

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592066

研究課題名（和文） 診断治療の分子標的同定をめざした増殖硝子体網膜症のマイクロアレイ解析

研究課題名（英文） Microarray analysis of proliferative vitreoretinopathy to identify molecular targets for new diagnosis and therapy

研究代表者

吉田 茂生（YOSHIDA SHIGEO）

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：50363370

研究成果の概要（和文）：

増殖硝子体網膜症に伴う網膜上増殖組織や増殖モデルマウス網膜に対し、包括的遺伝子発現解析を行った。増殖組織に発現する遺伝子群は、酸化的リン酸化、細胞間接着、アクチン骨格制御、細胞間コミュニケーション、サイトカイン受容体連関などに分類でき、線維芽細胞に局在するペリオスチン遺伝子を含んでいた。網膜前増殖の前駆病変である虚血マウス網膜の解析では、虚血に伴いMIP1 $\beta$ が網膜内層で発現上昇し、生理的な網膜血管新生に関与していた。

研究成果の概要（英文）：

We performed global gene expression analysis using epiretinal membranes (ERMs) from patients with proliferative vitreoretinopathy (PVR) and mouse model of ischemic retinopathy. Genes preferentially expressed in ERMs were subdivided by the functional sets of genes such as oxidative phosphorylation, cell adhesion, cell communication, cytokine-receptor association. Periostin was expressed in ERMs which located in smooth muscle actin-positive cells. In mouse model of ischemic retinopathy, MIP1 $\beta$  was upregulated in ischemic inner retina and was associated with physiological retinal revascularization.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1100000	330000	1430000
2009年度	1200000	360000	1560000
2010年度	1200000	360000	1560000
年度			
年度			
総計	3500000	1050000	4550000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：ゲノム医学、増殖硝子体網膜症、遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

増殖硝子体網膜症 proliferative vitreoretinopathy (PVR)は、裂孔原性網膜剥離や眼外傷に続発して増殖膜が網膜前・後面に形成され、収縮することにより牽引性網膜剥離を生じる難治性の疾患である。その病態は

網膜と硝子体を増殖の場とした眼内細胞増殖であり、一種の創傷治癒反応であるが、過剰増殖は眼内では透明性を阻害する。現在、PVRの治療は硝子体手術による手術療が主体で、その手術手技の進歩とともに治療成績は向上しているが、増殖組織の除去、光凝固術によ

る網脈絡膜の癥痕化と眼内タンポナーデという対症療法の域を出ず、患者の視機能を保持できないことも少なくない。また現在までPVRに対する薬物で明らかな有効性が確認されたものはない。

増殖組織の構成細胞は、網膜色素上皮細胞、網膜グリア細胞、マクロファージ、線維芽細胞、硝子体細胞などが報告されているが、主役は網膜色素上皮細胞であるとされている。網膜上・下で増殖した網膜色素上皮細胞は、線維芽細胞様細胞やマクロファージ様細胞に化生し(上皮間葉移行)、さらに増殖能に富むようになる。また TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) などの細胞増殖因子や走化性因子を分泌し、網膜色素上皮細胞自身、グリア細胞や線維芽細胞の遊走・増殖を促進する。これら増殖した細胞は、コラーゲンやファイブロネクチンを細胞外に産生して線維増殖組織を形成する。この増殖組織が収縮することにより牽引性網膜剥離が生じてPVRが完成する。PVRの発症機序についてこれまで蓄積されてきた知見は、上述のように少数の因子の関与が報告されているのみであるが、実際にはPVRは未知の様々な因子が絡み合って発症する多因子性の疾患である。

## 2. 研究の目的

本研究はPVR増殖組織の包括的遺伝子発現解析により、画期的な診断マーカーや治療の分子標的を同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) Expressed Sequence tag (EST)解析

硝子体手術時に採取した増殖組織をただちにRNAを抽出し、-80°Cに保存した。

#### Switching Mechanism At 5' end of RNA

Transcript(SMART)法によるcDNA増幅を用いたcDNAライブラリを作成し、5'末端からランダムシーケンスを行った。得られたシーケンスのうち低クオリティのクローンは解析から除去し、Repeat Maskerを用いて繰り返し配列をマスク後にBLASTアルゴリズム(National Center for Biotechnology Information (NCBI)を用いて公的データベース上のシーケンスとの一致性を検索し、機能の注釈づけを行った。

### (2) Illumina マイクロアレイ解析

マウス増殖モデル網膜、PVR増殖組織および特発性網膜前膜のサンプルからRNAを抽出し、各々ビオチンで標識したcRNAターゲットを合成し、このcRNAターゲットをIllumina社のマイクロアレイにハイブリダイズした。専用スキャナーでスキャン後、各遺伝子発現

を数値化し、GeneSpringを用いて、データマイニングを行った。

### (3) 硝子体手術後の患者硝子体液中の血管新生因子濃度の変化の検討

対象は初回硝子体手術を行った増殖糖尿病網膜症(PDR)39眼、黄斑上膜あるいは黄斑円孔36眼(対照群)、およびPDR術後3.5~9ヶ月(平均6.7ヶ月)にIOL二次挿入を行った39眼とした。インフォームドコンセントを得て、手術の際に硝子体液を採取し、VEGF、Endostatin濃度をELISA法で測定した。

## 4. 研究成果

(1)硝子体手術の際に網膜前増殖組織、硝子体液、血清を収集した。効率的な組織破碎やRNA抽出の条件を最適化し、増殖組織からのcDNAライブラリの作成後、5'末端からのExpressed Sequence Tag (EST)解析を行った。さらに、各ESTを解析し、non-redundantに分類するESTパイプラインを構築し、発現遺伝子のデータベース化を終了した。増殖硝子体網膜症に伴う増殖組織のESTデータベースをBioinformaticsにより機能分類したところ、抽出遺伝子群は、酸化的リン酸化、細胞間接着、アクチン骨格制御、細胞間コミュニケーション、サイトカイン-受容体関連などに分類できた。

