

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462720

研究課題名(和文) 糖尿病眼合併症におけるANGPTL2の機能に関する研究

研究課題名(英文) The functional analyses of Angptl2 in diabetic eye complication

研究代表者

伊藤 康裕 (Ito, Yasuhiro)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70380996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの糖尿病黄斑浮腫のサンプルの検討からAngptl2が増殖糖尿病網膜症だけではなく、糖尿病黄斑浮腫の病態形成にも関与している事が示唆された。またマウスを用いた実験結果よりAngptl2が網膜において血管内皮細胞やマクロファージなどに発現しており、Angptl2ノックアウトマウスを用いた糖尿病モデルマウスの検討によりAngptl2が炎症性サイトカインや接着因子などの発現を介して糖尿病網膜症の病態形成に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Concentration of Angptl2 in vitreous of patients with diabetic macular edema was increased compared to the control, and Angptl2 expression was found in inner limiting membrane of those patients. Moreover, IL-6, MCP-1 and ICAM-1 expression was decreased in streptozotocin-induced diabetic Angptl2 knockout mice compared to the control, and leukocyte adhesion to endothelial cells was suppressed in diabetic Angptl2 knockout mice. Those findings suggest that Angptl2 may play a role in pathological condition of diabetic retinopathy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：糖尿病網膜症

### 1. 研究開始当初の背景

私は大学院以来これまでに Angptl ファミリーのクローニングを行い、その機能解析を行ってきた。そのなかで、Angptl ファミリーがアンジオポエチンファミリーに構造的に類似しており、血管内皮細胞に作用が確認されたため、これまでに血管に対する機能を解析し報告してきた(Am J Pathol. 2010, Cell Metab. 2009, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008, Nat Med. 2005, Proc Natl Acad Sci U S A. 2005, Blood, 2004, Cancer Res., 2003)。Angptl2 は、これまでの我々の研究で糖尿病や関節リウマチなどの病態に深く関わっていることが明らかにされている(Cell Metab., 2009, Am J Pathol., 2010)。そのなかで、アンジオポエチン様蛋白 2(Angiopoietin-like protein 2:Angptl2)が血管内皮細胞から低酸素によって誘導されたり炎症を惹起したり、さらにそれが血管新生や血管透過性亢進といった病態に関与していることを報告してきた。我々のこれまでの研究では、糖尿病の患者から採取した血清中における Angptl2 の濃度は健常人と比較して上昇していることを報告している(Cell Metab., 2009)。また糖尿病網膜症の患者の手術中に得られた硝子体サンプル中の Angptl2 の濃度がコントロール(黄斑状膜や黄斑円孔などの黄斑疾患)の患者より上昇していることや、手術中に得られた増殖糖尿病網膜症の増殖膜において血管内皮細胞や浸潤してきているマクロファージなどにおいて Angptl2 が強く発現していることを認めている。また我々のグループでは MCP-1 や炎症性サイトカインが内眼手術既往眼の緑内障術後濾過胞維持にネガティブに作用していることも報告している(IOVS. 2012)。これらの知見をもとに、本研究ではこれまでの成果をさらに発展させ血管新生、血管透過性亢進や炎症がその病態に関与している糖尿病黄斑浮腫など糖尿病眼合併症における Angptl2 の役割について、患者サンプルを採取、解析し、また動物モデルを作成し解析を行うことにより、病態の新たなメカニズム、またその病態に基づいた新たな治療法につながる可能性があるか検討を行う。

### 2. 研究の目的

糖尿病により引き起こされる糖尿病網膜症(増殖性および糖尿病黄斑症)や血管新生緑内障は我が国における中途失明原因の上位を占めている。これまでの研究結果より Angptl2 が糖尿病や関節リウマチなど慢性炎症が関与する病態において重要な働きをしていることが明らかにされている。本研究では手術中に得られる硝子体や内境界膜サンプルなどをもとに Angptl2 の発現解析を行い、また Angptl2 のノックアウトマウスを用いてストレプトゾトシンによる糖尿病モデルを作成しワイルドタイプのマウスと比較検討を行う。さらに、血管内皮細胞株を用

いて Angptl2 のシグナル解析を行い Angptl2 の糖尿病合併症における機能解析を網羅的にやりたい。

### 3. 研究の方法

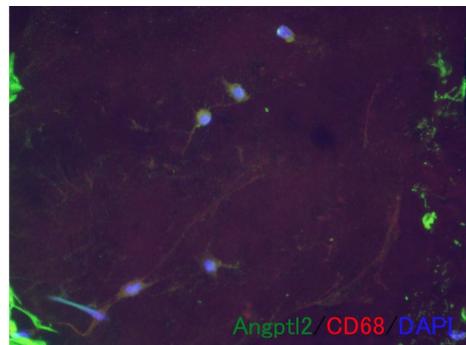
(1) 増殖糖尿病網膜症患者の硝子体中の Angptl2 の濃度が高く、増殖膜中にも Angptl2 の発現が認められたため、今度は糖尿病黄斑浮腫の患者の硝子体中の Angptl2 の濃度測定を行うために、硝子体手術施行時に硝子体サンプルを採取し enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)を行った。また、手術時に採取した網膜前膜や網膜内境界膜サンプルを用いて Angptl2、マクロファージのマーカーである CD68 などの発現を検討するため免疫染色を行った。

