



Title	難治性眼疾患における病態解明と新規治療法の開発
Author(s)	長谷, 敬太郎
Description	配架番号 : 2553
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14087号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14087
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77925
Type	doctoral thesis
File Information	Keitaro_Hase.pdf



学 位 論 文

難治性眼疾患における病態解明と

新規治療法の開発

(Elucidation of pathogenesis and
development of novel treatments for
refractory eye diseases)

2020 年 3 月

北海道大学

長谷 敬太郎

学 位 論 文

難治性眼疾患における病態解明と

新規治療法の開発

(Elucidation of pathogenesis and
development of novel treatments for
refractory eye diseases)

2020 年 3 月

北海道大学

長谷 敬太郎

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	3 頁
緒言	6 頁
略語表	1 1 頁
第 1 章	
緒言	1 3 頁
実験方法	1 6 頁
実験結果	1 9 頁
考察	3 0 頁
第 2 章	
緒言	3 3 頁
実験方法	3 5 頁
実験結果	3 6 頁
考察	4 3 頁
第 3 章	
緒言	4 5 頁
実験方法	4 7 頁
実験結果	5 3 頁
考察	6 6 頁
結論および総括	6 9 頁
謝辞および利益相反	7 2 頁

引用文献	73 頁
------------	------

なお、本文における図、表の一部はすでに *PLoS One* および *Int J Ophthalmol* に掲載されており、本論文における使用にあたっては出版社より承諾を得ている。

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Keitaro Hase, Atsuhiko Kanda, Ikuyo Hirose, Kousuke Noda, Susumu Ishida.

Systemic factors related to soluble (pro)renin receptor in plasma of patients with proliferative diabetic retinopathy.

PLoS One, 12(12):e01896962017, (2017).

2. Keitaro Hase, Atsuhiko Kanda, Kousuke Noda, Susumu Ishida.

Increased plasma galectin-1 correlates with advanced glycation end products and interleukin-1 β in patients with proliferative diabetic retinopathy.

Int J Ophthalmol, 12(4):692-694, (2019).

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Keitaro Hase, Atsuhiko Kanda, Kousuke Noda, Susumu Ishida. A comprehensive analysis of serum levels of prorenin/renin and inflammation-associated molecules in proliferative diabetic retinopathy. ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) Annual Meeting. 2017/5/11. Baltimore, USA.

2. Keitaro Hase, Atsuhiko Kanda, Kousuke Noda, Susumu Ishida. Pathological role of receptor-associated prorenin system and tumor necrosis factor- α for the development of proliferative retinopathy in type II diabetes mellitus. 14th Congress of the International Ocular Inflammation Society. 2017/10/18-21. Lausanne, Switzerland.

3. Keitaro Hase. Systemic factors related to soluble (pro)renin receptor in plasma of patients with proliferative diabetic retinopathy. Sapporo Novel Ophthalmology Workshop. 2018/1/13. Sapporo.

4. 長谷敬太郎、神田敦宏、廣瀬育代、野田航介、石田晋. 増殖糖尿病網膜症患者の血漿中における可溶型（プロ）レニン受容体と全身的要因との関連性解析. 第10回（プロ）レニン受容体フォーラム. 2018/3/31. 東京.

5. 長谷敬太郎、神田敦宏、野田航介、石田晋. 増殖糖尿病網膜症患者における血漿ガレクチン-1 と炎症関連分子との相関解析. 第 122 回日本眼科学会総会. 2018/4/22. 大阪.
6. Keitaro Hase, Atsuhiko Kanda, Kousuke Noda, Susumu Ishida. Increased plasma galectin-1 is correlated with advanced glycation end products and interleukin-1 β in patients with proliferative diabetic retinopathy. ARVO Annual Meeting. 2018/5/3. Honolulu, Hawaii.
7. 長谷敬太郎、南場研一、北市伸義、岩田大樹、辻飛雄馬、和田はるか、清野研一郎、石田晋. 人工多能性幹細胞由来マクロファージ様免疫抑制細胞を用いたぶどう膜炎モデルの軽症化. 第 123 回日本眼科学会総会. 2019/4/19. 東京.
8. Keitaro Hase, Kenichi Namba, Nobuyoshi Kitaichi, Daiju Iwata, Hyuma Tsuji, Haruka Wada, Ken-ichiro Seino, Susumu Ishida. Induced pluripotent stem cells-derived suppressor cells ameliorate experimental autoimmune uveoretinitis in mice. ARVO Annual Meeting. 2019/4/28. Vancouver, Canada.
9. 長谷敬太郎、南場研一、北市伸義、岩田大樹、神田敦宏、辻飛雄馬、和田はるか、清野研一郎、石田晋. 人工多能性幹細胞由来マクロファージ様免疫抑制細胞を用いたぶどう膜網膜炎の制御. 第 9 回わかもと先進眼科医療研究会. 2019/8/2. 東京.

要旨

第1章:増殖糖尿病網膜症患者における血漿可溶型（プロ）レニン受容体と炎症関連分子の関連性解析

【背景と目的】 糖尿病網膜症とは、高血糖により網膜微小血管障害を生じ、それによって網膜血流障害を起こす疾患である。網膜症が進行し、網膜に新生血管や線維血管組織を形成する増殖糖尿病網膜症（PDR）まで至ると、血管新生緑内障や牽引性網膜剥離を併発し、重篤な視力障害を起こす。

一方、血圧や体液を調節する循環ホルモンシステムであるレニン・アンジオテンシン系（RAS）が、臓器局所では、細胞の分化と増殖、炎症、線維化などに関与して組織の修復など生理的な役割を担っており、組織 RAS と呼ばれている。近年、我々はこの組織 RAS の上流に位置する（プロ）レニン受容体 [(P)RR]が、眼内における血管内皮増殖因子（VEGF）などの炎症性サイトカインの発現を制御し、PDR をはじめとした炎症・血管新生を特徴とする眼疾患の病態形成に関与していることを示した。そこで本研究では、PDR 患者の血漿中における可溶型（プロ）レニン受容体[s(P)RR]タンパク質濃度と糖尿病による全身的要因との関連性について検討した。

【対象と方法】 2型糖尿病に合併した PDR 患者 20 名と対照群として非糖尿病患者（特発性黄斑上膜もしくは黄斑円孔）20 名の手術前に採取した血漿を用いて検討した。血漿中における s(P)RR やプロレニン、様々な糖尿病誘発性炎症関連分子のタンパク質濃度はマルチプレックス解析システムおよび酵素免疫測定法を用いて測定・解析を行った。さらに、ヒト網膜血管内皮細胞を用いて種々の条件下における遺伝子発現変化を定量的リアルタイム PCR にて解析した。

【結果と考察】 PDR 群において血漿 s(P)RR、プロレニンおよび活性型プロレニンが非糖尿病群に比べ高値であり、また炎症関連分子ではロイシンリッチ α 2 グリコプロテイン（LRG）1、腫瘍壊死因子（TNF）- α 、補体 D 因子（CFD）が有意に上昇していた。さらに、s(P)RR とそれら分子は有意な相関が認められたが、プロレニンとは相関がなかった。また、臨床検査項目と s(P)RR との関連性について調べたところ、腎機能障害のパラメーターである推算糸球体濾過値や血清クレアチニン値との相関が認められた。ヒト網膜血管内皮細胞を LRG1、TNF- α 、CFD で刺激したところ、TNF- α でのみ (P)RR/*ATP6AP2* 遺伝子の発現が上昇したが、

プロレニン/*REN* の発現は変化しなかった。また、高血糖条件下ではヒト網膜血管内皮細胞における (P)RR/*ATP6AP2* とプロレニン/*REN* の両方の発現が上昇した。
【結論】 慢性炎症、腎機能障害および高血糖など糖尿病誘導因子が血漿中 s(P)RR 濃度を上昇させ、さらには組織 RAS の活性化を誘導して PDR における網膜新生血管を促進していることが示唆された。

第 2 章：増殖糖尿病網膜症患者における血漿中のガレクチン-1 と炎症関連分子との相関解析

【背景と目的】 我々は血管新生因子ガレクチン-1 が PDR 患者の眼内において VEGF 非依存的に増加していること、ガレクチン-1 の発現制御に低酸素以外に終末糖化産物 (AGEs) およびインターロイキン (IL) -1β が関与していることを明らかにした。本研究では、血漿中ガレクチン-1 と低酸素誘導および炎症関連分子との相関について検討を行った。

【対象と方法】 対象は、2 型糖尿病 (DM) による PDR 患者 20 例、DM の既往がない特発性黄斑上膜および黄斑円孔患者 20 例から手術前に採取した血漿を用いて、マルチプレックス解析システムと酵素免疫測定法で種々の血漿中タンパク質濃度を測定した。

【結果と考察】 PDR 患者血漿中のガレクチン-1、AGEs、IL- 1β 濃度は、非 DM 群に比べ有意に高値であった。さらに、PDR 群では血漿ガレクチン-1 は AGEs や IL- 1β と正の相関を示したが、非 DM 群では相関はなかった。また、PDR 群と非 DM 群の両者ともに血漿中におけるガレクチン-1 は VEGF ならびに低酸素誘導分子 (IL-6、エリスロポエチンなど) との相関は認められなかった。

【結論】 眼内と関与する細胞成分は異なるが、血漿中ガレクチン-1 も AGEs と IL- 1β の経路を介した発現制御系が存在し、他の DM 合併症における様々な臓器での病態形成に関与していることが示唆された。

第 3 章：マクロファージ様人工多能性幹細胞由来免疫抑制細胞を用いたマウス実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎の軽症化

【背景と目的】 ぶどう膜炎は、虹彩、毛様体、脈絡膜で構成される眼球の中間層に生じる炎症である。これまでぶどう膜炎の治療には主としてステロイド薬、消炎鎮痛薬、免疫抑制薬が用いられてきた。しかし、これらの治療は対症療法にすぎないため、減量とともに再発することが多いことや、長期投与による副作用も

高頻度にみられることが問題となっている。そこで、疾患の根幹にあると考えられる過剰な自己免疫反応を抑え、対症療法に頼らない根治治療を目指すべく、免疫抑制細胞を用いた免疫治療に着目した。本研究では、人工多能性幹細胞（iPS細胞）から誘導したマクロファージ様 iPS 細胞由来免疫抑制細胞（iPS-SCs）を用いて、マウス実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎（EAU）の抑制効果を検討した。

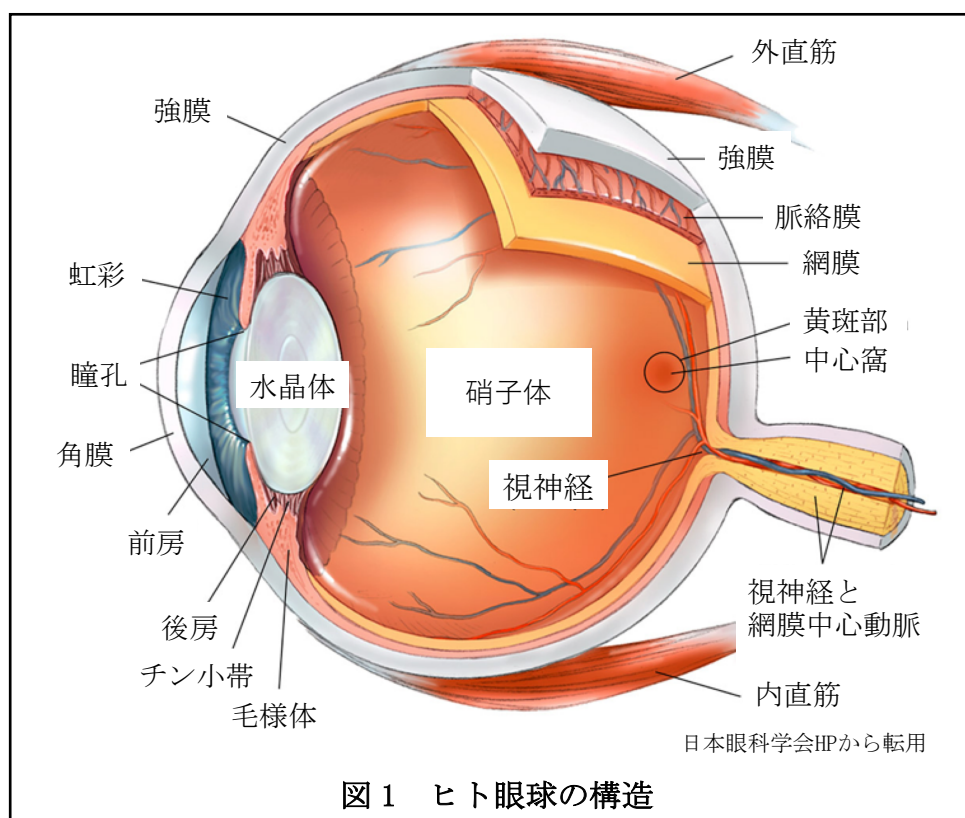
【対象と方法】 C57BL/6J マウスに、ヒト網膜視細胞間レチノイド結合蛋白由来合成ペプチド（hIRBPp1-20）と完全フロイントアジュバントのエマルジョンを皮下注射して EAU を誘導した。一方、C57BL/6J マウス脾臓 B 細胞由来の iPS 細胞から iPS-SCs を誘導した。治療群には iPS-SCs、対照群には溶媒のみをマウスに腹腔内投与した。臨床的重症度を経時的に観察し、21 日目に眼球を摘出して組織学的重症度を評価した。また、免疫後の所属リンパ節から抽出した CD4 陽性 T 細胞を抗原刺激する際に iPS-SCs を加えて、抗原特異的 T 細胞増殖反応と各種サイトカイン濃度を検討した。

【結果と考察】 マウス EAU における臨床的重症度は、iPS-SCs 投与群では対照群に比較して有意に炎症が軽症化しており、組織学的重症度においても有意な炎症の軽症化が認められた。次に、*in vitro* 解析の結果、抗原特異的 T 細胞の増殖は iPS-SCs の細胞数に依存して有意に抑制されることが示された。また、この T 細胞増殖抑制は iPS-SCs と他の細胞との接触がない状況下でも同様の結果が得られたことから、iPS-SCs 由来の液性因子に T 細胞増殖抑制能があると考えられた。そして培養上清では、ぶどう膜炎の病態に関わる炎症性サイトカインである TNF- α やインターフェロン（IFN）- γ の産生は、iPS-SCs の細胞数依存的に対照群と比べて有意に抑制されていた。また、iPS-SCs を含む培養上清では、免疫抑制に関わる分子である一酸化窒素（NO）とトランスフォーミング増殖因子（TGF）- β 1 濃度は有意に高値であった。

【結論】 iPS-SCs が液性因子を分泌することで、抗原特異的 T 細胞の増殖を抑制し、EAU における炎症病態を軽症化することが示唆された。

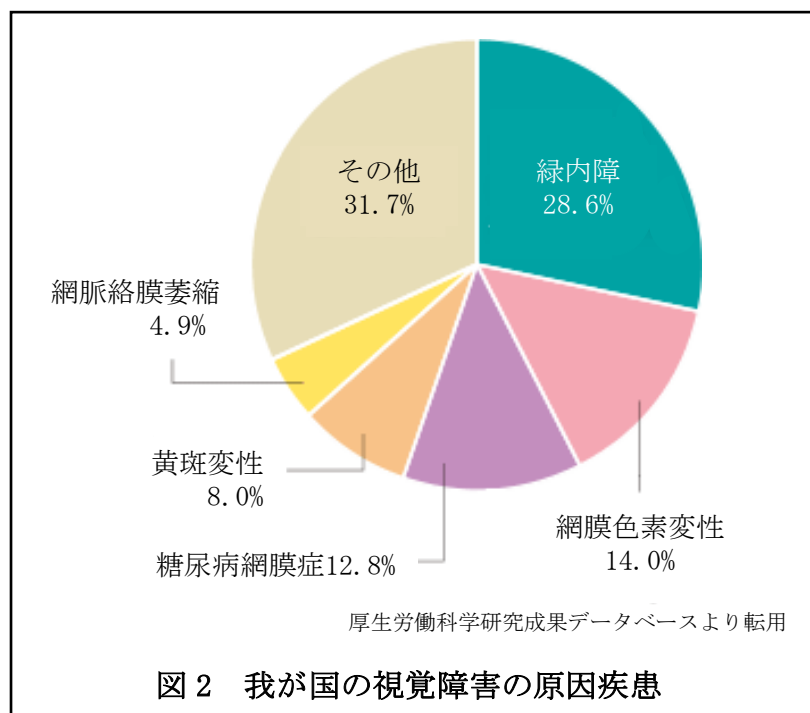
緒言

眼球は前後径が約 24mm で外壁と内容物から構成される（図 1）。外壁は 3 層構造をなし、外膜は角膜と強膜からなり、中膜は虹彩、毛様体、脈絡膜からなり、これら 3 者を総称してぶどう膜という。内膜は、脈絡膜の内面に接する網膜である。網膜の中心にはやや陥凹した黄斑があり、視力に最も重要な部位である。内容物は、前房と後房を満たす房水と水晶体と硝子体からなる。視覚の反応は、光が眼球の角膜から硝子体を通して網膜に達し、物理的な光エネルギーが、生体エネルギーに変換され、視神経を通して視覚中枢に伝達され、感覚として捉えられる。



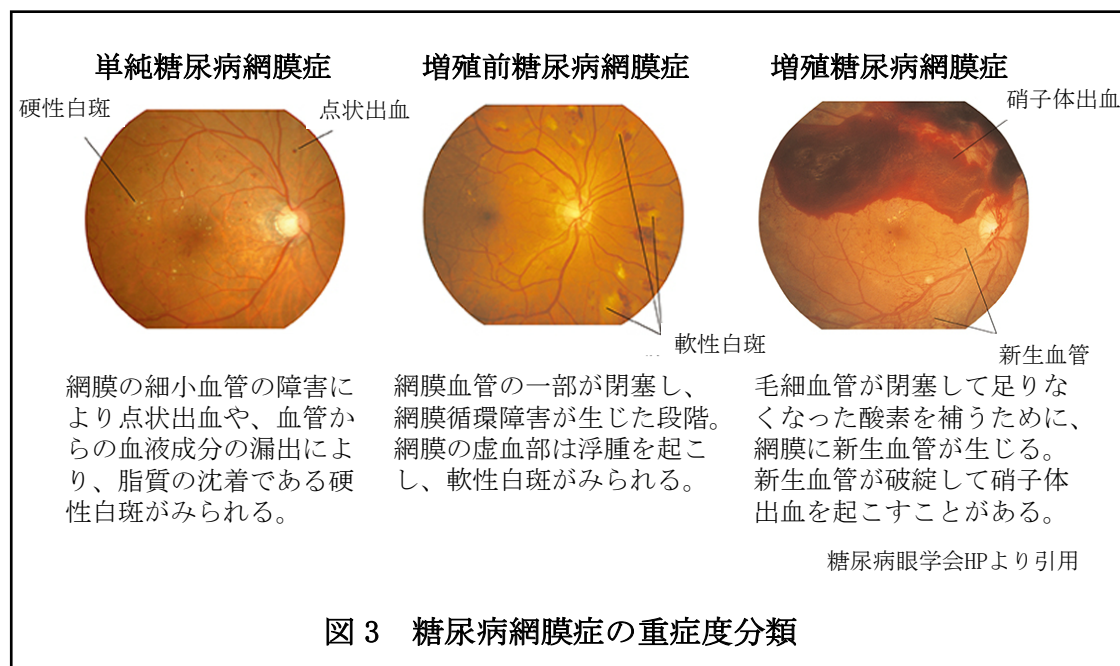
わが国はかつてない超高齢社会を迎えており、健康長寿という言葉に代表されるように、眼をはじめとする感覚器 (Quality of Vision) や循環器臓器の健康を維持することは、Quality of Life の向上に直結する重要課題となっている。しかしながら、我々を取り巻く環境は大きく変わり、近年の生活環境や食習慣の変化によって先進国における糖尿病の有病率は急速に増加しており、今後も高齢化の影響で罹病期間の長い糖尿病患者が増加すると予想されている。我

が国の視覚障害の原因疾患として、糖尿病網膜症が緑内障と網膜色素変性に次いで多いことが知られている（白神，2017）（図2）。



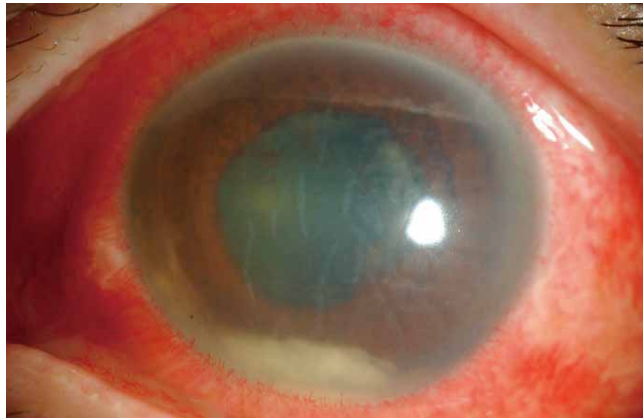
糖尿病網膜症の発症は、その罹病期間に依存することが知られており、近未来において網膜症を有する糖尿病患者が増加することは、明らかである。そのため、今後その発症機転や病態生理の解明が一層重要であると考えられる。

糖尿病網膜症は、糖尿病による高血糖が持続した結果、網膜の細小血管に障害が生じて網膜の機能や形態に異常を生じ、視機能が低下する疾患である。網膜症の病期は単純糖尿病網膜症・増殖前糖尿病網膜症・増殖糖尿病網膜症に分けられる（図3）。



単純糖尿病網膜症では、視力に影響を及ぼすことは少ないが、網膜細小血管構築の破壊が起こり、点状出血や、血管透過性亢進による網膜出血・硬性白斑（網膜への脂肪の沈着）を生じる。その後、毛細血管壁の異常が進行し、毛細血管床の閉塞を生じ、網膜が虚血状態になるのが、増殖前糖尿病網膜症である。この時期には、網膜虚血による軟性白斑とともに、出血斑や網膜浮腫の増大が認められる。網膜の中心部である黄斑部に浮腫（黄斑浮腫）を生じると、視力低下や歪みを惹起する。さらに、進行して網膜虚血が高度になると、それを代償するために、新生血管が網膜や視神経乳頭に現れ、増殖糖尿病網膜症となる。新生血管は容易に破綻して硝子体出血を生じたり、線維血管組織の形成により網膜を牽引して網膜剥離を生じると、高度な視力低下となることがある。この新生血管の形成は、虚血網膜から分泌される血管内皮増殖因子（VEGF）などの血管新生因子によって誘導される（Adamis et al., 1994）。近年、この VEGF に対する製剤が開発され、臨床応用されたことにより、治療成績は著しく向上している。しかしながら、現在でもなお臨床現場では治療抵抗性を示す症例も多く、抗 VEGF 製剤以外の薬剤の開発や臨床応用が期待されている。

一方、糖尿病の眼合併症として網膜症のほかに、ぶどう膜炎がある。ぶどう膜炎は、40 歳以上の中途失明原因の約 10% を占める難治性眼疾患である（図 4）。



日本眼炎症学会ぶどう膜炎診療ガイドラインより転用

図4 急性前部ぶどう膜炎の前眼部写真

強い結膜充血と前房炎症とともに前房下方に好中球の集簇である白色の沈殿物（前房蓄膿）を認める。

これは、眼球の中間層である、虹彩、毛様体、脈絡膜から構成されるぶどう膜の炎症疾患である。その多くがベーチェット病、サルコイドーシス、炎症性腸疾患に起因するが、糖尿病、感染症、悪性腫瘍など多種多様な原因や背景をもとに発症する。世界 25 カ所を調査した研究では、現在なおベーチェット病のぶどう膜炎患者の 1 / 4 が失明に至るといふ厳しい現実がある (Kitaichi et al., 2007)。ぶどう膜炎の多くは再発する可能性のある慢性疾患で、姑息的に眼炎症をコントロールするだけでなく、長期的観点から患者の視機能の維持を考える必要がある。治療法は、ステロイド薬や免疫抑制薬を中心とした治療であるが、副作用のために薬剤を使用できなかつたり、治療に抵抗する症例も多い。また、ぶどう膜炎は特に青壮年での発症が多く、患者本人はもちろん、社会的、経済的にも極めて重要な問題といえる。

近年、視機能予後の悪いぶどう膜炎の代表格であるベーチェット病に対して、2007 年から生物学的製剤である抗腫瘍壊死因子 (TNF) - α 製剤であるインフリキシマブが導入され、眼炎症発作が激減し、大きな改革をもたらしている。ただ、今のところインフリキシマブの使用はベーチェット病以外のぶどう膜炎では使用は認められておらず、ぶどう膜炎治療には今後新たな治療戦略が必要である。

糖尿病網膜症とぶどう膜炎は、いずれも難治性眼疾患であることから、これまでも数多くの研究が行われ、新たな生物学的製剤の開発が試みられている。し

かしながら、未だに現存の治療では病気の進行を抑えることができずに、失明に至ってしまう患者も少なからず見受けられる。

そこで、我々は失明率の高い難治性眼疾患である糖尿病網膜症とぶどう膜炎に対して、新たな分子を標的とした病態解明やバイオマーカーの探索、画期的な治療法を開発することを目指し、研究を行った。第 1 章では糖尿病網膜症の標的となりうる分子である（プロ）レニン受容体、第 2 章ではガレクチン-1 について糖尿病による全身的要因との関連性について検討を行った。第 3 章ではぶどう膜炎の新たな治療法の探索として、免疫抑制性細胞を用いたぶどう膜炎治療の可能性について研究を行った。

略語表

ACTB	β -actin
AGEs	advanced glycation end products
Ang II	angiotensin II
APC	antigen presenting cell
ARVO	association for research in vision and ophthalmology
AT1R	angiotensin II receptor type 1
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMP4	bone morphogenetic protein 4
CCL2	C-C motif ligand 2
CFA	complete Freund' s adjuvant
CFD	complement factor D
CRP	C-reactive protein
DM	diabetes mellitus
DME	diabetic macular edema
DR	diabetic retinopathy
EAU	experimental autoimmune uveoretinitis
EB	embryoid body
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
eGFR	estimated glomerular filtration rate
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EPO	erythropoietin
FGF	fibroblast growth factor
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
hIRBP	human interphotoreceptor retinoid-binding protein
HPC	hematopoietic progenitor cell
HRMECs	human retinal microvascular endothelial cells
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IFN- γ	interferon- γ
IgG	immunoglobulin G
IL	interleukin

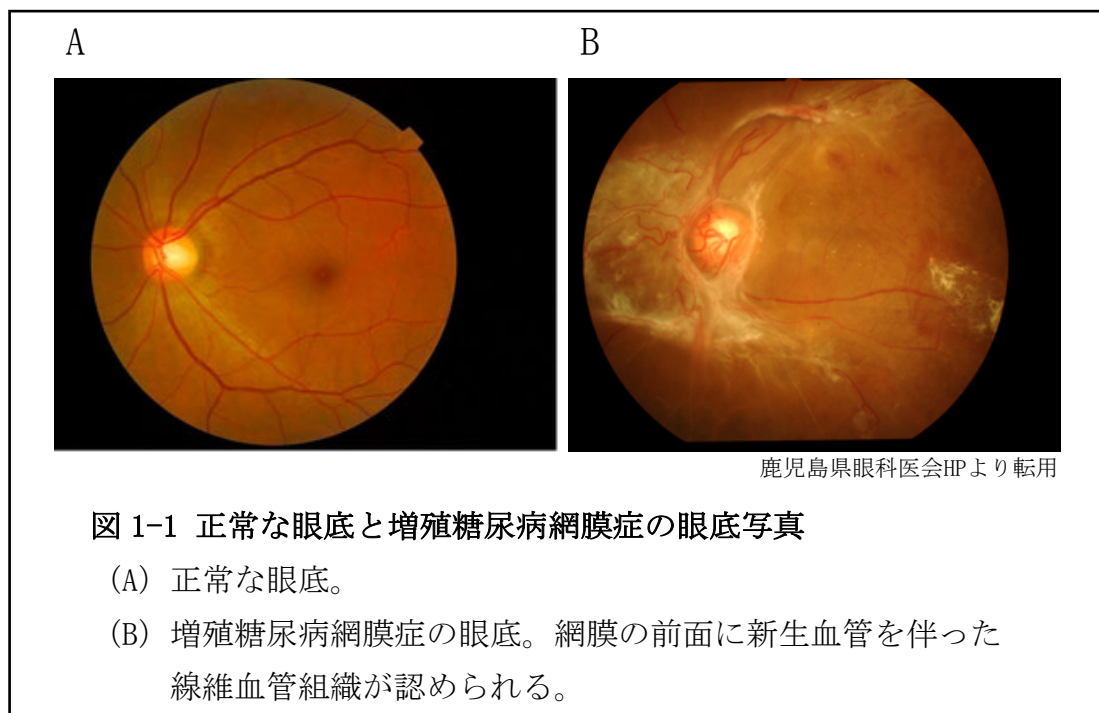
iPS-SCs	induced pluripotent stem cell-derived suppressor cells
IRB	institutional review board
K_D	dissociation constant
LDH	lactate dehydrogenase
L-NMMA	N ^G -Monomethyl-L-arginine, acetate
LPS	lipopolysaccharide
LRG1	leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	messenger ribonucleic acid
MSH	melanocyte stimulating hormone
NO	nitric oxide
PBS	phosphate buffered salts
PCC	pigeon cytochrome c
PDR	proliferative diabetic retinopathy
PlGF	placental growth factor
(P)RR	(pro)renin receptor
Psh	proline-modified short hairpin
PTX	pertussis toxin
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RAS	renin-angiotensin system
RAPS	receptor-associated prorenin system
sCr	serum creatinine
s(P)RR	soluble (pro)renin receptor
TGF- β	transforming growth factor- β
TLR4	toll-like receptor 4
TNF- α	tumor necrosis factor- α
VAP-1	vascular adhesion protein-1
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR2	vascular endothelial growth factor receptor 2

