

論文の内容の要旨

1 申請者

防衛医科大学校 田口万藏

2 論文題目

新規糖尿病モデルマウス ($Ins2^{Akita}IFN-\gamma^{-/-}$ マウス) におけるヘルパーT細胞性免疫応答と糖尿病網膜症の病態解析

3 目的

糖尿病網膜症 (DR; diabetic Retinopathy) の病態解明及び治療法の研究のためには適切なモデル動物が必要とされているが、 $Ins2^{Akita}$ (Akita) マウス等現存の糖尿病モデルマウスで網膜症は軽症であり、また発症には長期間を要する。 $IFN-\gamma^{-/-}$ (GKO; interferon-gamma knock out) マウスでは DR 発症が促進される Th17 細胞性免疫応答が活性化されており、血管内皮増殖因子 (VEGF; vascular endothelial growth factor) 発現が上昇する。本研究では、Akita マウスを GKO マウスと交配させ、 $Ins2^{Akita}IFN-\gamma^{-/-}$ (Akita-GKO マウス) を作成し、DR の発症及び免疫細胞及びサイトカイン動態を他の 3 群: WT (C57BL/6), Akita, GKO マウスと比較した。

4 対象並びに方法

- ① Akita-GKO マウスの作成: Akita マウスと GKO マウスを 2 世代掛け合わせ、genotyping を行い Akita-GKO マウスを作成した。その上で、*Crb1* 遺伝子上にある *rd8* 変異をもつマウスは除外した。
- ② Akita-GKO マウスの免疫細胞プロファイルの解析: 9 週齢で採取した網膜及び脾細胞に対し、RT-PCR を行い、脾細胞はフローサイトメトリーも実施した。
- ③ Akita-GKO マウスの網膜変化の解析: 9 週齢で眼底写真・蛍光眼底造影検査・網膜病理組織の検討を行い、他の 3 群と比較した。
- ④ Akita-GKO マウスの眼内サイトカインの定量解析: 9 週齢で採取した眼球に対しマイクロビーズアレイシステム™を用いたサイトカイン解析を施行した。

5 成績

- ① 2 系統のマウスの交配により $Ins2(+/-) \cdot IFN-\gamma(-/-) \cdot Crb1(wt/wt)$ マウスの作成に成功した。Akita-GKO マウスは胎生致死等なく、成獣まで発育した。Akita-GKO マウスの血糖値は WT, GKO マウスよりは高値であったものの、Akita マウスと同等であった。
- ② Akita-GKO マウスの網膜及び脾細胞では ROR- γ T の遺伝子発現および IL-17, IL-22 を発現する Th 細胞の割合が他の 3 群と比較して亢進していた。また、Akita-GKO マウスの網膜においては ICAM-1, VEGF の遺伝子発現が他の 3 群と比較して亢進していた。
- ③ 9 週齢の Akita-GKO マウスの網膜変化の解析により以下の知見が得られた。

- ・眼底写真にて Akita-GK0 マウスにのみ網膜白斑がみられ、蛍光眼底造影検査にて白斑の箇所と一致して血管漏出がみられた。
- ・白血球停滞が他の 3 群と比較して亢進していた。
- ・病理組織観察にて網膜表層に浮腫がみられた。
- ・免疫組織化学染色にて線維増殖膜 (FVM; fibrovascular membrane) のマーカーであるペリオスチンの濃染を神経線維層及び神経節細胞層に認め、電子顕微鏡写真において網膜血管の基底膜肥厚がみられた。
- ・9 週齢において既報にある従来の糖尿病モデルマウスよりも糖尿病網膜症が進展していた。

④ Akita-GK0 マウスでは眼内 VEGF の濃度が他の 3 群と比較して上昇していた。

6 考 察

- ① Crb1 遺伝子の変異があるマウスは網膜白斑が形成されることがあるが、本研究はその影響を完全に除外できている。Akita-GK0 マウスの血糖値は Akita マウスと同等であったことから DR の進展には血糖値以外の因子が影響している可能性が示唆された。
- ② 脾細胞の解析から DR の発症が進行する一要因として Th17 関連サイトカインが影響していると考えられた。
- ③ 従来の糖尿病モデルマウスでは、網膜毛細血管瘤の形成に至ることはあっても、9 週齢で網膜白斑の形成、および蛍光眼底造影検査にて網膜血管から蛍光漏出がみられたとの既報はない。Akita-GK0 マウスでは従来のモデルマウスよりも早期にかつ重症の DR を発症することが確認され、短期間での DR に対する実験が可能である。特に FVM の形成といったよりヒトの DR に近い所見が得られ、新規の治療法や、現在多用されている抗体 VEGF 抗体以外の新たな分子標的療法の開発に応用できる可能性が見出された。
- ④ Akita-GK0 マウスにおいて眼内 VEGF 濃度が上昇していたこと及び網膜血管基底膜の肥厚がみられたことは、蛍光眼底造影検査にて網膜血管漏出が生じていたことの裏付けになる。

7 結 論

Th17 細胞性の免疫活性優位の Akita-GK0 マウスでは従来の DR モデルマウスよりも早期から糖尿病網膜症の悪化がみられた。