

令和元年9月12日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11337

研究課題名(和文) 糖尿病網膜症の発症におけるTh細胞の関与およびTh細胞を中心とした病態の解明

研究課題名(英文) Involvement of Th cells in diabetic retinopathy and understanding of the Th-cell mediated pathogenic mechanisms

研究代表者

竹内 大 (Takeuchi, Masaru)

防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・眼科学・教授)

研究者番号：40260939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：増殖糖尿病網膜症(PDR)患者の前房水および硝子体液におけるIL-4、IL-17A、IL-22、IL-31、およびTNFを測定し、その関連性について検討した。これらのサイトカインの中で、IL-17Aが最も多くの前房水中で検出されたが、その濃度、検出率ともに硝子体液と比較して有意に低く、PDRの病態を反映する硝子体内IL-17Aのマーカーとして適当ではないことが示唆された。一方、糖尿病を自然発症するAkitaマウスとTh2およびTh17細胞優位のIFN- $\gamma$ 欠損マウスに戻し交配させた新たなDRマウスモデルは、Akitaマウスより早期に重症なDRを発症することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で解析したサイトカインでは臨床応用可能な成果はみられなかったが、DRの重症度を簡易かつ反復性に採取可能な眼の前房水により定量的に評価することができれば、DRに対する血糖コントロール、網膜光凝固治療の適応、有効性を適宜、包括的に判定することが可能になる。また、DRの進行に最も相関するサイトカインを同定できれば、血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)以外の分子標的療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We measured IL-4, IL-17A, IL-22, IL-31, and TNF in aqueous humors and vitreous fluids of patients with proliferative diabetic retinopathy (PDR), and examined their relevance. Although IL-17A was the most detected in the aqueous humor among these cytokines, it was significantly lower in both concentration and detection rate compared to that in the vitreous humor, and was not suitable as a marker for intravitreal IL-17A which reflects the pathological condition of PDR. On the other hand, it was shown that a new DR mouse model in which Akita mice that spontaneously develop diabetes were back-crossed to Th2 and Th17 cell dominant IFN- $\gamma$  deficient mice induced much more severe DR than Akita mice.

研究分野：眼免疫学

キーワード：糖尿病網膜症 Th17細胞 獲得免疫 T細胞 慢性炎症 糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

我が国を含め先進諸国における糖尿病 (DM) 患者は増加の一途であり、その合併症の一つである糖尿病網膜症 (DR) は失明に至る重篤な疾患である。成人DM患者における DRの頻度は40%以上であり、増殖糖尿病網膜症 (PDR) に進行すると新生血管を生じ、新生血管の破綻による硝子体出血、増殖した線維血管膜の収縮による牽引性網膜剥離により重篤な視力障害を来す。近年、DMの発症にlow grade inflammationと呼ばれる慢性炎症が関与することが知られ、PDR患者の硝子体液中においてもIL-1、IL-6、IL-8、およびTNF 濃度の上昇がみられることから、全身および局所の炎症性因子が網膜組織障害、PDRへの進行を促進していることが示唆される。炎症は免疫反応により惹起され、抗原非特異的でメモリー機能を持たない自然免疫と抗原特異的でメモリー機能を有する獲得免疫に大別される。この両者の活性にIL-17A, IL-17F, IL-21, およびIL-22を産生するTh17細胞が関与し、このTh17細胞の異常がアテローム硬化型疾患や脂肪細胞分化、糖代謝異常を来す疾患など、多くの慢性炎症性疾患で認められている。我々は、PDR患者の硝子体中におけるTh17細胞産生サイトカイン、臓器特異的自己免疫病に関与するTh1細胞 (IL-2およびIFN- $\gamma$ )、液性免疫疾患に関わるTh2細胞 (IL-4, IL-10, およびIL-31)、および炎症性サイトカイン (IL-1, IL-6, およびTNF) を測定した結果、PDR患者の硝子体中のTh2、Th17細胞関連サイトカインであるIL-4, IL-6, IL-17A, IL-21, IL-22, およびTNF の検出率および濃度はその血清よりも有意に高く、互いに相関し、黄斑上膜、黄斑円孔患者、および寛解期のサルコイドーシスぶどう膜炎患者の硝子体濃度よりも有意に高値であることを認めた。

