

令和 7 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22K09814

研究課題名（和文）糖尿病網膜症の病因におけるCdk5/ERK回路の役割

研究課題名（英文）Role of Cdk5/ERK pathway in the pathogenesis of diabetic retinopathy

研究代表者

三田村 佳典（MITAMURA, Yoshinori）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・教授

研究者番号：30287536

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：サイクリン依存性キナーゼ5(Cdk5)や細胞外シグナル調節キナーゼ(ERK)はほぼすべての臓器・組織で発現しており、細胞増殖を含む多機能な役割が知られているが、増殖糖尿病網膜症などの眼内増殖性疾患の眼球内でのCdk5とERK活性は不明な部分が多い。今回、我々は硝子体手術時に得られた臨床検体サンプルを用いてPPAR濃度、Cdk5、ERKの眼内での活性を検索し、増殖糖尿病網膜症の眼内液（硝子体）ならびに網膜前面に形成された増殖膜においてPPARの発現亢進、Cdk5、ERKの活性化が見られることを確認した。この研究結果からCdk5/ERK回路が糖尿病網膜症の病因に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

以前は我が国においても糖尿病網膜症が失明原因の第一位を占めていたが、近年の薬物療法や手術治療の目覚ましい進歩により現在は失明原因の第三位となっている。しかし、糖尿病網膜症で著しい視力障害をきたし日常生活や就労に支障をきたす人が後を絶たないのが現実である。今回、我々は硝子体手術時に得られた臨床検体サンプルを用いて、増殖糖尿病網膜症の眼内でPPAR濃度が上昇しCdk5、ERKが活性化していることを見出し、Cdk5/ERK回路が糖尿病網膜症の病因に関与している可能性が示唆された。このことはCdk5/ERK回路を標的とした糖尿病網膜症の新たな治療法と失明の予防の可能性を示すことができたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) and extracellular signal-regulated kinase (ERK) are expressed in almost all organs and tissues and are known to play multiple roles, including cell proliferation. However, the activity of Cdk5 and ERK in the eyeball of patients with intraocular proliferative diseases such as proliferative diabetic retinopathy remains unclear. Therefore, we investigated the intraocular concentration of PPAR and the activity of Cdk5 and ERK using clinical specimen samples obtained during vitreous surgery, and confirmed that the expression of PPAR and the activation of Cdk5 and ERK were observed in the intraocular fluid (vitreous) and the proliferative membrane formed on the surface of retina in the patients with proliferative diabetic retinopathy. These findings suggest that the Cdk5/ERK signaling pathway may be involved in the pathogenesis of diabetic retinopathy.

研究分野：眼科学

キーワード：外科 細胞・組織 生体分子 糖尿病 臨床

1. 研究開始当初の背景

サイクリン依存性キナーゼ 5 (Cdk5: Cyclin-dependent kinase 5) や細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK: extracellular signal-regulated kinase) はほぼすべての臓器・組織で発現しており、細胞増殖を含む多機能な役割が知られている。しかし、これまで増殖糖尿病網膜症などの眼内増殖性疾患の眼内での Cdk5 と ERK 活性は不明な部分が多い。

分子生物学的研究の発展に伴い糖尿病網膜症の病因に血管内皮増殖因子 (VEGF: vascular endothelial growth factor) が深く関与していることが明らかにされ、現在では抗 VEGF 療法が実臨床において広く臨床応用されている。今日では糖尿病網膜症の治療には網膜光凝固術や硝子体手術に加えて抗 VEGF 剤、ステロイドなどの薬物療法が行われているが、抗 VEGF 療法に関しては抗 VEGF 剤に抵抗性を示す症例もあることや VEGF の上流シグナルについては必ずしもすべてが明らかになっているわけではないのが現状である。VEGF の上流シグナルを解明することにより、抗 VEGF 療法よりも効果的な新たな糖尿病網膜症治療を開発できる可能性がある。リガンド応答性の核内受容体型の転写因子である PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) は VEGF などの新生血管促進因子の発現亢進を誘導することによって血管新生を促進することが報告されているが、我々は、この PPAR γ が増殖糖尿病網膜症の前房水・硝子体中に含まれるエクソソーム内に対照と比べて有意に高濃度で存在し、VEGF 濃度や病期の進行と正の相関を示すことや、増殖糖尿病網膜症の増殖膜においても PPAR γ の mRNA の発現が亢進していることを示した。

