

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592030

研究課題名（和文） 糖尿病網膜症とバゾヒビン

研究課題名（英文） Diabetic retinopathy (DMR) and Vasohibin

研究代表者

石川 有美 (ISHIKAWA YUMI )

東北大学・大学院医学系研究科・技術補佐員

研究者番号：60396439

研究成果の概要（和文）：糖尿病網膜症の治療評価マーカーや新規治療薬の検討を行った。まずバゾヒビンに注目した。（１）血漿中のバゾヒビン濃度と網膜症は相関はないが、増殖性の変化が強いほどバゾヒビン濃度が低い傾向だった。（２）hypoxia-inducible factor(HIF)で GFP 誘導される網膜色素上皮細胞を作成し培地中に眼内液を添加すると血管内皮細胞増殖因子（VEGF）と GFP は発現が有意に相関することが判明した。糖尿病網膜症眼内には HIF を誘発する因子が有意に多く含まれていた。

研究成果の概要（英文）：I examined vasohibin whether or not it works as marker for treatment of diabetic retinopathy (DMR) or as the possibility of new drug. Vasohibin in plasma was not correlated with retinopathy, however it was lower as the stronger the retinopathy. Retinal pigment epithelial cell transduced with HRE-directed EGFP expression vector showed positive correlation between VEGF and EGFP expression when I added intra-ocular fluids of patients in the medium. Patients with DMR had some factors that induced HIF.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：バゾヒビン、糖尿病、網膜症、血漿、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）、HIF

## 1. 研究開始当初の背景

失明原因の上位を占める疾患は、もともと発生頻度の高い糖尿病網膜症や加齢黄斑変性などの新生血管が出現する網膜疾患である。これらの疾患はともに手術やレーザー治療、あるいは光線力学療法などの新しい治療法が発達してきたが、いまだに難治性である。

最近では生物学的製剤として抗新生血管内皮細胞増殖因子（VEGF）などが臨床応用され始め、眼科領域でも各施設がそれぞれの倫理委員会に申請をして、新生血管抑制に利用されてきており、良好な結果が数多く報告されるようになってきた。欧米で開発された薬剤であるが、効果は一過性であることが多く、

また頻回の眼内投与は合併症の問題のために難しい。

一方、バゾヒビンは血管内皮細胞より産生される血管新生抑制因子であるが、最近我々の共同研究者により報告された因子で VEGF と発現が直接相関する。我々は、試行錯誤の結果、硝子体中のバゾヒビンが western で検知できるようになった。

治療により変動するマーカーになる可能性があり、光凝固などの治療を客観的に見るデータになる可能性が推測される。また、内因性の新生血管抑制因子として新しい抗新生血管抑制薬としての可能性があり、しかも現在世界中で積極的に使用されている抗 VEGF 抗体とは作用機序が異なり相乗効果も期待できる。

## 2. 研究の目的

糖尿病網膜症に対する光凝固治療後などの新しい治療評価マーカーとして、また、新しい抗新生血管抑制薬になる可能性の検討を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 血漿の収集と保存および血漿中、眼内液のバゾヒビン濃度測定

方法：東北大学倫理委員会ですでに承認されたのち、網膜症のない正常コントロール、活動性の強い糖尿病網膜症患者、加療により活動性が低下した糖尿病網膜症患者それぞれ 50-100 名、プロトコルに従って血球成分と血漿を分離した。血漿中のバゾヒビンは、2 種類の抗体を利用して我々が独自に作成した ELISA プレートで、サンドイッチ法で測定した。ELISA ではうまく測定できない場合は、western で確認した。前房水は ELISA で測定可能なので ELISA で検討した。一方、糖尿病網膜症の硝子体手術では増殖膜が採取されることが多いため、我々が以前報告した方法に従い、この増殖膜より RNA の抽出を行い

上記と同様に real-time PCR でバゾヒビン遺伝子発現を半定量した。ELISA あるいは real-time PCR の結果は血漿中のバゾヒビン濃度と比較し相関の有無について検討した。また、これらの結果は最終的に臨床像と比較し新生血管の活動性の指標である蛍光眼底撮影による色素の漏出や、視力、網膜電図などと比較した。

結果①：糖尿病網膜症患者血漿を 250 名分収集し血漿中のバゾヒビン濃度の測定を開始し、臨床データの収集も行い、血漿中のバゾヒビン量と臨床像の比較をおこなった。これまでの検討では増殖性の変化が強いほど血漿中のバゾヒビン濃度が低い傾向にあることが推測された。しかし有意差はなく、網膜機能との相関についても有意に相関しているものは見られていない。硝子体液は ELISA で測定できなかったためにウエスタンで検討したがこちらは重症度と硝子体内バゾヒビン濃度は有意に相関すると考えられた。すなわち増殖性変化が強いほど硝子体液のバゾヒビン量は多かった。また増殖膜内にもバゾヒビンが存在し、免疫染色では必ずしも血管内皮細胞のみに存在するものばかりでないことが推測された。

### (2) 新生血管促進因子とバゾヒビンの役割の in vitro での検討

Hypoxia-inducible factor (HIF) が作用する element である Hypoxia-responsive element (HRE) をリポートさせた塩基を EGFP 遺伝子と結合させたベクターを作成し、網膜細胞株 (RPEJ) に導入した。培養細胞への付加はインキュベーター内の酸素分圧を正常酸素濃度 (20%酸素) か低酸素 (2%酸素) にし、さらに培地中のグルコース濃度を変動させ、さまざまな付加を細胞に与える。また低酸素状態を疑似するといわれるコバルト (CoCl<sub>2</sub>) を用いて同様に負荷した。その後細

胞活性（細胞増殖能）と細胞死のみを検討するのではなく、細胞周期、細胞移動能も検討した。その後にVEGFなどの発現を確認し、まずバソヒビン遺伝子の発現を確認する。バソヒビンの有無でVEGF等の新生血管促進因子がどのような変化を示すのか検討後、VEGFRからの細胞内セカンドメッセンジャーを追跡する。また、糖尿病網膜症患者の前房水、硝子体液をバソヒビンの発現のみでなく、さらに虚血時に各種遺伝子発現のマスターコントロール的役割を行うhypoxia-inducible factor(HIF)の発現に影響を与える因子の発現を検討した。HIF発現はHIFのcis-elementであるhypoxia-responsive element (HRE)にGFP遺伝子を融合させたベクターを網膜色素上皮細胞内に導入し、細胞内のGFP発現を蛍光顕微鏡か遺伝子発現をreal-time PCRで確認しHIFの発現として検討し、さらにウエスタンでも発現を確認した。

結果②：ラット網膜色素上皮細胞株（RPE J）の培養系を用いてバソヒビン遺伝子が発現していることを確認したが、ウエスタンでは完全長よりも少し短い36kDaが主に発現していると推測された。興味深いことにこのバソヒビンを強制発現させるとその細胞は血管内皮細胞増殖因子（VEGF）の発現が有意に減少することが判明した。さらに虚血負荷をかけると細胞は増殖が抑制されるが、VEGFは細胞の増殖低下を抑制する。しかしバソヒビンはこの機能を抑制することが推測された。さらにバソヒビン強制発現細胞は非発現細胞やコントロールベクター導入細胞よりも虚血負荷条件下では細胞増殖能が低いことが推測された。このことはこれまでのところ正常培養状態では見られていない。

結果③：HIF発現はHIFのcis-elementであるhypoxia-responsive element (HRE)にGFP遺伝子を融合させたベクターを網膜色素上

皮細胞内に導入し、細胞内のGFP発現を蛍光顕微鏡か遺伝子発現をreal-time PCRで確認しHIFの発現として検討し、さらにウエスタンでも発現を確認した。その結果前房水、硝子体液の培地中への添加でVEGFとGFPは発現が有意に相関することが判明した。かなり厳密に相関し、本システムが有効に使用できることが確認された。また、これまでの検討では糖尿病網膜症硝子体中にはHIF(GFP)発現を誘発する因子が有意に多く含まれていることも判明した。今回のこれまでの検討では、サンプルは採取後一旦保存されるためにサンプル中の酸素濃度との関係でHIFの発現が左右されるものではなく、さらに違う因子がHIF発現に影響を与えていると推測された。実際にサンプル間の酸素濃度に差はなかった。

#### 4. 研究成果

糖尿病網膜症に対する光凝固治療後などの新しい治療評価マーカーとして、また、新しい抗新生血管抑制薬になる可能性の検討のために今回の研究を行った。標的因子として我々はバソヒビンに注目した。バソヒビンはVEGFに発現が刺激される血管内皮細胞特異的に発現する内因性血管新生抑制因子である。我々の共同研究者である東北大学の佐藤らにより最近報告された。今回の検討で判明した重要なことは、（1）糖尿病網膜症の硝子体中には増殖性変化が強くなるほどバソヒビン濃度が多くなることが判明した、（2）糖尿病網膜症患者血漿約250名分は血漿中のバソヒビン濃度と網膜症の程度などの臨床データとは相関が見られなかった。しかし増殖性の変化が強いほど血漿中のバソヒビン濃度が低い傾向にあった。（3）糖尿病網膜症患者の前房水、硝子体液内にはHIF発現を誘発する因子が含まれている可能