第1章

増殖糖尿病網膜症患者における血漿可溶型（プロ）レニン受容体と炎症関連分子の関連性解析

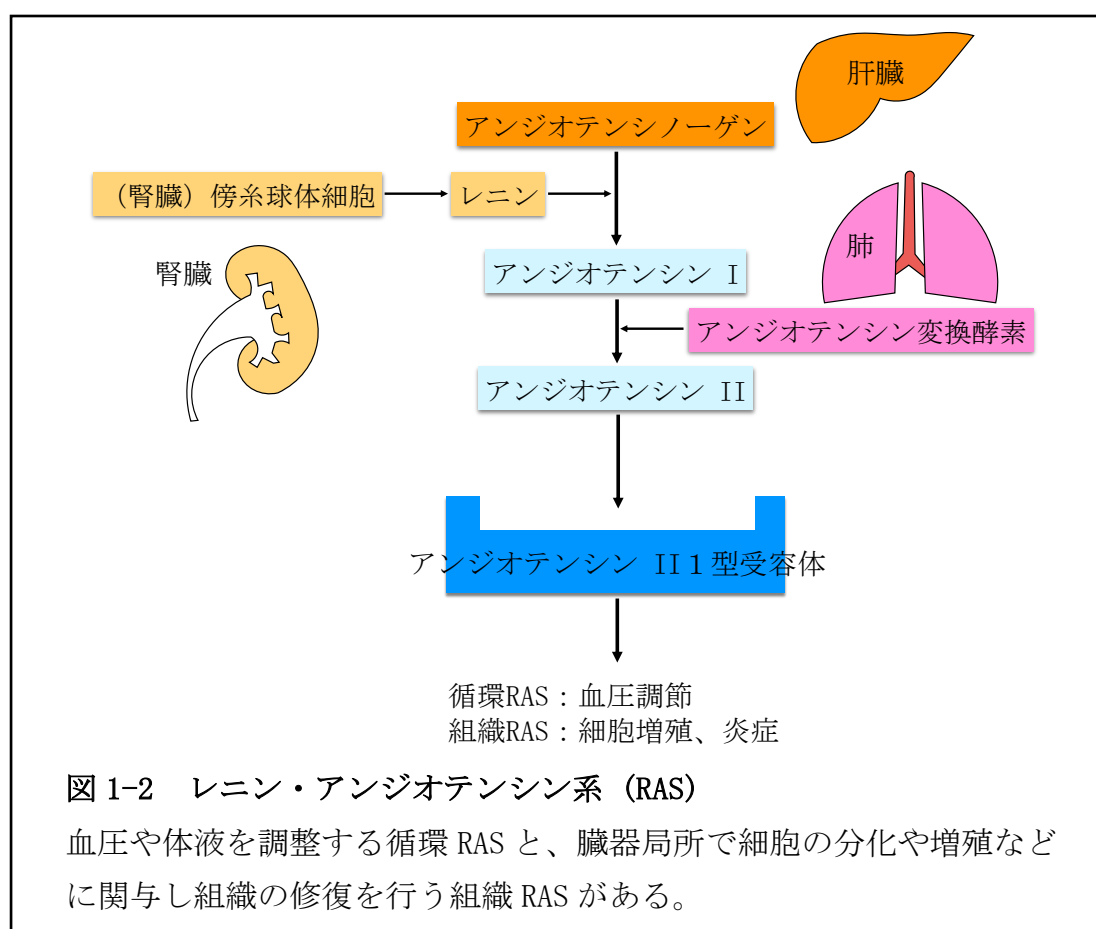
緒言

糖尿病網膜症（DR）とは、糖尿病の三大合併症の一つで、高血糖により網膜微小血管障害を生じ、それによって網膜血流障害を起こす疾患である。網膜症が進行し、網膜に新生血管や線維血管組織を形成する増殖糖尿病網膜症（PDR）（図1-1）まで至ると、血管新生緑内障や牽引性網膜剥離を併発し、重篤な視力障害を起こす。糖尿病網膜症の病態に関しては、慢性炎症による網膜への白血球浸潤が関与していることが知られている（Ishida et al., 2003; Miyamoto et al., 1999）。近年の生活習慣病の増加により、この慢性炎症が眼球のみならず様々な臓器で遷延化し、組織リモデリングから機能障害をきたすことが指摘されている。



レニン・アンジオテンシン系（RAS）は、肝臓で作られたアンジオテンシノーゲンが、腎臓で産生・分泌されたレニンによりアンジオテンシン I となり、さらに

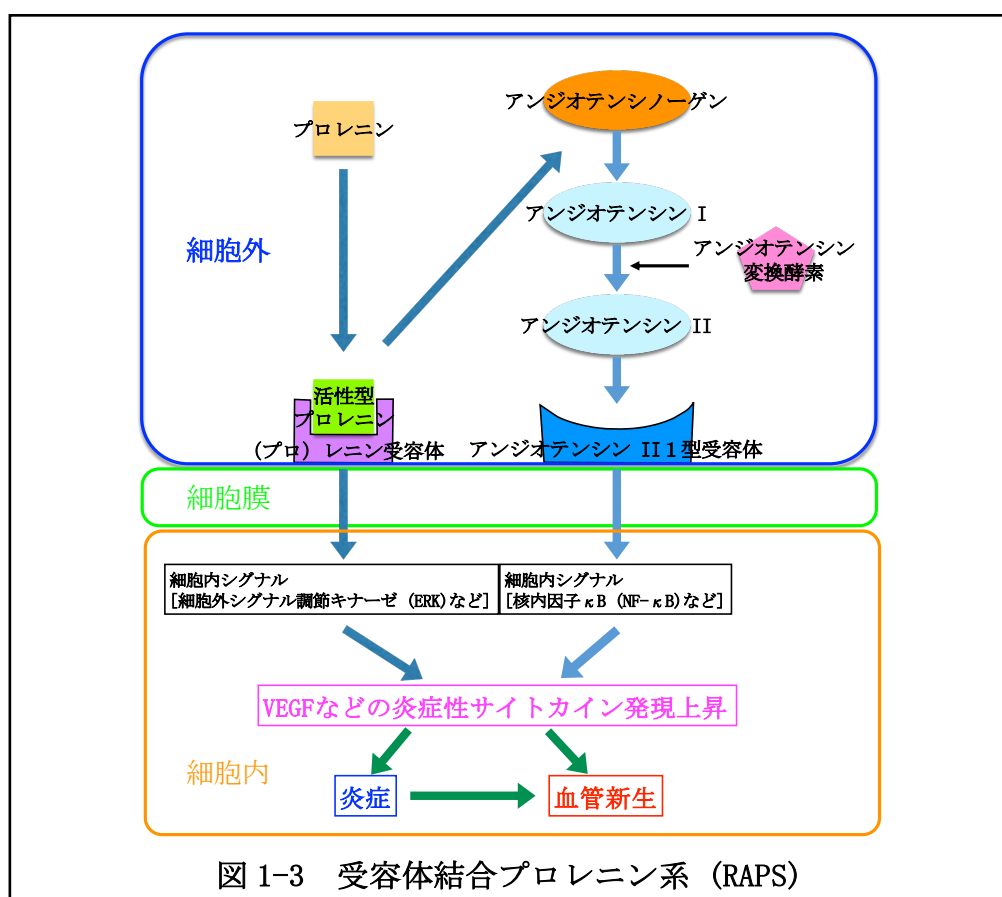
アンジオテンシン変換酵素によってアンジオテンシン II (Ang II) に変換される。最終活性ペプチドであるこの Ang II は、血管平滑筋や腎尿細管に存在する 1 型 Ang II 受容体 (AT1R) に作用し、血圧や体液を調節する循環ホルモンシステムである。そして、その阻害剤は高血圧治療薬として広く使われている。しかし、近年では臓器局所に RAS 関連分子が発現・局在しており、臓器局所では、細胞の分化と増殖、炎症、線維化などに関与して組織の修復など生理的な役割を担っている。そして、前者は循環 RAS、後者は組織 RAS と呼ばれている (図 1-2)。



近年の研究で、糖尿病などの生活習慣病の発症や進行には組織 RAS の活性化が関わっていることが明らかになった (Brenner et al., 2001; Takahashi et al., 2007)。また、正常血圧の糖尿病患者に RAS 抑制薬を投与すると網膜症の進行が抑えられる (Chaturvedi et al., 1998) という報告があり、我々の先行研究でもストレプトゾトシン誘導糖尿病モデルで、網膜における Ang II や AT1R の発現が上昇し、組織 RAS の活性化が認められた (Nagai et al., 2007)。このこ

とから、組織 RAS が糖尿病網膜症の発症や進行に関与していることが示唆されている。

さらに、我々は組織 RAS の上流に位置する（プロ）レニン受容体 [(P)RR] が、眼内における血管内皮増殖因子 (VEGF) などの炎症性サイトカインの発現を制御し、PDR をはじめとした炎症・血管新生を特徴とする眼疾患の病態形成に関与していることを示した (Kanda et al., 2012, 2013)。この病態概念を我々は受容体結合プロレニン系 (receptor-associated prorenin system: RAPS) と呼ぶ (図 1-3)。これはレニンの不活性酵素前駆体であるプロレニンが、まず (P)RR と結合し立体構造変化を起こし、活性型プロレニンとなる。続いて、活性型プロレニンが RAS による経路と RAS 非依存的な経路の 2 つの経路によって、細胞内シグナルを活性化し、炎症や血管新生を生じる。RAPS は、眼組織のみならず腎臓や心臓などの病態モデルにおいても認められ、糖尿病患者の眼内だけではなく全身でも糖尿病の病態に関与している可能性がある。そこで、本研究では PDR 患者の血漿中の可溶型 (P)RR [s(P)RR]、プロレニンといった RAS 関連分子と炎症関連分子濃度を測定・解析することで、RAS 関連分子と慢性炎症などの糖尿病が誘発する全身因子との因果関係について調べた。



実験方法

1. 臨床検体

2012 年から 2014 年にかけて、北海道大学病院眼科にて硝子体手術が施行された 2 型糖尿病による PDR 患者（20 例男性 7 例、女性 13 例、平均年齢 62.40 ± 1.95 歳）と対照群として非糖尿病（特発性黄斑上膜もしくは黄斑円孔）患者（20 例男性 10 例、女性 10 例、平均年齢 63.35 ± 0.96 ）において術前に採取された血漿を用いた。本研究に使用した臨床検体は全て書面により同意を得た患者より採取しており、臨床検体の扱いは北海道大学病院自主臨床研究審査委員会に承認を受け（IRB No. 011-0172）、「北海道大学病院における臨床研究の取り扱いに関する指針」に準じた。

2. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

血漿中のプロレニン、s(P)RR、ロイシンリッチ $\alpha 2$ グリコプロテイン (LRG) 1 濃度は、ヒトプロレニン (Abcam, Cambridge, UK)、s(P)RR (Immuno-Biological Laboratories, Gunma, Japan)、LRG1 (Immuno-Biological Laboratories) の ELISA キットを使用し、マイクロプレートリーダー (Sunrise, m  nnedorf, Switzerland) で測定した。

また、腫瘍壊死因子 (TNF) $-\alpha$ 、補体 D 因子 (CFD)、白血球接着分子 (VAP) -1 、単球走化性促進因子 (MCP) $-1/CC$ モチーフリガンド (CCL) 2、インターフェロン (IFN) $-\gamma$ 、インターロイキン (IL) -6 、血管細胞接着分子 (VCAM) -1 、細胞内接着分子 (ICAM) -1 、線維芽細胞増殖因子 (FGF) -1 、FGF-2、胎盤成長因子 (PlGF)、エンドスタチン、VEGF 濃度は、MAGPIX (Millipore, Austin, TX, USA) と磁気マルチプレックスビーズアッセイ用の Luminex[®]アッセイキット (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を使用して測定した。

活性型プロレニンはプロレニンが s(P)RR と結合することで作られ、プロレニンと s(P)RR の結合における解離定数 (K_D) は既報に従い以下のとおり計算した (Biswas et al., 2011)。

$$K_D (4.0 \text{ nmol/l}) = [\text{プロレニン}] \times [\text{s(P)RR}] / [\text{活性型プロレニン}]$$

3. 細胞培養

ヒト網膜血管内皮細胞 (HRMEC) (Cell Systems Corporation, Kirkland, WA, USA) を定常状態の血値値と同等の 5mM グルコースを含有した CS-C 完全培地

(Cell Systems Corporation) を用いて培養した。血清を除去した後、HRMEC をリコンビナントヒト TNF- α (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) と CFD (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) と LRG1 (R&D Systems) で 24 時間刺激して mRNA 発現量を測定した。TNF- α を中和するために、リコンビナントヒト TNF- α をウサギ抗 TNF- α 中和抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) で 37°C 15 分前処理した後に、24 時間培養し、遺伝子発現を測定した。抗 TNF- α 中和抗体のコントロールとして正常ウサギ IgG 抗体 (R&D Systems) を使用した。高血糖条件では、高グルコース負荷として 30mM グルコースを含有した CS-C 完全培地 (Cell Systems Corporation) を用いて培養した。

4. リアルタイム定量 PCR (qPCR)

細胞からの全 RNA の分離と逆転写は、SuperPrep® Cell Lysis & RT Kit for qPCR (TOYOBO, Tokyo, Japan) を使用し、末梢血からの全 RNA の分離と逆転写は、PAXgene® Blood RNA Isolation Kit (QIAGEN, Venlo, The Netherlands) と GoScrip Reverse™ Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) を使用して行った。使用したプライマーは以下の通りである。*ATP6AP2* [(P)RR; forward 5'-AGG CAG TGT CAT TTC GTA CC-3', reverse 5'-GCC TTC CCT ACC ATA TAC ACT C-3'], *TNFA* (TNF- α ; forward 5'-ACT TTG GAG TGA TCG GCC-3', reverse 5'-GCT TGA GGG TTT GCT ACA AC-3'), *CFD* (forward 5'-GAC ACC ATC GAC CAC GAC-3', reverse 5'-GTT GAC TAT GCC CCA GCC-3'), *LRG1* (forward 5'-GTT GGA GAC CTT GCC ACC T-3', reverse 5'-GCT TGT TGC CGT TCA GGA-3'), *ACTB* (β -actin; forward 5'-CTG GAA CGG TGA AGG TGA CA-3', reverse 5'-AAG GGA CTT CCT GTA ACA ATG CA-3'), *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; forward 5'-AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG-3', reverse 5'-TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA-3')。REN (プロレニン) は TaqMan プローブ (Thermo Fisher Scientific) を使用し、Real-time qPCR は GoTaq qPCR Master mix (Promega)、THUNDERBIRD Probe qPCR Mix (TOYOBO) と StepOne plus Systems (Thermo Fisher Scientific) を使用して行った。

5. 統計解析

すべての結果は平均値±標準誤差で示した。また、各群間の比較にはスチューデントの T 検定を用いて解析し、相関に関してはスピアマン順位相関係数を用

いて解析した。 p 値が 0.05 未満を呈した場合に統計学的に有意差があると評価した。

実験結果

1. 患者の臨床的背景

特発性黄斑疾患患者 20 名（平均年齢 63.35 ± 0.96 歳）（Non-DM 患者群）と PDR 合併 2 型糖尿病患者 20 名（平均年齢 62.40 ± 1.95 歳）（PDR 患者群）の血漿を用いて解析を行った。両群での年齢の有意差は認められず ($p = 0.665$)、さらに性別でも有意差は認められなかった ($p = 0.5$)。患者の臨床的な背景では、随時血糖値（Non-DM 群 = 105.90 ± 2.95 mg/dl、PDR 群 = 159.40 ± 12.02 mg/dl、 $p < 0.001$ ）と血清クレアチニン値（Non-DM 群 = 0.71 ± 0.03 mg/dl、PDR 群 = 1.00 ± 0.11 mg/dl、 $p < 0.05$ ）と視力（Log 最小視角）（Non-DM 群 = 0.71 ± 0.09 、PDR 群 = 1.28 ± 0.16 mg/dl、 $p < 0.01$ ）は両群で有意差を認めたが、それ以外には有意差は認めなかった（表 1-1）。

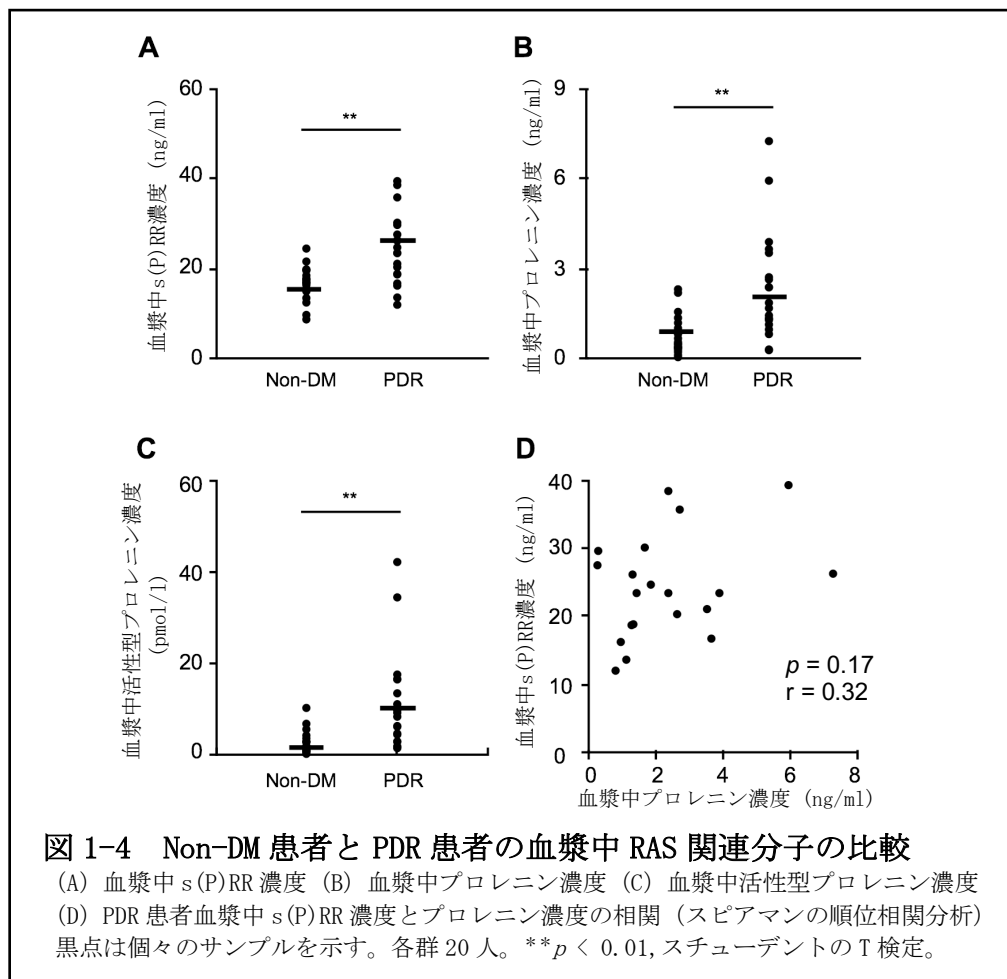
表 1-1 Non-DM 患者と PDR 患者の臨床像

患者	Non-DM	PDR	p値
数 (人)	20	20	-
年齢 (歳)	63.35 ± 0.96	62.40 ± 1.95	0.665
性別 (% 男性)	50	35	0.523 [#]
随時血糖 (mg/dl)	105.90 ± 2.95	159.40 ± 12.02	2.934E-04
ヘモグロビンA1c (%)	Not tested	7.12 ± 0.28	-
罹病期間 (年)	Not applicable	12.94 ± 1.89	-
高血圧 (%)	45	55	0.752 [#]
Body Mass Index	23.60 ± 0.73	24.28 ± 0.96	0.580
アンジオテンシン II 受容体拮抗薬内服 (%)	35	45	0.748 [#]
収縮期血圧 (mmHg)	128.50 ± 3.82	132.00 ± 4.49	0.556
拡張期血圧 (mmHg)	71.70 ± 2.04	73.35 ± 3.20	0.666
血清クレアチニン値 (mg/dl)	0.71 ± 0.03	1.00 ± 0.11	0.024
推算糸球体濾過値 (ml/min/1.73m ²)	76.45 ± 3.49	64.02 ± 7.34	0.138
視力 (Log 最小視角)	0.71 ± 0.09	1.28 ± 0.16	0.003
眼圧 (mmHg)	14.75 ± 0.79	15.00 ± 0.83	0.829
中心網膜厚 (μ m)	222.30 ± 63.38	349.80 ± 42.20	0.103

すべての結果は平均値±標準誤差で示す。統計解析はスチューデントのT検定もしくは[#]フィッシャーの正確確立検定を使用。

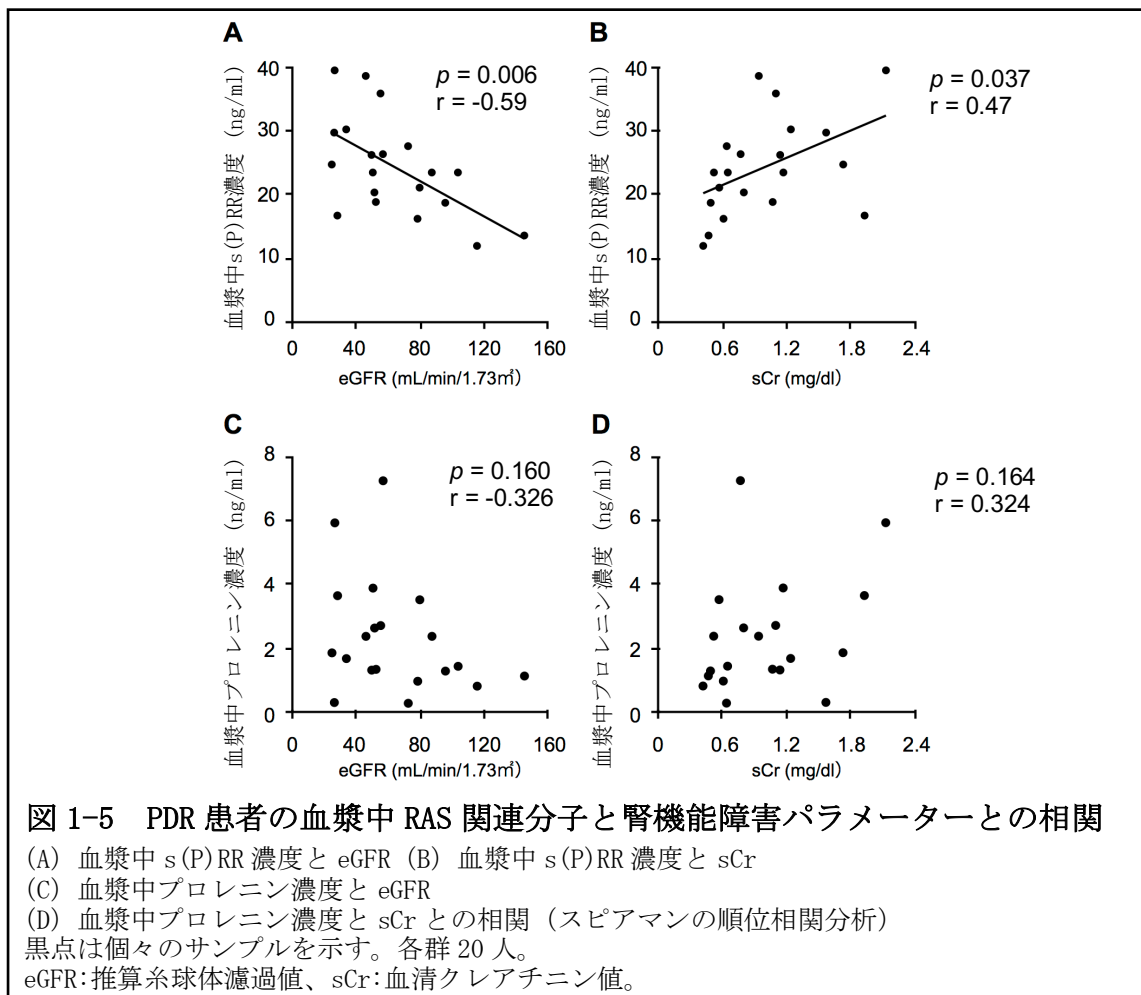
2. PDR 患者血漿中 s(P)RR、プロレニン、活性型プロレニン濃度の上昇

血漿中の s(P)RR 濃度とプロレニン濃度の上昇は妊娠高血圧腎症や心不全を合併した腎不全などの様々な病態に関与することが知られている (Amari et al., 2016; Fukushima et al., 2013; Hamada et al., 2013; Morimoto et al., 2014; Ohashi et al., 2016; Tan et al., 2014; Thomason et al., 2015; Watanabe et al., 2012)。全身における RAS 関連分子の関与を調べるために、Non-DM 群と PDR 群の血漿中の RAS 関連分子濃度を ELISA で測定した。Non-DM 群 [s(P)RR = 16.60 ± 0.85 ng/ml、プロレニン = 0.77 ± 0.14 ng/ml] と比較して、s(P)RR 濃度とプロレニン濃度が PDR 群 [s(P)RR = 24.34 ± 1.72 ng/ml、プロレニン = 2.33 ± 0.40 ng/ml、 $p < 0.01$] で有意に上昇していた。さらに、活性型プロレニン濃度は、Non-DM 群 (2.48 ± 0.57 pmol/l) に比べて PDR 群 (11.04 ± 2.40 pmol/l) では有意に上昇していた ($p < 0.01$)。一方で、PDR 群の血漿中 s(P)RR 濃度とプロレニン濃度の間には有意な相関は認められなかった (図 1-4)。



3. PDR 患者血漿中 s(P)RR 濃度と腎機能障害パラメーターとの相関

血漿中の s(P)RR 濃度は、心不全や腎不全や本態性高血圧の患者では、腎機能障害の指標である推算糸球体濾過値 (eGFR) と負の相関があると報告されている (Fukushima et al., 2013; Hamada et al., 2013; Morimoto et al., 2014)。そこで、血漿中 s(P)RR 濃度と腎機能障害パラメーターである eGFR と血清クレアチニン値 (sCr) との相関について調べた。結果、Non-DM 群では血漿中の s(P)RR 濃度と腎機能障害パラメーターとの間には有意な相関が認められなかったのに対し、PDR 群では血漿中の s(P)RR 濃度と eGFR との間には有意な負の相関 ($p = 0.006$, $r = -0.59$) があり、sCr との間には有意な正の相関 ($p = 0.037$, $r = 0.47$) が認められた。一方で、血漿中のプロレニン濃度は、Non-DM 群と PDR 群ともに、eGFR や sCr との間に有意な相関は認められなかった (図 1-5)。



このことは、血漿中 s(P)RR 濃度は糖尿病における腎機能障害の指標となる可能性を示している。

4. PDR 患者血漿中における炎症や血管新生に関わる分子濃度

糖尿病により長期間高血糖が続くと、ポリオール経路やプロテインキナーゼ C 活性化など、いくつかの経路が活性化する (Graves and Kayal, 2008)。これらの経路の活性化が糖尿病患者の血漿中では、TNF- α や VAP-1 といった炎症関連分子を上昇させ、臓器で慢性炎症を起こすことが知られている (Doganay et al., 2002; Graves and Kayal, 2008; Guha et al., 2000; Shanmugam et al., 2003; Yoshikawa et al., 2013)。そこで、PDR 患者の血漿中で上昇する s(P)RR と関連のある炎症関連分子を探索するために、炎症や血管新生に関連のある様々な分子濃度を測定した。その中では、PDR 患者では、Non-DM 患者に比べて血漿中の TNF- α 、CFD、LRG-1、VAP-1 濃度が有意に上昇していた (TNF- α = 0.45 ± 0.04 vs. 0.34 ± 0.02 pg/ml, $p = 0.015$; CFD = 542.81 ± 67.37 vs. 362.40 ± 22.36 ng/ml, $p = 0.018$; LRG1 = 13.28 ± 1.33 vs. 7.68 ± 0.93 μ g/ml, $p = 0.001$; VAP-1 = 38.41 ± 1.69 vs. 22.25 ± 1.04 ng/ml, $p < 0.001$) (表 1-2)。

表 1-2 患者血漿中炎症性サイトカインと血管新生因子濃度

	Non-DM	PDR	p 値
TNF- α (pg/ml)	0.34 ± 0.02	0.45 ± 0.04	0.015
CFD (ng/ml)	362.40 ± 22.36	542.81 ± 67.37	0.018
LRG1 (μ g/ml)	7.68 ± 0.93	13.28 ± 1.33	0.001
VAP-1 (ng/ml)	22.25 ± 1.04	38.41 ± 1.69	2.865E-09
MCP-1/CCL2 (pg/ml)	15.27 ± 2.40	15.07 ± 1.32	0.945
IFN- γ (pg/ml)	1.26 ± 0.01	1.28 ± 0.01	0.097
IL-6 (pg/ml)	0.22 ± 0.03	0.25 ± 0.04	0.455
VCAM-1 (ng/ml)	144.87 ± 24.28	376.79 ± 117.57	0.067
ICAM-1 (ng/ml)	3.00 ± 0.96	8.29 ± 4.15	0.229
FGF-1 (pg/ml)	1.99 ± 0.38	1.62 ± 0.12	0.370
FGF-2 (pg/ml)	1.20 ± 0.06	1.13 ± 0.05	0.363
PlGF (pg/ml)	0.04 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.419
Endostatin (ng/ml)	3.63 ± 0.32	4.31 ± 0.54	0.286
VEGF (pg/ml)	0.41 ± 0.02	0.44 ± 0.04	0.605

TNF: 腫瘍壊死因子、CFD: 補体因子D、LRG1: ロイシンリッチ α 2グリコプロテイン、VAP: 白血球接着分子、MCP: 単球走化性促進因子、CCL: C-Cモチーフリガンド、IFN: インターフェロン、IL: インターロイキン、VCAM: 血管細胞接着分子、ICAM: 細胞内接着分子、FGF: 線維芽細胞増殖因子、PlGF: 胎盤成長因子、VEGF: 血管内皮増殖因子。すべての結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示す。各群20人。統計解析はスチューデントのT検定を使用。

5. PDR 患者血漿中 RAS 関連分子濃度と炎症関連分子濃度との相関

PDR 患者の血漿中で上昇していた TNF- α 、CFD、LRG1、VAP-1 濃度と s(P)RR 濃度との相関について解析した。TNF- α 、CFD、LRG1 濃度は s(P)RR 濃度との間に有意な正の相関が認められたが (TNF- α , $p = 0.003$, $r = 0.64$; CFD, $p = 0.027$, $r = 0.49$; LRG1, $p = 0.0005$, $r = 0.71$)、VAP-1 濃度との相関は認められなかった ($p = 0.532$, $r = -0.15$)。なお、対照群である Non-DM 群ではすべての分子において s(P)RR 濃度との間に有意な相関は認められなかった (図 1-6)。

