

令和 3 年 6 月 13 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09415

研究課題名(和文) 糖尿病網膜症モデルラットの網膜微小血管内皮細胞におけるタイト結合蛋白の発現と機能

研究課題名(英文) Expression and function of tight junction proteins in retinal microvascular endothelial cells in the rat model of diabetic retinopathy

研究代表者

稲富 周一郎 (Inatomi, Shuichiro)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：10437999

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病モデルラットの脳から微小脳血管内皮細胞の分離培養に成功し、細胞間接着分子であるOccludinとタイト結合関連分子であるClaudin-5(Cld-5)がco-localizeしていることを確認した。また、脳血管内皮細胞にcAMPを作用させると、タイト結合バリア機能の指標である経上皮電気抵抗が3～4倍上昇することを確認した。また、グリア細胞から分泌される神経細胞に対し、グリア細胞株由来神経栄養因子(GDNF)が、脳血管内皮細胞のタイト結合のバリア機能を亢進することを見出した。また、GDNFが網膜血管のバリア機能を亢進させる作用があることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦における中途失明原因疾患の第二位である糖尿病性網膜症に関して、本研究では糖尿病モデルラットから網膜血管内皮細胞と同様に強固なタイト結合を有する初代微小脳血管内皮細胞を分離・培養し、その内皮細胞バリア機能を制御するタイト結合関連分子の発現と局在等の形態とバリア機能(透過性または抵抗)を胞間接着分子であるOccludinとタイト結合関連分子であるClaudin-5(Cld-5)を中心に検討した。本手技を用いることにより今後も各種モデル動物からの初代微小脳血管内皮細胞を利用して、さまざまな疾患における血管透過性及び抵抗のメカニズムを明らかにすることが可能と考えられた。

研究成果の概要(英文)：We completed the isolation and culture of cerebral microvascular endothelial cells from the brain of a diabetic model rat, and confirmed that the intercellular adhesion molecule, Occludin, and the tight junction-related molecule, Claudin-5 (Cld-5), are co-localized. It was also confirmed that when cAMP is allowed to act on cerebrovascular endothelial cells, transepithelial electrical resistance, which is an index of tight junction barrier function, increases 3 to 4 times. We also found that glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) enhances the tight junction barrier function of cerebrovascular endothelial cells for nerve cells secreted from glial cells. We also confirmed that GDNF has the effect of enhancing the barrier function of retinal blood vessels.

研究分野：Diabetic retinopathy

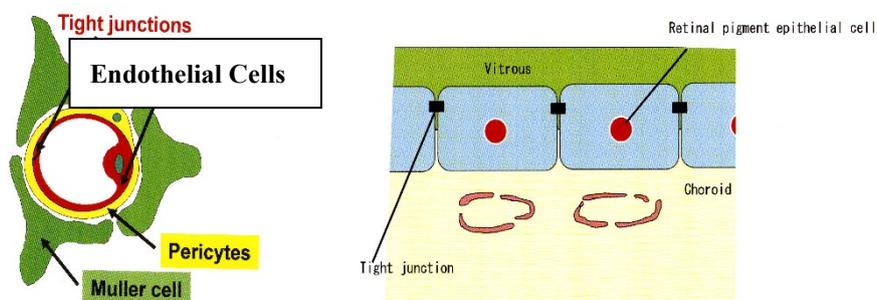
キーワード：Diabetic retinopathy tight junction

## 1. 研究開始当初の背景

網膜の血液循環には網膜循環と脈絡膜循環があり、それぞれがバリアを有している。その両者を併せて血液網膜関門 Blood Retinal Barrier (以下 BRB) を形成することで網膜のホメオスタシスを維持している。網膜循環では毛細血管内皮細胞が内側血液網膜関門 inner BRB (以下 i-BRB) を形成するが、脈絡膜系の血管は透過性が高いため網膜色素上皮細胞が外側血液網膜関門 outer BRB (以下 o-BRB) となって、血液が感覚網膜に侵入するのを防いでいる (Cunha-Vaz JG; The blood retinal barriers; Doc Ophthalmol. 1976 Oct; 41; 287-327)。特に i-BRB は、網膜内の恒常性維持に重要な役割を担っているため、糖尿病 (以下 DM) 等により破綻した場合、黄斑浮腫を引き起こし重大な視力低下や失明を招く。糖尿病性網膜症は、我が国における後天性失明の原因の第2位の疾患であり、毎年約4,000人がこの病気で失明しているといわれている。したがって BRB の形成と制御機構の解明が、BRB 破綻に伴う網膜障害に対する新たな予防・治療戦略と、ドラッグデリバリー法の鍵と考えられる。

