

平成 21 年 5 月 17 日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2007～2008
課題番号：19390445
研究課題名（和文） 糖尿病網膜症に伴う増殖組織の発症進展因子に関するゲノム医科学、疫学的研究
研究課題名（英文） Genomic study of preretinal fibrovascular membranes associated with proliferative diabetic retinopathy
研究代表者 石橋 達朗（ISHIBASHI TATSURO） 九州大学・医学研究院・教授 研究者番号：30150428

研究成果の概要：

増殖糖尿病網膜症に伴う網膜前増殖組織やモデルマウス網膜に対し、初めて包括的遺伝子発現解析を行った。増殖組織に発現する遺伝子群は、細胞生理反応、代謝、ストレス反応、細胞間コミュニケーションなどに分類でき、新生血管のみに局在するtumor endothelial marker 7遺伝子を含んでいた。網膜前増殖の前駆病変である虚血マウス網膜の包括遺伝子発現解析では、虚血に伴い解糖系、免疫やアポトーシス関連遺伝子の発現レベルが変化していた。本研究により、包括的遺伝子発現解析が、真に患者様に役立つ診断や治療の分子標的同定に有用である可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,800,000	2,940,000	12,740,000
2008年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：(1) 網膜前増殖組織 (2) 糖尿病網膜症 (3) 包括的遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本人の生活様式の欧米化や高齢化社会の進展により、近年糖尿病患者は増加の一途をたどっている。それに伴い糖尿病三大合併症の一つである糖尿病網膜症の患者数も増加し、年間約 3000 人が失明している。今後も糖尿病網膜症の患者数は増加するといわれており、よりよい予防や治療法の確立が社会的急務である。

(2) 増殖糖尿病網膜症では網膜上に線維血管増殖組織(以下増殖組織)を生じ、その収縮に伴う牽引性網膜剥離が失明の原因となる。現在のところ、増殖組織生成の分子機序は不明で、治療には外科的硝子体手術が第一選択であるが、視機能を保持できない場合も多い。そのうえ手術侵襲に伴う術後眼内細胞増殖による増殖硝子体網膜症がしばしば病状を

悪化させるが、その分子機序も殆ど明らかでない。また現在まで網膜症に対する薬物で明らかな有効性が確認されたものはない。

(3)我が国を中心に“もう一つのゲノムプロジェクト”と呼ばれる完全長 cDNA プロジェクトが行われており、ヒトやマウスの転写産物の全長配列、構造と機能、スプライスバリエーションの情報が増加的に蓄積され、特定の組織中に発現する各遺伝子の注釈付けが数年前とは比較にならないほど容易になっている。この潮流に沿って、Expressed sequence tag (EST)解析やマイクロアレイ法によって、特定の組織中での相対的な遺伝子発現レベルの包括的な定量が行われている。これまで眼科領域では、病的組織である増殖組織の EST 解析は行われていないため、ゲノム情報を基盤とした増殖組織の包括的遺伝子発現解析を行うことは時期を得ている。

2. 研究の目的

本研究では、包括的遺伝子発現解析による糖尿病網膜症に伴う増殖組織の発症進展の分子病態の解明と、抽出した分子標的を利用した画期的な診断マーカーや治療法開発の基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)Expressed Sequence tag (EST)解析

硝子体手術時に採取した増殖組織をただちに RNA を抽出し、 -80°C に保存した。Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript (SMART)法による cDNA 増幅を用いた cDNA ライブラリを作成し、5' 末端からランダムシーケンスを行った。得られたシーケンスのうち低クオリティのクローンは解析から除去し、Repeat Masker を用いて繰り返し配列をマスク後に BLAST アルゴリズム (National Center for Biotechnology Information (NCBI)を用いて公的データベース上のシーケンスとの一致性を検索し、機能の注釈づけを行った。

(2)Illumina マイクロアレイ解析

マウス虚血網膜、増殖組織および特発性網膜前膜のサンプルから RNA を抽出し、各々ビオチンで標識した cRNA ターゲットを合成し、この cRNA ターゲットを Illumina 社のマイクロアレイにハイブリダイズした。専用スキャナーでスキャン後、各遺伝子発現を数値化し、GeneSpring を用いて、データマイニングを行った。抽出遺伝子発現の再現性を Realtime RT-PCR により検証した。