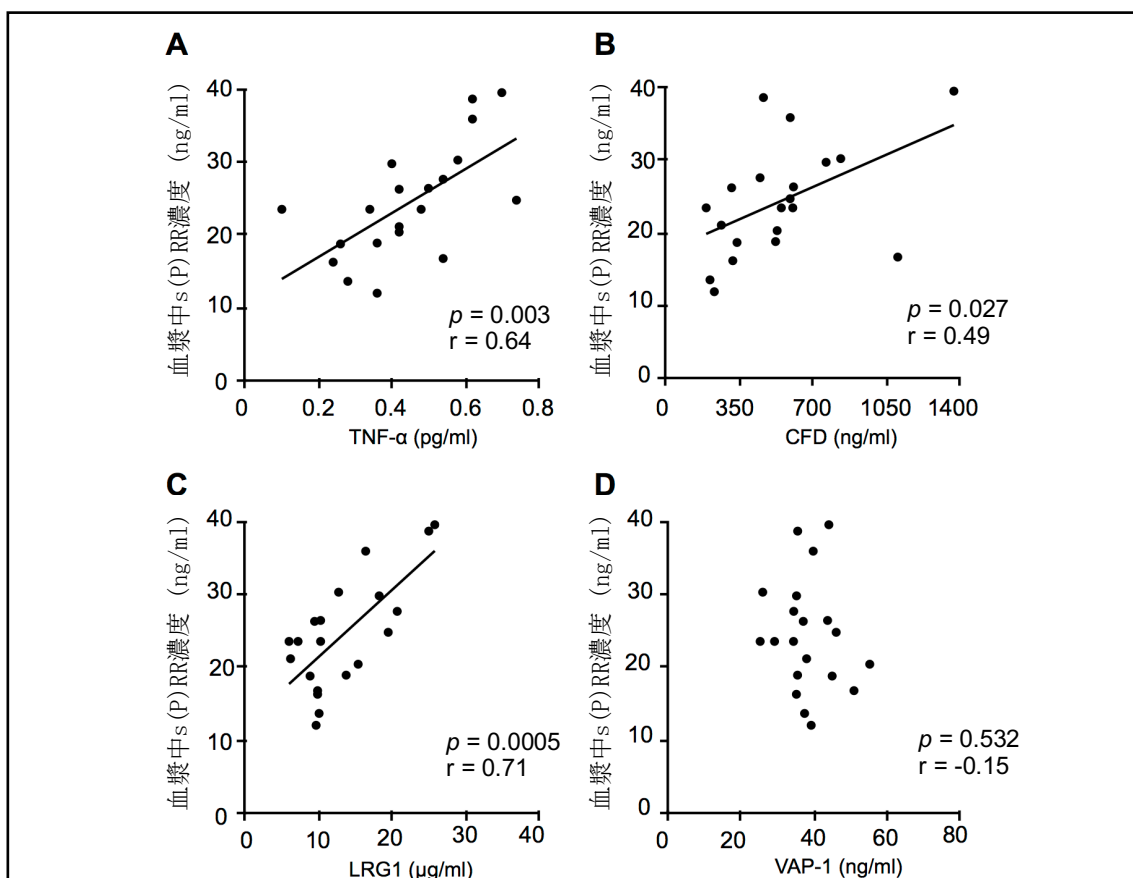
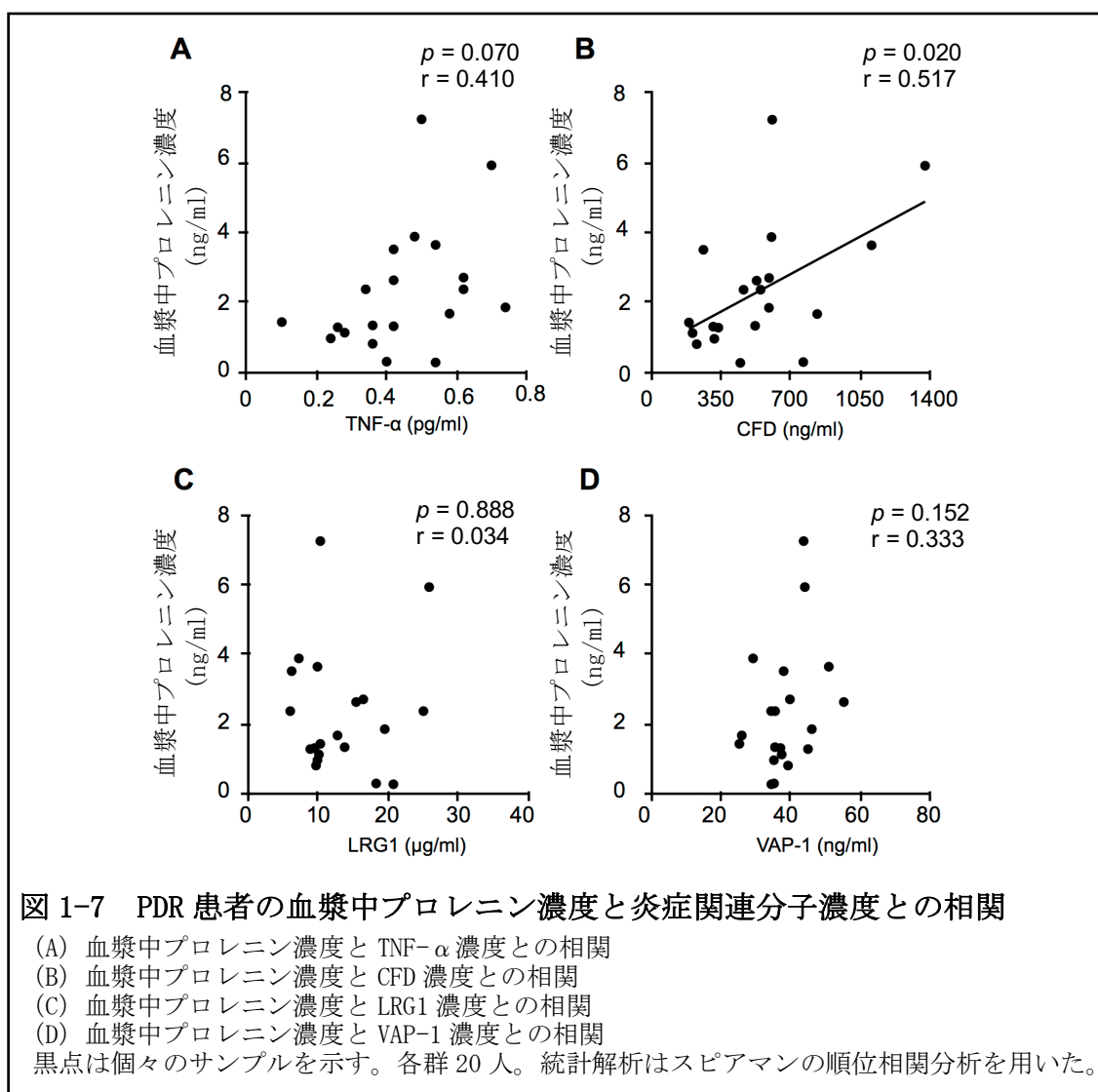


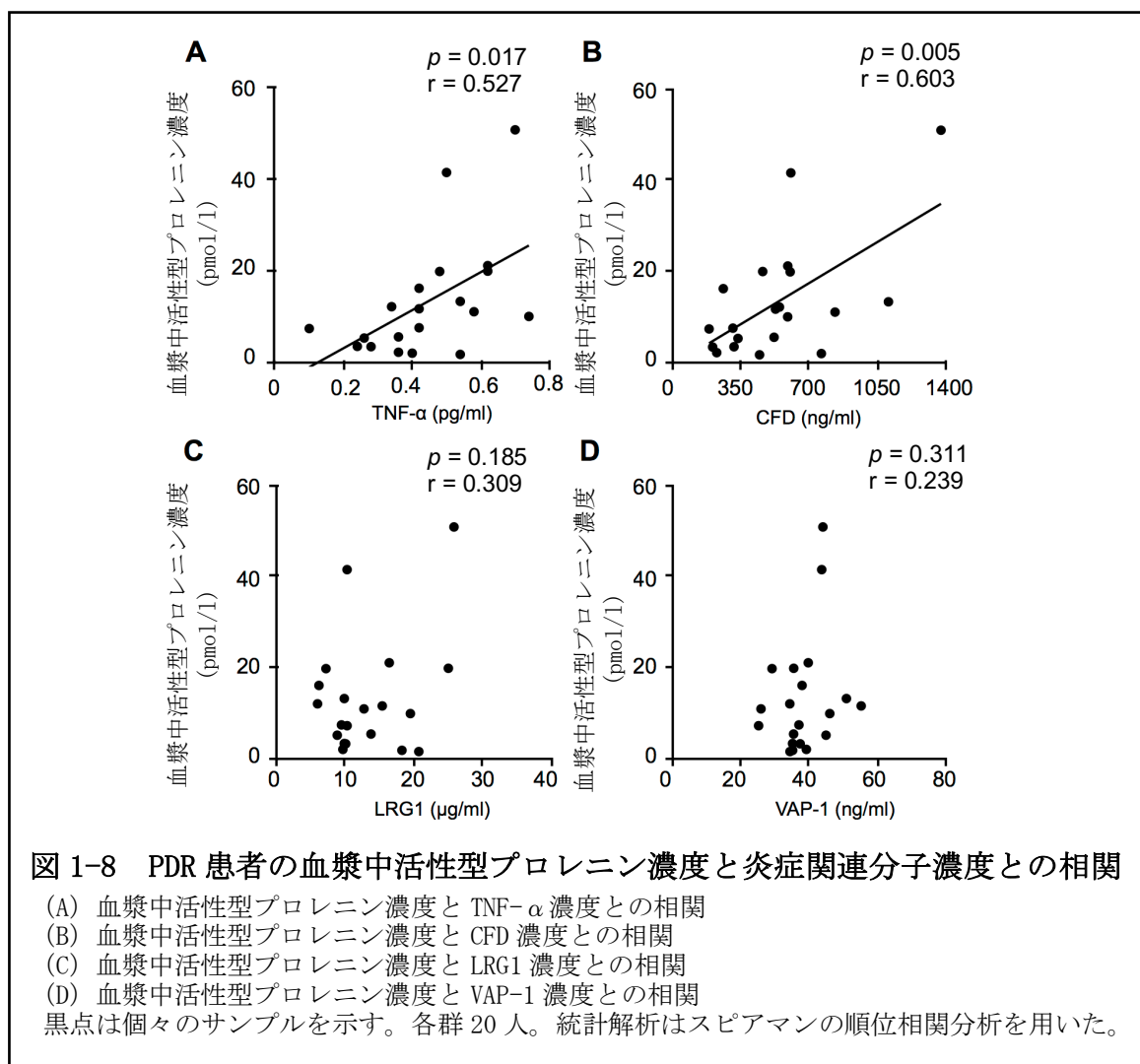
図 1-6 PDR 患者の血漿中 s(P)RR 濃度と炎症関連分子濃度との相関

(A) 血漿中 s(P)RR 濃度と TNF- α 濃度との相関 (B) 血漿中 s(P)RR 濃度と CFD 濃度との相関
(C) 血漿中 s(P)RR 濃度と LRG1 濃度との相関 (D) 血漿中 s(P)RR 濃度と VAP-1 濃度との相関
黒点は個々のサンプルを示す。各群 20 人。統計解析はスピアマンの順位相関分析を用いた。

次に、プロレニンと炎症関連分子との相関を調べたところ、PDR 患者では CFD のみ有意な相関が認められた ($p = 0.020$, $r = 0.517$) が、それ以外の $\text{TNF-}\alpha$ 、LRG1、VAP-1 では有意な相関が認められなかった ($\text{TNF-}\alpha$, $p = 0.07$, $r = 0.410$; LRG1, $p = 0.888$, $r = 0.034$; VAP-1, $p = 0.152$, $r = 0.333$) (図 1-7)。



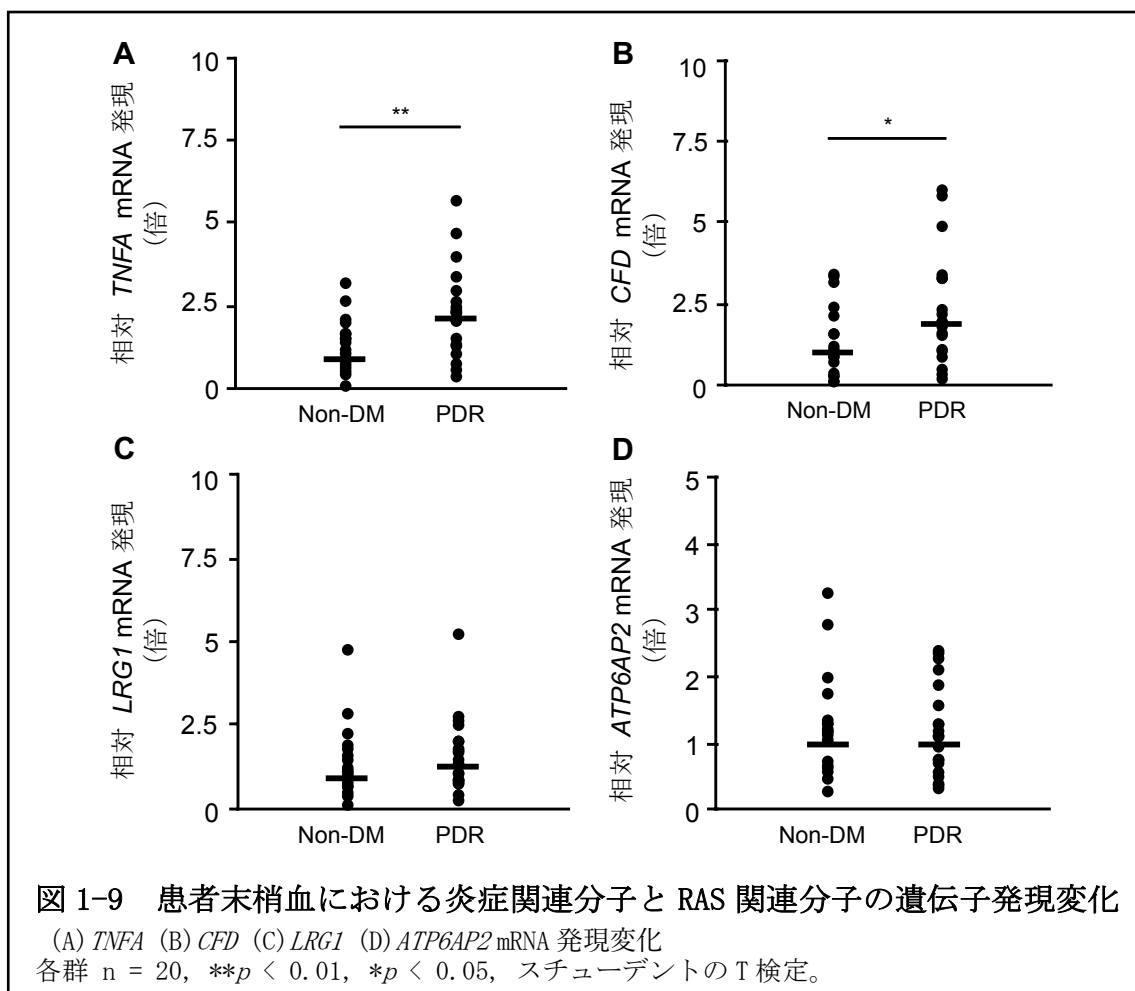
活性型プロレニン濃度と炎症関連分子濃度との相関を調べたところ、PDR 患者では TNF- α 濃度と CFD 濃度で有意な相関が認められたが、LRG1、VAP-1 濃度では有意な相関が認められなかった (TNF- α , $p = 0.017$, $r = 0.527$; CFD, $p = 0.005$, $r = 0.603$; LRG1, $p = 0.185$, $r = 0.309$; VAP-1, $p = 0.311$, $r = 0.239$) (図 1-8)。



以上の結果から、VAP-1 はどの RAS 関連分子とも相関は認められず、RAS 非依存的な機構で制御されていると示唆される。

6. PDR 患者白血球中の RAS 関連分子と炎症関連分子の mRNA 発現

RAS に関連する炎症関連分子 ($TNF-\alpha$ 、 CFD 、 $LRG1$)、(P)RR ($ATP6AP2$)、プロレニン (REN) の白血球における mRNA 遺伝子発現をリアルタイム定量 PCR で調べた。その結果、 $TNFA$ と CFD の mRNA は PDR 群では Non-DM 群に比べて有意に上昇していた ($TNFA$, fold change = 1.91, $p < 0.01$; CFD , fold change = 1.65, $p < 0.05$)。 $LRG1$ と $ATP6AP2$ は PDR 群と Non-DM 群で有意差は認められなかった ($LRG1$, fold change = 1.37, $p > 0.05$; $ATP6AP2$, fold change = 1.07, $p > 0.05$) (図 1-9)。

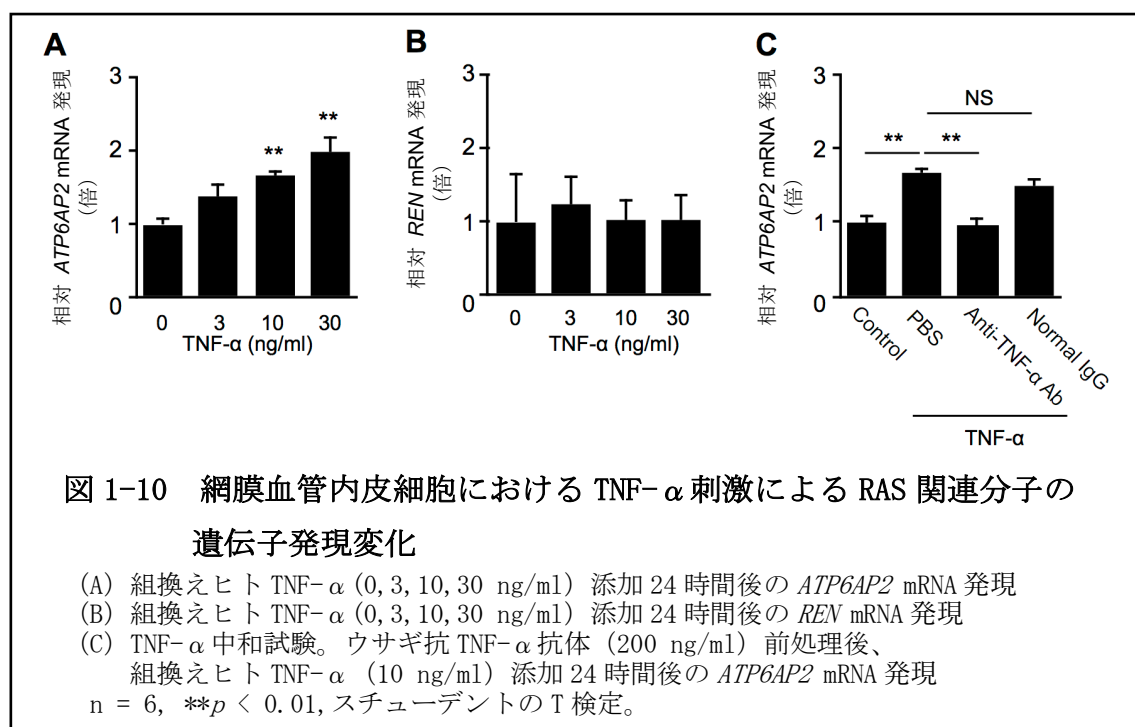


REN mRNA は検出されなかった。これらの結果は $LRG1$ や s(P)RR やプロレニンは循環血液中の白血球由来ではないことを示唆している。

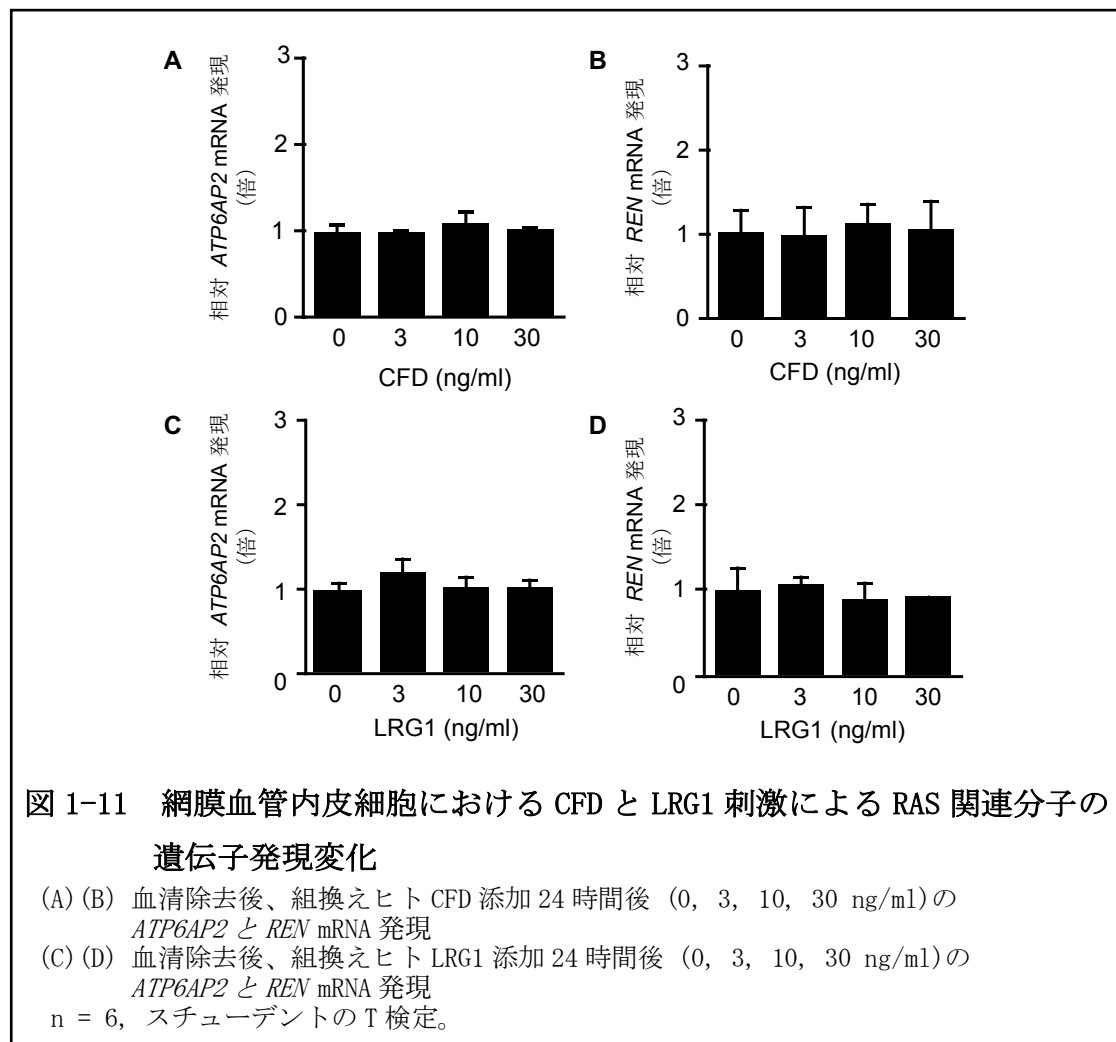
7. 網膜血管内皮細胞における TNF- α とグルコースによる RAS 関連分子の誘導

これまでの我々の研究で、PDR 患者の線維血管組織において、(P)RR とプロレニンが網膜新生血管の内皮細胞に共局在することを報告した (Kanda et al., 2012)。さらに、上述 6 の解析で血漿中の s(P)RR の上昇は、白血球由来でないことがわかったので、*in vitro* では (P)RR やプロレニンを制御している上流の分子を同定するために、培養ヒト網膜血管内皮細胞 (HRMEC) を用いた解析を次に行った。

RAS 関連分子と血漿中濃度の相関が認められた炎症関連分子 TNF- α 、CFD、LRG1 との因果関係を検証するために、HRMEC においてこれらの炎症関連分子で刺激した際の (P)RR/*ATP6AP2* とプロレニン/*REN* の mRNA 発現量の変化について調べた。結果、TNF- α で刺激した際には *REN* 発現量は変化がなかった (3 ng/ml, fold change = 1.23, $p > 0.05$; 10 ng/ml, fold change = 1.03, $p > 0.05$; 30 ng/ml, fold change = 1.02, $p > 0.05$) (図 1-10B) のに対して、*ATP6AP2* 発現量は濃度依存的に有意に上昇した (3 ng/ml, fold change = 1.36, $p > 0.05$; 10 ng/ml, fold change = 1.66, $p < 0.01$; 30 ng/ml, fold change = 1.99, $p < 0.01$) (図 1-10A)。さらに、HRMEC において TNF- α 刺激によって上昇した *ATP6AP2* 発現が、対照となる正常 IgG 抗体では抑制されなかった (fold change = 1.51) のに対して、TNF- α の中和抗体の事前投与によって抑制された (fold change = 0.96, $p < 0.01$) (図 1-10C)。

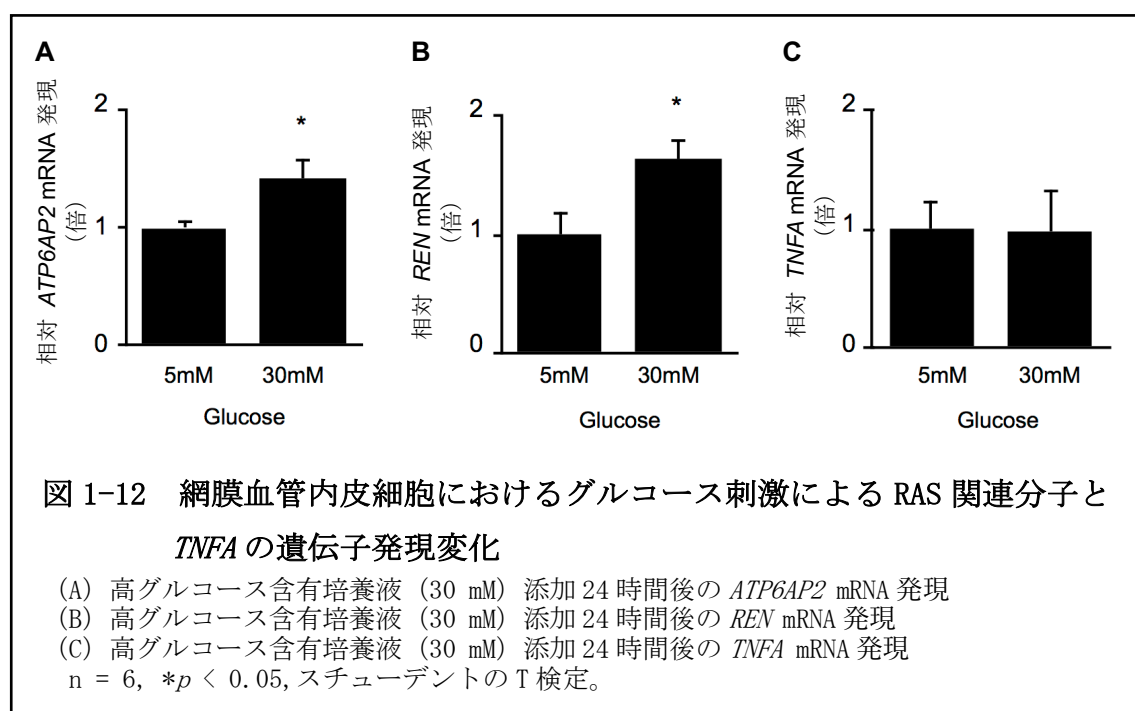


一方、CFD や LRG1 で刺激しても、対照群に比べて HRMEC の *ATP6AP2* や *REN* の発現量に変化は認められなかった（図 1-11）。



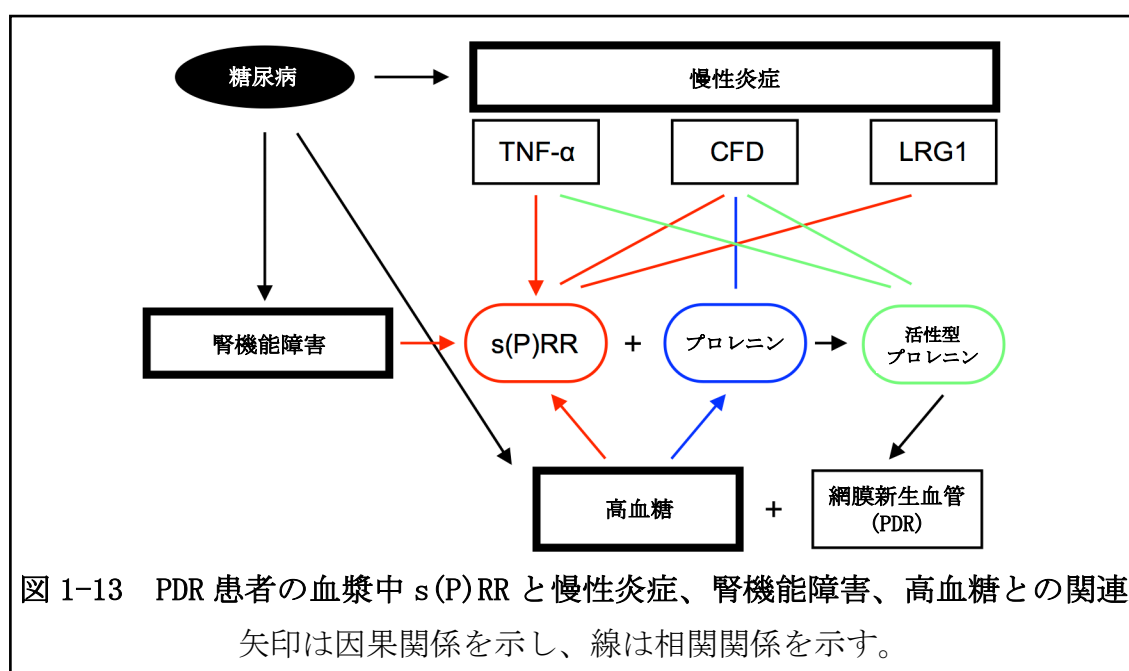
以上の結果から、TNF- α が (P)RR の上流に存在し、*ATP6AP2* の発現を誘導していると考えられる。

(P)RR やプロレニンが腎臓の糸球体上皮細胞やメサンギウム細胞では高グルコース条件下では発現が上昇する (Huang and Siragy, 2009; Li and Siragy, 2014) ことが報告されているため、高グルコース濃度 (30mM) で HRMEC を 24 時間培養し、HRMEC 中の *ATP6AP2* や *REN* の遺伝子発現を調べた。その結果、対照群である通常のグルコース濃度 (5mM) で培養したときよりも、*ATP6AP2* や *REN* の発現量は有意に上昇していた (*ATP6AP2*, fold change = 1.41, $p < 0.05$; *REN*, fold change = 1.65, $p < 0.05$) が、*TNFA* の発現量は変化が認められなかった (図 1-12)。



考察

今回我々は、PDR 患者の血漿中 s(P)RR 濃度と全身的な因子について検討をして、s(P)RR を中心とした PDR 患者血漿中の糖尿病病態との関連を明らかにした。RAS 関連分子である、s(P)RR、プロレニン、活性型プロレニンは Non-DM 群に比べて PDR 群では血漿中で全て上昇していた (図 1-4)。さらに、PDR 群では血漿中 s(P)RR は全身的な臨床データの中では腎機能障害パラメーターと相関していた (図 1-5)。また、炎症関連分子の中では TNF- α 、CFD、LRG1、VAP-1 が Non-DM 群に比べて PDR 群では血漿中で上昇していた (表 1-2)。さらにその相関に検討を行ったところ、血漿中 s(P)RR は TNF- α 、CFD および LRG1 と (図 1-6)、プロレニンは CFD と (図 1-7)、活性型プロレニンは TNF- α および CFD と相関していた (図 1-8)。RAS 関連分子と相関の認められたこれら炎症関連分子の中で、TNF- α は HRMEC における (P)RR の mRNA 発現を上昇させたのに対して、プロレニンの mRNA 発現を上昇させることはなかった (図 1-10)。高グルコース条件下では、HRMEC における (P)RR とプロレニンの両方の mRNA 発現を上昇させた (図 1-12)。以上の結果から、糖尿病によって誘発される腎機能障害や慢性炎症に関わる TNF- α が s(P)RR を、さらに高血糖によって s(P)RR とプロレニンの発現が誘導されるということ (因果関係) を明らかにした。また、RAS 関連分子と炎症関連分子との血漿中における相関関係が認められたことから、s(P)RR の血漿中濃度上昇が腎機能障害や慢性炎症や高血糖と密接に関わっていることが示唆された (図 1-13)。



高血糖が単球を活性化し、様々な成長因子やサイトカインを産生することで生じる慢性炎症が、糖尿病の病態に関与していることが知られている (Guha et al., 2000; Shanmugam et al., 2003)。そこで、RAS 関連分子と相関が認められた慢性炎症に関わる三つの分子 (TNF- α 、CFD、LRG1) について以下に考察する。

