

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592032

研究課題名（和文）糖尿病網膜症におけるアクチビン-フォリスタチン系の役割

研究課題名（英文）The role of Activin-Follistatin System in Diabetic Retinopathy

研究代表者

岸 章治 (KISHI SHOUJI)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30125843

研究成果の概要（和文）増殖糖尿病網膜症の硝子体中のアクチビン濃度が単純糖尿病網膜症よりも高かった。アクチビンはヒト臍帯静脈内皮細胞の管腔形成作用を抑制する作用があり、フォリスタチンでは逆に促進した。また、アクチビンは血管内皮増殖因子の管腔形成作用を抑制した。実験的マウス脈絡膜新生血管モデルにおいては、アクチビンの硝子体内注射により新生血管が縮小した。以上のことからアクチビンは血管新生に抑制的に働いていると推測される。

研究成果の概要（英文）：An Activin concentration in the vitreous of Proliferative Diabetic Retinopathy was higher than that of Simple Diabetic Retinopathy. Activin inhibited tubulogenesis of HUVECs even in the presence of VEGF. Follistatin induced tubulogenesis of HUVECs. Injection of Activin in the vitreous decreased the size of Laser-induced mouse choroidal neovascularization.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：血管新生

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：アクチビン、血管新生、糖尿病網膜症

1. 研究開始当初の背景

(1) アクチビンはウシ大動脈血管内皮細胞においてコラーゲンゲル3次元培養で管腔形成作用を持ちその作用は血管内皮増殖因子（VEGF）の作用を増強し、フォリスタチンは逆に VEGF の管腔形成作用を抑制した。これらのことからアクチビンは血管新生促進因子として血管内皮に作用しているのではないかと考えた。

(2) 増殖糖尿病網膜症の増殖膜中にはアクチビンが発現しており、病態に何らかの作用をしていると推測された。

2. 研究の目的

我々は、血管新生と増殖膜が主な病態である増殖糖尿病網膜症の病態にアクチビンが関与しているのではないかと考えその作用を解明することを目的として研究計画をたてた。

3. 研究の方法

(1) 群馬大学医学部附属病院にて増殖糖尿病網膜症患者、単純糖尿病網膜症患者及びコントロール患者の硝子体を一部（約 500 μ l）硝

子体手術中に採取して、検体として保存。後日 ELISA 法にて硝子体中アクチビン濃度を測定した。

(2) ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC s) においてコラーゲンゲル培養を行いアクチビン、フォリスタチン、VEGF を添加してその管腔形成作用を検討した。

(3) 同じく HUVEC s を用いてアクチビン及びフォリスタチンの細胞増殖作用を MTT 法にて検討した。

(4) 実験的マウス脈絡膜血管新生モデルを作成し、10 日後に眼球摘出し、ホルマリン固定を行い、脈絡膜新生血管を免疫組織学的に検討した。

(5) 実験的マウス脈絡膜血管新生モデルにおいてレーザー照射後すぐに硝子体中にアクチビンを注射し、10 日後フラットマウントを作成し、新生血管の大きさを検討した。

4. 研究成果

(1) 増殖糖尿病網膜症の増殖膜内新生血管にはアクチビン、アクチビンレセプター、フォリスタチンが発現していた。また、増殖糖尿病網膜症患者の硝子体中アクチビン濃度は $(441.87 \pm 234.63 \text{ pg/ml})$ であり、単純糖尿病網膜症群 $(212.02 \pm 67.4 \text{ pg/ml})$ とコントロール群 $(171.96 \pm 39.2 \text{ pg/ml})$ よりも高濃度のアクチビンが存在していた。今までアクチビンが増殖糖尿病網膜症にて高濃度存在しているという報告がなく、増殖糖尿病網膜症の病態解明に繋がる重要な結果と思われる。

