

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09938

研究課題名(和文)新しい糖尿病網膜症モデルの確立

研究課題名(英文) Establishment of a new diabetic retinopathy model of mice

研究代表者

鈴木 崇弘 (SUZUKI, TAKAHIRO)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：40384896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまで、神経系の発達に不可欠な遺伝子として見つかри、オートファジー進行に重要な役割を担うことが知られていたAMBRA1に着目してきた。糖尿病や網膜疾患におけるオートファジーの重要性が報告される中、オートファジー不全是糖尿病網膜症を増悪することが予想された。我々は、世界に先駆け作製したAMBRA1のコンディショナルKO(cKO)マウスを用い、糖尿病網膜症への影響を解析した。その結果網膜においてオートファジーに障害を生じ、炎症を増悪するモデルであること、さらには網膜前駆細胞と思われる一部の網膜細胞の増殖を誘導し、糖尿病による網膜障害を緩和する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、AMBRA1が、網膜におけるオートファジーや炎症の機序において非常に重要な遺伝子であることが明白になった。さらにはAMBRA1が細胞増殖の制御に重要な因子であることが報告される中、AMBRA1のKOマウスでは網膜前駆細胞と思われる一部の網膜細胞の増殖を誘導し、さらには糖尿病による網膜障害を緩和する可能性を見出した。AMBRA1の制御により、オートファジー、さらには網膜前駆細胞の増殖をコントロールすることが出来れば、新たな糖尿病網膜症治療の開発につながることも期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have focused on AMBRA1, a gene found to be essential for the development of the nervous system and known to play an important role in autophagy progression. As the importance of autophagy in diabetes and retinopathy has been reported, it was predicted that autophagy deficiency would exacerbate diabetic retinopathy. We analyzed the effects on diabetic retinopathy using the world's first AMBRA1-conditional knockout (cKO) mice. We found that cKO mice are a model of impaired autophagy and exacerbated inflammation in retina, and that cKO mice induce proliferation of some retinal cells that appear to be retinal progenitor cells, which may alleviate retinal damage due to diabetes.

研究分野：糖尿病網膜症とオートファジー

キーワード：糖尿病 糖尿病網膜症 糖尿病網膜症マウス オートファジー AMBRA1

1. 研究開始当初の背景

糖尿病を含むメタボリックシンドロームにおけるオートファジーの重要性が注目されている。高血糖は酸化ストレスをもたらすが、オートファジーは、酸化ストレスにより生じる変性成分や、ROS を生じる傷害ミトコンドリアを除去する機能を有する。また、糖尿病網膜症における血管症状は、慢性炎症を背景として見ることができるが、網膜におけるオートファジーの機能不全はインフラマソームの活性化を促し、炎症の要因となる可能性が指摘されている。したがって、オートファジーは糖尿病網膜症治療の標的となり得るが、その可否の検討のためには適切なモデルが必要である。

2. 研究の目的

オートファジーは酵母から哺乳類までよく保存されたシステムであり、多くの先行研究は、大隈博士らにより同定された酵母関連遺伝子(Atg 遺伝子群)の哺乳類ホモログを手掛かりに行われてきた。

AMBRA1 は脊椎動物にのみ存在し、胎生致死であるため解析は十分に行われていない。我々は最近、改良 CRISPR/Cas9 法を用いて AMBRA1 flox マウスの作製に成功し(Quadros et al. Genome Biol. 2017)、Rosa-Cre-ER2-Tg マウスと交配して、薬剤(タモキシフェン)誘導コンディショナル KO マウスを得た。また細胞株を用いた研究により、AMBRA1 KO 細胞は各種シグナルによるオートファジー反応が大きく障害されていることを確認し、さらに AMBRA1 KO 細胞では解糖系・ミトコンドリア系の変化が障害され、細胞増殖の制御も異常をきたす可能性が示唆された。したがって、AMBRA1 KO 細胞においてはオートファジー制御と独立に代謝制御の異常も起こることが考えられた。AMBRA1 はオートファジーと代謝制御反応を結ぶ鍵分子である可能性がある。すでに Atg7^{+/-}マウスを糖尿病モデルマウス(ob/ob マウス)と交配した実験から、オートファジーが全身のインスリン抵抗性やグルコース耐性、血糖値に影響することが報告されているが、AMBRA1 KO マウスではそれ以上の表現型を観察できる可能性が高いと思われる。本研究では、このマウスを用いてオートファジー不全と代謝異常を伴う糖尿病網膜症モデルの確立を行い、新たな治療戦略の探索・評価を目指す。

