

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03837

研究課題名(和文) Glycer-AGEによる網膜神経病態の機序解明と糖尿病網膜症に対する創薬

研究課題名(英文) Elucidation of the Mechanism of Retinal Neuropathology by Glycer-AGE and Drug Discovery for Diabetic Retinopathy

研究代表者

石田 晋 (Ishida, Susumu)

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：10245558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：グリセルアルデヒド由来の終末糖化産物は、その細胞障害性の強さからToxic AGE (TAGE)と呼ばれ、糖尿病網膜症を含む様々な疾患での病態形成への関与が報告されている。本研究では、TAGEによる網膜神経病態の機序を解明し、抗TAGE抗体によるDRの新規治療法を開発することを目的として検討を行なった。ヒト培養網膜色素上皮細胞(RPE)においてTAGEはRPEのバリア機能を低下させた。またRPE細胞においてTAGE化される標的タンパク候補を同定した。糖尿病網膜症患者の血漿中のTAGE濃度は対照群と比較し高い傾向を示したが有意な差ではなかった。今後さらに病期別に詳細な解析を行っていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病網膜症(diabetic retinopathy, DR)は重篤な視機能障害をきたす疾患であり、その病態理解は眼科学における最重要課題の一つである。これまでのDR治療はその血管病態を制御することを目的とされてきたが、近年、DRにおける「神経病態」が注目されている。しかし、DRにおける神経保護的治療法は現在のところ確立されておらず、眼科領域におけるアンメットニーズである。本研究によりTAGEが視細胞の恒常性維持に重要なRPEの機能を変化させることなどが明らかとなり、TAGEによる網膜神経病態形成機序の一端が示された。

研究成果の概要(英文)：Advanced glycation end products derived from glyceraldehyde called Toxic AGE (TAGE) due to its strong cytotoxicity, has been reported to be involved in the pathogenesis of various diseases including diabetic retinopathy. The aim of this study was to elucidate the mechanism of retinal neuropathology caused by TAGE and to develop a novel treatment for DR using anti-TAGE antibodies. In cultured human retinal pigment epithelial cells (RPE), TAGE decreased the barrier function of RPE. We also identified candidate target proteins of TAGE in RPE cells. Plasma levels of TAGE tended to be higher in diabetic retinopathy patients than in controls, but the difference was not significant. Further detailed analysis by stage will be conducted in the future.

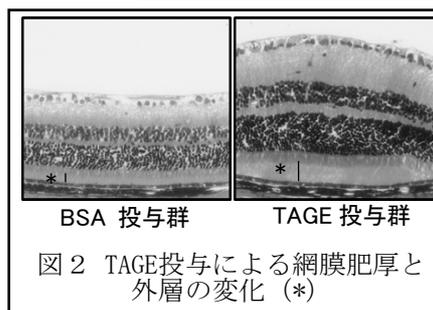
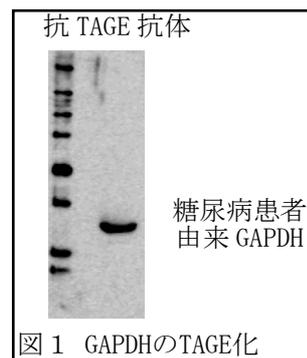
研究分野：網膜細胞生物学

キーワード：糖尿病網膜症 Glycer-AGE 網膜神経病態

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の合併症の一つである糖尿病網膜症 (Diabetic retinopathy、DR) は、糖尿病罹病期間に伴ってその発症率が急増する細小血管障害であり、世界的な高齢化にともなってDRを有する糖尿病患者数も今後増加すると推測されている。DRの重要な病態に、血管病態をその基盤とする浮腫がある。糖尿病黄斑浮腫 (diabetic macular edema、DME) は、網膜の中心部で視力を司る重要な部位である黄斑部に浮腫を生じた所見であり、糖尿病の病期に関わらず発症し、その進行に伴い著しい視力低下を引き起こす。その病態においては血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor、VEGF) が重要な役割を演じており、現在のDMEに対する第一選択は抗VEGF製剤である。一方、DMEは「血管病態」がその基盤にあるが、近年、DRにおける「神経病態」が注目されている。糖尿病患者ではDRの出現以前から、色覚異常やコントラスト感度の低下、網膜電図 (electroretinography、ERG) の異常などが生じることが知られている。また、糖尿病モデル動物を用いた研究においても、糖尿病早期の血管病変が発症するより以前にERGに変化が認められ、視細胞の変性や網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium、RPE) の機能低下が生じることが報告されている (Li et al. *Exp. Eye Res.* 2002)。しかし、DRにおける神経保護的治療法は現在のところ確立されていない。