TNF- α は糖尿病の慢性炎症に関与する主なサイトカインであり、腎臓や網膜の微小血管障害を引き起こすことが知られている (Flyvbjerg, 2010; Graves and Kayal, 2008; Guha et al., 2000; Shanmugam et al., 2003)。実際に、最近では抗 TNF- α 抗体であるインフリキシマブの静脈内投与が糖尿病黄斑浮腫の治療に効果があり、視力を改善させたとの報告がある (Sfikakis et al., 2010; Sfikakis et al., 2005)。しかしながら、硝子体内注射などの局所投与では効果がなかったという報告がある (Wu et al., 2011)。このことは、糖尿病によって誘導された全身的な血液中の TNF- α 濃度の上昇が、眼内の TNF- α 濃度の上昇よりも網膜症で起こる網膜微小血管の異常に影響していることを示唆している。我々の結果からも、TNF- α が (P)RR を誘導する上流の分子であることがわかり、TNF- α が糖尿病によって生じる慢性炎症の中心的な役割を果たしているという既報に矛盾しない結果であった。

CFD は脂肪細胞から特異的に産生されるセリンプロテアーゼであり、補体系副経路の分子の一つである。補体系の活性化は糖尿病における慢性炎症に関与していることが知られている (Flyvbjerg, 2010; Fujita et al., 2013; Ostergaard et al., 2005)。この分子は膵 β 細胞の機能を改善させ、糖尿病において保護的な役割を果たしている (Lo et al., 2014)。膵 β 細胞機能不全のある患者は機能不全のない患者と比べて血中 CFD が減少している (Lo et al., 2014) と報告されているが、肥満を伴う 2 型糖尿病患者では健常者よりも血中の CFD が上昇している (Costantini et al., 2012) との報告もあり、CFD にはインスリン分泌を制御する良い働きと炎症メディエーターとしての悪い働きの二面性があるといえる。今回の我々の結果では、PDR 群で血漿中の CFD は上昇していることから、後者の炎症メディエーターとしての機能の方が大きいと考えられる。

LRG1 はヒトの様々な組織の血管系に主に存在しており、関節リウマチや潰瘍性大腸炎など様々な炎症性疾患のバイオマーカーとして知られている (Fujimoto et al., 2015; Honda et al., 2016; Shinzaki et al., 2017)。その他に血管新生因子としても知られており (Wang et al., 2013; Zhang et al.,

2016)、虚血網膜から新生血管を生じるような酸素誘導網膜症モデルマウスの網膜では LRG1 の発現が上昇している (Wang et al., 2013) という報告がある。糖尿病に関する既報では、PDR 患者の硝子体中では LRG1 が上昇している (Wang et al., 2013) とされているが、糖尿病患者の血漿中の LRG1 が上昇するという報告は、我々の報告が初めてである。

次に、腎機能障害と (P)RR の関連について考察する。これまでに (P)RR 発現は糖尿病腎症患者の腎臓で上昇している (Takahashi et al., 2010) という報告はあるが、2 型糖尿病患者の血漿中の s(P)RR が、腎機能障害パラメーターである eGFR や sCr と有意な相関が認められるというのは、我々の報告が初めてである。今後もさらなる検討が必要と考えられるが、糖尿病患者血液中の s(P)RR 値は、新たな糖尿病腎症の指標となり得るかもしれない。その他にも、ストレプトゾトシン誘導糖尿病モデルマウスの腎臓において、(P)RR が上昇し、TNF- α 、IL-1 β などの炎症性サイトカインを誘導することによって、腎症を進行させる (Matavelli et al., 2010) という報告もある。すなわち、我々が明らかにした血漿中の s(P)RR の上昇は、糖尿病腎症の病態そのものに関与している可能性がある。

最後に、高血糖と (P)RR の関連について考察する。今回の我々の検討により、高グルコース条件下では HRMEC における (P)RR/*ATP6AP2* やプロレニン/*REN* の発現が上昇することが示された。以前に我々は PDR 患者の増殖膜新生血管には (P)RR やプロレニンの発現がある (Kanda et al., 2012) ことを報告しており、今回の結果は既報と矛盾しない結果であった。さらに、腎臓のメサンギウム細胞や糸球体上皮細胞でも高グルコースが (P)RR の発現を上昇させる (Huang and Siragy, 2009; Li and Siragy, 2014) という報告がある。すなわち、(P)RR は腎臓でも網膜でも産生されるためどちらの臓器由来か区別するのが難しいが、眼球と腎臓の臓器の大きさを考慮すると、PDR 患者血漿中の (P)RR の上昇は網膜からの産生よりも主に腎臓からの産生によるものであると推察される。

ただし、今回の研究に用いた検体は手術症例に限っているため、対照群が健常者ではなく特発性黄斑疾患患者で、患者群も増殖糖尿病網膜症に限定されており、また解析に使用した検体数が 20 例ずつであったことが本研究のリミテーションである。今後、検体数を増やし、健常者を対照群に用い、さらに単純および増殖前糖尿病網膜症など網膜症の重症度の異なる患者や網膜症のない糖尿病腎症などの患者血液を用いた解析がさらに必要であると思われる。

第2章

増殖糖尿病網膜症患者における血漿中のガレクチン-1 と炎症関連分子との相関解析

緒言

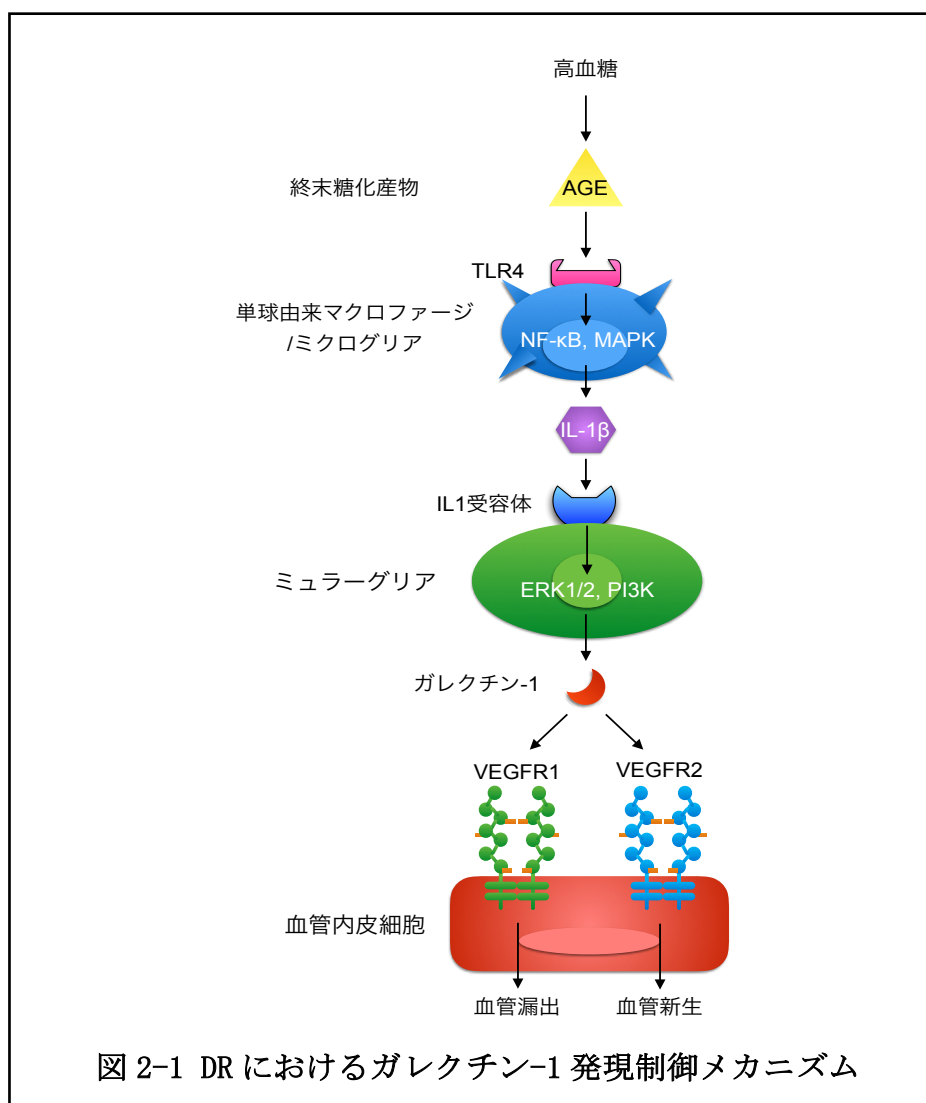
ガレクチンは、ガラクトース (β -ガラクトシド構造) を持った糖鎖を特異的に認識するレクチンの総称である (Camby et al., 2006)。脊椎動物をはじめ、線虫、昆虫などの無脊椎動物、キノコなどの真菌類にもガレクチンが存在する事が確認されており、構造上の特長より3つのサブグループ、糖認識ドメインを1つ持つプロト型、糖認識ドメイン1つと糖認識に関与しない短鎖反復配列からなるキメラ型、2つの糖認識ドメインがリンカー配列で結合したタンデムリピート型に分類される。そして、ガレクチンは糖鎖に親和性を示すレクチン活性のほか、発生、分化、形態形成、腫瘍転移、アポトーシス (細胞死) といった生命現象に関与することが明らかになっている (Camby et al., 2006)。

ガレクチンファミリーの一つであるガレクチン-1 は、腫瘍細胞や T 細胞などのあらゆる細胞で、細胞接着や細胞増殖や免疫抑制に関わっている (Camby et al., 2006; Thijssen et al., 2007; Zhao et al., 2010)。これまでに我々は、ガレクチン-1 が血管内皮増殖因子受容体 2 (VEGFR2) に存在する *N* 型糖鎖に結合して、細胞内シグナルを活性化することにより、DR において血管新生を惹起することを明らかにした (Kanda et al., 2015)。また、手術検体を用いた検討では、Non-DM 患者に比べて、PDR 患者の硝子体中のガレクチン-1 濃度は高値であり、硝子体中の VEGF 濃度とは相関せず (Kanda et al., 2015)、ガレクチン-1 が VEGF 非依存的に DR の病態に関与する血管新生因子であることを報告してきた。

これまでにガレクチン-1 の発現を制御する機構として、低酸素下で活性化する低酸素誘導因子 (HIF) -1α が報告されている (Semeraro et al., 2015)。我々も低酸素条件下において網膜血管内皮細胞におけるガレクチン-1 の発現が上昇することを報告した (Kanda et al., 2015)。さらに、DR 患者の前房水中におけるガレクチン-1 濃度は、対照群 (白内障) に比べ有意に増加しており、DR の病期 (糖尿病黄斑浮腫、PDR、血管新生緑内障) の進行に応じて上昇していた。一方で、DR と同様に低酸素が原因で誘導される VEGF が病態形成に関与している網

膜中心静脈分枝閉塞症や網膜中心静脈閉塞症ではガレクチン-1 タンパク質濃度は増加していなかった。このことより DR 選択的なガレクチン-1 発現制御機構があると推察された。そこで我々は低酸素とは独立した DM 病態選択的なガレクチン-1 の発現を制御する機構が存在すると考え、詳細な解析を行い、終末糖化産物 (AGEs) / IL-1 β 経路が存在することも明らかにした (Kanda et al., 2017a)。この経路は、持続的な高血糖により産生された AGEs がマクロファージなどの Toll 様受容体 (TLR) 4 を介して炎症性サイトカインである IL-1 β の発現を誘導し、それがミューラ細胞でのガレクチン-1 を上昇させる (図 2-1)。

本研究では、眼内だけではなく、血漿中でもガレクチン-1 が病態へ関与している可能性を考え、PDR 患者の血漿を用いて、血漿中ガレクチン-1 と、AGEs、IL-1 β 、低酸素誘導分子といった DR の病態形成への関連が報告されている分子濃度を測定し、その相関関係について検討した。



実験方法

1. 臨床検体

2012 年から 2014 年にかけて、北海道大学病院眼科にて硝子体手術が施行された PDR 患者（20 例男性 7 例、女性 13 例、平均年齢 62.40 ± 1.95 歳）と対照群として Non-DM（特発性黄斑上膜もしくは黄斑円孔）患者（20 例男性 10 例、女性 10 例、平均年齢 63.35 ± 0.96 ）において術前に採取された血漿を用いた。使用した患者の臨床像は表 1-1 に示した。本研究に使用した臨床検体は全て書面により同意を得た患者より採取しており、臨床検体の扱いは北海道大学病院自主臨床研究審査委員会に承認を受け（IRB No. 011-0172）、「北海道大学病院における臨床研究の取り扱いに関する指針」に準じた。

2. ELISA

血漿中のガレクチン-1、IL-1 β 、VEGF、C 反応性蛋白（CRP）、IL-6 は Luminex® アッセイキット（R&D Systems）と MAGPIX（Millipore）を使用して測定した。血漿中の AGEs とエリスロポエチン（EPO）と血清乳酸脱水素酵素（LDH）活性は、それぞれ OxiSelect AGE 競合 ELISA キット（Cell Biolabs, San Diego, CA, USA）とヒトエリスロポエチン（Thermo Fisher Scientific）ELISA キットと LDH アッセイキット（Serotec, Hokkaido, Japan）で測定した。

3. 統計解析

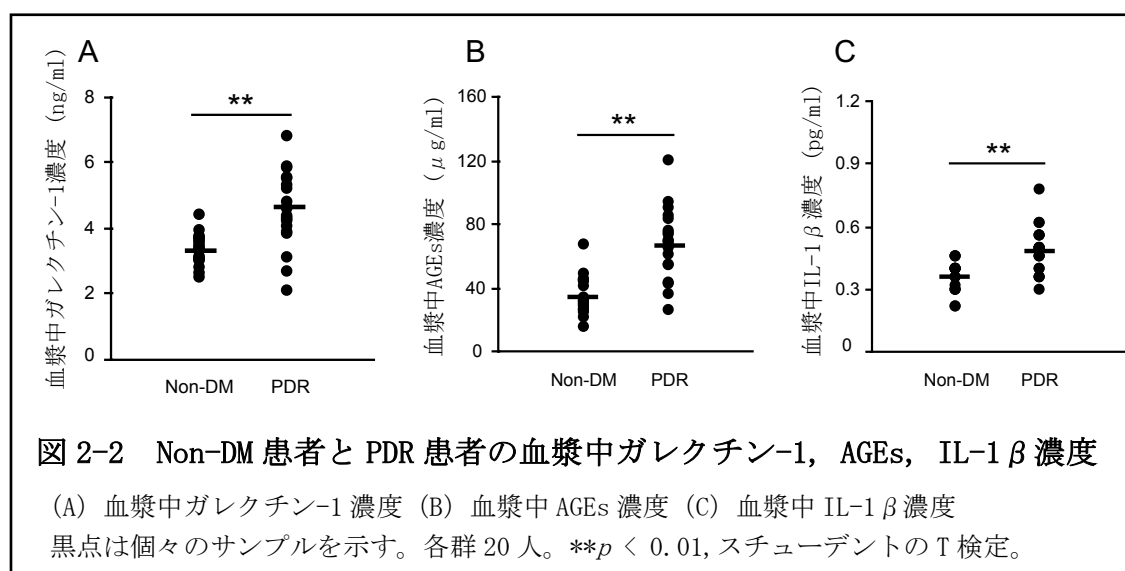
すべての結果は平均値±標準誤差で示した。また、各群間の比較にはスチューデントの T 検定を用いて解析し、相関に関してはスピアマン順位相関係数を用いて解析した。 p 値が 0.05 未満を呈した場合に統計学的に有意差があると評価した。

実験結果

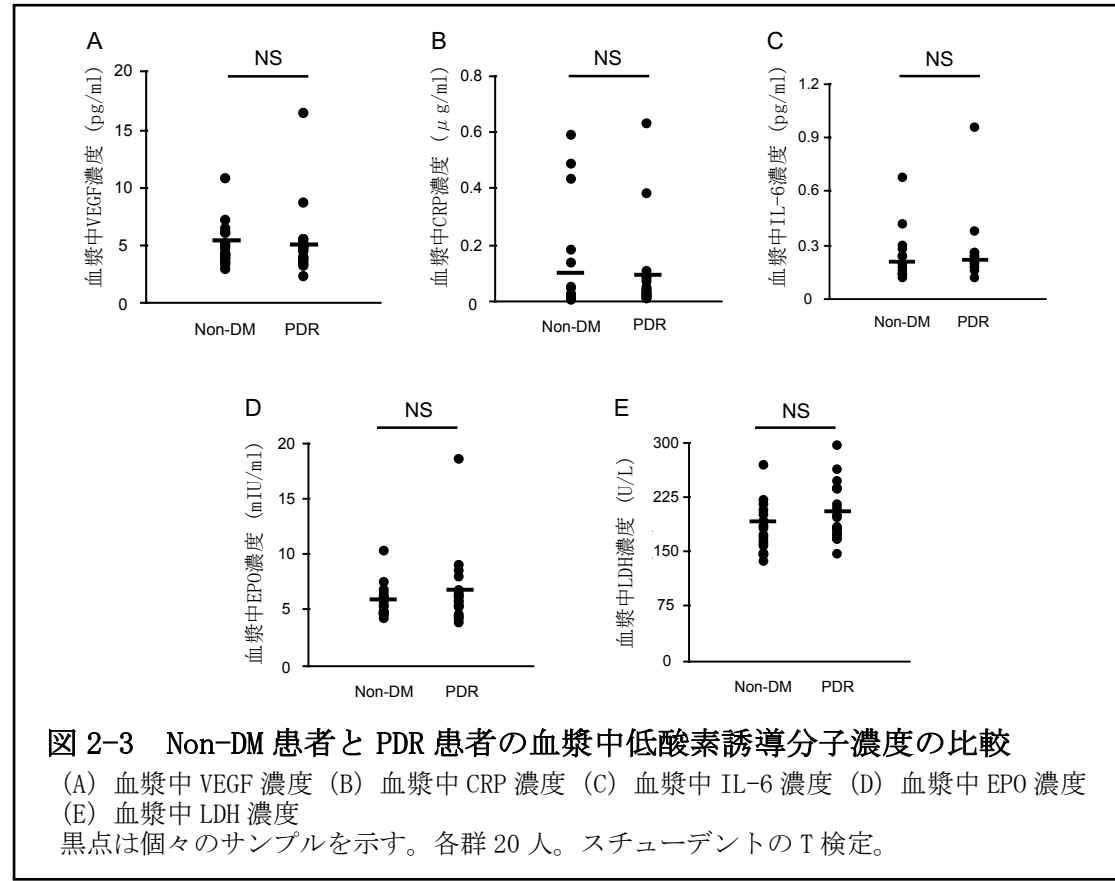
1. Non-DM 患者と PDR 患者の血漿中ガレクチン-1 と他の関連分子濃度

Non-DM 患者 20 例と PDR 患者 20 例の血液を用いて、DR の病態に關与するガレクチン-1 と、その発現を制御している AGEs/IL-1 β 経路の分子や低酸素によって誘導される分子との關連を調べるために、ELISA 法で血漿中の様々な分子濃度を測定した。

ガレクチン-1 と AGEs/IL-1 β 経路の分子について、Non-DM 患者と PDR 患者で比較したところ、Non-DM 患者に比べて、PDR 患者の血漿ではガレクチン-1、AGEs、IL-1 β 濃度が有意に高値であった（図 2-2）。



同様に、低酸素によって誘導される分子について Non-DM 患者と PDR 患者で比較したところ、血漿中 VEGF、CRP、IL-6、EPO、LDH 濃度は両群で有意差がなかった（図 2-3）。



血漿中ガレクチン-1 と他の関連分子の測定結果のまとめを表 2-1 に示す。

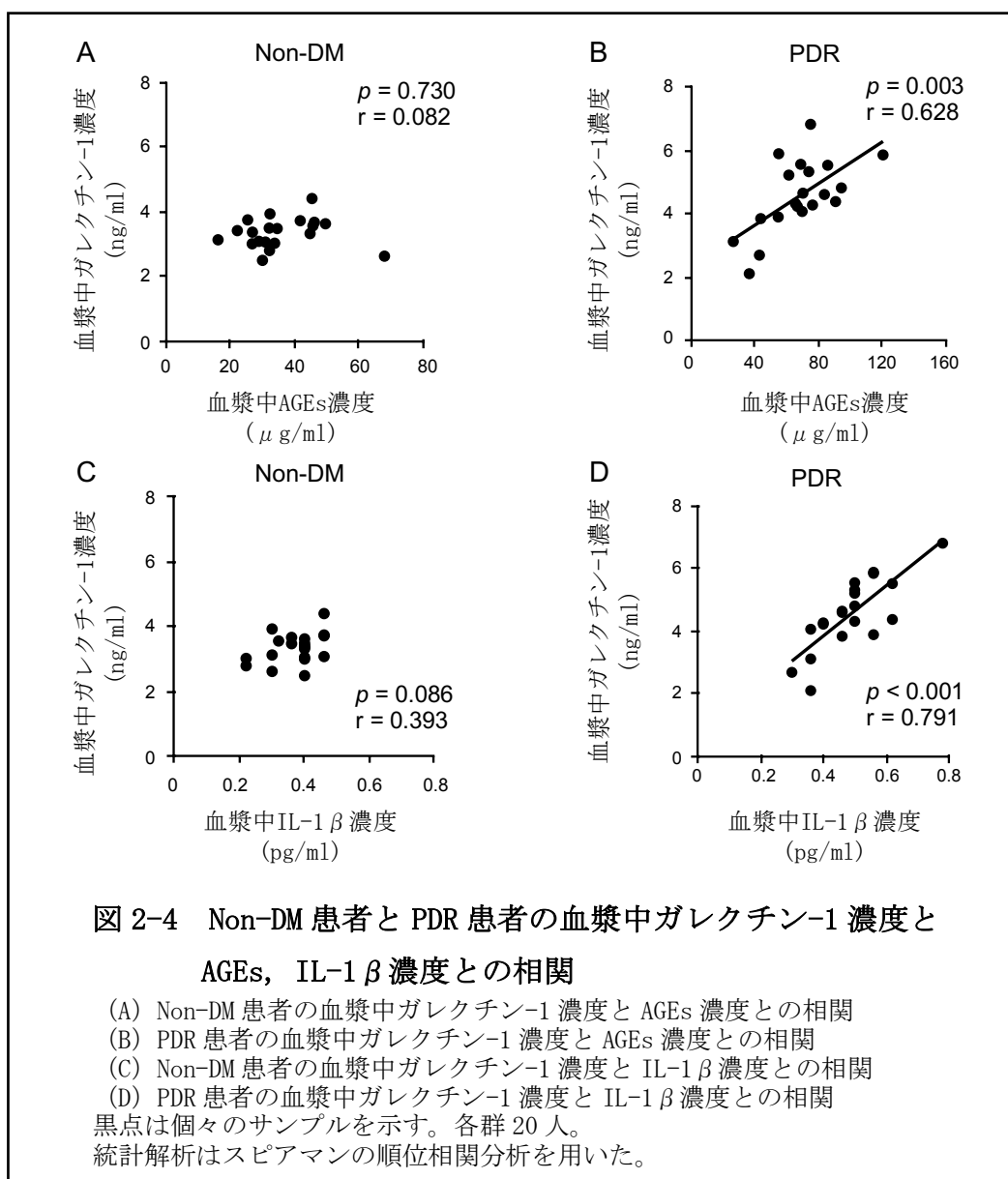
表 2-1 患者血漿中ガレクチン-1 と他の関連分子濃度			
	Non-DM	PDR	p値
ガレクチン-1 (ng/ml)	3.36 ± 0.10	4.55 ± 0.25	< 0.001
AGEs (μg/ml)	35.76 ± 2.63	68.48 ± 4.88	< 0.001
IL-1β (pg/ml)	0.37 ± 0.02	0.49 ± 0.03	< 0.001
VEGF (pg/ml)	4.92 ± 0.40	5.21 ± 0.66	0.713
CRP (μg/ml)	0.11 ± 0.04	0.09 ± 0.03	0.690
EPO (mIU/ml)	5.68 ± 0.32	6.53 ± 0.71	0.282
IL-6 (pg/ml)	0.22 ± 0.03	0.25 ± 0.04	0.455
LDH (U/L)	186.05 ± 8.23	203.40 ± 8.57	0.152

AGEs: 終末糖化産物、IL: インターロイキン、VEGF: 血管内皮増殖因子、CRP: C反応性蛋白、EPO: エリスロポエチン、LDH: 乳酸脱水素酵素。
すべての結果は平均値±標準誤差で示す。各群20人。統計解析はスチューデントのT検定を使用。

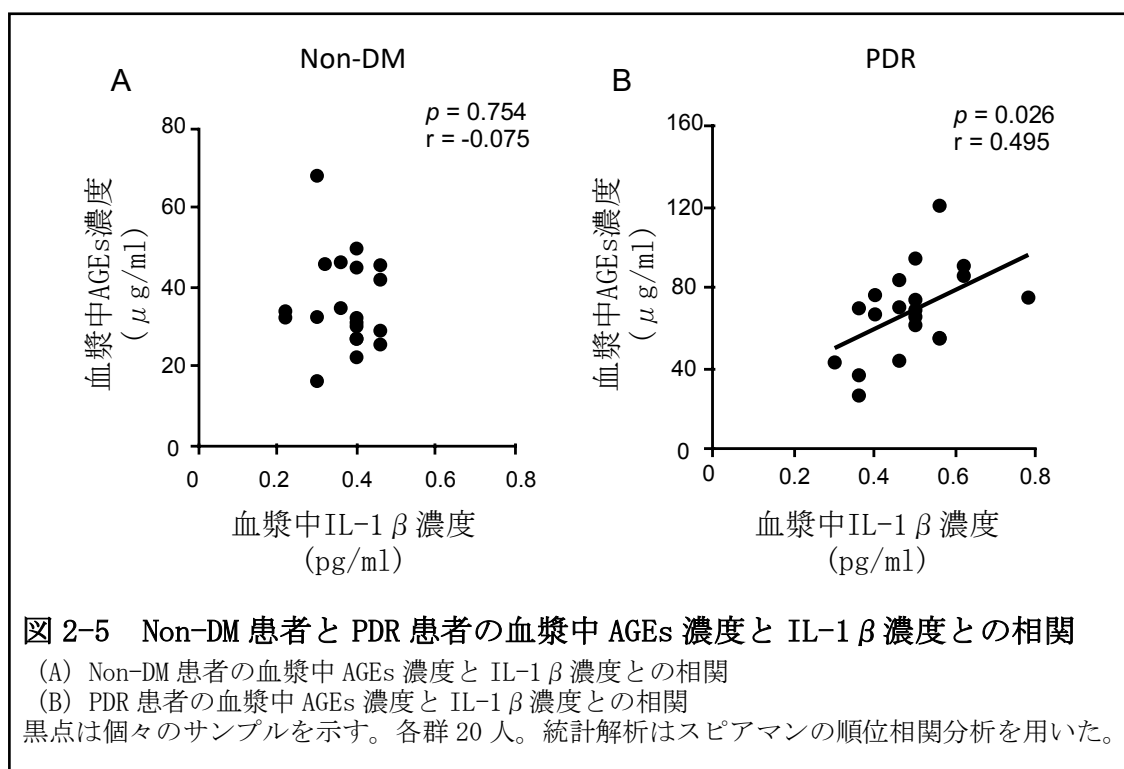
2. Non-DM 患者と PDR 患者の血漿中ガレクチン-1 と関連分子との相関解析

次に、ガレクチン-1 とそれに関連のある分子の相関について Non-DM 患者と PDR 患者で比較した。

ガレクチン-1 と AGEs および IL-1 β との相関についてであるが、Non-DM 患者では血漿中ガレクチン-1 濃度は、血漿中 AGEs や IL-1 β 濃度との相関が認められなかったのに対し、PDR 患者では血漿中ガレクチン-1 濃度は血漿中 AGEs や IL-1 β 濃度と正の相関が認められた (AGEs, $r = 0.628$, $p = 0.003$; IL-1 β , $r = 0.791$, $p < 0.001$) (図 2-4)。



さらに、AGEs と IL-1 β との相関について調べたところ、Non-DM 患者では血漿中 AGEs 濃度と IL-1 β 濃度との間に相関は認められなかったのに対して、PDR 患者では血漿中 AGEs 濃度と IL-1 β 濃度との間に相関が認められた ($r = 0.495$, $p = 0.026$) (図 2-5)。



同様にガレクチン-1 と低酸素に関連する分子との相関について検討を行ったが、Non-DM 患者と同様に PDR 患者においても血漿中ガレクチン-1 濃度と低酸素によって誘導される血漿中 VEGF、CRP、IL-6、EPO、LDH 濃度との間に相関は認められなかった（図 2-6）。

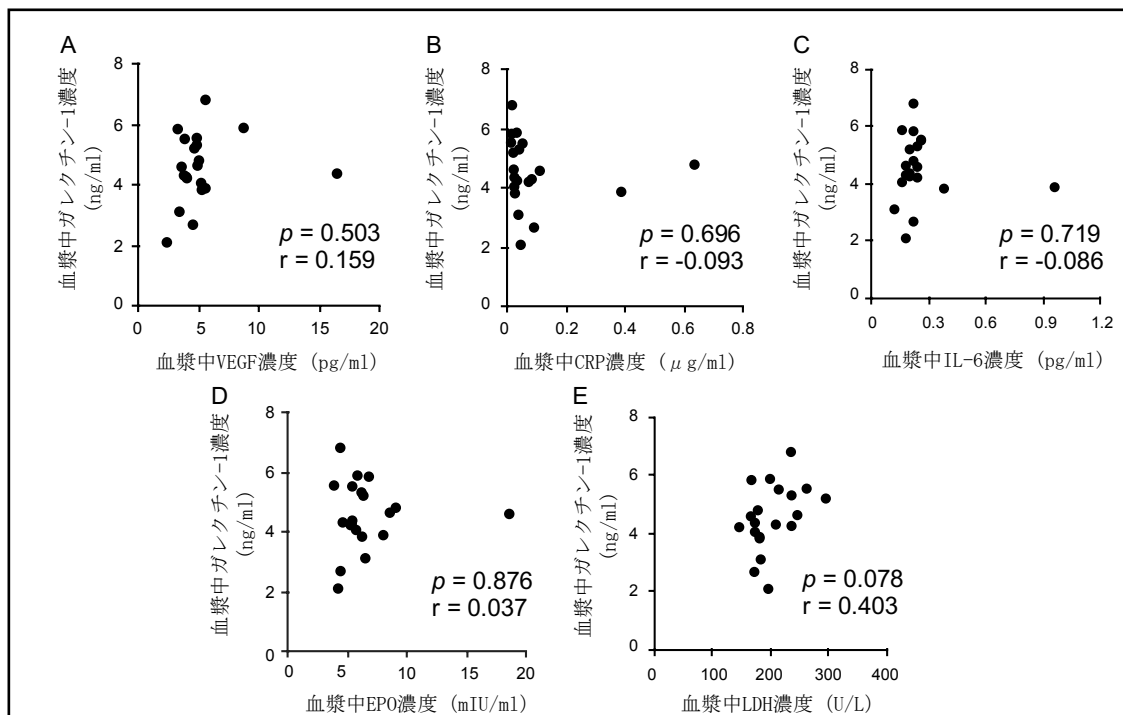


図 2-6 PDR 患者の血漿中ガレクチン-1 濃度と低酸素誘導分子濃度との相関

- (A) 血漿中ガレクチン-1 濃度と VEGF 濃度との相関
- (B) 血漿中ガレクチン-1 濃度と CRP 濃度との相関
- (C) 血漿中ガレクチン-1 濃度と IL-6 濃度との相関
- (D) 血漿中ガレクチン-1 濃度と EPO 濃度との相関
- (E) 血漿中ガレクチン-1 濃度と LDH 濃度との相関

