

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592594

研究課題名(和文) 臨床治験を基盤とする糖尿病網膜症の発生機序の解明

研究課題名(英文) Clinical evidence-based investigation of developmental mechanism in diabetic retinopathy

研究代表者

高木 均 (Takagi, Hitoshi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：70283596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：核内転写因子PPAR α のリガンドであるフェノフィブラートが大規模臨床治験により糖尿病網膜症進行・発症予防効果があることが明らかとなった。この作用機序を明らかにするため、PPAR α を選択的に刺激した血管内皮細胞の遺伝子変化を網羅的に解析した。炎症抑制、血栓抑制の方向に遺伝子調節が起こることが明らかとなり、トロンボモジュリンという遺伝子が仲介していることが見出された。本研究よりトロンボモジュリンを介した網膜症発症の予防や治療応用が有望であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Prospective-randomized clinical trials revealed efficacy of fenofibrate, a PPAR α agonist, in inhibition of diabetic retinopathy development or progression. In this regard, we investigated gene expression and epigenomic profile of PPAR α -stimulated vascular endothelial cells. Stimulation of PPAR α showed anti-inflammatory and anti-thrombotic effects in gene expression profile in vascular cells. Epigenomic analyses revealed thrombomodulin is regulated directly under transcriptional regulation of PPAR α and mediate such gene regulation of inflammatory and pro-thrombotic genes. These findings suggest that thrombomodulin is a key regulator of vascular defense mechanism in diabetic retinopathy and could be applied to future treatment strategies.

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：フェノフィブラート トロンボモジュリン PPAR α 血管内皮

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病網膜症は、現在、成人の失明主要原因であるばかりでなく、網膜症初期より発症する黄斑症などにより多くの患者を視力障害に至らしめ、その影響は社会的・経済的に重要な問題となっている。

(2) 現在まで有効な治療薬は見出されていなかったが、最近 FIELD 試験や ACCORD-EYE 試験によりフェノフィブレートが前例なき顕著な治療効果を有することが明らかにされた。作用機序は不明で、転写因子 PPAR α を介した全身的な中性脂肪の低下作用と血管細胞自体への直接作用の両面からの作用が考慮されていた。血管細胞への直接作用では核内転写因子 PPAR α のリガンドとして作用し、抗アポトーシス作用、抗 VEGF 作用や抗炎症作用の報告があるが、血管新生や糖尿病網膜血管病変への影響は未だ明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

網膜血管細胞におけるフェノフィブレートや PPAR α 活性化の影響を検討することにより、網膜症における血管障害への PPAR α 活性化の奏功機序を明らかにする。網膜症発症の予防や治療応用可能な新規細胞保護因子やシグナル伝達分子の同定を目指す。

3. 研究の方法

(1) 単球細胞との共培養系にて、TNF α 刺激による培養血管内皮細胞への接着を評価し、PPAR α アゴニストによる抗炎症、抗動脈硬化作用を評価する。

(2) 培養血管内皮細胞での低酸素刺激下における血管新生への PPAR アゴニストの抑制効果を検討する。

(3) 網膜症保護作用の新規分子機序を見出すため、PPAR アゴニスト刺激を加えた血管内皮細胞において遺伝子網羅的解析を行うとともに抗血管新生関連分子や、抗炎症関連分子を解析し、有望なシグナル経路を同定する。

(4) 網膜症保護作用の新規分子機序を見出すため、PPAR アゴニスト刺激を加えた血管内皮細胞においてエピゲノミック遺伝子網羅的解析を行う。(3)において見出された遺伝子が PPAR により直接的に転写調節されているかを明らかにする。

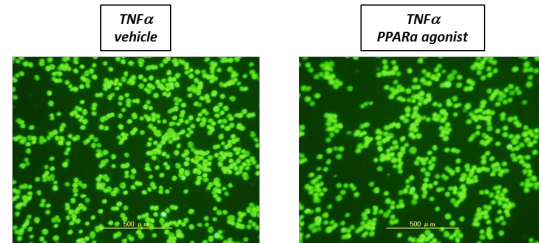
(5) (3)(4)で見出された経路の阻害効果を遺伝子改変マウスや siRNA を用いて検討し、網膜症に最もインパクトのある分子経路を探索する。

4. 研究成果

(1) In vitro における単球細胞接着 assay 単球細胞との共培養系にて、TNF α 刺激による単球細胞に対する PPAR α アゴニストの影響を検討したが、有意な単球細胞接着抑制効果はみられなかった(図1)。しかしながら PPAR α アゴニストに刺激された内皮細胞は CCL2 や VCAM1

