

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09394

研究課題名(和文) 糖尿病の脈絡膜厚調節に対するVEGF- B-クリスタリン系の関与

研究課題名(英文) Role of VEGF-alphaB-crystallin in regulation of choroidal thickness in diabetes

研究代表者

加瀬 諭 (Kase, Satoru)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：60374394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：培養網膜色素上皮(RPE)細胞を用いて、高血糖負荷を行なったところ、B-クリスタリンの発現は予想に反し、低下した。一方、A-クリスタリンの発現に変化はなかった。血糖下降薬であるメトフォルミンを投与すると、高血糖負荷によるB-クリスタリンの発現はさらに低下した。加えて、高血糖負荷により、培養RPE細胞におけるB-クリスタリンの上清中の分布を検討したが、有意な分泌上昇はみられなかった。以上より、RPE細胞における高血糖負荷後のB-クリスタリンは、細胞の保護的な機能よりも高血糖による細胞障害を反映す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

B-クリスタリンは様々な機能を有し、VEGFの分子シャペロンであるも筆者らは報告してきた。しかしながら、糖尿病網膜症病態における網膜色素上皮(RPE)のB-クリスタリンの機能は全くわかっていない。本研究により、当初我々はB-クリスタリンは高血糖負荷に対するRPEに対する細胞保護的な作用を有するのではないかと想像し研究を行った。しかし、予想に反し、高血糖下で容易に分解される可能性を示した。今後はB-クリスタリンの発現を増加させる研究を行い、糖尿病網膜症におけるRPEの細胞障害を可能な限り軽減するよう努めたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：We performed in vitro assays in human RPE cells treated with high glucose. B-crystallin mRNA levels were significantly decreased during culture with 50mM glucose to 24 hours in comparison to mannitol control. While the B-crystallin mRNA levels unaltered during culture with H2O2 with/without high-glucose condition and hypoxic conditions. On the other hand, B-crystallin protein concentrations remained undetectable throughout the time-course, which did not increase in the supernatants of RPE cells in high glucose stimulation.

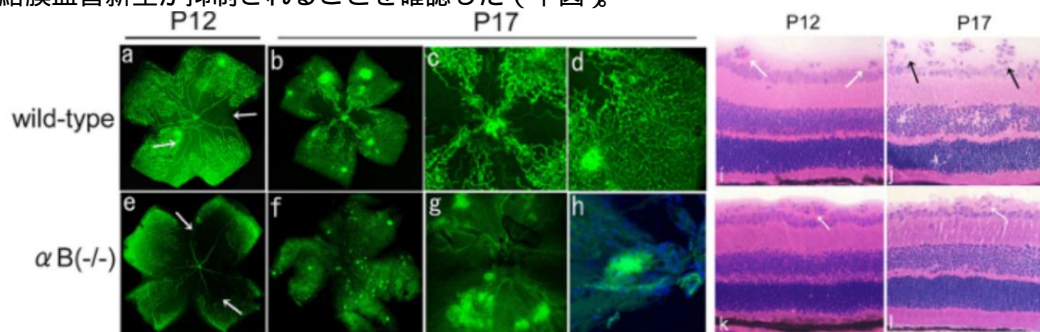
研究分野：眼病理学

キーワード：B-クリスタリン 網膜色素上皮 糖尿病網膜症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

VEGF の発現亢進が、糖尿病網膜症を始めとする様々な眼内血管新生疾患の病態に關与していることが明らかとなった。他方、VEGF 蛋白の分解経路の詳細は不明であった。 α -クリスタリンは水晶体構成蛋白の一つであり、A と B のサブユニットよりなる。我々は過去に B-クリスタリンが VEGF 蛋白に結合する分子シャペロンであることを同定した (Kase S, et al. Blood 2010)。B-クリスタリンの発現を低下させると VEGF 蛋白が分解され、マウス網膜血管新生、脈絡膜血管新生が抑制されることを確認した (下図)。



