
糖尿病網膜症の発生メカニズム に関する研究

(研究課題番号 14110401)

平成15年度厚生労働科学研究費補助金(感覚器障害研究事業)

総括研究報告書

平成16(2004)年3月

主任研究者 澤田典均

(札幌医科大学医学部)

目 次

I. 総括研究報告

糖尿病網膜症の発生メカニズムに関する研究 澤田 典均

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総括研究報告

糖尿病網膜症の発生メカニズムに関する研究

澤田 典均

(札幌医科大学医学部病理学第二講座教授)

総括研究報告書

糖尿病網膜症の発生メカニズムに関する研究

主任研究者 澤田 典均 札幌医科大学医学部病理学第二講座教授

研究要旨 糖尿病性網膜症の初期では、病期初期から、毛細血管の透過性が亢進する。毛細血管の透過性は、細胞間接着装置タイト結合によって調節されている。本研究の目的は、血液網膜関門のinner barrierを形成する網膜毛細血管のタイト結合の制御機構と、糖尿病性網膜症におけるタイト結合の変化を明らかにすることである。本年度は、以下の点を明らかにした。

- 1) 初代培養ブタ脳血管内皮細胞にcAMPを作用させると、3-4倍TERが上昇する。われわれは、このとき、claudin-5が、protein kinase A (PKA) 依存性リン酸化を受けることを明らかにした。しかしclaudin-5の転写の増加は、PKA非依存性であった。
- 2) ドキシサイクリン (Dox) 依存性転写因子を導入した血管内皮細胞に、claudin-5 及びその変異遺伝子を導入した細胞株を樹立し、claudin-5 の発現によって分子サイズ選択的内皮バリアが再構成されること、claudin-5 の Thr207 が PKA によるリン酸化部位であること、そのリン酸化が内皮バリアの制御に重要な役割を果たすことを明らかにした。

A. 研究目的

糖尿病網膜症は、現在我が国における後天性失明原因の第一位を占め、その本態は網膜血管の透過性亢進、網膜血管の内腔閉塞および血管新生といった網膜血管病変である。網膜血管の内皮細胞は、脳の血管内皮細胞と同様に連続性で細胞間にタイト結合が存在し、血管周囲にはアストロサイトが取り囲み、血管の透過性が調節され、網膜や脳の恒常性を維持している。このバリア機構は、血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) にならって、血液網膜関門 (blood-retinal barrier: BRB) と呼ばれている。糖尿病網膜症では、病態初期からBRBが破綻する。その病態形成には、高血糖に伴うサイトカインの発現異常、代謝異常、血流動態異常が複雑に絡み合っているが、現在最も注目されている成因の一つに、網膜における血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) の発現上昇がある。VEGFは、血管透過性因子

(vascular permeability factor: VPF) とも呼ばれ、血管新生を促進するばかりでなく血管透過性も亢進させる。VEGFの発現は、虚血あるいは低酸素で誘導されることが広く知られ、虚血網膜におけるVEGF産生細胞は網膜のグリア細胞と考えられている。しかし、臨床的には明らかな網膜血管の内腔閉塞が生じる前からVEGFの発現と血管の透過性亢進が起こっており、その発現因子として、慢性的な高血糖によってもたらされる後期グリケーション終末産物 (advanced glycation endproducts: AGE) の関与が示唆されている。網膜内のグリア細胞には、ミューラー細胞、アストロサイト、ミクログリアがあるが、実際、AGE がミューラー細胞に作用すると、VEGFの発現が亢進することが報告されている。

一方我々は、神経細胞に対し生存維持作用を持つグリア細胞株由来神経栄養因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor: GDNF) が、BBBを

構成する脳血管内皮細胞のタイト結合バリア機能を亢進することを明らかにした。さらに、網膜グリア細胞からもGDNFが分泌されていることを確認し、GDNFが網膜血管のバリア機能を亢進させる可能性があることを示した。

