

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16866

研究課題名（和文）酸化ストレスによる細胞老化とSTING経路に着目した糖尿病網膜症の病態解明

研究課題名（英文）Elucidation of the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy Focusing on Cellular Senescence Induced by Oxidative Stress and the STING Pathway

研究代表者

安田 正幸（Yasuda, Masayuki）

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：00569585

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病網膜症は多因子疾患であり、その病態の一つとして酸化ストレスが注目されている。本研究では、血中酸化ストレスマーカーである酸化ストレス度（dROM）と抗酸化能（BAP）を測定し、糖尿病網膜症との関連を調べた。その結果、dROMは糖尿病患者、および、増殖糖尿病網膜症患者で高値であった。ミュラー細胞を用いた実験では、高糖濃度培養により、酸化ストレスで誘導されるSTINGの遺伝子発現が亢進した。さらに、STING阻害剤を添加することで炎症性サイトカインの一つであるMCP-1の遺伝子発現が抑制された。以上の知見から、糖尿病網膜症の病態にSTING経路の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病網膜症は、慢性血糖による細小血管合併症の一つであるが、同程度に血糖降下しても予後には個人差があり、新たな治療法の開発が必要である。糖尿病網膜症は多因子疾患であり、酸化ストレスや炎症が重要な役割を果たすとされている。本研究で着目したSTINGは酸化ストレスによるDNA障害により活性化し、炎症性サイトカイン産生を誘導することが知られている。本研究の成果は、糖尿病網膜症の病態としてSTING経路の関与を示唆し、将来的にSTING阻害剤という新たな糖尿病網膜症の治療薬の開発研究に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Diabetic retinopathy is a multifactorial disease, and oxidative stress has been recognized as one of its pathogenic factors. In this study, we measured the oxidative stress level (dROM) and antioxidant capacity (BAP) as markers of blood oxidative stress and investigated their association with diabetic retinopathy. As a result, dROM levels were elevated in patients with diabetes and proliferative diabetic retinopathy. In experiments using Muller cells, high glucose culture significantly increased the gene expression of STING, which is known to be induced by oxidative stress. Furthermore, the addition of a STING inhibitor suppressed the gene expression of MCP-1, an inflammatory cytokine. These findings suggest the involvement of the STING pathway in the pathogenesis of diabetic retinopathy.

研究分野：眼科

キーワード：糖尿病網膜症 酸化ストレス 炎症

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症は、就労年齢に多い失明疾患であり、労働力人口が減少している少子超高齢化社会において特に対策が必要な疾患である (Cheung et al. *THE LANCET* 2010)。糖尿病網膜症の治療は、早期では血糖降下しかない。糖尿病網膜症は多因子疾患であり、同程度に血糖降下しても予後には個人差があり、新たな治療法の開発が必要である。

糖尿病網膜症の高血糖以外の病態として酸化ストレスが注目されている。酸化ストレスは細胞老化を誘導し、老化した細胞はサイトカインや増殖因子といった炎症性蛋白を分泌し、様々な加齢性疾患に関わることが明らかとなってきた (Gorgoulis et al. *Cell* 2019)。この現象は細胞老化関連分泌形質 (SASP) と呼ばれ、その誘導機構として STING (*Stimulator of Interferon Genes*) 経路が注目されている。STING は小胞体に局在する膜貫通性タンパク質で、微生物由来の DNA 成分に対する自然免疫応答の誘導機構とされていたが、様々なストレスによって傷害された DNA 成分にも反応し、SASP を誘導することが報告された (Tkahashi et al. *Nat Commun* 2018)。慢性腎不全モデルマウスにおいては、STING 経路が腎組織の線維化誘導されている (Chung et al. *Cell Metab* 2019) が、糖尿病網膜症における STING 経路と SASP の関与は不明である。よって本研究は、酸化ストレスや STING と糖尿病網膜症の関与を調べることを研究課題とした。さらに、本研究では、網膜細胞の一つである Muller 細胞を用いて糖尿病網膜症における STING 経路の変化を調べた。糖尿病網膜症は細小血管障害であるがその誘導に網膜グリア細胞の Muller 細胞が重要な働きをすることが示唆されている (Klaassen et al. *PRER* 2013)。よって本研究は、グリア細胞を標的とした STING 経路抑制による血管保護という新たな糖尿病網膜症治療法の開発につながる可能性がある。

2. 研究の目的

糖尿病網膜症患者において、血中酸化ストレスが網膜症の有無や増殖性変化の有無に関連があるかを調べる。ミュラー細胞を用いた培養実験で、酸化ストレスや高糖負荷によって STING 経路が活性化するかを調べ、さらに、STING 阻害剤の効果も検討する。

3. 研究の方法

東北大学病院眼科外来を受診した、糖尿病を有する患者 87 例 87 眼 (男:女=51:36、年齢 59.6 ± 12.9 歳) を対象とした。糖尿病のない患者 15 例 15 眼 (年齢 65.2 ± 4.5 歳) を対照群とした。血液を採取し、フリーラジカル分析装置 (Wismer II 社) を用い、血中の酸化ストレス度 (dROM)、抗酸化力 (BAP) を測定した。群間の血中酸化ストレスマーカーを Man-Whitney U 検定で比較し、さらに、多変量ロジスティック回帰分析を行い酸化ストレスマーカーと増殖糖尿病網膜症の関連を検討した。

糖尿病病態下におけるミュラー細胞と STING の関連を調べるために、マウスミュラー細胞の初代培養を既報に基づき作成した (Harada et al. *J. Neurosci.* 2022., Tawarayama et al. *Sci Rep* 2022.)。ミュラー細胞を高糖濃度培養し、qPCR で STING 経路の活性化を調べた。さらに STING 阻害剤を添加し、炎症性サイトカインの変化を調べた。

4. 研究成果

糖尿病と酸化ストレスの関連を調べるために、血中酸化ストレスマーカーである dROM、BAP、および、BAP/dROM 比を、糖尿病群 87 例と対照群 15 例で比較した。その結果、糖尿病群では、dROM が有意に高値 ($P < 0.001$)、BAP/dROM 比が有意に低値 ($P = 0.015$) であった。一方、BAP は有意差を認めなかった ($P = 0.47$) (図 1)。

糖尿病群 87 例 87 眼を網膜症の有無で分類し、網膜症の有無 (網膜症有り: 76 例、無し: 11 例) と血中酸化ストレスマーカーの関連を調べた。その結果、血中ストレスマーカーは網膜症の有無では全て有意差を認めなかった。

糖尿病群 87 例 87 眼を増殖糖尿病網膜症 (PDR) 群 ($n = 46$) とそれ以外 ($n = 41$) に分類し、増殖性変化の有無と血中酸化ストレスマーカーの関連を調べた。その結果、PDR 群で dROM が有意に高値 ($P = 0.018$) であった。一方、BAP と BAP/dROM 比は有意差を認めなかった (それぞれ、 $P = 0.94$ 、 $P = 0.17$)。

多変量ロジスティック回帰分析を行ったところ、年齢、性別を説明変数に加えて調整しても dROM は有意に PDR と関連していた ($P = 0.046$)

以上のことから、糖尿病患者と、増殖糖尿病網膜症の病態に血中の酸化ストレス亢進が関連することが示唆された。

次に、マウス網膜から作成したミュラー細胞初代培養を用いて、糖尿病病態における STING 経路の発現を調べた。ミュラー細胞を高糖濃度 (25mM) で培養し、cDNA を作成し PCR を行い、STING 経路および炎症性サイトカインの遺伝子発現を低糖濃度 (5mM) と比較した。その結果、高糖濃度群では、*Sting* の発現が有意に上昇していた ($P = 0.029$)。炎症性サイトカインでは、*Mcp-1* ($P = 0.027$) と *Vegf* ($P < 0.01$) の発現が有意に上昇していた。

さらに、高糖濃度培養したミュラー細胞に STING 阻害剤を添加すると *Mcp-1* の発現が有意に減少した ($P < 0.001$)。

以上により、ミュラー細胞における STING 活性化が糖尿病網膜症の病態に関与し、STING を阻害することで網膜症の抑制に寄与することが示唆された。本研究の成果は、今後タンパクレベルでの評価や動物実験も行い、STING の活性化が血管新生や線維化に与える影響や STING 阻害効果の検証を進めることで、糖尿病網膜症の創薬に貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Sato Masataka, Yasuda Masayuki, Takahashi Nana, Hashimoto Kazuki, Himori Noriko, Nakazawa Toru	4. 巻 18
2. 論文標題 Sex differences in the association between systemic oxidative stress status and optic nerve head blood flow in normal-tension glaucoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 282047
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0282047	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 星佳佑、國方彦志、相澤奈帆子、安田正幸、二宮高洋、阿部俊明、中澤徹
2. 発表標題 プロルシズマブ投与後眼内炎症の予測因子に関する検討
3. 学会等名 第76回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡部達、安田正幸、國方彦志、高田菜生子、前田雄大、中野讓、武野團、中澤徹
2. 発表標題 爪床毛細血管パラメータと非糖尿病網膜症との関連
3. 学会等名 第61回日本網膜硝子体学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 瀧澤廣輝、安田正幸、國方彦志、王紀英、星佳佑、岡部達、新田文彦、阿部俊明、中澤徹
2. 発表標題 プロルシズマブ導入前後の眼血流評価
3. 学会等名 第126回日本眼科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡部達、安田正幸、國方彦志、高田菜生子、瀧澤廣輝、前川重人、前田雄大、中野謙、武野團、中澤徹
2. 発表標題 糖代謝異常者における爪床毛細血管と黄斑部毛細血管の関連
3. 学会等名 第126回日本眼科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 王紀英、安田正幸、國方彦志、岡部達、星佳佑、瀧澤廣輝、中澤 徹
2. 発表標題 近視性脈絡膜新生血管と全身酸化ストレスマーカーの関連
3. 学会等名 第126回日本眼科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安田正幸、國方彦志、児玉慎二郎、岡部達、菱沼英史、瀧澤廣輝、片桐秀樹、小柴生造、中澤徹
2. 発表標題 メタボローム解析による糖尿病網膜症のバイオマーカーの探索
3. 学会等名 第126回日本眼科学会総会
4. 発表年 2022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
研究協力者	星 佳佑 (Hoshi Keisuke)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	岡部 達 (Okabe Tatsu)		

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