

令和 3 年 5 月 1 日現在

機関番号：10101
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2020
課題番号：18K09393
研究課題名(和文) 糖尿病網膜症における不飽和アルデヒドアクロレインの網膜グリア細胞活性化機構

研究課題名(英文) Glial activation induced by unsaturated aldehyde acrolein in diabetic retinopathy

研究代表者
野田 航介 (Noda, Kousuke)
北海道大学・医学研究院・准教授

研究者番号：90296666
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)：糖尿病網膜症は現在も先進国における主要な視力障害の原因である。これまでの研究は、網膜グリア細胞の遊走が重篤な病態の原因となる線維血管組織形成に関与することを示してきたが、その詳細は不明である。アクロレインは高反応性の不飽和アルデヒドであり、様々な蛋白に結合することでその機能異常を惹起する。今回の研究では、アクロレインによる網膜グリア細胞遊走の制御機構について探索し、その結果として、1) アクロレインは高濃度では著明な細胞毒性を示すが、低濃度ではむしろ細胞生存率の増加や細胞遊走の亢進につながることで、2) 炎症性サイトカインCXCL1がアクロレインによるグリア細胞遊走を仲介していること、を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、糖尿病網膜症の病態は少しずつ明らかとされ、同疾患に関する理解の蓄積、そしてその結果として糖尿病黄斑浮腫治療に臨床導入されたVEGF阻害剤の開発は糖尿病網膜症の治療体系を大きく変えた。しかしその一方で、糖尿病網膜症の病態、特に線維血管組織の形成メカニズムには不明な点が多く存在する。本研究は、線維血管組織の形成に重要な役割を演じると考えられている網膜グリア細胞の遊走メカニズムについて検討を行い、その一部を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Diabetic retinopathy (DR) is a retinal microvascular complication of diabetes and is still a leading cause of visual impairment in the developed countries. Previous studies revealed that retinal glial cell migration is involved in the fibrovascular tissue formation, leading to the severe complications in patients with DR; however, the detailed mechanisms remains unclear. Acrolein is a highly reactive unsaturated aldehyde that causes dysfunction of multiple proteins. In this study, we explored the regulatory mechanisms responsible for retinal glial cell migration induced by unsaturated aldehyde acrolein and found that i) acrolein exerted potent cellular toxicity at a high concentration; however, sublethal concentration of acrolein slightly induces viability and migratory property of retinal glial cells; and ii) inflammatory chemokine CXCL1 is a mediator of glial cell migration induced by acrolein.

研究分野：網膜硝子体疾患

キーワード：網膜グリア細胞 不飽和アルデヒド 糖尿病網膜症

1. 研究開始当初の背景

眼は外界の情報を視覚情報として伝達する重要な知覚器官である。糖尿病患者ではその眼に様々な病的変化が生じることで視機能に障害をきたすが、その病態の一つに糖尿病網膜症がある。糖尿病網膜症は、高血糖やその他糖尿病に由来する変化によって「網膜の細小血管構築が破壊され」、「その後生じる血管閉塞にともなって網膜に虚血状態が生じ」、「それを代償するためにvascular endothelial growth factor (VEGF)などの血管新生因子が産生されて、網膜血管新生が誘導される」ことをその病態とする糖尿病眼合併症である。

重篤な視力障害をきたす糖尿病網膜症病態は2つあり、それぞれ増殖糖尿病網膜症 (proliferative diabetic retinopathy, PDR) および糖尿病黄斑浮腫 (diabetic macular edema, DME) とよばれるが、本研究ではPDRの病態形成について検討を行った。PDR (図1) とは前述の網膜血管新生が網膜と硝子体の界面に生じた状態のことであり、その結果形成される線維血管組織が破綻することで「硝子体出血」や、網膜を挙上することで「牽引性網膜剥離」などの失明につながる状態となる。近年の基礎研究はこの線維血管組織の形成にVEGFが主要な役割を演じることを明らかとしたが、その一方で単なる虚血性変化にともなうVEGF産生亢進だけがその形成要因でないことは糖尿病網膜症の複雑な病態を考えれば自明である。以前から、糖尿病網膜症の発症および進行にはVEGF以外にも慢性炎症や酸化ストレスなどの病態変化が重要な役割を演じていることについて多くの報告がなされており、本研究では後者の酸化ストレス亢進に関する分子アクロレインに着目した。

