



|                     |                                                                                                 |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | 眼内血管新生性疾患の病態形成における候補分子の探索                                                                       |
| Author(s)           | 山本, 拓                                                                                           |
| Description         | 配架番号 : 2790                                                                                     |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                           |
| Degree Name         | 博士(医学)                                                                                          |
| Dissertation Number | 甲第15472号                                                                                        |
| Issue Date          | 2023-03-23                                                                                      |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k15472">https://doi.org/10.14943/doctoral.k15472</a> |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/91556">https://hdl.handle.net/2115/91556</a>               |
| Type                | doctoral thesis                                                                                 |
| File Information    | YAMAMOTO_Taku.pdf                                                                               |



# 学 位 論 文

眼内血管新生性疾患の病態形成における  
候補分子の探索

(Exploration of the candidate molecules  
for the pathogenesis  
of ocular neovascular diseases)

2023 年 3 月

北海道大学

山本 拓



# 学 位 論 文

眼内血管新生性疾患の病態形成における  
候補分子の探索

(Exploration of the candidate molecules  
for the pathogenesis  
of ocular neovascular diseases)

2023 年 3 月

北海道大学

山本 拓

## 目次

|                                            |      |
|--------------------------------------------|------|
| 発表論文目録および学会発表目録                            | 1 頁  |
| 要旨                                         | 3 頁  |
| 略語表                                        | 6 頁  |
| 緒言                                         | 8 頁  |
| 第 1 章: 網膜色素上皮細胞における低酸素条件下でのガレクチン-1 発現解析    |      |
| 緒言                                         | 11 頁 |
| 方法                                         | 13 頁 |
| 結果                                         | 18 頁 |
| 考察                                         | 42 頁 |
| 第 2 章: 増殖糖尿病網膜症における $\alpha$ B-クリスタリンの発現解析 |      |
| 緒言                                         | 45 頁 |
| 方法                                         | 48 頁 |
| 結果                                         | 52 頁 |
| 考察                                         | 66 頁 |
| 結論および総括                                    | 69 頁 |
| 謝辞および利益相反                                  | 71 頁 |
| 引用文献                                       | 72 頁 |

なお、本文における図、表の一部はすでに *Investigative Ophthalmology & Visual Science* および *Biomedical Reports* 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. **Taku Yamamoto**, Atsuhiko Kanda, Satoru Kase, Susumu Ishida.

Hypoxia Induces Galectin-1 Expression Via Autoinduction of Placental Growth Factor in Retinal Pigment Epithelium Cells.

*Invest Ophthalmol Vis Sci*, 62(2): 22, (2021).

2. **Taku Yamamoto**, Satoru Kase, Miyuki Murata, Susumu Ishida.

Serum advanced glycation end-products and  $\alpha$ B-crystallin in diabetic retinopathy patients.

*Biomed Rep*, 16(4): 28, (2022).

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. **Taku Yamamoto**, Atsuhiko Kanda, Miyuki Murata, Satoru Kase, Susumu Ishida.

Hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$  is a key regulator of galectin-1/*LGALS1* expression in human retinal pigment epithelial cells.

Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting 2020, 2020 年 6 月, Baltimore, USA / Online presentation.

2. **Taku Yamamoto**, Atsuhiko Kanda, Satoru Kase, Susumu Ishida.

The close link between hypoxia and autoinduction of placental growth factor in galectin-1 expression in retinal pigment epithelium cells.

Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting 2021, 2021 年 5 月 1 日～5 月 7 日, San Francisco, USA / Virtual.

3. **Taku Yamamoto**, Satoru Kase, Kasumi Kikuchi, Susumu Ishida.

Interleukin-1  $\beta$  regulates  $\alpha$ B-crystallin phosphorylation and mRNA expression in retinal Müller cells under diabetic conditions.

Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting 2022, 2022 年 5 月 1 日～5 日, Denver, USA / Virtual.

4. 山本 拓, 神田 敦宏, 加瀬 諭, 村田 美幸, 石田 晋.  
網膜色素上皮細胞における血管新生因子ガレクチン-1 発現制御機構の解明.  
第 124 回日本眼科学会総会, 2020 年 4 月 27 日～5 月 18 日, 東京 / Web 開催.
5. 山本 拓, 神田 敦宏, 加瀬 諭, 石田 晋.  
網膜色素上皮細胞におけるガレクチン-1 発現制御と胎盤成長因子の自己誘導.  
第 125 回日本眼科学会総会, 2021 年 4 月 8 日～11 日, 大阪 / Web 開催.
6. 山本 拓, 加瀬 諭, 菊地 香澄, 石田 晋.  
糖尿病網膜症病態におけるミュラー細胞での  $\alpha$ B クリスタリンのリン酸化.  
第 126 回日本眼科学会総会, 2022 年 4 月 14 日～17 日, 大阪.

## 要旨

### 第1章: 網膜色素上皮細胞における低酸素条件下でのガレクチン-1 発現解析

【背景と目的】 滲出型加齢黄斑変性の病態形成において、網膜組織の低酸素や血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)が大きく関わっていることが知られている。VEGF ファミリー分子には VEGF 受容体(VEGFR)-1 のリガンドである VEGF-A、胎盤成長因子(placental growth factor; PlGF)などが含まれている。滲出型加齢黄斑変性の治療で用いられる VEGF 阻害薬の 1 つに VEGFR-1 の一部分を含有する組換えタンパクのアフリベルセプトがあり、過去に我々の研究室ではアフリベルセプトが VEGF ファミリー分子ではないガレクチン-1 と呼ばれる糖鎖結合性タンパクと結合することを明らかにした。さらに、滲出型加齢黄斑変性の病態形成に関与する網膜色素上皮(retinal pigment epithelium; RPE)細胞の低酸素条件下での培養、および滲出型加齢黄斑変性モデルマウスの RPE でガレクチン-1 発現が亢進することを報告してきた。これらを踏まえ、低酸素とそれに伴う RPE からのガレクチン-1 発現が滲出型加齢黄斑変性の病態に関与していることが推察されるが、詳細な機序は明らかになっていない。本研究では、低酸素条件下における RPE でのガレクチン-1 発現制御機構について明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】 ヒト不死化 RPE 細胞を 1%O<sub>2</sub> 低酸素条件ならびに VEGF ファミリーなどのタンパク添加下で培養し、関連分子の発現変化を逆転写定量ポリメラーゼ連鎖反応(RT-qPCR)、ウエスタンブロッティング、Enzyme-linked immunosorbent assay、ルシフェラーゼレポーターアッセイ、クロマチン免疫沈降 qPCR によって確認した。また、滲出型加齢黄斑変性患者由来の網膜切片を用いて免疫組織化学染色を行った。

【結果】 RPE 細胞において低酸素条件下でガレクチン-1 発現が亢進し、それにはガレクチン-1 遺伝子のプロモーター領域における hypoxia inducible factor(HIF)-1 $\alpha$  結合が関与していた。また、アフリベルセプトが低酸素条件下におけるガレクチン-1 発現上昇を抑制し、その作用は VEGFR-1 阻害作用によるものであった。低酸素条件下において VEGFR-1 のリガンドである PlGF 発現が亢進し、それに伴う VEGFR-1 リン酸化を介して RPE 細胞におけるガレクチン-1 発現上昇が誘導されていた。この発現誘導にはガレクチン-1 遺伝子のエンハンサー領域における転写因子 activator protein-1 の結合が関与していた。さらに、RPE 細胞には PlGF による PlGF の発現誘導機構が存在し、それは VEGFR-1 活性化による複数の細胞内シグナル分子のリン酸化を介していた。最後に、これらの RPE 細胞における様々なガレクチン-1 発現制御機構が、実際の滲出型加齢黄斑変性患者の網膜においても生じていることを示すため、滲出型加齢黄斑変性患者由来の網膜組織において RPE 細胞に HIF-1 $\alpha$ 、PlGF、VEGFR-1 がガレクチン-1 と共局在していることを確認した。

【考察】 滲出型加齢黄斑変性の背景には脈絡膜循環減弱による RPE での低酸素が関与していると考えられ、その過程で HIF-1 $\alpha$  によるガレクチン-1 発現誘導が関与していることが示唆された。さらに、PlGF は病的な血管新生に関与することが知られており、RPE 細胞における低酸素での PlGF 発現誘導、PlGF によるガレクチン-1 発現誘導、PlGF の自己発現誘導が滲出型加齢黄斑変性の病態増悪をもたらすと考えられた。今後の課題として、解析に適した疾患モデルマウスでの検討などが期待される。

【結論】 RPE 細胞におけるガレクチン-1 発現制御機構として、低酸素によるガレクチン-1 と PlGF 発現誘導、PlGF によるガレクチン-1 発現誘導、PlGF の自己誘導という 3 点が存在し、滲出型加齢黄斑変性の病態形成への関与が示唆される。

## 第 2 章: 増殖糖尿病網膜症における $\alpha$ B-クリスタリンの発現解析

【背景と目的】 最重症の糖尿病網膜症は増殖糖尿病網膜症(proliferative diabetic retinopathy; PDR)と呼ばれ、網膜循環障害の遷延化によって新生血管増生や線維血管膜の形成などをきたす。PDR の病態形成には VEGF とともに炎症性サイトカインも関与しており、相互に作用している。我々の研究室では、終末糖化産物(advanced glycation endproduct; AGE)に起因するマクロファージ/ミクログリアからの interleukin(IL)-1 $\beta$  が、網膜の主要なグリア細胞である網膜ミューラー細胞由来のガレクチン-1 発現上昇を介して PDR における血管透過性亢進や新生血管増生に関与すること、および PDR における線維血管膜の形成という病理的な作用でも網膜ミューラー細胞が重要な役割を有していることを過去に報告してきた。一方でヒートショックプロテインの 1 つである  $\alpha$ B-クリスタリンは VEGF のシャペロンとして知られているが、PDR 患者の線維血管膜において  $\alpha$ B-クリスタリンおよびセリン 59 リン酸化  $\alpha$ B-クリスタリンが新生血管と共局在していること、PDR 患者の硝子体液中で  $\alpha$ B-クリスタリン濃度が上昇することが知られている。しかしながらこれらの病態形成への関与の詳細は未だ明らかではなく、網膜ミューラー細胞における AGE や VEGF・炎症性サイトカインを介した PDR の病態形成過程に  $\alpha$ B-クリスタリンが関与している可能性を考えた。本研究では、PDR における硝子体液中の  $\alpha$ B-クリスタリンの由来と、網膜ミューラー細胞における  $\alpha$ B-クリスタリンの PDR への病態関与について調べることを目的とした。

【対象と方法】 北海道大学病院眼科にて硝子体手術を施行した PDR 患者の血清における  $\alpha$ B-クリスタリンおよび AGE 濃度を測定し、相関を確認した。培養ヒト網膜ミューラー細胞を各種分子の添加下で培養し、関連分子の発現変化を RT-qPCR、ウェスタンブロッティング、Enzyme-linked immunosorbent assay、細胞機能変化を生細胞率測定、カスパーゼ 3/7 活性測定、TdT-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL)染色によって確認した。また、PDR 患者由来の線維血管膜切片を用いて免疫組織化学染

色を行った。

【結果】PDR 患者の血清中において、AGE 濃度は上昇するが $\alpha$ B-クリスタリン濃度の上昇は認めず、両者の有意な相関を認めなかった。網膜ミュラー細胞において、IL-1 $\beta$  は  $\alpha$ B-クリスタリンの発現を抑制すると同時に、p38 mitogen-activated protein kinase を介して  $\alpha$ B-クリスタリンのセリン 59 残基リン酸化を促進することで、細胞外濃度は減少する一方で細胞内濃度は維持されていた。網膜ミュラー細胞において $\alpha$ B-クリスタリンはアポトーシス抑制作用を有し、 $\alpha$ B-クリスタリンをノックダウンすることによってカスパーゼ 3/7 活性の亢進と TUNEL 陽性細胞率の増加を認めた。PDR 患者の線維血管膜組織切片において、グリア細胞マーカーである glial fibrillary acidic protein と  $\alpha$ B-クリスタリンおよびセリン 59 残基リン酸化  $\alpha$ B-クリスタリンの共局在を確認した。

【考察】PDR における硝子体中 $\alpha$ B-クリスタリン濃度上昇は血清中の高値を反映したわけではないことが示唆された。網膜ミュラー細胞においても細胞外  $\alpha$ B-クリスタリン分泌が低下しており、血管内皮細胞といった他細胞に由来する可能性などが考えられた。網膜ミュラー細胞におけるセリン 59 残基リン酸化が  $\alpha$ B-クリスタリンの細胞内保持をもたらし、アポトーシス抑制作用を介したグリア増生によって線維血管膜形成に関与すると考えられた。今後の課題として、 $\alpha$ B-クリスタリンの細胞内保持が網膜ミュラー細胞におけるグリア-間葉転換に関与している可能性などを検討したい。

【結論】網膜ミュラー細胞において、IL-1 $\beta$  によって $\alpha$ B-クリスタリンの新規合成は減少する一方、セリン 59 残基のリン酸化によって細胞内濃度が維持されており、線維血管膜におけるグリア細胞のアポトーシス抑制作用を介した PDR の病態形成への関与が示唆される。

## 略語表

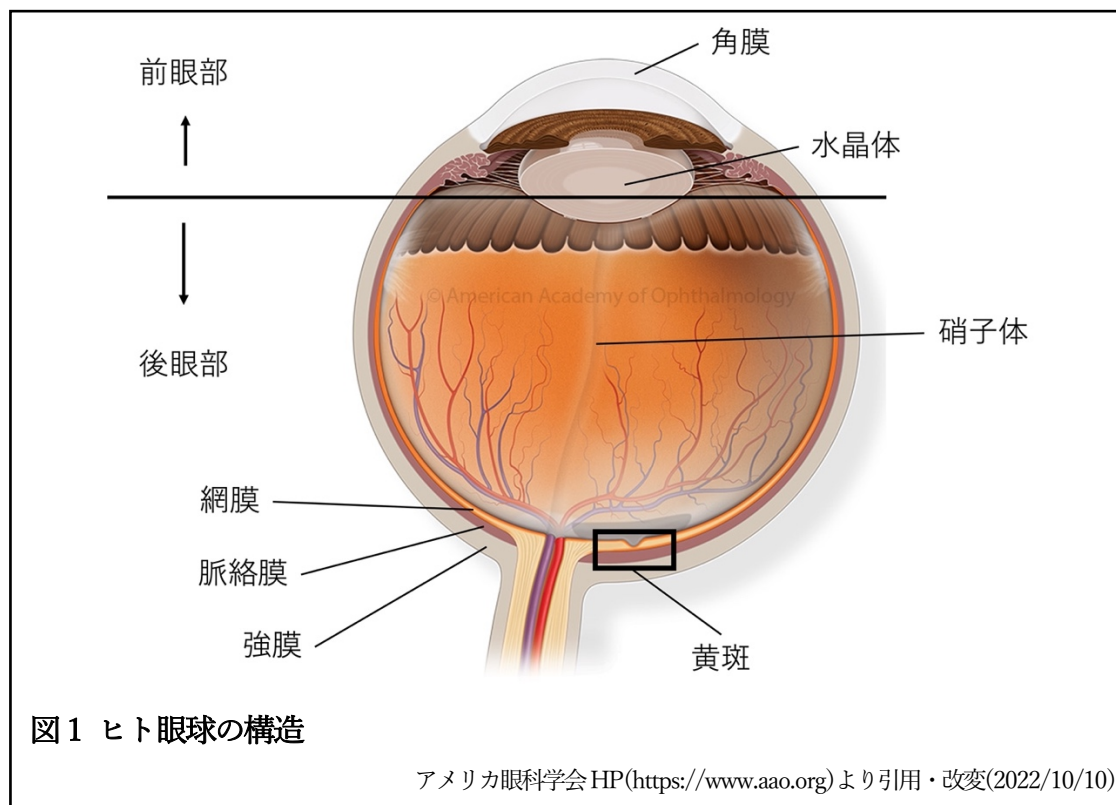
本文中および図表で使用した略語は以下のとおりである。

|       |                                          |
|-------|------------------------------------------|
| AGE   | advanced glycation endproduct            |
| ALT   | alanine aminotransferase                 |
| ANOVA | analysis of variance                     |
| AST   | aspartate aminotransferase               |
| ATF   | activating transcription factor          |
| bp    | base pair                                |
| ChIP  | chromatin immunoprecipitation            |
| CNV   | choroidal neovascularization             |
| DAPI  | 4',6-diamino-2-phenylidole               |
| DM    | diabetes mellitus                        |
| DMSO  | dimethyl sulfoxide                       |
| eGFR  | estimated glomerular filtration rate     |
| ERK   | extracellular signal-regulated kinase    |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay        |
| FBS   | fetal bovine serum                       |
| GAPDH | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase |
| GFAP  | glial fibrillary acidic protein          |
| HbA1c | hemoglobin A1c                           |
| HIF   | hypoxia inducible factor                 |
| HRE   | hypoxia response element                 |
| IgG   | immunoglobulin G                         |
| IL    | interleukin                              |
| IL-1R | interleukin-1 receptor                   |
| JNK   | c-Jun N-terminal kinase                  |
| mRNA  | messenger ribonucleic acid               |
| PBS   | phosphate-buffered saline                |
| PDR   | proliferative diabetic retinopathy       |
| PI3K  | phosphatidylinositol 3-kinase            |
| PlGF  | placental growth factor                  |

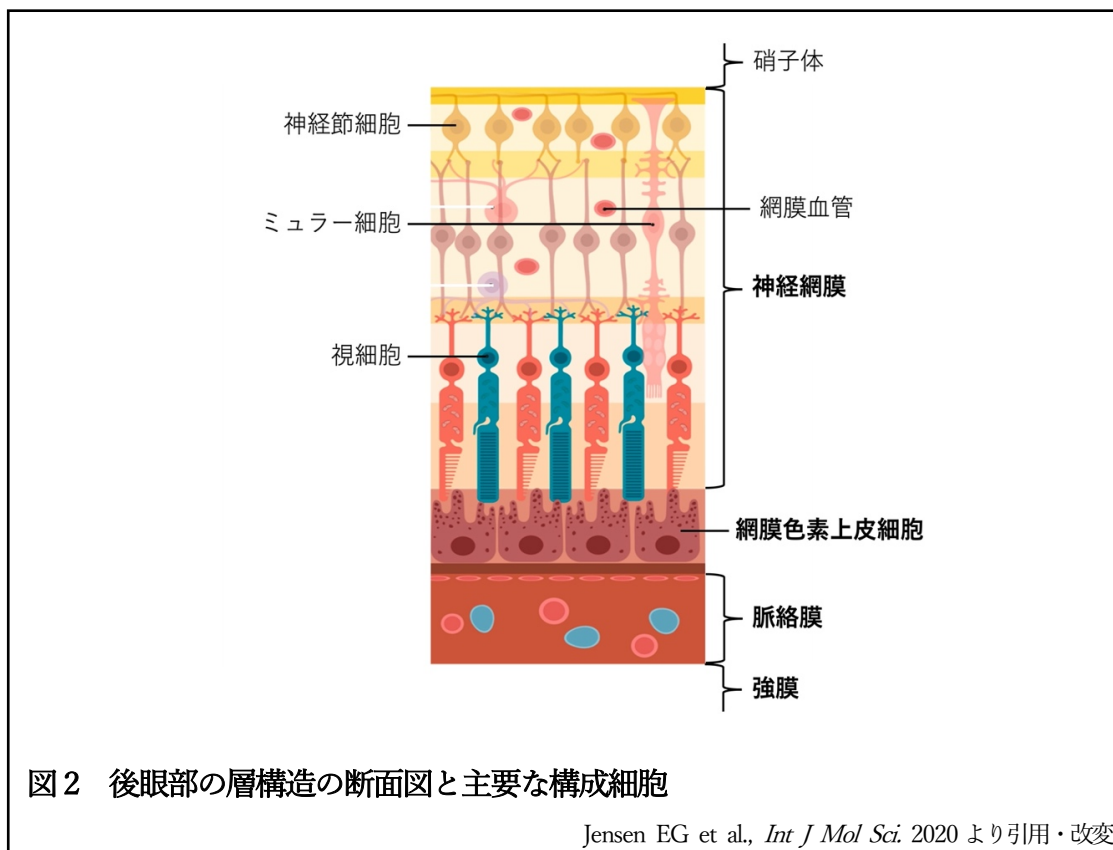
|         |                                                              |
|---------|--------------------------------------------------------------|
| RNA     | ribonucleic acid                                             |
| RPE     | retinal pigment epithelium                                   |
| RT-qPCR | reverse transcription quantitative polymerase chain reaction |
| siRNA   | small interfering ribonucleic acid                           |
| TNF     | tumor necrosis factor                                        |
| TUNEL   | TdT-mediated dUTP nick end labelling                         |
| VEGF    | vascular endothelial growth factor                           |
| VEGFR   | vascular endothelial growth factor receptor                  |

## 緒言

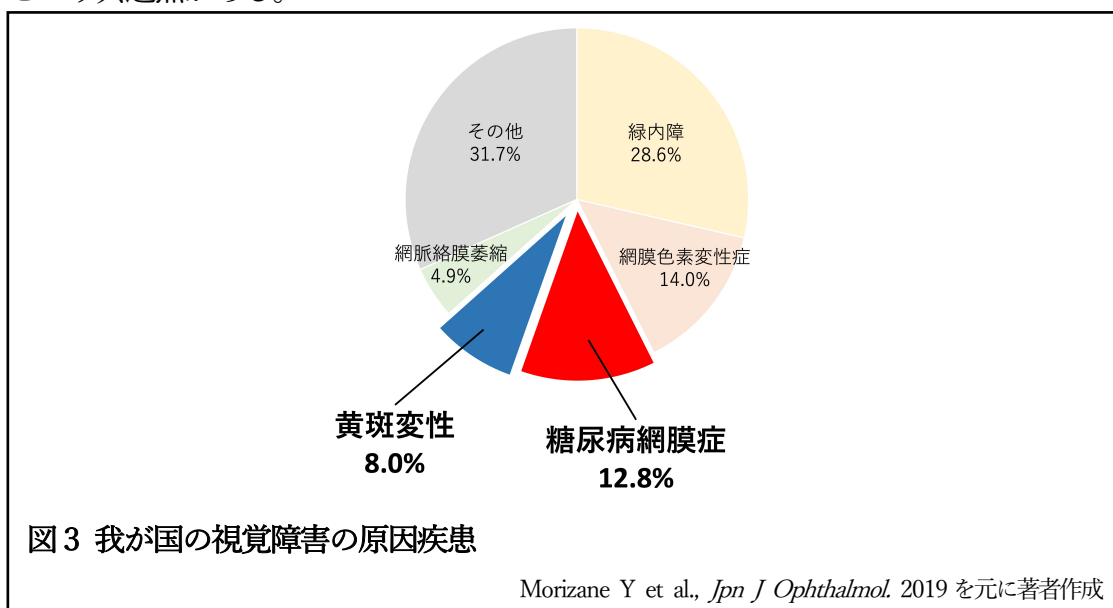
眼球は前後径が約 24mm 程度の球形をしており、水晶体を境にして前眼部と後眼部に分けられる(図 1)。眼科疾患は眼球内および付属器の様々な部位に生じうるが、先進国における視覚障害の原因疾患の多くは後眼部疾患である(Flaxman et al., 2017)。



後眼部の重要な解剖学的構造として、3 層の膜構造があり、眼球内側から順に網膜、脈絡膜、強膜で構成されている。そして、網膜の中心部には直径 1.5mm~2mm 程度の黄斑と呼ばれる視力に最も関与する部位があり、錐体細胞と呼ばれる色を感知する視細胞は主としてこの部位に存在する。網膜は更に、視細胞・網膜神経節細胞といった視覚受容と伝達に関わる細胞やミュラー細胞を含む網膜グリア細胞からなる神経網膜と、その外側にシート状の単層細胞層として存在する網膜色素上皮(retinal pigment epithelium; RPE)細胞とに区別される(図 2)。RPE 細胞は、血液網膜関門と呼ばれる循環血液と網膜組織とを分離するバリア機構の一端を占めており、網膜のホメオスタシス維持に重要な役割を担っている。



前述の先進国における視覚障害の原因疾患と同様に、我が国でも視覚障害の原因疾患は主に後眼部疾患である(図3)。中でも第3位である糖尿病網膜症、および第4位である黄斑変性の大部分を占める加齢黄斑変性は、今日の眼科臨床において最重要の網膜疾患であるとともに、眼内における病的血管新生がその病態に深く関与するという共通点がある。



加齢黄斑変性の中でも発症当初から新生血管を伴うものは滲出型加齢黄斑変性と呼ばれ、これは RPE 細胞の上または下における脈絡膜新生血管がその病態の本質である。また、糖尿病網膜症は進行とともに新生血管を生じ、その新生血管による症状を呈したものは最重症である増殖糖尿病網膜症と分類される。これら血管新生を伴う病態において鍵となる分子が血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)である。

現在眼内血管新生性疾患の治療としてこの VEGF の作用を抑制する VEGF 阻害薬が広く用いられており、その登場前に比して飛躍的な治療予後向上をもたらした。一方で VEGF 阻害薬が市場を席卷している現在においても、未だ加齢黄斑変性や糖尿病網膜症において満足な治療予後が得られない症例は多く、更なる病態機序の解明が望まれる状況である。そこで我々は、これら 2 疾患を主たる対象として、現在の治療法の改善および新たな治療標的となりうる候補分子について、その病態関与と機序を明らかにすることで新規治療法の開発へ資するべく研究を行った。

第 1 章では加齢黄斑変性に関与する RPE 細胞における病態修飾因子としてのガレクチン-1 について、第 2 章では増殖糖尿病網膜症の病態形成における  $\alpha$ B-クリスタリンの関与について検討している。

## 第1章

### 網膜色素上皮細胞における低酸素条件下でのガレクチン-1 発現解析

#### 緒言

加齢黄斑変性は世界における主要な失明原因の一つであり、RPE 細胞の異常などが原因と考えられる萎縮型加齢黄斑変性と、脈絡膜新生血管 (choroidal neovascularization; CNV) を主たる病態とする滲出型加齢黄斑変性の 2 種に大別される (Apte, 2021)。前者に対する有効な治療法は未だ存在しないが、後者の病態形成には VEGF が大きく関わっており、その作用を抑制する VEGF 阻害薬の硝子体内注射が現在の標準治療として重要である。

加齢黄斑変性の病態形成には網膜組織における低酸素が関連していることが知られており (Arjamaa et al., 2017)、過去の報告において加齢黄斑変性患者由来の CNV 組織で低酸素誘導因子 (hypoxia inducible factor; HIF)-1 $\alpha$  が発現していることが免疫染色にて示されている (Inoue et al., 2007)。なお HIF-1 $\alpha$  は、通常酸素下においてユビキチン化により恒常的に分解されるが、低酸素下においてはそのユビキチン化酵素の作用が阻害されることによって HIF-1 $\beta$  とヘテロダイマーを形成し、ゲノム上の転写調整配列の 1 つである低酸素応答領域 (hypoxia response element; HRE) に結合することで様々な作用をもたらす低酸素感受分子である (Krock et al., 2011)。

VEGF には主たる VEGF-A の他に、VEGF-B, C, D, E および胎盤成長因子 (placental growth factor; PlGF) といったサブタイプが含まれており、総じて VEGF ファミリー分子と呼ばれている。VEGF ファミリー分子の受容体としては VEGF 受容体 (VEGF receptor; VEGFR)-1 と VEGFR-2 が主な役割を担っており、VEGF-A, B および PlGF が VEGFR-1 のリガンド、VEGF-A, C, D, E が VEGFR-2 のリガンドと考えられている (Ria et al., 2020)。

滲出型加齢黄斑変性の治療に保険適応がある VEGF 阻害薬は現在数種存在する。その中でもアフリベルセプトは、VEGFR-1 のドメイン 2 と VEGFR-2 のドメイン 3 という VEGF への結合部位と、ヒト免疫グロブリン G (immunoglobulin G; IgG) の Fc 領域を組み合わせた組換えタンパクであり、VEGF ファミリー分子への阻分子として機能することでその作用を阻害するものである。これまでに我々は、アフリベルセプトが VEGF ファミリー分子ではないガレクチン-1 (*LGALS1*) と呼ばれる糖鎖結合性タンパクと結合することを、免疫沈降法および質量分析を通じて明らかにした (Kanda et al., 2015)。同報告にて、ガレクチン-1 はアフリベルセプトの VEGFR-2 部分にある N-グ