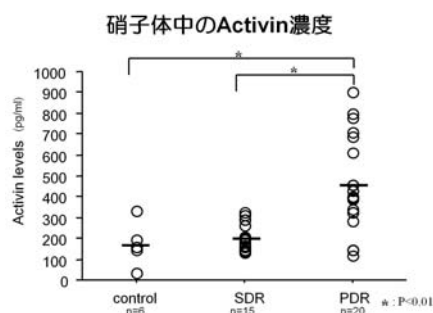


図 1 硝子体中アクチビン濃度

(2) アクチビンは HUVEC s の管腔形成作用を抑制した。さらにアクチビンは VEG (100ng/ml) 存在下でも濃度依存的に管腔形成は抑制された。その作用は、コントロールを 100% とするとアクチビン 4nM では約 34%、アクチビン 40nM では 18% と有意に VEGF の作用を抑制していることが分かる。フォリスタチンは逆に

HUVEC s の管腔形成作用を促進した。VEGF 存在下では、VEGF の管腔形成作用を増強しているようにも思えたが、実際管腔の長さを測定してみるとコントロールと比較して有意な差は得られなかった。

アクチビンは HUVEC s の増殖を濃度依存的に抑制した。これらのことから、アクチビンは管腔形成抑制作用があり、細胞増殖抑制作用があることがわかった。以上の結果からアクチビンは HUVEC s において血管新生抑制因子として作用していることが示唆される。また、興味深いことに、従来より VEGF は、主要な血管新生促進因子として知られているが、その管腔形成作用をアクチビンは抑制しており、その抑制作用も濃度依存的であることからアクチビンが VEGF の作用を制御している可能性が示唆される。

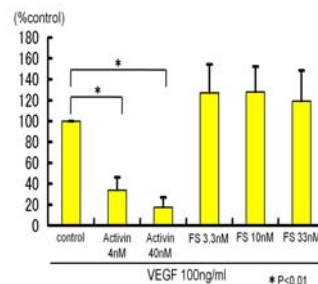


図 2 管腔形成作用

(3) 実験的マウス脈絡膜血管新生モデルにおいては、免疫組織学的に検討するとその血管内皮細胞にアクチビン、アクチビンレセプターが発現していた。脈絡膜新生血管においてもアクチビンが作用していることが考えられた。そこでマウスにレーザー照射後片眼アクチビンを硝子体中に注射し他眼には PBS を注射。10 日目にその血管新生の大きさを検討すると、アクチビン注射により血管新生の大きさが縮小した。その作用は濃度依存的であった。以上のことから、脈絡膜の新生血管においてもアクチビンが抑制的に働いている可能性があり、今後加齢黄斑変性症のような脈絡膜血管新生が原因の疾患に対してアクチビンが治療的意義をもたらす可能性があると思われる。

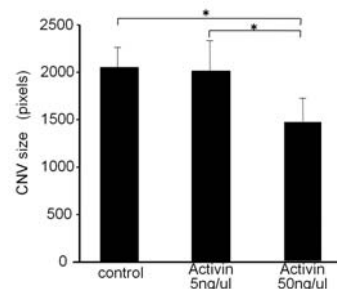


図 3 脈絡膜新生血管抑制作用

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 33 件)

