

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18872

研究課題名(和文) 糖尿病黄斑浮腫に対するレーザー治療の奏功メカニズムの解明と効果的な照射条件の探索

研究課題名(英文) Elucidation of the response mechanism of laser treatment for diabetic macular edema and search for effective irradiation conditions

研究代表者

白矢 智靖 (Shiraya, Tomoyasu)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60572394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病黄斑浮腫の治療としてマイクロパルスを用いた従来法よりも低侵襲を可能とした閾値下レーザーがある。本研究では、従来法による照射およびマイクロパルスによる2つの照射方法を用いてヒトiPS細胞由来のRPE細胞に対して照射を行い、これらの照射条件が及ぼす遺伝子発現変化についてRNAシーケンスを使って網羅的な検討を行った。その結果、閾値下レーザーでは従来法と比べて光感受性や視細胞維持などの神経系プロセスに有益な効果をもたらす遺伝子発現、また、従来法よりもアポトーシスの抑制に有利である遺伝子発現がみられた。この結果は、レーザー治療が網膜に及ぼす温熱効果の分子機構の解明に貢献するものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病黄斑浮腫(DME)に対する治療は抗VEGF療法が第一選択であるものの、頻回投与の必要性や治療抵抗例があり、現在でも黄斑レーザーが担う役割は大きい。しかし、従来法では視力の安定化は示されているものの、少なからず網膜への侵襲が懸念される。これを克服するためにマイクロパルスを使った閾値下レーザー(SMPL)が登場したが、この奏功機序については十分に解明されていない。本研究によってSMPLは従来法よりも光感受性や視細胞維持などの神経系プロセスに有益な効果をもたらす遺伝子発現や、アポトーシスの抑制に有利である遺伝子発現がみられ、SMPLの優位性を示し、これからのDME治療への普及が期待される。

研究成果の概要(英文)：Subthreshold micropulse laser(SMPL) is a treatment for diabetic macular edema that is less invasive therapy than conventional irradiation methods. In this study, we performed a transcriptome analysis using RNA sequencing to compare the effects of these two lasers on human pluripotent stem cell (hPSC)-derived RPE cells. As a result, SMPL suppressed apoptosis more than conventional laser, indicating that SMPL could be more advantageous for light-sensitive neurological processes and prevent photoreceptor degeneration. The results provide insights into the genetic responses and may contribute to the understanding of the molecular mechanisms of laser-induced thermal effects.

研究分野：糖尿病網膜症

キーワード：糖尿病黄斑浮腫 糖尿病網膜症 網膜光凝固術 閾値下レーザー RNAシーケンス

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病黄斑浮腫（DME）は、液体流入と排出のバランスが不均衡に転じた結果、網膜内に液体が貯留する現象であり、流入因子としての網膜血管の透過性亢進のみならず、バリア機能や排出機能を担う網膜色素上皮（RPE）の障害も重要である。DME の治療としては抗 VEGF（血管内皮増殖因子）療法を主とするほか、黄斑部への局所レーザー治療も適応される。近年では、DME に対する低侵襲黄斑レーザー治療として、マイクロパルスを用いた閾値下レーザー（SMPL）が注目され、既にランダム化比較試験や Meta-analysis といったエビデンスレベルの高い研究において従来法よりも視力改善に優れていることが報告されている。SMPL の奏功機序は分子シャペロンとして機能する熱ショック蛋白(HSP)の発現上昇が Key trigger とされているものの、SMPL が及ぼす分子メカニズムはまだ十分に解明されていない。

## 2. 研究の目的

- (1) 従来法と SMPL 法で human pluripotent stem cell (hPSC)-derived RPE cells に対して照射を行い、RNA シークエンスを用いたトランスクリプトーム解析によって遺伝子発現変化について比較検討した。
- (2) 照射による RPE のバリア機能の変化を調べるために、RPE の透過性を TEER（電気抵抗測定値）で測定し、さらに免疫染色で細胞間接着について調べた。

## 3. 研究の方法

### (1) 従来法と SMPL 法の照射条件の設定

連続波（Continuous wave: CW）方式である従来法、および SMPL 照射が可能なプロトタイプ実験用レーザー装置を用いて細胞への照射を行った。照射条件について、従来法では 50  $\mu$ m, 0.1sec, spacing:1, yellow として、一方 SMPL 法では 200  $\mu$ m, 0.2sec, 5% DC, spacing:0, yellow(実臨床に準じた設定)とした。ここで照射出力の設定方法として、従来法では細胞に照射スポットが確認された最小出力、SMPL 法では理想的な閾値下レーザーの照射条件を決定するために、Cell viability assay で細胞死を認めずに、かつ HSP70 の発現上昇が得られる値とした。

(2) 上記の設定条件で照射を行い、照射後 3 時間および 24 時間(hr)の細胞を用いて RNA シークエンスを行なった。発現変動遺伝子(DEGs)をもとに、両群における遺伝子発現量と HSP family の発現パターン、さらにエンリッチメント解析による機能予測を用いて比較を行なった。

(3) 培養 RPE へレーザー照射を行い、TEER を用いて RPE のバリア機能の変化として抵抗値を調べた。さらに細胞間接着の構造変化を調べるために tight junction の主要構成蛋白である ZO-1 の免疫染色による評価を行った。

## 4. 研究成果

(1) 照射条件の出力設定において、従来法では 150mW、SMPL 法では 300mW の出力とした。

(2) RNA シーケンス解析

① 遺伝子発現変動量の比較において、従来法では SMPL よりも多くの遺伝子発現がみられた (1,771 vs 520 genes)。また、HSP family の発現比較については、従来法による照射後 3hr では、Hsp70 family のほか、Hsp105/110 の発現上昇がみられ、24hr でも Hsp70 family の発現が維持された。一方で、SMPL では 3hr で HSP70 family (HSPA7, HSPA6, HSPA2) が発現上昇したものの、24hr ではこれらの発現は認めなかった。

② 遺伝子発現プロファイルを用いた gene ontology による比較では、従来法による照射後 3hr において以下の biological processes と pathway に関与する DEGs が発現上昇した。Positive regulation of cell death, Response to growth factor, Regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade, p38 MAPK cascade, Regulation of cellular response to stress, p53 downstream pathway, MAPK signaling pathways。また、SMPL 照射後 24hr においては視細胞維持や発達に関わる DEGs (Photoreceptor cell maintenance, Photoreceptor cell development) の発現が上昇したが、一方で従来法ではこれらの発現が低かった。さらに、従来法では regulation of the MAPK cascade や wound healing に関与する DEGs が 24hr で上昇し、p53 downstream pathway に関与する DEGs も 3hr と 24hr で上昇した。

③ エンリッチメント解析による SMPL 法と従来法との遺伝子発現比較では、従来法と比べて SMPL 法では光感受性や視細胞維持などの神経系プロセスに関する DEGs が発現上昇する一方で、成長因子や p53 downstream に関連する DEGs の発現が低いことがわかった。これらの結果から、従来法と比べて、SMPL では光感受性や視細胞維持などの神経系プロセスに有益な作用をもたらし、一方で、成長因子や p53 downstream に関連する DEGs の発現が低く、従来法よりも DME の軽減やアポトーシスの抑制に有利である可能性が示唆された。

(3) 0mW (コントロール)、SMPL、従来法の 3 群による TEER を比較したところ、照射後 3hr および 24hr でも差が認められなかった ( $p=0.93$ ,  $p=0.83$ ; one-way ANOVA)。また、ZO-1 の免疫染色において、従来法および SMPL で tight junction の構造に顕著な差はみられなかった。

本研究結果から、従来法および SMPL の照射条件の違いによって RPE の遺伝子応答に関する洞察をもたらし、これまで不明な点が多かったレーザー治療が網膜に及ぼす温熱効果の分子機構の解明に貢献するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 白矢智靖
2. 発表標題 糖尿病網膜症に対する低侵襲の検査と治療の現状
3. 学会等名 第36回日本糖尿病合併症学会・第27回日本糖尿病眼学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白矢智靖
2. 発表標題 閾値下レーザーが及ぼす遺伝子発現変化と各遺伝子群の機能予測による従来法との比較
3. 学会等名 第75回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2021年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------