黒点は個々のサンプルを示す。各群 20 人。統計解析はスピアマンの順位相関分析を用いた。

血漿中ガレクチン-1と関連分子との相関解析のまとめの数値を表2-2に示す。

表 2-2 患者血漿中ガレクチン-1 濃度と他の関連分子濃度との相関

	Non-DM		PDR	
	<i>r</i>	<i>p</i> 値	<i>r</i>	<i>p</i> 値
AGEs (μ g/ml)	0.082	0.730	0.628	0.003
IL-1 β (pg/ml)	0.393	0.086	0.791	< 0.001
VEGF (pg/ml)	0.155	0.513	0.159	0.503
CRP (μ g/ml)	0.211	0.371	-0.093	0.696
EPO (mIU/ml)	0.296	0.205	0.037	0.876
IL-6 (pg/ml)	0.229	0.332	-0.086	0.719
LDH (U/L)	0.240	0.309	0.403	0.078

AGEs: 終末糖化産物、IL: インターロイキン、VEGF: 血管内皮増殖因子、
CRP: C反応性蛋白、EPO: エリスロポエチン、LDH: 乳酸脱水素酵素。
統計解析はスピアマンの順位相関分析を用いた。

3. Non-DM 患者と PDR 患者の血漿中ガレクチン-1 と腎機能障害パラメーターとの相関解析

次に、ガレクチン-1 と表 1-1 にある全身的な臨床データとの相関を調べたところ、Non-DM 患者では血漿中のガレクチン-1 濃度と腎機能障害のパラメーターとの間に相関は認められなかったのに対して、PDR 患者では血漿中のガレクチン-1 濃度と eGFR との間に負の相関 ($p < 0.001$, $r = -0.820$) が認められ、sCr とは正の相関 ($p < 0.001$, $r = 0.741$) が認められた (図 2-7)。

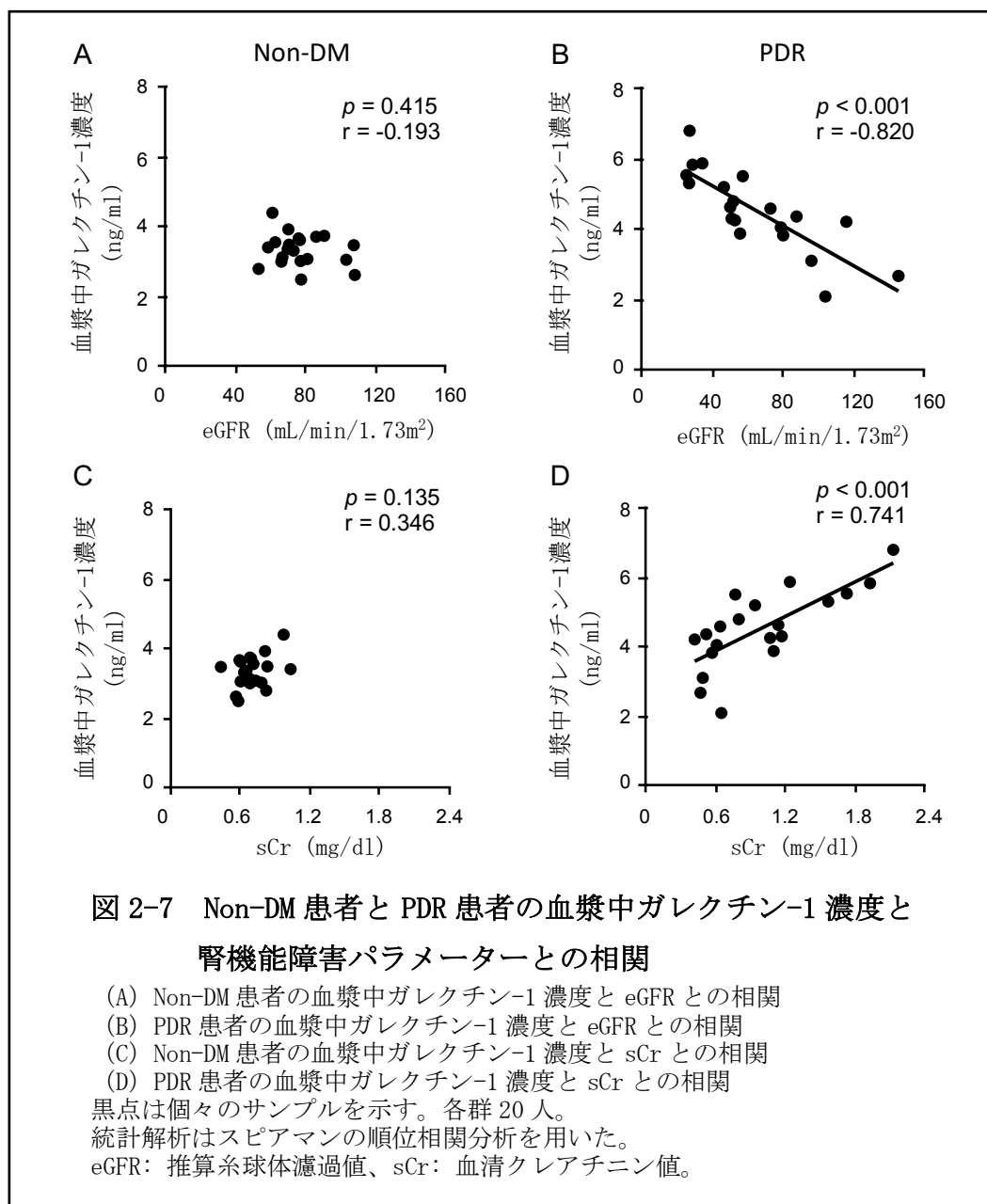


図 2-7 Non-DM 患者と PDR 患者の血漿中ガレクチン-1 濃度と腎機能障害パラメーターとの相関

- (A) Non-DM 患者の血漿中ガレクチン-1 濃度と eGFR との相関
- (B) PDR 患者の血漿中ガレクチン-1 濃度と eGFR との相関
- (C) Non-DM 患者の血漿中ガレクチン-1 濃度と sCr との相関
- (D) PDR 患者の血漿中ガレクチン-1 濃度と sCr との相関

黒点は個々のサンプルを示す。各群 20 人。

統計解析はスピアマンの順位相関分析を用いた。

eGFR: 推算糸球体濾過値、sCr: 血清クレアチニン値。

考察

DR の病態に関わるガレクチン-1 の発現を制御する機構として、我々はこれまでに眼内では AGEs を起点とした AGEs/IL-1 β 経路と低酸素を起点とした経路の 2 つの経路があることを明らかにした (Kanda et al., 2017a; Kanda et al., 2015)。我々の報告以外にも、DM では、AGEs の蓄積が炎症性サイトカインを産生することによって、微小血管障害を生じ、DR の病態である網膜の低酸素状態を引き起こすことが報告されている (Stitt et al., 2016)。さらに、低酸素下では HIF-1 α が、炎症に関わる分子である CRP や IL-6 の産生を誘導し、血管新生作用の VEGF や EPO が誘導されることが知られている (Semeraro et al., 2015)。そこで、本研究では血漿中におけるガレクチン-1 と、その制御に関わる AGEs や IL-1 β や低酸素によって誘導される分子との関連について検討した。その結果、PDR 患者の血漿では、Non-DM 患者に比べて、ガレクチン-1、AGEs、IL-1 β が全て有意に上昇しており、かつ PDR 患者では各々の分子との間に全て有意な相関も認められた (図 2-2、図 2-4、図 2-5)。

一方で、低酸素によって誘導される分子である VEGF、CRP、IL-6、EPO、LDH は、Non-DM 患者と PDR 患者との間で有意差は認められず、相関も認められなかった (図 2-3、図 2-6)。しかしながら、本研究で解析に使用した検体数は対照群と患者群併せて 40 例であった。今後、検体数を増やし、さらに糖尿病網膜症の重症度の異なる患者などの患者血液を用いたさらに詳細な解析が必要である。

以上のことから、眼内とは異なる細胞成分が関わっていると考えられるが、血漿中においても AGEs および IL-1 β を介してガレクチン-1 の発現上昇を誘導していること、また上昇したガレクチン-1 は低酸素よりも AGEs を介した炎症が誘因となっていることが示唆された。

次に、血漿中のガレクチン-1 と全身的な臨床データとの相関を調べたところ、PDR 患者では腎機能障害パラメーターである eGFR と sCr との相関が認められた (図 2-7)。これまでの報告でも、DR の発症や重症度と eGFR の低下が関連していることが知られている (El-Asrar et al., 2001; Man et al., 2015) が、血漿中のガレクチン-1 濃度が PDR 患者の腎機能障害パラメーターに相関しているという報告はこれまでになく、我々が初めての報告である。今回の我々の報告の他にも、DM モデルマウスの腎皮質でガレクチン-1 の発現が上昇したという報告や、ガレクチン-1 の阻害が線維化マーカーであるフィブロネクチンの腎臓での発

現を抑制した (Al-Obaidi et al., 2019) という報告があることを踏まえると、DM 腎症の発症、線維化にはガレクチン-1 が関連していることが示唆される。

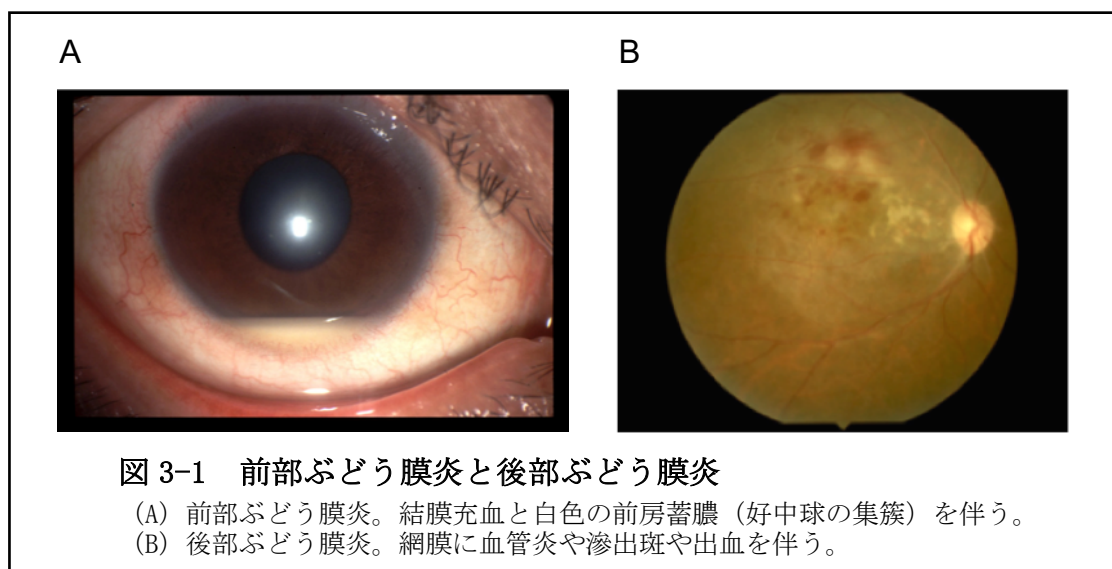
血漿中の AGEs や IL-1 β 濃度が DR の重症度に関係している (Koleva-Georgieva et al., 2011; Ono et al., 1998) という報告があることから、今後は血漿中のガレクチン-1 濃度が DR の重症度に相関があるかどうかを検討していきたい。それにより、血漿中のガレクチン-1 が、DR 患者を管理する上でバイオマーカーや治療のターゲットとなりうる分子かどうかを判別していきたい。

第3章

マクロファージ様人工多能性幹細胞由来免疫抑制細胞を用いたマウス実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎の軽症化

緒言

ぶどう膜炎は、虹彩、毛様体、脈絡膜で構成される眼球の中間層に生じる炎症であり、40歳以上の中途失明原因の約10%を占める難治性眼疾患である。解剖学的に、虹彩などの前眼部に局限した前部ぶどう膜炎、硝子体などの中間部に局限した中間部ぶどう膜炎、網膜や脈絡膜などの後眼部に局限した後部ぶどう膜炎に分類される（図3-1）。



ぶどう膜炎の多くはベーチェット病やサルコイドーシスなど全身性炎症性疾患に伴うものである。糖尿病によるぶどう膜炎も増加している。北海道大学病院を1994-2003年の10年間に初診したぶどう膜炎患者1,240名の平均発症年齢は男性41.7歳、女性45.7歳であり(Kitamei et al., 2009)、ぶどう膜炎は青壮年での発症が多く、このことは患者本人のみならず、社会的にも極めて重要な問題である。

これまでぶどう膜炎の治療には主としてステロイド薬、消炎鎮痛薬、免疫抑制薬が用いられてきた。しかし、これらの治療は対症療法にすぎないため、減量とともに再発することが多い。そのため、長期投与が余儀なくされ、いずれも副作用

用が高頻度にみられることが問題となっている。糖尿病によるぶどう膜炎ではそもそもステロイド薬を全身投与することはできない。最近では、炎症性サイトカインを標的とした治療法の開発が進んできている。例えば、難治性ベーチェット病に対する抗 TNF- α 抗体が高い有効性を示している (Ohno et al., 2004)。しかしこれも対症療法の域を出ることはなく、治療の継続が必要である点が問題となっており、根治治療にはほど遠いのが現実である。

対症療法に頼らない根治治療を目指すべく、これまでにいくつかの免疫抑制性細胞を用いたぶどう膜炎制御に関する研究が行われてきた。疾患の根幹にあると考えられている過剰な自己免疫反応を、免疫抑制性細胞を用いた免疫治療を行うことにより制御するという理論である。これまでに免疫抑制性細胞として制御性 T 細胞と制御性樹状細胞の 2 種類の細胞が用いられ、マウスにおいて研究がなされてきた。我々は、眼房水に含まれている α -メラノサイト刺激ホルモン (MSH) およびトランスフォーミング増殖因子 (TGF)- β 2 によって制御性 T 細胞が誘導されること、その制御性 T 細胞を移入することによりマウス実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (EAU) を抑制することを示した (Namba et al., 2002)。制御性樹状細胞を用いた研究は Usui Y らにより行われ、*in vitro* で IL-10 とともに誘導された制御性樹状細胞はマウス EAU を抑制することが示された (Usui et al., 2009)。これらの手法は遺伝的背景が同一な同系マウスでは別個体間での移入が可能であるが、ヒトへの臨床応用を考える際には患者本人の免疫抑制性細胞を用いることが必須条件となる。しかしながら、*in vitro* で免疫抑制性細胞を誘導・増殖させるには、得られる細胞数に限界があること、逆に免疫を増強させ、ぶどう膜炎を誘発・増悪させるような細胞が混入するリスクがあることが問題であった。

共同研究者の清野ら (北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物分野) は人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) からマクロファージ様 iPS 細胞由来免疫抑制細胞 (iPS-SCs) を誘導することに成功した (Sasaki et al., 2015)。マウスにおいて同種異系間の心筋様細胞の移植に際し、事前に iPS-SCs を投与しておくことにより移植片の生着期間が延長することを報告している。この手法を用いることにより患者本人の iPS 細胞から誘導した充分量の免疫抑制性細胞を得ることが可能となり、自己免疫疾患の治療に有効であることが期待される。

本章では、この iPS-SCs の免疫抑制能に着目し、マウス EAU における iPS-SCs の炎症抑制効果について検討した。

実験方法

1. 動物

オスの6週齢 C57BL/6J (H-2^b) (Ly5.2/Cd45.2) (Japan SLC, Hamamatsu, Japan) マウスを免疫に使用した。脾臓細胞の抽出にはメスの C57BL/6J (H-2^b) (Ly5.1/Cd45.1) (Japan SLC) を使用した。本実験におけるマウスの扱いは「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定」に準拠しておこなった(承認番号: 16-0079)。また、Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) で定められたガイドラインに基づいて実施した。

2. マウス実験的自己免疫性ぶどう膜網膜炎 (EAU) の誘導

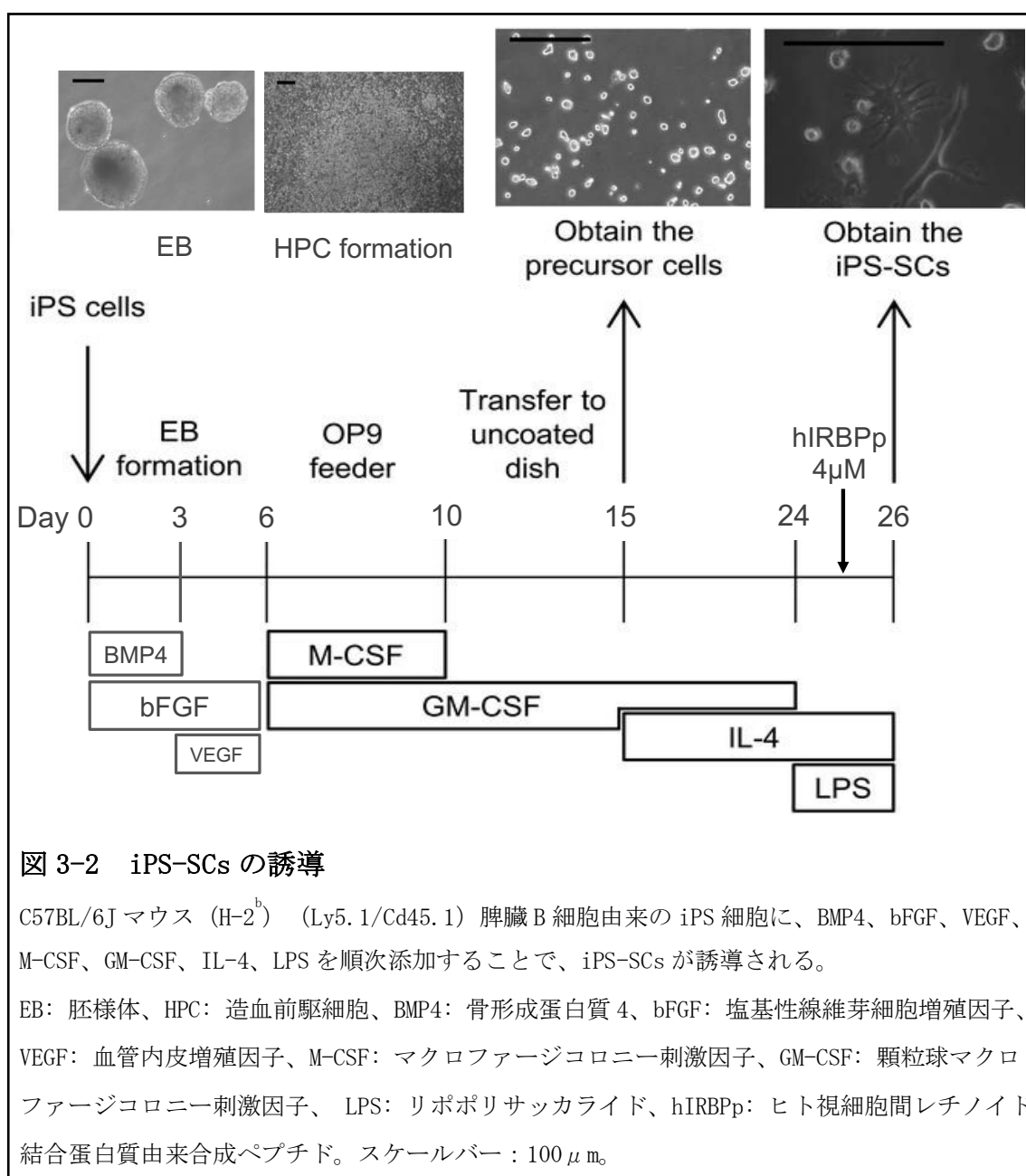
ヒト視細胞間レチノイド結合蛋白質由来合成ペプチド (hIRBPp1-20) (塩基配列: GPTHLFQPSLVLDMAKVLLD) は Sigma-Aldrich Japan (Tokyo, Japan) に合成・精製を依頼した。マウスの後頸部と背部に、200 μ g の hIRBPp1-20 と 500 μ g の結核死菌 (*M. tuberculosis* strain H37R) を含む強化完全フロイントアジュバント (CFA) (Difco, Detroit, MI, USA) との懸濁液 200 μ l を皮下注射して、マウスを免疫した。追加免疫として、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で希釈した百日咳菌毒素 (PTX) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 0.1 μ g を腹腔内投与して EAU を惹起した。免疫から約 10 日後に EAU が発症し、約 21 日後に炎症はピークに達する (Kitamura et al., 2007)。

3. iPS 細胞の作製およびマクロファージ様人工多能性幹細胞由来免疫抑制細胞 (iPS-SCs) への分化誘導

iPS 細胞の作製は、京都大学 iPS 細胞研究所のプロトコールと既報に準じ、C57BL/6J (Ly5.1/Cd45.1) マウス (Japan SLC) の脾臓から抽出した B 細胞に、レトロウイルスベクターを用いて Oct3/4・Sox2・Klf4・c-Myc の 4 遺伝子を導入し、17 日間培養し iPS 細胞のコロニーを得た (Takahashi and Yamanaka, 2006; Wada et al., 2011)。この iPS 細胞を中胚葉誘導培地 [α MEM (Thermo Fisher Scientific) に 20% ウシ胎児血清 (GE healthcare, Chicago, IL, USA)、0.1 mM 非必須アミノ酸 (NACALAI TESQUE, Kyoto, Japan)、1 mM ピルビン酸ナトリウム (NACALAI TESQUE)、1% ペニシリン/ストレプトマイシン (NACALAI TESQUE)、55 μ M 2-メルカプトエタノール (NACALAI TESQUE) を添加して作製] に 10 μ g/ml 骨形成蛋白質 4 (BMP4) (Peprotech) と 5 μ g/ml 塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)

(Peprotech) を添加して作製した培養液とともに低付着精細胞培養皿で3日間培養した。3日目に上記培養液を中胚葉誘導培地に $5\mu\text{g/ml}$ bFGF と $10\mu\text{g/ml}$ VEGF (Peprotech) を添加した培養液と交換して、6日目まで浮遊培養し胚様体 (EB) を誘導した。6日目にEBを回収し、予め10cm dishに播種した血液細胞への分化を支持する OP9 細胞[マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) 遺伝子を欠損した op/op マウスに由来する骨髓ストローマ細胞株 (Nakano et al., 1994)]上に播種した。培養液には、 10 ng/ml 顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) (Peprotech)、 10 ng/ml M-CSF (Peprotech) を添加した。10日目に血球系の細胞を回収し、低付着性培養皿に播種し、免疫抑制性細胞への分化誘導を行った。培養液には、 10 ng/ml GM-CSF を添加した。10日目以降は、培養液として RPMI (Wako) に10%ウシ胎児血清 (GE healthcare)、 0.1 mM 非必須アミノ酸、 1 mM ピルビン酸ナトリウム、1%ペニシリン/ストレプトマイシン、 $55\mu\text{M}$ 2-メルカプトエタノールを添加して使用した。

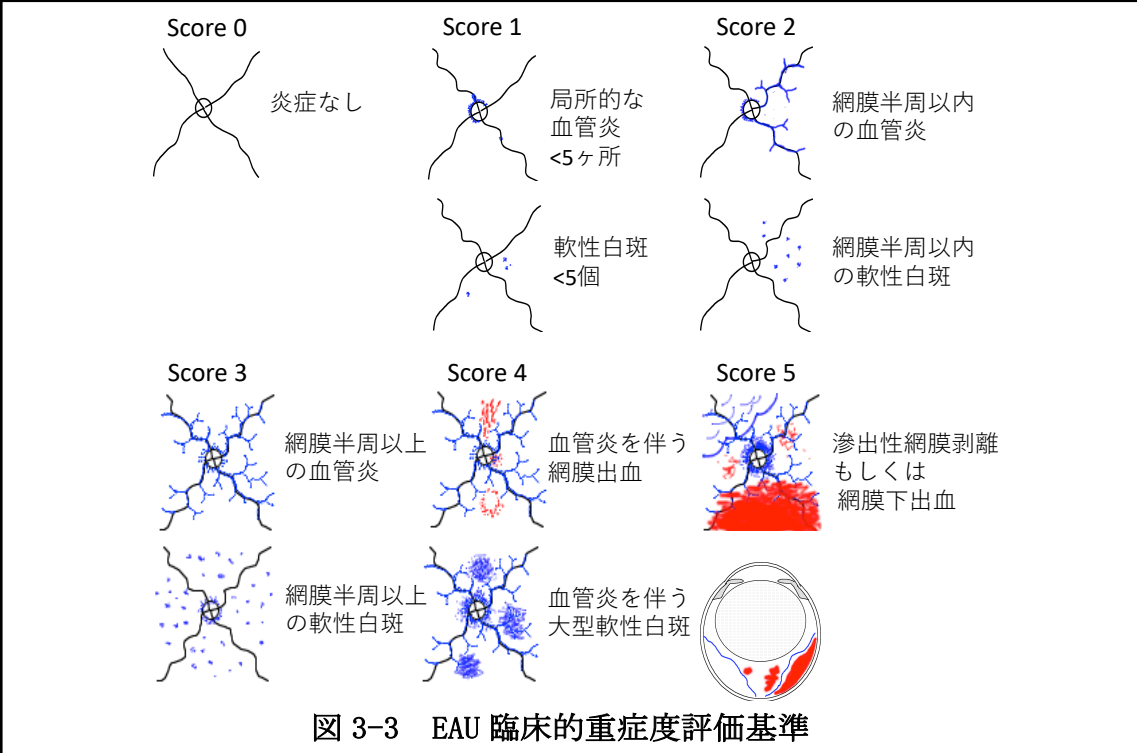
15日目に弱付着性、浮遊性の細胞を回収し、新しい低付着性培養皿に播き直した。その際、 5 ng/ml GM-CSF と 10 ng/ml IL-4 を添加した。24日目に浮遊細胞は回収し、再び培養皿に播種した。培養液には 10 ng/ml IL-4 と $1\mu\text{g/ml}$ リポポリサッカライド (LPS) (Sigma-Aldrich) を添加した。25日目にペプチドを iPS-SCs の主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) へ結合させる (iPS-SCs にロードする) ため、hIRBPp1-20 を $4\mu\text{M}$ になるよう培養液に添加した。26日目に培養皿を PBS で3回洗浄したのち、 10 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を添加して20分間 37°C でインキュベートし、セルスクレーパーで剥離させることにより iPS-SCs を得た (図3-2)。



4. EAU の評価

免疫後 7 日目から 3、4 日おきに 21 日目まで麻酔下で散瞳薬ミドリン P[®] (Santen Pharmaceutical, Osaka, Japan) を点眼し、検眼鏡を用いて経瞳孔的にマウスの眼底検査を行った。麻酔は PBS で希釈した 1mg ケタラル[®] (Daichi Sankyo Propharma, Tokyo, Japan) と 0.2% セラクター[®] (Bayer, Leverkusen, Germany) 混合液 100 μl を腹腔内投与した。その後、我々の既報 (Namba et al., 2000) に基づき、炎症の程度を 5 段階で評価した (臨床的重症度) (図 3-3)。

また、21 日目にマウスを安楽死させ、眼球を摘出し、4%グルタルアルデヒドで 1 時間固定後に、4%パラホルムアルデヒドで一晩固定した。固定後組織標本（パラフィン切片）を作製し、脱パラフィンを行い、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色後に炎症の程度を既報（Thurau et al., 1997）に基づき 5 段階で評価した（組織学的重症度）（図 3-4）。



グレード	基準
0	変化なし
0.5	軽微な炎症細胞浸潤
1	網膜皺襞や局所的な網膜剥離、網膜・脈絡膜の小型肉芽腫、血管周囲炎
2	網膜皺襞や網膜剥離、局所的な視細胞障害、小～中型肉芽腫、血管周囲炎や血管炎
3	広範囲の網膜皺襞や網膜剥離、視細胞障害、中型肉芽腫、網膜下新生血管
4	漿液性渗出液や網膜下出血を伴う広範囲の網膜剥離、広範囲の視細胞障害、大型肉芽腫、網膜下新生血管

図 3-4 EAU 組織学的重症度評価基準

5. hIRBPp1-20 特異的 CD4 陽性 T 細胞の抽出

hIRBPp1-20 抗原に特異的な CD4 陽性 T 細胞を抽出するために、hIRBPp1-20 200 μ g と結核死菌 500 μ g を含む CFA の懸濁液 200 μ l をオスの 6 週齢 C57BL/6J (Cd45.2) マウスの足底と背部に皮下注射した。免疫後 9 日目に腫大したリンパ節を膝窩と腋下から摘出した。摘出したリンパ節を PBS が入ったシャーレ内で注射筒の内筒でホモジナイズした。チューブの上部に 100 μ m 孔径のセルストレイナー (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) を取り付けて、そこにホモジナイズした懸濁液を流し、余分な被膜などの組織を除去した。得られた懸濁液と CD4 陽性 T 細胞抗体が付着した MACS[®]磁気マイクロビーズ (Miltenyl Biotec, Bergisch Gladbach, German) を 4°C で 15 分間反応させた。その懸濁液を LS カラム (Miltenyl Biotec) の中を通すことによって、hIRBPp1-20 特異的 CD4 陽性 T 細胞を抽出した。

6. T 細胞増殖アッセイ

hIRBPp1-20 特異的 CD4 陽性 T 細胞に PBS で 1000 倍希釈した Cell trace violet (Thermo Fisher Scientific) を加え、water bath の中に 37°C で 20 分間反応させた。

ナীব C57BL/6J (CD45.1) マウスより単離した脾臓細胞に、30Gy 放射線照射を行って細胞増殖を停止させたものを抗原提示細胞 (APC) として使用した。96 ウェルプレートに hIRBPp1-20 特異的 CD4 陽性 T 細胞、APC および hIRBPp1-20 を加え、同時に iPS-SCs を添加し、4 日間 37°C で共培養した。培養 4 日目に細胞を回収し、1.3 μ g/ml allophycocyanin-抗マウス CD45.2 抗体 (Biolegend, San Diego, CA, USA) と遮光の元で氷上 10 分間反応させ、CD4 陽性 T 細胞を標識した。さらに、死細胞を染色するために 1 mg/ml の propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich) と、遮光し氷上で 15 分間反応させた。同日、BD FACSCanto II フローサイトメーター (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を用いて、CD45.2 でゲートし、PI 陽性細胞を除外した。CD4 陽性 T 細胞について CellTrace Violet の蛍光強度を測定し、Flow Jo[™] (Tree Star, Ashland, OR, USA) で細胞増殖について解析した。

また、NO 合成酵素阻害剤 N^G-Monomethyl-L-arginine, acetate (L-NMMA) (Dojindo, Kumamoto, Japan) と、中和抗体としてマウス抗 TGF- β 1, 2, 3 抗

体 (R&D Systems) を添加して 4 日間共培養した後に、T 細胞の増殖率を測定した。

hIRBPp1-20 との抗原特異性を確認するため、hIRBPp1-20 の代わりに Pigeon cytochrome c (PCC) p43-58 (塩基配列: AEGFSYTEANKAKGIT) (Sigma-Aldrich Japan) を用いた。

7. サイトカイン濃度測定

培養上清中のサイトカイン濃度については、一つのサンプルから多項目の可溶性蛋白を同時に定量できるフローサイトメーター用ビーズアッセイキットである LEGENDplex™ (Biolegend) を使用した。他に、抑制性サイトカインの一つである TGF- β 1 は Mouse TGF- β 1 ELISA kit (R&D Systems) で測定した。また、一酸化窒素 (NO) 濃度は Griess Reagent System といわれる NO⁻の分解生成物である亜硝酸 (NO₂⁻) を測定するシステムを利用した nitric oxide assay kit (Promega) で測定した。

