

令和元年5月22日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11288

研究課題名(和文) 糖尿病網膜症の病因におけるPPAR γ を介したサイクリン依存性キナーゼ5の役割

研究課題名(英文) PPAR gamma-mediated role of cyclin-dependent kinase 5 in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy

研究代表者

三田村 佳典 (MITAMURA, Yoshinori)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・教授

研究者番号：30287536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々はPeroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ)の増殖糖尿病網膜症(PDR)進行への関与を報告したが、サイクリン依存性キナーゼ5(Cdk5)がPPAR γ の糖尿病誘発作用を促進することが報告された。そこで、PDRの眼内でのPPAR γ 、Cdk5、p35の発現について検討した。硝子体手術時に採取された増殖膜におけるPPAR γ 、Cdk5、p35のmRNA発現はPDRにおいて対照よりも有意に高かった。免疫染色法でもPDRの増殖膜でこれらの蛋白の発現増加がみられた。以上より、Cdk5が糖尿病網膜症の病因に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Cdk5はほぼすべての臓器・組織で発現しているが、神経細胞に高いことが知られている。しかし、これまで増殖糖尿病網膜症などの増殖性疾患の眼内でのCdk5活性は不明であった。我々は硝子体手術時に得られた手術検体を用いてPPAR γ 、Cdk5の眼内での発現を検索し、黄斑上膜などの対照と比較して有意に発現が亢進していることを示した。このことからCdk5が糖尿病網膜症の病因に関与していることが示唆され、将来的にCdk5阻害剤の投与が増殖糖尿病網膜症の進行を抑制する治療薬となりうる可能性を示したと考えている。

研究成果の概要(英文)：We have reported that peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) plays a role in the progression of proliferative diabetic retinopathy (PDR). Recently, it was reported that cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) promotes the diabetogenic action of PPAR γ . Thus, intraocular expression of PPAR γ , Cdk5, and p35 was examined in eyes with PDR. Expression of PPAR γ , Cdk5, and p35 mRNA in the epiretinal membrane samples obtained during vitrectomy was significantly higher in PDR than in controls. Immunohistochemical analysis showed intense staining of PPAR γ , Cdk5, and p35 in the membrane samples from PDR. Taken together, Cdk5 may play a role in the pathogenesis of diabetic retinopathy.

研究分野：眼科学

キーワード：外科 細胞・組織 生体分子 糖尿病 臨床

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症は成人の失明原因の大多数を占めており、現在の治療法は進行例には必ずしも十分とはいえないのが現状である。近年、増殖糖尿病網膜症の病因に種々のサイトカインやサイトカインの発現を制御している転写因子が関与していることをうかがわせる報告が多数なされている。そのなかでも血管内皮増殖因子 (VEGF: vascular endothelial growth factor) はもっとも注目されているサイトカインであり、VEGF 抗体はすでに臨床応用がなされている。また、VEGF の発現を制御している転写因子として activator protein-1 (AP-1) や hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) などが知られており、我々はこれまでに増殖糖尿病網膜症の増殖膜において AP-1 mRNA が有意に高頻度で発現していること、また増殖膜のグリア細胞において AP-1 の活性化がみられることを報告してきた。さらに、HIF-1 についても増殖膜における発現の亢進を確認している。

リガンド応答性の核内受容体型の転写因子である PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) は VEGF などの新生血管促進因子の発現亢進を誘導することによって血管新生を促進することが報告されているが、我々は最近、この PPAR γ が増殖糖尿病網膜症の前房水・硝子体中に含まれるエクソソーム内に対照と比べて有意に高濃度で存在し、病期の進行との正の相関を示すことや、増殖糖尿病網膜症の増殖膜においても mRNA、蛋白レベルで発現が亢進していることを示し、糖尿病網膜症の進行に関与していることを報告した。また、近年、サイクリン依存性キナーゼ 5 (Cdk5: Cyclin-dependent kinase 5) による PPAR γ のリン酸化がインスリン抵抗性の発生機序にかかわっていることが報告された。肥満と関連したインスリン抵抗性は、2 型糖尿病発症の主な前兆であるが、PPAR γ のセリン 273 の Cdk5 によるリン酸化が、脂肪組織で糖尿病誘発性遺伝子の発現を促進することが報告され、この修飾を阻害することは、PPAR γ に結合するチアゾリジンジオンや、PPAR γ の部分的アゴニストあるいは非アゴニストなどの抗糖尿病薬の主要な治療機序となっている。これを裏付けるように 2007 年に 2 型糖尿病患者の大規模 SNP 疫学研究の結果が多施設から報告され、注目を集めている。人種を問わず 2 型糖尿病発症リスクを高める遺伝子変異として Cdk5 regulatory subunit-associate protein 1-like 1 (CDKAL1) 遺伝子が同定された。この CDKAL1 は Cdk5 の活性を阻害する分子と相同性が高いことが報告されており、糖尿病の病因に Cdk5 が深くかかわっていることがうかがわれる。以上のことから Cdk5 が PPAR γ を介してインスリン抵抗性という糖尿病の基礎的病態に重要な役割を担っているのみならず、糖尿病網膜症の病因に関わっていることが推測される。増殖糖尿病網膜症の増殖膜組織では PPAR γ とともに Cdk5 活性の増加が予想され、Cdk5 の活性を抑制することにより増殖糖尿病網膜症における血管新生を抑制できる可能性がある。

