

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5月30日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890006

研究課題名（和文）糖尿病網膜症の血管新生における alphaB-crystallin の役割

研究課題名（英文）A role of alphaB-crystallin in angiogenesis of diabetic retinopathy

研究代表者

加瀬 諭（KASE SATORU）

北海道大学・北海道大学病院・医員

研究者番号：60374394

研究成果の概要（和文）：ヒト糖尿病網膜症の線維血管増殖組織において、熱ショック蛋白である alphaB-crystallin が CD31 陽性を示す微小血管の内皮細胞に発現していたが、正常網膜血管には発現はなかった。AlphaB-crystallin 陽性を示す糖尿病網膜症の増殖組織の微小血管では、血管新生因子 VEGF との共発現もみられた。

新生血管に対する α クリスタリンの研究は、直接的な VEGF 蛋白質を標的とするのではなく、その蛋白分解を制御している分子を治療標的にすることにより、抗 VEGF 抗体治療の効果の増強、反復投与の軽減効果が期待される。

研究成果の概要（英文）：AlphaB-crystallin, a small heat shock protein, was expressed in CD31-positive microvessels of proliferative membranes in human diabetic retinopathy, whereas alphaB-crystallin was not expressed in normal retinal vessels, alphaB-crystallin expression was colocalized with VEGF immunoreactivity in proliferative membranes of diabetic retinopathy. Researches on alpha-crystallin toward retinal neovascularization leads to discovery of additional treatments with anti-VEGF therapy, whereby the therapeutic target is not direct VEGF protein itself, but a molecule regulating VEGF degradation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2011年度	1,130,000	339,000	1,469,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

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：alpha-crystallin, VEGF, 糖尿病網膜症

1. 研究開始当初の背景

私は過去に、**alphaB-crystallin** が VEGF と結合し、マウス網膜新生血管の発達に重要なメカニズムを構築していることを明らかにした (Kase S, et al. Blood 2010)。しかし、ヒト組織における **alphaB-crystallin** と VEGF の関連は不詳である。

2. 研究の目的

糖尿病網膜症は眼内の虚血を来とし、網膜新生血管の発生、線維血管増殖膜の形成、網膜剥離へ進展し、社会的失明へつながる重大な疾患である。過去の研究では、糖尿病網膜症の硝子体液中には、非糖尿病眼に比較し、有意に血管新生因子 VEGF 濃度が上昇していることが報告された。**alphaB-crystallin** は水晶体構成蛋白として発見され、今日水晶体のみならず感覚網膜、網膜色素上皮細胞にも発見されており、分子シャペロン機能を有する。近年我々は、**alphaB-crystallin** が VEGF 蛋白と結合し、マウス眼内血管新生の発達に重要であることを報告した。

本研究では、ヒト糖尿病網膜症における線維血管増殖組織を使用し、**alphaB-crystallin** と VEGF の発現の相関を調べる。

3. 研究の方法

硝子体手術時に採取された増殖組織、糖尿病を有する網膜組織を含む、脈絡膜悪性黒色腫にて摘出された眼球をホルマリン固定、パラフィン包埋し、未染色標本作製し、免疫組織化学的検討を行った。野生型マウスに、リコンビナント最終糖化産物 (AGE) および BSA を硝子体内注射して、4日後に網膜を摘出し、総蛋白、mRNA を抽出し、Western blot, RT-PCR を行った。

4. 研究成果

眼内血管新生疾患では、近年抗 VEGF 抗体治療が注目されてきたが、臨床的には反復投与が必要であり、そのための合併症の発現が問題視されている。 α -クリスタリンは熱ショック蛋白 (HSP) における αA 、 αB という二つの異なるファミリーより成る。 α -クリスタリンは水晶体構成蛋白として発見され、網膜や網膜色素上皮 (RPE) にも発現されていることが確認された。加えて、 α -クリスタリンは、熱刺激のみならず虚血、低酸素や炎症など、種々のストレスでその発現が誘導され、分子シャペロンとして細胞の増殖制御やアポトーシス、細胞の分化に関与している。

本研究では糖尿病網膜症の発生がみられない段階における糖尿病眼の網膜においては、 αA -クリスタリン、及び最終糖化産物 (AGE) が高発現していることを示した。この結果を踏まえ、リコンビナント AGE 蛋白をマウスの硝子体に注入し、網膜を摘出して αB クリスタリンの発現を調べたところ、 αA -クリスタリンの発現が誘導された。