3. 研究の方法

(1) AMBRA1 KO マウスにおけるブドウ膜炎(以下 EIU)モデルを用いたオートファジー反応と眼内炎症における関連性の検討

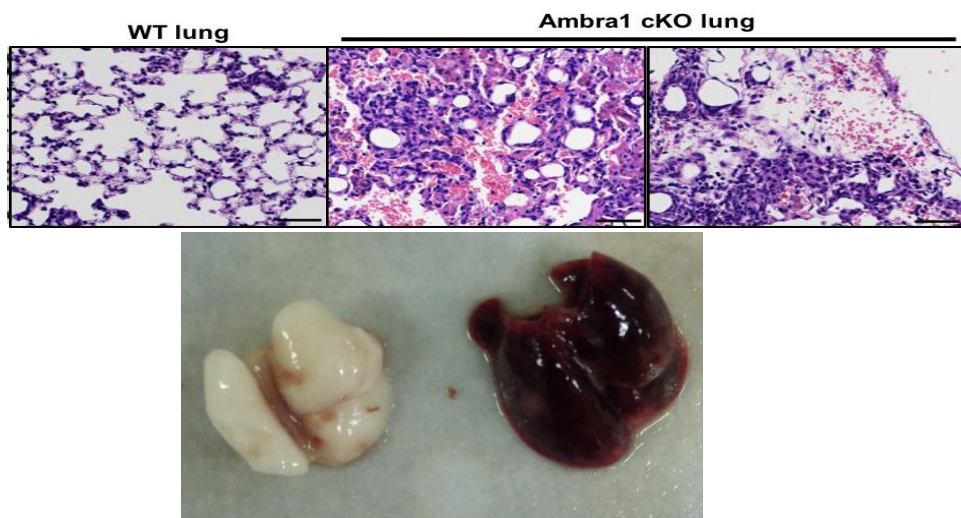
AMBRA1^{F/FxRosa-Cre-ER2-Tg} マウス及びコントロールの AMBRA1^{F/F} マウスにタモキシフェンを投与し、薬剤依存的に全身組織で Ambra1 遺伝子をノックアウトしたマウス、及びコントロールマウスを用意した。両マウスにリポ多糖(Lipopolysaccharide, 以下 LPS)を腹腔内投与することにより EIU モデルを作製し、網膜を採取後炎症性サイトカインである TNF- α , CCL2 の転写産物量を定量的 PCR(qPCR)により定量した。免疫組織学化学染色ではオートファジーのマーカーである Beclin1, LC-3 の染色像を観察し、オートファジー反応を評価した。

(2) スレプトゾトシン誘発糖尿病マウスにおける AMBRA1 の網膜への影響の検討

AMBRA1^{F/FxRosa-Cre-ER2-Tg} マウス及びコントロールの AMBRA1^{F/F} マウスにタモキシフェンを投与し、薬剤依存的に全身組織で AMBRA1 遺伝子をノックアウトしたマウス、及びコントロールマウスを用意した。各マウスにスレプトゾトシン投与を行い膵 β 細胞破壊による糖尿病を誘導し、cyclinD3, anti-glutamine synthetase (GS)を染色し、細胞分裂およびその局在を観察した。また神経細胞に関与し、糖尿病では発現の亢進を認めるアストロサイトのマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP) の染色も行った。