(3)硝子体手術後の患者硝子体液中の血管新生因子濃度の変化の検討

対象は初回硝子体手術を行った増殖糖尿病

網膜症 (PDR) 27 眼、黄斑上膜あるいは黄斑円孔 12 眼 (対照群)、および PDR 術後 3.5~9 ヶ月 (平均 4.9 ヶ月) に IOL 二次挿入を行った 12 眼とした。インフォームドコンセントを得て、手術の際に硝子体液を採取し、angiopietin-2、bFGF、HGF、PDGF、TIMP-1、TIMP-2 濃度を multiplex ELISA 法で測定した。

4. 研究成果

増殖糖尿病網膜症および対照として特発性網膜前膜患者の臨床所見 (視力、眼圧、視野、眼底所見、蛍光眼底造影、網膜断層像、増殖組織の大きさ、活動性など)、年齢、性別、糖尿病罹病期間、治療歴、治療の転帰、合併症、生活歴、家族歴などを含んだデータベースを個人情報保護には細心の注意を払いつつ作成した。硝子体手術の際に網膜前増殖組織、硝子体液、血清を各約 200 サンプル収集した。

(1) Expressed Sequence tag (EST)解析

①増殖組織ライブラリの EST パイプラインを構築した。抽出された遺伝子は細胞生理反応、代謝、ストレス反応、細胞間コミュニケーションなどに分類できた。

②発現遺伝子の構造と機能を解析した結果、腫瘍新生血管で特異的に発現が上昇していると考えられている tumor endothelial marker 7 (TEM7) が増殖組織でも発現していることを発見した。そこで増殖組織における発現レベルと局在を検討した。TEM7 mRNA の発現は特発性網膜上膜ではほとんど認められなかったのに対し、増殖組織 10 検体全てで有意に発現レベルが上昇していた。TEM7 PCR 産物のダイレクトシーケンスでは、増殖組織中に膜型、分泌型、細胞内停留型のアイソフォームが存在していた。蛍光免疫二重染色では、増殖組織中で TEM7 と血管内皮細胞のマーカーである CD34 が共染色された。免疫電顕では、TEM7 は管腔側の新生血管内皮細胞膜に局在していた。したがって、TEM7 は増殖組織において新生血管の機能維持に関与していることが示唆され、新しい診断や治療の分子マーカーになる可能性があると考えられた。

(2) Illumina マイクロアレイ解析

①マイクロアレイは一度に数万の遺伝子発現レベルが検討できる有用な解析法であるが、データのノイズの原因となる実験ステップも多く、注意深い使用が必要である。そこで、マウス網膜を用いて当施設でのマイクロアレイシステムの信頼性を検証した。効率的な RNA 抽出、ラベリング法、サンプルの繰り返し数、スキャンングのダイナミックレンジ、データ抽出の条件およびデータマイニン

グ法などを検証した結果、本マイクロアレイシステムは同一標本での相関係数が0.99以上であり、高い再現性があると結論できた。

②この系を用いて、網膜前増殖の前駆病変である虚血マウス網膜のマイクロアレイ解析を行った。その結果、酸素変動に伴い、クロマチン関連遺伝子、解糖系、免疫やアポトーシス関連遺伝子の発現レベルが変化することを確認した。

③得られた抽出遺伝子のうち、炎症性サイトカインや単球の誘導に関わるケモカインの一つであるMacrophage inflammatory protein-1 β (MIP-1 β)の発現が虚血網膜で最も優位に上昇していることを発見した。そこで、MIP-1 β の発現レベル、局在、機能についての検討したところ、MIP-1 β のmRNA、蛋白質は、網膜の虚血に伴い発現が上昇し、免疫染色でMIP-1 β は虚血部位である網膜内層に局在していた。さらに、MIP-1 β の中和抗体により虚血網膜への単球系細胞の浸潤が抑制された。以上より、MIP-1 β が網膜への単球系細胞の浸潤を介して虚血後炎症の病態形成に関与している可能性が示唆された。

④今日まで増殖組織のマイクロアレイ解析が行われていない理由の1つとして、ヒト増殖組織の採取組織量が少量であることが挙げられる。我々はこの問題点を克服する目的で、ホモジナイザーやビーズなどを用いた効率的な組織破碎、AGPC法やカラムによるRNA抽出の条件を最適化した。

