

令和 6 年 4 月 15 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09676

研究課題名（和文）糖尿病網膜症に網膜内血管再生を誘導することによる根本的治療法開発

研究課題名（英文）Re-vascularization in diabetic retinal ischemia

研究代表者

鈴間 潔（Suzuma, Kiyoshi）

香川大学・医学部・教授

研究者番号：80335265

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：M10-M1細胞とARPE19細胞を培養し、hypoxiaとstretchの刺激を付加し、VEGF, Angiopoietin1,2, PDGF, Erythropoietin, CTGFなどの増殖疾患に関係する遺伝子発現を検討した。その結果 stretchによりAngiopoietin1の発現が減少し細胞内酸化ストレスがその経路であることを発見した。その結果は学会で報告した。

【国内学会 - 一般講演】秋光純一郎、合田衣里奈、石本彩、鈴間潔、ヒトミュラー細胞における低酸素刺激と機械的伸展刺激によるAngiopoietin-1発現の検討 第127回日本眼科学会総会、2023年4月6日 - 9日、東京都

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、Angiopoietin2に対する抗体治療が実用化されているが、その治療が有効である病態は詳細にはわかっていない。今回細胞内酸化ストレスと細胞伸展刺激がAngiopoietin1の減少をもたらしたことから、黄斑牽引症候群などが合併する症例で抗体治療がより有効である可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：【Objective】Angiopoietin-1 (Ang-1) is expressed by cells in the perivascular wall and some mesenchymal cells, and regulates vascular structural stability and angiogenesis via Tie2 receptors. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in cell apoptosis induced by mechanical stretch stimuli. In this study, we measured and evaluated the expression of Ang-1 in a human Muller cell line in response to a mechanical stretch stimulus, and discussed its relationship to ROS. 【Results】The expression of Ang-1 decreased with prolonged mechanical stretch stimulation at 10%/60 cpm, the physiological stretch frequency, for 1, 3, and 6 h, respectively. This decrease in Ang-1 expression was reversed by DPI, an NADPH oxidase inhibitor, and NAC, an ROS scavenger 【Conclusion】The stretch stimulus-dependent decrease in Ang-1 expression in Muller cells may be due to increased intracellular oxidative stress caused by activation of intracellular NADPH oxidase.

研究分野：眼科学

キーワード：VEGF Angiopoietin 酸化ストレス

### 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。これまで研究代表者は VEGF 自体やその調節機構の制御に関して数々の研究成果をあげてきた(Suzuma K, Proc Natl Acad Sci U S A 2002:99:721, Suzuma K, J Biol Chem 2000:275:40725)。また高血圧と酸化ストレスによる網膜血管脱落のメカニズム(Suzuma I, Hypertension 2007:49:347)や血管成熟に関与する増殖因子であるアンギオポエチン-1(Ang1)と動静脈分化に関与する ephrin-Eph ファミリーの網膜血管安定化作用(Murakami T, J Biol Chem 2005:280:31841, Ojima T, Am J Pathol 2006:168:331)についてもデータを蓄積している。またエリスロポエチンが増殖糖尿病網膜症の眼内で VEGF と同等かそれ以上に病態の形成に深くかかわっていることも見出した(Watanabe D, N Engl J Med:2005:353:782)。最近、Sapieha らは網膜血管新生において独立して働く因子としてコハク酸の役割を報告した(Sapieha P, Nat Med 2008)。研究代表者は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時に採取した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(Matsumoto M, Am J Ophthalmol 2012)。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強い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。また高血圧は糖尿病網膜症の増悪因子あることが広く知られているが、高血圧を模倣した細胞伸展刺激で細胞内コハク酸濃度の上昇が認められることも発見した(Kinoshita H, Invest Ophthalmol Vis Sic 2014)。近年は眼科領域でも抗 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弱い病態や疾患もあることがわかってきた。そこで研究代表者は新しい眼内血管新生促進因子であるコハク酸やエリスロポエチン、Ang1-Tie2, ephrin-Eph システムなどの増殖因子と、幹細胞である iPS 細胞、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、VEGF を抑制するだけでなく透過性の亢進した病的毛細血管に正常のタイトジャンクションを再生し、周皮細胞をリクルートすることによる血管強化療法の開発を企画した。

