

北 陸 大 学  
学 長 殿

|     |    |     |    |     |    |       |
|-----|----|-----|----|-----|----|-------|
| 代表者 | 所属 | 薬学部 | 職位 | 准教授 | 氏名 | 高橋 達雄 |
|-----|----|-----|----|-----|----|-------|

|       |  |
|-------|--|
| 研究課題名 | 糖尿病網膜症の眼内異常血管新生に対するesRAGEの抑制効果と作用機序の解明 |
|-------|--|

|     |             |
|-----|-------------|
| 交付額 | 1,000,000 円 |
|-----|-------------|

**研究成果の概要**

糖尿病網膜症の発症には網膜における異常血管新生が原因の一つに考えられている。血管新生を促進する因子としてHMGB1の関与が示唆されており、HMGB1のおとり受容体である可溶性RAGE (esRAGE) の糖尿病網膜症に対する治療効果とその作用機序を解明することが本研究の目的である。ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスの硝子体液中では正常マウスと比較してHMGB1の濃度が高く、網膜内においては血管内皮細胞のマーカーであるCD31の陽性細胞及びmRNA発現の増加が認められた。また、HMGB1は培養網膜ミュラー細胞のCXCL2とMCP-1のmRNA発現を増大させたことから、これらが単球及び好中球の遊走を引き起こすことで糖尿病網膜症の病態に関与すると考えられた。esRAGEを糖尿病マウスに週1回静脈内投与することによって網膜内におけるCXCL2及びMCP-1のmRNA発現は有意に抑制され、CD31の陽性細胞とmRNA発現も同様に抑制された。

**研究目的** 研究開始時の背景・着想に至った経緯などを含めて目的を記入して下さい。

糖尿病網膜症は、糖尿病腎症・神経症とともに糖尿病の3大合併症の1つであり、日本では成人の失明原因の第2位となっている。日本における糖尿病網膜症の患者数は約300万人であり、その内年間約3000人が失明しており、効果的な治療法の確立は急務の課題である。

糖尿病網膜症を発症した患者の硝子体液中ではHigh-mobility group box-1 (HMGB1) 濃度が増加しており、糖尿病網膜症のバイオマーカーとしての有用性が注目されている。さらに、HMGB1は細胞膜に存在する受容体 (RAGE; receptor for advanced glycation end products) を介してTNF- $\alpha$ やVEGFの分泌を促進することから、糖尿病網膜症の病態への関与が示唆されている。特にVEGFは網膜における血管新生と血管透過性亢進に重要な役割を果たすとされており、実際に抗VEGF療法の有効性が大規模臨床試験によって立証されている。

申請者は、糖尿病網膜症の病態においてRAGEの活性化がVEGFの上流に位置すると考え、RAGEの活性化を阻害することによって糖尿病網膜症の幅広い病態を改善することが可能であると着想した。RAGEの活性化を阻害する候補物質として、可溶性RAGE (esRAGE; endogenous secretory RAGE) に着目した。esRAGEはRAGEと同様のリガンド親和性を有しているが細胞膜上に存在せず、可溶状態で存在していることから、RAGEのリガンドとして知られているHMGB1、CML及びBS100Bのおとり受容体として機能すると考えられる。申請者はすでに遺伝子組換えesRAGEの作製に成功しており、HMGB1のおとり受容体として機能することも確認している (Takahashi et al. Mol Med 19:183-194, 2013)。

本研究の目的は、糖尿病モデルマウスを用いて、esRAGEの糖尿病網膜症に対する治療効果を明らかにすることである。さらに、RAGEは単球、マクロファージおよび血管内皮細胞だけでなく網膜のグリア細胞などに発現が認められており、esRAGEの作用を詳細に検証することによってRAGEの活性化が糖尿病網膜症の病態にどのように関わっているかを解明することができる。

