

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670755

研究課題名(和文) 眼組織基底膜の糖化最終産物検出と生体内における糖化最終産物検出用臨床機器の開発

研究課題名(英文) Detectino of AGEs in the basement membrane in the eye, and establishment of the AGE detection clinical equipments.

研究代表者

園田 康平 (SONODA, Koh-Hei)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：10294943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：眼組織基底膜の糖化最終産物(AGE)検出と生体内におけるAGE検出臨床機器の開発を目的に研究を行った。AGEは様々な臓器障害を引き起こすが、種々の老化に伴う機能障害をGEの沈着した全身基底膜の器質的異常と一元的に捉え、それを安定的に測定する評価法を開発することは極めて有用である。眼球は血管はじめ組織の観察が容易な場所であり、身体状況を透見できる「全身の窓」である。モード固定式チタニウム・サファイアレーザー光源の波長を変化させ、AGE由来強散乱を発生させる至適波長を決定することができた。また作動距離が30mm以上の対物レンズを用いることで、網膜や水晶体が評価しやすい場所であることも確認できた。

研究成果の概要(英文)：We tried to detect AGEs in the basement membrane in the eye, and establish the AGE detection clinical equipments. AGE can cause organ dysfunction in the various conditions, abnormalities of the basement membrane are thought to contribute to the complications of aging. Eye ball must be the easiest organ to detect AGE in the whole body. We established the best conditioned wavelength in mode-fixed titanium sapphire laser light source. It was also confirmed that by using an objective lens with a working distance of 30 mm or more, the retina and the lens are easy to evaluate.

研究分野：眼科学、免疫学

キーワード：眼組織 AGE 老年期障害

1. 研究開始当初の背景

現在の日本は4人に1人が65歳以上の高齢者社会が本格化し深刻な社会問題となっている。加齢により高血圧や血管障害などの疾患が増加の一途をたどり、また糖尿病の患者数も推定700万人とされ、加齢及び糖尿病による国民の健康問題がますます深刻化してくる。加齢と糖尿病に共通する血管障害は、血管閉塞や血管内皮の異常が病態の根本にあると考えられるが、褥瘡や角膜上皮障害など上皮系の組織に異常を満たすことを考慮すると、多くの疾患や加齢に伴う種々の障害が全身の基底膜の器質的異常を一元的な原因と考えることが出来る。

加齢や糖尿病個体のタンパク質の性質変化として、糖化最終産物(Advanced Glycation Endopducts, AGEs)が知られている。AGEsは、メイラード反応という糖化反応によりタンパク質に非酵素的に糖が結合し産生される最終産物であり、網膜毛細血管の基底膜に沈着し血管内皮細胞の機能を修飾しさまざまな障害の原因となることが知られている。AGE化されたタンパク質は370nmの波長を励起光とする光に強散乱することが報告されており、この糖化産物の特徴となっている(図1)。

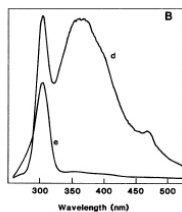


図1. 白内障(d)と正常若年水晶体(e)の励起光スペクトラパターン。AGEの沈着した白内障では350-400nmの間にピークができる。

結膜や網膜の血管は外部より直接的に観察できる組織であり、選択的直接的観察には適した臓器であるといえる。眼組織の特異的变化を検出できれば全身の血管変化を評価可能となり、将来的な高血圧評価や糖尿病慢性

合併症の管理の規準が変化する可能性がある。今回の挑戦的萌芽研究では、多光子原理と共焦点原理を組み合わせた励起系・観察系を適用し、角膜上皮基底膜だけでなく結膜上皮基底膜や結膜血管内皮、水晶体嚢、網膜内境界膜、ブルッフ膜、網膜血管内皮などの眼球の様々な基底膜の異常を評価する検出手法の開発及び臨床応用への前駆研究を行うことを目的とする

2. 研究の目的

AGEは、老化や糖尿病で生じるたんぱく質の最終産物であり、様々な臓器障害を引き起こす。代表的なAGEとして、ヘモグロビンA1cがあげられる。老化や糖尿病が原因で発生する種々の機能障害を、AGEの沈着した全身の基底膜の器質的異常であると一元的に考え、全身組織の基底膜のAGEを特異的かつ定量的に測定する評価法を開発することを目的とした。特に、血管の観察が容易である眼球組

