

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11282

研究課題名(和文) 糖尿病網膜症におけるエピジェネティックな制御機構の解明による新しい病態概念の確立

研究課題名(英文) Establishment of new pathological concept by elucidation of epigenetic control mechanism in diabetic retinopathy

研究代表者

高村 佳弘 (Takamura, Yoshihiro)

福井大学・学術研究院医学系部門・准教授

研究者番号：00283193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：網膜虚血性疾患のモデル生物として、高酸素誘導マウスモデル(OIR)を作成した。P7を生理的血管新生、P17 OIRを病的血管新生のサンプルと定義した。マイクロアレイ解析の結果、生理的状況でのみ変動を示したものとしてAqp1, Btg1, Cxcr4, F3の4遺伝子、病的状況でのみ変動を示したものとしてAdmが抽出された。病的血管新生のピークであるP17の時点で発現量の変動が確認された1321プローブの中から、ヒストン脱メチル化に関わるKdm3aが見出された。本結果から低酸素応答の遺伝子の中でも、発現量の変化は状況に応じて生理的と病的な血管新生の間で使い分けされている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの眼科領域では、正常と病的血管新生どちらの状況においても血管新生の誘導は低酸素応答であり、転写制御の違いについては注目されてこなかった。本結果から低酸素応答の遺伝子の中でも、発現量の変化は状況に応じて「使い分け」されている可能性が示唆された。この病態の仕組みにおける解明をさらに進めることで、生理的な血管の機能性を保存しつつ、病的な発現機構のみを制御する新たな治療戦略の構築が可能となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：As a model organism for retinal ischemic disease, a hyperoxia-induced mouse model (OIR) was created. P7 was defined as a physiological angiogenesis sample, and P17 OIR was defined as a pathological angiogenesis sample. As a result of microarray analysis, 4 genes of Aqp1, Btg1, Cxcr4, and F3 were extracted as those showing changes only under physiological conditions, and Adm was extracted as those showing changes only under pathological conditions. Kdm3a involved in histone demethylation was found in the 1321 probe whose expression level was confirmed to change at P17, which is the peak of pathological angiogenesis. These results suggest that, among hypoxia-responsive genes, changes in the expression level may be used properly depending on the situation, between physiological and pathological angiogenesis.

研究分野：眼科

キーワード：虚血性網膜疾患 エピジェネティクス VEGF サイトカイン 血管新生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

後天性失明の主な要因である糖尿病網膜症は、持続した高血糖により発症し同じ遺伝子の支配を受けているにも関わらず、その発症や進行において個体差や左右差が少なからず生じる。我々はこの理由を説明できうる機序としてエピジェネティックな制御機構の関与を考えた。

2. 研究の目的

本研究における目的は、糖尿病動物モデル、糖尿病網膜症患者から手術で得た増殖組織を用いて解析し、エピジェネティックな制御が関与する病態を明らかにすること。

3. 研究の方法

網膜虚血性疾患のモデル生物として、新生児期に起こる「生理的血管新生」と、網膜血管網の形成後に虚血となることで誘導される「病的血管新生」の比較が可能である点から、高酸素誘導マウスモデル (OIR) を採用した。このモデルでは、生後7日齢 (P7) の子供マウスを、母親とともに5日間、75%の高酸素条件下で生育した後、P12の時点で再び大気中に戻すことで病的血管新生を誘導した。P7、P12、P17、P25におけるControl群とOIR群について、マイクロアレイ解析を行った。

4. 研究成果

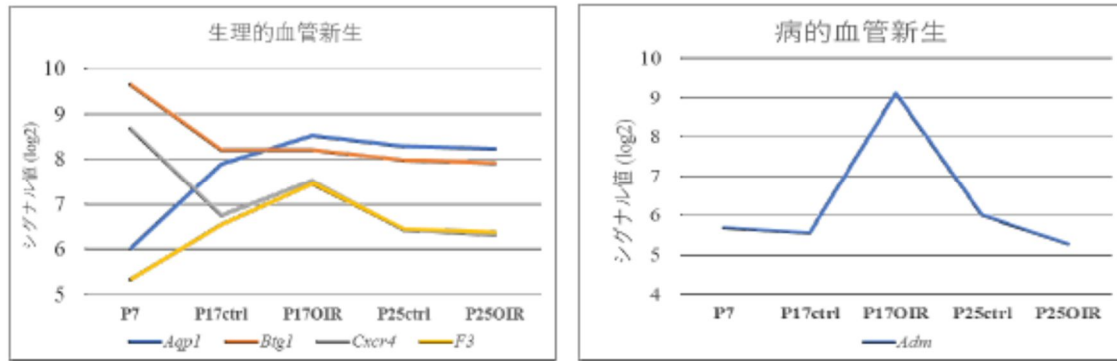
新生血管はP17を境に消退していき、P25の時点で正常状態へと回復した。各時点の網膜血管の様子は、網膜の摘出後 Isolectin B4 によって血管内皮を染色することで観察した。VEGFの転写量はP17でピークを迎えた。マウスの網膜血管は、生後一週間 (P0-8) の段階で、表層において視神経乳頭を中心に放射状に伸長していくことが知られているため、P7を「生理的血管新生」のサンプル、P17 OIRを「病的血管新生」のサンプルと定義し、マイクロアレイ解析を行った。

