

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590198

研究課題名（和文） 糖尿病角膜症に伴う基底膜の分子構築の変化の解析

研究課題名（英文） Analysis of the changes in the molecular structure of basement membrane accompanying by the diabetic keratopathy

研究代表者

秋元 義弘 (AKIMOTO YOSHIHIRO)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：60184115

研究成果の概要（和文）：糖尿病モデル動物 GK ラットを用いて、糖尿病角膜症に伴う基底膜の形態変化が糖尿病治療薬投与により回復するかについて検討した。その結果、基底膜の形態変化は薬剤投与により有意に回復することが明らかになった。

さらに糖尿病による角膜の形態変化に伴って糖修飾が変化を示すタンパク質を調べるため、プロテオーム解析を行った。その結果、基底膜を裏打ちしている細胞骨格系タンパク質に *O*-GlcNAc 修飾が増加することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：We examined changes in the ultrastructure of basement membrane of the cornea of diabetic GK rats. In the cornea of diabetic rats, many long-spacing collagen fibrils were observed in basement membrane. The antidiabetic agents significantly suppressed the formation of the long-spacing collagen.

To explore biomarker proteins of which glycosylation level change in diabetic cornea, we carried out the proteomic analysis. Selected proteins that changed markedly in the *O*-GlcNAc level were identified by Mass Spectrometry analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：糖尿病、角膜症、基底膜、糖鎖、細胞外マトリックス

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症では毛細血管基底膜の肥厚と周皮細胞の脱落が初期の特徴的病変として知られている。また糖尿病角膜症として点状角膜上皮症や再発性角膜びらんが報告され、組織学的には、角膜上皮基底膜異常、ヘミデスモゾームなどの上皮の接着能の低下が観察されている。

〈糖尿病における高血糖が血管障害を起こす原因〉としては、①非酵素的グリコシレーションの加速化、②ジアシルグリセロールの増加とPKCβ活性の上昇、③アルドース還元酵素の活性上昇によるポリオール代謝亢進が可能性として考えられ、それぞれの面から治療薬の開発が試みられている。これに加え、近年、第四の原因としてタンパク質への

O-GlcNAc とよばれる糖鎖修飾の上昇が提唱された。

〈経緯〉我々は、これまで糖尿病モデル GK ラットの腎臓、眼球組織、神経組織を用いて糖尿病合併症における基底膜の変化と糖鎖修飾との関係を検討してきた。その結果、糖尿病発症に伴い、これらの組織で基底膜の形態変化（基底細胞からの剥離、係留細線維の減少、long-spacing collagen の増加が生じること、さらに角膜の基底膜の構成分子ではラミニンが減少し、VIII 型コラーゲンが顕著に増加すること、また糖尿病の角膜上皮で糖鎖修飾レベルが上昇することを明らかにした。これらのことから糖尿病合併症における基底膜の変化の原因として、基底膜を構成しているタンパク分子の糖鎖修飾の異常が関与していることが推測されるに至った。以上の研究成果を踏まえ、我々は「糖尿病合併症に伴う基底膜の変化は、基底膜を構成するタンパク質への糖鎖修飾の異常による分子構築の変化が原因である」という作業仮説をたて、これを検証するため、実験を行なう。

2. 研究の目的

基底膜は細胞外マトリックスの一種でその機能や構造についてはまだ不明な点が多い。我々はこれまでの研究で上皮の発生分化過程で基底膜が重要な働きをしていることを明らかにしてきた。糖尿病網膜症や角膜症ではこの基底膜に変化が生ずることが報告されているが、その分子構築についてはまだ詳細には調べられていない。本研究では糖尿病角膜症における基底膜の分子構築の変化を免疫組織化学に解明することを目指す。昨年度に引き続き、糖尿病モデル動物を用いて眼組織の中で特に角膜に注目し、糖尿病角膜症に伴う基底膜の形態変化とその構成成分の変化を免疫組織化学的に調べる。さらに本年度は、基底膜の構成分子および基底膜の接着に関与する細胞骨格タンパク質の糖鎖レベルと局在を検討し、グライコプロテオミクスにより糖鎖修飾の変化する角膜タンパクを調べることにより、形態変化の成因を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Sendai ラットを用いて、基底膜の形態変化に伴う基底膜と角膜固有質の構成成分の変化の免疫組織化学的検討：

