

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 20 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21592234

研究課題名（和文）：血管安定化因子制御による糖尿病黄斑症の治療法開発

研究課題名（英文）：Regulation of angiostatic factors for diabetic macular edema

研究代表者

鈴間 潔（SUZUMA KIYOSHI）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：80335265

研究成果の概要（和文）：

増殖糖尿病網膜症において硝子体中のコハク酸濃度が有意に上昇していることを発見した。また抗 VEGF 治療を行った患者ではコハク酸濃度が有意に低下していることもわかった。コハク酸が VEGF を誘導することはすでに報告されていることから VEGF によるコハク酸へのポジティブフィードバック機構の存在が示唆された。このことは世界で初めての発見である。

研究成果の概要（英文）：

In proliferative diabetic retinopathy, levels of succinate increased significantly. However, in proliferative diabetic retinopathy after anti-VEGF therapy, levels of succinate decreased significantly. Since it has been previously reported that succinate induces VEGF expression, a positive feedback mechanism from VEGF to succinate was suggested. These data were novel findings.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：糖尿病網膜症、VEGF、エリスロポエチン、コハク酸

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症は成人の失明原因として主要な割合を占めており、その病態解明・治療法の確立が非常に重要な問題となっている。糖尿病網膜では毛細血管の障害・脱落により網膜無灌流領域が形成されることにより血管内皮増殖因子(VEGF)やエリスロポエチンといった様々な増殖因子が産生・放出され、血管透過性亢進による網膜浮腫（視力低下）や血管新生（緑内障、硝子体出血）により失明に至ると考えられている。網膜無灌流領域の

治療は網膜光凝固術が現在主流であるが虚血周辺網膜を焼き尽くすこの治療法は破壊的で侵襲も大きい。網膜血管脱落を最小限にとどめ、形成された無灌流領域には速やかに正常血管の再構築を行うことが理想的な治療法と言える。

これまでの重要な研究成果としては下記の二つがある。

(1)増殖糖尿病網膜症における眼内エリスロポエチンの役割の解明
糖尿病網膜症が進行し網膜無灌流領域が形

成されると虚血に陥った網膜神経細胞やグリア細胞から VEGF が産生・放出され増殖網膜症にいたると考えられていた。我々は硝子体手術時に採取したサンプル中の VEGF, エリスロポエチン濃度を解析した。すると驚くべきことにエリスロポエチンは VEGF と独立した VEGF よりも数倍増殖糖尿病網膜症と関連の深い因子であることが明らかとなった (Watanabe D, N Engl J Med:2005;353:782)。実験的網膜新生血管ではエリスロポエチンを阻害すると VEGF 阻害と同等の抑制効果が得られ、VEGF とエリスロポエチンの両方を阻害するとさらに強い阻害効果が得られた。VEGF は血管増殖と血管透過性亢進の作用を有し、エリスロポエチンは血管透過性亢進作用をもたないことから増殖網膜症にはエリスロポエチンと VEGF の両者が、糖尿病黄斑症には VEGF が主に関与しているということが示唆される。本研究においても透過性の低い安定した正常血管を再生するためにエリスロポエチンを利用できる可能性がある。

(2) 網膜組織培養下における網膜血管新生のリアルタイム観察

網膜血管新生をより深く理解するためにゼブラフィッシュなどで行われている共焦点レーザー顕微鏡を用いたリアルタイム観察システムを開発した (Murakami T, Invest Ophthalmol Vis Sci 2006;47:5529)。その結果興味深いことに既存血管からの新生血管萌芽 (sprouting) は一つの細胞の血管外への進展から生じること、新生血管の先端は一つの細胞がいろいろな方向への伸縮を繰り返して進んでいくことが観察できた。網膜無灌流領域のある増殖糖尿病網膜症においては新生血管が網膜内へは伸びず硝子体中へ進入してくることがその後の硝子体出血や増殖組織の形成の原因である。先端の一つの細胞 (single cell) の進行方向を制御し網膜内への血管再生を誘導するために非常に有用な実験系を得た。

2. 研究の目的

現在、眼科領域でも抗 VEGF 療法は一般的に行われるようになり劇的な効果が認められることもあるが、慢性の血管透過性亢進など効果がない病態や疾患もあることがわかってきた。そこで本研究では VEGF を阻害するだけではなく、エリスロポエチン、Ang1-Tie2, ephrin-Eph システムなどの増殖因子とその下流の Akt などの血管安定化シグナルを積極的に利用することにより、すでに障害された病的血管には正常のバリア機能を再生させることを目標とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞レベルでの検討 網膜血管を形成

