

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18345

研究課題名（和文）増殖糖尿病網膜症におけるCdk5とERK回路の関与について

研究課題名（英文）Involvement of Cdk5 and the ERK pathway in proliferative diabetic retinopathy

研究代表者

仁木 昌徳（NIKI, Masanori）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・助教

研究者番号：20861082

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：硝子体中のPPAR、Cdk5、p35濃度は、PDR（増殖糖尿病網膜症）群において対照群よりも有意に高かった。リン酸化ERK濃度も対照群よりも高かったが、有意差はなかった。さらに、増殖膜におけるPPAR、Cdk5、p35のmRNAの発現は、PDR群において対照群よりも有意に高かった。リン酸化ERKのmRNAの発現は、対照群よりも高かったが、有意差はなかった。PDR群の増殖膜での免疫染色では、PPAR、Cdk5、p35の発現の増加が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PPAR、Cdk5とその活性化サブユニットであるp35の眼内濃度は、PDR群において有意に増加していた。さらに、増殖膜におけるPPAR、Cdk5、p35のmRNAの発現は、PDR群において対照群よりも有意に高く、PDR群の増殖膜での免疫染色では、これらの蛋白の発現の増加が見られた。

以上のことから、Cdk5の活性化はPPARの発現を介した血管新生等のPDRの病因に関与している可能性がある。各因子の相関をさらに研究することにより、Cdk5を介したPPARのリン酸化の阻害が、PDRの治療のための新しい治療標的になり得ると考える。

研究成果の概要（英文）：PPAR, Cdk5 and p35 concentrations in the vitreous body were significantly higher in the PDR group compared with the control group. Phosphorylated ERK concentration was also higher in the PDR group compared with the control group, but the difference was not significant. Furthermore, the messenger ribonucleic acid expression levels of PPAR, Cdk5 and p35 in proliferative neovascular membranes were significantly higher in the PDR group compared with the control group. That level of phosphorylated ERK was also higher in the PDR group compared with the control group, but the difference was not significant. Immunostaining showed increased protein expression levels of PPAR, Cdk5 and p35 in proliferative neovascular membranes in the PDR group compared with the control group.

研究分野：眼科

キーワード：外科

### 1. 研究開始当初の背景

我々は腫瘍増殖などに伴う異常な血管新生や脈絡膜血管新生に関与しているペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR : peroxisome proliferator-activated receptor gamma) の過剰発現が糖尿病網膜症の進行にも関与していることを報告した。また、2010年のNature誌にサイクリン依存性キナーゼ5 (Cdk5: cyclin-dependent kinase 5) が PPAR のリン酸化を介して脂肪組織での糖尿病誘発性遺伝子の発現を促進させることが報告され、2015年のNature誌では脂肪組織で特異的にCdk5をKOしたマウスで細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK: extracellular signal-regulated kinase) が PPAR を直接リン酸化する機序とインスリン抵抗性との関係を示し、Cdk5の除去から生じる悪影響の可能性も指摘された。さらにはCdk5がERKを制御することでPPARの機能が調節されること、ERKとその上流のキナーゼであるMEK (MAP kinase/ERK kinase) の薬理的な阻害によるインスリン抵抗性の改善が示された。以上から糖尿病網膜症の進行においてもPPARがCdk5/ERK回路の制御を受ける可能性が予想される。

### 2. 研究の目的

Cdk5、ERKはほぼすべての臓器・組織で発現しており、細胞増殖を含む多機能な役割が知られている。しかし、これまで増殖糖尿病網膜症などの増殖性疾患の眼内でのCdk5とERK活性は不明である。また、我々は硝子体手術時に得られた臨床検体サンプルを用いてPPAR濃度、Cdk5、ERKの眼内での活性を検索するとともに、in vitroおよびin vivoでのCdk5、ERKの血管新生促進効果を確認し、Cdk5/ERK回路によるPPARの調節機構と糖尿病網膜症の関連についての検討と、将来的にCdk5またはERK/MEK阻害剤を投与することで増殖糖尿病網膜症の進行を抑制する治療薬としての可能性を模索する。