終末糖化産物 (advanced glycation end-product、AGE) は、タンパク質の非酵素的糖化反応 (AGE化) により作られる生成物の総称である。その中でも、グルコースおよびフルクトース代謝の中間体であるグリセルアルデヒド由来のGlycer-AGEは、その細胞障害性の強さからToxic AGE (TAGE) とも呼ばれ、心血管疾患、非アルコール性肝疾患、アルツハイマー病など様々な疾患での病態形成への関与が指摘されており、糖尿病患者の血清中においてもTAGEが増加していることが報告されている (Katagiri et al. *Int Ophthalmol.* 2018)。本研究課題の研究協力者であるBloom Technology社の研究グループは、TAGEが他のAGEには無い強力な酸化能を有し、このTAGEの酸化能が青色光照射により増強されることを見出した。そして、TAGE化される標的タンパク候補の一つとして、解糖系酵素の一つであるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、GAPDH) を見出している (図1)。網膜は光を受容する器官であり、光曝露によるTAGEの酸化作用に対し感受性が高いことが予想される。さらに、網膜組織の中でもRPEは代謝活性が高く、エネルギー産生が盛んであることから、GAPDHがTAGE化され糖代謝に異常が生じればRPEの細胞機能低下をもたらすと考えられる。RPEは、視細胞外節の食能や網膜-脈絡膜間のバリア機能を有し、視細胞の恒常性の維持に重要である。予備検討により、正常マウスにTAGEを腹腔内投与すると網膜肥厚を伴う網膜外層障害が認められ (図2)、TAGEがマウス胎仔脳の初代培養神経細胞のアポトーシスを誘導するという結果も得られている。これらの検討から、糖尿病で増加するTAGEが光によって酸化ストレスを増強して網膜を障害し、また細胞内タンパク質のTAGE化によりRPE機能が低下することにより、網膜神経病態が惹起される可能性が推察された。



2. 研究の目的

本研究の目的は、「TAGEによる網膜神経病態の機序を解明し、抗TAGE抗体によるDRの新規治療法を開発すること」である。

3. 研究の方法

ヒト培養RPE細胞株hTERT-RPE1に、グリセルアルデヒドと牛血清アルブミン (BSA) を反応させて作製したTAGE化BSA (TAGE-BSA) を添加し、リアルタイム細胞アナライザーiCelligenceを用いてバリア機能の解析を行なった。培養肝細胞へのグリセルアルデヒド添加により細胞内のタンパク質がTAGE化されることが報告されている (Takino et al. *World J Gastroenterol.* 2015)。本研究では、ヒト培養RPE細胞hTERT-RPE1にグリセルアルデヒドを添加してTAGE化反応を誘導し、抗TAGE抗体カラムによって免疫沈降した産物をゲル電気泳動して銀染色し、切り出したバンドをnanoLC-MS/MS質量分析法で解析してRPE細胞内でTAGE化される標的タンパク質の同定を試みた。臨床検体を用いた解析として、DR患者および対照群として非糖尿病性網膜症患者(黄斑円孔、黄斑前膜)の血漿中のTAGE濃度の測定を行なった。また、同検体において前述の解析で同定したTAGE化標的蛋白の濃度を測定し、TAGE濃度との相関について検討した。

4. 研究成果

リアルタイム細胞アナライザーを用いた解析において、TAGE-BSA添加後10時間まではhTERT-RPE1においてバリア機能の指標であるcell indexの上昇が認められたが、その後TAGE-BSA添加群では減少に転じ、24時間以降では濃度依存的にコントロールと比較し有意に低下していた(図3)。この結果から、TAGE-BSAにRPEのバリア機能を変化させる作用があることが示された。