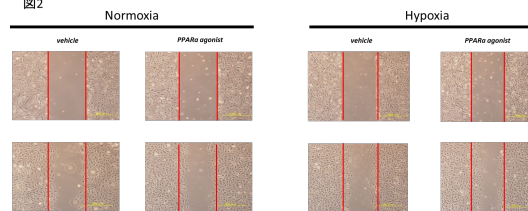
等の炎症関連遺伝子の発現レベルが低下した。

図1



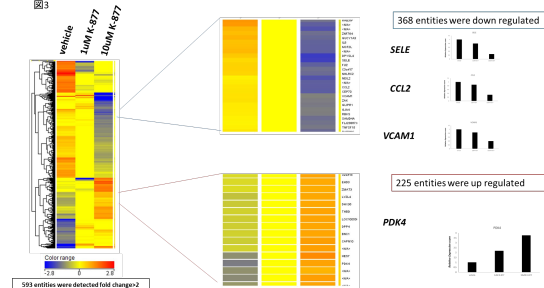
(2) In vitro における血管新生 assay In vitro における血管新生評価として PPAR α アゴニストによる細胞増殖、細胞遊走抑制効果を検討したが(図2)、抑制効果は見られなかった。

図2



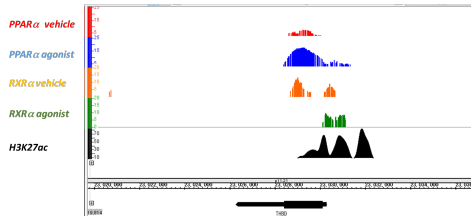
(3) マイクロアレイによる網羅的遺伝子網羅的なトランスクリプトーム解析の結果、PPAR α アゴニストで刺激することにより 225 遺伝子の発現レベルが2倍以上上昇しており、368 遺伝子の発現レベルが減少していた。上昇している遺伝子には既報にある PPAR α のターゲットである PDK4 や ANGPTL4 等が含まれていたが、その他にも抗トロンピン作用を持つトロンボモジュリン等が含まれていた。また、発現が減少している遺伝子には CCL2 や VCAM1 などの炎症関連遺伝子が多く含まれていた(図3)。

図3



(4) ChIP-seq による PPAR α 標的遺伝子探索 転写因子である PPAR α の直接のターゲットを解明するために行った ChIP-seq(図4)による網羅的解析の結果、トロンボモジュリン遺伝子の転写開始点近傍にシグナルをみとめた。また、ユークロマチンのヒストン修飾マーカーの一つである H3K27ac の ChIP-seq においても同様の領域にシグナルをみとめたことから、PPAR α はトロンボモジュリンの転写開始点近傍に直接結合し、転写を制御している可能性が考えられた。

図 4



(5) PPAR α -トロンボモジュリンを介した抗トロンピン作用の検討

内皮細胞にトロンピン刺激を加えることでVCAM1、SELE、CCL2の遺伝子発現が上昇したが、PPAR α アゴニストを加えることでそれらの遺伝子発現の上昇が抑制された。そしてその効果はトロンボモジュリンをSiRNAにてノックダウンすることで減弱した。すなわちPPAR α アゴニストによる抗炎症作用の一部はトロンボモジュリンを介していることが考えられた。

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 13 件) 全て査読有

Ueno H, Hattori T, Kumagai Y, Suzuki N, Ueno S, Takagi H.

Alterations in the corneal nerve and stem/progenitor cells in diabetes: preventive effects of insulin-like growth factor-1 treatment. *Int J Endocrinol*. 2014;2014:312401. doi: 10.1155/2014/312401.

高木 均、血管新生阻害薬の臨床現場における現状と今後の期待、最新医学 2013 ; 68 (12): 7-16.

Kitaoka Y, Munemasa Y, Kojima K, Hirano A, Ueno S, Takagi H.

Axonal protection by Nmnat3 overexpression with involvement of autophagy in optic nerve degeneration. *Cell Death Dis* 2013; 4: e860. doi: 10.1038/cddis.2013.391.

Shiono A, Kogo J, Klose G, Ueno S, Takagi H.

Effects of Indocyanine Green Staining on the Recovery of Visual Acuity and Macular Morphology after Macular Hole Surgery, *ophthalmologica*, 2013;230(3): 138-43. doi: 10.1159 /000351661.