### 3. 研究の方法

ヒトの手術検体を用いた検討と、培養系の研究と併行させていくことで、増殖糖尿病網膜症におけるCdk5とERKの眼内活性とPPARとの相互作用を総合的に解明していく。

#### (1) 前房水・硝子体液検体と増殖膜検体の採取、保存

硝子体切除開始時に灌流液を流す前に硝子体カッターにて硝子体液を採取する。白内障手術併用時には白内障手術の前に前房水を採取する。採取した前房水・硝子体液検体はすぐに-80にて保存する。特発性黄斑上膜・増殖糖尿病網膜症に対する硝子体手術にて遊離した増殖膜、網膜前膜を、免疫染色用検体については直ちにOCT compoundに包埋し-80にて保存する。Western blotting用検体についても-80にて保存し、RT-PCR用の検体については直ちにトリゾール0.5ccにひたし4にて保存する。

#### (2) 増殖糖尿病網膜症の前房水・硝子体・増殖膜でのCdk5とERK活性の検討

前房水・硝子体液検体についてはELISAキットを使用してPPARとリン酸化ERK1/2

の濃度を測定し、同時に総蛋白濃度も測定し総蛋白量における数値で補正する。また、前房水・硝子体検体を抗 Cdk5 抗体で免疫沈降したのち、ヒストン H1 と反応させヒストン H1 のリン酸化により Cdk5 活性を検索する。

増殖膜および特発性黄斑上膜の網膜前膜（新生血管を含まないコントロール）のヒト手術検体から RNA を抽出した後 cDNA を合成する。Cdk5 および Cdk5 の制御因子である p35、ERK に特異的なプライマーを用いた定量的 PCR 法により、両群における Cdk5、p35、ERK 遺伝子発現を比較検討する。Cdk5、p35、p20(p35 の分解産物)、ERK タンパク質の発現量についても PPAR $\alpha$  や VEGF など血管新生に関与するサイトカインを含めて Western blotting 法により確認する。一方、両群のヒト手術検体から凍結切片を作成し、蛋白レベルでの発現パターンについて Cdk5、ERK 抗体を用いた免疫染色法により比較する。さらに、血管内皮細胞などの特異抗体との免疫二重染色を行い、増殖糖尿病網膜症の増殖膜における Cdk5、ERK の局在について検討する。

### (3) 培養系を用いた PPAR $\alpha$ 、Cdk5、ERK 発現の変化の検討

糖尿病網膜に類似な培養条件下での初代培養細胞での PPAR $\alpha$ 、Cdk5 の発現について検討する。マウス網膜を用いてグリア（ミュラー）細胞の初代培養を行う。初代培養細胞へ glycated albumin もしくは高濃度の glucose を投与することにより糖尿病網膜内と類似状態下で培養を行う。これらの培養細胞からタンパク質を抽出し PPAR $\alpha$ 、ERK を Western blotting 法により検出し発現量の変化を検討するとともに、抗 Cdk5 抗体で免疫沈降したのち、ヒストン H1 と反応させヒストン H1 のリン酸化により Cdk5 活性の変化を検索する。培養上清からは VEGF などのサイトカインの産生量を ELISA 法によって検出し比較検討する。さらに、培養細胞への Cdk5 阻害剤である Olomoucine 投与群と、MEK 阻害剤である PD0325901 投与群で ERK と PPAR $\alpha$  の発現量変化、VEGF などの分泌の変化についても同様の検討を行う。

### (4) Cdk5、MEK 阻害剤による糖尿病網膜症の抑制に関する検討

Cdk5 阻害剤である Olomoucine または MEK 阻害剤である PD0325901 をマウスの網膜新生血管モデルに投与することによって、網膜症の進行を抑制できるかどうか、病理学的に検討する。また網膜電位図や光干渉断層計を用いてマウスを生体下で検査することにより、視機能や網膜構造の変化についても検討する。また、高脂肪食で飼育したマウスで Olomoucine 投与群と PD0325901 投与群を作製し、網膜からフローサイトメトリー法により内皮細胞を精製し、マイクロアレイ法によって発現遺伝子を網羅的に解析し、monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)等の炎症性に関与する一連の遺伝子群の発現の上昇について検索する。

