

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461365

研究課題名(和文)ペリオスチンをターゲットとした糖尿病網膜症における血管新生メカニズムの解明

研究課題名(英文)Analysis of role of periostin in proliferative diabetic retinopathy

研究代表者

伴 良行(BAN, YOSHIYUKI)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：00317554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ペリオスチンは細胞外基質の構成成分で、骨の分化・再生に関係することが知られている。しかし、最近の研究で、ペリオスチンは、心筋梗塞などで損傷を受けた細胞に対して強い増殖および保護作用を有していることが明らかになった。今回、我々は、糖尿病網膜症の網膜の血管新生メカニズムにおけるペリオスチンの役割を検討した。その結果、ペリオスチンには、ある程度、血管新生に関わることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Periostin is an extracellular matrix protein that functions as a cell adhesion molecule for preosteoblasts and is thought to be involved in osteoblast recruitment, attachment and spreading. Recently, it was shown that periostin promotes cardiac repair and remodeling. However, it is unclear that periostin plays a role in neovascularization and fibrovascular proliferation in proliferative diabetic retinopathy (PDR). Therefore, we examined the role of periostin in neovascularization and fibrovascular proliferation in PDR.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ペリオスチン 糖尿病網膜症 血管新生 細胞外基質

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症は、糖尿病の3大合併症の一つであり、細小血管障害による最も頻度の高い糖尿病合併症である。最近の統計では、成人における視力障害の原因疾患の第2位になったが、患者数も多く、依然、中途失明の原因疾患として重要な疾患である。我々は、ヒトより切除された糖尿病網膜症の増殖膜に含まれているタンパク質を LC/MS/MS を用いて網羅的に解析し、ペリオスチンが黄斑前膜と比較して糖尿病網膜症の増殖膜に高く発現していることを世界で初めて報告した。

ペリオスチンはショウジョウバエの fascilin と相同性が高いドメインを有する分泌型の接着因子の一つであり、骨分化に影響を及ぼすことが知られている。しかし、最近、ペリオスチンの発現が心筋梗塞における梗塞領域の繊維芽細胞で急激に上昇することが明らかにされた。さらに、ペリオスチンは繊維芽細胞の増殖を誘導することにより、梗塞によって疲弊した心臓の破裂を防ぐとともに、心筋細胞自体の細胞分裂を誘導し、失われた心筋細胞の増殖を誘導していることが明らかになってきた。しかしながら、糖尿病網膜症で生じる網膜の血管新生におけるペリオスチンの作用は不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病糖尿病網膜症で生じる網膜の血管新生におけるペリオスチンの発現制御とその役割の解明を行うことである。

(1) 糖尿病網膜症モデルラット (SDT/Jcl ラット) と高酸素負荷網膜症ラット (OIR) を用いた血管新生メカニズムとペリオスチンの関連の解明

(2) ヒト糖尿病網膜症増殖膜におけるペリオスチンと関連タンパク質 (TWIST、IL1-、TNF-、TGF-) の発現と局在の解明

(3) ペリオスチンのスプライシングバリエーションの同定

3. 研究の方法

(1) 糖尿病網膜症モデルラット (SDT/Jcl ラット) と高酸素負荷網膜症ラット (OIR) を用いた血管新生メカニズムとペリオスチンの関連の解明

糖尿病網膜症モデルラット (SDT/Jcl ラット) と高酸素負荷網膜症ラット (OIR) を用いてペリオスチンと関連タンパク質の発現を解析する。

(2) ヒト糖尿病網膜症増殖膜におけるペリオスチンと関連タンパク質 (TWIST、IL1-、TNF-、TGF-) の発現と局在の解明
免疫染色法とレーザーマイクロダイセクション法を用いて、増殖膜における各タンパク質の局在と遺伝子発現量を解析する。

(3) ペリオスチンのスプライシングバリエーションの同定

ペリオスチンには、スプライシングバリエーションが存在する。ヒトの増殖膜及び SDT/Jcl ラットあるいは OIR の網膜において、どのバリエーションが強く発現しているかを同定する。

4. 研究成果

(1) 糖尿病網膜症モデルラット (SDT/Jcl ラット) と高酸素負荷網膜症ラット (OIR) を用いた血管新生メカニズムとペリオスチン

の関連の解明

高酸素負荷網膜症ラット(OIR)モデルでは、ラット網膜におけるペリオスチンの mRNA を real time PCR を用いて評価した。OIR モデルでは、ペリオスチン mRNA 発現量は大気中飼育ラットと比較し、有意に増加した ($P<0.05$)。SDT/Jcl ラットでは、ラット網膜におけるペリオスチンの蛋白量をウエスタンブロット(WB)を用いて評価した。SDT/Jcl ラット群では、生後 30 週においてコントロール群と比較して、有意に低値だった ($P<0.05$)。SDT/Jcl ラット網膜におけるペリオスチン蛋白の発現を免疫染色にて評価した。方法は、生後各週にラットを屠殺後、眼球を摘出し、右眼を免疫染色用に 4%パラホルムアルデヒド/カコジレート緩衝液で 2 時間固定後、前眼部および硝子体を除去後 30% sucrose/PBS に 1 晩漬け、OCT で凍結保存した。クライオスタットを用いて $10\mu\text{m}$ 切片を作製し、スライドグラスに 3 枚ずつ連続に並べ、免疫染色を実施した。62 週において、採取の際に白内障と硝子体混濁を認めた。網膜や脈絡膜ではいずれの週齢でもペリオスチンの局在について SDT/Jcl ラット群とコントロール群に差は認めなかった。

(2) ヒト糖尿病網膜症増殖膜におけるペリオスチンと関連タンパク質(TWIST、IL1-、TNF-、TGF-)の発現と局在の解明

ヒト糖尿病網膜症増殖膜とコントロールとして黄斑上(前)膜を用いて、ペリオスチンと関連タンパク質の局在と遺伝子発現量を解析する予定であったが、研究代表者の所属の移転及び分担研究者の辞退に伴い、組織の収集が遅れているため、収集が完了次第行う予定である。

(3) ペリオスチンのスプライシングバリエーションの同定

real time PCR で、どのスプライシングバリエ

アントが SDT/Jcl ラットあるいは OIR モデルの網膜において、発現しているのかを検討した。リアルタイム PCR の条件設定が予想外に難航し、安定したデータが得られていない。詳細な条件検討を行ったが、現在も継続中である。

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1件)

Ban Y: Genetics of autoimmune thyroid diseases in Asians. J Autoimmun Res, 査読有, 2:1006, 2015.

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伴 良行 (BAN YOSHIYUKI)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：00317554

(2) 研究分担者

中西 孝子 (NAKANISHI TAKAKO)

昭和大学・医学部・准教授

研究者番号：00175499

植田 俊彦 (UEDA TOSHIHIKO)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：20175219

岩井 信市 (IWAI SHINICHI)

昭和大学・薬学部・教授

研究者番号：70317519

斎藤 雄太 (SAITO YUTA)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：70407477

(3) 連携研究者

谷山 義明 (TANIYAMA YOSHIAKI)

大阪大学・医学部・准教授

研究者番号：60372611