

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592005
 研究課題名（和文） 増殖糖尿病網膜症における血管新生の前骨髄性白血病腫瘍抑制因子による制御
 研究課題名（英文） Regulation of the angiogenesis in proliferative diabetic retinopathy using promyelocytic leukemia tumor suppressor (PML)
 研究代表者
 氏名（ローマ字）：三田村 佳典 (MITAMURA YOSHINORI)
 所属機関・部局・職：千葉大学・大学院医学研究院・准教授
 研究者番号：30287536

研究成果の概要：増殖糖尿病網膜症の病因にはサイトカイン VEGF が主要な役割を担い、その発現には転写因子 HIF が関与しているが、前骨髄球性白血病腫瘍抑制因子 (PML) は HIF の発現低下、血管新生の抑制を引き起こすとされている。今回、増殖糖尿病網膜症や血管新生を伴わない疾患の増殖膜を採取し、HIF、PML の発現を mRNA レベル、蛋白レベルで検索し、増殖糖尿病網膜症において HIF の発現亢進と PML の発現低下が起こっていることを示した。今回の研究結果は、将来的に PML の増殖糖尿病網膜症の血管新生を抑制する治療薬としての可能性を模索する第一歩となると思われる。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2008年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：外科、細胞・組織、生体分子、糖尿病、臨床、増殖糖尿病網膜症、血管新生、前骨髄性白血病腫瘍抑制因子

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症は成人の失明原因の大多数を占めており、現在の治療法は進行例には必ずしも十分とはいえないのが現状である。近年、増殖糖尿病網膜症の病因に種々のサイトカインやサイトカインの発現を制御している転写因子が関与していることをうかがわせる報告が多数なされている。そのなかでも血管内皮増殖因子 (VEGF: vascular

endothelial growth factor) はもっとも注目されているサイトカインであり、VEGF の抗体などは一部、臨床応用がなされている。また、VEGF の発現を制御している転写因子として activator protein-1 (AP-1) や hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1- α) などが知られており、我々はこれまでに増殖糖尿病網膜症の増殖膜において AP-1 mRNA が有意に高頻度で発現していること、また増殖膜

のグリア細胞において AP-1 の活性化がみられることを報告してきた。また、VEGF を介した血管新生の抑制という観点では、これまでに VEGF の発現がラパマイシンによって抑制されることや、腫瘍血管新生がラパマイシンによって影響を受けることなどの報告がある。また VEGF は HIF 転写因子によって転写が促進されること、さらに HIF 発現は mTOR によって制御されていることが知られており、ラパマイシン→mTOR→HIF の抑制→VEGF 抑制→血管新生抑制というシグナル経路が明らかとなっている。いっぽう、前骨髄球性白血病腫瘍抑制因子 (PML: promyelocytic leukemia tumor suppressor) は急性前骨髄性白血病において腫瘍抑制機能を有する因子として発見された。その機序としては、遺伝子転座によって PML と retinoic acid receptor の融合タンパクが合成された結果、白血球の成熟分化作用を阻止し急性前骨髄性白血病を発病するとされている。ヒト PML には 14 種類の splice variant が知られているが、機能的な差異は明確になっていない。また、多くのヒトの癌組織では血管新生の亢進とともに PML の発現が抑制されていることがわかっている。近年、PML が mTOR 活性を阻害して転写因子 HIF の発現低下、血管新生の抑制を引き起こすことが初めて報告された。このことから、増殖糖尿病網膜症の増殖膜など血管新生が促進されている組織では HIF の増加とともに PML の発現低下が予想される。また、将来的には PML を過剰に発現させることにより増殖糖尿病網膜症における血管新生を抑制できる可能性がある。