⑤増殖組織と網膜組織由来のRNAを用いてマイクロアレイ解析を行い比較検討したところ、網膜ではロドプシンなどの視細胞特異的な遺伝子の発現レベルの上昇を認める一方で、増殖組織ではTEM7やangiopietin-2など新生血管特異的な遺伝子発現の上昇を確認できた。したがって、増殖組織で優位に発現上昇している遺伝子は、組織の維持に必要不可欠である可能性が示唆された。

ESTおよびマイクロアレイ解析の結果により、増殖組織の包括的遺伝子発現解析が真に患者に役立つ分子標的の同定に極めて有用であることが示唆された。

(3) 硝子体手術後の患者硝子体液中の血管新生因子濃度の変化の検討

増殖糖尿病網膜症に対する現在の標準治療は硝子体手術であるが、その奏功機序は明らかでない。増殖組織の包括的遺伝子発現解析を基盤にして新しい治療を模索していく上で、併用療法となりうる硝子体手術の奏功機

序を把握しておくことは重要であると思われる。そこで、網膜症に対する硝子体手術前後での血管新生関連因子の変化について検討した。増殖糖尿病網膜症の初回硝子体手術において、硝子体液中のAngiopietin-2 (平均 303 pg/ml)、HGF (3056 pg/ml)、TIMP-1 (20.1 ng/ml)は対象群に比べて有意に増加していた ($p < 0.01$)。一方、IOL二次挿入時の硝子体液中のangiopietin-2 (平均 103 pg/ml)、HGF (1091 pg/ml)は初回手術時に比し有意に低下していた ($p < 0.01$)。したがって、硝子体手術後の硝子体腔内では血管新生因子群の発現プロファイルが変化しており、硝子体手術の奏功機序を部分的に説明しうると考えられた。

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 40 件)

1. Yoshimura T, Sonoda KH, Miyazaki Y, Iwakura Y, Ishibashi T, Yoshimura A, Yoshida H. Differential roles for IFN-gamma and IL-17 in experimental autoimmune uveoretinitis. *Int Immunol* 2008;20:209-214. 査読有
2. Yamaji Y, Yoshida S, Ishikawa K, Sengoku A, Sato K, Yoshida A, Kuwahara R, Ohuchida K, Oki E, Enaida H, Fujisawa K, Kono T, Ishibashi T. TEM7 (PLXDC1) in neovascular endothelial cells of fibrovascular membranes from patients with proliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:3151-3157. 査読有
3. Oshima T, Sonoda KH, Nakao S, Hijioka K, Taniguchi M, Ishibashi T. Protective role for CD1d-reactive invariant natural killer T cells in cauterization-induced corneal inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:105-112. 査読有
4. Murakami Y, Kohno RI, Yoshikawa H, Takeshita M, Sueishi K, Ishibashi T. Poorly differentiated adenocarcinoma positive for gross cystic disease fluid protein-15 in the lacrimal drainage system: a case report and its implications for tumour origin. *Eye* 2008. 査読有
5. Murakami Y, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Tanaka S, Kondo H, Okano S, Kohno R, Miyazaki M, Inoue M, Hasegawa M, Ishibashi T, Sueishi K. Newly-developed Sendai virus vector for retinal gene transfer: reduction of innate immune response via deletion of all envelope-related genes. *J Gene Med* 2008;10:165-176. 査読有