**研究の方法**

## 1. ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスにおけるesRAGEの糖尿病網膜症治療効果

6週齢雄性ddYマウスにストレプトゾトシン (STZ) を静脈内投与 (150 mg/kg) して糖尿病マウスを作製した。STZ投与2週目に血糖値を測定して糖尿病の発症を確認した後、糖尿病マウスを薬物非投与群とesRAGE (0.1 mg/kgもしくは0.3 mg/kg) 投与群とに分けた。薬物非投与群にはリン酸緩衝液を、esRAGE投与群には上記の用量となるようにesRAGEを週に1回静脈内投与した。STZを投与してから6週後、マウスを安楽死させて眼球を摘出した。眼球の凍結薄切片を作製した後、血管内皮細胞のマーカーであるCD31が陽性の細胞を免疫組織化学染色法によって染色し、網膜内の血管新生異常を評価した。また、糖尿病マウスの網膜における血管新生に関与する因子の遺伝子発現を定量的PCR法によって解析した。

## 2. 網膜内グリア細胞に対するHMGB1の作用とesRAGEによる抑制効果

1の研究から、HMGB1の標的細胞として網膜内のミュラー細胞もしくはミクログリアの関与が示唆されたため、これらの細胞に対するHMGB1の作用を検証した。ミュラー細胞は樹立細胞株であるMIO-M1細胞を用い、ミクログリアは生後2~3日齢のddYマウスの眼球から摘出した。これらの細胞にHMGB1を作用させた後、血管新生に関与する因子のmRNA発現を定量的PCR法によって測定した。さらにHMGB1の作用がesRAGEによって抑制されるかを検証することにより、esRAGEのおとり受容体としての機能を確認し、糖尿病網膜症に対する治療効果の作用機序を検証した。

## 研究成果

引用文献は文末に〈引用文献〉として記入して下さい。

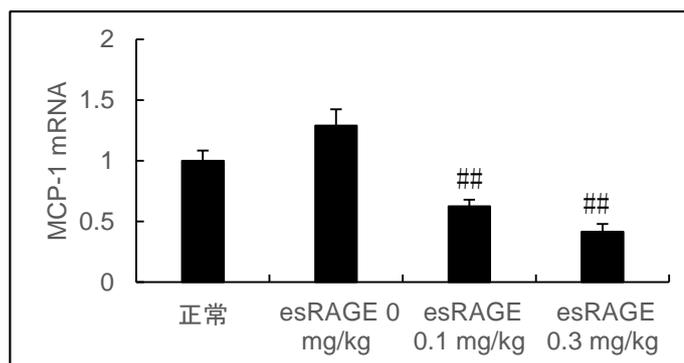
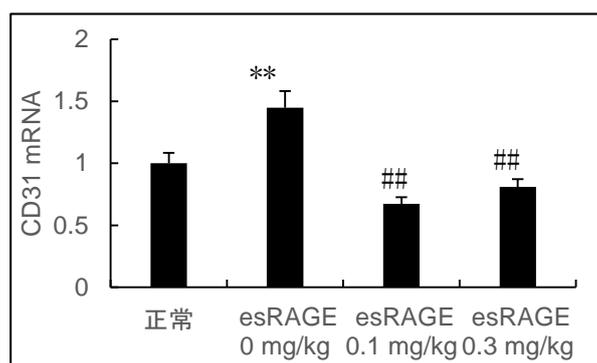
STZを投与したマウスは、投与2週目から血糖値が徐々に上昇して3週目ではすべてのマウスの血糖値が400 mg/dLを越え、実験終了時点（STZ投与6週目）においてもSTZ非投与群（正常マウス）と比較して血糖値は有意に高かった。

