

平成21年5月8日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791264

研究課題名（和文）糖尿病網膜症における小胞体ストレスの役割

研究課題名（英文）Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Diabetic Retinopathy

研究代表者 生杉 謙吾（IKESUGI KENGO）

三重大学・医学部附属病院・診療等従事者

研究者番号：10335135

研究成果の概要：糖尿病網膜症の発症に関与する網膜血管周皮細胞及び網膜血管内皮細胞のアポトーシス過程において小胞体ストレスシグナル機構の関与を明らかにした。網膜細胞の培養系を用い培養培地中のグルコース濃度の変化に伴う小胞体ストレスの活性化を解析し小胞体ストレス特異的と考えられているGRP78等のタンパク質の活性上昇を確認した。小胞体ストレスシグナルは、他のアポトーシスシグナルに比べ外部ストレスに対して非常に鋭敏な経路と考えられており、この成果は新しい糖尿病網膜症の治療につながる可能性があると考えている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	330,000	3,430,000

研究分野：眼科学・糖尿病網膜症・緑内障

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：小胞体ストレス・糖尿病網膜症・Unfolded Protein Response

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞内アポトーシスシグナル伝達の新たな発信地として注目されている小胞体ストレスについて現在まで眼科領域での研究はほとんどおこなわれていない。

小胞体は分泌タンパク質ならびに膜貫通タンパク質がその立体構造を整える場であるが、細胞に加わる様々な物理化学的ストレスがタンパク質の折り畳み異常という分子変化へと変換されることを利用して、ストレ

スを感じ取るオルガネラとしてもきわめて重要な働きをしている。また最近、小胞体が認識するストレスは未知の部分が多い分子機構を介して細胞内シグナル伝達へと受け渡され、最終的に細胞の生死を制御していることも明らかになってきた。

小胞体に特異的なアポトーシスシグナルの発生機構は2000年ごろよりアルツハイマー病やパーキンソン病など主に神経変性疾患の分野で研究が始められた。つまり、疾患の原因である異常タンパク質が小胞体内に

蓄積することにより、Unfolded Protein Response (UPR) と呼ばれる一連のアポトーシスシグナル機構が誘導されることが明らかにされた。

さて、このような小胞体ストレスの基礎的研究により小胞体が非常に鋭敏なストレスセンサーとしての役割を持つことが明らかにされるに従い、異常タンパク質が小胞体内に蓄積するような神経変性疾患のみでなく、糖尿病などの一般的な代謝疾患等によっても小胞体ストレスが誘導され、細胞のアポトーシスに深く関与していることが最近になって明らかにされた。(Ozcan U. et al, Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. Science. 2004.)

このように糖尿病における小胞体ストレス、及び、小胞体ストレスによる細胞死はまさに注目され始めたばかりである。

そこで、今回糖尿病網膜症の発症に大きくかかわっていると考えられる網膜血管周皮細胞、網膜血管内皮細胞のアポトーシスに注目し、糖尿病における網膜血管細胞のアポトーシスに小胞体ストレスが大きく関わっているのではないかと推測した。網膜研究分野では勿論のこと、眼科研究領域においては、現在のところ小胞体ストレスによるアポトーシス機構については、まったく研究が進められておらず、この新たなオルガネラ発信のアポトーシスシグナル機構の解析は、非常に興味深い分野であると考えている。

本研究代表者は、2003年から2005年まで、米国ネブラスカ大学眼科学Shinohara研究室に留学し、眼科領域、特に白内障の病因としての小胞体ストレスについて研究をおこない、いくつかの実績をあげている。

今回の研究課題にて網膜組織における小胞体ストレス発症のメカニズムが明らかにされれば、網膜細胞のアポトーシスの制御、さらには今後、全く新しい糖尿病網膜症の治療につながる研究成果が得られるものと考えたことが、研究開始当初の背景である。

2. 研究の目的

(1) 糖尿病網膜症の発症にかかわるとされる網膜血管周皮細胞及び網膜血管内皮細胞のアポトーシス過程において小胞体ストレスのシグナル機構を明らかにする。網膜周皮細胞(rat retinal pericyte, TR-rPCT)、網膜神経節細胞(mouse retinal ganglion cell)、網膜

視細胞(mouse photoreceptor cell, 661W cell)の細胞培養系を用い、培養培地中のグルコース濃度の変化に伴う小胞体ストレスの活性化を解析するため、小胞体ストレス特異的と考えられている GRP78 や Caspase-12 等様々なタンパク質の活性を *in vitro* で確認する。眼球以外の様々な臓器由来の細胞については、細胞外グルコース濃度の変化による小胞体ストレスの発生が報告されているが、これと同じような機構が網膜の様々な細胞によって起こるのかどうか注目する。

(2) 糖尿病モデル動物(主に rat)を用い小胞体ストレス及び unfolded protein response の糖尿病における分子生物学的メカニズムを明らかにする。*in vivo* の実験では、網膜細胞特異的なグルコース濃度変化に伴う小胞体ストレス反応を糖尿病動物モデルにて研究する。糖尿病モデルラット(ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットや Goto-Kakizaki ラット)を使った実験は、すでに当教室にて進行中であったため、安定した糖尿病モデルの作成が可能である。これらのモデルラットを用い、糖尿病罹患期間別に、網膜組織に小胞体ストレス特異的な enzyme に変化がおきているかを検証する。