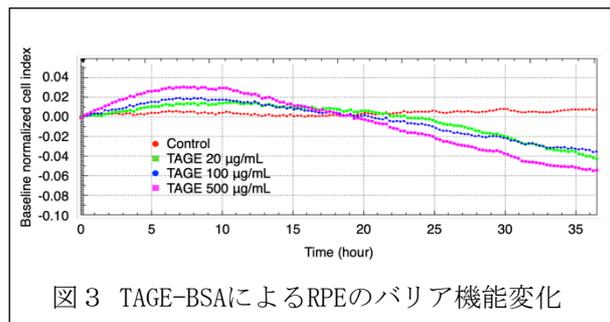


図3 TAGE-BSAによるRPEのバリア機能変化

グリセルアルデヒドでTAGE化反応を誘導したRPE細胞では、グリセルアルデヒドを加えないコントロールと比べ、抗TAGE抗体で検出されるバンドが増加することがウエスタンブロッティングで確認された。このTAGE化誘導されたRPEを抗TAGE抗体で免疫沈降し、銀染色で検出されたバンドを質量分析法で解析したところ(図4)、35個の蛋白が同定された。検出された蛋白は、細胞骨格分子、転写因子、リボソーム蛋白などだった。

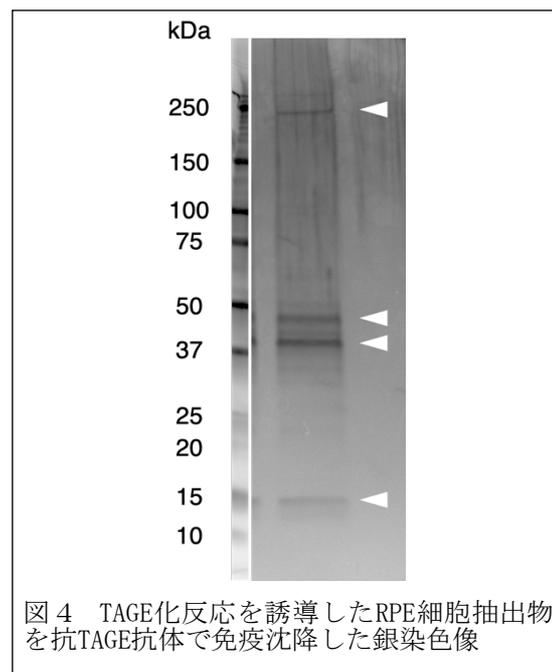
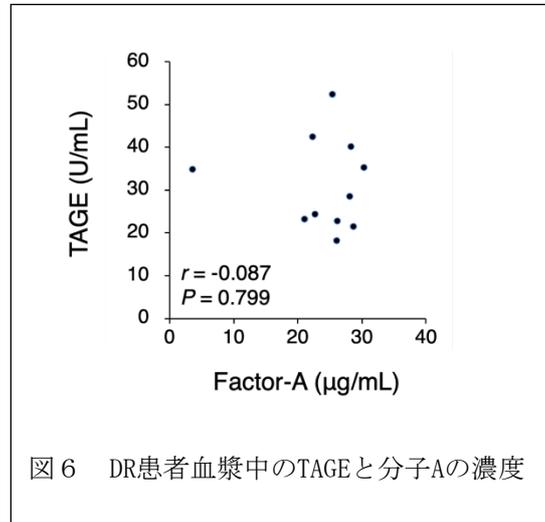
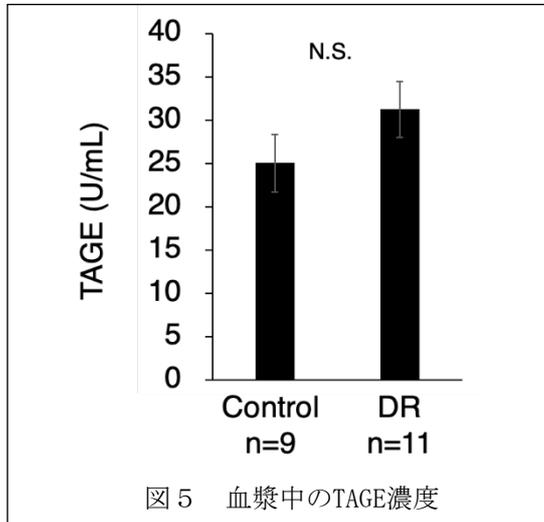


図4 TAGE化反応を誘導したRPE細胞抽出物を抗TAGE抗体で免疫沈降した銀染色像

続いて、臨床検体を用いた解析を行なった。DR患者の血漿中のTAGE濃度は、対照群と比較し高い傾向は認められたものの有意な差ではなかった(図5、 $P=0.201$)。今回測定した検体はDR