4. 研究成果

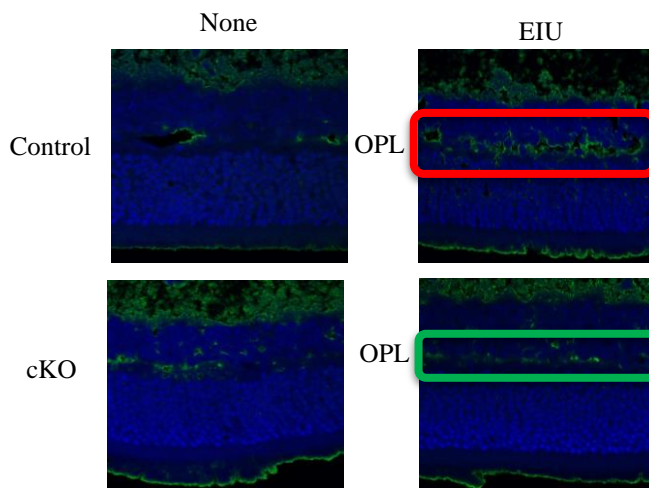
(1) AMBRA1 KO マウスの EIU モデル(肺および肺の病理組織像)



AMBRA1 KO マウスに LPS を腹腔内投与することにより EIU モデルを作製、上記に示すように、明らかに肺における炎症細胞の多量の浸潤と出血を認め、炎症の劇症化が示唆された。

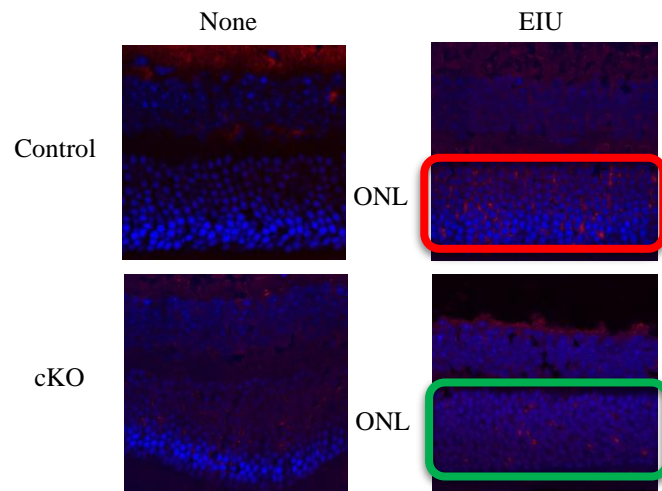
(2) AMBRA1 KO マウスの EIU モデルでは Beclin-1 の発現が低下する。

網膜におけるオートファジーの発現について Beclin-1 (緑) の免疫組織化学染色により検討した。右図のように AMBRA1 KO マウスの EIU モデルでは、網膜外網状層 (OPL) において発現が低下している。

