

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791671

研究課題名（和文） Angpt12 の糖尿病網膜症の病態における機能解析

研究課題名（英文） functional analyses of Angpt12 in pathogenesis of diabetic retinopathy

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

研究成果の概要（和文）：本研究では Angpt12 が糖尿病網膜症の病態に関与しているかどうか検討を行った。増殖糖尿病網膜症患者の硝子体中の Angpt12 の濃度は上昇しており、また増殖糖尿病網膜症の患者の手術時に採取した増殖膜に Angpt12 の強い発現を認めた。さらに、Angpt12 のノックアウトマウスを用いた実験では網膜における IL-6 や MCP-1 などの炎症性サイトカインや ICAM-1 や VCAM-1 といった接着分子の発現の低下を認め、白血球の血管への接着も抑制されていた。

研究成果の概要（英文）：Concentration of Angpt12 in vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy was increased compared to the control, and Angpt12 expression was found in fibrovascular membrane of proliferative diabetic retinopathy. Moreover, IL-6, MCP-1, ICAM-1 and VCAM-1 expression was decreased in Angpt12 knockout mice compared to the control, and leukocyte adhesion to endothelial cells was suppressed in Angpt12 knockout mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、眼科学

キーワード：眼生化学・分子生物学

## 1. 研究開始当初の背景

それまでの研究成果で Angpt12 が血管内皮細胞株を用いた *in vitro* の実験において血管内皮細胞の遊走を促進し、皮膚の表皮に Angpt12 を強発現させた K14-Angpt12 トランスジェニックマウスを用いた実験で、皮膚の血管の径、特に毛細血管レベルで拡張しており、強い炎症や浮腫を認めた。さ

らにこれらの作用は血管内皮細胞のインテグリン受容体を介して NF $\kappa$ B のシグナル伝達系を介して血管の炎症を惹起することが明らかになっていた。これらの結果より糖尿病の病態において Angpt12 がマウスおよびヒトにおいてインスリン感受性や炎症の病態に深く関与していることが明らかとなっていた。以上のことなどから、Angpt12

2が、糖尿病の眼合併症である糖尿病網膜症の病態においても深く関与していることが示唆されたため、Angptl2が糖尿病網膜症の病態において関与しているかどうか検討を行った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、本邦における成人の失明原因の上位にある糖尿病網膜症の病態において増殖期における血管新生や増殖膜あるいは血管新生緑内障などの病態において、Angptl2が関与しているか検討を行う。またさらにAngptl2のノックアウトマウスを用いた検討を行うことにより、現在手術療法や光凝固療法などの外科治療が主体の増殖糖尿病網膜症に対する新たな治療戦略の可能性を検討することにある。

## 3. 研究の方法

(1) 増殖糖尿病網膜症患者とコントロール(糖尿病がなく眼内新生血管が認められない黄斑疾患などの症例)の硝子体を手術時に採取を行い、その中におけるAngptl2の濃度をELISAにて測定を行い、また手術時に採取された増殖糖尿病網膜症患者の線維増殖血管膜におけるAngptl2の発現を免疫染色にて検討を行う。

(2) 高脂肪食を負荷したマウスにおけるAngptl2の血清中および網膜中の濃度、発現の検討。2ヶ月間高脂肪食と普通食を摂取させたマウスの血清および網膜におけるAngptl2の発現をwestern blottingにて検討を行う。

(3) ①Angptl2ノックアウトマウスを用いて高脂肪食負荷マウスを作製し、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、VCAM-1などの接着因子などの発現をELISAにて解析を行い、コントロールと比較する。

②また、コンカナバリンAレクチン染色を行い、白血球の血管内皮細胞への接着の検討を行う。

(4) Human Retinal Endothelial Cell (HREC)を用いたin vitroの実験。

①HRECを用いて増殖糖尿病網膜症の病態に関与している低酸素刺激によるAngptl2の発現の変化をwestern blottingを用いて検討する。

②HRECを用いてAngptl2のin vitroでのシグナル伝達経路の解析。HRECにAngptl2を添加し、NFκBがリン酸化される

かwestern blottingを行う。また、NFκBの核移行を免疫染色にて検討を行う。

③HRECとヒトのmonocyte/macrophage細胞株であるU937との共培養を行い、Angptl2刺激によりU937の接着が亢進するか検討を行う。

## 4. 研究成果

(1) 硝子体中のAngptl2の濃度は増殖糖尿病網膜症の患者で $2.89 \pm 0.46 \text{ ng/ml}$ 、対照群で $1.58 \pm 0.06 \text{ ng/ml}$ と増殖糖尿病網膜症群において有意に高かった( $P < 0.001$ )。また、手術時に採取した増殖糖尿病網膜症の増殖膜の免疫染色において、血管内皮細胞やマクロファージなどに強い発現が認められた(図1、2)。

