

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 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：2013～2015

課題番号：25462701

研究課題名(和文) 糖尿病網膜症におけるGAG糖鎖およびRAGEの関連性解析

研究課題名(英文) Involvement of Sulfated Glycosaminoglycan in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy

研究代表者

吉澤 史子 (YOSHIZAWA, Chikako)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：80533653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病誘導モデルマウスより白血球を採取し、硫酸化グリコサミノグリカンの解析を行った。しかしながら、コントロールマウスと比較して、顕著な差は認められなかった。そこで、糖尿病網膜症患者より手術中に採取される臨床検体(硝子体)を用いて、眼内に含まれる糖鎖を網羅的に解析した。結果、硫酸化グリコサミノグリカンを含む糖鎖量が対照群の非糖尿病患者に比べ糖尿病網膜症患者群で有意に上昇していた。このことは、糖鎖量の増加が病態形成に何かしら関与していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：The white blood cells were purified from diabetes-induced mouse model, and analyzed composition of sulfated glycosaminoglycan. However, compared to control mice, significant difference was not observed. Therefore, we comprehensively analyzed sugar chains in the vitreous fluids from diabetic retinopathy patients. As results, total glycan amount including sulfated glycosaminoglycan were significantly elevated in diabetic retinopathy patients than in non-diabetic patients (control group). This suggests that increased glycans may be involved in the pathogenesis of diabetic retinopathy.

研究分野：眼科学

キーワード：硫酸化グリコサミノグリカン 糖尿病網膜症 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた我が国では、国民の健康を維持することは社会的に重要な課題となっている。さらに、世界規模で肥満は増加の一途をたどっており、そして生活習慣病に伴う糖尿病の罹患率、死亡率の増加はますます重要な課題となっている。糖尿病の3大合併症の一つ、糖尿病網膜症は我が国における主要な失明原因であり、血管新生の前駆段階である炎症病態に早期介入する治療戦略の確立は、失明や重度の視力障害を回避するための社会的急務である。

炎症は局所の組織傷害に対して生じる生体の防御機構である反面、慢性化すると組織傷害をかえって悪化させる場合がある。申請者らのグループは、この慢性炎症、そしてそれに附随する白血球浸潤が糖尿病網膜症の病態に関与することが明らかとした [Ishida et al. J Exp Med. 2003, Nat Med. 2003, Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003]。例えば、糖尿病網膜症では網脈絡膜における白血球接着分子の発現が増加し、網膜毛細血管瘤の内部には白血球が集積していることがヒト剖検眼および自然発症糖尿病モデル動物(サル)を用いた検討で明らかとされている。また、ヒト線維性血管組織でも浸潤した白血球は血管内皮増殖因子(VEGF)を分泌して同組織の形成に関与している。つまり、糖尿病網膜症の病態機序には慢性炎症と白血球接着の関与がある。

高血糖は血漿タンパク質のみならず基底膜などの細胞外マトリックスを糖化し、終末糖化産物(Advanced Glycation Endproducts, AGEs)の生成を促進する。そしてAGEs受容体であるReceptor for Advanced Glycation Endproducts(RAGE)を介して認識され、細胞内酸化ストレスの亢進を引き起こし周皮細胞のアポトーシスを惹起する。糖尿病血管障害の発生・進展においてAGEs-RAGEは重要な役割を担っていることは明らかとされている。さらに、AGEs-RAGE系は血管内皮細胞にも直接的に作用し酸化ストレスの産生を亢進させ、血管炎症や血管新生を引き起こす。また、AGEs-RAGEによってもたらされる血栓傾向は網膜局所の虚血や低酸素を引き起こし、VEGF165の産生を亢進させて、さらなる血管炎症・血管新生を誘導する。

細胞増殖・細胞分化・ウイルス感染・神経再生や幹細胞の分化さらには細胞の癌化や癌の悪性化に硫酸化グリコサミノグリカン(GAG)の構造変化、コンドロイチン硫酸(CS)などの癌転移への関与は知られていたが、それらの生物学的意義や分子メカニズムは不明であった。最近、分担研究者の菅原一幸らは、癌細胞の肺への転移において、癌細胞表面の硫酸化グリコサミノグリカン(GAG)多糖鎖が肺に発現しているRAGEに結合することで引き起こされることを明らかにした[Mizumoto S et

al. J. Biol. Chem. 2012]。Recombinant RAGEはCS鎖(CS-E)だけでなくヘパラン硫酸(HS)とも相互作用し、一方、CS鎖(CS-E)やそのCS鎖特異的抗体、そして抗RAGE抗体を予め投与することにより、癌細胞の肺への転移が強く阻害された。これらの結果から、血管内皮細胞のRAGEが癌細胞表面のCS鎖やHS鎖と相互作用して、肺転移のレセプターとして機能していることが示唆された。また興味深いことにHSは、病的血管新生に重要な役割を担うVEGF165やFGF(線維芽細胞増殖因子)を介し、血管形成を促進することが明らかとなっている[Xu D et al. J. Biol. Chem. 2010]。

癌細胞の接着と白血球接着においては、類似する点が多く存在する。例えば、白血球が血管内皮細胞と接着し、血管外に浸潤する際に、白血球表面の糖鎖(シアル酸が結合したシアリルLex糖鎖抗原)と血管内皮細胞表面に存在するセレクチンが関与する。同様に、シアリルLex糖鎖抗原やシアリルLea糖鎖抗原を発現した癌細胞も、血管内皮細胞へ接着し転移する際、セレクチンを介して癌の血行転移に関連している。

以上のことから、白血球接着においてもGAG糖鎖-RAGE系が関与している可能性は非常に高い。本研究の目的は、糖尿病網膜症の病態形成に深く関与する白血球接着におけるGAG糖鎖の関与およびその詳細なメカニズムを明らかにすることにある。

2. 研究の目的

老化や生活習慣による慢性炎症が原因で引き起こされる網膜疾患(糖尿病網膜症や加齢黄斑変性など)の罹患患者数が近年急増している。申請者らのグループは、これまでに慢性炎症に附随する白血球浸潤が糖尿病網膜症の病態において重要な役割を担っていることを明らかにした。我々は、近年癌細胞の転移に深く関与することが報告された糖鎖修飾、なかでも硫酸化グリコサミノグリカン多糖鎖に着目した。血管内皮への白血球接着と癌細胞接着には類似する箇所が多くあるため、白血球が硫酸化グリコサミノグリカン糖鎖を介して糖尿病網膜症の病態に関与している可能性が考えられる。

本研究では、糖尿病網膜症患者より採取した臨床検体、さらに糖尿病網膜症モデルマウスを用いて糖尿病網膜症における白血球接着・浸潤への硫酸化グリコサミノグリカン糖鎖の関与について詳細な生物学的解析を行う。

3. 研究の方法

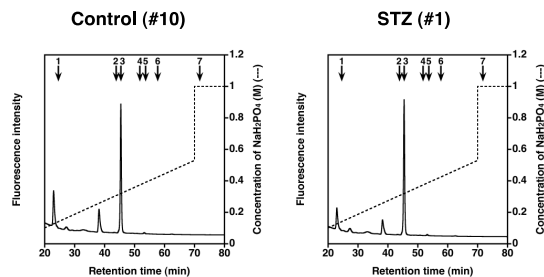
糖尿病網膜症における網膜血管への白血球接着に硫酸化グリコサミノグリカン糖鎖-RAGE系が関与しているかを明らかにすべく、以下に示す複数の異なるアプローチにより詳細な解析を行う。

- (1) ストレプトゾトシン誘導糖尿病モデルマウス白血球における硫酸化グリコサミノグリカン糖鎖を主とする糖鎖解析。
- (2) 硫酸化グリコサミノグリカン糖鎖阻害剤(コンドロイチン硫酸鎖やコンドロイチン硫酸-E 特異的抗体など)の投与による白血球接着抑制効果、病態の抑制検討。
- (3) 糖尿病網膜症患者における硫酸化グリコサミノグリカン糖鎖の解析。を中心に研究を行う。

4. 研究成果

成体マウスにストレプトゾトシンを腹腔内注射すると、ストレプトゾトシンが睪臓に取り込まれて睪細胞を選択的に破壊するため、高度の高血糖が誘導される。高血糖により糖尿病網膜症でみられる網膜炎が4週間後から誘導され、網膜血管への白血球接着などが生じる。まずこのモデル作成の手法を確立した。そして、正常マウスの白血球や網膜にコンドロイチン硫酸鎖合成に必須な酵素や終末糖化産物(Advanced Glycation Endproducts, AGEs)受容体遺伝子の発現をPCR法にて確認した。

正常マウスから採取したリンパ球を用いて硫酸化グリコサミノグリカンの二糖組成分析および定量を行った。その結果、マウスのリンパ球からコンドロイチン硫酸由来の二糖のピークが観察され、4-O-硫酸化構造である A-unit [HexUA-GalNAc (4-O-sulfate)] (HexUA および GalNAc はそれぞれ、4,5-不飽和ヘキサロン酸と N-アセチルガラクトサミンを表す) が主要な硫酸化修飾構造として存在していることがわかった。そして、糖尿病による硫酸化グリコサミノグリカン糖鎖の変化を調べるため、ストレプトゾトシン投与後1ヶ月、2ヶ月の糖尿病誘導モデルマウスより白血球を採取し、同様の解析を行った。しかしながら、コントロールマウスと比較して、顕著な差は認められなかった(下図)。その原因として、糖尿病罹患期間が短く有意な差が認められなかった可能性が考えられる。



そこで我々は、糖尿病網膜症患者より手術中に採取される臨床検体(硝子体)を用いて、眼内に含まれる糖鎖を網羅的に解析した。結果、硫酸化グリコサミノグリカンを含む糖鎖量が対照群の非糖尿病患者に比

べ糖尿病網膜症患者群で有意に上昇していた。このことは、糖鎖量の増加が糖尿病網膜症の病態形成に関与していることを示唆している。

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5件)

Hashimoto Y, Saito W, Fujiya A, Yoshizawa C, Hirooka K, Mori S, Noda K, Ishida S. Changes in inner and outer retinal layer thicknesses after vitrectomy for idiopathic macular hole: Implications for visual prognosis. PLoS One, 査読有, 10巻, 2015

DOI: 10.1371/journal.pone.0135925

Inafuku S, Noda K, Amano M, Ohashi T, Yoshizawa C, Saito W, Kanda A, Nishimura S, Ishida S. Alteration of N-glycan profiles in diabetic retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 査読有, 10巻, 2015, pp.5316- 5322, DOI: 10.1167/ iovs.15- 16747

Inafuku S, Noda K, Amano M, Ohashi, Yoshizawa C, Saito W, Kanda A, Nishimura S, Ishida S. A comparison of N- glycan profiles in human plasma and vitreous fluid. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 査読有, 252巻, 2014, pp.1235- 1243, DOI: 10.1007/ s00417- 014- 2671- x

Saito M, Saito W, Hashimoto Y, Yoshizawa C, Fujiya A, Noda K, Ishida S. Macular choroidal blood flow velocity decreases with regression of acute central serous chorioretinopathy. Br J Ophthalmol. 査読有, 97巻, 2013, pp.775- 780, DOI: 10.1136/bjophthalmol-2012-302349

Yoshizawa C, Saito W, Hirose S, Kitamei H, Noda K, Ishida S. Photodynamic therapy combined with intravitreal bevacizumab and sub- tenon triamcinolone acetonide injections for age- related macular degeneration. Jpn J Ophthalmol. 査読有. 57巻, 2013, pp. 68- 73, DOI: 10.1007/s10384-012-0206-8

[学会発表](計4件)

安藤 亮、齋藤 航、廣岡季里子、鈴木智浩、吉澤史子、齋藤理幸、加瀬 諭、森祥平、野田航介、石田 晋. PDTトリプル療法を行ったポリープ状脈絡膜血管症における治療1年後視力の規定因子. 第54回日本網膜硝子体学会総会、第32回日本眼循環学会合同学会. 2015年12月04日~ 2015年12月06日. 京国際フォ

ーラム(東京都・千代田区)
鈴木智浩、齋藤 航、森 祥平、齋藤理幸、
安藤 亮、加瀬 諭、廣岡季里子、吉澤史
子、野田航介、石田 晋. アプリベルセブ
ト併用 PDT トリプル療法 1 年後の治療成
績. 第 54 回日本網膜硝子体学会総会、
第 32 回日本眼循環学会合同学会. 2015
年 12 月 04 日~ 2015 年 12 月 06 日. 東京
国際フォーラム(東京都・千代田区)
森 祥平、齋藤 航、齋藤理幸、安藤 亮、
廣岡季里子、吉澤史子、野田航介、石
田 晋. 2 型脈絡膜新生血管を伴った加齢
黄斑変性に対する PDT トリプル療法の治
療成績. 第 54 回日本網膜硝子体学会総
会、第 32 回日本眼循環学会合同学会.
2015 年 12 月 04 日~ 2015 年 12 月 06 日.
東京国際フォーラム(東京都・千代田区)
稲福沙織、野田航介、天野麻穂、大橋哲、
吉澤史子、齋藤 航、村田美幸、神田敦
宏、西村紳一郎、石田 晋. 糖尿病網膜症
の硝子体および血漿における N 型糖鎖の
網羅的解析. 第 68 回日本日本臨床眼科
学会. 2014 年 11 月 13 日~2014 年 11 月
16 日. 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸
市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉澤 史子 (YOSHIZAWA, Chikako)
北海道大学・大学院医学研究科・客員研究員
研究者番号: 80533653

(2) 研究分担者

菅原 一幸 (SUGAWARA, Kazuyuki)
北海道大学・先端生命科学研究科・名誉教授
研究者番号: 60154449

(2) 研究分担者

神田 敦宏 (KANDA, Atsuhiko)
北海道大学・大学院医学研究科・特任講師
研究者番号: 80342707

(3) 連携研究者 なし