## 4. 研究成果

増殖糖尿病網膜症(PDR)患者 24 例(1 型糖尿病患者 3 例、2 型糖尿病患者 21 例)24 眼から硝子体手術中に眼内灌流液で希釈されていない硝子体液を採取した。女性 14 人、男性 10 人で、平均年齢は 57.8 歳 $\pm$ 15.0 歳であった。糖尿病の持続期間は、PDR 患者の平均 11.3 $\pm$ 8.4 年であった。対照群は、特発性黄斑上膜(ERM)および特発性黄斑円孔(MH)で硝子体手術を受けた 63 人 63 眼とした。対照群は女性 36 人、男性 27 人であり、平均年齢は 68.1 歳 $\pm$ 7.5

歳だった。PDR 群と対照群の平均年齢には有意差があった。また、PDR 患者 7 例の増殖膜、対照群である ERM 患者 5 例から ERM を採取し、硝子体液および増殖膜検体は直ちに凍結させ解析するまで - 80 で冷凍保存した。PDR 患者の増殖膜および特発性 ERM 患者の ERM における PPAR $\gamma$ 、Cdk5 および p35 の mRNA の発現レベルを定量的 PCR 分析で調べた。PPAR $\gamma$  の mRNA の発現レベルは、対照群の患者(0.0033 $\pm$ 0.053、p=0.018)よりも PDR 患者(0.79 $\pm$ 1.25)で有意に高かった。同様に、Cdk5 の mRNA の発現レベルは、対照群の患者(0.45 $\pm$ 0.29、p=0.028)よりも PDR 群(13.55 $\pm$ 14.17)で有意に高かった。p35 の mRNA の発現レベルは、対照群の患者(0.0051 $\pm$ 0.0032、p=0.042)よりも PDR 患者(0.077 $\pm$ 0.070)で有意に高かった。また、有意差はなかったが、リン酸化 ERK の mRNA の発現レベルも対照群の患者よりも、PDR 群で高かった。

増殖膜と ERM における免疫蛍光分析を行った。PDR 患者の増殖膜において、PPAR $\gamma$ 、Cdk5、および p35 は、対照群と比較して強い免疫染色が観察された。定量分析の結果、PPAR $\gamma$  の蛍光強度は、対照群よりも PDR 患者で有意に高かった。同様に、Cdk5、p35 の蛍光強度も対照群よりも PDR 患者で有意に高かった。また、抗 vWF 抗体で二重標識されたことから、これらの発現が主として PDR の増殖膜の血管内皮細胞にあることが示唆された。

PDR 患者群と対照群で回収した硝子体液の解析を進めた。硝子液中の PPAR $\gamma$ 、Cdk5、p35、リン酸化 ERK 濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit を用いて測定し、さらに硝子液中の総蛋白質濃度も測定した。PDR を有する患者の硝子液中の PPAR $\gamma$ 、Cdk5、p35、リン酸化 ERK 濃度の上昇は、眼局所で PPAR $\gamma$ 、Cdk5、p35、リン酸化 ERK が産生されただけでなく、糖尿病網膜症に伴う血液網膜関門の破壊により血漿中の成分が漏出して上昇した可能性がある。この漏出による影響を最小限にするため PPAR $\gamma$ 、Cdk5、p35、リン酸化 ERK の各濃度は総蛋白質濃度で除した値として評価した。PDR 患者群の蛋白質濃度は、対照群に比べて有意に高く、同様に PPAR $\gamma$  濃度、Cdk5 濃度、p35 濃度も対照群に比べて有意に高かった。リン酸化 ERK 濃度も、対照群に比べて高かったが、有意差はなかった。

