

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11442

研究課題名(和文) 糖尿病網膜症における毒性アルデヒド-アクロレインの産生機構

研究課題名(英文) Mechanism of acrolein generation in diabetic retinopathy

研究代表者

村田 美幸 (Murata, Miyuki)

北海道大学・医学研究院・特任助教

研究者番号：50423752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Vascular adhesion protein (VAP)-1は血管内皮細胞に発現するタンパクであり、白血球接着分子として炎症に関与する一方、アミン酸化酵素としての活性も有する。アクロレインは高反応性の不飽和アルデヒドであり、外因性の毒性物質として煙草などに含まれる他、ポリアミンと呼ばれる生体内分子の酸化などにより内因性にも産生されることが近年報告されている。我々は糖尿病網膜症患者の硝子体においてアクロレイン結合蛋白とVAP-1が共に増加し、正の相関を示すことを見出した。本研究により、VAP-1がポリアミンの一種であるスベルミンを酸化してアクロレインを生成することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病網膜症の病態形成には、炎症と酸化ストレスの亢進が重要な役割を果たす。本研究では、白血球接着分子として炎症を促進する分子であるVAP-1が、糖尿病網膜症患者の硝子体中で増加するスベルミンを基質として、不飽和アルデヒドであるアクロレインを生成し、酸化ストレスの亢進にも関与することを明らかにした。本研究により糖尿病網膜症の病態形成の新たなメカニズムが明らかになり、新規治療法の開発につながる重要な知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Vascular adhesion protein-1 (VAP-1) expresses in vascular endothelial cells and involved in inflammation as a leukocyte adhesion molecule. In addition to its role as an adhesion molecule, VAP-1 also has enzymatic activity as an amine oxidase. Acrolein is a highly reactive unsaturated aldehyde and is included in cigarettes and so on as an exogenous pollutant. Recently it has been shown that acrolein is also produced endogenously as a consequence of polyamine oxidation. We found that the levels of the acrolein-conjugated protein are elevated in the vitreous fluid of patients with diabetic retinopathy (DR). VAP-1 protein levels are also elevated in the vitreous fluid of DR patients and correlated with acrolein-conjugated protein levels. In this study, we showed that VAP-1 generates acrolein by oxidizing the spermine, a kind of polyamine.

研究分野：眼細胞生物学

キーワード：眼細胞生物学 糖尿病網膜症 アクロレイン 酸化ストレス VAP-1

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者は全世界で急速に増加している。International Diabetes Federation (IDF) によれば、2017 年における糖尿病患者数は約 4 億 2500 万人である。また、糖尿病の合併症の一つである糖尿病網膜症 (図 1) は糖尿病罹病期間にともなってその発症率が急増する細小血管障害であり、世界的な高齢化にともなって糖尿病網膜症を有する糖尿病患者数も今後増加すると推測されている。

糖尿病網膜症は、網膜毛細血管の構成成分である血管内皮細胞やペリサイトが高血糖による直接的な障害や高血糖によって惹起される炎症や酸化ストレスなどの間接的な障害を受けることによって生じる。我々は、これまで糖尿病網膜症の病態メカニズムにおける炎症と酸化ストレスの関与に着目して検討を進め、この両者に関連する分子 Vascular adhesion protein (VAP)-1 を主な研究対象としてきた。VAP-1 は血管内皮細胞に発現するタンパクであり、白血球接着分子として白血球の血管外遊走を促進して炎症に関与する一方、semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) として生体内に存在する一級アミンを酸化してアルデヒド、アンモニアおよび過酸化水素を産生する。先行研究 (基盤研究(C) 24592615) で我々は、糖尿病網膜症患者の硝子体において VAP-1 が増加し酸化ストレス亢進の原因となっていることを示した(図 2) [Murata M, Noda K et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012; 53: 4055-62]。しかしながら、酸化ストレス亢進の詳細な機序を同検討で解明することはできなかった。