疾患の病態研究においてモデル動物は不可欠であり、DMに関しても多くの動物モデルが存在する。Ins2<sup>Akita</sup> (Akita) マウスは、7番染色体上のMody4遺伝子座にインスリン2遺伝子点突然変異を有するDMを自然発症するモデル動物である。ヘテロ接合体遺伝子変異雄マウスは、出生後4週間で高血糖症および低インスリン血症を発症し、網膜では、神経細胞の変性、血管透過性の亢進、毛細血管無灌流域の僅かな増加、白血球停滞の増加、並びにアマクリンおよび神経節細胞の喪失がみられる。しかし、他のDMモデル動物と同じくこのような網膜の変化はヒトにおけるDRの初期の病態であり、網膜浮腫、視神経萎縮、硝子体出血ならびに網膜前新生血管形成までは進展せず、理想的なDRモデルとしては不十分である。もし、Th2、Th17細胞誘導免疫応答がDRの発症および進行に関与しているのであれば、AkitaマウスにおいてTh2、Th17細胞分化を促進することにより、重篤なDRの発症を誘発できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

今回我々は、眼内におけるIL-4, IL-6, IL-17A, IL-21, IL-22, およびTNF のDRの進行に伴う変化を検討するために、簡便かつ繰り返し採取可能な前房水における含有量を測定すること、および新たなDR動物モデルを用いてこれらTh2、Th17細胞関連サイトカインがDRの進行に促進的または抑制的に働くのか、相加的、相乗的、あるいは拮抗的に作用するのかを明らかにすることを目的として研究を開始した。

## 3. 研究の方法

ヒト検体、糖尿病動物モデルを用いた研究に分けて記載する。

PDR患者の前房水を用いた研究

- 1) 防衛医大眼科を受診し、白内障 + 硝子体手術の適用となった増殖糖尿病網膜症患者で、防衛医大倫理委員会が承認した本研究プロトコルに同意が得られた31例を対象とした。
- 2) 白内障手術時に破棄される前房水を100~400 $\mu$ l、硝子体手術時に破棄される硝子体液を500 $\mu$ l採取し、-80 $^{\circ}$ Cのディープフリーザーで保管した。
- 3) 保管した検体は解凍後、Bio-Plex Pro<sup>TM</sup> Human Th17 Assays<sup>®</sup>を用いてその中に含まれるIL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-23, IL-25, IL-31, IL-33, IFN- $\gamma$ , TNF, およびsCD40Lを同時に測定した。

糖尿病モデルマウスを用いた研究

- 1) 新たなDMモデル動物の作成

IFN- $\gamma$  の合成を阻害したIFN- $\gamma$  knock out (Interferon-gamma knock out; GKO) マウスでは、Th1細胞への分化が抑制され、相対的にTh2およびTh17細胞の分化および活性が亢進している。そこでヘテロのAkita (Ins2<sup>+/+</sup>) マウスとホモのGKO (IFN- $\gamma$  knock out) マウス、およびそれらの仔を2世代にわたり交配させ、Akita-GKO (Ins2<sup>+/+</sup>xIFN- $\gamma$  knock out) マウスを作成した。Crb1 (crumbs

