

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10865

研究課題名(和文) 糖尿病網膜症の発症におけるMrp4の役割の解明

研究課題名(英文) Roles of Mrp4 in the development of diabetic retinopathy

研究代表者

楠原 仙太郎 (KUSUHARA, SENTARO)

神戸大学・医学研究科・講師

研究者番号：40437463

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)：Multidrug resistance protein 4 (Mrp4)ノックアウトマウスでは野生型マウスに比較してストレプトゾトシン誘発高血糖における有意な網膜血管密度の低下が認められた。InsCreTg; Pdk1flox/floxマウスでは明らかな網膜血管の異常がない段階で、ラミニンの菲薄化と網膜神経線維の減少が生じていることが判明した。糖尿病初期の網膜細胞異常を評価するために2光子顕微鏡を用いた網膜生体イメージングの系をマウスで確立した。これらの成果は糖尿病網膜症の病態解明に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Multidrug resistance protein 4 (Mrp4) knockout mice showed a significantly lower retinal vascular density compared with wildtype mice under streptozotocin-induced hyperglycemia. InsCreTg; Pdk1flox/flox mice exhibited thinning of laminin and decrease in the number of retinal nerve fibers prior to obvious manifestations of retinal microvascular abnormality. To evaluate the abnormality of retinal cells in an early stage of diabetes, in vivo mouse retinal imaging system with two-photon microscopy was established. These results seem to be helpful for elucidating the pathogenesis of diabetic retinopathy.

研究分野：医師薬学

キーワード：糖尿病 網膜 Mrp4 トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症は我が国の成人失明原因の第2位を占める疾患であり、年間約3,000人が視覚障害となっている。心血管では耐糖能異常の時期から血管内皮機能障害が生じており、動脈硬化を経て心血管イベントの発症リスクが上昇することが報告されているのに対し、網膜血管においては、糖尿病発症から何らかの網膜血管異常が検出されるまでの期間は7-10年である。このことはすなわち、検眼鏡的に異常が認められない期間(糖尿病発症初期)に網膜血管異常が進行していることを示唆している。糖尿病網膜症の発症初期に周皮細胞の脱落が重要であるとの報告があるが、糖尿病網膜症発症メカニズムの詳細については未だ不明な点が多い。

我々は以前、フローサイトメトリーによって血管内皮細胞をソートし、DNAマイクロアレイで遺伝子発現を比較する方法(FACS-Array法)を用いて血管新生時の網膜血管内皮細胞特異的に発現が有意に変化している遺伝子として *Mrp4/Abcc4* を特定した(Kusuhara S, et al. Presented at ARVO 2010 annual meeting, 2010, Kusuhara S, et al. PLoS One 2012;7:e45858.)。Multidrug resistance protein 4 (MRP4)はABCトランスポーターファミリーに属し、薬剤などの生体内代謝物を含む様々な物質を細胞外に排出することにより組織保護に働くことが知られている。MRP4は広範な基質選択性を示すが、重要な生理活性物質であるcAMPもMRP4の主要な基質である。マウス高酸素網膜症(oxygen-induced retinopathy, OIR)モデルを用いた実験では、*Mrp4*の蛋白発現が病的新生血管部位では低下しており(Tagami M, Kusuhara S, et al. Brain Res, 2009)、培養ヒト網膜血管内皮細胞を用いた実験では、1)MRP4の発現は外因性VEGFによって低下すること、2)MRP4ノックダウンによって細胞の遊走が促進されること、3)MRP4ノックダウンによって細胞の異常凝集が認められること、が明らかとなった(Tagami M, Kusuhara S, et al. Biochem Biophys Res Commun, 2010)。これらの結果を受けて *Mrp4* ノックアウトマウスでの解析を行ったところ、*Mrp4* ノックアウトマウスに細胞内cAMP産生を増加させるフォルスコリンを投与すると生理的網膜血管新生が障害されると同時に周皮細胞数も減少することが分かった(Matsumiya W, Kusuhara S, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012)。また、*Mrp4* ノックアウトマウスでOIRモデルを作成すると同腹野生型マウスに比べて有意に病的新生血管が生じるという結果であった(Kusuhara S, et al. 未発表データ)。

先行研究からMRP4が、(1)網膜血管新生に抑

制的に働いていること、(2)周皮細胞の安定性に関与していること、が明らかとなったことから、我々は糖尿病マウスモデルにおけるMRP4の役割を解析することとした。MRP4はバクテリアからヒトまで広く存在する膜タンパク質であり先に挙げたcAMPに加え、cGMP、プロスタグランジンE2、ロイコトリエンC4、等多くの重要な生理活性物質を細胞外(血管内皮細胞では血管内腔側)に排出することから血管内皮細胞の保護に深く関わっていると推測される。すなわち、もし糖尿病の初期においてMRP4の機能障害が生じるならば、血管内皮細胞内のこれらの生理活性物質濃度が上昇し、結果として数多くの細胞内シグナルを介して周皮細胞、グリア細胞、神経細胞に影響を及ぼすと考えられる。