実際、B-クリスタリンの発現を低下させると、新生血管の発達過程において、病理学的に多数の毛細血管がアポトーシスを生じた。我々はさらに、B-クリスタリンは増殖糖尿病網膜症 (PDR) の増殖組織の新生血管にも発現されており、VEGF と共発現していることを確認した (Dong Z, Kase S, et al. Retina 2012)。一方、マウスの硝子体内に終末糖化産物 (AGE) 蛋白を注射すると、網膜では A-クリスタリンの発現が誘導された (Kase S, et al. Int J Mol Med 2009)。ヒト剖検眼における AGE の免疫組織化学的検討では、糖尿病の既往のある症例において網膜より脈絡膜に AGE が蓄積していた (Kase S, et al. JDM 2011)。 α -クリスタリンは糖尿病網膜症のみならず、眼腫瘍など様々な眼部増殖性疾患の病態にも關与していることを示した (Kase S, et al. Arch Ophthalmol 2009; Kase S, et al. Br J Ophthalmol 2009)。網膜の視細胞を含む外層機能の維持には、適切な脈絡膜血流が必須である。我々は近年、全身の糖尿病治療歴が中心窩下脈絡膜厚に影響を及ぼすことを明らかにした (Kase S, et al. Eur J Ophthalmol 2016)。実際、糖尿病無治療群では、初期の糖尿病網膜症において脈絡膜厚が菲薄化し、PDR ではむしろ肥厚する結果を得た。一方、糖尿病眼における脈絡膜厚は網膜光凝固や抗 VEGF 薬投与などにより変化することも報告された (Melancia et al. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2016)。しかしながら、糖尿病における脈絡膜厚変化がどのような分子メカニズムで制御が行われているか不明である。

本研究により、当初我々は B-クリスタリンは高血糖負荷に対する RPE に対する細胞保護的な作用を有するのではないかと想像し研究を行った。加えて、RPE における B-クリスタリンの発現が、脈絡膜厚調節に關与しているのではないかと推測した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病網膜症における脈絡膜厚調節における B-クリスタリンの關与を明らかにすることである。これを示すために、B-クリスタリンと VEGF および AGE との關連を検討する。

3. 研究の方法

本研究では、同意の得られた全身的に無治療の糖尿病患者より血清を採取し、B-クリスタリン・AGE の濃度を測定する。ストレプトゾトシン (STZ) の容量を 60 mg/kg に調整し、8 週令の C57BL6 マウスの腹腔内に注入し、STZ 誘導糖尿病モデルを作製する。当研究室で使用可能であるマウス OCT 画像を用いて、糖尿病モデルマウスにおける脈絡膜厚を定量的に経時的に測定しマウスの体重、および血中グルコース濃度と比較する。VEGF の発現変化と網脈絡膜厚が關連するか、RPE/脈絡膜組織を分けて蛋白、mRNA を抽出し、定量的に評価する。培養網膜色素上皮細胞を用いて高血糖負荷を行い、細胞及び培養上清中の A, B-クリスタリンの発現を ELISA 法で検討する。

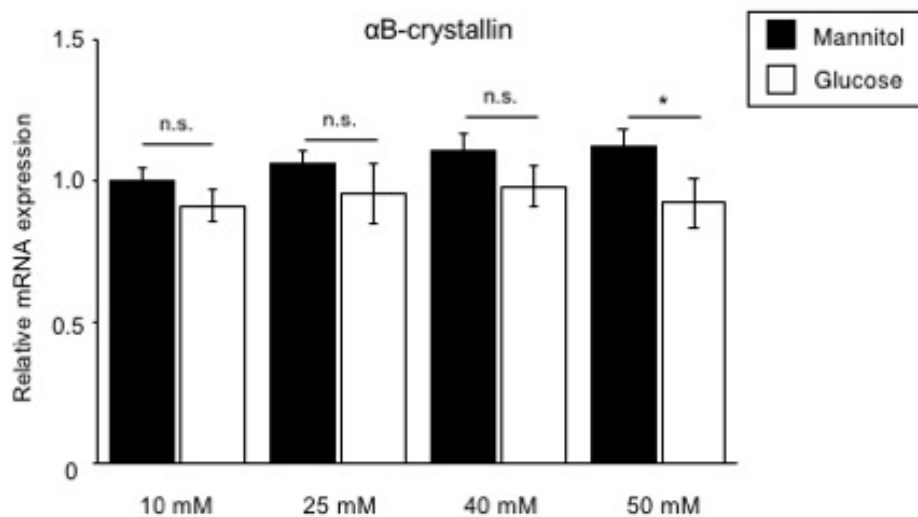
4. 研究成果

糖尿病患者の血清を検討したところ、非糖尿病と比較し、AGE のみが有意な上昇が見られた。B-クリスタリンの変化はなく、AGE との相関も見られなかった。STZ 誘導糖尿病モデルマウスでは、誘導 2 ヶ月をピークに血中グルコース値、体重の上昇と脈絡膜厚の肥厚が見られた。網膜