リカンに結合し、VEGF とは相関せず独立して網膜疾患において硝子体内発現濃度が対象群に比べ上昇していることを示した。

ガレクチンとは糖鎖の一種であるガラクトシドに結合するレクチンタンパクの総称であり、人体において普遍的に存在している。その中の 1 つであるガレクチン-1 は、腫瘍細胞および免疫細胞などにおいて、発生・分化・細胞増殖・細胞遊走・アポトーシスなどに関与していることが知られている(Camby et al., 2006)。

我々はヒト RPE 細胞を低酸素条件で培養することでガレクチン-1 発現が亢進することや(Kanda et al., 2015)、ガレクチン-1 が血管内皮細胞において VEGFR-1 を介した血管透過性亢進や VEGFR-2 を介した血管新生作用に関与することを報告した(Kanda et al., 2017)。またガレクチン-1 が滲出型加齢黄斑変性モデルマウスであるレーザー誘導 CNV モデルマウスにおける RPE で発現上昇し、血管新生および組織線維化に関与することを報告してきた(Wu et al., 2019)。

以上のことから、低酸素とそれに伴う RPE からのガレクチン-1 発現が滲出型加齢黄斑変性の病態に関与していることが推察されるが、詳細な機序は明らかになっていない。そこで我々は、HIF-1 $\alpha$  が関与する低酸素条件下において、RPE でのガレクチン-1 発現制御機構について明らかにすることを目的として、研究を行なった。

## 方法

### 1. 細胞培養と試薬

培養ヒト不死化 RPE 細胞(hTERT-RPE1)は American Type Culture Collection より購入し、10%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS)を添加した Dulbecco's modified Eagle medium/F-12(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)で、37°C、5%CO<sub>2</sub>濃度で培養した。低酸素条件での培養では、1%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>、94%N<sub>2</sub>の気体混合下にて培養した。

細胞実験には Human recombinant galectin-1, PlGF, VEGF-A, VEGF-B, interleukin(IL)-1 $\beta$  (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)を記載の濃度で用いた。中和実験では、goat anti-VEGFR1, goat anti-VEGFR2, normal goat IgG (R&D systems)、normal human IgG (FUJIFILM Wako, Osaka, Japan)、アフリベルセプト (Bayer, Leverkusen, Germany)を記載の濃度で用いた。ケミカルインヒビターによる阻害実験では、U0126 (Promega, Madison, WI, USA)、JSH-23, SP600125 (Millipore, Temecula, CA, USA)、LY294002 (FUJIFILM Wako)、SB203580 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)を記載の濃度で用いた。

### 2. 動物

オスの5-6週齢 C57BL/6J マウス(日本クレア)を購入し、レーザー誘導 CNV モデルマウスおよび塩化コバルト (CoCl<sub>2</sub>)硝子体注射モデルマウスに用いた。レーザー誘導 CNV モデルマウスでは、マウスをペントバルビタール(0.015mg/g)腹腔内注射により麻酔し、5%トロピカミドフェニレフリン塩酸塩(参天製薬)で散瞳の後、角膜にカバーガラスを接触させた上で視神経乳頭を中心としてレーザー 4-6 発を照射した(レーザー照射条件:532nm、130-160mW、0.1 秒、75 $\mu$ m スポットサイズ、Lumines 社 Novus Spectra)。CoCl<sub>2</sub> 硝子体注射モデルマウスでは、塩化コバルト(II)六水和物(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)をリン酸緩衝生理食塩水(phosphate-buffered saline; PBS)にて溶解して使用した。マウス硝子体注射では、角膜輪部より 1mm 程度後極側より 33 ゲージ針をつけたマイクロシリンジ(伊藤製作所)にて 1 $\mu$ l の薬液を注入した。解析には RPE 細胞が含まれる RPE-脈絡膜複合体、または神経網膜を用いた。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(承認番号:19-0067)、Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)で定められた動物実験ガイドラインに基づいて実施された。

### 3. 逆転写定量ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription quantitative polymerase chain reaction; RT-qPCR)

細胞からの全 RNA の分離と逆転写は SuperPrep® II Cell Lysis & RT Kit for qPCR (TOYOBO, Tokyo, Japan)を用い、マウス網膜および脈絡膜からの全 RNA の分離と逆転写は TRI reagent® (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA)および GoScript reverse transcriptase (Promega)を用いて行なった。使用したプライマーは以下の通りである。

表 1-1 RT-qPCR に用いたプライマー配列

| Target gene         |         | Sequence                               |
|---------------------|---------|----------------------------------------|
| human <i>LGALS1</i> | forward | 5'- CGC TAA GAG CTT CGT GCT GAA C -3'  |
|                     | reverse | 5'- CAC ACC TCT GCA ACA CTT CCA G -3'  |
| human <i>PGF</i>    | forward | 5'- AAC GGC TCG TCA GAG GTG -3'        |
|                     | reverse | 5'- AGA CAC AGG ATG GGC TGA AC -3'     |
| human <i>VEGFA</i>  | forward | 5'- CAG ATT ATG CGG ATC AAA CCT CA -3' |
|                     | reverse | 5'- CAA GGC CCA CAG GGA TTT TC -3'     |
| human <i>VEGFB</i>  | forward | 5'- AAG GAC AGT GCT GTG AAG CCA G -3'  |
|                     | reverse | 5'- TGG AGT GGG ATG GGT GAT GTC A -3'  |
| human <i>GAPDH</i>  | forward | 5'- CCT GGC CAA GGT CAT CCA TG -3'     |
|                     | reverse | 5'- GGA AGG CCA TGC CAG TGA GC -3'     |
| mouse <i>Lgals1</i> | forward | 5'- TCC CCG AAC TTT GAG ACA TTC -3'    |
|                     | reverse | 5'- GTC TCA GGA ATC TCT TCG CTT C -3'  |
| mouse <i>Pgf</i>    | forward | 5'- TGC TGT GGT GAT GAA GGT CTG C -3'  |
|                     | reverse | 5'- GCA TTC ACA GAG CAC ATC CTG AG -3' |
| mouse <i>Hif1a</i>  | forward | 5'- CCT GCA CTG AAT CAA GAG GTT GC -3' |
|                     | reverse | 5'- CCA TCA GAA GGA CTT GCT GGC T-3'   |
| mouse <i>Actb</i>   | forward | 5'- CAT TGC TGA CAG GAT GCA GAA GG -3' |
|                     | reverse | 5'- TGC TGG AAG GTG GAC AGT GAG G -3'  |

qPCR は GoTaq® qPCR Master mix (Promega)と StepOne plus Systems (Thermo Fisher Scientific)を使用して行い、qPCR 条件は 95°C・2 分の後、95°C・15 秒、60°C・1 分を 40 サイクルとして、全てのデータを GAPDH(ヒト)または Actb(マウス)を内在コントロールとした  $\Delta\Delta C_t$  法にて算出した。

#### 4. ウェスタンブロッティング

細胞からのタンパク抽出は Laemmli SDS sample buffer を用い、マウス眼球からのタンパク抽出は RIPA buffer (Cell Signaling Technology)を用いた。細胞および組織を溶解の後、超音波処理を行って Pierce BCA assay(Thermo Fisher Scientific)にて総タンパク量を定量した。試料は必要に応じて加熱処理した後、SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)での分離と polyvinylidene difluoride メンブレンへの転写を行なった。メンブレンは 5% skim milk を含有する Tris-buffered saline でブロッキングし、以下の抗体を用いて一次抗体反応を行なった: goat anti-galectin-1 antibody (R&D systems), mouse anti-GAPDH antibody (Thermo Fisher Scientific), rabbit anti-activating transcription factor (ATF)2, phosphorylated ATF2, AKT, phosphorylated AKT, c-Jun, phosphorylated c-Jun, extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2, phosphorylated ERK1/2, p38, phosphorylated p38, HIF-1  $\alpha$  (Cell signaling technology), VEGFR1 (Abcam, Cambridge, MA, USA), phosphorylated VEGFR1 (Millipore) antibodies。二次抗体には horseradish peroxidase-conjugated anti-goat, -mouse, -rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) を用い、SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent (Thermo Fisher Scientific)にて発光させ、iBright FL1000 (Thermo Fisher Scientific)で観察した。

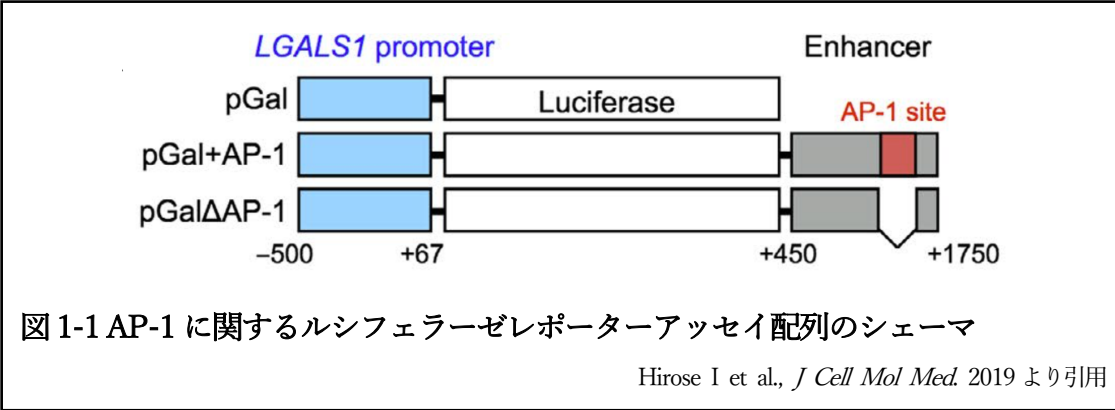
#### 5. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

細胞および培養上清由来のガレクチン-1、PlGF 濃度は、human galectin-1 (R&D systems), human PlGF (BioLegend, San Diego, CA, USA)の ELISA キットを使用し、マイクロプレートリーダー (Tecan, Männedorf, Switzerland)にて測定した。

#### 6. ルシフェラーゼレポーターアッセイ

ルシフェラーゼレポーターアッセイは、Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assays System (Promega)を用いて行なった。我々の既報(Hirose et al., 2019)と同様に、ヒト *LGALS1* 遺伝子の転写開始点から数えて -500 bp ~ +67 bp のプロモーター領域配列(promoter region; pGal)、それに加えて +450 bp ~ +1750 bp のエンハンサー領域を結合させた配列(enhancer region; pGal+AP-1)、同配列から Activator protein (AP)-1 サイト (TGACTCA 配列)を欠失させた配列(pGal $\Delta$ AP-1)の 3 種 DNA を Integrated DNA Technology 社(Coralville, IA, USA)にて作製し、それぞれを pGL4 promoterless reporter vector (Promega)にクローニングした(図 1-1)。同様にして既報に則り(Zhao et al., 2010)、ヒト *LGALS1* 遺伝子のプロモーター領域配列内の 2 箇所の HRE を改変 (-441 bp ~ -437 bp および -427 bp ~ -423 bp の CACGC 配列を CAaaC 配列へと変更)したコンストラクトも作製した。pRL-CMV *Renilla* luciferase plasmid (Promega)

をトランスフェクションコントロールとして補正に用い、培養 RPE 細胞に Lipofectamine® LTX with Plus Reagent (Thermo Fisher Scientific)を用いて細胞にトランスフェクションし、マイクロプレートリーダー(Tecan)にて発光を測定した。



## 7. クロマチン免疫沈降 (Chromatin immunoprecipitation; ChIP)-qPCR

ChIP-qPCR は、SimpleChIP® Enzymatic Immunoprecipitation Chromatin IP Kit (Cell Signaling Technology)を用いた。クロマチンのクロスリンクおよび断片化を行った検体において各抗体で免疫沈降を行った。その後、*LGALS1* プロモーター領域の前述の HRE 部位および *LGALS1* エンハンサー領域の AP-1 結合部位に特異的なプライマーを使用して、qPCR によって評価した。免疫沈降を行う前に全体の 2%相当のトータル DNA を Input sample として使用した。なお、免疫沈降に用いた抗体は以下の通りである: mouse anti-HIF-1  $\alpha$  (Novus Biologicals, Centennial, CO, USA), rabbit anti-ATF2, c-Fos, c-Jun (Cell Signaling Technology), normal mouse IgG (R&D systems), normal rabbit IgG (Cell Signaling Technology)。また、qPCR は上記の RT-qPCR の項の記載に従い、プライマーは既報に従って下記の配列を用いた(Zhao et al., 2010 ; Ouyang et al., 2011)。

| 表 1-2 ChIP-qPCR で用いたプライマー配列 |         |          |                                   |
|-----------------------------|---------|----------|-----------------------------------|
| Target gene                 |         | Sequence |                                   |
| <i>LGALS1</i> promoter      | forward | 5'-      | CCC AGC CTT TCT TTA GCC TTC C -3' |
|                             | reverse | 5'-      | GAT GAT GAG CTA GGC CCA CAA G -3' |
| AP-1-binding site           | forward | 5'-      | CCA AGC CCA CAT CTC CTC -3'       |
|                             | reverse | 5'-      | GAG GCT GCA GCT GGT TTA GT -3'    |

## 8. 免疫組織化学染色

当研究室にて管理・保管されている、悪性黒色腫疑いにて眼球摘出された滲出型加齢黄斑変性患者由来の網膜切片を用いた。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自主臨床研究審査委員会に承認を受け(研究番号: 自 017-0496)、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準じた。

4%パラホルムアルデヒドにて固定された組織をパラフィン包埋し、切片を作製した。キシレンおよびエタノールを用いて脱パラフィンの後、10mM クエン酸バッファー(pH6.0)を用いて電子レンジで抗原賦活化を行なった。続いて、以下に述べる一次抗体を用いて 4°C で一次抗体反応を行なった: mouse anti-galectin-1 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), mouse anti-RPE65 (Millipore), mouse anti-HIF-1  $\alpha$  (Novus Biologicals), rabbit anti-galectin-1 (Millipore), rabbit anti-PlGF (Abcam), goat anti-VEGFR1 (R&D systems)。その後、AlexaFluor488 または 546 にて標識された二次抗体(Thermo Fisher Scientific)を用いて反応を行い、核染色には 4',6-diamino-2-phenylidole (DAPI; Lonza, Basel, Switzerland)を用いた。切片の観察は蛍光顕微鏡 Keyence BZ-9000 series (Keyence, Osaka, Japan)で行なった。

## 9. 統計解析

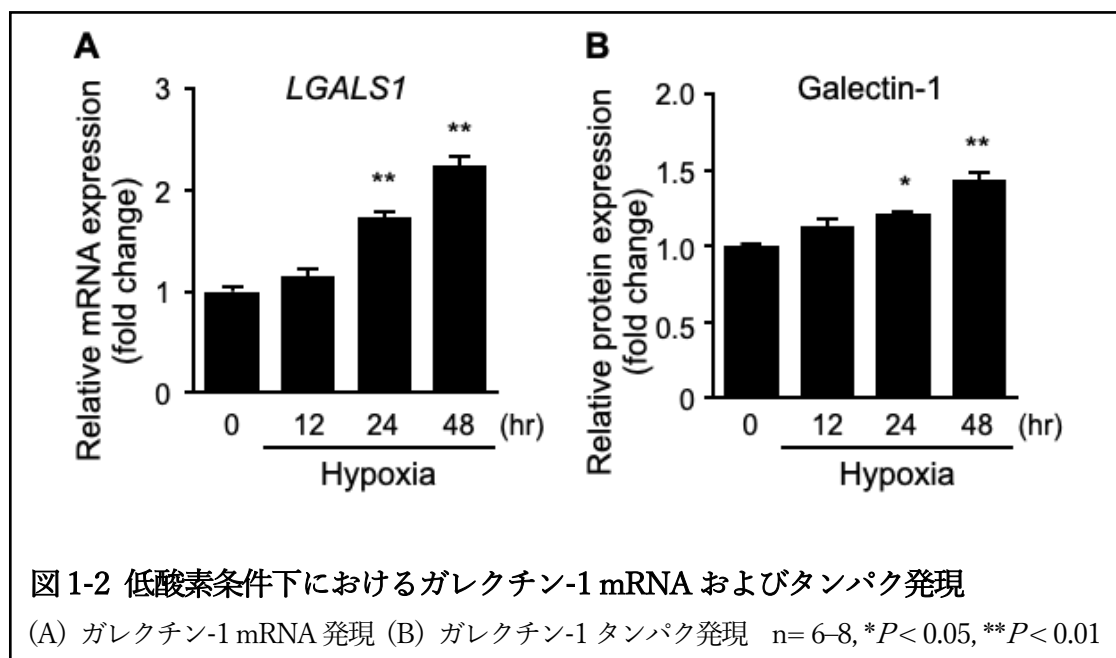
全ての結果は平均値±標準誤差で示した。また、2 群間の比較には Student's *t*-test を用い、多群間での比較には one-way analysis of variance (ANOVA) に引き続いて Tukey-Kramer 法を用いた。*P* 値が 0.05 未満を呈した場合に統計学的に有意差があると評価した。

## 結果

### 1. RPE 細胞における低酸素条件下での HIF-1 $\alpha$ を介したガレクチン-1 発現上昇

これまでに我々は低酸素条件下で hTERT-RPE1 (以下、RPE 細胞) においてガレクチン-1 の発現上昇を報告しているが、HIF-1 $\alpha$  の関与を示すため、まず 1%O<sub>2</sub> 低酸素条件下での RPE 細胞におけるガレクチン-1 の発現変化を RT-qPCR および ELISA にて確認した。

既報に一致して (Kanda et al., 2015)、低酸素条件下においてガレクチン-1 は mRNA, タンパクともに発現上昇し、それが時間依存的に増加することが明らかになった (図 1-2)。



続いて、1%O<sub>2</sub> 低酸素条件下においてガレクチン-1 発現とともに、HIF-1 $\alpha$  の発現量が上昇していることをウェスタンブロットにて確認した。

低酸素条件下において、HIF-1 $\alpha$  タンパク量が 24 時間・48 時間時点で上昇していることが認められた (図 1-3)。

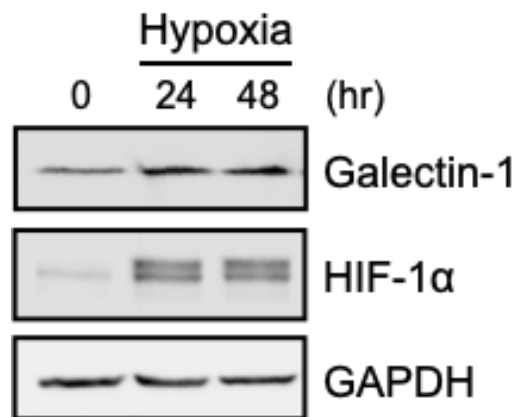


図 1-3 低酸素条件下におけるガレクチン-1 および HIF-1 $\alpha$  タンパク発現

次に、低酸素誘導 HIF-1 $\alpha$  とガレクチン-1 発現制御について詳細に調べた。既報にてガレクチン-1 の発現は転写開始点上流 2.2 kbp にわたるプロモーター領域に存在する HRE に HIF-1 $\alpha$  が結合することにより上昇することが知られており (Zhao et al., 2010)、そのうち近位から 2 つが重要であることが明らかとなっている。そこで、それら 2 つの配列を改変(CACGC→CAaaC)し HRE の活性を減じたプロモーター配列を保有したルシフェラーゼベクターを RPE 細胞に導入し、1%O<sub>2</sub> 低酸素条件にて 24 時間培養の上でルシフェラーゼ活性による発光を測定した。

この実験から、低酸素条件におけるガレクチン-1 発現上昇は、RPE 細胞においてもそのプロモーター領域に存在する HRE が重要であることが示された(図 1-4)。

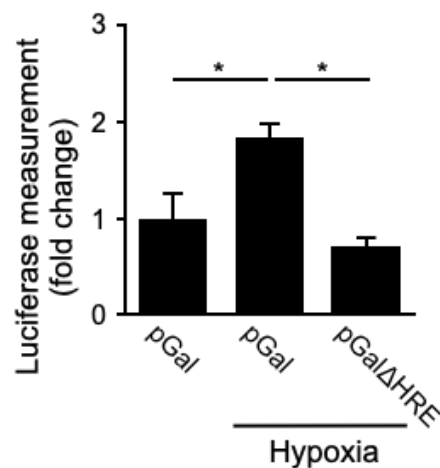


図 1-4 低酸素条件下におけるガレクチン-1 発現での HRE 配列の重要性

通常の *LGALS1* プロモーター配列(pGal; 転写開始点から数えて-500 bp～+67 bp)と HRE 活性を減じた同配列(pGalΔHRE)を用いて 24 時間培養の後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

n=6-8, \* $P$ <0.05

さらに HIF-1 $\alpha$  によるガレクチン-1 プロモーター制御への関与を確認するため、RPE 細胞での *LGALS1* プロモーター領域における HRE への HIF-1 $\alpha$  の結合を HIF-1 $\alpha$  抗体を用いた ChIP-qPCR にて調べた。

結果、低酸素条件において、*LGALS1* プロモーター領域における HRE への HIF-1 $\alpha$  の結合が増加していることが分かった(図 1-5)。

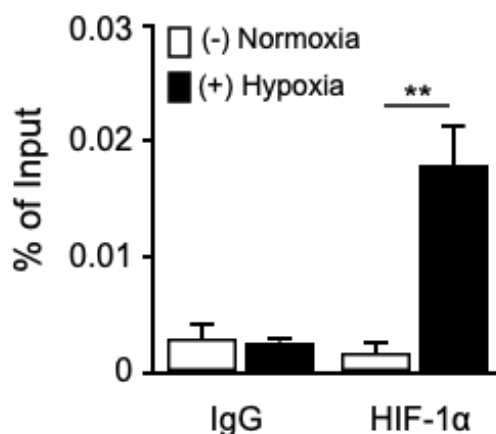


図 1-5 低酸素条件下における *LGALS1* プロモーター領域内 HRE への HIF-1 $\alpha$  の結合増加

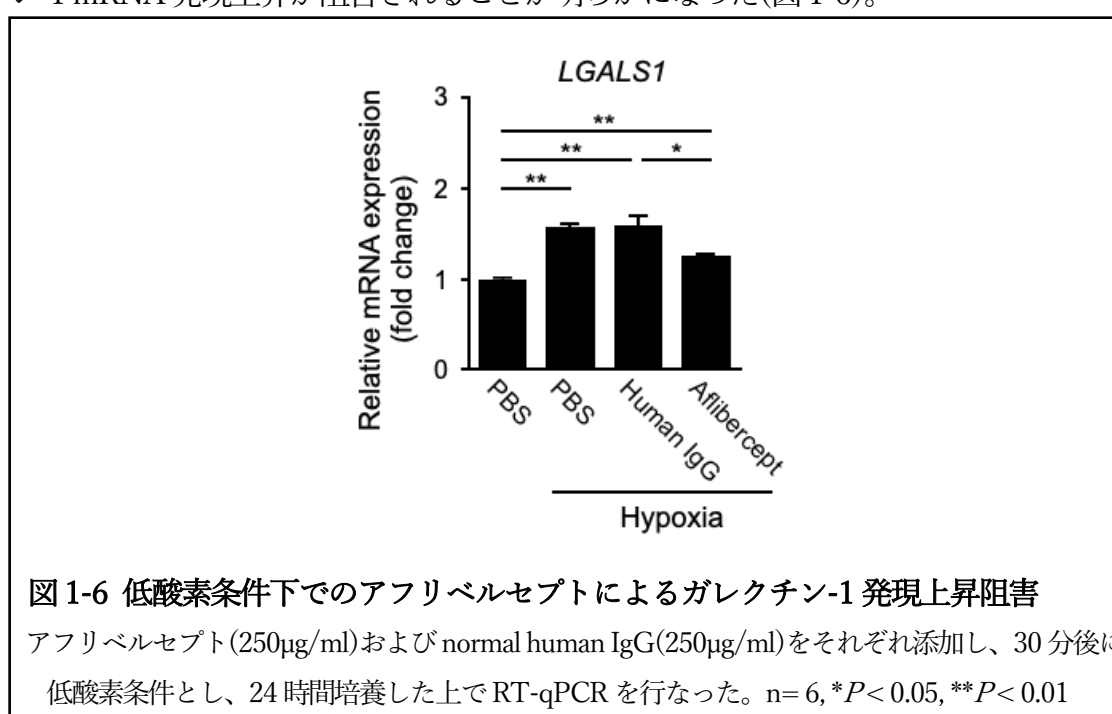
HIF-1 $\alpha$  抗体を用いた ChIP-qPCR にて、低酸素条件で HIF-1 $\alpha$  抗体にて免疫沈降された *LGALS1* プロモーター配列 DNA 量が増加している。n=6-8, \*\* $P<0.01$

以上の結果から、低酸素条件下では *LGALS1* プロモーター領域内 HRE への HIF-1 $\alpha$  結合が増加することによって、RPE 細胞におけるガレクチン-1 発現が上昇することが明らかになった。

## 2. RPE 細胞における低酸素条件での VEGFR1 を介したガレクチン-1 発現変化

これまでに我々は、滲出型加齢黄斑変性の治療に臨床使用されている VEGF 阻害薬 アフリベルセプトが、VEGF ファミリー分子の他にガレクチン-1 と結合することを示している(Kanda et al., 2015)。一方で、これら VEGF ファミリー分子は低酸素環境において発現上昇することが知られている(Hollborn et al., 2016)。そこで、VEGF ファミリー分子の作用を阻害することにより低酸素環境でのガレクチン-1 発現が変化するという仮説を立て、アフリベルセプトを用いて実験を行なった。

RPE 細胞を 1%O<sub>2</sub> 低酸素条件にて 24 時間培養し、アフリベルセプトを添加してガレクチン-1 mRNA 発現を RT-qPCR にて測定したところ、低酸素条件でのガレクチン-1 mRNA 発現上昇が阻害されることが明らかになった(図 1-6)。



アフリベルセプトは VEGFR-1 および VEGFR-2 それぞれの VEGF 結合部位を持ち合わせているため、この阻害作用が VEGFR-1 阻害によるものなのか VEGFR-2 阻害によるものなのかを調べるべく、それぞれに特異的な中和抗体を用いて実験を行なった。

RPE 細胞を 1%O<sub>2</sub> 低酸素条件にて 24 時間培養し、VEGFR-1 および VEGFR-2 の中和抗体を添加してガレクチン-1 mRNA 発現を RT-qPCR にて測定したところ、VEGFR-1 阻害のみにてガレクチン-1 mRNA 発現上昇が阻害されることが明らかとなった。さらに、HIF-1α 発現と合わせてタンパク発現レベルにおいても確認したところ、HIF-1α の発現変化は認められないにも関わらずガレクチン-1 発現はタンパクレベルでも同様の結果が得られた(図 1-7)。

