

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592615

研究課題名(和文) 糖尿病網膜症における可溶性VAP-1の産生メカニズムとその病態関与

研究課題名(英文) Production of soluble vascular adhesion protein-1 in diabetic retinopathy

## 研究代表者

野田 航介 (NODA, KOUSUKE)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90296666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：Vascular adhesion protein (VAP)-1は血管内皮細胞の表面に発現する酵素機能を有する接着分子である。VAP-1は可溶性フォーム(sVAP-1)も存在し、その酵素機能によって酸化ストレスに関与することが知られている。本研究では、血管内皮細胞に糖負荷や炎症性サイトカイン刺激が加わると、sVAP-1産生が増加することが明らかとなった。また、その機序にマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)ファミリーに属するMMP-2やMMP-9が関与することも明らかとなった。本研究データは、糖尿病網膜症の病態におけるsVAP-1産生メカニズムに関する新しい知見を示すものである。

研究成果の概要(英文)：Vascular adhesion protein (VAP)-1, a multifunctional molecule with adhesive and enzymatic properties, is expressed at the surface of vascular endothelial cells of mammals. It also exists as a soluble form (sVAP-1), which is implicated in oxidative stress via its enzymatic activity. This study explores a mechanistic components to form sVAP-1 in retinal endothelial cells. Retinal capillary endothelial cells released sVAP-1 when stimulated with high glucose or inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 and vascular endothelial growth factor in vitro. Furthermore, matrix metalloproteinase -2 and -9, type IV collagenases, were the key molecules to mediate the protein cleavage of VAP-1 from retinal capillary endothelial cells. Our data for the first time provide the evidence on the sVAP-1 production mediated by inflammatory cytokines and type IV collagenases in the pathogenesis of diabetic retinopathy.

研究分野：糖尿病網膜症

キーワード：糖尿病網膜症 白血球接着分子 酸化ストレス VAP-1 MMPs

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者は全世界で急速に増加している。International Diabetes Federation によれば、2013 年における糖尿病患者数は約 3 億 8000 万人であり、2035 年にその数は実に 5 億 9200 万人に到達すると推定されている。また、糖尿病の合併症の一つ、糖尿病網膜症 (diabetic retinopathy, DR) の有病率は糖尿病患者の約 1/3 とされ、患者の生活の質を著しく下げる要因となっている。これまでの検討で、本疾患の病態においては血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) が主要な役割を演じていることが明らかとなっており、同分子に対する阻害剤が本疾患の治療オプションとして比較的良好な治療成績をあげている。しかしながら、同薬剤の治療有効性が認められない症例も存在するため、本疾患の病態に VEGF 以外の分子が関与していることは明らかである。世界的な高齢化にともなって DR 患者数は今後増加すると推測されており、超高齢社会に突入した我が国でも本疾患は中途失明原因の第 2 位となっている。本疾患の病態メカニズムに関与する VEGF 以外の病態責任分子の同定は、今後の新規治療法探索につながるため、眼科領域における重要な検討課題である。

申請者らは、これまで DR の病態メカニズムにおける炎症と酸化ストレスの関与に着目して検討を進め、この両者に関連する分子 vascular adhesion protein (VAP)-1 を主な研究対象としてきた。VAP-1 は血管内皮細胞に発現する白血球接着分子であり、白血球の血管外遊走を担っている。また、VAP-1 はその白血球接着分子としての機能に加えて、酵素 semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) としての機能を有することが知られている。VAP-1/SSAO は生体内に存在するアミンを基質としてアルデヒド、アンモニアおよび過酸化水素を産生し、さまざまな疾患病態に関与するとされる。例えば、メチルアミンやアミノアセトンなどを基質として VAP-1/SSAO は過酸化水素を産生するが、同反応は DR 病態において重要な役割を演じる酸化ストレスの亢進につながるが知られている。

このように、VAP-1/SSAO は膜蛋白として炎症細胞遊走を惹起するとともに可溶性 VAP-1 としての酵素機能を介して同疾患の病態に関与している可能性がある。しかしながら、DR の病態メカニズムにおける可溶性 VAP-1 の関与については検討されていなかった。

