

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592631

研究課題名(和文) 増殖因子と細胞内シグナル制御による糖尿病網膜症の病的血管の再生治療

研究課題名(英文) Regeneration of retinal vasculature in diabetic retinopathy with growth factors and signal transduction

研究代表者

鈴間 潔 (SUZUMA, Kiyoshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：80335265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病網膜症は失明の原因として主要な割合を占めている。血管内皮増殖因子(VEGF)は糖尿病網膜症や加齢黄斑変性の病態で主要な役割を果たしている。私たちは高血圧を模倣した機械的伸展刺激がVEGFの作用を強めることを発見し、コハク酸が増殖糖尿病網膜症の発症と進展にかかわっていることも発見した。今後コハク酸の作用を応用することにより病的な血管を治療することができるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Diabetic retinopathy is the leading cause of new onset blindness among working age individuals. Vascular endothelial growth factor (VEGF) has been strongly implicated as a primary mediator of ocular complications in diabetes and age-related macular degeneration. We reported that mechanical stretch induced expression of VEGF and its receptors in retinal vascular cells and demonstrated that retinal expression of VEGF and VEGF-R2 was increased during hypertension in vivo. It has recently been demonstrated that G protein-coupled receptor 91 (GPR91: a succinate receptor) plays a major role in both vasculature development and retinal angiogenesis. Recently, we have reported increases of succinate in vitreous from proliferative diabetic retinopathy patients and the signaling pathways involved in hypertension-dependent succinate release.

研究分野：眼科学

キーワード：VEGF 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

(1) 糖尿病網膜症における眼内コハク酸の役割の解明

増殖糖尿病網膜症の硝子体中では新しい眼内血管新生促進因子であるコハク酸濃度が上昇していたが、さらに興味深いことが明らかとなった。近年では硝子体手術の際に抗 VEGF 薬を術前投与することが広く行われているが抗 VEGF 治療を行った増殖糖尿病網膜症患者ではコハク酸濃度が有意に低下していた。コハク酸が VEGF を誘導することはすでに報告されていることから (Sapieha P, Nat Med 2008) VEGF によるコハク酸へのポジティブフィードバック機構の存在が示唆された。(Matsumoto M, Am J Ophthalmol in press)このことは世界で初めての発見であり、コハク酸は網膜血管の発生段階において 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。

(2) 増殖糖尿病網膜症における眼内エリスロポエチンの役割の解明

糖尿病網膜症が進行し網膜無灌流領域が形成されると虚血に陥った網膜神経細胞やグリア細胞から VEGF が産生・放出され増殖網膜症にいたると考えられていた。我々は硝子体手術時に採取したサンプル中の VEGF, エリスロポエチン濃度を解析した。すると驚くべきことにエリスロポエチンは VEGF と独立した VEGF よりも数倍増殖糖尿病網膜症と関連の深い因子であることが明らかとなった(Watanabe D, N Engl J Med:2005:353:782)。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。本研究においても透過性の低い安定した正常血管を再生するためにエリスロポエチンを利用できる可能性がある。

国内外の関連する研究の中での当該研究の位置づけ

上記のようなコハク酸とエリスロポエチンを制御することにより糖尿病網膜での毛細

血管障害の予防と血管再生を目指しているのは国内外で我々のみのようである。また血管の再生治療は心臓の領域で盛んであるが今の所、組織培養下でのリアルタイム観察システムを用いた研究は見られない。

2. 研究の目的

糖尿病網膜では毛細血管の障害・脱落により網膜無灌流領域が形成され、血管内皮増殖因子(VEGF)などの増殖因子が産生・放出され、血管透過性亢進による網膜浮腫(視力低下)や血管新生(緑内障、硝子体出血)により失明に至ると考えられている。網膜無灌流領域の治療は網膜光凝固術が主流であるが虚血周辺網膜を焼き尽くすこの治療法は破壊的で侵襲も大きい。形成されてしまった無灌流領域には速やかに正常血管の再生を行うことが理想的な治療法と言える。そこで研究代表者らは最近眼内血管新生因子として発見された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、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、網膜無灌流領域の re-vascularization を促進させ網膜を破壊することなく治療する方法を開発するため本研究を企画した。

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)や血管成熟に関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 in press)。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。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な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、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、網膜無灌流領域の re-vascularization を促進させ網膜を破壊することなく治療する方法を開発するため本研究を企画した。

