

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18791259

研究課題名 (和文) 増殖性糖尿病網膜症における蛋白糖化最終産物の役割

研究課題名 (英文) Role of advanced glycation end products in the development of proliferative diabetic retinopathy.

研究代表者

加治 優一 (KAJI YUICHI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：50361332

研究成果の概要：

増殖糖尿病網膜症の硝子体液中には蛋白糖化最終産物の中でも pyrraline や imidazolone 濃度が高値であった。さらに糖尿病患者の硝子体液中における total antioxidant power が低値を示すことより、酸化ストレスの亢進が眼局所でも生じていることが明らかになった。

実験的には、蛋白糖化最終産物と蛋白糖化最終産物受容体の相互作用の亢進によって、網膜血管への白血球粘着や網膜血管透過性の亢進という、糖尿病網膜症の前段階の変化が *in vivo* で生じていることが明らかになった。さらに蛋白糖化最終産物と蛋白糖化最終産物受容体の相互作用を抑制する可溶性 RAGE の全身投与によって、糖尿病網膜症を予防することができた。

上記の結果より、蛋白糖化最終産物と蛋白糖化最終産物受容体の相互作用や酸化ストレスの亢進は VEGF などのサイトカインの発現を誘発し、糖尿病網膜症の発症に関与することが明らかになった。また、蛋白糖化最終産物受容体の作用を阻害することが、将来的には糖尿病網膜症をはじめとする合併症の予防につながると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	330,000	3,830,000

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：蛋白糖化最終産物、酸化ストレス、活性酸素、アポトーシス、サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病の有病率は増加傾向にあり、糖尿病合併症の一つである網膜症の罹患率も増加している。糖尿病網膜症に対する治療法は、

厳密な血糖値の管理、網膜光凝固術、硝子体切除術、抗 VEGF 抗体投与を含めて様々なものがある。しかし、これらの治療手段を試みても、なお失明に至る患者は増加しつつある。

(2) 糖尿病合併症の発症には、蛋白糖化最終産物が重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。蛋白糖化最終産物は糖尿病網膜症の発症にも関与するという動物実験の結果があるものの、ヒトのデータは皆無であった。

(3) 蛋白糖化最終産物が糖尿病合併症につながるとなれば、AGE と蛋白糖化最終産物受容体の相互作用を抑制することが糖尿病合併症の予防や治療につながる可能性がある。しかしながら、現在のところ AGE と蛋白糖化最終産物受容体の相互作用を抑制するような治療薬は得られていない。

## 2. 研究の目的

(1) ヒトの硝子体切除検体を収集し、蛋白糖化最終産物の役割を検討する

(2) 糖尿病の動物において蛋白糖化最終産物および蛋白糖化最終産物受容体の相互作用の亢進が糖尿病網膜症に対してどのような影響を及ぼすかについて検討する。

(3) 可溶性蛋白糖化最終産物受容体を全身投与することにより、蛋白糖化最終産物と蛋白糖化最終産物受容体の相互作用を抑制することが、糖尿病網膜症にどのように得今日を及ぼすかについて検討する。

(4) 加齢性変化や糖尿病合併症との関連が指摘されている D 型アミノ酸について、分子レベルで検討をする。

## 3. 研究の方法

(1) 糖尿病網膜症、糖尿病黄斑浮腫、網膜剥離、増殖硝子体網膜症、黄斑円孔の患者に対する硝子体切除検体を 300 症例以上あつめ、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存する。この硝子体切除検体における AGE, VEGF, total antioxidant power の量を ELISA を用いて定量化し、病型・年齢・性別・糖尿病歴・血中 HbA1c 濃度のパラメーターと比較検討する。

(2) AGE と蛋白糖化最終産物受容体の相互作用を促進するため、コントロールマウス、ストレプトゾトシンを用いて高血糖を誘発したマウス、蛋白糖化最終産物受容体の一つである RAGE を強制的に発現させた RAGE トランスジェニックマウス、さらに RAGE トランスジェニックマウスを高血糖に誘発したマウスにおける糖尿病網膜症の評価を行った。評価項目は、網膜血管への白血球粘着と網膜血管透過性の亢進を用いた。

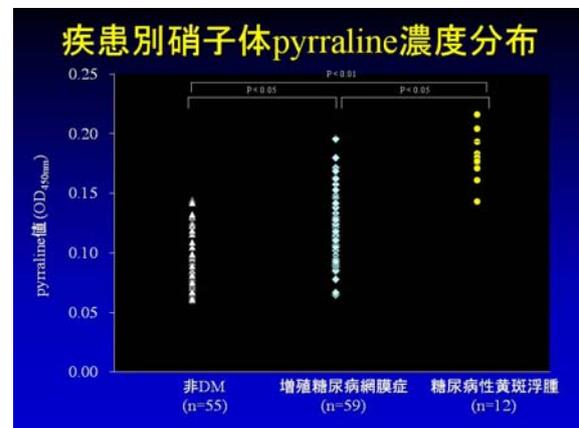
(3) バキュロウイルスをベクターに用いて SF9 昆虫細胞に感染させることにより、蛋白糖化最終産物受容体の一つである RAGE の細胞外ドメインを大量に作成する。次にストレプトゾトシンを用いて高血糖を誘発したマウスに対して可溶性 RAGE を腹腔内投与し、網膜血管への白血球粘着や網膜血管透過性を検討する。

(4) 胎児から高齢者に至るまで、ヒトの眼球摘出標本を用いて D 型アミノ酸含有蛋白質の局在を免疫組織化学的に検討する。さらに糖尿病患者の角膜標本においても D 型アミノ酸含有蛋白質の局在を免疫組織化学的に検討する。さらに角膜上皮基底膜の主要な構成因子であるラミニンにグルコースを添加することによって D 型アミノ酸形成が促進されることを示す。最後に D 型アミノ酸を含有したラミニンは角膜上皮との接着能が低下していることを *in vitro* で証明する。

## 4. 研究成果

### (1)

硝子体切除検体における AGE (pyrraline および imidazolone) の量を ELISA を用いて検討した。その結果、非糖尿病群に比較して糖尿病群、特に糖尿病黄斑浮腫の患者において硝子体中の pyrraline および imidazolone 濃度が高い傾向にあった。



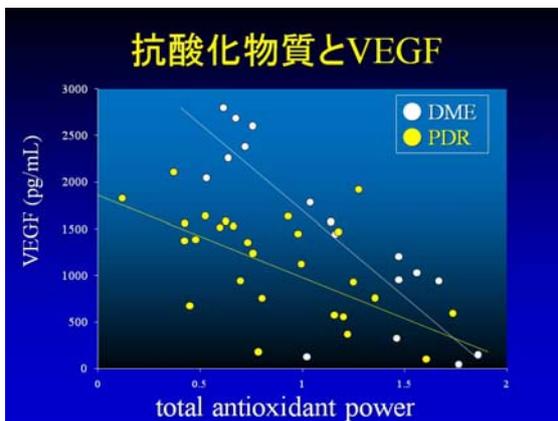
蛋白糖化最終産物は年齢とともに蓄積する傾向があることが知られているが、硝子体中の pyrraline および imidazolone 濃度は年齢との相関を示さなかった。

さらに、AGE が形成される中間段階においては、HbA1c のようなアマドリ化合物が形成されることが知られている。しかしながら、硝子体中の pyrraline および imidazolone は血中 HbA1c 濃度の相関を示さなかった。

以上の結果より、硝子体中の蛋白糖化最終産物濃度は、糖尿病網膜症という疾患によって決まってくる可能性が高い。

糖尿病網膜症の病勢を反映させるサイトカインとして VEGF が知られている。VEGF は血管新生や血管透過性を亢進させることにより、糖尿病網膜症を増悪させる。我々の検討した硝子体検体においては、糖尿病網膜症、特に糖尿病黄斑浮腫において VEGF 濃度が高い傾向にあった。

さらに、糖尿病の発症には抗酸化能の低下が重要な役割を果たしていることが知られているため、硝子体液における total antioxidant power を定量した。その結果、糖尿病黄斑浮腫は非糖尿病患者と有意差がなかったものの、増殖糖尿病網膜症患者の硝子体液における total antioxidant power は非糖尿病眼に比較して有意に低い傾向にあった。



最後に、硝子体中の抗酸化物質量の視標である total antioxidant power と、硝子体中の VEGF 濃度との関連を検討した。その結果、硝子体中の抗酸化物質量が減少するほど、硝子体中の VEGF 濃度が高い傾向にあることが明らかになった。すなわち、抗酸化物質の減少によって生じる酸化ストレスの亢進によって、VEGF などのサイトカインの発現が亢進し、糖尿病網膜症の症状が増悪する可能性が示唆された。

