

平成 22 年 5 月 11 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791277
 研究課題名 (和文) 糖尿病網膜症モデルにおける白血球接着分子 LFA-1, Mac-1 の機能解析
 研究課題名 (英文) Functional analysis for LFA-1 and Mac-1 in STZ-induced diabetic animal model

研究代表者
 野田 航介 (NODA KOUSUKE)
 北海道大学・大学院医学研究科・講師
 研究者番号：90296666

研究成果の概要 (和文) :本研究の目的は、糖尿病網膜症モデルであるストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病マウスにおいて接着分子 ICAM-1 の counter-receptor LFA-1、Mac-1 の接着機能が亢進するか否かを検討することである。結果として、LFA-1、Mac-1 の機能亢進と考えられる現象は認められなかった。一方、P-selectin の counter-receptor である PSGL-1 の機能亢進と考えられる現象が認められた。本検討結果は、糖尿病のような慢性炎症によっても白血球接着分子 PSGL-1 の機能亢進が生じる可能性を示唆していた。

研究成果の概要 (英文) : The purpose of this study is to determine whether the function of LFA-1 and Mac-1, both of which are the counter-receptors for ICAM-1, is upregulated in an animal model of early phase of diabetic retinopathy induced by streptozotocin (STZ). The data provided no evidence showing functional upregulation of LFA-1 and Mac-1. However, PSGL-1, counter-receptor for P-selectin, seemed to be upregulated in STZ-induced diabetic animal model. The current data indicates the functional change of PSGL-1 in chronic inflammation such as diabetes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：眼科学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：白血球接着分子、白血球ローリング、白血球接着、糖尿病網膜症

1. 研究開始当初の背景

医療の進歩や生活環境の変化にともなう我が国における平均寿命がますます伸びる傾向にあることを考えると、近い将来に罹病期間の長い糖尿病患者数が著しく増加していくことは自明であり、その長期にわたる

罹病期間 (10 年以上) は三大合併症の一つである網膜症のリスクファクターであることから、糖尿病網膜症も増加の一途をたどるといふ結論に帰着する。そのため、今後は光凝固療法や手術療法といった従来の治療に加えて、予防医学的なアプローチや新たな分子

標的治療の探索が、糖尿病網膜症の治療にあたる眼科の課題となっていくと考えられた。

その糖尿病網膜症の発症を予防するという治療戦略を構築していく上で、同症の病初期における病態生理の理解は不可欠であるが、依然として糖尿病網膜症の発症メカニズムには不明な点が多いのが実情である。しかしながら、病的に活性化された白血球が毛細血管を閉塞する、あるいは血管内皮細胞を障害することが糖尿病網膜症初期の病態に深く関わっている可能性は以前より報告されていた。特に、糖尿病モデル動物を用いた検討では、白血球接着に関わる分子 **InterCellular Adhesion Molecule(ICAM)-1** が糖尿病性変化によって網膜血管に誘導されて白血球接着を増加させること [Proc Natl Acad Sci U S A 96:10836,1999]、そして活性化された単球そして顆粒球が毛細血管閉塞・血管内皮障害を引き起こすこと [American Journal of Pathology 139:81,1991] が報告されていた。また、ICAM-1 あるいはその counter-receptor である lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1 (CD11a /CD18) や macrophage adhesion molecule(Mac)-1(CD11b/CD18) の subcomponent,CD18 に対する阻害は、糖尿病網膜症モデル動物における白血球接着 [Investigative Ophthalmology and Visual Science 41:1153,2000] と血管内皮細胞障害 [American Journal of Pathology 158:147,2001] を抑制することが知られ、CD18 がヒト糖尿病網膜症患者の好中球において増加してその発現量は網膜症の重症度と相関していることも報告されていた [Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 245:24,2007]。

これらのことは、LFA-1 や Mac-1 といった白血球上に発現する接着分子の増加が糖尿病網膜症発症に関与していること、そしてその機能抑制が網膜症に対する予防医学的治療となりうることを強く示唆している。しかし、糖尿病網膜症において LFA-1 や Mac-1 の機能 (接着能) が亢進しているかどうかは現在まで明らかにされておらず、糖尿病網膜症モデル動物における上記二つの接着分子の機能についての知見は、本疾患の発症メカニズムに対する理解を深めるため、そして新しい治療概念を構築するために重要であると考えられた。