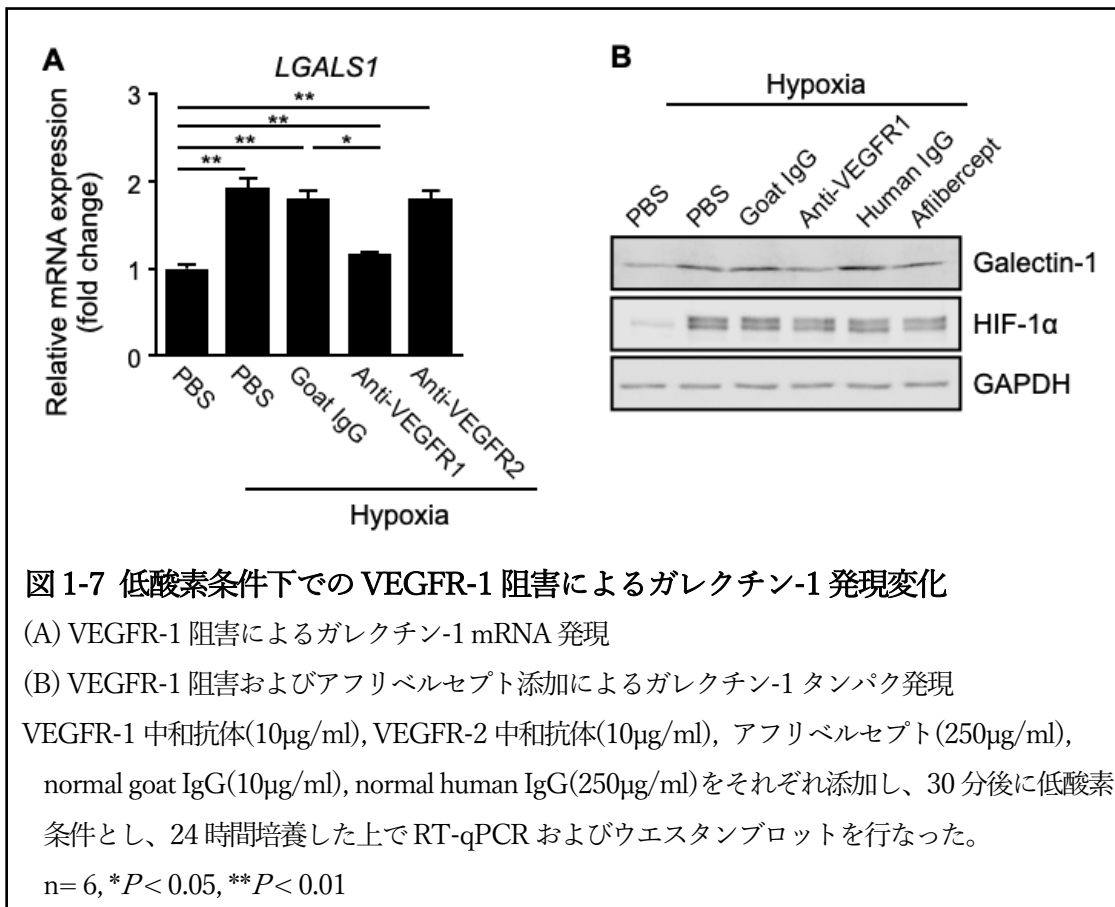


図 1-7 低酸素条件下での VEGFR-1 阻害によるガレクチン-1 発現変化

(A) VEGFR-1 阻害によるガレクチン-1 mRNA 発現

(B) VEGFR-1 阻害およびアフリベルセプト添加によるガレクチン-1 タンパク発現

VEGFR-1 中和抗体(10μg/ml), VEGFR-2 中和抗体(10μg/ml), アフリベルセプト(250μg/ml), normal goat IgG(10μg/ml), normal human IgG(250μg/ml)をそれぞれ添加し、30 分後に低酸素条件とし、24 時間培養した上で RT-qPCR およびウエスタンブロットを行なった。

n=6, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

以上の結果から、アフリベルセプトが低酸素条件下におけるガレクチン-1 発現上昇を抑制し、その作用は VEGFR-2 阻害ではなく VEGFR-1 阻害作用によるものであることが示された。

### 3. RPE 細胞における PlGF 誘導ガレクチン-1 発現上昇

これまでの結果から、アフリベルセプトに結合し、さらに VEGFR-1 に結合する VEGF ファミリー分子、つまり VEGF-A、VEGF-B、PlGF が低酸素条件でのガレクチン-1 発現上昇に関与していると考え、それらを候補としてスクリーニングを行なった。

まず初めに RPE 細胞を 1%O<sub>2</sub> 低酸素条件にて 48 時間培養し、VEGF-A、VEGF-B、PlGF の mRNA 発現を RT-qPCR にて測定したところ、前述の既報(Hollborn et al., 2016)に一致して 3 種類全ての発現上昇を確認し、それが時間依存的に生じることが認められた(図 1-8)。

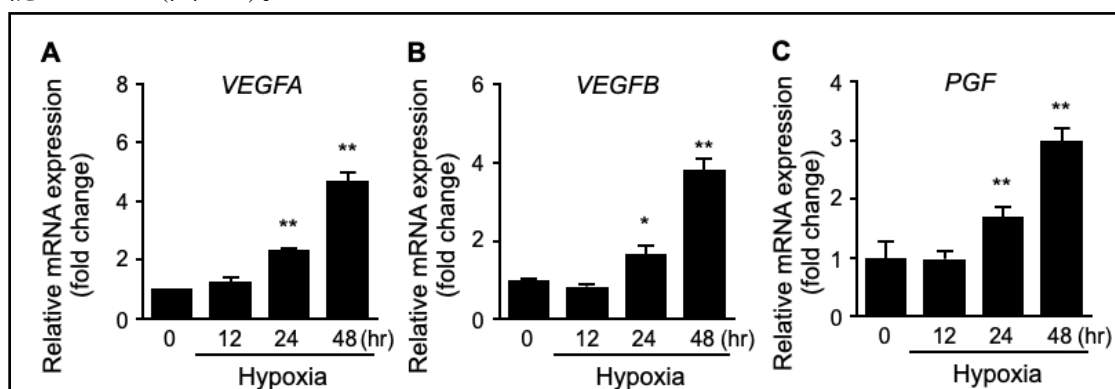


図 1-8 低酸素条件下での VEGFR-1 に結合する VEGF ファミリー分子の発現変化

(A) VEGF-A (B) VEGF-B (C) PlGF の mRNA 発現 n=6, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

続いてこれら 3 種類の分子を様々な濃度で RPE 細胞に添加し、24 時間培養してガレクチン-1 mRNA 発現を RT-qPCR にて測定したところ、PlGF のみにて発現上昇を認め、それが濃度依存的であることがわかった(図 1-9)。

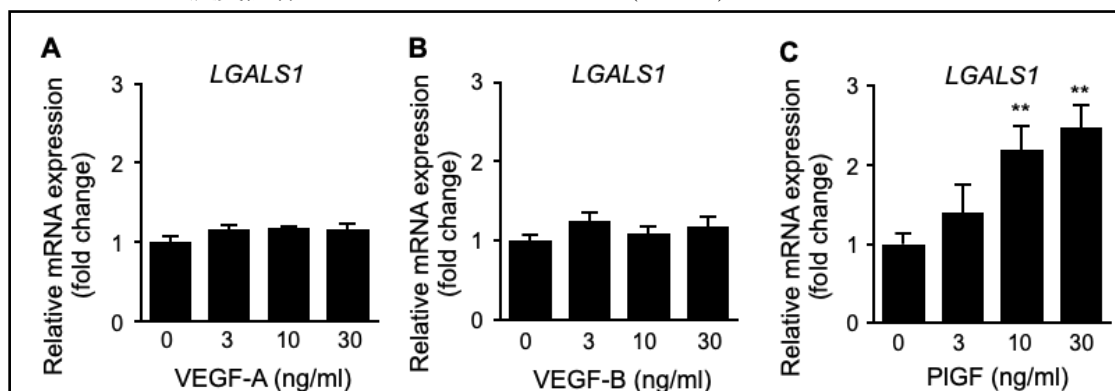
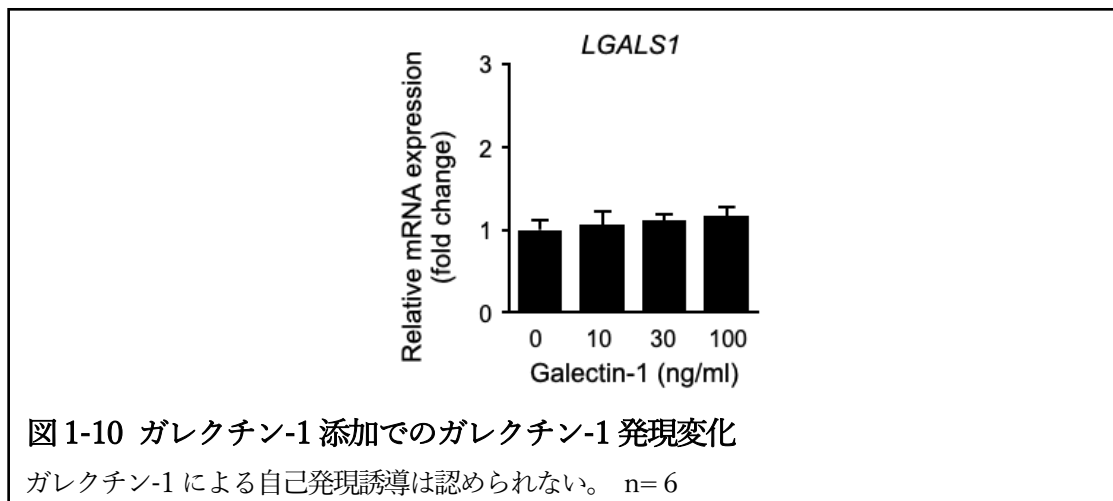


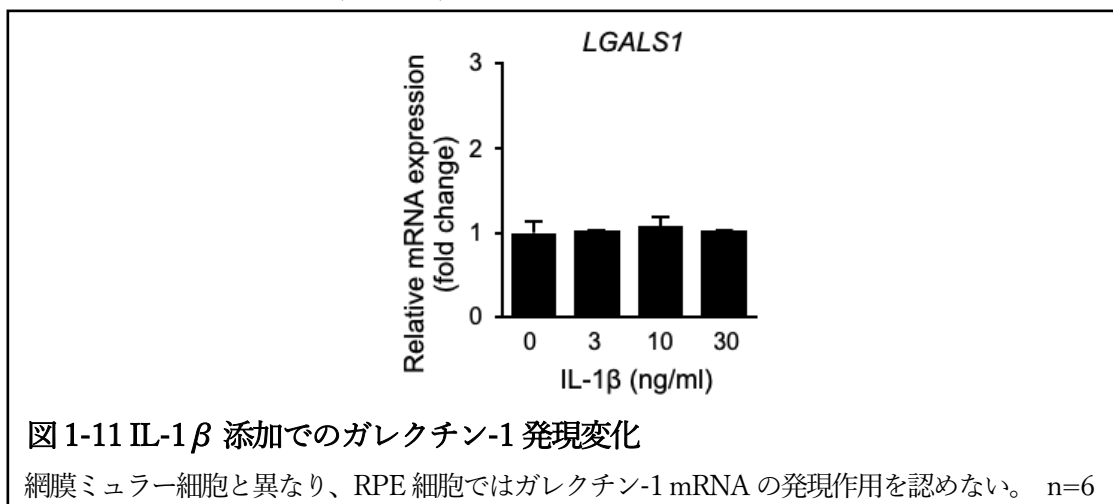
図 1-9 VEGFR-1 に結合する VEGF ファミリー分子添加でのガレクチン-1 発現変化

(A) VEGF-A (B) VEGF-B (C) PlGF を記載の濃度で添加し、24 時間培養後のガレクチン-1 mRNA 発現 n=6, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

また、VEGF ファミリー分子ではないがアフリベルセプト・VEGFR-1 に結合する分子として、ガレクチン-1 自体を添加することによるガレクチン-1 の自己発現誘導について調べたが、ガレクチン-1 発現上昇は認めなかった(図 1-10)。



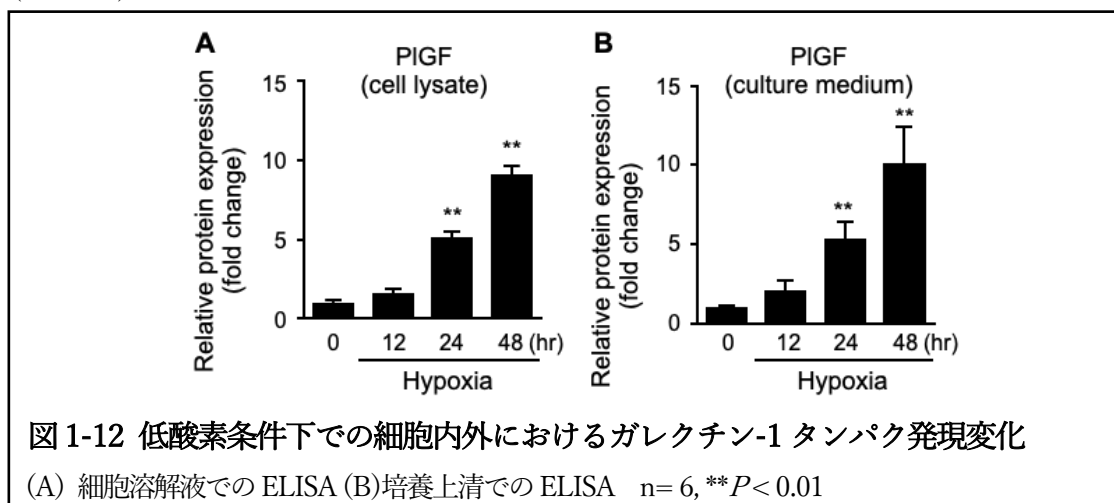
加えて、これまでに当研究室の既報においてヒト培養網膜ミューラー細胞でのガレクチン-1 発現誘導作用を示した IL-1 $\beta$  を添加し(Hirose et al., 2019)、24 時間培養してガレクチン-1 mRNA 発現を RT-qPCR にて測定したが、RPE 細胞ではガレクチン-1 発現上昇を認めなかった(図 1-11)。



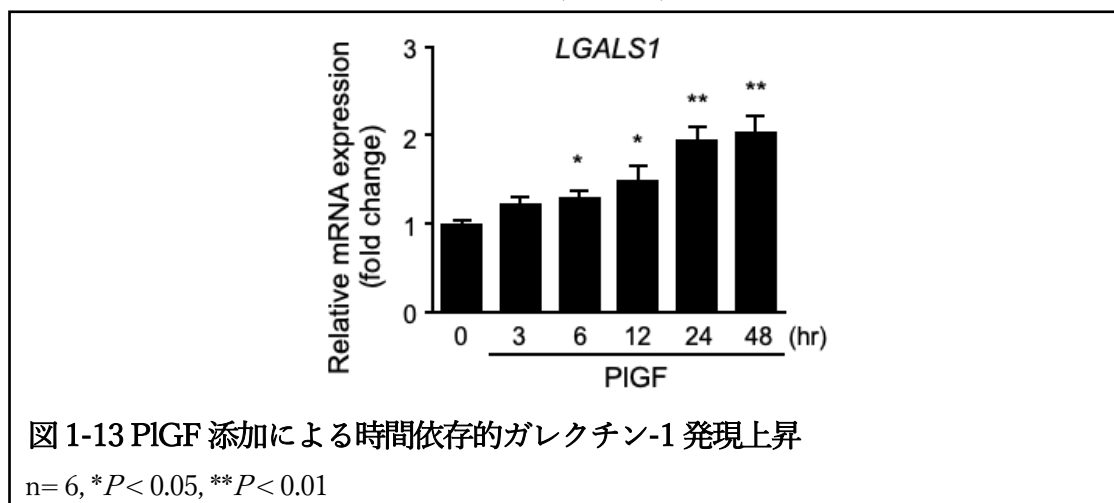
以上の結果を踏まえて、PlGF が低酸素条件下におけるガレクチン-1 発現上昇において重要な分子であると考え、更に実験を追加した。

既に示した低酸素条件下による PlGF の発現上昇がタンパクレベルでも生じ、かつ細胞外でもタンパク量増加していることを確認するために、RPE 細胞を 1%低酸素条件下にて 48 時間培養し、細胞溶解液および培養上清において PlGF タンパクの発現を

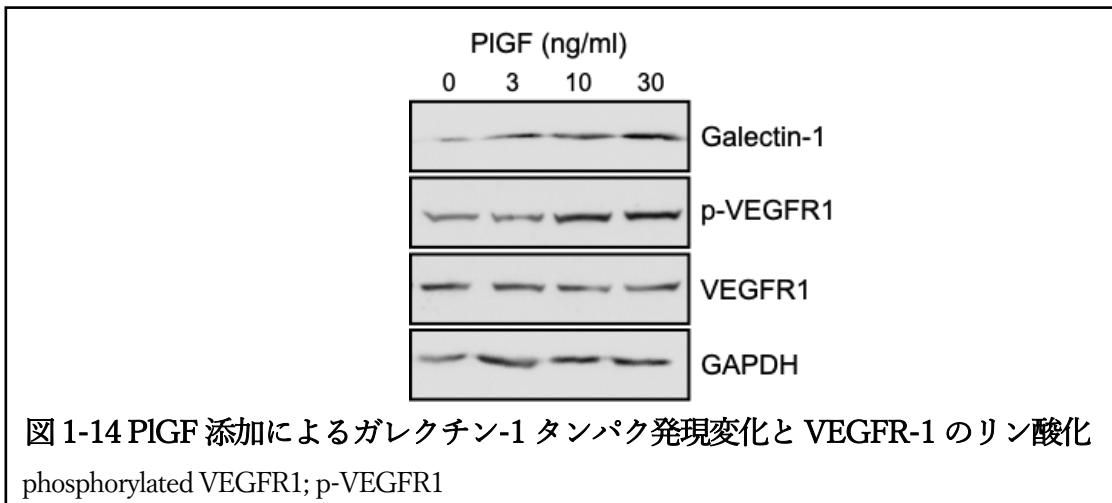
ELISA で測定したところ、共に時間依存的に PIGF タンパク量の増加が認められた。  
(図 1-12)



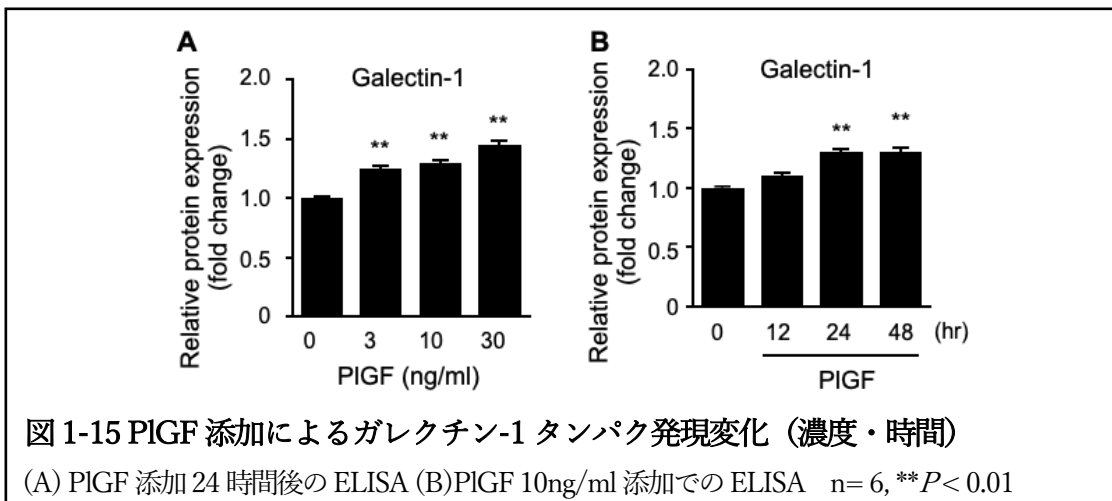
RPE 細胞に PIGF 10ng/ml を添加し、様々な時間で培養してガレクチン-1 mRNA 発現を RT-qPCR にて測定したところ、PIGF によるガレクチン-1 mRNA 発現上昇が時間依存的に生じることが明らかとなった (図 1-13)。



続いて、PIGF による作用が VEGFR-1 を介していることを確認するために、RPE 細胞に PIGF を添加して 24 時間培養し、ガレクチン-1 の発現変化および VEGFR-1 の活性化を示唆するチロシンリン酸化をウェスタンブロットにて調べたところ、PIGF 添加によってガレクチン-1 の発現上昇とともに VEGFR-1 のリン酸化亢進が認められた (図 1-14)。



これらの結果を受け、PIGF 添加によるガレクチン-1 タンパクの発現上昇を ELISA にて確認した。PIGF 添加によってガレクチン-1 タンパク量も増加し、それが濃度依存的および時間依存的に生じることが示された(図 1-15)。

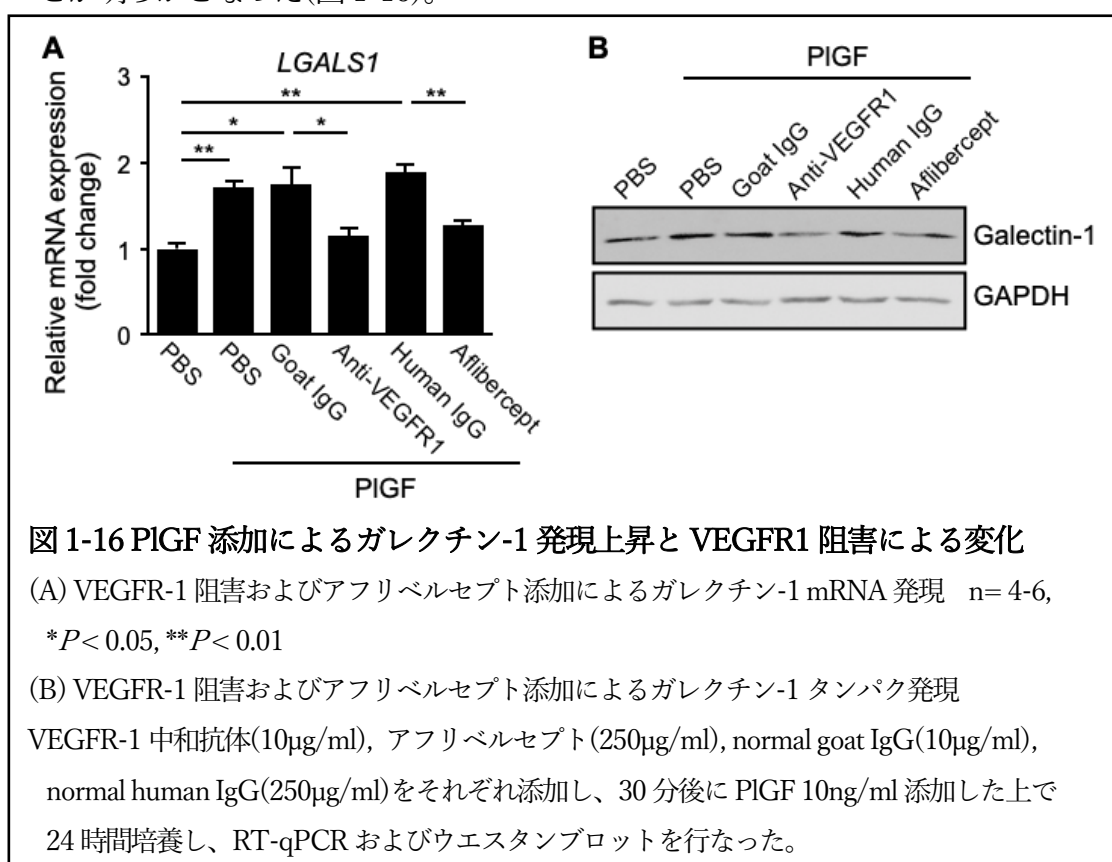


以上の結果から、低酸素条件において発現上昇した PIGF によって、VEGFR-1 リン酸化を介して RPE 細胞におけるガレクチン-1 発現上昇が誘導されることが明らかとなった。

#### 4. RPE 細胞における PlGF 誘導ガレクチン-1 発現上昇のシグナルパスウェー解析

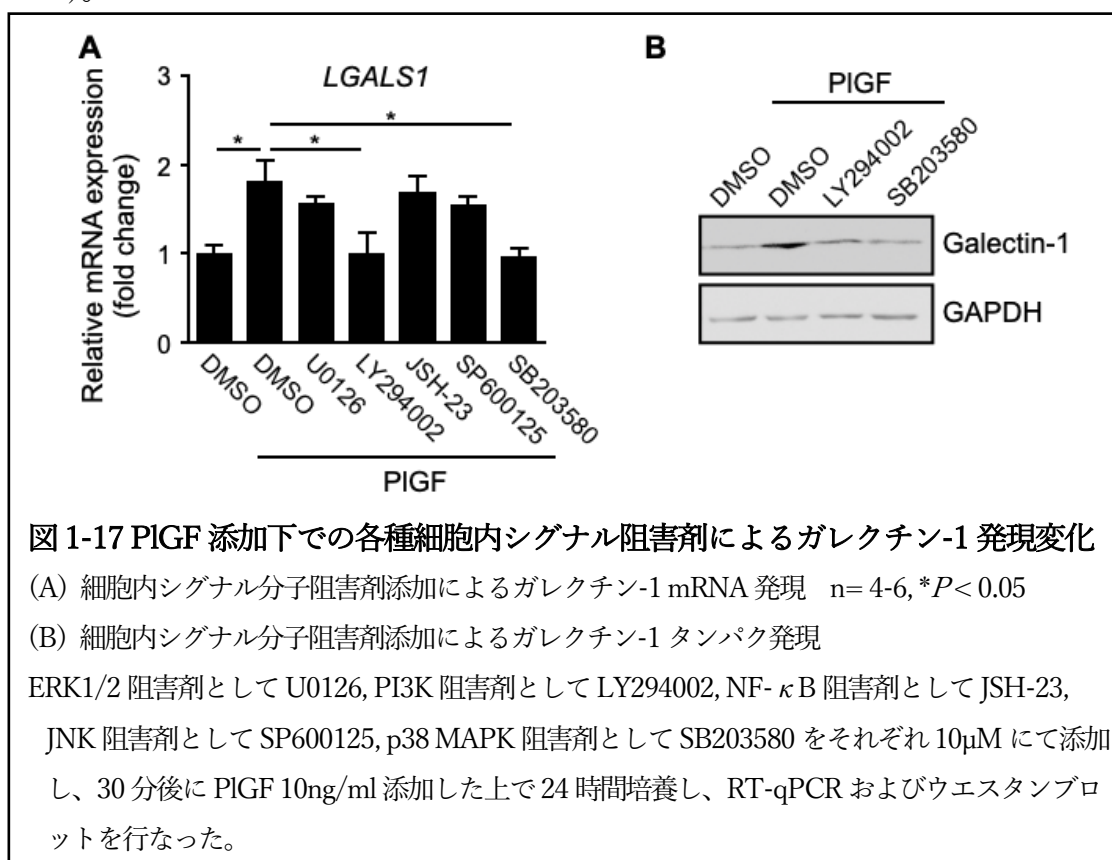
これまでの結果から、PlGF が RPE 細胞においてガレクチン-1 発現を誘導することが明らかになった。そこで本項では、その発現誘導に関与する分子動態についての詳細を述べる。

PlGF によるガレクチン-1 発現誘導が VEGFR-1 を介していることを確認するために、RPE 細胞に PlGF を添加して 24 時間培養し、VEGFR-1 阻害の有無によるガレクチン-1 の発現変化を RT-qPCR およびウエスタンブロットにて調べた。その結果、PlGF 添加によって生じるガレクチン-1 の発現上昇が VEGFR-1 阻害にて抑制されることが明らかとなった(図 1-16)。



続いて PlGF によるガレクチン-1 発現誘導における細胞内シグナル分子について、各種細胞内シグナル分子阻害剤を用いて検討した。VEGFR-1 の下流に存在することが知られている ERK1/2, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), NF- $\kappa$ B, c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)のケミカルインヒビターを用い、dimethyl sulfoxide (DMSO)の最終濃度が 0.1%以下となるように希釈の上で添加し、PlGF 添加によるガレクチン-1 発現の変化を RT-qPCR およびウエスタンブロットにて調べたところ、PI3K 阻害剤である LY294002 と p38 MAPK 阻害

剤である SB203580 によってガレクチン-1 発現上昇が抑制されることが示された(図 1-17)。



更に詳細な PI3GF 誘導ガレクチン-1 発現制御系について調べるために、*LGALS1* プロモーター領域およびエンハンサー領域についての実験を行なった。初めに *LGALS1* プロモーター領域のみを用いたところ、プロモーター領域単独では PI3GF 添加による下流配列の発現増加を認めなかった。そこで既報に従い、*LGALS1* 遺伝子の転写開始点から +450 bp ~ +1750 bp の範囲にあるエンハンサー領域における、AP-1 と総称される転写因子の作用について検討を行なった(Juszczynski et al., 2007)。ATF2, c-Fos, c-Jun 等を含む転写因子 AP-1 は、TPA-Responsive Element や cAMP Responsive Element 等を含む AP-1 結合配列に結合し、そのリン酸化によって遺伝子発現が調整されている(Eferl et al., 2003)。この AP-1 結合配列がガレクチン-1 発現調節に重要であることを、網膜ミューラー細胞を用いた実験にて我々は過去に示している(Hirose et al., 2019)。そこで、RPE 細胞を用いて同様の実験系を行った。