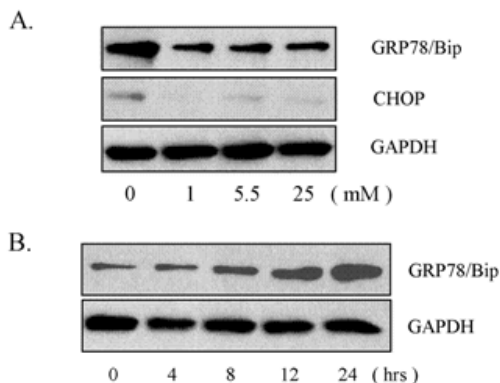
3. 研究の方法

網膜周皮細胞(rat retinal pericyte, TR-rPCT)・網膜神経節細胞(mouse retinal ganglion cell)・網膜視細胞(mouse photoreceptor cell, 661W cell)の細胞培養系を利用し細胞培養培地中のグルコース濃度を 0mM か 25mM

(5.5mM が基準値)まで変化させ小胞体ストレス特異的な enzyme 群の変化を経時的に観察する。そのために、MTS assay 法(細胞死数の測定)・TUNEL assay 法(アポトーシス細胞の染色)・Western blot 法等分子生物学的手法を用いる。また、糖尿病動物モデル(主にラット)を用いて、*in vivo* 実験系でも同様に摘出網膜において糖尿病網膜症に対する小胞体ストレスの関与について検討する。動物実験については、糖尿病罹患期間別にラット網膜を還流固定下に摘出し、網膜 flat mount または、網膜の細胞層ごとに小胞体ストレス特異的な enzyme の局在、罹患期間別での変化、また、定量評価をおこなう。

4. 研究成果

小胞体ストレス特異的な enzyme の変化を経時的に観察したところ、結果、低グルコース濃度下における網膜周皮細胞において小胞体ストレス特異的な enzyme (GRP78(Glucose regulated protein 78)、ATF4(Activating transcription factor 4)、CHOP(C/EBP homologous protein)、Caspase-12 など) の活性を、Western blot 法により検証できた。これらの実験結果は、in vitro ではあるが、特に低グルコース濃度の状態において、小胞体ストレス及び unfolded protein response というメカニズムが、糖尿病網膜症の発症及びその初期病変である網膜血管の変化に密接に関連している可能性を示唆しており、その病態を考える上で、非常に興味深い結果が得られたと考えている。



A. X軸は、グルコース濃度を示す。標準的な濃度の5.5mMに比べ、0mMでは、小胞体ストレスマーカーである GRP78/Bip 及び CHOP の活性化がみられた。網膜周皮細胞において、低濃度グルコース状態で小胞体ストレスの誘導がおこなわれたと考えられる。一方、25mM の高濃度のグルコース下にては、小胞体ストレスの誘導は見られなかった。(GAPDH：コントロール。)

B. 低濃度グルコース下における網膜周皮細胞での小胞体シャペロン GRP78/Bip の誘導は、時間依存的に増加した。(0 時間～24 時間までの結果。)
(GAPDH：コントロール。)

また、In vivo での実験結果 (糖尿病ラットモデルでの小胞体ストレスの誘導) については、網膜展開切片、網膜断面切片の組織を作成し、免疫染色法等をの手法を用い、現在解析中であり、近い将来に国際雑誌等にそれらの結果を公表できるものと考えている。

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 3 件)

① Fukunaga T, Ikesugi K, etc. The effect of the Rho-associated protein kinase inhibitor, HA-1077, in the rabbit ocular hypertension model induced by water loading. *Current Eye Research* 査読有
34 巻 2009 年 p42-47.

② 生杉謙吾 超音波生体顕微鏡で PAC・プラトー虹彩を診断するには. *あたらしい眼科*. 査読無. 2008 年 25 巻 p54-56.

③ 築留英之, 生杉謙吾 他 トラベクレクトミー術後早期に難治性の房水漏出をきたした症例の検討. *あたらしい眼科*. 査読有. 2007 年 24 巻 p669-672.

[学会発表] (計 7 件)

① 生杉謙吾 宿題報告: 小胞体ストレスと眼疾患 第114回京都眼科学会 2008年6月1日 京都市

② Tsukitome H, Ikesugi K 他 Comparison of Quantitative Analysis of Anterior Chamber Between a Novel Ultrasound Biomicroscopy and a Former Ultrasound Biomicroscopy. *The Association for Research in Vision and Ophthalmology*. 2008 年 5 月 1 日 アメリカ合衆国フォートローダーデイル

③ 生杉謙吾 UBM のこれまでとこれから 第18回緑内障学会シンポジウム1 2007年9月14日 岐阜市

④ 生杉謙吾 他 5 名 当科における羊膜を利用した濾過胞再建術 三重県眼科セミナー 2007年7月22日 三重県津市

⑤ 生杉謙吾 他 4 名 高浸透圧ストレスに対する水晶体上皮細胞のストレス応答 第111回日本眼科学会総会一般口演 2007年4月20日 大阪市

〔図書〕（計 2 件）

①生杉謙吾、金原出版株式会社、眼科 2007
年臨時増刊号、2007 年、p1317-1322

②生杉謙吾、文光堂、眼科プラクティス 18
巻前眼部アトラス、2007 年、p276

6. 研究組織

(1) 研究代表者

生杉 謙吾 (IKESUGI KENGO)

三重大学・医学部附属病院・

診療等従事者

研究者番号：10335135

(2) 研究分担者

(3) 連携研究