2. 研究の目的

硝子体手術の技術の進歩により術中に眼内の増殖膜、硝子体液などのサンプルを安全に採取することが可能になってきた。我々は、これまでも術中に得られた硝子体サンプルを用いて、マクロファージ遊走阻止因子 (Macrophage Migration Inhibitory Factor: MIF) や Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) などのケモカインと、肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor: HGF)、VEGF、Placenta Growth Factor (PlGF) などの増殖因子が増殖糖尿病網膜症などの眼内増殖性疾患の前房水、硝子体液中に高濃度で存在していることを報告してきた。今回、増殖糖尿病網膜症や特発性黄斑上膜などの血管新生を伴わない疾患の増殖膜を採取し、Cdk5 および Cdk5 の制御因子である p35、p35 の分解産物である p20 の発現を mRNA レベル、蛋白レベルで検索するとともに Cdk5 活性を抗 Cdk5 抗体で免疫沈降したのち、ヒストン H1 のリン酸化で測定し、増殖糖尿病網膜症の増殖膜において Cdk5 の異常な活性化がないかを確認する。また、同時に硝子体手術にて採取可能な硝子体液や前房水を採取し、ヒストン H1 を用いて Cdk5 活性を測定するとともに PPAR γ 濃度も測定し両者に相関がないかを確認する。また、最近、眼科領域にて抗 VEGF 抗体による治療が盛んに行われており、増殖糖尿病網膜症手術前に抗 VEGF 抗体を硝子体内注射し、増殖糖尿病網膜症の活動性を低下させることがある。この抗 VEGF 療法後の眼内の PPAR γ 濃度、Cdk5 活性の変化についても解析を行う。

Cdk5 はほぼすべての臓器・組織で発現しているが、神経細胞に高いことが知られている。しかし、これまで増殖糖尿病網膜症などの増殖性疾患の眼内での Cdk5 活性は不明である。また、我々は硝子体手術時に得られたサンプルを用いて PPAR γ 濃度、Cdk5 の眼内での活性を検索し、将来的に Cdk5 の阻害剤を投与することで増殖糖尿病網膜症の進行を抑制する治療薬としての可能性を模索したいと考えている。

3. 研究の方法

ヒトの手術検体を用いた検討により増殖糖尿病網膜症における Cdk5 の眼内活性と PPAR γ との相互作用を解明していく。

(1) 前房水・硝子体液検体と増殖膜検体の採取、保存

手術は必要に応じて白内障手術を行った後、型のごとく three port を作成し硝子体切除を行う。硝子体切除開始時に硝子体カッターにて硝子体液を採取する。白内障手術併用時には白内障手術の前に前房水を採取する。採取した前房水・硝子体液検体はすぐに -80℃ にて保存する。特発性黄斑上膜については ILM 鑷子などを用いて網膜前膜を peel する。増殖糖尿病網膜症では、必

要に応じて垂直剪刀による segmentation を行った後、水平剪刀にて delamination を行い、増殖膜を網膜面から遊離する。遊離した増殖膜、網膜前膜は硝子体鑷子にて眼外に摘出し、免疫染色用検体については直ちに OCT compound に包埋し液体窒素にて凍結させた後、-80 にて保存する。Cdk5 活性測定用検体についても-80 にて保存し、RT-PCR 用の検体については直ちにトリゾール 0.5cc にひたし 4 にて保存する。