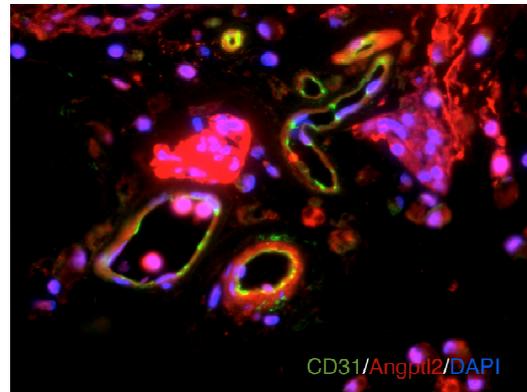


図1 血管内皮細胞(CD31;緑)とAngptl2(赤)の共発現が認められた。

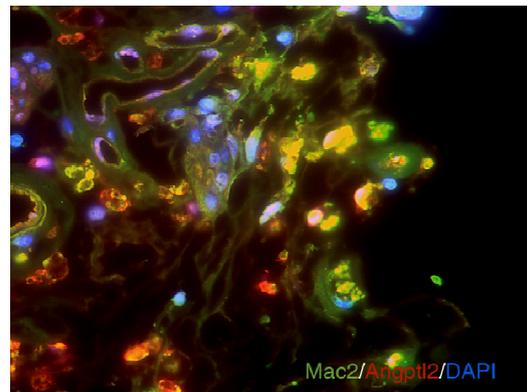
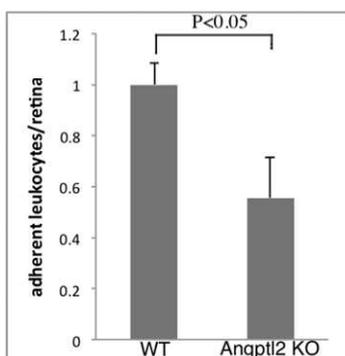


図2 マクロファージ(Mac2;緑)とAngptl2(赤)の共発現が認められた。

(2) 高脂肪食を2ヶ月間摂取させたマウスにおけるAngptl2の血清中濃度をwestern blottingにより検討したところ、普通食を摂取していたマウスに比べ高脂肪食を摂取していたマウスにおいてAngptl2の血清中の濃度は上昇していることが明らかとなった。

(3) ①Angptl2 ノックアウトマウスを用いて2ヶ月間高脂肪食を摂取させた後、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、VCAM-1などの接着因子の発現をELISAにて検討したところ、Angptl2 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の発現がコントロールの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。

②コンカナバリン A レクチンを用いて白血球の血管内皮への接着を検討したところ、Angptl2 ノックアウトマウスにおいてコントロールと比較して白血球の接着が抑制されることが明らかとなった。



(4) ①HREC を用いて低酸素刺激 (2% O<sub>2</sub>、24 時間培養) による Angptl2 の発現の変化を western blotting により検討したところ、HREC において Angptl2 は低酸素刺激にて発現が増強することが明らかとなった。

②HREC を用いて Angptl2 刺激にて、NF $\kappa$ B のリン酸化を western blotting にて検討したところ、HREC において Angptl2 刺激にて NF $\kappa$ B のリン酸化されることが明らかとなった。また、NF $\kappa$ B の核移行を免疫染色で検討したところ、Angptl2 刺激にて NF $\kappa$ B の核移行を認めた。

③HREC とヒトの monocyte/macrophage 細胞株である U937 との共培養を行い、Angptl2 刺激により U937 の接着が亢進するか検討したところ、Angptl2 刺激にて血管内皮細胞株への U937 の接着は亢進しておりことが認められた。

(5) 以上の in vivo および in vitro の実験結果より、Angptl2 は血管内皮細胞やマクロファージなどに主に発現しており、NF $\kappa$ B のシグナルを介して炎症性サイトカインや接着因子の発現を増強させることにより、炎症や血管新生などの病態に深く関与していることが示唆された。

(6) 以上の研究成果は、Angptl2 が炎症や低酸素がその病態に関与している糖尿病網膜症の病態に深く関与していることを示唆する結果であり、Angptl2 が糖尿病網膜症の病態に深

く関与していることを示す世界で最初の報告であると思われる (現在論文投稿準備中)。現在は増殖糖尿病網膜症に対しては光凝固や手術療法が主体となっているが Angptl2 の作用を抑制するような薬剤を開発できれば新たな治療のターゲットになる可能性があると思われる。

今後の展望であるが Angptl2 は血管透過性亢進作用も有しているので糖尿病網膜症のもう一つの病態である糖尿病黄斑浮腫の病態に Angptl2 が関与しているか検討を行う予定にしている。これが証明されれば、この病態に関して現在は抗 VEGF 抗体療法が海外では主に行われているが、その治療に抵抗性を示す症例も報告されているため、Angptl2 が VEGF とは違った経路を持つ新たな治療のターゲットになる可能性があると思われる。

## 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)

[学会発表] (計 4 件)

① Angptl2 Knockout Mice Suppress Inflammation In Retinal Vessels Induced By A High-fat Diet

Yasuhiro Ito, Yuichi Oike, Hidenobu Tanihara

The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), 2012. 5. 8

Broward County Convention Center (Greater Fort Lauderdale, Florida, USA)

② Increased Intraocular Level of Angiopoietin-like protein 2 in Diabetic Retinopathy

Yasuhiro Ito, Mikiko Fukushima, Hidenobu Tanihara

American Academy of Ophthalmology, 2011. 10. 24 Orange County Convention Center (Orlando, Florida, USA)

③ Angptl2 Induces Inflammation of Retinal Vessels in Diabetes

Yasuhiro Ito, Yuji Takihara, Mikiko Fukushima, Masaru Inatani, Yuichi Oike, Hidenobu Tanihara

The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), 2010. 5. 6

Broward County Convention Center (Greater Fort Lauderdale, Florida, USA)

④ 増殖糖尿病網膜症における硝子体中の Angptl2 の濃度

伊藤 康裕、福島 美紀子、犬丸 淳子、宮崎 智成、後藤 信祐、尾池 雄一、谷原 秀信

第 114 回日本眼科学会総会、2010. 4. 15  
名古屋国際会議場（愛知）

〔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

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：