アクロレインは煙草などに含まれる高反応性の不飽和アルデヒドであり、抗酸化物質グルタチオンに結合し、細胞内グルタチオンを減少させることで酸化ストレスを亢進させる。これまで外因性の毒性物質として知られていたが、近年内因性にも産生されることが明らかとなり、酸化ストレスの関与する様々な疾患で注目されている。生体内でのアクロレインの産生経路の一つとしてポリアミン酸化がある。ポリアミンとは分子中にアミノ基を 2 つ以上含む低分子の塩基性物質であり、ヒトの生体内にはプトレスシン、スペルミジンとスペルミンが主に存在する。これらの中で、スペルミジンとスペルミンが糖尿病網膜症眼内で増加していることが報告されており [Nicoletti R et al. Br J Ophthalmol. 2003;87:1038-1042.]、その病態における意義が注目されている。牛血清存在下で培養した細胞にスペルミンを添加すると細胞毒性が観察されることが現象として古くから知られていた。これは牛血清中に存在する SSAO がスペルミンを酸化してアクロレインや過酸化水素を産生するためであることがわかっている [Sharmin S et al. Biochem Biophys Res Commun., 2001; 282: 228-235.]。ヒトの SSAO である VAP-1 も同様にポリアミン酸化に関与する可能性が示されている [Tipnis UR et al. Toxicol In Vitro. 1998;12:233-40.]。我々の検討により、糖尿病網膜症患者の硝子体においてアクロレインと VAP-1 が共に増加し、両者が正の相関を示すことが明らかになっている。しかし、VAP-1 がアク

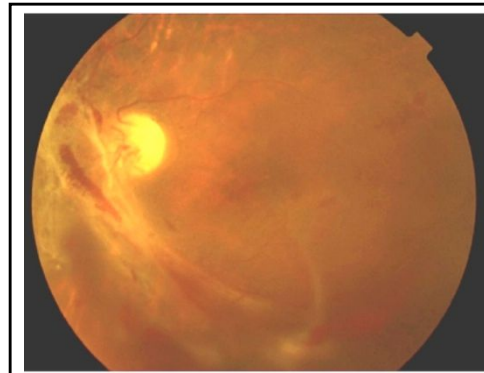


図 1 糖尿病網膜症

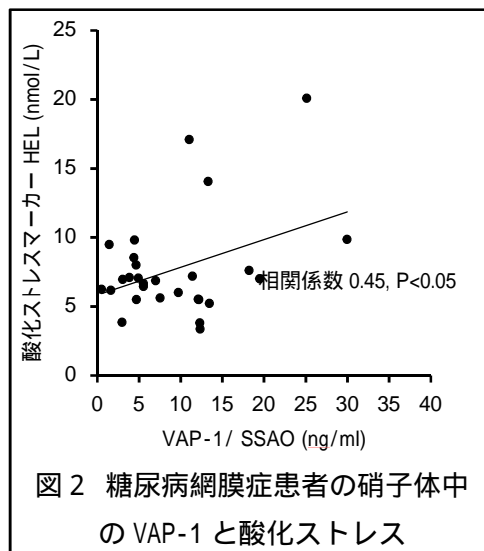


図 2 糖尿病網膜症患者の硝子体中の VAP-1 と酸化ストレス

ロレインを産生するかどうかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は糖尿病網膜症におけるアクロレイン産生の機序を解明することである。

3. 研究の方法

VAP-1 によるアクロレイン産生を調べるため、組換えヒト VAP-タンパク (recombinant human VAP-1, rhVAP-1) とポリアミンを各種条件で反応させ、過酸化水素およびアクロレインが生成されるかを解析した。また、増殖糖尿病網膜症 (proliferative diabetic retinopathy, PDR) 患者の線維血管組織において免疫染色をおこない、アクロレイン結合タンパクと VAP-1 の組織内の局在を検討した。続いて、培養ラット網膜血管内皮細胞 TR-iBRB2 を用い、スペルミンの添加および VAP-1 の発現亢進によりアクロレイン産生が増加するかを調べた。また、先行研究 (基盤研究(C) 24592615) により、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF) - α やインターロイキン (interleukin, IL) -1 α などの炎症性サイトカインにより網膜血管内皮細胞からの VAP-1 の分泌が増加することが判明していることから (図 3) [Murata M, Noda K et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012; 53: 4055-62]、TR-iBRB2 を TNF- α で刺激して VAP-1 分泌を亢進させた条件においてもアクロレイン産生が増加するか検討した。さらに、同条件での細胞の酸化ストレスマーカーを測定した。

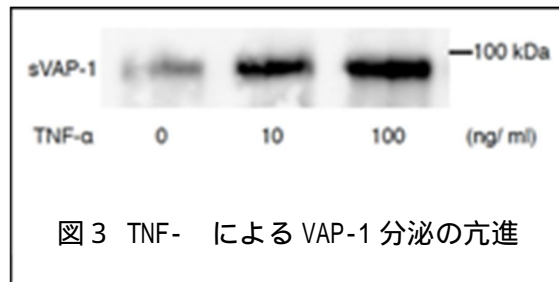


図 3 TNF- α による VAP-1 分泌の亢進

続いて、培養ラット網膜血管内皮細胞 TR-iBRB2 を用い、スペルミンの添加および VAP-1 の発現亢進によりアクロレイン産生が増加するかを調べた。また、先行研究 (基盤研究(C) 24592615) により、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF) - α やインターロイキン (interleukin, IL) -1 α などの炎症性サイトカインにより網膜血管内皮細胞からの VAP-1 の分泌が増加することが判明していることから (図 3) [Murata M, Noda K et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012; 53: 4055-62]、TR-iBRB2 を TNF- α で刺激して VAP-1 分泌を亢進させた条件においてもアクロレイン産生が増加するか検討した。さらに、同条件での細胞の酸化ストレスマーカーを測定した。