*LGALS-1* エンハンサー領域における AP-1 結合配列を除いた塩基配列の DNA を用意し、*LGALS1* プロモーター領域のみ(pGal)、*LGALS1* プロモーター領域に正常 *LGALS-1* エンハンサー配列を結合させたもの(pGal+AP-1)、*LGALS1* プロモーター領域と AP-1 結合配列を欠失させた *LGALS-1* エンハンサー配列を結合させたもの

(pGal $\Delta$ AP-1)の3種のルシフェラーゼベクターを作製の上でRPE細胞に遺伝子導入し、PIGF添加にて24時間培養の上でルシフェラーゼ活性による発光を測定した。

結果、PIGFによるガレクチン-1発現上昇はAP-1配列を含んでいるエンハンサー領域によって増幅され、そしてRPE細胞においてもそのエンハンサー領域内のAP-1結合配列が重要であることがわかった(図1-18)。

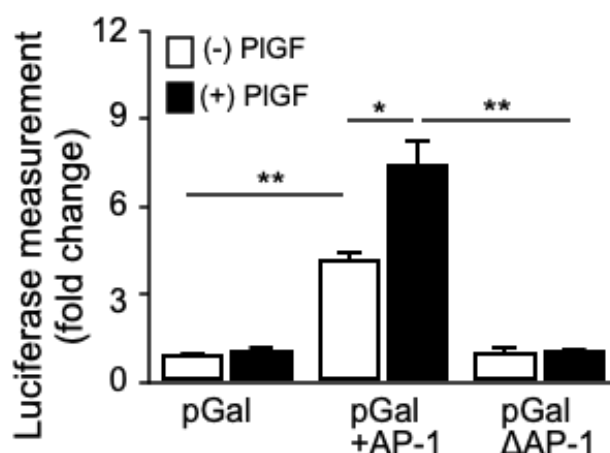


図1-18 PIGF添加下におけるガレクチン-1発現でのAP-1結合配列の重要性

*LGALS1* プロモーター配列(pGal; 転写開始点から数えて-500 bp~+67 bp)、同プロモーター配列とAP-1結合配列を含んでいるエンハンサー領域配列(転写開始点から数えて+450 bp~+1750 bp)を組み合わせたもの(pGal+AP-1)、そこからエンハンサー領域配列中のAP-1結合配列を欠損させたもの(pGal $\Delta$ AP-1)の3種類をそれぞれ導入し、PIGF 10ng/ml添加した上で24時間培養の後、ルシフェラーゼ活性を測定した。 n= 4-6, \* $P$ < 0.05, \*\* $P$ < 0.01

加えて、RPE細胞においてエンハンサー領域内のAP-1結合配列に対するAP-1の結合がPIGF添加によって増加していることを、各種AP-1抗体を用いたChIP-qPCRにて調べた。

PIGF添加によって、*LGALS1*エンハンサー領域におけるAP-1結合配列へATF2、c-Junの結合が増加することが明らかになった(図1-19)。

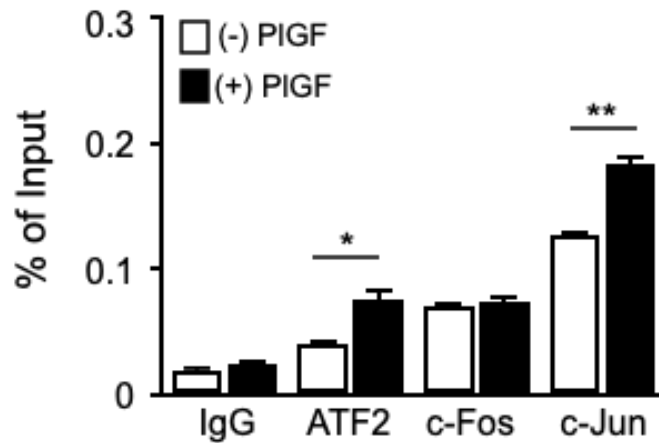
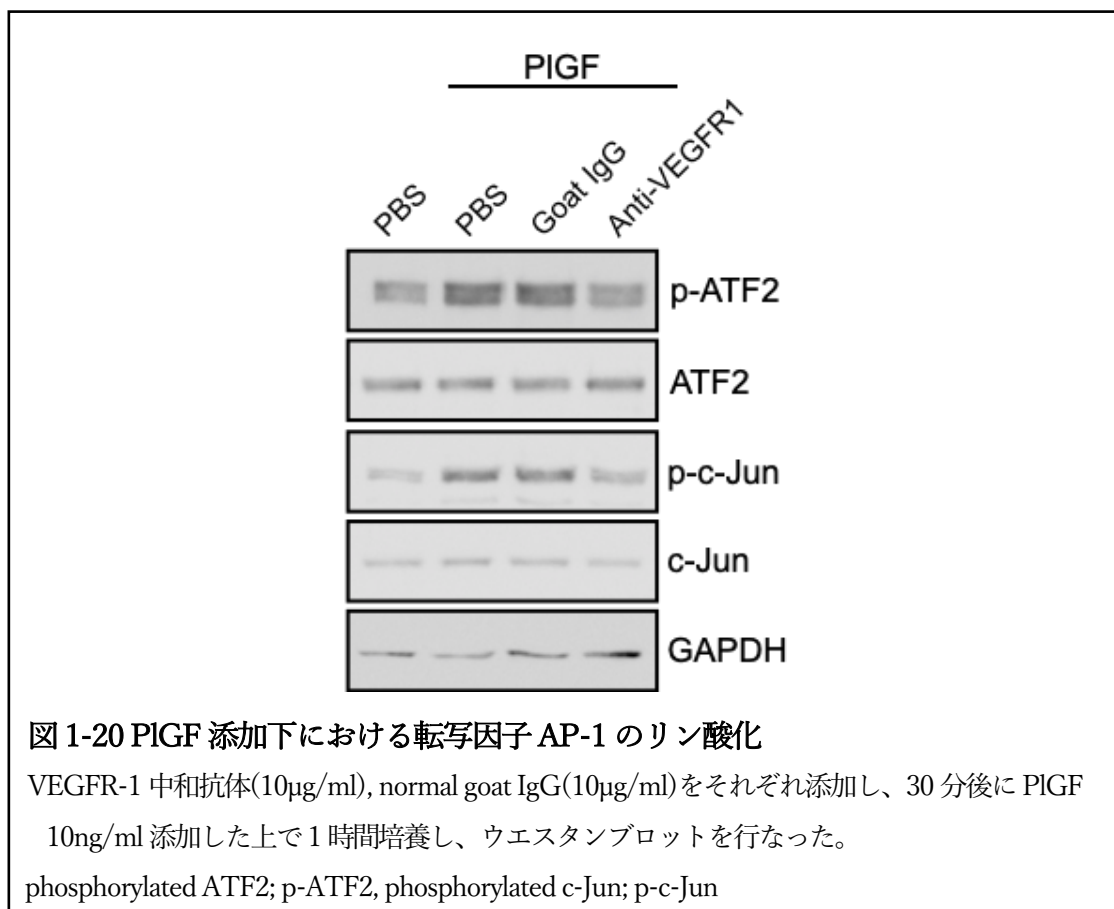


図 1-19 PIGF 添加下における *LGALS1* エンハンサー領域内 AP-1 結合配列への転写因子 AP-1 の結合変化

PIGF 10ng/ml 添加 1 時間後に細胞を回収し、各種 AP-1 サブユニットタンパクに対する抗体で ChIP-qPCR を行くと、ATF2 抗体および c-Jun 抗体で免疫沈降した場合に、AP-1 結合配列を含む部分の *LGALS1* エンハンサー配列 DNA 量が増加している。n= 4-6, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

この結果を踏まえて、ATF2 および c-Jun について、そのリン酸化をウェスタンブロットで調べたところ、PIGF 添加によってそのリン酸化が増強し、そしてそれが VEGFR-1 阻害によって抑制された(図 1-20)。

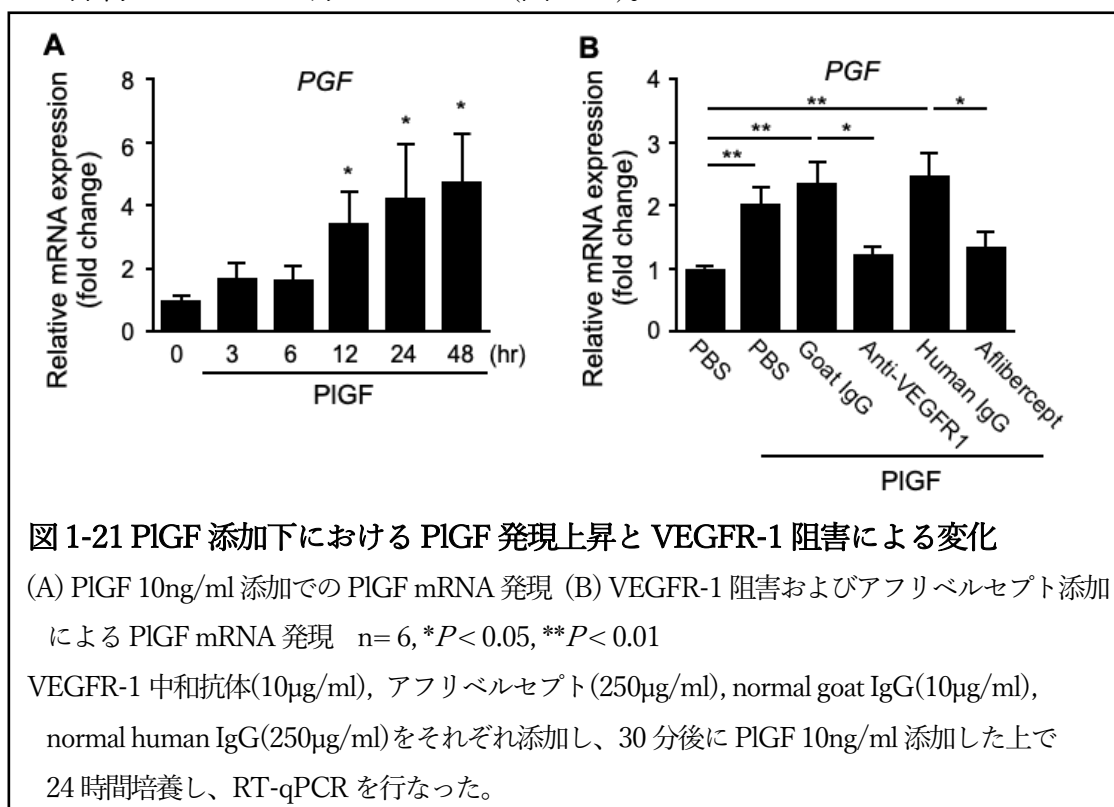


以上の結果から、PlGF 添加によるガレクチン-1 発現誘導においては、VEGFR-1 活性化による PI3K および p38 MAPK を経由した転写因子 AP-1 の作用が重要であることが示された。

## 5. RPE 細胞における PlGF の自己発現誘導

ここまでの結果で、RPE 細胞における低酸素条件および PlGF 刺激によるガレクチン-1 の発現誘導経路を明らかにした。一方で、PlGF を含む VEGF ファミリー分子は、オートクライン/パラクラインによってその発現量に変化することが知られている (Gerber et al., 2002; Ikai et al., 2005)。そこで、RPE 細胞においても PlGF による同様の機序が関与する可能性を考え、以下の検討を行なった。

RPE 細胞に PlGF を添加して培養し、VEGFR-1 阻害の有無による PlGF mRNA の発現変化を RT-qPCR にて調べたところ、PlGF 添加によって時間依存的に PlGF 自身の発現増加、すなわち PlGF の自己発現誘導が生じ、そしてそれが VEGFR-1 阻害にて抑制されることが明らかとなった(図 1-21)。



続いて PlGF の自己発現誘導における細胞内シグナル分子について、各種細胞内シグナル分子阻害剤を用いて検討した。前項と同様に ERK1/2, PI3K, NF- $\kappa$ B, JNK, p38 MAPK の阻害剤を用い、PlGF 添加による PlGF 発現の変化を RT-qPCR にて調べた結果、ERK1/2 阻害剤である U0126, PI3K 阻害剤である LY294002, p38 MAPK 阻害剤である SB203580 によって PlGF の自己発現誘導が抑制されることがわかった。(図 1-22)。

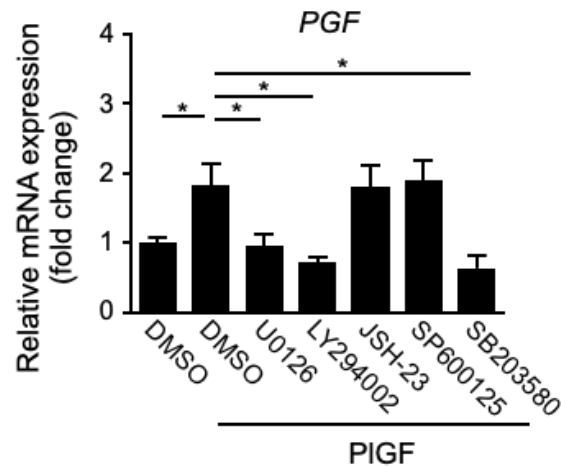


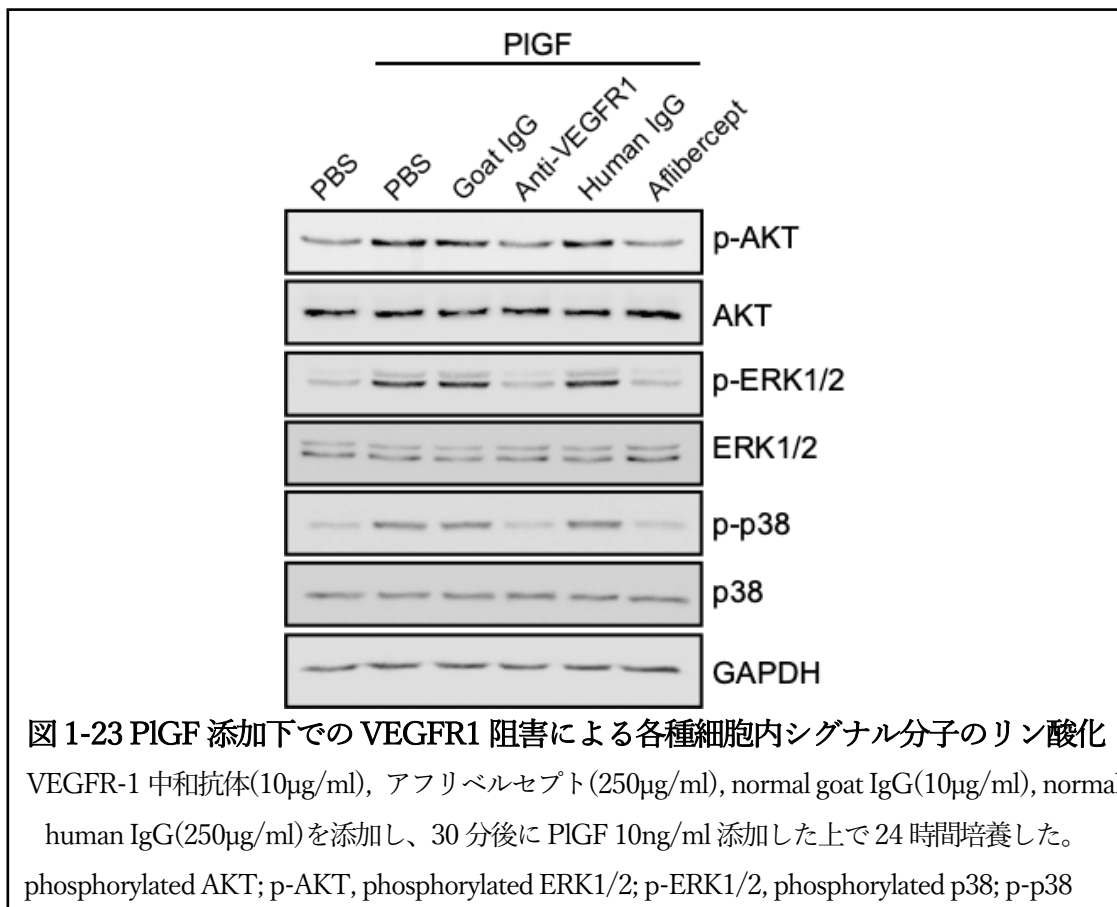
図 1-22 PIGF 添加下での各種細胞内シグナル阻害剤による PIGF 発現変化

ERK1/2 阻害剤として U0126, PI3K 阻害剤として LY294002, NF- $\kappa$ B 阻害剤として JSH-23, JNK 阻害剤として SP600125, p38 MAPK 阻害剤として SB203580 をそれぞれ 10 $\mu$ M にて添加し、30 分後に PIGF 10ng/ml 添加した上で 24 時間培養し、RT-qPCR を行なった。

n= 4-6, \* $P$  < 0.05

この結果を踏まえて、VEGFR-1 阻害によってこれら細胞内シグナル分子の活性化が抑制されることを、そのリン酸化を指標としてウエスタンブロットで確認した。

PI3K/AKT, ERK1/2, p38 MAPK のリン酸化が PIGF 添加によって増強し、それが VEGFR-1 阻害によって抑制されることを明らかにした(図 1-23)。



以上の結果から、RPE 細胞には PlGF による PlGF の発現誘導機構、すなわち PlGF の自己発現誘導が存在し、それが VEGFR-1 活性化による PI3K, ERK1/2, p38 MAPK のリン酸化を介した作用であることを示した。

## 6. 滲出型加齢黄斑変性患者由来の網膜組織における免疫染色

これまでの結果にて、ヒト不死化 RPE 細胞を用いて低酸素と PlGF を介したガレクチン-1 の発現調整について示した。我々は既報において、滲出型加齢黄斑変性患者由来の網膜組織で RPE 細胞にガレクチン-1 が発現していることを明らかにしている (Wu et al., 2019)。そこで本研究では、同患者の網膜組織切片を用いて、ヒト生体内の RPE において HIF-1 $\alpha$ 、PlGF、VEGFR-1 がガレクチン-1 と共に局在しているかを、蛍光免疫組織化学染色法で調べた。

滲出型加齢黄斑変性患者由来の網膜組織において RPE 細胞のマーカーの一つである RPE65 とガレクチン-1 が共局在しており、同様の部分において HIF-1 $\alpha$ 、PlGF、VEGFR-1 がガレクチン-1 と共局在していることが確認できた(図 1-24)。

以上から、前項までで示した RPE 細胞における様々なガレクチン-1 発現制御機構が、実際の滲出型加齢黄斑変性患者の網膜においても生じていると考えられる。

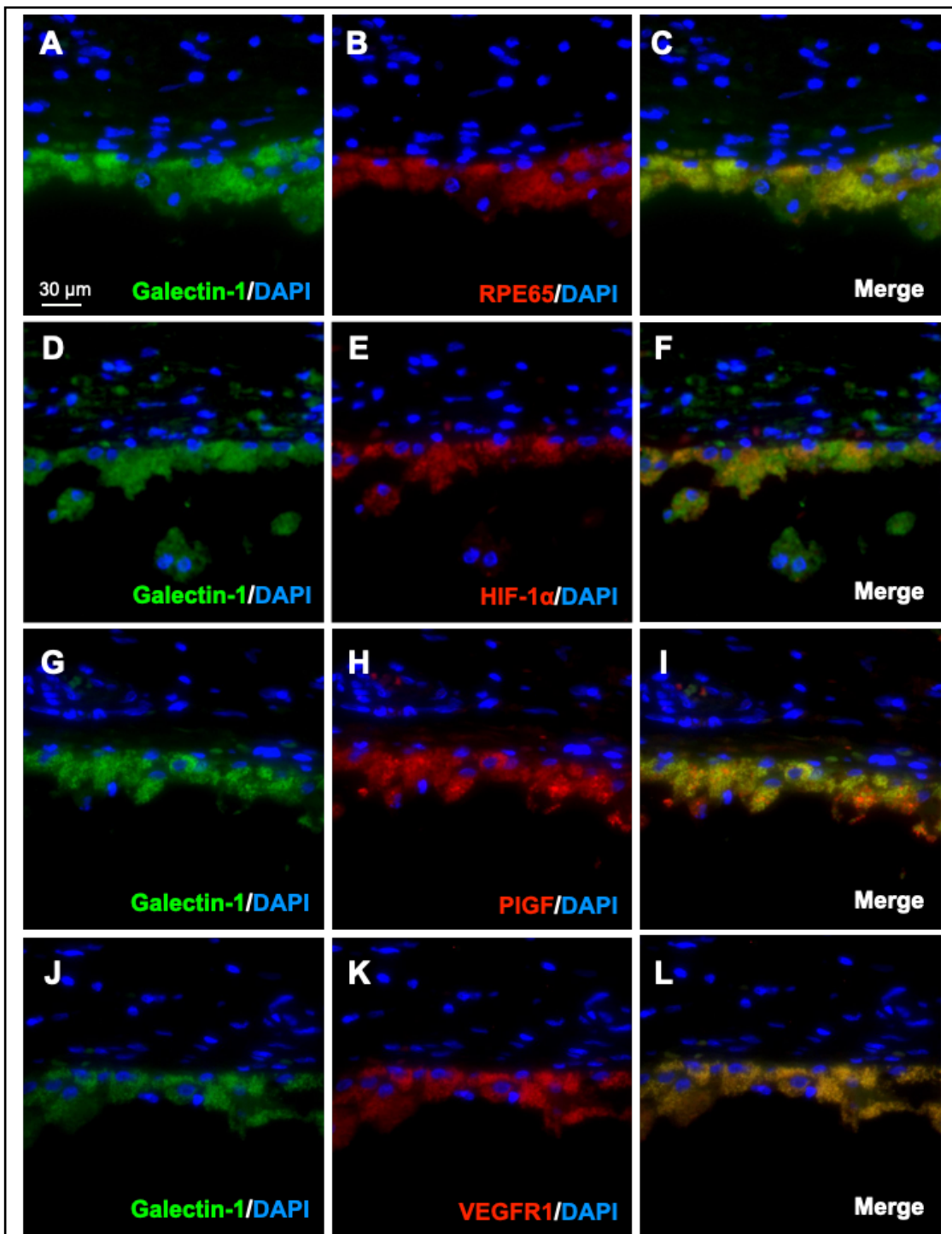


図 1-24 滲出型加齢黄斑変性患者由来組織での RPE 細胞における各種分子とガレクチン-1 の共局在

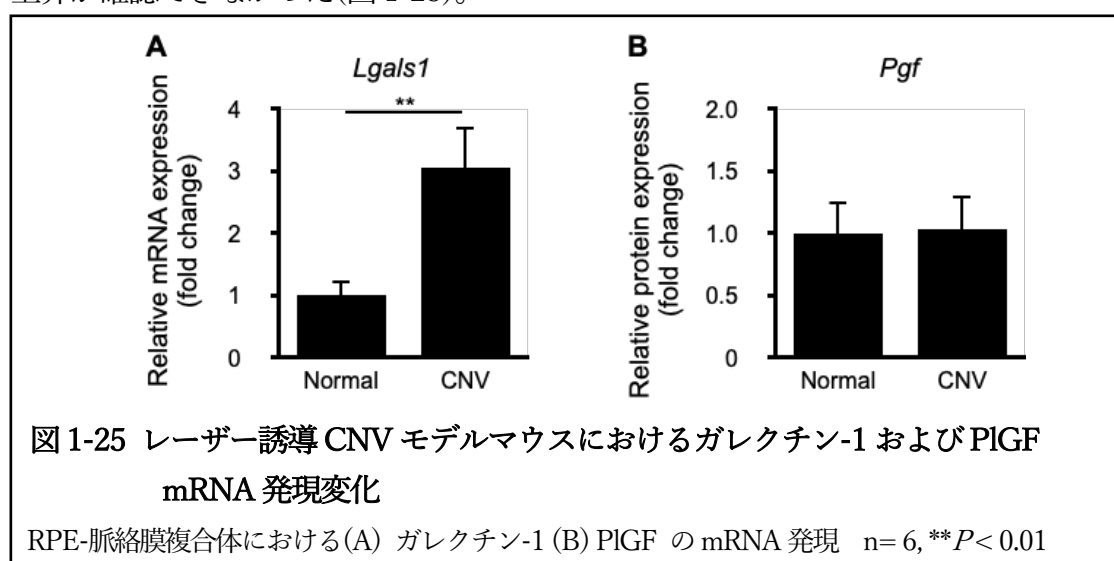
(A-C) RPE 細胞のマーカーである RPE65 とガレクチン-1、(D-F) HIF-1 $\alpha$  とガレクチン-1、(G-I) PlGF とガレクチン-1、(J-L) VEGFR-1 とガレクチン-1 について共局在を確認した。

## 7. レーザー誘導 CNV モデルマウスおよび CoCl<sub>2</sub> 硝子体注射モデルマウス由来網膜組織における関連分子の発現解析

滲出型加齢黄斑変性の動物モデルとして頻用されるのが、レーザー誘導 CNV モデルマウスである。これはマウス網膜にスポット状のレーザー光を照射することで、RPE の基底膜であるブルッフ膜を局所的に蒸散させ、同部において脈絡膜側から新生血管が生じるという機序が考えられている。当研究室においても同モデルマウスを用いて多くの実験を行なってきており、前述の通り同モデルマウスの網膜においてガレクチン-1 発現が上昇することを過去に示している(Wu et al., 2019)。

これを踏まえて、本研究で示したガレクチン-1 発現誘導の機序がレーザー誘導 CNV モデルマウスの眼組織においても生じているかを検討した。

C57BL/6J マウスでレーザー照射 5 日後に眼球摘出し、RPE-脈絡膜複合体においてガレクチン-1 および PlGF の mRNA 発現変化を RT-qPCR にて調べたところ、ガレクチン-1 に関しては既報と同様に著明な発現上昇を認めたが、PlGF については発現上昇が確認できなかった(図 1-25)。



また、既報や臨床使用時の濃度を参考にして(Van Bergen et al., 2017)、C57BL/6J マウスにレーザー照射後ただちに VEGFR-1 中和抗体、アフリベルセプト, normal goat IgG を 1μl ずつ硝子体注射し、5 日後に摘出した眼球の RPE-脈絡膜複合体においてガレクチン-1 の mRNA 発現変化を RT-qPCR にて調べた。結果、レーザー・硝子体注射とも非施行の正常群に比してガレクチン-1 発現上昇は認めるものの、VEGFR-1 中和抗体およびアフリベルセプトによる抑制効果は認めなかった(図 1-26)。

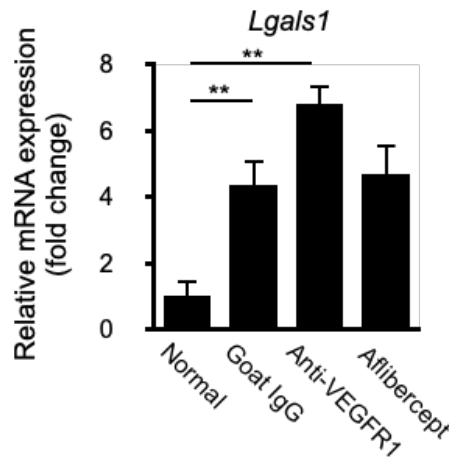


図 1-26 レーザー誘導 CNV モデルマウスでの VEGFR-1 阻害によるガレクチン-1 mRNA 発現変化

VEGFR-1 中和抗体(5mg/ml), アフリベルセプト(2.5mg/ml), normal goat IgG(5mg/ml)を 1 $\mu$ l ずつ硝子体注射し、RPE-脈絡膜複合体のガレクチン-1 mRNA 発現を測定した。

n= 5-6, \*\* $P < 0.01$

これらの結果を踏まえ、PlGF 発現が上昇し、かつ VEGFR-1 阻害にてガレクチン-1 発現が抑制される他の動物モデルが必要と考え、次の候補として塩化コバルト( $\text{CoCl}_2$ )硝子体注射モデルマウスに取り組むこととした。 $\text{CoCl}_2$  は化学的低酸素誘導剤として一般的に用いられており、HIF 分解酵素を阻害することで HIF-1 $\alpha$  を安定化させると言われている(Muñoz-Sánchez et al., 2019)。RPE 細胞においても PlGF 発現を誘導する化学的低酸素として有効であることが既報で示されている(Hollborn et al., 2016)。またマウスにおいても、 $\text{CoCl}_2$  の硝子体注射によって神経網膜における HIF-1 $\alpha$  が増加することが免疫染色によって示されている(Yaung et al., 2008)。