- ① Itakura H, Kishi S: Aging changes of vitreomacular interface. Retina. 査読有(inpress)
- ② Otani T, Yamaguchi Y, Kishi S: Improved visualization of Henle fiber layer by changing the measurement beam angle on optical coherence tomography. Retina 査読有 31: 497-501, 2011
- ③ Itakura H, Kishi S: Restored photoreceptor outer segment in commotio retinae. Ophthalmic Surg Lasers Imaging. 査読有 2011 3; 42 Online:e29-31.
- ④ Matsumoto H, Kishi S, Sato T, Mukai R: Fundus autofluorescence of elongated photoreceptor outer segments in central serous chorioretinopathy. Am J Ophthalmol 査読有 151(4): 617-623, 2011
- ⑤ Ooto S, Hangai M, Sakamoto A, Tomidokoro A, Araie M, Otani T, Kishi S, Matsushita K, Maeda N, Shirakashi M, Abe H, Takeda H, Sugiyama K, Saito H, Iwase A, Yoshimura N : Three-dimensional profile of macular retinal thickness in normal Japanese eyes. Invest Ophthalmol Vis Sci 査読有 51(1) : 465-73, 2010
- ⑥ Shimoda Y, Sano M, Hashimoto H, Yokota Y, Kishi S : Restoration of photoreceptor outer segment after vitrectomy for retinal detachment. Am J Ophthalmol 査読有 149(2) : 284-90, 2010
- ⑦ Matsumoto H, Sato T, Kishi S : Tomographic features of intraretinal neovascularization in retinal angiomatous proliferation. Retina、査読有 30(3) : 425-30, 2010
- ⑧ Otani T, Yamaguchi Y, Kishi S : Correlation between visual acuity and foveal microstructural changes in diabetic macular edema. Retina、査読有 30(5):774-80, 2010
- ⑨ Mukai R, Kishi S, Sato T, Watanabe G, Matsumoto H : Protective Effect of Intravitreal Bevacizumab and Sub-Tenon Triamcinolone Acetonide against Occlusion of Choriocapillaris Induced by Photodynamic Therapy. Ophthalmologica、査読有 224(5):267-273, 2010
- ⑩ Takahashi M, Sato T, Kishi S:. Intravitreal bevacizumab for age-related macular degeneration with good visual acuity. Jpn J Ophthalmol 査読有、54(6):565-70, 2010.
- ⑪ Hirasawa H, Tomidokoro A, Araie M, Konno S, Saito H, Iwase A, Shirakashi M, Abe H, Ohkubo S, Sugiyama K, Ootani T, Kishi S, Matsushita K, Maeda N, Hangai M, Yoshimura N: Peripapillary retinal nerve fiber layer thickness determined by spectral-domain optical coherence tomography in ophthalmologically normal eyes. Arch Ophthalmol 査読有、128(11):1420-6, 2010
- ⑫ Kishi S, Li D, Takahashi M, Hashimoto H: Photoreceptor damage after prolonged gazing at a computer game display. Jpn J Ophthalmol 査読有、54(5):514-6, 2010
- ⑬ Ikeda F, Kishi S: Inner neural retina loss in central retinal artery occlusion. Jpn J Ophthalmol 査読有 54(5):423-9, 2010
- ⑭ Sato T, Kishi S, Matsumoto H, Mukai R: Combined photodynamic therapy with verteporfin and intravitreal bevacizumab for polypoidal choroidal vasculopathy. Am J Ophthalmol 査読有 149(6): 947-954, 2010
- ⑮ Mukai R, Kishi S, Sato T, Watanabe G, Matsumoto H: Protective effect of intravitreal bevacizumab and sub-tenon triamcinolone acetonide against occlusion of choriocapillaris induced by photodynamic therapy. Ophthalmologica 査読有 224(5):267-73, 2010
- ⑯ Tano Y, Ohji M; EXTEND-I Study Group: EXTEND-I: safety and efficacy of

