

課題番号 : 24指111
研究課題名 : 糖尿病網膜症の新規治療開発に向けた基盤研究
主任研究者名 : 奥村彰規
分担研究者名 : なし

キーワード : 糖尿病網膜症、網膜周皮細胞、プロテオーム、ペプチドーム
研究成果 :

糖尿病網膜症は大多数の国で働く世代における最も多い失明原因である。我が国でも、糖尿病網膜症は年間 3000 人もの患者から光を奪っている。さらに、増え続ける糖尿病患者のうち約 15%は糖尿病網膜症を発症しており、ごく初期から網膜毛細血管の障害に伴う神経変性が起こっている。視神経を不可逆的な神経変性から保護する観点からも、単純網膜症の病期から使用可能である血管新生阻害剤および血管透過性亢進抑制剤の開発は急務である。網膜毛細血管は、網膜毛細血管内皮細胞と、周皮細胞、それから基底膜より構成されている。網膜周皮細胞は、血管新生、血管の安定性、内皮細胞の調節、血液網膜関門の保全など、幅広い重要な役割がある。この網膜周皮細胞が糖尿病の高血糖により細胞障害を受けたり、網膜毛細血管から脱落したりした結果、周皮細胞由来因子が欠乏して引き起こされる血管新生および血管透過性亢進のメカニズムを解明することは重要視されているが、詳細は明らかにされていない。そこで、本研究では、ヒト網膜由来の周皮細胞を用いて、糖尿病網膜症の進展抑制や寛解に関連する新規因子の同定を行うことで、糖尿病網膜症の疾患メカニズムの解明および新規治療法開発のための標的分子の探索を目的として研究を行った。

まず、培養細胞レベルで網膜周皮細胞が分泌するペプチドの探索を遂行した。ヒト網膜周皮細胞の初代培養を行い、培養上清から生理活性ペプチド群の網羅的同定を行った。ヒト初代培養細胞は Cell Systems より市販のものを入手して解析用の培養までは無血清のメーカー推奨培地で行った。推奨培地の基礎培地である DMEM/HamF12 で培地を洗浄、交換して 24 時間後に回収した。得られた培地を逆相 C18 カラムでバッチ法により濃縮・粗精製を行い、粗ペプチド画分とした。この画分をゲルろ過カラムで分離を行い、おおよそ分子量 1,000 から 10,000 となる溶出時間の画分を回収した。続いて色素類の除去のため強陽イオン交換カラムで精製し、ペプチド画分とした。このペプチドサンプルを還元アルキル化の処理ののち、ナノフロー液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (nano LC-MS/MS) でマスマススペクトルデータを取得し、タンパク質同定ソフトウェア ProteinPilot で、デコイを含めたヒトデータベースに対して検索、ペプチド同定を行った。この結果、培養上清から 5,137 種類のペプチドを同定することに成功した。このうち、質量分析による同定の信用度が 95%以上と非常に高いペプチドは、128 種類の遺伝子由来よりなる 276 ペプチドであった。同様の操作を 1 日間または 7 日間培養した培養上清で行ったが類似した結果を得ている。

同定されたペプチドのうちには、血管内皮細胞に作用する報告があるペプチドホルモンも含まれており、網膜周皮細胞ではこれまでに一切報告は無いものであった。また、興味あることとして、血管内皮細胞に対して作用するタンパク質だけでなく、神経細胞やグリア細胞に作用することが知られているタンパク質についても部分ペプチドが多数同定された。この結果は、周皮細胞が網膜毛細血管の外側に存在するため、網膜内の各種視神経細胞やグリア細胞とも相互作用している可能性を示している。以上のように、多数のペプチドの同定に成功したが、一つ一つ詳細に人工ペプチドを作製して網膜毛細血管内皮細胞に対する機能を検証するのは多すぎて非常に困難である。そこで、UniProt データベース上で分泌タンパク質としてカテゴリー化されているタンパク質由来のペプチドのみに注目することとした。その結果、下に示す 24 遺伝子由来のペプチドに絞り込まれ、大多数がコラーゲン類であった。

ADM (adrenomedullin)	Collagen, type XVII, $\alpha 1$
Annexin A2	Collagen, type XVIII, $\alpha 1$
BPI fold-containing family B member 4	Collagen, type XXI, $\alpha 1$
Collagen, type I, $\alpha 1$	Decorin