### (2)

コントロールマウスの腹腔内にストレプトゾトシンを投与し、血中グルコースが 300mg/dL 以上の動物を糖尿病群とした。さらに VEGF 受容体の一つである flt-1 プロモーターの下流にヒト型 RAGE を挿入したベクターを用いて、全身の血管における RAGE の発現が亢進したトランスジェニックマウスについても同様に検討を行った。

高血糖を誘導して 3 ヶ月後には、検眼鏡的には網膜出血や血管新生は観察されなかったものの、網膜血管への白血球粘着が亢進していた。さらに RAGE トランスジェニックマウスにおいては、血糖値が正常であるにもかかわらず網膜血管への白血球粘着が亢進し、それは高血糖を誘導することにより増強した。

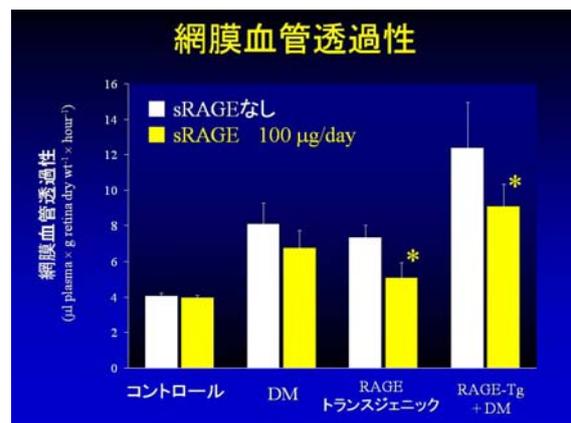
次にマウスの静脈内にエバンスブルーを投与し、1 時間後に網膜血管外に漏出した色素を定量することより、網膜血管の透過性を定量的に測定した。

その結果、高血糖を誘導して 3 ヶ月後には、網膜血管の血管透過性が亢進していた。さらに RAGE トランスジェニックマウスにおいては、血糖値が正常であるにもかかわらず網膜血管の透過性が亢進し、それは高血糖を誘導することにより増強した。

### (3)

RAGE の細胞外ドメイン (可溶化 RAGE) を精製し、コントロールマウス、RAGE トランスジェニックマウス、およびそれぞれを高血糖にしたマウスに連続 14 日間腹腔内投与した。その結果、コントロール群をのぞいて、可溶化 RAGE の全身投与は網膜血管への白血球粘着を有意に抑制した。

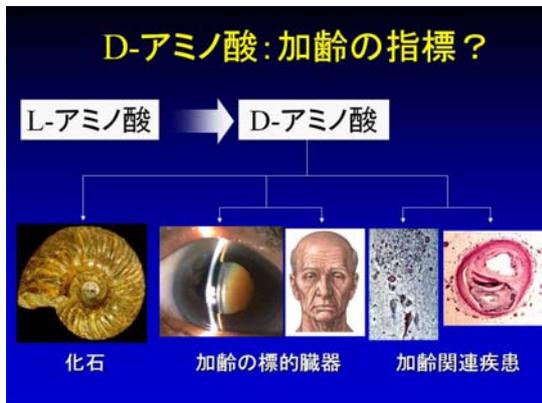
同様にエバンスブルーの網膜血管外への漏出を検討することにより、可溶化 RAGE の全身投与はコントロール群および糖尿病群をのぞいて、有意に網膜血管透過性の亢進を抑制することが明らかになった。



### (4)

我々は様々な年齢の眼球摘出標本において D 型アミノ酸含有蛋白質の局在を検討した。その結果、水晶体、強膜、毛様体無色素上皮基底膜、網膜血管、網膜内境界膜、篩板といった眼の様々な領域に D 型アミノ酸含有蛋白質が沈着することを明らかにした。これらの

D型アミノ酸含有蛋白質の沈着部位は、眼の加齢性変化が最も進みやすい部位であることより、生体内におけるD型アミノ酸形成は眼の加齢性変化に密接な関連を有することが明らかになった。