また、2015 年に Cdk5/ERK 回路による PPAR γ のリン酸化の制御がインスリン抵抗性の発生機序にかかわっていることが報告された。肥満と関連したインスリン抵抗性は、2 型糖尿病発症の主な前兆であるが、PPAR γ のセリン 273 の Cdk5 によるリン酸化が、脂肪組織で糖尿病誘発性遺伝子の発現を促進することが報告され、この修飾を阻害することは、PPAR γ に結合するチアゾリジンジオンや、PPAR γ の部分的アゴニストあるいは非アゴニストなどの抗糖尿病薬の主要な治療機序となっている。また、脂肪組織で特異的に Cdk5 をノックアウトしたマウスで ERK が PPAR γ を直接リン酸化する機序とインスリン抵抗性との関連性が相次いで報告された。さらには Cdk5 が ERK を制御することで PPAR γ の機能が調節されることが示された。

2007 年に 2 型糖尿病患者の大規模 SNP 疫学研究の結果が多施設から報告され、2 型糖尿病発症リスクを高める遺伝子変異として Cdk5 regulatory subunit-associate protein 1-like 1 (CDKAL1) 遺伝子が同定された。この CDKAL1 は Cdk5 の活性を阻害する分子と相同性が高いことが報告されており、糖尿病の病因に Cdk5 が深くかかわっていることがうかがわれる。Cdk5 が ERK を制御することで PPAR γ の機能が調節されること、ERK とその上流のキナーゼである MEK (MAP kinase/ERK kinase) の薬理的な阻害によるインスリン抵抗性の改善が示されており、糖尿病網膜症の進行において PPAR γ が Cdk5/ERK 回路の制御を受ける可能性が予想される。

2. 研究の目的

これまでの研究で PPAR γ が癌などに伴う血管新生や実験的脈絡膜血管新生に関与していることが分かっているが、我々は PPAR γ が糖尿病網膜症の進行にも関与していることを報告してきた。Cdk5 はほぼすべての臓器・組織で発現しているが、神経細胞の発現が高いことが知られている。また、2015 年の Nature 誌に Cdk5 が PPAR γ の糖尿病誘発作用を促進することが発表され、糖尿病網膜症の進行においても PPAR γ が Cdk5 の制御を受けている可能性が予想される。また、脂肪組織で特異的に Cdk5 をノックアウトしたマウスで ERK が PPAR γ を直接リン酸化する機序とインスリン抵抗性との関連性や、Cdk5 が ERK を制御することで PPAR γ の機能が調節されることが示された。以上から糖尿病網膜症の進行においても PPAR γ が Cdk5/ERK 回路の制御を受けている可能性が予想される。

以前は我が国においても糖尿病網膜症が失明原因の第一位を占めていたが、近年の薬物療法や手術治療の目覚ましい進歩により現在では失明原因の第三位となっている。しかし、糖尿病網膜症で著しい視力障害をきたし日常生活や就労に支障をきたす人が後を絶たないのが現実である。また、手術治療技術の進歩により糖尿病網膜症に対する手術中に眼内の増殖膜、前房水、硝子体液などの検体を安全に採取することが可能になっている。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、Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) やマクロファージ遊走阻止因子 (Macrophage Migration Inhibitory Factor: MIF) などのケモカインと、肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor: HGF)、VEGF、Placenta Growth Factor (PlGF) などの増殖因子が増殖糖尿病網膜症の前房水、硝子体液に高濃度で存在していることを報告してきたが、このような研究成果が今日、広く行われている抗 VEGF 療法の臨床応用の一助になったものと思われる。今回、我々は硝子体手術時に得られた臨床検体サンプルを用いて PPAR γ 濃度、Cdk5、ERK の眼内での活性を検索するとともに、Cdk5/ERK 回路による PPAR γ の調節機構と糖尿病網膜症の関連についての検討と、将来的に Cdk5 または ERK/MEK 阻害剤を投与することで増殖糖尿病網膜症の進行を抑制する治療薬としての可能性を模索したいと考え、本研究を立案した。

3. 研究の方法

糖尿病網膜症が進行すると眼内に新生血管を形成して増殖糖尿病網膜症となり、新生血管から眼内に出血して硝子体出血となったり、新生血管を主成分とする増殖膜が網膜を牽引することで網膜剥離となったりして著しい視力障害をきたす(図1)。このような増殖糖尿病網膜症に対する手術治療として行われる硝子体手術の手術中に得られたヒトの手術検体を対象とした研究により増殖糖尿病網膜症における Cdk5、ERK の眼内活性と PPAR との相互作用を総合的に解明した。

(1) 眼内液である硝子体液検体と増殖膜検体の採取、保存

正常眼に対して手術を行うことはないので、眼内新生血管をきたさない特発性黄斑上膜(図2)、特発性黄斑円孔(図3)を対照(コントロール)とした。特発性黄斑上膜、特発性黄斑円孔と眼内新生血管を伴う増殖糖尿病網膜症に対する硝子体切除開始時に灌流液を流す前に硝子体カッターにて硝子体液を採取した。採取した硝子体液検体はすぐに-80℃にて保存した。また、特発性黄斑上膜・増殖糖尿病網膜症に対する硝子体手術では網膜前面に形成された膜組織(黄斑上膜の網膜前膜、増殖糖尿病網膜症の増殖膜)を手術中に除去するが、この遊離した増殖膜、網膜前膜を、免疫染色用検体については直ちに OCT compound に包埋し-80℃にて保存した。Western blotting 用検体についても-80℃にて保存した。

(2) 増殖糖尿病網膜症の硝子体・増殖膜での Cdk5 と ERK 活性の検討

硝子体液検体については ELISA キットを使用して PPAR、Cdk5、Cdk5 の制御因子である p35 量を測定し、同時に総蛋白量も測定し総蛋白量における数値で補正した。硝子体液中の PPAR、Cdk5、p35 濃度は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (LifeSpan Bio- Sciences, Inc., Seattle, WA, USA) を用いて測定した。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のヒト手術検体について、ERK1/2 ならびに活性型であるリン酸化 ERK1/2 タンパク質の発現量を Western blotting 法により確認した。増殖膜検体における ERK1/2 ならびにリン酸化 ERK1/2 蛋白の発現は市販の antibody kit (ERK1/2; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, リン酸化 ERK1/2; Cell Singaling Technology, Danvers, MA, USA) を用いて測定し -Actin に対する相対値で評価した。

一方、両群のヒト手術検体から凍結切片を作成し、蛋白レベルでの発現パターンについて PPAR と Cdk5、p35、リン酸化 ERK1/2 抗体を用いた免疫染色法により比較した。さらに、血管内皮細胞などの特異抗体との免疫二重染色を行い、増殖糖尿病網膜症の増殖膜における PPAR、Cdk5、p35、リン酸化 ERK1/2 の局在についても検討した。

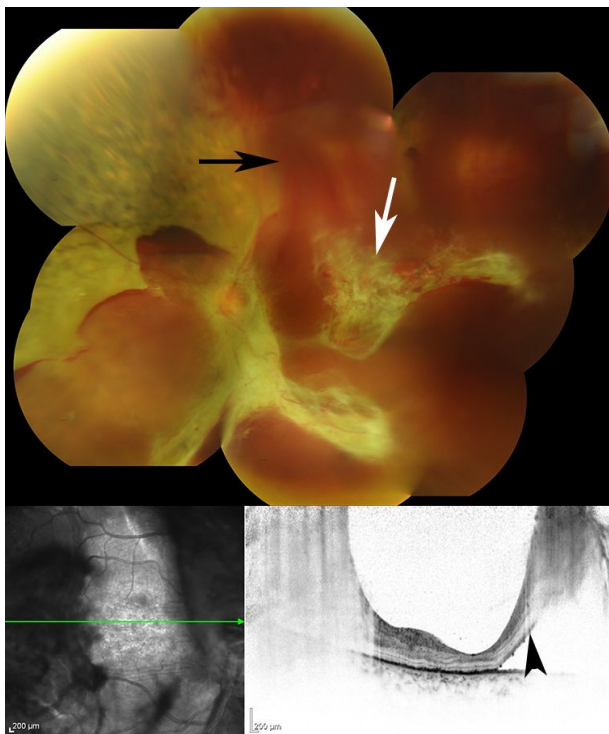


図1 増殖糖尿病網膜症患者の検査画像

上段: 9枚の眼底写真をつなぎ合わせた合成写真にて血管成分(新生血管)を含む白色の増殖組織(白矢印)が確認できる。新生血管から眼内(硝子体中)に出血して(黒矢印)著しい視力低下をきたしている。増殖組織を硝子体手術で摘出して増殖糖尿病網膜症の増殖膜検体(新生血管を含む増殖膜検体)として蛋白の発現を調べた。

下段: 光干渉断層計を用いた網膜の断層像で増殖組織に引っ張られて網膜が剥離している(黒矢

頭) のがわかる。

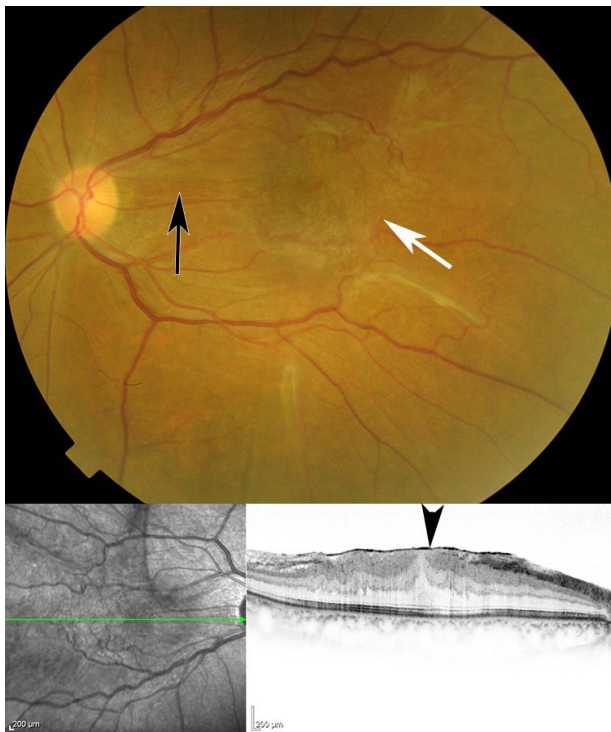


図2 対照(コントロール)である特発性黄斑上膜患者の検査画像

上段:眼底写真にて白色の組織である黄斑上膜(白矢印)が確認でき、網膜に皺を生じている(黒矢印)。網膜の皺のために視力低下や歪視(物が歪んで見える)をきたしている。黄斑上膜を硝子体手術で摘出してコントロール(新生血管を含まない網膜前膜検体)として蛋白の発現を調べた。

下段:光干渉断層計を用いた網膜の断層像で網膜の表面に黄斑上膜(黒矢頭)が確認できる。



図3 対照(コントロール)である特発性黄斑円孔患者の検査画像

上段:眼底写真にて網膜の中央(黄斑)に円形の黄斑円孔(白矢印)が確認できる。膜検体は採取できないが、眼内液である硝子体を採取してコントロールとして蛋白の発現を調べた。

下段:光干渉断層計を用いた網膜の断層像で網膜の中央に円孔(黒矢印)が確認できる。

4. 研究成果

(1) 増殖膜ならびに網膜前膜検体における ERK1/2 ならびに活性化型 ERK1/2 の発現

黄斑上膜 8 検体、増殖糖尿病網膜症 6 検体の増殖膜検体を採取し ERK タンパク質の発現量を Western blotting 法により確認した。Western blotting 法により測定した活性化型であるリン酸化 ERK1/2 発現量を ERK1/2 発現量で割ったリン酸化の相対値は黄斑上膜の対照患者で 0.19 ± 0.01 、PDR 患者では 0.58 ± 0.05 で対照より有意に高かった ($p < 0.050$)。

(2) 増殖膜ならびに網膜前膜検体における PPAR と Cdk5、p35、リン酸化 ERK1/2 蛋白の発現

Cdk5 は主に神経細胞に発現しているリン酸化酵素であり、活性化サブユニットである p35 と結合することによって活性をもつようになる。そこで、Cdk5 の活性化を調べる目的で Cdk5 に加えて p35 蛋白の発現を調べた。増殖糖尿病網膜症患者の増殖膜検体ならびに対照 (コントロール) として黄斑上膜症例の網膜前膜検体から凍結切片を作成し、蛋白レベルでの発現パターンについて PPAR と Cdk5、p35、リン酸化 ERK1/2 抗体を用いた免疫染色法により比較した。PPAR と Cdk5、p35、リン酸化 ERK1/2 の免疫染色では増殖糖尿病網膜症において対照よりも明らかに強く染色された。

また、増殖糖尿病網膜症患者の増殖膜検体について二重染色を行うと PPAR と Cdk5、p35、リン酸化 ERK1/2 は血管内皮細胞のマーカーである von Willebrand factor 抗体と二重標識され、これらが主に増殖糖尿病網膜症患者の増殖膜の血管内皮細胞に発現していることが示唆された。

(3) 硝子体中の PPAR と Cdk5、p35、総蛋白濃度

増殖糖尿病網膜症ならびにコントロールとして特発性黄斑円孔・特発性黄斑上膜患者の硝子体 147 検体を硝子体手術時に眼内還流液の還流を始める前に採取し、ELISA 法による硝子体 PPAR と Cdk5、p35、総蛋白濃度の測定を行った。増殖糖尿病網膜症を有する患者の硝子体液中の PPAR、Cdk5、p35 濃度の上昇は、眼局所で PPAR、Cdk5、p35 が産生されただけではなく糖尿病網膜症に伴う血液網膜関門の破壊により血漿中の成分が漏出して上昇した可能性があるため、この蛋白の漏出による影響を最小限にするため PPAR、Cdk5、p35 の各濃度は総蛋白質濃度で除した値として評価した。

硝子体液中の全蛋白質濃度は、対照患者 (0.59 ± 0.44 mg/ml) よりも増殖糖尿病網膜症患者 (2.01 ± 1.03 mg/ml) で有意に高かった ($p < 0.001$)。硝子体液中の全蛋白質濃度あたりの PPAR 濃度は、対照患者 (69.18 ± 37.21 ng/mg) よりも増殖糖尿病網膜症患者 (374.26 ± 258.26 ng/mg) で有意に高かった ($p < 0.001$)。全蛋白質濃度あたりの Cdk5 濃度は、対照患者 (0.86 ± 0.13 ng/mg) よりも増殖糖尿病網膜症患者 (5.01 ± 1.54 ng/mg) で有意に高かった ($p < 0.001$)。硝子体液中の全蛋白質濃度あたりの p35 濃度は、対照患者 (184.32 ± 122.12 pg/mg) よりも PDR 患者 (376.21 ± 554.18 pg/mg) で有意に高かった ($p = 0.011$)。

糖尿病罹患の有無が PPAR と Cdk5、p35 濃度に与える影響を調べるため、糖尿病に罹患したものの糖尿病網膜症発症前で、特発性黄斑上膜もしくは特発性黄斑円孔を発症して手術を行った症例について検討した。糖尿病を有するが糖尿病網膜症を発症していない対照患者の PPAR 濃度および Cdk5 濃度 (68.12 ± 37.35 ng/mg、 0.69 ± 0.52 ng/mg) は、増殖糖尿病網膜症患者 (374.26 ± 258.26 ng/mg、 5.01 ± 1.54 ng/mg) と比較して有意に低かった ($p < 0.001$ 、 $p = 0.009$)。糖尿病を有する対照患者の p35 濃度 (182.89 ± 128.02 pg/mg) も PDR 患者と比較して低かったが、その差は統計的に有意ではなかった (376.21 ± 554.18 pg/mg、 $p = 0.116$)。これは、糖尿病を有する対照患者のサンプル数が少なかったことが一因である可能性がある。対照群のみで糖尿病の有無で検討すると、糖尿病のない対照患者と糖尿病を有する対照患者間で PPAR、Cdk5 および p35 濃度に有意差はなかった ($p = 0.781$ 、 $p = 0.535$ 、 $p = 0.991$)。このことから糖尿病患者は増殖糖尿病網膜症を発症してから眼内 PPAR と Cdk5、p35 濃度が上昇することがわかった。

以上の研究結果より、Cdk5/ERK 回路が糖尿病網膜症の病因に関与し、糖尿病網膜症治療の標的となりうることが示唆された。本研究の Limitation として検体のサンプル量が少ないため同一検体で Cdk5、PPAR、ERK の発現を定量化することができなかったことがあげられる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Nagasato Daisuke, Sogawa Takahiro, Tanabe Mao, Tabuchi Hitoshi, Numa Shogo, Oishi Akio, Ohashi Ikeda Hanako, Tsujikawa Akitaka, Maeda Tadao, Takahashi Masayo, Ito Nana, Miura Gen, Shinohara Terumi, Egawa Mariko, Mitamura Yoshinori	4. 巻 141
2. 論文標題 Estimation of Visual Function Using Deep Learning From Ultra-Widefield Fundus Images of Eyes With Retinitis Pigmentosa	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JAMA Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 305 ~ 305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1001/jamaophthalmol.2022.6393	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 Sano Hiroki, Namekata Kazuhiko, Niki Masanori, Semba Kentaro, Muraio Fumiko, Harada Takayuki, Mitamura Yoshinori	4. 巻 13
2. 論文標題 Ocular expression of cyclin dependent kinase 5 in patients with proliferative diabetic retinopathy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 628 ~ 637
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13702	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	仙波 賢太郎 (SEMBA Kentaro) (10745748)	徳島大学・病院・助教 (16101)	
研究分担者	江川 麻理子 (EGAWA Mariko) (70507657)	徳島大学・病院・講師 (16101)	

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
---------	---------