Collagen, type I, $\alpha 2$	Elastin
Collagen, type IV, $\alpha 6$	Fibronectin 1
Collagen, type V, $\alpha 1$	Heparanase
Collagen, type V, $\alpha 2$	Laminin, $\beta 4$
Collagen, type V, $\alpha 3$	Matrix metalloproteinase 1
Collagen, type VI, $\alpha 3$	Sulfhydryl oxidase 1
Collagen, type XI, $\alpha 1$	Glia-derived nexin
Collagen, type XIX, $\alpha 1$	Vasorin

網膜毛細血管内皮細胞を調節する新規ペプチドの探索という観点から、特筆するペプチドとして、我々は内皮細胞の調節因子と報告がある ADM 遺伝子由来のペプチドに着目した。この ADM 遺伝子より作られる 185 残基のプリプレホルモンは、21 残基のシグナルペプチド以降、翻訳後修飾を受け、酵素によって 4 つのペプチドが産生されると考えられている。それぞれ N 末側より PAMP (ADM₂₂₋₄₁), MR-proADM (ADM₄₅₋₉₂), adrenomedullin (ADM₉₅₋₁₄₆), adrenotensin (ADM₁₅₃₋₁₈₅) であり、adrenomedullin が初めにヒト褐色細胞腫から同定された降圧作用を示すペプチドである。その他のペプチドは合成ペプチドにて活性の検証が行われており、adrenotensin は adrenomedullin の血管内皮細胞内の一酸化窒素産生をアンタゴナイズする報告がある。しかしながら、これまでヒト由来の試料で adrenotensin が同定された報告はない。本研究において、我々は、ヒト初代培養網膜周皮細胞の培養上清中にはこの adrenotensin が部分ペプチド状になって存在していることを見出した。

我々はこのペプチドを Δ ADT と命名し、ヒト網膜毛細血管内皮細胞 (HRMVEC) に対して処理を行い、細胞増殖、走化性、管腔形成について活性を調査した。まず、細胞増殖について検討すると、HRMVEC の細胞増殖は濃度依存的に高くなることが明らかとなった。さらに、adrenotensin と比べるとより低濃度でも細胞増殖能がみられており、より高い細胞増殖活性を持つことが示された。次に、HRMVEC の走化性活性に対する影響を測定するため、早期の創傷治癒アッセイを採用した。この測定にはリアルタイムで細胞の変動が観察できる利点があるため、ECIS を使って行うこととした。創傷治癒アッセイでは、金電極上にコンフルエントとなるように HRMVEC を播種し、測定するペプチドを添加した。インキュベーションを行った後、一過的に強い電圧をかけ、細胞を死亡させる。その後もモニタリングを行い、金電極が元通り細胞によって覆い被るまでの時間を計測する。この創傷治癒アッセイでは、 Δ ADT は adrenotensin や未添加コントロールに比べて早く被覆される結果となった。これらの結果より、 Δ ADT は、adrenotensin より強い血管作動性作用があることが示された。これに加えて、HRMVEC に対して管腔形成アッセイを行い、 Δ ADT 刺激により分岐点数の増加など、管腔形成も促進されている結果となった。また我々は、これまでにヒト尿検体よりペプチドーム解析を行っており、尿中にも Δ ADT が検出・同定されることがわかった。以上をまとめると、生体内に存在する新規の血管作動性ペプチド Δ ADT を発見したが、HRMVEC に対するメカニズムを調べたり、糖尿病網膜症への役割・機能解析についてはさらなる研究が必要であると考えられる。

並行して、分画操作により生理活性ペプチド候補をヒト初代網膜周皮細胞より段階的に精製することとした。網膜周皮細胞の培養上清から、上述の通りにペプチド粗画分を調製し、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーにて分画した。得られた各画分を濃縮して、ヒト網膜毛細血管内皮細胞に対する生理活性を測定した。測定手法は、細胞増殖・管腔形成・血管透過性・血管新生について検討を行ったが、微細な変化をとらえることができるリアルタイム細胞解析装置 (ECIS) を使った細胞間バリア機能の解析がより効果的であることが判明し、以降、ECIS を使って活性測定を行うこととした。逆相カラムクロマトグラフィーにより細胞間バリア機能を強める作用のある生理活性ペプチドを含む画分の調製に成功したが、アミノ酸配列の決定までには至らなかった。