糖尿病モデル動物を用いて糖尿病角膜症に伴う角膜上皮と基底膜の形態変化に伴い、基底膜、ボーマン膜、デスメ膜、角膜固有質の構成成分の変化を組織化学的に光顕並びに電顕レベルで検出した。

各種抗体の結合部位の検出：

IV、VI、VIII 型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、ヘパラン硫酸プロテオグリカ

ン

(2) 基底膜の形態変化を、糖尿病治療薬で抑えられるかどうかを検討した。

ナテクリニド、グリベンクラミドなどの薬剤存在下で培養した場合の、基底膜の変化について解析した。

(3) 糖尿病により O-GlcNAc 修飾が変化する角膜のタンパク質の検討：

糖尿病モデル動物 (GK ラット) の角膜を用いて、タンパク質を二次元電気泳動後、O-GlcNAc に対するモノクローナル抗体 (RL2, CTD110.6) を用いて O-GlcNAc の修飾が変化するタンパクを調べた。糖尿病に関連して O-GlcNAc 修飾が変化するタンパクを、PVDF 膜に blot 後、トリプシン処理してマスペクトロメトリーによりアミノ酸配列を調べ、既知のデータベースによりタンパクを同定した。

4. 研究成果

(1) LEA-DP/Sendai ラット (以下、Sendai ラット) は Long Evans Agouti (LEA) ラットコロニーから糖尿病を発症する個体を基に確立された非肥満型 2 型糖尿病モデル動物である。インスリン分泌低下を主因にするヒト 2 型糖尿病の優れたモデルと考えられている。本研究では、糖尿病の発症に伴う Sendai ラットの角膜における形態変化について免疫組織化学的に検討した。

6、10、14 週齢のいずれの週齢においても角膜上皮基底膜付近にトルイジンブルーに濃染する沈着物が観察された。またこの沈着物は週齢が進むにつれて量が増加した。電子顕微鏡で観察したところ、この沈着物は円形ないし楕円形をなし、上皮基底細胞内、上皮基底細胞と基底膜との間、あるいは基底膜近くの角膜固有質に認められた。これら沈着物の存在する部位の上皮基底細胞では多くの場合、空胞変性ならびに基底膜の剥離や多層化などの形態変化が観察された。分析電顕による解析より、この沈着物はリン酸カルシウム、リン酸マグネシウムの結晶であることが明らかになった。さらに細胞外マトリックスの構成成分 (IV、VI、VIII 型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン) に対する抗体を用いて免疫電顕にて局在を検討した。VI 型コラーゲン、フィブロネクチン、ヘパラン硫酸プロテオグリカンは主に固有質に反応が認められた、また VIII 型コラーゲンはデスメ膜に反応が認められた。しかし VI、VIII 型コラーゲン、フィブロネクチン、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの局在並びに発現に変化は認められなかった。これに対して、基底膜の形態変化に伴い、基底膜の構成成分であるラミニン、

IV 型コラーゲンの局在および発現が変化することが明らかになった。

(2) インスリン非依存性糖尿病モデル動物 (GK ラット) を用いて、糖尿病角膜症に伴い、基底膜の形態がどのように変化するか、その基底膜の分子構築変化を免疫組織化学的に検討し、さらに糖尿病治療薬投与によりこの形態変化が回復するかについて検討した。

まず電子顕微鏡にて形態を観察したところ、糖尿病 GK ラット角膜では、角膜上皮基底細胞におけるヘミデスモゾームの減少並びに上皮基底細胞からの基底膜の剥離が観察された。また GK ラットでは角膜内皮側の基底膜 (デスメ膜) において long spacing collagen が正常な角膜に比べて、加齢に伴い顕著に増加することが観察された。次ぎに免疫組織染色により細胞外マトリックスの構成成分 (I、III、IV、VI、VIII 型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン) の発現を調べた。その結果、VIII 型コラーゲンの発現の増加とラミニンの発現の減少が観察された。さらにコロイド金法ならびに HRP 法を用いた免疫電顕により、VIII 型コラーゲンが正常なラットの角膜ではデスメ膜全体にほぼ均一に分布するのに対し、GK ラットでは特に long spacing collagen に局在していることが明らかになった。以上の形態変化は糖尿病治療薬 (nateglinide, glibenclamide) 投与により有意に回復することが明らかになった。これらのことから基底膜の分子構築の変化が糖尿病角膜症の原因の一つになっていることが推測された。

(3) 糖尿病による角膜の形態変化に伴って糖修飾が変化を示す蛋白質を調べるため、糖尿病モデル動物 (GK ラット) と正常 (対照、Wistar ラット) の角膜を用い、糖 (*O*-GlcNAc) に対するモノクローナル抗体により免疫沈降して単離した蛋白質を 2 次元電気泳動後、タンパク質の量的変動を PDQuest (ver 8.0) を用いて解析し、その中のいくつかの spot について MALDI-TOF 質量分析を用いたプロテオーム解析を行った。その結果、総タンパク質の約 1~2% のタンパク質に *O*-GlcNAc 修飾が起こっていること、また糖尿病では、多数のタンパク質の *O*-GlcNAc 修飾レベルが上昇することが認められた。さらに、基底膜を裏打ちしているアクチンやビンキュリンなど細胞骨格系タンパク質に *O*-GlcNAc 修飾の増加が観察された。以上のことから、基底膜の形態変化は基底膜を裏打ちしているタンパク質の糖修飾の異常が一因になっていることが推測された。

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 14 件)

- ① Ogawa Y, Miura Y, Harazono A, Kanai-Azuma M, Akimoto Y, Kawakami H, Yamaguchi T, Toda T, Endo T, Tsubuki M, Yanoshita R: Proteomic analysis of two types of exosomes in human whole saliva. *Biol Pharm Bull* 34: 13-23, 2011. (査読有)
- ② Ohara-Imaizumi M, Yoshida M, Aoyagi K, Saito T, Okamura T, Takenaka H, Akimoto Y, Nakamichi Y, Takashi-Yanobu R, Nishiwaki C, Kawakami H, Kato N, Hisanaga S, Kakei M, Nagamatsu S: Deletion of CDKAL1 affects mitochondrial ATP generation and first-phase insulin exocytosis. *PLoS ONE* 5: e15553, 2010. (査読有)
- ③ Nikzad H, Kabir-Salmani M, Shiokawa S, Akimoto Y, Iwashita M: Co-expression of galectin-3 and $\alpha_5\beta_1$ integrin at pinopodes of human endometrium. *Iranian J Reprod Med* 8: 145-152, 2010. (査読有)
- ④ Ueyama M, Akimoto Y, Ichimiya T, Ueda R, Kawakami H, Aigaki T, Nishihara S: Increased apoptosis of myoblasts in *Drosophila* model for the Walker-Warburg syndrome. *PLoS ONE* 5: e11557, 2010. (査読有)
- ⑤ Denda-Nagai K, Aida S, Saba K, Suzuki K, Moriyama S, Oo-puthinan S, Tsuiji M, Morikawa A, Kumamoto Y, Sugiura D, Kudo A, Akimoto Y, Kawakami H, Bovin NV, Irimura T: Distribution and function of macrophage galactose-type C-type lectin 2 (MGL2/CD301b): Efficient uptake and presentation of glycosylated antigens by dendritic cells. *J Biol Chem* 285: 19193-19204, 2010. (査読有)
- ⑥ Kaji M, Kabir-Salmani M, Anzai N, Jin CJ, Akimoto Y, Horita A, Sakamoto A, Kanai Y, Sakurai H, Iwashita M: Properties of L-type amino acid transporter 1 in epidermal ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 20: 329-336, 2010. (査読有)
- ⑦ Fujita K, Teramura N, Hattori S, Irie S, Mitsunaga-Nakatsubo K, Akimoto Y, Sakamoto N, Yamamoto T, Akasaka K: Mammalian arylsulfatase A functions as a novel component of the extracellular matrix. *Connect Tissue Res* 51: 388-396, 2010. (査読有)
- ⑧ Ohara-Imaizumi M, Aoyagi K, Akimoto Y, Nakamichi Y, Nishiwaki C, Kawakami H, Nagamatsu S: Imaging exocytosis of single glucagon-like peptide-1 containing granules in a murine enteroendocrine cell

line with total internal reflection fluorescent microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 390: 16-20, 2009. (査読有)

