

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09668

研究課題名（和文）糖尿病網膜症病態におけるミュラー細胞の B-クリスタリンの発現

研究課題名（英文）AlphaB-crystallin in retinal Muller cells

研究代表者

加瀬 諭（Kase, Satoru）

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：60374394

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：ヒートショックプロテインの一種である B-クリスタリンは、分子シャペロン効果を含む多面的な機能を有しているが、その一つとして炎症病態におけるアポトーシス抑制作用が知られている。網膜ミュラー細胞において B-クリスタリンがアポトーシス抵抗性に関与するか検討を行なった。炎症性サイトカインである IL-1 により、ミュラー細胞での B-クリスタリンの新規合成が減少する一方、セリン59残基のリン酸化に伴う細胞外分泌の抑制によって細胞内濃度が維持されていた。これら機序に伴うアポトーシス抑制作用を介して、糖尿病網膜症病態での線維血管膜形成における B-クリスタリンの関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では糖尿病網膜症病態で、IL-1betaによる B-クリスタリンリン酸化が網膜ミュラー細胞のアポトーシスを回避することに貢献し、失明に繋がる線維血管増殖膜の形成に関与することを明らかにした。今後、IL-1betaが上昇する網膜症の病期において、B-クリスタリンの発現を抑制することが、増殖膜形成の抑制が治療標的になる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：AlphaB-crystallin, a small heat shock protein, plays a pleiotropic role as a molecular chaperone, one of which is escape from apoptotic stimuli. In this study, we examined alphaB-crystallin as an escape from apoptosis in retinal Muller cells. In fact, IL-1beta, one of inflammatory cytokines that is known to be upregulated in diabetic conditions, reduced alphaB-crystallin protein synthesis, while phosphorylation of alphaB-crystallin at Ser59 led to retention of the protein export, and maintained intracellular protein concentrations. These mechanisms might underlie escape from apoptosis of retinal Muller cells, which contributed to formation of fibrovascular membrane in diabetic retinopathy.

研究分野：網膜

キーワード：アルファB-クリスタリン 網膜 ミュラー細胞 アポトーシス

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症は眼部の高血糖負荷に伴う血管障害に起因し、結果的に線維血管性増殖組織が形成され、成人の重大な視力障害の一因となる。病理組織学的には、血管内皮細胞とミュラー細胞は増殖組織の重要な構成細胞である(加瀬 論, 日眼会誌 2011)。血管内皮増殖因子-A (VEGF-A) の発現亢進が、糖尿病網膜症の病態に関与していることが明らかとなったが、VEGF-A 蛋白の翻訳後修飾機構は不詳である。 $\alpha$ -クリスタリンは水晶体構成蛋白の一つであり、 $\alpha$ A と  $\alpha$ B のサブユニットよりなる。 $\alpha$ B-クリスタリンは細胞増殖、細胞骨格、細胞生存に関与し、分子シャペロンとして標的タンパクの保護にも貢献する。我々は過去に  $\alpha$ B-クリスタリンが VEGF-A 蛋白に結合する分子シャペロンであることを同定した(Kase S, et al. Blood 2010)。 $\alpha$ B-クリスタリンの発現が低下すると VEGF-A タンパクが分解され、マウス眼内血管新生が抑制されることを確認した。 $\alpha$ B-クリスタリンは眼内血管新生の進展に寄与するだけでなく、線維化にも重要な役割を果たす(Ishikawa K, et al. Am J Pathol 2016)。研究代表者はさらに、 $\alpha$ B-クリスタリンは PDR の増殖組織の新生血管にも発現しており、VEGF-A と共発現していることを確認した(Dong Z, Kase S, et al. Retina 2012)。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病網膜症の病態に関してミュラー細胞における  $\alpha$ B-クリスタリンの役割を明らかにすることである。これを示すために、高血糖状態や糖尿病網膜症で上昇する炎症性サイトカインを培養網膜ミュラー細胞へ添加し、 $\alpha$ B-クリスタリンの発現、リン酸化を in vitro、in vivo の系を用いて検討する。加えて、 $\alpha$ B-クリスタリンの遺伝子発現を抑制し、糖尿病網膜症病態におけるミュラー細胞のアポトーシスの誘導について in vitro で検討する。

### 3. 研究の方法

(1) 臨床検体：IRB での承認後、硝子体手術で得られた増殖糖尿病網膜症 (PDR) 患者の線維血管増殖膜をホルマリン固定、パラフィン包埋し未染色切片を作製し、免疫組織化学的検討を行った。

(2) 細胞培養：培養ヒト網膜ミュラー細胞(MIO-M1)は UCL Business LTD より Material Transfer Agreement を締結の上、購入した。これを用いて RT-PCR, Western blot, 免疫細胞化学による検討を行った。