(2) Angptl2 ノックアウトマウスと野生型マウスを用いてストレプトゾトシンの腹腔内注射にて誘発した糖尿病モデルマウスを作成し、網膜における MCP-1、IL-6 などの炎症性サイトカインや intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1)などの接着因子の発現を検討した。また、コンカナバリン A を用いた白血球と血管内皮細胞の接着を検討を行った。

(3) ヒト網膜血管内皮細胞株である Human retinal endothelial cell (HREC)を用いて腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor ; TNF-) 刺激により Angptl2 の発現が誘導されるか検討を行った。

### 4. 研究成果

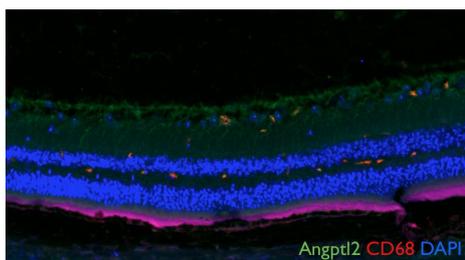
(1) 手術中に採取した硝子体における Angptl2 の濃度は糖尿病黄斑浮腫の患者において、対照群と比較して有意に高かった。また、手術時に採取した網膜前膜や網膜内境界膜の免疫染色において、膜に接着しているマクロファージなどの細胞に Angptl2 の発現が認められた。



手術中に採取した内境界膜上に Angptl2(緑)とマクロファージ(CD68;赤)の共発現が認められた(DAPI;青)。

(2) まず野生型マウスにおける Angptl2 の網膜における発現を検討した。下図に示すよ

うに、Angpt12(緑)とマクロファージ(CD68;赤)の共発現が認められ(DAPI;青)またAngpt12は血管内皮のマーカーであるCD31とも共発現を認め、以上の結果よりAngpt12は網膜において血管内皮細胞やマクロファージ、網膜色素上皮などに発現している事が示唆された。



ストレプトゾトシンを腹腔内投与し2ヶ月間高血糖状態を維持した野生型マウス(糖尿病モデルマウス)における血清中のAngpt12濃度をwestern blottingにより検討したところ、野生型マウスに比べ糖尿病モデルマウスにおける血清中のAngpt12濃度は上昇していた。

Angpt12ノックアウトマウスと野生型マウスを用いてストレプトゾトシンを投与し糖尿病モデルマウスを作成し、2ヶ月後に網膜におけるIL-6、MCP-1などの炎症性サイトカインやICAM-1などの接着因子の発現をELISAにて検討したところ、Angpt12ノックアウトマウスにおいてそれらの炎症性サイトカインや接着因子などの発現がコントロールの野生型マウスと比較して抑制されていることが明らかとなった。

コンカナバリンAレクチンを用いて白血球の血管内皮細胞への接着を検討したところ、Angpt12ノックアウトマウスにおいてコントロールの野生型マウスと比較して白血球の血管内皮細胞への接着が抑制されることが明らかとなった。

(3) HRECを用いてTNF-刺激にて、Angpt12の発現が誘導されるかwestern blottingにて検討したところ、HRECにおいてはTNF-刺激にてAngpt12の発現が誘導されることを認めた。

(4)以上の結果より、ヒトの糖尿病黄斑浮腫のサンプルの検討からAngpt12が増殖糖尿病網膜症だけではなく、糖尿病黄斑浮腫の病態形成にも関与している事が、またマウスを用いた実験結果よりAngpt12が網膜において血管内皮細胞やマクロファージなどに発現しており、Angpt12ノックアウトマウスを用いた糖尿病モデルマウスの検討によりAngpt12

が炎症性サイトカインや接着因子などの発現を介して糖尿病網膜症の病態形成に関与している可能性が示唆された。

#### 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 2件)

Frequency and risk factors for neovascular glaucoma after vitrectomy in eyes with proliferative diabetic retinopathy. Goto A, Inatani M, Inoue T, Awai-Kasaoka N, Takihara Y, Ito Y, Fukushima M, Tanihara H. J Glaucoma. 22:572-6, 2013.

Effects of mechanical stress and vitreous samples in retinal pigment epithelial cells. Takahashi E, Fukushima A, Haga A, Inomata Y, Ito Y, Fukushima M, Tanihara H. Biochem Biophys Res Commun. 12:470:569-74, 2016

〔学会発表〕(計 2件)

Angiopoietin-like 2 contributes to pathogenesis of diabetic retinopathy. Yasuhiro Ito, Mikiko Fukushima, Hidenobu Tanihara. European Association for Vision and Eye Research(EVER), 2013.9.18~9.21 Nice, France

Microglial cells are associated with pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy. Yasuhiro Ito, Mikiko Fukushima, Hidenobu Tanihara. 15th EURETINA Congress, 2015.9.17~9.20, Nice, France

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

伊藤 康裕 (ITO YASUHIRO)  
熊本大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：70380996

##### (2) 研究分担者

福島 美紀子 (FUKUSHIMA MIKIKO)  
熊本大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：10284770

##### (3) 連携研究者

谷原 秀信 (TANIHARA HIDENOBU)  
熊本大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：60217148