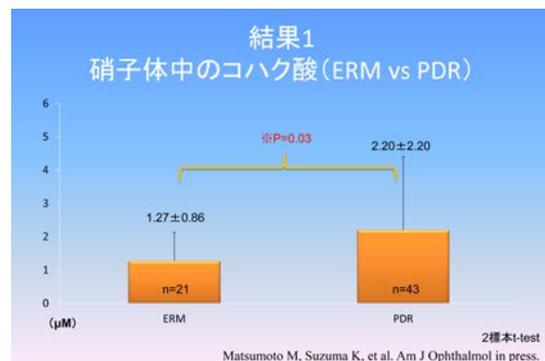
する内皮・周皮細胞、網膜血管周囲を形成するグリア・神経細胞による in vitro の系において高血糖・酸化ストレスを負荷することにより Akt などの細胞生存シグナルと酸化ストレス、JNK などの細胞死シグナル、血管に作用するエリスロポエチン、VEGF, PDGF, IGF などの増殖因子、Fas などの細胞死誘導因子、Ang1, ephrin などの血管安定化因子等について発現を検討し、その結果に基づき阻害実験を行い細胞増殖、生存、透過性がどのように修飾されるかを検討する。

(2) 網膜組織培養下での検討 網膜を組織培養し、高血糖、酸化ストレス、機械的伸張を負荷、上記1の結果を再確認する。次に高酸素負荷による網膜無血管領域を作成し、組織培養下で血管の再生を誘導する。血管再生局所にエリスロポエチン、Ang1, ephrin を過剰発現させて成熟した安定な血管網が形成されるかどうか確認する。さらに細胞死シグナルの活性化を抑制、細胞生存シグナルの活性化を促進するべく dominant-negative, RNAi, 特異的器質配列を持つペプチドの micro-injection などの手技を用いて操作し single cell レベルの動態まで解析する。同時に再生された血管を維持できるメカニズムについても検討する。

(3) 動物レベルでの検討 遺伝子改変マウスで上記2の結果を in vivo で確認する。培養血管内皮細胞、周皮細胞、末梢血管内皮前駆細胞、骨髄幹細胞、分化誘導をかけた ES 細胞や iPS 細胞に虚血領域で転写活性が上がるプロモータを組み込んだエリスロポエチン、Ang1, ephrin, 種々のシグナル分子の dominant-negative の発現ベクターなどを遺伝子導入後、網膜無血管領域へ移植することにより虚血網膜・病的血管のみを選択的に治療可能か検討する。

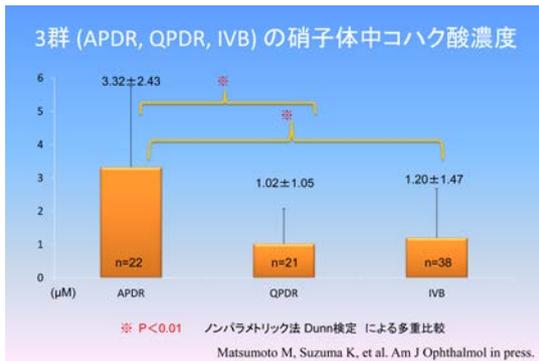
4. 研究成果

糖尿病黄斑症に関係する血管安定化因子を検索するため手術の時に採取した網膜症の硝子体中のサイトカイン濃度を検討したところ驚くべきことに増殖糖尿病網膜症において硝子体中のコハク酸濃度が有意に上昇していることを発見した。また抗 VEGF