2. 研究の目的

硝子体手術の技術の進歩により術中に眼内の増殖膜、硝子体液などのサンプルを安全に採取することが可能になってきた。我々は、これまでも術中に得られた硝子体サンプルを用いて、マクロファージ遊走阻止因子 (Macrophage Migration Inhibitory Factor: MIF) や Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) などのケモカインと、肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor: HGF)、血管内皮増殖因子 (VEGF)、Placenta Growth Factor (PlGF) などの増殖因子が増殖糖尿病網膜症などの眼内増殖性疾患の前房水、硝子体液に高濃度で存在していることを報告してきた。今回、増殖糖尿病網膜症や特発性黄斑上膜などの血管新生を伴わない疾患の増殖膜を採取し、PML や HIF の発現を mRNA レベル、蛋白レベルで検索し、増殖糖尿病網膜症の増殖膜において PML 発現の抑制や HIF の発現亢進がないかを確認する。

3. 研究の方法

(1) マウス網膜での PML 発現の確認

これまで PML が実際に眼内での発現しているか否かについて報告がないため、human と mouse 両種の PML mRNA を検出することが可能な PML プライマーを用いてマウス whole retina で RT-PCR を行い、網膜において PML が発現していることを確認する。

RT-PCRに使用するPMLプライマー配列を以下に示す。

nucleotide 449-468;

5' -GTGCTTCGAGGCACACCAGT-3'

nucleotide 874-893;

5' -AGCAGCTCGCGCTCCTGAGC-3'

これらのプライマーペアを用いた RT-PCR では、ヒト PML-1 の nucleotide 449-893 (445bp) の領域を検出することが可能である。また、PML-1 だけではなく少なくとも PML variant の 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 の検出が可能である。さらに human と mouse 両方の PML に共通した配列を有しているため、両種の PML mRNA を検出することが可能となる。

(2) 増殖膜検体の採取、保存

特発性黄斑上膜および増殖糖尿病網膜症に対して硝子体手術を行った。手術は必要に応じて白内障手術を行った後、型のごとく three port を作成し硝子体切除を行う。特発性黄斑上膜については microhooked needle、ILM 鑷子などを用いて網膜前膜を peel する。増殖糖尿病網膜症では、必要に応じて垂直剪刀による segmentation を行った後、水平剪刀にて delamination を行い増殖膜を網膜面から遊離する。遊離した増殖膜、網膜前膜は硝子体鑷子にて眼外に摘出し、免疫染色用検体については直ちに OCT compound に包埋し液体窒素にて凍結させた後、-80℃にて保存する。RT-PCR 用の検体については直ちにトリゾール 0.5cc にひたし 4℃にて保存する。

(3) 増殖糖尿病網膜症の増殖膜における PML および HIF の発現変化の検討

増殖糖尿病網膜症の増殖膜および特発性黄斑上膜の網膜前膜 (新生血管を含まないコントロール) のヒト手術検体から RNA を抽出した後 cDNA を合成する。PML および HIF に特異的なプライマーを用いた定量的 PCR 法により、両群における PML および HIF 遺伝子発現量を比較検討する。一方、両群のヒト手術検体から凍結切片を作成し、タンパクレベルでの発現パターンについて PML および HIF の抗体を用いた免疫染色法により比較する。さらに、グリア細胞などの特異抗体との免疫二重染色を行う。これらの結果から増殖糖尿病網膜症の増殖膜において、PML および HIF1 の動態について検討する。

4. 研究成果

(1) マウス網膜での PML 発現の確認

human testis では PML mRNA の強い発現が確認されたので (図 1 : 右レーン)、これをポジティブコントロールとしてマウス whole retina でも RT-PCR を行ったところ、PML の発現が確認できた (図 1 : 中央レーン)。網膜に PML の発現が確認されたことから、PML が眼内においてなんらかの役割を担っている可能性が推測される。

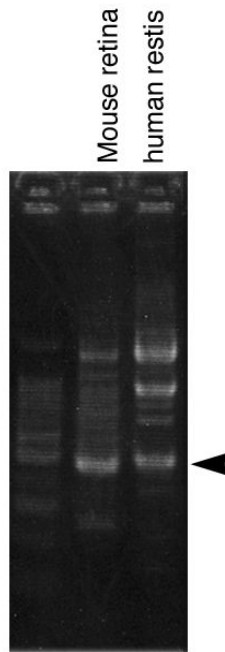


図 1 マウス網膜における RT-PCR の結果

(2) 増殖膜における RT-PCR の結果

増殖糖尿病網膜症は 19 検体中 13 検体 (68%) と高率に HIF-1 mRNA が検出されたのに対して、特発性黄斑上膜では 12 検体中 2 検体 (17%) にしか検出されず、両群の検出率には有意差が認められた ($P=0.0050$)。