さらに抽出遺伝子の構造と機能を解析した結果、増殖組織中にperiostinが発現しており、増殖組織の線維芽細胞に発現していることを明らかにし、新しい診断治療の分子標的になりうると考えた。本研究を通じて、増殖組織の包括的遺伝子発現解析が真に患者に役立つ分子標的の同定に極めて有用であることが示唆された。

(2)DNAマイクロアレイ(4万遺伝子)を用いて、網膜増殖モデルマウス網膜の包括的遺伝子発現解析を行った。高酸素負荷網膜では、対照正常網膜に比べ発達に関連する遺伝子群の発現低下を認め、高酸素曝露による網膜発達障害を反映していると考えられた。虚血網膜では、高酸素負荷網膜に比べ、代表的な虚血関連因子であるVEGF-AやHif-1 $\alpha$ の発現レベルが上昇していた。虚血網膜で発現が変動した遺伝子群は、血管新生、神経形成関連因子、炎症、抗アポトーシス、解糖系の機能単位に分類された。本解析で抽出された遺伝子群は、網膜において、高酸素負荷による発達障害、虚血後の炎症、血管新生およびリモデリングを規定していると考えられた。

得られた抽出遺伝子のうち、炎症性サイトカインや単球の誘導に関わるケモカインの一

つであるMacrophage inflammatory protein-1 $\beta$  (MIP1 $\beta$ ) の発現が虚血網膜で最も優位に上昇していることを発見した。そこで、MIP-1 $\beta$ の発現レベル、局在、機能についての検討したところ、MIP1 $\beta$ のmRNA、蛋白は、網膜の虚血に伴い発現が上昇し、免疫染色でMIP1 $\beta$ は虚血部位である網膜内層に局在していた。さらに、MIP1 $\beta$ の中和抗体により虚血網膜への単球系細胞の浸潤が抑制され、生理的血管新生も抑制された。以上より、MIP1 $\beta$ が網膜への単球系細胞の浸潤を介して生理的網膜血管新生に関与している可能性が示唆された。

(3)患者の硝子体中の血管新生関連因子をELISA法で測定し、硝子体手術前後で比較したところ、増殖促進因子であるVEGFが急速に減少しており、網膜症の沈静化に寄与すると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

Yoshida S, Ogura A, Ishikawa K, Yoshida A, Kohno R, Yamaji Y, et al.: Gene expression profile of fibrovascular membranes from patients with proliferative diabetic retinopathy. Br J Ophthalmol 94:795-801, 2010.

Ishikawa K, Yoshida S, Kadota K, Nakamura T, Niuro H, Arakawa S, et al.: Gene expression profile of hyperoxic and hypoxic retinas in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 51:4307-4319, 2010.

Yoshida S, Ishikawa K, Matsumoto T, Yoshida A, Ishibashi T, Kono T: Reduced concentrations of angiogenesis-related factors in vitreous after vitrectomy in patients with proliferative diabetic retinopathy. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 248:799-804, 2010.

[学会発表] (計6件)

吉田茂生, 石川桂二郎, 樋口直美, 向野利寛, 石橋達朗 (2010) 増殖糖尿病網膜症にともなう線維血管増殖組織におけるペリオスチンの発現上昇. 2010年4月15日 第114回日本眼科学会総会, 名古屋

吉田茂生, 石川桂二郎, 向野利寛, et al. (2010) 増殖糖尿病網膜症の硝子体手術前後の硝子体中 VEGF の低下:同一症例での検討. 2010年11月26日 日本網膜硝子体学会, 大阪市

吉田茂生, 松本時子, 鍋島崇寛, 野田美登利, 佐伯有祐, 向野利寛 (2010) 最近2年間の増殖糖尿病網膜症に対する硝子体手術成績. 九州眼科学会, 2010年5月28日 佐賀市

Yoshida S (2011) Alteration of the balance between vascular endothelial growth factor and endostatin in vitreous after vitrectomy in patients with proliferative diabetic retinopathy. ASIA PACIFIC ACADEMY OF OPHTHALMOLOGY CONGRESS, 2011年3月24日 SYDNEY

Yoshida S, Sassa Y, Asato R, Ishikawa K, Saeki Y, Kono T (2010) The concentration changes of VEGF and MCP-1 in the eyes of the patients with proliferative diabetic retinopathy. (The second vitrectomy cases). The Third Joint Meeting of Korea-China-Japan Ophthalmologists, 2010年9月14日 Beijing

Yoshida S, Ishikawa K, Yukio S, Ryo A, Ayako Y, Kono T (2010) Reduced concentrations of VEGF in vitreous after vitrectomy in patients with proliferative diabetic retinopathy. In: The Third Joint Meeting of Korea-China-Japan Ophthalmologists, 2010年9月14日 Beijing

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 増殖糖尿病網膜症の検出方法および予防・治療剤のスクリーニング方法

発明者: 吉田茂生、出原賢治

権利者: 福岡大学、佐賀大学

種類: 特許権

番号: 特願 2010-93240

出願年月日: 2010年4月9日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.eye.med.kyushu-u.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田茂生 (YOSHIDA SHIGEYO)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号: 50363370

(2)研究分担者

石橋 達朗 (ISHIBASHI TATSURO)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：30150428

向野 利寛 (KONO TOSHIHIRO)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：40161880

(3)連携研究者

なし