## 2. 研究の目的

以上の研究背景より、本研究の目的を DR における可溶性 VAP-1 の産生機序を明らかにすることとした。

## 3. 研究の方法

### (1) 網膜血管内皮細胞 (TR-iBRB2) の培養系確立と膜型 VAP-1 発現の検討

本研究で用いた網膜血管内皮細胞 TR-iBRB2 は、株式会社ファクト社 (仙台) が分与をおこなっているラット網膜血管内皮細胞で

ある。同培養細胞における膜型 VAP-1 の発現を PCR 法および免疫染色法によって確認した。

### (2) 網膜血管内皮細胞に対する糖負荷による膜型および可溶性 VAP-1 変化の検討

同細胞に対して DR の眼内環境に類似した刺激をおこない、細胞分画における膜型 VAP-1 と培養上清における可溶性 VAP-1 の量的変化を real-time PCR、western blotting 法、ELISA 法などを用いて検討した。刺激条件は以下の通りである。

<刺激条件>

①糖負荷刺激(5.5mM, 25mM): 一般に 5.5mM は正常血糖と同等の、25mM 以上は高血糖状態と同等の糖負荷と考えられている。

②炎症性サイトカイン(tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$ , VEGF)刺激: これらの炎症性サイトカインは DR 眼内で増加することが知られている。

### (3) 網膜血管内皮細胞に対する糖負荷による VAP-1 発現機構の検討

近年、可溶性 VAP-1 は膜型 VAP-1 が蛋白切断を受けて生じる遊離型フォームであることが構造解析によって明らかとなっている。そのため、糖負荷などで可溶性 VAP-1 が増加するメカニズムとして、膜型 VAP-1 の切断 (shedding) による機序が想定された。しかしながら、可溶性 VAP-1 を遊離させる蛋白分解酵素は同定されていなかったため、DR 眼内で増加することが知られている蛋白分解酵素、すなわち MMPs (matrix metalloproteinases)、ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) などがその役割を演じている可能性があるという仮説をたてた。これらの蛋白分解酵素に対する阻害剤を用いてその分解能を抑制し、可溶性 VAP-1 産生を担う蛋白分解酵素の同定をおこなった。

## 4. 研究成果

### (1) TR-iBRB2 における膜型 VAP-1 発現

PCR 法および免疫染色法により、網膜血管内皮細胞 TR-iBRB2 は膜型 VAP-1 を産生することを確認した (図 1)。

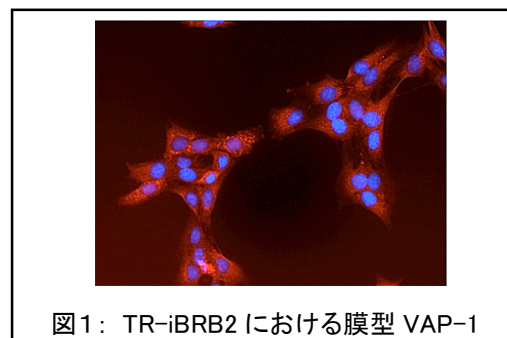


図 1: TR-iBRB2 における膜型 VAP-1

### (2) 網膜血管内皮細胞に対する糖負荷刺激による可溶性 VAP-1 産生

DR 眼内では glucose 濃度が増加していることが報告されており、その病態機序に糖負荷が関与していることが知られている。そのため、糖負

荷が可溶性 VAP-1 産生に関与しているのかについての検討をおこなった。

培養網膜血管内皮細胞 TR-iBRB2 を low glucose(5.5mM)および high glucose(25mM)条件下に培養すると、TNF- $\alpha$ や IL-1 $\beta$ などの炎症性サイトカインの発現は増加するが、VAP-1 の発現量は変化しないことが明らかとなった(図 2)。

