

令和 2 年 5 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11444

研究課題名(和文) 糖尿病網膜症における可溶性VAP-1/SSAOの産生機構

研究課題名(英文) Mechanism of soluble VAP-1/SSAO production in diabetic retinopathy

研究代表者

齋藤 理幸 (Michiyuki, Saito)

北海道大学・大学病院・特任助教

研究者番号：90443944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病網膜症は重篤な視機能障害をきたすため、その病態の解明は眼科学における重要な課題である。VAP-1/SSAOは、生体内に存在する一級アミンを酸化してアルデヒドや過酸化水素などを産生する酵素である。先行研究において、糖尿病網膜症患者の硝子体中でこのVAP-1/SSAOが増加していることが明らかになっていた。

本研究により、血管内皮増殖因子(VEGF)がマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-2およびMMP-9の活性化を介して網膜毛細血管内皮細胞からのVAP-1/SSAOの分泌を促進し、増加したVAP-1/SSAOが細胞の酸化ストレスを亢進させることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病網膜症は糖尿病罹病期間にともなってその発症率が急増する細小血管障害であり、世界的な高齢化にともなって糖尿病網膜症患者数も今後増加すると推測されている。我々は、これまで糖尿病網膜症の病態メカニズムにおける炎症と酸化ストレスの関与に着目して検討を進め、この両者に関連する分子VAP-1/SSAOを主な研究対象としてきた。本研究により、VEGFによる網膜血管内皮細胞からのVAP-1/SSAO分泌亢進の機序が明らかとなり、糖尿病網膜症の病態形成に関わる重要な知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Diabetic retinopathy (DR) is a leading cause of severe vision impairment; therefore, the elucidation of pathological mechanisms of DR is an important task in the field of ophthalmology. VAP-1/SSAO is an enzyme that generates aldehydes and hydrogen peroxide through oxidation of primary monoamines. In the previous studies, we found that levels of VAP-1/SSAO are elevated in the vitreous fluid of patients with DR.

In the current study, we showed that vascular endothelial growth factor (VEGF) increases VAP-1/SSAO secretion from retinal capillary endothelial cells via induction of MMP-2 and MMP-9 enzymatic activity, and thereby accelerates oxidative stress in the cells.

研究分野：眼細胞生物学、眼循環代謝学

キーワード：糖尿病網膜症 血管内皮増殖因子 マトリックスメタロプロテアーゼ VAP-1/SSAO

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症 (図1) は糖尿病罹病期間にともなうてその発症率が急増する細小血管障害であり、世界的な高齢化にともなうて糖尿病網膜症患者数も今後増加すると推測されている。糖尿病網膜症は、網膜毛細血管の構成成分である血管内皮細胞やペリサイトが高血糖による直接的な障害や二次的に惹起される炎症や酸化ストレスなどの間接的な障害を受けることによって生じる。Vascular adhesion protein (VAP)-1 は血管内皮細胞に発現するタンパクであり、白血球接着分子として白血球の血管外遊走を促進して炎症に関与する一方、アミン酸化酵素である semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) としての酵素活性を有する。VAP-1/SSAO (図2) は膜結合型、および膜結合ドメインの切断を受けた可溶型タンパクとして細胞外に局在し、生体内に存在する一級アミンを酸化してアルデヒド、アンモニアおよび過酸化水素を産生する。糖尿病網膜症患者硝子体においては、この可溶型 VAP-1/SSAO が増加してお

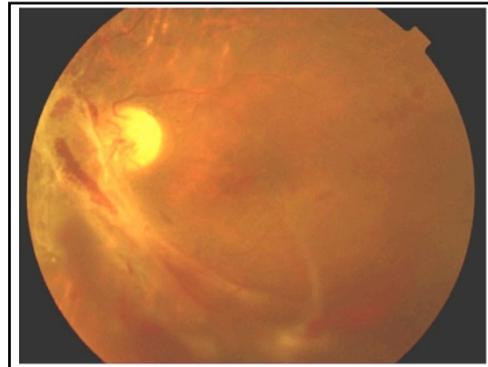


図1 糖尿病網膜症

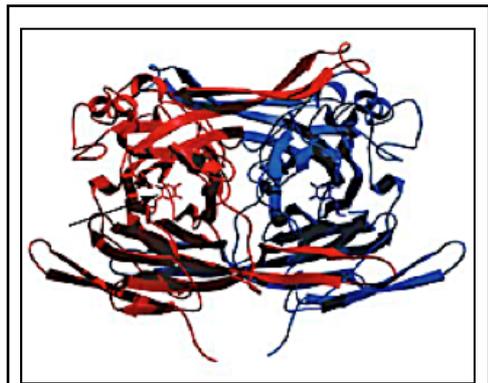


図2 VAP-1/SSAO

り [Murata M, **Noda K** et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012; 53: 4055-62]、また酸化ストレス亢進の原因となっていることが明らかとなっている。

糖尿病網膜症の進行した病型である増殖糖尿病網膜症の重症例に対して硝子体手術を施行する際、その血管新生反応の活動を抑制してから手術に臨む目的で血管新生因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) に対する阻害剤を硝子体内に投与し、その数日後に手術をおこなう場合がある。その術中に得られた硝子体液中の可溶型 VAP-1 濃度を測定したところ、抗 VEGF 製剤を投与した増殖糖尿病網膜症患者の硝子体では可溶型 VAP-1 (可溶型 VAP-1/SSAO) 濃度が著明に減少していることがわかった (図3)。本結果は、VEGF が可溶型 VAP-1 産生経路の上流にあることを示唆していた。

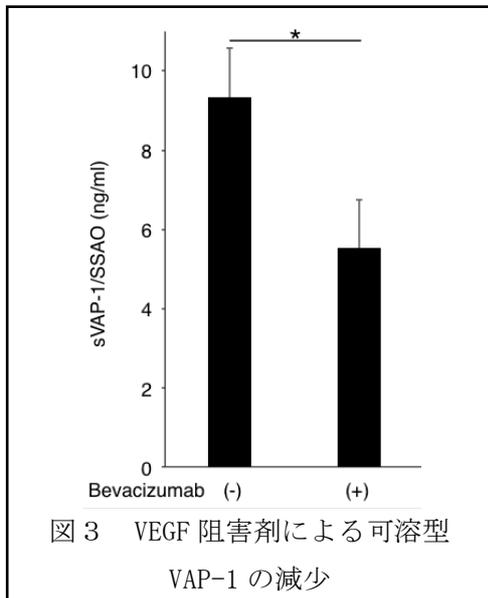


図3 VEGF 阻害剤による可溶型 VAP-1 の減少

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病網膜症眼内における可溶型 VAP-1/SSAO の産生メカニズムと同疾患の病態責任分子 VEGF の関連を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

北海道大学病院眼科で硝子体手術を施行される増殖糖尿病網膜症患者より硝子体液採取を

おこない、硝子体中の可溶性 VAP-1/SSAO 濃度、および酸化ストレスマーカーであるヘキサノイルリジン (N epsilon-(hexanoyl) lysine、HEL) 濃度を ELISA 法で測定し、術前に抗 VEGF 製剤であるベバシズマブを硝子体内に投与した群と投与しない群で比較検討をおこなった。本研究は、「ヘルシンキ宣言 (2013 年 10 月修正)」及び「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」(平成 26 年文部科学省・厚生労働省告示第 3 号、平成 29 年 2 月一部改正)を遵守して、北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の諮問を経て実施した。

さらに、ラット網膜毛細血管内皮細胞 TR-iBRB2 を用いて *in vitro* 解析をおこない、VEGF (1-100 ng/ml) 刺激による *Vap-1* mRNA 発現量、培養上清中の VAP-1/SSAO 蛋白濃度および SSAO 酵素活性の変化を real-time PCR 法、ウェスタンブロット法、および fluoro SSAO assay により検討した。網膜血管内皮細胞において腫瘍壊死因子 TNF- $\alpha$  やインターロイキン 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) などの炎症性サイトカインがマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) を誘導し、膜型 VAP-1 切断によって可溶性 VAP-1/SSAO を同細胞から遊離させることを我々は先行研究で明らかとしている。そのため、MMPs が VAP-1/SSAO 分泌に関与しているとの仮説を立て、その検証をおこなった。ゼラチンザイモグラフィ法を用いて、MMP-2 と MMP-9 活性化率を測定し、それらが VEGF 刺激により変化するかを検討した。続いて、MMP 阻害剤により VAP-1/SSAO の分泌が抑制されるかについての検討をおこなった。可溶性 VAP-1/SSAO は生体内に存在する一級アミンを酸化してアルデヒド、アンモニアおよび過酸化水素を産生する酵素である。TR-iBRB2 に VEGF 刺激をおこない、ポリアミンの一種であるスペルミンを添加した際の過酸化水素および活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS) の生成量に変化がみられるかについても解析した。