- ranibizumab in Japanese patients with subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol* 査読有、88(3):309-16, 2010
- ⑰ 鈴木康大, 横田幸大, 橋本英明, 下田幸紀, 岸章治: 網膜細動脈瘤へのベバシズマブ硝子体内注射の効果、臨床眼科、査読有、(0370-5579)64 巻 9 号 Page1561-1566(2010.09)
- ⑱ 浅原大典, 向井亮, 佐藤拓, 渡辺五郎, 堀内康史, 森本雅裕, 松本英孝, 高橋牧, 村上結香, 袖山博隆, 岸章治: ベバシズマブ硝子体内投与により退縮した点状脈絡膜内層症に併発した脈絡膜新生血管臨床眼、査読有、64 巻 5 号 Page699-706(2010.05)
- ⑲ Medina. J., Yamada, S., and Kojima, I. Identification of differentially express genes induced during the proliferative response of the liver induced by follistatin. *Endocrine J.* 査読有、56:1067-1077. 2009
- ⑳ Sano M, Shimoda Y, Hashimoto H, Kishi S: Restored photoreceptor outer segment and visual recovery after macular hole closure. *Am J Ophthalmol* 査読有 147(2) : 313-318, 2009
- ㉑ Furuta M, Iida T, Kishi S: Foveal thickness can predict visual outcome in patients with persistent central serous chorioretinopathy. *Ophthalmologica* 査読有り、223(1) : 28-31, 2009
- ㉒ Li D, Kishi S: Restored photoreceptor outer segment damage in multiple evanescent white dot syndrome. *Ophthalmology* 査読有、116(4) : 762-70, 2009
- ㉓ Itakura H, Kishi S, Kotajima N, Murakami M : Decreased vitreal hyaluronan levels with aging. *Ophthalmologica* 査読有、223(1) : 32-5, 2009;
- ㉔ Matsumoto H, Sato T, Kishi S: Outer nuclear layer thickness at the fovea determines visual outcomes in resolved central serous chorioretinopathy. *Am J Ophthalmol* 査読有、148(1) : 105-10, 2009
- ㉕ Itakura H, Kishi S: Intravitreal injection of 0.3 ml of SF6 gas for persistent subfoveal fluid after scleral buckling for rhegmatogenous retinal detachment. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 査読有、247(8) : 1147-50, 2009
- ㉖ Sakurai K, Akiyama H, Shimoda Y, Yoshida I, Kurabayashi M, Kishi S: Effect of Intravitreal Injection of High-Dose Bevacizumab in Monkey Eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 査読有、50(10) : 4905-16, 2009
- ㉗ Hashimoto H, Kishi S: Shortening of the rod outer segment in Oguchi disease. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 査読有、247(11) : 1561-3, 2009
- ㉘ Otani T, Kishi S: Surgically induced posterior vitreous detachment by tearing the premacular vitreous cortex. *Retina* 査読有、29(8) : 1193-4, 2009
- ㉙ Ikeda F, Iida T, Kishi S: Resolution of retinoschisis after vitreous surgery in X-linked retinoschisis. *Ophthalmology* 査読有、115(4) : 718-722, 2008
- ㉚ Shimoda Y, Hamano R, Ishihara K, Shimoda N, Hagimura N, Akiyama H, Kishi S, Kaneko A: Effects of intraocular irrigation with melphalan on rabbit retinas during vitrectomy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 査読有、246(4) : 501-8, 2008
- ㉛ Matsumoto H, Kishi S, Otani T, Sato T: Elongation of photoreceptor outer segment in central serous chorioretinopathy. *Am J Ophthalmol* 査読有、145(1) : 162-168, 2008
- ㉜ Kogure A, Ohkoshi K, Kogure S, Yamaguchi T, Kishi S: Efficacy and retention times of intravitreal triamcinolone acetate for macular edema. *Jpn J Ophthalmol* 査読有、52(2) : 122-6, 2008
- ㉝ Watanabe G, Fujii H, Kishi S: Imaging of choroidal hemodynamics in eyes with polypoidal choroidal vasculopathy using laser speckle phenomenon. *Jpn J Ophthalmol* 査読有、52(3) : 175-81, 2008

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① 前嶋京子、小島至、岸章治、The role of Activin A in Angiogenesis、ARVO 2011 annual meeting, 2011. 5. 4、フォートローダーデール国際会議場、(フロリダ、アメリカ)
- ② 吉田いづみ、前嶋京子、小島至、岸章治、実験的脈絡膜新生血管とアクチビン、第 113 回日本眼科学会、2009. 4. 17、東京国際フォーラム（東京都）
- ③ 前嶋京子、小島 至、岸 章治、アクチビン及びフォリスタチンによる管腔形成作用、第 112 回日本眼科学会、2008. 4. 18 パシフィコ横浜（神奈川県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸 章治 (KISHI SHOUJI)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：3 0 1 2 5 8 4 3

(2) 研究分担者

小島 至 (KOJIMA ITARU)
群馬大学・生体調節研究所・教授
研究者番号：6 0 1 4 3 4 9 2