family member 1) 遺伝子にある rd8 変異のあるマウスは特徴的な網膜白斑を呈するため、rd8 変異を有するマウスは全て実験から除外した。

#### 2) Akita-GKO (Ins2<sup>+/+</sup>xIFN-<sup>-/-</sup>) マウスの作成過程における遺伝子タイピング

Insulin2 遺伝子変異は既報に従って実施した。Genomic DNA を抽出後、上流プライマー「TGGTCCCACATATGCACATG」<sub>J</sub>、下流プライマー「TGCTGATGCCCTGGCCTGCT」を加え Veriti<sup>®</sup>サーマルサイクラー (Applied Biosystems, Massachusetts, USA) で増幅した後に制限酵素 Fnu4HI (New England Biolabs, Massachusetts, USA) を加え、電気泳動を行なった。正常の Ins2 遺伝子は制限酵素で全て切断され 140 bp の 1 本のバンドのみが形成されるが、Ins2 遺伝子にヘテロ変異がある Akita マウスは半数が切断されず、140 bp と 280 bp の 2 本のバンドを示すことで識別される。IFN- 遺伝子変異も既報に従って実施し、上流プライマー「AACAGAGGATGGTTTGCATCTGGG」<sub>J</sub>、野生型の下流プライマー「AAAGCCAAGATGCAGTGTGTAGCG」<sub>J</sub>、及び GKO の下流プライマー「ACGTGCATGGATCTGCAACATGTC」を用いた。正常の IFN- 遺伝子は 11 kbp の 1 本のバンドのみが形成されるが、IFN- 遺伝子ホモノックアウトマウスは 13 kbp に 1 本のバンドを示し、IFN-ヘテロノックアウトマウスは 11 kbp と 13 kbp に 2 本のバンドを示すことで識別される。rd8 変異の検出は、野生株の上流プライマー「GTGAAGACAGCTACAGTTCTGATC」<sub>J</sub>、rd8 変異を検出する上流プライマー「GCCCCGTGTTTGCATGGAGAACTTGAAGACAGCTACAGTTCTTCTG」<sub>J</sub>、および共通の下流プライマー「GCCCCATTTGCACACTGATGAC」を用い、野生型の増幅した DNA は 220 bp の 1 本のバンドのみであるが、ホモ rd8 変異を持つマウスは 244 bp に 1 本のバンドを示し、ヘテロ rd8 変異を持つマウスは 220 bp と 244 bp に 2 本のバンドを示すことで識別した。

#### 3) 網膜血管における白血球吸着の観察

網膜血管内の白血球吸着の観察は既報に則って測定した<sup>9,30</sup>。はじめに赤血球および非付着性白血球を除去するために PBS (5 mL) を通常の心拍出量 (10~14 mL/min) で左心室より灌流し、次にフルオレセインイソチオシアネート-コンカナバリン A (FITC-ConA) (5 mg/kg; 20 µg/mL in PBS [pH 7.4]; Vector, CA, USA) を付着白血球および血管内皮を染色するために注入後、PBS で灌流洗浄した。網膜を脈絡膜および強膜から分離し、伸展標本を作成し、蛍光顕微鏡で撮影した。動脈または静脈は視神経乳頭周囲の血管からその第 1 分枝までと定義し、それ以外のすべての血管は微小血管とした。動脈または静脈のいずれかに付着した白血球を数え、微小血管に付着したものは除外した。1 網膜あたりの血管壁に付着している白血球の総数を各群 8 眼 (網膜) で計測した。

#### 4) 病理組織所見

各群のマウスをイソフルラン吸入下、過量のペントバルビタールによる深麻酔後、リン酸緩衝 4%パラホルムアルデヒド液で灌流固定した。眼球を摘出し、角膜と水晶体を除去した後、同じ固定液に 4 度で一晩浸漬固定した。次に標本をパラフィン包埋した後、5 µm 厚の切片を作成し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行った。