この iBRB の本体が iBRB 構成血管内皮細胞間をシールするタイト結合 (以下 TJ) であり、網膜血管内皮細胞には TJ 膜貫通分子 occludin や claudin-5 などの TJ 関連分子が発現し、また網膜色素上皮細胞には claudin-1, claudin-2, claudin-8 が発現していることが分かっている (Erickson KK et al; Angiogenesis. 2007; 10(2): 103-17. Epub 2007 Mar 6. Review)。

これまで BRB を用いた in vivo の研究は動物網膜から実験・研究に十分な血管内皮細胞の分離培養が量的に困難であった。しかし一方、iBRB 同様に発達した TJ を有する脳の Blood Brain Barrier (以下 BBB) を構成する血管内皮細胞は量的に分離培養が可能で血液組織関門のモデルとして用いられることができる可能性が示唆されていた。申請者らのグループはこれまでに iBRB 同様に発達した TJ を有するブタ脳血管内皮細胞を分離培養する方法を確立し (Ishizaki T, Chiba H, Kojima T, Fujibe M, et al; Cyclic AMP induces phosphorylation of claudin-5 immunoprecipitates and expression of claudin-5 gene in blood-brain-barrier endothelial cells via protein kinase A-dependent and -independent pathways. Exp Cell Res. 2003 Nov 1; 290(2): 275-288)、また、同様の手技を用いて正常ラット及び糖尿病モデルラットより脳微小血管内皮細胞を分離・培養することに成功した (Primary Cell Culture of Neural Microvessel Endothelial Cell from Diabetic Retinopathy Model Rat.; Biennial Meeting of the International Society for Eye research in Canada; paper submitting for publication)。



また近年、糖尿病性網膜症の進行に関わる因子として血管内皮細胞増殖因子 Vascular Endothelial Growth Factor (以下 VEGF)、TNF- $\alpha$ 、Glial cell line-derived neurotrophic factor (以下 GDNF)、IL-1 $\beta$ 、IL-6、Retinoic Acid (以下 RA) の関与が報告されている (Inatomi S, Ohguro H, Nishikiori N, Sawada N; Glial Cell-Derived Cytokines and Vascular Integrity in Diabetic Retinopathy. Visual Dysfunction in Diabetes Ophthalmology Research 2012; 325-338)。この中で VEGF は糖尿病性網膜症において血管新生に関与すると共に血管内皮細胞のバリア機能を低下させ、その透過性を亢進することで病状を悪化させる。これに対し申請者らのグループは GDNF が VEGF 血管内皮細胞バリアを強化させて透過性を抑制し、病状を安定させることが可能であるという研究を報告した (Nishikiori N et al. Glial cell-Derived Cytokines Attenuate the Breakdown of Vascular Integrity in Diabetic Retinopathy Diabetes. 2007 May; 56(5): 1333-40.)。そこで、今回我々は、糖尿病性網膜症モデルラットの初代脳微小血管内皮細胞を用いてタイト結合関連蛋白の発現とその局在を調査し、さらに VEGF 及び GDNF がそのタイト結合関連タンパクの発現とバリア機能にどう影響するか検討する。

## 2. 研究の目的

本邦における中途失明原因疾患の第二位である糖尿病性網膜症に関して、糖尿病モデルラットから網膜血管内皮細胞と同様に強固なタイト結合を有する初代微小血管内皮細胞を分離・培

