

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19791303
 研究課題名（和文）色素上皮由来因子（PEDF）の初期糖尿病性網膜症における血管透過性の抑制
 研究課題名（英文）Depressor effect of pigment epithelium-derived factor（PEDF）on vascular permeability.
 研究代表者
 松井 孝憲（MATSUI TAKANORI）
 久留米大学・医学部・研究員
 研究者番号：10425233

研究成果の概要：

糖尿病腎症の進展阻止が期待される蛋白質として色素上皮由来因子（Pigment epithelium-derived factor:以下 PEDF）に着目した。PEDF の抗酸化ストレス活性が腎症の初期病変を改善するのか検討するために、テトラサイクリン投与によりヒト PEDF の発現が誘導されるマウスを作製して、ストレプトゾトシン投与による糖尿病モデルを用いて糖尿病網膜症の抑制効果を確認することが可能になった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：血管細胞生物学

科研費の分科・細目：外科系臨床学・眼科学

キーワード：糖尿病性網膜症

1. 研究開始当初の背景

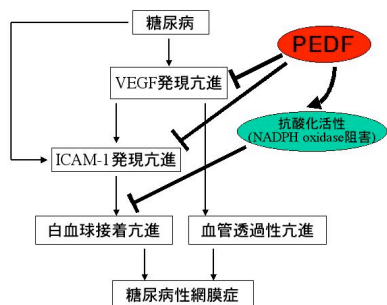
糖尿病網膜症は中途失明の原因疾患第一位であり、毎年 3000 人もの糖尿病患者が失明しており、発症数は年々増加している。外科的療法が標準的治療法として用いられているが、その奏成功率は必ずしも満足のいくものではなく、効果的な治療法が求められている。初期糖尿病網膜症において、酸化ストレスや血管透過性の亢進が増悪、進展因子といわれており、それらを抑制することで網膜症の進行を止めることができると予想される。我々は以下の理由により、網膜症の進展阻止が期待される蛋白質として色素上皮由来因子（Pigment epithelium-derived factor:以下 PEDF）に着目した。

PEDF は 1989 年にヒト網膜色素上皮細胞

から単離、精製された分子量約 50kDa の分泌蛋白質で、中枢神経細胞の発生や分化を促す作用があることが知られている（Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 30, 1700-1707, 1989; Exp. Eye Res. 53, 411-414, 1991）。その後 PEDF は、酸化ストレスによる神経細胞傷害を抑制する働きをもつことが明らかにされ（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 1526-1530, 1993）、各種臓器をはじめとして血中等様々な組織に存在することが報告された（Mol. Vis. 2(11), 1996）。

初期糖尿病網膜症において酸化ストレスは血管内皮への白血球接着の亢進させる（Diabetes 52, 829-37, 2003）。白血球接着により網膜の微小血管がつまり、虚血障害を引き起こし糖尿病性網膜症が増悪する。我々

は、糖尿病状態で促進的に形成される終末糖化産物 (Advanced glycation end-products: 以下 AGE) やサイトカインによる血管細胞の傷害に対して、PEDF が抗酸化活性を介して保護的に働くことを培養細胞系において明らかにしてきた (Diabetologia 46, 284-287, 2003; Biochem. Biophys. Res. Comm. 296, 877-882, 2002)。以上より、PEDF は抗酸化活性により白血球接着を抑制しようと考えられる。一方、血管透過性を亢進させる代表的な因子としては、血管内皮増殖因子 (Vascular endothelial growth factor: 以下 VEGF) が知られている。我々は以前に、NADPH oxidase による活性酸素種産生の阻害を介して、VEGF のもうひとつの生理作用である血管新生亢進を、PEDF が抑制することを明らかにしている (J. Mol. Cell. Cardiol. 37, 497-506, 2004)。VEGF のの主要な機能である血管透過性と血管新生の亢進は密接に関連しており、PEDF は血管新生のみならず血管透過性の亢進を抑制する可能性が高いと考えられる。



