

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09404

研究課題名(和文)コハク酸シグナルとエリスロポエチンによる糖尿病黄斑症の血管強化療法開発

研究課題名(英文)Retinal vascular regeneration for diabetic macular edema by succinate & erythropoietin

研究代表者

鈴間 潔 (Suzuma, Kiyoshi)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：80335265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：基礎の研究室と共同で細胞培養のシステムが使用可能となった。細胞伸展刺激装置を購入しcardiac profileで細胞を伸展刺激することが可能となった。今後高血圧の分子メカニズムを研究することが可能となった。硝子体手術中に硝子体液を採取し増殖因子の濃度を測定する研究が香川大学の倫理委員会に承認された。実際の運用を開始した。眼底血流解析装置、網膜血管酸素分圧測定装置を用いて外来患者の眼底評価をルーチンで行う体制を整えた。医師だけで研究活動をするのは限界があるため、研究クランクをあらたに2名雇用した。今後は細胞培養や硝子体サンプルの処理、網膜血流や酸素分圧の結果解析などを依頼できるようになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コハク酸はVEGFだけでなくAng1などの血管安定化因子も誘導する必要不可欠な因子であることも報告されており正常な血管の再構築に役立つ因子である可能性がある。実験的網膜新生血管ではエリスロポエチンを阻害するとVEGF阻害と同等の抑制効果が得られ、VEGFとエリスロポエチンの両方を阻害するとさらに強い阻害効果が得られた。VEGFは血管増殖と血管透過性亢進の作用を有し、エリスロポエチンは血管透過性亢進作用をもたないことから増殖網膜症にはエリスロポエチンとVEGFの両者が、糖尿病黄斑症にはVEGFが主に関与しているということが示唆される。糖尿病網膜症の治療、社会的失明患者の減少に役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Principle investigator (PI) moved to Ophthalmology, Kagawa University. PI set up cell culture system there, and introduced FLEXCELL cell extension system. It became possible to investigate effects of mechanical stress for intracellular signaling & retinal neovascularization in diabetic eye diseases. For human study, PI set up a system for sampling aqueous humor & vitreous for evaluation of cytokines or growth factors in diabetic macular edema & proliferative diabetic retinopathy. In addition, laser speckle flow graphy & retinal oxymap were introduced for real-time measurement for physiological retinal blood flow or oxygen saturation. New 2 technicians are employed for assistances.

研究分野：眼科学

キーワード：糖尿病網膜症 エリスロポエチン コハク酸

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症は成人の失明原因として主要な割合を占めており、その病態解明・治療法の確立が非常に重要な問題となっている。これまで研究代表者は VEGF 自体やその調節機構の制御に関して数々の研究成果をあげてきた(Suzuma K, Proc Natl Acad Sci U S A 2002:99:721, Suzuma K, J Biol Chem 2000:275:40725)。また高血圧と酸化ストレスによる網膜血管脱落のメカニズム(Suzuma I, Hypertension 2007:49:347)や血管成熟に關与する増殖因子であるアンギオポエチン-1 (Ang1) と動静脈分化に關与する ephrin-Eph ファミリーの網膜血管安定化作用 (Murakami T, J Biol Chem 2005:280:31841, Ojima T, Am J Pathol 2006:168:331)についてもデータを蓄積している。またエリスロポエチンが増殖糖尿病網膜症の眼内で VEGF と同等かそれ以上に病態の形成に深くかかわっていることも見出した(Watanabe D, N Engl J Med:2005:353:782)。最近、Sapieha らは網膜血管新生において独立して働く因子としてコハク酸の役割を報告した (Sapieha P, Nat Med 2008)。研究代表者らは糖尿病黄斑症に關係する血管安定化因子を検索するため手術時に採取した硝子体中のサイトカイン濃度を検討したところ驚くべきことに増殖糖尿病網膜症において硝子体中のコハク酸濃度が有意に上昇していることを発見した(Matsumoto M, Am J Ophthalmol 2012)。コハク酸濃度と血管内皮増殖因子(VEGF)やエリスロポエチンの濃度は強い相関を示さなかったことからコハク酸は眼内で独立した血管作用因子であることが推察される。また高血圧は糖尿病網膜症の増悪因子あることが広く知られているが、高血圧を模倣した細胞伸展刺激で細胞内コハク酸濃度の上昇が認められることも発見した (Kinoshita H, Invest Ophthalmol Vis Sic 2014)。近年は眼科領域でも抗 VEGF 療法は一般的に行われるようになり劇的な効果が認められることもあるが、慢性の血管透過性亢進など効果が弱い病態や疾患もあることがわかってきた。そこで研究代表者らは新しい眼内血管新生促進因子であるコハク酸やエリスロポエチン、Ang1-Tie2, ephrin-Eph システムなどの増殖因子と、幹細胞である iPS 細胞、その下流の Akt などの血管安定化シグナルを積極的に利用することにより、VEGF を抑制するだけでなく透過性の亢進した病的毛細血管に正常のタイトジャンクションを再生し、周皮細胞をリクルートすることによる血管強化療法の開発を企画した。