これらのことから、レーザー CNV 誘導モデルマウスに代わり、眼局所の低酸素を誘発するのに適切であると考え、 $\text{CoCl}_2$  硝子体注射モデルマウスを作製した。塩化コバルト六水和物を既報に従い 10mM となるよう PBS に溶解し、それを 1 $\mu$ l 硝子体注射した後 24~72 時間で眼球摘出し、RPE-脈絡膜複合体においてガレクチン-1 および PlGF の mRNA 発現変化を RT-qPCR にて調べた。その結果、硝子体注射非施行の正常群に比してガレクチン-1 発現上昇は認めるものの、PlGF の発現上昇は認めず、むしろ減少傾向を認めた(図 1-27)。

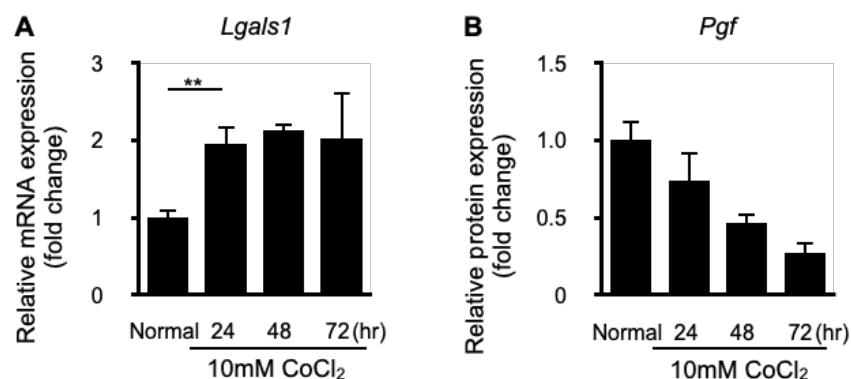


図 1-27 CoCl<sub>2</sub>硝子体注射モデルマウスにおけるガレクチン-1 および PlGF mRNA の時間依存性発現変化

RPE-脈絡膜複合体における(A) ガレクチン-1 (B) PlGF の mRNA 発現 n=6, \*\**P*<0.01

加えて、同様の実験を 0.2~10mM CoCl<sub>2</sub>硝子体注射 48 時間後の眼球摘出で行なった。この際は硝子体注射非施行の野生型をコントロール群として用いるのではなく、溶剤である PBS を硝子体注射したものをコントロール群として採用した。

RPE-脈絡膜複合体においてガレクチン-1 および PlGF の mRNA 発現変化を RT-qPCR にて調べたところ、PBS 硝子体注射群と CoCl<sub>2</sub>硝子体注射群でガレクチン-1 発現に変化は見られず、また PlGF は先の実験と同様に減少傾向が認められた(図 1-28)。

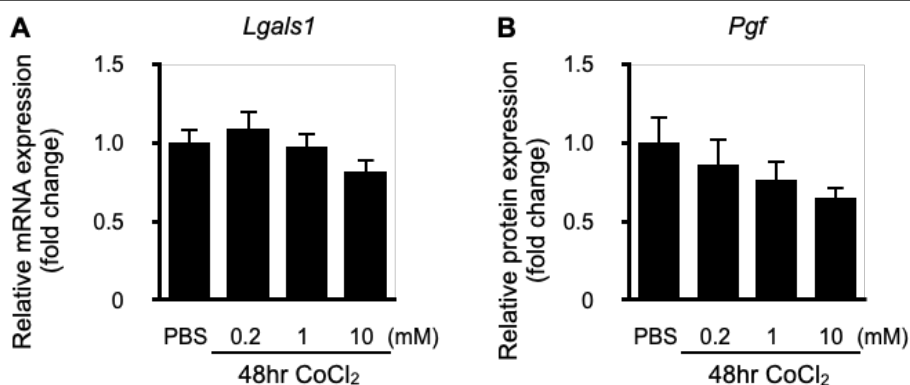


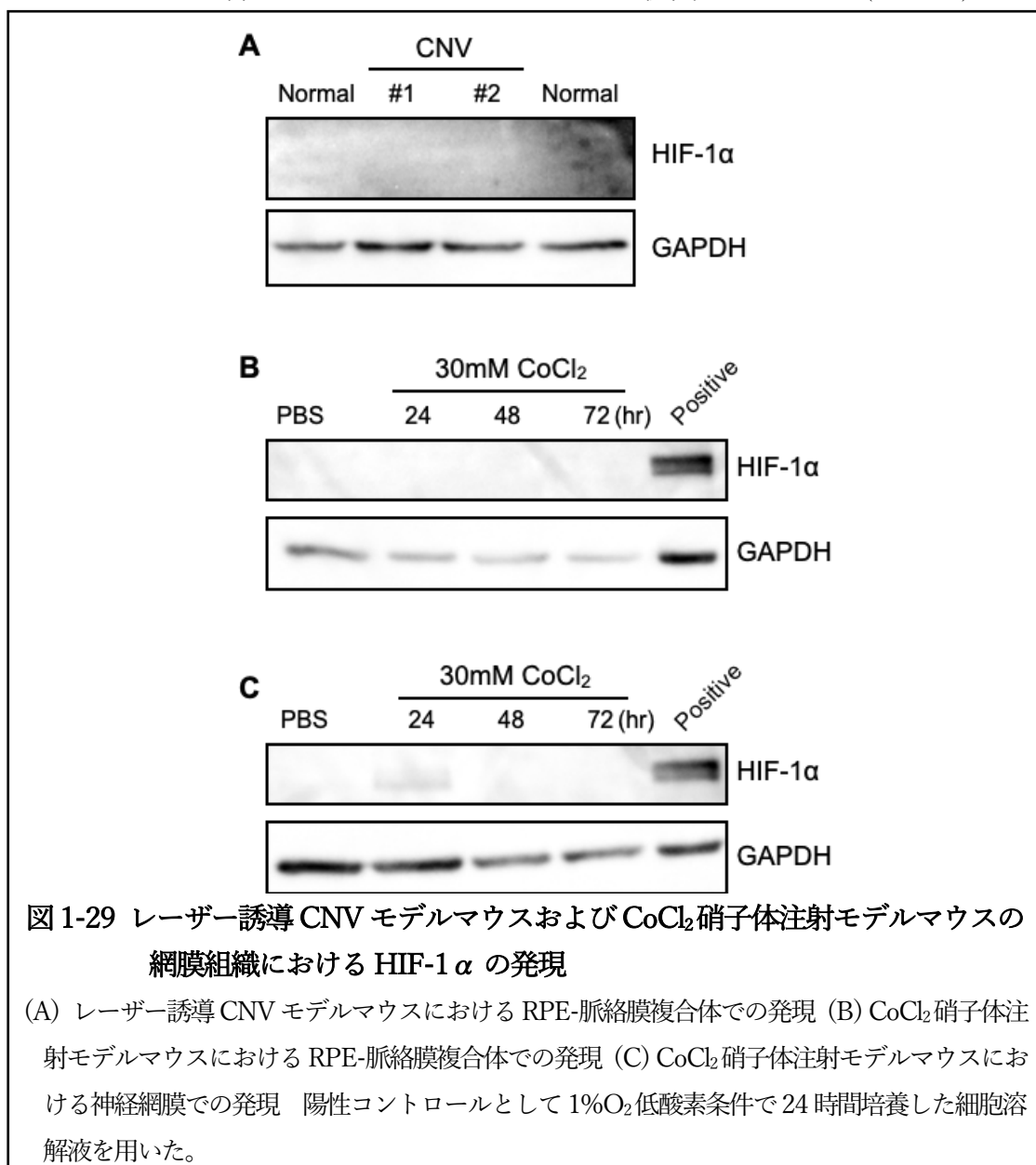
図 1-28 CoCl<sub>2</sub>硝子体注射モデルマウスにおけるガレクチン-1 および PlGF mRNA の濃度依存性発現変化

RPE-脈絡膜複合体における(A) ガレクチン-1 (B) PlGF の mRNA 発現

このように CoCl<sub>2</sub>硝子体注射モデルマウスにおいても仮説に合致する結果が得られず、レーザー誘導 CNV モデルマウスと CoCl<sub>2</sub>硝子体注射モデルマウスの両方において、眼組織での HIF-1 $\alpha$  タンパクを調べることで組織低酸素が生じていることを確認することとした。なお、CoCl<sub>2</sub>硝子体注射モデルマウスでの検討では HIF-1 $\alpha$  の陽性コントロールとして培養細胞を 1%O<sub>2</sub> 低酸素条件で 24 時間培養し、総タンパク量を

組織サンプルと同量にしてウエスタンブロットを行なった。

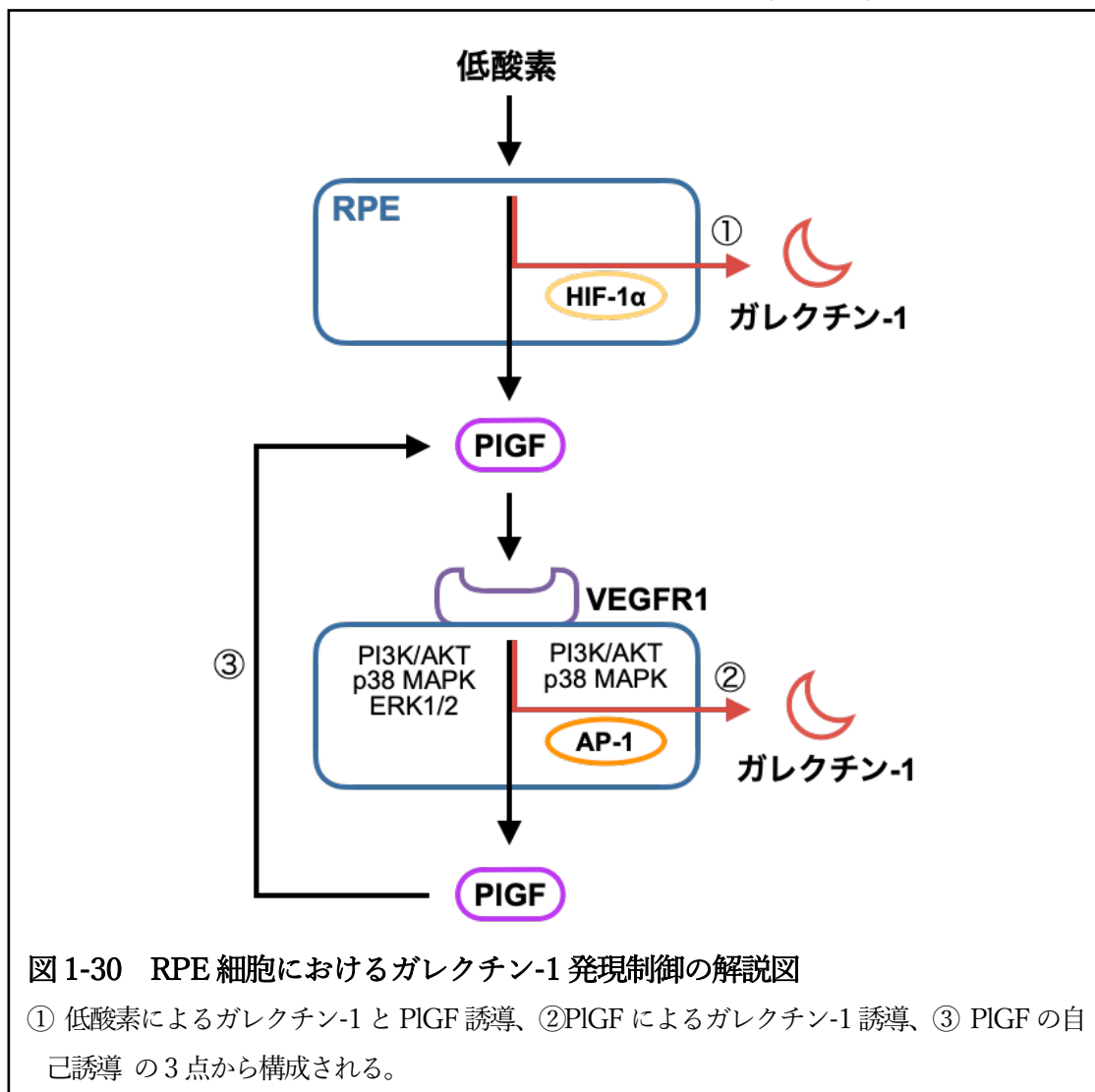
レーザー誘導 CNV モデルマウスではレーザー照射後 7 日後に眼球摘出し、RPE-脈絡膜複合体における HIF-1 $\alpha$  の発現、CoCl<sub>2</sub>硝子体注射モデルマウスでは 30mM CoCl<sub>2</sub> 硝子体注射 24～72 時間後に眼球摘出し、RPE-脈絡膜複合体および神経網膜における HIF-1 $\alpha$  の発現をウエスタンブロットで確認したところ、CoCl<sub>2</sub> 硝子体注射モデルマウスの神経網膜においては 24 時間時点でわずかに HIF-1 $\alpha$  の発現量増加が認められたが(図 1-29C)、本研究で用いた細胞である RPE 細胞が含まれる RPE-脈絡膜複合体をサンプルとした際にはいずれの場合も HIF-1 $\alpha$  を検出できなかった(図 1-29)。



以上の結果から、当初想定された眼局所での介入手段である硝子体注射の手技自体によってガレクチン-1 発現が変化すると想定されること、いずれのモデルマウスにおいても RPE での PlGF および HIF-1 $\alpha$  の増加を認めないことが明らかとなり、モデルマウスにおける検討を中止した。

## 考察

本研究から、網膜のホメオスタシス維持に重要な役割を持っている RPE 細胞において、①低酸素によって HIF-1 $\alpha$  を介してガレクチン-1 発現が上昇する、②低酸素で発現誘導される PIGF が VEGFR-1 に作用し、AP-1 を含む細胞内シグナル経路を介してガレクチン-1 発現が上昇する、③PIGF が PIGF 自体の発現を上昇させる自己発現誘導能を持っている、という 3 つの機序が明らかとなった(図 1-30)。



RPE における組織低酸素には、網膜における活発なエネルギー消費や生体内でも有数の速い血流速度を示す脈絡膜循環が関わっていることが報告されており(Alm et al., 1973; Yu et al., 2001)、脈絡膜循環の減弱により RPE を含む網膜外層で低酸素が生じることが理にかなっている。それを裏付けるように、滲出型加齢黄斑変性患者の黄斑における脈絡膜循環の減弱が CNV 形成と相関していることが既報で示されている

(Metelitsina et al., 2008; Scharf et al., 2021)。また、RPE が滲出型加齢黄斑変性の病態形成に多大な寄与をしていることは広く知られているが、これには低酸素によって RPE 細胞より発現増加する VEGF-A、IL-6 を含む様々な血管新生因子・炎症性サイトカインが関与している(Arjamaa et al., 2017)。これまでに我々は、ガレクチン-1 が VEGF-A による血管新生と TGF- $\beta$  による線維化を介して滲出型加齢黄斑変性の病態形成に深く関わっていることを示している(Wu et al., 2019)。これらを踏まえると、RPE 細胞における低酸素が滲出型加齢黄斑変性の病態形成に関与しており、そこに本研究で示した HIF-1 $\alpha$  によって誘導されるガレクチン-1 が寄与していることが示唆される。

同様に、VEGF ファミリーの 1 つである PlGF もまた、滲出型加齢黄斑変性の病態形成に関わっていることが知られている(Mesquita et al., 2018)。PlGF ノックアウトマウスにおける解析によって、PlGF は通常は発現量が低く生理的な血管新生での役割が大きい一方で、病的な血管新生に関与することが知られている(Dewerchin et al., 2012)。また過去のレーザー誘導 CNV モデルマウスを用いた研究で、PlGF をノックアウトすることで CNV 形成が抑制されることが示されている(Rakic et al., 2003)。これらから、本研究において示した低酸素による PlGF の発現誘導および PlGF によるガレクチン-1 発現誘導が、CNV の形成を促進することによって滲出型加齢黄斑変性の病態増悪をもたらすことが考えられる。

PlGF の自己発現誘導能に関して、他の VEGFR-1 陽性細胞では報告があるものの(Ikai et al., 2005)、RPE 細胞においては明確な機序を示したのは渉猟する限り本研究が初めてである。我々は増殖糖尿病網膜症患者の前房水中での PlGF 濃度が上昇していることも報告しており(Ando et al., 2014)、VEGF が関与する様々な疾患において PlGF が病態の悪化を助長していると考えられている。これらのことから、RPE 細胞における PlGF の自己発現誘導は滲出型加齢黄斑変性の病態形成においても悪循環をもたらしていると考えられる。すなわち、VEGF 阻害薬によって PlGF 発現を抑制することは、その作用を止めるのみならずこの悪循環も抑制できることから、治療戦略において重要であることが示唆される。

一方で今後の課題として、ヒト正常眼におけるガレクチン-1 や PlGF の分布について検討できていない点、疾患モデルマウスでの検討で仮説に合致するデータが得られなかった点が挙げられる。正常眼における検討に関しては、倫理的な問題などから行っていないが、本研究に用いた検体の CNV 以外の部位における予備検討でガレクチン-1 の発現自体は非 CNV 部の RPE においても検出された。病態特異的な発現変化を明らかにすることは病態形成の機序解明に繋がる重要な課題であり、今後の検討を要する。またモデルマウスで仮説に合致する結果が得られなかった理由として、レーザー誘導 CNV モデルではレーザー範囲が網膜全体の面積に対してわずかであり、

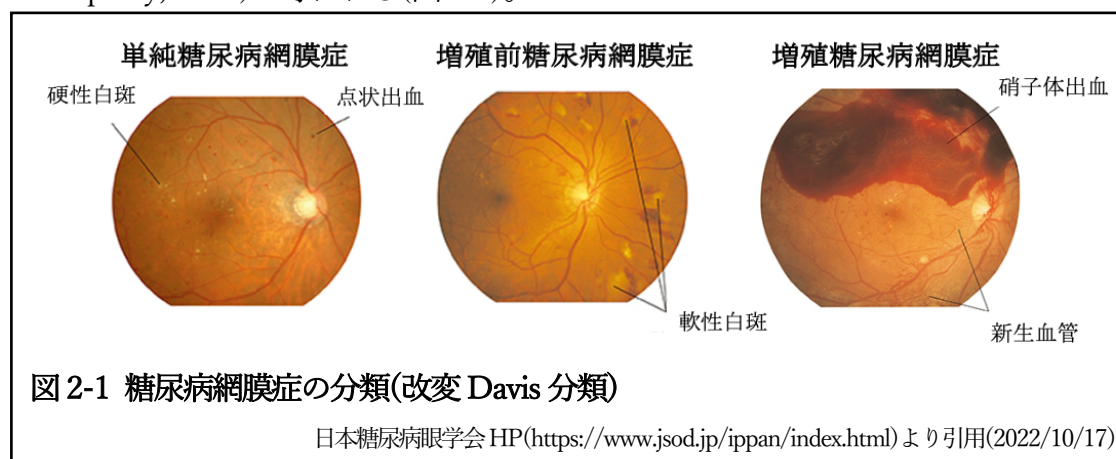
広範囲の網膜をサンプルとした場合に検出できる量として十分でなかった事、また  $\text{CoCl}_2$  硝子体注射モデルマウスでは効果の調整が難しく、 $\text{CoCl}_2$  の硝子体注射によって RPE を含む網膜細胞が死滅している可能性などが考えられる。これらをクリアする滲出型加齢黄斑変性モデルマウスを見出すのは困難であると考えられるが、仮に存在した場合でも硝子体注射の侵襲自体によるガレクチン-1 発現上昇を考慮し、点眼や内服などの硝子体注射以外のドラッグデリバリーに適した治療薬や阻害剤を用いた検討を行う必要があるだろう。

## 第2章

### 増殖糖尿病網膜症における $\alpha$ B-クリスタリンの発現解析

#### 緒言

糖尿病は様々な合併症をもたらすことが知られているが、眼合併症として特に重要なのが糖尿病三大合併症の1つとして知られる糖尿病網膜症である。糖尿病網膜症の発症や悪化には、糖尿病の病勢を示す血中ヘモグロビン A1c(Hemoglobin A1c; HbA1c)値や罹患期間などが関与しており(Kawasaki et al., 2011)、その病期分類には様々なものが存在する。その中で頻用される改変 Davis 分類について下記に示すが、最も進行した段階の糖尿病網膜症は増殖糖尿病網膜症 (proliferative diabetic retinopathy; PDR)と呼ばれる(図 2-1)。



糖尿病網膜症の本態は持続する高血糖による網膜微小血管障害をきっかけとした、網膜虚血に伴う循環障害と考えられており、それに伴う血管透過性亢進や網膜微小血管破綻による点状出血を生じるのが単純糖尿病網膜症、循環障害が進行して網膜神経節細胞の軸索膨化による軟性白斑などが見られるのが増殖前糖尿病網膜症、そしてそれらの遷延化によって網膜新生血管が増生し、そこからの硝子体出血や線維血管膜の形成などをきたす状態が PDR である。

この PDR における網膜血管新生には、第 1 章で言及した VEGF が大きく関与しており、PDR 治療においてもその併存症である糖尿病黄斑浮腫や血管新生緑内障に対して VEGF 阻害薬が標準治療の 1 つとして用いられている(Jampo et al., 2020)。また VEGF による血管新生に加えて、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  等のサイトカインによる炎症病態も PDR の病態形成に深く関与しており、その由来として終末糖化産物

(advanced glycation endproduct; AGE)に起因する免疫細胞からの発現増加が考えられている(Stitt, 2010)。AGE は持続的な高血糖によってタンパク、脂質、核酸がメイラード反応と呼ばれる非酵素的糖化を受けることで生成され、炎症や血管新生、細胞増殖に関与することが知られている(Chaudhuri et al., 2018)。

当研究室では過去に、AGE に起因するマクrofアージ/ミクログリアからの IL-1 $\beta$  が、網膜ミューラー細胞由来のガレクチン-1 を発現上昇させ、VEGFR-1,2 を介して PDR における血管透過性亢進や血管新生に関与することを示した(Kanda et al., 2017)。ミューラー細胞とは網膜固有のグリア細胞であり、神経網膜の全層にわたって柱のように存在しており、網膜のホメオスタシス維持に関与していると考えられている(Eastlake et al., 2020)。生理的な作用のみならず、PDR における線維血管膜の形成という病理的な作用でも網膜ミューラー細胞は重要な役割を有しており、transforming growth factor- $\beta$  1/2 を介したミューラー細胞のグリア-間葉転換がそこに関わることを我々の研究室は過去に報告している(Wu et al., 2020)。

一方で、過去に加瀬らは  $\alpha$ B-クリスタリンと呼ばれる分子が VEGF-A の分子シャペロンとして機能することで、RPE 細胞から分泌される VEGF-A に結合してその分解を抑制しており、酸素誘導網膜症モデルマウスにおいて  $\alpha$ B-クリスタリンをノックアウトすると網膜における VEGF-A 発現が低下し、網膜新生血管を抑制する作用があることを報告している(Kase et al., 2010)。 $\alpha$ B-クリスタリン(*CRYAB*)は当初水晶体に豊富に含まれる構成要素として発見されたが、後に small heat shock protein ファミリーの 1 つであることが明らかとなり、HspB5 という名前でも知られている。 $\alpha$ B-クリスタリンは分子シャペロンとして 70 種以上のタンパクと結合可能であり、VEGF-A のシャペロン機能の他に特徴的な作用として、炎症病態におけるアポトーシス抑制などが知られている(Rothbard et al., 2012 ; Losiewicz et al., 2011)。

また、PDR 患者由来の網膜上膜において CD31 陽性新生血管に VEGF-A と  $\alpha$ B-クリスタリンが共局在していることや、PDR 患者由来の線維血管膜において CD31 陽性新生血管に VEGF-A とセリン 59 残基がリン酸化された  $\alpha$ B-クリスタリン(Ser59 phosphorylated  $\alpha$ B-crystallin; pSer59- $\alpha$ BC)が共局在していることを我々の研究室において過去に示してきた(Dong et al., 2012 ; Dong et al., 2016)。加えて近年、PDR 患者の硝子体液において VEGF-A と相関して  $\alpha$ B-クリスタリンの濃度が上昇していると報告されており(Chen et al., 2017)、これらから PDR の線維血管膜形成において  $\alpha$ B-クリスタリンおよび pSer59- $\alpha$ BC が関与していることが示唆されるが、その詳細は未だ明らかでない。

以上を踏まえ、網膜ミューラー細胞において AGE や VEGF/炎症性サイトカインが作用することで PDR の病態形成に関与しており、そこに  $\alpha$ B-クリスタリンが何らかの影響を与えている可能性を考えた。そこで今回、PDR における硝子体液中の  $\alpha$ B-クリ

スタリンの由来と、網膜ミュラー細胞における  $\alpha$ B-クリスタリンの PDR への病態形成関与に特に着目して、研究を行なった。

## 方法

### 1. 臨床検体

PDR 患者の血清における  $\alpha$ B-クリスタリンと AGE の相関検討に関しては、北海道大学病院眼科にて硝子体手術が施行された 2 型糖尿病に起因した PDR 患者(7 例、男性 2 例、女性 5 例、平均年齢  $60.29 \pm 5.67$  歳)、およびその対照群として、黄斑前膜または黄斑円孔に対して硝子体手術を施行した患者(8 例、男性 5 例、女性 3 例、平均年齢  $72.13 \pm 3.19$  歳)において、術前に採取された血清を用いた。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自主臨床研究審査委員会に承認を受け(研究番号: 自 019-0186)、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準じた。

また、PDR 患者由来の線維血管膜における検討に関しては、北海道大学病院 生命・医学系研究倫理審査委員会に承認を受け(研究番号: 指 021-0180)、「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針」に準じた。

### 2. ELISA

$\alpha$ B-クリスタリン濃度、および血清中 AGE 濃度は、StressXpress® Alpha B Crystallin ELISA kit (StressMarq Biosciences, Victoria, Canada), AGE (advanced glycation end) assay kit (Abcam)の ELISA キットを使用し、マイクロプレートリーダー (Tecan)にて測定した。細胞培養上清での検討では、上清回収後、 $4^{\circ}\text{C}$ 、500g、5 分間遠心して用いた。なお AGE 濃度計測において、AGE 濃度は AGE-BSA( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )に換算されている。

### 3. 細胞培養と試薬

培養ヒト網膜ミューラー細胞(MIO-M1)は UCL Business LTD より Material Transfer Agreement を締結の上、購入した。細胞は 10%FBS を添加した D-MEM(高グルコース) (FUJIFILM Wako)で、 $37^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 濃度で培養した。低グルコース条件での培養では、10%FBS を添加した D-MEM(低グルコース) (FUJIFILM Wako)を用いて同様の環境で培養し、記載の濃度になるよう PBS にて希釈した D(+)-グルコース、D(-)-マンニトール(FUJIFILM Wako)を添加した。

細胞実験では recombinant human IL-1 $\beta$ , IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  (Peprotech, Cranbury, NJ, USA)を記載の濃度で用いた。中和実験では、goat anti-IL-1RI, normal goat IgG (R&D systems)を記載の濃度で用いた。ケミカルインヒビターによる阻害実験では、p38MAPK 阻害剤である SB203580 (Adipogen Life Sciences, San Diego, CA, USA)を記載の濃度で用いた。small interfering RNA (siRNA)導入による

*CRYAB* ノックダウンには、Opti-MEM® 培地(Thermo Fisher Scientific)において Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific)と最終濃度が 10nM となるように調整した Silencer® Select siRNA (Negative Control No.1 および *CRYAB* siRNA 2 種, Thermo Fisher Scientific)を混合して用いた。

#### 4. RT-qPCR

細胞からの全 RNA の分離と逆転写は TRI reagent® (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA)および GoScript reverse transcriptase (Promega)を用いて行なった。使用したプライマーは以下の通りである。

