y., Huang K. H., Lee M. J., Galas D. J., and Wang K., The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids, *Clin Chem.* 56, 1733-1741 (2010).
- 88)Kenny A., Jiménez-Mateos E. M., Zea-Sevilla M. A., Rábano A., Gili-Manzanaro P., Prehn J. H. M., Henshall D. C., Ávila J., Engel T., and Hernández F., Proteins and microRNAs are differentially expressed in tear fluid from patients with Alzheimer's disease, *Sci Rep.* 9, 15437 (2019).
- 89)Kim Y. J., Yeon Y., Lee W. J., Shin U. Y., Cho H., Sung Y. K., Kim D. R., Lim H. W. and Kang M. H., Comparison of microRNA expression in tears of normal subjects and sjögren syndrome patients, *IOVS.* 60, 4889-4895 (2019).
- 90)Tamkovich S., Grigor'eva A., Eremina A., Tupikin A., Kabilov M., Chernykh V., Vlassov V., and Ryabchikova E., What information can be obtained from the tears of a patient with primary open angle glaucoma? *Clin Chim Acta.* 495, 529-537 (2019).
- 91)Chan H. W., Yang B., Wong W., Blakeley P., Seah I., Tan Q. S. W., Wang H., Bhargava M., Lin H. A., Chai C. H., Mangunkusumo E. A., Thet N., Yuen Y. S. Sethi R., Wang S., Hunziker W., Lingam G., and Su X., A pilot study on microRNA profile in tear fluid to predict response to anti-VEGF treatmentsfor diabetic macular edema, *J Clin Med.* 9, 2920 (2020).

- 92)Raga-Cervera J., Bolarin J. M., Millan J. M., Garcia-Medina J. J., Pedrola L., Abellán-Abenza J., miRNAs and genes involved in the interplay between ocular hypertension and primary open-angle glaucoma. Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis Networks, *J Clin Med.* 10, 2227 (2021).
- 93)Omoto M., Suri K., Amouzegar A., Li M., Katikireddy K. R., Mittal S. K., and Chauhan S. K., Hepatocyte growth factor suppresses inflammation and promotes epithelium repair in corneal injury, *Mol Ther.* 25, 1881-1888 (2017).
- 94)Nagai N., Ito Y., Okamoto N., and Shimomura Y., A nanoparticle formulation reduces the corneal toxicity of indomethacin eye drops and enhances its corneal permeability, *Toxicology.* 319, 53-62 (2014).
- 95)Nagai N., Fukuoka Y., Ishii M., Otake H., Yamamoto T., Taga A., Okamoto N., and Shimomura Y., Instillation of Sericin enhances corneal wound healing through the ERK pathway in rat debrided corneal epithelium, *Int J Mol Sci.* 19, 1123 (2018).
- 96)Žiniauskaitė A., Ragauskas S., Ghosh A. K., Thapa R., Roessler A. E., Koulen P., Kalesnykas G., Hakkarainen J. J., and Kaja S., Manganese(III) tetrakis(1-methyl-4-pyridyl) porphyrin, a superoxide dismutase mimetic, reduces disease severity in vitro and in vivo models for dry-eye disease, *Ocul Surf.* 17, 257-264 (2019).
- 97)Matsuda Y., Machida M., Nakagami Y., Nakajima T., and Azuma M., NFE2L2 activator RS9 protects against corneal epithelial cell damage in dry eye models, *PLoS One.* 15, e0229421 (2020).
- 98)Jin J., Deng J., Wang F., Xia X., Qiu T., Lu W., Li X., Zhang H., Gu X., Liu Y., Cao W., and Shao W., The expression and function of microRNA-203 in lung cancer, *Tumor Biol.* 34, 349-357 (2013).
- 99)Wang C., Wang X., Liang H., Wang T., Yan X., Cao M., Wang N., Zhang S., Zen K., Zhang C., and Chen X., miR-203 inhibits cell proliferation and migration of lung cancer cells by targeting PKC α , *PLoS One.* 8, e73985 (2013).
- 100)Chi Y., Jin Q., Liu X., Xu L., He X., Shen Y., Zhou Q., Zhang J., and Jin M., miR-203 inhibits cell proliferation, invasion, and migration of non-small-cell lung cancer by downregulating RGS17, *Cancer Sci.* 108, 2366-2372 (2017).
- 101)Sonkoly E., Wei T., Janson P. C., Sääf A., Lundeborg L., Tengvall-Linder M., Norstedt G., Alenius H., Homey B., Scheynius A., Ståhle M., and Pivarcsi A., MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis? *PLoS One.* 2, e610 (2007).
- 102)Lena A. M., Shalom-Feuerstein R., Rivetti di Val Cervo P., Aberdam D., Knight R. A., Melino G., and Candi E., miR-203 represses 'stemness' by repressing DeltaNp63, *Cell Death Differ.* 15, 1187-1195 (2008).
- 103)Viticchie G., Lena A. M., Cianfarani F., Odorisio T., Annicchiarico-Petruzzelli M.,

- Melino G., and Candi E., MicroRNA-203 contributes to skin re-epithelialization, *Cell Death Dis.* 3, e435 (2012).
- 104) Yi R., Poy M. N., Stoffel M., and Fuchs E., A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness', *Nature.* 452, 225-229 (2008).
- 105) Kuemmerle J. F., and Zhou H., Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5) stimulates growth and IGF-I secretion in human intestinal smooth muscle by Ras-dependent activation of p38 MAP kinase and Erk1/2 pathways, *J Biol Chem.* 277, 20563-20571 (2002).
- 106) Hyde C., Hollier B., Anderson A., Harkin D., and Upton Z., Insulin-like growth factors (IGF) and IGF-binding proteins bound to vitronectin enhance keratinocyte protein synthesis and migration, *J Invest Dermatol.* 122, 1198-1206 (2004).
- 107) Vijayan A., Guha D., Ameer F., Kaziri I., Mooney C. C., Bennett L., Sureshbabu A., Tonner E., Beattie J., Allan G. J., Edwards J., and Flint D. J., IGFBP-5 enhances epithelial cell adhesion and protects epithelial cells from TGF β 1-induced mesenchymal invasion, *Int J Biochem Cell Biol.* 45, 2774-2785 (2013).
- 108) Symonowicz K., Duś-Szachniewicz K., Woźniak M., Murawski M., Kołodziej P., Osiecka B., Jurczyszyn K., and Ziółkowski P., Immunohistochemical study of nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinase substrate 1 in invasive breast carcinoma of no special type, *Exp Ther Med.* 8, 1039-1046 (2014).
- 109) Poon M. W., Jiang D., Qin P., Zhang Y., Qiu B., Chanda S., Tergaonkar V., Li Q., Wong I. Y., Yu Z., Tse H. F., Wong D. S., and Lian Q., Inhibition of NUCKS Facilitates Corneal Recovery Following Alkali Burn, *Sci Rep.* 7, 41224 (2017).
- 110) Grimaldo S., Yuen D., Theis J., Ng M., Ecoiffier T., and Chen L., MicroRNA-184 regulates corneal lymphangiogenesis, *IOVS.* 56, 7209-7213 (2015).
- 111) Zong R., Zhou T., Lin Z., Bao X., Xiu Y., Chen Y., Chen L., Ma J. X., Liu Z., and Zhou Y., Down-regulation of microRNA-184 is associated with corneal neovascularization, *IOVS.* 57, 1398-1407 (2016).
- 112) Park J. K., Peng H., Yang W., Katsnelson J., Volpert O., and Lavker R. M., miR-184 exhibits angiostatic properties via regulation of Akt and VEGF signaling pathways, *FASEB J.* 31, 256-265 (2017).
- 113) Kosaka N., Iguchi H., and Ochiya T., Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis, *Cancer Sci.* 101, 2087-2092 (2010).
- 114) Okajima W., Komatsu S., Ichikawa D., Miyamae M., Kawaguchi T., Hirajima S., Ohashi T., Imamura T., Kiuchi J., Arita T., Konishi H., Shiozaki A., Moriumura R., Ikoma H., Okamoto K., Taniguchi H., Itoh Y., and Otsuji E., Circulating microRNA

- profiles in plasma: identification of miR-224 as a novel diagnostic biomarker in hepatocellular carcinoma independent of hepatic function, *Oncotarget*. 7, 53820-53836 (2016).
- 115) Armand-Labit V., Meyer N., Casanova A., Bonnabau H., Platzer V., Tournier E., Sansas B., Verdun S., Thouvenot B., Hilselberger B., Doncescu A., Lamant L., Lacroix-Triki M., Favre G., and Pradines A., Identification of a circulating MicroRNA profile as a biomarker of metastatic cutaneous melanoma, *Acta Derm Venereol*. 96, 29-34 (2016).
- 116) Zhou Y., Wang X., Zhang Y., Zhao T., Shan Z., and Teng W., Circulating MicroRNA profile as a potential predictive biomarker for early diagnosis of spontaneous abortion in patients with subclinical hypothyroidism, *Front Endocrinol (Lausanne)*. 9, 128 (2018).
- 117) Santamaria-Martos F., Benítez I., Ortega F., Zapater A., Giron C., Pinilla L., Pascual L., Cortijo A., Dalmases M., Fernandez-Real J. M., Barbé F., and Sánchez-de-la-Torre M., Circulating microRNA profile as a potential biomarker for obstructive sleep apnea diagnosis, *Sci Rep*. 9, 13456 (2019).

6. 研究業績

6.1 原著論文

Nakagawa A., Sakai O., Tokushige H., Fujishiro T., and Aihara M., Development and characterization of a new rat ocular hypertension model induced by intracameral injection of conjunctival fibroblasts, *Scientific Reports*, 2019 Apr, 9(1):6593, doi:10.1038/s41598-019-43048-2.

(本文 2 項「結膜線維芽細胞の前房内注入によるラット慢性高眼圧モデルの確立及び病態解析」に関する論文)

Nakagawa A., Nakajima T., and Azuma M., Tear miRNA expression analysis reveals miR-203 as a potential regulator of corneal epithelial cells, *BMC Ophthalmology*, 2021 Oct, 21(1):377, doi:10.1186/s12886-021-02141-9.

(本文 3 項「涙液に特徴的な microRNA の同定とその角膜上皮細胞に対する作用の解明」に関する論文)

Nakagawa A., Moriya K., Arita M., Yamamoto Y., Kitamura K., Ishiguro N., Kanzaki T., Oka T., Makabe K., Kuwajima K., and Yohda M., Dissection of the ATP-dependent conformational change cycle of a group II chaperonin, *Journal of Molecular Biology*, 2014 Jan, 426(2), 447-459, doi: 10.1016/j.jmb.2013.09.034.

Sekiguchi H., Nakagawa A., Moriya K., Makabe K., Ichianagi K., Nozawa S., Sato T., Adachi S., Kuwajima K., Yohda M., and Sasaki Y. C., ATP dependent rotational motion of group II chaperonin observed by X-ray single molecule tracking, 2013 May, *PLoS One*, 8(5), e64176, doi: 10.1371/journal.pone.0064176.

Kanzaki T., Ushioku S., Nakagawa A., Oka T., Takahashi K., Nakamura T., Kuwajima K., Yamagishi A., and Yohda M., Adaptation of a hyperthermophilic group II chaperonin to relatively moderate temperatures, *Protein Engineering, Design and Selection*, 2010 May, 23(5), 393-402, doi: 10.1093/protein/gzq010.

6.2 レター論文

中川 あゆみ、井上 晃子、貞本 和代、香西 聖子、根本 真吾、倉田 昌明、酒井 修、徳重 秀樹、イヌの眼圧下降に対する 0.005%ラタノプロスト点眼液の有用性の評価、*比較眼科学研究*、38 巻、2019 年 12 月、9-13 頁。

6.3 国際学会発表

Nakagawa A., Nakajima T., and Azuma M., miRNA-203 regulates proliferation in cultured human corneal epithelial cells, *ARVO 2015 Annual Meeting*, 2015.5.3-7 (Denver, Colorado, USA).

Nakagawa A., Sakai O., Tokushige H., Fujishiro T., and Aihara M., Development and characterization of a new rat chronic ocular hypertension model, *ARVO 2016 Annual Meeting*, 2016.5.1-5 (Seattle, Washington, USA).

Nakagawa A., Sakai O., Tokushige H., Fujishiro T., and Aihara M., Development of a new rat glaucoma model for analysis of mechanisms for retinal ganglion cell loss, *The 7th World Glaucoma Congress*, 2017.6.28-7.1 (Helsinki, Finland).

6.4 特許

千寿製薬株式会社、中川 あゆみ、中嶋 毅、東 光佳、角膜上皮障害治療剤、特許第 6377618 号、2018 年 8 月。

SENJU PHARMACEUTICAL CO., LTD., Nakagawa A., Nakajima T., and Azuma M., THERAPEUTIC AGENT FOR CORNEAL EPITHELIAL DISORDER, Patent No. US 9,562,231 B2, 2017 Feb.

SENJU PHARMACEUTICAL CO., LTD., Nakagawa A., Nakajima T., and Azuma M., THERAPEUTIC AGENT FOR ECTOCORNEA INJURY, International publication No. WO/2015/030078 A1, 2015 Mar.

SENJU PHARMACEUTICAL CO., LTD., Nakagawa A., Nakajima T., and Azuma M., THERAPEUTIC AGENT FOR ECTOCORNEA INJURY, Patent No. EP 3 040 084 A1, 2016 Jul.