一方でタンパク質の探索については、分画分子量 3,000 のメンブレンフィルターにて濃縮した培養上清をイオン交換カラムクロマトグラフィーにより分画操作を行った後に、ECIS でヒト網膜毛細管内皮細胞に対するタンパク質試料の影響を観察した。その結果、細胞間バリア機能を弱める働きのあるタンパク質画分の調製に成功した。当ラボの質量分析装置では同定に至らなかったため、共同研究として外部研究機関に解析を依頼している。

以上のとおり、糖尿病網膜症の治療法に向けた研究成果としてペプチドは投与、タンパク質は抗体療法で、網膜周皮細胞が障害を受けた際に効果的である可能性を見出しているため、さらなる研究を行い、合成ペプチドや組換えタンパク質を使った検証を行いたい。

Subject No. : 24 指 111
Title : Basic studies on the novel treatment of diabetic retinopathy
Researchers : Akinori Okumura
Key word : Diabetic retinopathy, Retinal pericyte, Proteome, Peptidome
Abstract :

Diabetic retinopathy (DR) is a leading cause of blindness in the working-age population of most countries. More than 3,000 new cases of blindness related to diabetic retinopathy occur in Japan each year. The number of diabetes patients continues to increase and approximately 15% of diabetes patients suffer from DR, in which nerve degeneration associated with microvascular disease begins from a very early stage. From the standpoint of protecting the optic nerve from irreversible degeneration, there is an urgent need to develop angiogenesis and vascular hyperpermeability inhibitors that can be used from the simple DR stage. Retinal capillaries are composed of microvascular endothelial cells, pericytes and basement membrane. Retinal pericytes have important roles in a range of functions, including angiogenesis, vessel stabilization, endothelial cell regulation and maintenance of the blood-retinal barrier. The retinal pericytes are susceptible to damage by hyperglycemia in diabetes. There has been particular focus on elucidating the mechanism by which pericyte-derived factor deficiency, caused by the detachment of retinal pericytes from retinal capillaries, results in angiogenesis and microvascular hyperpermeability. However, this mechanism remains poorly understood. Therefore, this study aimed to use the primary culture of human retinal pericytes to identify new factors relating to the progression of DR in order to elucidate the mechanism of DR and investigate target molecules for the development of novel treatments.

We investigated the identification of peptides secreted by retinal pericytes. We performed shotgun peptidomics experiments to investigate the bioactive peptides in the conditioned medium of the cells. Primary human retinal pericytes were purchased from Cell Systems Corporation. By culturing the retinal pericytes in a serum-free medium and filling the recovered medium in a reverse-phase column cartridge, we concentrated the crude peptide fraction. The crude peptide fraction was applied to a gel filtration column. Peptides containing fractions corresponding to molecular masses between approximately 1,000 and 10,000 were collected. We then used a strong cation exchange ion exchange column chromatography to remove the pigment composition and obtain the peptide fraction. After reductive alkylation treatment of the fraction, we employed a nanoscale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (nano LC-MS/MS) for comprehensive peptide identification. The nano LC-MS/MS data were submitted through the ProteinPilot software and searched against human database with a decoy database. Using this technique, we successfully identified 5,137 peptides in the conditioned medium. Of these, the 276 peptides originating from 128 genes could be identified with a confidence level at least 95%. Similar results were obtained when the cells were cultured for 1 day or for 7 days.

These peptides included functional peptides that have been reported to act on vascular endothelial cells; it is noteworthy that these have never before been reported in retinal pericytes. In addition to some of proteins that act on vascular endothelial cells, it is interesting that we also identified many partial peptides of proteins that have been reported to act on neurons and glial cells. This finding indicates that since retinal pericytes are located outside retinal capillaries, they may interact with optic nerve cells and glial cells. Despite successfully identifying many peptides, the large quantity meant that it would have been difficult to verify all of these peptides by synthesis. Therefore, we selected 24 genes encoding a extracellular protein that categorized as "Secreted protein" in the UniProt database (see below).