以上より、糖尿病眼において、 αA -クリスタリンの発現が網膜のアポトーシス制御に重要な役割を果たすことが示唆された。

α -クリスタリンの発現をヒト糖尿病網膜症の増殖組織を用いて解析したところ、網膜新生血管の血管内皮細胞に αB -クリスタリンの発現がみられ、かつ VEGF と共発現していることを二重染色法で確認した。

alphaB-crystallin は線維血管増殖組織を構成する微小血管の内皮細胞に発現していた。加えて、**alphaB-crystallin** を発現している血管内皮細胞は、VEGF も共発現していた。ヒトの網膜新生血管の発達に、**alphaB-crystallin** が VEGF と関連し、重要な役割を果たすことが示唆された。

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 8 件)

- ① Dong Z, Kase S, Ando R, Fukuhara J, Saito W, Kanda A, Murata M, Noda K, Ishida S. AlphaB-crystallin expression in epiretinal membrane of human proliferative diabetic retinopathy. *Retina* 2012 Feb 24. [Epub ahead of print] 査読有
DOI : 10.1097/IAE.0b013e318233ab9c
- ② Kase S, Ishida S, Rao NA. Increased expression of α A-crystallin in human diabetic eye. *Int J Mol Med*. 2011 Oct;28(4):505-511. 査読有
DOI : 10.3892/ijmm.2011.708
- ③ Satoru Kase, Susumu Ishida, Narsing Adupa Rao, Immunolocalization of advanced glycation end products in human diabetic eyes. Vol. 1, No. 3, 57-62, 2011 査読有
DOI : 10.4236/jdm.2011.13009
- ④ Amin EM, Oltean S, Hua J, Gammons MV, Hamdollah-Zadeh M, Welsh GI, Cheung MK, Ni L, Kase S, Rennel ES, Symonds KE, Nowak DG, Royer-Pokora B, Saleem MA, Hagiwara M, Schumacher VA, Harper SJ, Hinton DR, Bates DO, Ladomery MR. WT1 mutants reveal SRPK1 to be a downstream angiogenesis target by altering VEGF splicing. *Cancer Cell*. 2011 Dec 13;20(6):768-80 査読有
DOI : 10.1016/j.ccr.2011.10.016.
- ⑤ Kase S, He S, Sonoda S, Kitamura M, Spee C, Wawrousek E, Ryan SJ, Kannan R, Hinton DR. alphaB-crystallin regulation of angiogenesis by modulation of VEGF. *Blood*. 2010 Apr 22;115(16):3398-406. 査読有

DOI : 10.1182/blood-2009-01-197095

- ⑥ Kase S, Saito W, Ohno S, Ishida S. Cyclo-oxygenase-2 expression in human idiopathic epiretinal membrane. *Retina*. 2010 May;30(5):719-23. 査読有
DOI : 10.1097/IAE.0b013e3181c59698
- ⑦ Kase S, Saito W, Saito A, Ohno S. Uveal effusion syndrome caused by choroidal invasion of malignant lymphoma. *Jpn J Ophthalmol*. 2010 Jan;54(1):109-10. 査読有
DOI : 10.1007/s10384-009-0757-5
- ⑧ 加瀬 諭、坂本泰二、山下英俊、眼内血管新生の治療標的としてのクリスタリン蛋白。あたらしい眼科 2012: 29(3), 361-363 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 董 震宇、加瀬 諭、安藤 亮、福原淳一、レニコフ・アントン、神田敦宏、村田美幸、野田航介、齋藤 航、石田 晋
「増殖糖尿病網膜症の繊維血管膜における alphaB-crystallin の発現」
第 115 回 日本眼科学会、2011 年 5 月 13 日、東京国際フォーラム (東京)
- ② 加瀬 諭、園田 祥三、北村 瑞、Stephen Ryan、David Hinton、石田 晋
「AlphaB-crystallin による実験的脈絡膜新生血管の制御」
第 115 回 日本眼科学会、2011 年 5 月 12 日、東京国際フォーラム (東京)
- ③ Dong Z, Kase S, Ando R, Fukuhara J, Lennikov A, Kanda A, Murata M, Noda K, Saito W, Ishida S
「AlphaB-crystallin in fibrovascular membrane of human proliferative diabetic retinopathy」
Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting 2011、2011 年 5 月 5 日、Broward County Convention Center (Fort Lauderdale)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加瀬 諭 (KASE SATORU)

北海道大学・北海道大学病院・医員

研究者番号：60374394

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし