



Title	糖尿病網膜症における不飽和アルデヒドの病的意義に関する探索的研究
Author(s)	福津, 佳苗
Description	配架番号 : 2781
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15463号
Issue Date	2023-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15463
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91635
Type	doctoral thesis
File Information	FUKUTSU_Kanae.pdf



学位論文

糖尿病網膜症における不飽和アルデヒドの
病的意義に関する探索的研究

(Exploratory research on the pathological significance
of an unsaturated aldehyde in diabetic retinopathy)

2023年3月

北海道大学

福津佳苗

学位論文

糖尿病網膜症における不飽和アルデヒドの

病的意義に関する探索的研究

(Exploratory research on the pathological significance
of an unsaturated aldehyde in diabetic retinopathy)

2023年3月

北海道大学

福津佳苗

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
方法	12 頁
結果	21 頁
考察	35 頁
結論	39 頁
謝辞	40 頁
利益相反	40 頁
引用文献	41 頁

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. Kanae Fukutsu, Miyuki Murata, Kasumi Kikuchi, Shiho Yoshida, Kousuke Noda, Susumu Ishida.
ROCK1 Mediates Retinal Glial Cell Migration Promoted by Acrolein.
Frontiers in Medicine. 2021; 8: 717602.

本研究の一部は下記の学会に発表した。

1. 福津佳苗、村田美幸、菊地香澄、吉田志帆、野田航介、石田 晋
Müller 細胞におけるアクロレインによる単球走化性因子の発現誘導。
第 126 回日本眼科学会総会、2022 年 4 月、大阪。
2. Kanae Fukutsu, Miyuki Murata, Kasumi Kikuchi, Shiho Yoshida, Kousuke Noda, and Susumu Ishida
Acrolein promotes Müller cell migration via ROCK1 pathway.
The 14th Joint Meeting of Japan-China-Korea Ophthalmologists, 2021 年 11 月, Web 開催。
3. Kanae Fukutsu, Kousuke Noda, Miyuki Murata, Shiho Yoshida, Atsuhiro Kanda, Susumu Ishida
Role of acrolein and ROCK1 in retinal glial cells.
Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual meeting,
2020 年 5 月, Web 開催。
4. 福津佳苗、村田美幸、野田航介、吉田志帆、神田敦宏、石田 晋
アクロレインによる網膜ミュラーグリア細胞の遊走作用と ROCK1 の関与。
第 124 回日本眼科学会総会、2020 年 4 月、東京。

要旨

【背景と目的】糖尿病網膜症(diabetic retinopathy, DR)は重篤な視機能障害をきたすため、その病態解明は眼科学における重要な課題である。Müller細胞は網膜特異的なグリア細胞であり、網膜全層にわたって網膜の支柱をなす形状で存在し、神経伝達物質の取り込みや網膜の栄養・代謝、血流調整などを担っている。一方、Müller細胞はDR病態において活性化され、血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)や種々のサイトカインおよびケモカインを分泌し、その病態形成において重要な役割を演じることも知られている。また、活性化されたMüller細胞は硝子体腔に遊走し、線維血管組織と呼ばれる網膜硝子体界面の増殖組織形成に寄与すると考えられているが、その詳細な機序は現在まで不明である。我々は過去に、増殖糖尿病網膜症(proliferative diabetic retinopathy, PDR)患者の線維血管組織に存在する網膜グリア細胞にアクロレインと呼ばれる物質の結合蛋白が蓄積すること、そしてアクロレインがMüller細胞の遊走を惹起することなどを報告してきた。アクロレインは反応性が高い不飽和アルデヒドの一種であり、様々な蛋白と結合することでその機能異常を引き起こすため、神経変性疾患や悪性腫瘍などの疾患病態でも注目されている分子である。

今回、アクロレインがMüller細胞の活性化・遊走を促進するメカニズムについて、rho-associated coiled-coil-containing protein kinase 1 (ROCK1)と monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)に着目して検討をおこなった。ROCKは細胞骨格のアクトミオシン束に作用して細胞遊走を促進する分子であり、ROCK1とROCK2の2つのアイソフォームが同定されている。DR病態においてROCK経路が活性化しているとする既報がある一方、MCP-1は炎症細胞の遊走を促す炎症メディエーターとしてDR眼内での増加および病態への関与が報告されている。しかし、DR病態におけるMüller細胞の活性化とこれらの分子との関連はこれまで明らかになっていない。本研究の目的は、DR病態においてアクロレインが果たす病的意義について検討することであり、1)アクロレインは、ROCK1を介してMüller細胞の遊走を惹起する、2)アクロレインは、Müller細胞からMCP-1の放出を促進して炎症細胞の遊走を促す、という2つの仮説を立てて研究を行った。

【材料と方法】

1) アクロレインとROCKを介したMüller細胞遊走に関する検討

PDR患者から採取した線維血管組織を用いて、ROCK1/2に対する免疫染色を行った。培養ラットMüller細胞TR-MUL5にアクロレイン(10-50 μ M)を負

荷し、ROCK1/2 および活性型 ROCK1 (cleaved ROCK1) の発現変化を real-time PCR および western blotting で解析した。さらに、アクロレインおよび ROCK 阻害剤リパスジル添加による TR-MUL5 の遊走能変化を Oris™ cell migration assay を用いて検討した。

2) アクロレインによる Müller 細胞の MCP-1 発現誘導に関する検討

PDR 患者から採取した硝子体液における MCP-1 およびアクロレイン結合蛋白 FDP-lys の濃度を ELISA によって測定し、両者の相関関係を解析した。また、TR-MUL5 にアクロレイン (10-50 μ M) を負荷し、MCP-1 の発現変化を real-time PCR、ELISA および western blotting で解析した。さらに、TR-MUL5 にアクロレインを添加し、Transwell® assay を用いて培養マクロファージ細胞株 RAW264.7 の遊走能変化を検討した。

【結果】

1) アクロレインと ROCK を介した Müller 細胞遊走に関する検討

免疫染色法を用いて、PDR 患者から採取した線維血管組織において Müller 細胞の細胞質に ROCK1 が存在することを明らかとした。TR-MUL5 へのアクロレイン負荷によって ROCK1 mRNA 発現が有意に上昇し、western blotting においても ROCK1 および活性型である cleaved ROCK1 が増加することを確認した。Oris™ migration assay を用いた実験では、アクロレイン負荷によって Müller 細胞の遊走能は有意に上昇し、ROCK 阻害剤リパスジンを添加することでその遊走は有意に抑制された。

2) アクロレインによる Müller 細胞の MCP-1 発現誘導に関する検討

PDR 患者の硝子体液においてアクロレイン結合蛋白 FDP-lys および MCP-1 の濃度は有意に増加しており、両者には有意な正の相関が認められた。また、アクロレイン負荷によって TR-MUL5 における MCP-1 産生が有意に増加することが real-time PCR および ELISA で確認された。さらに、Transwell® assay においてアクロレインを添加した TR-MUL5 から放出された MCP-1 はマクロファージの遊走を亢進させたが、MCP-1 受容体である C-C motif chemokine receptor type 2 (CCR2) に対する阻害剤 RS504393 でその遊走は抑制された。

アクロレイン刺激による TR-MUL5 からの MCP-1 放出促進のメカニズムについては high mobility group box 1 (HMGB1) に着目した。HMGB1 は核内で転写制御などを担い、細胞へのストレスなどにより核外に放出されると damage-associated molecular patterns (DAMPs) として機能する分子である。HMGB1 に対する阻害剤グリチルリチンは、アクロレイン刺激によって亢進した TR-MUL5 における MCP-1 発現を有意に抑制した。また、免疫染色および細胞分画 western blotting によって、アクロレイン添加で HMGB1 の細胞内局在が変化すること

を明らかとした。

【考察】

Müller 細胞において、アクロレインは ROCK1 を介してその遊走を亢進させることが明らかとなった。また、DR 眼内においてアクロレインと MCP-1 の濃度には正の相関があること、アクロレインは Müller 細胞において炎症性サイトカイン MCP-1 の発現を増加させること、そのメカニズムには HMGB1 の細胞内局在変化が関わっていること、なども明らかとした。

DR の病態形成に Müller 細胞を含む網膜グリア細胞が重要な役割を演じていることはよく知られており、重篤な糖尿病網膜症患者の剖検眼における Müller 細胞の遊走も報告されているが、その機序はこれまで不明であった。本研究では、DR の硝子体中で増加する不飽和アルデヒドアクロレインが Müller 細胞の遊走を促進し、その機構に ROCK1 が関与することを明らかとした。本検討結果は、すでに緑内障点眼薬として製剤化されている ROCK 阻害剤リパスジルが、DR 進行抑制効果を有する可能性を示した。

また、DR の眼内で MCP-1 が増加することは既に報告があり、MCP-1 は DR 組織へのマクロファージ遊走を促し、そのマクロファージから分泌される炎症性サイトカインが DR の初期病態形成に寄与すると考えられている。一方、MCP-1 は DR 病態下で活性化した Müller 細胞から分泌されることが知られているが、その産生および分泌の制御機構については不明な点が多い。本研究では、アクロレインが HMGB1 を介して、Müller 細胞からの MCP-1 産生を増加させることを明らかとした。アクロレインに対する阻害剤は悪性腫瘍治療製剤の副作用である膀胱障害に対する薬剤としてすでに臨床使用されている。今後、同薬剤を DR の進行予防に適用できるのか、さらなる研究を進めていきたい。

【結論】

DR 病態における Müller 細胞の遊走および MCP-1 産生の亢進にはアクロレインが重要な役割を果たしており、アクロレインは DR に対する創薬研究において新たな治療標的分子となり得ることが示唆された。

略語表

本文中および図表で使用した略語は以下の通りである。

【略語】

CCR2 : C-C motif chemokine receptor 2、MCP-1 受容体の一種

DME : diabetic macular edema 糖尿病黄斑浮腫

DR : diabetic retinopathy、糖尿病網膜症

FDP-lys : FDP-lysine、アクロレイン結合蛋白

GFAP : glial fibrillary acidic protein

HMGB1 : high mobility group box 1

MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1

MLC : myosin light chain

NAC: N-acetylcysteine

MYPT1 : myosin phosphatase targeting subunit 1

PDR : proliferative diabetic retinopathy、増殖糖尿病網膜症

ROCK : Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase

SMOX : spermine oxidase

SSAO : semicarbazide-sensitive amine oxidase

VAP-1 : vascular adhesion protein-1

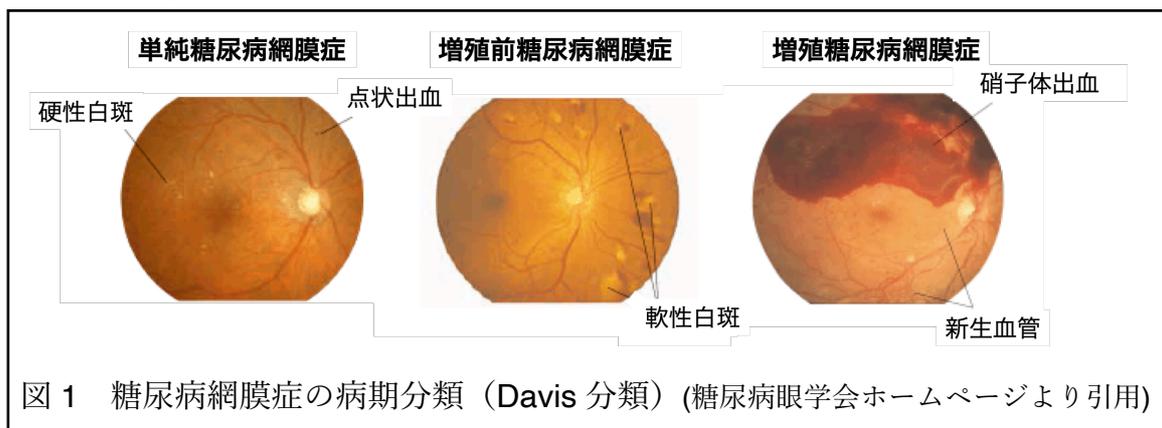
VEGF : vascular endothelial growth factor

緒言

糖尿病は現代においても全世界人口の 10%に発症し、世界の主な死因の 9 位とされている (Zheng et al., 2018)。糖尿病の主な合併症は神経、腎、そして眼に生じることが知られている。糖尿病眼合併症である糖尿病網膜症 (diabetic retinopathy, DR) は、世界の主要な失明原因の一つである (Hammes, 2018)。以下、DR について記載する。

糖尿病網膜症について

DR は糖尿病を背景として眼内に慢性的な炎症病態が惹起され、血管透過性亢進や病的血管新生を生じる疾患である (Semeraro et al., 2019)。眼科臨床では、DR 病期分類として改変 Davis 分類が使われることが多く、同分類では軽症から重症の順に、血管透過性亢進を特徴とし、硬性白斑や点状出血を呈する単純糖尿病網膜症、血管閉塞を伴う増殖前糖尿病網膜症、線維血管組織が生じる増殖糖尿病網膜症 (proliferative diabetic retinopathy, PDR) の 3 つの病期に分類されている。DR が PDR まで進行した場合、線維血管組織形成や網膜剥離、硝子体出血によって重篤な視力障害を引き起こす (Cheung et al., 2010)。現代における DR および DR の一病型である糖尿病黄斑浮腫 (diabetic macular edema, DME) に対する最も効果的な治療法として、抗血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 抗体の硝子体注射がある。同薬剤は眼内で増加する炎症性サイトカインである VEGF を抑制することによって DR や DME を改善するが、すでに進行した病態に対する治療法であることであり、同薬剤に対して治療抵抗性の症例もあることから進行前の DR にも適用できる新規薬剤の開発が求められている。



Müller 細胞について

DR の病態基盤には慢性的な炎症病態が存在することが多くの検討で明らかとされてきた。DR 眼内で炎症を惹起する細胞として、白血球や網膜血管内皮細胞、網膜グリア細胞などが知られている。Müller 細胞は網膜特異的なグリア細胞であり、網膜全層に渡ってその支柱をなすような形状で存在し、神経伝達物質の取り込みや網膜の栄養・代謝、血流調整などに重要な役割を果たしている (Coughlin et al., 2017 ; García-Bermúdez et al., 2021)。Müller 細胞は DR 病態下で活性化され、線維血管組織形成を助長することが知られている。DR 病態において Müller 細胞は VEGF を放出することに加え、複数の炎症性サイトカインやケモカインを放出することで白血球遊走を促進し、炎症の増悪を引き起こすことが報告されている (Amin et al., 1997 ; Coughlin et al., 2017)。また、活性化した Müller 細胞は生理的な組織局在を離れて遊走することによって線維血管組織形成を促進することも知られている (Nork et al., 1987)。

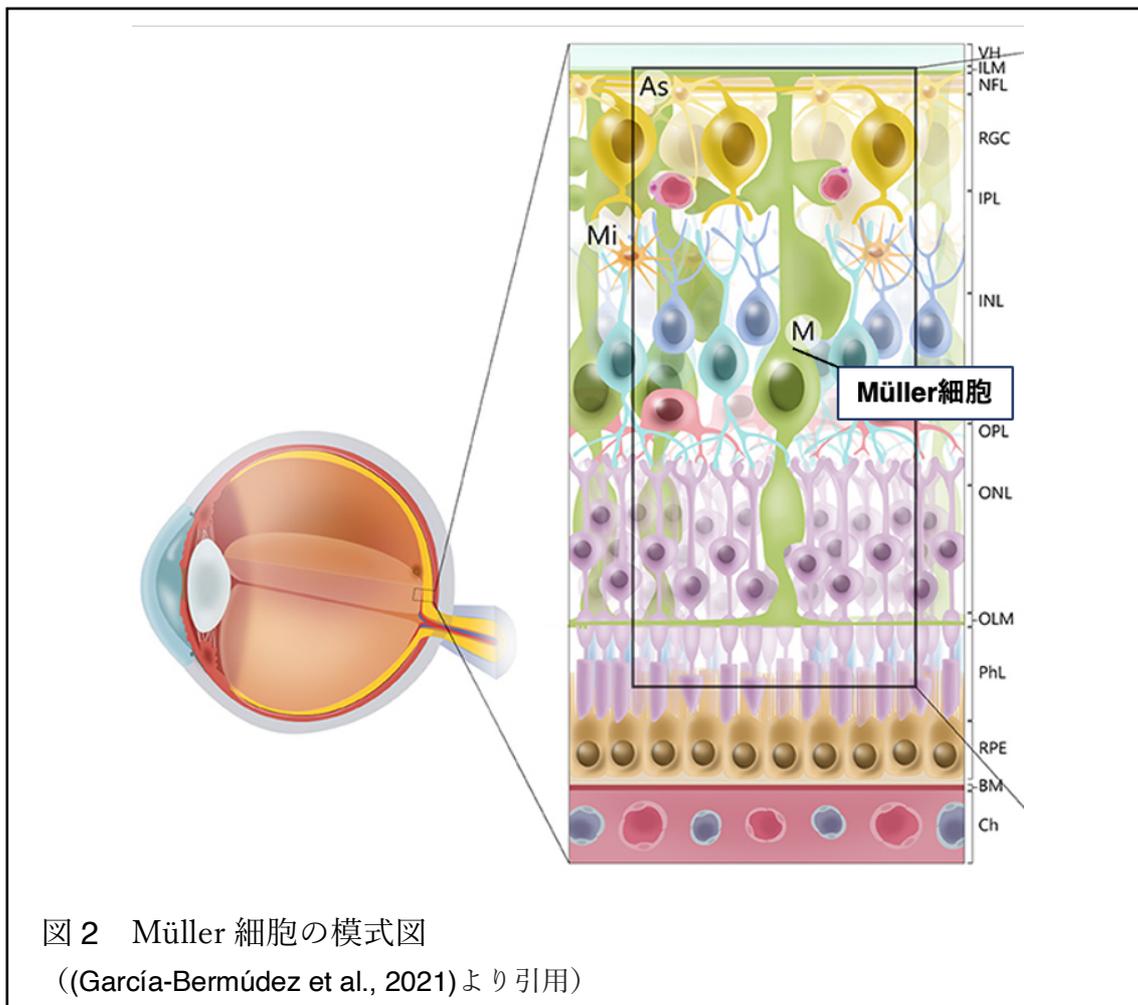


図 2 Müller 細胞の模式図

((García-Bermúdez et al., 2021)より引用)