表 2-1 RT-qPCR に用いたプライマー配列

| Target gene        |         | Sequence                              |
|--------------------|---------|---------------------------------------|
| human <i>CRYAB</i> | forward | 5'- ACT TCC CTG AGT CCC TTC TAC C -3' |
|                    | reverse | 5'- GGA GAA GTG CTT CAC ATC CAG G -3' |
| human <i>ACTB</i>  | forward | 5'- CAC CAT TGG CAA TGA GCG GTT C -3' |
|                    | reverse | 5'- AGG TCT TTG CGG ATG TCC ACG T -3' |

qPCR は GoTaq® qPCR Master mix (Promega)と StepOne plus Systems (Thermo Fisher Scientific)を使用して行い、qPCR 条件は 95°C・2 分の後、95°C・15 秒、60°C・1 分を 40 サイクルとして、全てのデータで  $\beta$  アクチンを内在コントロールとした  $\Delta\Delta$  Ct 法にて算出した。

#### 5. ウェスタンブロッティング

細胞からのタンパク抽出は Laemmli SDS sample buffer を用い、細胞超音波処理・総タンパク定量・SDS-PAGE・メンブレンへの転写・ブロッキングは第 1 章の記載と同様に行なった。一次抗体反応は以下の抗体を用いて行なった: rabbit anti-phospho Ser59- $\alpha$ B crystallin antibody, mouse anti- $\alpha$ B crystallin antibody (Abcam), mouse anti-GAPDH antibody (MBL, Tokyo, Japan)。二次抗体には horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse, -rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories)を用い、SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent (Thermo Fisher Scientific)にて発光させ、iBright FL1000 (Thermo Fisher Scientific)で観察した。

## 6. 生細胞率の測定

MTS assay では CellTiter 96® Aqueous cell proliferation assay (Promega)、WST assay は Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan)をそれぞれ用い、吸光度はマイクロプレートリーダー(Tecan)にて測定している。

中和抗体を用いた実験では、96 ウェルマイクロプレートに MIO-M1 を  $1.5 \times 10^4$  cell/well ずつ播種し、翌日に 1%FBS 含有培地に培地交換、48 時間後に goat anti-IL-1RI, normal goat IgG (R&D systems)を最終濃度 10 $\mu$ g/ml となるよう添加し、30 分間ブレインキュベートの後に IL-1 $\beta$  を 10ng/ml となるよう添加の上、24 時間後に MTS assay および WST assay を行なった。

siRNA を用いた *CRYAB* ノックダウンによる実験では、96 ウェルマイクロプレートに MIO-M1 を  $1.5 \times 10^4$  cell/well ずつ播種した後、9 時間後に siRNA を導入し、翌日に 1%FBS 含有培地に培地交換、48 時間後に IL-1 $\beta$  を 10ng/ml となるよう添加の上、24 時間後に MTS assay を行なった。

## 7. カスパーゼ 3/7 活性の測定

カスパーゼ 3/7 活性の測定には、Caspase-Glo® 3/7 assay system (Promega)を用い、発光はマイクロプレートリーダー(Tecan)にて測定している。

96 Well White/Clear Bottom Plate に MIO-M1 を  $1.5 \times 10^4$  cell/well ずつ播種した後、9 時間後に siRNA を導入し、翌日に 1%FBS 含有培地に培地交換、48 時間後に IL-1 $\beta$  を 10ng/ml となるよう添加の上、24 時間後にカスパーゼ 3/7 活性を測定した。

## 8. TdT-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL)染色

Falcon® 4 ウェルカルチャースライド (Corning, Corning, NY, USA)に MIO-M1 を  $1.2 \times 10^5$  cell/well ずつ播種し、9 時間後に siRNA を導入し、翌日に 1%FBS 含有培地に培地交換、48 時間後に IL-1 $\beta$  を 10ng/ml となるよう添加の上、24 時間培養した。TUNEL 染色には ApopTag® fluorescein in situ apoptosis detection kit (Sigma-Aldrich)、核染色には DAPI(Lonza)を用いた。スライドの観察は蛍光顕微鏡 Keyence BZ-9000 series (Keyence)で行なった。TUNEL 陽性細胞率は、各ウェルで 2 枚ずつ画像を撮影し、ImageJ (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)を用いて DAPI 陽性核数は二値化による自動カウント、TUNEL 陽性細胞数は手動で測定し、そこから TUNEL 陽性細胞率を計算の上で、各ウェルの TUNEL 陽性細胞率の平均を用いた。

## 9. 免疫組織化学染色

4%パラホルムアルデヒドにて固定された組織をパラフィン包埋し、切片を作製した。キシレンおよびエタノールを用いて脱パラフィンの後、10mM クエン酸バッファー

(pH6.0)を用いて電子レンジで抗原賦活化を行なった。続いて、以下に述べる一次抗体を用いて 4°Cで一次抗体反応を行なった: rabbit anti-phospho Ser59- $\alpha$ B crystallin antibody, mouse anti- $\alpha$ B crystallin antibody (Abcam), rabbit anti-GFAP antibody (DAKO, Carpinteria, CA, USA), mouse anti-GFAP antibody (Thermo Fisher Scientific)。その後、AlexaFluor488 または 546 にて標識された二次抗体(Thermo Fisher Scientific)を用いて反応を行い、核染色には DAPI (Lonza)を用いた。切片の観察は蛍光顕微鏡 Keyence BZ-9000 series (Keyence)で行なった。

## 10. 統計解析

全ての結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。また、2 群間の比較には血清中の ELISA においては Mann-Whitney U test、性別の比較においては Fisher の正確確率検定、細胞実験においては Student's *t*-test を用いた。 $\alpha$ B-クリスタリン濃度と AGE 濃度の相関については、Spearman の順位相関係数を用いた。外れ値の検定には Smirnov-Grubbs test を用い、 $\alpha$ B-クリスタリン濃度と AGE 濃度の相関は外れ値の除外の後に検定した。多群間での比較には Tukey-Kramer 法を用いた。*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。

## 結果

### 1. PDR 患者血清における $\alpha$ B-クリスタリンと AGE の相関関係

PDR 患者の硝子体液において増加している  $\alpha$ B-クリスタリンの由来について調べるにあたり、PDR 患者の血中  $\alpha$ B-クリスタリン量が反映されている可能性を考慮し、糖尿病に由来しない黄斑前膜・黄斑円孔患者群(非糖尿病群)と PDR 患者群(PDR 群)で、血清における  $\alpha$ B-クリスタリンと AGE の相関について ELISA によって検討した。

非糖尿病群 8 名(平均年齢  $72.13 \pm 3.19$  歳)、PDR 群(平均年齢  $60.29 \pm 5.67$  歳)において年齢・性別・肝機能(aspartate aminotransferase; AST, alanine aminotransferase; ALT)・腎機能(estimated glomerular filtration rate; eGFR)の有意差は認めず、一方で随時血糖値に関しては有意に PDR 群において高値(非糖尿病群 =  $5.92 \pm 0.29$  mmol/L、PDR 群 =  $9.21 \pm 1.20$  mmol/L、 $P < 0.05$ )であった(表 2-2)。

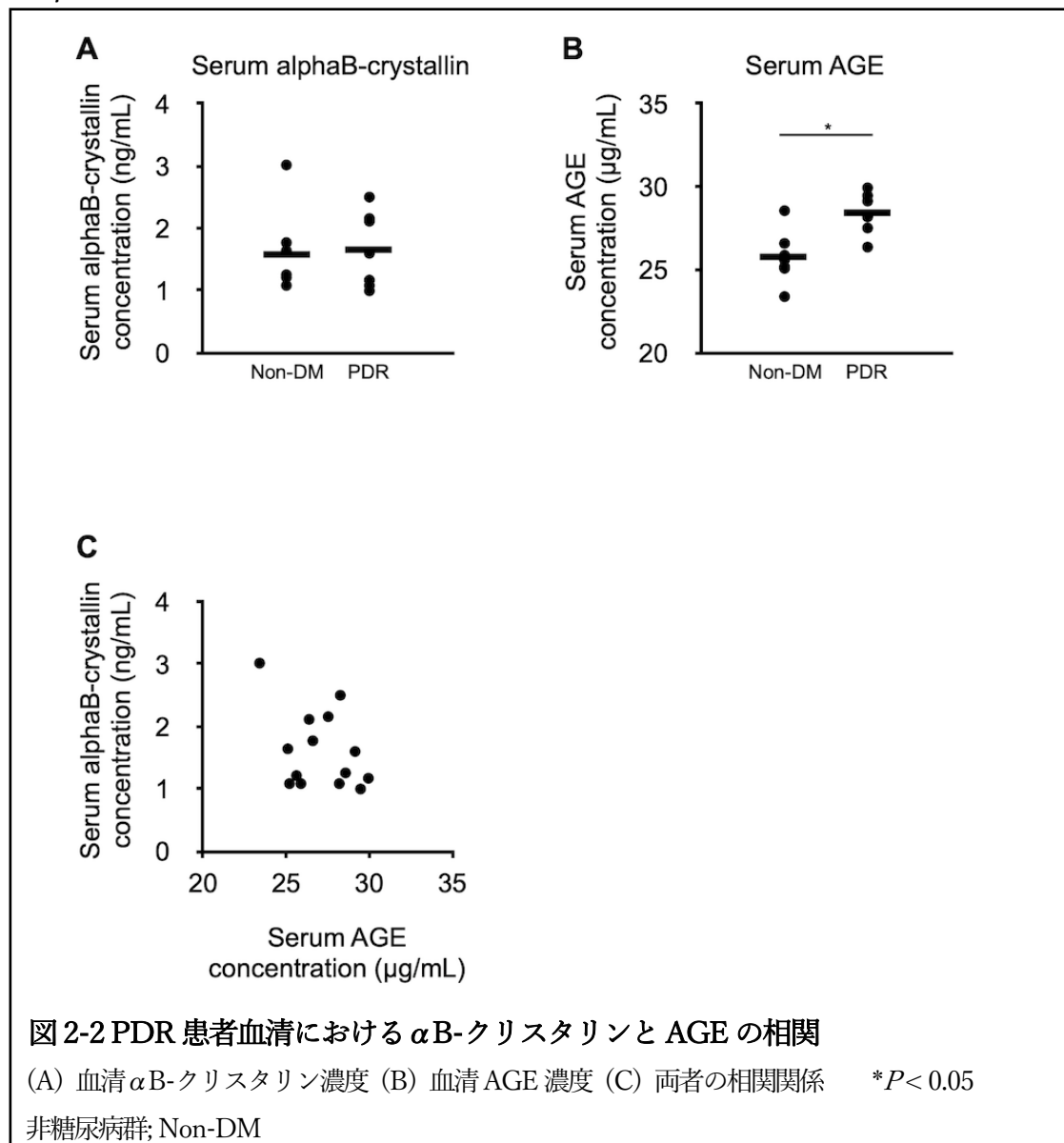
表 2-2 非糖尿病患者と PDR 患者の臨床像

|               | 非糖尿病             | PDR              | P 値                |
|---------------|------------------|------------------|--------------------|
| 患者数           | 8                | 7                |                    |
| 年齢(歳)         | $72.13 \pm 3.19$ | $60.29 \pm 5.67$ | 0.118              |
| 性別(%、男性の割合)   | 63               | 29               | 0.315 <sup>#</sup> |
| 随時血糖値(mmol/L) | $5.92 \pm 0.29$  | $9.21 \pm 1.20$  | 0.011*             |
| eGFR (ml/min) | $58.05 \pm 4.49$ | $61.80 \pm 9.13$ | 0.418              |
| AST (U/L)     | $20.50 \pm 0.96$ | $21.14 \pm 2.20$ | 0.861              |
| ALT (U/L)     | $22.25 \pm 3.86$ | $20.86 \pm 3.64$ | 0.728              |

平均 $\pm$ 標準誤差で示す。統計解析は Mann-Whitney U test もしくは<sup>#</sup> Fisher の正確確率検定を使用した。\* $P < 0.05$

血清の  $\alpha$ B-クリスタリン濃度に関して、測定後に非糖尿病群において平均値の 80 倍程度の異常高値を示した 1 例を認め( $123.9$  ng/ml)、この患者の背景について詳細を調べたところ関節性リウマチおよび間質性肺炎に対して 20 年以上にわたり経口ステロイド薬を継続投与されていることが判明した。この患者のデータは Smirnov - Grubbs test にて外れ値として判定され( $P < 0.01$ )、他患者は全員経口ステロイドによる治療を受けていないことを確認の上で、以降の全ての解析から除外された。結果として、同患者データを除いた血清  $\alpha$ B-クリスタリン濃度は、両群間で差を認めなかった(非糖尿病群  $1.58 \pm 0.26$  ng/ml, PDR 群  $1.66 \pm 0.23$  ng/ml,  $P = 0.949$ )。血清 AGE 濃度

は、PDR 群において非糖尿病群に比して有意に高値であった(非糖尿病群  $25.76 \pm 0.60 \mu\text{g/ml}$ , PDR 群  $28.41 \pm 0.46 \mu\text{g/ml}$ ,  $P=0.015$ )。血清  $\alpha$ B-クリスタリン濃度と血清 AGE 濃度の相関について、Spearman の順位相関係数にて有意な相関を認めなかった( $\rho = -0.276$ ,  $P=0.340$ ) (図 2-2)。

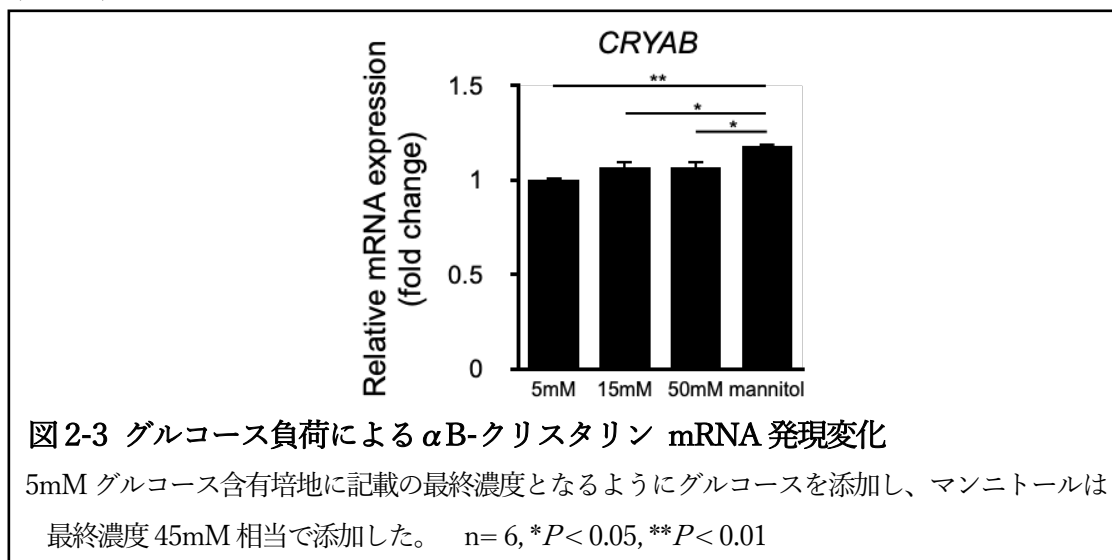


## 2. 網膜ミューラー細胞における炎症性サイトカイン添加に伴う $\alpha$ B-クリスタリンの細胞内外での発現変化

続いて網膜ミューラー細胞を介した  $\alpha$ B-クリスタリンの発現変化について検討するため、初めに培地中のグルコース濃度に応じた  $\alpha$ B-クリスタリンの発現変化について検討した。

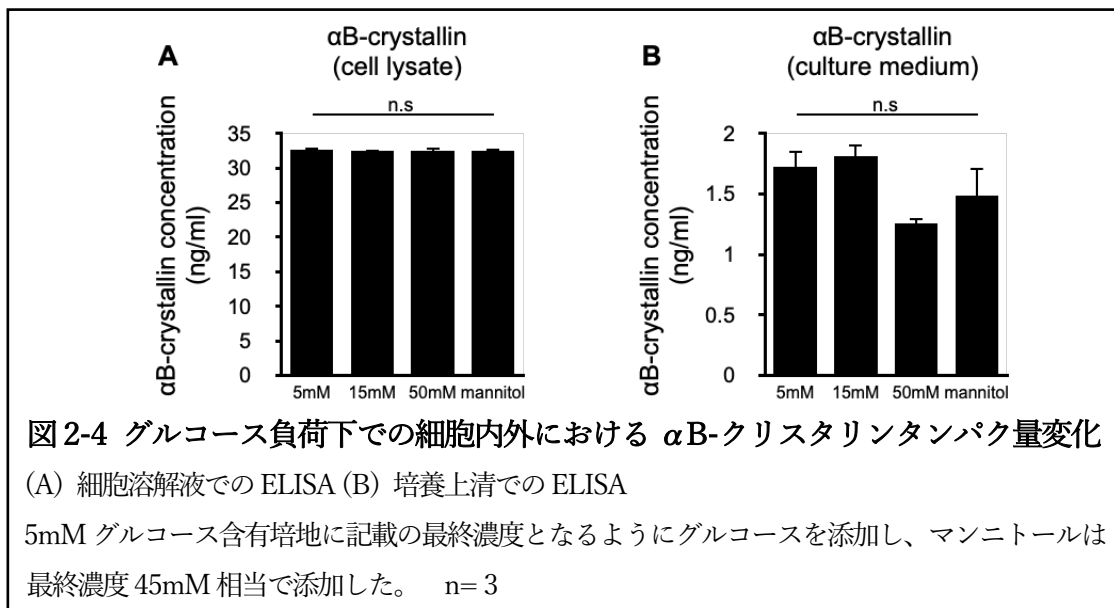
5mM グルコースを含有した低グルコース培地で網膜ミューラー細胞を培養し、そこに最終濃度が 15mM および 50mM となるように D(+)グルコースを添加の上で 24 時間培養し RT-qPCR を行なった。なお浸透圧による影響を考慮し、解糖系で利用されない糖類である D(-)マンニトールを最終濃度が 45mM となるよう添加して、添加した糖類による浸透圧が 50mM グルコース群と同様になるような群を作製した。

グルコース添加群ではマンニトール添加群に比して有意に  $\alpha$ B-クリスタリン mRNA の発現が少ないものの差はわずかであり、加えてグルコース添加群間では差が見られなかった(発現量比 5mM; 1.00, 15mM; 1.07, 50mM; 1.07, マンニトール; 1.18) (図 2-3)。



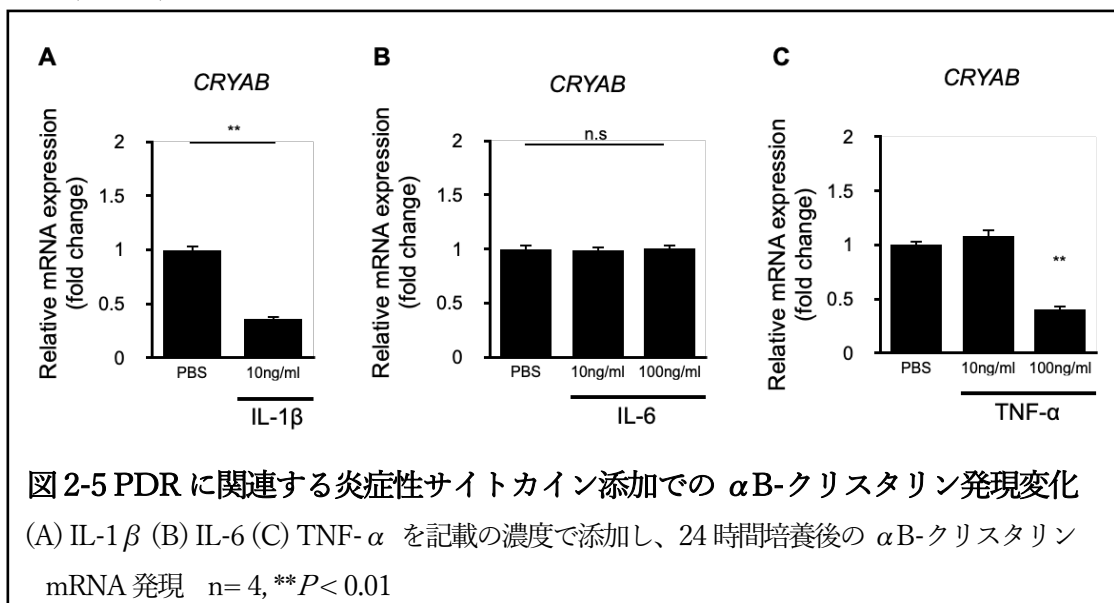
同様の条件にて、グルコース濃度に応じた  $\alpha$ B-クリスタリンタンパクの発現変化を細胞溶解液および培養上清にて計測した。

網膜ミューラー細胞を記載の濃度となるようにグルコースおよびマンニトール添加して 24 時間培養し、ELISA を行なったところ、細胞溶解液では全群間で有意差を認めず同程度の濃度であり、培養上清では有意差を認めないものの 50mM グルコース添加群において  $\alpha$ B-クリスタリンタンパクが減少する傾向が見られた(図 2-4)。



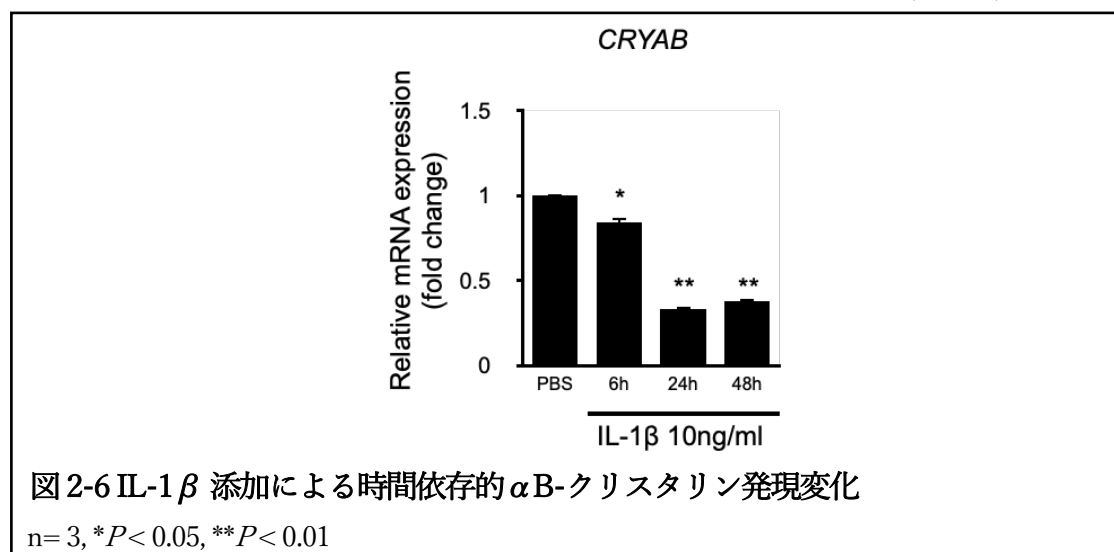
以上の通り、グルコース添加では mRNA, タンパクとも十分な変化が見られなかったため、PDR 病態における αB-クリスタリンの変化をより選択的に検証できる条件として、既報から PDR において眼内での上昇が示されている炎症性サイトカインに着目した(Stitt, 2010)。

PDR の硝子体において増加している代表的な炎症性サイトカインとして、IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  を添加して 24 時間培養し RT-qPCR を行なったところ、IL-1 $\beta$  10ng/ml および高濃度の TNF- $\alpha$  (100ng/ml)にて αB-クリスタリン mRNA の発現減少が示された(図 2-5)。



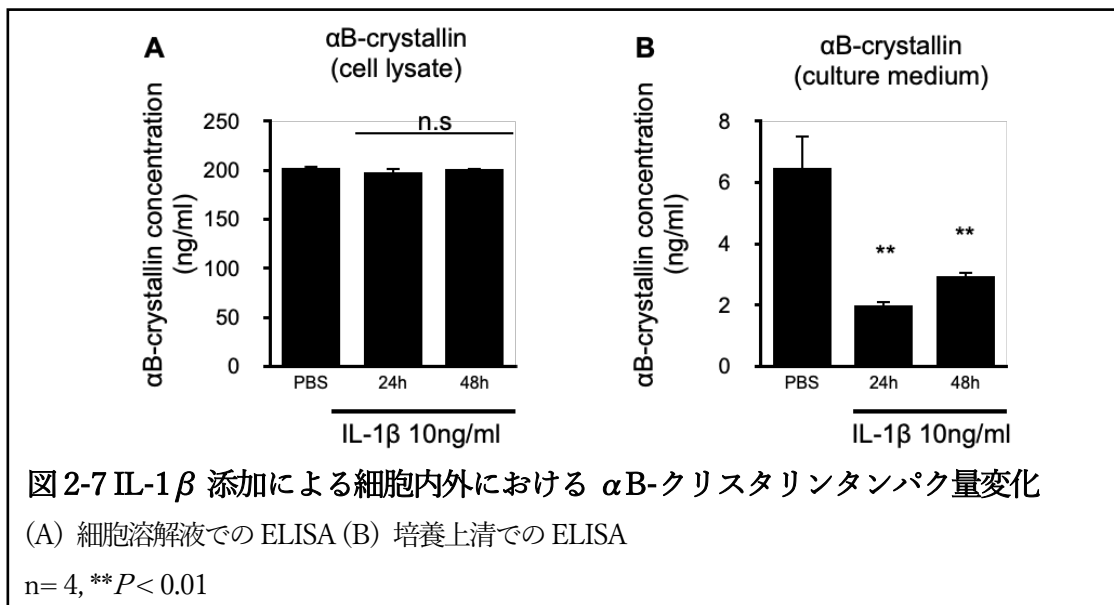
この結果に加え、後に述べる炎症性サイトカイン添加での  $\alpha$ B-クリスタリンのリン酸化、および前述した PDR 病態での網膜ミュラー細胞における当科からの既報を考慮し(Kanda et al., 2017)、IL-1 $\beta$  添加での  $\alpha$ B-クリスタリン発現について詳細を調べることにした。

網膜ミュラー細胞に IL-1 $\beta$  10ng/ml を添加し、様々な時間で培養して  $\alpha$ B-クリスタリン mRNA 発現を RT-qPCR にて測定したところ、IL-1 $\beta$  による  $\alpha$ B-クリスタリン mRNA 発現減少が時間依存的に生じることが明らかとなった (図 2-6)。

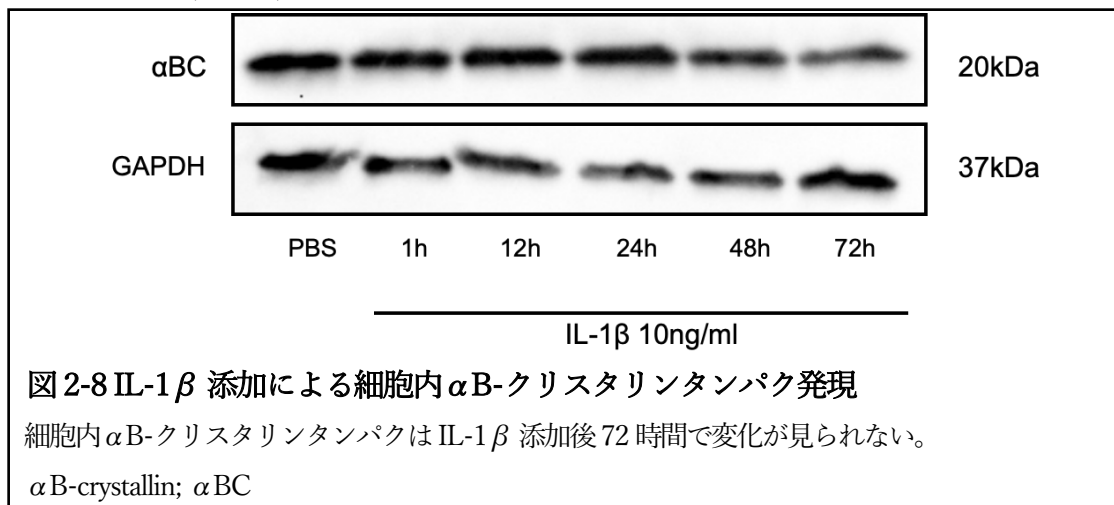


同様に、IL-1 $\beta$  添加による  $\alpha$ B-クリスタリンタンパクの発現変化を細胞溶解液および培養上清にて計測した。

網膜ミュラー細胞に IL-1 $\beta$  10ng/ml を添加し、様々な時間で培養して  $\alpha$ B-クリスタリンタンパク量を ELISA で測定したところ、細胞溶解液では全群間で有意差を認めず同程度の濃度である一方、培養上清では IL-1 $\beta$  添加にて有意な濃度減少を認めた (図 2-7)。