4. 研究成果

試験管内で rhVAP-1 をスペルミンと反応させると、rhVAP-1 の濃度依存的に過酸化水素が生成されるという結果を得た。また条件検討により、反応バッファーの至適条件が判明した。この条件において rhVAP-1 とスペルミンを反応させ、血清アルブミンを加えアクロレイン結合タンパクを enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で測定したところ、rhVAP-1 の濃度依存的にアクロレイン結合タンパクが増加した。この反応は、VAP-1 阻害剤により抑制された (図 4)。これらの結果は、rhVAP-1 がスペルミンを基質として過酸化水素とアクロレインを生成することを示した。さらに、PDR 患者の線維血管組織において、アクロレイン結合タンパクと VAP-1 が血管内皮細胞に共局在するという結果を免疫染色により得た (図 5)。

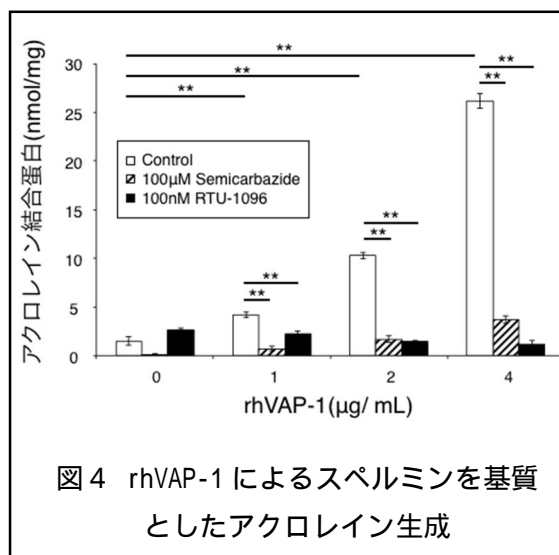


図 4 rhVAP-1 によるスペルミンを基質としたアクロレイン生成

過酸化水素とアクロレインを生成することを示した。さらに、PDR 患者の線維血管組織において、アクロレイン結合タンパクと VAP-1 が血管内皮細胞に共局在するという結果を免疫染色により得た (図 5)。

培養ラット網膜血管内皮細胞 TR-iBRB2 にスペルミンを添加すると、アクロレイン結合タンパクが増加した。VAP-1 を過剰発現させた TR-iBRB2 を TNF- α で刺激して VAP-1 分泌を亢進させると、スペルミン添加による培養上清中のアクロレイン生成が増加した（図 6）。さらに、TR-iBRB2 へのアクロレイン添加により、抗酸化物質グルタチオンの減少と活性酸素種(Reactive Oxygen Species, ROS)の増加がみられた。rhVAP-1 とスペルミンの反応物を添加した場合も、同様にグルタチオンの減少と ROS の増加が認められた。

これらのことから、VAP-1 がスペルミンを基質としてアクロレインを生成し、網膜血管内皮細胞の酸化ストレスを亢進させることが明らかになった。

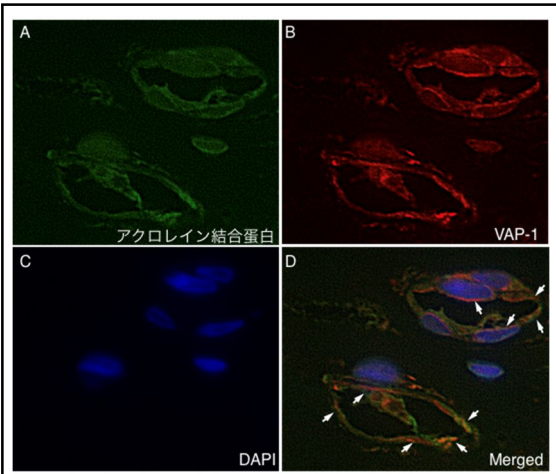


図 5 PDR 患者の線維血管組織におけるアクロレイン結合蛋白(緑)と VAP-1(赤)