2. 研究の目的

本研究の第1の特色は治療応用で HIF1 結合部位を発現ベクターに組み込むことにより網膜無血管領域でのみ目的遺伝子が発現するような、選択的治療法の開発を目指している点である。第2の特色は、我々がこの研究遂行の上で非常に有利な立場にある点である。研究代表者は、網膜血管細胞・網膜血管新生動物モデルを用いた最先端の技術を修得しており世界的にも認められている。コハク酸のシグナル解析に不可欠な抗体や発現ベクターは Sapieha ら (モントリオール大学) から分与される準備が整っている。VEGF レセプター2を選択的に刺激し透過性の低い血管を形成させる VEGF-E については東京医科歯科大学渋谷正史教授と、細胞内シグナル関係では国立国際医療研究センター研究所糖尿病研究センター長植木浩二郎先生とも共同研究の予定である。iPS 細胞では高橋政代先生 (理化学研究所) 血管再生では植村明嘉教授 (名古屋市立大学) と協力関係を築いている。このような状況より分子機構の解明から、臨床応用可能な段階まで速やかに研究が展開されることが約束されている。

(3)本研究で何をどのように、どこまで明らかにしようとするのか

1.細胞レベルでの検討 網膜血管を形成する内皮・周皮細胞、網膜血管周囲を形成するグリア・神経細胞による *in vitro* の系において高血糖・酸化ストレスを負荷することにより Akt などの細胞生存シグナルと酸化ストレス、JNK などの細胞死シグナル、血管に作用するコハク酸、エリスロポエチン、VEGF, PDGF, IGF などの増殖因子、Fas などの細胞死誘導因子、Ang1, ephrin などの血管安定化因子等について発現を検討し、その結果に基づき阻害実験を行い細胞増殖、生存、透過性がどのように修飾されるかを検討する。

2.網膜組織培養下での検討 網膜を組織培養し、高血糖、酸化ストレス、機械的伸展を負荷、上記1の結果を再確認する。次に iPS 細胞から再生した無血管な 3D retina や高酸素負荷による無血管網膜を作成し、組織培養下で血管の再生を誘導する。血管再生局所にコハク酸レセプター-GPR91、エリスロポエチン、Ang1, ephrin を過剰発現させて成熟した安定な血管網が形成されるかどうか確認する。さらに細胞死シグナルの活性化を抑制、細胞生存シグナルの活性化を促進するべく dominant-negatives, RNAi, 特異的器質配列を持つペプチドの micro-injection などの手技を用いて操作し single cell レベルの動態まで解析する。同時に再生された血管を維持できるメカニズムについても検討する。

3.動物レベルでの検討 マウスで上記2の結果を *in vivo* で確認する。培養血管内皮細胞、周皮細胞、末梢血管内皮前駆細胞、骨髓幹細胞、分化誘導をかけた iPS 細胞に虚血領域で転写活性が上がるプロモータ (HIF1 など) を組み込んだコハク酸レセプター-GPR91、エリスロポエチン、Ang1, ephrin, 種々のシグナル分子の dominant-negative の発現ベクターなどを遺伝子導入後、網膜無血管領域へ移植することにより虚血網膜・病的血管のみを選択的に治療可能か検討

する。

本研究を進展させることにより糖尿病網膜症の理想的な治療法開発への発展が期待できる。

3. 研究の方法

平成 30 年度 細胞レベルでの検討（鈴間、村上）：基礎データとしてコハク酸の網膜細胞に対する作用を明らかにする。網膜血管内皮細胞、周皮細胞による *in vitro* の系においてコハク酸受容体の細胞内シグナル、血管新生、血管透過性への作用を検討する。

1. コハク酸とエリスロポエチンが網膜血管内皮細胞に及ぼす作用を検討する。細胞の増殖、遊走、管腔形成、細胞外マトリックス溶解、に及ぼす影響を検討する。増殖は細胞内 DNA 濃度測定か 3H-thymidine 取り込み能にて測定し、遊走能は boyden-chamber 法、管腔形成はマトリジェルをもちいた *in vitro* の管腔形成により検討する。