6. Murakami Y, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Onimaru M, Nakagawa K, Kohno R, Miyazaki M, Hisatomi T, Nakamura M, Yabe T, Hasegawa M, Ishibashi T, Sueishi K. Inhibition of nuclear translocation of apoptosis-inducing factor is an essential mechanism of the neuroprotective activity of pigment epithelium-derived factor in a rat model of retinal degeneration. *Am J Pathol* 2008;173:1326-1338. 査読有
7. Mochizuki Y, Enaida H, Hisatomi T, Hata Y, Miura M, Arita R, Kawahara S, Kita T, Ueno A, Ishibashi T. The internal limiting membrane peeling with brilliant blue G staining for retinal detachment due to macular hole in high myopia. *Br J Ophthalmol* 2008;92:1009. 査読有
8. Miyazaki M, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Goto Y, Kohno R, Murakami Y, Inoue M, Ueda Y, Hasegawa M, Tobimatsu S, Sueishi K, Ishibashi T. Synergistic neuroprotective effect via simian lentiviral vector-mediated simultaneous gene transfer of human pigment epithelium-derived factor and human fibroblast growth factor-2 in rodent models of retinitis pigmentosa. *J Gene Med* 2008;10:1273-1281. 査読有
9. Kita T, Hata Y, Arita R, Kawahara S, Miura M, Nakao S, Mochizuki Y, Enaida H, Goto Y, Shimokawa H, Hafezi-Moghadam A, Ishibashi T. Role of TGF-beta in proliferative vitreoretinal diseases and ROCK as a therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:17504-17509. 査読有
10. Kawahara S, Hata Y, Kita T, Arita R, Miura M, Nakao S, Mochizuki Y, Enaida H, Kagimoto T, Goto Y, Hafezi-Moghadam A, Ishibashi T. Potent inhibition of cicatricial contraction in proliferative vitreoretinal diseases by statins. *Diabetes* 2008;57:2784-2793. 査読有
11. Ishibashi T, Zhao H, Kawabe K, Oono T, Egashira K, Suzuki K, Nawata H, Takayanagi R, Ito T. Blocking of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) activity attenuates the severity of acute pancreatitis in rats. *J Gastroenterol* 2008;43:79-85. 査読有
12. Inoue H, Muneuchi J, Ohno T, Arikawa A, Ishibashi T, Hara T. Central retinal artery occlusion following transcatheter balloon aortic valvuloplasty in an adolescent with aortic valvular stenosis. *Pediatr Cardiol* 2008;29:830-833. 査読有
13. Hijioka K, Sonoda KH, Tsutsumi-Miyahara C, Fujimoto T, Oshima Y, Taniguchi M, Ishibashi T. Investigation of the role of CD1d-restricted invariant NKT cells in experimental choroidal neovascularization. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;374:38-43. 査読有
14. Hata Y, Sassa Y, Kita T, Miura M, Kano K, Kawahara S, Arita R, Nakao S, Shih JL, Ishibashi T. Vascular endothelial growth factor expression by hyalocytes and its regulation by glucocorticoid. *Br J Ophthalmol* 2008;92:1540-1544. 査読有
15. Hata Y, Miura M, Nakao S, Kawahara S, Kita T, Ishibashi T. Antiangiogenic properties of fasudil, a potent Rho-Kinase inhibitor. *Jpn J Ophthalmol* 2008;52:16-23. 査読有
16. Enaida H, Ishibashi T. Brilliant blue in vitreoretinal surgery. *Dev Ophthalmol* 2008;42:115-125. 査読有
17. Zhang H, Sonoda KH, Qiao H, Oshima T, Hisatomi T, Ishibashi T. Development of a new mouse model of branch retinal vein occlusion and retinal neovascularization. *Jpn J Ophthalmol* 2007;51:251-257. 査読有
18. Ueno A, Hisatomi T, Enaida H, Kagimoto T, Mochizuki Y, Goto Y, Kubota T, Hata Y, Ishibashi T. Biocompatibility of brilliant blue G in a rat model of subretinal injection. *Retina* 2007;27:499-504. 査読有
19. Ueno A, Enaida H, Hata Y, Hisatomi T, Nakamura T, Mochizuki Y, Sakamoto T, Ishibashi T. Long-term clinical outcomes and therapeutic benefits of triamcinolone-assisted pars plana vitrectomy for proliferative vitreoretinopathy: a case study. *Eur J Ophthalmol* 2007;17:392-398. 査読有
20. Sonoda KH, Yoshimura T, Takeda A, Ishibashi T, Hamano S, Yoshida H. WSX-1 plays a significant role for the initiation of experimental autoimmune uveitis. *Int Immunol* 2007;19:93-98. 査読有
21. Sakamoto H, Sakamoto M, Hata Y, Kubota T, Ishibashi T. Aqueous and vitreous penetration of levofloxacin after topical and/or oral administration. *Eur J Ophthalmol* 2007;17:372-376. 査読有
22. Nakao S, Hata Y, Miura M, Noda K, Kimura YN, Kawahara S, Kita T, Hisatomi T, Nakazawa T, Jin Y, Dana MR, Kuwano M, Ono M, Ishibashi T, Hafezi-Moghadam A. Dexamethasone inhibits interleukin-1beta-induced corneal neovascularization: role of nuclear

factor-kappaB-activated stromal cells in inflammatory angiogenesis. *Am J Pathol* 2007;171:1058-1065. 査読有