(2) 増殖糖尿病網膜症の前房水・硝子体液検体と増殖膜における Cdk5 の活性変化の検討

増殖糖尿病網膜症の前房水・硝子体液検体については ELISA キットを使用して PPAR、p35、VEGF 濃度を測定する。同時に総蛋白量も分光光度計を使用して測定し、総蛋白量における PPAR、p35、VEGF 量を補正する。また、前房水・硝子体検体を抗 Cdk5 抗体で免疫沈降したのち、ヒストン H1 と反応させヒストン H1 のリン酸化により Cdk5 活性を検索する。

増殖膜 (図 1) および特発性黄斑上膜の網膜前膜 (新生血管を含まないコントロール) のヒト手術検体から RNA を抽出した後 cDNA を合成する。PPAR、Cdk 5 および Cdk 5 の制御因子である p35 に特異的なプライマーを用いた定量的 PCR 法により、両群における PPAR、Cdk 5、p35 遺伝子発現量を比較検討する。一方、両群のヒト手術検体から凍結切片を作成し、蛋白レベルでの発現パターンについて PPAR、Cdk 5、p35 抗体を用いた免疫染色法により比較する。さらに、血管内皮細胞などの特異抗体との免疫二重染色を行い、増殖糖尿病網膜症の増殖膜における PPAR、Cdk5、p35 の局在について検討する。

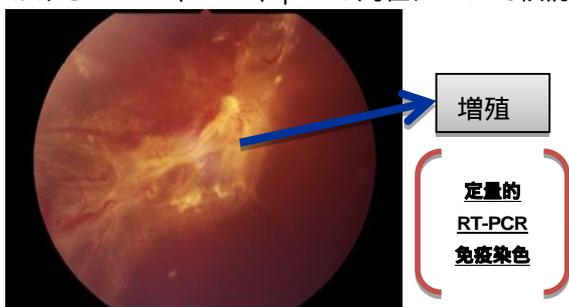


図 1 増殖膜検体の解析

4. 研究成果

(1) 増殖膜検体における PPAR と Cdk5、p35 蛋白の発現

ヒト増殖糖尿病網膜症症例ならびにコントロールとして黄斑上膜症例の増殖膜サンプル各 2 例ずつについて PPAR と Cdk5、p35 蛋白の発現をみるため免疫染色を行った。その結果、黄斑上膜と比較して増殖糖尿病網膜症の増殖膜において PPAR と Cdk5、p35 蛋白の発現が増加していることを確認した。

(2) 増殖膜検体における PPAR と Cdk5、p35 の mRNA の発現

ヒト増殖糖尿病網膜症症例の硝子体手術に得られた増殖膜サンプル 7 検体とコントロールとして新生血管を伴わないヒト特発性黄斑上膜 5 検体について PPAR と Cdk5、Cdk 5 の制御因子である p35 の mRNA の発現を調べるため定量的 RT-PCR を行った。増殖膜における PPAR と Cdk5、p35 の mRNA の発現は、PDR において対照よりも有意に高かった ($p=0.0185$ 、 $p=0.028$ 、 $p=0.042$)。

(3) 前房水・硝子体中の PPAR と Cdk5、p35、VEGF 濃度

徳島大学病院倫理委員会の承認ならびに患者さんの承諾を得たうえで、増殖糖尿病網膜症ならびにコントロールとして黄斑円孔・黄斑上膜症例の硝子体ならびに前房水検体、それぞれ 8 8 検体を硝子体手術時に眼内還流液の還流を始める前に採取し、ELISA 法による硝子体・前房水 PPAR 濃度の測定を行った。測定値は糖尿病網膜症で見られる血液 - 網膜関門の破綻に伴う血漿成分の漏出による影響を排除するため、総蛋白濃度で割ることにより補正した値を用いた。前房水については、増殖糖尿病網膜症では 0.375 ± 0.466 nmol/mg であったのに対してコントロールでは 0.072 ± 0.078 nmol/mg と増殖糖尿病網膜症において有意に前房水 PPAR 濃度が高かった。また、硝子体についても増殖糖尿病網膜症では 0.581 ± 0.683 nmol/mg であったのに対してコントロールでは 0.077 ± 0.090 nmol/mg と増殖糖尿病網膜症において有意に硝子体 PPAR 濃度が高かった。Cdk5 活性、p35 濃度についても増殖糖尿病網膜症において対照と比較して有意に高値を示した ($p < 0.001$ 、 $p = 0.014$)。