の様々な病期の患者に由来するものであったことから、今後病期別の解析を行う必要があると考えられる。また、硝子体中のTAGE濃度についても今後解析を進める予定である。更に、前述し

たTAGE化候補分子のうちスコアの高かった分子Aについて、同血漿検体中で濃度を測定し、TAGE濃度との相関についても検討を行なった。血漿中の分子A濃度はDR群と対照群で有意な差は認められなかった ($P=0.514$)。またDR患者血漿中で、TAGE濃度と分子Aの濃度の間に有意な相関は認められなかった (図6)。今後、更に他のTAGE化候補分子についても検討を行っていく予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 3件）

1. 著者名 Murata Miyuki, Noda Kousuke, Kase Satoru, Hase Keitaro, Wu Di, Ando Ryo, Ishida Susumu	4. 巻 298
2. 論文標題 Placental growth factor stabilizes VEGF receptor-2 protein in retinal pigment epithelial cells by downregulating glycogen synthase kinase 3 activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102378 ~ 102378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102378	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 Fukutsu Kanae, Murata Miyuki, Kikuchi Kasumi, Yoshida Shiho, Noda Kousuke, Ishida Susumu	4. 巻 8
2. 論文標題 ROCK1 Mediates Retinal Glial Cell Migration Promoted by Acrolein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	6. 最初と最後の頁 717602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmed.2021.717602	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 Yamamoto Taku, Kase Satoru, Murata Miyuki, Ishida Susumu	4. 巻 16
2. 論文標題 Serum advanced glycation end-products and B-crystallin in diabetic retinopathy patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedical Reports	6. 最初と最後の頁 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/br.2022.1511	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Yamamoto T, Kase S, Kikuchi K, Ishida S.
2. 発表標題 The role of phosphorylated aB-crystallin in Muller cells under diabetic inflammatory conditions
3. 学会等名 FUJIRETINA (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ishida S
2. 発表標題 Peripapillary Circulatory Dysfunction Precedes Structural Loss in Treatment- Naive Diabetic Retinopathy
3. 学会等名 The Macula Society 46rd Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ishida S.
2. 発表標題 Peripapillary circulatory dysfunction precedes structural loss in treatment-naive diabetic retinopathy.
3. 学会等名 International Ocular Inflammation Society (IOIS) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ishida S, Willis JR, Haskova Z, Westenskow P.
2. 発表標題 Angiopoietin-2 Signalling and Vascular Stability With Faricimab in Diabetic Macular Edema (DME)
3. 学会等名 FUJIRETINA (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kikuchi K, Murata M, Kageyama Y, Shinohara M, Sasase T, Noda K, Ishida S.
2. 発表標題 Retinal capillary changes and cytokine expression 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 2022年

1. 発表者名 福津佳苗、村田美幸、菊地香澄、野田航介、石田 晋
2. 発表標題 増殖糖尿病網膜症におけるマクロファージ遊走とアクロレイン
3. 学会等名 第25回眼科分子生物学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福津佳苗、村田美幸、菊地香澄、吉田志帆、野田航介、石田 晋
2. 発表標題 Muller細胞におけるアクロレインによる単球走化性因子の発現誘導
3. 学会等名 第126回日本眼科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石田 晋
2. 発表標題 Muller Glial-Mesenchymal Transition (GMT)
3. 学会等名 第15回 Retina Research Meeting
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fukutsu K, Murata M, Kikuchi K, Yoshida S, Noda K, Ishida S.
2. 発表標題 Acrolein promotes Muller cell migration via ROCK1 pathway
3. 学会等名 The 14th Joint Meeting of Japan-China-Korea Ophthalmologists (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ishida S
2. 発表標題 Circulatory Hemodynamics in a Patient with Choroidal Macrovesel
3. 学会等名 8th Annual Meeting of Asia-Pacific Retina Imaging Society (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊地香澄、野田航介、村田美幸、影山 靖、篠原雅巳、笹瀬智彦、石田 晋
2. 発表標題 Spontaneously Diabetic Torii fatty ラットの網膜血管の解析
3. 学会等名 第27回日本糖尿病眼学会
4. 発表年 2021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	村田 美幸 (Murata Miyuki) (50423752)	北海道大学・医学研究院・特任助教 (10101)	
研究 分担者	神田 敦宏 (Kanda Atsuhiro) (80342707)	北海道大学・医学研究院・客員研究員 (10101)	

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
---------	---------