ADM (adrenomedullin)	Collagen, type XVII, α 1
Annexin A2	Collagen, type XVIII, α 1

Researchers には、分担研究者を記載する。

BPI fold-containing family B member 4	Collagen, type XXI, α 1
Collagen, type I, α 1	Decorin
Collagen, type I, α 2	Elastin
Collagen, type IV, α 6	Fibronectin 1
Collagen, type V, α 1	Heparanase
Collagen, type V, α 2	Laminin, β 4
Collagen, type V, α 3	Matrix metalloproteinase 1
Collagen, type VI, α 3	Sulfhydryl oxidase 1
Collagen, type XI, α 1	Glia-derived nexin
Collagen, type XIX, α 1	Vasorin

In a search for novel regulators of retinal microvascular endothelial cells, we focused on a peptide derived *ADM* gene, because *ADM* gene products are reported that the regulators of endothelial cells. The *ADM* gene encodes for a prehormone of 185 amino acid residues, which is post-translationally modified to generate four peptides: PAMP (*ADM*₂₂₋₄₁), MR-proADM (*ADM*₄₅₋₉₂), adrenomedullin (*ADM*₉₅₋₁₄₆), adrenotensin (*ADM*₁₅₃₋₁₈₅). Adrenotensin has been shown to antagonize the stimulatory effect of adrenomedullin on endothelial nitric oxide generation. However, the adrenotensin on human samples has not been determined. In this study, we found that conditioned medium of human primary retinal pericytes contained a partial fragment of adrenotensin.

We investigated whether the peptide (named Δ ADT) could activate human retinal microvascular endothelial cells (HRMVECs) proliferation, migration, and tube formation. To investigate the effect of the Δ ADT on HRMVEC growth, we assayed cell proliferation by cell counting. The Δ ADT increases HRMVEC proliferation in a dose-dependent manner. Moreover, the cells that were treated with the Δ ADT showed increased cell growth compared with adrenotensin treated cells. We measured HRMVEC migration assay by early wound healing using electric cell-substrate impedance sensing (ECIS). ECIS could allow a real time monitoring of cellular behaviour. For wound healing assays, confluent cells cultured on gold electrodes culture plates, and the Δ ADT was added. After incubation, cells were submitted to an elevated voltage, which led to the death and detachment of cells present on the small active electrode, resulting in a wound normally healed by cells surrounding the small active electrode that have not been submitted to the elevated voltage pulse. Wound healing was then assessed by continuous impedance measurements at 16 kHz for 12 hours. This assay showed that the Δ ADT more effectively stimulated HRMVEC migration than adrenotensin and solvent control. These results suggest that the Δ ADT has a higher angiogenic activity than adrenotensin. Consistent with the cell proliferation and migration assay results, the Δ ADT significantly stimulated HRMVEC tube formation. Recently, we also identified the Δ ADT in human urine samples by nano LC-MS/MS analysis. Further clinical and experimental studies are required to elucidate the relationship between diabetic retinopathy and the Δ ADT expression in retinal pericytes.

We also opted to use fractionation to incrementally purify candidate bioactive peptides from the conditioned medium of human primary retinal pericytes. We then prepared the crude peptide fraction from the conditioned medium as described above and used gel filtration column chromatography to obtain the fractions. After concentrating each of the fractions, we measured bioactivity on HRMVECs. We tried HRMVEC proliferation, migration tube formation, and vascular permeability, and established that intracellular barrier function analysis using electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) is more effective, and therefore, used ECIS to measure

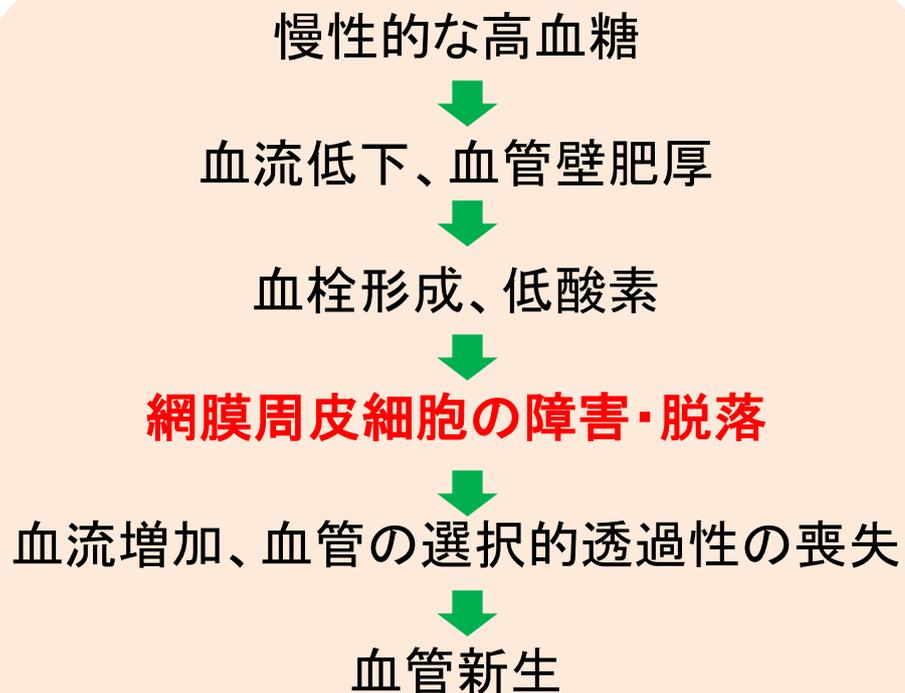
activity. We also used reversed-phase high-performance liquid chromatography to successfully prepare a fraction comprising bioactive peptides that strengthen intracellular barrier function, but were unable to complete amino acid sequence determination.