### 4. 研究成果

5mM グルコースを含有した低グルコース培地で網膜ミュラー細胞を培養し、そこに最終濃度が 15mM および 50mM となるように D(+) グルコースを添加の上で 24 時間培養し RT-qPCR を行なった。なお浸透圧による影響を考慮し、解糖系で利用されない糖類である D(-) マンニトールを最終濃度が 45mM となるよう添加して、添加した糖類による浸透圧が 50mM グルコース群と同様になるような群を作成した。グルコース添加群ではマンニトール添加群に比して有意に  $\alpha$ B-クリスタリン mRNA の発現が少ないものの差はわずかであり、加えてグルコース添加群間では差が見られなかった。網膜ミュラー細胞を記載の濃度となるようにグルコースおよびマンニトール添加して 24 時間培養し、ELISA を行なったところ、細胞溶解液では全群間で有意差を認めず同程

度の濃度であり、培養上清では有意差を認めないものの 50mM グルコース添加群において  $\alpha$ B-クリスタリタンパクが減少する傾向が見られた。グルコース添加では mRNA、タンパクとも十分な変化が見られなかったため、PDR 病態における  $\alpha$ B-クリスタリンの変化をより選択的に検証できる条件として、既報から PDR において眼内での上昇が示されている炎症性サイトカインに着目した。PDR の硝子体において増加している代表的な炎症性サイトカインとして、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  を添加して 24 時間培養し RT-qPCR を行なったところ、IL-1 $\beta$  10ng/ml および高濃度の TNF- $\alpha$  (100ng/ml) にて  $\alpha$ B-クリスタリン mRNA の発現減少が示された。

本研究では IL-1 $\beta$  添加での  $\alpha$ B-クリスタリン発現について詳細を調べることにした。

網膜ミュラー細胞に IL-1 $\beta$  10ng/ml を添加し、様々な時間で培養して  $\alpha$ B-クリスタリン mRNA 発現を RT-qPCR にて測定したところ、IL-1 $\beta$  による  $\alpha$ B-クリスタリン mRNA 発現減少が時間依存的に生じることが明らかとなった。同様に、IL-1 $\beta$  添加による  $\alpha$ B-クリスタリタンパクの発現変化を細胞溶解液および培養上清にて計測した。網膜ミュラー細胞に IL-1 $\beta$  10ng/ml を添加し、様々な時間で培養して  $\alpha$ B-クリスタリタンパク量を ELISA で測定したところ、細胞溶解液では全群間で有意差を認めず同程度の濃度である一方、培養上清では IL-1 $\beta$  添加にて有意な濃度減少を認めた。

次に  $\alpha$ B-クリスタリンのリン酸化の検討を行った。上述の実験系で用いた炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  を添加して 24 時間培養しウエスタンブロットを行なったところ、IL-1 $\beta$  添加のみにて  $\alpha$ B-クリスタリンのセリン 59 残基のリン酸化亢進が示された。網膜ミュラー細胞に IL-1 $\beta$  を様々な濃度で添加し、24 時間培養の後にウエスタンブロットを行なったところ、IL-1 $\beta$  による  $\alpha$ B-クリスタリンのセリン 59 残基のリン酸化が濃度依存的に生じることが明らかとなった。次に、IL-1 受容体 (IL-1 receptor; IL-1R) の特異的な中和抗体を用いて、これらの作用が IL-1R を介していることを確認した。網膜ミュラー細胞に IL-1R の中和抗体を添加した後、IL-1 $\beta$  10ng/ml を添加して 24 時間培養の後にウエスタンブロットを行ない、IL-1 $\beta$  による  $\alpha$ B-クリスタリンのセリン 59 残基のリン酸化が IL-1R を介していることを示した。最後に、IL-1 $\beta$  添加下におけるセリン 59 残基リン酸化  $\alpha$ B-クリスタリンが、 $\alpha$ B-クリスタリンのノックダウンによって同様に減少することをウエスタンブロットで確認した。

