

令和 4 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：2019～2021

課題番号：19K09951

研究課題名(和文) サイクリン依存性キナーゼ5を標的とした糖尿病網膜症治療

研究課題名(英文) Treatment for diabetic retinopathy targeting cyclin-dependent kinase 5

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は腫瘍増殖などに伴う異常な血管新生や脈絡膜血管新生に関与しているPPAR α が糖尿病網膜症の進行にも関与していることを報告したが、サイクリン依存性キナーゼ5(Cdk5)がPPAR α の糖尿病誘発作用を促進することが報告された。そこで、増殖糖尿病網膜症(PDR)に対する硝子体手術で得られた手術検体を用いてCdk5の発現について検討した。硝子体手術時に採取された硝子体と増殖膜におけるCdk5の蛋白発現はPDRにおいて対照よりも有意に高かった。また、Cdk5 mRNAの発現もPDRで有意に高値であった。以上より、Cdk5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を示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病網膜症に対する抗VEGF療法は治療抵抗性を示す症例もあり、VEGFの上流の発症機序は不明な部分も多い。Cdk5はほぼすべての臓器・組織で発現しているが、神経細胞に高いことが知られている。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活性は不明であった。我々は硝子体手術時に得られた手術検体を用いてCdk5の眼内での発現を検索し対照と比較して有意に発現が亢進していることを示した。このことからCdk5がPPAR α とVEGFの発現亢進を介して糖尿病網膜症の病因に関与していることが示唆され、Cdk5が糖尿病網膜症治療の標的となりうることを示したと考えている。

研究成果の概要(英文)：We reported that PPAR α , which is involved in abnormal angiogenesis associated with tumor growth and choroidal neovascularization, is also involved in the progression of diabetic retinopathy. In addition, it was reported that cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) promotes the diabetogenic action of PPAR α . Therefore, we decided to investigate the expression of Cdk5 using surgical specimens obtained by vitrectomy for proliferative diabetic retinopathy (PDR). Cdk5 protein expression in the vitreous and proliferative membranes collected during vitrectomy was significantly higher in PDR than in controls. Expression of Cdk5 mRNA was also significantly higher in PDR. These results suggested that Cdk5 may be involved in the pathogenesis of diabetic retinopathy and may be a target for the treatment 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

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでの研究で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臨床応用されている。しかし、抗 VEGF 療法に抵抗性を示す症例もあることや VEGF の上流の発症機序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 の上流の発症機序を解明することにより、抗 VEGF 療法よりも効果的な糖尿病網膜症治療を実現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 (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、我々は最近、この PPAR 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の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 mRNA、蛋白レベルで発現が亢進していることを示し、糖尿病網膜症の進行に関与していることを報告した。

また、2015年にサイクリン依存性キナーゼ 5 (Cdk5: Cyclin-dependent kinase 5) による PPAR のリン酸化がインスリン抵抗性の発症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 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 に結合するチアゾリジンジオンや、PPAR 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。これを裏付けるように 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、注目を集めている。人種を問わず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関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。そこで、この Cdk5 に着目し Cdk5 の活性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かを検証するために本研究を立案した。

2. 研究の目的

我々は腫瘍増殖などに伴う異常な血管新生や脈絡膜血管新生に関与している PPAR が糖尿病網膜症の進行にも関与していることを報告した。また、2015年の Nature 誌に Cdk5 が PPAR 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 が Cdk5 の制御を受けている可能性が予想される。Cdk5 はほぼすべての臓器・組織で発現しているが、神経細胞に高いことが知られている。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 活性は不明である。

また、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 Chemoattractant 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、硝子体液中に高濃度で存在していることを報告してきた。今回、硝子体手術で得られる増殖膜と硝子体液を用いて Cdk5 活性を検査し、増殖糖尿病網膜症において Cdk5 の異常な活性化がないかを確認し、将来的に Cdk5 の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ている。

3. 研究の方法

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 の眼内活性と PPAR との相互作用を総合的に解明していく。

(1) 硝子体液検体と増殖膜検体の採取、保存

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する。採取した硝子体液検体はすぐに -80℃ にて保存する。特発性黄斑上膜・増殖糖尿病網膜症 (図1、図2) に対する硝子体手術にて遊離した増殖膜、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℃ にて保存する。Western blotting 用検体についても -80℃ にて保存し、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。