謝辞

本論文を結ぶにあたり、研究を遂行する上でご指導とご鞭撻をいただいた方々に深く感謝いたします。

東京農工大学工学府生命工学専攻 教授 養王田 正文先生には、大学学部学生と修士学生時代より多大なるご指導をいただき、この度も指導教官として本研究を進める上で暖かいご指導とご鞭撻をいただきましたこと、深く感謝申し上げます。同専攻 教授 中村 暢文先生、教授 斉藤 美佳子先生、准教授 篠原 恭介先生、准教授 モリ テツシ先生には、学位審査の上で多角的なご意見をいただきましたこと、心より感謝申し上げます。研究室での発表の場などにおいては、同専攻 教授 野口 恵一先生、助教 福谷 洋介先生に貴重なご助言をいただきました。心より感謝申し上げます。

東京大学医学部眼科学教室 教授 相原 一先生、同教室 助教 藤代 貴志先生には、ラット慢性高眼圧モデルに関する研究の構想から論文作成に至るまで、暖かいご指導と貴重なご助言をいただきました。深く感謝申し上げます。

千寿製薬株式会社 東 光佳取締役、同社オキュラーサイエンス研究所創薬開発研究室 中嶋 毅室長には、miRNA に関する研究の構想から論文作成に至るまで、忍耐強くご指導とご鞭撻をいただきました。厚くお礼申し上げます。同社研究開発本部開発部 徳重 秀樹部長、同社事業戦略本部 新規事業企画室 酒井 修新規事業専任マネージャーには、本学位論文をまとめる機会を与えていただき、ラット慢性高眼圧モデルに関する研究の構想から論文作成に至るまで、暖かいご指導とご支援をいただきました。厚くお礼申し上げます。同社研究開発本部総合研究所 磯脇 明治所長、同研究所薬理グループ 羽仁 俊夫グループマネージャーには、本研究の遂行にあたり多大なるご支援をいただきました。厚くお礼申し上げます。薬理グループをはじめとする総合研究所の皆様には、日頃より業務においてご指導をいただき、本研究遂行にあたっては多大なるご協力をいただきました。心より感謝申し上げます。

ここに記しきれない多くの方々の学恩やご支援、ご激励によって本研究が成立していることを銘記し、深く感謝いたします。

最後に、これまで温かく見守り、応援してくれた家族に感謝します。

2022年3月

永松（中川） あゆみ

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Development and characterization of a new rat ocular hypertension model induced by intracameral injection of conjunctival fibroblasts

Ayumi Nakagawa¹, Osamu Sakai¹, Hideki Tokushige¹, Takashi Fujishiro² & Makoto Aihara^{1,2} 

Glaucoma is a chronic optic neuropathy that leads to visual field loss. Elucidating the mechanisms underlying glaucoma is essential for developing new treatments, such as neuroprotective drugs. Various glaucoma models based on the induction of intraocular pressure (IOP) elevation have been established for use in glaucoma studies. However, the time-dependent pathological changes accompanying IOP elevation have not been fully elucidated. In this study, rat conjunctival fibroblasts were injected into the anterior chamber of rat eyes, and IOP elevation was induced for 28 days. Glaucomatous signs such as optic nerve head cupping, retinal thinning, glial activation and apoptotic signaling in the retina were obvious in the cell-injected eyes on the 14th day after injection. The pattern of retinal ganglion cell (RGC) loss differed by the magnitude of IOP elevation. The number of RGCs decreased by 37.5% in eyes with IOP lower than 50 mmHg (Under-50) and by 88.0% in those with IOP higher than 50 mmHg (Over-50) 28 days after cell injection. The RGC counts were correlated with IOP in the Under-50 group but not in the Over-50 group. Our model may contribute to the investigation of pathogenic mechanisms of glaucoma and the development of new glaucoma treatments.

Glaucoma is a chronic degenerative optic neuropathy characterized by retinal ganglion cell (RGC) dysfunction, and it is a leading cause of visual field loss and irreversible blindness. Multiple and complex risk factors influence the development and progression of glaucoma. Elevated intraocular pressure (IOP) is one of the critical risk factors for glaucomatous optic neuropathy, and currently, the only evidence-based treatment for glaucoma is the lowering of IOP by pharmacological and surgical therapies^{1,2}. IOP elevation causes optic nerve damage at the lamina cribrosa³, but the progression of optic nerve damage and the mechanism of RGC loss are not fully understood⁴. Thus, a chronic ocular hypertension (COH) model is essential for studying the pathophysiology of glaucoma^{5,6}. Moreover, COH models are required for identifying therapeutic targets for not only IOP-lowering drugs but also neuroprotective drugs, as well as for the evaluation of neuroprotective drugs^{7–9}.

To date, various COH models have been established in monkeys^{10–12}, rats¹³ and mice^{14–17} to investigate the molecular mechanisms underlying glaucomatous optic neuropathy progression. Monkey models of COH have particular advantages because the ocular anatomy is similar between monkeys and humans. However, preparing samples from a large number of monkeys is a challenging task. Although rodent models have some advantages over monkey models in experiments, some models require special devices or advanced techniques to induce IOP elevation. Therefore, establishing a new rodent model through a simple procedure would be helpful for the advancement of glaucoma research.

We previously reported a method for developing a COH model in ferrets¹⁸. In this model, conjunctival fibroblasts obtained from ferrets were injected into the anterior chamber of ferret eyes. The injected conjunctival fibroblasts accumulated at the angle of the anterior chamber and occluded the outflow, resulting in IOP elevation followed by an increase in optic nerve head (ONH) cupping and degeneration of axon in the optic nerve. This damage in the ferret COH model resembles the clinical pathogenesis of glaucoma. However, ferrets are difficult to handle and house. Nevertheless, ferrets are often used for visual-pathway investigations because they have binocular vision. Rats are easy to use in preclinical studies and have been extensively employed in glaucoma

¹Central Research Laboratories, Senju Pharmaceutical Co., Ltd., 6-4-3, Minatojima-Minamimachi, Chuoku, Kobe, Hyogo, 650-0047, Japan. ²Department of Ophthalmology, University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo, Tokyo, 113-8655, Japan. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.A. (email: aihara-ky@umin.net)

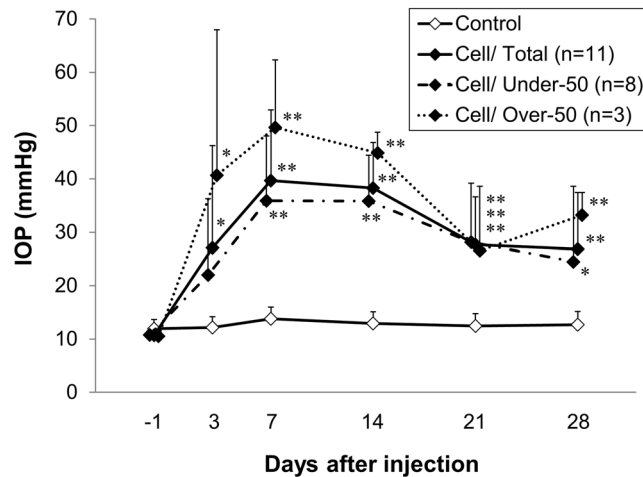


Figure 1. IOP profiles in eyes after cell injection and in control eyes. IOP elevation was first observed 3 days after cell injection and persisted for 28 days. The IOP values across all cell-injected eyes were 27.1 ± 19.1 , 39.7 ± 13.3 , 38.3 ± 8.5 , 27.7 ± 8.9 , and 26.9 ± 10.5 mmHg on the 3rd, 7th, 14th, 21st, and 28th day, respectively, after cell injection ($n = 11$). IOP was lower than 50 mmHg (Under-50) in 8 and higher than 50 mmHg (Over-50) in 3 of the 11 cell-injected eyes. Data are presented as the mean \pm S.D. (mmHg). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the control (medium-injected) group ($n = 8$) (two-tailed Student's t -test).

experiments⁶. In this study, we adapted the technique of intracameral fibroblast injection to rats and developed a simple model of COH that mirrored the pathology in human glaucoma.

Few studies have reported the time-dependent pathological changes, particularly the initial response, in glaucoma models. Thus, information regarding the time course of the neurological and morphological changes accompanying IOP elevation is limited. Therefore, we studied multiple pathological changes in our rat model at several time points. Furthermore, open angle glaucoma (OAG), which is the most common type of glaucoma, is characterized by long-term optic nerve neuropathy with a slow rate of progression. Animal models that display long-term IOP elevation but not abnormally high IOP are required to mimic the clinical pathology of OAG. However, the pathology in some experimental COH models differs from that in COH patients because those models are exposed to IOP values higher than 50 mmHg, leading to ischemic optic neuropathies such as acute primary angle closure (APAC)¹⁹. In this study, we also investigated the relationship between retinal morphological changes and the magnitude of IOP elevation and evaluated the pathological similarity between our model and glaucoma patients.

Results

Intraocular pressure (IOP). In this study, IOP was elevated in 39 of 55 eyes (70.9%) that were injected with conjunctival fibroblasts (i.e., the IOP difference between baseline and post-injection was higher than 10 mmHg) but not elevated (IOP differences consistently lower than 10 mmHg) in the remaining 16 injected eyes (29.1%). Animals without IOP elevation were excluded from the data analysis. Figure 1 shows IOP profiles for 28 days in the cell-injected eyes ($n = 11$) and in the medium-injected control eyes ($n = 8$). The mean IOP values were significantly higher in the cell-injected eyes than in the control (medium-injected) eyes 3 days after cell injection (27.1 ± 19.1 mmHg vs 12.2 ± 2.0 mmHg, $p = 0.04$, two-tailed Student's t -test). The mean IOP values in the injected eyes reached its maximum value (39.7 ± 13.3 mmHg) 7 days after cell injection and was 26.9 ± 10.5 mmHg 28 days after injection. The IOP was lower than 50 mmHg in 8 of the 11 cell-injected eyes (the "Under-50" group: eyes consistently showing IOP lower than 50 mmHg throughout the measurement period) and higher than 50 mmHg in the remaining 3 eyes (the "Over-50" group: eyes showing IOP higher than 50 mmHg at least once during the measurement period). The mean IOP values in the Under-50 group were similar to those in the whole group of injected eyes. Conversely, the mean IOP values of eyes in the Over-50 group were 40.7 ± 27.3 , 49.7 ± 12.7 , 44.9 ± 3.9 , 26.6 ± 12.0 , and 33.2 ± 4.2 mmHg on the 3rd, 7th, 14th, 21st, and 28th day after cell injection, respectively. Overall, 11 eyes had an IOP higher than 50 mmHg on the 3rd or 7th day after cell injection, and it constituted 28.2% of the total number of eyes (39 eyes) with elevated IOP. An IOP higher than 50 mmHg may cause ischemic optic neuropathy, which differs from chronic glaucomatous optic neuropathy in OAG. Therefore, we compared the number of RGCs between the Over- and Under-50 groups using the following tests.

Slit-lamp examination. Injected cells accumulated on the corneal endothelium and anterior synechiae developed in eyes with elevated IOP. These observations were confirmed from 3 to 28 days after cell injection (Fig. 2a). There were no abnormal findings in the control (medium-injected) eyes.

Histological analysis of eyeballs. To characterize the morphological changes after cell injection, we performed histological analysis on some eyes from the Under-50 group ($n = 2-3$). The size of the eyes with elevated IOP started to increase 7 days after cell injection (Fig. 2b). The angle was completely occluded due to the adhesion of the iris to the cornea (Fig. 2c) and ONH cupping was increased (Fig. 2d) in the eyes with elevated IOP.

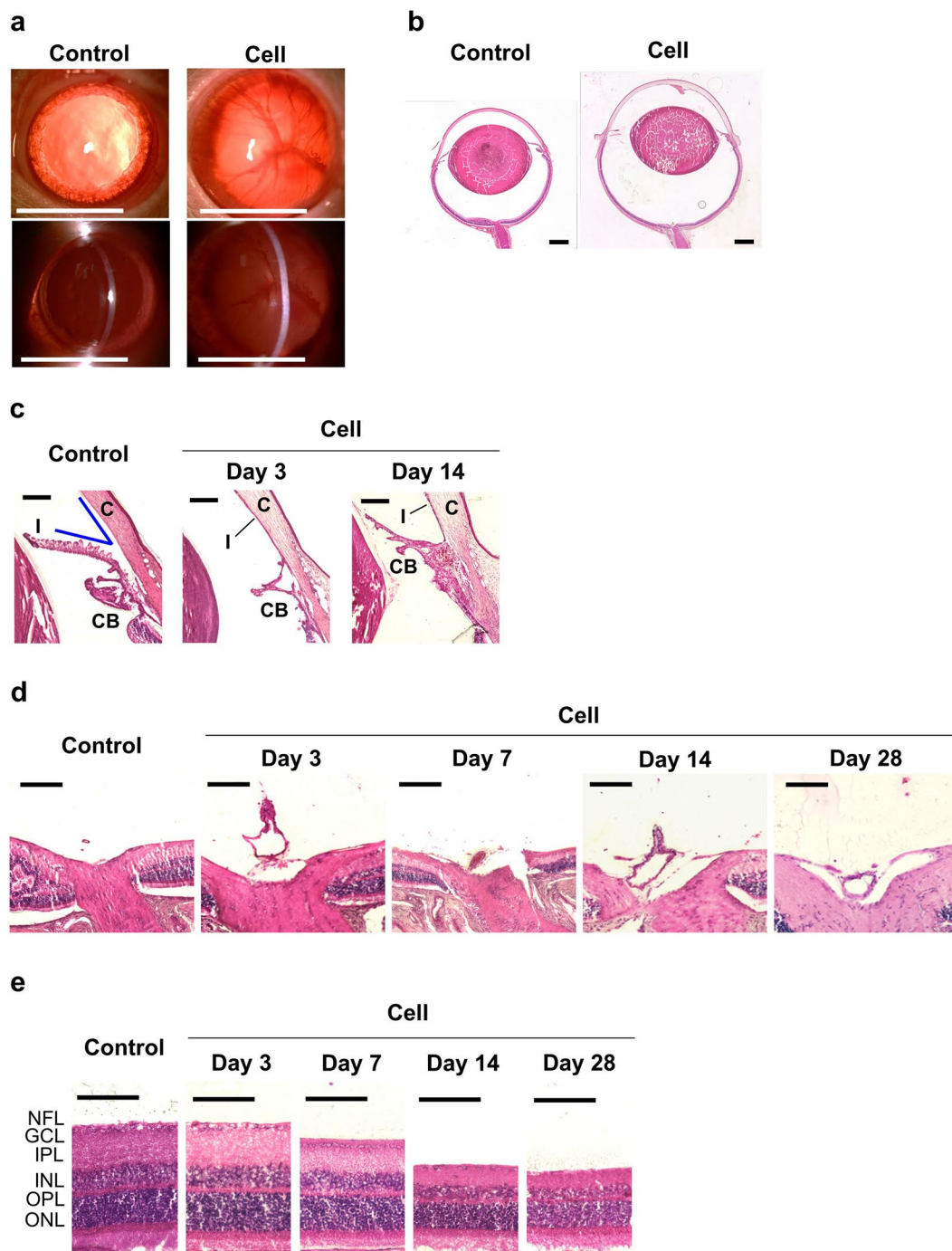


Figure 2. Histological analysis of the Under-50 group and the control group. Representative images of control eyes and Under-50 eyes on the 14th day (a,b), the 3rd and 14th day (c), or the 3rd, 7th, 14th, and 28th day after cell injection (d,e). (a) Slit-lamp examination of the anterior chamber of eyes under mydriasis. Cell accumulation in the anterior chamber and anterior synechiae was observed in the injected eyes from the 3rd to the 28th day after cell injection. Scale bars represent 5 mm. (b) Histological micrographs of hematoxylin and eosin (HE)-stained eyeballs. The cell-injected eyes gradually increased in size starting 7 days after the injection. Scale bars represent 1 mm. (c) Angle closure and (d) increase in optic nerve head cupping were observed 3 days after cell injection. Scale bars represent 200 μ m. (e) Histological micrographs of retinal sections located 2 mm away from the optic nerve head. The retinal thickness in the Under-50 group decreased from 7 to 28 days after cell injection. Scale bars represent 100 μ m. C, cornea; I, iris; CB, ciliary body; NFL, nerve fiber layer; GCL, ganglion cell layer; IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; ONL, outer nuclear layer.

beginning 3 days after cell injection. Moreover, the thicknesses of the nerve fiber layer (NFL) and the inner plexiform layer (IPL) decreased 7 days after cell injection, and thinning of the retina, including the inner nuclear layer (INL) and the outer nuclear layer (ONL), was observed 14 and 28 days after cell injection (Fig. 2e).