2. 研究の目的

PEDF が生体内で酸化ストレス・血管透過性の亢進を抑制し、網膜症の進展を阻止しようと期待するものである。初期糖尿病網膜症で PEDF 遺伝子の影響を検討するために、まずヒト PEDF 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (PEDF-Tg マウス) を作成する。PEDF-Tg マウスにストレプトゾトシンで糖尿病を発症させ以下の条件で検討する。初期糖尿病網膜症に認められる白血球接着の鍵の一つは酸化ストレスであり、上で述べたように我々は PEDF が酸化ストレスに対して抑制的にはたらくことを明らかにしてきた。一方、白血球接着のもうひとつの鍵は接着因子 (Intercellular adhesion molecule-1: 以下 ICAM-1) であるが、酸化ストレスと ICAM-1 の関連はよく分かっていない。そこで PEDF の抗酸化活性が ICAM-1 を介して白血球接着を阻害するのか検討する。(1) PEDF-Tg マウスで ICAM-1 による白血球接着の亢進が抑制されるか、糖尿病発症マウス網膜の微小血管に接着した白血球数を評価する。(2) PEDF は

ICAM-1 発現を低下させるのか、PEDF-Tg マウスで ICAM-1 の mRNA を定量する。(3) PEDF による ICAM-1 を介した白血球接着の抑制が NADPH oxidase 活性の阻害によるものなのか、分子機構を明らかにする。

初期糖尿病性網膜症における血管透過性亢進を PEDF が抑制するかを、我々は検討していきたい。その際に、(1) PEDF-Tg マウスで VEGF による血管透過性の亢進が抑制されるか、糖尿病発症マウス網膜に取り込まれた蛍光トレーサーの定量により評価する。(2) PEDF は ICAM-1 発現を低下させるのか、PEDF-Tg マウスで VEGF の mRNA を定量する。(3) PEDF による VEGF を介した血管透過性亢進の抑制は NADPH oxidase 活性の阻害によるものなのか、分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

I. 1型糖尿病モデルの作製

クエン酸緩衝液で調整したストレプトゾトシン (Streptozotocin: 以下 STZ) 溶液を、マウス腹腔内に $100 \mu\text{g-STZ/体重 (g)}$ で注射する。STZ により膵臓の β 細胞が破壊され、インスリンが分泌されなくなり、1 型糖尿病初期にみられる高血糖状態になる。48 時間後の血中グルコース濃度を測定し、血中グルコース濃度が 300mg/dl 以上を糖尿病発症とみなす。尚、対照実験としてクエン酸緩衝液を腹腔内注射した群を設ける。

II. 血管透過性亢進の検討

網膜における血管透過性亢進の観察を次のようにおこなう。STZ 介入後 8 週目にマウスを開腹し、下大静脈より蛍光トレーサーである FITC-dextran (PBS 液) を 500mg 注入し、5 分間循環する。その後、麻酔死させ眼球摘出し、4% パラホルムアルデヒドにて固定する。固定後の眼球から実体顕微鏡下にて網膜を摘出し、数カ所切れ目を入れスライド上にマウントする。

蛍光顕微鏡にて検鏡する際は、励起 485nm 、検出 538nm の FITC 用フィルターを用いる。透過性亢進の定量的検討を次のようにおこなう。STZ 介入後 8 週目にマウスを開腹し、下大静脈より蛍光トレーサーである FITC-dextran (PBS 液) を 250mg 注入し、15 分間循環させる。下大静脈より採血。左心室から PBS にて還流し、血管中の蛍光トレーサーを洗い流す。その後、網膜を摘出し、重量測定後、ホモジナイズする。限外ろ過カラム用いて FITC-dextran を抽出精製し、蛍光プレートリーダーにて蛍光強度を測定する。また下大静脈より採血した血液は、血漿分離し、蛍光強度を測定しておく。以下の計算式にて血液中から網膜に取り込まれた FITC-dextran の定量をおこない、野生型マウスと比較して PEDF-Tg マウスで透過性が抑制されていることを確認する。

透過性=(網膜の蛍光強度/網膜重量(g))/(血漿の蛍光強度×循環時間(分))

III. 血管透過性について PEDF と血管内皮増殖因子 (VEGF) 関与の検討

まず、VEGF の血管透過性亢進作用については、マウス血液中への抗 VEGF 抗体の投与により VEGF の作用を中和し、血管透過性の亢進が抑制されるかを確認する。野生型マウスと PEDF-Tg マウスの摘出眼球をホモジナイズして mRNA を抽出し、real-time PCR 法にて VEGF の発現を定量する。PEDF-Tg マウスで VEGF の発現が抑制されているならば、PEDF が VEGF の発現を抑制した可能性が考えられる。