To investigate proteins, we used a membrane filter with a molecular weight cut off of 3,000 to concentrate the conditioned medium before employing ECIS to observe the effects of sample proteins on HRMVECs. As a result, we successfully obtained a protein fraction that acts to weaken intracellular barrier function.

Within the context of DR therapy, the above findings suggest that administering peptides or using antibodies against proteins may be efficacious for the treatment of damaged retinal pericytes. Further studies are required to identification and verification using synthetic peptides and recombinant proteins.

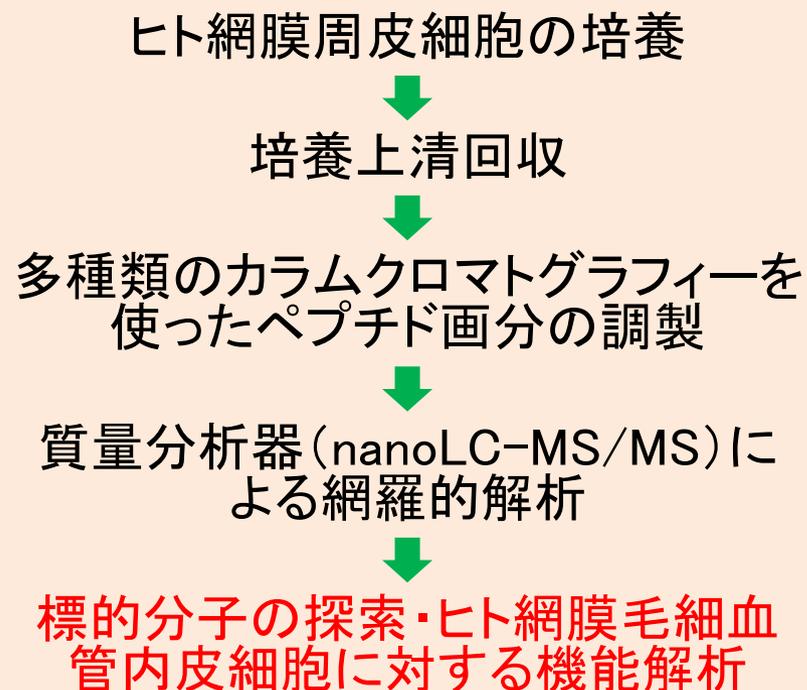
糖尿病網膜症の新規治療開発に向けた基盤研究

糖尿病により網膜毛細血管で起こる症状



網膜周皮細胞から血管内皮細胞に作用するペプチドを見出して機能解析する

網膜周皮細胞の分泌ペプチドーム解析



ショットガンペプチドーム解析の結果

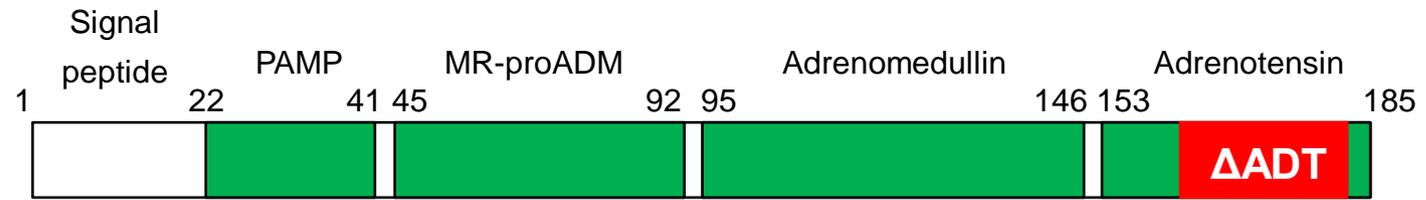
128種の遺伝子由来のペプチドが276種同定された

VIME_HUMAN	ARHGB_HUMAN	BCAT1_HUMAN	MEGF8_HUMAN	CO4A6_HUMAN	TTC19_HUMAN
ACTB_HUMAN	ZZEF1_HUMAN	LPLC4_HUMAN	ZN546_HUMAN	PLEC_HUMAN	VASN_HUMAN
ACTG_HUMAN	BRD4_HUMAN	RAN_HUMAN	ABCAD_HUMAN	MPND_HUMAN	T132E_HUMAN
MMP1_HUMAN	CSTN1_HUMAN	EF1A1_HUMAN	MON1A_HUMAN	LAMB4_HUMAN	PHLB3_HUMAN
TYB10_HUMAN	PCDH8_HUMAN	MLL1_HUMAN	LRP11_HUMAN	GTPBA_HUMAN	CK061_HUMAN
ANXA2_HUMAN	TACC2_HUMAN	ZO1_HUMAN	CC023_HUMAN	TMM8C_HUMAN	TRI67_HUMAN
MAP4_HUMAN	SODC_HUMAN	LRP1_HUMAN	NKAP_HUMAN	F157A_HUMAN	TBA1A_HUMAN
RTN4_HUMAN	CO1A1_HUMAN	GOGA3_HUMAN	O52B4_HUMAN	MA2B1_HUMAN	KI21A_HUMAN
CO1A2_HUMAN	FINC_HUMAN	MZT1_HUMAN	FBF1_HUMAN	NCAN_HUMAN	HECW2_HUMAN
CD44_HUMAN	ALDOA_HUMAN	FOXC1_HUMAN	RPGF6_HUMAN	HGS_HUMAN	UBQL2_HUMAN
ADML_HUMAN	HSPB1_HUMAN	SPTA2_HUMAN	MAML1_HUMAN	JUND_HUMAN	PRR12_HUMAN