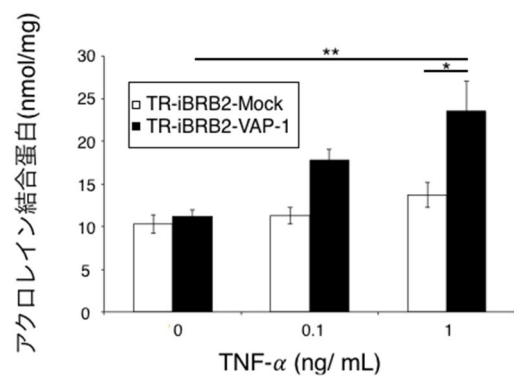


図 6 VAP-1 分泌の亢進によるアクロレイン生成の増加

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Murata Miyuki, Noda Kousuke, Yoshida Shiho, Saito Michiyuki, Fujiya Akio, Kanda Atsuhiko, Ishida Susumu	4. 巻 60
2. 論文標題 Unsaturated aldehyde acrolein promotes retinal glial cell migration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci	6. 最初と最後の頁 4425-4435
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/iovs.19-27346.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida Shiho, Murata Miyuki, Noda Kousuke, Matsuda Takashi, Saito Michiyuki, Saito Wataru, Kanda Atsuhiko, Ishida Susumu.	4. 巻 62
2. 論文標題 Proteolytic cleavage of vascular adhesion protein-1 induced by vascular endothelial growth factor in retinal capillary endothelial cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Jpn J Ophthalmol	6. 最初と最後の頁 256-264
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10384-017-0555-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Matsuda Takashi, Noda Kousuke, Murata Miyuki, Kawasaki Akiko, Kanda Atsuhiko, Mashima Yukihiko, Ishida Susumu	4. 巻 58
2. 論文標題 Vascular Adhesion Protein-1 Blockade Suppresses Ocular Inflammation After Retinal Laser Photocoagulation in Mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci	6. 最初と最後の頁 3254-3261
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/iovs.17-21555	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Murata Miyuki, Noda Kousuke, Kawasaki Akiko, Yoshida Shiho, Dong Yoko, Saito Michiyuki, Dong Zhenyu, Ando Ryo, Mori Shohei, Saito Wataru, Kanda Atsuhiko, Ishida Susumu	4. 巻 42
2. 論文標題 Soluble Vascular Adhesion Protein-1 Mediates Spermine Oxidation as Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase: Possible Role in Proliferative Diabetic Retinopathy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Curr Eye Res	6. 最初と最後の頁 1674-1683
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/02713683.2017.1359847	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Wu D, Noda K, Murata M, Liu Y, Kanda A and Ishida S
2. 発表標題 Hypoxia inducible factor-1 regulates spermine oxidase leading to acrolein generation in Muller Glial cells
3. 学会等名 Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊地香澄、野田航介、村田美幸、田川義晃、神田敦宏、加瀬 諭、影山 靖、篠原雅巳、笹瀬智彦、石田 晋
2. 発表標題 Spontaneously Diabetic Torii fatty ラットにおける糖尿病白内障の検討
3. 学会等名 第123回日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wu D, Murata M, Noda K, Liu Y, Kanda A, Ishida S
2. 発表標題 Hypoxia aggravates acrolein generation via HIF-1/SMOX pathway in glial cells
3. 学会等名 第123回日本眼科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村田美幸、野田航介、長谷敬太郎、Wu Di、神田敦宏、石田 晋
2. 発表標題 網膜色素上皮細胞における胎盤成長因子による血管内皮増殖因子受容体-2の安定化機序
3. 学会等名 第25回日本糖尿病眼学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊地香澄、野田航介、村田美幸、神田敦宏、加瀬 諭、影山 靖、篠原雅巳、笹瀬智彦、石田 晋
2. 発表標題 Spontaneously Diabetic Torii fatty ラット網膜における炎症性サイトカインの発現解析
3. 学会等名 第25回日本糖尿病眼学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村田美幸、野田航介、長谷敬太郎、神田敦宏、石田 晋
2. 発表標題 網膜色素上皮細胞における胎盤成長因子のアポトーシス抑制効果
3. 学会等名 第57回日本網膜硝子体学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤谷顕雄、野田航介、村田美幸、神田敦宏、石田 晋
2. 発表標題 増殖糖尿病網膜症患者の硝子体中アクロレイン結合蛋白とCXCL1濃度
3. 学会等名 第72回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村田美幸、野田航介、長谷敬太郎、神田敦宏、石田 晋
2. 発表標題 網膜グリア細胞の遊走能に対するアクロレインの作用
3. 学会等名 第22回眼科分子生物学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Noda K, Murata M, Saito W, Kanda A, Ishida S
2. 発表標題 Accumulation of acrolein-conjugated protein in the vitreous fluid of proliferative diabetic retinopathy
3. 学会等名 Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔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	野田 航介 (Noda Kousuke) (90296666)	北海道大学・医学研究院・准教授 (10101)	