IV. 白血球接着検討

マウスを麻酔後、開腹し下大静脈より採血し、血清を得る。左心室より PBS を 500 μ L/体重(g) で還流し血球成分を除去した後、FITC-ConA(0.04 μ g/ μ l) を 125 μ L/体重(g) で還流し、微小血管の内皮細胞および接着した白血球を標識する。その後 500 μ L/体重(g) の PBS にて還流し遊離の FITC-ConA を洗浄後、眼球を摘出し 1% PFA にて固定する。実体顕微鏡下にて網膜を摘出し、スライドガラス上にマウント後、蛍光顕微鏡にて検鏡 (FITC 用フィルター: 励起 485nm、検出 538nm) し、接着した白血球を計数し野生型マウスと PEDF-Tg マウスで比較する。それぞれの眼球を摘出し、すぐにドライアイスで凍結させた後、mRNA を抽出し real-time PCR にて ICAM-1 の発現をみる。

野生型マウスのみで ICAM-1 の発現が亢進し、ICAM-1 の中和抗体で白血球接着が抑えられているならば、PEDF が ICAM-1 の発現を抑制した可能性が考えられ、白血球接着に ICAM-1 の関与が考えられる。

4. 研究成果

テトラサイクリン依存的に PEDF の発現が誘導されるプラスミドベクターを構築した。Clontech 社の pTetOnAdvance (図 1) と pTRE-Tight システムを用いた。pTRE-Tight の multi cloning site にヒト PEDF 遺伝子を挿入した pTRE-Tight-PEDF を作製した(図 2)。テトラサイクリンにより PEDF 発現が誘導されるか、HEK293 細胞を用いて確認した。HEK293 細胞に pTRE-Tight-PEDF と pTetOnAdvance の両方を導入した細胞、pTRE-Tight-PEDF のみを導入した細胞、pTetOnAdvance のみを導入した細胞を準備し、培地にテトラサイクリンを加えた。24 時間後に培地を回収し、電気泳動に続いてウェスタンブロット法により、PEDF 蛋白の発現誘導を確認した。pTRE-Tight-PEDF と pTetOnAdvance の両方を導入した細胞のみ

で、テトラサイクリン依存的な PEDF 蛋白質の発現誘導が確認できた。そこで、pTRE-Tight-PEDF と pTetOnAdvance マウス胚に注入した。注入の際に pTRE-Tight-PEDF は ApaLI を用いて制限酵素処理し、pTetOnAdvance は XhoI と HindIII を用いて制限酵素処理をおこなった。得られた DNA 鎖をマウス胚に注入したところヒト PEDF 遺伝子を有するマウスを作製する事が出来た。テトラサイクリン投与により PEDF の発現が誘導されるマウスを用いて、ストレプトゾトシン投与による糖尿病モデルを用いて糖尿病網膜症の抑制効果を確認することが可能になった。

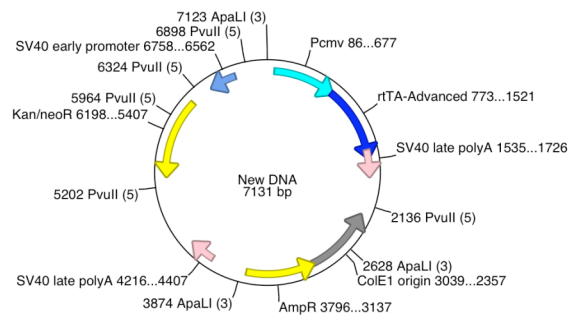


図 1 pTetOnAdvance プラスミドの構造模式

図

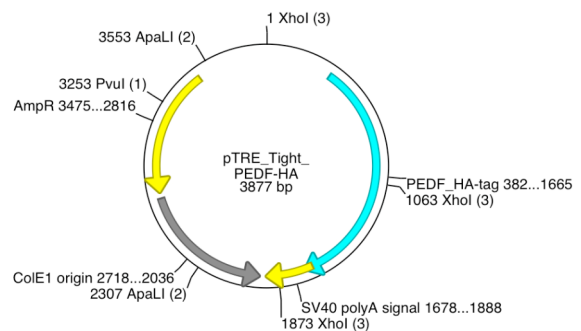


図 2 pTre-Tight-PEDF プラスミドの構造模式

図

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 0 件)

〔学会発表〕（計 0 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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 孝憲 (MATSUI TAKANORI)

久留米大学・医学部・研究員

研究者番号：10425233

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者