PPAR と VEGF の発現レベルの相関を調べる目的で前房水・硝子体の VEGF 濃度を測定した。PPAR 測定値と同様に血液 - 網膜関門の破綻に伴う血漿成分の漏出による影響を排除するため、総蛋白濃度で割ることにより補正した値を用いた。VEGF 濃度は増殖糖尿病網膜症では前房水 49.2 ± 9.33 pg/mg、硝子体 84.6 ± 16.1 pg/mg であったのに対してコントロールでは前房水 7.32 ± 3.09 pg/mg、硝子体 3.06 ± 1.00 pg/mg と増殖糖尿病網膜症において有意に VEGF 濃度が高く、この結果はこれまでの報告と一致していた。また、前房水・硝子体 PPAR 濃度は有意に前房水・硝子体 VEGF 濃度と正の相関を示すことがわかった。

以上より、Cdk5が糖尿病網膜症の病因に関与していることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9件)

Egawa M, Mitamura Y, Niki M, Sano H, Miura G, Chiba A, Yamamoto S, Sonoda S, Sakamoto T, Correlations between choroidal structures and visual functions in eyes with retinitis pigmentosa, *Retina*, 査読有、印刷中 2019

DOI: 10.1097/IAE.0000000000002285.

Sano H, Namekata K, Kimura A, Shitara H, Guo X, Harada C, Mitamura Y, Harada T, Differential effects of *N*-acetylcysteine on retinal degeneration in two mouse models of normal tension glaucoma, *Cell Death Dis*, 査読有、10(2)、2019、pp.75

DOI: 10.1038/s41419-019-1365-z.

Akaiwa K, Namekata K, Azuchi Y, Sano H, Guo X, Kimura A, Harada C, Mitamura Y, Harada T, Topical ripasudil suppresses retinal ganglion cell death in a mouse model of normal tension glaucoma, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 査読有、59、2018、pp. 2080-2089

DOI: 10.1167/iovs.17-23276.

Akaiwa K, Namekata K, Azuchi Y, Guo X, Kimura A, Harada C, Mitamura Y, Harada T, Edaravone suppresses retinal ganglion cell death in a mouse model of normal tension glaucoma, *Cell Death Dis*, 査読有、8、2017、pp.e2934

DOI: 10.1038/cddis.2017.341.

Kinoshita T, Mitamura Y, Shinomiya K, Egawa M, Iwata A, Fujihara A, Ogushi Y, Semba K, Akaiwa K, Uchino E, Sonoda S, Sakamoto T, Diurnal variations in luminal and stromal areas of choroid in normal eyes, *Br J Ophthalmol*, 査読有、101、2017、pp. 360-364

DOI: 10.1136/bjophthalmol-2016-308594.

Daizumoto E, Mitamura Y, Sano H, Akaiwa K, Niki M, Yamanaka C, Kinoshita T, Egawa M, Sonoda S, Sakamoto T, Changes of choroidal structure after intravitreal aflibercept therapy for polypoidal choroidal vasculopathy, *Br J Ophthalmol*, 査読有、101、2017、pp. 56-61

DOI: 10.1136/bjophthalmol-2016-309694.

Kinoshita T, Mori J, Okuda N, Imaizumi H, Iwasaki M, Shimizu M, Miyamoto H, Akaiwa K, Semba K, Sonoda S, Sakamoto T, Mitamura Y, Effects of exercise on the structure and circulation of choroid in normal eyes, *PLoS ONE*, 査読有、11(12)、2016、pp. e0168336

DOI: 10.1371/journal.pone.0168336.

Kinoshita T, Mitamura Y, Mori T, Akaiwa K, Semba K, Egawa M, Mori J, Sonoda S, Sakamoto T, Changes in choroidal structures in eyes with chronic central serous chorioretinopathy after half-dose photodynamic therapy, *PLoS ONE*, 査読有、11(9)、2016、pp. e0163104

DOI: 10.1371/journal.pone.0163104.

Fujihara-Mino A, Mitamura Y, Inomoto N, Sano H, Akaiwa K, Semba K, Optical coherence tomographic parameters predictive of visual outcome after anti-vascular endothelial growth factor therapy for retinal vein occlusion, *Clin Ophthalmol*, 査読有、10、2016、pp. 1305-1313

DOI: 10.2147/OPHTH.S110793.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：江川 麻理子

ローマ字氏名：(EGAWA, Mariko)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部(医学系)

職名：講師

研究者番号(8桁): 70507657

(2)研究分担者

研究分担者氏名：仙波 賢太郎

ローマ字氏名：(SEMBA, Kentaro)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：病院

職名：助教

研究者番号(8桁): 10745748

(3)研究協力者

研究協力者氏名：原田 高幸

ローマ字氏名：(HARADA, Takayuki)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。