⑨Sekine Y, Nishibori Y, Akimoto Y, Kudo A, Ito N, Fukuhara D, Kurayama R, Higashihara E, Babu E, Kanai Y, Asanuma K, Nagata M, Majumdar A, Tryggvason K, Yan K: Amino acid transporter LAT3 is required for podocyte development and function. *J Am Soc Nephrol* 20: 1586-1596, 2009. (査読有)

⑩Mitsunaga-Nakatsubo K, Kusunoki S, Kawakami H, Akasaka K, Akimoto Y: Cell surface arylsulfatase A and B on sinusoidal endothelial cells, hepatocytes and Kupffer cells in mammalian livers. *Med Mol Morphol* 42: 63-69, 2009. (査読有)

⑪Mitsunaga-Nakatsubo K, Akimoto Y, Kawakami H, Akasaka K: Sea urchin arylsulfatase, an extracellular matrix component, is involved in gastrulation during embryogenesis. *Dev Genes Evol* 219: 281-288, 2009. (査読有)

⑫Akimoto Y, Sawada H, Ohara-Imaizumi M, Nagamatsu S, Kawakami H: Change in long-spacing collagen in Descemet's membrane of diabetic Goto-Kakizaki rats and its suppression by antidiabetic agents. *Exp Diabetes Res* 2008: Article ID 818341, 8 pages, 2008. (査読有)

⑬Shimizu M, Khoshnoodi J, Akimoto Y, Kawakami H, Hirano H, Higashihara E, Hosoyamada M, Sekine Y, Kurayama R, Kurayama H, Joh K, Hirabayashi J, Kasai K, Tryggvason K, Ito N, Yan K: Expression of galectin-1, a new component of slit diaphragm, is altered in minimal change nephritic syndrome. *Lab Invest* 89: 178-195, 2009. (査読有)

⑭Ogawa Y, Kanai-Azuma M, Akimoto Y, Kawakami H, Yanoshita R: Exosome-like vesicles with dipeptidyl peptidase IV in human saliva. *Biol Pharm Bull* 31: 1059-1062, 2008. (査読有)

[学会発表] (計13件)

①秋元義弘, Gerald W Hart, 三浦ゆり, 戸田年総, 遠藤玉夫, 川上速人: 糖尿病性角膜症に伴うタンパク質への糖修飾変化のプロテオミクスによる解析. 第88回日本生理学会大会・第116回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会, 横浜, 平成23年3月28-30日.

②秋元義弘: (平成22年度杏林大学医学部研究奨励賞中間報告) 糖尿病に伴う O-GlcNAc

修飾タンパク質の変化. 第39回杏林医学会総会, 三鷹, 平成22年11月20日.

③秋元義弘, 三浦ゆり, 戸田年総, 遠藤玉夫, Hart GW, 川上速人: *In situ* proximity ligation assay 法による腎臓における O-GlcNAc 修飾タンパク質の検出. 第51回日本組織細胞化学学会総会・学術集会, 東京, 平成22年9月4-5日.

④秋元義弘, 川上速人: 糖修飾の組織化学解析の基礎と応用. 第35回組織細胞化学講習会, 甲府, 平成22年8月4-6日.

⑤Akimoto Y, Miura Y, Toda T, Hart GW, Endo T, Kawakami H: O-GlcNAc-modification of the proteins in diabetic tissues. 7th International Symposium on Glycosyltransferases. Tokyo, July 30-Aug. 1, 2010.

⑥Akimoto Y, Miura Y, Toda T, Hart GW, Endo T, Kawakami H: Proteomic analysis of O-GlcNAc-modified proteins in diabetic kidney. The 28th Naito Conference on Glycan Expression and Regulation [I]: Function and disease mechanism, Hayama, July 27-30, 2010.