正常マウスにおいて、血管内皮細胞のマーカーであるCD31の陽性細胞は脈絡膜及び網膜に存在が認められ、網膜内においては特に内顆粒層周辺からその内側（外網状層、内顆粒層、内網状層及び神経節細胞層）に存在していた。糖尿病マウスの網膜におけるCD31陽性面積は、正常マウスと比較して有意に増加しており、糖尿病網膜症の特徴的な病態である網膜内の血管新生を確認することが出来た。糖尿病マウスにesRAGEを1週間に1回、4週間におわり静脈内投与することによって、網膜内のCD31陽性面積は減少し、さらに糖尿病マウスの網膜内で増加したCD31 mRNA発現量もesRAGEの投与によって低下した（下左図、\*\*、 $P < 0.01$  vs. 正常、##、 $P < 0.01$  vs. esRAGE 0 mg/kg）。一方、esRAGEはSTZによって誘導された高血糖に影響を与えなかった。

HMGB1は主に核内に局在しており、網膜内においても核が多数存在している外顆粒層と内顆粒層に多く存在していた。HMGB1は細胞の壊死もしくはサイトカインによる刺激を受けると細胞外に放出され、正常マウスにおいても硝子体液中には血中よりも1000倍以上の高濃度のHMGB1が存在しており、糖尿病マウスの硝子体液中ではさらに高濃度のHMGB1が存在していた。また、RAGEは網膜内全般に分布していた。

糖尿病マウスの病理組織学的所見から、HMGB1はミュラー細胞もしくはミクログリアに作用して血管新生に寄与していると推察され、esRAGEは網膜内異常血管新生を抑制して糖尿病網膜症の治療効果を有することが示唆されたため、ミュラー細胞（MIO-M1細胞）及び網膜内ミクログリアを用いて作用メカニズムを検証した。

MIO-M1細胞にHMGB1を作用させ、血管新生に関与する因子（CXCL1、CXCL2、IL-1、IL-6、IL-8、MCP-1、PDGF-B、TNF- $\alpha$ 、VEGF）のmRNA発現を測定した結果、CXCL2、IL-8とMCP-1はHMGB1の濃度依存的にmRNAの発現増加が認められた。また、培養上清中へのIL-8分泌量もHMGB1の濃度依存的に増加が認められ、この分泌増加はesRAGEによって有意に抑制された。一方、網膜ミクログリアに対しては、HMGB1はTNF- $\alpha$ とVEGFのmRNA発現を増加させたが、esRAGEによってVEGFの発現のみが抑制された。IL-8はマウスでの発現が認められないため、上記の結果から少なくともHMGB1はCXCL2、MCP-1、TNF- $\alpha$ 、VEGFの発現を増加させて糖尿病マウスにおける網膜内血管新生に寄与することが示唆された。そこで、マウス網膜内における上記の血管新生に関与する因子のmRNA発現を測定したところ、正常マウスと比較して糖尿病マウスでのCXCL2 mRNAの発現が有意に増加しており、esRAGEを投与することによってCXCL2、MCP-1、TNF- $\alpha$ のmRNA発現が顕著に抑制された（下右図、\*\*、 $P < 0.01$  vs. 正常、##、 $P < 0.01$  vs. esRAGE 0 mg/kg）。CXCL2とMCP-1は糖尿病網膜症における血管新生に関与するという報告がなされていることから、esRAGEはHMGB1によって誘導されたミュラー細胞のCXCL2とMCP-1発現を抑制することで網膜内血管新生を抑制したと考えられる。また、TNF- $\alpha$ も糖尿病網膜症の病態への関与が示唆されており、esRAGEを投与された糖尿病マウスの網膜内におけるTNF- $\alpha$ 発現抑制も血管新生抑制効果に寄与すると考えられる。しかし、HMGB1によって誘導されたミクログリアのTNF- $\alpha$ 発現はesRAGEによって抑制されなかったことから、esRAGEによる網膜内TNF- $\alpha$ 発現抑制はミクログリア以外の細胞が関与しているか、もしくは間接的な作用だと思われる。



主な発表論文等 論文・学会・HP等の発表があれば、項目ごとに記入して下さい