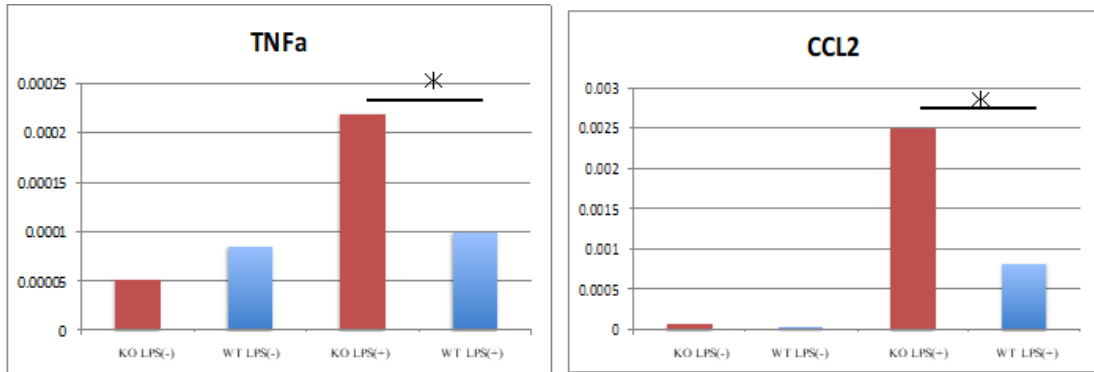


(3) AMBRA1 KO マウスの EIU モデルでは LC-3 の発現が低下する。

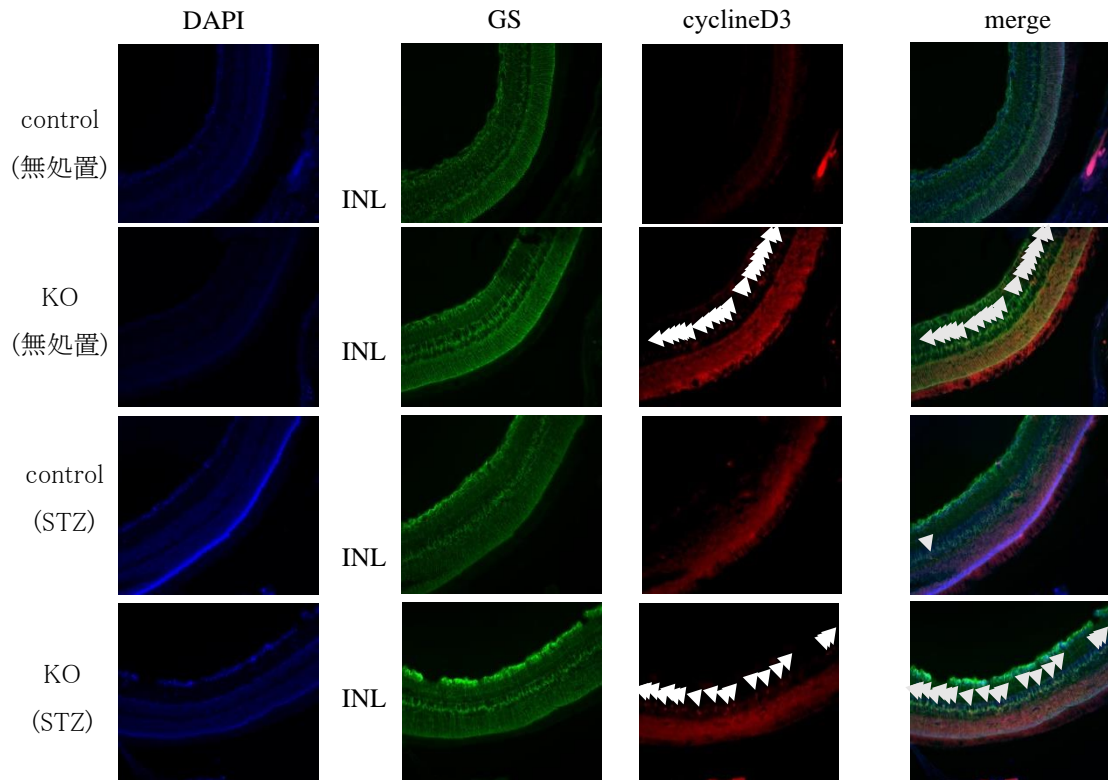
網膜におけるオートファジーの発現について LC-3 (赤) の免疫組織化学染色により検討した。右図のように AMBRA1 KO マウスの EIU モデルでは、網膜外顆粒層 (ONL) において発現が低下している。



(4) AMBRA1 KO マウスの EIU モデルでは TNF- α 、CCL2 の発現が上昇する。
 網膜において、炎症性サイトカインであるの転写産物量を定量的 PCR (qPCR) により定量した。下図の
 ように AMBRA1 KO マウスの EIU モデルでは、TNF- α 、CCL2 ともに発現が有意に高い。