#### 4. 研究成果

抗 VEGF 製剤ベバシズマブを投与した増殖糖尿病病網膜症患者の硝子体中の可溶性 VAP-1/SSAO 濃度、および酸化ストレスマーカーの濃度は投与していない群に比べ有意に低下していた(図 4)。抗 VEGF 製剤を投与しない増殖糖尿病病網膜症患者の硝子体中では可溶性 VAP-1/SSAO 濃度と HEL 濃度に正の相関がみられたが、抗 VEGF 製剤を投与した群では両者の相関は失われていた。

ラット網膜毛細血管内皮細胞 TR-iBRB2 を糖尿病を模した 25 mM の糖負荷条件で培養し、同条件下で VEGF (1-100 ng/ml) 刺激をすると、培養上清中の VAP-1/SSAO 蛋白(図 5)、および SSAO 酵素活性が有意に増加するという結果を得た。*Vap-1* mRNA の発現量は VEGF 刺激により変化しなかった。これらの結果から、VEGF が糖負荷条件下において網膜血管内皮細胞からの VAP-1/SSAO 分泌を亢進させることが示された。続いて、VEGF による網膜血管内皮細胞からの VAP-1/SSAO 分泌亢進の機序について検討をおこない、TR-iBRB2 において MMP-2 と MMP-9 活性が VEGF 刺激によって亢進すること、MMP 阻害剤 batimastat によって VEGF 刺激による培養上清中の SSAO 活性の亢進が抑制されることが明らかになった(図 6)。最後に、

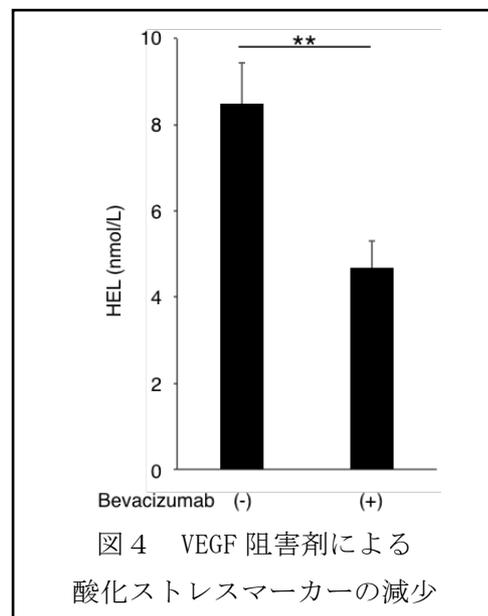


図 4 VEGF 阻害剤による酸化ストレスマーカーの減少

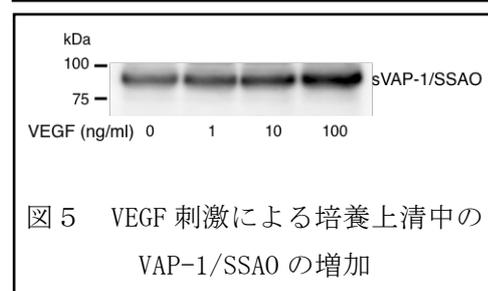


図 5 VEGF 刺激による培養上清中の VAP-1/SSAO の増加

VEGF による可溶性 VAP-1/SSAO の増加がどのような影響を網膜血管内皮細胞に及ぼすかに関する検討を行い、TR-iBRB2 に対する VEGF 刺激は過酸化水素の産生を亢進させること、VEGF 刺激はポリアミンの一種であるスペルミンを添加した場合に ROS を増加させるが、VAP-1/SSAO に対する阻害剤であるセミカルバジドを加えると同変化は抑制されることがわかった (図 7)。