我々は、糖尿病網膜症の初期変化である網膜血管の透過性亢進が起こる機序として、AGEにより網膜グリア細胞でのVEGFの分泌が亢進する一方で、もともと分泌していたGDNFが減少するという仮説を立て、研究を進めている。AGEは、グリケーション反応（非酵素的糖化反応）の最終産物であるが、その反応の性質上、単一の物質ではなく多様なものと考えられている。実際、糖尿病患者の血清に少なくとも5種類のAGEと、carboxymethyl-lysine (CML), carboxyethyl-lysine (CEL) が存在することが報告されている。

本研究では、グリア細胞がGDNFを産生するという形質を失う機構を明らかにしようとするものである。さらに糖尿病網膜症の初期変化である血管透過性の亢進は、血管内皮細胞のタイト結合の機能が低下するために起こることから、VEGF, GDNFを含めた各種サイトカインによる血管内皮細胞のタイト結合の機能調節を調べる。これらの研究成果は、糖尿病網膜症の初期変化である血管透過性の亢進という症状に対して、タイト結合機能を正常状態にまで高めるといった根治療法の開発に大きく寄与すると考えられ、さらに糖尿病網膜症による後天性失明を激減させるの期待される。

平成14年度は、7種のAGEをグリア細胞や毛細血管内皮細胞に作用させ、VEGFとGDNF発現および内皮細胞のタイト結合バリア機能の変化を検討した。平成15年度は、血液網膜関門の本体である血管内皮細胞のタイト結合機能制御について検討した。血管内皮細胞ではclaudin-1, claudin-5などが発現していることが知られているが、血管内皮のタイト結合の形成、維持、制御の分子メカニズムについては未だ不明な点が多い。そこで、

まず初代培養ブタ脳血管内皮細胞を用いて、cAMPによるタイト結合機能の調節機構を検討した。更にwild-typeあるいはmutant claudin-5の発現を誘導できる肺血管内皮細胞株(RLE)を樹立し、タイト結合が再構成されるかを、またclaudin-5がシグナル伝達分子の一つであるprotein kinase A (PKA)の標的分子であるかを検討した。本年度は、以下の点を明らかにすることである。

- 1) 初代培養ブタ脳血管内皮細胞にcAMPを作用させると、3-4倍TERが上昇する。このとき、claudin-5が、どのようなprotein kinase A (PKA) 依存性制御を受けるか。
- 2) ドキシサイクリン (Dox) 依存性転写因子を導入した血管内皮細胞に、claudin-5及びその変異遺伝子を導入した細胞株を樹立し、claudin-5の発現によって分子サイズ選択的内皮バリアが再構成されるか、claudin-5のThr207がPKAによるリン酸化部位であることの証明、そのリン酸化が内皮バリアの制御に重要な役割を果たすか。

B. 研究方法

1) cAMPによる血管内皮細胞のタイト結合の制御

初代培養ブタ脳血管内皮細胞にcAMPを作用させると、3-4倍TERが上昇する。われわれは、このとき、protein kinase A (PKA) 阻害剤 (H-89) を作用させ、claudin-5が、PKA依存性リン酸化を受けるか否かを、免疫染色、western blot, phosphoamino acid analysisなどを用いて検討した。さらにclaudin-5の転写についても検討した。

2) claudin-5による内皮バリアの再構成

RLE細胞株は、いくつかのタイト結合関連分子を発現しているが、タイト結合の超微構造を欠如し、バリア機能が極めて低いことが知られている。我々は、RLE細胞にreverse tetracycline-controlled transactivator (rtTA; Tet-on系)を導入し、ドキシサイクリン (Dox) で外来遺伝子の発現を調節できるコンディショナルシステム (RLE:rtTA L20)

を確立している (Fujibe et al., 2004). そこでこの細胞株に, tet オペレータを有する野生型 claudin-5 または Thr207 を Ala に置換した変異型 claudin-5 の発現ベクター (pUHD10-3-KmCL5, pUHD10-3-KmCL5T207A) を導入し, それらの発現を Dox. で誘導できる細胞株

(RLE:rtTA:CL5, RLE:rtTA:CL5T207A) を樹立した. これら 2 種類の細胞株を Dox, cAMP, PKA 阻害剤 H-89 またはそれらの組み合わせで処理し, claudin-5 の発現量, 細胞内局在, リン酸化や, バリア機能の指標となる電気抵抗値 (TER), イヌリン・マンニトールの透過性の変化を検討した.