マイクロアレイ解析結果

この解析では、P7を正常血管新生のサンプル、P17 OIRを病的血管新生のサンプル、またP17 Control、P25 Control および P25 OIRを網膜血管新生に関わらないサンプルとし、ヒートマップを作成することでサンプル間の遺伝子発現パターンの比較を行った。そこでまず、既に血管新生の誘導における重要な役割が報告されている転写因子 HIF (hypoxia inducible factor) による転写制御について、正常と病的な血管新生では応答する遺伝子が異なるのかどうかを確認した。ここでは、Hypoxia response gene の Gene Set を用い、細胞の低酸素処理 (虚血状態の組織を想定) によって発現の変動が確認されている遺伝子群の発現量をサンプル間で比較した。血管新生とは関連しないサンプルである P17 Control、P25 の Control および OIR では全体として大きな発現量の変化は認められなかった。一方で、P7 と P17 OIR では明らかに異なる結果を示した。さらに、Angiogenesis の Gene Set を用いて同様の解析を行った結果、こちら P17 OIR と P7 のサンプル間で発現パターンが異なっていることが確認できた (図 2 B)。

そこで次に、「生理的血管新生」あるいは「病的血管新生」のみで特異的に機能する血管新生因子の絞り込みを行った。ここでは、Angiogenesis の Gene Set に含まれる遺伝子について、P7 もしくは P17 OIR でのみ発現傾向の異なるという条件のもと絞り込みを行った。その結果、生理的状況でのみ変動を示したのものとして Aqp1, Btg1, Cxcr4, F3 の 4 遺伝子、病的状況でのみ変動を示したのものとして Adm が抽出された (図 1)。

図1 生理的・病的な血管新生において特異的に機能する遺伝子のシグナル変化

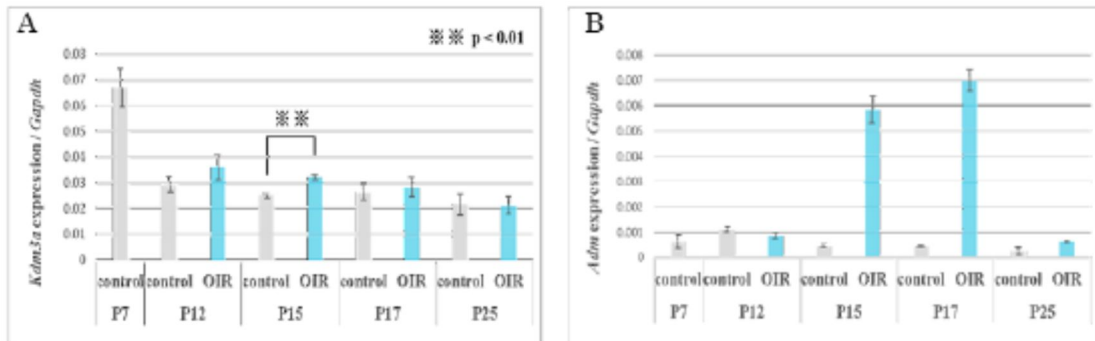


この解析では病的血管新生のピークである P17 の時点で発現量の変動が確認された 1,321 プローブ ($p < 0.05$) の中から、エピジェネティック制御に関わる遺伝子の抽出を行った。結果として、DNA のメチル化に関わる遺伝子の変動は確認できなかったものの、ヒストン脱メチル化に関わる Kdm3a が有意に変動していることが見出された。興味深いことに、KDM3A は解析 1 において病的血管新生のサンプルのみで発現の変動を示した Adm の転写活性化に寄与していることが報告されている。

次に、抽出された遺伝子の転写量を RT-qPCR 法により定量した (図 2)。まず、Kdm3a の定量結果について、マイクロアレイ解析で変動していた P17 時点で、Control の結果と比較して有意差は認められなかった。しかしながら、それ以前の P15 の時点における有意な発現量の増加が確認できた。この結果について、KDM3A が血管新生因子の転写活性化を誘導し、OIR モデルの病的血管新生の誘導に関わっているのであれば、Kdm3a 自身の発現は血管新生のピークである P17 よりも前の時点で変動するものとして解釈した。実際に、KDM3A が標的としている血管新生因子 Adm について、この遺伝子の転写は P15、P17 の時点でのみ高く発現していることが確認できた。

以上の結果から、KDM3A による転写活性化が本疾患の病的血管新生の誘導に関わる可能性が示唆された。さらに興味深い結果として、P7 時点での転写量を比較したところ、Kdm3a は高く発現しているにもかかわらず、Adm の転写量は対応していないことが確認できた。ここでも、「正常」と「病的」血管新生における転写制御機構の違いが明確に示されている。

図2 生理的・病的な血管新生において特異的に機能する遺伝子の転写量の変化



これまでの眼科領域では、「正常」と「病的」血管新生どちらの状況においても血管新生の誘導は低酸素応答であり、転写制御の違いについては注目されてこなかった。本結果から低酸素応

答の遺伝子の中でも、発現量の変化は状況に応じて「使い分け」されている可能性が示唆された。ここまでの結果を踏まえて、我々は、病的虚血に特徴的なエピジェネティックな修飾因子を特定し、新規の治療標的とすることで「病的血管新生」のみを阻害する、あるいは生理的血管新生を促す治療が実現するのではないかと期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|---------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 稲谷 大 (Inatani Masaru) (40335245) | 福井大学・学術研究院医学系部門・教授 (13401) | |
| 研究分担者 | 沖 昌也 (Oki Masaya) (60420626) | 福井大学・学術研究院工学系部門・教授 (13401) | |
| 研究協力者 | 有村 尚吾 (Arimura Syougo) | | |
| 研究協力者 | 後沢 誠 (Gozawa Makoto) | | |
| 研究協力者 | 松村 健大 (Matsumura Takehiro) | | |