これらのことから、VEGF は MMP-2 および MMP-9 の活性化を介して網膜血管内皮細胞からの VAP-1/SSAO の分泌を促進し、増加した VAP-1/SSAO が網膜血管内皮細胞の酸化ストレスを亢進させることが明らかになった。酸化ストレスは糖尿病における代表的な病態変化であり、本研究課題における一連の検討結果は VEGF により増加する可溶性 VAP-1/SSAO が糖尿病網膜症の病態形成に寄与していることを示唆していた。

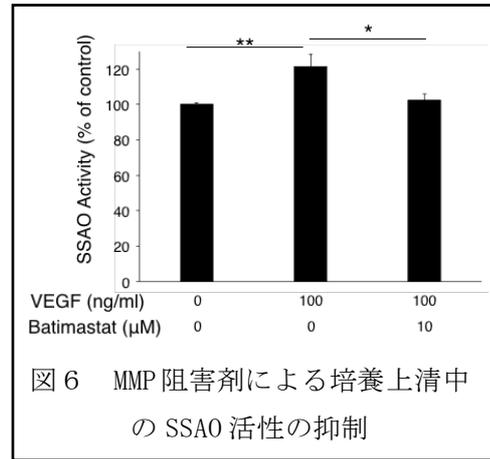


図 6 MMP 阻害剤による培養上清中の SSAO 活性の抑制

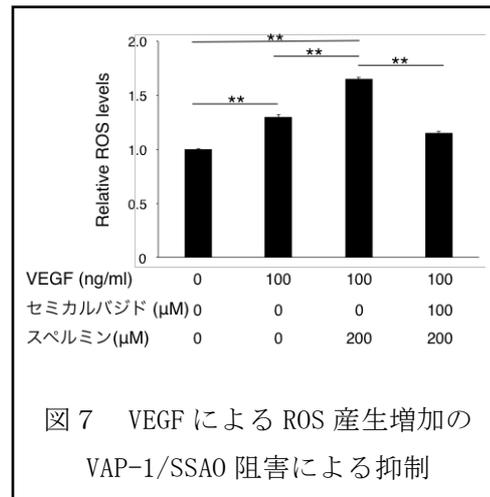


図 7 VEGF による ROS 産生増加の VAP-1/SSAO 阻害による抑制

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Murata Miyuki, Noda Kousuke, Yoshida Shiho, Saito Michiyuki, Fujiya Akio, Kanda Atsuhiko, Ishida Susumu	4. 巻 60
2. 論文標題 Unsaturated Aldehyde Acrolein Promotes Retinal Glial Cell Migration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 4425-4435
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/iovs.19-27346	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Saito Michiyuki, Noda Kousuke, Saito Wataru, Ishida Susumu	4. 巻 256
2. 論文標題 Relationship between choroidal blood flow velocity and choroidal thickness in patients with regression of acute central serous chorioretinopathy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 227-229
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00417-017-3791-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida Shiho, Murata Miyuki, Noda Kousuke, Matsuda Takashi, Saito Michiyuki, Saito Wataru, Kanda Atsuhiko, Ishida Susumu	4. 巻 62
2. 論文標題 Proteolytic cleavage of vascular adhesion protein-1 induced by vascular endothelial growth factor in retinal capillary endothelial cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 256-264
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10384-017-0555-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 野田航介	4. 巻 32
2. 論文標題 VEGF阻害薬と次の分子標的. シンポジウム2：硝子体内注射の現況と進展.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 眼薬理.	6. 最初と最後の頁 51-54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 野田航介	4. 巻 122
2. 論文標題 第121回 日本眼科学会総会 評議員会指名講演 眼科のトランスレーショナルリサーチ 多機能蛋白質に着目した糖尿病網膜症に対する創薬研究	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日眼会誌	6. 最初と最後の頁 223-248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Shiho, Murata Miyuki, Noda Kousuke, Matsuda Takashi, Saito Michiyuki, Saito Wataru, Kanda Atsuhiko, Ishida Susumu	4. 巻 62
2. 論文標題 Proteolytic cleavage of vascular adhesion protein-1 induced by vascular endothelial growth factor in retinal capillary endothelial cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Jpn J Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 256-264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10384-017-0555-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsuda Takashi, Noda Kousuke, Murata Miyuki, Kawasaki Akiko, Kanda Atsuhiko, Mashima Yukihiko, Ishida Susumu	4. 巻 58