網膜ミュラー細胞において *CRYAB* siRNA を導入した後、翌日に 1%FBS 含有培地へと交換の上で 48 時間後に IL-1 $\beta$  10ng/ml を添加し、さらに 24 時間培養の後にカスパーゼ 3/7 活性を測定したところ、ノックダウン作用を持たない siRNA においてはコントロール群に比してカスパーゼ 3/7 活性が低下しており、 $\alpha$ B-クリスタリンノックダウン群ではそのカスパーゼ 3/7 活性低下が減弱されていた。続いて、 $\alpha$ B-クリスタリンによるアポトーシス抑制作用について TUNEL 染色を行い検討した。4 ウェルチャンバースライドにて網膜ミュラー細胞を培養し、*CRYAB* siRNA を導入した後、翌日に 1%FBS 含有培地へと交換の上で 48 時間後に IL-1 $\beta$  10ng/ml を添加し、さらに 24 時間培養の後に TUNEL 染色を行った。なお、陽性細胞率は各ウェルにおいて独立した 2 箇所計測し、それを平均したものをを用いた。コントロール群およびノックダウン作用を持たない siRNA 群に比して、 $\alpha$ B-クリスタリンノックダウン群では TUNEL 陽性細胞率の増加が認められた。PDR 患者の線維血管膜組織検体切片を用いて、ヒト生体由来の PDR 組織検体において網膜ミュラー細胞に  $\alpha$ B-クリスタリンが局在しているかを、蛍光免疫組織化学染色による二重染色で調べた。

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) は中間径フィラメントタンパク質の 1 つであり、グリア細胞マーカーとして用いられるが、PDR を含む病的状態での網膜ミュラー細胞で発現していることが知られている (Eastlake et al., 2018)。PDR 患者由来の線維血管膜組織において、

網膜ミュラー細胞のマーカーの一つである GFAP と  $\alpha$ B-クリスタリンおよびセリン 59 残基リン酸化  $\alpha$ B-クリスタリンが共局在していることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7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 Mizuho Mitamura, Hiroaki Endo, Satoru Kase, Zhenyu Dong, Mitsuo Takahashi, Satoshi Katsuta, Manabu Kase, Susumu Ishida	4. 巻 261
2. 論文標題 Peripapillary circulatory dysfunction precedes structural loss in treatment-naive diabetic retinopathy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol	6. 最初と最後の頁 85-95
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00417-022-05773-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Satoru Kase, Kenichi Namba, Daiju Iwata, Kazuomi Mizuuchi, Kayo Suzuki, Takako Ito, Keitaro Hase, Nobuyoshi Kitaichi, Susumu Ishida	4. 巻 3
2. 論文標題 Diagnostic Accuracy of Cell Block Preparations and Clinical Features Affecting It in Vitreoretinal Lymphoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Clin Med	6. 最初と最後の頁 1391
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm11051391	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 Taku Yamamoto, Satoru Kase, Miyuki Murata, Susumu Ishida	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 Biomed Rep	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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyuki Murata, Kousuke Noda, Satoru Kase, Keitaro Hase, Di Wu, Ryo Ando, Susumu Ishida	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 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 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 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto T, Kase S, Shinkai A, Murata M, Kikuchi K, Wu D, Kageyama Y, Shinohara M, Sasase T, Ishida S.	4. 巻 64
2. 論文標題 Phosphorylation of B-Crystallin Involves Interleukin-1beta-Mediated Intracellular Retention in Retinal Muller Cells: A New Mechanism Underlying Fibrovascular Membrane Formation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci	6. 最初と最後の頁 20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.64.10.20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka T, Kase S, Saito M, Hirose I, Murata M, Takakuwa E, Ishida S	4. 巻 29
2. 論文標題 Clinicopathological findings in refractory diabetic macular edema: A case report	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomed Rep	6. 最初と最後の頁 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/br.2023.1701	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suimon Y, Kase S, Mitsuhashi T, Ishida S.	4. 巻 2
2. 論文標題 Undifferentiated pleomorphic sarcoma of the conjunctiva: a case report and review of the literature.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Diagnosis & Prognosis	6. 最初と最後の頁 232-239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/cdp.10099	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wu D, Kase S, Liu Y, Kanda A, Murata M, Ishida S	4. 巻 36
2. 論文標題 Downregulation of AlphaB-crystallin in Retinal Pigment Epithelial Cells Exposed to Diabetes-related Stimuli in Vivo and in Vitro.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 132-139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.12684.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 加瀬 諭
2. 発表標題 糖尿病網膜症病態における脈絡膜の関与：病理と臨床
3. 学会等名 第127回日本眼科学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Taku Yamamoto, Satoru Kase, Kasumi Kikuchi, Susumu Ishida
2. 発表標題 Role of phosphorylated B-crystallin in Muller cells under diabetic inflammatory conditions
3. 学会等名 2nd Fujiretina（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加瀬 諭、石田 晋
2. 発表標題 COVID-19関連慢性両側性涙腺炎：臨床病理学的検討
3. 学会等名 第126回日本眼科学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 加瀬 諭	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 6
3. 書名 今日の眼疾患治療指針	

〔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	神田 敦宏  (Kanda Atsuhiko)  (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