

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 11 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592216

研究課題名（和文）D-アミノ酸を新たな分子標的とする糖尿病網膜症のメカニズムの解明

研究課題名（英文）Role of D-amino acid-containing proteins in the development of diabetic retinopathy.

## 研究代表者

加治 優一（KAJI YUICHI）

筑波大学 医学医療系・准教授

研究者番号：50361332

研究成果の概要（和文）：糖尿病角膜症において基底膜が D-アミノ酸を含むようになることが疾患の引き金となることを分子レベルで明らかにした。さらに糖尿病網膜症の硝子体液において D-アミノ酸含有蛋白質が増大し、病勢を反映していた。最後に D-アミノ酸含有蛋白質や蛋白質糖化最終産物の凝集によって生じる角膜ジストロフィーの *in vitro* モデルを作成し、光線力学療法を開発した。

研究成果の概要（英文）：First, we have shown that accumulation of D-amino acid-containing proteins in the basement membrane of the cornea induces diabetic keratopathy. Second, we have found increased concentration of D-amino acid-containing proteins in the vitreous fluid of diabetic retinopathy. Finally, we have developed a photodynamic therapy for corneal dystrophy using *in vitro* model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼生化学・分子生物学

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症患者は増大傾向にあり、糖尿病網膜症の新しい治療メカニズムの解明が期待されている。同時に、タンパク質の翻訳後修飾であるタンパク糖化最終産物や D-アミノ酸含有タンパク質は、幅広い疾患のメカニズムに関わることが明らかになってきた。

## 2. 研究の目的

糖尿病網膜症をはじめとする難治性眼疾患の発症に、タンパク糖化最終産物あるいは

D-アミノ酸含有タンパク質が関わることを証明し、新しい予防薬・治療法の開発に関わる。

## 3. 研究の方法

（1）糖尿病網膜症だけではなく、網膜剥離や黄斑上膜の手術時に得られる硝子体切除検体を-80度で保存し、世界最大規模の硝子体ライブラリーを整備する。硝子体中における AGE および D-アミノ酸含有タンパク質の量を ELISA 法で定量的に評価する。さらに患者

のバックグラウンド（糖尿病網膜症の種類、HbA1c、透析の有無、糖尿病罹患年数）のパラメーターと比較することで、硝子体中のAGEおよびD-アミノ酸含有タンパク質の重要性を明らかにする。

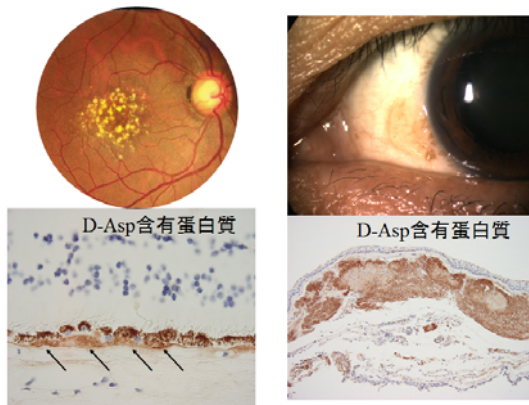
(2) 加齢黄斑変性症・脛裂斑・Climatic Droplet Keratopathy・膠様滴状角膜ジストロフィーなどの病理検体において、AGEおよびD-アミノ酸含有タンパク質の局在を免疫組織科学的に証明する。

(3) 角膜ジストロフィーの原因となるTGFBI由来ペプチドを合成し、*in vitro*でアミロイド形成能を評価することにより、角膜ジストロフィーの*in vitro*モデルを作成する。同時に角膜ジストロフィー由来合成ペプチドから得られたアミロイドをチオフラビンTを用いて標識後に、レーザーを照射することにより、アミロイドを特異的に分解する方法を開発する。これは、角膜ジストロフィーに対する光線力学療法の基礎となる。

#### 4. 研究成果

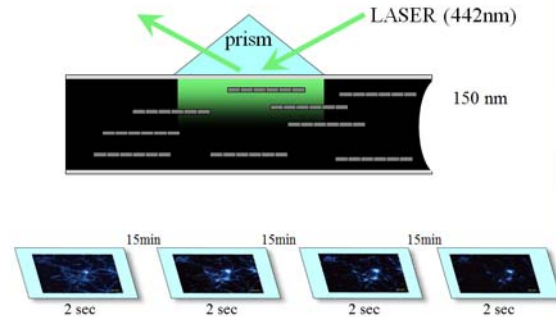
(1) 白内障において、アルファおよびベータクリスタリン分子におけるD-アミノ酸の局在を同定し、白内障発生の分子メカニズムの一端を解明した。