本研究にはいくつかの制限があった。最初に、対象が比較的少数のサンプルのため、PDR 患者を病期や治療歴に応じて詳細に解析することができなかった。第 2 に、手術で得られた硝子体サンプルのタンパク質量が非常に少ないため、1 つの硝子体サンプルで多数の分析を実行することができなかった。そのために、Cdk5、ERK と、VEGF との関係の検討ができなかった。第 3 に、硝子体手術時に検体を採取しているため、研究デザインは横断的であり、経時変化や治療前後での比較ができていない。最後に今回の研究結果は Cdk5 や ERK が PDR の病因に關与する直接的な証拠を示すデータではない。この研究では、PDR 患者の眼内における Cdk5 のタンパク質レベルの発現亢進のみを検出しただけであることから、メカニズムを明らかにするためには、さらなる研究が必要である。

結論として、増殖膜と硝子体中での Cdk5、PPAR $\gamma$ 、p35 の活性は PDR 患者において対照患者より有意に高かった。Cdk5 は PPAR $\gamma$  を介して血管新生などの PDR の病態に關与している可能性がある。

本研究では硝子体・増殖膜検体でのタンパク質量が少なく、各因子と増殖糖尿病網膜症と

の関連について解析が進まなかった。また、硝子体・増殖膜検体での ERK の発現についても、検体数を増やして再度の解析をする必要がある。今後の課題として、下記(1)での ERK の有意な活性を認めれば、(2)(3)での研究を進めていく方針である。

(1) 増殖膜での ERK 遺伝子発現の比較検討、硝子体中の ERK タンパク質の発現量についても PPAR $\gamma$  や VEGF など血管新生に関与するサイトカインを含めて Western blotting 法により確認する。また、増殖膜の凍結切片を作成し、蛋白レベルでの発現パターンについて ERK 抗体を用いた免疫染色法により比較する。

(2) 培養系を用いた PPAR $\gamma$ 、Cdk5、ERK 発現の変化の検討として、糖尿病網膜に類似な培養条件下での初代培養細胞での PPAR $\gamma$ 、Cdk5 の発現について検討する。マウス網膜を用いてグリア(ミュラー)細胞の初代培養を行う。初代培養細胞へ glycated albumin もしくは高濃度の glucose を投与することにより糖尿病網膜内と類似状態 下で培養を行う。これらの培養細胞からタンパク質を抽出し PPAR $\gamma$ 、ERK を Western blotting 法により検出し発現量の変化を検討するとともに、抗 Cdk5 抗体で免疫沈降したのち、ヒストン H1 と反応させヒストン H1 のリン酸化により Cdk5 活性の変化を検索する。培養上清からは VEGF などのサイトカインの産生量を ELISA 法によって検出し比較検討する。さらに、培養細胞への Cdk5 阻害剤である Olomoucine 投与群と、MEK 阻害剤である PD0325901 投与群で ERK と PPAR $\gamma$  の発現量変化、VEGF などの分泌の変化についても同様の検討を行う。

(3) Cdk5、MEK 阻害剤による糖尿病網膜症の抑制に関する検討として Cdk5 阻害剤である Olomoucine または MEK 阻害剤である PD0325901 をマウスの網膜新生血管モデルに投与することによって、網膜症の進行を抑制できるかどうか、病理学的に検討する。また網膜電位図や光干渉断層計を用いてマウスを生体下で検査することにより、視機能や網膜構造の変化についても検討する。また、高脂肪食で飼育したマウスで Olomoucine 投与群と PD0325901 投与群を作製し、網膜からフローサイトメトリー法により内皮細胞を精製し、マイクロアレイ法によって発現遺伝子を網羅的に解析し、monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)等の炎症性に関与する一連の遺伝子群の発現の上昇について検索する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sano Hiroki, Namekata Kazuhiko, Niki Masanori, Semba Kentaro, Muraio Fumiko, Harada Takayuki, Mitamura Yoshinori	4. 巻 13
2. 論文標題 Ocular expression of cyclin dependent kinase 5 in patients with proliferative diabetic retinopathy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 628 ~ 637
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdi.13702	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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