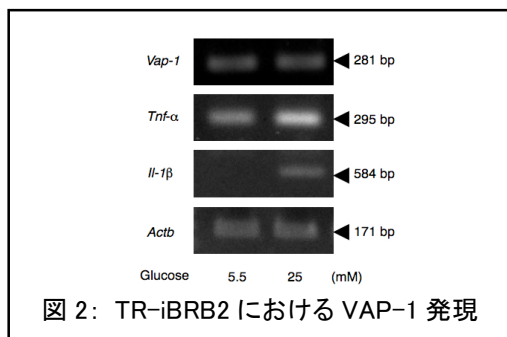


図 2: TR-iBRB2 における VAP-1 発現

一方で、培養上清中の可溶性 VAP-1 は増加することが明らかになった(図 3)。

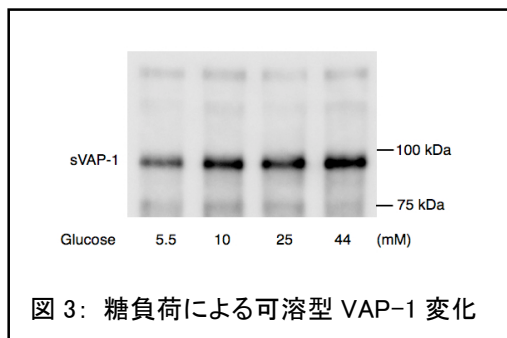


図 3: 糖負荷による可溶性 VAP-1 変化

次に、糖負荷によって増加する TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカインによって培養網膜血管内皮細胞を刺激すると、糖負荷刺激をおこなった場合と同様に培養上清中の可溶性 VAP-1 は増加した(図 4)。一方、同刺激で細胞側の膜型 VAP-1 は減少することがわかった。

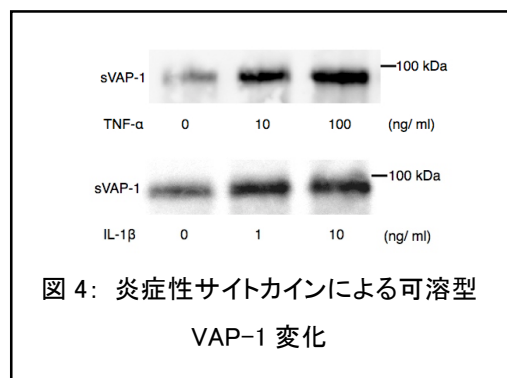


図 4: 炎症性サイトカインによる可溶性 VAP-1 変化

これらの検討結果は、糖負荷刺激条件では膜型 VAP-1 が切断 (shedding) されて可溶性 VAP-1 となり放出されること、その可溶性 VAP-1 の増加には炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  が介在していること、を示唆していた。

### (3) 網膜血管内皮細胞における膜型 VAP-1 shedding 機構

次に、TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  はどのように可溶性

VAP-1 を産生しているのかについて検討した。これらの分子は MMP の活性化を司る代表的なサイトカインであり、その下流で MMP が作用して膜型 VAP-1 を血管内皮細胞膜表面から切断しているという仮説を立て、検証をおこなった。

MMP ファミリーに対する非選択的阻害剤 BB94 を用いると、培養上清中への可溶性 VAP-1 の放出は低下するが、MMP と同様に metalloproteinase ファミリーに属し、他の白血球接着分子 E-selectin や L-selectin の切断酵素である ADAM に対する阻害剤 KB-R7785 を用いても可溶性 VAP-1 の増加は抑制されなかった(図 5)。

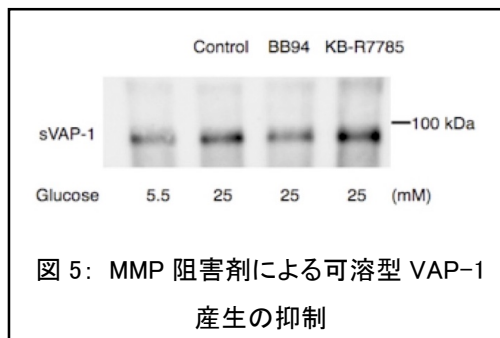


図 5: MMP 阻害剤による可溶性 VAP-1 産生の抑制

また、MMP-2 および MMP-9 に対する阻害剤を用いると、BB94 と同様の阻害効果が得られることが分かった(図 6)。

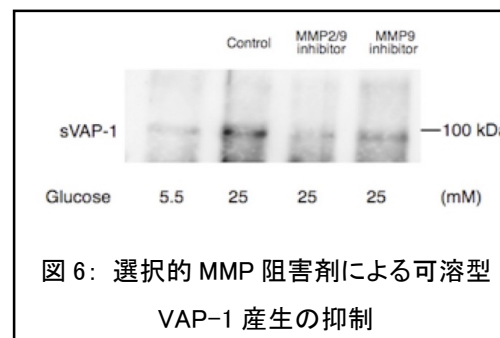


図 6: 選択的 MMP 阻害剤による可溶性 VAP-1 産生の抑制

これらの検討結果は、炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  による可溶性 VAP-1 の増加には MMP-2 および MMP-9 などの蛋白分解酵素が介在していることを示していた。