Shiono A, Kogo J, Klose G, Takeda H, Ueno H, Tokuda N, Inoue J, Matsuzawa A, Kayama N, Ueno S, Takagi H.

Photoreceptor outer segment length, a prognostic factor for idiopathic epiretinal membrane surgery. *Ophthalmology*, 2013 ; 120 : 788-794.

Munemasa Y, Kitaoka Y.

Molecular mechanisms of retinal

ganglion cell degeneration in glaucoma and future prospects for cell body and axonal protection. *Front Cell Neurosci*. 2012;6:60. doi: 10.3389/fncel.2012.00060.

Kojima K, Kitaoka Y, Munemasa Y, Ueno S.

Axonal protection via modulation of the amyloidogenic pathway in tumor necrosis factor-induced optic neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012 Nov 15;53(12):7675-83. doi: 10.1167/iovs.12-10271.

Ueno H, Matuzawa A, Kumagai Y, Takagi H, Ueno S.

Imaging of a severe case of acute hydrops in a patient with keratoconus using anterior segment optical coherence tomography *Case Rep Ophthalmol*. 2012 Sep; 3(3):304-10. doi: 10.1159/000337483.

Munemasa Y, Chang CS, Kwong JM, Kyung H, Kitaoka Y, Caprioli J, Piri N.

The neuronal EGF-related gene Nell2 interacts with Macf1 and supports survival of retinal ganglion cells after optic nerve injury. *PLoS One*. 2012;7(4):e34810. doi: 10.1371/journal.pone.0034810.

Koseki N, Kitaoka Y, Munemasa Y, Kumai T, Kojima K, Ueno S, Ohtani-Kaneko R. 17 -estradiol prevents reduction of retinal phosphorylated 14-3-3 zeta protein levels following a neurotoxic insult. *Brain Res*. 2012 Jan 18;1433:145-52. doi: 10.1016/j.brainres.2011.11.034.

Kusuhara S, Ooto S, Kimura D, Itoi K, Mukuno H, Miyamoto N, Akimoto M, Takagi H.

Intraocular gas dynamics after 20- and 23-gauge vitrectomy with sulfur hexafluoride gastamponade. *Retina* 2011 ; 31(2) : 250-256.

Takada K, Munemasa Y, Kuribayashi J, Fujino H, Kitaoka Y.

Protective effect of thalidomide against N-methyl-D-aspartate-induced retinal neurotoxicity. *J Neurosci Res*. 2011 Oct;89(10):1596-604. doi: 10.1002/jnr.22698.

Kitaoka Y, Munemasa Y, Hayashi Y, Kuribayashi J, Koseki N, Kojima K, Kumai T, Ueno S.

Axonal protection by 17 -estradiol through thioredoxin-1 in tumor necrosis factor-induced optic neuropathy. *Endocrinology*. 2011 Jul;152(7):2775-85. doi: 10.1210/n.2011-0046.

[学会発表](計 20 件)

塩野 陽

転写因子 PPAR 制御による糖尿病網膜症治療の可能性を探る. シンポジウム 2 糖尿病網膜症の分子病態 (オーガナイザー 石田 晋、高木 均) 第 118 回日本眼科学会総会, 2014 年 4 月 3 日, 東京 Mitsui K, Kogo J, Sasaki H, Shiono A, Ueno S, Takagi H.

Comparative efficiency of 27-gauge vitrectomy with 25-gauge vitrectomy, American Academy of Ophthalmology, 2013.11.18, New Orleans

Kitaoka Y, Munemasa Y, Kojima K, Ueno S.

Nmnat3 inhibits up-regulation of p62 in high IOP-induced optic nerve degeneration, 2013 annual meeting of The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2013.5.6, Seattle Kojima K, Kitaoka Y, Munemasa Y, Ueno S.

Induction of autophagy prevents increase of p-PS1 in THF-induced optic nerve axonal degeneration. 2013 annual meeting of The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2013.5.6, Seattle

Munemasa Y, Takada K, Kojima K, Ueno S, Kitaoka Y.

The novelty of Toll like receptor-4 ligand and RGC degeneration, 2013 annual meeting of The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2013.5.6, Seattle

Ueno H, Hattori T, Kumagai Y, Suzuki N, Ueno S.

Evaluation of Corneal Stem/Progenitor Cells in leptin deficient mice. 2013 annual meeting of The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2013.5.5, Seattle

Ueno H, Hattori T, Kumagai Y, Takada E, Suzuki N, Ueno S.