#### 5) 免疫組織化学染色

各群から得られたパラフィン切片を、キシレンで脱パラフィンした後、抗ペリオスチン抗体染色を行う場合のみ室温で 2 分間 Histo/Zyme (Diagnostic BioSystems, CA, USA) で処理した。標本を内因性ペルオキシダーゼ阻害剤 (Dako, Glostrup, Denmark) にて室温で 15 分間、さらに、2.5%のウマ血清と共に 45 分間インキュベートした。1 次抗体反応は、抗ペリオスチン抗体 (RSD, Minneapolis, USA) (1:200 希釈) および抗 CD105 抗体 (RSD, Minneapolis, USA) (1:200 希釈) を 4 度で一晩行った。PBS で洗浄した後、スライドをペルオキシダーゼ結合ポリマー二次抗体 (ImmPRESS reagent; Vector, CA, USA) と共に室温で 45 分間インキュベートし、3,3'-ジアミノベンジジンで発色させ、核をヘマトキシリンで対比染色した。

#### 6) カラー眼底 (FP) と蛍光眼底造影 (FFA)

WT、GKO、Akita、Akita-GKO 群の各マウスをペントバルビタール (50 mg/kg) で麻酔後、0.5% トロピカミド点眼 (ミドリン-P<sup>®</sup>; 参天製薬, Osaka, Japan) を用いて散瞳した。ヒドロキシエチルセルロースゲル (スコピゾル<sup>®</sup>; 千寿製薬, Osaka, Japan) を眼に点入し、Micron IV<sup>®</sup> 網膜 (Phoenix Research Laboratories, CA, USA) イメージング顕微鏡にて眼底の変化を観察した。その後、FITC (100 mg/ml) (Fluorescein<sup>®</sup>; ノバルティス ファーマ, Tokyo, Japan) を 0.05 ml 腹腔内注射し、蛍光眼底造影検査を施行した。

#### 7) 卵白アルブミンによる免疫反応の活性化

網膜と脾臓のサンプルを用いて RT-PCR 及びフローサイトメトリーを実施するにあたり全身の免疫反応を活性化するために、各群のマウスを Ovalbumin (OVA; Wako, Osaka, Japan) - Complete

Freund's adjuvant (CFA; Becton Dickinson, New Jersey, USA; 以下 BD) で免疫した。

#### 8) 網膜および脾臓における転写因子およびサイトカイン遺伝子の発現解析

免疫した WT、Akita、GKO、および Akita-GKO マウスを過量のペントバルビタールによる深麻酔により屠殺後、網膜及び脾臓を採取し、全 RNA を抽出した。RT-PCR に使用したプローブは以下の通りである。T-bet (Tbx21、Mm00450960\_m1)、GATA-3 (Gata3、Mm00484683\_m1)、ROR- $\gamma$  T (Rorc、Mm01261022\_m1)、ICAM-1 (Icam1、Mm046023\_m1)、VEGF (Vegfa、Mm00437304\_m1)。18S rRNA (Rn18s、Mm03928990\_g1) を内因性コントロールとして用いた。T-bet は Th1 細胞への、GATA-3 は Th2 細胞への、ROR- $\gamma$  T は Th17 細胞への分化をそれぞれ促進する転写因子である。各因子の mRNA レベルは 18S rRNA を基準とした相対発現量で示した。Akita、GKO および Akita-GKO マウスにおける発現は、WT マウスを基準として示した。網膜、脾臓は各群 9 サンプルずつ測定した。

#### 9) フローサイトメトリーによる脾細胞のサイトカイン発現解析

免疫した WT、Akita、GKO、および Akita-GKO マウスより脾臓を採取し、CD3<sup>+</sup>T 細胞を単離後、PMA (50 ng/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) および ionomycin (500 ng/ml; Wako, Osaka, Japan) を加えて 6 時間培養し、最後の 2 時間にゴルジ体輸送をブロックしサイトカインを細胞内に留めるためのプレフェルジジン A (10  $\mu$ g/ml; Wako, Osaka, Japan) を加えた。6 時間培養後、細胞を洗浄し、抗 CD4 抗体 (PerCP-Cy5.5) で細胞表面を染色し、Cytotfix / Cytoperm™ Fixation / Permeabilization Solution Kit (BD) を用いて細胞膜処理を行ったのちに抗 IL-2、4、10、17、22、TNF 抗体 (APC) で細胞内染色をした。全ての抗体は  $1 \times 10^6$  個の細胞に対し 0.02  $\mu$ g/ $\mu$ l で使用した。染色細胞を、BD FACS Canto II (BD) を用いてフローサイトメトリー (2 色法) により分析した。全ての抗体は eBioscience から購入した。アイソタイプが一致した対照抗体を用いて、BD FACSDiva™ ソフトウェア (BD) によりデータを分析した。脾臓は各群 6 サンプルずつ測定した。

### 4. 研究成果

#### ヒト検体を用いた研究

##### 1) PDR患者の前房水と硝子体液中のサイトカインの比較

30%以上の前房水または硝子体液の検体で検出されたサイトカインはIL-6、IL-10、IL-17A、IL-17F、IL-22、IL-25、IL-31、IFN- $\gamma$ 、sCD40L、TNF であり、IL-10、IL-17A、IL-22、TNF は硝子体の方が、IL-17F、IL-25、IFN- $\gamma$ 、sCD40Lは前房水の方が有意に高率に検出され高濃度であった。IL-6は前房水、硝子体液の全ての検体で検出され、前房水の方が有意に高濃度であった。

##### 2) PDR患者の前房水と硝子体液中のサイトカインの相関解析

前房水と硝子体液のIL-10およびIL-17A濃度に有意な相関がみられ、重回帰分析では硝子体液中のIL-17濃度とIL-6、IL-10、IL-22、およびTNF 濃度が有意に関連したが、前房水中のIL-17A濃度とIL-10、IL-22、またはTNF 濃度との関連はみられなかった。一方、硝子体IL-17A濃度は、前房水中のIL-10、IL-22、およびTNF 濃度と有意に関連したが、前房水IL-17A濃度と関連した硝子体サイトカインはみられなかった。

#### 糖尿病モデルマウスを用いた研究

##### 1) 各群のマウスのBGLの比較

9 週齢の WT、Akita、GKO、および Akita-GKO マウスの BGL (平均値  $\pm$  SD) は、133.8  $\pm$  11.9 mg/dL、382.7  $\pm$  42.9 mg/dL、124.1  $\pm$  29.8 mg/dL、そして 369.5  $\pm$  68.7 mg/dL であった。Akita-GKO マウスおよび Akita マウスで BGL が高値であり、同週齢の WT マウスまたは GKO マウスよりも有意に高かった。WT マウスと GKO マウスとの間、Akita マウスと Akita-GKO マウスとの間に BGL に統計学的有意差はみられなかった。

##### 2) 各群のマウスのBWの比較

9 週齢の WT、Akita、GKO、および Akita-GKO マウスの BW (平均  $\pm$  SD) は、22.3  $\pm$  0.820 g、18.7  $\pm$  0.691 g、21.8  $\pm$  1.18 g、そして 20.3  $\pm$  1.29 g であった。Akita マウスおよび Akita-GKO マウスの BW は、同週齢の WT マウスまたは GKO マウスよりも有意に低かった。WT マウスと GKO マウスとの間、Akita マウスと Akita-GKO マウスとの間に統計学的有意差はみられなかった。

##### 3) 網膜における遺伝子発現解析

WT、Akita、GKO、および Akita-GKO マウスの網膜における VEGF、ICAM-1、ROR- $\gamma$  t、GATA-3、および T-bet の遺伝子発現を RT-PCR により解析した。VEGF の mRNA 発現は、Akita マウス