(3) 増殖膜における免疫染色の結果

ヒト増殖糖尿病網膜症症例の増殖膜 3 検体の免疫染色を行ったところ、特発性黄斑上膜の 3 検体と比べて HIF の発現が明らかに亢進し PML の発現が低下する傾向がみられた (図 2)。以上のことから増殖糖尿病網膜症においては HIF の発現亢進と PML の発現低下が起こっていると考えられる。

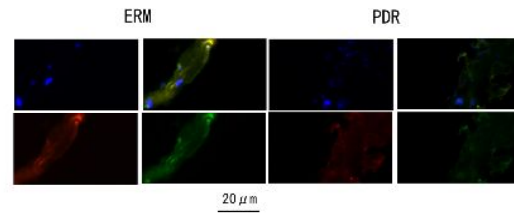


図 2 特発性黄斑上膜 (ERM) および増殖糖尿病網膜症 (PDR) の増殖膜における PML 蛋白の発現 (免疫染色 : 3 重染色)
青 : 核染色、緑 : 抗 PML 抗体、赤 : GFAP (グリア細胞のマーカー)

これまで PML の眼内での発現は報告がなく、我々の研究結果は、将来的に PML の増殖糖尿病網膜症の血管新生を抑制する治療薬としての可能性を模索する第一歩となると思われる。

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 5 件)

① Mitamura Y, Hirano K, Baba T, et al: Correlation of visual recovery with presence of photoreceptor inner/outer segment junction in optical coherence images after epiretinal membrane surgery. Br J Ophthalmol 93:171-175, 2009. 査読有

② Mitamura Y, Aizawa S, Baba T, et al: Correlation between retinal sensitivity and photoreceptor inner/outer segment junction in patients with retinitis pigmentosa. Br J Ophthalmol 93:126-127, 2009. 査読有

③ Mitamura Y, Yamamoto S: Sustained closure of surgically repaired macular hole after proliferative vitreoretinopathy. Indian Journal of Ophthalmology 56:526-527, 2008. 査読有

④ Mitamura Y, Ogata K, Oshitari T, et al: Retinal detachment with macular hole following intravitreal bevacizumab in patients with severe proliferative diabetic retinopathy. Br J Ophthalmol 92:717-718, 2008. 査読有

⑤ Mitamura Y, Kubota-Taniai M, Okada K, et al: Comparison of photodynamic therapy to transpupillary thermotherapy for polypoidal choroidal vasculopathy. Eye 23:67-72, 2009. 査読有

〔学会発表〕(計 2件)

- ①三田村佳典：シンポジウム 06 Functional Imaging の最先端 微小視野計測、第 112 回日本眼科学会、2008. 4. 17.、横浜
- ②三田村佳典：シンポジウム 眼科手術の視機能に及ぼす影響（その光と影） 「網膜硝子体手術の視機能に及ぼす影響」、第 61 回日本臨床眼科学会、2007. 10. 12.、京都

〔図書〕(計 1件)

- ①三田村佳典、朝倉書店、炎症・再生医学事典 I.B. 炎症疾患 3. 眼 b. 変性疾患 加齢黄斑変性、2009、p30-32

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三田村 佳典 (MITAMURA YOSHINORI)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：3 0 2 8 7 5 3 6

(2) 研究分担者

窪田 真理子 (KUBOTA MARIKO)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：5 0 3 7 5 7 1 3

(3) 研究協力者

原田 高幸 (HARADA TAKAYUKI)
東京都神経科学総合研究所・副参事研究員
研究者番号：9 0 3 4 5 3 0 6