2. 研究の目的

MRP4と糖尿病網膜症発症の関係についてマウスモデルを用いて解析すること。

3. 研究の方法

(1)1型糖尿病マウスモデルでの解析

Mrp4 ノックアウト(KO)マウスと野生型(コントロール)マウスを用いて以下の実験を行った。成体マウス(生後8-10週)にストレプトゾトシン(45mg/kg body weight)の腹腔内注射を5日連続で行い2週間後に血糖値を測定し300mg/dl以上であることが継続的に確認できた個体をその後の実験に用いた。高血糖が出現してから3ヵ月後に網膜を取り出し網膜伸展標本および切片を用いて組織染色を行った。

(2)2型糖尿病マウスモデルでの解析

InsCre^{Tg} マウスと *Pdk1^{fllox/+}* マウスの交配により、*InsCre^{Tg}; Pdk1^{fllox/fllox}* マウスを作成しこれを *Mrp4KO* マウスと交配した。生後20週までの体重と血糖の推移および個体差を調べた。また、生後12週時点で網膜を取り出し網膜伸展標本および切片を用いて免疫組織染色を行った。

(3)2光子顕微鏡を用いた in vivo imaging

血管内皮細胞機能評価については網膜血管内皮細胞に蓄積されたfluo-cAMPを蛍光画像で描出することを予定していたが、将来の臨床応用を考えると in vivo imaging の系を確立することが優先されたと考え、2光子顕微鏡による細胞レベルでの網膜イメージングを行った。

4. 研究成果

(1)1型糖尿病マウスモデルでの解析

高血糖が出現してから3ヵ月後に網膜を取り出し網膜伸展標本で免疫組織染色を行ったところ、*Mrp4KO* マウスでは野生型マウスと比較して有意な網膜血管密度の低下が認め

られた(図1)。ただ、SMA 陽性周皮細胞およびGFAP 陽性アストロサイトについては明らかな形態変化は認められなかった。また、網膜切片を用いたHE染色においても網膜10層構造に明らかな変化は認められなかった(図2)。

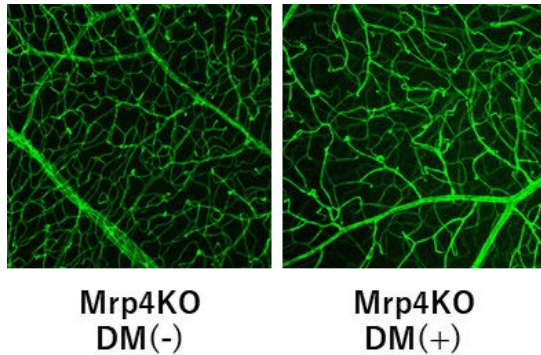


図1 Mrp4KO マウスにおける網膜血管密度への高血糖の影響

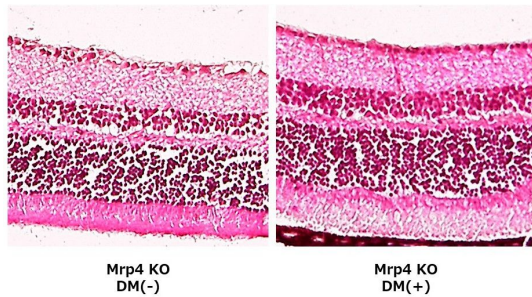


図2 Mrp4KO マウスにおける網膜層構造への高血糖の影響

(2) 2型糖尿病マウスモデルでの解析

InsCre^{Tg}; Pdk1^{flox/flox} マウスの交配中に動物実験施設で微生物感染の問題が生じたため、交配が長期間にわたり中断されたため、*InsCre^{Tg}; Pdk1^{flox/flox}* マウスとMrp4KOマウスの交配にまでいたらず、*InsCre^{Tg}; Pdk1^{flox/flox}* マウスの網膜での表現型を確かめるのみとなった。*InsCre^{Tg}; Pdk1^{flox/flox}* マウスでは体重と血糖の推移に個体差が少ないことが明らかとなった(図3)。

生後12週の免疫染色では、糖尿病網膜症に特徴的な、ミューラー細胞の形態変化とGFAP陽性化(ストレス応答)、ミクログリアの活性化、が確認できた。また、明らかな網膜血管の異常がない段階で、細胞外マトリクスであるラミニンの菲薄化と網膜神経線維の減少が生じていることが判明した(図4)。

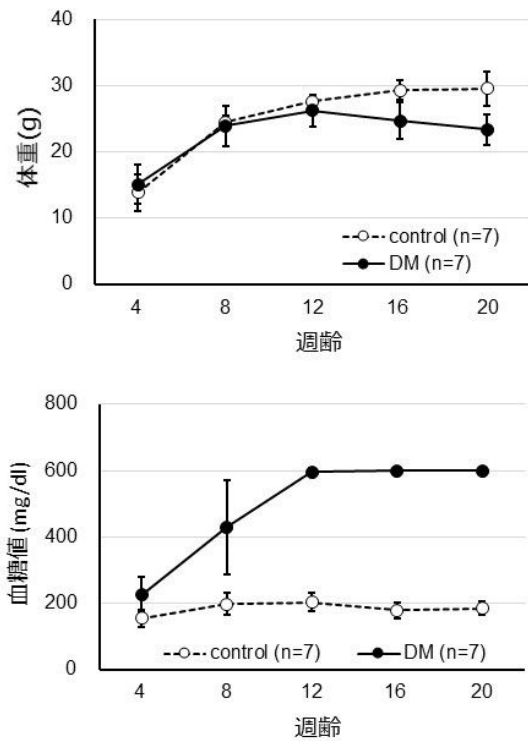


図3 *InsCre^{Tg}; Pdk1^{flox/flox}* マウスの体重と血糖値の推移(エラーバー = 標準偏差)

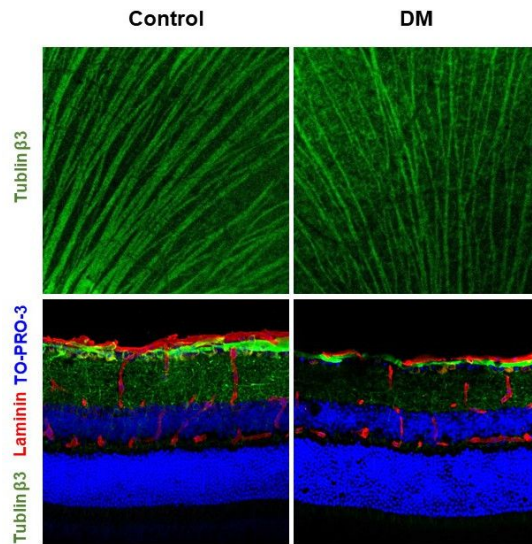


図4 *InsCre^{Tg}; Pdk1^{flox/flox}* マウスにおける網膜神経線維の減少とラミニンの菲薄化

(3) 2光子顕微鏡を用いた in vivo imaging

従来から経瞳孔的な2光子網膜イメージングは技術的に困難とされていたが、独自に開発したコンタクトレンズと姿勢保持装置を組み合わせることによって良好な画像が得られることが分かった(図5)。

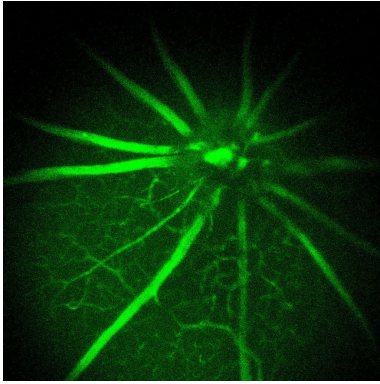


図5 2光子顕微鏡を用いたフルオレセイン蛍光眼底造影像

1型糖尿病マウスモデルを用いた本研究の結果から Mrp4 が糖尿病網膜における網膜血管障害に対して保護的に働く可能性が示唆された。また、本研究で用いた2型糖尿病マウスは個体少なく網膜血管異常が検出される前の網膜構造変化を捉えることができることから、サブクリニカルな網膜異常を評価するのに最適なマウスモデルであることが分かった。さらに2光子顕微鏡による網膜 in vivo imaging の系が確立されたことにより、これらを組み合わせれば、糖尿病網膜症の発症を解明する強力なツールなると思われる。

本研究で得られた知見は糖尿病網膜症の発症予防に利用可能であり、本研究をさらに発展させることができれば創薬もしくは drug repositioning を促進させることが期待できる。ひいては、糖尿病網膜症患者の失明予防につながり社会に貢献できるものと考えられる。

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)

[雑誌論文](計 1 件)

Ogura S, Kurata K, Hattori Y, Takase H, Ishiguro-Oonuma T, Hwang Y, Ahn S, Park I, Ikeda W, Kusuhara S, Fukushima Y, Nara H, Sakai H, Fujiwara T, Matsushita J, Ema M, Hirashima M, Minami T, Shibuya M, Takakura N, Kim P, Miyata T, Ogura Y, Uemura A. Sustained inflammation after pericyte depletion induces irreversible blood-retina barrier breakdown. JCI Insight. 2017 Feb 9;2(3):e90905. (査読有)

[学会発表](計 2 件)

Atsuko Katsuyama, Sentaro Kusuhara, Wataru Matsumiya, Shigeru Honda,

Makoto Nakamura, Structural changes in the inner retina assessed by slab en face optical coherence tomography in diabetic eyes, 2018 ARVO Annual Meeting, April 29, 2018, ハワイ (アメリカ)

勝山敦子、楠原仙太郎、松宮 亘、本田茂、中村 誠、光干渉断層計 slab en face 像を用いた糖尿病網膜内層構造変化の評価、第 122 回 日本眼科学会、2018 年 4 月 19 日、大阪

[図書](計 0 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：
出願年月日：
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

楠原 仙太郎 (KUSUHARA SENTARO)
神戸大学・医学研究科・講師
研究者番号：40437463

(2) 研究分担者 (該当なし) ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 (該当なし) ()

研究者番号：