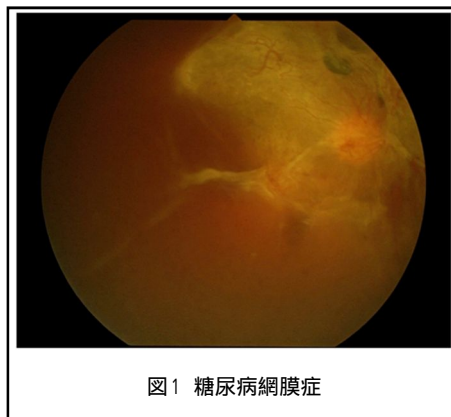


図1 糖尿病網膜症

アクロレイン ($\text{CH}_2=\text{CHCHO}$)は、煙草や排気ガスなどの環境汚染物質に含まれる不飽和アルデヒドである。反応性が高く、さまざまな蛋白のLys, Cys, Hisなどのアミノ酸残基に結合し、機能異常を惹起することが知られている。これらの複合体の中でも、Lysと結合することによって生じる生成物はN-(3-formyl-3,4-dehydropiperidino) lysine adduct (FDP-Lys)と呼ばれ、生体内に長期滞留することが知られていた。これまで、アクロレインは外因性に体内に取り込まれることでFDP-Lysを形成し、肺癌などの呼吸器疾患の発症に関与する物質と考えられていた。しかし、その後の検討でアクロレインは内因性にも産生されることが明らかとなり、各種疾患の病態との関係が注目されるようになった。我々のグループも以前、糖尿病網膜症患者の眼内でFDP-Lysが増加すること、そしてその内因性の産生機序について明らかにしたが[Murata M, Noda K et al. *Curr Eye Res.* 2017]、アクロレインが糖尿病網膜症の病態形成に寄与するののかについては答えを見出せずにいた。

糖尿病網膜症の病態形成には網膜グリア細胞が重要な役割を演じていることが知られている。PDR患者の線維血管組織には網膜グリア細胞が存在し、同細胞は網膜虚血にともなう低酸素状態でVEGFを分泌することで網膜血管新生を引き起こす。一方、進行した糖尿病網膜症患者の網膜組織では網膜グリア細胞の一つMüller細胞がその配列性を失っており、網膜組織内での遊走を示唆する報告がある[Nork TM et al. *Arch Ophthalmol.* 1987]。近年、悪性腫瘍の研究領域においてheme oxygenase-1 (HO-1)と呼ばれる蛋白が注目されている。HO-1はヘムをビリルビンに変換することで酸化ストレスを軽減する抗酸化酵素として同定された分子だが、悪性腫瘍の遊走と浸潤にも関与することが報告され、分子標的の一つとして検討されている [Chau LY. *J Biomed Sci.* 2015]。そして、前述のアクロレインが網膜血管内皮細胞においてHO-1を誘導することを我々は最近明らかとした[Dong Y, Noda K et al. *Curr Eye Res.* 2017]。これらのことから、糖尿病網膜症における何らかの病的状態がMüller細胞の遊走を惹起し、同細胞が産生するVEGFによって網膜症病態は進展すると考え、そのトリガーの一つがアクロレインではないか、という仮説に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「網膜グリア細胞の遊走に対するアクロレインの関与並びに作用機序を明らかにすること」である。

3. 研究の方法

(1) ラット網膜グリア細胞 TR-MUL5 に対するアクロレイン刺激による各種変化

細胞生存率

TR-MUL5細胞 (2×10^4 cells) を96穴プレートに播種し、 33°C で24時間培養した。無血清培地に交換し、アクロレイン (0-200 μM , AccuStandard®, New Haven, CT) を負荷後17時間でRealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay (Promega, Fitchburg, WI)を用いて、その細胞生存率を評価した。