(倫理面への配慮)

本研究は, 大部分が培養細胞を用いて行われ, 倫理上の問題が生じることを極力避けた. 実験動物に対しては, 十分な麻酔薬投与などを行い, 苦痛を最小限に抑えるよう努力した.

C. 研究結果

1) 初代培養ブタ脳血管内皮細胞にcAMPを作用させると, 3-4倍TERが上昇する. われわれは, このとき, protein kinase A (PKA) 阻害剤 (H-89) を作用させると, claudin-5が, PKA依存性リン酸化を受けることを明らかにした. さらにclaudin-5の転写も上昇したが, その上昇は, H-89の投与に影響を受けずPKA非依存性であることが明らかになった. そこでclaudin-5の細胞質部分を調べたところ, PKAコンセンサスリン酸化候補部位Thr207を見出した.

2) RLE:rtTA:CL5 (野生型), RLE:rtTA:CL5T207A (変異型) 細胞株いずれにおいても, Doxの濃度と処理時間に依存していずれのclaudin-5の発現が誘導された. またいずれのclaudin-5も, 主に細胞境界に局在し, 少なくとも一部はタイト結合膜裏打ち分子ZO-1との共局在を示した. TER値はDoxの濃度と処理時間, すなわちclaudin-5の発現量に依存して増加したが, 予想に反してRLE:rtTA:CL5

の値がRLE:rtTA:CL5T207Aに比べて有意に低かった. またRLE:rtTA:CL5細胞株では, イヌリン (SkDa) に対するバリアが再構成されたが, マニトール (182Da) に対するバリアは誘導されなかった. 一方, RLE:rtTA:CL5T207A細胞株では, 両分子に対するバリアの再構成が認められた. これらの結果から, claudin-5の発現によって分子サイズ選択的な内皮バリアが再構成されることが明らかとなり, claudin-5のThr207が内皮のバリア機能に影響することが示唆された.

RLE:rtTA:CL5株では, cAMP処理によって細胞境界のclaudin-5陽性シグナルが増強し, このシグナル増強はH-89の前処理によって抑制された. またRLE:rtTA:CL5細胞株では, cAMPによるPKA活性化がclaudin-5をリン酸化し, claudin-5の六量体と思われる175kDaリン酸化タンパクの形成を誘導した. さらにcAMPによるPKA活性の上昇は, TER値の急激な低下, マニトールに対するバリア機能の低下を起こした. 一方, RLE:rtTA:CL5T207A細胞株では, PKA活性化は, claudin-5の細胞内局在, リン酸化, バリア機能に影響しなかった.

D. 考察

血管内皮細胞のタイト結合は血液組織関門の本体であり, その破綻は, 脳浮腫, 肺浮腫や不妊, 癌細胞の血管外脱出等さまざまな病態を引き起こす. 近年多くのタイト結合構成分子が同定され, 血管内皮細胞には膜貫通分子 claudin-1, claudin-5, occludin や, 膜裏打ち分子 ZO-1, ZO-2 が発現することが明らかになっている. しかし, 血液組織関門の形成や制御の分子機構は未だ不明である. 本研究から, 血液組織関門を形成する血管内皮細胞では, 少なくとも6種類のタイト結合蛋白を発現し, かつ比較的高いバリア機能を有することから, BBB の in vitro モデルとして極めて有用なものである. 我々はこの培養系を用いて, 血管内皮のバリア機能を上昇させることが知られている cAMP

が、claudin-5を主たる標的分子として、そのリン酸化と発現を各々protein kinase A (PKA) 依存性、非依存性に誘導することを明らかにした。これは、PKAやclaudin-5が糖尿病網膜症の治療の標的分子となりうることを示している。