3. 研究の方法

まずコハク酸の網膜細胞に対する作用を明らかにし、血管透過性の低い健全な血管再生に利用できるか確認する。次に糖尿病状態である高血糖・酸化ストレスの細胞内シグナルを明らかにし、阻害すべきシグナルを絞り込む。コハク酸のそれら阻害すべきシグナルへの効果も検討する。次に網膜組織培養の系を用いてコハク酸に加えて血管安定化因子である Ang1 と ephrinA1 の細胞レベルでの結果を再検討する。最後にコハク酸レセプター GPR91 の発現ベクターを用いて糖尿病、虚血モデルなどに応用することにより in vivo での効果を検討すると同時にエリスロポエチン、Ang1, ephrinA1 を網膜局所に作用させて治療への応用が可能か検討する。以下ではわかりやすく年度ごとに分けているが必要に応じて同時進行で研究を遂行する。

4. 研究成果

最近血糖コントロールに使用されるようになったインクレチン製剤である exendin4 の網膜血管透過性への効果を検討したところ VEGF 依存性の透過性亢進を exendin4 が有為に抑制した。このことは世界で初めての発見であり、血糖コントロールと糖尿病黄斑浮腫の両方を同時に治療できる薬剤の開発につながる可能性がある。Exendin4 の作用メカニズムの検討もほぼ終了しており近いうちに論文投稿を予定している（前川執筆中）。また、iPS 細胞から網膜を再生し、それを無血管網膜とした血管再生研究を神戸理化学研究所との共同研究で開始し、毛様体（木下 IOVS）と神経節細胞（前川 Current Eye Research）を再生することに成功した。網膜の再生医療に応用することができると考えられる。現在 iPS 細胞から再生した視細胞の網膜へ移植の研究も進行中である（渡邊）。

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 10 件)

Yamada Y, Suzuma K, Matsumoto M, Tsuiki E, Fujikawa A, Harada T, Kitaoka T: RETINAL BLOOD FLOW CORRELATES TO AQUEOUS VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN CENTRAL RETINAL VEIN OCCLUSION. *Retina* 35: 2037-2042, 2015 査読有

DOI: 10.1097/IOC.0000000000000595

Kinoshita H, Suzuma K, Maki T, Maekawa Y, Matsumoto M, Kusano M, Uematsu M, Kitaoka T: Cyclic stretch and hypertension increase retinal succinate: potential mechanisms for exacerbation of ocular neovascularization by mechanical stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55: 4320-4326, 2014 査読有

DOI: 10.1167/iovs.13-13839

Onizuka N, Uematsu M, Kusano M, Sasaki H, Suzuma K, Kitaoka T: Influence of different additives and their concentrations on corneal toxicity and antimicrobial effect of benzalkonium chloride. *Cornea* 33: 521-526, 2014 査読有

DOI: 10.1097/IOC.0000000000000086

Matsumoto M, Suzuma K, Fukazawa Y, Yamada Y, Tsuiki E, Fujikawa A, Kitaoka T: Retinal blood flow levels measured by laser speckle flowgraphy in patients who received intravitreal bevacizumab injection for macular edema secondary to central retinal vein occlusion. *Retin Cases Brief Rep* 8: 60-6, 2014 査読有

DOI: 10.1097/IOC.0000000000000005

Yamada Y, Suzuma K, Kumagami T, Fujikawa A, Kitaoka T: Systemic factors influence the prognosis of diabetic macular edema after pars plana vitrectomy with internal limiting membrane peeling. *Ophthalmologica* 229: 142-146, 2013 査読有

DOI: 10.1159/000345494

Yamada Y, Suzuma K, Fujikawa A, Kumagami T, Kitaoka T: Imaging of laser-photocoagulated diabetic microaneurysm with spectral domain optical coherence tomography. *Retina-J Ret Vit Dis* 33: 726-731, 2013 査読有

DOI: 10.1097/IAE.ob013e3182753960

Tsuiki E, Suzuma K, Ueki R, Maekawa Y, Kitaoka T: Enhanced Depth Imaging

Optical Coherence Tomography of the Choroid in Central Retinal Vein Occlusion. *Am J Ophthalmol* 156: 543-547, 2013 査読有

DOI: 10.1016/j.ajo.2013.01.008

Yamada Y, Suzuma K, Ryu M, Tsuiki E, Fujikawa A, Kitaoka T: Systemic factors influence the prognosis of diabetic macular edema after pars plana vitrectomy with internal limiting membrane peeling. *Curr Eye Res* 38: 1261-1265, 2013 査読有

DOI: 10.3109/02713683.2013.820327

Matsumoto M, Yamada K, Uematsu M, Fujikawa A, Tsuiki E, Kumagami T, Suzuma K, Kitaoka T: Spontaneous dislocation of in-the-bag intraocular lens primarily occurred in cases with prior vitrectomy. *Eur J Ophthalmol* 2012;22:363-367 査読有

DOI: 10.5301/ejo.5000046

Matsumoto M, Suzuma K, Maki T, Kinoshita H, Tsuiki E, Fujikawa A, Kitaoka T: Succinate increases in the vitreous fluid of patients with active proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 12012;153:896-902 査読有

DOI: 10.1016/j.ajo.2011.10.116

[学会発表](計 15 件)

Fujikawa A, Kinoshita H, Matsumoto M, Tsuiki E, Suzuma K, Kitaoka T: The visual outcome and prognostic factors in open globe ocular injuries. (ARVO) 2015. 5.3-7 Denver USA

Yoneda A, Suzuma K, Maekawa Y, Tsuiki E, Kitaoka T: Comparison of retinal and choroidal blood flow changes after treatment with ranibizumab or aflibercept in exudative age-related macular degeneration. (ARVO) 2015. 5.3-7 Denver USA

Matsumoto M, Suzuma K, Tsuiki E, Fujikawa A, Kitaoka T: Retinal blood flow levels after intravitreal ranibizumab for diabetic macular edema. 15th EURETINA Congress – Nice (FRANCE) 2015

Onizuka N, Uematsu M, Suzuma K, Kitaoka T: Correlation of retina circulation and blood pressure before and after panretinal photocoagulation for diabetic retinopathy. (ARVO) 2014. 5.4-8 Orlando USA

Matsumoto M, Suzuma K, Tsuiki E, Fujikawa A, Kitaoka T: Retinal blood flow levels measured by Laser Speckle Flowgraphy significantly increased after vitrectomy for diabetic macular

edema. (ARVO) 2014. 5.4-8 Orlando USA
Kinoshita H, Suzuma K, Kaneko J, Mandai M, Kitaoka T, Takahashi M: Generation of ciliary epithelium from mouse ES and iPS cells. (ARVO) 2014. 5.4-8 Orlando USA

Yoneda A, Suzuma K, Maekawa Y, Tsuiki E, Wakiyama H, Kitaoka T: Retinal and choroidal blood flow changes after switching therapy from ranibizumab to aflibercept in exudative age-related macular degeneration. (ARVO) 2014. 5.4-8 Orlando USA

Fujikawa A, Suzuma K, Yamada K, Inoue D, Kitaoka T: Optical coherence tomography and ultra-wide-field autofluorescence imaging are the useful tools to understand the changes in peripheral retinal lesions. (ARVO) 2013. 5.5-9 Seattle USA

Tsuiki E, Suzuma K, Maekawa Y, Kitaoka T: Blood flow changes of the retina and choroid after vitrectomy for epiretinal membrane measured by laser speckle flowgraphy. (ARVO) 2013. 5.5-9 Seattle USA

Onizuka N, Suzuma K, Uematsu M, Yamada Y, Kitaoka T: Choroidal circulation before and after panretinal photocoagulation using a Pattern Scanning Laser for Diabetic Retinopathy. (ARVO) 2013. 5.5-9 Seattle USA

Matsumoto M, Suzuma K, Yamada Y, Tsuiki E, Fujikawa A, Kitaoka T: Retinal blood flow levels measured by Laser Speckle Flowgraphy in central retinal vein occlusion as a predictive factor for ischemia and visual loss. (ARVO) 2013. 5.5-9 Seattle USA

Tsuiki E, Suzuma K, Matsumoto M, MCB MD DOMS, Kitaoka T: Oral Kallidinogenase Improved Retinal Blood Flow Levels and Visual Acuity in Diabetic Macular Edema Patients. (AAO) 2013.11.16-11.19 New Orleans USA

Kinoshita H, Suzuma K, Maki T, Matsumoto M, Kusano M, Uematsu M, Kitaoka T: Cyclic Stretch And Hypertension Increase Retinal Succinate And Fumarate: Potential Mechanisms For Exacerbation Of Ocular Neovascularization By Mechanical Stress. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2012. 5.6-10 Fort Lauderdale USA

Matsumoto M, Suzuma K, Yamada Y, Liu M, Tsuiki E, Fujikawa A, Kitaoka T: Retinal

Blood Flow Levels Measured by Laser Speckle Flowgraphy Before and After Vitrectomy for Diabetic Macular Edema. American Academy of Ophthalmology (AAO) 2012.11.10-13 Chicago USA
Onizuka N, Suzuma K, Yamada Y, Uematsu M, Kitaoka T: Retinal Blood Flow in Patients With Diabetic Retinopathy Treated With Panretinal Photocoagulation. American Academy of Ophthalmology (AAO) 2012.11.10-13 Chicago USA

北岡 隆 (KITAOKA, Takashi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授
研究者番号：80234235

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴間 潔(SUZUMA, Kiyoshi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員
研究者番号：80335265

(2) 研究分担者

築城 英子(TSUIKI, Eiko)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師
研究者番号：30363493

藤川 亜月茶(FUJIKAWA, Azusa)
長崎大学・病院(医学系)・講師
研究者番号：60363503

松本 牧子(MATSUMOTO, Makiko)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教
研究者番号：70437903