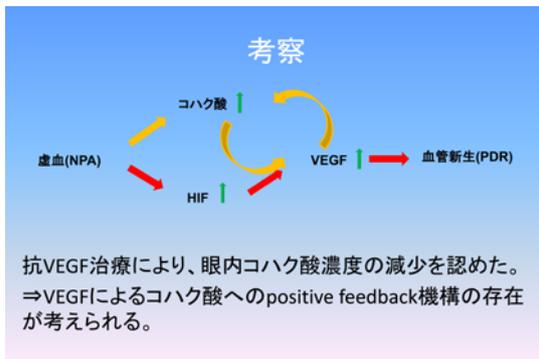


治療を行った患者ではコハク酸濃度が有意

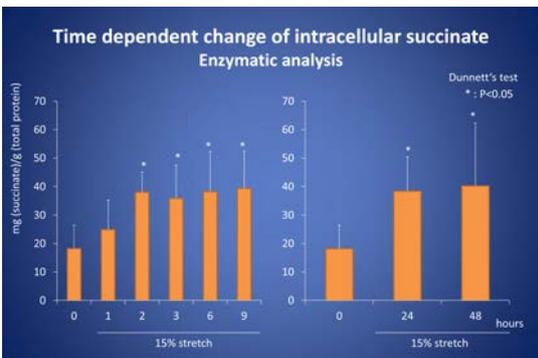
に低下していることもわかった。コハク酸が VEGF を誘導することはすでに報告されてい



ることから VEGF によるコハク酸へのポジティブフィードバック機構の存在が示唆され



た。このことは世界で初めての発見であり、日本眼科学会、日本糖尿病学会、米国での association for research of vision and ophthalmology (ARVO) 学会に演題は採用され発表した。また American Journal of Ophthalmology に論文が採択された (現在印刷中)。コハク酸は網膜血管の発生段階において必要不可欠な因子であることが報告されており正常な血管の再構築に役立つ因子である可能性がある。コハク酸濃度と血管内皮増殖因子 (VEGF) やエリスロポエチンの濃度は有意な相関を示さなかったことからコハク酸は眼内で独立した血管作用因子であることが推察される。コハク酸を利用した糖尿病黄斑症の治療法開発につなげたいと考えている。また高血圧を模倣した機械的伸展刺激により網膜色素上皮細胞において細胞内コハク酸濃度の上昇が認められた。



コハク酸の regulation の分子メカニズムの解明につながると考えている。

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 1 件)

鈴間 潔 : 【黄斑浮腫の治療戦略】糖尿病黄斑浮腫への抗VEGF療法. 眼科, 53: 867-872, 2011

〔学会発表〕 (計 9 件)

松本牧子、鈴間 潔他: 増殖糖尿病網膜症におけるコハク酸の役割. 日本眼科学会, 2010. 4. 16, 名古屋市

松本牧子、鈴間 潔他: 増殖糖尿病網膜症におけるコハク酸の役割. 日本糖尿病学会, 2010. 5. 28, 名古屋市

M Matsumoto, K Suzuma, et al.: Succinate as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2010. 5. 6, Fort Lauderdale 米国

松本牧子、鈴間 潔他: 増殖糖尿病網膜症におけるVEGFによるコハク酸へのポジティブフィードバック機構. 第 15 回眼科分子生物研究会, 2011 1/22-1/23, 宮崎市

松本牧子、鈴間 潔他: The Positive Feed Back Mechanism to Succinate by VEGF in Proliferative Diabetic Retinopathy. ARVO, 2011 5/1-5/5, フォートローダーデール (アメリカ)

木下博文、鈴間 潔他: Cyclic Stretch Increased Intracellular Succinate Concentration In Cultured Retinal Pigment Epithelial Cells Through A Calcium Dependent Pathway. 2011 5/1-5/5, フォートローダーデール (アメリカ)

松本牧子、鈴間 潔他: 増殖糖尿病網膜症におけるVEGFによるコハク酸へのポジティブフィードバック機構 第 115 回日本眼科学会総会, 2011 5/12-5/15, 東京都

松本牧子、鈴間 潔他: 増殖糖尿病網膜症におけるVEGFによるコハク酸へのポジティブフィードバック機構 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2011 5/19-5/21, 東京都

鈴間 潔：網膜硝子体疾患の分子病態と炎症の
メカニズム 第31回日本眼薬理学会,
2011 9/17-9/18, 松江市

(3)連携研究者
なし

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴間 潔 (SUZUMA KIYOSHI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究
科・准教授
研究者番号：80335265

(2) 研究分担者

北岡 隆 (KITAOKA TAKASHI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究
科・教授
研究者番号：80234235

藤川 亜月茶 (FUJIKAWA AZUSA)
長崎大学・病院・講師
研究者番号：60363503

築城 英子 (TUIKI EIKO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究
科・助教
研究者番号：30363493

松本 牧子 (MATSUMOTO MAKIKO)
長崎大学・病院・助教
研究者番号：70437903