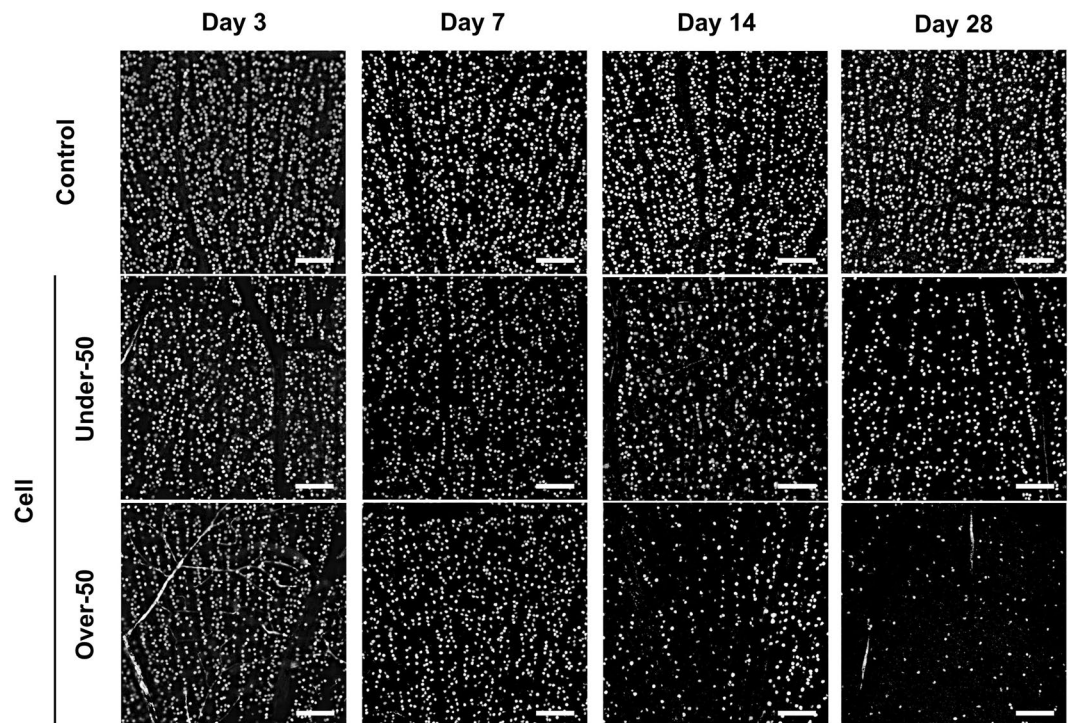


Figure 3. Representative micrographs of RGCs in retinal field. Representative micrographs showing RGCs located 1 mm away from the optic nerve head. BRN3A-positive RGCs were identified on flat-mounted retinae. The number of RGCs decreased in the injected eyes. In the Over-50 group, the numbers of RGCs were notably lower 14 and 28 days after cell injection than the numbers in the Under-50 group. Scale bars represent 100 μm .

Quantitative analysis of RGCs. BRN3A is specifically expressed in the nuclei of ganglion cells; thus, BRN3A-positive cells were counted as RGCs (Fig. 3). The number of BRN3A-positive cells decreased in a time-dependent manner in the Under-50 group, whereas in the Over-50 group, the number of BRN3A-positive cells markedly decreased from 14 days after cell injection onward. The overall mean number of RGCs on the 3rd, 7th, 14th, and 28th day after the induction of IOP elevation was 2790 ± 336 , 2211 ± 286 , 1361 ± 743 , and 998 ± 764 cells/ mm^2 ($n = 5-9$), respectively, in all eyes with elevated IOP, and 3128 ± 240 , 2798 ± 170 , 2803 ± 160 , and 2677 ± 110 cells/ mm^2 ($n = 5-6$), respectively, in control (medium-injected) eyes (Fig. 4a). The RGC counts were significantly lower in the injected eyes at 7, 14, and 28 days after cell injection than those in the control eyes ($p = 0.0013$, 0.0012 , and 0.0009 , respectively, two-tailed Student's *t*-test). The rates of RGC loss on the 3rd, 7th, 14th, and 28th day after cell injection were 10.8%, 21.0%, 51.4%, and 62.7%, respectively. RGC counts at 3, 7, 14, and 28 days after cell injection were 2846 ± 330 , 2158 ± 306 , 1719 ± 419 , and 1673 ± 166 cells/ mm^2 ($n = 2-7$) in the Under-50 group and 2455 , 2395 ± 57 , 1123 ± 896 , and 323 ± 248 cells/ mm^2 ($n = 1-3$) in the Over-50 group, respectively (Fig. 4b). Thus, the RGC numbers were significantly lower in the Over-50 group than in the Under-50 group at 28 days after cell injection ($p < 0.01$, two-tailed Student's *t*-test). The rates of RGC loss on the 3rd, 7th, 14th, and 28th days after cell injection were 9.0%, 22.9%, 38.7%, and 37.5% in the Under-50 group and 21.5%, 14.4%, 59.9%, and 88.0% in the Over-50 group, respectively.

Correlation analysis between the number of RGCs and IOP change. RGC counts in the cell-injected eyes were compared to those in the contralateral (noninjected) normal eyes for each animal and expressed as a percentage of the RGC count of the cell-injected eyes. This percentage of RGCs showed a tendency toward a negative correlation with the area under the curve (AUC) of IOP change 14 days after cell injection (Under-50 group: $n = 3$, $r = -0.8359$, $p = 0.3699$; Over-50 group: $n = 3$, $r = -0.9473$, $p = 0.2076$) (Fig. 5a). On the 28th day after cell injection, there was an apparent negative correlation between the percentage of RGCs and the AUC of IOP in the Under-50 group ($n = 9$, $r = -0.9308$, $p < 0.001$) (Fig. 5b). In contrast, there was no negative correlation between the percentage of RGCs and the AUC of IOP in the Over-50 group ($n = 3$, $r = 0.5278$, $p = 0.6460$), and the number of RGCs showed an obvious reduction.

TUNEL assay of retinal cells. TUNEL assays were performed to investigate how RGC loss was induced after cell injection. TUNEL-positive cells were observed in the ganglion cell layer (GCL), INL, and ONL 14 days after cell injection in the Under-50 group (Fig. 6a). However, the number of TUNEL-positive cells decreased by 28 days after cell injection.

Immunostaining for glial fibrillary acidic protein (GFAP) in retinal cells. To detect the activation of glial cells, a typical sign of glaucomatous neuropathic damage, we evaluated the induction of GFAP expression

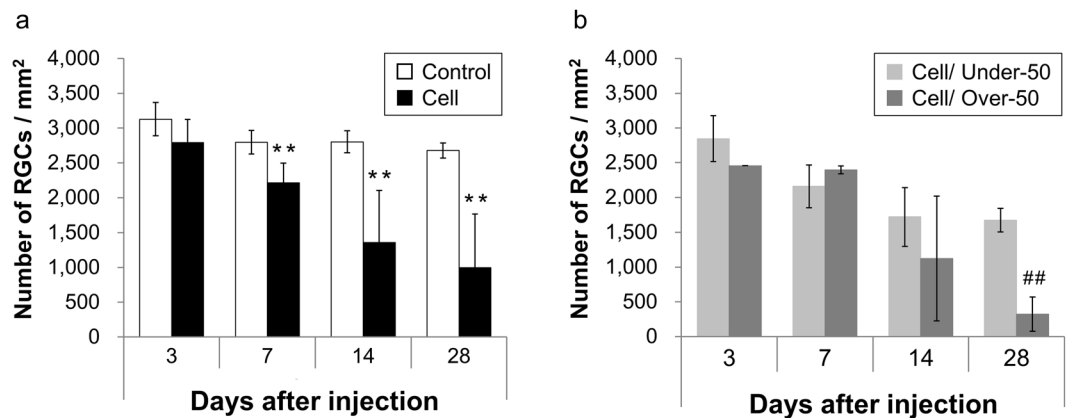


Figure 4. Quantitative analysis of RGCs. (a) Overall, the number of RGCs in the cell-injected eyes decreased by 10.8%, 21.0%, 51.4%, and 62.7% of that in the control group 3, 7, 14, and 28 days after cell injection, respectively. Data are presented as the mean \pm S.D. ($n = 5-9$). ** $p < 0.01$ compared with the control group (two-tailed Student's t -test). (b) The number of RGCs in the Over-50 group was significantly decreased relative to that in the Under-50 group 28 days after cell injection. Data are presented as the mean \pm S.D. ($n = 1-7$). ## $p < 0.01$ compared with the Under-50 group (two-tailed Student's t -test).

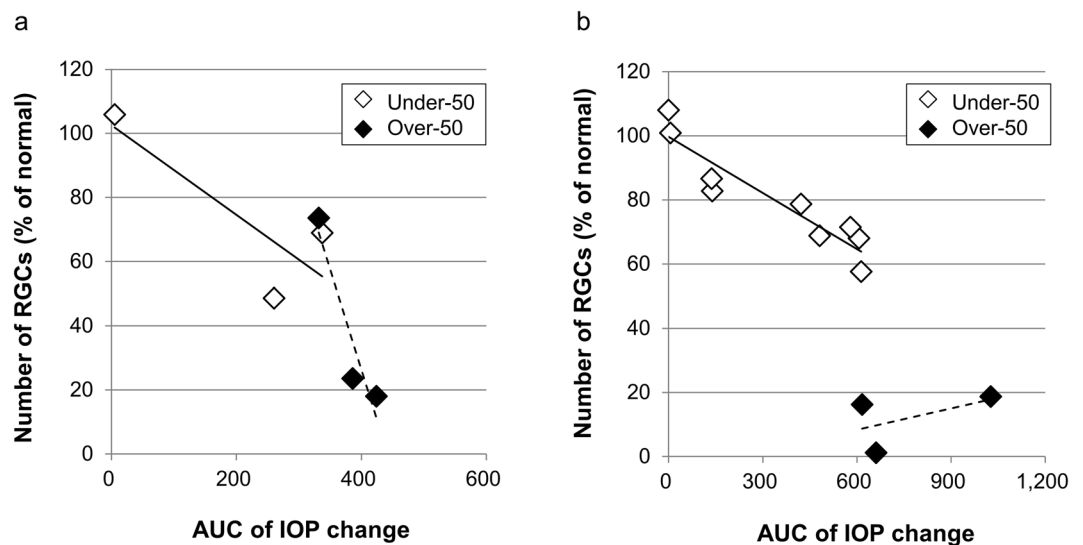


Figure 5. The correlation between RGC loss and area under the curve (AUC) of IOP change. The number of RGCs 14 days (a) and 28 days (b) after cell injection showed a negative correlation with the AUC of IOP change from baseline, except in the Over-50 group 28 days after cell injection.

in retinae. Positive staining for GFAP was restricted to the GCL, co-localizing with astrocytes, in control eyes (Fig. 6b), but GFAP was expressed in Müller glial cells throughout the GCL, IPL, and INL in the injected eyes of the Under-50 group 7 days after cell injection and was present in all retinal layers, reaching its highest level, 14 days after cell injection. GFAP expression was attenuated 28 days after cell injection.

Discussion

COH models have been developed in several animal species, and rat COH models, in particular, are widely studied because rats are easy to use in large numbers of experiments in preclinical settings. The techniques used in establishing these models include episcleral vein cauterization²⁰ and ligation^{13,21}, trabecular meshwork laser photocoagulation^{22,23}, episcleral and limbal vein laser photocoagulation²³, hypertonic saline injection into the episcleral vein²⁴ and intracameral injection of microbeads²⁵. In some cases, however, it is technically difficult to induce IOP elevation. Furthermore, few reports have demonstrated the pathological changes in their models sequentially. Thus, we developed a new COH model and performed a time-course analysis using the model.

In this study, we developed a rat COH model using a method that we previously established in ferrets¹⁸. The idea of intracameral injection of conjunctival fibroblasts is based on the clinical occurrence of epithelial down-growth into the anterior chamber, which has often been observed during invasive ocular surgery with a wide

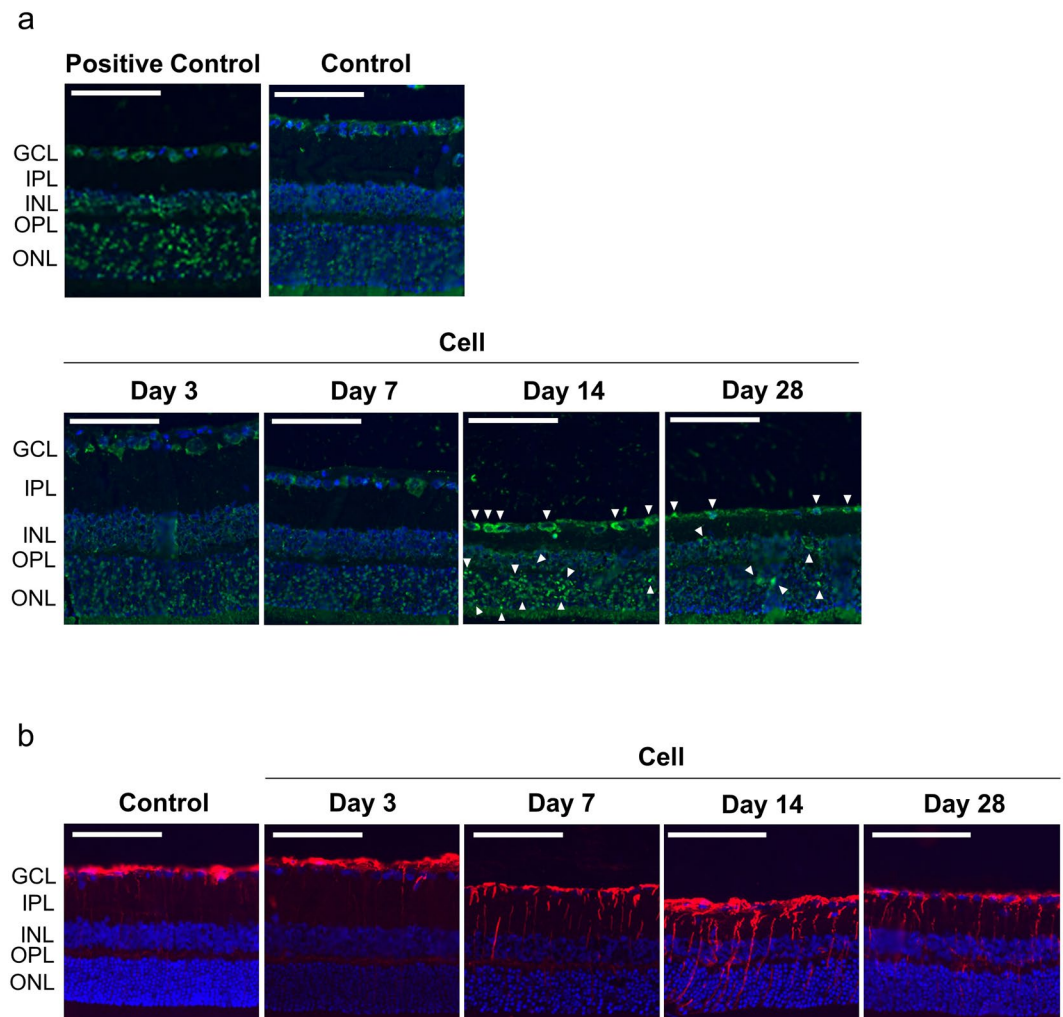


Figure 6. TUNEL and immunostaining for GFAP in retinal cells. Representative images of TUNEL-stained and GFAP-immunostained retinal sections 2 mm away from the optic nerve head. **(a)** TUNEL positivity was observed in the GCL, INL, and ONL of retinae in the injected eyes 14 days after cell injection (arrow heads) but decreased by 28 days after the injection. Positive controls were treated with DNase I to induce DNA fragmentation. Nuclei of cells were stained with DAPI (blue). Scale bars represent 100 μ m. **(b)** GFAP positivity (red) was only observed in the GCL in control eyes. However, GFAP expression gradually extended throughout the retina from the GCL to ONL starting on the 7th day after cell injection, and it reached a peak 14 days after the injection. GFAP expression decreased by the 28th day after the injection. Nuclei of the cells were stained with DAPI (blue). Scale bars represent 100 μ m. GCL, ganglion cell layer; IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; ONL, outer nuclear layer.

corneal incision. Intracameral injection of conjunctival fibroblasts into the rat anterior chamber induced significant IOP elevation, relative to that in control eyes, 3 days after cell injection. The peak IOP was reached on the 7th day, and IOP remained at higher-than-normal levels until 28 days after cell injection. In our model, cell injection succeeded in inducing high IOP in 70.9% of the cell-injected eyes. This result shows that long-term IOP elevation could be stably induced in our rat model. In this model, slit-lamp examination revealed cell accumulation on the corneal endothelium and anterior synechiae starting at 3 days after cell injection. These changes finally led to the obstruction of the aqueous outflow, followed by IOP elevation. A longitudinal study is required to confirm the appropriate model for OAG.

Maintaining IOP elevation at a desired level has been one of the problems with existing experimental COH models. IOP elevations of higher than 50 mmHg were observed in 28.2% of the eyes with elevated IOP in this study. It has been reported that abrupt increases in IOP values to higher than 50 mmHg in rats lead to ONH degeneration, followed by a reduction in the retinal blood flow rate and diameter^{26–28}. This finding suggests that an IOP higher than 50 mmHg causes ischemic optic neuropathy identified in APAC and unlike COH models that mimic primary open-angle glaucoma (POAG)^{29,30}. Therefore, we compared RGC degeneration between the Over-50 group and the Under-50 group (Fig. 5). IOP-dependent RGC loss occurred 14 days after cell injection in both groups. However, 28 days after cell injection, the pattern of RGC loss differed between the two groups. In the Under-50 group, RGC loss increased in an IOP-dependent manner (Fig. 5b). This result indicates that

chronic high IOP led to IOP-dependent cell death, mimicking the clinical pathology of POAG. Conversely, in the Over-50 group, severe RGC loss occurred on the 28th day after cell injection without correlation with IOP (Fig. 5b). In clinical APAC, abrupt elevation in IOP elicits ischemic optic neuropathy rather than glaucomatous optic neuropathy with chronic deformation of the lamina cribrosa. This suggests that IOP values exceeding 50 mmHg in our model induced severe RGC loss by ischemic optic neuropathy; these cases can be classified as having APAC. Therefore, the Over-50 group in this model may be useful for developing neuroprotective drugs for APAC-induced optic neuropathy.

In the Under-50 group, characteristic features of glaucoma, such as thinning of the retina and increased ONH cupping, were confirmed. Mechanical compression by IOP elevation leads to the deformation of the lamina cribrosa in humans or the glial lamina in rats, and then compression of retinal nerve fibers results in RGC dysfunction in glaucoma^{6,31}. The histological and morphological changes leading to the development of retinal thinning and increased ONH cupping were also observed in our model (Fig. 2d,e). These results support the claim that optic neuropathy is caused by ONH compression following IOP elevation in our model, similar to the changes in POAG. Meanwhile, eyeballs with elevated IOP were enlarged, and it was predicted that the entire posterior retina was exposed to high pressure. Thus, not only did optic neuropathy result from ONH compression but retinal degeneration was also induced by mechanical compression of the retinae in our model. Longitudinally, this eyeball expansion might continue because flexibility of the sclera in young (9-week-old) rats could predispose their eyeballs to expansion by pressure^{32,33}. Moreover, this global expansion may compensate for the high IOP-induced focal stress on ONH. Thus, older rats may be ideal as glaucoma models with severe ONH deformation because of lower induction of eyeball expansion, thereby exposing the ONH to higher pressure.

TUNEL-positive cells were identified in the GCL, INL and ONL 14 days after cell injection. Kerrigan *et al.* have reported that the retinae of glaucoma patients contain an increased number of TUNEL-positive cells³⁴, and our results corroborate these clinical observations. Glial activation, a marker of neurological disorder characterized by increased GFAP expression, is also observed in the retinae of glaucoma patients and various experimental COH models^{21,35–37}. In this study, GFAP expression was limited to the GCL, co-localizing with astrocytes, in control eyes but was observed in Müller glial cells throughout the GCL extending to the ONL from the 7th day to a peak expression on the 14th day after cell injection. These results suggest that our model exhibits the pathological changes that occur in glaucoma and that the neurological disorder in our model progresses from approximately the 7th day to the 14th day after cell injection.

There are several limitations in this study. First, we only examined changes in IOP and morphology until 28 days after cell injection. Analysis of the duration of elevated IOP should be extended beyond a month after cell injection. Second, while long-lasting IOP elevation was achieved at a high rate, IOP values were difficult to control. It should be possible to control the degree of IOP elevation by varying the cell injection protocol. Third, the main disadvantage of our model is that the view of the posterior chamber of the eye was continuously obstructed by cell accumulation and iris adhesion at the front of the lens. We need to improve our method for producing occlusion of the angle by restricting cell accumulation to the peripheral area of the anterior chamber. Fourth, the possibility that an inflammatory response to injected cells occurred in the anterior segment cannot be excluded. However, it is possible to select animals with limited anterior damage. Finally, as mentioned in a recent review of glaucoma animal models³⁸, rodents have only a glial lamina rather than a structured lamina cribrosa. Thus, humans or primates may exhibit a different pathology of axon damage and pattern of progression. Nevertheless, in contrast to models with a structured lamina cribrosa, our rat model may still be used to clarify the initial site or mechanism of axon damage.

In this study, we developed a reproducible rat glaucoma model with sustained IOP elevation using intracameral injection of conjunctival fibroblasts. In addition, our model was classified into two groups based on the cut-off value of IOP, and each group displayed different types of RGC loss. One type of RGC loss represented chronic optic neuropathy, which developed after an increase in ONH cupping and RGC dysfunction and mimicked the clinical pathology of POAG. The other type was severe RGC loss, mimicking APAC. Our model has great potential for further investigation of the pathogenic mechanisms of glaucoma and may be useful in the development of IOP-lowering drugs and neuroprotective drugs.

Methods

Animals. All animals used in this study were treated in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. The protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Research Laboratories at Senju Pharmaceutical Co., Ltd. (No. 20150116-01). Nine-week-old male Sprague-Dawley rats were obtained from Charles River Japan (Yokohama, Japan), housed at 23 °C with a 12-hour light/dark cycle, and fed *ad libitum*.

Preparation of conjunctival fibroblasts. Conjunctival tissues were excised from five rat eyes and incubated in Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with 0.2% dispase[®] II (Roche, Basel, Switzerland) for 1 hour at 37 °C. Epithelial cells were mechanically removed, and the remaining tissue was minced and digested with 0.1% collagenase A (Roche) overnight at 37 °C. Conjunctival fibroblasts in collagenase solution were then re-suspended in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin (all from Invitrogen) and cultured under standard conditions (humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C). Cultured conjunctival fibroblasts were repeatedly cultured after achieving 70%–90% confluence.

Intracameral injection of conjunctival fibroblasts. After achieving approximately 90% confluence, conjunctival fibroblasts were dissociated with TrypLE[™] Express (Invitrogen) and suspended in DMEM

supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin (1.5×10^7 cells/mL). After topical administration of 0.5% tropicamide and 0.5% phenylephrine mixed eye drops (Mydrin-P, Santen Pharmaceuticals, Osaka, Japan), animals were anesthetized with intraperitoneal ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Then, topical 0.4% oxybuprocaine (Benoxyl, Santen Pharmaceuticals) diluted 10-fold and 0.3% gatifloxacin (Gatifro, Senju Pharmaceutical, Osaka, Japan) were applied to the corneal surface. Five microliters of cell suspension was injected slowly over 2–3 minutes into the anterior chamber of one eye with a 34-gauge needle ($n = 55$), and the contralateral eye was left untreated. In addition, 5 μ L of culture medium was unilaterally injected into the anterior chamber of one eye in other rats as a control ($n = 31$). The contralateral eyes of animals in both groups were untreated and regarded as normal eyes. After injection, the eyes were treated with an ointment containing 0.3% ofloxacin (Tarivid, Santen Pharmaceuticals), and animals were given an intraperitoneal injection of 1 mg/kg atipamezole (Antisedan, Nippon Zenyaku Kogyo, Fukushima, Japan) to facilitate recovery from anesthesia.

Measurement of intraocular pressure (IOP). After inducing anesthesia with sevoflurane, IOP was measured using a rebound TonoLab[®] (iCare, Helsinki, Finland) 1 day before (baseline) and 3, 7, 14, 21 and 28 days after intracameral injection. IOP measurements were started 5 minutes after the induction of anesthesia and completed within 5 minutes to circumvent the effect of anesthesia on IOP. All measurements were conducted between 9:00 and 12:00. To avoid drying of the cornea, we administered 0.1% hyaluronic acid (Tearbalance, Senju Pharmaceutical) during the maintenance of anesthesia. Three IOP values were obtained from each eye, and the daily mean IOP values for each eye were calculated. The area under the curve (AUC) of IOP change from baseline in each injected eye was calculated 3, 7, 14, and 28 days after cell injection.

Slit-lamp observation of the anterior chamber. The anterior segments of eyes were examined with a slit lamp (Topcon, Tokyo, Japan) at the same time as the IOP measurements were made.

Tissue preparation. Animals were deeply anaesthetized by inhalation of air-saturated isoflurane and perfused with cold saline followed by 4% paraformaldehyde (PFA) on the 3rd, 7th, 14th or 28th day after intracameral injection. Eyes were enucleated and post-fixed with 4% PFA.

Histological analysis. Three- μ m paraffin-embedded sections and 8- μ m cryosections were prepared and stained with hematoxylin and eosin. Changes in the anterior segment, retinal thickness, and ONH cupping were examined using the bright-field mode of a fluorescence microscope.

RGC counting. After overnight fixation, retinæ were flat-mounted and then incubated with a primary antibody against BRN3A (Millipore, Billerica, MA, USA), a transcription factor specifically expressed in the nuclei of ganglion cells. Then, retinæ were incubated with a secondary antibody conjugated to Alexa Fluor[®] 488 (Invitrogen). Regions that were located 1 mm and 2 mm away from the ONH in each of four quadrants were photographed with a fluorescence microscope (Keyence, Osaka, Japan). BRN3A-positive RGCs were counted in fields of 0.4 mm² using an image visualization software (Image-Pro Plus, Nippon Roper, Tokyo, Japan). The counts of RGCs in 8 areas of each eye were averaged, and the mean numbers of RGCs for each group were calculated. The rate of RGC loss was defined as the percentage decrease in the number of cells in the cell-injected eye relative to the number of cells in the control (culture medium-injected) eye.

TUNEL assay. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) staining of cryosections was carried out using the Click-iT[®] TUNEL Alexa Fluor[®] 488 Imaging Assay (Invitrogen) to detect DNA degradation that occurs during apoptosis *in situ*. Sections were embedded with Vectashield[®] Mounting Media with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and examined under a fluorescence microscope. Positive controls were prepared by treating sections with DNase I before TUNEL to detect DNA fragmentation.

Immunohistochemical analysis. Eight- μ m-thick cryosections were cut and immersed in 10 mM phosphate-buffered saline (PBS). The sections were incubated with a blocking solution containing 5% bovine serum albumin/0.1% Triton X-100/10 mM PBS at room temperature for 20 minutes to eliminate non-specific binding, incubated with primary antibodies against glial fibrillary acid protein (GFAP, Dako, Glostrup, Denmark) at 4 °C overnight, and washed with PBS. Then, they were incubated with secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor[®] 546 (Invitrogen) at room temperature for 1 hour and embedded with Vectashield[®] Mounting Media with DAPI (Vector Laboratories). Immunofluorescence images were acquired using fluorescence microscopy.

Statistical analysis. The IOP values and RGC counts are presented as the mean \pm standard deviation (S.D.). The differences in IOP values and RGC counts between the injected eyes and the control eyes were statistically analyzed with two-tailed Student's *t*-tests of data from each day after cell injection. Linear regressions with Pearson's correlation coefficients were performed between normalized RGC numbers and AUCs of the differential IOP from baseline in cell-injected eyes for the Under-50 and Over-50 groups. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Data Availability