また、より長時間での細胞内 $\alpha$ B-クリスタリンタンパクの発現変化について、ウェスタンブロットで確認したところ、IL-1 $\beta$  10ng/ml 添加後 72 時間で明らかな変化を認めなかった(図 2-8)。



### 3. 網膜ミューラー細胞における炎症性サイトカインと $\alpha$ B-クリスタリンのセリン59残基のリン酸化

既報にて、 $\alpha$ B-クリスタリンはセリン59残基のリン酸化によってその細胞外への分泌が阻害されることが示されている(D'Agostino et al., 2019)。このことから、網膜ミューラー細胞にて確認された IL-1 $\beta$  添加下における細胞内外での  $\alpha$ B-クリスタリン量の挙動の違いについて、セリン59残基リン酸化が関与していると考えた。

まず初めに、上述の実験系で用いた炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  を添加して24時間培養しウエスタンブロットを行なったところ、IL-1 $\beta$  添加のみにて  $\alpha$ B-クリスタリンのセリン59残基のリン酸化亢進が示された(図2-9)。

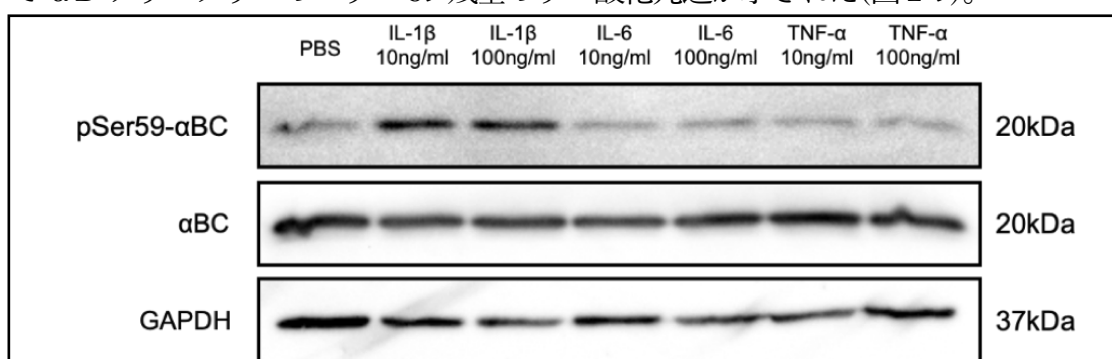


図2-9 PDRに関連する炎症性サイトカイン添加での  $\alpha$ B-クリスタリンリン酸化  
IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  を記載の濃度で添加し、24時間培養後の  $\alpha$ B-クリスタリンリン酸化  
Ser59 phosphorylated  $\alpha$ B-crystallin; pSer59- $\alpha$ BC,  $\alpha$ B-crystallin;  $\alpha$ BC

続いて網膜ミューラー細胞に IL-1 $\beta$  を様々な濃度で添加し、24時間培養の後にウエスタンブロットを行なったところ、IL-1 $\beta$  による  $\alpha$ B-クリスタリンのセリン59残基のリン酸化が濃度依存的に生じることが明らかとなった(図2-10)。

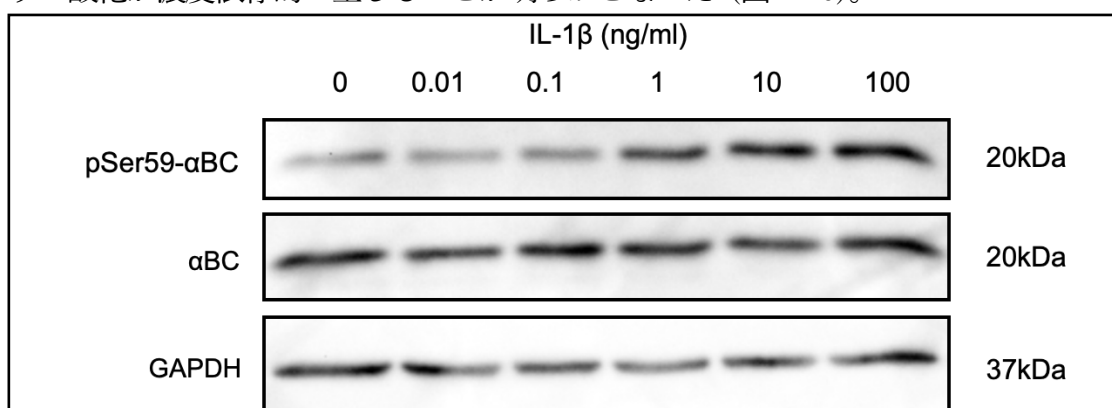
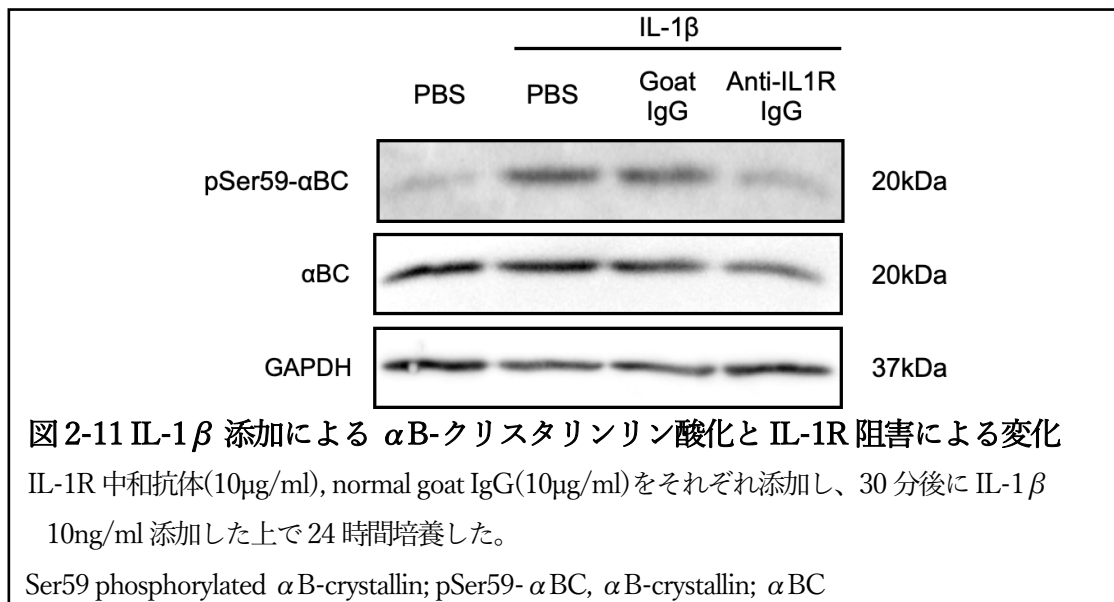


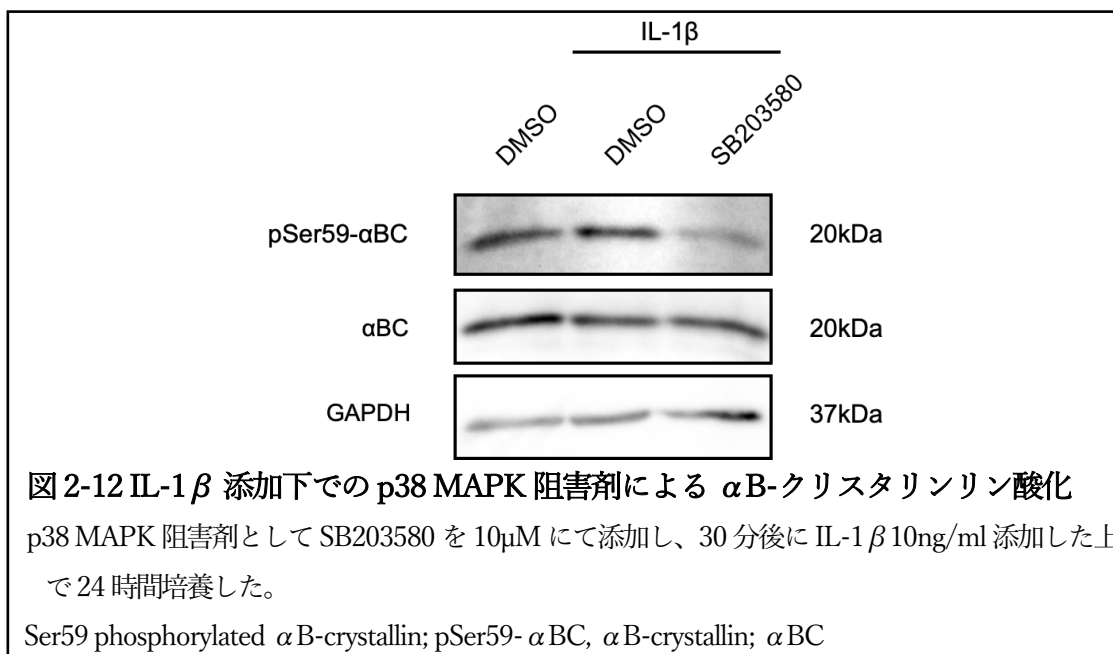
図2-10 IL-1 $\beta$  添加による濃度依存的な  $\alpha$ B-クリスタリンリン酸化  
IL-1 $\beta$  を記載の濃度で添加し、24時間培養後の  $\alpha$ B-クリスタリンリン酸化  
Ser59 phosphorylated  $\alpha$ B-crystallin; pSer59- $\alpha$ BC,  $\alpha$ B-crystallin;  $\alpha$ BC

次に、IL-1 受容体(IL-1 receptor; IL-1R)の特異的な中和抗体を用いて、これらの作用が IL-1R を介していることを確認した。

網膜ミューラー細胞に IL-1R の中和抗体を添加した後、IL-1 $\beta$  10ng/ml を添加して 24 時間培養の後にウエスタンブロットを行ない、IL-1 $\beta$  による  $\alpha$ B-クリスタリンのセリン 59 残基のリン酸化が IL-1R を介していることを示した (図 2-11)。

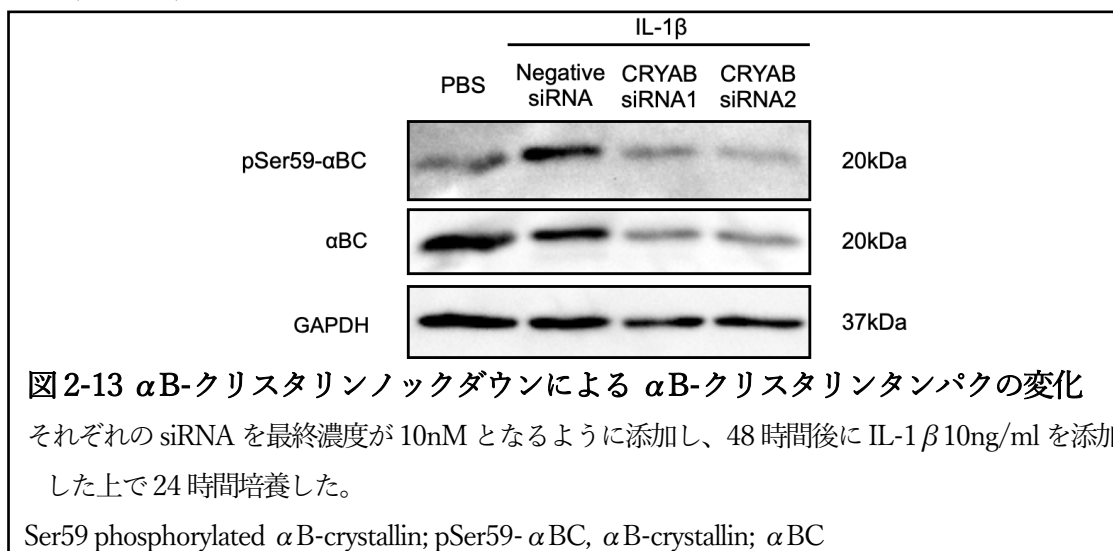


続いて IL-1 $\beta$  による  $\alpha$ B-クリスタリンのセリン 59 残基のリン酸化における細胞内シグナル分子について、p38 MAPK 阻害剤を用いて検討した。既報にてセリン 59 残基のリン酸化は p38 MAPK を介していることが明らかとなっている(Li et al., 2011)。DMSO の最終濃度が 0.1%以下となるように希釈の上で添加し、IL-1 $\beta$  10ng/ml 添加による  $\alpha$ B-クリスタリンのセリン 59 残基のリン酸化をウエスタンブロットにて調べたところ、p38 MAPK 阻害剤である SB203580 によってリン酸化が抑制されることが示された(図 2-12)。



最後に、*CRYAB* siRNA を用いた  $\alpha$ B-クリスタリンノックダウン実験の効果判定、および IL-1 $\beta$  添加下においてもノックダウンによって細胞内セリン 59 残基リン酸化  $\alpha$ B-クリスタリンが減少することを確認するため、ウエスタンブロットを行った。

網膜ミューラー細胞において、二種類の *CRYAB* siRNA を導入し、IL-1 $\beta$  10ng/ml を添加した上で 24 時間培養後にウエスタンブロットを行ったところ、 $\alpha$ B-クリスタリンおよびセリン 59 残基リン酸化  $\alpha$ B-クリスタリンの両方で発現減少することが示された(図 2-13)。



以上の結果から、IL-1 $\beta$  によって  $\alpha$ B-クリスタリンのセリン 59 残基のリン酸化が生じ、それは p38 MAPK を介していることが明らかとなった。

#### 4. 網膜ミュラー細胞への IL-1 $\beta$ 添加下での細胞機能における $\alpha$ B-クリスタリンの役割

ここまでの結果より、PDR 病態に関与する IL-1 $\beta$  が  $\alpha$ B-クリスタリンのセリン 59 残基のリン酸化を通して細胞外への分泌を抑制し、それによって新規合成が減少するにも関わらず細胞内  $\alpha$ B-クリスタリン濃度が維持されることが示唆された。

本項では、網膜ミュラー細胞における  $\alpha$ B-クリスタリンが PDR 病態に関係したどのような細胞機能に関与しているかを検討するため、生細胞率の変化およびアポトーシスへの関与について実験を行った。

まず、PDR での増殖膜形成において、 $\alpha$ B-クリスタリンが網膜ミュラー細胞の細胞増殖をもたらすという仮説を立て、IL-1 $\beta$  添加での生細胞率を MTS assay を用いて調べた。

網膜ミュラー細胞に IL-1 $\beta$  10ng/ml を添加し、24 時間後に MTS assay を用いて生細胞に由来するホルマザン量を吸光度計で計測したところ、IL-1 $\beta$  添加にて有意な生細胞率増加を認めた (図 2-14)。

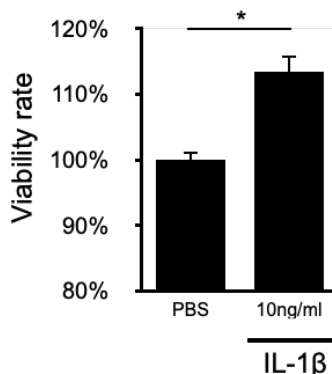
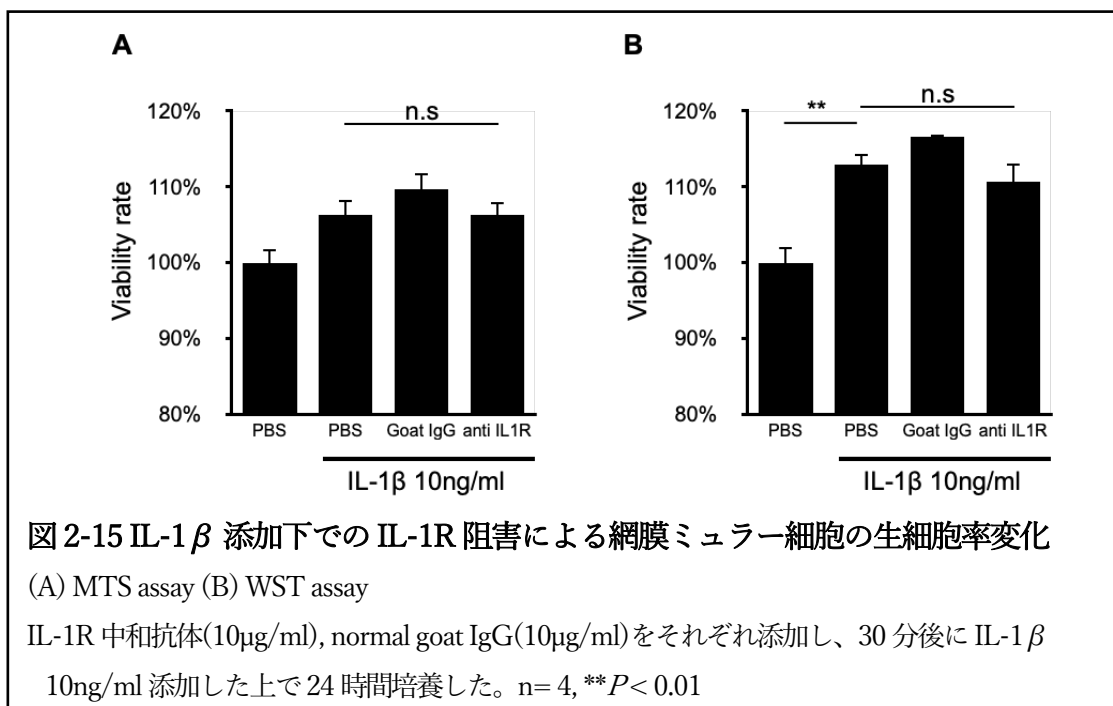


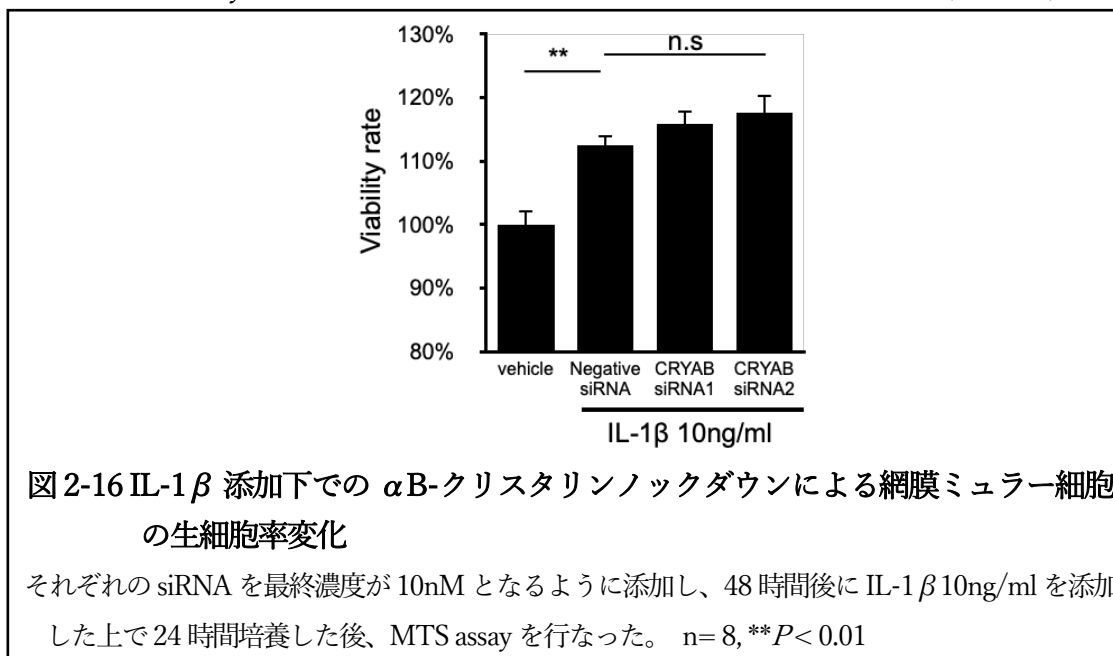
図 2-14 IL-1 $\beta$  添加下での網膜ミュラー細胞の生細胞率変化

IL-1 $\beta$  を記載の濃度で添加し、24 時間培養した後、MTS assay を行なった。n = 5, \* $P$  < 0.05

次に、この生細胞率増加が IL-1R を介していることを調べるために、IL-1R の中和抗体を添加した後に IL-1 $\beta$  10ng/ml を加え、24 時間後に MTS assay および WST assay を用いて生細胞率で計測したが、IL-1R 阻害による生細胞率の変化は認めなかった (図 2-15)。



また、IL-1 $\beta$  による生細胞率の変化について、前項の *CRYAB* siRNA を用いたウェスタンブロットにて使った手法と同様の条件で  $\alpha$ B-クリスタリンをノックダウンした後に MTS assay を行い確認したが、生細胞率の変化は認めなかった (図 2-16)。



以上より、生細胞率に関して網膜ミュラー細胞における  $\alpha$ B-クリスタリンの作用が明らかでなかったため、引き続き  $\alpha$ B-クリスタリンのアポトーシス抑制作用について検討した。

既報にて、ラット神経細胞において無血清培地での  $\alpha$ B-クリスタリン short hairpin RNA を用いたノックダウンをすることでアポトーシスが促進されることが報告されており (Losiewicz et al., 2011)、これを参考に *CRYAB* siRNA 導入後に 1%FBS 含有培地にて血清飢餓状態とし、IL-1 $\beta$  を添加の上で  $\alpha$ B-クリスタリンによるアポトーシス抑制作用を検討した。

網膜ミュラー細胞において *CRYAB* siRNA を導入した後、翌日に 1%FBS 含有培地へと交換の上で 48 時間後に IL-1 $\beta$  10ng/ml を添加し、さらに 24 時間培養の後にカスパーゼ 3/7 活性を測定したところ、ノックダウン作用を持たない siRNA においてはコントロール群に比してカスパーゼ 3/7 活性が低下しており、 $\alpha$ B-クリスタリンノックダウン群ではそのカスパーゼ 3/7 活性低下が減弱していた(図 2-17)。

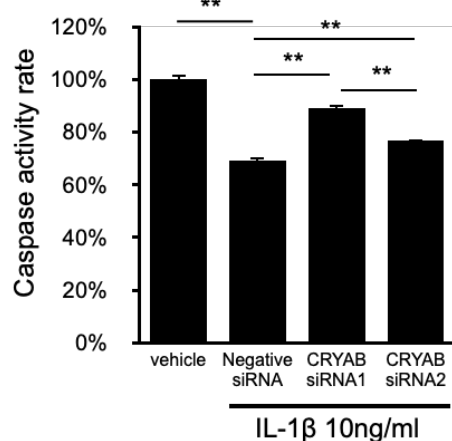


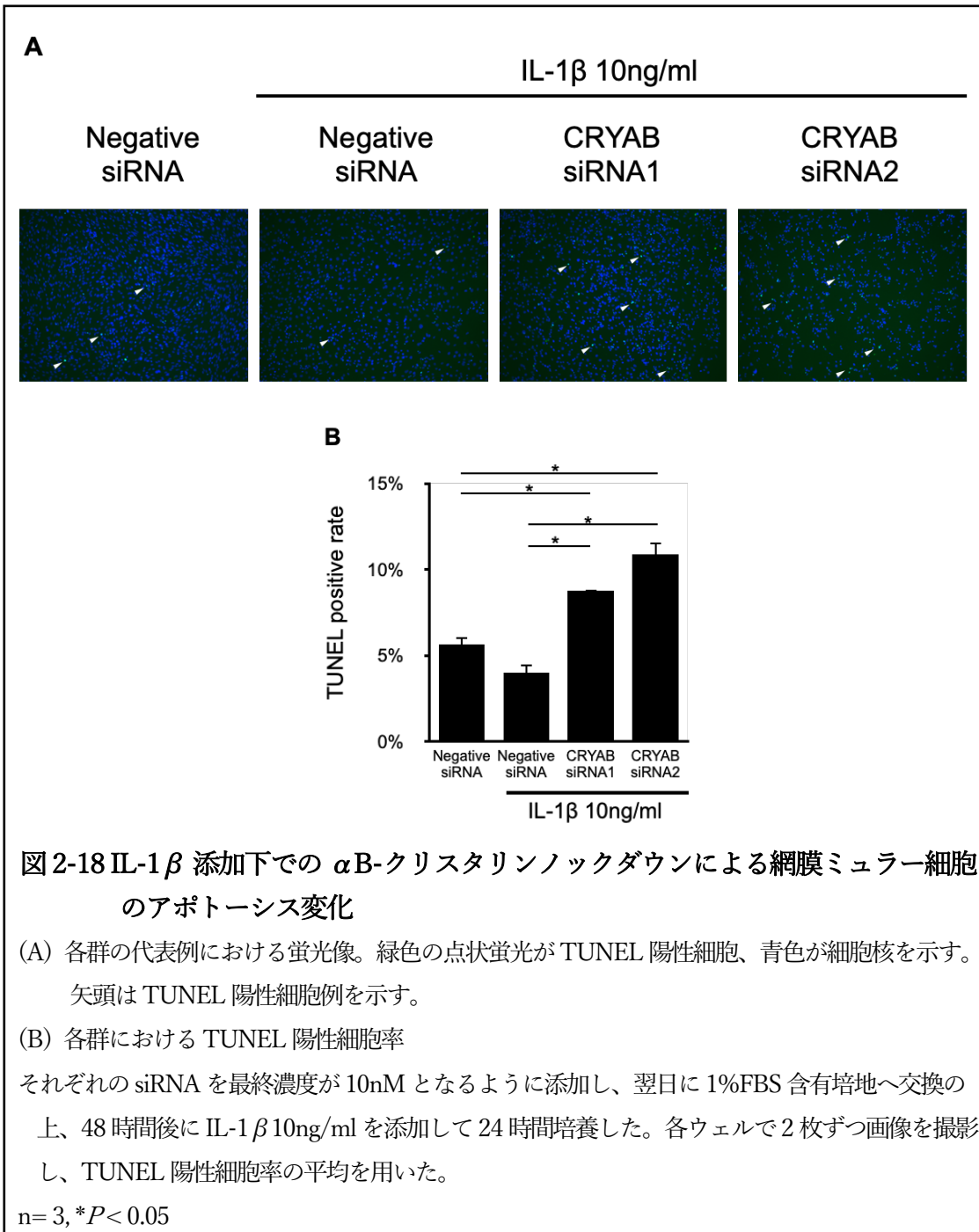
図 2-17 IL-1 $\beta$  添加下での  $\alpha$ B-クリスタリンノックダウンによる網膜ミュラー細胞のアポトーシス関連分子(Caspase3/7)変化

それぞれの siRNA を最終濃度が 10nM となるように添加し、翌日に 1%FBS 含有培地へ培地交換、48 時間後に IL-1 $\beta$  10ng/ml を添加して 24 時間培養した後、カスパーゼ 3/7 活性を測定した。 n= 4, \*\* $P$ < 0.01

続いて、 $\alpha$ B-クリスタリンによるアポトーシス抑制作用について TUNEL 染色を行い検討した。

4 ウェルチャンバースライドにて網膜ミュラー細胞を培養し、*CRYAB* siRNA を導入した後、翌日に 1%FBS 含有培地へと交換の上で 48 時間後に IL-1 $\beta$  10ng/ml を添加し、さらに 24 時間培養の後に TUNEL 染色を行った。なお、陽性細胞率は各ウェルにおいて独立した 2 箇所計測し、それを平均したものをを用いた。

コントロール群およびノックダウン作用を持たない siRNA 群に比して、 $\alpha$ B-クリスタリンノックダウン群では TUNEL 陽性細胞率の増加が認められた(図 2-18)。