AHNK_HUMAN	CO5A2_HUMAN	ITPR2_HUMAN	COLA1_HUMAN	PTPRG_HUMAN	CAPS1_HUMAN
PTRF_HUMAN	GDN_HUMAN	COJA1_HUMAN	TEP1_HUMAN	COF1_HUMAN	COHA1_HUMAN
QSOX1_HUMAN	PGS2_HUMAN	PDIA6_HUMAN	ANKR2_HUMAN	GATA2_HUMAN	BAIP2_HUMAN
SRGP2_HUMAN	CATL1_HUMAN	PLCL1_HUMAN	CLPB_HUMAN	PEBP1_HUMAN	HDAC5_HUMAN
ANXA1_HUMAN	TSP1_HUMAN	PTN14_HUMAN	QRIC2_HUMAN	COIA1_HUMAN	HPSE_HUMAN
CO5A1_HUMAN	4F2_HUMAN	TAF12_HUMAN	CE032_HUMAN	GPR12_HUMAN	STB5L_HUMAN
CO5A3_HUMAN	K2C3_HUMAN	DREB_HUMAN	PTN23_HUMAN	NEST_HUMAN	SIGL9_HUMAN
PER1_HUMAN	COBA1_HUMAN	ZN827_HUMAN	PKHA4_HUMAN	HNRPM_HUMAN	
NP1L1_HUMAN	CO6A3_HUMAN	GRAP1_HUMAN	YS027_HUMAN	DPOG1_HUMAN	
TYB4_HUMAN	ELN_HUMAN	GREB1_HUMAN	WDR26_HUMAN	TAF7L_HUMAN	
MAP1A_HUMAN	HMGA1_HUMAN	H90B3_HUMAN	MRGBP_HUMAN	GARL3_HUMAN	



UNIPROT_ID	GENE NAME	UNIPROT_ID	GENE NAME
ADML_HUMAN	Adrenomedullin	COHA1_HUMAN	Collagen, type XVII, alpha 1
ANXA2_HUMAN	Annexin A2	COIA1_HUMAN	Collagen, type XVIII, alpha 1
LPLC4_HUMAN	BPI fold-containing family B member 4	COLA1_HUMAN	Collagen, type XXI, alpha 1
CO1A1_HUMAN	Collagen, type I, alpha 1	PGS2_HUMAN	Decorin
CO1A2_HUMAN	Collagen, type I, alpha 2	ELN_HUMAN	Elastin
CO4A6_HUMAN	Collagen, type IV, alpha 6	FINC_HUMAN	Fibronectin 1
CO5A1_HUMAN	Collagen, type V, alpha 1	HPSE_HUMAN	Heparanase
CO5A2_HUMAN	Collagen, type V, alpha 2	LAMB4_HUMAN	Laminin, beta 4
CO5A3_HUMAN	Collagen, type V, alpha 3	MMP1_HUMAN	Matrix metalloproteinase 1
CO6A3_HUMAN	Collagen, type VI, alpha 3	QSOX1_HUMAN	Sulfhydryl oxidase 1
COBA1_HUMAN	Collagen, type XI, alpha 1	GDN_HUMAN	Glia-derived nexin
COJA1_HUMAN	Collagen, type XIX, alpha 1	VASN_HUMAN	Vasorin

