

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 4 月 8 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591931

研究課題名（和文） 糖尿病網膜症の神経病変における小胞体ストレスの役割の解析

研究課題名（英文） Elucidation of the role of ER stress in neuronal abnormalities of diabetic retinopathy

研究代表者 忍足 俊幸 (OSHITARI TOSHIYUKI)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：40546769

研究成果の概要（和文）：糖尿病網膜症における神経細胞死にはミトコンドリア・カスパーゼ依存性経路が関与することを網膜器官培養を用いて解析した。また、同時に小胞体ストレス関連細胞死経路も糖尿病誘導神経細胞死に関与していることを網膜培養及び人糖尿病網膜組織切片を用いて解析した。このことからミトコンドリア・カスパーゼ依存性経路と小胞体ストレスの間には分子レベルでのクロストークがあることが示唆された。さらに BDNF, NT-4, citicoline は糖尿病誘導神経細胞死を救済し再生を促進することを確認した。特に NT-4 は糖尿病環境における神経保護・再生に最も適した神経栄養因子であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have demonstrated that mitochondria-caspase dependent cell death pathways are associated with neuronal cell death in cultured rat retinas under diabetic stress. In addition, we have suggested that ER stress-related cell death pathways are related to neuronal cell death in cultured diabetic rat retinas and in human diabetic retinas. Taken together, our results indicate that there are a molecular crosstalk between mitochondria and ER stress cell death pathways in diabetic retinas. Furthermore, BDNF, NT-4 and citicoline rescued neuronal cell death and induce neurite regeneration in cultured diabetic rat retinas. Especially NT-4 showed the most neuroprotective and regenerative effect in damaged retinal neurons of diabetic retinas.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2012 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：眼細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病網膜症の初期病変には血管病変の他に神経病変が関与する。神経細胞死に代表される神経病変は不可逆的な変化であり視機能の障害に直結する変化である。治療の

最終目的は視機能を保護することであり、いは神経を保護することである。しかしながら糖尿病網膜の神経細胞死のメカニズムは不明なままであり、糖尿病網膜神経病変の神経保護・再生戦略確立のためにそのメカニ

ズム解明は必須の研究課題である。

(2) 虚血網膜の神経細胞死に小胞体ストレス (ER stress) が関与することが報告されている。ER stress を低分子シャペロンで抑制する治療戦略はインスリン抵抗性改善など糖尿病病態を改善する効果が糖尿病モデル動物で示唆されており、糖尿病神経病変における ER stress 関与の有無を検討することは内科的治療戦略との相乗効果を考えるとメリットが大きい。

2. 研究の目的

糖尿病網膜の神経細胞死に ER stress が関与するかを網膜3次元培養と人糖尿病網膜組織切片を用いて解析した。また、糖尿病誘導神経細胞死に対する神経保護・軸索再生戦略に有用と思われる神経栄養因子の検討を網膜3次元培養で検討した。

3. 研究の方法

(1) 生後7週 of SD ラット網膜を3次元培養し、正常濃度グルコース (NG) と高濃度グルコース環境 (HG) で培養した。また、終末糖化産物 (AGE)-BSA 負荷群と非負荷群を作成し、AGE-BSA の神経細胞死・再生に与える影響も解析した。さらに STZ 誘導糖尿病ラット (DM) を作成し、その網膜を同様に培養し、正常ラット培養網膜 (NG) と比較検討した。3次元培養の方法は、ラットを屠殺後無菌下で網膜を単離、乳頭から1.5mmの部位で0.5mm四方の網膜切片を作成、type I コラーゲンのゲルに包埋し無血清培養液で7日間培養維持した。培養7日後に再生突起数を観察し、その後速やかに切片を固定、凍結切片を作成した。神経節細胞層 (GCL) における TUNEL 陽性率、AIF、caspase-9、caspase-3、PERK、CHOP、P-c-JUN、P-JNK の免疫陽性率をそれぞれの群で比較検討した。また、培養液に BDNF、NT-4、citicoline、VEGF120、VEGF164、TUDCA (低分子シャペロン) を付加し、それぞれの神経保護作用・再生促進作用を比較検討した。

(2) NDRI より得た年齢をマッチさせた正常者5眼、糖尿病患者5眼の網膜を単離・固定し、凍結切片を作成した。過去の我々の報告で Bax、caspase-9、caspase-3 の免疫染色と変性神経のマーカー Fluoro-Jade B (FJB) の同時染色を行い、正常者と糖尿病網膜の GCL における FJB+Bax 陽性率、FJB+caspase-9 陽性率、FJB+caspase-3 陽性率を比較検討したが (Oshitari et al. BJO 2008)、今回はさらに FJB+c-Fos、FJB+p-c-Jun、FJB+p-JNK 陽性細胞率の比較検討を追加した。