8. セルカルチャーインサートプレートを用いた培養

Millicell-96 Cell Culture Insert Plates (Millipore) を用い、上層ウェルに iPS-SCs を播種し、下層ウェルには hIRBPp1-20 特異的 CD4 陽性 T 細胞と APC を入れて、hIRBPp1-20 を含む培養液とともに 37°C で培養した。4 日間培養後に、同様の方法でフローサイトメーターを用いて T 細胞増殖率を測定し、Flow Jo™ で解析した。

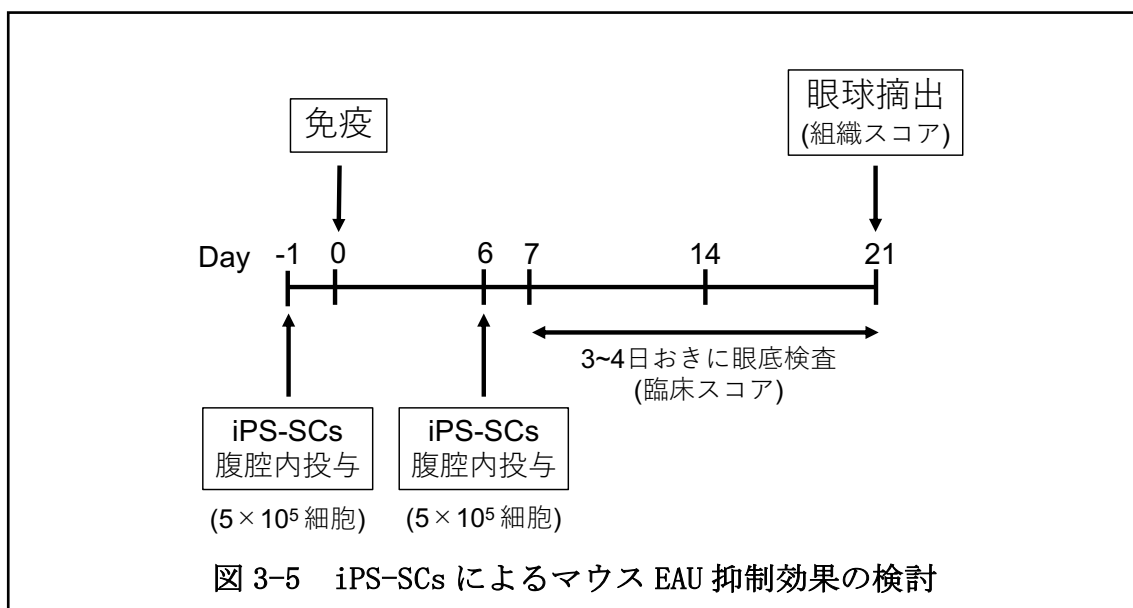
9. 統計解析

すべての結果は平均値±標準偏差で示した。2 群間の比較には Mann-Whitney U test を用いて解析した。また、多群間の比較には Tukey's test を用いて解析した。 p 値が 0.05 未満を呈した場合に統計学的に有意差があると評価した。

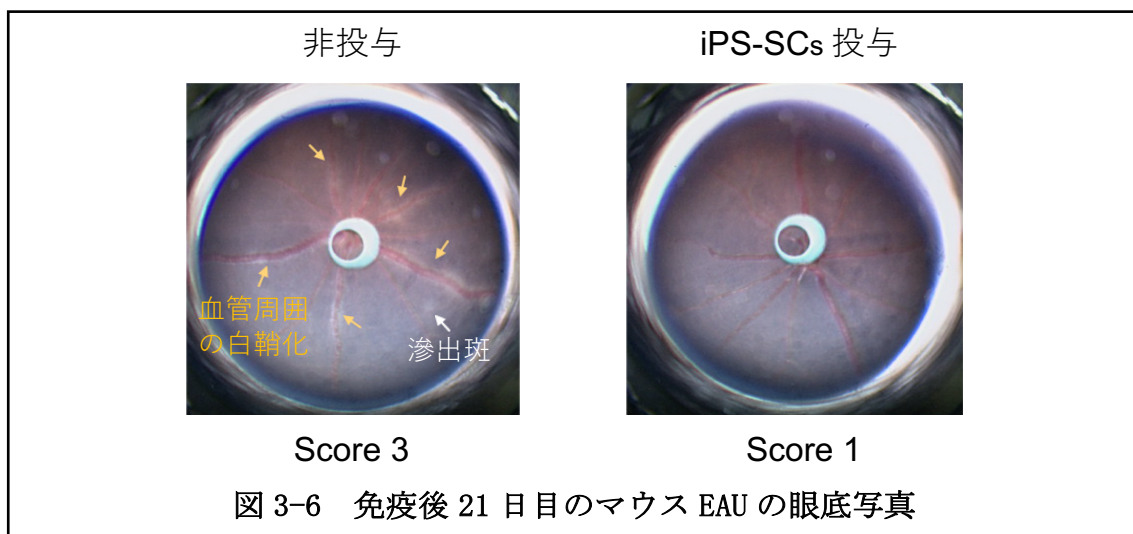
実験結果

1. マウス EAU に対する iPS-SCs の炎症抑制効果

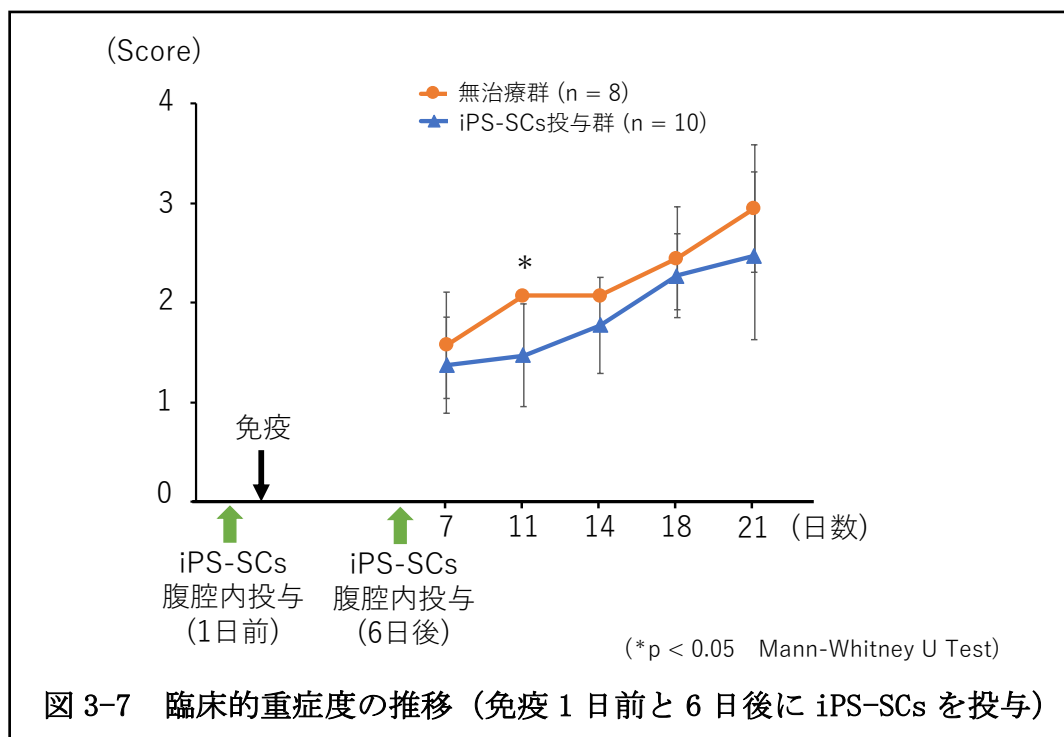
マウス EAU 誘導のために行う免疫の 1 日前と 6 日後に、対照群には PBS を腹腔内投与し、治療群には PBS に懸濁した iPS-SCs (5×10^5 個/匹) を腹腔内投与した。免疫後 7 日目から 3、4 日おきに 21 日目まで麻酔下で散瞳して眼底検査を行い、臨床的重症度を評価した (図 3-5)。



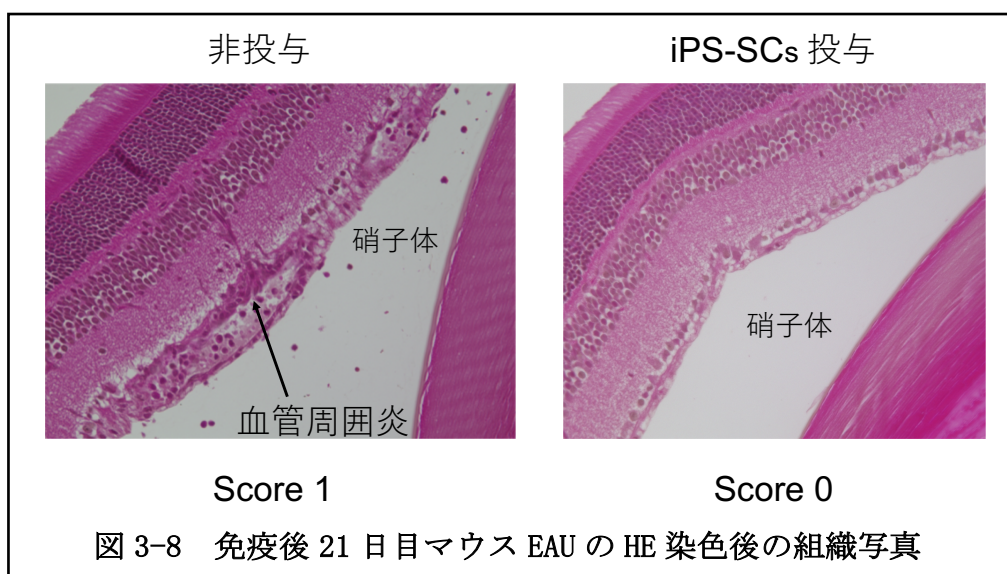
免疫の 1 日前と 6 日目に iPS-SCs を投与した結果、21 日目の眼底は iPS-SCs 非投与群では血管炎による血管周囲の白鞘化があり、炎症による網膜滲出斑も認められたのに対し、iPS-SCs 投与群ではそのような炎症所見は目立たなかった (図 3-6)。



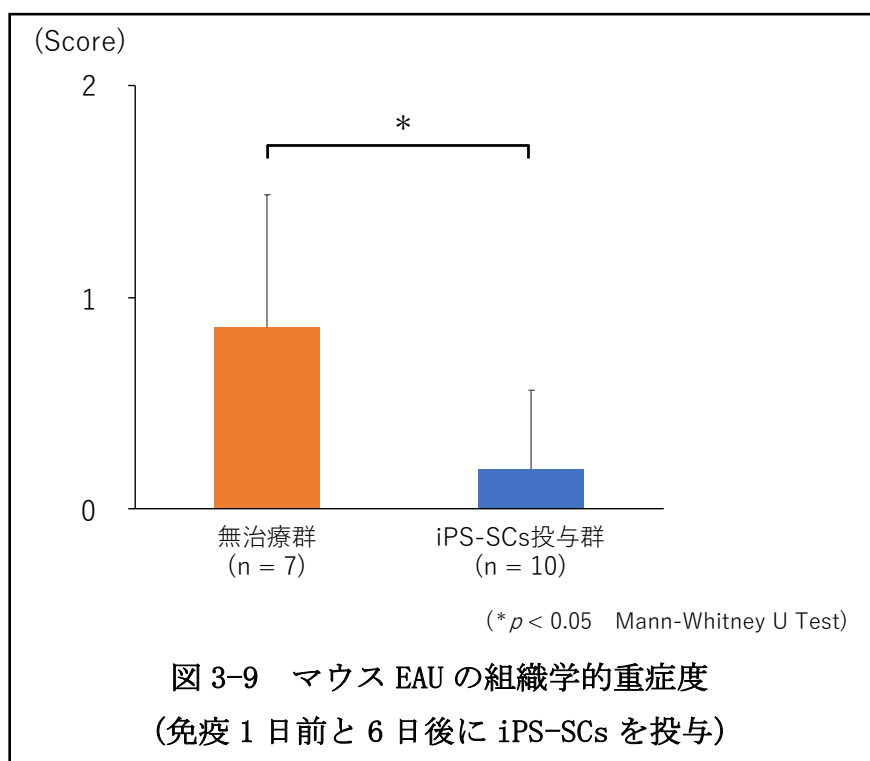
免疫後の臨床的重症度の推移について解析したところ、免疫後 11 日目に iPS-SCs 投与群では非投与群に比べて有意に炎症は軽症化していた ($p < 0.05$) (図 3-7)。



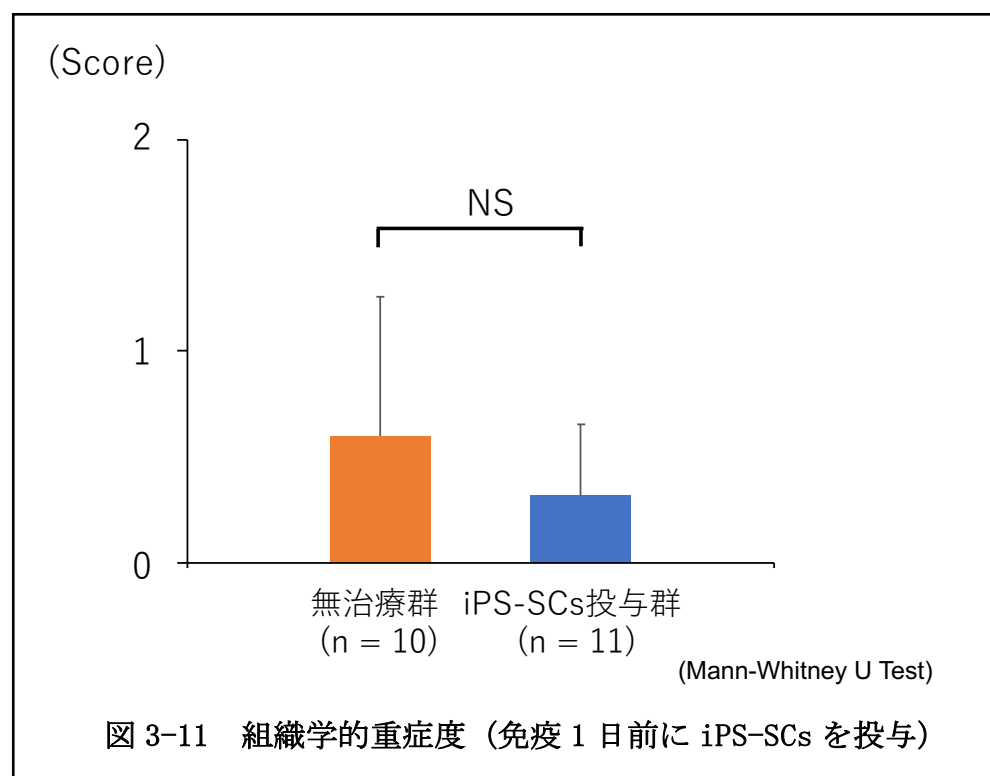
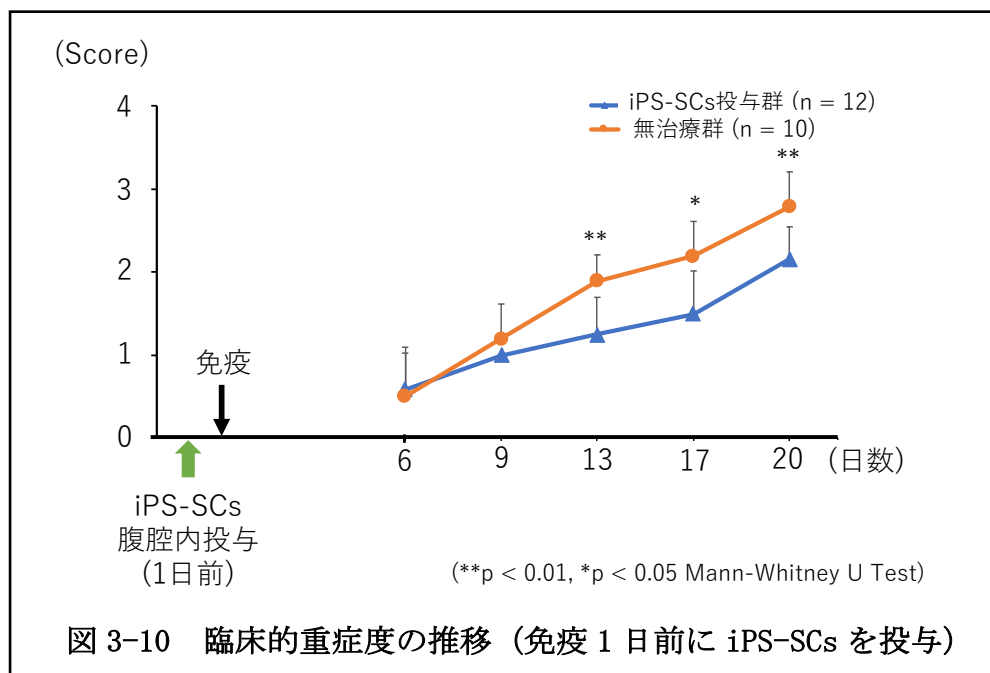
21 日目に眼球を摘出し、固定後に HE 染色を行い、組織学的重症度を評価した。iPS-SCs 非投与マウスでは、血管周囲炎の他に硝子体中に白血球が多数認められたのに対して、iPS-SCs 投与マウスではこれらの炎症所見は認められなかった (図 3-8)。



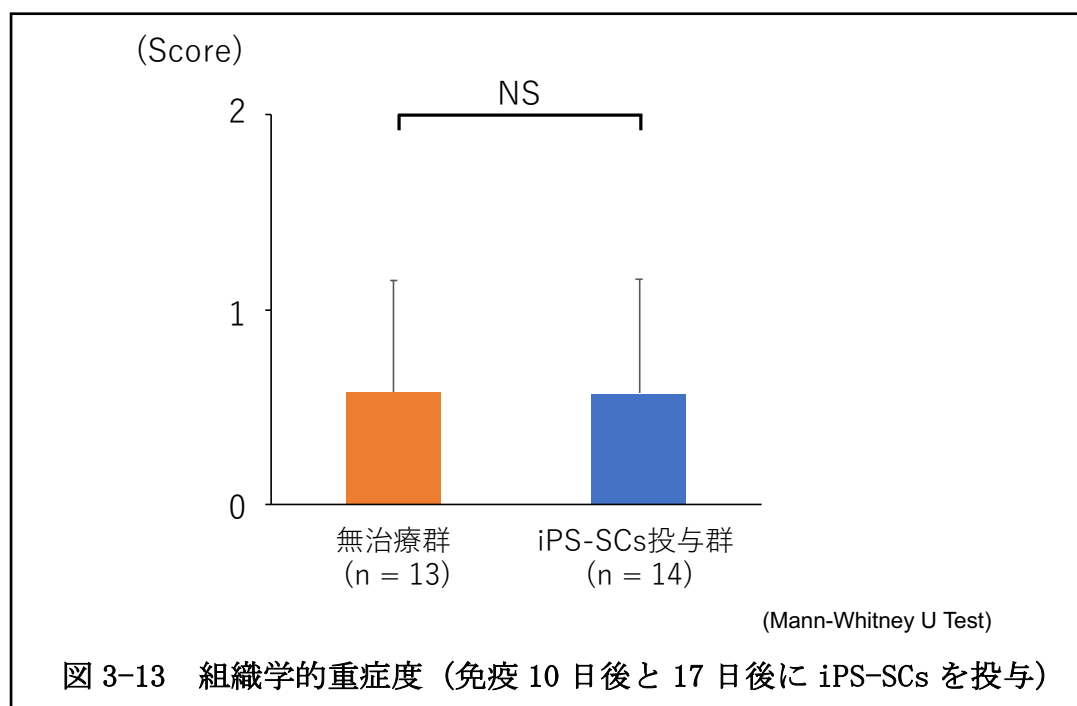
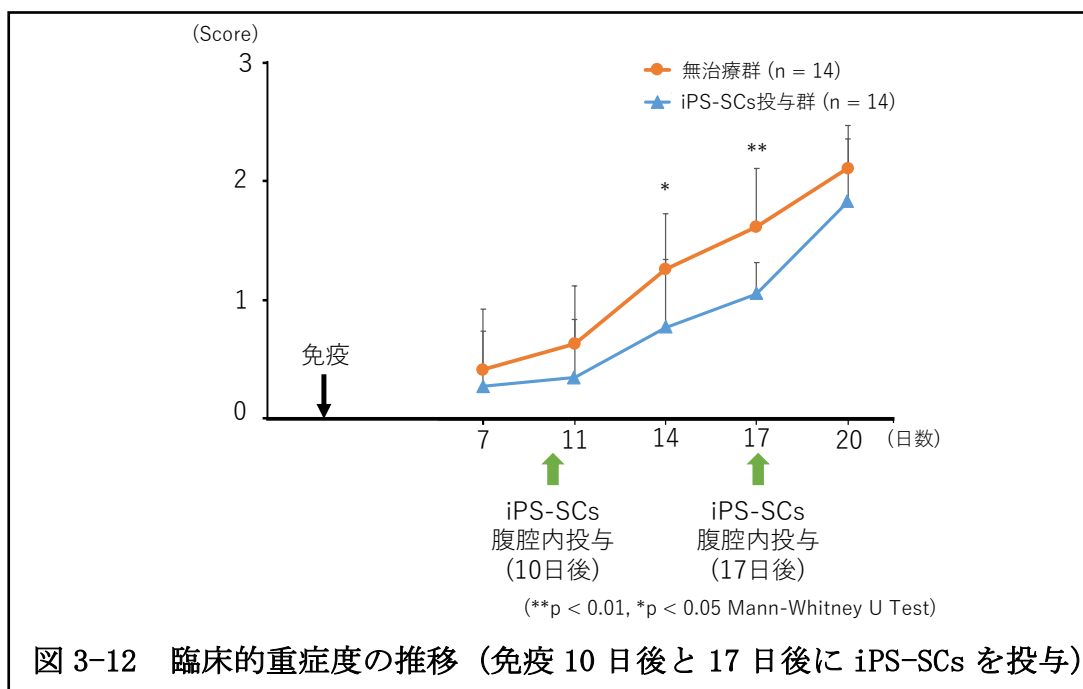
組織学的重症度について、iPS-SCs 非投与群と投与群で比較してみたところ、iPS-SCs 投与群では非投与群に比べて組織学的にも有意に炎症が軽症化していた ($p < 0.05$) (図 3-9)。



iPS-SCs の投与時期を免疫の 1 日前に倍量投与に変更した場合の結果は、臨床的重症度では免疫から 13 日目、17 日目、20 日目で iPS-SCs 投与群では非投与群と比べて EAU の炎症が軽症化していた (13 日目, 20 日目: $p < 0.01$ 、17 日目: $p < 0.05$) (図 3-10)。組織学的重症度では、両群間で有意差はなかった (図 3-11)。

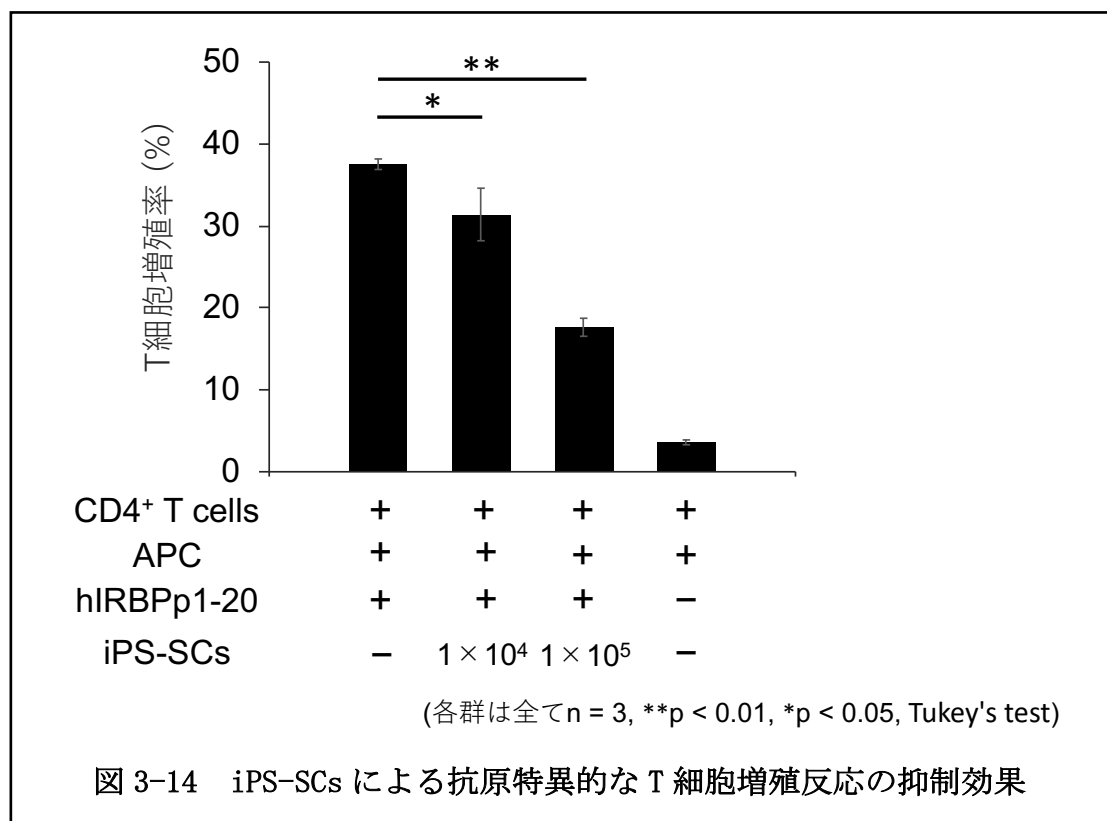


次に、iPS-SCs の投与時期を免疫から 10 日目と 17 日目に変更した場合の結果は、臨床的重症度では免疫から 14 日目、17 日目で iPS-SCs 投与群では非投与群と比べて EAU の炎症が有意に軽症化していた（14 日目： $p < 0.05$ 、17 日目： $p < 0.01$ ）（図 3-12）。組織学的重症度では、両群間で有意差はなかった（図 3-13）。

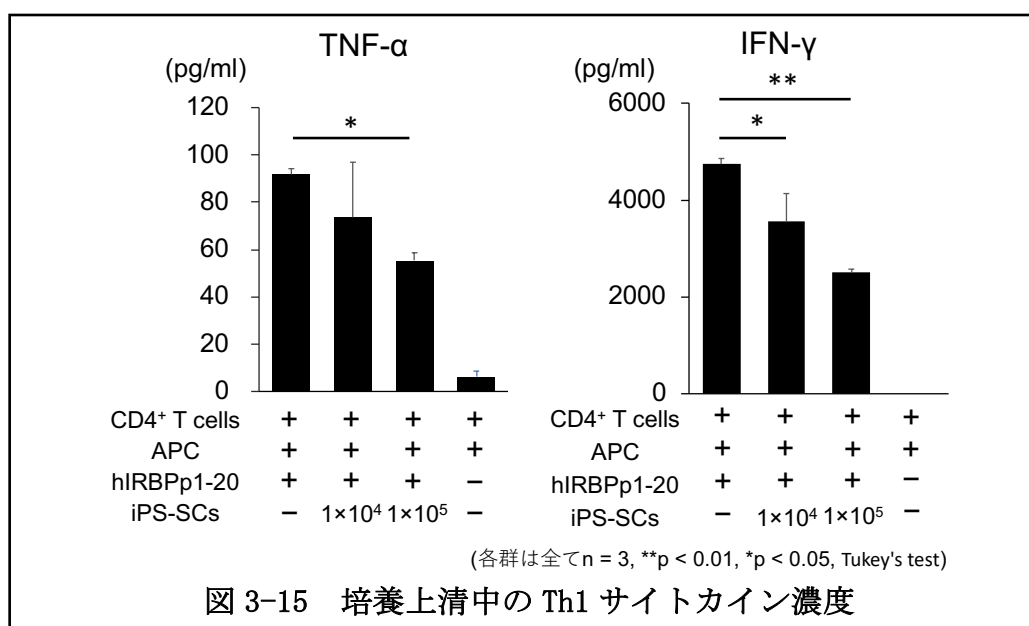


2. iPS-SCs による抗原特異的な T 細胞増殖反応の抑制効果と培養上清中のサイトカイン、NO 濃度の検討

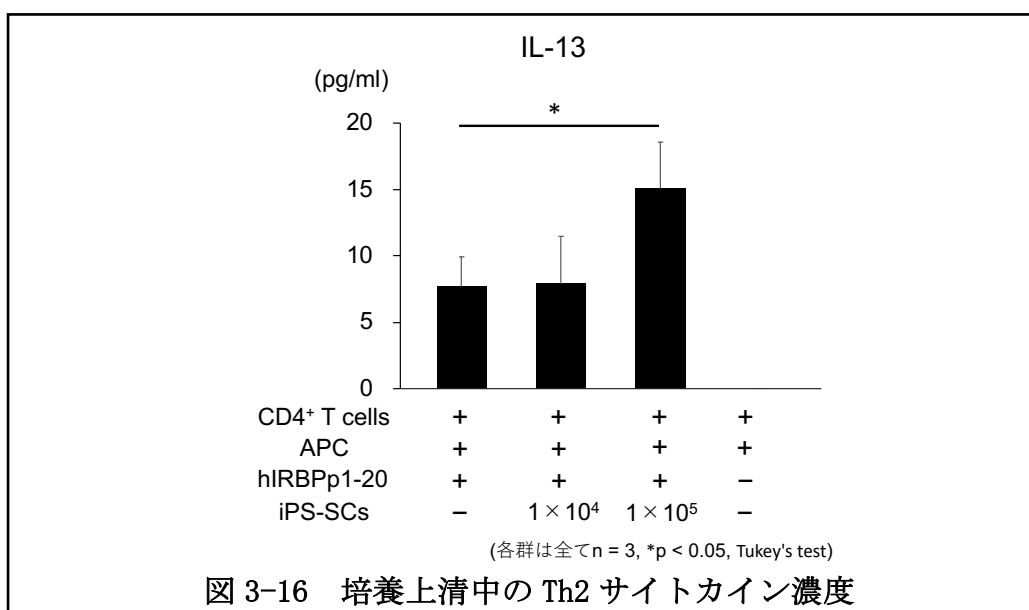
次に、*in vitro* で iPS-SCs が抗原特異的な T 細胞の増殖を抑制するのか検討した。hIRBPp1-20 を免疫したマウスから抽出した CD4 陽性 T 細胞 (4×10^5 個) とナイーブなマウスの脾臓細胞由来の APC (1×10^5 個) と hIRBPp1-20 と iPS-SCs (1×10^4 個もしくは 1×10^5 個) を共培養し、4 日後にフローサイトメーターを用いて T 細胞増殖反応を測定した。その結果、図 3-14 のように hIRBPp1-20 抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞は抗原ペプチドの存在下で APC と共培養することで強い増殖反応を示した。一方、iPS-SCs 添加により細胞数依存的にその T 細胞の増殖が有意に抑制された ($p < 0.05$)。