### 2. 研究の目的

糖尿病網膜症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、血管内皮増殖因子(VEGF)などの増殖因子が放出され、血管透過性亢進による黄斑浮腫(視力低下)や血管新生(血管新生緑内障、牽引性網膜剥離)により失明に至ると考えられている。黄斑浮腫の治療は抗 VEGF 療法が現在主流であるが繰り返し投与が必要であるため治療する側、される側、医療費などの面で非常に大きな問題となっている。また VEGF を阻害するだけでは正常血管再生は起こり難いこともわかってきた。そこで最近眼内血管新生因子として発見されたコハク酸やエリスロポエチン、Ang1-Tie2, ephrin-Eph システムなどの増殖因子と、幹細胞である iPS 細胞、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、網膜内血管再生を誘導する。また透過性の亢進した病的毛細血管には正常のタイトジャンクションを再生し、周皮細胞をリクルートすることによる新規治療法の開発を企画した。

### 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、血管に作用するコハク酸、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、機械的伸展を負荷、上記1の結果を再確認する。次に iPS 細胞から再生した無血管な 3D retina や高酸素負荷による無血管網膜を作成し、組織培養下で血管の再生を誘導する。血管再生局所にコハク酸レセプター-GPR91、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-negatives, 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 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 iPS 細胞に虚血領域で転写活性が上がるプロモータ(HIF1 など)を組み込んだコハク酸レセプター-GPR91、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。

本研究を進展させることにより糖尿病網膜症の理想的な治療法開発への発展が期待できる。

#### 4. 研究成果

MIO-M1 細胞と ARPE19 細胞を培養し、hypoxia と stretch の刺激を付加し、VEGF, Angiopoietin1,2, PDGF, Erythropoietin, CTGF などの増殖疾患に関係する遺伝子発現を検討した。その結果 stretch により Angiopoietin1 の発現が減少し細胞内酸化ストレスがその経路であることを発見した。stretch により実際に細胞内で酸化ストレスが亢進することを測定することもできた。またヒトの糖尿病網膜症において血管抵抗が上昇していることも学会で報告した。

##### 【国際学会 - 一般講演】

1. Yuta Koyama, Hirokazu Kojima, Yukiko Miyoshi, Rie Osaka, Yuki Nakano, Ayaka Hara, Kiyoshi Suzuma. Retinal blood flow and vascular resistance in diabetic macular edema. FujiRetina, 2023.3.25-26, Tokyo, Japan
2. Yuta Koyama, Yuki Nakano, Yukiko Miyoshi, Rie Osaka, Ayaka Hara, Kiyoshi Suzuma. Retinal blood flow and vascular resistance in diabetic macular edema. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2023, 2023.4.23-27, New Orleans, USA

##### 【国内学会 - 一般講演】

1. 秋光純一郎、合田衣里奈、石本彩、鈴間潔 . ヒトミュラー細胞における低酸素刺激と機械的伸展刺激による Angiopoietin-1 発現の検討 第 127 回日本眼科学会総会、2023 年 4 月 6 日 - 9 日、東京都
2. 秋光純一郎、合田衣里奈、石本彩、鈴間潔 . ヒトミュラー細胞とヒト網膜色素上皮細胞における低酸素刺激による CTGF 発現の検討 第 29 回日本糖尿病眼学会総会、2023 年 6 月 30 日 - 7 月 1 日、札幌市
3. 秋光純一郎、合田衣里奈、石本彩、鈴間潔 . ヒトミュラー細胞における低酸素刺激及び周期的伸展刺激による PlGF 発現の検討 第 39 回日本眼循環学会、2023 年 7 月 22 日 - 23 日、奈良市
4. 秋光純一郎、合田衣里奈、石本彩、鈴間潔 . ミュラー細胞の伸展刺激による Angiopoietin-1 発現減少メカニズムの検討 第 62 回日本網膜硝子体学会総会、2023 年 11 月 24 日 - 26 日、横浜市

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 秋光純一郎、小山雄太、三好由希子、鈴間潔
2. 発表標題 ヒトミューラー細胞における低酸素刺激と機械的伸展刺激によるVEGFA発現の検討
3. 学会等名 第61回日本網膜硝子体学会総会
4. 発表年 2022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	新田 恵里 (Nitta Eri) (50771523)	香川大学・医学部・助教  (16201)	
研究分担者	逢坂 理恵 (Osaka Rie) (60867315)	香川大学・医学部・助教  (16201)	
研究分担者	中野 裕貴 (Nakano Yuki) (70814854)	香川大学・医学部附属病院・助教  (16201)	
研究分担者	山下 彩奈 (Yamashita Ayana) (20448369)	香川大学・医学部附属病院・講師  (16201)	

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