養し、その内皮細胞バリア機能を制御するタイト結合関連分子の発現と局在等の形態とバリア機能(透過性または抵抗)を検討することにより微小血管内皮細胞の機能異常を分子レベルで解明することを目的とする。今回は国内外に先駆けて糖尿病性網膜症モデルラットの脳微小血管内皮細胞を初代培養し、その培養細胞を血管組織閉鎖のモデルとして糖尿病性網膜症初期における血管透過性及び抵抗のメカニズムを明らかにし、それに対する治療をデザインすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

正常ラットとSDTラットから分離培養した脳微小血管内皮細胞を用いてRT-PCR法、Western Blot法、蛍光免疫染色によってそれぞれの血管内皮細胞間をシールするタイト結合分子の発現と局在を調べる。また、培養細胞の経上皮細胞電気抵抗TER値とラジオアイソトープを用いてそのバリア機能を検討する。また、VEGF及びGDNFによる糖尿病性網膜症の進行に伴うタイト結合関連分子の発現と局在変化とバリア機能の変化をしらべ、糖尿病性網膜症(以下DMR)における血管内皮細胞の透過性の異常亢進の本態について以下の方法を用いて分子レベルで検討する。

具体的には、正常ラットおよびSDTラットから脳血管内皮細胞を分離培養し、培養したラットの脳血管内皮細胞におけるTJ関連分子の発現と局在をRT-PCR法、ウエスタンブロット法、蛍光免疫染色法を用いて検討する。及びそれぞれのラットの血管内皮細胞間をシールするタイト結合のバリア機能を比較検討する。正常ラットとSDTラットの脳血管内皮細胞のバリア機能を経上皮電気抵抗値TERとラジオアイソトープにて標識された分子量の異なる<sup>14</sup>C-Mannitolと<sup>14</sup>C-Inulinの透過の変化を調べることによって検討する。次にVEGFがそれぞれの細胞のタイト結合関連タンパクの発現と局在を変化させるかをRT-PCR法、ウエスタンブロット法、蛍光免疫染色法を用いて検討する。また、同時にVEGFがそれぞれの細胞のタイト結合におけるバリア機能をどのように変化させるかをTER法及びラジオアイソトープを用いて検討する。

### 4. 研究成果

糖尿病モデルラットから初代微小脳血管内皮細胞を分離・培養しその内皮細胞のバリア機能を制御するタイト結合関連分子の発現と局在などの形態とそのバリア機能(透過性または抵抗)を検討し、糖尿病網膜症における微小血管内皮細胞の機能異常を分子レベルで解明することが本研究の目的である。これまでの研究で糖尿病モデルラットであるSDTラットの脳から微小脳血管内皮細胞の分離培養に成功し、細胞間接着分子であるOccludinとタイト結合関連分子であるClaudin-5(Cld-5)発現と局在をウエスタンブロット法及び免疫染色にて確認し、OccludinとCld-5がco-localizeしていることを確認した。また、過去に示された脳血管内皮のタイト結合機能がcAMPによって制御されていることより脳血管内皮細胞にcAMPを作用させると、タイト結合バリア機能の指標である経上皮電気抵抗(transepithelial electrical resistance (TER))が3~4倍上昇することを確認した。また、グリア細胞から分泌される神経細胞に対し、生存維持作用を持つグリア細胞株由来神経栄養因子(glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF))が、脳血管内皮細胞のタイト結合のバリア機能を亢進することを見出した。また、GDNFが網膜血管のバリア機能を亢進させる作用があること確認した。GDNFがVEGFを介してタイト結合関連蛋白の発現に与える影響を検討してきたが、正常ラットの微小脳血管内皮細胞でのGDNF投与によるVEGF発現の変化は認めず、GDNFとVEGF同時投与による網膜血管のバリア機能を検討したが、GDNF・VEGFの共役した効果を認めなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大黒 浩  (OHGURO Hiroshi)  (30203748)	札幌医科大学・医学部・教授   (20101)	
研究分担者	日景 史人  (HIKAGE Fumihito)  (30837547)	札幌医科大学・医学部・講師   (20101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関