The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

References

- Kass, M. A. *et al.* The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch. Ophthalmol.* **120**, 701–713 (2002).
- Friedman, D. S., Wilson, M. R., Liebmann, J. M., Fechtner, R. D. & Weinreb, R. N. An evidence-based assessment of risk factors for the progression of ocular hypertension and glaucoma. *Am. J. Ophthalmol.* **138**, Suppl S19–31 (2004).
- Quigley, H. A. Glaucoma. *Lancet.* **377**, 1367–1377 (2011).
- Qu, J., Wang, D. & Grosskreutz, C. L. Mechanisms of retinal ganglion cell injury and defense in glaucoma. *Exp. Eye Res.* **91**, 48–53 (2010).
- Naskar, R. & Thanos, S. Retinal gene profiling in a hereditary rodent model of elevated intraocular pressure. *Mol. Vis.* **12**, 1199–1210 (2006).
- Morrison, J. C., Cepurna, W. O., Guo, Y. & Johnson, E. C. Pathophysiology of human glaucomatous optic nerve damage: insights from rodent models of glaucoma. *Exp. Eye Res.* **93**, 156–164 (2011).
- WoldeMussie, E., Ruiz, G., Wijono, M. & Wheeler, L. A. Neuroprotection of retinal ganglion cells by brimonidine in rats with laser-induced chronic ocular hypertension. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**, 2849–2855 (2001).
- Shih, G. C. & Calkins, D. J. Secondary neuroprotective effects of hypotensive drugs and potential mechanisms of action. *Expert. Rev. Ophthalmol.* **7**, 161–175 (2012).
- Doozandeh, A. & Yazdani, S. Neuroprotection in Glaucoma. *J. Ophthalmic. Vis. Res.* **11**, 209–220 (2016).
- Pederson, J. E. & Gaasterland, D. E. Laser-induced primate glaucoma. I. Progression of cupping. *Arch. Ophthalmol.* **102**, 1689–1692 (1984).
- Radius, R. L. & Pederson, J. E. Laser-induced primate glaucoma. II. *Histopathology. Arch. Ophthalmol.* **102**, 1693–1698 (1984).
- Hare, W. A. *et al.* Characterization of retinal injury using ERG measures obtained with both conventional and multifocal methods in chronic ocular hypertensive primates. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**, 127–136 (2001).
- Shareef, S. R., García-Valenzuela, E., Salierno, A., Walsh, J. & Sharma, S. C. Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats. *Exp. Eye Res.* **61**, 379–382 (1995).
- Grozdanic, S. D. *et al.* Laser-induced mouse model of chronic ocular hypertension. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 4337–4346 (2003).
- Mabuchi, F., Aihara, M., Mackey, M. R., Lindsey, J. D. & Weinreb, R. N. Regional optic nerve damage in experimental mouse glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**, 4352–4358 (2004).
- Chen, H. *et al.* Optic neuropathy due to microbead-induced elevated intraocular pressure in the mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 36–44 (2011).
- Tsuruga, H., Murata, H., Araie, M. & Aihara, M. A model for the easy assessment of pressure-dependent damage to retinal ganglion cells using cyan fluorescent protein-expressing transgenic mice. *Mol. Vis.* **18**, 2468–2478 (2012).
- Fujishiro, T. *et al.* Establishment of an experimental ferret ocular hypertension model for the analysis of central visual pathway damage. *Sci. Rep.* **4**, 6501, <https://doi.org/10.1038/srep06501> (2014).
- Lee, E. J., Kim, T. W., Lee, K. M., Lee, S. H. & Kim, H. Factors associated with the retinal nerve fiber layer loss after acute primary angle closure: A prospective EDI-OCT study. *PLoS. One.* **12**, e0168678, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168678> (2017).
- Sawada, A. & Neufeld, A. H. Confirmation of the rat model of chronic, moderately elevated intraocular pressure. *Exp. Eye Res.* **69**, 525–531 (1999).
- Yu, S., Tanabe, T. & Yoshimura, N. A rat model of glaucoma induced by episcleral vein ligation. *Exp. Eye Res.* **83**, 758–770 (2006).
- Ueda, J. *et al.* Experimental glaucoma model in the rat induced by laser trabecular photocoagulation after an intracameral injection of india ink. *Jpn. J. Ophthalmol.* **42**, 337–344 (1998).
- Levkovitch-Verbin, H. *et al.* Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 402–410 (2002).
- Morrison, J. C. *et al.* A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**, 1854–1862 (2004).
- Sappington, R. M., Carlson, B. J., Crish, S. D. & Calkins, D. J. The microbead occlusion model: a paradigm for induced ocular hypertension in rat and mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**, 207–216 (2010).
- Zhi, Z., Cepurna, W. O., Johnson, E. C., Morrison, J. C. & Wang, R. K. Impact of intraocular pressure on changes of blood flow in the retina, choroid, and optic nerve head in rats investigated by optical microangiography. *Biomed. Opt. Express.* **3**, 2220–2233 (2012).
- Fortune, B. *et al.* Deformation of the rodent optic nerve head and peripapillary structures during acute intraocular pressure elevation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 6651–6661 (2011).
- Zhi, Z. *et al.* Volumetric and quantitative imaging of retinal blood flow in rats with optical microangiography. *Biomed. Opt. Express.* **2**, 579–591 (2011).
- Sng, C. C. A. *et al.* Changes in retinal nerve fibre layer, optic nerve head morphology, and visual field after acute primary angle closure. *Eye. (Lond).* **25**, 619–625 (2011).
- Liu, X. *et al.* Damage patterns of retinal nerve fiber layer in acute and chronic intraocular pressure elevation in primary angle closure glaucoma. *Int. J. Ophthalmol.* **3**, 152–157 (2010).
- Quigley, H. A. & Addicks, E. M. Regional differences in the structure of the lamina cribrosa and their relation to glaucomatous optic nerve damage. *Arch. Ophthalmol.* **99**, 137–143 (1981).
- Girard, M. J. A. *et al.* Scleral biomechanics in the aging monkey eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **50**, 5226–5237 (2009).
- Myers, K. M. *et al.* The *in vitro* inflation response of mouse sclera. *Exp. Eye Res.* **91**, 866–875 (2010).
- Kerrigan, L. A., Zack, D. J., Quigley, H. A., Smith, S. D. & Pease, M. E. TUNEL-positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma. *Arch. Ophthalmol.* **115**, 1031–1035 (1997).
- Wang, L., Cioffi, G. A., Cull, G., Dong, J. & Fortune, B. Immunohistologic evidence for retinal glial cell changes in human glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 1088–1094 (2002).
- Hernandez, M., Rodriguez, F. D., Sharma, S. C. & Vecino, E. Immunohistochemical changes in rat retinas at various time periods of elevated intraocular pressure. *Mol. Vis.* **15**, 2696–2709 (2009).
- Can, N. *et al.* Neuroprotective and antioxidant effects of ghrelin in an experimental glaucoma model. *Drug. Des. Dev. Ther.* **9**, 2819–2829 (2015).
- Quigley, H. A. Use of animal models and techniques in glaucoma research: Introduction. *Methods. Mol. Biol.* **1695**, 1–10, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7407-8_1 (2018).

Author Contributions

A.N. executed the experiments, wrote the main manuscript text, and created the figures. O.S., H.T., T.F. and M.A. reviewed the manuscript.

Additional Information

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

RESEARCH

Open Access



Tear miRNA expression analysis reveals miR-203 as a potential regulator of corneal epithelial cells

Ayumi Nakagawa¹, Takeshi Nakajima² and Mitsuyoshi Azuma^{2*}

Abstract

Background: microRNAs (miRNAs) are small noncoding RNAs that negatively regulate gene expression. They are found within cells and in body fluids. Extracellular miRNAs have been shown to associate with the surrounding tissues. Therefore, we predicted that miRNAs in tears may contribute to regulate corneal epithelial cell function. However, information on the miRNA expression profile of tears is limited and the specific functions of tear miRNAs for corneal epithelial cells are still unknown. To study the role of tear miRNAs, we determined which miRNAs are highly expressed in tears and examined the involvement of miRNAs in corneal epithelial cell viability.

Methods: miRNAs extracted from monkey tears and sera were subjected to microarray analysis. miRNAs of which expression levels were higher in tears than in sera were selected, and their expression levels were quantified by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). To examine miRNA function, mimics and inhibitors of miRNAs were transfected into human corneal epithelial (HCE-T) cells and incubated for 24 or 48 h. After transfection of miRNA mimics and inhibitors, the viability of HCE-T cells was measured using the water soluble tetrazolium salt (WST) assay, and microarray analysis and qPCR were performed using total RNA extracted from HCE-T cells. siRNAs of the candidate targets for miR-203 were transfected into HCE-T cells and the WST assay was performed. To determine a direct target gene for miR-203, a dual luciferase reporter assay was performed in HCE-T cells using a luciferase reporter plasmid containing 3'-UTR of human IGFBP5.

Results: Microarray and qPCR analyses showed that miR-184 and miR-203 were expressed significantly more highly in tears than in sera (165,542.8- and 567.8-fold, respectively, $p < 0.05$). Of these two miRNAs, transfection of a miR-203 mimic significantly reduced the viability of HCE-T cells ($p < 0.05$), while a miR-203 inhibitor significantly increased this viability ($p < 0.05$). miR-203 mimic downregulated insulin-like growth factor-binding protein 5 (IGFBP5) and nuclear casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate 1 (NUCKS1), while miR-203 inhibitor upregulated these two genes. Transfection of IGFBP5-siRNA decreased the viability of HCE-T cells. miR-203 mimic significantly diminished the luciferase reporter activity.

Conclusions: In this study, we identified miRNAs that are highly expressed in tears, and the inhibition of miR-203 increases the viability of corneal epithelial cells. Our results suggest that miR-203 contributes to regulating the homeostasis of corneal epithelial cells.

Keywords: microRNA, Tear, Microarray, Corneal epithelial cell, Viability

*Correspondence: mitsuyoshi-azuma@senju.co.jp

² Senju Laboratory of Ocular Sciences, Senju Pharmaceutical Co., Ltd., 6-4-3, Minatojima-Minamimachi, Chuo-Ku, Kobe, Hyogo 650-0047, Japan
Full list of author information is available at the end of the article



Background

The cornea, the anteriormost layer of the eye, is a transparent tissue and mechanical barrier that limits the entry of exogenous substances into the eye and protects the ocular tissues [1]. Based on its transparent structure, the cornea is the only part of the human body that has no blood supply; it receives nutrition through tears and aqueous humor, as well as oxygen from the air. The corneal epithelium, which is the outermost layer of the cornea, is replaced approximately every 2 weeks, and corneal wound healing is a highly regulated process that requires the proliferation and migration of epithelial cells. In tears, various proteins such as growth factors are secreted by the lacrimal gland and distributed over the cornea, where they are involved in cellular proliferation, migration, and survival. However, various chemical, physical, and pathological factors injure the corneal epithelium, resulting in corneal epithelium disorder. It is clinically important to develop a new method for treating corneal epithelium disorder.

MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNAs (~22 nucleotides) that regulate gene expression at the post-transcriptional level by binding to the 3'-untranslated region (3'-UTR) of target messenger RNAs (mRNAs) for translational repression or degradation [2, 3]. The interaction between miRNAs and their target mRNAs requires only partial base-pairing of miRNAs, occurring at a site called the seed region (nucleotides 2-8), which allows miRNAs to target multiple genes [4]. Several studies have revealed that miRNAs play important regulatory roles in diverse cellular pathways including differentiation, organogenesis, cell proliferation, and apoptosis [5–7]. In addition, miRNAs have been reported to contribute to human diseases including ocular diseases such as glaucoma, cataract, and diabetic retinopathy [8–10].

Recently, some of the functional miRNAs previously identified in cells and tissues were found in extracellular fluids such as plasma, serum, saliva, and urine, and also in tears [11–17]. Although these studies showed the expression profile of miRNAs in patients such as Alzheimer's disease, cancer, Sjögren syndrome, diabetic retinopathy and glaucoma, there is little information available on miRNA which is constitutively and specifically expressed in tears. miRNAs can be packaged in membrane vesicles such as exosome, released into various extracellular fluids, and transferred into cells to participate in cell-to-cell communication [16, 18, 19]. The delivered miRNAs can regulate other cells in new locations [19, 20]. Thus, we hypothesized that miRNAs present in tears might function and play important roles in maintaining the homeostasis of the ocular surface like growth factors. However, many of the available miRNA expression profiles in tears

are limited in a particular disease condition and the functions of miRNAs detected in tears are not clearly understood.

The first aim of this study was to identify the dominant miRNAs in tears. We then investigated the contribution of miRNAs highly expressed in tears to the viability of corneal epithelial cells, and explored its target genes.

Methods

Sample collection

Tear and serum samples were collected from 4 male and 4 female cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). All of the samples were individually obtained from EveBioscience Co., Ltd. Fifty microliter of saline (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. Japan) was instilled in the nasal side of one eye by micropipette, and after a few blinking, diluted tears were collected from the temporal side. Diluted tears were repeatedly collected after an interval until sufficient volume (approximately 600 μ L) was acquired. Sera were separated from approximately 2 mL blood sample drawn from the femoral vein. Animal care and all experimental procedures were performed in accordance with the guidelines of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. The protocol was approved by the Animal Welfare Committee of Research Laboratories at EveBioscience Co., Ltd.

Microarray analysis of miRNAs

Three hundred microliter of tears and sera were centrifuged for the removal of cellular components, and their aqueous phases were gently collected. Total RNAs were extracted from each sample in accordance with the manufacturer's protocol. The quality and quantity of total RNAs were confirmed by an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) with an RNA 6000 Pico kit. The miRNAs extracted from monkey tears and sera were labeled with Hy5 using the miRCURY LNA Array miR labeling kit (Exiqon, Vedbaek, Denmark) and hybridized onto 3D-Gene Human miRNA Oligo chip V16.1.0.0 (Toray Industries, Tokyo, Japan), on which 1212 oligonucleotides are spotted. Hybridization signals were scanned using a 3D-Gene Scanner (Toray Industries). The raw data above a level corresponding to the average of the background plus two standard deviations were selected, and selected miRNAs were processed by background subtraction and global normalization. The miRNA profile of tears was compared with that of sera ($n=2$ for each of tear and serum). The miRNAs which were detected in two samples were included in the analysis.

Quantitative real-time PCR of miRNAs

Total RNAs were extracted from 4~6 samples for each of tears and sera (300 μ L) using QIAzol (QIAGEN, Hilden, Germany) and miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen). To normalize for technical variation, 0.01 fmol of synthetic cel-miR-39-3p (QIAGEN) was spiked into each tear and serum sample after addition of denaturing solution. Total RNAs were treated with SUPERase-In (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), and the quality and quantity of the extracted miRNAs were assessed using a spectrophotometer (NanoVue™; GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

Four miRNAs, expressed at high levels in microarrays, were measured by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) following the manufacturer's instructions. Briefly, 1.12 μ L of template RNAs were reverse-transcribed using miRCURY LNA RT Kit (QIAGEN), then real-time PCR was performed using miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit (QIAGEN). The following primers were used: hsa_miR-184 miRCURY LNA miRNA PCR Assay, hsa_miR-3616-3p miRCURY LNA miRNA PCR Assay, hsa_miR-3610 miRCURY LNA miRNA PCR Assay, hsa_miR-203a-3p miRCURY LNA miRNA PCR Assay (QIAGEN). Fluorescence was monitored on a 7500 Real Time PCR system (Thermo Fisher Scientific). Relative expression levels were normalized to cel-miR-39-3p and calculated using standard curve method.

miRNA mimics, inhibitors and siRNAs

The synthesized double-stranded full-length miRNA (22-bp) and the fully 2'-O-methylated complementary antisense oligonucleotide (22-mer) were purchased from QIAGEN (miScript miRNA Mimic: Syn-hsa-miR-184 and Syn-hsa-miR-203a-3p, miScript miRNA Inhibitor: Anti-hsa-miR-184 and Anti-hsa-miR-203a-3p, respectively). miRNA without any homology and 2'-O-methylated antisense oligonucleotides without any homology were purchased from QIAGEN (AllStars Negative Control siRNA and miScript Inhibitor Negative Control, respectively) as negative controls. siRNAs of IGFBP5, NUCKS1 and negative control were purchased from Thermo Fisher Scientific (Silencer® Select siRNAs).