ラット肺血管内皮 (RLE) 細胞株は、occludinやclaudin-1, claudin-5の発現や、タイト結合の超微構造と機能をほとんど欠如している。我々は、本細胞株にreverse tetracycline-controlled trans-activator (rtTA) を恒常発現させ、テトラサイクリン誘導体であるドキシサイクリン (Dox) 処置によって外来遺伝子の発現を時間的・量的に調節できるコンディショナルシステムを確立している。そこで野生型あるいは変異型claudin-5の発現を誘導できるRLE細胞株を樹立し、この分子の発現誘導によって機能的なタイト結合が再構成されることを示した。タイト結合機能は、claudin-5の発現量に依存して増加した。しかし予想に反して、野生型claudin-5発現株のタイト結合機能が変異型claudin-5発現株のタイト結合機能に比べて有意に低かった。また野生型claudin-5発現株では、イヌリン (5kDa) に対するバリアが再構成されたが、マンニトール (182Da) に対するバリアは誘導されなかった。一方、変異型claudin-5発現株では、両分子に対するバリアの再構成が認められた。これらの結果から、claudin-5の発現によって分子サイズ選択的な内皮バリアが再構成されることが明らかとなり、claudin-5のThr207が内皮のバリア機能に影響することが示唆された。野生型claudin-5発現株では、cAMP処理によって細胞境界のclaudin-5陽性シグナルが増強し、このシグナル増強はH-89の前処理によって抑制された。さらに、cAMPによるPKA活性化がclaudin-5をリン酸化し、claudin-5の六量体と思われる175kDaリン酸化タンパクの形成を誘導した。ところが、cAMPによるPKA活性の上昇によって、TER値の急激な低下、マンニトールに対するバリア機能の低下を起こした。イヌリンに対するバリア機能は、いずれの細

胞株においてもcAMPによって低下したが、H-89による影響を受けなかった。したがって、cAMPはPKA非依存性に大分子に対するバリア機能を減少させると考えられた。前述した通り、cAMPは内皮バリアを増強することから、その作用にはclaudin-5以外のタイト結合分子が必要であることが強く示唆された。実際、2003年に、claudin-5ノックアウトマウスの研究から、血液脳関門の血管内皮細胞にclaudin-12が発現していることが報告された。このマウスは、生後24時間以内に原因不明で死亡するが、血液脳関門血管内皮細胞のタイト結合を調べると小分子の透過性が増しており、claudin-5が小分子の透過性を制御していると考えられた。したがって今後claudin-5に加えてclaudin-12についての解析が必要となった。今後これらの系を用いて、血液組織関門の分子解析をさらに進め、その破綻が原因となる病気に対する新たな予防法・治療法を開発する基盤を確立したい。

E. 結論

BBBやBRBは、血管内皮細胞とグリア細胞からなる生体機能ユニットである。したがって糖尿病網膜症の初期変化である血管透過性の亢進は、血管内皮細胞のタイト結合の機能が低下するために起こるが、グリア細胞による制御も考慮する必要がある。昨年度の結果から、高血糖により生じるAGEは、BRBを構成するグリア細胞に選択的に働き、血管透過性を高めるVEGF産生を促進した。一方、本年度の結果から、血管内皮細胞に対しては、PKAの活性化を介して血管透過性を低下させることが示唆された。これらの研究成果は、糖尿病網膜症の初期変化である血管透過性の亢進という症状に対して、血管内皮細胞のタイト結合機能を正常状態にまで高めるという根治療法の開発には、グリア細胞の形質を調節する方法と、血管内皮細胞のタイト結合機能を直接制御する方法が提案された。今後、AGEによる、あるいはcAMPによるシグナル伝達経路を明らかにする

ことができれば、糖尿病網膜症による後天性失明を激減させることと期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

総説

Sawada N, Murata M, Kikuchi K, Osanai M, Tobioka H, Kojima T, Chiba H. Tight junctions and human diseases. *Med Electron Microsc*, 36: 147-156, 2003.

Kojima T, Yamamoto T, Murata M, Chiba H, Kokai Y, Sawada N. Regulation of the blood-biliary barrier: interaction between gap and tight junctions in hepatocytes. *Med Electron Microsc*, 36: 157-164, 2003.

