

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462671

研究課題名(和文) 網膜症極前期におけるオートファジー-関連機構を介した血管細胞死メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of autophagy-regulated mechanism of vascular cell death in early 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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病網膜症は、網膜血管細胞死に始まる疾患であり、オートファジーは細胞死を制御する新たなメカニズムとして注目されている。高血糖培養された網膜血管細胞の遺伝子変化を網羅的に解析した。炎症、血栓促進に遺伝子調節が起こることが明らかとなり、特にTGFB2発現誘導が細胞死を仲介していた。高血糖動物においてオートファジーは促進され、TNFによるp62増加を抑制すること、この変化がオートファジー阻害薬により解除されることが示された。オートファジー制御による治療応用への可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Vascular cell death causes diabetic retinopathy and autophagy has been paid attention as a novel cell death mechanism. We compared gene expression between low and high glucose-stimulated vascular endothelial cells. High glucose-stimulation induced inflammatory and thrombotic effects in gene expression profile in vascular cells. TGFB2 specially upregulated and mediated cell death. High glucose condition upregulated autophagy and inhibited TNF-induced P62 increase, which are reversed by inhibition of autophagy reflux. These finding suggests that autophagy regulation could be applied to future treatment strategies.

研究分野：眼科学

キーワード：オートファジー 糖尿病網膜症 網膜血管細胞死

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病網膜症、視神経症は、成人失明の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) 従前の我々の研究成果より網膜症極前期において血管細胞の恒常性を維持し血管を強固にすることで網膜症の発症自体を阻止できることが示唆されている。糖尿病細胞死の機序はアポトーシスが関与することが既知であるが、オートファジーならびにそのシグナル機構の関与については明らかになっていない。オートファジーは自身細胞内含有量を消化するリソソームを介した細胞内バルク分解パスウェイであるが、低栄養状態、低酸素、酸化ストレス、炎症、感染、などにより活性化され、細胞内不要老廃物のクリアランスを図り細胞の自己防御機構として働く上に、Programmed cell death 機構に主要な役割を担っている。糖尿病では高血糖はじめ多様なストレスにより細胞障害が惹起されるため、その細胞死へのオートファジー関連機構の影響が強く示唆され、その制御による細胞保護治療が考慮される。

2. 研究の目的

(1) 高血糖負荷下の網膜細胞や動物モデルにおける細胞死、その関連分子の同定

(2) 高血糖負荷動物におけるオートファジー機構を検討することにより、糖尿病における細胞障害への関与を明らかにする。オートファジー機構への介入による網膜症発症予防や治療応用可能となる新規細胞保護治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 培養血管細胞への高血糖、低血糖負荷による細胞死を検討。

(2) 培養血管細胞での高血糖、低血糖培養における micro RNA array 解析。

(3) 遺伝子ノックアウトによる細胞死への影響の検討。

(4) ストレプトゾトシン (STZ) や組織壊死因子 (TNF) 動物モデルにおけるオートファジー関連物質の定量。

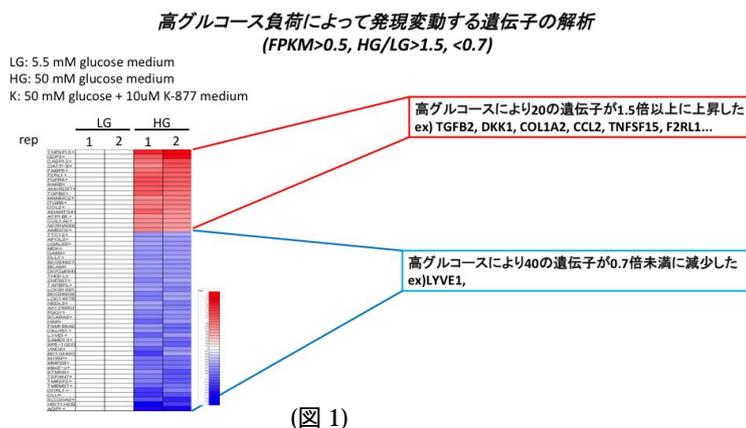
(5) 動物モデルで見出された経路の阻害効果を siRNA を用いて検討し、網膜症に最もインパクトのある分子経路を探求する。