Cell cultures and transfection

Cultured immortalized human corneal epithelial (HCE-T) cells were obtained from Dr. Kaoru Sasaki at JCHO Hoshigaoka Medical Center. The cell line was authenticated with short tandem repeat (STR) analysis. The STR results showed that the DNA of the cell line completely matched HCE-T. These cells were cultured with DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen), 5 μ g/mL insulin

(Wako, Japan), 10 ng/mL human recombinant epidermal growth factor (EGF, Invitrogen), 40 μ g/mL gentamycin (Invitrogen), and 100 U/mL penicillin/streptomycin (Invitrogen) at 37°C and 5% CO₂. Cells were seeded at 1.0×10^3 cells/well in 96-well culture plates for water-soluble tetrazolium (WST) assay, 4.0×10^4 cells/well in 24-well culture plates for dual luciferase reporter assay, and 9.0×10^4 cells/well in 6-well culture plates for RNA extraction in DMEM/F12 medium containing 5% FBS and 40 μ g/mL gentamycin on the day before transfection. At 18 h post-plating, the culture medium was replaced with DMEM/F12 medium. Transfection of miRNA mimics/ inhibitors and siRNAs was performed according to the manufacturer's recommendations. The miRNA mimics (20 nM) and inhibitors (50 to 100 nM) were transfected into HCE-T cells with HiPerFect Transfection Reagent (QIAGEN). The 50 nM of siRNAs were transfected with Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen).

To examine the baseline expression level of miR-184 and miR-203 in HCE-T cells, total RNAs were extracted from cultured cells using QIAzol and miRNeasy Mini Kit (QIAGEN) followed by reverse transcription PCR. qPCR was performed with specific primers using RNU6B (endogenous control).

Water-soluble tetrazolium salt (WST) assay

The cell viability was determined by WST assay [21]. Forty-eight hours after transfection, WST-8 (Cell Counting Kit-8 reagent; Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) was added to each well, followed by incubation in a 37°C, 5% CO₂ incubator for 1 h. The absorbance was measured at 450 nm in a microplate reader (BioTek, Winooski, VT). The background (WST-8 reagent absorbance) was subtracted from the data for each well. Relative changes of miRNA mimic- or inhibitor-treated cells were calculated comparing with negative control-treated cells. All assays were performed in triplicate and repeated two or three times.

Microarray analysis and qPCR of genes

Forty-eight hours after transfection of miR-203 mimic and inhibitor, total RNA was extracted from HCE-T cells using TRIzol® Reagent (Invitrogen) and RNeasy Mini kit (QIAGEN). Subsequently, microarray analysis was performed using Genechip (Affymetrix, Santa Clara, CA). The relative expression levels of genes after transfection of mimic or inhibitor compare with their negative control were calculated ($n = 3$).

To validate the expression levels of insulin-like growth factor binding protein 5 (*IGFBP5*), nuclear casein kinase and cyclin dependent kinase substrate 1 (*NUCKS1*) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) mRNAs, 300 ng of template RNAs were

reverse-transcribed using PrimeScript[®] RT Master Mix (Perfect Real Time) Kit (Takara Bio, Shiga, Japan), and real-time PCR was performed using TaqMan[™] Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific). The assay ID of TaqMan[®] Gene Expression Assays used as primers were following: Hs00181213_m1 (for *IGFBP5*), Hs05054673_s1 (for *NUCKS1*) and Hs02786624_g1 (for *GAPDH*). *GAPDH* was used as an internal control. Relative expression levels were calculated using standard curve method.

miRNA target prediction

Potential target genes of miR-203 and the target sites on their 3'-UTR were predicted by miRDB (<http://mirdb.org/>), an online database for miRNA target prediction [22].

Dual luciferase reporter assay

Fifty nanogram of luciferase reporter plasmid containing 3'-UTR of human *IGFBP5* (HmiT100927-MT06, Genecopoeia, Rockville, MD) or pEZX-MT06 control plasmid (CmiT000001-MT06, Genecopoeia) were co-transfected with 50 nM of miR-203 mimic or negative control into HCE-T cells by Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in 24-well culture plates. At 48 h after incubation, the firefly and *Renilla* luciferase activities were measured using the Luc-Pair[™] Duo-Luciferase Assay kit 2.0 (Genecopoeia). Relative luciferase activities were calculated by normalization of firefly luciferase activities based on those of *Renilla* luciferase.

Statistical analysis

All data of qPCR, WST assays and dual luciferase reporter assay are expressed as mean \pm standard deviation (SD). Differences in these assays between groups were assessed using Student's *t*-test. A *p* value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

miRNA expressions in tears and sera

High-quality total RNAs from tears and sera were confirmed with the bioanalyzer (Fig. 1). There were only RNAs shorter than 200 nt and no ribosomal RNA, suggesting that the purified total RNAs did not contain RNAs derived from cells but contained RNAs circulating in fluids. The yields of total RNAs were 4 to 18 ng.

Microarray analysis detected 483 and 492 miRNAs in monkey tears and sera, respectively (Additional file 2). Of these, 367 were confirmed to be expressed in both tears and sera. Among these 367 miRNAs, 314 exhibited expression that was at least twice as high in tears as that in sera. Table 1 shows top miRNAs with higher expression in tears than in sera among these 314 miRNAs.

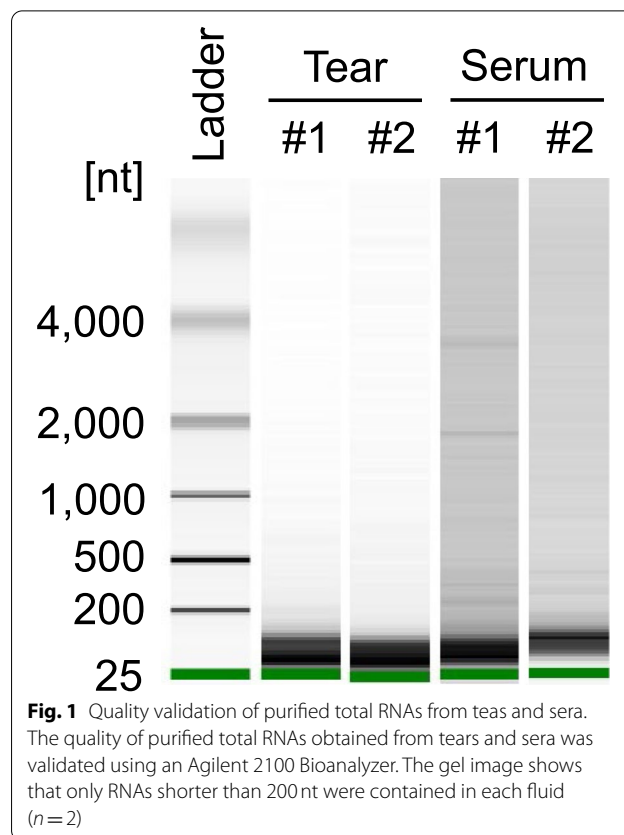


Fig. 1 Quality validation of purified total RNAs from tears and sera. The quality of purified total RNAs obtained from tears and sera was validated using an Agilent 2100 Bioanalyzer. The gel image shows that only RNAs shorter than 200 nt were contained in each fluid (*n* = 2)

Table 1 Top 5 miRNAs with higher expression in tears than in sera

miRNA name	Averages of intensities (individual value)		Fold change (Tears/ Sera)
	Tears	Sera	
miR-184	1616.7 (1173.4, 2060.0)	19.3 (21.6, 17.1)	83.7
miR-3616-3p	1123.3 (775.1, 1471.6)	31.5 (40.1, 23.0)	35.6
miR-720 ^a	7077.6 (3950.5, 10,204.6)	212.3 (262.3, 162.3)	33.3
miR-3610	471.3 (562.2, 380.4)	15.7 (16.1, 15.3)	30.1
miR-203	587.3 (184.4, 990.1)	20.4 (22.1, 18.7)	28.8

^a The sequence annotated as miR-720 is likely to be a fragment of a transfer RNA, and it has been removed from the miRBase (<https://www.mirbase.org/>)

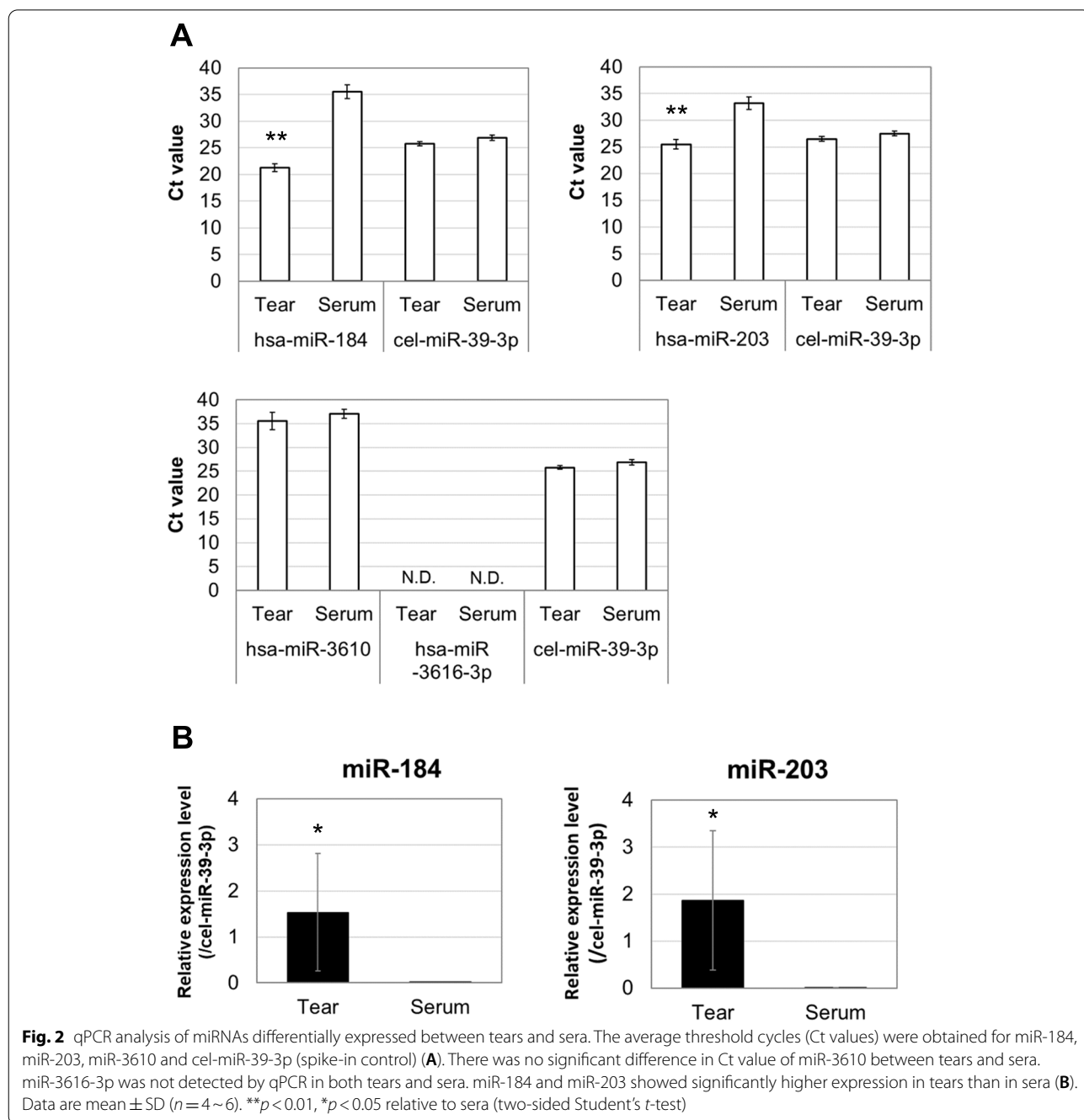
On the other hand, the top miRNAs expressed higher in tears were shown in Table 2. There were few differences in the expression level between tears and sera (Additional file 2).

Table 2 Top 5 miRNAs with the higher expression in tears

miRNA name	Averages of intensities (individual value)
miR-2861	22,888.4 (14,951.8, 30,825.0)
miR-4294	22,274.8 (4206.8, 40,342.8)
miR-1908	20,012.9 (15,340.5, 24,685.4)
miR-3665	18,755.7 (15,602.1, 21,909.3)
miR-762	18,247.9 (13,612.1, 22,883.6)

Validation of microarray analysis by qPCR

miR-720, which is likely to be a fragment of a transfer RNA, has now been removed from the miRNA database (miRBase; <https://www.mirbase.org/>). Therefore, the expression levels of the top 4 miRNAs, miR-184, miR-3616-3p, miR-3610, and miR-203, were validated by qPCR. The average threshold cycles (Ct values) of miR-184 and miR-203 in tears were 21.3 and 25.5, respectively, and those in sera were 35.6 and 33.2, respectively (Fig. 2A). The Ct value of miR-3610 was higher than 35



in both tears and sera, and there was no significant difference between them. miR-3616-3p was not detected by qPCR in both tears and sera. Two of the four miRNAs, miR-184 and miR-203, showed significantly higher expression in tears than in sera (Fig. 2B, 165,542.8- and 567.8-fold, respectively, $p < 0.05$). Thus, two dominant miRNAs in tears, miR-184 and miR-203, were selected to identify their effects on HCE-T cells.

Contribution of miRNA to the viability of HCE-T cells

We next studied the contributions of the two relatively highly expressed miRNAs in tears, miR-184 and miR-203, to regulating the viability of corneal epithelial cells. The baseline expression levels of miR-184 and miR-203 compared with that of RNU6B (endogenous control)

were 0.56 and 0.15, respectively (Fig. 3A). The cell viability was significantly decreased to 0.8-fold by the miR-203 mimic ($p < 0.05$) and was significantly enhanced 1.2-fold by miR-203 inhibitor ($p < 0.05$) comparing with these of the negative controls (Fig. 3B and C). In contrast, mimic and inhibitor of miR-184 did not change the cell viability (Fig. 3D).