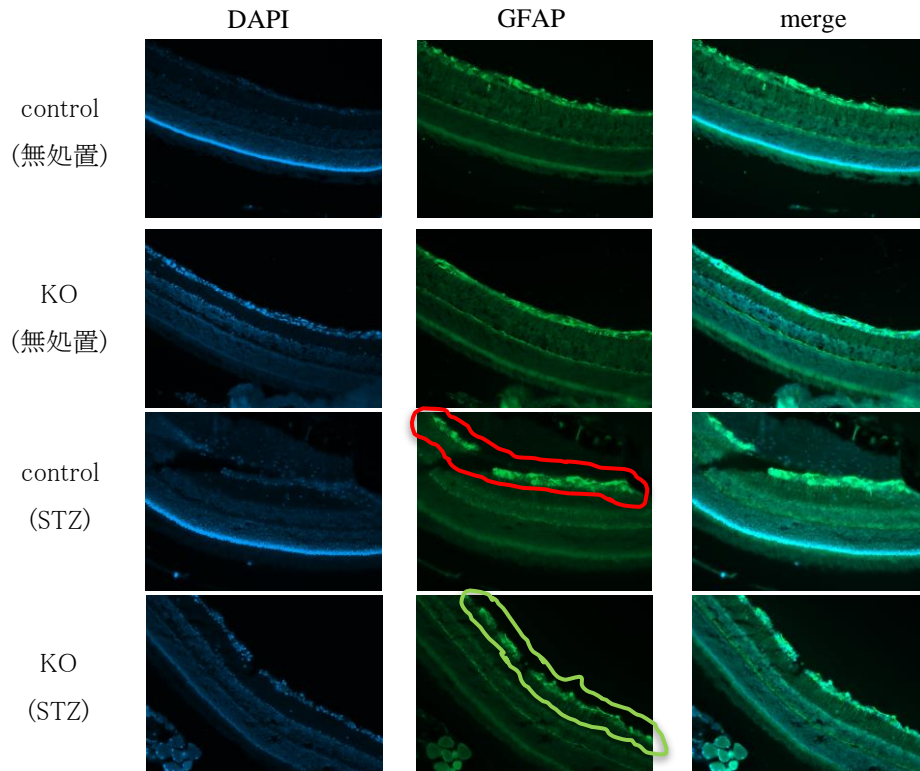


(5) AMBRA1 KO マウスでは cyclineD3 が発現し、それらは anti-glutamine synthetase (GS)と一致する。



細胞増殖のマーカーである cyclineD3 (赤), ミューラーグリア細胞のマーカーである anti-glutamine synthetase (GS) (緑) を染色した。上図のごとく免疫組織化学染色では、コントロールマウスについて無処置・STZ 処置共に cyclineD3 の陽性細胞(白矢頭)をほぼ認めなかったが、AMBRA1 KO マウスでは網膜内顆粒層(INL)にそれらを確認することができ、また GS の染色と多く一致した。無処置・STZ 処置では差を認めなかった。

(6) AMBRA1 KO マウスの糖尿病モデルでは、GFAP 発現が低下する。



糖尿病では発現の亢進を認めるアストロサイトのマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP) (緑) の染色を行った。GFAP の染色では、コントロールマウスにおいて無処置と比較し STZ 処置では GFAP の発現が亢進していたが、AMBRA1 KO マウスでは発現の亢進がコントロールマウスと比較し低下していた。

これらの結果から、AMBRA1 KO マウスが、オートファジーに障害を生じ、炎症を増悪するモデルであること、ミューラーグリア由来細胞の増殖が起きている可能性を得た。しかしながら糖尿病モデルを作成したところ、予想された網膜の増悪変化を認めず、網膜障害時に亢進するアストロサイトのマーカー GFAP が抑制されていた。我々はこの相反する結果について、ミューラーグリア由来細胞が、網膜創傷治癒との関連も報告されている網膜前駆細胞の増殖に関わっており、結果として網膜障害が緩和されているのではないかと考えており、研究を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 鈴木崇弘 |
| 2. 発表標題 ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスにおけるAMBRA1の網膜への影響 |
| 3. 学会等名 第26回日本糖尿病眼学会総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 鈴木崇弘 |
| 2. 発表標題 AMBRA 1 は網膜においてオートファジーとミューラーグリア細胞の増殖に關与する |
| 3. 学会等名 第124回日本眼科学会総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 鈴木崇弘 |
| 2. 発表標題 AMBRA 1 遺伝子欠損によるミューラーグリア由来細胞の増殖と抗炎症効果 |
| 3. 学会等名 第126回日本眼科学会総会 |
| 4. 発表年 2022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 | 佐藤 健人 (SATO TAKEHITO) (50235363) | 東海大学・医学部・准教授 (32644) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|