上記検討時に培養上清を採取し、細胞性免疫を司り感染防御に関わる Th1 サイトカイン (TNF- α 、IFN- γ 、IL-2)、液性免疫を司りアレルギー反応に関わる Th2 サイトカイン (IL-4、IL-5、IL-10、IL-13)、感染防御や自己免疫疾患に関わる Th17 サイトカイン (IL-17A、IL-17F) 濃度について測定した (Zhu and Paul, 2008)。Th1 サイトカインでは、 1×10^5 個の iPS-SCs を加えた群で、対照群に比べて TNF- α と IFN- γ 濃度が有意に減少していた (TNF- α : $p < 0.05$, IFN- γ : $p < 0.01$) (図 3-15)。IL-2 濃度は検出限界以下であった。



Th2 サイトカインでは、IL-13 濃度が 1×10^5 個の iPS-SCs を加えた群では、対照群に比べて有意に上昇していた ($p < 0.05$) (図 3-16)。IL-4、IL-5、IL-10 濃度は検出限界以下であった。



Th17 サイトカインでは、 1×10^5 個の iPS-SCs を加えた群で、対照群に比べて IL-17A と IL-17F 濃度が有意に上昇していた ($p < 0.01$) (図 3-17)。

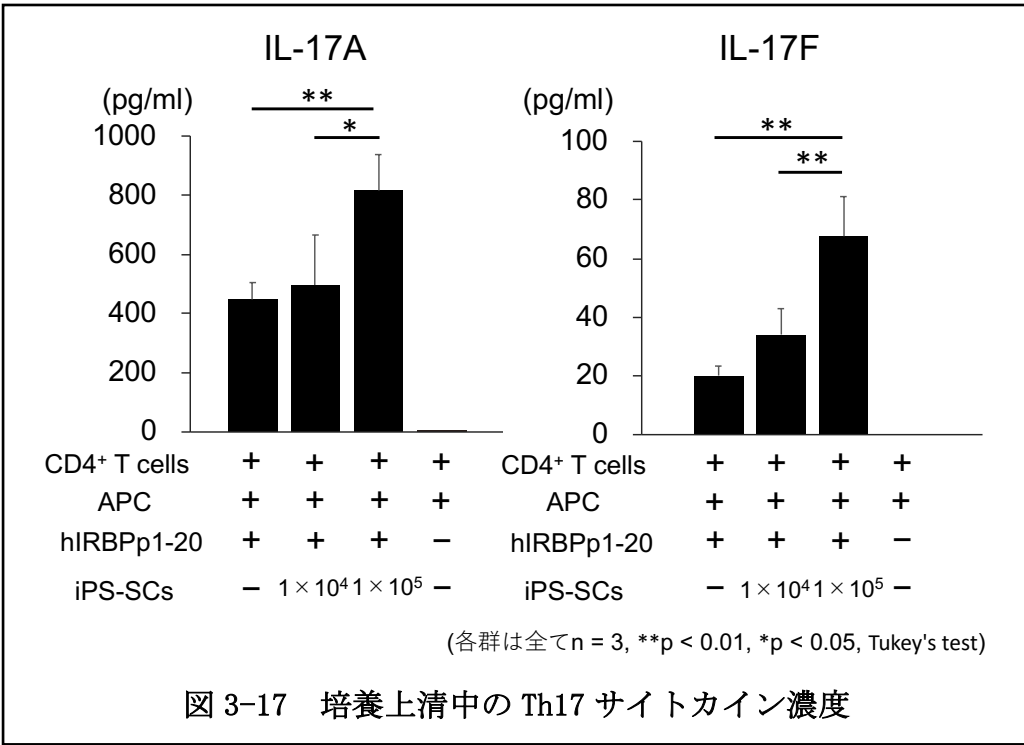
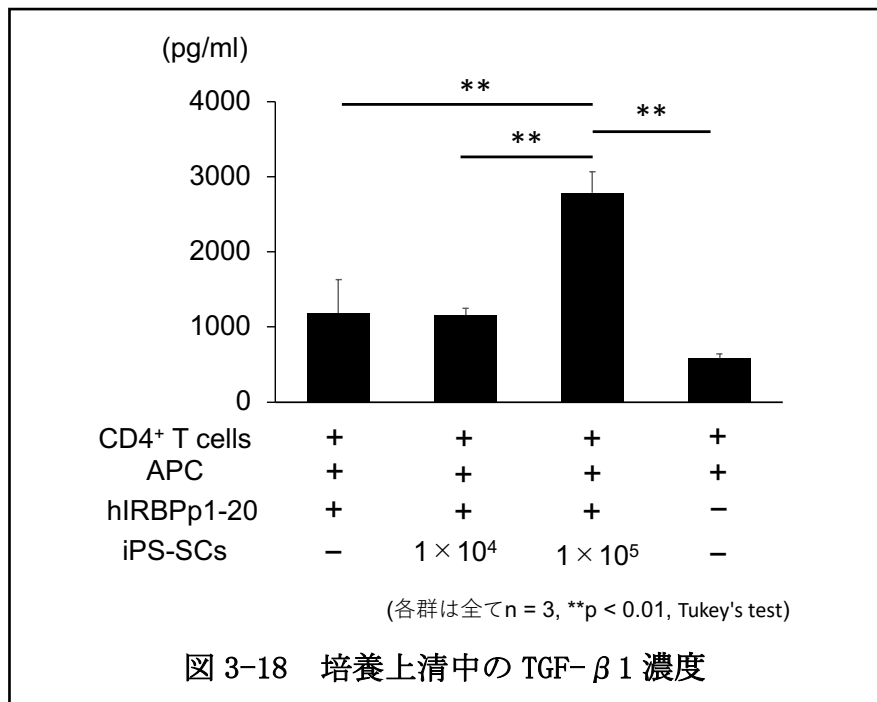
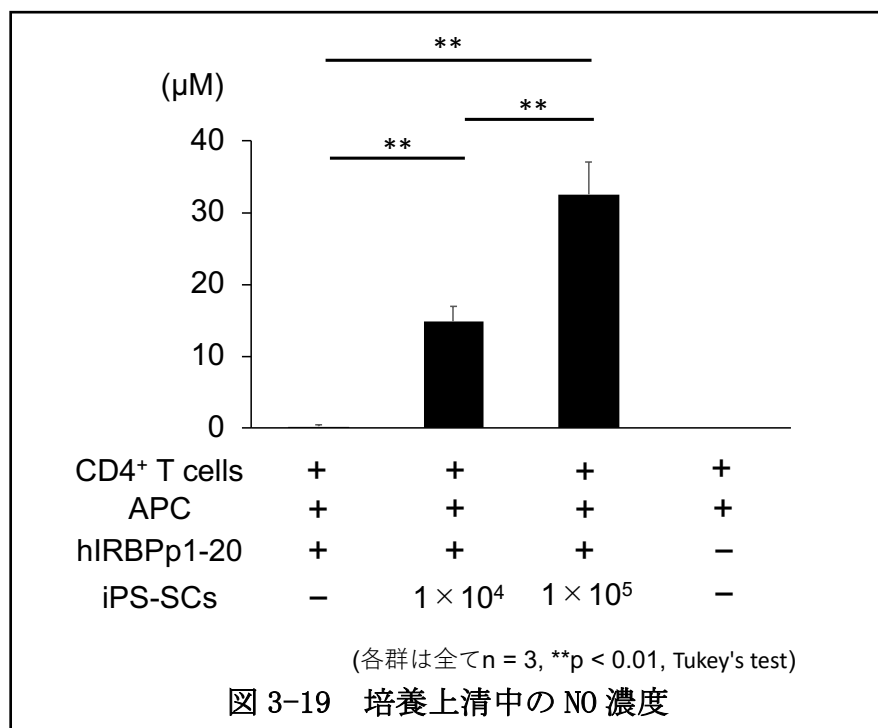


図 3-17 培養上清中の Th17 サイトカイン濃度

そのほか、抗炎症性サイトカインとして知られる $TGF-\beta 1$ が、活性化 T 細胞を抑制し、免疫抑制に関与することが報告されている (Kehrl et al., 1986) ため、培養上清中の $TGF-\beta 1$ 濃度についても測定を行った。結果、 $TGF-\beta 1$ 濃度は 1×10^5 個の iPS-SCs を加えた群で対照群に比べて有意に上昇していた ($p < 0.01$) (図 3-18)。

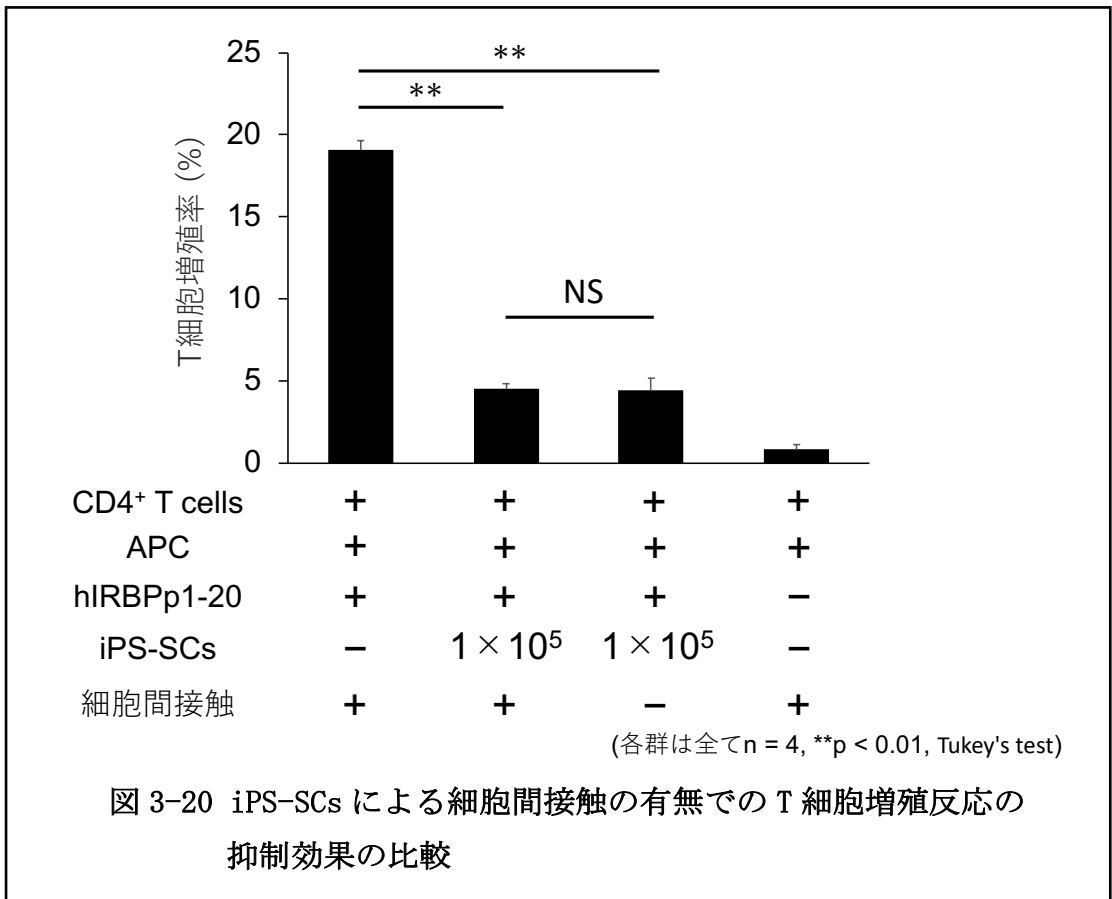


さらに、もう一つの免疫抑制に関わる分子として NO がある。NO は Th1 応答を低下させ、感染防御免疫の抑制に関与することが報告されている (Akaike, 2001)。NO 濃度についても測定した結果、 1×10^4 個と 1×10^5 個の iPS-SCs を加えた群では、対照群に比べて iPS-SCs の細胞数依存的に有意に上昇していた ($p < 0.01$) (図 3-19)。



3. iPS-SCs による細胞間接触の有無での抗原特異的な T 細胞増殖反応の抑制効果の比較検討

iPS-SCs が T 細胞の増殖反応を抑制する機序として、iPS-SCs が他の細胞との接触が関与するかについて検討した。セルカルチャーインサートプレートによって、iPS-SCs (1×10^5 個/well) と T 細胞 (4×10^5 個/well) および APC (1×10^5 個/well) を分離して培養した。結果、細胞同士の接触がない培養条件下でも、iPS-SCs は抗原特異的な T 細胞増殖反応を抑制した (図 3-20)。このことから、iPS-SCs は、他の細胞との接触に関係なく、何らかの液性因子を分泌して、T 細胞の増殖を抑制していることが示唆された。



4. NO 合成酵素阻害剤と抗 TGF- β 抗体による iPS-SCs の T 細胞増殖反応抑制効果への影響

図 3-18 と 3-19 で示したが培養上清中のサイトカインの中で、iPS-SC を含む well では NO と TGF- β 1 濃度が上昇しており、既報にて両分子に免疫抑制能があるとされている(Bingisser et al., 1998; Cottrez and Groux, 2001; Kehrl et al., 1986)ことから、iPS-SCs がこれらの分子を分泌して T 細胞の増殖を抑制している可能性が考えられた。そのため、T 細胞と APC と hIRBPp1-20 と iPS-SCs を共培養する際に、NO や TGF- β 1 の阻害剤を加え、iPS-SCs の T 細胞増殖抑制効果が消去されるかどうかについて検討した。

まず、NO の産生を阻害することが知られる L-NMMA を用いて検討を行った。iPS-SCs による T 細胞増殖抑制効果は、L-NMMA (5000 μ M, 500 μ M, 50 μ M) を添加しても、全ての濃度で消去されることはなかった (図 3-21)。

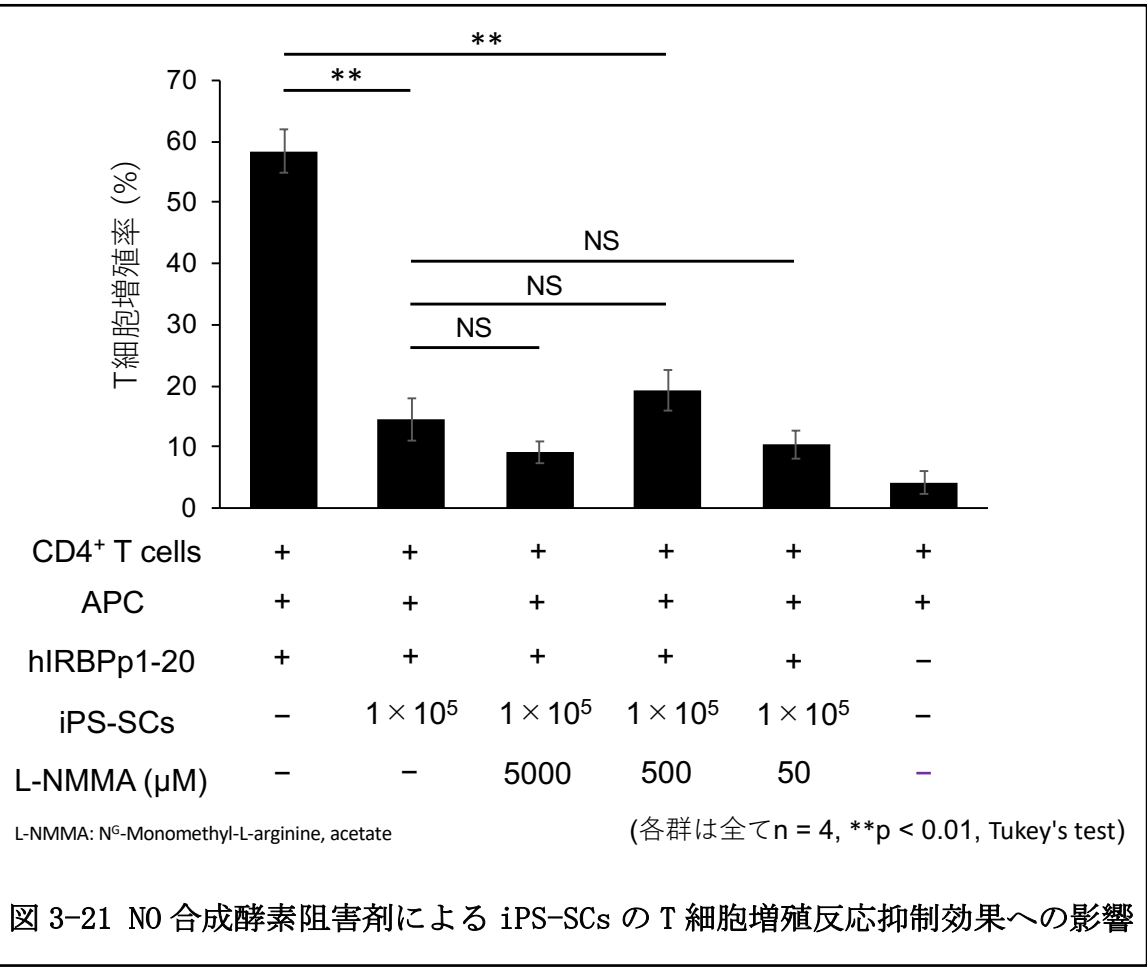
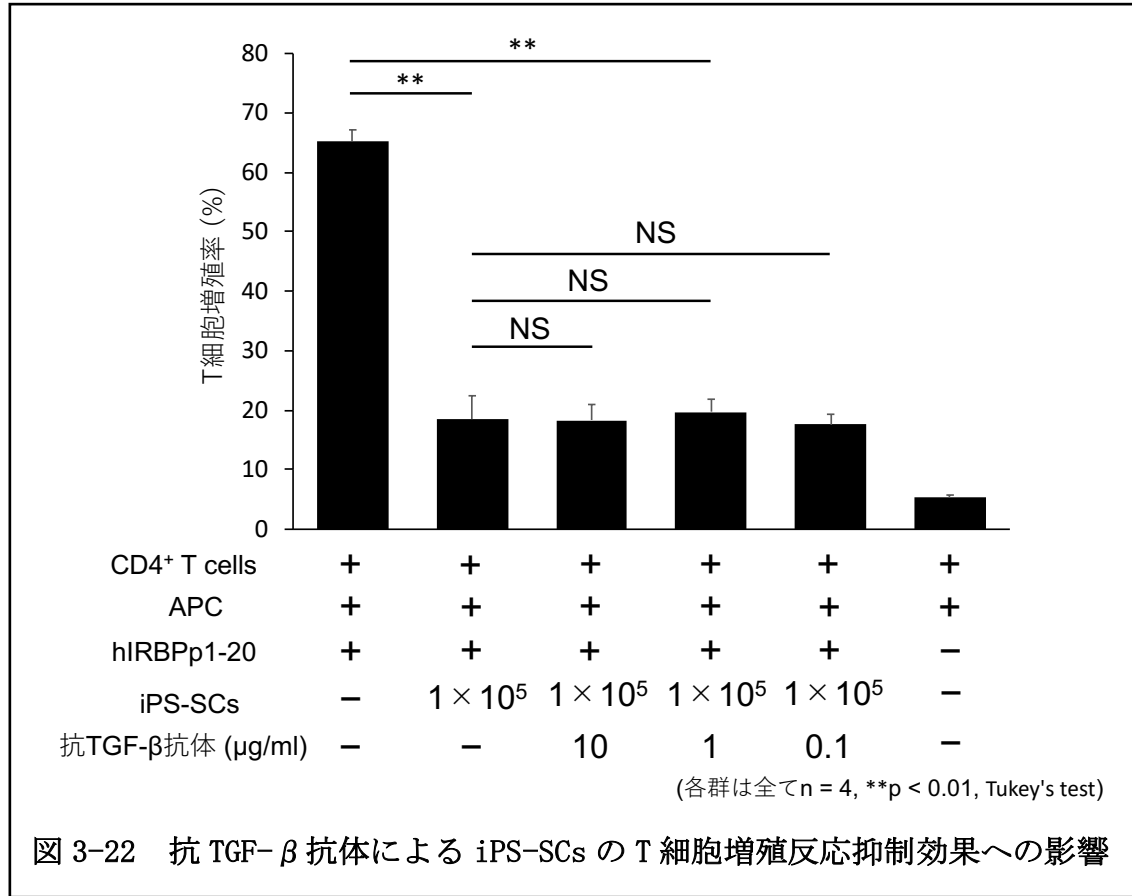


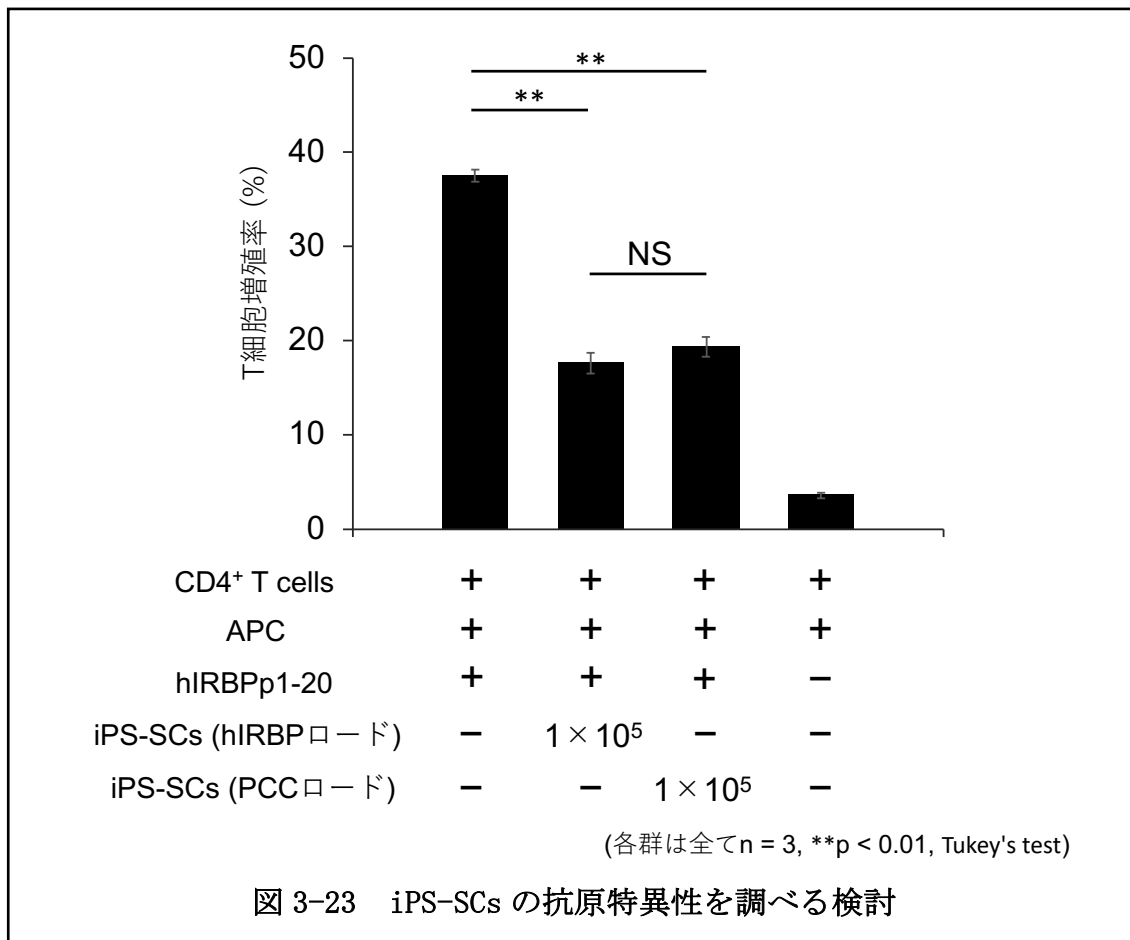
図 3-21 NO 合成酵素阻害剤による iPS-SCs の T 細胞増殖反応抑制効果への影響

次に、抗 TGF- β 中和抗体を用いた TGF- β 1 の阻害実験を行った結果、3 段階の濃度（10 μ g/ml, 1 μ g/ml, 0.1 μ g/ml）すべてで T 細胞増殖抑制効果は消去されなかった（図 3-22）。



5. iPS-SCs の抗原特異性についての検証

iPS-SCs に抗原特異性があれば、生体防御にとって大事な免疫反応を残し、疾患の原因となる抗原に対する免疫反応のみを抑えることができ、その有用性は高まる。そのため、iPS-SCs の抗原特異性について検討した。iPS-SCs の回収 24 時間前に、iPS-SCs の培養液に hIRBPp1-20 を添加することにより iPS-SCs に hIRBPp1-20 をロードしたものと、hIRBPp1-20 と同様に C57BL/6J マウスの MHC クラス II に結合する Pigeon cytochrome c (PCC) p43-58 を添加することにより PCC p43-58 をロードしたものの 2 種類の iPS-SCs を準備した。hIRBPp1-20 を免疫したマウスから抽出した CD4 陽性 T 細胞と APC と hIRBPp1-20 と iPS-SCs (hIRBPp1-20 ロードもしくは PCC p43-58 ロード) を共培養し、4 日後にフローサイトメーターを用いて T 細胞増殖反応を測定した。結果、hIRBPp1-20 抗原特異的な T 細胞増殖反応は、hIRBPp1-20 をロードした iPS-SCs でも、PCC p43-58 をロードした iPS-SCs でも同程度に抑制され、両群間に有意差は認められなかった (図 3-23)。



考察

iPS-SCs は、マウス脾臓 B 細胞由来の iPS 細胞から誘導され、CD11b、F4/80、CD206、CD14 などのマクロファージマーカー分子を発現し、Arginase-1 や Nos2 などの免疫抑制性分子の mRNA を高発現している。このことから、得られた細胞は免疫抑制能を有していることが推測され、マクロファージ様 iPS 細胞由来免疫抑制細胞 (iPS-SCs) と命名された (Sasaki et al., 2015)。 *in vitro* で同種異系間の樹状細胞と T 細胞を共培養する際に、この iPS-SCs を加えると、細胞数に依存して同種異系反応性 T 細胞の増殖が抑制された。また、 *in vivo* では同種異系間の移植片組織の生着期間について検討したところ、iPS-SCs を投与されたマウスでは、非投与マウスと比べて、拒絶反応が抑制され、同種異系間の移植片組織の生着が延長された (Sasaki et al., 2015)。以上のことから、iPS-SCs には免疫抑制能があることが示唆されている。今回、我々はこの免疫抑制能に着目し、ぶどう膜炎治療に応用できるのではないかと考え、本研究に至った。

我々の検討により、iPS-SCs を免疫の 1 日前と 6 日後に投与した場合には、iPS-SCs が EAU マウスの臨床的重症度 (免疫後 11 日目) と組織学的重症度ともに軽症化することがわかった (図 3-7、図 3-9)。また、iPS-SCs の投与時期を免疫の 1 日前に 1 回投与にした場合は、臨床的重症度は免疫後 13 日目、17 日目、20 日目で有意に抑制され (図 3-10)、免疫の 10 日後と 17 日後に iPS-SCs を投与した場合にも、免疫後 14 日目、17 日目で有意に臨床的重症度は抑制された (図 3-12)。しかしながら、両者ともに組織学的重症度では有意な抑制がみられなかった (図 3-11、図 3-13)。獲得免疫機構における CD4 陽性 T 細胞の分化には、胸腺で作られたナイーブヘルパー T 細胞 (Th0 細胞) が、リンパ節で APC から外来抗原の刺激を受けて活性化されるプライミング期 (抗原刺激から約 7 日～10 日目以前) と、活性化された後に Th1, Th2, Th17 などのエフェクター細胞に分化し外来抗原を攻撃するエフェクター期 (抗原刺激から約 7 日～10 日目以降) がある (Usui, 2007)。今回の結果によると、プライミング期もしくはエフェクター期のいずれかの時期に iPS-SCs を投与しても、臨床的重症度を見る限りでは、炎症を軽症化する効果があった。臨床応用する観点から考えると、エフェクター期の投与で効果があるということは、ぶどう膜炎を発症した後でも iPS-SCs を投与すると効果があることになり、有用性は高い。ただ、問題点としては臨床的重症度では有意差がつくが、組織学的重症度では有意差がつかないという、炎症所見の乖離が起きたことである。この原因として、組織学的重症度は組

組織切片の断面に肉芽種や血管炎の所見が含まれないと炎症スコアが低くなってしまい、組織学的重症度は臨床的重症度に比べて、炎症スコアが低くなりやすいことが考えられる。これを解決するには、より重症度の高い炎症が得られる系統のマウスを用いる、あるいは各実験でより多くのマウスを用いることが望ましい。しかしながら、iPS-SCs 作製の技術的制約から一度にこれ以上の必要細胞を準備することも、他の系のマウスを用いることも困難であった。将来、技術の進歩によってこれらの問題点が解決してさらに本研究が進歩することを期待している。

iPS-SCs が *in vitro* でも抗原特異的な T 細胞増殖反応を細胞数に依存して有意に抑制し（図 3-14）、さらに培養上清中の Th1 サイトカインである TNF- α や IFN- γ を有意に減少させた（図 3-15）。EAU は Th1 サイトカインと Th17 サイトカインが病態に関与していることが知られている (Kikly et al., 2006; Lohr et al., 2006; Xu et al., 1997; Yen et al., 2006)。そのことを踏まえると、Th1 サイトカインの中でも、特に数値的に大きな IFN- γ の産生を大幅に減少させたことが EAU の軽症化につながったと考えられる。一方で、今回の結果では培養上清中の IL-17A や IL-17F といった Th17 サイトカインは逆に上昇している（図 3-17）。これは、Th1 と Th17 は拮抗している (Harrington et al., 2005; Rangachari et al., 2006) ため、Th1 サイトカインである TNF- α や IFN- γ が減少したことに反応して相対的に Th17 サイトカインが上昇したと考えられる。同様に、Th1、Th2 についても両者は Th1/Th2 パラダイムと呼ばれ、お互いに拮抗している (Muraille and Leo, 1998) ことが知られている。すなわち、Th2 サイトカインである IL-13 が上昇した（図 3-16）ことも、Th1 サイトカインの減少に伴って上昇した可能性がある。

次に、iPS-SCs が EAU を抑制するメカニズムについてであるが、iPS-SCs と T 細胞や APC といった他の細胞を分離して、細胞間接触がない状態で培養しても、iPS-SCs が抗原特異的な細胞増殖を抑制した（図 3-20）ことから、何らかの液性因子が免疫抑制に関与していることが示唆された。その候補として iPS-SCs を含む培養上清中で上昇している NO や TGF- β 1（図 3-18、図 3-19）が考えられ、両分子の阻害実験を行った。NO には活性化した T 細胞に対する抑制機能を持っており、すなわち免疫抑制能があることが知られている (Bingisser et al., 1998)。既報でも、iPS-SCs が同種異系間の移植片組織の生着を延長させるメカニズムとして、iPS-SCs による免疫抑制に NO の介在が重要であるとされている

(Sasaki et al., 2015)。同様に、TGF- β 1 も免疫抑制能を持っており、T 細胞の増殖反応を抑制することが知られている (Cottrez and Groux, 2001; Kehr et al., 1986)。しかしながら、L-NMMA および TGF- β 中和抗体を加えても iPS-SCs の T 細胞増殖抑制効果を消去することはできなかった (図 3-21、図 3-22)。すなわち、今回の結果からは EAU における iPS-SCs の免疫抑制効果に NO や TGF- β 1 は関与していないことが示唆され、免疫抑制に関わる液性因子の同定には至らなかった。NO や TGF- β 1 以外の分子が iPS-SCs の T 細胞の増殖反応抑制に関与している可能性がある。