2. 研究の目的

上記背景に基づいて、本研究においては、ヒト糖尿病網膜症の重症度と相関するとされる CD18 の発現増加によって関連する白血球接着分子 LFA-1、Mac-1 の機能が糖尿病網膜症モデルにおいて実際に亢進しているのか否かを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

前述のごとく過去の研究において、糖尿病網膜症モデル動物では白血球の血管内皮細胞への接着が亢進することが知られ、そのメカニズムとして血管内皮細胞上の接着分子 ICAM-1 が関与していることが明らかとされていた。しかしながら、ICAM-1 の counter-receptor である LFA-1、Mac-1 の機能亢進が生じるか否かについては、既存の実験方法では検討が困難であり不明のままであった。

そこで今回我々は、その検討方法として **Ex-vivo Micro Flow Chamber System** (方法 (2) の図、申請書内容を参照のこと) を用いることによって血管側接着分子の条件を一定化し、ICAM-1 の counter-receptor である LFA-1、Mac-1 の機能評価を試みた。

(1) STZ 誘発糖尿病網膜症マウスの作成

本検討においては、低容量 STZ 投与によって作成した糖尿病網膜症マウスを使用した。すなわち、生後8週のマウスに対して40mg/kgのSTZを5日間投与して、さらにその7週後(生後15週)に同容量のSTZを5日間投与して糖尿病網膜症モデルを作製した。その利点は、血糖値上昇が急峻ではないため、インスリン導入を行うことなく動物モデルの維持が可能な点である。随時血糖値が250mg/dl以上の場合を糖尿病発症と定義した。糖尿病網膜症群と対照群を作成し、以下の実験をおこなった。

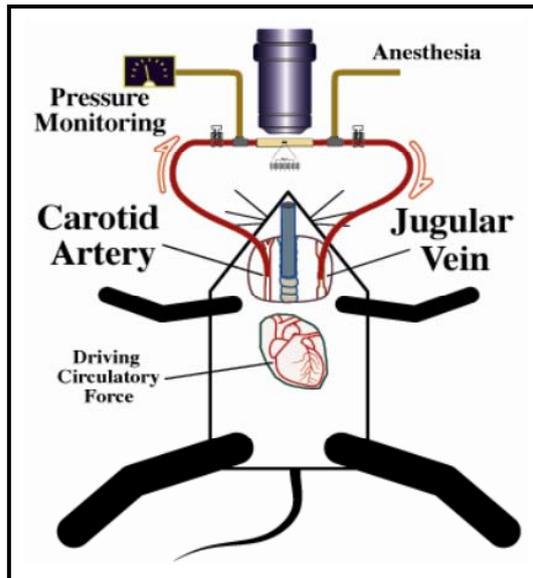
(2) Ex-vivo Micro Flow Chamber System を用いた白血球動態の観察

上記の糖尿病網膜症モデルマウスを発症2週の時点で実験に使用した。糖尿病網膜症群と対照群を用いて Ex-vivo Micro Flow Chamber System (下図) を作成し、micro flow chamber に各種接着分子タンパクをコーティングした状態で、顕微鏡下に白血球ローリング速度を計測する実験をおこなった。計測は、micro flow chamber に血流が達してから5分間に顕微鏡視野に認められた全ての白血球に対しておこなった。管内圧測定モニターを使用して、流速一定の状態での測定をおこなった。

<Ex-vivo Micro Flow Chamber System>

① ICAM-1 coating micro flow chamber を用いた実験

LFA-1、Mac-1 の接着機能を評価するために mouse recombinant ICAM-1 (5µg/ml, R&D 社) を micro flow chamber にコーティングして、対照群と糖尿病群における白血球ローリングおよび接着の評価を試みた(対照群、糖尿病群ともに n=3)。