4. 研究成果

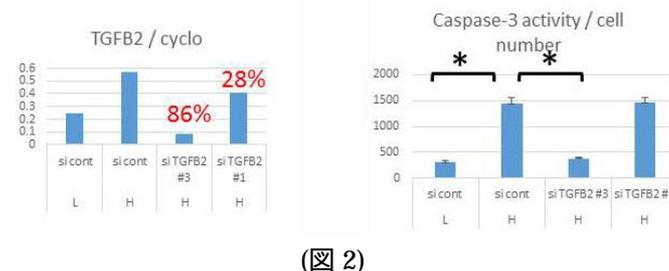
(1) 高血糖培養によりヒト網膜血管内皮細胞の細胞数減少、および caspase 活性の増強がみられた。

(2) microRNA array 解析の結果、従来の microDNA array 解析よりも、正確かつ詳細に変異遺伝子の解析が可能であった。高グルコ

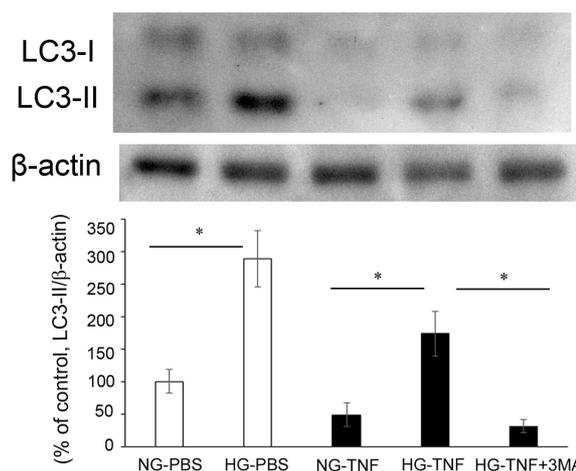
ースにより 20 の遺伝子が 1.5 倍以上に上昇した (TGFB2, DKK1, COL1A2, CCL2, TNFSF15, F2RL1...)。また、高グルコースにより 40 の遺伝子が 0.7 倍未満に減少した (LYVE1 など) (図 1)。



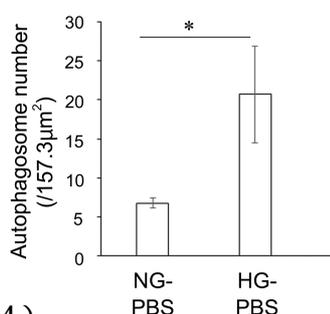
(3) 網膜血管内皮細胞における検討で高血糖により最も顕著に増加した TGFB2 (組織成長因子) を siRNA を用いてノックアウトしたところ、高血糖による caspase 活性の上昇、細胞死の上昇が抑制され、同因子の関与が強く示唆された(図 2)。



(4) STZ 誘発糖尿病ラットにおいて immunoblot で LC-3 II の発現は正常血糖群と比較し高血糖群、TNF 負荷群で有意に上昇していた。また、3-MA を併用するとその変化は抑制された (図 3)。また、電子顕微鏡組織像に

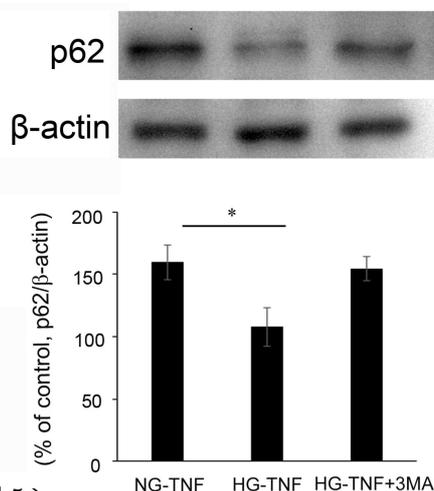


においてもオートファゴゾーム数の増加が確認された(図4)。



(図4)

また、高血糖群ではTNFによるP62発現増加を抑制した(図5)。p62低下はオートファジ



(図5)

ーフラックスの上昇を示すとの報告もあり、STZ誘発高血糖がオートファジーフラックスの増加につながっている可能性が考えられた。これによりSTZ糖尿病ラットにおいて高血糖はオートファジーフラックスを促進する可能性が示唆された。

(5)高血糖と同様にTNFは糖尿病網膜症において炎症を解して主要な病変進展メカニズムを制御している。TNF硝子体注射の影響はP62 siRNAによる遺伝子ノックアウトにより抑制された。これらの結果よりオートファジーリフラックスの制御は網膜症病変を抑制する可能性が示唆された。TGFB2を介する血管内皮細胞死のメカニズムにautophagyの促進が関与しているか、その阻害効果を有する3-MAやrefluxを抑制するP62 siRNAを用いた検討が明らかになることにより、今後より有力な網膜症における血管細胞死抑制治療が見いだされる。

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 13 件)

Sasaki H, Shiono A, Kogo J, Yomoda R, Munemasa Y, Syoda M, Otake H, Kurihara

H, Kitaoka Y, Takagi H.