4. 研究成果

(1) NG 群に比べて HG 群や DM 群では GCL に

おける TUNEL 陽性率は有意に増加し、再生突起数は逆に有意に減少した。同様に AGE-BSA を負荷した群では非負荷群に比べて TUNEL 陽性率は有意に増加し、再生突起数は有意に減少した。また、BDNF、NT-4、citicoline、VEGF120、VEGF164、TUDCA を付加した群では TUNEL 陽性率は有意に減少した。このことから VEGF も含めてこれらの因子は糖尿病ストレス誘導神経細胞死に対して神経保護作用を発揮することが示唆された。また、BDNF、NT-4、citicoline は再生突起数を有意に増加させることが確認されその中でも NT-4 が最も再生促進作用が強かった。このことから糖尿病網膜の神経病変に対しては NT-4 が最も神経保護・再生促進作用が強いことが示唆された。

(2) 次に糖尿病誘導神経細胞死のメカニズムについてであるが、まず HG 群では caspase-9、caspase-3 の免疫活性が有意に高く BDNF、NT-4、citicoline はこれらの免疫活性を有意に抑制した。すでに DM 群で Bax の免疫活性や蛋白量が増加していることは過去に確認しており (Oshitari et al. Neurosci Lett 2005)、糖尿病誘導神経細胞死にはミトコンドリアカスパーゼ依存性経路が関与することが示唆された。また、HG 群、DM 群においては PERK、CHOP 免疫活性が有意に増加しており、NT-4、TUDCA 付加群でこれらの免疫活性が有意に減少したことから、糖尿病誘導神経細胞死には ER stress 関連細胞死経路も同時に関与していることが同じシステムで確認された。両者の結果から糖尿病誘導神経細胞死経路ではミトコンドリアと小胞体の間に分子レベルでの crosstalk があることが示唆された。

(3) AGE-BSA 負荷群では caspase-9 の免疫活性の他に、カスパーゼ非依存性経路に関与する AIF の免疫活性も増加していることが確認された。また、NT-4 付加により caspase-9 及び AIF の免疫活性は有意に抑制された。このことから AGE 誘導神経細胞死にはカスパーゼ依存性経路と非依存性経路両者が同時に関与していることが示唆され、NT-4 はその両方を抑制することで神経保護・再生促進作用を発揮していることが確認された。また、このとき細胞死を誘導した AGE-BSA の濃度は 10 µg/ml と低濃度であり、これはほとんどの糖尿病患者で全身に循環していると推察される濃度であることから AGE による糖尿病網膜の神経細胞への影響は予想以上に大きいものであることが予想された。

(4) HG 群、DM 群では p-c-Jun、p-JNK 免疫活性も有意に増加していることが確認された。JNK は ER stress の下流で活性化するこ

とが知られており、c-Jun/AP-1 は細胞死のシグナルをミトコンドリアに伝えることも知られている。すなわち、c-Jun/JNK 経路はミトコンドリア依存性細胞死経路と ER stress 誘導細胞死経路との間に存在する分子レベルでの crosstalk の候補の1つであることが確認された。

(5) 人糖尿病網膜切片を用いた解析ではすでにミトコンドリアーカスペース依存性経路が人糖尿病網膜の神経細胞死に関与することを確認しているが、今回さらに c-Fos, c-Jun, p-JNK の免疫活性が糖尿病患者の網膜 FJB 陽性細胞で有意に増加していることを確認した。このことから、網膜3次元培養の糖尿病ストレスで誘導される神経細胞死の経路と人糖尿病網膜の神経細胞死経路には共通する部分が多いことが示唆された。網膜3次元培養で神経保護・再生促進作用を有した因子は人糖尿病網膜の神経病変に対しても効果が期待できることを示唆する結果である。よってNT-4や副作用の少ないciticoline、あるいは低分子シャペロンのような ER stress を抑制する薬剤は糖尿病網膜の神経病変に対して有効に作用する可能性が一連の研究によって示唆された。

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 Baba T, Hagiwara A, Sato E, Arai M, Oshitari T, et al. Comparison of vitrectomy with brilliant blue G or indocyanine green on retinal microstructure and function of eyes with macular hole. *Ophthalmology* 査読有り 119, 2012, 2609-2615, DOI:http://dx.doi.org/10.1016/j.ophtaha.2012.06.048
- ② Baba T, Yamamoto S, Kimoto R, Oshitari T, et al. Reduction of thickness of ganglion cell complex after internal limiting membrane peeling during vitrectomy for idiopathic macular hole. *Eye* 査読有り 26, 2012, 1173-1180, DOI:10.1038/eye.2012.170
- ③ Bikbova G, Oshitari T, et al. Corneal changes in diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rev* 査読有り 8, 2012, 294-302.
- ④ Bikbova G, Oshitari T, et al. Diabetes mellitus and retinal vein occlusion as risk factors for open angle glaucoma and neuroprotective therapies for retinal ganglion cell neuropathy. *J*

Clin Exp Ophthalmol 査読有り S3-002, 2012, 1-10,

DOI:http://dx.doi.org/10.4172/2155-9570.S3-002

- ⑤ Oshitari T, et al. Effect of neurotrophin-4 on endoplasmic reticulum stress-related neuronal apoptosis in diabetic and high glucose exposed rat retinas. *Neurosci Lett* 査読有り 501, 2011, 102-106, DOI:10.1016/j.neulet.2011.06.057
- ⑥ Ooka E, Mitamura Y, Baba T, Kitahashi M, Oshitari T, et al. Foveal microstructure on spectral-domain optical coherence tomographic images and visual function after macular hole surgery. *Am J Ophthalmol* 査読有り 152, 2011, 283-290, DOI:10.1016/j.ajo.2011.02.001
- ⑦ Oshitari T, et al. Effect of neurotrophic factors on neuronal apoptosis and neurite regeneration in cultured rat retinas exposed to high-glucose. *Brain Res* 査読有り 1346, 2010, 43-51, DOI:10.1016/j.brainres.2010.05.073

[学会発表] (計8件)

- ① Bikbova G, Oshitari T, et al. Neuroprotective and regenerative effect of neurotrophin-4 on neuronal degeneration induced by advanced glycation end-products in adult rat retinas. European Association for Vision and Eye Research 2012, 186, 2012年10月、Nice, France (Travel Award 受賞).
- ② Oshitari T, et al. Werner syndrome accompanied with refractory CME and WRN proteins expression in human retinas. European Association for Vision and Eye Research 2012, 298, 2012年10月、Nice, France.
- ③ Oshitari T, et al. Upregulation of p-c-Jun and p-JNK associated with neuronal cell death in rat and human diabetic retinas. XX Biennial Meeting of the International Society for Eye Research 2012, 248, 2012年7月、Berlin, German.
- ④ Yokouchi H, Oshitari T, et al. Angiopoietin-like protein 6 (ANGPTL6) has angiogenic activity on retinal endothelial cells under high glucose concentrations. Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting 2012, 5759, 2012年5月、

- Fort Lauderdale, Florida.
- ⑤ Bikbova G, Oshitari T, et al. Effect of low dose advanced glycation end-products on neurite regeneration in adult rat retinas and regenerative effect of NT-4 in advanced glycation end-products exposed retinas. Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting 2012, 3481, 2012年5月、Fort Lauderdale, Florida.
 - ⑥ Oshitari T, et al. Increased expression of p-c-Jun and p-JNK in neuronal cells of diabetic and high-glucose exposed rat retinas. Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting 2012, 5425, 2012年5月、Fort Lauderdale, Florida.
 - ⑦ Oshitari T, et al. Effect of NT-4 on ER stress-related neuronal apoptosis in cultured rat retinas exposed to high-glucose. Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting 2011, 5935, 2011年5月、Fort Lauderdale, Florida.
 - ⑧ Oshitari T, et al. Neuroprotective and regenerative effect of BDNF, NT-4, and citicoline in rat retinas exposed to high-glucose. XIX Biennial Meeting of the International Society for Eye Research 2010, 202, 2010年7月、Montreal, Canada.

[図書] (計3件)

- ① 忍足俊幸、山本修一、網膜症における最近の話題、東京医学社、腎と透析、73巻、2012, 192-196.
- ② 忍足俊幸、山本修一、増殖性糖尿病網膜症に対する抗VEGF抗体有効例、中山書店、Visual 糖尿病網膜症のすべて、2012, 214-216.
- ③ 忍足俊幸、山本修一、樹氷状血管炎、中山書店、専門医のための眼科診療クオリファイ、2011, 165-167.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

忍足 俊幸 (OSHITARI TOSHIYUKI)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：40546769

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：