②P-selectin coating micro flow chamber を用いた実験

白血球が micro flow chamber 上の接着分子蛋白と反応することを確認するために mouse recombinant P-selectin (5 μ g/ml, R&D 社) を micro flow chamber にコーティングして、対照群と糖尿病群における白血球ローリングの評価を試みた(対照群 n=4、糖尿病群 n=5)。

③P-selectin+ICAM-1 coating micro flow chamber を用いた実験

上記実験によって P-selectin の存在下では白血球と micro flow chamber との反応(ローリング)を生じることが判明したため、P-selectin (5 μ g/ml) と ICAM-1 (5 μ g/ml) の2重コーティングをおこない、対照群と糖尿病群における白血球ローリング速度の評価を試みた(対照群、糖尿病群ともに n=5)

4. 研究成果

(1) STZ 誘発糖尿病網膜症マウス

STZ 投与によって糖尿病は順調に誘発されることがわかった。また、対照群と糖尿病群における血中白血球数と白血球分画を測定したが、両群間で有意差は認められなかった。

(2) Ex-vivo Micro Flow Chamber System

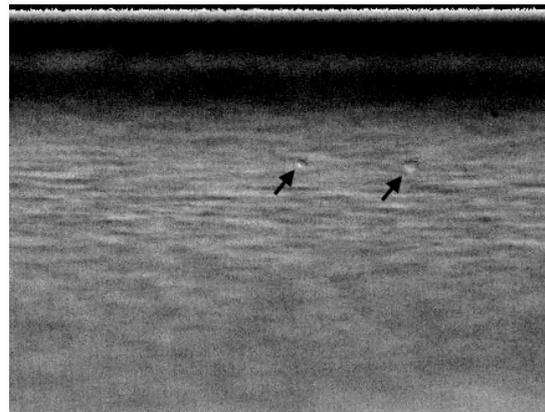
① ICAM-1 coating micro flow chamber を用いた実験

ICAM-1 coating をおこなった micro flow chamber 上では白血球と micro flow chamber との反応(ローリング、接着)は認められなかった。このことは、ICAM-1 の存在のみでは同システムにおいて白血球ローリングや接着は開始されないことを示唆していた。すなわち、他の接着分子との同時コーティングが

必要であることを示していると考えられた。

② P-selectin coating micro flow chamber を用いた実験

本実験では、白血球ローリングが観察され(下図)、ローリング速度の測定が可能であった。対照群における白血球ローリング速度は $4.3 \pm 2.7 \mu\text{m}/\text{sec}$ (観察白血球数は 74 cells) であるのに対して、糖尿病群における白血球ローリング速度は $2.7 \pm 1.6 \mu\text{m}/\text{sec}$ (観察白血球数は 122 cells) と低下しており、P-selectin に対する counter-receptor PSGL-1 の機能亢進が示唆された。



〈観察された白血球ローリング〉

③ P-selectin+ICAM-1 coating micro flow chamber を用いた実験

結果として、対照群 ($2.1 \pm 1.1 \mu\text{m}/\text{sec}$ 、観察白血球数は 94 cells) および糖尿病群 ($2.3 \pm 1.4 \mu\text{m}/\text{sec}$ 、観察白血球数は 183 cells) における白血球ローリング速度は同様であり、統計学的有意差は認められなかった。

本結果に対する考察としては、1) coating した ICAM-1 の濃度が過剰量であったため、P-selectin coating micro flow chamber の実験で認められた PSGL-1 の機能亢進と考えられる変化が検出できなかった、2) LFA-1、Mac-1 は通常状態でも発現しており、PSGL-1 の機能亢進と考えられる変化がマスクされた、などの可能性が考えられた。今後はさらに flow cytometry 法などをおこない、上記仮説について検討を継続する予定である。

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)

[学会発表] (計1件)

発表表題: 眼科血管・リンパ管研究の最前線

発表者名: 野田航介

学会名: 第113回日本眼科学会

発表年月日: 2009/4/18

発表場所: 東京国際フォーラム (東京都)

6. 研究組織

(1)研究代表者

野田 航介 (NODA KOUSUKE)

北海道大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：90296666

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：