不飽和アルデヒド・アクロレインについて

当研究室では以前から DR における炎症と酸化ストレスの関連について研究を行っており、アクロレインという物質に着目してきた。アクロレインは反応性が高く、タンパクなどに結合することでその機能異常を惹起する毒性の強いアルデヒドである。同物質は元来、タバコの煙や車の排気ガスなどに含まれる外因性の環境汚染物質として認知されていたが、その後内因性にも生成されることが明らかとなり、神経変性疾患や呼吸器疾患との関係が注目されるようになった(Feng et al., 2006)。アクロレインがタンパク中の lysine 残基に結合して生じる生成物は FDP-lysine(FDP-lys)とよばれ、体内に滞留して酸化ストレスを亢進させることが知られている。

眼内におけるアクロレインの産生機序にはこれまで 2 つの経路が報告されている(Murata et al., 2020)。1 つ目は、vascular adhesion protein-1 (VAP-1) と呼ばれる分子が介在する経路である。VAP-1 は血管内皮細胞において産生され、白血球の血管外遊走に関与することで糖尿病を含む炎症性疾患において重要な役割を果たすタンパクである(Noda et al., 2012)。我々はこれまで、DR において VAP-1 は網膜と脈絡膜の血管内皮細胞に局在し(Almulki et al., 2010)、糖尿病動物モデルで VAP-1 阻害によって網膜組織内への白血球遊走が抑制されること(Noda et al., 2009)、VAP-1 濃度が PDR の硝子体中で上昇していること(Murata et al., 2012)などを報告し、VAP-1 が膜結合型の白血球接着因子として DR 病態形成に関与することを明らかにしてきた。一方、VAP-1 は分泌型の形態も取ることが知られている(soluble VAP-1, s-VAP-1)。VAP-1 および sVAP-1 は semicarbazide-sensitive amine oxidase(SSAO) と呼ばれる酵素機能も有する。SSAO はアミン酸化酵素であり、一級アミンの酸化反応を仲介することによって、アルデヒド、アンモニア、過酸化水素を生成する。SSAO の基質として、第一級アミノ基を持つポリアミンが知られている。ポリアミンはあらゆる生体中に存在し、細胞周期や細胞増殖の制御に関わる分子である。ヒトの体内にはプトレッシン、スペルミジン、スペルミンの 3 種類が主に存在する(Pegg, 2013)。その中で、PDR の硝子体中ではスペルミンの濃度が上昇している(Nicoletti et al., 2003)。過去に我々は、網膜血管内皮細胞に存在する VAP-1 が SSAO 酵素活性を介してスペルミンを基質としてアクロレインを産生することを報告している(Murata et al., 2017)。

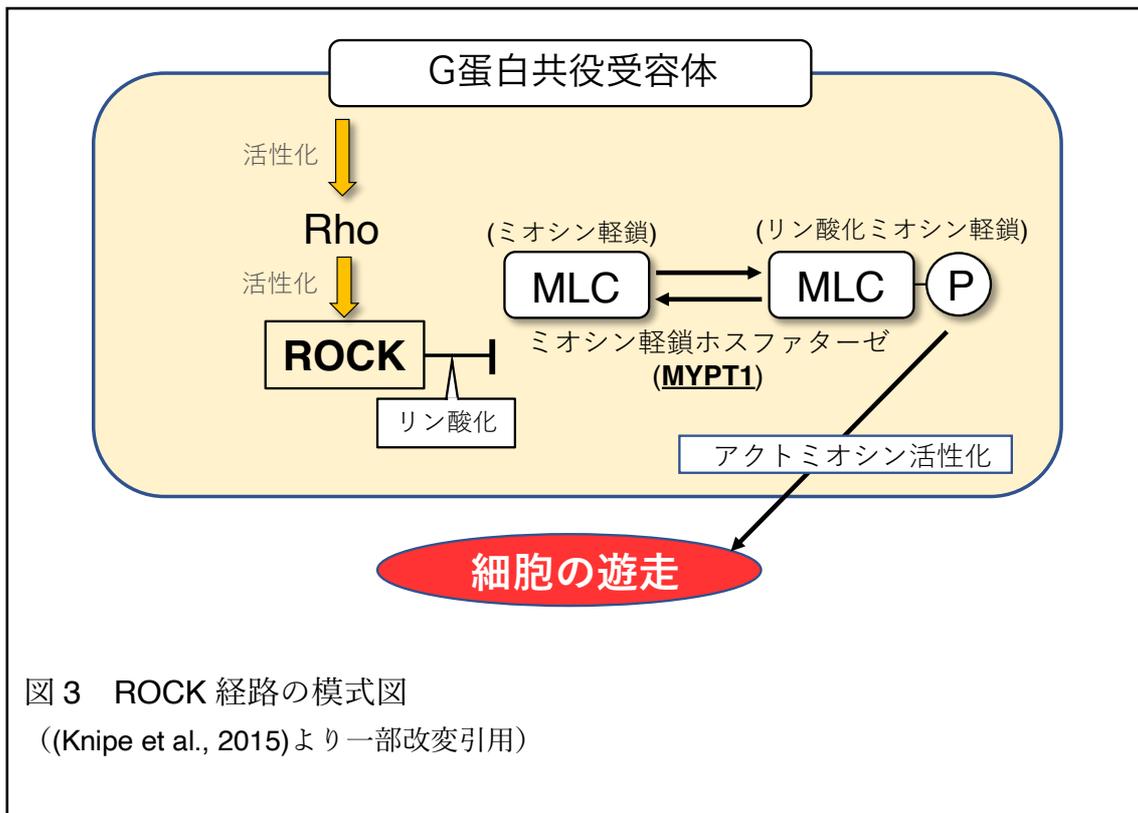
2 つ目のアクロレイン産生経路は、網膜グリア細胞において spermine oxidase(SMOX) という酵素が介在するものである。SMOX はスペルミンを酸化分解してスペルミジンに変化させ、その過程で過酸化水素とアクロレインの前駆物質である 3-アミノプロパナールを生成することが知られている(Sharmin et al., 2001)。DR の初期病態では毛細血管が脱落して網膜組織に低酸素状態が生

じるが(Frank, 2004)、我々は低酸素状態の細胞内で活性化される hypoxia inducible factor-1(HIF-1)が、網膜グリア細胞において *SMOX*のプロモーター領域に結合することによりグリア細胞からの *SMOX* 産生を増加させ、スペルミンをスペルミジンへ分解する過程でアクロレインを産生することを明らかにした(Wu et al., 2020)。

我々はこれまで DR とアクロレインの関連について、PDR 患者の硝子体中で FDP-lys 濃度が上昇していること(Murata et al., 2017)、PDR 患者の線維血管組織において FDP-lys はグリア細胞に局在していること(Dong et al., 2017)、そしてアクロレインが Müller 細胞の遊走を惹起すること(Murata et al., 2019)などを報告してきたが、その具体的な機序については未解明であった。

Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase(ROCK)について

細胞遊走に関わる分子の一つとして、Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase (ROCK)が知られている。ヒトの体内では ROCK1 と ROCK2 の 2つのアイソフォームが存在するが、これらは主にアクチン細胞骨格に作用して細胞収縮や遊走を制御している。ROCK の主要な基質はミオシン軽鎖ホスファターゼに存在するミオシンホスファターゼ標的サブユニット 1(myosin phosphatase target subunit 1, MYPT1)である。ROCK により MYPT1 がリン酸化されることによりミオシン軽鎖ホスファターゼの活性が阻害され、その結果、ミオシン軽鎖(myosin light chain, MLC)のリン酸化が促進され、アクトミオシン活性化を介し細胞の遊走・収縮を促すと考えられている(Loirand, 2015)。



アクロレインと ROCK の関連を調べた先行研究では、タバコの煙に含まれるアクロレインが肺微小血管において ROCK 経路を介しバリア機能を障害することが報告されている (Schweitzer et al., 2015)。さらに、ROCK と DR の関連については白血球による糖尿病網膜血管内皮障害 (Arita et al., 2009) や炎症性微小血管障害に ROCK が関与していること (Arita et al., 2013) が報告されている。これらのことから、ROCK は特に血管障害に関与し、DR の病態形成に関与していることが示唆される。しかしながら、ROCK と DR 病態下で遊走し線維血管組織形成に関与するとされる Müller 細胞との関係はこれまで明らかになっていなかった。本学位論文の前半では、アクロレインが Müller 細胞の遊走を促す機序について ROCK に着目して行った検討結果について述べる。

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) について

次に、我々はアクロレインが Müller 細胞の遊走能亢進だけではなく、Müller 細胞の活性化を促進して炎症病態形成に関わっているのではないかと仮説を立て、研究を進めた。DR 病態を増悪させる主な炎症性サイトカインの一つとして、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) が知られている。MCP-1 は CC ケモカインの一つであり、C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2) としても知られている。硝子体術後の PDR 患者眼内では MCP-1 の濃度が上昇し、DME 発症を惹起することが報告されている (Yoshida et al., 2015)。また、DR 初期段階の

ヒト前房水中で MCP-1 が増加していること (Tashimo et al., 2004)、糖尿病動物モデルである STZ ラットの網膜において MCP-1 が DR 発症前から増加していること (Dong et al., 2012)、なども報告されている。これら既報によって、DR において増加する MCP-1 は網膜組織へのマクロファージの遊走を促し、そのマクロファージから分泌される炎症性サイトカインが DR の初期病態形成に寄与すると考えられている。一方、MCP-1 は DR 病態下で活性化した Müller 細胞から分泌されることが知られているが (Eastlake et al., 2016)、その産生および分泌の制御機構については不明な点が多い。本学位論文の後半では、アクロレインが Müller 細胞からの MCP-1 の放出を促進し、炎症細胞の遊走を惹起するという仮説を立てて行なった検討結果について述べる。

High mobility group box-1 (HMGB1) について

上記の仮説を検証する中で、介在分子候補として high mobility group box-1 (HMGB1) に注目した。HMGB1 は様々な細胞の核に存在する分子で、定常状態では核内で DNA の転写やタンパク合成等の制御を担うが、細胞へのストレス等の刺激により細胞質および細胞外へ放出され、MCP-1 を含む炎症性サイトカインの誘導などを引き起こすことが知られている (Andersson et al., 2018 ; Biscetti et al., 2019)。糖尿病患者の血中では HMGB1 が増加していること (Yan et al., 2009 ; Wang et al., 2015)、HMGB1 は PDR 患者硝子体中で増加して MCP-1 の濃度と相関していること (El-Asrar et al., 2011) が報告されている。さらに、HMGB1 は酸化ストレスによって核外へ放出されること (Lugrin et al., 2014)、そして PDR 患者の硝子体中でアクロレイン産生に必要な酵素である sVAP-1 と、HMGB1 の濃度が相関していることも報告されている (Abu El-Asrar et al., 2017)。

これらの既報から、DR 眼内における酸化ストレスと MCP-1 に関連する分子として、本仮説への HMGB1 の関与の有無を検討した。

本論文では前半にアクロレインと ROCK を介した Müller 細胞遊走に関する検討、そして後半にアクロレインによる Müller 細胞の MCP-1 発現誘導に関する検討について記す。本研究全体を通じての検討目的は、DR 病態においてアクロレインが果たす病的意義について検討することである。

方法

1. アクロレインと ROCK を介した Müller 細胞遊走に関する検討

1, 臨床検体

北海道大学病院眼科で PDR に対し硝子体切除術が施行された 2 型糖尿病患者の線維血管組織を用いた。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から採取しており、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 #014-0293)、「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, 細胞培養

ラット培養 Müller 細胞株 TR-MUL5 を用いた (Fact Inc, Sendai, Japan)。TR-MUL5 は、温度感受性 SV40 ラージ T 抗原遺伝子を保有するトランスジェニックラットから確立された細胞株であり、33°C で増殖する (Tomi et al., 2003)。TR-MUL5 は 33°C で 10% ウシ胎児血清 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を含有した Dulbecco's modified Eagle's medium (Fuji Film Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan) 中で培養された。

3, 免疫染色

組織染色においては、PDR を有する患者の眼から採取されホルマリン固定の後パラフィン包埋された線維血管組織の切片を脱パラフィンし、10mM クエン酸バッファー (pH6.0) 中で電子レンジにて抗原賦活化を行ったのち、10% normal goat serum (Thermo Fisher Scientific) を載せて 30 分ブロッキングを行った後、4°C で一晩一次抗体反応を行った。使用した一次抗体は以下の通りである。抗 ROCK1 抗体 (1:50, EP786Y, Abcam, Cambridge, MA, USA) と抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体 (1:50, NCL-L-GFAP-GA5, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany)、あるいは抗 ROCK2 抗体 (1:100, #610623, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) と抗 GFAP 抗体 (1:200, Z033429, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) を組み合わせて共染色を行った。二次抗体として Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG と Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG、あるいは Alexa flour 488 goat anti-rabbit IgG と Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IgG (1:500, Thermo Fisher Scientific) を用い、1 時間室温でインキュベートした後、観察を行った。

細胞免疫染色では、カバーガラスの入った 6 ウェルプレートに TR-MUL5 を播種し 24 時間培養したのち、17 時間の血清飢餓状態を経て、アクロレインを添加した。23 時間後にリパスジル (2 μ M) を添加し、1 時間インキュベートした。

4%パラホルムアルデヒドで15分間固定を行い、0.1% Triton X-100 で10分間の透過処理を行った。10% normal goat serum を載せて30分間ブロッキングした後、4°Cで一晩、抗 p-MLC2 抗体(1:100, #3675, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) を用いて一次抗体反応を行った。Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IgG (1:400)及びファロイジン(1:143, Cytoskeleton, Inc., Denver, CO, USA)を載せて1時間室温でインキュベートし、観察を行った。全ての染色において、核は4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)で共染色を行った。観察にはBZ-9000顕微鏡(Keyence, Osaka, Japan)を用いた。

4, Real-time PCR

Rock1, *Rock2*, *Mypt1*, *Mlc2* の mRNA 発現量を real-time PCR で測定した。TR-MUL5 を6ウェルプレートに 4×10^5 個/ウェルずつ播種し、24時間培養を行った。17時間の血清飢餓状態を経た後アクロレインを添加し、6時間後にサンプルを採取した。なお抗酸化物質である N-アセチルシステイン(N-acetylcysteine, NAC)を用いた実験では、アクロレイン添加の30分前に NAC(5, 50, 500 μ M)を添加した。ポジティブコントロールとして、前述と同様に細胞を播種し血清除去を行った後、過酸化水素(H_2O_2)100 μ M を添加し、6時間後にサンプルを採取した。サンプル採取には TRI-reagent[®] (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA) を用い、逆転写反応には GoScript reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) を用いて cDNA を作製した。PCR に使用したプライマーは下記の通りである(表1)。解析には StepOnePlus Real-Time PCR システム(Thermo Fisher Scientific)を用いた。PCR 条件は 95°C 2分、95°C 15秒、60°C 1分を40サイクル施行し、 $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて算出した。

表 1 本実験に用いたプライマー配列

Gene		Primer Sequence
rat <i>Rock1</i>	Forward	5'-ATGAACTTCAAATGCAGTTGGCT-3'
	Reverse	5' -ATAAGGAATGCAGGCAGAACCA-3'
rat <i>Rock2</i>	Forward	5' -CTGCTGACTGA GCGAACACT-3'
	Reverse	5'- ACCACGCTTGACAGG TTCTT-3'
rat <i>Mypt1</i>	Forward	5'-GTCAGCTCAACAGGCCAAAC- 3'
	Reverse	5'-TCGCCGTCGTTCTCTGATTG-3'
rat <i>Mlc2</i>	Forward	5'-GCCTTGCCCTCAGAGGATCTA-3'
	Reverse	5'-CAT TGGAGCTCCCTTCTGCTG-3'
rat <i>Actb</i>	Forward	5'-GGGAAATCGTGCGTGACATT-3'
	Reverse	5'-GCGGCAGTGGCCATCTC-3'

5, Western blotting

TR-MUL5 を 8×10^5 細胞/dish の濃度で 6cm dish に播種し、24 時間培養を行った。17 時間の血清飢餓状態を経た後アクロレインを添加し、その 24 時間後にサンプルを回収した。MYPT1 および MLC2 のリン酸化に関する western blotting では、同様のプロトコルで細胞を用意し、サンプル回収の 1 時間前にリバズジル (0.08, 0.4, $2 \mu\text{M}$) を添加した。サンプル回収には 1xSDS バッファーを用いた。得られた細胞溶解物は 5 秒ずつ計 5 回、氷上で超音波破碎を行った後、 4°C 、 $15,000 \times g$ で 10 分間の遠心を行った。タンパク定量は BCA アッセイキット (Thermo Fisher Scientific) を用いて行い、サンプル濃度を揃えたのち、 95°C で 3 分間ボイルした。SDS-PAGE を行い、蛋白を転写した PVDF メンブレンを 5% スキムミルクで 1 時間ブロッキングした後、 4°C で一晩一次抗体反応を行った。使用した抗体と希釈倍率は以下の通りである。抗 ROCK1 抗体 (1:5000, EP786Y, Abcam)、抗 MLC2 抗体 (1:1000, #8505, Cell Signaling)、抗 p-MLC2 抗体 (1:1000, #3675, Cell Signaling)、抗 MYPT1 抗体 (1:1000, #2634, Cell Signaling)、抗 p-MYPT1 抗体 (1:1000, #5163, Cell Signaling)、抗 cleaved ROCK1 抗体 (1:1000, 154C1465, Novus biologicals, Centennial, CO, USA)。一次抗体反応後にメンブレンを TBS-T (0.1% Tween-20) で洗浄し、二次抗体で室温 1 時間インキュベートした。二次抗体には、goat anti-mouse IgG (H+L) horseradish peroxidase conjugate (1:4000, Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) もしくは goat anti-rabbit IgG (H+L) horseradish peroxidase

conjugate(1:4000, Jackson ImmunoResearch)を用いた。化学発光基質には SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate(Thermo Fisher Scientific)を用いた。観察には iBright imaging system (Thermo Fisher Scientific)を用いた。

6, GSH アッセイ

TR-MUL5 を 24 ウェルプレートに 1×10^5 細胞/well の濃度で播種し、24 時間培養した。17 時間の血清飢餓状態を経て、アクロレイン($10-50 \mu\text{M}$)を添加し 3 時間後に総グルタチオン(GSH)量を測定した。測定には total GSH アッセイキット(Nikken Seil Co., Ltd., Shizuoka, Japan)を用いた。

7, 細胞遊走能の測定

Oris™ Cell Migration assay キット(Platypus Technologies, Madison, WI, USA)を用いて細胞遊走能を測定した。TR-MUL5 を 1×10^5 細胞/well の濃度で 96 ウェルの Oris™ プレートに播種し、24 時間培養した後、17 時間血清飢餓状態とした。各ウェルにアクロレイン($25 \mu\text{M}$)を添加し、その 23 時間後にリパスジル($0.08, 0.4, 2 \mu\text{M}$)と DNA 合成阻害剤アフィジコリン($10 \mu\text{g/ml}$)を添加し、1 時間後に Oris™ プレートからストッパーを抜去し、細胞をウェルの中央に向かって遊走可能な状態とした。24 時間後に各ウェルの写真を撮影し、遊走した面積を計測した。観察には BZ-9000 顕微鏡(Keyence)を用い、計測には BZ- II アナライザー(Keyence)を使用した。

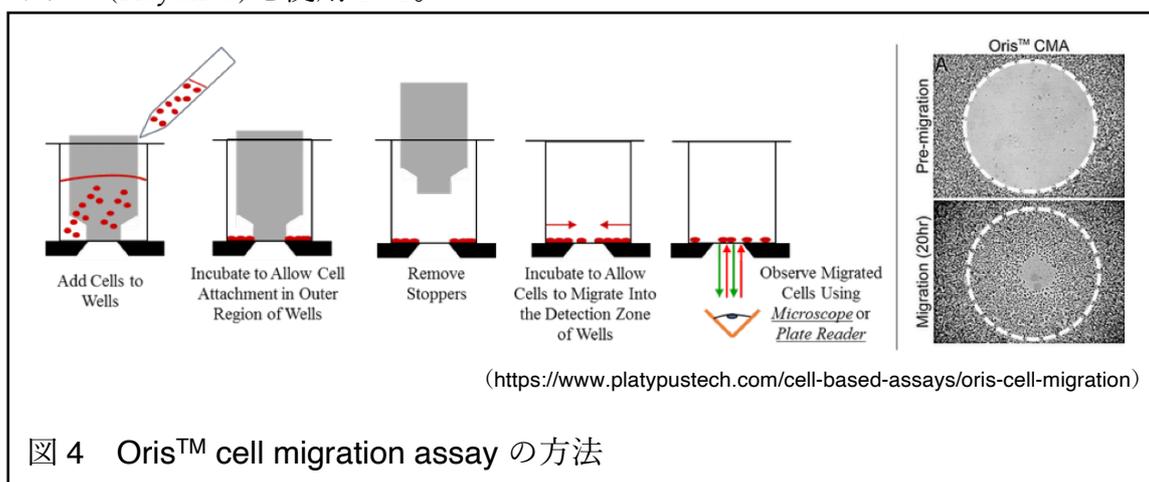


図 4 Oris™ cell migration assay の方法

8, 統計解析

全ての結果は平均値±標準誤差で示した。また、2 群間の比較は student の t 検定、多群の比較は one-way ANOVA と post hoc 解析として Tukey-Kramer 法を用いて解析した。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。

2. アクロレインによる Müller 細胞の MCP-1 発現誘導に関する検討

1, DNA マイクロアレイ

ラット培養 Müller 細胞株 TR-MUL5 にアクロレイン 25 μ M を添加し、6 時間後に NucleoSpin RNA Plus(MACHERY-NARGEL, Düren, Germany)を用いて total RNA を抽出し、タカラバイオ社 (Shiga, Japan) へ DNA マイクロアレイ解析を委託した。解析に用いたアレイは Sure Print G3 Rat Gene Expression 8 \times 60K v2 Microarray (Agilent) である。Total RNA の品質は 2100 Bioanalyzer(Agilent)で分析し、マイクロアレイ解析に用いた total RNA の RNA integrity number(RIN)値は 9.0 以上であった。

2, 臨床検体

北海道大学病院眼科で PDR に対し硝子体切除術が施行された 2 型糖尿病患者 12 名と、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 9 名において術中に採取された硝子体液を用いた。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から採取しており、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 #014-0293)、「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。

3, 細胞培養

ラット培養 Müller 細胞株 TR-MUL5 を用いた(Fact Inc)。TR-MUL5 は、温度感受性 SV40 ラージ T 抗原遺伝子を保有するトランスジェニックラットから確立された細胞株であり、33 $^{\circ}$ Cで増殖する(Tomi et al., 2003)。TR-MUL5 は 33 $^{\circ}$ C で 10%ウシ胎児血清(Thermo Fisher Scientific)を含有した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Fuji Film Wako Pure Chemicals) 中で培養された。Transwell[®] assay ではマウス培養マクロファージ株 RAW 264.7 (ATCC, Manassas, VA, USA) も使用した。RAW264.7 は 37 $^{\circ}$ Cで 10%ウシ胎児血清を含有した DMEM 中で培養した。

4, 硝子体中の MCP-1 及び FDP-lys タンパク量の測定

硝子体中の MCP-1 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)を用いて測定した。FDP-lys の濃度は ELISA キット (Acrolein-Lysin adduct competitive EIA kit, Takara, Shiga, Japan)を用いて測定した。

5, Real-time PCR

Mcp1, *Hmgb1* の mRNA 発現量を real-time PCR で測定した。TR-MUL5 を 6 ウェルプレートに 4×10^5 個/ウェルずつ播種し、24 時間培養を行った。17 時間の血清飢餓状態を経た後アクロレインを添加し、6 時間後にサンプルを採取した。なお、なお NAC を用いた実験では、アクロレイン ($50 \mu\text{M}$) 添加の 30 分前に NAC ($5, 50, 500 \mu\text{M}$) を添加した。HMGB1 の阻害剤であるグリチルリチンを用いた実験では、アクロレイン ($50 \mu\text{M}$) 添加の 30 分前にグリチルリチン ($1, 10, 100 \mu\text{M}$) を添加した。HMGB1 受容体の阻害実験では、HMGB1 の主な受容体である receptor for advanced glycation end products (RAGE) 阻害剤 FPS-ZM ($0.01, 0.1, 1.0 \mu\text{M}$) 及び Toll-like receptor 4 (TLR4) の阻害薬 TAK-242 ($0.1, 1.0, 10 \mu\text{M}$) をアクロレイン ($50 \mu\text{M}$) 添加の 30 分前に添加した。

サンプル採取には TRI-reagent[®] (Molecular Research Center, Inc) を用い、逆転写反応には GoScript reverse transcriptase (Promega) を用いて cDNA を作製した。PCR に使用したプライマーは下記の通りである (表 2)。解析には StepOnePlus Real-Time PCR システム (Thermo Fisher Scientific) を用いた。PCR 条件は 95°C 2 分、 95°C 15 秒、 60°C 1 分を 40 サイクル施行し、 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法を用いて算出した。

表 2 本実験に用いたプライマー配列

Gene		Primer Sequence
rat <i>Mcp1</i>	Forward	5'-ACTGTGTGGTTGACATGCACT-3'
	Reverse	5'-GCAGCAGTGTGTCATTCCAAG-3'
rat <i>Hmgb1</i>	Forward	5'-AATGTTACAGAGCGGAGAGAGTG-3'
	Reverse	5'-CATTTTGCCTCTCGGCTTCTTAG-3'
rat <i>Actb</i>	Forward	5'-GGGAAATCGTGCGTGACATT-3'
	Reverse	5'-GCGGCAGTGGCCATCTC-3'

6, 細胞培養上清中の MCP-1 及び HMGB1 タンパク量の測定

MCP-1 の培養上清サンプルを取得するため、TR-MUL5 を 6 ウェルプレートに 5.4×10^5 細胞/well の濃度で播種し、24 時間培養した。17 時間の血清飢餓状態を経て、アクロレイン ($10-50 \mu\text{M}$) を添加しさらに 24 時間インキュベートした後、培地を回収し $500 \times g$ で 10 分間遠心を行い、上清を回収しサンプルとした。グリチルリチンを用いた HMGB1 阻害実験では同様に細胞の準備を進めたのち、アクロレインを添加する 30 分前にグリチルリチン ($1, 10, 100 \mu\text{M}$) を添加した。

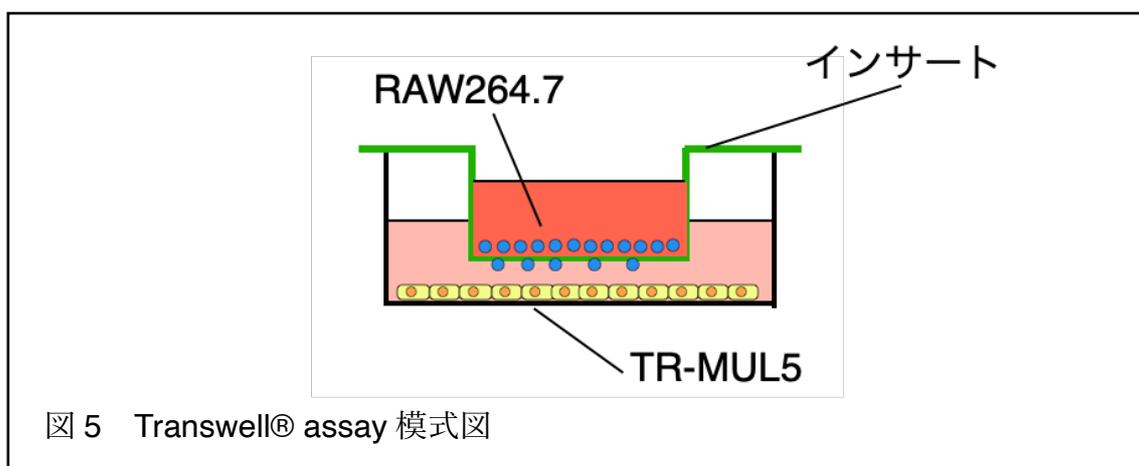
測定には ELISA キット (MCP-1 rat instant ELISA kit, BMS631INST, Thermo Fisher Scientific) を用いた。

HMGB1 の培養上清サンプルを取得するため、TR-MUL5 を 6cm ディッシュに 1×10^6 細胞/well の濃度で播種し、24 時間培養した。17 時間の血清飢餓状態を経たのち、アクロレイン ($10-50 \mu\text{M}$) を添加し、3 時間後に培地を回収し $500 \times g$ で 10 分間遠心を行い、上清を回収しサンプルとした。測定には HMGB1 ELISA kit Exp (#326078738, シノテスト, Tokyo, Japan) を用いた。

7, アクロレイン添加後 Müller 細胞の存在下におけるマクロファージの遊走能

Transwell® assay (3421, Corning, NY, USA) を用いてマクロファージの遊走能を調べた。上段にはマクロファージ細胞株 RAW264.7、下段にはアクロレインを添加した TR-MUL5 を蒔いた状態で実験を行った。まず、TR-MUL5 を 24 ウェルプレートに 1.1×10^5 細胞/well の濃度で播種し 24 時間培養した。17 時間の血清飢餓状態を経て、アクロレイン ($50 \mu\text{M}$) を添加した後、24 時間後に Transwell® インサート内に RAW264.7 を 1.0×10^5 細胞/well の濃度で播種し、MCP-1 の主な受容体である C-C motif chemokine receptor 2 (CCR2) 阻害薬 RS 504393 ($0.1, 1.0 \mu\text{M}$) (Abcam) を添加し、6 時間後に Transwell® のメンブレンの観察を行った。メンブレンは 100% メタノールで 2 分間固定し、トルイジンブルー (Fuji Film Wako Pure Chemicals) で 2 分間染色を行った。観察には BZ-9000 顕微鏡 (Keyence) を用い、ランダムに 3 視野を観察し、遊走している細胞の数を平均した。

さらにコントロール実験として、TR-MUL5 を播種せずに培地のみを入れたウェルにアクロレイン ($50 \mu\text{M}$) を加え、同様に Transwell® インサートに RAW264.7 を播種して 6 時間後に観察を行った。



8, 細胞免疫染色

カバーガラスの入った 6 ウェルプレートに TR-MUL5 を播種し 24 時間培養したのち、17 時間の血清飢餓状態を経て、アクロレインを添加した。23 時間後にグリチルリチン(100 μ M)を添加し、1 時間インキュベートした。4%パラホルムアルデヒドで 15 分間固定を行い、0.1% Triton X-100 で 10 分間の透過処理を行った。10% normal goat serum を載せて 30 分間ブロッキングした後、4°Cで一晩、抗 HMGB1 抗体(1 μ g/ml, EPR3507, Abcam)を用いて一次抗体反応を行った。PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄後、Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG (1:400) を載せて 1 時間室温でインキュベートし、PBS で 5 分間ずつ 3 回洗浄後封入し、観察を行った。核は 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Roche Applied Science)で共染色を行った。観察には BZ-9000 顕微鏡 (Keyence) を用いた。

9, RT-PCR

TR-MUL5 を 6 ウェルプレートに 4×10^5 個/ウェルずつ播種し、24 時間培養を行った。17 時間の血清飢餓状態を経た後に細胞の RNA を回収して逆転写反応により cDNA を作製した後、*Rage* と *Tlr4* のプライマーを用いて先述の通り PCR を行った。増幅後のサンプルを、2%アガロースゲルを用いて電気泳動し、TR-MUL5 における RAGE と TLR4 の発現を確認した。

表 3 本実験に用いたプライマー配列

Gene		Primer Sequence
rat <i>Rage</i>	Forward	5'-CCCCAATGGTTCACCTCCTCC-3'
	Reverse	5'-GAGCGACTGTTCCACCTTCA-3'
rat <i>Tlr4</i>	Forward	5'-AAATGCCAGGATGATGCCTCT-3'
	Reverse	5'-ATCCAGCCACTGAAGTTGTGA-3'

10, 核分画及び細胞質分画

TR-MUL5 を 2.5×10^5 細胞/ウェルの濃度で 10cm ディッシュに播種し、24 時間培養を行った。17 時間の血清飢餓状態を経て、アクロレイン(50 μ M)を添加し 3 時間インキュベートした。なおグリチルリチン(100 μ M)添加は、アクロレイン添加の 30 分前に行った。

核分画及び細胞質分画の抽出は、既報(Schreiber et al., 1989)を参考に行った。培地を除いて PBS で 2 回洗浄した後、トリプシン EDTA を用いて細胞を回収し、4°C、200 x *g* で 2 分間遠心した後、ペレットを PBS 1ml で懸濁し、4°C、500 x *g* で 3 分間遠心した。ペレットを 300 μ l のバッファーA (10mM HEPES,

10mM KCl, 0.1mM EGTA, 0.1mM EDTA, 1mM DTT) で懸濁し、氷上で 15 分間静置した。18.75 μ l の 10%NP-40 を加えてボルテックスで混合し、4°C、500 x *g* で 3 分間遠心した。この上清を細胞質分画として回収した。ペレットをバッファA 300 μ l で 2 回懸濁・洗浄した後、4°C、500 x *g* で 1 分間遠心し、ペレットをバッファB (20mM HEPES, 400mM NaCl, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 1mM DTT) で懸濁し、氷上で 15 分間静置した。ボルテックスで 10 秒間混合したのち、4°C、15000 x *bpm* で 15 分間遠心し、上清を核分画として回収した。細胞質分画、核分画サンプルのタンパク定量は RC-DC assay (BIORAD, CA, USA) を用いて行った。SDS バッファ及び 2-メルカプトエタノールを用いてサンプル濃度を揃えたのち、95°C で 3 分間ボイルした。SDS-PAGE を行い、蛋白を転写した PVDF メンブレンを 5% スキムミルクで 1 時間ブロッキングした後、4°C で一晩一次抗体反応を行った。使用した抗体と希釈倍率は以下の通りである。抗 HMGB1 抗体(1:10000, EPR3507, Abcam)、抗 PCNA 抗体(1:2000, #2586, Cell signaling)。一次抗体反応後にメンブレンを TBS-T(0.1% Tween-20) で洗浄し、二次抗体に室温 1 時間でインキュベートした。二次抗体には、goat anti-mouse IgG (H+L) horseradish peroxidase conjugate(1:4000, Jackson Immunoresearch) 及び goat anti-rabbit IgG (H+L) horseradish peroxidase conjugate(1:4000, Jackson Immunoresearch) を用いた。化学発光基質には SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate(Thermo Fisher Scientific) を用いた。観察には iBright imaging system (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

11. 統計解析

全ての結果は平均値±標準誤差で示した。また、2 群間の比較は student の t 検定、多群の比較は one-way ANOVA と post hoc 解析として Tukey-Kramer 法を用いて解析した。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。

結果

1. アクロレインと ROCK を介した Müller 細胞遊走に関する検討

1, ヒト PDR 線維血管組織における ROCK の局在

PDR 患者から得られた線維血管組織検体に免疫染色を行ったところ、GFAP (緑) 陽性細胞において ROCK1 (赤) の局在が確認された (図 6A)。一方、ROCK 2 (赤) も GFAP (緑) 陽性細胞でわずかに染色シグナルが認められたが、ROCK1 と比較するとその染色性は弱かった (図 6B)。

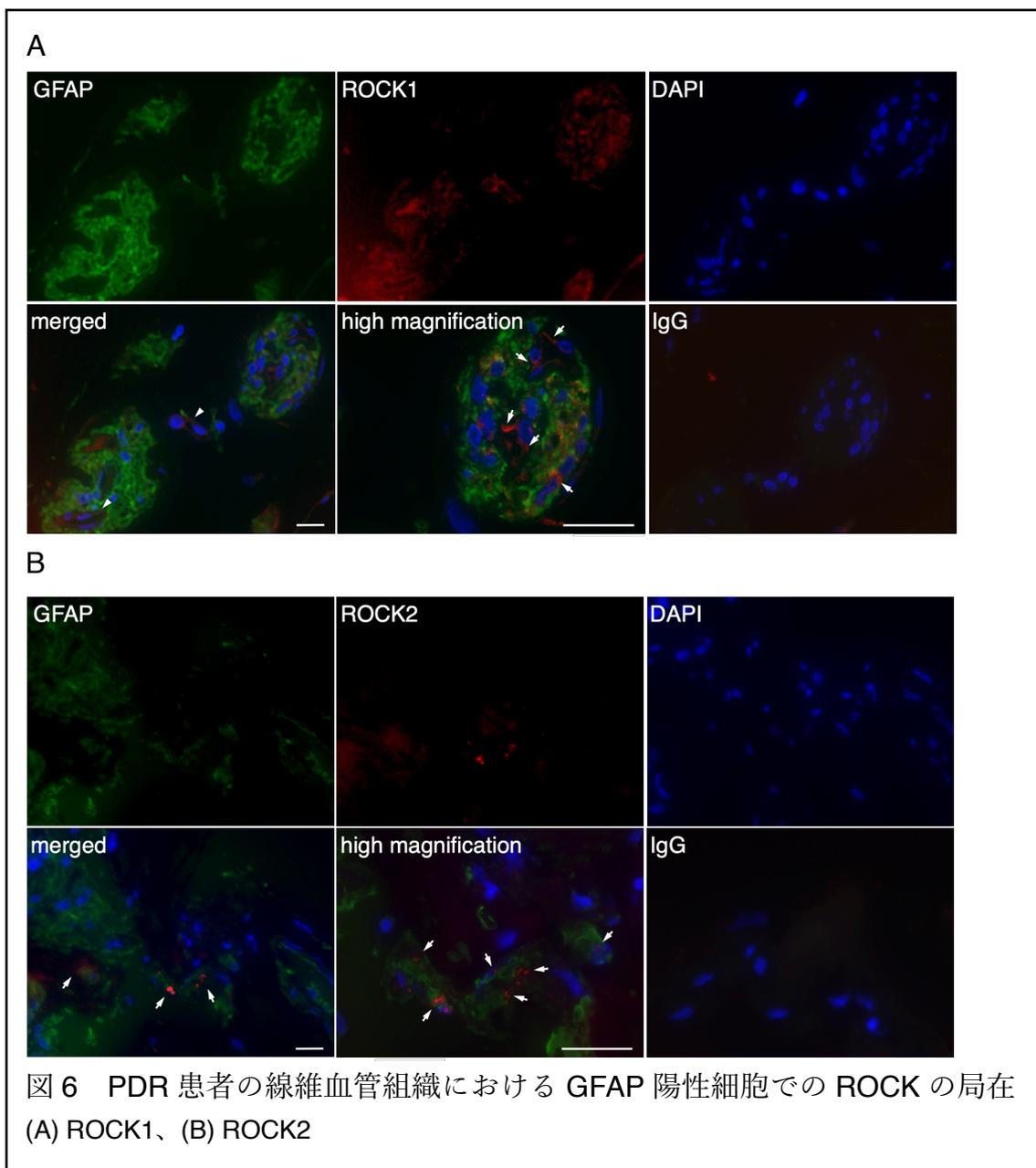
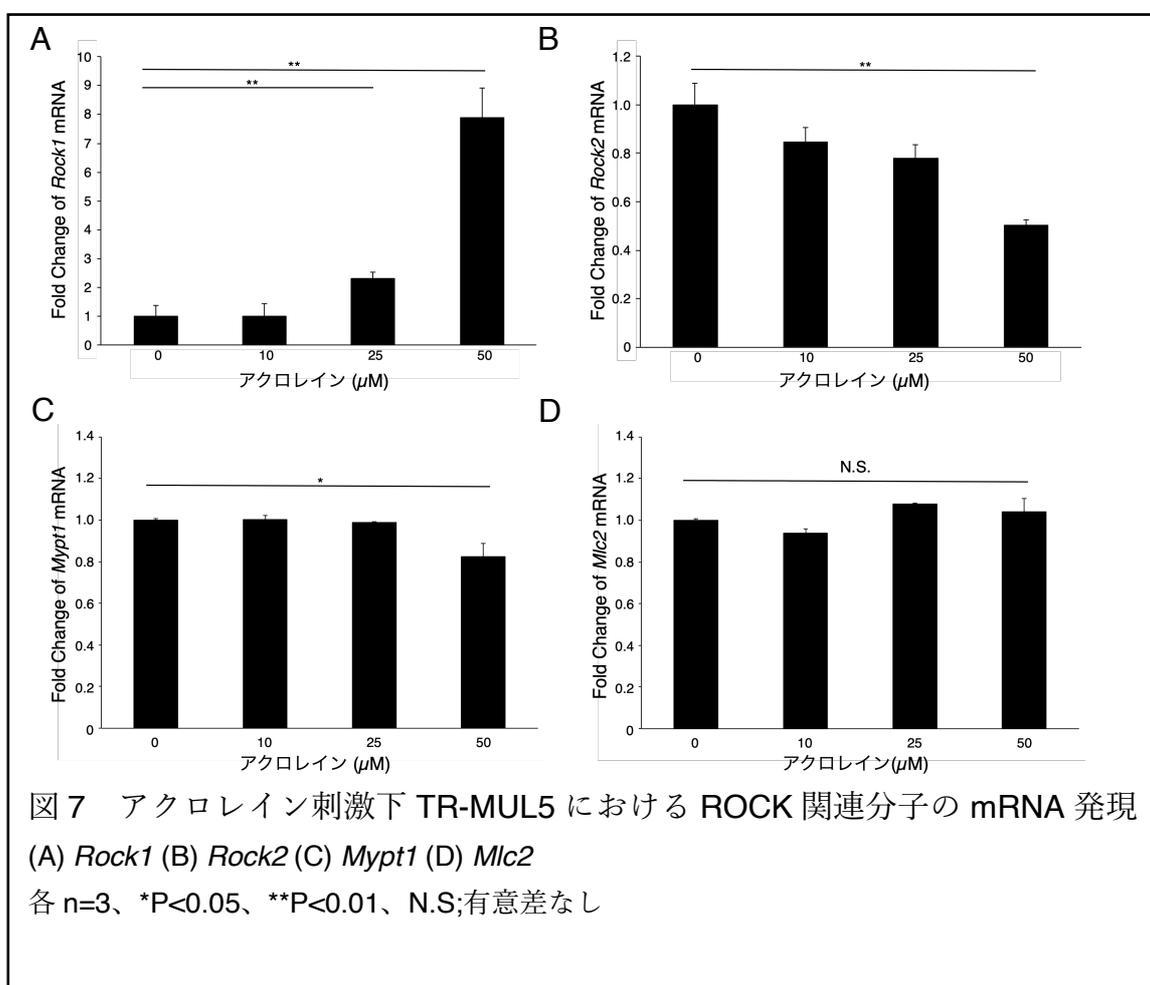


図 6 PDR 患者の線維血管組織における GFAP 陽性細胞での ROCK の局在 (A) ROCK1、(B) ROCK2

2, アクロレイン刺激下での ROCK および下流分子の発現変化

アクロレイン刺激によって、*Rock1* の mRNA 発現は有意に増加した (n=3, P<0.01, 図 7A)。一方で、*Rock2* の mRNA 発現はわずかに減少した (図 7B)。ROCK1 の下流分子である *Mypt1* と *Mlc2* の mRNA の発現には変化を認めなかった (図 7C,D)。また、western blotting を用いた検討ではアクロレイン刺激下の Müller 細胞において ROCK1 のタンパク量が増加していることが確認された (図 8A,B)。さらに、アクロレイン刺激下では ROCK1 が活性化した状態を示す cleaved ROCK1 の産生が増加していた (図 8A,C)。その一方で、MYPT1 と MLC2 の産生には変化がなかった (図 8D)。



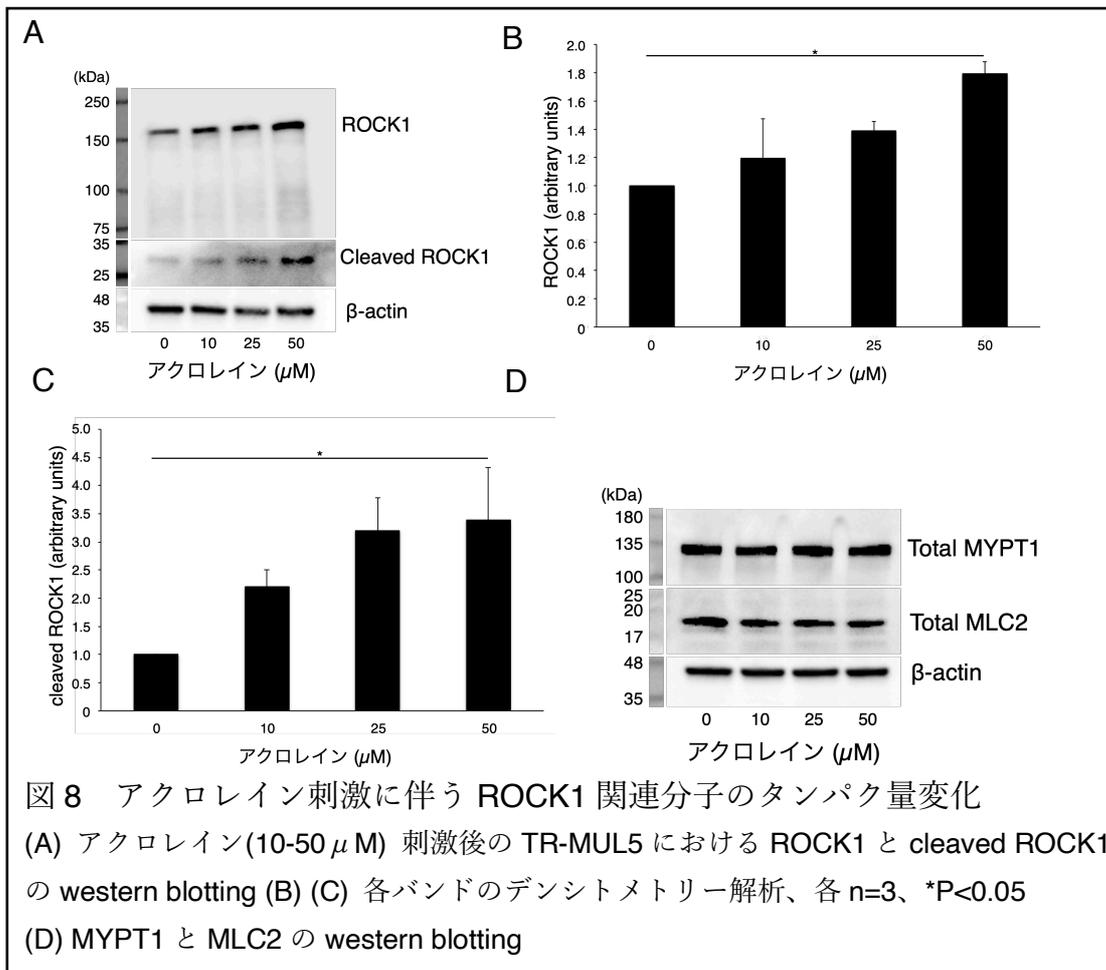
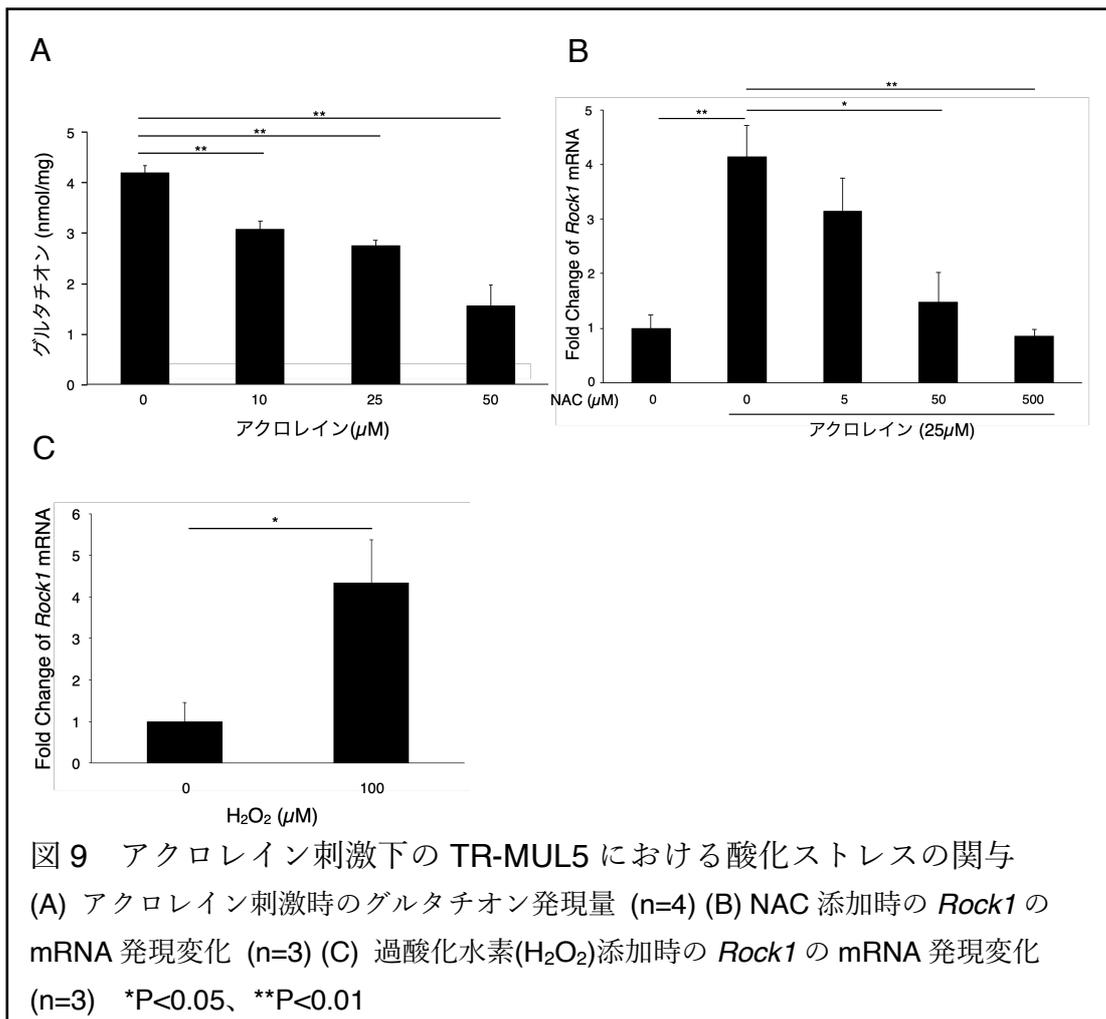


図 8 アクロレイン刺激に伴う ROCK1 関連分子のタンパク量変化
 (A) アクロレイン(10-50 μM) 刺激後の TR-MUL5 における ROCK1 と cleaved ROCK1 の western blotting (B) (C) 各バンドのデンストメトリー解析、各 n=3、*P<0.05
 (D) MYPT1 と MLC2 の western blotting

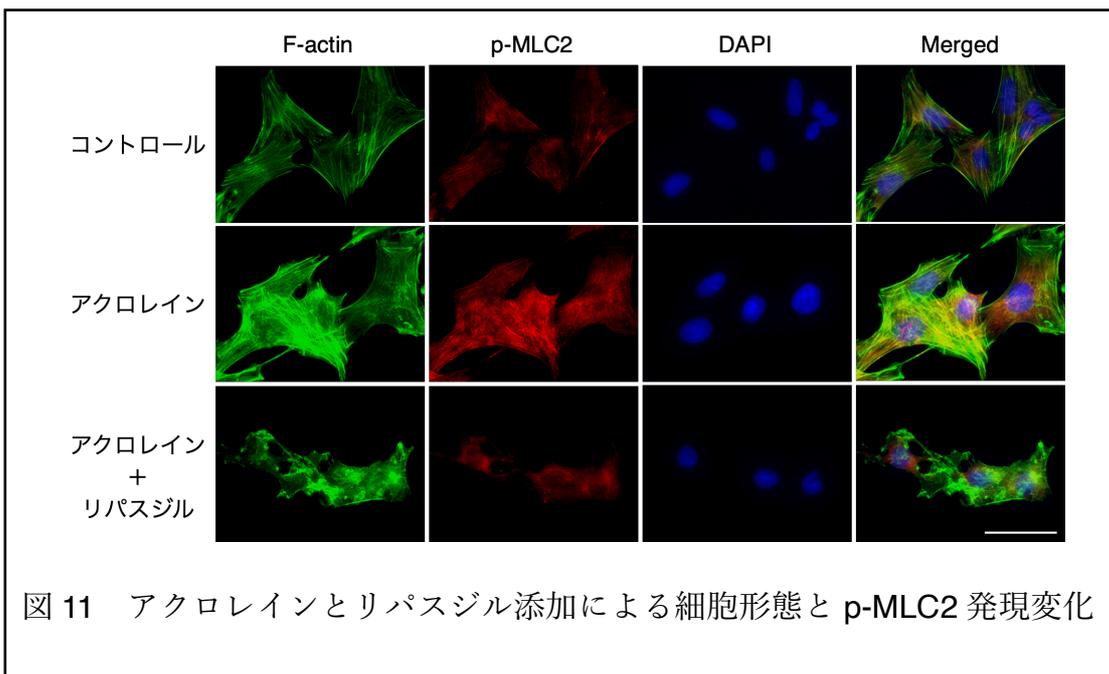
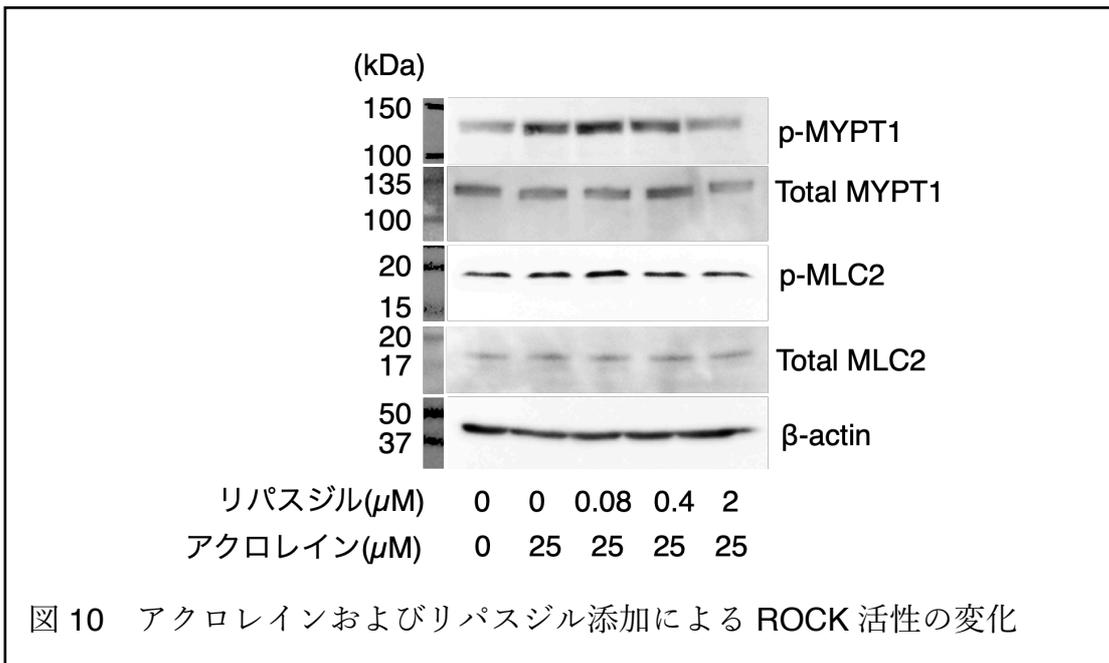
3. アクロレイン刺激下における ROCK1 産生増加への酸化ストレスの関与

ヒト線維血管組織の免疫染色結果および real-time PCR の結果から、我々は Müller 細胞における ROCK1 の産生増加に着目して実験を進めた。アクロレイン(10-50 μM)を TR-MUL5 に負荷すると、抗酸化物質であるグルタチオンが濃度依存性に減少することが確認できた (n=4, P<0.01, 図 9A)。また、TR-MUL5 に対するアクロレイン刺激によって *Rock1* mRNA の発現は約 4 倍上昇し、その変化は抗酸化物質である NAC で有意に抑制された (n=3, P<0.01, 図 9B)。さらに、活性酸素種の一つである過酸化水素(H₂O₂)を TR-MUL5 に負荷すると、*Rock1* の mRNA 発現は上昇した (n=3, P<0.05, 図 9C)。



4. ROCK1-pMYPT1-pMLC 経路の活性化

アクロレインと ROCK 阻害剤リパスジルが ROCK1 とその下流分子に与える影響を調べるため、ROCK1 の活性の指標として用いられる MYPT1 と MLC2 のリン酸化について western blotting で検討した。アクロレイン(25 μM)を TR-MUL5 に負荷すると、MYPT1 と MLC2 のリン酸化は増加した一方で、MYPT1 と MLC2 の総量は変化しなかった。また、リパスジル(2 μM)はアクロレイン刺激による MYPT1 と MLC2 のリン酸化を抑制した (図 10)。免疫染色では、アクロレイン刺激によって TR-MUL5 のアクチンストレスファイバーの染色が増強されているのに対し、リパスジル投与を行なった細胞ではアクチン細胞骨格が脱重合される様子が観察された。同様に、pMLC2 の染色もアクロレイン刺激で増強されたが、リパスジルによって抑制された (図 11)。



5, リパスジルによる Müller 細胞遊走の抑制

ROCK1 と Müller 細胞の遊走の関連について調べるため、アクロレイン刺激を加えた TR-MUL5 において Oris™ migration assay を行った。アクロレインは TR-MUL5 の遊走を有意に増加させ (n=4, P<0.01)、リパスジル(0.4 μM, 2 μM)がその変化を抑制することがわかった(n=4, P<0.05, 図 12A-F)。

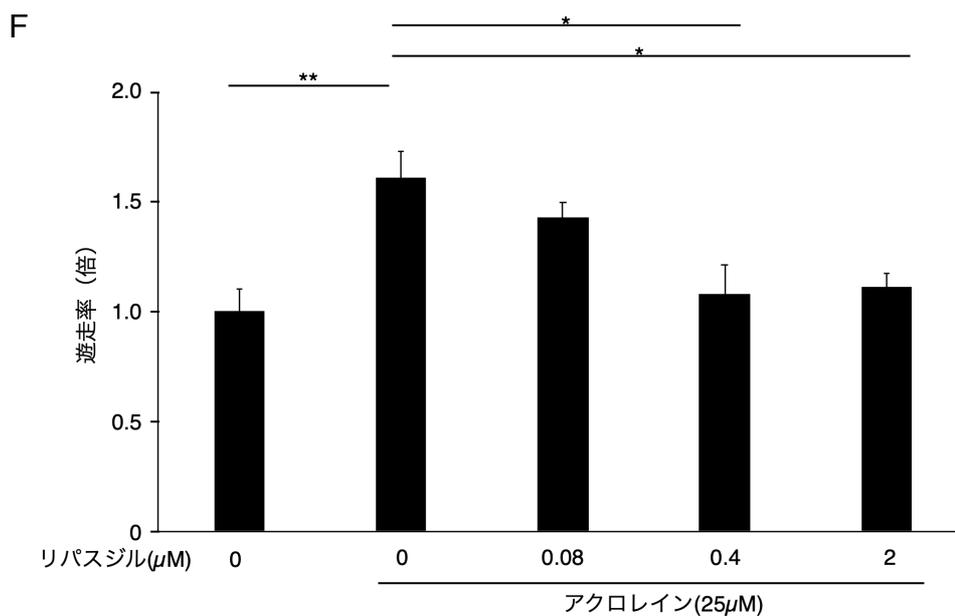
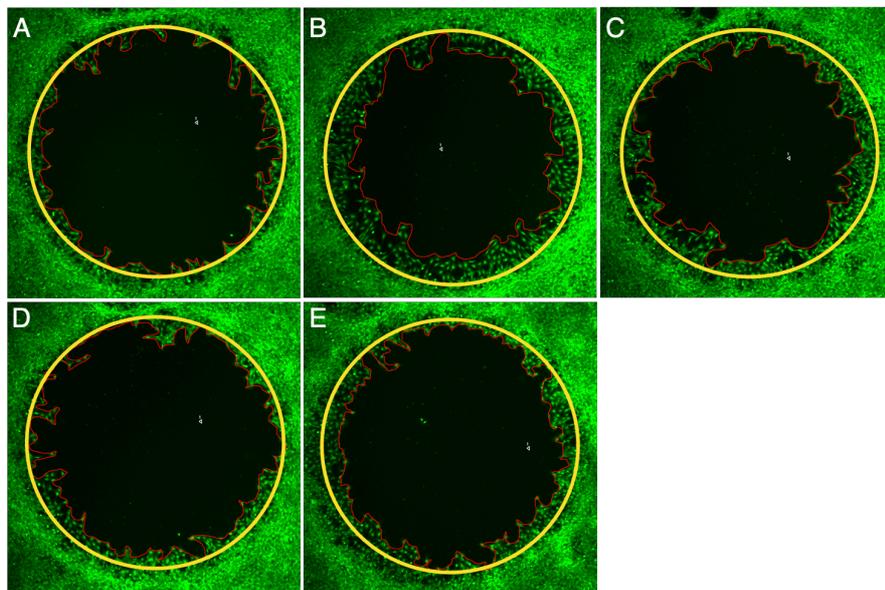


図 12 アクロレインおよびリパスジル添加による細胞遊走能の変化
 (A) コントロール (B) アクロレイン 25 μM (C) アクロレイン+リパスジル 0.08 μM
 (D) アクロレイン+リパスジル 0.4 μM (E) アクロレイン+リパスジル 2 μM
 各 n=4、*P<0.05、**P<0.01

2. アクロレインによる Müller 細胞の MCP-1 発現誘導に関する検討

1, アクロレイン添加 TR-MUL5 の DNA マイクロアレイ解析

アクロレイン添加によって発現変化する遺伝子を調べるため、アクロレインを添加した TR-MUL5 の遺伝子発現を DNA マイクロアレイ解析で評価したところ、表 4 に示すように複数の遺伝子に発現増加が認められた。*Mcp1* はコントロールと比較して約 12 倍の発現増加がみられた。

順位	遺伝子記号	Genbank Accession	コントロール	アクロレイン25 μ M添加	コントロール比(倍)
1	Cxcl1	NM_030845	8.5	364.3	43
2	Fosl1	NM_012953	46.8	1386.3	29.6
3	Hmox1	NM_012580	1354.8	36866.5	27.2
4	Osgin1	NM_138504	47.4	816	17.2
5	Srxn1	NM_001047858	1165.2	19266.5	16.5
6	Mcp1	NM_031530	98.1	1163.3	11.9
7	Gdf15	NM_019216	8.3	93.2	11.2
8	Atf3	NM_012912	242.4	1819.8	7.5
9	Dusp5	NM_133578	192	1409.8	7.3
10	Phlda1	NM_017180	39	265.6	6.8

2, PDR 患者硝子体における MCP-1 と FDP-lys 濃度の上昇

PDR 患者(PDR 群 12 名)の硝子体中で、MCP-1 濃度は対照群(黄斑前膜または黄斑円孔 9 名)と比較して有意に上昇していた($P < 0.01$) (図 13A)。また、PDR 群における MCP-1 の濃度はアクロレイン結合蛋白 FDP-lys の濃度と有意な正の相関が認められた ($r = 0.60$, $P < 0.05$) (図 13B)。

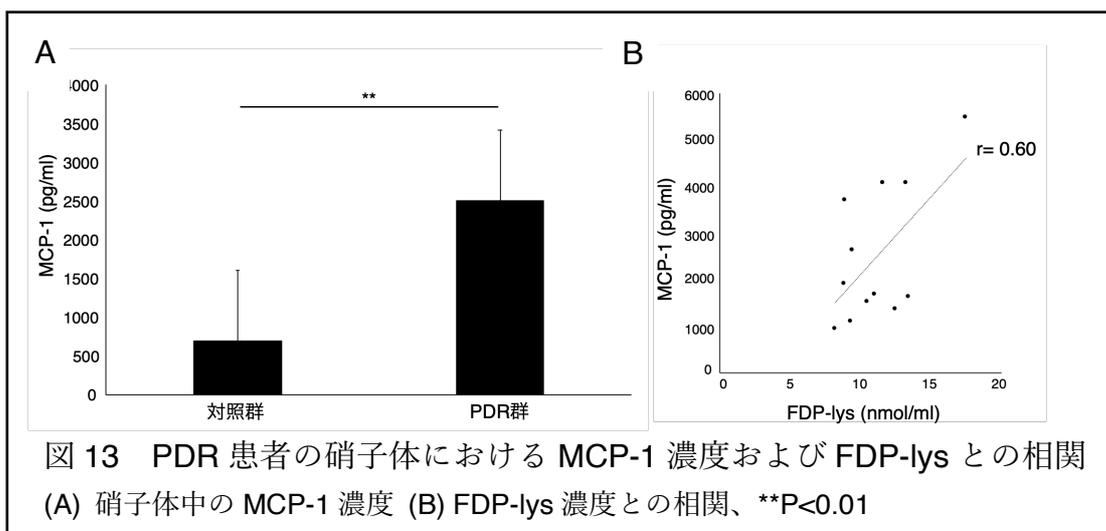
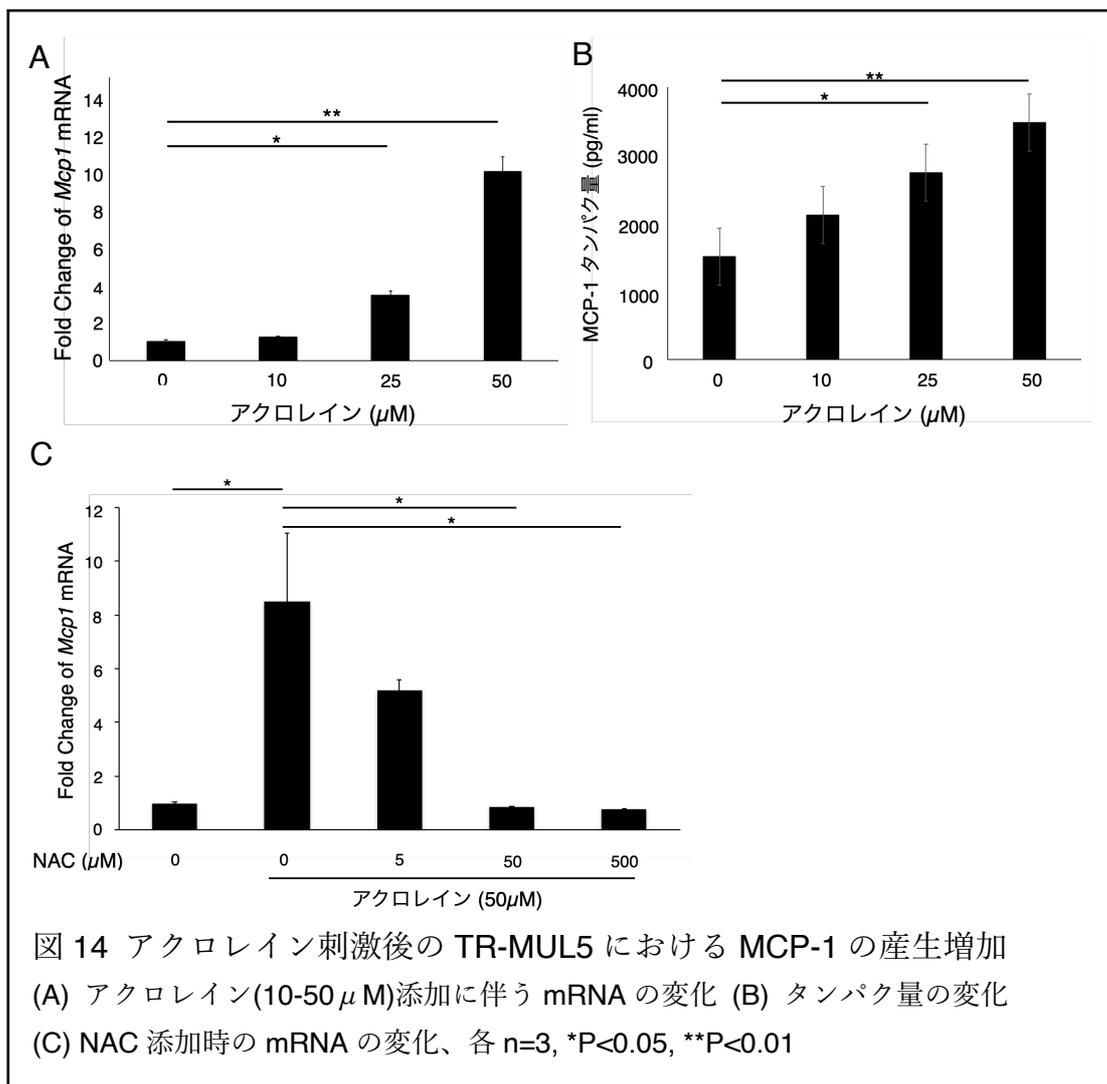


図 13 PDR 患者の硝子体における MCP-1 濃度および FDP-lys との相関
(A) 硝子体中の MCP-1 濃度 (B) FDP-lys 濃度との相関、** $P < 0.01$

3, アクロレイン刺激下での Müller 細胞における MCP-1 産生増加

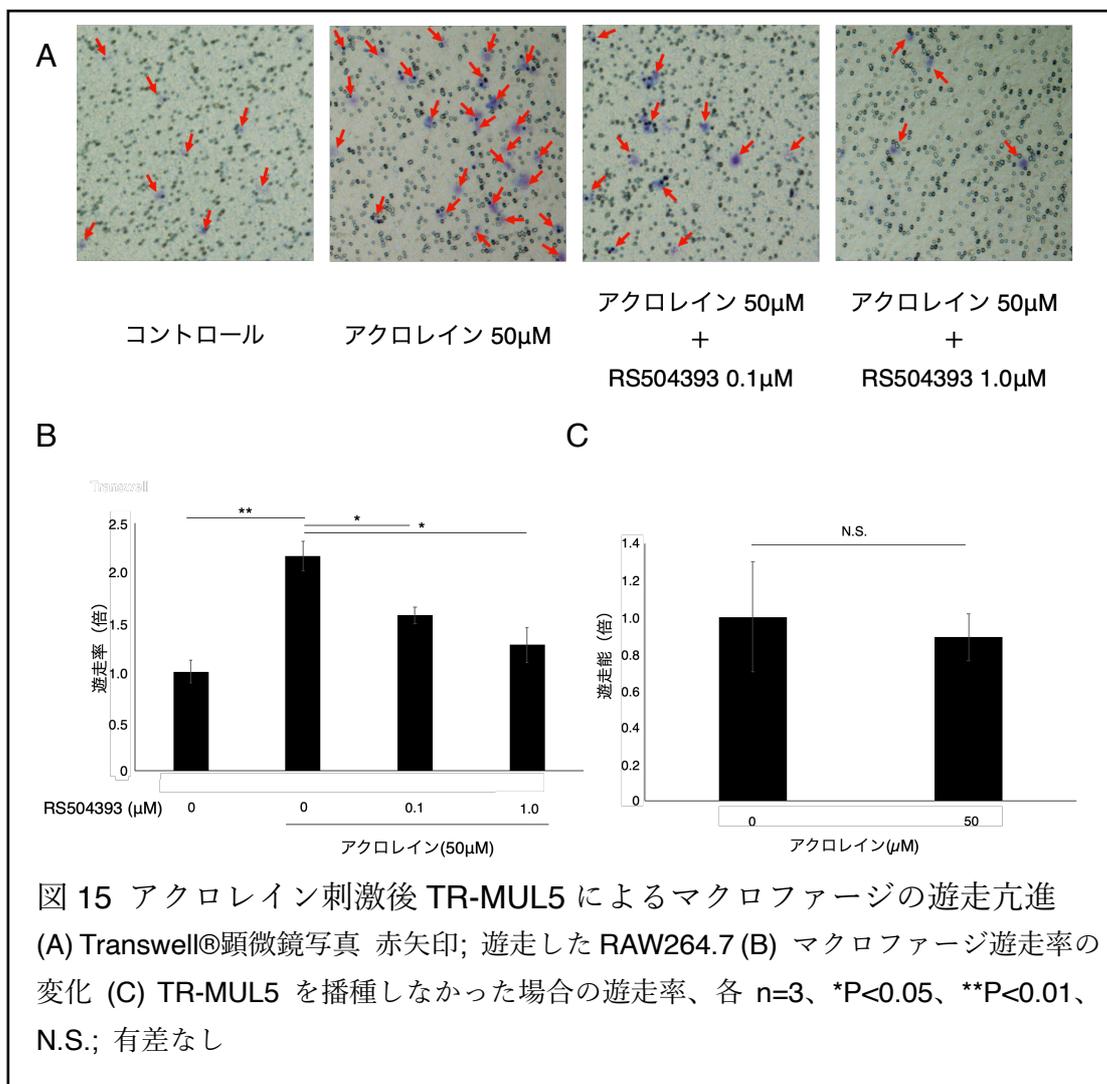
TR-MUL5 にアクロレイン(10-50 μ M)を添加したところ、*Mcp1* mRNA の発現量は有意に増加した($P < 0.01$)(図 14A)。また、培養上清における MCP-1 蛋白濃度を ELISA で定量したところ、アクロレイン添加による MCP-1 産生の有意な増加が認められた($P < 0.01$)(図 14B)。また、酸化ストレスとの関連を調べるために NAC を添加したところ、アクロレイン刺激で増加した *Mcp1* mRNA 発現は抑制された($P < 0.05$)(図 14C)。



4, アクロレイン添加 Müller 細胞による MCP-1 を介したマクロファージの誘導

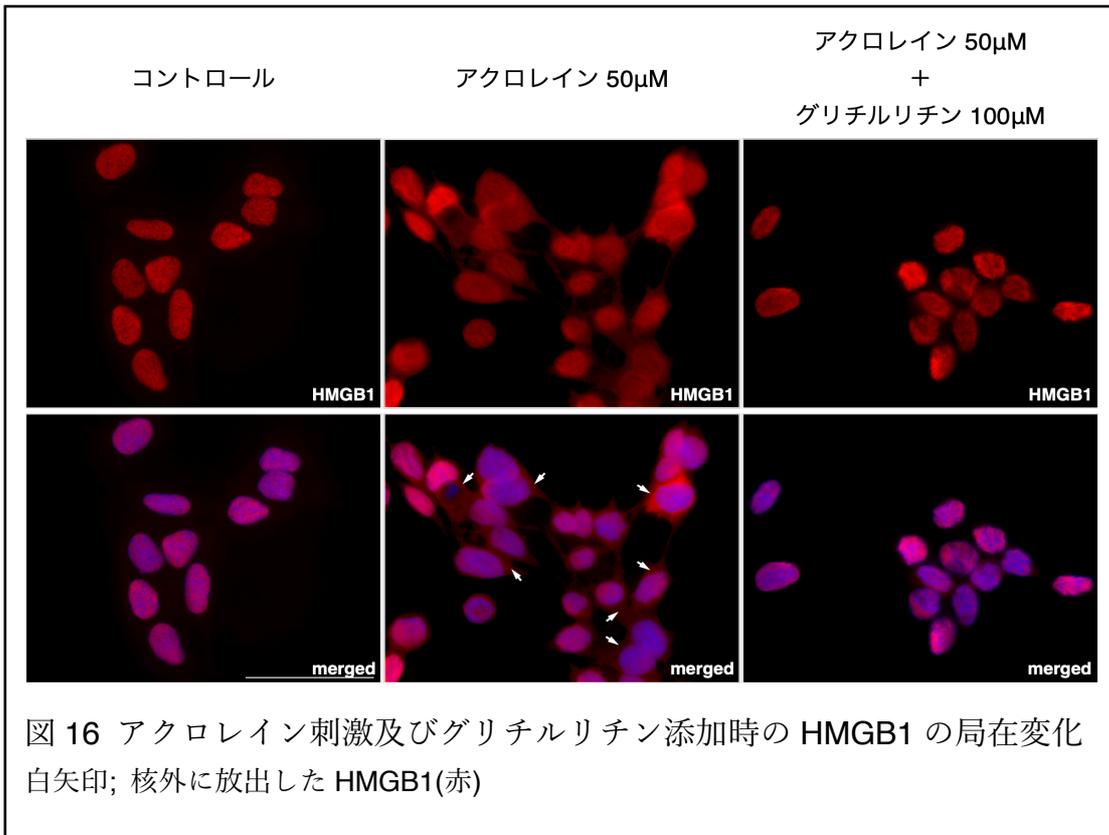
Müller 細胞から放出された MCP-1 の役割を調べるために Transwell® assay を行ったところ、アクロレイン添加により有意に RAW264.7 の遊走が亢進し、MCP-1 の主な受容体である CCR2 に対する阻害剤 RS504393 を RAW264.7 に添加するとその遊走亢進は抑制された ($P < 0.05$) (図 15AB)。

また、アクロレイン自体によるマクロファージ遊走亢進作用の有無について検討するため、培地のみアクロレインを添加した際の RAW264.7 における遊走変化を観察したところ、TR-MUL5 非存在下でアクロレインを培地に添加したのみでは RAW264.7 の遊走に変化は生じなかった (図 15C)。



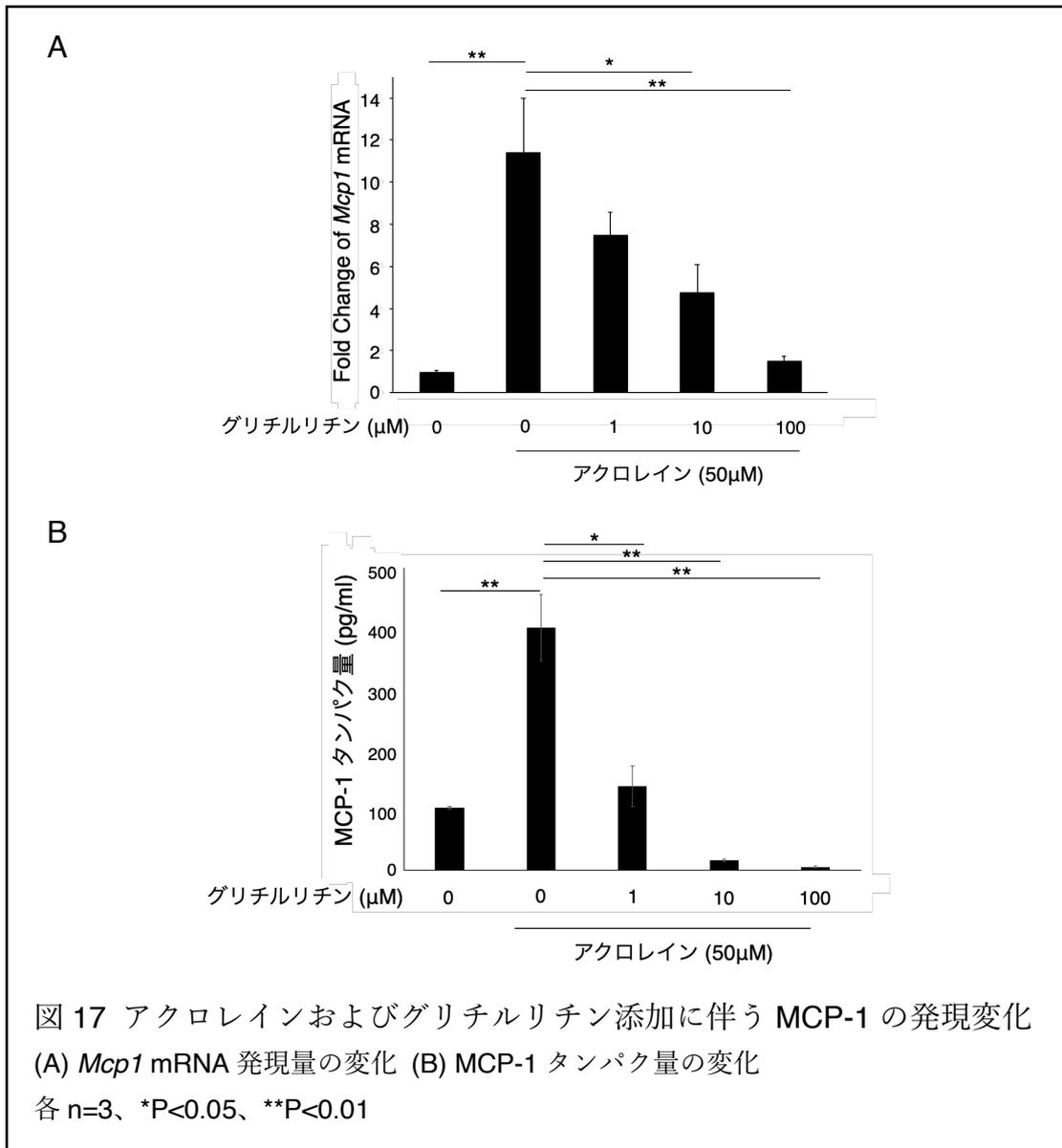
5, アクロレイン刺激による HMGB1 の局在変化

アクロレイン(50 μ M)刺激下の TR-MUL5 で HMGB1 が核から細胞質へ移行する様子が免疫染色法を用いて確認された。HMGB1 阻害剤であるグリチルリチンは HMGB1 に直接結合することにより、HMGB1 を核内に留める作用があることが報告されている (Mollica et al., 2007 ; Li et al., 2019)。アクロレイン刺激による HMGB1 の核から細胞質への移行はグリチルリチン(100 μ M)添加によって抑制された (図 16)。



6, Müller 細胞からの MCP-1 産生における HMGB1 の関与

アクロレイン(50 μ M)刺激を行った TR-MUL5 にグリチルリチン(1-100 μ M)を加えて real-time PCR を行ったところ、アクロレインによって増加した *Mcp1* mRNA 発現はグリチルリチンによって有意に抑制された (P<0.01) (図 17A)。また、ELISA でタンパク量を測定したところ、アクロレインで増加した MCP-1 の産生はグリチルリチンで同様に抑制された (P<0.01) (図 17B)。



7, TR-MUL5 における HMGB1 受容体の発現

当初我々は、TR-MUL5 から HMGB1 が細胞外に放出され、オートクリンに細胞膜表面の受容体に結合することで MCP-1 産生を誘導するのではないかと考えていた。そこで、TR-MUL5 に HMGB1 の受容体が存在するか調べるため、半定量 PCR を施行したところ、TR-MUL5 には HMGB1 の主な受容体である RAGE や Toll-like Receptor 4 (TLR4) が発現していることが明らかとなった (図 18A)。そこで、アクロレインを负荷した TR-MUL5 に RAGE 阻害剤 FPS-ZM および TLR4 阻害剤 TAK-242 を添加し *Mcp1* mRNA 発現の変化を調べたが、それらの受容体を阻害しても TR-MUL5 における *Mcp1* mRNA 発現量は変化し

なかった (図 18B)。

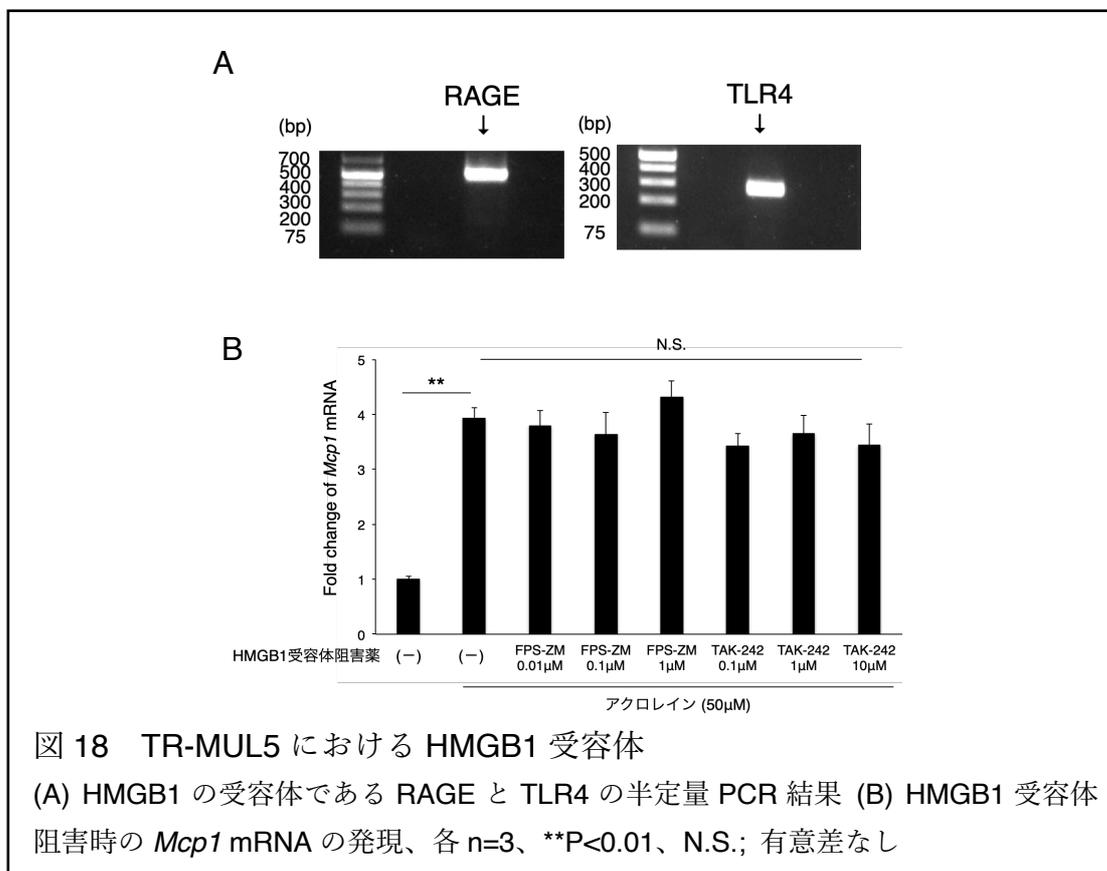
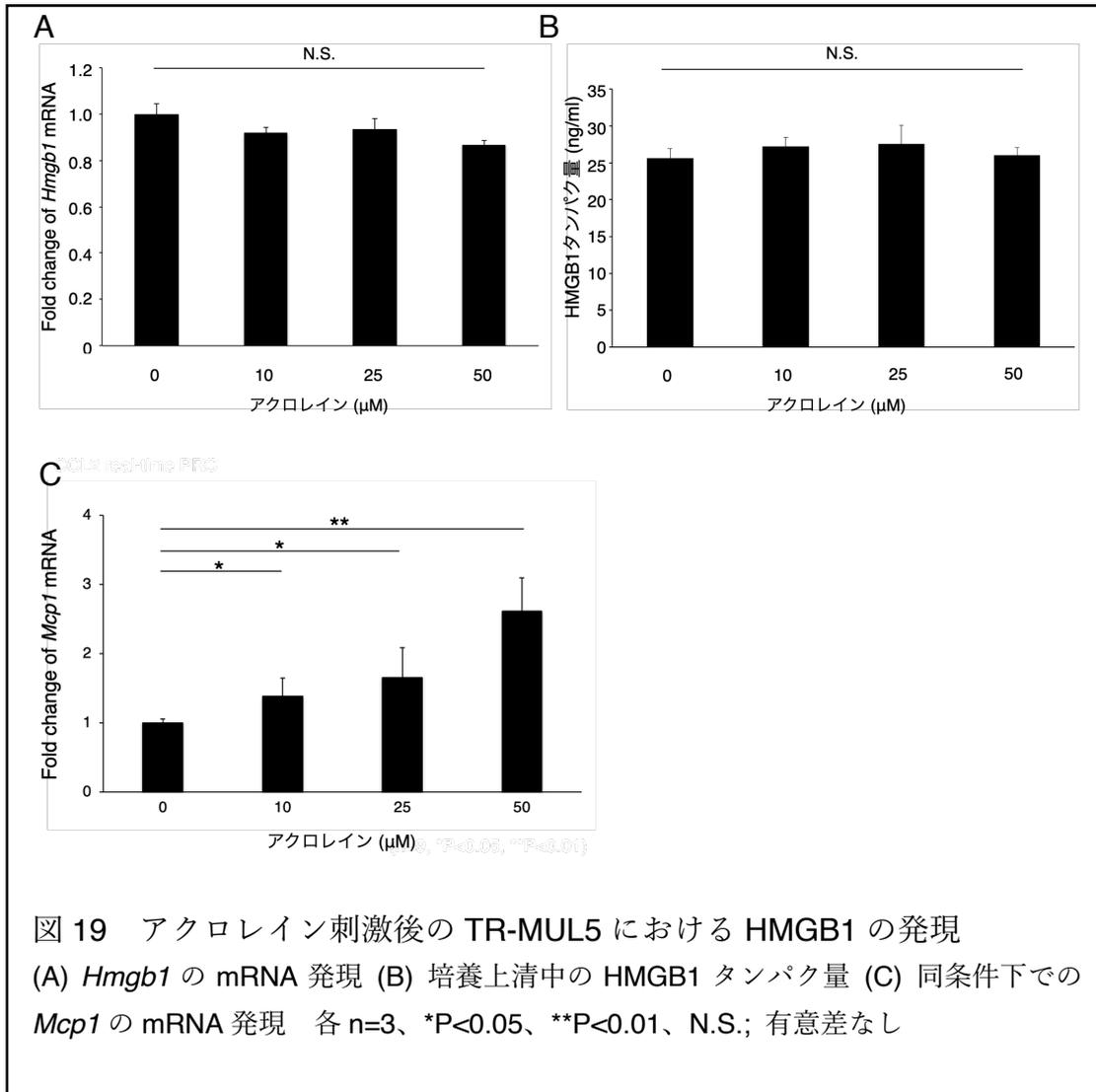


図 18 TR-MUL5 における HMGB1 受容体

(A) HMGB1 の受容体である RAGE と TLR4 の半定量 PCR 結果 (B) HMGB1 受容体阻害時の *Mcp1* mRNA の発現、各 n=3、**P<0.01、N.S.; 有意差なし

8, アクロレイン刺激下 Müller 細胞における HMGB1 の発現変化

7 と同様に、アクロレイン負荷により細胞外に放出された HMGB1 がオートクリンに TR-MUL5 に作用するという仮説の下、アクロレイン刺激下 TR-MUL5 における *Hmgb1* の mRNA 発現の変化及び培養上清中の HMGB1 蛋白濃度を調べた。その結果、アクロレイン(10-50 μM)刺激によって TR-MUL5 における *Hmgb1* の mRNA 発現量は変化しなかった (図 19A)。また、培養上清中の HMGB1 タンパク量も変化しなかった (図 19B)。一方で、同様の条件で TR-MUL5 における *Mcp1* の mRNA 発現量は増加していた (図 19C)。



9, アクロレイン刺激に伴う HMGB1 の細胞内局在変化

前述 7 および 8 の結果から、アクロレイン刺激によって細胞外に分泌された HMGB1 が RAGE や TLR4 への結合を介して TR-MUL5 へオートクリンに作用するという仮説は否定された。そこで我々は、前述 1 の免疫染色の結果から、HMGB1 が核から細胞質に移行することが MCP-1 の産生増加に寄与しているのではないかと考え、アクロレイン刺激下の TR-MUL5 を核成分と細胞質成分に分け western blotting を行った。その結果、アクロレインを添加すると核成分において HMGB1 が減少し、さらにグリチルリチンを添加するとその変化が抑制されることが明らかとなった。一方、細胞質成分は核成分と逆の挙動を示し、アクロレイン添加で HMGB1 が増加し、グリチルリチン添加でその変化が抑制された (図 20)。

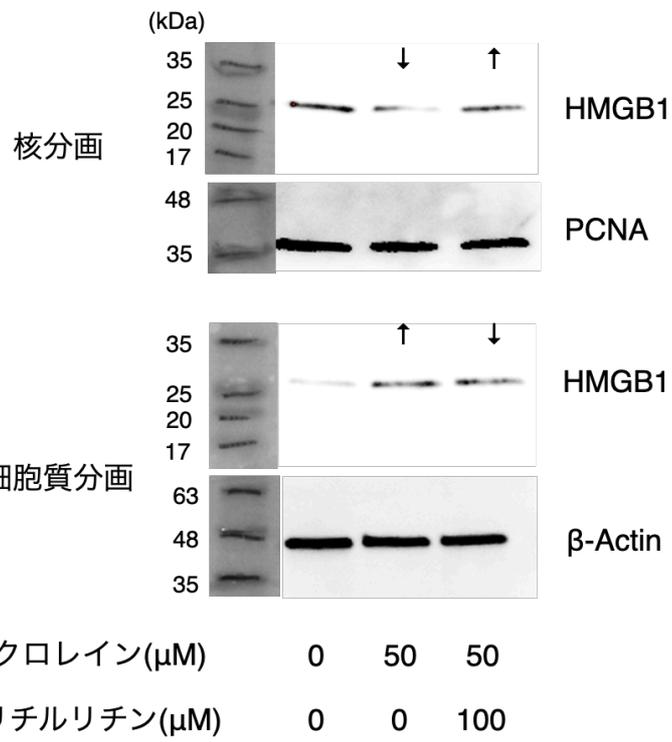


図 20 アクロレインおよびグリチルリチン添加に伴う HMGB1 の各細胞分画における発現

考察

本研究では、DR 眼内で増加する不飽和アルデヒド・アクロレインが Müller 細胞に与える影響について検討した。その結果として、アクロレインが ROCK1 を介して Müller 細胞の遊走を促進すること、アクロレインが Müller 細胞からの MCP-1 放出を促進してマクロファージの遊走を誘導すること、その機序には HMGB1 の細胞内局在変化が関与していること、などが明らかとなった。Müller 細胞におけるこれらの解析は、渉猟する限り本研究が初めてである。

1. アクロレインと ROCK を介した Müller 細胞遊走に関する検討

本研究では、Müller 細胞が遊走する機序に着目して検討を行った。Müller 細胞は通常、主に網膜の栄養・代謝や血流調整を担っているが、DR 病態では硝子体腔内に遊走することが知られており (Nork et al., 1987)、その際に炎症性サイトカインを放出することによって線維血管組織の形成に寄与すると考えられている (Taghavi et al., 2019)。本検討では初めに、ROCK が PDR 患者の線維血管組織において、GFAP 陽性細胞の細胞質に存在していることを明らかとした。GFAP はグリア細胞のマーカーであり、Müller 細胞は定常状態においては GFAP 陰性であるが、DR 病態において活性化すると GFAP 陽性になることがわかっている (Barber et al., 2000)。我々は過去に、アクロレイン結合蛋白である FDP-lys が PDR 患者の線維血管組織において GFAP 陽性細胞に局在していることを報告しており (Dong et al., 2017)、本研究結果は FDP-lys と ROCK が線維血管組織中の Müller 細胞に共局在することを示唆していた。

本検討において PDR 患者の線維血管組織における GFAP 陽性細胞では ROCK1 の染色シグナルが強く認められた一方、ROCK2 の染色シグナルは弱かった。また、アクロレイン刺激によって培養 Müller 細胞における ROCK1 の産生は亢進した一方で、ROCK2 は増加しなかった。ROCK1 と ROCK2 は高い相同性を有しているが、ROCK1 と ROCK2 のノックアウトマウスを用いた検討ではこの 2 つの分子は厳密には別の役割を持つことが示されており (Shi et al., 2013)、ROCK1 は MLC2 のリン酸化を亢進することでアクトミオシン活性化を介して細胞骨格の収縮を引き起こす一方で、ROCK2 はむしろ細胞骨格の安定化に作用していることが報告されている。したがって、DR 病態下の Müller 細胞においては ROCK1 のみが活性化され、細胞の遊走が促進されていると考えた。

培養 Müller 細胞を使った実験において、アクロレインは酸化ストレスを介し ROCK1 を活性化させることによって下流分子である MYPT1 と MLC2 のリン酸化を亢進させ、Müller 細胞の遊走を惹起することが示された。アクロレイン

は生体内において、抗酸化物質であるグルタチオンと結合して枯渇させることによって酸化ストレスを誘導することが知られている (Kehrer and Biswal, 2000 ; Luo and Shi, 2005 ; Jia et al., 2007 ; Sun et al., 2015)。本研究においても、アクロレイン添加によって Müller 細胞内のグルタチオンは減少し、アクロレイン添加による *Rock1* mRNA 増加が抗酸化物質 NAC の投与によって抑制された。本結果から、アクロレイン添加後の Müller 細胞における ROCK1 の増加にはアクロレインがグルタチオンに結合することによって生じる酸化ストレスが介在していることが明らかとなった。また、アクロレイン添加によって ROCK1 の下流分子である MYPT1 と MLC2 のリン酸化が促進し、ROCK 阻害剤リパスジルによってその変化が抑制された。さらに、アクロレインを添加した Müller 細胞では ROCK1 の活性型である cleaved ROCK1 のタンパク量も増加していた。これらの結果から、アクロレインは ROCK1 を増加させるだけでなく、その活性化を促進することで下流分子のリン酸化を介してアクトミオシン活性化を惹起し、Müller 細胞の遊走に寄与していることが示唆された。

最後に、ROCK 阻害剤リパスジルは Müller 細胞のアクチン重合を抑制し、その遊走を抑制する効果が認められた。リパスジルは、すでに緑内障に対する点眼薬として広く臨床使用されている薬剤である。一連の検討結果は、リパスジルを用いて Müller 細胞の遊走を抑制することで DR における線維血管組織形成を阻止できる可能性を示していた。

2. アクロレインによる Müller 細胞の MCP-1 発現誘導に関する検討

本研究では、Müller 細胞における MCP-1 の産生およびマクロファージの誘導に着目して検討を行った。まず、アクロレイン刺激下 Müller 細胞を DNA マイクロアレイ解析にかけた結果、MCP-1 の遺伝子発現が約 12 倍に上昇していた。同スクリーニングデータからアクロレインと MCP-1 の関連に着目し、PDR 患者硝子体中における MCP-1 濃度増加、そして MCP-1 濃度とアクロレイン結合蛋白 FDP-lys 濃度との相関を見出した。

Müller 細胞が DR 病態において活性化されることは前述の通りだが、その際に MCP-1 産生も増加することも報告がある (Eastlake et al., 2016)。また、PDR の硝子体中で MCP-1 が増加していること (Matsumoto et al., 2002 ; Mitamura et al., 2001) や、硝子体中の MCP-1 濃度は PDR の重篤度と相関していること (Hernández et al., 2005) も報告されている。本研究でも既報と同様に PDR 患者硝子体における MCP-1 増加が確認された。さらに我々は MCP-1 濃度と FDP-lys 濃度との有意な相関を認めており、これは DNA マイクロアレイ解析の結果と矛盾しないものと考えられた。

培養 Müller 細胞にアクロレインを負荷すると *Mcp1* mRNA 発現が上昇し、培

養上清中の MCP-1 タンパク量が増加した。さらに、NAC を投与することによって同変化は抑制された。前述の如く、アクロレインは細胞内のグルタチオンに結合することで酸化ストレスを惹起することが知られており、これらの結果からアクロレインは酸化ストレスを介して MCP-1 の発現誘導を行なっていると考えられた。酸化ストレスが Müller 細胞からの MCP-1 産生を誘導するという報告はこれまでになく、本研究が初めてである。

さらに我々は Transwell® assay を用いて、TR-MUL5 から分泌された MCP-1 がマクロファージの遊走を惹起することを見出した。白血球の遊走は DR における重要な病態促進機構として知られる (Noda et al., 2012)。DR の背景には慢性的な炎症病態が存在することが知られており (Antonetti et al., 2006 ; Gardner et al., 2002)、炎症状態において血管外へ遊走した白血球が血管内皮細胞に接着して血管障害を引き起こすこと (Miyamoto et al., 1999) や、線維血管組織の構成細胞となっていること (Yanoff M, 2015) が報告されている。

背景で述べたように、アクロレインは眼内で血管内皮細胞では VAP-1、網膜グリア細胞では SMOX を介して産生されることがわかっている (Murata et al., 2020)。また、DR 眼内において VAP-1 自体も白血球遊走を惹起する分子であることが知られている (Noda et al., 2012)。アクロレインはその産生経路の上流にある VAP-1、そして下流分子である MCP-1 の双方ともに眼内炎症を惹起する白血球の遊走に関わっており、本検討結果によってアクロレインが DR の病態形成に重要な役割を演じていることが示唆された。

また、本検討ではアクロレインによる Müller 細胞における MCP-1 発現誘導を仲介する分子として HMGB1 に着目した。HMGB1 は通常核内で転写制御などクロマチン構造の安定化などを担っているが、細胞へのストレスなどが生じると受動的もしくは能動的に細胞外へ分泌され、RAGE や TLR4 などの分子を介して炎症サイトカイン産生を促進することが様々な細胞を用いた検討で報告されてきた (Kang et al., 2014 ; Faraco et al., 2007)。そのため、本研究でも当初は HMGB1 の細胞外への分泌が行われることが MCP-1 発現誘導に関与していると仮説を立てて検証したが、アクロレイン刺激による Müller 細胞から細胞外への HMGB1 の分泌は確認されず、RAGE や TLR4 に対する阻害剤を用いた実験でも *Mcp1* mRNA 発現は変化しなかった。一方、HMGB1 の特異的な阻害剤グリチルリチンはアクロレイン刺激に伴う MCP-1 の産生増加を、遺伝子レベルおよび蛋白レベルにおいて著明に抑制した。そこで我々は、Müller 細胞においては HMGB1 の細胞外分泌でなく、同分子の細胞内における局在変化が MCP-1 の産生増加に関わっているのではないかという 2 つ目の仮説を立てて検証を行なった。

HMGB1 の細胞内局在変化に関する既報は複数存在し、過酸化水素による酸

化ストレスを負荷したマクロファージにおいて、核から細胞質への HMGB1 の局在変化が生じたこと (Tang et al., 2007)、タバコ抽出物を添加した肺胞マクロファージにおいて HMGB1 が核内から細胞質にその局在を変化させ、マクロファージの遊走や炎症性サイトカインの産生を惹起したこと (Le et al., 2020) などが報告されている。核内において HMGB1 は多数の遺伝子の転写調節領域や RNA に結合することで転写やスプライシングなどを制御しており (Sofiadis et al., 2021)、核内の HMGB1 に対する選択的ノックダウンは炎症病態を惹起することが報告されている (De Toma et al., 2014)。さらに興味深いことに、近年発表された角化細胞を用いた接触性皮膚炎に関する研究では、HMGB1 は核内に存在することで炎症に対して保護的に作用することが報告されている (Senda et al., 2021)。

本研究においても、Müller 細胞においてアクロレイン刺激によって誘導される MCP-1 産生は、細胞外に放出される HMGB1 による炎症促進作用ではなく、HMGB1 の核外移行が寄与していることを強く示唆している。Müller 細胞における同様の報告はなく、もしこの仮説が証明された場合は新たな知見になると考える。現在、TR-MUL5 における HMGB1 のノックダウンを行い、MCP-1 の発現が変化するかについて検討を行なっている。

最後に、本研究で用いた臨床検体は PDR 患者の硝子体であるものの、MCP-1 は PDR だけに留まらず、DR 早期の病態にも関連していると考えられている。(Tashimo et al., 2004 ; Dong et al., 2012)。本研究結果は、アクロレインが MCP-1 産生の上流分子の一つであることを示し、アクロレイン阻害は DR 早期からの治療介入となり得ることを示唆している。アクロレインに対する阻害剤はすでに癌治療中の膀胱障害に対する薬剤として臨床応用されており、同薬剤が DR に適用できるのかについて今後さらなる研究を進めていきたい。

結論

本研究全体から得られた新知見は以下の通りである。

- 1) アクロレインが ROCK1 を介して Müller 細胞の遊走を誘導すること
- 2) アクロレインが HMGB1 の細胞内における局在変化を介して Müller 細胞からの MCP-1 分泌を促進し、マクロファージの遊走を誘導すること

これらの知見から、アクロレイン、ROCK1 および HMGB1 が Müller 細胞による DR 病態形成に寄与しており、これらの分子が新たな治療標的となる可能性が明らかとなった。しかし、本研究では HMGB1 の細胞内局在変化がどのようにして MCP-1 の発現変化につながるかを検討しきれていない。現在、HMGB1 のノックダウンを行い、核内から HMGB1 が除去されることによって MCP-1 の発現がどのように変化するのかを解析中である。また、生体内におけるアクロレインや ROCK、HMGB1 に対する阻害が DR に及ぼす影響を検討するために、今後は糖尿病モデルを使った動物実験も行っていきたいと考えている。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂き、多大なる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 野田航介准教授、村田美幸特任助教に厚く御礼を申し上げます。また、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佐員、吉田志帆技術補佐員に厚く御礼を申し上げます。最後に、公私ともにサポートして下さいました大学院の諸先輩方ならびに大学院の同輩に厚く御礼を申し上げます。

利益相反

本研究で使用した ROCK 阻害薬リパスジルは、興和株式会社から提供を受けたものである。

引用文献

Abu El-Asrar, A.M., Alam, K., Garcia-Ramirez, M., Ahmad, A., Siddiquei, M.M., Mohammad, G., Mousa, A., De Hertogh, G., Opdenakker, G., and Simó, R. (2017). Association of HMGB1 with oxidative stress markers and regulators in PDR. *Mol Vis* 23, 853-871.