澤田典均, 小島隆, 飛岡弘敏, 小海康夫, 千葉英樹. “すきま”の細胞生物学 細胞間接着装置タイプ結合とヒト疾患, 札幌医学雑誌, 72: 1-7, 2003.

原著

Chiba H, Gotoh T, Kojima T, Satohisa S, Kikuchi K, Osanai M, Sawada N. Hepatocyte nuclear factor (HNF)-4 α triggers formation of functional tight junctions and establishment of polarized epithelial morphology in F9 embryonal carcinoma cells. *Exp Cell Res* 286: 288-297, 2003.

Ishizaki M, Chiba H, Kojima T, Fujibe M, Soma T, Miyajima H, Nagasawa K, Wada I, Sawada N. Cyclic AMP induces phosphorylation of claudin-5-immunoprecipitates and expression of claudin-5 gene in blood-brain-barrier endothelial cells via protein kinase A-dependent and -independent pathways. *Exp Cell Res*, 290(2): 275-288, 2003.

Kojima T, Yamamoto T, Murata M, Lan M, Takano K, Go M, Ichimiya S, Chiba H, Sawada N. Role of the p38 MAP-kinase signaling pathway for cx32 and claudin-1 in the rat liver. *Cell Communication and Adhesion*, 10: 1-7, 2003.

Tobioka H, Isomura H, Kokai Y, Tokunaga Y, Yamaguchi J, Sawada N. Occludin expression decreases with the progression of human endometrial carcinoma. *Human Pathol* 35(2): 159-164, 2004.

Tokunaga Y, Tobioka H, Isomura H, Kokai Y, Sawada N. Expression of occludin in human rectal carcinoid tumours as a possible marker for glandular differentiation. *Histopathology*, 44: 247-250, 2004.

Fujibe M, Chiba H, Kojima T, Soma T, Wada T, Yamashita T, Sawada N. Thr203 of claudin-1, a putative phosphorylation site for MAP kinase, is required to promote the barrier function of tight junctions. *Exp Cell Res*, 295: 36-47, 2004.

Kojima T, Yamamoto T, Lan M-D, Murata M, Takano K, Go M, Ichimiya S, Chiba H, Sawada N. Inhibition of MAP-kinase activity moderates changes in expression and function of Cx32 but not claudin-1 during DNA synthesis in primary cultures of rat hepatocytes. *Med Electron Microsc*, in press.

その他

澤田典均, 発癌物質, その他 12 項目, 伊藤正男, 井村裕夫, 高久史磨総編集, 医学大辞典, 医学書院, 東京, 2003.

2. 学会発表

相馬 有, 千葉 英樹, 石崎 努, 藤部 正人, 宮嶋 秀彰, 小島 隆, 澤田 典均.

Cyclic AMP は血管内皮細胞における claudin-5 のリン酸化と発現を誘導して血液脳関門のバリア機能を制御する.

第 62 回日本癌学会総会, 2003.

長澤 邦彦, 千葉 英樹, 藤部 正人, 相馬 有, 小島 隆, 澤田 典均.

MAP キナーゼは claudin-1 の Thr²⁰³ をリン酸化して血管内皮細胞のバリア機能を亢進させる.

第 62 回日本癌学会総会, 2003.

菊地 慶介, 千葉 英樹, 伊藤 泰成, 郷久 晴朗, 小島 隆, 澤田 典均.

Hepatocyte nuclear factor-4 α は p21^{waf1/cip1} の発現を誘導し, 細胞増殖を抑制する.

第 62 回日本癌学会総会, 2003.

郷久 晴朗, 千葉 英樹, 菊地 慶介, 小島 隆, 大野 茂男, 澤田 典均.

Hepatocyte nuclear factor (HNF)-4 α はタイト結合分子の発現と上皮の極性形成を誘導する.

第 62 回日本癌学会総会, 2003.

千葉英樹, 澤田典均.

血液組織関門の再構成と制御機構.

第 92 回日本病理学会総会, 2003.

佐藤攻, 小海康夫, 小島隆, 飛岡弘敏, 澤田典均.