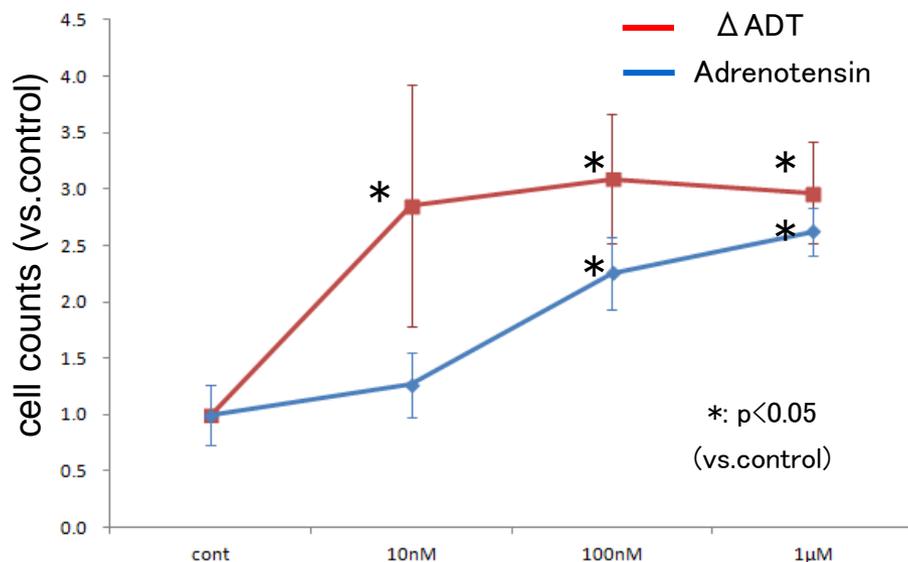
UniProtにてSubcellular locationが secreted proteinに注目すると 24遺伝子由来のペプチドに絞り込まれた



Hypoxiaで誘導されるADM遺伝子の部分ペプチドΔADMに注目した

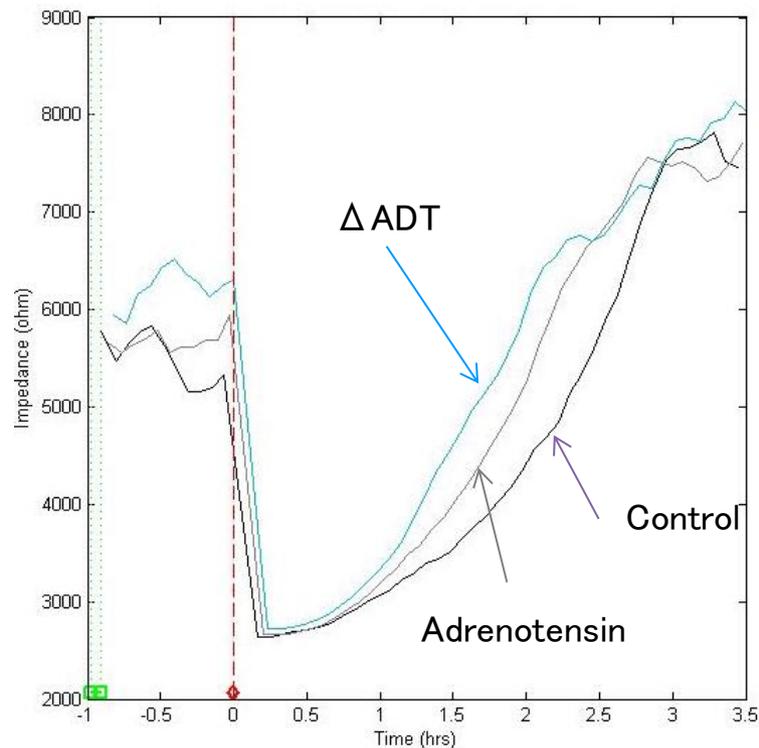
網膜周皮細胞より分泌されている Δ ADTがヒト網膜毛細血管内皮細胞にどのような生理活性を示すかを初代培養細胞で探索