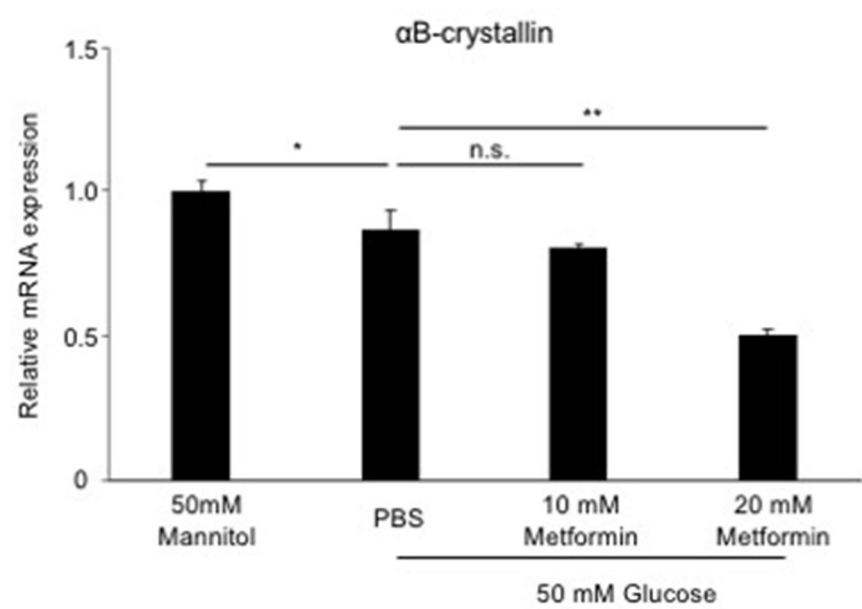
色素上皮(RPE)と脈絡膜の複合を摘出して、 α B-クリスタリン、VEGF の発現を検討したところ、STZ 誘導 2 ヶ月で両者が有意に低下していることが示唆された。培養 RPE 細胞を用いて、高血糖負荷を行なったところ、 α B-クリスタリンの発現は予想に反し、低下した(下図上段 A)。

一方、 α A-クリスタリンの発現に変化はなかった。血糖降薬であるメトホルミンを投与すると、高血糖負荷による α B-クリスタリンの発現はさらに低下した(下図下段 B)。加えて、高血糖負荷により、培養 RPE 細胞における α B-クリスタリンの上清中の分布を検討したが、有意な分泌上昇はみられなかった。