2. コハク酸、エリスロポエチンの作用がどのような細胞内シグナル伝達を介しているか検討する。JAK, STAT, PKC, PKA, MAPkinase などの抗燐酸化抗体、阻害剤およびそれらの dominant negative mutant を用いることによりその役割を検討する。

3. 高血糖・酸化ストレスのタイトジャンクションなど血管細胞間の接着に関与する分子の発現量に対する影響を Real time quantitative PCR, Northern blot 解析や Western blot 解析により検討する。またそれらの分子のチロシン、セリンスレオニンリン酸化を抗リン酸化抗体を用いた免疫沈降 western blot により解析する。さらに *In vitro* の透過性を電気抵抗およびアルブミン透過率等を測定する事により検討する。

令和元年度 網膜組織培養下での検討とウイルスベクターの作成（鈴間）：*in vivo* より細胞環境を操作しやすい状況で研究を行う。

1. iPS 細胞から再生した 3D retina、糖尿病モデル動物から網膜組織培養法を用い高血糖、酸化ストレスを負荷、細胞レベルでの発現、シグナルにおける結果を確認する。

2. 高酸素負荷による網膜無血管領域を作成し、血管の再生を誘導し高血糖、酸化ストレスの効果を ZEISS コンフォーカルレーザー顕微鏡と蛍光タイムラプス撮影装置を用いリアルタイムで検討する。さらに血管再生局所にエリスロポエチン, Ang1, ephrinA1 を過剰発現させて成熟した安定な血管網が形成されるかどうか確認する。

令和 2 年度 動物モデルでの検討（鈴間、大音）：トランスジェニックマウスを作成し、長期間の糖尿病による透過性亢進へのコハク酸、エリスロポエチンの作用を検討する。

1. tetracyclin-inducible promoter をエリスロポエチン又はコハク酸レセプターに結合させた DNA を作成し、トランスジェニックマウス作成を依頼する。

2. 培養血管内皮細胞、周皮細胞、iPS 細胞から作成した血管内皮細胞に虚血領域で転写活性が上がるように HIF1 結合部位を持つプロモータを組み込んだエリスロポエチン, Ang1, ephrin, 種々のシグナル分子の dominant-negative の発現ベクターなどを遺伝子導入後、網膜無血管領域へ移植することにより虚血網膜のみを選択的に治療可能か検討する。さらにこれら一連のステップを統合する形で、臨床応用可能な形で糖尿病網膜症に対する薬物治療法、再生治療法を開発する。

研究が当初計画どおりに進まない時の対応

サイトカインにより期待とは相反する結果が出た場合は速やかに対象を VEGF-C や VEGF-E などの他の増殖因子に変更する。Ang1 やアディポネクチンのように多量体を作るとうまくいくこともある。動物実験は計画通りにいかないことも多いが、動物種やモデルを適宜変更すると成功することも多い。

研究体制について

香川大学眼科：鈴間潔（代表・総括・細胞生物学）

京都大学眼科：村上智昭助教（細胞生物学、網膜組織培養）、宇治彰人助教（動物モデル、イメージング）、大音壮太郎講師（発生・再生学、イメージング）、赤木忠道講師（組織化学、動物モデル）

長崎大学眼科：北岡隆教授（組織化学）、築城英子講師（脂質代謝・分子生物学）、松本牧子助教（ELISA・蛋白質免疫・画像処理）、木下博文助教（細胞生物学）、前川有紀助教（細胞生物学）、高見由美子実験助手（研究補助）、浜崎幸子実験助手（研究補助）

国内研究協力者：高橋政代理研チームリーダー（神戸理化学研究所）植木浩二郎センター長（国立国際医療研究センター研究所糖尿病研究センター）、植村明嘉特任教授（名古屋市立大学）渋谷正史名誉教授（東京医科歯科大学）

海外研究協力者：Sapieha P（モントリオール大学）King GL 教授（ハーバード大学）、Aiello LP 教授（ハーバード大学）、Yancopoulos GD（リジェネロン社）

4. 研究成果

研究代表者の異動のため、研究体制を 1 から構築した。最終年度は新型コロナ感染拡大のため研究活動に大きな支障が生じた。

基礎の研究室と共同で細胞培養のシステムが使用可能となった。今後は血管内皮細胞の培養を開始する。細胞伸張刺激装置を購入し cardiac profile で細胞を伸張刺激することが可能となった。今後高血圧の分子メカニズムを研究することが可能となった。硝子体手術中に硝子体液

