

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10855

研究課題名(和文) 糖尿病網膜症におけるポリアミン代謝経路の病態関与

研究課題名(英文) Polyamine metabolism in diabetic retinopathy

研究代表者

野田 航介 (Noda, Kousuke)

北海道大学・医学研究院・准教授

研究者番号：90296666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、糖尿病を含むさまざまな疾患においてポリアミンとよばれる生体内物質、およびその代謝酵素の役割が注目されている。本研究では、ポリアミン代謝酵素の糖尿病網膜症病態への関与とその産生機序を検討し、網膜グリア細胞において糖尿病網膜症類似刺激である低酸素により、ポリアミン代謝酵素であるスペルミンオキシダーゼ(SMOX)の発現が亢進すること、その代謝反応により酸化ストレス増悪因子である過酸化水素およびアクロレインとよばれるアルデヒドの産生が増加することが示された。本結果は、低酸素により惹起される酸化ストレスの亢進にSMOXが寄与しており、糖尿病網膜症の病態形成に同分子が関与している可能性を示していた。

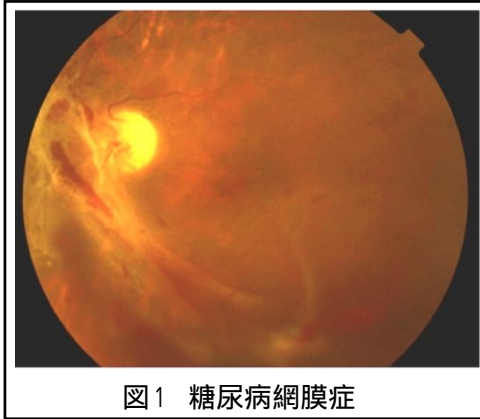
研究成果の概要(英文)：Recently, the roles of endogenous substance polyamines and its metabolizing enzymes have been focused on in the pathogenesis of systemic diseases such as diabetes. In the current study, we investigated the production mechanism of polyamine-metabolizing enzymes under diabetic condition. Hypoxia induces the production of spermine oxidase (SMOX), and subsequently increases the generation of hydrogen peroxide and acrolein, oxidative stress inducer and unsaturated aldehyde, respectively, through the metabolic reaction of spermine by SMOX in cultured retinal glial cells. The current data indicate that SMOX plays a role in the oxidative stress increase exacerbated under hypoxic condition in diabetic retinopathy.

研究分野：眼科学

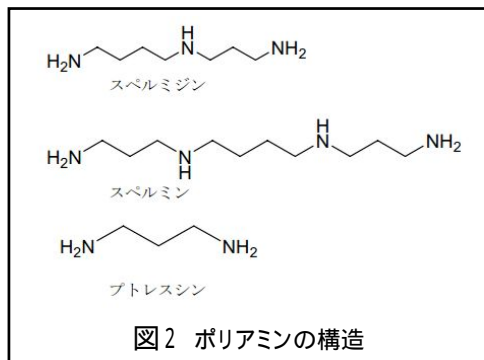
キーワード：糖尿病網膜症 ポリアミン 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

世界的に進行する高齢化にともない、失明疾患である糖尿病網膜症 (diabetic retinopathy, DR 図 1) の患者は今後さらに増加すると考えられている。



近年さまざまな疾患病態において、ポリアミンという生体内物質の関与が注目されている。ポリアミンとは分子中にアミノ基を2つ以上含む低分子の塩基性物質であり、生体内には2つのアミノ基を含むブトレスシン、3つのアミノ基を含むスペルミジンとスペルミンが主に存在している(図2)。これらの



中で、スペルミジンとスペルミンがDR眼内で増加していることは過去に報告があり [Nicoletti R et al. Br J Ophthalmol. 2003;87:1038-1042.]、その増加のメカニズムおよび病態における意義が注目されている。また、I型糖尿病患者の血中ではポリアミンを代謝する酵素群の一つ、ポリアミンオキシダーゼが増加しているとの報告がある [Bjelakovic G et al. Mol Cell Biochem 2010;341:79-85]。ポリアミンオキシダーゼはポリアミンを代謝する際にアクロレイン

とよばれる不飽和アルデヒドを生成する。アクロレインは抗酸化作用を有するグルタチオン (glutathione, GSH) と結合することでその機能を低下させ、結果として酸化ストレスを亢進させることが知られている分子である [Shi R et al. Mol. Nutr. Food Res. 2011, 55, 1320-1331.]. そのため、ポリアミン代謝はDRにおける酸化ストレスの増加につながっている可能性がある。これら一連の知見はポリアミン、ポリアミン代謝酵素群がアクロレイン産生を介してDRの病態形成に関与する可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ポリアミン代謝酵素群のDR病態における関与とその産生機序を明らかにすることである。

3. 研究の方法

本研究においてはヒトDRにおけるポリアミン代謝の関与を調べるために、培養ラット網膜毛細血管内皮細胞 TR-iBRB2 および培養ラット網膜グリア細胞 TR-MUL5 に、マルチガスインキュベーターを用いた低酸素刺激、グルコース添加による糖負荷刺激、および血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 添加刺激をおこない、DR眼内で生じる生体条件によるポリアミン代謝酵素群の発現変化について検討をおこなった。

また、ポリアミン代謝酵素群の発現亢進を生じる刺激条件下で実際に酸化ストレス増加の原因物質である過酸化水素およびアクロレインが増加するかについても検討した。

4. 研究成果

培養網膜毛細血管内皮細胞 TR-iBRB2 への1% O₂ 24時間の低酸素刺激により、ポリアミン合成系酵素であるアルギナーゼ2 (arginase 2, Arg2)、オルニチン脱炭酸酵

素(Ornithine decarboxylase 1, Odc1)、スペルミジン合成酵素(spermidine synthase, Srm)の発現亢進が認められた。また、ポリアミンの一種であるスペルミンを酸化し副生成物としてアルデヒドおよび過酸化水素を発生させて酸化ストレス亢進に寄与するスペルミンオキシダーゼ(spermine oxidase, Smox)も低酸素刺激によってその発現が亢進していた。高グルコース(25mM)による糖負荷刺激では、Arg2、Odc1、SrmおよびSmox発現の低下傾向が認められた。VEGF添加(10, 100ng/ml)ではポリアミン関連酵素の発現変化は生じなかった。これらの結果から、網膜血管内皮細胞において高グルコースや低酸素刺激などの糖尿病網膜症病態においてポリアミン関連酵素群の発現が大きく変化することが明らかになった。さらに、TR-iBRB2にスペルミンを添加すると細胞の過酸化水素生成が亢進すること、低酸素条件下ではこのスペルミン添加による過酸化水素生成の亢進が増強されることを明らかにし、さらにこの過酸化水素生成の増加がSmoxの特異的阻害剤であるMDL72527によって抑制されることを見出し、網膜血管内皮細胞において低酸素によって惹起される酸化ストレス亢進にSmoxが寄与する可能性を示した。

また、網膜血管内皮細胞とともに糖尿病網膜症病態に重要であるグリア細胞の糖尿病類似環境下でのポリアミン代謝酵素の発現変化の検討もおこない、低酸素刺激により網膜グリア細胞TR-MUL5においてSmoxの発現が亢進することをmRNAおよびタンパクレベルで明らかにした。さらに網膜グリア細胞において、低酸素条件下では過酸化水素およびアクロレイン結合タンパクの産生が増加すること、低酸素条件下培養した網膜グリア細胞における過酸化水素およびアクロレイン生成の増加がSmoxの特異的阻害剤であるMDL72527によって抑制されることを見出した。本結果は、低酸素により惹起される酸化ストレスの亢進に

Smoxが寄与しており、糖尿病網膜症の病態形成に同分子が関与している可能性を示していた。また、ヒト増殖糖尿病網膜症患者から手術中に採取された繊維血管組織をグリア細胞のマーカーであるglial fibrillary acidic protein(GFAP)とSMOXに対する抗体で免疫染色をおこない、実際にヒト糖尿病網膜症患者のグリア細胞においてもSMOXが局在することを明らかとした。

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. Yoshida S, Murata M, Noda K, Matsuda T, Saito M, Saito W, Kanda A, Ishida S. Proteolytic cleavage of vascular adhesion protein-1 induced by vascular endothelial growth factor in retinal capillary endothelial cells. *Jpn J Ophthalmol.* 2018 ; 62: 256-264. doi: 10.1007/s10384-017-0555-4. 査読あり
2. Dong Y, Noda K, Murata M, Yoshida S, Saito W, Kanda A, Ishida S. Localization of acrolein-lysine adduct in fibrovascular tissues of proliferative diabetic retinopathy. *Curr Eye Res.* 2017; 42: 111-117 doi:10.3109/02713683.2016.1150491 査読あり
3. Matsuda T, Noda K, Murata M, Kawasaki A, Kanda A, Mashima Y, Ishida S. Vascular adhesion protein-1 blockade suppresses ocular inflammation after retinal laser photocoagulation in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017; 58: 3254-3261 doi: 10.1167/iovs.17-21555. 査読あり

4. Murata M, Noda K, Kawasaki A, Yoshida S, Dong Y, Saito M, Dong Z, Ando R, Mori S, Saito W, Kanda A, Ishida S. Soluble vascular adhesion protein-1 mediates spermine oxidation as semicarbazide-sensitive amine oxidase: possible role in proliferative diabetic retinopathy. *Curr Eye Res.* 2017; 42: 1674-1683
doi:10.1080/02713683.2017.1359847.
査読あり
5. 野田航介. 糖尿病黄斑浮腫に対するメディカルアプローチに関する最近の話題. *あたらしい眼科.* 34: 639-644, 2017 査読なし
6. 野田航介. 糖尿病合併症動物モデルの探索. Young Investigator Award受賞講演. *糖尿病合併症.* 31: 135-141, 2017 査読なし
7. 野田航介, 石田 晋. 糖尿病網膜症. 特集眼疾患の治療. *医学と薬学.* 73 : 1135-1142, 2016 査読なし
8. 野田航介. 糖尿病網膜症と基礎研究. *月刊糖尿病.* 7: 14 -18, 2015 査読なし
9. 眞島行彦, 野田航介. VAP-1の糖尿病網膜症における基礎研究. 別冊Bio Clinica 「慢性炎症と疾患」. 4: 131-137, 2015 査読なし
10. 安藤 亮, 野田航介. 糖尿病網膜症・黄斑浮腫の分子病態. *あたらしい眼科.* 32: 327-330, 2015 査読なし
11. 野田航介. 抗VEGF薬の基礎研究と開発の歴史. *あたらしい眼科.* 32: 1069-1073, 2015 査読なし
12. 野田航介. 知っておきたい糖尿病網膜症 (DR) の2大病態. 合併症 網膜症. *プラクティス.* 32: 13 -15, 2015 査読なし
13. 野田航介. 近年における糖尿病網膜症 (DR) 診療機器の進歩. 合併症 網膜症. *プラクティス.* 32 132-135, 2015査読なし
14. 野田航介. 糖尿病網膜症 (DR) に対する分子標的治療 - 抗VEGF療法. 合併症 網膜症. *プラクティス.* 32: 260 -262, 2015 査読なし
- 〔学会発表〕(計 7 件)
1. 野田航介, 村田美幸, 吉田志帆, 神田敦宏, 石田 晋. 網膜グリア細胞に対するアクロレインの作用. 第32回日本糖尿病合併症学会、東京、2017/10/27-29
2. 野田航介. VEGF阻害薬と次の分子標的. シンポジウム「硝子体内注射の現況と進展」. 第37回日本眼薬理学会、高山、2017/9/1-2
3. 野田航介. 糖尿病網膜症に対する創薬研究. 評議員会指名講演 「眼科のトランスレーショナルリサーチ」. 第121回日本眼科学会総会、東京、2017/4/6-9
4. 森 祥平, 村田美幸, 野田航介, 鈴木智浩, 齋藤理幸, 安藤 亮, 加瀬 諭, 齋藤 航, 神田敦宏, 石田 晋. 増殖糖尿病網膜症患者の硝子体アクロレイン結合蛋白 FDP-lysine濃度. 第55回日本網膜硝子体学会総会、東京、2016/12/2-4
5. Noda K. Polyamine oxidation in diabetic retinopathy. 11th Japan-Korea International Symposium in Ophthalmology: Sapporo, Japan; 2016/11/14
6. Noda K, Murata M, Kanda A, Ishida S. Accumulation of acrolein-lys adduct in the vitreous fluid of proliferative diabetic retinopathy. 49th Annual Retina Society Meeting: San Diego, USA; 2016/9/14-17
7. 野田航介, 村田美幸, 神田敦宏, 石田 晋. 糖尿病網膜症におけるポリアミン代謝の病態関与. 第22回日本糖尿病眼学会総会、仙台、2016/10/7-8

〔図書〕(計 2 件)

1. 野田航介. Monthly Book OCULISTA 48.
全日本病院出版会 150 (100-106), 2017
2. 野田航介. 知っているようで知らない新しい糖尿病網膜症診療. メジカルビュー社 268 (31-35), 2016

6. 研究組織

(1)研究代表者

野田 航介 (Noda, Kousuke)
北海道大学・医学研究院・准教授
研究者番号： 90296666

(2)研究分担者

神田 敦宏 (Kanda, Atsuhiro)
北海道大学・医学研究院・特任講師
研究者番号： 80342707

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()