### (4) 網膜血管内皮細胞に対する VEGF 刺激による可溶性 VAP-1 産生

網膜血管内皮細胞 TR-iBRB2 を low glucose(5.5mM)および high glucose(25mM)条件下に培養した後に VEGF 刺激をおこなったところ、膜型 VAP-1 発現量は、どちらの条件下においても VEGF 刺激では増加しなかった(図 7)。

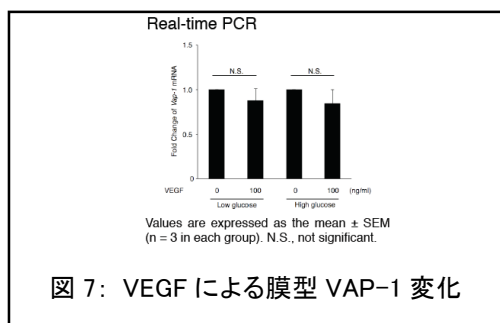


図 7: VEGF による膜型 VAP-1 変化

一方で、培養上清中の可溶性 VAP-1 量は high glucose 条件下では VEGF 刺激で増加し、その効果は濃度依存性が認められた。しかしながら、low glucose 条件下では VEGF 刺激によって増加しなかった(図 8)。

これらの検討結果は、VEGF には血管内皮細胞から可溶性 VAP-1 を増加させる作用があること、またそのメカニズムには細胞に対する糖負荷が必要であることを示唆していた。その機

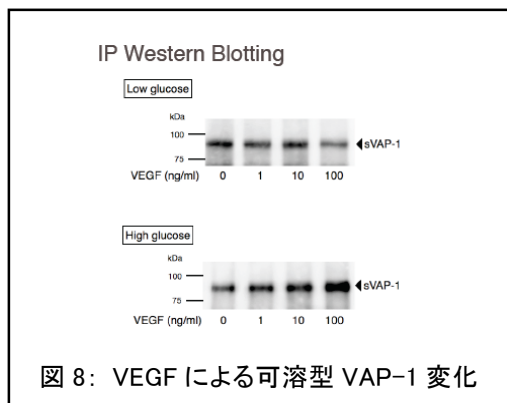


図 8: VEGF による可溶性 VAP-1 変化

序が TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$  と同様のものであるかは、今後引き続き検討をおこなう予定である。

#### 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. Ando R, Noda K, Namba S, Saito W, Kanda A, Ishida S. Aqueous humor levels of placental growth factor in diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol.* Epub 2014; 92: 245-6  
DOI:10.1111/aos.12251 査読有
2. Kinoshita S, Noda K, Tagawa Y, Inafuku S, Dong Y, Fukuhara J, Dong Z, Ando R, Kanda A, Ishida S. Genistein Attenuates Choroidal Neovascularization. *J Nutr Biochem.* 2014; 25: 1177-1182  
DOI: 10.1016/j.jnutbio.2014.06.004 査読有
3. Noda K, Nakao S, Zandi S, Sun D, Hayes KC, Hafezi-Moghadam A. Retinopathy in a novel model of metabolic syndrome and type 2 diabetes: New insight on the inflammatory paradigm. *FASEB J.* 2014; 28: 2038-46  
DOI: 10.1096/fj.12-215715 査読有
4. 野田航介、糖尿病網膜症における炎症と酸化ストレスの関与、日本の眼科、2014; 85:142-145 査読有
5. Yoshikawa N, Noda K, Ozawa Y, Mashima Y, Ishida S. Blockade for vascular adhesion protein-1 suppresses pathological neovascularization in oxygen-induced retinopathy. *Acta Ophthalmol.* 2013; e409-e410  
DOI: 10.1111/aos.12128 査読有

6. Murata M, Noda K, Fukuhara J, Kanda A, Kase S, Saito W, Ozawa Y, Mochizuki S, Kimura S, Mashima Y, Okada Y, Ishida S. Soluble vascular adhesion protein-1 accumulates in proliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012; 53: 4055-62  
DOI: 10.1167/iovs.12-9857. 査読有
7. Noda K, Nakao S, Ishida S, Ishibashi T. Leukocyte adhesion molecules in diabetic retinopathy. *J Ophthalmol.* 2012; 279037  
DOI:10.1155/2012/279037 査読有

##### [学会発表](計 11 件)

1. 木下哲志、野田航介、田川義晃、石塚タニエルダ、稲福沙織、董陽子、齋藤航、神田敦宏、石田晋. 増殖糖尿病網膜症における硝子体中 VEGF-B 濃度の検討. 第 20 回日本糖尿病眼学会総会. 2015 年 03 月 06 日-2015 年 03 月 08 日. ソラシティカンファレンスセンター(東京都・千代田区)
2. Noda K. Inflammation and oxidative stress in diabetic retinopathy. Symposium: Molecular mechanisms in diabetic retinopathy. Asia-ARVO 2015(招待講演). 2015 年 02 月 16 日. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
3. Yoshida S, Noda K, Murata M, Kanda A, Ishida S. Vascular endothelial growth factor increases soluble vascular adhesion protein-1 under high glucose condition. 第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会. 2014 年 06 月 19 日-2014 年 06 月 20 日. 北海道大学医学部フラテ会館(北海道・札幌市)
4. Noda K, Namba S, Murata M, Kanda A, Ishida S. Production of soluble vascular adhesion protein-1 by VEGF Stimulation under high glucose condition. World Ophthalmology Congress 2014 Tokyo. 2014 年 04 月 02 日-2014 年 04 月 04 日. 東京国際フォーラム(東京都・千代田区)
5. Namba S, Noda K, Murata M, Kanda A, Ishida S. Shedding of vascular adhesion protein-1 by VEGF stimulation under high glucose condition. ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) Annual Meeting. 2013 年 05 月 05 日-2013 年 05 月 09 日. Washington State Convention Center (Seattle, USA)
6. Namba S, Noda K, Murata M, Kanda A, Ishida S. Vascular endothelial growth factor increases soluble vascular adhesion protein-1 under high glucose condition. The 8th Asia Pacific Vitreo-retina Society Congress/ 52nd Annual Meeting of Japanese Retina and Vitreous Society. 2013 年 12 月 06 日-2013 年 12 月 08 日. Nagoya Congress Center (Nagoya, Aichi)

7. 難波志帆、野田航介、村田美幸、神田敦宏、石田 晋. 糖負荷時における VEGF 刺激による可溶型 vascular adhesion protein- 1 産生. 第 35 回 日本分子生物学会. 2012 年 12 月 11 日-2012 年 12 月 14 日. 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)
8. Noda K. Recent advances in understanding the molecular mechanism of diabetic retinopathy. The 10th Korea- Japan Joint Symposium on Vascular Biology (招待講演). 2012 年 12 月 06 日. あわぎんホール(徳島県・徳島市)
9. Noda K. Soluble vascular adhesion protein- 1 in proliferative diabetic retinopathy, 2012 Seoul National University- Hokkaido University Joint Symposium in Ophthalmology (招待講演). 2012 年 11 月 19 日. 北海道大学医学研究科(北海道・札幌市)
10. Ando R, Noda K, Murata M, Namba S, Kinoshita S, Fukuhara J, Dong Z, Saito W, Kanda A, Ishida S. Impact of intravitreal bevacizumab on accumulation of vascular adhesion protein- 1 in proliferative diabetic retinopathy. ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) Annual Meeting. 2012 年 05 月 06 日-2012 年 05 月 10 日. Broward County convention Center(Fort Lauderdale、米国)
11. 安藤 亮、野田航介、村田美幸、難波志帆、木下哲 志、福原淳一、董 震宇、Anton Lennikov、齋藤 航、神田敦宏、石田 晋. 増殖糖尿病網膜症における VEGF 阻害剤の硝子体内 VAP- 1 濃度への影響. 第 116 回 日本眼科学会. 2012 年 04 月 05 日-2012 年 04 月 08 日. 東京国際フォーラム(東京都・千代田区)

[図書](計1件)

1. 野田航介 他. 医学書出版 診断と治療社. 酸化ストレスの医学 改訂第 2 版. 2014. 456(272-277)

6. 研究組織

(1)研究代表者

野田 航介(NODA Kousuke)  
北海道大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号:90296666

(2)研究分担者

神田 敦宏(KANDA Atsuhiro)  
北海道大学・大学院医学研究科・特任講師  
研究者番号: 80342707