( $1.85 \pm 0.47$ ) および Akita-GKO マウス ( $2.58 \pm 0.49$ ) において亢進していた。Akita-GKO マウスでは WT および GKO マウスと比較して有意に発現が亢進していたが、Akita マウスでは WT や GKO マウスと比較して有意差はなかった。Akita マウス ( $2.20 \pm 0.46$ ) および Akita-GKO マウス ( $3.54 \pm 0.60$ ) において ICAM-1 mRNA 発現のレベルは亢進しており、共に WT マウスまたは GKO マウスよりも有意に上昇していた。ROR- $\gamma$  t の mRNA 発現は、Akita マウス ( $1.49 \pm 0.26$ )、GKO マウス ( $1.62 \pm 0.252$ ) および Akita-GKO マウス ( $2.53 \pm 0.39$ ) で上昇していたが、WT マウスと比較した統計学的有意差は Akita-GKO マウスでのみ観察された。GATA-3 の発現は GKO マウス ( $1.52 \pm 0.56$ ) および Akita-GKO マウス ( $2.01 \pm 0.55$ ) で上昇し、WT マウスと比較した統計学的有意差は Akita-GKO マウスで観察されたが、GKO マウスでは観察されなかった。4 群間で T-bet の mRNA 発現に有意差はなかった。

#### 4) 脾臓における遺伝子発現解析

脾臓においても同様の結果が観察され、Akita-GKO マウスの VEGF と ICAM-1、および ROR- $\gamma$  t の mRNA 発現は WT マウスよりも有意に高かった。一方、GATA-3 の mRNA 発現は WT または Akita マウスよりも GKO および Akita-GKO マウスで上昇していたが、それらの間に統計学的有意差はなかった。

#### 5) Th 細胞による産生サイトカイン解析

WT、Akita、GKO、および Akita-GKO マウスの脾臓より CD3<sup>+</sup>細胞分離し、CD4<sup>+</sup>細胞における IL-2、IL-4、IL-10、IL-17A、IL-22、および TNF 産生を FACS により解析した。各群の CD4<sup>+</sup>細胞中の IL-2、IL-4、IL-10、および TNF 陽性率に有意差はみられなかったが、CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>細胞および CD4<sup>+</sup>IL-22<sup>+</sup>細胞の割合は、それぞれ WT マウスでは  $0.177 \pm 0.144\%$ 、 $0.107 \pm 0.144\%$ 、Akita マウスでは  $0.251 \pm 0.136\%$ 、 $0.308 \pm 0.290\%$ 、GKO マウスでは  $0.367 \pm 0.253\%$ 、 $0.340 \pm 0.321\%$  であったが、Akita-GKO マウスでは  $2.10 \pm 0.571\%$ 、 $1.66 \pm 0.396\%$  であり、他の 3 群と比較して有意に上昇していた。

#### 6) 網膜血管における白血球吸着

網膜血管に付着する白血球の数は、WT ( $5.88 \pm 1.69$  cells/retina) または GKO マウス ( $8.75 \pm 1.56$  cells/retina) と比較して Akita マウス ( $14.9 \pm 4.22$  cells/retina) で有意に増加していたが、Akita-GKO マウス ( $20.6 \pm 4.92$  cells/retina) ではさらに多く、他の 3 群と比較して有意差がみられた。

#### 7) 網膜の病理組織学的変化

WT、Akita、または GKO マウスでは異常な組織学的変化は観察されなかったが、Akita-GKO マウスでは網膜表層に浮腫性変化を認めた。免疫組織化学染色では、Akita-GKO マウスの NFL および GCL に抗ペリオスチン抗体陽性所見がみられ、他の群のマウスではみられなかった。抗 CD105 抗体陽性所見も Akita-GKO マウスの血管内皮細胞を含む INL および OPL においてのみ観察された。

#### 8) FP と FFA 所見

Akita-GKO マウスでは網膜に白斑が観察されたが、WT、GKO および Akita マウスにはみられなかった。FFA では、フルオレセインの蛍光漏出は Akita-GKO マウスの網膜の白斑の箇所と一致して観察された。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕

1. Takeuchi M, Sato T, Sakurai Y, Taguchi M, Harimoto K, Karasawa Y, Ito M: Association between aqueous humor and vitreous fluid levels of Th17 cell-related cytokines in patients with proliferative diabetic retinopathy. PLoS One. 2017 May 30;12(5):e0178230.