G-CSFによる骨髄B細胞発生抑制と卵巣摘除後骨粗鬆症の阻害.

第 92 回日本病理学会総会, 2003.

小海康夫, 飛岡弘敏, 小島隆, 澤田典均.

G-CSFによる Mesenchymal ablation 誘導と間葉幹細胞生着誘導.

第 92 回日本病理学会総会, 2003.

宮嶋秀彰, 千葉英樹, 澤田典均.

各種 AGF によるグリア細胞における GDNF 発現の変化に関する検討.

第 92 回日本病理学会総会, 2003.

村田雅樹, 小島隆, 山本敏誠, 千葉英樹, 小海康夫, 澤田典均.

肝細胞のタイト結合における occludin の役割.

第 92 回日本病理学会総会, 2003.

小島隆, 山本敏誠, 村田雅樹, 神原由季, 小海康夫, 千葉英樹, 澤田典均.

ストレス応答 MAP キナーゼ経路を介した肝細胞のギャップおよびタイト結合の発現調節機構.

第 92 回日本病理学会総会, 2003.

飛岡弘敏, 磯村洋, 徳永祐一, 小海康夫, 澤田典均.

浮遊培養 T84 細胞 spheroid の腺管形成に対するタイト結合の役割.

第 92 回日本病理学会総会, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む.)

なし

Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sawada N, Murata M, Kikuchi K, Osanai M, Tobioka H, Kojima T, Chiba H.	Tight junctions and human diseases.	Med Electron Microsc	36	147-156	2003
Kojima T, Yamamoto T, Murata M, Chiba H, Kokai Y, Sawada N.	Regulation of the blood-biliary barrier: interaction between gap and tight junctions in hepatocytes.	Med Electron Microsc	36	157-164	2003
澤田典均, 小島隆, 飛岡弘敏, 小海康夫, 千葉英樹.	“すきま”の細胞生物学 細胞間接着装置タイト結合とヒト疾患	札幌医学雑誌	72	1-7	2003
Chiba H, Gotoh T, Kojima T, Satohisa S, Kikuchi K, Osanai M, Sawada N.	Hepatocyte nuclear factor (HNF)-4 α triggers formation of functional tight junctions and establishment of polarized epithelial morphology in F9 embryonal carcinoma cells.	Exp Cell Res	286	288-297	2003
Ishizaki M, Chiba H, Kojima T, Fujibe M, Soma T, Miyajima H, Nagasawa K, Wada I, Sawada N.	Cyclic AMP induces phosphorylation of claudin-5-immunoprecipitates and expression of claudin-5 gene in blood-brain-barrier endothelial cells via protein kinase A-dependent and -independent pathways.	Exp Cell Res	290(2)	275-288	2003
Kojima T, Yamamoto T, Murata M, Lan M, Takano K, Go M, Ichimiya S, Chiba H, Sawada N.	Role of the p38 MAP-kinase signaling pathway for cx32 and claudin-1 in the rat liver.	Cell Communication and Adhesion	10	1-7	2003
Tobioka H, Isomura H, Kokai Y, Tokunaga Y, Yamaguchi J, Sawada N.	Occludin expression decreases with the progression of human endometrial carcinoma.	Human Pathol	35(2)	159-164	2004
Tokunaga Y, Tobioka H, Isomura H, Kokai Y, Sawada N.	Expression of occludin in human rectal carcinoid tumours as a possible marker for glandular differentiation.	Histopathology	44	247-250	2004
Fujibe M, Chiba H, Kojima T, Soma T, Wada T, Yamashita T, Sawada N.	Thr203 of claudin-1, a putative phosphorylation site for MAP kinase, is required to promote the barrier function of tight junctions.	Exp Cell Res	295	36-47	2004
Kojima T, Yamamoto T, Lan M-D, Murata M, Takano K, Go M, Ichimiya S, Chiba H, Sawada N.	Inhibition of MAP-kinase activity moderates changes in expression and function of Cx32 but not claudin-1 during DNA synthesis in primary cultures of rat hepatocytes.	Med Electron Microsc		in press	

20030588

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。