Almulki, L., Noda, K., Nakao, S., Hisatomi, T., Thomas, K.L., and Hafezi-Moghadam, A. (2010). Localization of vascular adhesion protein-1 (VAP-1) in the human eye. *Exp Eye Res* 90, 26-32.

Amin, R.H., Frank, R.N., Kennedy, A., Elliott, D., Puklin, J.E., and Abrams, G.W. (1997). Vascular endothelial growth factor is present in glial cells of the retina and optic nerve of human subjects with nonproliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 36-47.

Andersson, U., Yang, H., and Harris, H. (2018). Extracellular HMGB1 as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Expert Opin Ther Targets* 22, 263-277.

Antonetti, D.A., Barber, A.J., Bronson, S.K., Freeman, W.M., Gardner, T.W., Jefferson, L.S., Kester, M., Kimball, S.R., Krady, J.K., LaNoue, K.F., *et al.* (2006). Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease. *Diabetes* 55, 2401-2411.

Arita, R., Hata, Y., Nakao, S., Kita, T., Miura, M., Kawahara, S., Zandi, S., Almulki, L., Tayyari, F., Shimokawa, H., *et al.* (2009). Rho kinase inhibition by fasudil ameliorates diabetes-induced microvascular damage. *Diabetes* 58, 215-226.

Arita, R., Nakao, S., Kita, T., Kawahara, S., Asato, R., Yoshida, S., Enaida, H., Hafezi-Moghadam, A., and Ishibashi, T. (2013). A key role for ROCK in TNF- α -mediated diabetic microvascular damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54, 2373-2383.

Barber, A.J., Antonetti, D.A., and Gardner, T.W. (2000). Altered expression of retinal occludin and glial fibrillary acidic protein in experimental diabetes. The Penn State Retina Research Group. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *41*, 3561-3568.

Biscetti, F., Rando, M.M., Nardella, E., Cecchini, A.L., Pecorini, G., Landolfi, R., and Flex, A. (2019). High Mobility Group Box-1 and Diabetes Mellitus Complications: State of the Art and Future Perspectives. *Int J Mol Sci* *20*.

Cheung, N., Mitchell, P., and Wong, T.Y. (2010). Diabetic retinopathy. *Lancet* *376*, 124-136.

Coughlin, B.A., Feenstra, D.J., and Mohr, S. (2017). Müller cells and diabetic retinopathy. *Vision Res* *139*, 93-100.

De Toma, I., Rossetti, G., Zambrano, S., Bianchi, M.E., and Agresti, A. (2014). Nucleosome loss facilitates the chemotactic response of macrophages. *J Intern Med* *276*, 454-469.

Dong, N., Li, X., Xiao, L., Yu, W., Wang, B., and Chu, L. (2012). Upregulation of retinal neuronal MCP-1 in the rodent model of diabetic retinopathy and its function in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *53*, 7567-7575.

Dong, Y., Noda, K., Murata, M., Yoshida, S., Saito, W., Kanda, A., and Ishida, S. (2017). Localization of Acrolein-Lysine Adduct in Fibrovascular Tissues of Proliferative Diabetic Retinopathy. *Curr Eye Res* *42*, 111-117.

Eastlake, K., Banerjee, P.J., Angbohang, A., Charteris, D.G., Khaw, P.T., and Limb, G.A. (2016). Müller glia as an important source of cytokines and inflammatory factors present in the gliotic retina during proliferative vitreoretinopathy. *Glia* *64*, 495-506.

El-Asrar, A.M., Nawaz, M.I., Kangave, D., Geboes, K., Ola, M.S., Ahmad, S., and Al-Shabrawey, M. (2011). High-mobility group box-1 and biomarkers of inflammation in the vitreous from patients with proliferative diabetic retinopathy. *Mol Vis* *17*, 1829-1838.

Faraco, G., Fossati, S., Bianchi, M.E., Patrone, M., Pedrazzi, M., Sparatore, B., Moroni, F., and Chiarugi, A. (2007). High mobility group box 1 protein is released by neural cells upon different stresses and worsens ischemic neurodegeneration in vitro and in vivo. *J Neurochem* *103*, 590-603.

Feng, Z., Hu, W., Hu, Y., and Tang, M.S. (2006). Acrolein is a major cigarette-related lung cancer agent: Preferential binding at p53 mutational hotspots and inhibition of DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 15404-15409.

Frank, R.N. (2004). Diabetic retinopathy. *N Engl J Med* *350*, 48-58.

García-Bermúdez, M.Y., Freude, K.K., Mouhammad, Z.A., van Wijngaarden, P., Martin, K.K., and Kolko, M. (2021). Glial Cells in Glaucoma: Friends, Foes, and Potential Therapeutic Targets. *Front Neurol* *12*, 624983.

Gardner, T.W., Antonetti, D.A., Barber, A.J., LaNoue, K.F., and Levison, S.W. (2002). Diabetic retinopathy: more than meets the eye. *Surv Ophthalmol* *47 Suppl 2*, S253-262.

Hammes, H.P. (2018). Diabetic retinopathy: hyperglycaemia, oxidative stress and beyond. *Diabetologia* *61*, 29-38.

Hernández, C., Segura, R.M., Fonollosa, A., Carrasco, E., Francisco, G., and Simó, R. (2005). Interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and IL-10 in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabet Med* *22*, 719-722.

Jia, L., Liu, Z., Sun, L., Miller, S.S., Ames, B.N., Cotman, C.W., and Liu, J. (2007). Acrolein, a toxicant in cigarette smoke, causes oxidative damage and mitochondrial dysfunction in RPE cells: protection by (R)-alpha-lipoic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *48*, 339-348.

Kang, R., Chen, R., Zhang, Q., Hou, W., Wu, S., Cao, L., Huang, J., Yu, Y., Fan, X.G., Yan, Z., *et al.* (2014). HMGB1 in health and disease. *Mol Aspects Med* *40*, 1-116.

Kehrer, J.P., and Biswal, S.S. (2000). The molecular effects of acrolein. *Toxicol Sci* *57*, 6-15.

Knipe, R.S., Tager, A.M., and Liao, J.K. (2015). The Rho kinases: critical mediators of multiple profibrotic processes and rational targets for new therapies for pulmonary fibrosis. *Pharmacol Rev* *67*, 103-117.

Le, Y., Wang, Y., Zhou, L., Xiong, J., Tian, J., Yang, X., Gai, X., and Sun, Y. (2020). Cigarette smoke-induced HMGB1 translocation and release contribute to migration and NF- κ B activation through inducing autophagy in lung macrophages. *J Cell Mol Med* *24*, 1319-1331.

Li, Y.J., Wang, L., Zhang, B., Gao, F., and Yang, C.M. (2019). Glycyrrhizin, an HMGB1 inhibitor, exhibits neuroprotective effects in rats after lithium-pilocarpine-induced status epilepticus. *J Pharm Pharmacol* *71*, 390-399.

Loirand, G. (2015). Rho Kinases in Health and Disease: From Basic Science to Translational Research. *Pharmacol Rev* *67*, 1074-1095.

Lugrin, J., Rosenblatt-Velin, N., Parapanov, R., and Liaudet, L. (2014). The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biol Chem* *395*, 203-230.

Luo, J., and Shi, R. (2005). Acrolein induces oxidative stress in brain mitochondria. *Neurochem Int* *46*, 243-252.

Matsumoto, Y., Takahashi, M., and Ogata, M. (2002). Relationship between glycoxidation and cytokines in the vitreous of eyes with diabetic retinopathy. *Jpn J Ophthalmol* *46*, 406-412.

Mitamura, Y., Takeuchi, S., Matsuda, A., Tagawa, Y., Mizue, Y., and Nishihira, J. (2001). Monocyte chemotactic protein-1 in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmologica* *215*, 415-418.

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.

Mollica, L., De Marchis, F., Spitaleri, A., Dallacosta, C., Pennacchini, D., Zamai, M., Agresti, A., Triscioglio, L., Musco, G., and Bianchi, M.E. (2007). Glycyrrhizin binds to high-mobility group box 1 protein and inhibits its cytokine activities. *Chem Biol* *14*, 431-441.

Murata, M., Noda, K., Fukuhara, J., Kanda, A., Kase, S., Saito, W., Ozawa, Y., Mochizuki, S., Kimura, S., Mashima, Y., *et al.* (2012). Soluble vascular adhesion protein-1 accumulates in proliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *53*, 4055-4062.

Murata, M., Noda, K., and Ishida, S. (2020). Pathological Role of Unsaturated Aldehyde Acrolein in Diabetic Retinopathy. *Front Immunol* *11*, 589531.

Murata, M., Noda, K., Kawasaki, A., Yoshida, S., Dong, Y., Saito, M., Dong, Z., Ando, R., Mori, S., Saito, W., *et al.* (2017). Soluble Vascular Adhesion Protein-1 Mediates Spermine Oxidation as Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase: Possible Role in Proliferative Diabetic Retinopathy. *Curr Eye Res* *42*, 1674-1683.

Murata, M., Noda, K., Yoshida, S., Saito, M., Fujiya, A., Kanda, A., and Ishida, S. (2019). Unsaturated Aldehyde Acrolein Promotes Retinal Glial Cell Migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *60*, 4425-4435.

Nicoletti, R., Venza, I., Ceci, G., Visalli, M., Teti, D., and Reibaldi, A. (2003). Vitreous polyamines spermidine, putrescine, and spermine in human proliferative disorders of the retina. *Br J Ophthalmol* *87*, 1038-1042.

Noda, K., Nakao, S., Ishida, S., and Ishibashi, T. (2012). Leukocyte adhesion molecules in diabetic retinopathy. *J Ophthalmol* *2012*, 279037.

Noda, K., Nakao, S., Zandi, S., Engelstädter, V., Mashima, Y., and Hafezi-Moghadam, A. (2009). Vascular adhesion protein-1 regulates leukocyte transmigration rate in the retina during diabetes. *Exp Eye Res* *89*, 774-781.

Nork, T.M., Wallow, I.H., Sramek, S.J., and Anderson, G. (1987). Müller's cell involvement in proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* *105*, 1424-1429.

Pegg, A.E. (2013). Toxicity of polyamines and their metabolic products. *Chem Res Toxicol* *26*, 1782-1800.

Schreiber, E., Matthias, P., Müller, M.M., and Schaffner, W. (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* *17*, 6419.

Schweitzer, K.S., Chen, S.X., Law, S., Van Demark, M., Poirier, C., Justice, M.J., Hubbard, W.C., Kim, E.S., Lai, X., Wang, M., *et al.* (2015). Endothelial disruptive proinflammatory effects of nicotine and e-cigarette vapor exposures. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* *309*, L175-187.

Semeraro, F., Morescalchi, F., Cancarini, A., Russo, A., Rezzola, S., and Costagliola, C. (2019). Diabetic retinopathy, a vascular and inflammatory disease: Therapeutic implications. *Diabetes Metab* *45*, 517-527.

Senda, N., Yanai, H., Hibino, S., Li, L., Mizushima, Y., Miyagaki, T., Saeki, M., Kishi, Y., Hangai, S., Nishio, J., *et al.* (2021). HMGB1-mediated chromatin remodeling attenuates Il24 gene expression for the protection from allergic contact dermatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *118*.

Sharmin, S., Sakata, K., Kashiwagi, K., Ueda, S., Iwasaki, S., Shirahata, A., and Igarashi, K. (2001). Polyamine cytotoxicity in the presence of bovine serum amine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* *282*, 228-235.

Shi, J., Wu, X., Surma, M., Vemula, S., Zhang, L., Yang, Y., Kapur, R., and Wei, L. (2013). Distinct roles for ROCK1 and ROCK2 in the regulation of cell detachment. *Cell Death Dis* *4*, e483.

Sofiadis, K., Josipovic, N., Nikolic, M., Kargapolova, Y., Übelmesser, N., Varamogianni-Mamatsi, V., Zirkel, A., Papadionysiou, I., Loughran, G., Keane, J., *et al.* (2021). HMGB1 coordinates SASP-related chromatin folding and RNA homeostasis on the path to senescence. *Mol Syst Biol* *17*, e9760.

Sun, Y., Ito, S., Nishio, N., Tanaka, Y., Chen, N., Liu, L., and Isobe, K. (2015). Enhancement of the acrolein-induced production of reactive oxygen species and lung injury by GADD34. *Oxid Med Cell Longev* *2015*, 170309.

Taghavi, Y., Hassanshahi, G., Kounis, N.G., Koniari, I., and Khorramdelazad, H. (2019). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) in diabetic retinopathy: latest evidence and clinical considerations. *J Cell Commun Signal* *13*, 451-462.

Tang, D., Shi, Y., Kang, R., Li, T., Xiao, W., Wang, H., and Xiao, X. (2007). Hydrogen peroxide stimulates macrophages and monocytes to actively release HMGB1. *J Leukoc Biol* *81*, 741-747.

Tashimo, A., Mitamura, Y., Nagai, S., Nakamura, Y., Ohtsuka, K., Mizue, Y., and Nishihira, J. (2004). Aqueous levels of macrophage migration inhibitory factor and monocyte chemotactic protein-1 in patients with diabetic retinopathy. *Diabet Med* *21*, 1292-1297.

Tomi, M., Funaki, T., Abukawa, H., Katayama, K., Kondo, T., Ohtsuki, S., Ueda, M., Obinata, M., Terasaki, T., and Hosoya, K. (2003). Expression and regulation of L-cystine transporter, system xc-, in the newly developed rat retinal Müller cell line (TR-MUL). *Glia* *43*, 208-217.

Wang, H., Qu, H., and Deng, H. (2015). Plasma HMGB-1 Levels in Subjects with Obesity and Type 2 Diabetes: A Cross-Sectional Study in China. *PLoS One* *10*, e0136564.

Wu, D., Noda, K., Murata, M., Liu, Y., Kanda, A., and Ishida, S. (2020). Regulation of Spermine Oxidase through Hypoxia-Inducible Factor-1 α Signaling in Retinal Glial Cells under Hypoxic Conditions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *61*, 52.

Yan, X.X., Lu, L., Peng, W.H., Wang, L.J., Zhang, Q., Zhang, R.Y., Chen, Q.J., and Shen, W.F. (2009). Increased serum HMGB1 level is associated with coronary artery disease in nondiabetic and type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis* *205*, 544-548.

Yanoff M. (2009). Diabetes Mellitus. In *Ocular Pathology* 6th edition. (Amsterdam, The Netherlands: Elsevier), pp. 617

Yoshida, S., Kubo, Y., Kobayashi, Y., Zhou, Y., Nakama, T., Yamaguchi, M., Tachibana, T., Ishikawa, K., Arita, R., Nakao, S., *et al.* (2015). Increased vitreous concentrations of MCP-1 and IL-6 after vitrectomy in patients with proliferative diabetic retinopathy: possible association with postoperative macular oedema. *Br J Ophthalmol* *99*, 960-966.

Zheng, Y., Ley, S.H., and Hu, F.B. (2018). Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol* *14*, 88-98.