〔学会発表〕

1. Takeuchi M, Taguchi M, Nishio Y, Inada M, Takayama K, Harimoto K, Karasawa Y, and Ito M: 糖尿病網膜症を発症する IFN- $\gamma$  欠損 Akita マウスの免疫メカニズム解析. 第 123 回日本眼科学会総会 (東京, 2018.04)
2. Taguchi M, Nishio Y, Inada M, Takayama K, Harimoto K, Karasawa Y, Ito M, and Takeuchi M: IFN- $\gamma$  欠損 Ins2<sup>Akita</sup> マウスに発症した糖尿病網膜症. 第 123 回日本眼科学会総会 (東京, 2018.04)

3. Taguchi M, Nishio Y, Inada M, Harimoto K, Karasawa Y, Ito M, and Takeuchi M: **Immune responses in diabetic retinopathy: Molecules in disease progression. International Society for Eye Research (ISER) 2018 Biennial Meeting, Belfast, Northern Ireland 2018.09/09-09/13**
4. 竹内大、佐藤智人、藤田雄己、北村力、唐沢容子、櫻井裕: **眼サルコイドーシスおよび増殖糖尿病網膜症の硝子体中におけるオステオポンチンの解析. 第122回日本眼科学会総会(東京、2018.04)**
5. Taguchi M, Inada M, Murata T, Harimoto K, Karasawa Y, Ito M, Takeuchi M: **Retinal leukostasis in diabetic mice immunized with Keyhole Limpet Hemocyanin. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2017 Annual Meeting, Baltimore, Maryland 2017.05/07-05/11**
6. Takeuchi M, Sato T, Taguchi M, Karasawa Y, Sakurai Y, Harimoto K, Ito M: **Association of Th17-cell related cytokines between Aqueous Humor and Vitreous Fluid in Proliferative Diabetic Retinopathy Patients. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) 2017 Annual Meeting, Baltimore, Maryland 2017.05/07-05/11**
7. **Takeuchi M: Correlation of inflammatory cytokines in the aqueous humor with aqueous flare in patients with Proliferative Diabetic Retinopathy. 14th International Ocular Inflammation Society Meeting in conjunction with SOIE, 4th Assembly (IOIS), Lausanne, Switzerland 2017.10/18-10/21**
8. 竹内大、佐藤智人、田口万蔵、播本幸三、唐沢容子、櫻井裕、伊藤正孝: **増殖糖尿病網膜症患者の前房水および硝子体液中の IL-17A 関連サイトカイン. 第121回日本眼科学会総会(東京、2017.04)**
9. 田口万蔵、稲田真、村田敏彦、播本幸三、唐沢容子、伊藤正孝、竹内大: **Keyhole Limpet Hemocyanin 免疫による Akita マウスの網膜変化. 第121回日本眼科学会総会(東京、2017.04)**

#### 6. 研究組織

研究代表者

竹内 大 (TAKEUCHI, Masaru)

防衛医科大学校・眼科学・教授

研究者番号：40260939

研究分担者

佐藤 智人 (SATO, Tomohito)

防衛医科大学校・眼科学・助教

研究者番号：00724246

伊藤 正孝 (ITO, Masataka)

防衛医科大学校・再生発生学・准教授

研究者番号：30534896

播本幸三 (HARIMOTO, Kozo)

防衛医科大学校・眼科学・助教

研究者番号：80626804

櫻井 裕 (SAKURAI, Yutaka)

防衛医科大学校・眼科学・教授

研究者番号：10338816

唐澤容子 (KARASAWA Yoko)

防衛医科大学校・眼科学・教授

研究者番号：60535540