

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462751

研究課題名(和文) 糖尿病網膜症における神経軸索変性の神経軸索保護・再生戦略の検討

研究課題名(英文) Establishment of neuroprotective and regenerative therapies for neuronal degeneration of diabetic retinopathy

研究代表者

忍足 俊幸(Oshitari, Toshiyuki)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40546769

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)：糖尿病網膜症の初期神経病変は不可逆的で水面下で蓄積していくため、長期的には視機能の障害に直結する。本研究では糖尿病網膜初期神経病変の神経保護・再生促進目的に網膜3次元培養を用いて有効な治療戦略を模索した。培養液に終末糖化産物(AGEs)を負荷し、同時に栄養因子であるNT-4, HGF, GDNF, TUDCAを付加した。どの栄養因子も再生を促進したがNT-4が最も再生促進作用が強かった。また、NF-kB・SP1・JNK・p38はAGE負荷で発現増加し、栄養因子付加でSP1を除いて発現が減少した。SP1のみ持続発現していた。NF-kB・JNK・p38は細胞死に促進的に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Neuronal abnormalities of diabetic retinopathy are irreversible changes and accumulated below the surface. These changes are directly related to permanent vision loss. RGC neuropathy is a progressive optic nerve neuropathy with RGC death and axonal degeneration in diabetic patients. Thus, neuroprotective and regenerative therapies that inhibit the progression of RGC loss and axonal degeneration are greatly required. For these purpose, we used three-dimensional collagen gel culture of rat retinas. Retinal explants were incubated with AGEs simultaneously supplemented with NT-4, HGF, GDNF, and TUDCA. In retinas supplemented with NT-4, the number of regenerating neurites were the most among all groups. In addition, immunopositivities of NF-kB, SP1, JNK and p38 were increased in retinas incubated with AGEs, and decreased in retinas with AGEs supplemented with neurotrophic factors. These results indicate that NF-kB, JNK and p38 are proapoptotic factors in diabetic retinal neurons.

研究分野：医歯薬学

キーワード：RGC neuropathy 糖尿病網膜症 神経保護 神経突起再生 neurotrophin-4 NF-kB SP1 網膜3次元培養

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症の初期病変には血管病変と神経病変がある。神経細胞死に代表される神経病変は不可逆的な変化であり、水面下で蓄積していくため、長期的には視機能の障害に直結する。神経網膜において最も糖尿病ストレスに感受性が高い細胞は網膜神経節細胞 (RGC) であり、網膜レベルでは血管病変の発症する前から dendrite で構成される内網状層が障害される。このような軸索や dendrite を含めた細胞体の障害は RGC neuropathy と定義される。その進行のメカニズム解明と神経保護・再生治療の確立が糖尿病網膜症の進行抑制のために必須となる。特に軸索保護まで含めた治療では神経栄養因子が必要である。

2. 研究の目的

本研究では神経栄養因子のなかで最も有望である NT-4 と最近 RGC に保護効果が確認された HGF, GDNF の他、低分子シャペロンである TUDCA の神経保護・再生促進作用を in vitro, in vivo の糖尿病モデルを用いて検討した。

3. 研究の方法

網膜3次元培養を用いた糖尿病モデルとして、培養液を正常濃度グルコースと高濃度グルコースに分ける方法、終末糖化産物 AGEs を負荷する方法、糖尿病モデルラット網膜を直接培養する方法がある。網膜をコラーゲンのゲルの中に無菌下で包埋し、正常濃度グルコース、高濃度グルコース、糖尿病ラット網膜を同時に培養し、培養液に NT-4、TUDCA を負荷した。培養7日で再生突起数を観察し、次いで凍結切片を作成し TUNEL 染色を施行した。また、AGE 負荷モデルでは、低濃度 AGE 負荷で神経細胞死・再生突起減少が見られることを確認した (Bikbova et al., 2013)。それを踏まえ、10 倍の高濃度 AGE を負荷したよりシビアな環境において NT-4、HGF、TUDCA、GDNF を付加し同時に TUNEL 陽性率・再生突起数を比較検討した。また、転写因子である NF-kB・SP1、細胞死関連キナーゼである JNK・p38 の免疫活性も同時に比較検討した。

4. 研究成果

(1) 低濃度 AGE s 負荷群では TUNEL 陽性率は有意に増加し、再生突起数は有意に減少した (Bikbova et al., 2013)。高濃度 AGEs 負荷では TUNEL 陽性率に差は低濃度 AGE s と差はなかったが、再生突起数は低濃度 AGEs に比べて有意に減少した。このことから再生現象は神経細胞死よりもストレスに鋭敏な現象であることが示唆された (Bikbova et al., 2013)。これを踏まえ、高濃度 AGEs 負荷群では種々の栄養因子はどれも有意に再生突起数を増加させた。TUNEL 陽性率は一部の栄養因子 (NT-4、TUDCA など) で有意に陽性率が

減少した。GDNF は TUNEL 陽性率は改善しなかったが、再生突起数は有意に増加した。このように神経細胞が生存するという事実と再生するという事実は別の現象であることがわかる。すなわち神経保護と再生促進には別の戦略の組み合わせが必要であることが示唆される。また、種々の栄養因子の中で、NT-4 が最も神経保護・再生促進作用が強かった (Bikbova et al., 2015)。また、NF-kB・SP1 は AGE 負荷で発現が増加したが、栄養因子付加で NF-kB は発現が低下し、SP1 は持続的に発現した。NF-kB は神経細胞に proapoptotic に関与しているが、SP1 持続発現は栄養因子の神経保護・再生促進作用に重要であることが示唆された (Bikbova et al., 2015)。また、JNK・p38 の免疫活性は培養 24 時間の早期において活性増加し、栄養因子付加においてその活性は低下した。JNK・p38 はより早期において AGE 誘導神経細胞死に関与していることが示唆された (ARVO2015)。JNK は人糖尿病網膜の変性神経でも活性が増加しており、緑内障でも活性が確認されている。AGE は糖尿病網膜症だけでなく、緑内障や加齢黄斑変性など様々な神経疾患に関与しており、糖尿病網膜症のみならず、本研究で有用と判明した栄養因子は様々な網膜神経疾患の治療に応用可能である可能性が示唆された。

(2) 正常濃度グルコースと高濃度グルコース及び糖尿病ラット網膜では TUNEL 陽性率は有意に増加し、再生突起数は有意に減少した (Oshitari et al., 2014)。また NT-4、TUDCA は神経保護・再生促進作用を呈したが、NT-4 の再生促進作用は TUDCA より有意に高かった。小胞体ストレスを抑えるだけでは再生には十分ではないことが示唆された。また、c-Jun/JNK の免疫活性は NT-4、TUDCA で有意に減少した。C-Jun/JNK は人糖尿病網膜の変性神経でも活性化することを確認しており (Oshitari et al 2013) 培養網膜と人糖尿病網膜の変性神経の細胞死のメカニズムが一部共通していることが示唆された。このことから培養網膜で神経保護・再生促進作用を示した薬剤は人においても有用である可能性が示唆された。

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 14 件)

Bikbova G, Oshitari T, Baba T, Yamamoto S. Altered expression of NF-kB and SP1 after exposure to advanced glycation end-products and effects of neurotrophic factors in AGEs exposed rat retinas. J Diabetes Res 査読有り ID543818, 2015, 11 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/543818>
8
Baba T, Oshitari T, Yamamoto S. Level

of vitreous alpha B crystalline in eye with rhegmatogenous retinal detachment. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 査読有り 253, 2015, 1251-1254, DOI:10.1007/s00417-014-2815-z

Oshitari T. Neurovascular protection instead of only neuroprotection. Edorium J Ophthalmol 査読有り 1, 2015, 1-3, DOI:10.5348/002-2015-1-ED-1

Oshitari T, 他 7 人. Risk factors for refractory diabetic macular edema after sub-tenon's capsule triamcinolone acetonide injection. J Ophthalmol 査読有り ID195737, 2015, 4 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/195737>

Oshitari T, 他 6 人. Effects of sub-Tenon's triamcinolone acetonide injection combined with micro aneurysm photocoagulation on diabetic macular edema. Int Med Case Rep J 査読有り 8, 2015, 321-326, <http://dx.doi.org/10.2147/IMCRJ.S89970>

Bikbova G, Oshitari T, 他 2 人. Neurotrophic factors for retinal ganglion cell neuropathy - with a special reference to diabetic neuropathy in the retina. Curr Diabetes Rev 査読有り 10, 2014, 166-176, DOI: 10.2174/1573399810666140508121927

Oshitari T, 他 4 人. Correlation between Fourier Domain optical coherence tomography parameters and HbA1c level and diabetes duration in early stage diabetic retinopathy. Austin J Clin Ophthalmol 査読有り 1, 2014, 6(1-6),

Bikbova G, Oshitari T, Yamamoto S. Neuronal cell death and regeneration in diseases associated with AGEs accumulation: perspectives. Neural Reg Res 査読有り 9, 2014, 701-702, doi: 10.4103/1673-5374.131569

Nonomura S, Oshitari T, 他 5 人. The effect of posterior sub-Tenon's capsule triamcinolone acetonide injection to that of pars plana vitrectomy for diabetic macular edema. Clin Ophthalmol 査読有り 8, 2014, 825-830, doi: 10.2147/OPHTH.S59849

Oshitari T, 他 8 人. Werner syndrome with refractory cystoid macular edema and immunohistochemical analysis of WRN proteins in human retinas. BMC Ophthalmol 査読有り 14, 2014, 31(1-6), doi: 10.1186/1471-2415-14-31

Baba T, Bikbova G, Kitahashi M, Yokouchi H, Oshitari T, Yamamoto S. Level of vascular endothelial growth factor 165b in human aqueous humor. Curr Eye Res 査読有り 39, 2104, 830-836, DOI:10.3109/02713683.2013.877935

Oshitari T, 他 2 人. Increased expression of phosphorylated c-Jun and phosphorylated c-Jun N-terminal kinase associated with neuronal cell death in diabetic and high glucose exposed rat retinas. Brain Res Bull 査読有り 101, 2014, 18-25, doi: 10.1016/j.brainresbull.2013.12.002

Oshitari T, 他 2 人. Increased expression of c-Fos, c-Jun and c-Jun N-terminal kinase associated with neuronal cell death in retinas of diabetic patients. Curr Eye Res 査読有り 39, 2014, 527-531, doi: 10.3109/02713683.2013.833248

Bikbova G, Oshitari T, Yamamoto S. Neurite regeneration in adult rat retinas exposed to advanced glycation end-products and regenerative effects of neurotrophin-4. Brain Res 査読有り 1534, 2013, 33-45, doi: 10.1016/j.brainres.2013.08.027

[学会発表](計 8 件)

Oshitari T, 他 2 人. Transcription factors involved in cell death and regeneration in AGEs exposed retinal neurons. European Association for Vision and Eye Research 2015, S095, 2015 年 10 月 7-10 日、Nice, France.

Bikbova G, Oshitari T, Yamamoto S. JNK and p38 expression involved in regenerative effect of different neurotrophic factors in rat retinas exposed to AGEs. Association of Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting 2015, 3627, 2015 年 5 月 3-7 日、Denver, Colo, USA.

Bikbova G, Oshitari T, Yamamoto S. Advanced glycation end-products induced activation of NF-kB and its suppression by different neurotrophic factors. European Association for Vision and Eye Research 2015, 2651, 2014 年 10 月 1-4 日、Nice, France (Travel Fellowship Award 受賞).

Oshitari T, 他 2 人. Regenerative effect of taurine-conjugated ursodeoxycholic acid and neurotrophin-4 in rat retinas exposed to high glucose. XXI Biennial Meeting of the ISER 2014, P338, 2014 年 7 月 20-24 日、San Francisco, CA, USA.

Bikbova G, Oshitari T, Yamamoto S. Neurite regeneration in adult rat retinas exposed to low dose advanced glycation end-products and regenerative effects of neurotrophin-4. ISER 2014, P207, 2014年7月20-24日、San Francisco, CA, USA.
Oshitari T, 他 2 人. Neuroprotective and regenerative effect of taurine-conjugated ursodeoxycholic acid in rat retinas exposed to high glucose. Association of Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting 2014, 5833, 2014年5月4-8日、Orlando, FL, USA.
Oshitari T, 他 2 人. Comparison of regenerative effects of tauroursodeoxycholic acid with neurotrophin-4 in high glucose exposed rat retinas. World Ophthalmology Congress 2014, P01581, 2014年4月2-6日、Chiyoda-ku, Tokyo, Japan.
Bikbova G, Oshitari T, Yamamoto S. In neuronal cell death of AGE-exposed rat retinas both caspase-dependent and independent cell death pathways are involved. World Ophthalmology Congress 2014, P01581, 2014年4月2-6日、Chiyoda-ku, Tokyo, Japan.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

忍足 俊幸 (OSHITARI TOSHIYUKI)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40546769