織の観察を中心的に行い、AGE化された内皮基底膜由来の強散乱光を検出し、全身の血管変化をAGE化を指標に評価するシステムを構築する。この基底膜のAGE化を評価することにより、種々の眼疾患の詳細な病期判定や潜在的な易上の検出、さらには全身の血管の潜在的な変化を評価するシステム構築へと発展させることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 励起光系のスクリーニング

検出ターゲットをAGEとしているので、in vitroでのAGEの作成を行った。アルブミン、ラミニン、コラーゲン(I型、IV型)をガラスボトムディッシュにコートし、3週間インキュベートした。これにより、AGE化された基底膜構成タンパク質がガラス表面にコートされる。励起光には、レーザー共焦点顕微鏡(LSM Pascal, カールツァイスマイクロイメージング)及び多光子顕微鏡(LSM710 NLO, カールツァイスマイクロイメージング)に装備されているアルゴン(波長488nm, 543nm)、ヘリウムネオン(633nm)、チタニウム:サファイアレーザー(波長幅650-1100nm)を励起光源とした。ステージ上にマウントしたAGEコートガラスボトムディッシュのコート面にレーザー光を照射し、散乱光として生じるAGE由来の特異的散乱光(波長400nm)をスペクトラ検出系であるMETA detectorで検出した。

	1年目	2年目	3年目
1. 励起光系のスクリーニング (園田, 森重)	→		
2. 検出系の開発・確立 (森重)		→	
3-1. モデル動物での基底膜AGE化の検討 (森重, 柳井)		→	
3-2. モデル動物での基底膜散乱光の検出 (森重)			→
4-1. ヒト摘出組織におけるAGE化の検討 (柳井)		→	
4-2. ヒト生体組織での検討 (園田, 森重)			→

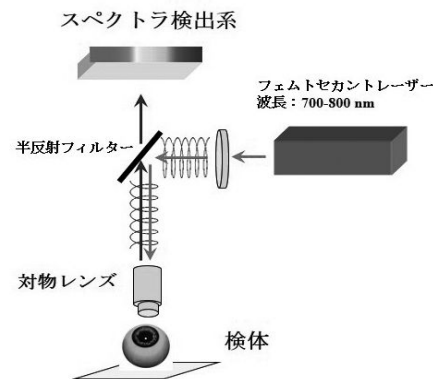


図2. 多光子顕微鏡を用いたAGE化タンパク質検出システム

(2) 動物モデルでの基底膜 AGE 化の検討

AGE を体内に蓄積する動物モデルとして、糖尿病モデルである db/db マウスおよび KK/TaJ マウス、加齢モデルである Senescence Accelerated-prone Mouse を用いた。8 週齢で購入、12~24 週飼育後屠殺し、眼球、腎臓、背部皮膚、大動脈を摘出し、凍結薄切標本作製、坑 AGE 抗体で免疫染色を行い、各臓器基底膜での発現の有無および程度を評価した。

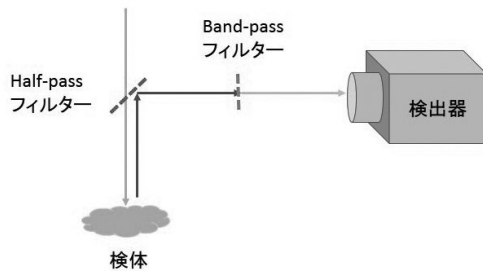


図3. 検出系の開発. 簡素な光学系を用いることにより、効率よく信号を採取する。

次に、AGE 由来強散乱検出の至適レーザー条件および至適検出条件で構成した検出系を用い、加齢及び糖尿病動物モデルの *in vivo* 組織での AGE 化の評価を行う。この際、長作動距離対物レンズを観察系に導入し、至適観察条件も合わせて決定した。*In vivo* での観察終了後、モデル動物を屠殺し、組織学的に AGE 化を評価し、*in vivo* での観察結果と比較検討した。

In vivo での観察条件が安定してきた段階で、加齢マウス及び糖尿病マウス、それぞれの対照マウスを用いて眼組織の AGE 化を測定評価した。モデル動物は飼育期間や罹病期間を変えて、加齢や疾患ストレスの影響を経時的に評価した。

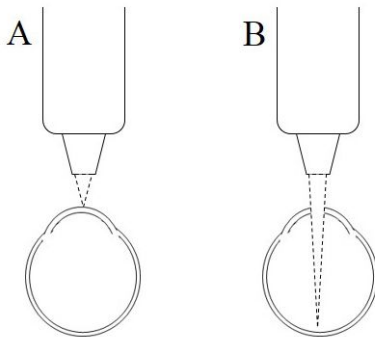


図4. 通常作動距離対物レンズ(A)と長作動距離対物レンズ(B)の違い。作動距離が短いAでは眼表面組織の観察しかできないが、作動距離の長いBでは眼内組織の観察も可能となる。

4. 研究成果

眼組織基底膜の糖化最終産物(AGE)検出と生体内における AGE 検出臨床機器の開発を目的に研究を行った。AGE は様々な臓器障害を引き起こすが、種々の老化に伴う機能障害を AGE の沈着した全身基底膜の器質的異常と一元的に捉え、それを安定的に測定する評価法を開発することは極めて有用である。眼球は血管はじめ組織の観察が容易な場所であり、身体状況を透見できる「全身の窓」である。

モード固定式チタニウム・サファイアレーザーは光源の波長を変化させることができるため、その特性を活かして AGE 由来強散乱を発生させる至適波長を決定することができた(740nm)。また作動距離が 30mm 以上の対物レンズを用いることで、網膜や水晶体が評価しやすい場所であることも確認できた。

この基底膜の AGE 化を評価することにより、種々の眼疾患の詳細な病期判定や潜在的病変の検出、さらには全身血管の潜在的な変化を評価するシステム構築へと発展できる可能性を示した。

散乱光として発生する光を波長に基づき選択的に検出する手法の開発・応用は、医療分野のみならず生命科学領域全体に応用可能であり、その概念の創出ができたと考えている。小血管の定性的形態評価は、全身の血管変化を推測させる。また、糖尿病患者における網膜動脈の AGE 化評価は、網膜血管造影検査で変化が見られるより先に血管変化を検出でき、侵襲的な光凝固治療をより適切に安全に施行するための重要な情報となる。

一方で、当初予定していたヒトで使用に耐える機器としての開発までは期間内に到達できなかった。動物での測定条件を決めるのに時間を要したことで、倫理委員会承認が間に合わなかったことが原因として挙げられる。この点を真摯に反省し、今後の研究開発に活かしていきたい。

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4件)

1. Morishige N, Murata S, Nakamura Y, Azumi H, Shin-Gyou-Uchi R, Oki KT, Morita Y, Sonoda KH: Coordinated regulation of palladin and α -smooth muscle actin by transforming growth factor- β in human corneal fibroblasts. Invest Ophthalmol Vis Sci 57(7):3360-3368, 2016

2. Jester JV, Morishige N, BenMohamed L, Brown DJ, Osorio N, Hsiang C, Perng GC, Jones C, Wechsler SL: Confocal Microscopic Analysis of a Rabbit Eye Model of High-Incidence Recurrent Herpes Stromal Keratitis. Cornea 35(1): 81-88, 2016

3. Ko JA, Hirata J, Yamane K, Sonoda KH, Kiuchi Y: Up-regulation of semaphorin 4A expression in human retinal pigment epithelial cells by PACAP released from cocultured neural cells. Cell Biochem Funct 33(1): 29-36, 2015

4. Morishige N, Shin-gyou-uchi R, Azumi H, Ohta H, Morita Y, Yamada N, Kimura K, Takahara A, Sonoda KH: Quantitative Analysis of Collagen Lamellae in the Normal and Keratoconic Human Cornea by Second Harmonic Generation Imaging Microscopy. Invest Ophthalmol Vis Sci 55(12): 8377-8385, 2014

[学会発表](計 件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~eye/index.html>

<http://www.eye.med.kyushu-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

園田康平 (SONODA, Koh-Hei)

九州大学大学院医学研究院眼科学・教授
研究者番号: 10294943

(2)研究分担者

森重直行 (MORISHIGE, Naoyuki)

山口大学医学研究科眼科学・講師
研究者番号: 40346565

柳井亮二 (YANAI, Ryoji)

山口大学医学研究科眼科学・講師
研究者番号: 10346554

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()