加齢性変化が病的に進むと、失明につながる様々な眼疾患が誘発される。我々は加齢黄斑変性症、瞼裂斑、spheroid degenerationにおいて生じる異常な凝集蛋白質は、すべてD型アミノ酸を豊富に含んでいることを明らかにすることができた。すなわち、生体内におけるD型アミノ酸形成は上記のような眼疾患の発症に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

最後に、我々は糖尿病患者の角膜上皮基底膜には、D型アミノ酸含有蛋白質が豊富に含まれていることを明らかにした。

角膜上皮基底膜の中も最も細胞接着に重要な役割を果たすラミニンについて、高血糖の及ぼす影響を検討した。その結果、ラミニンを50°Cで穏和に1ヶ月加温することより、アスパラギン酸残基のD/L比が0.01から0.13に上昇した。すなわち、加温は蛋白質中のアスパラギン酸残基のラセミ化を促進させることが明らかになった。

さらに反応液にグルコースを250mM添加することによって、アスパラギン酸残基のD/L比は0.16にまで上昇した。すなわち、グルコースの存在は、蛋白質中のアミノ酸残基のラセミ化を促進させることが明らかになった。

最後に、ラセミ化されたラミニンの機能を、培養角膜上皮細胞を用いて定量的に評価した。

その結果、グルコースを加えずに加温することでラセミ化を促進させたラミニンの細胞接着能は50%程度減少することが明らかになった。

さらにグルコースを加えながら加温することにより、細胞接着能は80%以上低下した。

このように、ラミニン分子のラセミ化は、高血糖により誘発され、ラミニンの機能障害につながる事が明らかになった。このことは、糖尿病患者の角膜上皮細胞が基底膜と接着不良を生じている原因となっている可能性が高い。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10件)

① Kaji Y, Hiraoka T, Oshika T. Increased level of (1,3)- $\beta$ -D-glucan in tear fluid of mycotic keratitis. *Graefe Arch Clin Exp Ophthalmol*. 査読有, in press

② Kaji Y, Yamamoto E, Hiraoka T, Oshika T. Toxicities and pharmacokinetics of subconjunctival injection of liposomal amphotericin B. *Graefe Arch Clin Exp Ophthalmol*. 査読有, in press

③ Kaji Y, Oshika T, Takazawa Y, Masashi F, Fujii N. Immunohistochemical localization of D- $\beta$ -aspartic acid-containing proteins in climatic droplet keratopathy. *Br J Ophthalmol*. 査読有, in press.

④ Kaji Y, Oshika T, Okamoto F, Fujii N. Immunohistochemical localization of D- $\beta$ -aspartic acid in pinguecula. *Br J Ophthalmol*. 査読有, in press

⑤ Kaji Y, Hiraoka T, Okamoto F, Asano H, Oshika T. Comparison of triamcinolone acetonide, 11-deoxycortisol and other lipid formulae for the visualization of vitreous body in the anterior chamber after posterior capsule rupture in animal models. *Acta Ophthalmol Scand*. 査読有, 86(1):97-102, 2008.

⑥ Kaji Y, Oshika T, Takazawa Y, Fukayama M, Takata T, Fujii N. Localization of D- $\beta$ -aspartic acid-containing proteins in human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 査読有, 48(9):3923-3927, 2007.

⑦Kaji Y, Usui T, Ishida S, Yamashiro K, Moore TC, Moore J, Yamamoto Y, Yamamoto H, Adamis AP. Inhibition of diabetic leukostasis and blood-retinal barrier breakdown with a soluble form of a receptor for advanced glycation end products. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 査読有, 48(2):858-865, 2007.

⑧Kaji Y, Nagai R, Amano S, Takazawa Y, Fukayama M, Oshika T. Advanced glycation end product deposits in climatic droplet keratopathy. 査読有, *Br J Ophthalmol*. 91(1):85-88, 2007.

⑨ Kaji Y, Hiraoka T, Oshika T. Vital staining of squamous cell carcinoma of conjunctiva using toluidine blue. 査読有, *Acta Ophthalmol Scand*. 84(6):825-826, 2006.

⑩Kaji Y, Oshika T, Amano S, Okamoto F, Koito W, Horiuchi S. Immunohistochemical localization of advanced glycation end products in pinguecula. 査読有, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 244(1):104-108, 2006.