最後に、iPS-SCs の抗原特異性に関しては、hIRBPp1-20 と同様に C57BL/6J (H-2^b) の MHC クラス II 分子に結合することが知られている PCC p43-58 (Itoh et al., 1997) を使用して検討した。もし、iPS-SCs に抗原特異性があるとすれば、hIRBPp1-20 をロードしたものは、PCC p43-58 をロードしたものより、hIRBPp1-20 抗原特異的な T 細胞増殖反応を強く抑制することが予測された。しかしながら、我々の実験の結果では、抗原特異的な iPS-SCs の T 細胞の増殖抑制効果に有意差は認められなかった (図 3-23)。iPS-SCs がマクロファージ様であることを踏まえると、iPS-SCs は well 内に存在するよりも、マウスの体内 (血液中など) に存在するほうが自然な環境であり、炎症局所へ遊走し、より選択的に機能する可能性がある。

今後の課題として、iPS-SCs の T 細胞の増殖反応抑制に関わる液性因子の同定や抗原特異性などのメカニズムの解明が挙げられる。抗原特異性に関しては、iPS-SCs を直接 well 内に入れるのではなく、免疫したマウスに投与して、同様に抗原特異性を検討する予定である。具体的には、hIRBPp1-20 をロードした iPS-SCs を、hIRBPp1-20 と PCC p43-58 を免疫したマウスに腹腔内投与して、そこから抽出した T 細胞と APC とペプチド (hIRBPp1-20 もしくは PCC p43-58) を共培養し、両ペプチドに対する T 細胞の増殖反応に差が出るかどうか検討する。もし、hIRBPp1-20 をロードした iPS-SCs に抗原特異性があれば、hIRBPp1-20 と共培養した際の T 細胞増殖反応は、PCC p43-58 と共培養した際に比べて、より強く抑制されることが予測される。抗原特異性があれば、疾患の原因となる抗原に対する T 細胞の増殖のみを抑えることができ、生体防御に必要な免疫反応に影響は与えないため、治療の安全性を考えた上で非常に有用である。

今後さらに本研究が発展し、安全な再生医療実現の一助となることを期待する。

結論

第 1 章

糖尿病による慢性炎症や腎機能障害や高血糖は、全身の s(P)RR の発現を上昇させ、それにより組織 RAS の活性化が起こり、PDR における網膜新生血管に関わっていることが示唆された。

第 2 章

眼内と関与する細胞は異なるが、血漿中ガレクチン-1 が AGEs と IL-1 β の経路を介した発現制御系が存在し、糖尿病合併症における様々な臓器での病態形成に関与していることが示唆された。

第 3 章

iPS-SCs が分泌する液性因子が抗原特異的 T 細胞の増殖を抑制し、EAU における炎症病態を軽症化することが示唆された。

総括

近年の生活環境や食習慣の変化と高齢化に伴い、我が国には罹病期間の長い DM 患者が急増したことにより、DR を伴った患者が増加している。DR の病態には、慢性炎症による網膜への白血球浸潤が関与していることが知られている (Ishida et al., 2003; Miyamoto et al., 1999)。病態機序の解明により、近年は抗 VEGF 製剤の臨床応用によって治療成績は著しく向上している。しかしながら、現在でもなお治療に抵抗する症例は数多く、DR は我が国における視覚障害原因疾患第 3 位の難治性眼疾患である (白神, 2017)。

炎症が病態に関与するもう一つの疾患としてぶどう膜炎がある。ぶどう膜炎も 40 歳以上の中途失明原因の約 10%を占める難治性眼疾患である。DM の合併症として生じることも知られている。治療は、ステロイド薬や免疫抑制薬の全身投与が主体である。しかしながら、薬剤の副作用のために治療を行えないこともしばしば見受けられる。例えば、ステロイド薬全身投与の副作用で高血糖が生じるために、DM 患者では使用できない。そのため、最近では抗 TNF- α 製剤であるインフリキシマブが臨床応用され、ベーチェット病患者のぶどう膜炎治療に大きな効果を上げている。ただ、この治療は高額であるため、経済的な理由で継続できない患者も多く、新たな画期的な治療が望まれている。そこで、本研究では難

治性眼疾患である DR とぶどう膜炎に対して、(P)RR とガレクチン-1 という新たな分子を標的にした病態解明と、新規治療法の開発を目指して検討を行った。

これまでに我々は、DM モデルマウスを用いて、組織 RAS の活性化が DR の発症や進行に関与していることを明らかにした (Nagai et al., 2007)。さらに、RAS の上流に位置する (P)RR が眼内における炎症性サイトカインの発現を上昇させ、DR やぶどう膜炎などの炎症や血管新生を特徴とする炎症性眼疾患の病態形成に関与していることも明らかにした (Kanda et al., 2012, 2013)。そして、これらの発見をきっかけに、我々は (P)RR を標的分子とした治療薬の開発に取り組んできた。RNA 干渉のメカニズムを応用した日本独自の核酸医薬に関する新規基盤技術を用いて、新規 (P)RR 阻害剤として一本鎖長鎖 RNA である (P)RR-proline-modified short hairpin (Psh) RNA を開発することに成功した。さらに、ぶどう膜炎や DR 疾患モデル動物において (P)RR-PshRNA の硝子体内投与により有害事象なく、眼病態の抑制効果を認めることを示した (Kanda et al., 2017b)。また近年、脈絡膜に新生血管を生じる病気の一つである加齢黄斑変性モデル動物でも、この (P)RR-PshRNA 硝子体内投与によって、血管新生を抑制できることを報告した (Liu et al., 2019)。以上のことから、(P)RR-PshRNA はぶどう膜炎や DR や加齢黄斑変性などの幅広い炎症性眼疾患に用いることができるため、もし臨床応用されれば非常に革命的な治療薬になると期待している。第 1 章では、DM 患者において慢性炎症や腎機能障害や高血糖が、血漿中の s(P)RR の発現を上昇させ、組織 RAS を活性化し、PDR の病態に関与していることが示唆された。また、血漿中の s(P)RR の上昇は、DM 腎症の病態そのものにも関与している可能性も示された。このことから、(P)RR-PshRNA などの (P)RR 阻害剤によって血漿中の s(P)RR 濃度を減少させることができれば、網膜症のみならず腎機能障害などの全身的な合併症を抑制することができる可能性も秘めている。

血管新生因子ガレクチン-1 は低酸素によって誘導されるほか、眼内では AGEs によって産生された IL-1 β によって発現誘導が起こり、DR に関与していることを我々は以前に報告した (Kanda et al., 2017a; Kanda et al., 2015)。第 2 章の研究により、ガレクチン-1 が DM 患者の血漿中でも上昇し、AGEs や IL-1 β と相関していることから、(P)RR と同様に全身的な糖尿病合併症に関与していることが示唆された。最近、我々は糖尿病黄斑浮腫 (DME) に対する眼局所注射薬として用いられるステロイド薬のグルココルチコイドが、眼内で IL-1 β シグナル伝達を介したガレクチン-1 発現を制御していることを我々は明らかにした

(Hirose et al., 2019)。グルココルチコイドによる黄斑浮腫の抑制メカニズムに、ガレクチン-1 の産生抑制が関連しているという報告は我々が世界で初めてである。DR 患者の眼内で高値を示すガレクチン-1 は VEGF 非依存的に血管新生を惹起することから、VEGF 阻害薬に抵抗する DME 症例は、ステロイド治療によるガレクチン-1 の産生抑制を考慮した治療法を開発できる可能性がある。今後は、治療に抵抗する DME に対する新たな治療法の一つとして、ガレクチン-1 阻害剤の開発に取り組みたいと考えている。

ぶどう膜炎治療の根治療法を目指すべく、これまでにいくつかの免疫抑制性細胞を用いた研究が行われてきた。我々も眼房水に含まれている α -MSH 及び TGF- β 2 によって制御性 T 細胞を誘導し、その制御性 T 細胞を移入することによりマウス EAU を抑制することを報告した (Namba et al., 2002)。しかしながら、これらの手法は遺伝的背景が同一な同系マウスでは別個体間での移入が可能であるが、ヒトへの臨床応用を考える際には患者本人の免疫抑制性細胞を用いることが必須条件となる。また免疫抑制性細胞を *in vitro* で誘導・増殖させるには、得られる細胞数に限界があることや、逆にぶどう膜炎を誘発・増悪させるような細胞が混入するリスクがあることが問題であった。第 3 章の研究で用いた iPS-SCs の利点は、iPS 細胞由来であるため同じ細胞を大量に生産することができ、細胞を移植する際に拒絶反応が起きにくいということである。すなわち、本手法を用いることで、患者本人の iPS 細胞から誘導した充分量の免疫抑制性細胞を得ることが可能となり、ぶどう膜炎のみならず自己免疫疾患の治療に有効であることが期待される。しかしながら、iPS-SCs の抗原特異性や炎症抑制機序の解明や、将来的にヒトに臨床応用するためには、従来のステロイド薬との効果の比較、最良の投与時期や安全性などについて検討すべき課題は数多い。

今後は、(P)RR やガレクチン-1 などを標的とした DR の治療法開発や、免疫抑制性細胞である iPS-SCs の臨床応用を目指した研究を今後も進めていきたい。本研究の成果が今後の難治性眼疾患の治療の一助になる日が来れば幸いである。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂き、御指導と御校閲を賜りました、北海道大学大学院医学研究院眼科学教室 石田晋教授に深甚なる謝意を表します。また本研究にわたって直接御指導を頂きました北海道大学大学院医学研究院眼科学教室 神田敦宏特任講師、南場研一診療准教授に深く感謝の意を表します。マクロファージ様 iPS 細胞由来免疫抑制細胞を分与頂き、御指導を賜りました北海道大学遺伝子病制御研究所免疫生物分野 清野研一郎教授、和田はるか講師、研究にあたって多くの御助言を頂きました北海道大学大学院医学研究院眼科学教室 野田航介准教授、加瀬諭講師、村田美幸特任助教に厚く御礼を申し上げます。さらに研究室のサポートをして頂いた、廣瀬育代技術補助員、吉田志帆研究補助員に心より感謝の意を表します。最後に、公私ともにサポートして下さいました医局員・秘書・大学院の諸先輩方、ならびに大学院生の仲間達に深く感謝致します。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- Adamis, A.P., Miller, J.W., Bernal, M.T., D'Amico, D.J., Folkman, J., Yeo, T.K., and Yeo, K.T. (1994). Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* *118*, 445-450.
- Akaike, T. (2001). Role of free radicals in viral pathogenesis and mutation. *Rev Med Virol* *11*, 87-101.
- Al-Obaidi, N., Mohan, S., Liang, S., Zhao, Z., Nayak, B.K., Li, B., Sriramaraao, P., and Habib, S.L. (2019). Galectin-1 is a new fibrosis protein in type 1 and type 2 diabetes. *FASEB J* *33*, 373-387.
- Amari, Y., Morimoto, S., Nakajima, F., Ando, T., and Ichihara, A. (2016). Serum Soluble (Pro)Renin Receptor Levels in Maintenance Hemodialysis Patients. *PLoS One* *11*, e0158068.
- Bingisser, R.M., Tilbrook, P.A., Holt, P.G., and Kees, U.R. (1998). Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. *J Immunol* *160*, 5729-5734.
- Biswas, K.B., Nabi, A.N., Arai, Y., Nakagawa, T., Ebihara, A., Ichihara, A., Inagami, T., and Suzuki, F. (2011). Qualitative and quantitative analyses of (pro)renin receptor in the medium of cultured human umbilical vein endothelial cells. *Hypertens Res* *34*, 735-739.
- Brenner, B.M., Cooper, M.E., de Zeeuw, D., Keane, W.F., Mitch, W.E., Parving, H.H., Remuzzi, G., Snapinn, S.M., Zhang, Z., Shahinfar, S., *et al.* (2001). Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* *345*, 861-869.
- Camby, I., Le Mercier, M., Lefranc, F., and Kiss, R. (2006). Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology* *16*, 137R-157R.
- Chaturvedi, N., Sjolie, A.K., Stephenson, J.M., Abrahamian, H., Keipes, M., Castellarin, A., Rogulja-Pepeonik, Z., and Fuller, J.H. (1998). Effect of lisinopril on progression of retinopathy in normotensive people with type 1 diabetes. The EUCLID Study Group. EURODIAB Controlled Trial of Lisinopril in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Lancet* *351*, 28-31.
- Costantini, S., Capone, F., Guerriero, E., Marfella, R., Sorice, A., Maio, P., Di Stasio, M., Paolisso, G., Castello, G., and Colonna, G. (2012). Cytokinome

profile of patients with type 2 diabetes and/or chronic hepatitis C infection. *PLoS One* *7*, e39486.

Cottrez, F., and Groux, H. (2001). Regulation of TGF-beta response during T cell activation is modulated by IL-10. *J Immunol* *167*, 773-778.

Doganay, S., Evereklioglu, C., Er, H., Turkoz, Y., Sevinc, A., Mehmet, N., and Savli, H. (2002). Comparison of serum NO, TNF-alpha, IL-1beta, sIL-2R, IL-6 and IL-8 levels with grades of retinopathy in patients with diabetes mellitus. *Eye (Lond)* *16*, 163-170.

El-Asrar, A.M., Al-Rubeaan, K.A., Al-Amro, S.A., Moharram, O.A., and Kangave, D. (2001). Retinopathy as a predictor of other diabetic complications. *Int Ophthalmol* *24*, 1-11.

Flyvbjerg, A. (2010). Diabetic angiopathy, the complement system and the tumor necrosis factor superfamily. *Nat Rev Endocrinol* *6*, 94-101.

Fujimoto, M., Serada, S., Suzuki, K., Nishikawa, A., Ogata, A., Nanki, T., Hattori, K., Kohsaka, H., Miyasaka, N., Takeuchi, T., *et al.* (2015). Leucine-rich alpha2 -glycoprotein as a potential biomarker for joint inflammation during anti-interleukin-6 biologic therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* *67*, 2056-2060.

Fujita, T., Hemmi, S., Kajiwarra, M., Yabuki, M., Fuke, Y., Satomura, A., and Soma, M. (2013). Complement-mediated chronic inflammation is associated with diabetic microvascular complication. *Diabetes Metab Res Rev* *29*, 220-226.

Fukushima, A., Kinugawa, S., Homma, T., Masaki, Y., Furihata, T., Abe, T., Suga, T., Takada, S., Kadoguchi, T., Okita, K., *et al.* (2013). Increased plasma soluble (pro)renin receptor levels are correlated with renal dysfunction in patients with heart failure. *Int J Cardiol* *168*, 4313-4314.

Graves, D.T., and Kayal, R.A. (2008). Diabetic complications and dysregulated innate immunity. *Front Biosci* *13*, 1227-1239.

Guha, M., Bai, W., Nadler, J.L., and Natarajan, R. (2000). Molecular mechanisms of tumor necrosis factor alpha gene expression in monocytic cells via hyperglycemia-induced oxidant stress-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* *275*, 17728-17739.

Hamada, K., Taniguchi, Y., Shimamura, Y., Inoue, K., Ogata, K., Ishihara, M.,

Horino, T., Fujimoto, S., Ohguro, T., Yoshimoto, Y., *et al.* (2013). Serum level of soluble (pro)renin receptor is modulated in chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol* *17*, 848-856.

Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* *6*, 1123-1132.

Hirose, I., Kanda, A., Noda, K., and Ishida, S. (2019). Glucocorticoid receptor inhibits Muller glial galectin-1 expression via DUSP1-dependent and -independent deactivation of AP-1 signalling. *J Cell Mol Med* *23*, 6785-6796.

Honda, H., Fujimoto, M., Miyamoto, S., Ishikawa, N., Serada, S., Hattori, N., Nomura, S., Kohno, N., Yokoyama, A., and Naka, T. (2016). Sputum Leucine-Rich Alpha-2 Glycoprotein as a Marker of Airway Inflammation in Asthma. *PLoS One* *11*, e0162672.

Huang, J., and Siragy, H.M. (2009). Glucose promotes the production of interleukine-1beta and cyclooxygenase-2 in mesangial cells via enhanced (Pro)renin receptor expression. *Endocrinology* *150*, 5557-5565.

Ishida, S., Usui, T., Yamashiro, K., Kaji, Y., Ahmed, E., Carrasquillo, K.G., Amano, S., Hida, T., Oguchi, Y., and Adamis, A.P. (2003). VEGF164 is proinflammatory in the diabetic retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *44*, 2155-2162.

Itoh, Y., Kajino, K., Ogasawara, K., Takahashi, A., Namba, K., Negishi, I., Matsuki, N., Iwabuchi, K., Kakinuma, M., Good, R.A., *et al.* (1997). Interaction of pigeon cytochrome c-(43-58) peptide analogs with either T cell antigen receptor or I-Ab molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 12047-12052.

Kanda, A., Dong, Y., Noda, K., Saito, W., and Ishida, S. (2017a). Advanced glycation endproducts link inflammatory cues to upregulation of galectin-1 in diabetic retinopathy. *Sci Rep* *7*, 16168.

Kanda, A., Ishizuka, E.T., Shibata, A., Matsumoto, T., Toyofuku, H., Noda, K., Namba, K., and Ishida, S. (2017b). A Novel Single-Strand RNAi Therapeutic Agent Targeting the (Pro)renin Receptor Suppresses Ocular Inflammation. *Mol Ther Nucleic Acids* *7*, 116-126.

Kanda, A., Noda, K., Saito, W., and Ishida, S. (2012). (Pro)renin receptor is

associated with angiogenic activity in proliferative diabetic retinopathy. *Diabetologia* *55*, 3104-3113.

Kanda, A., Noda, K., Saito, W., and Ishida, S. (2013). Vitreous renin activity correlates with vascular endothelial growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* *97*, 666-668.

Kanda, A., Noda, K., Saito, W., and Ishida, S. (2015). Aflibercept Traps Galectin-1, an Angiogenic Factor Associated with Diabetic Retinopathy. *Sci Rep* *5*, 17946.

Kehrl, J.H., Wakefield, L.M., Roberts, A.B., Jakowlew, S., Alvarez-Mon, M., Derynck, R., Sporn, M.B., and Fauci, A.S. (1986). Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med* *163*, 1037-1050.

Kikly, K., Liu, L., Na, S., and Sedgwick, J.D. (2006). The IL-23/Th(17) axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr Opin Immunol* *18*, 670-675.

Kitaichi, N., Miyazaki, A., Iwata, D., Ohno, S., Stanford, M.R., and Chams, H. (2007). Ocular features of Behcet's disease: an international collaborative study. *Br J Ophthalmol* *91*, 1579-1582.

Kitamei, H., Kitaichi, N., Namba, K., Kotake, S., Goda, C., Kitamura, M., Miyazaki, A., and Ohno, S. (2009). Clinical features of intraocular inflammation in Hokkaido, Japan. *Acta Ophthalmol* *87*, 424-428.

Kitamura, M., Iwabuchi, K., Kitaichi, N., Kon, S., Kitamei, H., Namba, K., Yoshida, K., Denhardt, D.T., Rittling, S.R., Ohno, S., *et al.* (2007). Osteopontin aggravates experimental autoimmune uveoretinitis in mice. *J Immunol* *178*, 6567-6572.

Koleva-Georgieva, D.N., Sivkova, N.P., and Terzieva, D. (2011). Serum inflammatory cytokines IL-1beta, IL-6, TNF-alpha and VEGF have influence on the development of diabetic retinopathy. *Folia Med (Plovdiv)* *53*, 44-50.

Li, C., and Siragy, H.M. (2014). High glucose induces podocyte injury via enhanced (pro)renin receptor-Wnt-beta-catenin-snail signaling pathway. *PLoS One* *9*, e89233.

Liu, Y., Kanda, A., Wu, D., Ishizuka, E.T., Kase, S., Noda, K., Ichihara, A., and Ishida, S. (2019). Suppression of Choroidal Neovascularization and

Fibrosis by a Novel RNAi Therapeutic Agent against (Pro)renin Receptor. *Mol Ther Nucleic Acids* *17*, 113-125.

Lo, J.C., Ljubicic, S., Leibiger, B., Kern, M., Leibiger, I.B., Moede, T., Kelly, M.E., Chatterjee Bhowmick, D., Murano, I., Cohen, P., *et al.* (2014). Adipsin is an adipokine that improves beta cell function in diabetes. *Cell* *158*, 41-53.

Lohr, J., Knoechel, B., Wang, J.J., Villarino, A.V., and Abbas, A.K. (2006). Role of IL-17 and regulatory T lymphocytes in a systemic autoimmune disease. *J Exp Med* *203*, 2785-2791.

Man, R.E., Sasongko, M.B., Wang, J.J., MacIsaac, R., Wong, T.Y., Sabanayagam, C., and Lamoureux, E.L. (2015). The Association of Estimated Glomerular Filtration Rate With Diabetic Retinopathy and Macular Edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *56*, 4810-4816.

Matavelli, L.C., Huang, J., and Siragy, H.M. (2010). (Pro)renin receptor contributes to diabetic nephropathy by enhancing renal inflammation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* *37*, 277-282.

Miyamoto, K., Khosrof, S., Bursell, S.E., Rohan, R., Murata, T., Clermont, A.C., Aiello, L.P., Ogura, Y., and Adamis, A.P. (1999). Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 10836-10841.

Morimoto, S., Ando, T., Niiyama, M., Seki, Y., Yoshida, N., Watanabe, D., Kawakami-Mori, F., Kobori, H., Nishiyama, A., and Ichihara, A. (2014). Serum soluble (pro)renin receptor levels in patients with essential hypertension. *Hypertens Res* *37*, 642-648.

Muraille, E., and Leo, O. (1998). Revisiting the Th1/Th2 paradigm. *Scand J Immunol* *47*, 1-9.

Nagai, N., Izumi-Nagai, K., Oike, Y., Koto, T., Satofuka, S., Ozawa, Y., Yamashiro, K., Inoue, M., Tsubota, K., Umezawa, K., *et al.* (2007). Suppression of diabetes-induced retinal inflammation by blocking the angiotensin II type 1 receptor or its downstream nuclear factor-kappaB pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *48*, 4342-4350.

Nakano, T., Kodama, H., and Honjo, T. (1994). Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* *265*,

1098-1101.

Namba, K., Kitaichi, N., Nishida, T., and Taylor, A.W. (2002). Induction of regulatory T cells by the immunomodulating cytokines alpha-melanocyte-stimulating hormone and transforming growth factor-beta2. *J Leukoc Biol* 72, 946-952.

Namba, K., Ogasawara, K., Kitaichi, N., Morohashi, T., Sasamoto, Y., Kotake, S., Matsuda, H., Iwabuchi, K., Iwabuchi, C., Ohno, S., *et al.* (2000). Amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis by pretreatment with a pathogenic peptide in liposome and anti-CD40 ligand monoclonal antibody. *J Immunol* 165, 2962-2969.

Ohashi, N., Isobe, S., Ishigaki, S., Suzuki, T., Iwakura, T., Ono, M., Fujikura, T., Tsuji, T., Otsuka, A., Ishii, Y., *et al.* (2016). Plasma Soluble (Pro)renin Receptor Reflects Renal Damage. *PLoS One* 11, e0156165.

Ohno, S., Nakamura, S., Hori, S., Shimakawa, M., Kawashima, H., Mochizuki, M., Sugita, S., Ueno, S., Yoshizaki, K., and Inaba, G. (2004). Efficacy, safety, and pharmacokinetics of multiple administration of infliximab in Behcet's disease with refractory uveoretinitis. *J Rheumatol* 31, 1362-1368.

Ono, Y., Aoki, S., Ohnishi, K., Yasuda, T., Kawano, K., and Tsukada, Y. (1998). Increased serum levels of advanced glycation end-products and diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract* 41, 131-137.

Ostergaard, J., Hansen, T.K., Thiel, S., and Flyvbjerg, A. (2005). Complement activation and diabetic vascular complications. *Clin Chim Acta* 361, 10-19.

Rangachari, M., Mauermann, N., Marty, R.R., Dirnhofer, S., Kurrer, M.O., Komnenovic, V., Penninger, J.M., and Eriksson, U. (2006). T-bet negatively regulates autoimmune myocarditis by suppressing local production of interleukin 17. *J Exp Med* 203, 2009-2019.

Sasaki, H., Wada, H., Baghdadi, M., Tsuji, H., Otsuka, R., Morita, K., Shinohara, N., and Seino, K. (2015). New Immunosuppressive Cell Therapy to Prolong Survival of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Allografts. *Transplantation* 99, 2301-2310.

Semeraro, F., Cancarini, A., dell'Omo, R., Rezzola, S., Romano, M.R., and Costagliola, C. (2015). Diabetic Retinopathy: Vascular and Inflammatory Disease. *J Diabetes Res* 2015, 582060.

- Sfikakis, P.P., Grigoropoulos, V., Emfietzoglou, I., Theodossiadis, G., Tentolouris, N., Delicha, E., Katsiari, C., Alexiadou, K., Hatziagelaki, E., and Theodossiadis, P.G. (2010). Infliximab for diabetic macular edema refractory to laser photocoagulation: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover, 32-week study. *Diabetes Care* *33*, 1523-1528.
- Sfikakis, P.P., Markomichelakis, N., Theodossiadis, G.P., Grigoropoulos, V., Katsilambros, N., and Theodossiadis, P.G. (2005). Regression of sight-threatening macular edema in type 2 diabetes following treatment with the anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody infliximab. *Diabetes Care* *28*, 445-447.
- Shanmugam, N., Reddy, M.A., Guha, M., and Natarajan, R. (2003). High glucose-induced expression of proinflammatory cytokine and chemokine genes in monocytic cells. *Diabetes* *52*, 1256-1264.
- Shinzaki, S., Matsuoka, K., Iijima, H., Mizuno, S., Serada, S., Fujimoto, M., Arai, N., Koyama, N., Morii, E., Watanabe, M., *et al.* (2017). Leucine-rich Alpha-2 Glycoprotein is a Serum Biomarker of Mucosal Healing in Ulcerative Colitis. *J Crohns Colitis* *11*, 84-91.
- Stitt, A.W., Curtis, T.M., Chen, M., Medina, R.J., McKay, G.J., Jenkins, A., Gardiner, T.A., Lyons, T.J., Hammes, H.P., Simo, R., *et al.* (2016). The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res* *51*, 156-186.
- Takahashi, K., Yamamoto, H., Hirose, T., Hiraishi, K., Shoji, I., Shibasaki, A., Kato, I., Kaneko, K., Sasano, H., Satoh, F., *et al.* (2010). Expression of (pro)renin receptor in human kidneys with end-stage kidney disease due to diabetic nephropathy. *Peptides* *31*, 1405-1408.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* *126*, 663-676.
- Takahashi, N., Li, F., Hua, K., Deng, J., Wang, C.H., Bowers, R.R., Bartness, T.J., Kim, H.S., and Harp, J.B. (2007). Increased energy expenditure, dietary fat wasting, and resistance to diet-induced obesity in mice lacking renin. *Cell Metab* *6*, 506-512.
- Tan, P., Shamansurova, Z., Bisotto, S., Michel, C., Gauthier, M.S., Rabasa-

- Lhoret, R., Nguyen, T.M., Schiller, P.W., Gutkowska, J., and Lavoie, J.L. (2014). Impact of the prorenin/renin receptor on the development of obesity and associated cardiometabolic risk factors. *Obesity (Silver Spring)* *22*, 2201-2209.
- Thijssen, V.L., Poirier, F., Baum, L.G., and Griffioen, A.W. (2007). Galectins in the tumor endothelium: opportunities for combined cancer therapy. *Blood* *110*, 2819-2827.
- Thomason, J., Reyes, M., Allen, S.R., Jones, R.O., Beeram, M.R., Kuehl, T.J., Suzuki, F., and Uddin, M.N. (2015). Elevation of (Pro)Renin and (Pro)Renin Receptor in Preeclampsia. *Am J Hypertens* *28*, 1277-1284.
- Thurau, S.R., Chan, C.C., Nussenblatt, R.B., and Caspi, R.R. (1997). Oral tolerance in a murine model of relapsing experimental autoimmune uveoretinitis (EAU): induction of protective tolerance in primed animals. *Clin Exp Immunol* *109*, 370-376.
- Usui, T. (2007). [Transcription factors that regulate helper T cell differentiation]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* *30*, 419-427.
- Usui, Y., Takeuchi, M., Hattori, T., Okunuki, Y., Nagasawa, K., Kezuka, T., Okumura, K., Yagita, H., Akiba, H., and Goto, H. (2009). Suppression of experimental autoimmune uveoretinitis by regulatory dendritic cells in mice. *Arch Ophthalmol* *127*, 514-519.
- Wada, H., Kojo, S., Kusama, C., Okamoto, N., Sato, Y., Ishizuka, B., and Seino, K. (2011). Successful differentiation to T cells, but unsuccessful B-cell generation, from B-cell-derived induced pluripotent stem cells. *Int Immunol* *23*, 65-74.
- Wang, X., Abraham, S., McKenzie, J.A.G., Jeffs, N., Swire, M., Tripathi, V.B., Luhmann, U.F.O., Lange, C.A.K., Zhai, Z., Arthur, H.M., *et al.* (2013). LRG1 promotes angiogenesis by modulating endothelial TGF-beta signalling. *Nature* *499*, 306-311.
- Watanabe, N., Bokuda, K., Fujiwara, T., Suzuki, T., Mito, A., Morimoto, S., Jwa, S.C., Egawa, M., Arai, Y., Suzuki, F., *et al.* (2012). Soluble (pro)renin receptor and blood pressure during pregnancy: a prospective cohort study. *Hypertension* *60*, 1250-1256.
- Wu, L., Hernandez-Bogantes, E., Roca, J.A., Arevalo, J.F., Barraza, K., and

- Lasave, A.F. (2011). intravitreal tumor necrosis factor inhibitors in the treatment of refractory diabetic macular edema: a pilot study from the Pan-American Collaborative Retina Study Group. *Retina* 31, 298-303.
- Xu, H., Rizzo, L.V., Silver, P.B., and Caspi, R.R. (1997). Uveitogenicity is associated with a Th1-like lymphokine profile: cytokine-dependent modulation of early and committed effector T cells in experimental autoimmune uveitis. *Cell Immunol* 178, 69-78.
- Yen, D., Cheung, J., Scheerens, H., Poulet, F., McClanahan, T., McKenzie, B., Kleinschek, M.A., Owyang, A., Mattson, J., Blumenschein, W., *et al.* (2006). IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 116, 1310-1316.
- Yoshikawa, N., Noda, K., Shinoda, H., Uchida, A., Ozawa, Y., Tsubota, K., Mashima, Y., and Ishida, S. (2013). Serum vascular adhesion protein-1 correlates with vascular endothelial growth factor in patients with type II diabetes. *J Diabetes Complications* 27, 162-166.
- Zhang, J., Zhu, L., Fang, J., Ge, Z., and Li, X. (2016). LRG1 modulates epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis in colorectal cancer via HIF-1alpha activation. *J Exp Clin Cancer Res* 35, 29.
- Zhao, X.Y., Chen, T.T., Xia, L., Guo, M., Xu, Y., Yue, F., Jiang, Y., Chen, G.Q., and Zhao, K.W. (2010). Hypoxia inducible factor-1 mediates expression of galectin-1: the potential role in migration/invasion of colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* 31, 1367-1375.
- Zhu, J., and Paul, W.E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112, 1557-1569.
- 白神史雄. (2017). 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患政策研究事業 網膜脈絡膜・視神経萎縮症に関する調査研究. 平成 28 年度 総括・分担研究報告書, 32.