Inverted internal limiting membrane flap technique as a useful procedure for macular hole-associated retinal detachment in highly myopic eyes. *Eye (Lond)*. 2017 Apr;31(4):545-550.

Kitaoka Y, Tanito M, Kojima K, Sase K, Kaidzu S, Munemasa Y, Takagi H, Ohira A, Yodoi J

Axonal protection by thioredoxin-1 with inhibition of interleukin-1 in *TNF-induced optic nerve degeneration*. *Exp Eye Res* 2016; 152: 71-76.

Mitsui K, Kogo J, Takeda H, Shiono A, Sasaki H, Munemasa Y, Kitaoka Y, Takagi H.

Comparative study of 27-gauge vs 25-gauge vitrectomy for epiretinal membrane. *Eye*. 2016;30: 538-544.

向後二郎, 高木 均.

糖尿病網膜症の病態と病期分類. 新時代の臨床糖尿病学(下), XI 糖尿病合併症の病態・診断・治療, 2 慢性合併症. 日本臨床 74 巻増刊号 2, 2016:112-119.

Sase K, Kitaoka Y, Munemasa Y, Kojima K, Takagi H.

Axonal protection by short-term hyperglycemia with involvement of autophagy in TNF-induced optic nerve degeneration. *Front Cell Neurosci*. 2015 Oct 28;9:425.

Tokuda N, Kitaoka Y, Matsuzawa A, Miyamoto J, Sakae S, Munemasa Y, Takagi H.

The Effect of Rebamipide on Ocular Surface Disorders Induced by Latanoprost and Timolol in Glaucoma Patients. *J Ophthalmol*. 2015;689076. doi: 10.1155/2015/689076. Epub 2015 May 102015

Kitaoka Y, Kojima K, Munemasa Y, Sase K, Takagi H.

Axonal protection by brimonidine with modulation of p62 expression in TNF-induced optic nerve degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2015 Aug;253(8):1291-6.

塩野 陽, 高木 均.

網膜上膜. VI 硝子体網膜界面疾患硝子体・網膜病変の診かた 私はこう診る. 眼科臨時増刊号 2015; 57(4): 591-595.

塩野 陽, 高木 均.

ERMの視機能評価と治療適応. 特集「黄斑疾患診療の進歩」. 眼科 2014; 56(12): 1427-1432.

高木 均.

内科医に伝えたい糖尿病網膜症の基本知識 特集 「どう診る、どうケアする糖尿病の合併症」. *Modern Physician*

2015;35(1):28-31.
塩野 陽, 高木 均.
ERM の視機能評価と治療適応. 特集「黄斑疾患診療の進歩」.眼科 2014;56(12):1427-1432.
高木 均.
糖尿病網膜症診療の展望.Medical View Point 2014;35(9):3.
Kojima K, Kitaoka Y, Munemasa Y, Hirano A, Sase K, Takagi H.
Axonal protection by modulation of p62 expression in TNF-induced optic nerve degeneration. Neurosci Lett. 2014 Aug 20;581C:37-41.

〔学会発表〕(計 20 件)

JIRO KOGO
Microinision vitrectomy surgery and new surgical treatment in macular diseases. International symposium 1 New insights in the treatment and mechanism of retinal diseases, (director: Hitoshi Takagi, Organizer: Hitoshi Takagi, Yasuo Yanagi) 第 121 回日本眼科学会総会,2017.4.6.東京都
塩野 陽
網膜外層評価による網膜循環障害の治療予測.シンポジウム 2 基礎から極める網膜血管機能解析,(オーガナイザー 高木 均,門之園 一明) 第 121 回日本眼科学会総会,2017.4.6.東京都
佐瀬佳奈,北岡康史,宗正泰成,田中千広,高木 均.
短期高血糖による視神経軸索保護とオートファジー関連因子 Beclin1. 第 121 回日本眼科学会総会,2017.4.6.東京都
Yomoda R, Shiono A, Kogo J, Takagi H.
Comparison of Inverted Internal Limiting Membrane Flap Technique With Internal Limiting Membrane Peeling for Macular Morphology in Patients With Large Macular Hole. American Academy of Ophthalmology, 2016.10.17.
シカゴ
高木 均
網膜静脈閉塞症と網膜外層構造、Japan Macula Club 第 18 回学術集会,2016.8.27. 蒲郡市
Kitaoka Y, Sase K, Munemasa Y, Takagi H.
Ripasudil, a ROCK inhibitor, modulates p62 expression in TNF-induced optic nerve degeneration. 2016 annual meeting of The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2016.5.3. Seattle
Munemasa Y, Kitaoka Y, Sase K, Kojima K, Shiono A, Kogo J, Tokuda N, Takagi H.
HistoneH2B, a potential role of cell death ligand, induced RGC death through Toll like receptor 4 in the