2. 論文標題 Vascular Adhesion Protein-1 Blockade Suppresses Ocular Inflammation After Retinal Laser Photocoagulation in Mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci.	6. 最初と最後の頁 3254-3261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.17-21555	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Murata Miyuki, Noda Kousuke, Kawasaki Akiko, Yoshida Shiho, Dong Yoko, Saito Michiyuki, Dong Zhenyu, Ando Ryo, Mori Shohei, Saito Wataru, Kanda Atsuhiko, Ishida Susumu	4. 巻 42
2. 論文標題 Soluble Vascular Adhesion Protein-1 Mediates Spermine Oxidation as Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase: Possible Role in Proliferative Diabetic Retinopathy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Curr Eye Res.	6. 最初と最後の頁 1674-1683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/02713683.2017.1359847	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 福津佳苗、齋藤理幸、野田航介、村田美幸、加瀬 諭、柴 涼介、磯貝直己、道家 充、石田 晋
2. 発表標題 機械学習によって自動算出された網膜動静脈面積と血圧脈波の関係
3. 学会等名 第58回日本網膜硝子体学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤理幸、野田航介、福津佳苗、村田美幸、加瀬 諭、柴 涼介、磯貝直己、道家 充、石田 晋
2. 発表標題 機械学習によって自動算出された網膜動静脈面積と血圧の関係
3. 学会等名 第73回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福津佳苗、齋藤理幸、野田航介、村田美幸、加瀬 諭、柴 涼介、磯貝直己、道家 充、石田 晋
2. 発表標題 ニューラルネットワークによる眼底写真の網膜動静脈検出
3. 学会等名 第36回日本眼循環学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤 理幸、高橋 光生、伊藤 有希、遠藤 弘毅、坂口 貴鋭、七戸 夏子、和田 莉奈、勝田 聡、鈴木 康夫、加瀬 学
2. 発表標題 機械学習を用いたpachychoroidの EDI-OCTの脈絡膜画像パターンの解析
3. 学会等名 第72回臨床眼科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤有希、齋藤理幸、高橋光生、遠藤弘毅、勝田聡、加瀬 諭、園田祥三、坂本泰二、加瀬 学 .
2. 発表標題 2 階調化法を用いた pachychoroid neovascularopathy の脈絡膜構造変化の検討
3. 学会等名 第57回日本網膜硝子体学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤 理幸、高橋 光生、伊藤 有希、遠藤 弘毅、坂口 貴鋭、七戸 夏子、和田 莉奈、勝田 聡、鈴木 康夫、加瀬 学
2. 発表標題 機械学習により作成した pachychoroid index と加齢黄斑変性の関連
3. 学会等名 第57回日本網膜硝子体学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 新海晃弘、齋藤 航、橋本勇希、齋藤理幸、野田航介、石田 晋
2. 発表標題 黄斑部毛細血管拡張症 type 2 の視力と視細胞形態の推移
3. 学会等名 第57回日本網膜硝子体学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 遠藤弘毅、加瀬 諭、高橋光生、齋藤理幸、横井匡彦、菅原ちさと、勝田 聡、加瀬 学
2. 発表標題 糖尿病黄斑浮腫と脈絡膜層別厚の関連
3. 学会等名 第24回日本糖尿病眼学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本勇希、齋藤 航、長谷川裕香、齋藤理幸、野田航介、石田 晋.
2. 発表標題 発症前後の脈絡膜形態変化が観察できたacute macular neuroretionpathy の1例
3. 学会等名 第35回日本眼循環学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Saito M, Noda K, Shibata Y, Fujiya A, Suzuki T, Ando R, Mori S, Kase S, Ishida S.
2. 発表標題 Visco-assisted internal limiting membrane translocation technique for unclosed macular hole
3. 学会等名 Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting. (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 齋藤理幸、野田航介、星川靖裕、小林正彦、道家 充、村田美幸、齋藤 航、加瀬 学、石田 晋
2. 発表標題 血管径自動解析プログラムによる網膜動静脈比と血圧脈波の相関
3. 学会等名 第56回日本網膜硝子体学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 齋藤理幸
2. 発表標題 LSFGによるCSCの脈絡膜循環解析. シンポジウム「網脈絡膜疾患の病態解明：網脈絡膜循環障害評価」
3. 学会等名 第121回日本眼科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	野田 航介  (Noda Kousuke)  (90296666)	北海道大学・医学研究院・准教授    (10101)	