Transcripts in HCE-T cells changed by miR-203 mimic and inhibitor

To identify target mRNAs for miR-203 in HCE-T cells, we confirmed the identity of the transcripts altered after transfection of miR-203 mimic and inhibitor in HCE-T cells by microarray analysis (Table 3). At 48h after transfection, seven genes, IGFBP5, GNAO1, CDKN2B,

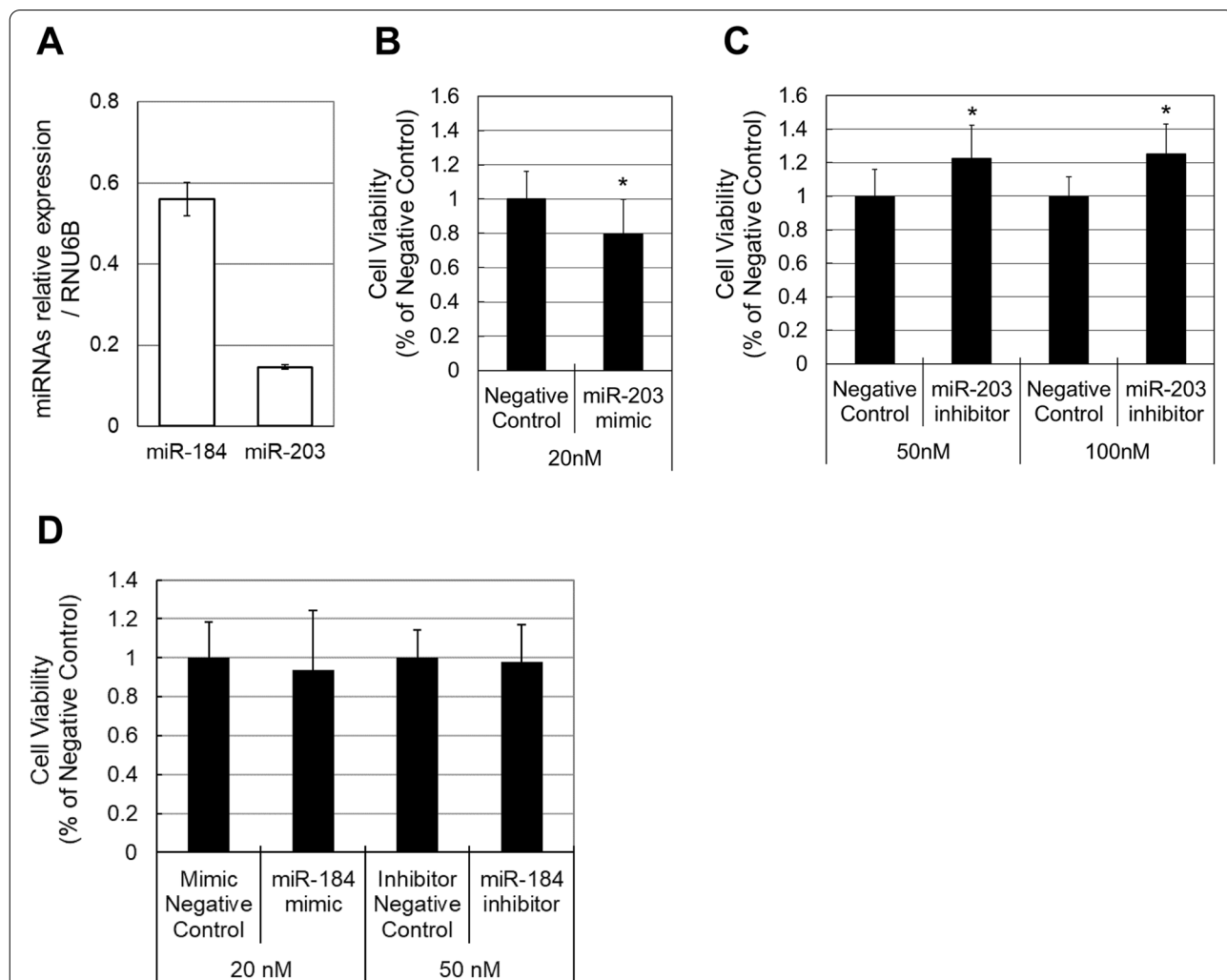


Fig. 3 Contribution of miR-203 and miR-184 to the viability of corneal epithelial cells. The baseline expression level of miRNAs (A). The viability of HCE-T cells was significantly decreased by the miR-203 mimic (B) and was significantly increased by the miR-203 inhibitor (C). The viability of HCE-T cells was not changed by the mimic and inhibitor of miR-184 (D). Data are mean \pm SD ($n = 6$ for miR-203 mimic, $n = 9$ for miR-203 inhibitor, and $n = 9$ for mimic and inhibitor of miR-184). * $p < 0.05$ relative to the negative control (two-sided Student's t -test)

Table 3 Gene transcripts changed by miR-203 mimic and inhibitor

Gene symbol	Intensity		Fold change (/ NC)	Intensity		Fold change (/ NC)
	miR-203 Mimic	Mimic NC		miR-203 Inhibitor	Inhibitor NC	
IGFBP5	36.76	63.56	-1.72	80.45	48.50	1.66
GNAO1	38.85	72.00	-1.85	67.18	46.85	1.44
CDKN2B	58.08	95.01	-1.64	105.42	68.59	1.54
NUCKS1	48.84	83.29	-1.7	98.36	72.50	1.36
FRAS1	70.52	112.99	-1.6	126.24	90.51	1.4
TLL1	199.47	278.20	-1.39	254.23	184.82	1.37
ARID5B	120.26	160.90	-1.34	170.07	128.89	1.32
AREG	44.02	32.45	1.36	33.59	44.63	-1.33
PSTPIP2	310.83	215.27	1.45	177.29	238.86	-1.35
NFATC2	106.15	54.95	1.94	45.25	62.25	-1.38

NC Negative control, *IGFBP5* Insulin-like growth factor-binding protein 5, *GNAO1* G protein subunit alpha o1, *CDKN2B* Cyclin dependent kinase inhibitor 2B, *NUCKS1* Nuclear casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate 1, *FRAS1* Fraser extracellular matrix complex subunit 1, *TLL1* Tolloid like 1, *ARID5B* AT-rich interaction domain 5B, *AREG* Amphiregulin, *PSTPIP2* Proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 2, *NFATC2* Nuclear factor of activated T cells 2

NUCKS1, FRAS1, TLL1, and ARID5B, were downregulated by miR-203 mimic and upregulated by miR-203 inhibitor (cut-off: >1.3-fold). In contrast, three genes AREG, PSTPIP2, and NFATC2, were upregulated by miR-203 mimic and downregulated by miR-203 inhibitor (cut-off: > 1.3-fold).

Identification a direct target gene for miR-203

To screen the target genes of miR-203 among 10 genes which was identified by microarray analysis, miR-203 target sites were identified by an in silico miRNA target prediction search. IGFBP5 and NUCKS1 mRNA had two putative target sites in their 3'-UTR (Fig. 4A). In order to validate the change of expression level of IGFBP5 and NUCKS1 in microarray analysis, we then performed qPCR analysis for these two genes 24h and 48h after transfection of miR-203 mimic and inhibitor into HCE-T cells. At 24h, the expression of IGFBP5 and NUCKS1 were significantly downregulated by the miR-203 mimic ($p < 0.01$) and were significantly upregulated by the miR-203 inhibitor ($p < 0.01$) comparing with the negative controls (Fig. 4B and C). The effects induced by miR-203 mimic and inhibitor were reduced at 48h (data not shown).

The effect of IGFBP5 and NUCKS1 silencing on the viability of HCE-T cells was determined using siRNAs of these genes. IGFBP5-siRNA significantly decreased the cell viability of HCE-T comparing with the negative control (Fig. 4D, $p < 0.05$). In contrast, NUCKS1-siRNA had no significantly effect on the cell viability. To further determine whether IGFBP5 is a direct target gene for miR-203, a dual luciferase reporter assay was performed in HCE-T cells. The luciferase reporter activity was

significantly diminished after the transfection of miR-203 mimic compared with transfection of negative control of miRNA (Fig. 4E). These results demonstrated that miR-203 negatively regulates the proliferation of HCE-T cells by targeting IGFBP5.

Discussion

Several miRNAs have been reported to be specific to individual organs, tissues, or cell types. For example, miR-122 and miR-124 are specifically expressed in liver and brain, respectively [23–27]. In addition, Weber et al. reported that the composition and concentrations of miRNAs differ among several body fluid types [11]. These results demonstrate that specific miRNAs are generated at each cell and secreted into body fluids to act in the specific site. Therefore, we hypothesized that miRNAs express higher in tear than in other body fluid may play key roles in the homeostasis of ocular surfaces such as corneal epithelial cells.

In this study, we characterized the miRNA expression profiles of two body fluids, tears and sera. Several studies on miRNA expression in tears have been reported [12–17]. Although these studies showed the difference of miRNAs expression between patients and healthy controls, little information is currently available on miRNA which is constitutively and specifically expressed in tears. Blood circulates throughout the body and maintains the homeostasis of various organs, while tears supply oxygen and nutrition to the ocular surface and maintain its homeostasis. For this reason, sera fractionated from blood were used as a control body fluid to determine miRNAs specific for tears. Dufourd T et al. reported that there were differences of miRNA quality, content and profile between plasma and serum in rat

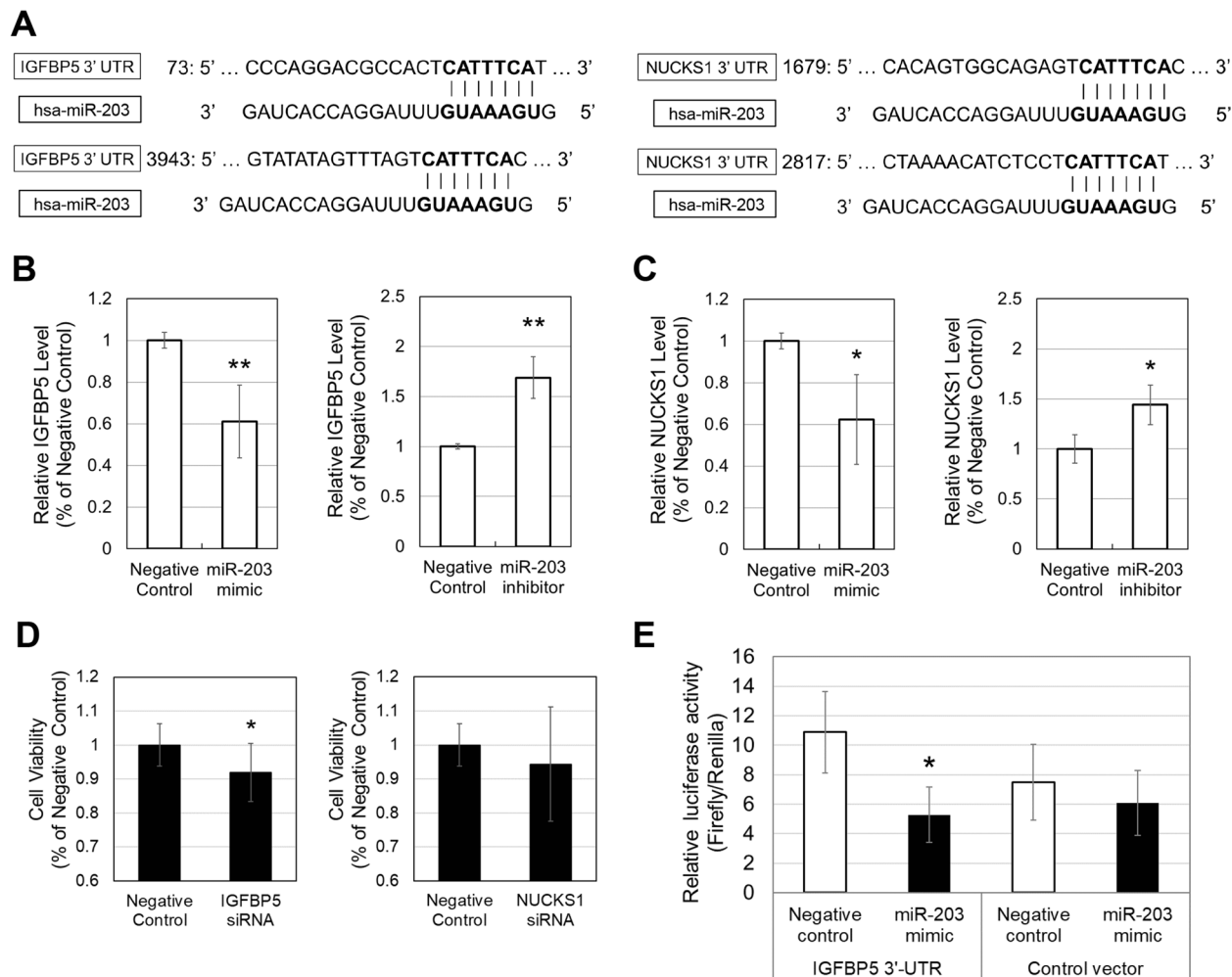


Fig. 4 The potential target genes of miR-203. There were two putative target sites of miR-203 in the 3'-UTR of IGFBP5 and NUCKS1 mRNA (A). qPCR analysis revealed that the relative expression levels of IGFBP5 (B) and NUCKS1 (C) were significantly decreased by the miR-203 mimic (20 nM) and were significantly increased by the miR-203 inhibitor (75 nM) comparing with the negative controls. Data are mean \pm SD ($n = 4$). ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ relative to the negative control (two-sided Student's *t*-test). The viability of HCE-T cells was significantly decreased by the IGFBP5-siRNA comparing with the negative controls (D). NUCKS1-siRNA had no significantly effect on the cell viability. Data are mean \pm SD ($n = 6$). * $p < 0.05$ relative to the negative control (one-sided Student's *t*-test). The luciferase reporter activity using a luciferase reporter plasmid containing 3'-UTR of human IGFBP5 was significantly diminished after the transfection of miR-203 mimic (E). Data are mean \pm SD ($n = 3$). * $p < 0.05$ relative to the negative control (one-sided Student's *t*-test)

while no differences were found between them in human because of its large blood volume. Therefore, monkey serum and plasma also might not show important differences in miRNA profile because of their comparably large blood volume similar to human [28]. We analyzed the miRNA expression profiles in tears of monkey using human probes because the majority of monkey miRNAs have been well conserved in the human genome [29]. We revealed that miR-203 expressed higher in tears than sera. The viability of HCE-T cells was significantly increased 1.2-fold by miR-203 inhibitor compared with negative control (Fig. 3). In the immortalized HCE cell

line, the proliferation was promoted approximately 1.5-fold even by standard growth supplements [30], indicating the effect of miR-203 inhibitor was significant for the viability of HCE-T cells. Several studies demonstrated that the effect of the drug on the viability of HCE-T cells can be linked to the effect on the corneal wound healing [31–34]. Taken together, miR-203 inhibitor may have a therapeutic potential in corneal epithelial wound healing. miR-203 is widely known as a tumor suppressor and skin-related miRNA, and plays important roles in cell proliferation, differentiation, and metastasis by controlling various genes [35–41]. In the skin, miR-203 represses

stemness and promote epidermal differentiation by restricting proliferative potential [36, 37]. miR-203 may also control corneal differentiation by inhibiting its proliferation to balance between them and maintain its homeostasis.

Our microarray analysis and qPCR analysis revealed that miR-203 mimic downregulates IGFBP5 and NUCKS1, and miR-203 inhibitor upregulates this gene (Table 3 and Fig. 4B). In silico analysis demonstrated that miR-203 directly recognizes the 3'-UTR of the IGFBP5 and NUCKS1 mRNAs by its positions 2 to 8 (Fig. 4A). Luciferase reporter assay demonstrated that IGFBP-5 is a direct target gene for miR-203 (Fig. 4E). IGFBP5 have been reported to be involved in cell proliferation, migration and/or adhesion [42, 43]. Another study demonstrated that IGFBP5 enhances wound closure of mammary epithelial cells during injury by inhibiting the pro-fibrotic/pro-metastatic actions of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) [44]. In this study, we also revealed that silencing of IGFBP5 resulted in decreasing the cell viability of HCE-T cells. These findings support that miR-203 directory regulates IGFBP5 expression to control the viability of corneal epithelial cells, and inhibiting miR-203 enhanced its viability. In contrast, the silencing of NUCKS1 had no significantly effect on the cell viability of HCE-T cells. Previous studies demonstrated that NUCKS1 associates with cell proliferation in tumor [45], while the silencing of NUCKS1 facilitates corneal wound healing following alkali injury [46]. Taken together, these and our results indicated that NUCKS1 may have a different effect on the cell proliferation in different cells or conditions.

miR-184, other highly expressed miRNA in tears, did not show an association with any change in the viability of HCE-T cells. However, miR-184, which showed the highest relative expression level in tears compared with that in sera, has been reported to negatively regulate corneal lymphangiogenesis and angiogenesis [47–49]. These findings indicate that miR-184 in tears may be important for maintaining corneal homeostasis to prevent inflammation and neovascularization.