を採取し増殖因子の濃度を測定する研究が香川大学の倫理委員会に承認された。実際の運用を開始した。laser スペックルフローグラフィ、オキシマップ（網膜血管酸素分圧測定装置）を用いて外来患者の眼底評価をルーチンで行う体制を整えた。地方大学であるので医師だけで研究活動をするのは限界があるため、研究クランクをあらたに2名雇用した。今後は細胞培養や硝子体サンプルの処理、網膜血流や酸素分圧の結果解析などを依頼できるようになった。

以下間接的に関連する論文：

Yoshitake S, Murakami T, Suzuma K, Yoshitake T, Uji A, Morooka S, Dodo Y, Fujimoto M, Shan Y, Fort PE, Ito S, Tsujikawa A, Yoshimura N: Anti-fumarase antibody promotes the dropout of photoreceptor inner and outer segments in diabetic macular oedema. *Diabetologia* 2019;62:504-516.

Tu HY, Watanabe T, Shirai H, Yamasaki S, Kinoshita M, Matsushita K, Hashiguchi T, Onoe H, Matsuyama T, Kuwahara A, Kishino A, Kimura T, Eiraku M, Suzuma K, Kitaoka T, Takahashi M, Mandai M: Medium- to long-term survival and functional examination of human iPSC-derived retinas in rat and primate models of retinal degeneration. *EBioMedicine* 2019;39:562-574.

Yasukura S, Murakami T, Suzuma K, Yoshitake T, Nakanishi H, Fujimoto M, Oishi M, Tsujikawa A: Diabetic Nonperfused Areas in Macular and Extramacular Regions on Wide-Field Optical Coherence Tomography Angiography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018;59:5893-5903.

uda M, Nakanishi H, Akagi T, Murakami T, Suzuma K, Suda K, Kameda T, Morooka S, Ikeda H, Tsujikawa A: Baerveldt or Ahmed glaucoma valve implantation with pars plana tube insertion in Japanese eyes with neovascular glaucoma: 1-year outcomes. *Clin Ophthalmol* 2018;12:2439-2449.

Yoshitake T, Murakami T, Yoshitake S, Suzuma K, Dodo Y, Fujimoto M, Ito S, Tsujikawa A: Anti-Hexokinase 1 Antibody as a Novel Serum Biomarker of a Subgroup of Diabetic Macular Edema. *Sci Rep* 2019;9:4806.

Iida-Miwa Y, Muraoka Y, Iida Y, Ooto S, Murakami T, Suzuma K, Tsujikawa A: Branch Retinal Vein Occlusion: Treatment Outcomes According to the Retinal Nonperfusion Area, Clinical Subtype, and Crossing Pattern. *Sci Rep* 2019;9:6569.

Yoshitake T, Murakami T, Suzuma K, Fujimoto M, Dodo Y, Tsujikawa A: Predictor of Early Remission of Diabetic Macular Edema under As-Needed Intravitreal Ranibizumab. *Sci Rep* 2019;9:7599.

Yoshitake T, Murakami T, Yoshitake S, Suzuma K, Dodo Y, Fujimoto M, Tsujikawa A: Anti-Fumarase Antibody as a Predictor of Functional Efficacy of Anti-VEGF Therapy for Diabetic Macular Edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2019;60:787-794.

Yoshitake T, Murakami T, Suzuma K, Dodo Y, Fujimoto M, Tsujikawa A: Hyperreflective Foci in the Outer Retinal Layers as a Predictor of the Functional Efficacy of Ranibizumab for Diabetic Macular Edema. *Sci Rep* 2020;10:873.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsumoto Makiko, Suzuma Kiyoshi, Akiyama Fumito, Yamada Kanako, Harada Shiori, Tsuiki Eiko, Kitaoka Takashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Retinal Microvascular Resistance Estimated from Waveform Analysis Is Significantly Higher With a Threshold Value in Central Retinal Vein Occlusion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Translational Vision Science & Technology	6. 最初と最後の頁 4~4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1167/tvst.9.11.4	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Shigeo, Murakami Tomoaki, Nozaki Miho, Suzuma Kiyoshi, Baba Takayuki, Hirano Takao, Sawada Osamu, Sugimoto Masahiko, Takamura Yoshihiro, Tsuiki Eiko	4. 巻 259
2. 論文標題 Review of clinical studies and recommendation for a therapeutic flow chart for diabetic macular edema	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 815~836
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00417-020-04936-w	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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	宮田 学 (Miyata Manabu) (00548505)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	
研究分担者	大音 壮太郎 (Ooto Sotaro) (10511850)	京都大学・医学研究科・特定講師 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	村上 智昭 (Murakami Tomoaki) (50549095)	京都大学・医学研究科・講師 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関