Evaluation of Corneal Progenitor Cells in mice with Type II diabetes mellitus. 2012 annual meeting of The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2012.5.8, Fort Lauderdale

Kitaoka Y, Munemasa Y, Kojima K, Hayashi Y, Kitaoka Y, Ueno S.

Up-regulation of p62 in high IOP-induced optic nerve degeneration, 2012 annual meeting of The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2012.5.8, Fort Lauderdale

Kojima K, Kitaoka Y, Munemasa Y, Ueno S.

Acceleration of APP cleavage in amyloidgenic pathway in THF-induced optic nerve axonal degeneration. 2012 annual meeting of The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2012.5.8, Fort Lauderdale

Shiono A, Takeda H, Kogo J, Ueno S, Takagi H.

Photoreceptor outer segment length, A prognosis factor for surgical of idiopathic epiretinal membrane, 2012 annual meeting of The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2012.5.8, Fort Lauderdale

Kogo J, Shiono A, Takeda H, Ueno S, Takagi H.

Clinical and Morphologic changes in patients with polypoidal choroidal vasculopathy 6 months after ranibizumab monotherapy, 2012 annual meeting of The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2012.5.8, Fort Lauderdale

Munemasa Y, Kitaoka Y, Kojima K, Ueno S.

Retinal ganglion cell degeneration in the senescence-accelerated mouse, 2012 annual meeting of The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2012.5.6, Fort Lauderdale

Shinoda M, Shiono A, Kogo J, Ueno S, Takagi H.

Short-term outcomes of 25-gauge pars plana vitrectomy for large macular hole, The 27th Asia Pacific Academy of Ophthalmology Congress, 2012.4.16, Busan

Shiono A, Kogo J, Ishimaru A, Shinoda M, Ueno S, Takagi H.

Associations between macular findings and visual acuity in patients with idiopathic epiretinal membrane, The 27th Asia Pacific Academy of Ophthalmology Congress, 2012.4.16, Busan

Shiono A, Kogo J, Ueno S, Takagi H.

Short-term outcomes of 25-gauge pars plana vitrectomy for large macular hole, The 27th Asia Pacific Academy of Ophthalmology Congress, 2012.4.16, Busan

塩野 陽, 向後二郎, 篠田芽衣子, 高木均, 上野聰樹.

特発性黄斑上膜における SD-OCT を用いた視力予後因子の検討, 第 116 回日本眼科学会総会, 2012 年 4 月 6 日, 東京

Kogo J, Shiono A, Ueno S, Takagi H. Indocyanine Green Staining Affects the Recovery of Macular Morphology and Visual Acuity After Macular Hole Surgery, American Academy of Ophthalmology, 2011.10.24, Orland
Shiono A, Kogo J, Takagi H, Kita M, Ueno S.

Triple Therapy for large Retinal Pigment Epithelial Detachment Secondary to AMD, American Academy of Ophthalmology, 2011.10.23, Orland
Takagi H

Further improvement of microincision vitrectomy surgery for macular diseases, 16th Congress of Chinese Ophthalmological Society, 2011.9.8, 広州

Kogo J, Shiono A, Takagi H, Ueno S. Early Postoperative Length of External Limiting Membrane Defect is Prognostic Factor of Visual Outcome in Macular hole Surgery, 2011 annual meeting of The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2011.5.2, Fort Lauderdale

〔図書〕(計 6 件)

王 英泰, 高木 均、メディカルレビュー社、入門血管新生学、2013、57-65.

高木 均、中山書店、ヴィジュアル糖尿病臨床のすべて 糖尿病網膜症のすべて、2012、65-71.

向後二郎, 高木 均、中山書店、ヴィジュアル糖尿病臨床のすべて 糖尿病網膜症のすべて、2012、144-145.

高木 均、日本臨床社、最新臨床糖尿病学、2012、349-355.

高木 均、医学書院、網膜硝子体手術 SOS トラブルとその対策、2012、67-69

高木 均、文光堂、眼手術学 8 網膜・硝子体 II、2012、105-116.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.marianna-u.ac.jp/opht./index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高木 均 (TAKAGI, Hitoshi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：70283596

(2)研究分担者

北岡 康史 (KITAOKA, Yasushi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：10367352

宗正 泰成 (MUNEMASA, Yasunari)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：30440340

上野 聰樹 (UENO, Satoki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：20109010

(3)連携研究者

小川 佳宏 (OGAWA, Yoshihiro)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：70291424

高倉 伸幸 (TAKAKURA, Nobuyuki)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：80291954