細胞増殖アッセイ



アドレノテンシンよりも低濃度で有意な細胞増殖活性を示した

リアルタイム細胞解析装置による初期創傷治癒モニタリングによる走化性アッセイ

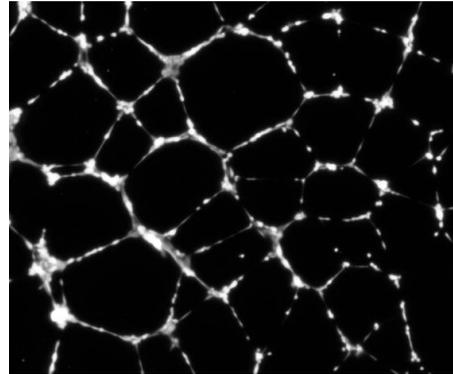
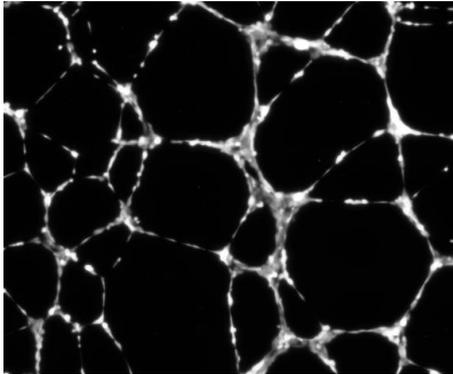


アドレノテンシンよりも高い走化性活性を示した

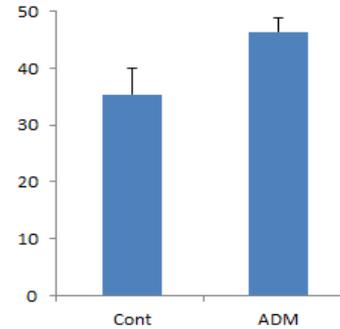
管腔形成アッセイ

Control

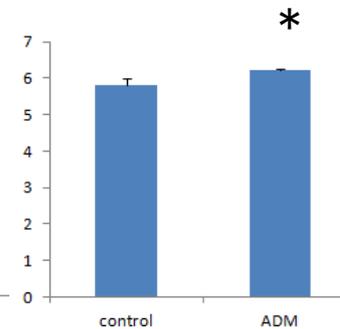
Δ ADT



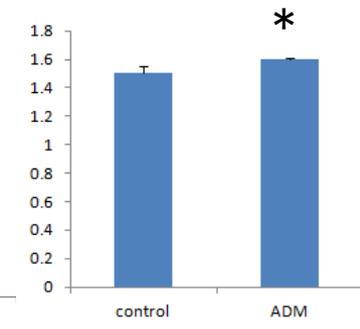
分岐点数 *



ネットワーク長



ネットワーク面積



Δ ADTはヒト網膜毛細血管内皮細胞の管腔形成を促進する

ヒト尿検体ペプチドーム解析

ヒト尿採取



多種類のカラムクロマトグラフィーを使ったペプチド画分の調製



質量分析器 (nanoLC-MS/MS) による網羅的解析



Δ ADTをヒト尿中に確認できた

まとめ

ヒト網膜周皮細胞より新規鎖長生理活性ペプチドを見出すことに成功した。

Hypoxiaで誘導される血管新生因子であり、VEGF同様、このペプチドも糖尿病網膜症の治療ターゲットとなりうる。

体内でも存在が示唆されており今後詳細に検討する必要がある。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 24指111

研究課題名： 糖尿病網膜症の新規治療開発に向けた基盤研究

主任研究者名： 奥村彰規

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Increased serum leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2) levels in obesity and fatty liver	奥村彰規 久保田浩之 松下由実 志賀智子 森吉百合子 山越智 鏑木康志	BioScience Trends	Vol.7 No.6	2013年

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
網膜周皮細胞の分泌ペプチドーム解析と網膜毛細血管内皮細胞への役割解析	奥村彰規 高橋枝里 久保田浩之 鏑木康志	第58回日本糖尿病学会年次学術集会	下関	2015年5月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。