(2) 増殖糖尿病網膜症の硝子体・増殖膜での Cdk5 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 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する。増殖膜および特発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。Cdk5 および Cdk5 の制御因子である p35 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 Cdk5、p35 遺伝子発現量を比較検討する。Cdk5、p35 タンパク質の発現量についても PPAR や、VEGF など血管新生に関与するサイトカインを含めて Western blotting 法により確認する。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 Cdk5 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、Cdk5、p35 の局在についても検討する。

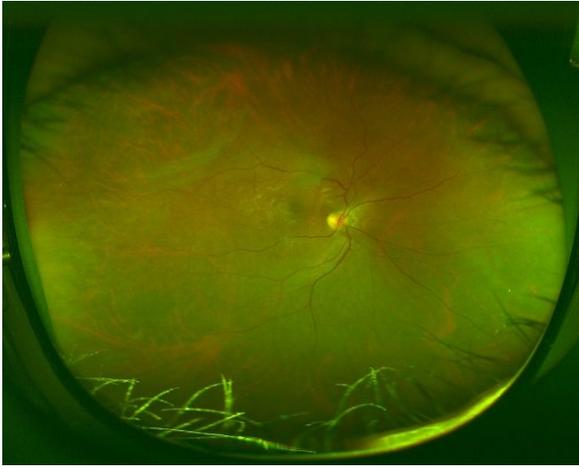


図1 コントロール患者の眼底画像（上段：特発性黄斑上膜（中央の白色の組織が網膜前膜）
下段：特発性黄斑円孔）

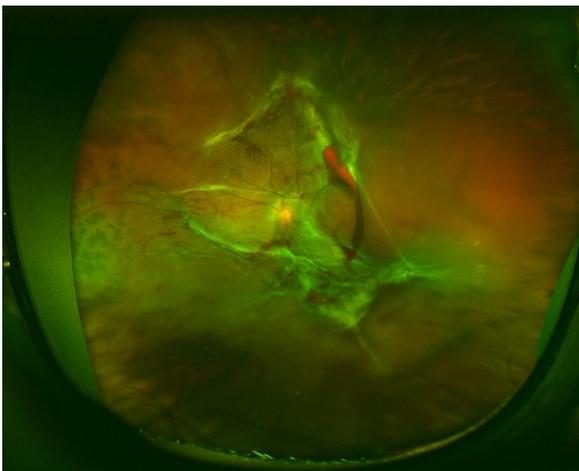


図2 増殖糖尿病網膜症患者の眼底画像（視神経乳頭から伸びる白色の組織が増殖膜）

4. 研究成果

(1) 増殖膜検体における PPAR と Cdk5、p35 の mRNA の発現

ヒト増殖糖尿病網膜症患者の硝子体手術に得られた増殖膜サンプル7検体とコントロールとして新生血管を伴わないヒト特発性黄斑上膜5検体について RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて総 RNA を抽出した。得られた RNA を DNase (RQ1 RNase フリー-DNase, Promega, Madison, WI) で処理し、Revertra ace (Toyobo, Osaka, Japan) で逆転写して cDNA を得た。定量的 RT-PCR は、ABI 7500 高速リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems, Foster City, CA) と SYBR Green PCR マスターミックス (Applied Biosystems) を用いて施行した。PPAR と Cdk5、Cdk 5 の制御因子である p35 の mRNA の発現は、グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) の発現で正規化した。

PPAR mRNA の発現レベルは、対照患者 (0.033 ± 0.053 、平均 \pm 標準偏差) よりも増殖糖尿病網膜症患者 (0.79 ± 1.25) で有意に高かった ($p = 0.0185$)。同様に、Cdk5 mRNA 発現レベルは、対照患者 (0.45 ± 0.29) よりも増殖糖尿病網膜症患者 (13.55 ± 14.17) で有意に高かった ($p = 0.028$)。p35 の mRNA レベルは、対照患者 (0.0051 ± 0.0032) よりも増殖糖尿病網膜症患者 (0.077 ± 0.070) で有意に高かった ($p = 0.042$)。

(2) 増殖膜検体における PPAR α と Cdk5、p35 蛋白の発現

ヒト増殖糖尿病網膜症患者の増殖膜サンプル7検体ならびにコントロールとして黄斑上膜症例の網膜前膜サンプル5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 Cdk5 抗体を用いた免疫染色法により比較した。PPAR α と Cdk5、p35 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。

蛍光強度の定量分析では、PPAR α の蛍光強度がコントロール (100 ± 40.92) よりも増殖糖尿病網膜症 (220.20 ± 49.06) で有意に高かった ($p = 0.003$)。同様に、Cdk5 の蛍光強度は、コントロール (100 ± 21.36) よりも増殖糖尿病網膜症 (230.86 ± 46.50) で有意に高かった ($p = 0.003$)。p35 の蛍光強度は、増殖糖尿病網膜症 (231.91 ± 15.93) のほうがコントロール (100 ± 13.26 , $p = 0.003$) よりも有意に高かった。また、二重染色を行うと PPAR α と Cdk5、p35 は血管内皮細胞のマーカーである von Willebrand factor と二重染色され主に血管内皮細胞に発現していることが確認された。

(3) 硝子体中の PPAR α と Cdk5、総蛋白濃度

徳島大学病院生命科学・医学系研究倫理審査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特発性黄斑円孔・特発性黄斑上膜患者の硝子体87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 α と Cdk5、総蛋白濃度の測定を行った。硝子体液中の PPAR α 、Cdk5濃度は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (LS-F12376-1, LS-F11104-1; LifeSpan Bio-Sciences, Inc., Seattle, WA, USA) を用いて測定した。増殖糖尿病網膜症を有する患者の硝子体液中の PPAR α 、Cdk5濃度の上昇は、眼局所で PPAR α 、Cdk5 が産生されただけで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、この漏出による影響を最小限にするため PPAR α 、Cdk5 の各濃度は総蛋白濃度で除した値として評価した。硝子体液中の全蛋白濃度は、対照患者 (0.62 ± 0.42 mg/ml) よりも増殖糖尿病網膜症患者 (1.90 ± 0.91 mg/ml) で有意に高かった ($p < 0.001$)。硝子体液中の全蛋白濃度あたりの PPAR α 濃度は、対照患者 (70.82 ± 36.02 ng/mg) よりも増殖糖尿病網膜症患者 (270.53 ± 56.41 ng/mg) で有意に高かった ($p < 0.001$)。全蛋白濃度あたりの Cdk5 濃度は、対照患者 (0.88 ± 0.11 ng/mg) よりも増殖糖尿病網膜症患者 (4.83 ± 1.13 ng/mg) で有意に高かった ($p < 0.001$)。

以上の研究結果より、Cdk5 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を示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mitamura Yoshinori, Enkhmaa Tserennadmid, Sano Hiroki, Niki Masanori, Murao Fumiko, Egawa Mariko, Sonoda Shozo, Sakamoto Taiji	4. 巻 105
2. 論文標題 Changes in choroidal structure following intravitreal aflibercept therapy for retinal vein occlusion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 704 ~ 710
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bjophthalmol-2020-316214	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 該当する
1. 著者名 Nagasato Daisuke, Mitamura Yoshinori, Egawa Mariko, Murao Fumiko, Nagasawa Toshihiko, Komori Natsumi, Sonoda Shozo, Sakamoto Taiji, Tabuchi Hitoshi	4. 巻 62
2. 論文標題 Changes in Choroidal Component Ratio and Circulation After Coffee Intake in Healthy Subjects	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.62.3.27	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 Kinoshita Takamasa, Imaizumi Hiroko, Shimizu Miho, Mori Junya, Hatanaka Akira, Aoki Shuichiro, Miyamoto Hiroto, Iwasaki Masanori, Murao Fumiko, Niki Masanori, Sano Hiroki, Sonoda Shozo, Sakamoto Taiji, Mitamura Yoshinori	4. 巻 9
2. 論文標題 Systemic and Ocular Determinants of Choroidal Structures on Optical Coherence Tomography of Eyes with Diabetes and Diabetic Retinopathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-52750-0	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 Nagasato Daisuke, Mitamura Yoshinori, Egawa Mariko, Kameoka Masahiro, Nagasawa Toshihiko, Tabuchi Hitoshi, Kinoshita Takamasa, Sonoda Shozo, Sakamoto Taiji	4. 巻 257
2. 論文標題 Changes of choroidal structure and circulation after water drinking test in normal eyes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 2391-2399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00417-019-04427-7	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 -

〔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・大学院医歯薬学研究部(医学域)・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		
モンゴル	モンゴル健康科学大学		