遊走能

TR-MUL5細胞 (5×10^4 cells) を96穴プレートに播種し、 33°C で24時間培養した。無血清培地に交換し、アクロレイン (0-100 μM) を負荷後17時間でOris cell migration

plate(Platypus Technologies, Madison, WI) を用いて、その細胞遊走を評価した。
を用いた wound healing assay をおこない、その遊走能を経時的に定量した。

各種分子の発現変化に対する網羅的検討

TR-MUL5 細胞をアクロレイン (25 μ M) で刺激し、NucleoSpin[®] RNA Plus (MACHEREY-NARGEL, Du[®]ren, Germany)を用いて total RNA を回収した。DNA マイクロアレイ(SurePrint G3 Rat Gene Expression 8 \times 60K v2 Microarray, Agilent, Santa Clara, CA)によって、アクロレイン刺激によって生じる各種分子の発現変化を評価した。

(2) ケモカイン CXCL1 に着目した検討

アクロレイン刺激による発現変化 (real-time PCR)

TR-MUL5 細胞をアクロレイン (0-50 μ M) で刺激し、TRI reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH)を用いて total RNA を回収した。GoScript[™] reverse transcriptase (Promega)を用いて逆転写を行ったのちに、GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega)および StepOnePlus[™] Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)を用いて real-time PCR を行い、アクロレイン刺激によって生じる *Cxcl1 mRNA* の発現変化を評価した。

アクロレイン刺激による発現変化 (ELISA, WB)

TR-MUL5 細胞 (4 \times 10⁵ cells) を 96 穴プレートに播種し、33 $^{\circ}$ C で 24 時間培養した。無血清培地に交換して 17 時間経過した時点で、アクロレイン (0-50 μ M) を負荷して 24 時間刺激した。培養上清を回収して遠心後(1000 \times g, 10 分、に保存した。CXCL1 タンパク量を ELISA 法 (R&D systems)を用いて評価した。

遊走能

TR-MUL5 細胞 (5 \times 10⁴ cells) を 96 穴プレートに播種し、33 $^{\circ}$ C で 24 時間培養した。無血清培地に交換し、アクロレイン (0-50 μ M) を負荷後 17 時間で Oris cell migration plate(Platypus Technologies, Madison, WI) を用いてその細胞遊走を評価した。また、を用いた wound healing assay をおこない、その遊走能を経時的に定量した。また、CXCL1 中和抗体 (1-10 μ g/mL, MAB515, R&D systems, Minneapolis, MN)で 24 時間前処置した TR-MUL5 細胞の細胞遊走能変化 (6 時間後) を評価した。

(3) 酵素 heme oxygenase-1 (HO-1) に着目した検討

アクロレイン刺激による発現変化 (real-time PCR)

TR-MUL5 細胞をアクロレイン (0-25 μ M) で刺激し、TRI reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH)を用いて total RNA を回収した。GoScript[™] reverse transcriptase (Promega)を用いて逆転写を行ったのちに、GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega)および StepOnePlus[™] Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)を用いて real-time PCR を行い、アクロレイン刺激によって生じる *HO-1 mRNA* の発現変化を評価した。

アクロレイン刺激による発現変化 (ELISA, WB, 免疫染色)

TR-MUL5 細胞 (4 \times 10⁵ cells) を 96 穴プレートに播種し、33 $^{\circ}$ C で 24 時間培養した。無血清培地に交換して 17 時間経過した時点で、アクロレイン (0-50 μ M) を負荷して 24 時間刺激した。培養上清を回収して遠心後(1000 \times g, 10 分、に保存した。HO-1 タンパク量を ELISA 法 western blotting 法を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) ラット網膜グリア細胞 TR-MUL5 に対するアクロレイン刺激による各種変化

細胞生存率

Müller 細胞に対するアクロレインの影響を調べるために、アクロレイン刺激による TR-MUL5 の細胞生存率変化を検討した。100-200 μ M という高濃度のアクロレインは細胞生存率の低下を引き起こすのに対して、低濃度(25-50 μ M)のアクロレインはむしろ細胞生存率を増加させた (図 2)。