以上より、RPE 細胞における高血糖負荷後の α B-クリスタリンは、細胞の保護的な機能よりも高血糖による細胞障害を反映する可能性が示唆された。



A



B

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Endo H, Kase S, Takahashi M, Saito M, Yokoi M, Sugawara C, Katsuta S, Ishida S, Kase M	4. 巻 7
2. 論文標題 Relationship between diabetic macular edema and choroidal layer thickness.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0226630
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0226630.	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 Kase S, Endo H, Takahashi M, Saito M, Yokoi M, Ito Y, Katsuta S, Sonoda S, Sakamoto T, Ishida S, Kase M	4. 巻 104
2. 論文標題 Alteration of choroidal vascular structure in diabetic retinopathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 British Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 417 ~ 421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bjophthalmol-2019-314273	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Endo H, Kase S, Ito Y, Takahashi M, Yokoi M, Katsuta S, Sonoda S, Sakamoto T, Ishida S, Kase M	4. 巻 257
2. 論文標題 Relationship between choroidal structure and duration of diabetes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol	6. 最初と最後の頁 1133-1140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00417-019-04295-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Liu Y, Kanda A, Wu D, Ishizuka ET, Kase S, Noda K, Ichihara A, Ishida S	4. 巻 17
2. 論文標題 Suppression of choroidal neovascularization and fibrosis by a novel RNAi therapeutic agent against (pro)renin receptor.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Ther Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 113-125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtn.2019.05.012.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wu D, Kanda A, Liu Y, Kase S, Noda K, Ishida S	4. 巻 33
2. 論文標題 Galectin-1 promotes choroidal neovascularization and subretinal fibrosis mediated via epithelial-mesenchymal transition.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB J	6. 最初と最後の頁 2498-2513
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201801227R.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 加瀬 諭	4. 巻 36
2. 論文標題 糖尿病網膜症における脈絡膜厚と糖尿病治療の関与	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 あたらしい眼科	6. 最初と最後の頁 647-652
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wu Di, Kanda Atsuhiko, Liu Ye, Kase Satoru, Noda Kousuke, Ishida Susumu	4. 巻 33
2. 論文標題 Galectin-1 promotes choroidal neovascularization and subretinal fibrosis mediated via epithelial-mesenchymal transition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 2498 ~ 2513
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201801227R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ando Ryo, Saito Wataru, Kanda Atsuhiko, Kase Satoru, Fujinami Kaoru, Sugahara Michitaka, Nakamura Yosuke, Eguchi Shuichiro, Mori Shohei, Noda Kousuke, Shinoda Kei, Ishida Susumu	4. 巻 196
2. 論文標題 Clinical Features of Japanese Patients With Anti- -enolase Antibody?Positive Autoimmune Retinopathy: Novel Subtype of Multiple Drusen	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 181 ~ 196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajo.2018.08.044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Endo Hiroaki, Kase Satoru, Takahashi Mitsuo, Yokoi Masahiko, Isozaki Chisato, Katsuta Satoshi, Kase Manabu	4. 巻 46
2. 論文標題 Alteration of layer thickness in the choroid of diabetic patients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical & Experimental Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 926 ~ 933
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ceo.13299	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Atsushi, Saito Wataru, Kase Satoru, Ishijima Kan, Noda Kousuke, Ishida Susumu	4. 巻 2018
2. 論文標題 Role of the Epipapillary Membrane in Maculopathy Associated with Cavitory Optic Disc Anomalies: Morphology, Surgical Outcomes, and Histopathology	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/5680503	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 加瀬 諭	4. 巻 33
2. 論文標題 加齢性疾患への対応Q&A . 高齢者の前眼部に生じる腫瘍について教えてください	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 あたらしい眼科	6. 最初と最後の頁 321-326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 加瀬 諭	4. 巻 60
2. 論文標題 今日の治療指針 私はこう治療しているー	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 眼内腫瘍	6. 最初と最後の頁 1501-1502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 加瀬 諭	4. 巻 72
2. 論文標題 特集 黄斑円孔の最新レビュー 黄斑円孔手術におけるinverted ILM flap techniqueの評価	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床眼科	6. 最初と最後の頁 38-43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Kase S, Noda K, Hirooka K, Hashimoto Y, Ishida S
2. 発表標題 Choroidal circulation in radiation retinopathy
3. 学会等名 The 52nd Annual Retina Society Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kase S
2. 発表標題 Flow Cytometry of IgG4-Related Ophthalmic Disease: Ocular Immunity and Inflammatory Diseases.
3. 学会等名 34th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress (APAO) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kase S
2. 発表標題 Flow Cytometry in the Diagnosis of Lymphoma and Lymphoproliferative Disorders.
3. 学会等名 34th Asia-Pacific Academy of Ophthalmology Congress (APAO) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加瀬 諭、遠藤弘毅、高橋光生、齋藤理幸、横井匡彦、伊藤有希、勝田 聡、園田祥三、坂本泰二、石田 晋、加瀬 学
2. 発表標題 糖尿病網膜症眼における脈絡膜構造解析
3. 学会等名 第58回日本網膜硝子体学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kase S, Namba K, Iwata D, Mizuuchi K, Kitaichi N, Ishida S.
2. 発表標題 Clinical features of primary vitreoretinal lymphoma in Hokkaido, Japan
3. 学会等名 American Academy of Ophthalmology: Chicago, USA
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kase S, Noda K, Ishida S.
2. 発表標題 Choroidal melanoma arising in pachychoroid
3. 学会等名 The Retina Society 51st Annual Scientific Meeting: San Francisco, USA
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kase S, Namba K, Kannno-Okada H, Iwata D, Mizuuchi K, Fukuhara T, Fukuhara J, Kitaichi N, Matsuno Y, Ishida S.
2. 発表標題 Immunohistochemical and immunocytochemical analyses in patients with vitreoretinal lymphoma
3. 学会等名 36th World Ophthalmology Congress (WOC) 2018: Barcelona, Spain
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 遠藤弘毅、加瀬 諭、高橋光生、齋藤理幸、横井匡彦、菅原ちさと、勝田 聡、加瀬 学
2. 発表標題 糖尿病黄斑浮腫と脈絡膜層別厚の関連
3. 学会等名 第24回日本糖尿病眼学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加瀬 諭、橋本勇希、木下留美子、石田 晋.
2. 発表標題 眼付属器悪性リンパ腫に対する放射線照射後の脈絡膜循環
3. 学会等名 第35回日本眼循環学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菊地 郁、加瀬 諭、石田 晋
2. 発表標題 視神経乳頭黒色細胞腫のOCT angiography所見
3. 学会等名 第122回日本眼科学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Rodriguez F, Eagle RC, Moulin A, Croxatto JO, Kase S, Mudhar HS.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 International Agency for Research on Cancer (IARC)	5. 総ページ数 94-95
3. 書名 Neurofibroma and ganglioneuroma of the choroid. WHO Classification of Eye Tumours, 4th edition.	

〔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	神田 敦宏 (Kanda Atsuhiko) (80342707)	北海道大学・医学研究院・特任講師 (10101)	

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