性があり、HIF が発現を誘導する 1 つの因子である VEGF 発現と強く相関した。サンプルは採取後一旦保存されるためにサンプル中の酸素濃度との関係で HIF の発現が左右されるものではなく、さらに違う因子が HIF 発現に影響を与えていると推測された。実際にサンプル間の酸素濃度に差はなかった。したがって今後は HIF 発現に影響をあたえるものの解析とバソヒビンとの相関を確認する価値があると考えられた。これらの検討を行い、バソヒビンの関与を検討できることで、バソヒビンの糖尿病網膜症への関与をさらに詳細に理解でき、また治療薬としての可能性を検討できると考えた。

#### 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, Yumi Ishikawa, Nobuhiro Nagai, Hideyuki Onami, Norihiro Kumasaka, Ryosuke Wakusawa, Hikaru Sonoda, Yasufumi Sato, Toshiaki Abe, Vasohibin-1 and retinal pigment epithelium., *Adv Med Exp Biol*, 査読有, 2011, in press
- 2, Maki Kayama, Toru Nakazawa, Aristomenis Thanos, Yuki Morizane, Yusuke Murakami, Sofia Theodoropoulou, Toshiaki Abe, Demetrios Vavvas and Joan W. Miller. Exploring the role of HSP70 in retinal detachment. *Am J Pathol*, 査読有, 2011, in press
- 3, Ryu M, Nakazawa T, Akagi T, Tanaka T, Watanabe R, Yasuda M, Himori N, Maruyama K, Yamashita T, Abe T, Akashi M, Nishida K, Suppression of phagocytic cells in retinal disorders using amphiphilic poly( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticles containing dexamethasone. *J Control Release*. 査読有 2011 Apr 10;151(1):65-73
- 4, Takeaki Kawashima, Nobuhiro Nagai, Hirokazu Kaji, Norihiro Kumasaka, Hideyuki Onami, Yumi Ishikawa, Noriko Osumi, Matsuhiko Nishizawa, and Toshiaki Abe, A scalable controlled release device for transscleral drug delivery to the retina, *Biomaterials*, 査読有, 2011 Mar, 32(7), 1950-1956
- 5, Nobuo Fuse, MingGe Mengkegale, Akiko Miyazawa, Toshiaki Abe, Toru Nakazawa, Ryosuke Wakusawa and Kohji Nishida Polymorphisms in ARMS2 (LOC387715) and LOXL1 Genes in Japanese with Age-related Macular Degeneration. 査読有, *AJO*, 2011 Mar, 151, (3), 551-556
- 6, Ryosuke Wakusawa, Toshiaki Abe, Hajime Sato, Hikaru Sonoda, Masaaki Sato, Yuuichi Mitsuda, Tomoaki Takakura, Tomi Fukushima, Hideyuki Onami, Nobuhiro Nagai, Yumi Ishikawa, et al, Suppression of Choroidal Neovascularization by Vasohibin-1, Vascular Endothelium-derived Angiogenic Inhibitor, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 査読有, 2011, Feb 23 PMID21345982
- 7, Hiroshi Kunikata Toshiaki Abe, Jiro Kinukawa Kohji Nishida, Preoperative factors predictive of postoperative decimal visual acuity  $\cdot$  1.0 following surgical treatment for idiopathic epiretinal membrane. *Clinical Ophthalmology* 査読有 2011 Feb (5) 147-154
- 8, Ryu M, Nakazawa T, Akagi T, Tanaka T, Watanabe R, Yasuda M, Himori N, Maruyama K, Yamashita T, Abe T, Akashi M, Nishida K. Suppression of phagocytic cells in retinal disorders using amphiphilic poly( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticles containing dexamethasone. *J Control Release*. 査読有, 2010 Dec 2. [Epub ahead of print]
- 9, Tokita-Ishikawa Y, Wakusawa R, Abe T. Evaluation of retinal degeneration in P27K1P1 null mice. *Adv Exp Med Biol*. 査読有 2010;664:467-471.
- 10, Nagai N, Kumasaka N, Kawashima T, Kaji H, Nishizawa M, Abe T. Preparation and characterization of collagen microspheres for sustained release of VEGF. *J Mater Sci Mater Med*. 査読有, 2010, 21(6), 1891-1898
- 11, 雪田昌克、阿部俊明、高橋秀肇、大友孝昭、西田幸二、Vogt-小柳-原田病における HLA-DRB1\*040501 検出の頻度 あたらしい眼科、査読有、27 巻 1 号 Page129-132(2010. 01)
- 12, Shimura M, Yasuda K, Nakazawa T, Abe T, Shiono T, Iida T, Sakamoto T, Nishida K. Panretinal photocoagulation induces pro-inflammatory cytokines and macular thickening in high-risk proliferative diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 査読有 2009 Dec;247(12):1617-24.
- 13, Sato H, Abe T, Wakusawa R, Asai N, Kunikata H, Ohta Sonoda H, Sato Y, Nishida K: Vitreous Levels of Vasohibin-1 and

Vascular Endothelial Growth Factor in Patients with Proliferative Diabetic Retinopathy. Diabetologia 査読有 52:359-361, 2009

14, Saito T, Abe T, Wakusawa R, Sato H, Asai N, Tokita-Ishikawa Y, and Nishida K: TrkB-T1 Receptors on Muller Cells Play Critical Role in Brain-Derived Neurotrophic Factor-Mediated Photoreceptor Protection against Phototoxicity CURRENT EYE RESEARCH, 査読有 34(7):580-588, 2009

[学会発表] (計 11 件)

1, N Nagai, T Kawashima, N Kumasaka, H Kaji, M Nishizawa, T Abe, A novel membrane-based drug delivery capsule for retinal neuroprotection, Pacifichem2010, 2010年12月16-20日 Hawaii, USA

2, 熊坂典浩、永井展裕、川島丈明、梶弘和、大浪英之、西澤松彦、阿部俊明、徐放制御性に優れた PEG カプセルの作製と網膜 DDS への応用、第 32 回日本バイオマテリアル学会大会、2010年11月29-30日、広島

3, Yumi Ishikawa, Nobuhiro Nagai, Hideyuki Onami, Norihiro Kumasaka, Ryosuke Wakusawa, Hikaru Sonoda, Yasufumi Sato, Toshiaki Abe, Vasohibin-1 and retinal pigment epithelium. RD2010, 2010年7月13-17日、Quebec, Canada

4, 永井展裕、川島丈明、梶弘和、熊坂典浩、西澤松彦、阿部俊明、コラーゲンとポリエチレングリコール複合体からなる薬物徐放制御に優れたカプセル DDS の作製、第 26 回 DDS 学会、2010年6月17-18日、大阪

5, 大浪英之、涌澤亮介、阿部俊明、佐藤靖史、西田幸二、マウス脈絡膜新生血管モデルに対する血管増殖抑制因子バソヒビン遺伝子発現の検討、第 114 回日本眼科学会総会、2010年4月15-18日、名古屋

6, 永井展裕、川島丈明、梶弘和、熊坂典浩、西澤松彦、阿部俊明、網膜変性疾患治療を目指したコラーゲン微粒子/ポリエチレン

グリコール複合体からなる薬物徐放カプセルの作製と評価、第 9 回再生医療学会総会、2010年3月18-19日、広島

7, 川島丈明、永井展裕、梶弘和、西澤松彦、阿部俊明、コラーゲン微粒子/ポリエチレングリコール複合体を用いた薬物徐放カプセルの作製と評価、第 31 回日本バイオマテリアル学会、2009年11月16-17日、京都

8, 宮澤晃子、布施昇男、中澤徹、涌澤亮介、阿部俊明、西田幸二、加齢黄斑変性における LOXL1 遺伝子の解析、第 113 回日本眼科学会総会、2009年4月16-19日、東京 (以下 9~11 は同学会)

9, 佐藤 肇、阿部俊明、涌澤亮介、浅井信晴、國方彦志、太田英樹、園田 光、佐藤靖史、西田幸二、増殖糖尿病網膜症患者における硝子体中 vasohibin-1 と VEGF

10, 大浪英之、阿部俊明、涌澤亮介、佐藤靖史、西田幸二、マウス脈絡膜新生血管モデルに対する血管増殖抑制因子 vasohibin の抑制効果

11, 涌澤亮介(東北大学)、阿部俊明、國方彦志、宮澤弘史、鬼怒川次郎、西郷陽子、西田幸二、網膜静脈分枝閉塞に伴う黄斑浮腫に対する抗 VEGF 抗体・光凝固併用療法

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

1. 名称: 持続性ドラッグデリバリーシステム

発明者: 阿部 俊明

権利者: 同上

種類: 出願 (PCT)

番号: PCT/JP2010/63793

出願年月日: 2010年8月10日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.med.tohoku.ac.jp/org/ctaar/88/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 有美 ( ISHIKAWA YUMI )  
東北大学・大学院医学系研究科・技術補佐員  
研究者番号：60396439

(2) 研究分担者

阿部 俊明 ( ABE TOSHIAKI )  
東北大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：90191858

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：