vitreous of acute angle closure. 2016 annual meeting of The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2016.5.3. Seattle
Kogo J, Shiono A, Takagi H.
Swept-source OCT images of sclerotomy site of 27-gauge vitrectomy. 2016 annual meeting of The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2016.5.3. Seattle
Shiono A, Sasaki H, Kogo J, Takagi H.
Evaluation of inverted internal limiting membrane flap technique in the treatment for macular hole-associated retinal detachment in high myopia. 2016 annual meeting of The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2016.5.3. Seattle
Sase K, Kitaoka Y, Munemasa Y, Takagi H.
Atg4A in axonal protection by short-term hyperglycemia in TNF-induced optic nerve degeneration. 2016 annual meeting of The Association for Research in Vision and Ophthalmology, 2016.5.3. Seattle
塩野 陽, 四方田 涼, 向後二郎, 高木 均
網膜静脈分枝閉塞症に対するラニピズマブ硝子体投与における網膜外層評価の有用性, 第 120 回日本眼科学会総会,2016年4月7日,仙台
宗正泰成,佐瀬佳奈,塩野 陽,小島 香,向後二郎,徳田直人,北岡康史,高木 均
急性閉塞隅角症における HistoneH2B と網膜神経節細胞死, 第 120 回日本眼科学会総会,2016年4月7日,仙台
四方田 涼,塩野 陽,向後二郎,高木 均.
円孔底径 > 800 μ m 黄斑円孔硝子体手術における術後黄斑形態, 第 120 回日本眼科学会総会,2016年4月8日,仙台
北岡康史,佐瀬佳奈,宗正泰成,高木 均.
TNF 誘発視神経障害における SARM1, 第 120 回日本眼科学会総会,2016年4月8日,仙台
佐瀬佳奈, 北岡康史, 宗正泰成, 高木 均.
短期高血糖による視神経軸索保護とオートファジー関連因子 Atg4B, 第 120 回日本眼科学会総会,2016年4月8日,仙台
高木 均
「糖尿病網膜症発症機序におけるジアシルグリセロールとプロテインキナーゼ C シグナル伝達の役割」ワークショップ DG シグナリングと糖尿病関連疾患, 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会,2015年12月2日,神戸.
Kitaoka Y.

Autophagy in the high IOP-and TNF-induced axonal degeneration. C-S-7. Pathogenesis of retinal ganglion cell death in glaucoma animal models. 6th World Glaucoma Congress. 2015.6.7, Hong Kong

Munemasa Y, Sase K, Kojima K, Kitaoka Y, Takagi H.

Activation autophagy in the optic nerve of senescence accelerated mice. 6th World Glaucoma Congress. 2015.6.7, Hong Kong

Sase K, Kitaoka Y, Munemasa Y, Takagi H.

Axonal protection by short-term hyperglycemia with involvement of autophagy in TNF-induced optic neuropathy. 6th World Glaucoma Congress. 2015.6.7, Hong Kong

Kitaoka Y, Kojima K, Munemasa Y, Sase K, Takagi H.

Axonal protection by brimonidine with modulation of P62 expression in TNF-induced optic nerve degeneration. 6th World Glaucoma Congress. 2015.6.7, Hong Kong

〔図書〕(計 5 件)

塩野 陽、高木 均、医学書院、網膜中心静脈閉塞症 今日の眼疾患治療指針 第3版、2016、492-494.

塩野 陽、高木 均、医学書院、網膜静脈分枝閉塞症 今日の眼疾患治療指針 第3版、2016、494-496.

Kitaoka Y, Springer、Axonal Degeneration. Neuroprotection and Neuroregeneration for Retinal Diseases、2014、123-132

Munemasa Y, Springer、Molecular Architecture of Glutamate Signaling Pathway in Glaucomatous Optic Neuropathy. Neuroprotection and Neuroregeneration for Retinal Diseases、2014、3-12

高木 均、医学書院、糖尿病網膜症 今日の治療指針 私はこう治療している、2014、1379-1381.

〔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：7028596

(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・准教授

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

(3)連携研究者

高倉信幸 (TAKAKURA, Nobuyuki)

大阪大学・微生物学研究所・教授

研究者番号：80291954

古家大祐 (KOYA, Daisuke)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：70242980