⑦秋元義弘, Hart GW, 三浦ゆり, 戸田年総, 遠藤玉夫, 川上速人: 糖尿病に伴うタンパク質への糖修飾異常のプロテオミクスによる解析. 第115回日本解剖学会総会・全国学術集会, 盛岡, 平成22年3月28-30日.

⑧秋元義弘: 糖尿病に伴う O-GlcNAc 化タンパク質の変化. 東京都健康長寿医療センター研究所 産学公連携プロテオーム共同研究センター 第5回公開セミナー. 東京, 平成22年1月28日.

⑨秋元義弘, Hart GW, 三浦ゆり, 戸田年総, 遠藤玉夫, 川上速人: シンポジウム「翻訳後修飾 ADP-リボシル化と O-GlcNAc 化の意義」糖尿病と O-GlcNAc 修飾異常. 第82回日本生化学大会, 神戸, 平成21年10月21-24日.

⑩秋元義弘, 川上速人: 糖の組織化学 ―レクチン法―. 第34回組織細胞化学講習会, 徳島, 平成21年7月29-31日.

⑪秋元義弘, 福田稔, 松原幸枝, 澤田元, 今泉美佳, 永松信哉, 川上速人: 糖尿病 GK ラット角膜の基底膜における形態変化と薬剤投与による回復. 日本顕微鏡学会第65回学術講演会, 仙台, 平成21年5月26-29日.

⑫秋元義弘, 岡村匡史, 近藤由美, 渡部智美, 今泉美佳, 永松信哉, 渡邊卓, 澤田元, 川上速人: 新規ヒト2型糖尿病モデル動物 (LEA-DP/Sendai ラット) の角膜における基底膜の形態変化: 免疫組織化学的検討. 第114回日本解剖学会総会・学術集会, 岡山, 平成21年3月28-30日.

⑬ Akimoto Y: (Invited speaker) O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins and diabetic complications. 5th Asian Pacific Congress of Anatomy, Tehran, May 16-19, 2008.

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

〔図書〕 (計 8 件)

① 秋元義弘 (翻訳): 結合組織. ジュンケイラ組織学 第 3 版. 坂井建雄, 川上速人監訳. 東京, 丸善, 2011. p.91-115.

② 秋元義弘 (翻訳): 核および細胞質におけるグリコシル化. コールドスプリングハーバー 糖鎖生物学 第 2 版. 鈴木康夫, 木全弘治監訳. 東京, 丸善, 2010. p. 209-220.

③ 秋元義弘 (翻訳): O-GlcNAc 修飾. コールドスプリングハーバー 糖鎖生物学 第 2 版. 鈴木康夫, 木全弘治監訳. 東京, 丸善, 2010. p. 221-235.

④ Akimoto Y, Kawakami H: Pre-embedding electron microscopy methods for glycan localization in chemically fixed mammalian tissue using horseradish peroxidase-conjugated lectin. In: ImmunoelectronMicroscopy. Schwartzbach SD, Osafune T (Eds.). New York, Humara Press, Methods Mol Biol 657: 2010, p. 217-224.

⑤ 秋元義弘, 川上速人: 糖修飾の組織化学解析の基礎と応用. 「組織細胞化学 2010」. 日本組織細胞化学会編. 東京, 学際企画, 2010. p. 145-156.

⑥ 秋元義弘, 川上速人: 糖の組織化学 — レクチン法 —. 「組織細胞化学 2009」 (日本組織細胞化学会編), 日本組織細胞化学会, 京都, pp. 45-52, 2009.

⑦ Hart GW, Akimoto Y: The O-GlcNAc Modification. In: Essentials of Glycobiology. 2nd Ed. (Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Stanley P, Bertozzi C, Hart GW & Etzler M, eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, pp.263-279, 2009.

⑧ 秋元義弘, Hart GW, 川上速人: 【新時代の糖尿病学 病因・診断・治療研究の進歩】 糖尿病に起因する合併症 慢性合併症 細小血管症 発症の主な危険因子 ヘキソサミン代謝の亢進. 日本臨床 66 増刊 9 新時代の糖尿病学 (4). 大阪, 日本臨床社, 2008. p. 94-98

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋元 義弘 (AKIMOTO YOSHIHIRO)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号: 6 0 1 8 4 1 1 5