A limitation of this study is that we confirmed the function of miR-203 in the steady state cell culture, not in the disease condition. Viticchie et al. reported that miR-203 was downregulated to increase the expression of its targets which are necessary for cell proliferation and migration in keratinocytes of mouse skin epidermis during injury [38]. They demonstrated that miR-203 repression could mediate the skin re-epithelialization during wound healing. Furthermore, An J et al reported that miR-203 was downregulated in mouse corneal epithelium during corneal epithelial injury [50]. Their study suggested the possibility that inhibiting of miR-203 during corneal

epithelial injury might increase the viability of corneal epithelial cells as shown in this study. Further studies are needed to understand the function of miR-203 in corneal epithelial disease. Moreover, the circulating miRNA can reportedly be a biomarker for several diseases [51–55]. Thus, the specific and/or abundant miRNAs in tears might have the potential to be valuable biomarkers for ocular diseases.

Conclusion

The abundant miRNAs in tears would play important roles to maintain the homeostasis of ocular surface. In particular, our study provides evidence that miR-203 in tears is an important factor in controlling the physiology of corneal epithelial cells. The effect of inhibiting miR-203 on enhancing corneal epithelial cell viability supports its potential as a therapeutic role in corneal epithelial wound healing.

Abbreviations

miRNA: microRNA; 3'-UTR: 3'-untranslated region; mRNA: Messenger RNA; qPCR: Quantitative polymerase chain reaction; IGFBP5: Insulin-like growth factor binding protein 5; NUCKS1: Nuclear casein kinase and cyclin dependent kinase substrate 1; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HCE-T: Human corneal epithelial; DMEM: Dulbecco's minimum essential medium; FBS: Fetal bovine serum; EGF: Epidermal growth factor; WST: Water-soluble tetrazolium salt; SD: Standard deviation; GNAO1: G protein subunit alpha o1; CDKN2B: Cyclin dependent kinase inhibitor 2B; FRAS1: Frasier extracellular matrix complex subunit 1; TLL1: Tolloid like 1; ARID5B: AT-rich interaction domain 5B; AREG: Amphiregulin; PSTPIP2: Proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 2; NFATC2: Nuclear factor of activated T cells 2; NC: Negative control; TGF- β 1: Transforming growth factor- β 1.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12886-021-02141-9>.

Additional file 1. The gel images of capillary electrophoresis for total RNAs from teas and sera. This data is the uncropped gel images of capillary electrophoresis for total RNAs from teas and sera using the Agilent 2100 bioanalyzer. Microarray analysis was performed for each 2 sample of tear and serum (#1 and #2 in this figure).

Additional file 2. The intensities of microarray analysis for individual miRNAs in monkey tears and sera. This data is the full result table of the microarray analysis of miRNA in tears and sera.

Additional file 3. The viability of HCE-T cells after transfection with mimic or inhibitor of miR-203 and miR-184. This data is the raw data of WST assay of HCE-T cells after transfection with miR-203 mimic (A, 2 experiments, triplicate), miR-203 inhibitor (B, 3 experiments, triplicate), and mimic and inhibitor of miR-184 (C, 3 experiments, triplicate).

Acknowledgements

Not applicable.

Authors' contributions

AN and TN contributed to the design of the study. AN executed the experiments, performed data acquisition and analysis, created the figures and tables, and drafting of the manuscript. TN and MA crucially revised the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Funding

No funding was obtained for this study.

Availability of data and materials

The datasets during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

All of our animal samples were obtained from EveBioscience Co., Ltd., and we have gotten the informed consent for publication of this study from them. All animal procedures in EveBioscience Co., Ltd. were conducted in accordance with the guidelines of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Central Research Laboratories, Research and Development Division, Senju Pharmaceutical Co., Ltd., 6-4-3, Minatojima-Minamimachi, Chuo-Ku, Kobe, Hyogo 650-0047, Japan. ²Senju Laboratory of Ocular Sciences, Senju Pharmaceutical Co., Ltd., 6-4-3, Minatojima-Minamimachi, Chuo-Ku, Kobe, Hyogo 650-0047, Japan.

Received: 26 October 2020 Accepted: 8 October 2021

Published online: 25 October 2021

References

- McCaa CS. The eye and visual nervous system: anatomy, physiology and toxicology. *Environ Health Perspect.* 1982;44:1–8.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116:281–97.
- Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature.* 2004;431:350–5.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 2005;120:15–20.
- Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol.* 2004;5:R13.
- Yuva-Aydemir Y, Simkin A, Gascon E, Gao FB. MicroRNA-9 functional evolution of a conserved small regulatory RNA. *RNA Biol.* 2011;8:557–64.
- Guo D, Li Q, Lv Q, Wei Q, Cao S, Gu J. MiR-27a targets sFRP1 in hFOB cells to regulate proliferation, apoptosis and differentiation. *PLoS One.* 2014;9:e91354.
- Luna C, Li G, Huang J, Qiu J, Wu J, Yuan F, et al. Regulation of trabecular meshwork cell contraction and intraocular pressure by miR-200c. *PLoS One.* 2012;7:e51688.
- Peng CH, Liu JH, Woung LC, Lin TJ, Chiou SH, Tseng PC, et al. MicroRNAs and cataracts: correlation among let-7 expression, age and the severity of lens opacity. *Br J Ophthalmol.* 2012;96:747–51.
- Farr RJ, Januszewski AS, Joglekar MV, Liang H, McAulley AK, Hewitt AW, et al. A comparative analysis of high-throughput platforms for validation of a circulating microRNA signature in diabetic retinopathy. *Sci Rep.* 2015;5:10375.
- Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem.* 2010;56:1733–41.
- Kenny A, Jiménez-Mateos EM, Zea-Sevilla MA, Rábano A, Gili-Manzanaro P, Prehn JHM, et al. Proteins and microRNAs are differentially expressed in tear fluid from patients with Alzheimer's disease. *Sci Rep.* 2019;9:15437.
- Kim YJ, Yeon Y, Lee WJ, Shin UY, Cho H, Sung YK, et al. Comparison of microRNA expression in tears of normal subjects and sjögren syndrome patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2019;60:4889–95.
- Tamkovich S, Grigor'eva A, Eremina A, Tupikin A, Kabilov M, Chernykh V, et al. What information can be obtained from the tears of a patient with primary open angle glaucoma? *Clin Chim Acta.* 2019;495:529–37.
- Chan HW, Yang B, Wong W, Blakeley P, Seah I, Tan QSW, et al. A pilot study on microRNA profile in tear fluid to predict response to anti-VEGF treatments for diabetic macular edema. *J Clin Med.* 2020;9:2920.
- Inubushi S, Kawaguchi H, Mizumoto S, Kuniyama T, Baba M, Kitayama Y, et al. Oncogenic miRNAs identified in tear exosomes from metastatic breast cancer patients. *Anticancer Res.* 2020;40:3091–6.
- Raga-Cervera J, Bolarin JM, Millan JM, Garcia-Medina JJ, Pedrola L, Abellán-Abenza J. miRNAs and genes involved in the interplay between ocular hypertension and primary open-angle glaucoma. *Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis Networks.* *J Clin Med.* 2021;10:2227.
- Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9:654–9.
- Redis RS, Calin S, Yang Y, You MJ, Calin GA. Cell-to-cell miRNA transfer: from body homeostasis to therapy. *Pharmacol Ther.* 2012;136:169–74.
- Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol.* 2012;22:125–32.
- Tanaka Y, Kamohara H, Kinoshita K, Kurashige J, Ishimoto T, Iwatsuki M, et al. Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2013;119:1159–67.
- Wong N, Wang X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:146–52.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol.* 2002;12:735–9.
- Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell.* 2007;129:1401–14.
- Minami K, Uehara T, Morikawa Y, Omura K, Kanki M, Horinouchi A, et al. miRNA expression atlas in male rat. *Sci Data.* 2014;1:140005.
- Iguchi T, Sakurai K, Tamai S, Mori K. Circulating liver-specific microRNAs in cynomolgus monkeys. *J Toxicol Pathol.* 2018;31:3–13.
- Taniguchi K, Ito Y, Sugito N, Kumazaki M, Shinohara H, Yamada N, et al. Organ-specific PTB1-associated microRNAs determine expression of pyruvate kinase isoforms. *Sci Rep.* 2015;5:8647.
- Dufourd T, Robil N, Mallet D, Carcenac C, Boulet S, Brishoual S, et al. Plasma or serum? A qualitative study on rodents and humans using high-throughput microRNA sequencing for circulating biomarkers. *Biol Methods Protoc.* 2019;4(1):bpz006.
- Veeranagouda Y, Rival P, Prades C, Mariet C, LeÅonard JF, Gautier JC, et al. Correction: Identification of microRNAs in *Macaca fascicularis* (Cynomolgus monkey) by homology search and experimental validation by small RNA-seq and RT-qPCR using kidney cortex tissues. *PLoS One.* 2015;10:e014270.
- Omoto M, Suri K, Amouzegar A, Li M, Katikireddy KR, Mittal SK, et al. Hepatocyte growth factor suppresses inflammation and promotes epithelium repair in corneal injury. *Mol Ther.* 2017;25:1881–8.
- Nagai N, Ito Y, Okamoto N, Shimomura Y. A nanoparticle formulation reduces the corneal toxicity of indomethacin eye drops and enhances its corneal permeability. *Toxicology.* 2014;319:53–62.
- Nagai N, Fukuoka Y, Ishii M, Otake H, Yamamoto T, Taga A, et al. Instillation of Sericin enhances corneal wound healing through the ERK pathway in rat debrided corneal epithelium. *Int J Mol Sci.* 2018;19(4):1123.
- Žiniauskaitė A, Ragauskas S, Ghosh AK, Thapa R, Roessler AE, Koulen P, et al. Manganese(III) tetrakis(1-methyl-4-pyridyl) porphyrin, a superoxide dismutase mimetic, reduces disease severity in in vitro and in vivo models for dry-eye disease. *Ocul Surf.* 2019;17(2):257–64.
- Matsuda Y, Machida M, Nakagami Y, Nakajima T, Azuma M. NFE2L2 activator RS9 protects against corneal epithelial cell damage in dry eye models. *PLoS One.* 2020;15(4):e0229421.
- Sonkoly E, Wei T, Janson PC, Sääf A, Lundeberg L, Tengvall-Linder M, et al. MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis? *PLoS One.* 2007;2:e610.

36. Lena AM, Shalom-Feuerstein R, Rivetti di Val Cervo P, Aberdam D, Knight RA, Melino G, et al. miR-203 represses 'stemness' by repressing DeltaNp63. *Cell Death Differ*. 2008;15:1187–95.
37. Yi R, Poy MN, Stoffel M, Fuchs E. A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'. *Nature*. 2008;452:225–9.
38. Viticchie G, Lena AM, Cianfarani F, Odorisio T, Annicchiarico-Petruzzelli M, Melino G, et al. MicroRNA-203 contributes to skin re-epithelialization. *Cell Death Dis*. 2012;3:e435.
39. Jin J, Deng J, Wang F, Xia X, Qiu T, Lu W, et al. The expression and function of microRNA-203 in lung cancer. *Tumor Biol*. 2013;34:349–57.
40. Wang C, Wang X, Liang H, Wang T, Yan X, Cao M, et al. miR-203 inhibits cell proliferation and migration of lung cancer cells by targeting PKC α . *PLoS One*. 2013;8:e73985.
41. Chi Y, Jin Q, Liu X, Xu L, He X, Shen Y, et al. miR-203 inhibits cell proliferation, invasion, and migration of non-small-cell lung cancer by downregulating RGS17. *Cancer Sci*. 2017;108:2366–72.
42. Kuemmerle JF, Zhou H. Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5) stimulates growth and IGF-I secretion in human intestinal smooth muscle by Ras-dependent activation of p38 MAP kinase and Erk1/2 pathways. *J Biol Chem*. 2002;277:20563–71.
43. Hyde C, Hollier B, Anderson A, Harkin D, Upton Z. Insulin-like growth factors (IGF) and IGF-binding proteins bound to vitronectin enhance keratinocyte protein synthesis and migration. *J Invest Dermatol*. 2004;122:1198–206.
44. Vijayan A, Guha D, Ameer F, Kaziri I, Mooney CC, Bennett L, et al. IGFBP-5 enhances epithelial cell adhesion and protects epithelial cells from TGF β 1-induced mesenchymal invasion. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45:2774–85.
45. Symonowicz K, Duś-Szachniewicz K, Woźniak M, Murawski M, Kołodziej P, Osiecka B, et al. Immunohistochemical study of nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinase substrate 1 in invasive breast carcinoma of no special type. *Exp Ther Med*. 2014;8:1039–46.
46. Poon MW, Jiang D, Qin P, Zhang Y, Qiu B, Chanda S, et al. Inhibition of NUCKS facilitates corneal recovery following alkali burn. *Sci Rep*. 2017;7:41224.
47. Grimaldo S, Yuen D, Theis J, Ng M, Ecoiffier T, Chen L. MicroRNA-184 regulates corneal lymphangiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56:7209–13.
48. Zong R, Zhou T, Lin Z, Bao X, Xiu Y, Chen Y, et al. Down-regulation of microRNA-184 is associated with corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57:1398–407.
49. Park JK, Peng H, Yang W, Katsnelson J, Volpert O, Lavker RM. miR-184 exhibits angiostatic properties via regulation of Akt and VEGF signaling pathways. *FASEB J*. 2017;31:256–65.
50. An J, Chen X, Chen W, Liang R, Reinach PS, Yan D, et al. MicroRNA expression profile and the role of miR-204 in corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56:3673–83.
51. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci*. 2010;101:2087–92.
52. Okajima W, Komatsu S, Ichikawa D, Miyamae M, Kawaguchi T, Hirajima S, et al. Circulating microRNA profiles in plasma: identification of miR-224 as a novel diagnostic biomarker in hepatocellular carcinoma independent of hepatic function. *Oncotarget*. 2016;7:53820–36.
53. Armand-Labit V, Meyer N, Casanova A, Bonnabau H, Platzer V, Tournier E, et al. Identification of a circulating MicroRNA profile as a biomarker of metastatic cutaneous melanoma. *Acta Derm Venereol*. 2016;96:29–34.
54. Zhou Y, Wang X, Zhang Y, Zhao T, Shan Z, Teng W. Circulating MicroRNA profile as a potential predictive biomarker for early diagnosis of spontaneous abortion in patients with subclinical hypothyroidism. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:128.
55. Santamaria-Martos F, Benítez I, Ortega F, Zapater A, Giron C, Pinilla L, et al. Circulating microRNA profile as a potential biomarker for obstructive sleep apnea diagnosis. *Sci Rep*. 2019;9:13456.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

