

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462717

研究課題名(和文) PPAR を標的とした糖尿病網膜症治療

研究課題名(英文) Diabetic retinopathy treatment targeting PPAR gamma

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・教授

研究者番号：30287536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト臍血管内皮細胞の培養上清においてPeroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ )がエソソーム分画に検出され、核内蛋白であるPPAR $\gamma$ が細胞外液に分泌されうことを示した。増殖膜中のPPAR $\gamma$ 遺伝子や前房水・硝子体中のPPAR $\gamma$ 蛋白濃度はコントロールと比べ増殖糖尿病網膜症で有意に高値であった。また、前房水・硝子体中のPPAR $\gamma$ 濃度はvascular endothelial growth factor濃度や糖尿病網膜症の病期と有意に正の相関を示した。以上より、PPAR $\gamma$ が糖尿病網膜症治療の標的となりうることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) was detected in the exosome fraction of the culture media of human umbilical vein endothelial cells, indicating that PPAR $\gamma$ , a nuclear protein, can be released into the extracellular fluid. PPAR $\gamma$  mRNA expression levels in membrane samples, and the PPAR $\gamma$  protein concentrations in aqueous humor and vitreous fluid samples were significantly higher in patients with proliferative diabetic retinopathy (PDR) than control patients. We observed a significant positive correlation between the PPAR $\gamma$  levels and vascular endothelial growth factor levels or clinical stage of retinopathy in the aqueous humor and vitreous fluid of PDR patients. Taken together, PPAR $\gamma$  may be a therapeutic target for diabetic retinopathy.

研究分野：医歯薬学

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

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 (HIF1-) 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。さらに、HIF1- についても増殖膜における発現の亢進を確認している。

また、リガンド応答性の核内受容体型の転写因子である PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) は同じく核内受容体型転写因子である RXR (retinoid X receptor) とヘテロダイマーを形成して DR-1 (direct repeat-1) タイプの認識配列である PPRE (peroxisome proliferator response element) に結合する。PPAR/RXRヘテロダイマーにPPARもしくはRXRのアゴニストが結合すると、コリプレッサーの解離とCBPなどのコアクチベーターの会合が起こり、転写因子活性化能を有するようになる。

PPAR は脂肪細胞の分化に非常に重要な役割を担っており、インスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン誘導体の細胞内標的である。PPAR ヘテロ欠損マウスにおいては、高脂肪食でみられる脂肪細胞の肥大化・インスリン抵抗性の程度が野生型に比べて抑制されていたことからPPAR は脂肪細胞の肥大化を媒介することが明らかとなった。また、PPAR アンタゴニストを糖尿病モデルマウスに投与するとインスリン抵抗性が改善することが示されている。

近年の研究によってPPAR がインスリン抵抗性という糖尿病の基礎的病態に重要な役割を担っているのみならず、腫瘍の増殖などに伴う異常な血管新生に関わっていることが明らかになってきた。

また、眼内にPPAR の抑制剤であるチアゾリジンを投与すると脈絡膜新生血管が抑制されることが報告されている。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PPAR の増加が予想される。また、PPAR の発現を抑制す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)、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、PPAR 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 PPAR 発現の亢進がないかを確認する。同時に硝子体手術にて採取可能な硝子体液や前房水を採取し、ELISA 法を用いて PPAR の蛋白量を測定する。また、最近眼科領域にて抗 VEGF 抗体による治療が盛んに行われており、増殖糖尿病網膜症手術前には、抗 VEGF 抗体を眼内に注射し、増殖糖尿病網膜症の活動性を低下させている。この抗 VEGF 抗体加療後の眼内の PPAR の活性の変化についても解析を行う。

これまで増殖糖尿病網膜症などの増殖性疾患の眼内での PPAR の発現は不明である。また、我々は硝子体手術時に得られたサンプルを用いて PPAR の眼内での発現を検索し、将来的に PPAR のアンタゴニストを投与することで増殖糖尿病網膜症の進行、血管新生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

対象として増殖糖尿病網膜症に対して硝子体手術を行った症例、コントロールとして新生血管を伴わない黄斑円孔・黄斑上膜に対して硝子体手術を行った症例を選択した。

#### (1) 細胞外液への PPAR 分泌の検討

本来、核内蛋白である PPAR が細胞外液に分泌されるかどうかを確認するため、in vitro の実験系においてヒト臍血管内皮細胞の培養上清に PPAR がエスソソーム分画に検出されるかどうかを検討する。

#### (2) 前房水・硝子体液検体と増殖膜検体の採取、保存

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。硝子体切除開始時に硝子体カッターにて硝子体液を採取する。白内障手術併用時には白内障手術の前に前房水を採取する。採取した前房水・硝子体液検体はすぐに -80 にて保存する。

特発性黄斑上膜については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。また、前房水・硝子体の検体はELISA用としてスピッツに入れたまま-80にて凍結保存する。

### (3) 増殖糖尿病網膜症の前房水・硝子体液検体と増殖膜におけるPPARの発現変化の検討

増殖糖尿病網膜症の前房水・硝子体液検体についてはELISAキットを使用してPPAR量を測定する。同時に総蛋白量も分光光度計を使用して測定し、総蛋白量におけるPPAR量を算出する。

増殖膜(図1)および特異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。PPAR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PPAR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、蛋白レベルでの発現パターンについてPPAR抗体を用いた免疫染色法により比較する。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の局在について検討する。

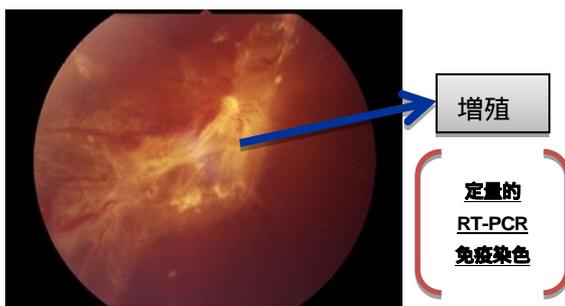


図1 増殖膜検体の解析

また近年眼科領域では抗VEGF抗体を用いた治療が盛んに行われるようになってきており、抗VEGF抗体の眼内注射後のPPAR量の変化についても解析を進めていく。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞外液へのPPAR分泌

in vitroの実験系においてPPARを過剰発現させると培養液中に本来は核内蛋白であるPPAR蛋白がエソソーム分画に高濃度で分泌されることを確認した。このことはPPARが前房水・硝子体液などの眼内液に分泌されうることを示唆している。

### (2) 前房水・硝子体中のPPAR濃度

徳島大学病院倫理委員会の承認ならびに患

者さんの承諾を得たうえで、増殖糖尿病網膜症ならびにコントロールとして黄斑円孔・黄斑上膜症例の硝子体ならびに前房水検体、それぞれ88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・前房水PPAR濃度の測定を行った(図2、図3)。測定値は糖尿病網膜症で見られる血液-網膜関門の破綻に伴う血漿成分の漏出による影響を排除するため、総蛋白濃度で割ることにより補正した値を用いた。前房水については、増殖糖尿病網膜症では $0.375 \pm 0.466$  nmol/mgであったのに対してコントロールでは $0.072 \pm 0.078$  nmol/mgと増殖糖尿病網膜症において有意に前房水PPAR濃度が高かった。また、硝子体についても増殖糖尿病網膜症では $0.581 \pm 0.683$  nmol/mgであったのに対してコントロールでは $0.077 \pm 0.090$  nmol/mgと増殖糖尿病網膜症において有意に硝子体PPAR濃度が高かった。

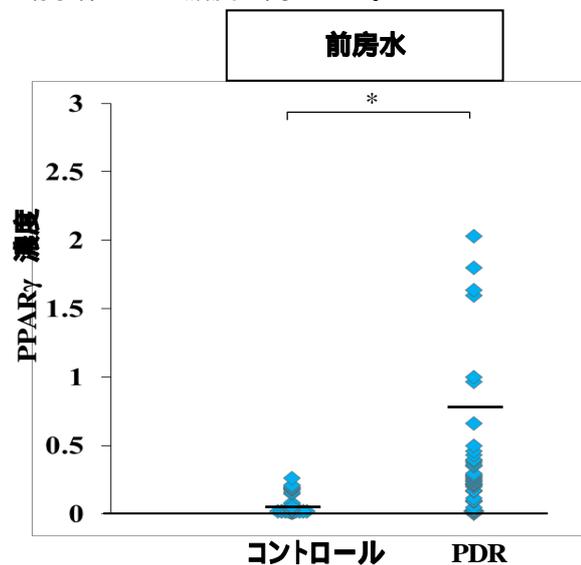


図2 前房水のPPAR濃度 (\*P<0.001)

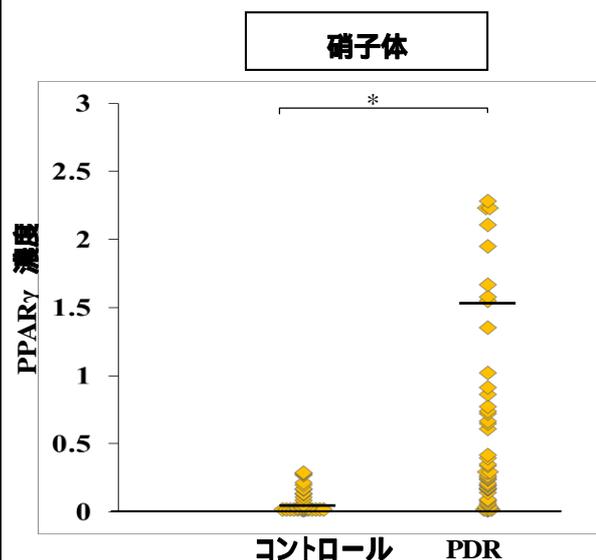


図3 硝子体のPPAR濃度 (\*P<0.001)

### (3)前房水・硝子体中のPPAR 濃度とVEGF濃度の相関

PPAR とVEGFの発現レベルの相関を調べる目的で前房水・硝子体のVEGF濃度を測定した。PPAR 測定値と同様に血液 - 網膜関門の破綻に伴う血漿成分の漏出による影響を排除するため、総蛋白濃度で割ることにより補正した値を用いた。VEGF濃度は増殖糖尿病網膜症では前房水 $49.2 \pm 9.33$  pg/mg、硝子体 $84.6 \pm 16.1$  pg/mgであったのに対してコントロールでは前房水 $7.32 \pm 3.09$  pg/mg、硝子体 $3.06 \pm 1.00$  pg/mgと増殖糖尿病網膜症において有意にVEGF濃度が高く、この結果はこれまでの報告と一致していた。また、前房水・硝子体PPAR 濃度は有意に前房水・硝子体VEGF濃度と正の相関を示すことがわかった。

### (4)前房水・硝子体中のPPAR 濃度と糖尿病網膜症の病期・抗VEGF療法との相関

増殖糖尿病網膜症症例において病期が進行し増殖膜が広範囲に存在する症例ほど硝子体・前房水PPAR 濃度は有意に高かった。また、手術前に前治療として抗 VEGF 抗体の眼内注射を行った増殖糖尿病網膜症症例では行わなかった症例と比較して、硝子体 VEGF 濃度は抗 VEGF 抗体の作用により有意に低下していたが、硝子体 PPAR 濃度は有意に高かった。

### (5)増殖膜検体における PPAR 蛋白の発現

増殖糖尿病網膜症症例 12 例ならびにコントロールとして黄斑上膜症例 5 例の増殖膜サンプルについて PPAR 蛋白の発現をみるため免疫染色を行った。その結果、黄斑上膜と比較して増殖糖尿病網膜症の増殖膜において PPAR 蛋白の発現が亢進し、主に血管内皮細胞に局在することを見出した。

### (6)増殖膜検体における PPAR mRNA の発現

増殖糖尿病網膜症症例の硝子体手術に得られた増殖膜サンプル 12 検体とコントロールとして新生血管を伴わない特異性黄斑上膜 5 検体について PPAR mRNA の発現を調べるため定量的 RT-PCR を行った。増殖糖尿病網膜症では PPAR mRNA の発現が相対値で $104.8 \pm 80.9$  %であったのに対してコントロールでは $17.3 \pm 12.5$  %と、増殖糖尿病網膜症において PPAR mRNA の発現が統計学的に有意に増加していることが示された。

以上の結果はPPAR が糖尿病網膜症の眼内で発現が亢進していること、糖尿病網膜症の主要な病因と考えられているVEGFと正の相関をする形で発現が亢進していることを示し、PPAR が糖尿病網膜症治療の標的になる可能性を支持する結果と思われる。また、現在普及している抗VEGF療法を施行してもPPAR の発現が低下しないことからPPAR を標的とした糖尿病網膜症治療が抗VEGF療法を補完する治療法になる可能性が示された。

## 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 11 件)

Katome T, Namekata K, Mitamura Y, Semba K, Egawa M, Naito T, Harada C, Harada T, Expression of intraocular peroxisome proliferator-activated receptor gamma in patients with proliferative diabetic retinopathy, J Diabetes Complications, 査読有、29、2015、pp.275-281,2015

DOI: 10.1016/j.jdiacomp.2014.10.010.  
Egawa M, Mitamura Y, Sano H, Akaiwa K, Niki M, Semba K, Sonoda S, Sakamoto T, Changes of choroidal structure after treatment for primary intraocular lymphoma: retrospective, observational case series, BMC Ophthalmol, 査読有、15、2015、pp.136  
DOI: 10.1186/s12886-015-0127-7.

Mino A, Mitamura Y, Katome T, Semba K, Egawa M, Naito T, Case of adult-onset Coats' disease with epiretinal membrane treated with 25-gauge pars plana vitrectomy, J Med Invest, 査読有、62、2015、pp.85-88  
DOI: 10.2152/jmi.62.85.

Iwata A, Mitamura Y, Niki M, Semba K, Egawa M, Katome T, Sonoda S, Sakamoto T, Binarization of enhanced depth imaging optical coherence tomographic images of an eye with Wyburn-Mason syndrome: a case report, BMC Ophthalmol, 査読有、15、2015、pp.19

DOI: 10.1186/s12886-015-0014-2.  
Nakamura Y, Mitamura Y, Hagiwara A, Kumagai K, Miura G, Sugawara T, Egawa M, Yamamoto S, Relationship between retinal microstructures and visual acuity after cataract surgery in patients with retinitis pigmentosa, Br J Ophthalmol, 査読有、99、2015、pp.508-511

DOI: 10.1136/bjophthalmol-2013-304819.  
Egawa M, Mitamura Y, Hayashi Y, Semba K, Naito T, Changes of fundus autofluorescence and spectral-domain optical coherence tomographic findings after treatment of primary intraocular lymphoma, J Ophthalmic Inflamm Infect, 査読有、4、2014、pp.7  
DOI: 10.1186/1869-5760-4-7.

Akaiwa K, Mitamura Y, Katome T, Semba K, Egawa M, Naito T, Prepapillary vascular loops complicated by suspected macroaneurysm rupture, Case

Rep Ophthalmol Med、査読有、2014、2014、  
pp.157242  
DOI: 10.1155/2014/157242.  
Semba K、Namekata K、Kimura A、Harada  
C、Katome T、Yoshida H、Mitamura Y、  
Harada T、Dock3 overexpression and p38  
MAPK inhibition synergistically  
stimulate neuroprotection and axon  
regeneration after optic nerve injury、  
Neurosci Lett 査読有、581、2014、  
pp.89-93  
DOI: 10.1016/j.neulet.2014.08.034.

## 6 . 研究組織

### (1)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・教授  
研究者番号：3 0 2 8 7 5 3 6

### (2)研究分担者

堀田 芙美香 (HOTTA, Fumika)  
徳島大学・病院・医員  
研究者番号：8 0 6 4 5 8 3 8

江川 麻理子 (EGAWA, Mariko)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・講師  
研究者番号：7 0 5 0 7 6 5 7

三野 亜希子 (MINO, Akiko)  
徳島大学・病院・助教  
研究者番号：5 0 5 3 1 8 3 6

### (3)連携研究者

原田 高幸 (HARADA, Takayuki)  
公益財団法人東京都医学総合研究所・視覚  
病態プロジェクト・副参事研究員  
研究者番号：9 0 3 4 5 3 0 6