23. Matsumoto H, Yamanaka I, Hisatomi T, Enaida H, Ueno A, Hata Y, Sakamoto T, Ogino N, Ishibashi T. Triamcinolone acetate-assisted pars plana vitrectomy improves residual posterior vitreous hyaloid removal: ultrastructural analysis of the inner limiting membrane. *Retina* 2007;27:174-179. 査読有

24. Kita T, Hata Y, Miura M, Kawahara S, Nakao S, Ishibashi T. Functional characteristics of connective tissue growth factor on vitreoretinal cells. *Diabetes* 2007;56:1421-1428. 査読有

25. Kita T, Hata Y, Kano K, Miura M, Nakao S, Noda Y, Shimokawa H, Ishibashi T. Transforming growth factor-beta2 and connective tissue growth factor in proliferative vitreoretinal diseases: possible involvement of hyalocytes and therapeutic potential of Rho kinase inhibitor. *Diabetes* 2007;56:231-238. 査読有

26. Kawahara S, Hata Y, Miura M, Kita T, Sengoku A, Nakao S, Mochizuki Y, Enaida H, Ueno A, Hafezi-Moghadam A, Ishibashi T. Intracellular events in retinal glial cells exposed to ICG and BBG. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:4426-4432. 査読有

27. Hiroishi G, Murata T, Ishibashi T. Effect of thiazolidinedione on the proliferation of bovine retinal endothelial cells stimulated by vascular endothelial cell growth factor. *Jpn J Ophthalmol* 2007;51:21-26. 査読有

28. Hata Y, Enaida H, Sassa Y, Ueno A, Miura M, Hisatomi T, Goto Y, Ishibashi T. Preclinical investigation of fluorometholone acetate as a potential new adjuvant during vitreous surgery. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245:1019-1025. 査読有

[学会発表] (計 37 件)

1. Ishibashi T: The Pathologic Myopia in Japan: The Hisayama Study WOC June 26, 2008, Hong Kong

2. 石橋 達朗: これからの眼科医療と社会のかかわり 日本学術会議 第 62 回日本臨床眼科学会 2008 年 10 月 25 日 東京都

3. Ishibashi T: Diabetic Vitreoretinopathy. AOI2007 年 3 月 Cape Town, South Africa

4. Ishibashi T: Epidemiology of AMD. Sino-Japanese AMD Symposium 2007 年 4 月

6 日 Chengdu China

5. Ishibashi T, Yasuda M, Noda Y, Oshima Y: Epidemiology of Age-related Maculopathy in Japan: The Hisayama Study 9th Michaelson Symposium 2007 年 5 月 1-4 日 Baltimore USA

6. Ishibashi T: Brilliant Blue G in Vitreoretinal Surgery The 3rd International Symposium on Macular Diseases. September 14-16, 2007, Sydney, Australia

7. Ishibashi T: Use of Brilliant Blue G Dye in Vitreoretinal Surgery. REACT (Retinal Education For Accessing Current Techniques) September 18-21, 2007, Kyoto, Japan

[その他]

ホームページ

<http://www.eye.med.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石橋 達朗 (ISHIBASHI TATSURO)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号: 30150428

(2) 研究分担者

吉田 茂生 (YOSHIDA SHIGEO)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号: 50363370

五條 堀 孝 (GOJOBORI TAKASHI)

国立遺伝学研究所・教授

研究者番号: 50162136

池尾 一穂 (IKEO KAZUHO)

国立遺伝学研究所・教授

研究者番号: 20249949

山本 健 (YAMAMOTO KEN)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号: 60274528

後藤 純信 (GOTO YOSINOBU)

国際医療福大学・保健学部・准教授

研究者番号: 30336028

吉益 光一 (YOSHIMASU KOUICHI)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号: 40382337

畑 快右 (HATA YASUAKI)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号: 90346776

江内田 寛 (ENAIDA HIROSHI)

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号: 00363333