遊走能

Müller 細胞に対するアクロレインの影響を調べるために、アクロレイン刺激による TR-MUL5 の遊走能変化を検討した。細胞生存率の検討結果と同様に、高濃度のアクロレインは遊走能の低下を引き起こすのに対して、低濃度(25-50 μ M)のアクロレインはむしろ遊走能を増加させた (図 3)。

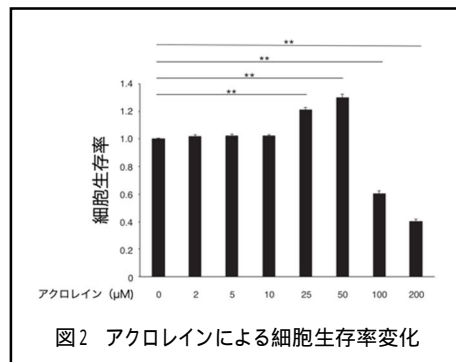


図2 アクロレインによる細胞生存率変化

各種分子の発現変化に対する網羅的解析
TR-MUL5 に対するアクロレイン刺激によって発現
変化する分子を DNA マイクロアレイで網羅的に解
析した。2 倍以上の発現増加を示した分子数は
437、一方 1/2 以下の発現減少を示した分子数は
822 であった。2 倍以上の発現増加を示した分子
の中で上位に創傷治癒や細胞遊走に参与するケモ
カイン CXCL1 および抗酸化ストレスに参与する酵
素 HO-1 が存在した。

これらの検討結果は、細胞毒性を生じない濃度の
アクロレインは Müller 細胞の増殖・遊走を亢進させること、また複数の分子発現を変化さ
せることを示した。

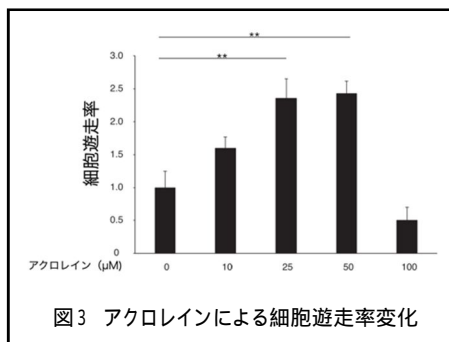


図3 アクロレインによる細胞遊走率変化

(2) ケモカイン CXCL1 に着目した検討

アクロレイン刺激による発現変化
DNA マイクロアレイの結果を検証するため、アク
ロレインで刺激した TR-MUL5 における *Cxcl1* mRNA
の発現変化を real-time PCR 法を用いて、CXCL1
タンパク量を ELISA を用いて評価し、ともに増加
することを確認した(図4)。

遊走能

TR-MUL5 に対するアクロレイン刺激によって生じ
る遊走能亢進に CXCL1 が介在するかを検討するた
めに、CXCL1 中和抗体添加によって TR-MUL5 の遊
走能に変化が生じるかを検討した。CXCL1 中和抗
体がアクロレインによって誘導される TR-MUL5 の
遊走能亢進を阻害したことから、アクロレインに
よって誘導される CXCL1 が遊走能亢進を引き起こ
していることが明らかとなった。

これらの検討結果は、アクロレインがその下流で
細胞遊走に参与するケモカイン CXCL1 の発現亢進
を引き起こし、網膜グリア細胞の遊走に寄与する
ことを示していた。

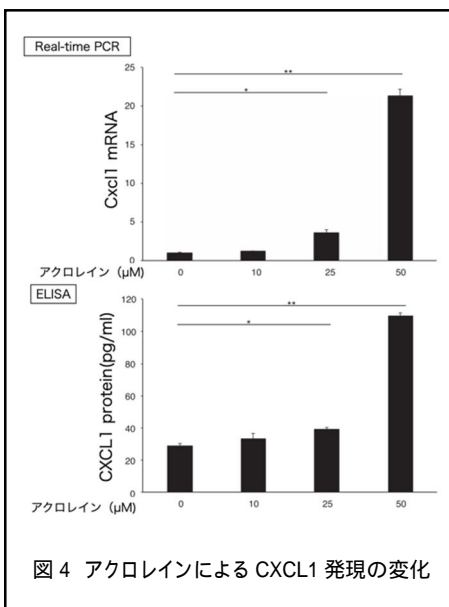


図4 アクロレインによる CXCL1 発現の変化

(3) 酵素 HO-1 に着目した検討

CXCL1 と同様の検討を酵素 HO-1 に対しても行った
ところ、1) アクロレインは網膜グリア細胞にお
ける HO-1 mRNA 発現を誘導すること、2) アク
ロレインは網膜グリア細胞における HO-1 蛋白合成
を濃度依存的に増加させること、3) 網膜グリア
細胞において HO-1 は細胞質内に局在するが、ア
クロレイン刺激はそれを増加させること、などが
明らかとなった。HO-1 はヘムをビリルピンに変換することで酸化ストレスを軽減する抗酸
化酵素として同定された分子だが、悪性腫瘍の遊走と浸潤にも関与することが報告され、そ
の分子標的の一つとしても近年注目を集めている。
今回の検討結果は、アクロレインによって生じる酸化ストレスに対して網膜グリア細胞は
HO-1 の発現を亢進させて対応していることを示唆するとともに、その遊走を惹起している
可能性を示した。今後も引き続き検討の予定である。

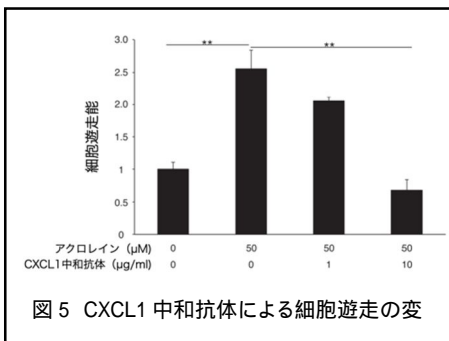


図5 CXCL1 中和抗体による細胞遊走の変

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2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 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 無
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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kikuchi K, Noda K, Murata M, Tagawa Y, Kanda A, Kase S, Kageyama Y, Shinohara M, Sasase T, Ishida S
2. 発表標題 Diabetic Cataract in Spontaneously Diabetic Torii Fatty Rats
3. 学会等名 Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wu D, Noda K, Murata M, Liu Y, Kanda A and Ishida S
2. 発表標題 Hypoxia inducible factor-1 regulates spermine oxidase leading to acrolein generation in Muller Glial cells
3. 学会等名 Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊地香澄、野田航介、村田美幸、神田敦宏、加瀬 諭、影山 靖、篠原雅巳、笹瀬智彦、石田 晋
2. 発表標題 Spontaneously Diabetic Torii fatty ラット網膜における炎症性サイトカインの発現解析
3. 学会等名 第25回日本糖尿病眼学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊地香澄、野田航介、村田美幸、田川義晃、神田敦宏、加瀬 諭、影山 靖、篠原雅巳、笹瀬智彦、石田 晋
2. 発表標題 Spontaneously Diabetic Torii fatty ラットにおける糖尿病白内障の検討
3. 学会等名 第123回日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wu D, Murata M, Noda K, Liu Y, Kanda A, Ishida S
2. 発表標題 Hypoxia aggravates acrolein generation via HIF-1/SMOX pathway in glial cells
3. 学会等名 第123回日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野田航介
2. 発表標題 糖尿病黄斑浮腫に対する抗VEGF療法とbeyond VEGF. シンポジウム「糖尿病網膜症治療の近未来」
3. 学会等名 第24回糖尿病眼学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野田航介
2. 発表標題 網膜硝子体疾患と炎症
3. 学会等名 第75回日本眼科医会生涯教育講座（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野田航介
2. 発表標題 糖尿病網膜症病態におけるvascular adhesion protein-1の役割. シンポジウム「糖尿病網膜症：臨床応用を目指した基礎研究による新たな病態理解」
3. 学会等名 第122回日本眼科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------