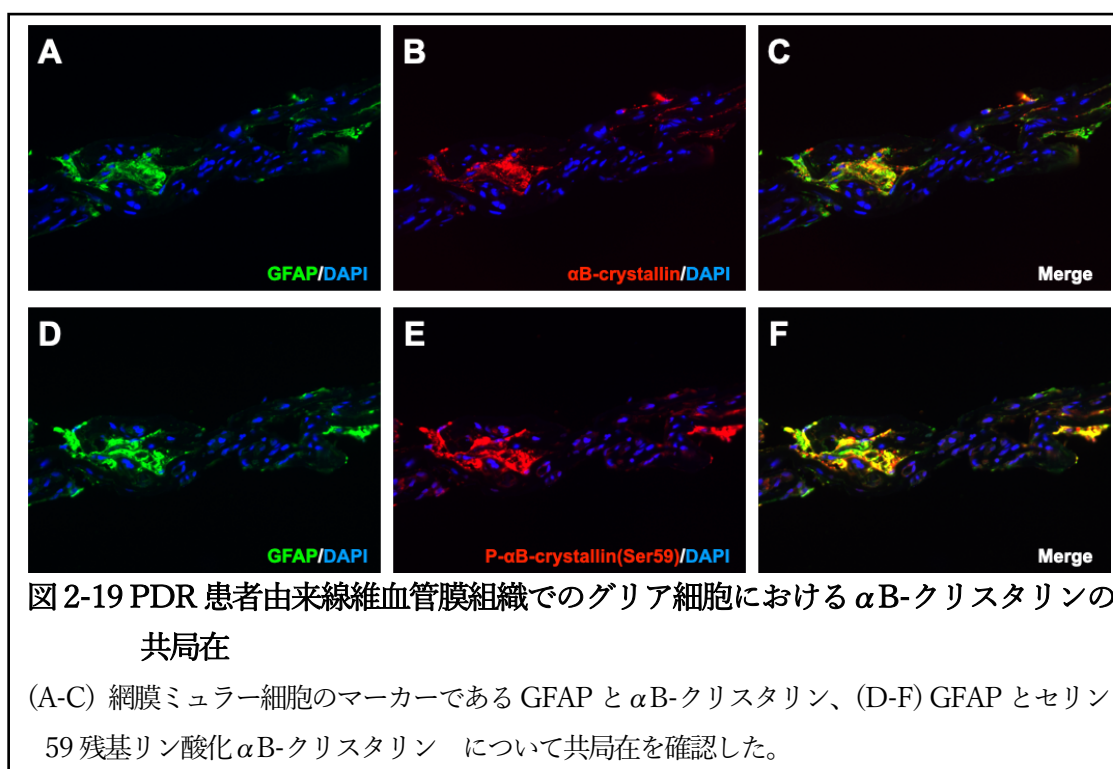


以上の結果から、網膜ミューラー細胞において  $\alpha$ B-クリスタリンはアポトーシス抑制作用を有し、 $\alpha$ B-クリスタリンをノックダウンすることによってカスパーゼ 3/7 を介するアポトーシスが促進されていると考えられた。

## 5. PDR 患者由来の線維血管膜組織における免疫染色

PDR 患者の線維血管膜組織検体切片を用いて、ヒト生体由来の PDR 組織検体において網膜ミュラー細胞に  $\alpha$ B-クリスタリンが局在しているかを、蛍光免疫組織化学染色による二重染色で調べた。

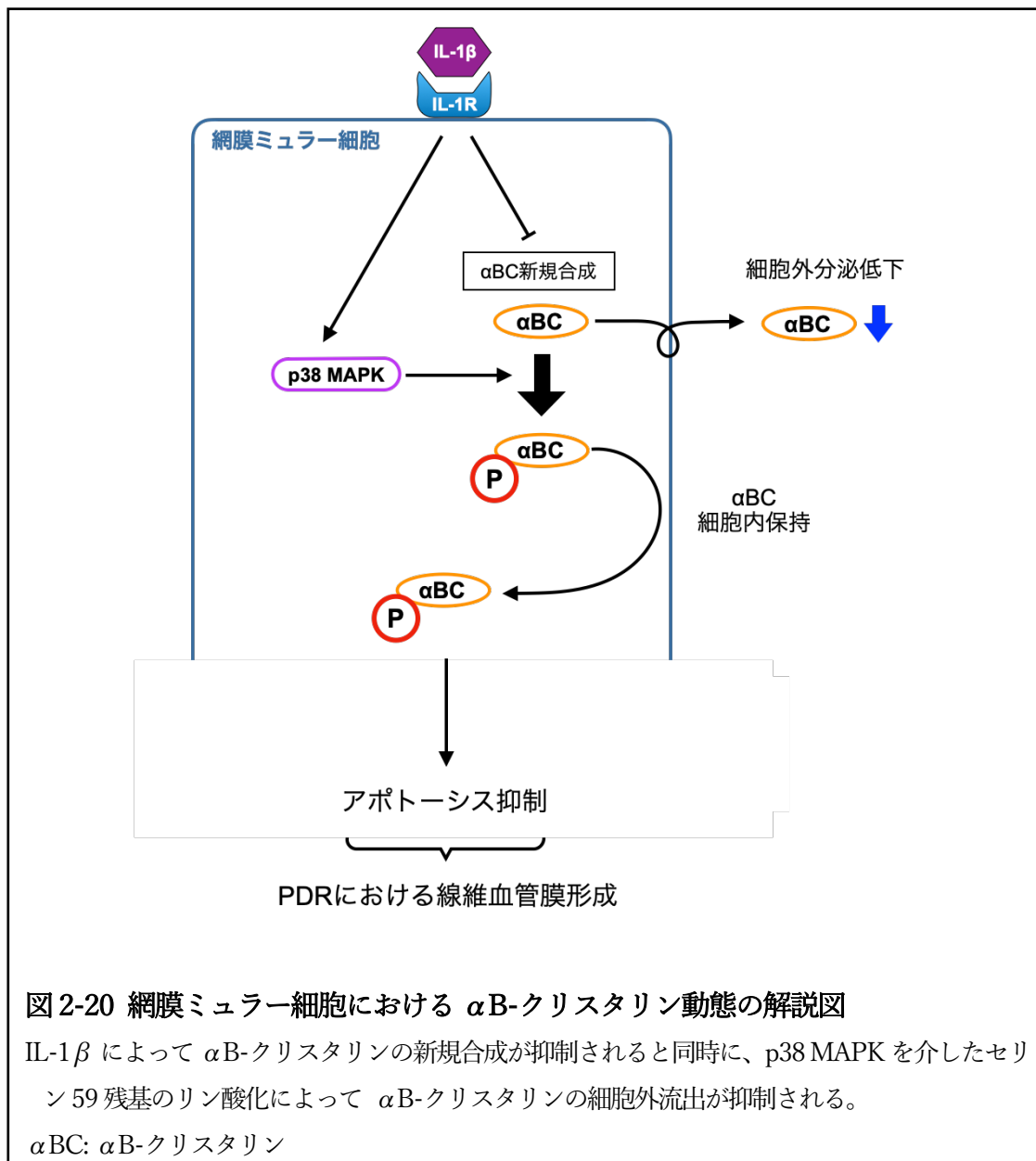
Glial fibrillary acidic protein(GFAP)は中間径フィラメントタンパク質の 1 つであり、グリア細胞マーカーとして用いられるが、PDR を含む病的状態での網膜ミュラー細胞で発現していることが知られている(Eastlake et al., 2018)。PDR 患者由来の線維血管膜組織において、網膜ミュラー細胞のマーカーの一つである GFAP と  $\alpha$ B-クリスタリンおよびがセリン 59 残基リン酸化  $\alpha$ B-クリスタリンが共局在していることを示した(図 2-19)。



以上から、前項までで示した網膜ミュラー細胞における  $\alpha$ B-クリスタリンの発現変化・機能が、実際の PDR 患者の眼内においても生じていることが示唆された。

## 考察

PDR の病態解釈では、虚血を背景とした VEGF 増加による血管新生疾患という側面の他に、サイトカインなどによる炎症病態という観点も重要であり、これら 2 つは相互に作用している。本研究では網膜ミューラー細胞において、当初 VEGF との関連から PDR に関与すると考えていた  $\alpha$ B-クリスタリンが、IL-1 $\beta$  の仲介による炎症病態とも大きく関係しているということが明らかとなった(図 2-20)。



当初は既報にて報告されている PDR 患者での硝子体中で増加している  $\alpha$ B-クリスタリン(Chen et al., 2017)の由来を示すことを目標としていたが、今回の検討では硝子

体液中の  $\alpha$ B-クリスタリンの由来について迫ることはできなかった。 $\alpha$ B-クリスタリンと AGE の血清中濃度の検討においては、PDR 患者の血清において既報に一致して AGE は上昇しているものの(Boehm et al., 2004)、 $\alpha$ B-クリスタリン濃度に有意な変化は見られていない。PDR を含む糖尿病網膜症患者においては RPE における血液網膜関門が破綻しており、加えて AGE 自体もまた AGE 受容体に結合することで血管透過性を亢進させることが知られている(Moore et al., 2003)。これらから、PDR 患者の硝子体液中の  $\alpha$ B-クリスタリン増加が血液での高値を反映している可能性を考慮したが、今回血清での  $\alpha$ B-クリスタリン濃度上昇は認めず、PDR 患者の硝子体中の  $\alpha$ B-クリスタリン増加は他の眼内組織に由来する可能性、もしくは血中に由来している場合には血管からの選択的な漏出の可能性が考えられる。我々は既報にて、RPE 細胞にグルコース添加および AGE 添加を行うと  $\alpha$ B-クリスタリン mRNA 発現が減少していることを示しており(Wu et al., 2022)、今回網膜ミュラー細胞においてもグルコース添加にて  $\alpha$ B-クリスタリンの発現減少傾向が認められたことから、硝子体中  $\alpha$ B-クリスタリン濃度上昇をもたらす他の眼内組織としては、新生血管に関与する血管内皮細胞などが候補に挙がるだろう。

一方で網膜ミュラー細胞における IL-1 $\beta$  による  $\alpha$ B-クリスタリンの細胞内保持という新しい知見が得られ、これが線維血管膜の形成に寄与している可能性が示された。 $\alpha$ B-クリスタリンは細胞内において通常は細胞質に局在しているが、エクソソームを介して分泌されることが知られており(Kannan et al., 2016)、この機構は  $\alpha$ B-クリスタリンのセリン 59 残基のリン酸化によって抑制される(D'Agostino et al., 2019)。当研究室では過去に PDR 患者由来の線維血管膜の CD31 陽性新生血管でのセリン 59 残基リン酸化  $\alpha$ B-クリスタリンの局在を示しており(Dong et al., 2016)、今回 PDR 患者由来の線維血管膜における GFAP 陽性網膜ミュラー細胞での局在も示せたことから、PDR における線維血管膜においてセリン 59 残基リン酸化  $\alpha$ B-クリスタリンが広く分布していることが明らかとなった。 $\alpha$ B-クリスタリンのセリン 59 残基リン酸化は脳における炎症病態において、脳内グリア細胞であるアストロサイトのグリア増生を促進する作用が知られており(Kuipers et al., 2017)、本研究で得られた網膜ミュラー細胞でのセリン 59 残基リン酸化による  $\alpha$ B-クリスタリンの細胞内保持とアポトーシス抑制もまたグリア増生、そしてそれに伴う線維血管膜形成に寄与することが示唆される。加えて網膜ミュラー細胞は PDR においてグリア-間葉転換を介して線維血管膜形成に関与することが知られており(Wu et al., 2020)、今回示した  $\alpha$ B-クリスタリンのセリン 59 残基リン酸化と引き続く細胞内保持が、グリア-間葉転換に関与している可能性も考えられる。

今後の課題として、細胞外  $\alpha$ B-クリスタリン減少による網膜脆弱性が初期の段階から糖尿病網膜症へ関与している可能性を検討したい。近年網膜ミュラー細胞から分泌

される $\alpha$ B-クリスタリンが神経網膜において神経保護作用を持つことが緑内障モデルマウスによって示されており(Liu et al., 2022)、また糖尿病網膜症では早期の段階から神経網膜における伝達が障害されることが、網膜電図での律動様小波減弱から示されている(Tzekov et al., 1999)。この病態において本研究で示した細胞外 $\alpha$ B-クリスタリン減少の関与を調べることは、糖尿病網膜症における $\alpha$ B-クリスタリンの役割のさらに深い理解へつながるだろう。また、今回は $\alpha$ B-クリスタリンの量的な側面で検討を行なったが、リン酸化によって $\alpha$ B-クリスタリンの結合タンパクが変化することが知られており(Kuipers et al., 2017)、今後はリン酸化による質的な変化の検討も行いたいと考えている。

## 結論および総括

本研究では以下の新知見が得られた。

### 第1章: 網膜色素上皮細胞における低酸素条件下でのガレクチン-1 発現解析

- 1) RPE 細胞において、低酸素条件下における *LGALS1* プロモーター領域内 HRE への HIF-1 $\alpha$  結合増加によって、RPE 細胞におけるガレクチン-1 発現が上昇する。
- 2) RPE 細胞において、アフリベルセプトが低酸素条件下におけるガレクチン-1 発現上昇を抑制し、その作用は VEGFR-2 阻害ではなく VEGFR-1 阻害作用によるものである。
- 3) 低酸素条件下において発現上昇した PlGF によって、VEGFR-1 リン酸化を介して RPE 細胞におけるガレクチン-1 発現上昇が誘導される。
- 4) RPE 細胞での PlGF 添加によるガレクチン-1 発現誘導において、VEGFR-1 活性化による PI3K および p38 MAPK を経由した転写因子 AP-1 の作用が重要である。
- 5) RPE 細胞には PlGF による PlGF の発現誘導機構、すなわち PlGF の自己発現誘導が存在し、それが VEGFR-1 活性化による PI3K, ERK1/2, p38 MAPK のリン酸化を介した作用である。
- 6) RPE 細胞における HIF-1 $\alpha$  や PlGF を介したガレクチン-1 発現制御機構が、実際の滲出型加齢黄斑変性患者の網膜においても生じていることが示唆される。

### 第2章: 増殖糖尿病網膜症における $\alpha$ B-クリスタリンの発現解析

- 7) PDR 患者の血清中において、 $\alpha$ B-クリスタリン濃度の上昇は見られない。
- 8) 網膜ミュラー細胞において、IL-1 $\beta$  は  $\alpha$ B-クリスタリンの mRNA 発現を抑制すると同時に、 $\alpha$ B-クリスタリン Ser59 残基のリン酸化を促進する。
- 9) 網膜ミュラー細胞において、 $\alpha$ B-クリスタリンはアポトーシス抑制作用を持つ。
- 10) PDR 患者由来の線維血管膜において、グリア細胞に局在する  $\alpha$ B-クリスタリンが認められる。

本研究から、眼内血管新生性疾患である加齢黄斑変性および糖尿病網膜症の2疾患について、ガレクチン-1 および  $\alpha$ B-クリスタリンという2つの分子が VEGF ファミリー分子や炎症性サイトカインと相互作用しつつ病態形成に携わることがわかった。

今後の課題として、本研究にて得られたガレクチン-1 および  $\alpha$ B-クリスタリンによる病態への関与を適した動物モデルでの研究やより詳細な病態機序解明を通じて検討し、これら候補分子を介した眼内血管新生性疾患の新規治療法の開発を目指したいと

考えている。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂き、ご指導とご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 石田晋教授に厚く御礼申し上げます。また、本研究にあたって直接ご指導を賜りました同教室 加瀬諭講師、神田敦宏前特任講師（現 千寿製薬株式会社 研究開発本部 総合研究所 薬理グループ グループマネージャー）に厚く御礼申し上げます。研究にあたり多くのご助言を頂きました野田航介准教授、村田美幸特任助教に厚く御礼申し上げます。さらに研究を遂行するにあたり、環境を整えてくださった廣瀬育代技術補助員、吉田志帆技術補助員に厚く御礼申し上げます。最後に、公私ともにサポートして下さいました医局員・医局秘書・大学院の諸先輩方ならびに大学院の仲間達に心からの感謝を申し上げます。

## 利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

## 引用文献

Alm, A., and Bill, A. (1973). Ocular and optic nerve blood flow at normal and increased intraocular pressures in monkeys (*Macaca irus*): a study with radioactively labelled microspheres including flow determinations in brain and some other tissues. *Exp. Eye Res.* *15*, 15-29.

Ando, R., Noda, K., Namba, S., Saito, W., Kanda, A., and Ishida, S. (2014). Aqueous humour levels of placental growth factor in diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol.* *92*, e245-246.

Apte, R.S. (2021). Age-Related Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* *385*, 539-547.

Arjamaa, O., Aaltonen, V., Piippo, N., Csont, T., Petrovski, G., Kaarniranta, K., and Kauppinen, A. (2017). Hypoxia and inflammation in the release of VEGF and interleukins from human retinal pigment epithelial cells. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* *255*, 1757-1762.

Boehm, B.O., Schilling, S., Rosinger, S., Lang, G.E., Lang, G.K., Kientsch-Engel, R., and Stahl, P. (2004). Elevated serum levels of N(epsilon)-carboxymethyl-lysine, an advanced glycation end product, are associated with proliferative diabetic retinopathy and macular oedema. *Diabetologia* *47*, 1376-1379.

Camby, I., Le Mercier, M., Lefranc, F., and Kiss, R. (2006). Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology* *16*, 137R-157R.

Chaudhuri, J., Bains, Y., Guha, S., Kahn, A., Hall, D., Bose, N., Gugliucci, A., and Kapahi, P. (2018). The Role of Advanced Glycation End Products in Aging and Metabolic Diseases: Bridging Association and Causality. *Cell Metab.* *28*, 337-352.

Chen, W., Lu, Q., Lu, L., and Guan, H. (2017). Increased levels of alphaB-crystallin in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy and correlation with vascular endothelial growth factor. *Clin. Exp. Ophthalmol.* *45*, 379-384.

D'Agostino, M., Scerra, G., Cannata Serio, M., Caporaso, M.G., Bonatti, S., and Renna, M. (2019). Unconventional secretion of alpha-Crystallin B requires the Autophagic pathway and is controlled by phosphorylation of its serine 59 residue. *Sci. Rep.* *9*, 16892.

Dewerchin, M., and Carmeliet, P. (2012). PlGF: a multitasking cytokine with disease-restricted activity. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *2*.

Dong, Y., Dong, Z., Kase, S., Ando, R., Fukuhara, J., Kinoshita, S., Inafuku, S., Tagawa, Y., Ishizuka, E.T., Saito, W., et al. (2016). Phosphorylation of alphaB-crystallin in epiretinal membrane of human proliferative diabetic retinopathy. *Int. J. Ophthalmol.* *9*, 1100-1105.

Dong, Z., Kase, S., Ando, R., Fukuhara, J., Saito, W., Kanda, A., Murata, M., Noda, K., and Ishida, S. (2012). AlphaB-crystallin expression in epiretinal membrane of human proliferative diabetic retinopathy. *Retina* *32*, 1190-1196.

Eastlake, K., Heywood, W.E., Banerjee, P., Bliss, E., Mills, K., Khaw, P.T., Charteris, D., and Limb, G.A. (2018). Comparative proteomic analysis of normal and gliotic PVR retina and contribution of Muller glia to this profile. *Exp. Eye Res.* *177*, 197-207.

Eastlake, K., Luis, J., and Limb, G.A. (2020). Potential of Muller Glia for Retina Neuroprotection. *Curr. Eye Res.* *45*, 339-348.

Eferl, R., and Wagner, E.F. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 859-868.

Flaxman, S.R., Bourne, R.R.A., Resnikoff, S., Ackland, P., Braithwaite, T., Cicinelli, M.V., Das, A., Jonas, J.B., Keeffe, J., Kempen, J.H., et al. (2017). Global causes of blindness and distance vision impairment 1990-2020: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob. Health* *5*, e1221-e1234.

Gerber, H.P., Malik, A.K., Solar, G.P., Sherman, D., Liang, X.H., Meng, G., Hong, K., Marsters, J.C., and Ferrara, N. (2002). VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature* *417*, 954-958.

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.

Hollborn, M., Reichmuth, K., Prager, P., Wiedemann, P., Bringmann, A., and Kohen, L. (2016). Osmotic induction of placental growth factor in retinal pigment epithelial cells in vitro: contribution of NFAT5 activity. *Mol. Biol. Rep.* *43*, 803-814.

Ikai, T., Miwa, H., Shikami, M., Hiramatsu, A., Tajima, E., Yamamoto, H., Imai, N., Hattori, A., Nishii, K., Miura, K., et al. (2005). Placenta growth factor stimulates the growth of Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia cells by both autocrine and paracrine pathways. *Eur. J. Haematol.* *75*, 273-279.

Inoue, Y., Yanagi, Y., Matsuura, K., Takahashi, H., Tamaki, Y., and Araie, M. (2007). Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha and 2alpha in choroidal neovascular membranes associated with age-related macular degeneration. *Br. J. Ophthalmol.* *91*, 1720-1721.

Jampol, L.M., Glassman, A.R., and Sun, J. (2020). Evaluation and Care of Patients with Diabetic Retinopathy. *N. Engl. J. Med.* *382*, 1629-1637.

Jensen, E.G., Jakobsen, T.S., Thiel, S., Askou, A.L., and Corydon, T.J. (2020). Associations between the Complement System and Choroidal Neovascularization in Wet Age-Related Macular Degeneration. *Int. J. Mol. Sci.* *21*.

Juszczynski, P., Ouyang, J., Monti, S., Rodig, S.J., Takeyama, K., Abramson, J., Chen, W., Kutok, J.L., Rabinovich, G.A., and Shipp, M.A. (2007). The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *104*, 13134-13139.

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

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.

Kannan, R., Sreekumar, P.G., and Hinton, D.R. (2016). Alpha crystallins in the retinal pigment epithelium and implications for the pathogenesis and treatment of age-related macular degeneration. *Biochim. Biophys. Acta* *1860*, 258-268.

Kase, S., He, S., Sonoda, S., Kitamura, M., Spee, C., Wawrousek, E., Ryan, S.J., Kannan, R., and Hinton, D.R. (2010). alphaB-crystallin regulation of angiogenesis by modulation of VEGF. *Blood* *115*, 3398-3406.

Kawasaki, R., Tanaka, S., Tanaka, S., Yamamoto, T., Sone, H., Ohashi, Y., Akanuma, Y., Yamada, N., Yamashita, H., and Japan Diabetes Complications Study, G. (2011). Incidence and progression of diabetic retinopathy in Japanese adults with type 2 diabetes: 8 year follow-up study of the Japan Diabetes Complications Study (JDCS). *Diabetologia* *54*, 2288-2294.

Krock, B.L., Skuli, N., and Simon, M.C. (2011). Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes Cancer* *2*, 1117-1133.

Kuipers, H.F., Yoon, J., van Horssen, J., Han, M.H., Bollyky, P.L., Palmer, T.D., and Steinman, L. (2017). Phosphorylation of alphaB-crystallin supports reactive astrogliosis in demyelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *114*, E1745-E1754.

Li, R., and Reiser, G. (2011). Phosphorylation of Ser45 and Ser59 of alphaB-crystallin and p38/extracellular regulated kinase activity determine alphaB-crystallin-mediated protection of rat brain astrocytes from C2-ceramide- and staurosporine-induced cell death. *J. Neurochem.* *118*, 354-364.

Liu, H., Bell, K., Herrmann, A., Arnhold, S., Mercieca, K., Anders, F., Nagel-Wolfrum, K., Thanos, S., and Prokosch, V. (2022). Crystallins Play a Crucial Role in Glaucoma and Promote Neuronal Cell Survival in an In Vitro Model Through Modulating Muller Cell Secretion. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *63*, 3.

Losiewicz, M.K., and Fort, P.E. (2011). Diabetes impairs the neuroprotective properties of retinal alpha-crystallins. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *52*, 5034-5042.

Mesquita, J., Castro-de-Sousa, J.P., Vaz-Pereira, S., Neves, A., Passarinha, L.A., and Tomaz, C.T. (2018). Vascular endothelial growth factors and placenta growth factor in retinal vasculopathies: Current research and future perspectives. *Cytokine Growth Factor Rev.* *39*, 102-115.

Metelitsina, T.I., Grunwald, J.E., DuPont, J.C., Ying, G.S., Brucker, A.J., and Dunaief, J.L. (2008). Foveolar choroidal circulation and choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *49*, 358-363.

Moore, T.C., Moore, J.E., Kaji, Y., Frizzell, N., Usui, T., Poulaki, V., Campbell, I.L., Stitt, A.W., Gardiner, T.A., Archer, D.B., et al. (2003). The role of advanced glycation end products in retinal microvascular leukostasis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *44*, 4457-4464.

Morizane, Y., Morimoto, N., Fujiwara, A., Kawasaki, R., Yamashita, H., Ogura, Y., and Shiraga, F. (2019). Incidence and causes of visual impairment in Japan: the first nationwide complete enumeration survey of newly certified visually impaired individuals. *Jpn. J. Ophthalmol.* *63*, 26-33.

Muñoz-Sánchez, J., Cháñez-Cárdenas, M.E. (2019). The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *J. Appl. Toxicol.* *39*, 556-570.

Ouyang, J., Juszczynski, P., Rodig, S.J., Green, M.R., O'Donnell, E., Currie, T., Armant, M., Takeyama, K., Monti, S., Rabinovich, G.A., et al. (2011). Viral induction and targeted inhibition of galectin-1 in EBV+ posttransplant lymphoproliferative disorders. *Blood* *117*, 4315-4322.

Rakic, J.M., Lambert, V., Devy, L., Luttun, A., Carmeliet, P., Claes, C., Nguyen, L., Foidart, J.M., Noel, A., and Munaut, C. (2003). Placental growth factor, a member of the VEGF family, contributes to the development of choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *44*, 3186-3193.

Ria, R., Melaccio, A., Racanelli, V., and Vacca, A. (2020). Anti-VEGF Drugs in the Treatment of Multiple Myeloma Patients. *J. Clin. Med.* *9*.

Rothbard, J.B., Kurnellas, M.P., Brownell, S., Adams, C.M., Su, L., Axtell, R.C., Chen, R., Fathman, C.G., Robinson, W.H., and Steinman, L. (2012). Therapeutic effects of systemic administration of chaperone alphaB-crystallin associated with binding proinflammatory plasma proteins. *J. Biol. Chem.* *287*, 9708-9721.

Scharf, J., Corradetti, G., Corvi, F., Sadda, S., and Sarraf, D. (2021). Optical Coherence Tomography Angiography of the Choriocapillaris in Age-Related Macular Degeneration. *J. Clin. Med.* *10*, 751.

Stitt, A.W. (2010). AGEs and diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *51*, 4867-4874.

Tzekov, R., and Arden, G.B. (1999). The electroretinogram in diabetic retinopathy. *Surv. Ophthalmol.* *44*, 53-60.

Van Bergen, T., Hu, T.T., Etienne, I., Reyns, G.E., Moons, L., and Feyen, J.H.M. (2017). Neutralization of placental growth factor as a novel treatment option in diabetic retinopathy. *Exp. Eye Res.* *165*, 136-150.

Wu, D., Kanda, A., Liu, Y., Kase, S., Noda, K., and Ishida, S. (2019). Galectin-1 promotes choroidal neovascularization and subretinal fibrosis mediated via epithelial-mesenchymal transition. *FASEB J.* *33*, 2498-2513.

Wu, D., Kanda, A., Liu, Y., Noda, K., Murata, M., and Ishida, S. (2020). Involvement of Muller Glial Autoinduction of TGF-beta in Diabetic Fibrovascular Proliferation Via Glial-Mesenchymal Transition. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *61*, 29.

Wu, D., Kase, S., Liu, Y., Kanda, A., Murata, M., and Ishida, S. (2022). Downregulation of AlphaB-crystallin in Retinal Pigment Epithelial Cells Exposed to Diabetes-related Stimuli In Vivo and In Vitro. *In Vivo* *36*, 132-139.

Yaung, J., Kannan, R., Wawrousek, E.F., Spee, C., Sreekumar, P.G., and Hinton, D.R. (2008). Exacerbation of retinal degeneration in the absence of alpha crystallins in an in vivo model of chemically induced hypoxia. *Exp. Eye Res.* *86*, 355-365.

Yu, D.Y., and Cringle, S.J. (2001). Oxygen distribution and consumption within the retina in vascularised and avascular retinas and in animal models of retinal disease. *Prog. Retin. Eye Res.* *20*, 175-208.

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.