〔学会発表〕(計 10件)

①加治優一

蛋白糖化最終産物 AGE と接着分子。眼炎症・接着分子研究会。2009年2月28日，新宿区，慶応大学総合医科学研究センター。

②加治優一，大鹿哲郎，竹村太郎，箕輪貴司，藤井紀子

瞼裂斑を構成する蛋白質のプロテオーム解析。第33回角膜カンファレンス。2009年2月19～21日，大阪市，ザ・リッツカールトン・大阪。

③加治優一

糖尿病網膜症発症における AGE/RAGE の役割。第23回日本糖尿病・肥満動物年次学術集会。2009年2月13～14日，岡山市，岡山

国際交流センター

④加治優一

タンパク質の異常凝集がもたらす眼疾患の基礎と臨床。第1回タンパク質の異常凝集とその防御・修復機構に関する研究会。2008年10月2日，大阪府泉南郡，京都大学原子炉実験所事務所棟大会議室。

⑤加治優一

メタボリックシンドロームにおける眼の加齢性変化。第47回日本白内障学会総会，第23回日本眼内レンズ屈折手術学会総会。2008年6月20～22日，東京，東京国際フォーラム

⑥加治優一，大鹿哲郎，藤井紀子。

蛋白糖化最終産物と右手型アミノ酸がもたらす加齢関連眼疾患。第8回抗加齢医学会総会。2008年6月6～8日，東京，東京国際フォーラム

⑦加治優一

蛋白質の翻訳後修飾がもたらす眼疾患（宿題報告）。第112回日本眼科学会総会。2008年4月17日～20日，パシフィコ横浜，横浜市。

⑧加治優一，森雄平，大鹿哲郎，藤井紀子  
糖尿病角膜症における右手型アスパラギン酸含有蛋白質の沈着と接着能低下。第32回角膜カンファレンス 第24回日本角膜移植学会。2008年2月28日～3月1日，東京ベイホテル東急。浦安市。

⑨加治優一

「蛋白質の AGE 化とラセミ化による眼疾患」ロート賞受賞講演。第111回日本眼科学会総会。2007年4月19日から22日。大阪国際会議場，大阪

⑩Kaji Y, Amano S, Nagai R, Takazawa Y, Fukayama M, Oshika T. Deposition of Advanced Glycation End Products in Climatic Droplet Keratopathy  
Association of Research in Visual Science

and Ophthalmology. 2006年4月30日～5月4日, Fort Lauderdale Convention Center, Fort Lauderdale, FL, USA

〔図書〕(計 7件)

①加治優一, 藤井紀子. 蛋白質の異常沈着が彦起こす眼疾患. *Pharma Medica* 26(9): 61-64, 2008年.

②加治優一, 藤井紀子. 眼の加齢性変化におけるAGEとD-アミノ酸の役割. *眼科プラクティス* 22「抗加齢眼科学」(坪田一男編集) 164-169, 総223ページ, 2008年.

③加治優一, 大鹿哲郎: 糖代謝異常・ムコ多糖症. *臨床眼科増刊号「眼科専門医に必要な全身疾患と眼の全て」*(中澤満編集), 46-52, 医学書院, 2007年.

④加治優一: 今日的眼疾患治療指針 第2版 (田野保雄, 樋田哲夫総編集) 麻醉薬 823-825, 消毒薬 826-827, 抗原虫薬・寄生虫薬 842-843, 抗真菌薬 844-847, 抗ウイルス薬 848-849. 医学書院, 2007年.

⑤加治優一: ひとまず覚えたい抗真菌薬. 「眼科ケア」特集号 (山田昌和編集). (MCメディカ出版) 32-35, 2007年.

⑥加治優一: 感染症の治療に使う薬. 「眼科ケア 2006年冬季増刊号」眼科の薬まるわかりブック (坪田一男, 後藤英樹編集) (MCメディカ出版) 90-112, 2006年.

⑦加治優一: 講義録 眼・視覚学. (山本修一, 大鹿哲郎編集) MEDICAL VIEW社. 感染性の角膜炎 (p124-129), 非感染性の角膜炎 (p130-133) 2006年

〔その他〕

個人紹介ホームページ

[http://www.md.tsukuba.ac.jp/chs/clinical\\_sciences/kaji.htm](http://www.md.tsukuba.ac.jp/chs/clinical_sciences/kaji.htm)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加治 優一 (KAJI YUICHI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師  
研究者番号 50361332

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし