

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462657

研究課題名(和文) 糖尿病網膜症におけるアクロレインの病態関与

研究課題名(英文) Role of acrolein in the pathogenesis of diabetic retinopathy

研究代表者

齋藤 航 (Saito, Wataru)

北海道大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：00339160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、糖尿病網膜症の病態における不飽和アルデヒドアクロレインの関与について検討することであった。本検討では、アクロレイン結合タンパクであるFDP-Lysがヒト増殖糖尿病網膜症(PDR)患者の線維血管組織において血管内皮細胞とグリア細胞に存在すること、PDR患者硝子体中で増加すること、高濃度のアクロレイン刺激は培養血管内皮細胞に対して毒性を発揮するが、低濃度刺激ではむしろその生存や増殖に対して正の働きをすること、などを示した。本検討結果は、糖尿病網膜症におけるアクロレインの病態関与を明らかとし、今後さらなるその病態解明や予防的介入の開発につながっていくと期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the involvement of acrolein, a highly reactive unsaturated aldehyde, in diabetic retinopathy (DR). We conducted immunohistochemistry for acrolein-conjugated protein, FDP-Lys, using surgically-excised tissues from patients with proliferative diabetic retinopathy (PDR) and idiopathic epiretinal membrane. In fibrovascular tissues, FDP-Lys was found in vascular components and clusters of glial cells. Morphological analysis revealed that fibrovascular tissues with FDP-Lys staining in vascular components showed high vascular density. In addition, protein level of FDP-Lys increased in the vitreous of PDR. Exposure of cultured endothelial cells to high concentration of acrolein resulted in the decrease of cell viability and proliferation, whereas lower concentration of acrolein increased cell viability and proliferation. The current data demonstrated the presence of acrolein in eyes with DR and indicate its involvement in the pathogenesis of DR.

研究分野：眼科学

キーワード：糖尿病網膜症 不飽和アルデヒド アクロレイン

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は現代の生活環境や食習慣の変化につれてその有病率が急速に増加しており、世界の糖尿病人口は 2012 年時点で約 3 億 7,100 万人、2030 年には 5 億 1,000 万人を超えるとする試算がある。一方、糖尿病の罹病期間と網膜症の発症率は正の相関を有するため、網膜症を有する糖尿病患者数も今後増加すると考えられる。そのため、糖尿病網膜症は壮年期における主要な中途失明原因として今後さらに社会問題化することが予測され、予防的介入につながる標的分子の探索が眼科における重要な課題となっている。

糖尿病患者において高血糖が網膜症のような細小血管障害を惹起する機序としては、ポリオール代謝経路亢進、プロテインキナーゼ C の活性化、終末糖化蛋白 (advanced glycation end-products, AGEs) の蓄積などがあるが、これらは体内で酸化ストレスを亢進させることが知られている生体现象である。さらに、これらの経路以外にも糖尿病の代謝異常にもなる活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) 産生の機序として、グルコース自己酸化、キサンチンオキシダーゼ活性化、ヘキソサミン代謝亢進、スーパーオキシド産生亢進などがある。つまり、糖尿病では酸化ストレスが全身的に亢進した状態にあり、その病態に重要な役割を演じている。

不飽和アルデヒドであるアクロレインは、煙草や排気ガスなどの環境汚染物質に含まれ、油脂の加熱などによって生成される分子である。反応性が高く、さまざまなタンパクの Lys, Cys, His などのアミノ酸残基に結合することで複合体を形成し、その機能に変化をおよぼす。これらの複合体の中でも、Lys と結合することによって生じる生成物は *N*ε-(3-formyl-3,4-dehydropiperidino) lysine adduct (FDP-Lys) と呼ばれ、生体内に長期滞留することが知られている。

これまで、アクロレインは FDP-Lys を形成し、肺癌などの呼吸器疾患の発症に関与する外因性の毒性の高い物質と考えられていたが、近年になって内因性にもアクロレインは産生されることが明らかとなり、注目を集めるようになった。すでに、酸化ストレスがその病態に関与する疾患、すなわち心疾患、神経変性疾患、脳梗塞の病態などにアクロレインが関与するという報告がある。前述のごとく、糖尿病においても酸化ストレスは病態発症の重要なトリガーとなっており、本疾患におけるアクロレインやその結合タンパク FDP-Lys の病態関与は大変興味深い点であった。

2. 研究の目的

本研究計画の目的は、「ヒト糖尿病網膜症患者におけるアクロレインの産生亢進を調べ、糖尿病網膜症病態におけるその関与を明らかにすること」である。

3. 研究の方法

1) 糖尿病網膜症患者の線維血管組織における FDP-Lys の局在

北海道大学病院眼科で硝子体手術を施行される増殖糖尿病網膜症患者 11 例 11 眼より線維血管組織の検体採取をおこない、抗 FDP-Lys 抗体を用いた免疫染色法を施行することで同組織における FDP-Lys の存在および局在を検討した。対照群としては、非糖尿病患者として黄斑上膜患者 3 例 3 眼から採取された組織を使用した。

組織切片における glial fibrillary acidic protein (GFAP) 陽性のグリア細胞と CD34 陽性の血管内皮細胞における FDP-Lys の局在とその陽性率について検討した。さらに、血管密度測定をおこない、FDP-Lys 陽性率との関係を検討した。

2) 糖尿病網膜症患者の硝子体液における FDP-Lys の定量

増殖糖尿病網膜症患者 12 例 12 眼より、硝子体液および血液の検体採取をおこなった。対照群としては、同手術を施行される非糖尿病患者 (黄斑上膜および黄斑円孔) 9 例 9 眼から検体を採取した。血液検体は入院中ルーチンで行なう血液検査の際に、硝子体液は前述の手術中に採取されるために、対象患者には本検体採取による追加の侵襲的検査は生じない。同硝子体液および血漿サンプルを用いて、増殖糖尿病網膜症患者と非糖尿病患者において FDP-Lys 濃度に差があるかを検討した。さらに、FDP-Lys 産生と関連が推測される酵素セミカルバジド感受性アミノキシダーゼ (semicarbazide-sensitive amine oxidase, SSAO) の濃度も測定し、両者の相関について検討をおこなった。

3) アクロレイン刺激による網膜血管内皮細胞の応答

培養ヒト網膜血管内皮細胞 (human retinal microvascular endothelial cells, HRMEC) に対してアクロレイン刺激 (10-200 μM, 24 時間) をおこない、RealTime-Glo™ MT cell viability assay を用いて細胞生存に関する検討をおこなった。さらに、5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 取込を比較することで増殖能変化を検討した。さらに、各種酵素、炎症性サイトカイン、接着分子などの発現変化を real-time PCR 法を用いて検討した。また、培養ラット網膜グリア細胞 (TR-MUL5) を用いてその増殖および遊走能に対して変化を与えるかを検討した。

4. 研究成果

本研究によって、下記の 3 項目が明らかとなった。

1) 糖尿病網膜症患者の線維血管組織において、FDP-Lys は網膜血管内皮細胞とグリア細胞

胞に局在する。

増殖糖尿病網膜症患者より硝子体手術中に採取された線血管組織における FDP-Lys の局在を検討した。11 例の線維血管組織切片全例(100%)で CD34 は陽性であり、11 例中 7 例で FDP-Lys は陽性であった(63.6%、図 1)。

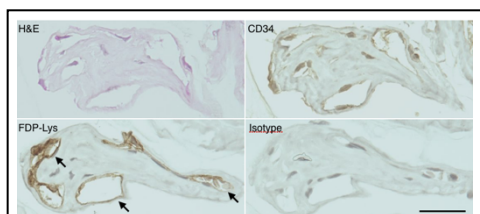


図 1 増殖糖尿病網膜症患者の線血管組織における FDP-Lys の局在。

矢印は FDP-Lys の局在を示しており、血管構造に存在することがわかる。

一方、GFAP 陽性細胞は 5 例(45.5%)で認められ、4 例(80%)で同細胞に FDP-Lys の染色シグナルが認められた(図 2)。

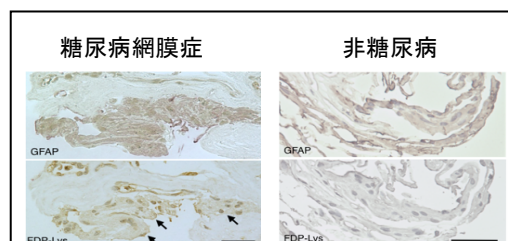


図 2 増殖糖尿病網膜症および非糖尿病患者の眼内組織における FDP-Lys の局在。

矢印は FDP-Lys の染色シグナル。増殖糖尿病網膜症患者の組織では GFAP 陽性細胞のクラスターに FDP-Lys は局在しているが、非糖尿病網膜症患者の組織ではその染色シグナルは認められない。

また、FDP-Lys が CD34 陽性細胞において陽性であった群においては、陰性群に比べて血管密度が統計学的有意差をもって増加していた(FDP-Lys 陰性群 93.52 ± 31.90 vessels/mm², FDP-Lys 陽性群 387.71 ± 66.04 vessels/mm², $P < 0.05$)。本データから、アクロレインと血管新生の活動性には相関があることが示唆された。

2) 糖尿病網膜症患者の硝子体液において、FDP-Lys は非糖尿病患者のそれと比較して増加している。

増殖糖尿病網膜症患者および非糖尿病患者より硝子体手術中に採取された眼内液(硝子体液)におけるアクロレイン結合蛋白

FDP-Lys を定量し、両者で比較検討した。FDP-Lys は増殖糖尿病網膜症患者の硝子体液中で、非糖尿病網膜症患者と比較して統計学的有意に増加していた(図 3)。一方、血漿において差は認められなかった。

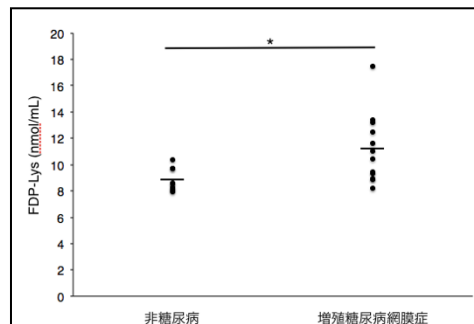


図 3 非糖尿病患者および増殖糖尿病網膜症の硝子体液における FDP-Lys 濃度。

糖尿病網膜症患者の眼内では、アクロレイン結合蛋白 FDP-Lys が統計学的有意に増加している。 $*P < 0.05$ 。

また、酵素 SSAO も同様に増殖糖尿病網膜症患者の硝子体液中ですべてあり、アクロレイン結合蛋白との間に有意な正の相関が認められた(図 4)。

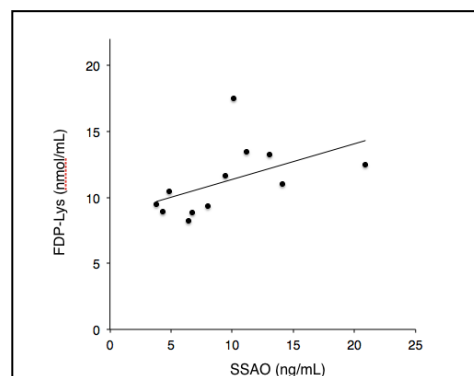


図 4 増殖糖尿病網膜症の硝子体液における FDP-Lys と SSAO の相関。

糖尿病網膜症患者の眼内では、FDP-Lys と SSAO は中等度の正の相関を有する。 $\rho = 0.67$, $*P < 0.05$ 。

3) アクロレイン刺激は網膜血管内皮細胞および網膜グリア細胞の刺激因子である。

培養網膜血管内皮細胞に対してアクロレイン刺激をおこなうと、高濃度のアクロレインでは細胞死が生じるが、低濃度刺激ではむしろ細胞の生存を増加させることが明らかとなった(図 5)。また、BrdU 取込の検討によっても低濃度アクロレイン刺激は、同細胞の増殖を誘導することが明らかとなった。

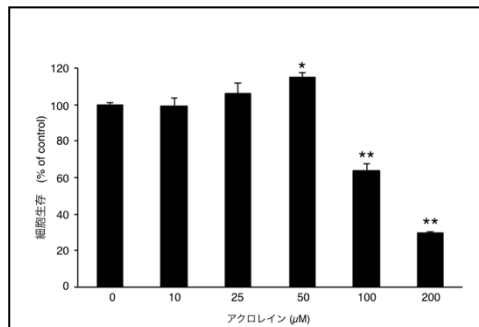


図 5 培養網膜血管内皮細胞の生存に対するアクロレインの効果

高濃度のアクロレインでは細胞死が生じるが、低濃度刺激ではむしろ細胞の生存を増加させる。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

しかしながら、アクロレインの低濃度刺激は vascular endothelial growth factor (VEGF) や tumor necrosis factor- α (TNF- α)、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)、interleukin-6 (IL-6) などの糖尿病網膜症の病態形成に関わるとして従来注目されてきた炎症性サイトカインなどに対する誘導効果は認められなかった。一方、ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) と呼ばれる分子を誘導することが本検討で明らかとなった。HO-1は抗酸化物質として知られる分子だが、近年悪性腫瘍の研究領域ではさまざまな細胞の増殖と遊走に対して促進的に作用することが報告されている分子である。今後、HO-1と今回の検討結果との関連を検討する予定である。

以上、本検討は、アクロレインは単なる毒性物質ではなく、網膜血管内皮細胞や網膜グリア細胞に対して作用することで糖尿病網膜症の病態形成に関与していることを明らかとした。本知見は、今後の糖尿病網膜症病態のさらなる解明、そしてその予防的介入につながる標的分子の探索につながっていくと期待される。

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 16 件)

1. Dong Y, Noda K, Murata M, Yoshida S, Saito W, Kanda A, Ishida S. Localization of acrolein-lysine adduct in fibrovascular tissues of proliferative diabetic retinopathy. *Curr Eye Res.* 2017; 42: 111-117 doi:10.3109/02713683.2016.1150491

2. 齋藤 航. 抗 VEGF 治療セミナー. 抗 VEGF 治療時代における PDT 併用療法のメリット. *あたらしい眼科.* 33: 1163 - 1164, 2016
3. 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.* 2015; 10: e0135925 doi: 10.1371/journal.pone.0135925.
4. 眞島行彦、野田航介. VAP-1 の糖尿病網膜症における基礎研究. 別冊 *Bio Clinica*「慢性炎症と疾患」. 4: 131-137, 2015
5. Hashimoto Y, Saito W, Saito M, Hirooka K, Yoshizawa C, Noda K, Ishida S. Retinal outer layer thickness increases with regression of multiple evanescent white dot syndrome and visual improvement positively correlates with photoreceptor outer segment length. *Acta Ophthalmol.* 2014; 92: 591-592 doi: 10.1111/aos.12413.
6. Hashimoto Y, Saito W, Saito M, Hirooka K, Fujiya A, Yoshizawa C, Noda K, Ishida S. Retinal outer layer thickness increases after vitrectomy for epiretinal membrane and visual improvement positively correlates with photoreceptor outer segment length. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2014; 252: 219-226 doi: 10.1007/s00417-013-2432-2.

[学会発表] (計 8 件)

1. Noda K. Polyamine oxidation in diabetic retinopathy. 11th Japan-Korea International Symposium in Ophthalmology: Hokkaido University Sapporo (Japan), 2016/11/14
2. Noda K, Murata M, Kanda A, Ishida S. Accumulation of acrolein-lysine adduct in the vitreous fluid of proliferative diabetic retinopathy. 49th Annual Retina Society Meeting: San Diego, (USA), 2016/9/14-17
3. 野田航介、村田美幸、神田敦宏、石田 晋. 糖尿病網膜症におけるポリアミン代謝の病態関与. 第22回日本糖尿病眼学会総会、

仙台国際センター（宮城県・仙台市）、
2016/10/7-8

4. Dong Y, Noda K, Saito W, Kanda A, Ishida S. Localization of acrolein-lys adduct in fibrovascular tissues of proliferative diabetic retinopathy. World Ophthalmology Congress 2014 Tokyo: Tokyo International Forum (Japan), 2014/4/2-4
5. Dong Y, Noda K, Yoshida S, Tagawa Y, Ishizuka ET, Inafuku S, Kinoshita S, Murata M, Saito W, Kanda A, Ishida S. Localization of acrolein-lys adduct in fibrovascular tissues of proliferative diabetic retinopathy. 第79回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、北海道大学（北海道・札幌市）、2014/6/19-20

〔図書〕（計 1 件）

1. 齋藤 航. 手術で治す糖尿病黄斑浮腫 (DME) そのサイエンスとアート. 知っているようで知らない新しい糖尿病網膜症診療. メジカル社. 268 (212-217), 2016

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 航 (SAITO, Wataru)
北海道大学・大学院医学研究科・客員研究員
研究者番号：00039160

(2) 研究分担者

野田 航介 (NODA, Kousuke)
北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：90296666

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()