(2) 加齢に伴う眼疾患であるClimatic Droplet KeratopathyがAGEおよびD-アミノ酸を豊富に含むタンパク質の異常凝集によって生じることを明らかにした。

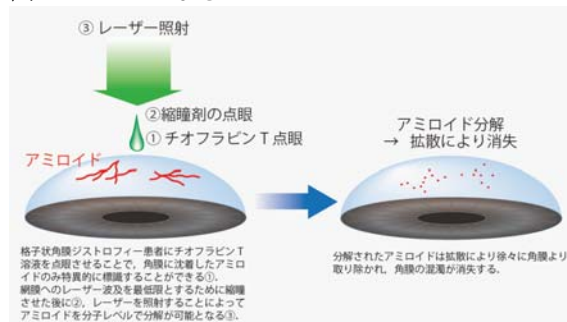


(3) 遺伝性疾患で角膜が進行性に混濁する角膜ジストロフィーが、AGEおよびD-アミノ酸を豊富に含むタンパク質（主にラクトフェリンとTGFBI）の凝集物であることを見いだした。

さらに角膜ジストロフィー由来のTGFBI合成ペプチドを用いて、アミロイド形成を*in vitro*で解析することにより、角膜ジストロフィーにおけるアミロイド形成過程を詳細に明らかにすることができた。さらに全反射が竹井校頭顕微鏡を用いてアミロイド線維の形成を直接的に観察できる系を確立した。



さらにTGFBI由来の合成ペプチドをチオフラビンTを用いて標識した後に442nmのレーザーを照射することにより、アミロイド線維を特異的に破壊することに成功した。この成果は、角膜ジストロフィーの光線力学療法に道を開いたこととなる。



#### 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 22 件)

- ① Ozawa D, Kaji Y, Yagi H, Sakurai K, Kawakami T, Naiki H, Goto Y. Destruction of amyloid fibrils of keratoepithelin peptides by laser irradiation coupled with amyloid-specific thioflavin T. 査読有り J Biol Chem. 286(12):10856-10863, 2011
- ② Kaji Y, Oshika T, Takazawa Y, Fukayama M, Fujii N. Pathological role of D-amino acid-containing proteins and advanced glycation end products in the development of age-related macular degeneration. 査読有り Anti-aging Med. 7(10): 107-111, 2010.
- ③ Kaji Y, Kiuchi T, Oshika T. Carteolol hydrochloride suppresses the generation of reactive oxygen species and rescues cell death after ultraviolet irradiation of cultured lens

epithelial cells. 査読有り Open Ophthalmol J. 4:60-65, 2010.

④ Kaji Y, Oshika T, Takazawa Y, Fukayama M, Fujii N. Accumulation of D-beta-Aspartic Acid-Containing Proteins in Age-Related Ocular Diseases. 査読有り Chem Biodivers. 7(6):1364-1370, 2010.

⑤ Kaji Y, Yamamoto E, Hiraoka T, Oshika T. Toxicities and pharmacokinetics of subconjunctival injection of liposomal amphotericin B. 査読有り Graefe Arch Clin Exp Ophthalmol. 247(4):549-53, 2009.

⑥ Kaji Y, Hiraoka T, Oshika T. Increased level of (1,3)- $\beta$ -D-glucan in tear fluid of mycotic keratitis. Graefe Arch Clin Exp Ophthalmol. 247(7):989-992, 2009.

⑦ Kaji Y, Oshika T, Okamoto F, Fujii N. Immunohistochemical localization of D- $\beta$ -aspartic acid in pinguecula. Br J Ophthalmol. 93(7):974-6, 2009.

⑧ Kaji Y, Oshika T, Takazawa Y, Fukayama M, Fujii N. Immunohistochemical localization of D- $\beta$ -aspartic acid-containing proteins in climatic droplet keratopathy. Br J Ophthalmol. 93(7):977-9, 2009.

[学会発表] (計 36 件)

① 加治優一, 後藤英樹, 岡本史樹, 大鹿哲郎. アミロイドーシスとしての瞼裂斑. 第 115 回 日本眼科学会総会. 平成 23 年 5 月 12 日~15 日, 東京国際フォーラム, 東京都.

② 加治優一, サントスシモーネ, 子島良平, 森洋斉, 宮田和典, 藤井紀子, 大鹿哲郎. 翼状片における D-アミノ酸含有蛋白質および蛋白糖化最終産物. 第 11 回日本抗加齢医学会総会. 平成 23 年 5 月 27 日~29 日, 京都国際会館, 京都府

③ 加治優一. 角膜ジストロフィー研究の新展開. 大阪大学眼科先端医療研究会. 平成 22 年 11 月 24 日, 大阪大学, 大阪

④ 加治優一. 眼科領域におけるアミロイド沈着病の単純さと複雑さ. 第 2 回 蛋白質の異常凝集とフォールディング病研究会. 平成 22 年 11 月 11-12 日, 京都大学原子炉実験所, 大阪府泉南郡熊取

⑤ 加治優一. 糖尿病網膜症の硝子体液における蛋白糖化最終産物と抗酸化物質質量. 第 20 回日本メイラード学会. 平成 22 年 9 月 17 日, お茶の水女子大学, 東京都文京区

⑥ Yuichi Kaji, Masaki Yamashita, Jun Sakakibara, Tetsuro Oshika. Visualization and quantification of the velocity distribution of irrigation fluid in the anterior chamber using particle image velocimetry. XXVIII European Society of Cataract and Refractive Surgery. 2010 年 9 月 4~8 日, Paris de Congre, Paris, France

⑦ 加治優一. 加齢黄斑変性症の発症における蛋白糖化最終産物と右手型アミノ酸. 第 10 回 日本抗加齢学会総会. シンポジウム「加齢関連疾患における AGEs の意義». 2010 年 6 月 11 日~13 日, 京都国際会議場, 京都.

⑧ 加治優一. 糖化とラセミ化がもたらす多彩な眼疾患. 第 15 回国際食品素材/添加物会議 第 8 回ヘルスフードエキスポ ifia JAPAN 2010 「抗糖化セミナー». 2010 年 5 月 19~21 日, ビックサイト, 東京

⑨ 加治優一, 小澤大作, 八木寿梓, 後藤祐児, 大鹿哲郎. Avellino および格子状角膜ジストロフィーに対する光線力学療法 of 基礎開発. 第 114 回 日本眼科学会総会. 2010 年 4 月 15~18 日, 名古屋国際会議場, 名

古屋, 愛知

⑩ Yuichi Kaji, Masaki Yamashita, Jun Sakakibara, Tetsuro Oshika .  
Visualization and quantification of the velocity distribution of irrigation fluid in the anterior chamber using particle image velocimetry. American Society of Cataract and Refractive Surgery. 2010年4月9~14日, Boston Convention Center, Boston, MA, USA.

⑪ 加治優一, 小澤大作, 八木寿梓, 後藤祐児, 大鹿哲郎. 格子状角膜ジストロフィーの *in vitro* モデルを用いた光線力学療法の開発. 第34回角膜カンファレンス 日本角膜移植学会. 2010年2月11~13日 (発表は12日). 仙台国際センター, 仙台, 宮城県.

⑫ 加治優一. 遺伝性角膜混濁疾患の発症におけるアミロイド形成のメカニズム. 第2回タンパク質の異常凝集とその防御・修復機構に関する研究会. 2009年11月11日~12日. 京都大学原子炉実験施設大会議室, 熊取郡, 大阪府.

⑬ Yuichi Kaji, Yutaka Takazawa, Masashi Fukayama, Noriko Fujii. Accumulation of D- $\beta$ -Asp-containing proteins in age-related and hereditary ocular diseases. International Conference of D-amino Acid Research. 2009年7月1日~4日. 淡路夢舞台国際会議場, 淡路市, 兵庫県.

⑭ 加治優一. 角膜の遺伝性混濁疾患におけるアミロイド沈着のメカニズム. 大阪大学蛋白質研究所セミナー「蛋白質立体構造を基盤とするプリオン現象の解明と制御」. 2009年7月13日~14日. 大阪大学吹田キャンパス内蛋白質研究所講堂, 大阪市.

〔図書〕 (計15件)

① 加治優一. 加齢性眼疾患の発症における蛋白糖化最終産物. 糖化による疾患と抗糖化食品・素材, 90-97 ページ, 総223 ページ, 2010年12月27日出版 (米井嘉一編集) シーエムシー出版.

② Yuichi Kaji. Accumulation of D- $\beta$ -Aspartic acid-containing proteins in age-related ocular diseases.

D-Amino Acids in Chemistry, Life Sciences, and Biotechnology, 総392 ページ, 2010年12月1日発刊 (Hans Bruckner, Noriko Fujii 編集), Wiley-VCH.

③ 加治優一. 糖尿病で角膜障害が多いのはなぜか? 眼のサイエンス 視覚の不思議 68-69, 総249 ページ, 2010年4月発刊, (根木昭編集), 文光堂

〔その他〕

ホームページ等

<http://kajiyuichi.jimdo.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加治 優一 ( KAJI YUICHI )  
筑波大学・医学医療系・准教授  
研究者番号: 50361332

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし