

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25年 5月27日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591929

研究課題名（和文） 腫瘍抑制因子の糖尿病網膜症治療への応用

研究課題名（英文） Promyelocytic leukemia tumor suppressor as therapeutic agent for diabetic retinopathy

研究代表者

三田村 佳典 (MITAMURA YOSHINORI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：30287536

研究成果の概要（和文）：増殖膜中の promyelocytic leukemia tumor suppressor (PML) 遺伝子や前房水・硝子体中の PML 蛋白濃度はコントロールと比べ増殖糖尿病網膜症で有意に低値であった。また、前房水・硝子体中の PML 濃度は vascular endothelial growth factor 濃度と有意に負の相関を示した。以上より、PML の増殖糖尿病網膜症の診断マーカーや治療薬としての可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：Promyelocytic leukemia tumor suppressor (PML) mRNA expression levels in membrane samples, and the PML protein concentrations in aqueous humor and vitreous fluid samples were significantly lower in PDR patients than control patients. We observed a statistically significant inverse correlation between the concentrations of PML and vascular endothelial growth factor in the aqueous humor and vitreous fluid of PDR patients. Taken together, PML may be a good candidate as a diagnostic marker and a therapeutic agent for PDR.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：外科、細胞・組織、生体分子、糖尿病、臨床

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症は成人の失明原因の大多数を占めており、現在の治療法は進行例には必ずしも十分とはいえないのが現状である。近年、増殖糖尿病網膜症（PDR）の病因に種々のサイトカインやサイトカインの発現を制御している転写因子が関与していることがわける報告が多数なされている。その

なかでも血管内皮増殖因子（VEGF: vascular endothelial growth factor）はもっとも注目されているサイトカインであり、VEGFの抗体などは一部、臨床応用がなされている。また、VEGFの発現を制御している転写因子としてhypoxia-inducible factor 1 α （HIF1- α ）などが知られており、我々はこれまでに増殖糖尿病網膜症の増殖膜においてHIF1 α mRNA

が有意に高頻度で発現していること、増殖膜のグリア細胞においてHIFの活性化がみられることを確認していた。

前骨髄球性白血病腫瘍抑制因子 (PML: promyelocytic leukemia tumor suppressor) は急性前骨髄性白血病において腫瘍抑制機能を有する因子として発見された。多くのヒトの癌組織では血管新生の亢進とともにPMLの発現が抑制されていることがわかっている。VEGFはHIF転写因子によって転写が促進されること、さらにHIF発現はmTORによって制御されていることが知られているが、近年、Nature誌において、PMLがこのmTOR活性を阻害して転写因子HIFおよびVEGFの発現低下、血管新生の抑制を引き起こすことが初めて報告された。このことから、増殖糖尿病網膜症の増殖膜など血管新生が促進されている組織ではHIF、VEGFの増加とともにPMLの発現低下が推定される。

また、腫瘍の血管新生抑制剤として知られているラパマイシンにおいては、ラパマイシン→mTOR抑制→HIFの抑制→VEGF抑制→血管新生抑制というシグナル経路がすでに明らかとなっている。同様に、このようなシグナル経路を介して、PMLを過剰に発現させ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る可能性がある。

さらに、我々はすでに網膜におけるPMLの発現をRT-PCR法によって確認している。human testisではPML mRNAの強い発現が確認されたので、これをポジティブコントロールとしてマウスwhole retinaでもRT-PCRを行ったところ、PML mRNAの発現が確認できた。網膜にPML mRNAの発現が確認されたことから、PMLが眼内において何らかの役割を担っている可能性が推測される。

<プライマー配列>

RT-PCRに使用したPMLプライマー配列を以下に示す。

nucleotide 449-468;

5' -GTGCTTCGAGGCACACCAGT-3'

nucleotide 874-893;

5' -AGCAGCTCGCCTCTGAGC-3'

これらのプライマーペアを用いたRT-PCRでは、ヒトPML-1のnucleotide 449-893 (445bp)の領域を検出し、humanとmouse両方のPPML mRNAを検出することが可能である。

2. 研究の目的

前骨髄球性白血病腫瘍抑制因子 (PML) は白血病において腫瘍抑制機能を有する因子として発見され、癌組織では血管新生の亢進とともにPMLの発現が抑制されていることがわかっている。近年、PMLがmTOR活性を阻害して転写因子HIFおよびVEGFの発現低下、血管新生の抑制を引き起こすことが解明された。このことから、増殖糖尿病網膜症の増

殖膜など血管新生が促進されている組織ではHIF、VEGFの増加とともにPMLの発現低下が推定される。今回、PMLを過剰に発現させることにより糖尿病網膜症における血管新生を抑制できる可能性について探究するため本研究を立案した。

3. 研究の方法

対象として増殖糖尿病網膜症に対して硝子体手術を行った症例、コントロールとして新生血管を伴わない黄斑円孔・黄斑上膜に対して硝子体手術を行った症例を選択した。

(1) 前房水・硝子体検体、増殖膜検体の採取、保存

手術に先がけて前房穿刺を行い、前房水を採取する。手術は必要に応じて白内障手術を行った後、型のごとくthree portを作成し硝子体切除を行う。灌流液を流す前に硝子体を0.5-1.0cc硝子体カッターで切除吸引した後、直ちに-80℃にて保存する。特発性黄斑上膜についてはILM鑷子などを用いて網膜前膜をpeelする。増殖糖尿病網膜症では水平剪刀にて増殖膜を網膜面から遊離する。遊離した増殖膜、網膜前膜は硝子体鑷子にて眼外に摘出し、免疫染色用検体については直ちにOCT compoundに包埋し液体窒素にて凍結させた後、-80℃にて保存する。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。また、硝子体手術時に得られたサンプルを用いて解析をするに当たっては、徳島大学倫理委員会での承認をすでに得ており、対象患者からは倫理委員会で承認された書式に則って十分なインフォームドコンセントを得る。

(2) 増殖膜におけるPMLの発現変化の検討

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。PML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PML遺伝子発現量を比較検討する。PML蛋白質の発現量についても免疫染色法により確認する。

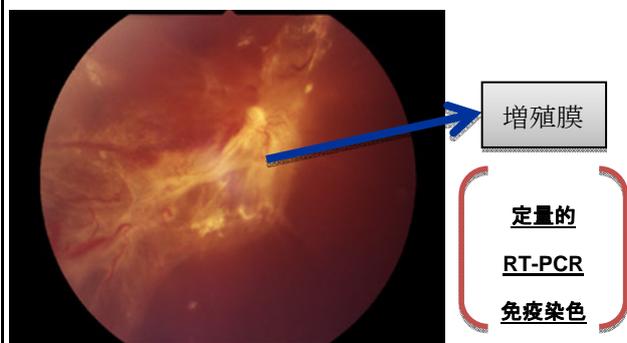


図1 増殖膜検体の解析

(3) 前房水・硝子体中のPML濃度の測定

統計解析に必要な症例数を確保するために前房水・硝子体検体の解析を進める。手術時に採取した前房水・硝子体について、特発性黄斑円孔、特発性黄斑上膜をコントロールとして増殖糖尿病網膜症症例のPMLの濃度をELISA法にて測定する。測定に先立ち、硝子体サンプルを希釈液でサンプル量を考慮して適宜希釈する。希釈した硝子体サンプル100 μ lとPML標準溶液(PML濃度:0,31.2、62.5、125、250、500、1000 pg/ml)をPML抗体で固相化したウェル2カ所に加える。ビオチン化抗PML抗体50 μ lを加え、25 $^{\circ}$ C、2時間でインキュベートし、サンプルを洗浄した後、アビジン化ホースラディッシュペルオキシダーゼ溶液100 μ lを各ウェルに加える。30分間のインキュベーションの後、酵素反応基質液を加え暗所で30分間インキュベートして発色させる。反応はキットの反応停止液で終息させ450 nmと630 nmの吸光度を測定し、各サンプルについて2つの測定値の平均を算出する。PML値は、PML標準溶液の吸光度による標準曲線から計算する。また同検体でVEGFの濃度測定を行い、PML値と逆相関が見られるかどうか、統計学的に解析する。

4. 研究成果

(1) 増殖膜検体におけるPML蛋白の発現

ヒト増殖糖尿病網膜症症例ならびにコントロールとして黄斑上膜症例の増殖膜サンプル各2例ずつについてPML蛋白の発現をみるため免疫染色を行った。その結果、黄斑上膜と比較して増殖糖尿病網膜症の増殖膜においてPML蛋白の発現が低下していることを確認した。

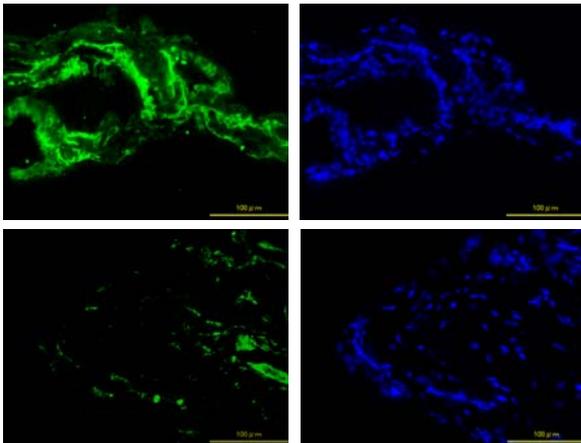


図2 増殖膜検体の免疫染色
上段はコントロール(黄斑上膜)
下段は増殖糖尿病網膜症
左はPML蛋白の発現、右は核染色
増殖糖尿病網膜症でPML蛋白の発現が低下しているのがわかる。

(2) 増殖膜検体におけるPML mRNAの発現

ヒト増殖糖尿病網膜症症例の硝子体手術

に得られた増殖膜サンプル34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38検体についてPML mRNAの発現を調べるため定量的RT-PCRを行った。増殖糖尿病網膜症ではPML mRNAの発現が相対値で $9.03 \pm 5.86\%$ であったのに対してコントロールでは $100.0 \pm 29.6\%$ と、増殖糖尿病網膜症においてPML mRNAの発現が有意に低下していることが示された。

(3) 前房水・硝子体中のPML濃度

徳島大学病院倫理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黄斑円孔・黄斑上膜症例の硝子体ならびに前房水検体72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・前房水PML濃度の測定を行った。前房水については、増殖糖尿病網膜症では 0.032 ± 0.007 ng/mlであったのに対してコントロールでは 0.049 ± 0.004 ng/mlと増殖糖尿病網膜症において有意に前房水PML濃度が低かった。また、硝子体についても増殖糖尿病網膜症では 0.026 ± 0.005 ng/mlであったのに対してコントロールでは 0.050 ± 0.007 ng/mlと増殖糖尿病網膜症において有意に硝子体PML濃度が低かった。

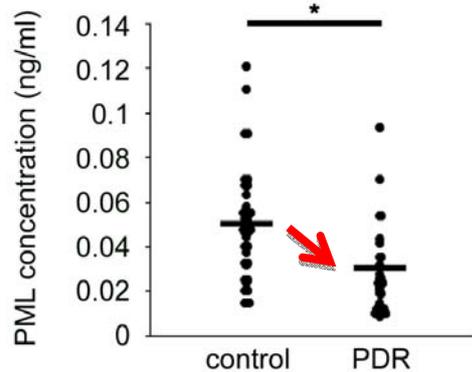


図3 前房水のPML濃度

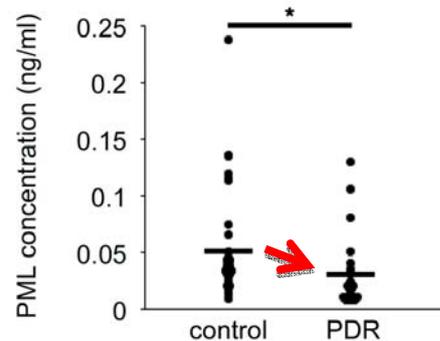


図4 硝子体のPML濃度

(4) 前房水・硝子体中のPML・VEGF濃度の相関 PMLとVEGFの発現レベルの相関を調べる目

的で前房水・硝子体のVEGF濃度を測定した。VEGF濃度は増殖糖尿病網膜症では前房水49.2 ± 9.33、硝子体84.6 ± 16.1であったのに対してコントロールでは前房水7.32 ± 3.09、硝子体3.06 ± 1.00と増殖糖尿病網膜症において有意にVEGF濃度が高く、この結果はこれまでの報告と一致していた。また、前房水・硝子体PML濃度は有意に前房水・硝子体VEGF濃度と負の相関を示すことがわかった。

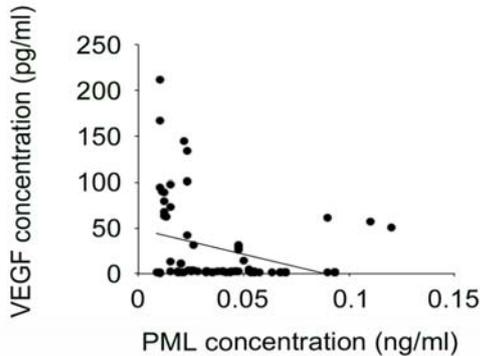


図5 前房水におけるPML・VEGF濃度の相関

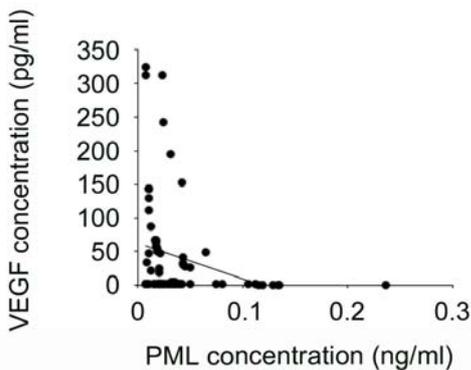


図6 硝子体におけるPML・VEGF濃度の相関

以上の結果はPMLが糖尿病網膜症の眼内で発現が低下していること、糖尿病網膜症の主要な病因と考えられているVEGFと逆相関する形で発現が低下していることを示し、PMLが糖尿病網膜症の治療に有用である可能性を支持する結果と思われる。

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7件)

- ① Katome T, Namekata K, Guo X, Semba K, Kittaka D, Kawamura K, Kimura A, Harada C, Ichijo H, Mitamura Y, Harada T, Inhibition of ASK1-p38 pathway prevents neural cell death following optic nerve injury, Cell Death Differ,

査読有、20、2013、pp.270-280

DOI: 10.1038/cdd.2012.122.

- ② Katome T, Namekata K, Naito T, Semba K, Guo X, Harada C, Harada T, Mitamura Y, Expression of promyelocytic leukemia protein and vascular endothelial growth factor in aqueous humor and vitreous fluid in patients with proliferative diabetic retinopathy, Diabetes Res Clin Pract、査読有、98、2012、pp. e9-e11

DOI: 10.1016/j.diabres.2012.09.020.

- ③ Katome T, Mitamura Y, Nagasawa T, Eguchi H, Naito T, Quantitative analysis of cystoid macular edema using scanning laser ophthalmoscope in modified dark-field imaging, Retina、査読有、32、2012、pp.1892-1899

DOI: 10.1097/IAE.0b013e3182497141

- ④ Yoshida-Hata N, Mitamura Y, Oshitari T, Namekata K, Harada C, Harada T, Yamamoto S, Transcription factor, SP1, in epiretinal membranes of patients with proliferative diabetic retinopathy, Diabetes Res Clin Pract、査読有、87、2010、pp. e26-8

DOI :10.1016/j.diabres.2009.12.008

[学会発表] (計1件)

- ① 香留崇、増殖糖尿病網膜症の眼内におけるPML発現の解析、第18回日本糖尿病眼学会総会、2012.11.2、アクロス福岡(福岡市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三田村 佳典 (MITAMURA YOSHINORI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：30287536

(2) 研究分担者

香留 崇 (KATOME TAKASHI)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：50464342

(3) 研究分担者

長澤 利彦 (NAGASAWA TOSHIHIKO)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：00511338

(4) 連携研究者

原田 高幸 (HARADA TAKAYUKI)

公益財団法人東京都医学総合研究所・視覚病態プロジェクト・副参事研究員

研究者番号：90345306