

オステオポンチンが糖尿病網膜症の  
血管透過性に及ぼす影響についての研究

そめや ひであき  
染谷 秀彬

(眼科学専攻)

防衛医科大学校

令和5年度



# 目次

第 1 章	背景と目的 .....	1
第 2 章	材料と方法 .....	7
2.1	実験動物 .....	8
2.2	STZ マウスの作成 .....	8
2.3	試薬の硝子体内投与 .....	8
2.4	ヘマトキシリン/エオジン染色 .....	9
2.5	網膜毛細血管網の観察 .....	9
2.6	網膜伸展標本の免疫組織化学染色 .....	10
2.7	遺伝子の発現解析 .....	11
2.8	OPN および VEGF のタンパク質濃度の定量 .....	11
2.9	網膜におけるエバンスブルー色素漏出の解析 .....	12
2.10	細胞培養 .....	13
2.11	バリア機能の評価 .....	13
2.12	LDH の測定 .....	14

2.13	免疫細胞化学染色 .....	15
2.14	統計解析 .....	15
第 3 章	結果 .....	17
3.1	STZ マウスの特徴 .....	18
3.2	糖尿病状態における OPN の増加 .....	18
3.3	網膜におけるエバンスブルー色素の血管外漏出 .....	19
3.4	抗 OPN 中和抗体によるタイトジャンクションの変化 .....	19
3.5	網膜における VEGF の遺伝子およびタンパク質の発現 .....	20
3.6	HREC 単層細胞シート培養液への OPN 添加の影響 .....	21
第 4 章	考察 .....	23
第 5 章	まとめ .....	28
5.1	研究成果のまとめ .....	29
5.2	本研究による貢献 .....	30
5.3	研究の限界と今後の課題 .....	31
謝辞	.....	33
略語	.....	35

引用文献 .....	38
图表 .....	51

# 第 1 章

## 背景と目的

わが国は世界に類をみないスピードで高齢化が進行しており、2005年には65歳以上の高齢者の全人口に対する比率は21%に達し、世界で最初の超高齢社会に突入した(1)。それに伴い、高齢者の独居率も増加し、高齢者の心身を支えるキーパーソンの存在となる人との関係の希薄化も進んでいる。そのため健全な生活環境を維持することが困難となり、代表的な生活習慣病である糖尿病の惹起あるいは悪化が加速することが危惧されている(1)。糖尿病は、インスリンの分泌低下あるいはインスリン抵抗性によって生じるグルコースの代謝障害を特徴とした慢性疾患である。糖尿病患者数は発展途上国でも先進国でも増加の一途にあり、日本では約830万人と推定される(2, 3)。

日常生活を送るうえで必要な情報の8割は視覚情報といわれている。そのため健康で長生きするには、高齢になっても良い視力を維持することが重要になってくる。しかし自覚症状が乏しい眼疾患も存在し、一度進行してしまうと治療による視力回復が困難となることも多いため、視力低下の原因となる病気を知ることで、その病気を対象とした予防や治療を重点的に行うことが重要になる。

2015年に本邦で行われた疫学調査によると、新規に視覚障害の認定を受けた対象者の年齢の割合は80歳代が29.6%で最も多く、ついで70歳代(26.3%)、60歳代(17.3%)となり、視覚障害の認定を受ける人は高齢者に多いことがわかった(4)。2001年から2004年にかけて行われた失明原因の疫学調査では第一位は緑内障(20.9%)、以下糖尿病網膜症(19.0%)、網膜色素変性症(13.5%)、黄斑変性(9.3%)と続いていた(5)。2015年の疫学調査においても第一位は緑内障(28.6%)で、以下網膜色素変性(14.0%)、糖尿病網膜症(12.8%)、黄斑変性(8.0%)(4)であり、糖尿病治療薬の新規開発や眼科診療技術の進歩によって糖

尿病網膜症による失明は改善されつつあるが、依然として糖尿病網膜症は日本人の失明原因の脅威であり続けている。

糖尿病網膜症は進行性の網膜血管の循環障害(6)および神経機能不全(7)から生じ、単純糖尿病網膜症、増殖前糖尿病網膜症、増殖糖尿病網膜症へと段階的に病期が進行する(8, 9) (表 1)。また、糖尿病網膜症は、いずれの病期においても糖尿病黄斑浮腫を生じ得る(10)。糖尿病網膜症は糖尿病発症後約 10 年以上の経過ののちに発症、進行すると考えられ、糖尿病網膜症の発症を予防すること、もしくは早い段階における治療が有効である。まずは血糖コントロールの改善(11-13)、不可逆性の無灌流領域に対しては網膜光凝固術(14)を施行し、増殖糖尿病網膜症に進行した症例に対しては硝子体手術が適用されるが、その視力予後は決して良好とは言えない(15-18)。さらに、これらの治療により失明を防ぐことができたとしても、糖尿病黄斑浮腫により黄斑部の機能が障害されれば視力は不良である。糖尿病黄斑浮腫は単純糖尿病網膜症のような軽度の網膜症においても発生し、患者の生活の質 (Quality of Life) を著しく低下させる。

網膜には、循環血液と網膜神経組織を隔てる血液網膜関門 (BRB; blood-retinal barrier) と呼ばれる関門機構が存在する。内側 BRB は網膜内皮細胞、周皮細胞 (ペリサイト) およびミュラー細胞によって形成された血管バリアであり (図 1a)、その破綻が糖尿病黄斑浮腫の原因である(19)。網膜内皮細胞はタイトジャンクション複合体を形成しており、血液網膜関門の不浸透性に寄与している(20)。タイトジャンクションは細胞間接着分子構造の一つであり、隣り合う細胞を膜状に密着させて、透過性バリアとして膜の内外を隔てている(21) (図 1b)。網膜のタイトジャンクションを構成する代表的な分子として claudin-5、occludin、ZO-1 があげられる。claudin は哺乳類動物におい



て 27 種類が確認されており、発現する組み合わせは臓器や細胞によって異なるが、血管内皮細胞においては主に claudin-5 が発現していることが報告されている(22-33)。また、occludin はリン酸化によってバリア機能を調節することが知られている(34)。ZO-1 は claudin や occludin に結合して細胞骨格アクチンに連結させることで細胞質側を裏打ちしており、様々な分子と相互作用すると考えられている(35)。網膜内皮細胞が高グルコースに曝されることで、タイトジャンクションタンパクの発現に変化をきたすこと、および透過性亢進が生じることが報告されている(36)。このようなことから、糖尿病網膜症におけるバリア機能の低下は血管透過性の亢進をきたし、糖尿病網膜症の初期変化の一つと考えられている(37)。

Vascular endothelial growth factor (VEGF) は、血管新生の重要な調節因子であるだけでなく、血管透過性を亢進する因子でもある(38, 39)。糖尿病網膜症の進行には VEGF が関与しており、VEGF を標的とした抗体治療の有効性が示されている(40)。しかし、糖尿病網膜症の合併症である糖尿病黄斑浮腫に対する VEGF 阻害剤を用いた薬物療法に不応性の患者もみられ、治療効果が得られた場合においても黄斑浮腫が再発する症例も少なくない(41, 42)。そのため糖尿病網膜症に対するさらなる病態メカニズムの解明および創薬開発が待望されている。

オステオポンチン (OPN; osteopontin) は、Franzén と Heinegård によりウシ骨基質由来のシアロプロテイン (BSP-1 or BNSP; bone sialoprotein I) として 1985 年にはじめて同定された分泌型マトリックスタンパク質であり、44kDa の骨のリン酸化糖タンパク質(44K BPP; bone phosphoprotein)として分泌型リン酸化タンパク質 1 (SPP1; secreted phosphoprotein 1) あるいはシアロプロテイン 1、さらには T 細胞に存在する分子としての早期 T リンパ球活性化 1

(ETA-1; early T lymphocyte activation-1) タンパク質としても知られている(43)。OPN は細胞外マトリックス、炎症性サイトカイン、細胞内シグナル伝達に関与するなど多様な機能を有するタンパク質である(44, 45)。OPN は前骨芽細胞、骨芽細胞、骨細胞(46)、軟骨細胞(47)、線維芽細胞(48)、樹状細胞、マクロファージおよび T 細胞(49)、肝細胞(50)、平滑筋細胞(51)、骨格筋(52)、内皮細胞(53)、内耳(54)、脳(55)、胎盤および乳腺(56)、十二指腸および腎臓(57, 58)などの様々な細胞および組織で発現しており、多発性硬化症(59)およびクローン病(60)などの自己免疫疾患(61, 62)に加え、癌(63-65)および心血管系疾患(66-69)などにおいて重要な役割を担っている。さらに、OPN は脂肪組織の炎症とインスリン抵抗性に関与している(70, 71)。

眼球組織では網膜のミクログリア(72)、ミュラーグリア(73)、神経節細胞(74)、色素上皮細胞(75)および内皮細胞(76, 77)における OPN の発現が認められている。OPN の網膜内皮細胞への作用に関しては、内皮細胞の遊走を促進すること(78)、細胞外マトリックスを誘導して血管基底膜の肥厚をきたすこと(76)がこれまでに報告されている。

OPN と糖尿病網膜症の関係についてはいくつかの報告がある。糖尿病網膜症患者の硝子体液中における OPN 濃度が上昇していること(79, 80)、血漿中の OPN 濃度は糖尿病網膜症の有無および重症度と有意に相関していることが報告されている(81)。このことから OPN は糖尿病網膜症の発症に関与している可能性が示唆されるが、OPN の血管透過性への関与は明らかになっていない。そこで我々は、糖尿病における OPN の上昇が血管内皮細胞のタイトジャンクション機能を変化させ、網膜血管の透過性亢進を引き起こしているとする仮説を立てた。この仮説を検証するために動物実験と細胞実験を行った。動物実験では、ストレプトゾトシン (STZ; streptozotocin) 誘発糖尿病マウス (STZ マ

ウス) の硝子体内に抗 OPN 中和抗体 (OPN Ab; anti-osteopontin neutralizing antibody) を投与した。細胞実験ではヒト網膜内皮細胞 (HREC; human retinal endothelial cell) を OPN に暴露した。これらの実験を通して、糖尿病状態において OPN が透過性機能、タイトジャンクションの構造および VEGF の発現にどのような影響を及ぼすかについて検討を行った。

## 第 2 章

### 材料と方法

## 2.1 実験動物

実験動物として日本エスエルシー（静岡）から購入した C57BL/6J 野生型（WT; wild type）マウスを用いた。すべての実験において雄マウスのみを使用した。マウスは通常の概日リズム（明暗各 12 時間サイクル）の下で飼育され、自由に食事と水を与えられた。12 週齢に達した実験動物は、イソフルラン（富士フィルム和光純薬，大阪）の吸入麻酔下において、過量のペントバルビタール（ソムノペンチル<sup>®</sup>；共立製薬，東京）の腹腔内注射により安楽死された。すべての動物実験は防衛医科大学校倫理に関するガイドラインおよび ARVO Statement for Use Animals に則って実施した（承認番号：18073）。

## 2.2 STZ マウスの作成

過去の報告(82, 83)をもとに糖尿病網膜症モデルマウスとして STZ マウスを作成した。4 週齢の WT マウスに 1 日あたり 60 mg/kg の STZ を、0.05 M のクエン酸バッファー（pH 4.5）で溶解させて、5 日間連続で腹腔内に投与した。コントロール（Ctrl）マウスには同量のクエン酸バッファーのみを投与した。4 週齢、6 週齢、8 週齢、12 週齢における Ctrl および STZ マウスの体重と血糖値の測定を 4 時間絶食させた後に行った。血糖値は LAB Gluco<sup>®</sup>血糖測定器（biomedical science, 東京）を用いて測定した。6 週齢における血糖値が 300 mg/dL 以上のマウスを STZ マウスとして実験に使用した。

## 2.3 試薬の硝子体内投与

8 週齢の Ctrl および STZ マウスにイソフルランの吸入麻酔下でペントバルビタール（50 mg/kg）の腹腔内注射を行い、0.5%トロピカミド点眼・0.5%フェ

ニレフリン塩酸塩点眼（ミドリン-P®; 参天製薬, 大阪）を用いて散瞳した。33 G 針を接続したマイクロシリンジ（Hamilton Company, Reno, NV, USA）を用いて anti-mouse OPN antibody（polyclonal goat IgG, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA）あるいは normal goat IgG（R&D Systems）のいずれかを角膜輪部の強膜から硝子体内に 200 ng（1  $\mu$ L）投与した。投与量は既報（84, 85）を参考にして決めた。

## 2.4 ヘマトキシリン/エオジン染色

12 週齢の Ctrl および STZ マウスを上述した麻酔後、眼球を摘出した。摘出した眼球を 4%パラホルムアルデヒド（PFA; paraformaldehyde）を含有したリン酸緩衝生理食塩水（PBS; phosphate buffered saline）中に室温下で 1 時間浸漬固定した後に、角膜と水晶体を除去した。その後、同じ固定液に 4°C で一晩浸漬固定した。次に標本をパラフィン包埋した後、5  $\mu$ m 厚の切片を作成した。切片をパラフィン除去し、ヘマトキシリン/エオジン染色した。染色した網膜切片を顕微鏡（Keyence BZ-X810 Microscope; Keyence, 大阪）で撮影し、視神経乳頭中心から 500  $\mu$ m 離れた位置における網膜厚を計測した。

## 2.5 網膜毛細血管網の観察

過去の報告（86）をもとに網膜組織から網膜毛細血管網を分離した。上述した通りマウスの眼球を摘出して、4% PFA で 1 時間固定後、眼球から網膜を摘出した。網膜を蒸留水中で室温のもと一晩穏やかに振盪させた後に、3%トリプシン中で 37°C のもと 90 分間穏やかに振盪させた。トリプシン消化した網膜を蒸留水で洗浄して網膜付着組織から血管網を分離した。血管分離後、血管をシラ

ンコーティングスライドガラス上に乗せて完全に乾燥させた。その後、スライドを過ヨウ素酸シッフ/ヘマトキシリン染色した。染色した網膜血管を顕微鏡 (BZ-X810) で観察して、無細胞毛細血管 (アセルラーキャピラリー) を数えた。主幹動静脈を避けた末梢部 3 か所を無作為に選び解析した。1 か所一視野 (270  $\mu\text{m}$   $\times$  360  $\mu\text{m}$ ) あたりのアセルラーキャピラリーを数えて、3 か所の平均を算出した値を 1 サンプルの値として採用した。

## 2.6 網膜伸展標本の免疫組織化学染色

上述の通り摘出した網膜をメタノールで  $-20^{\circ}\text{C}$  のもと 20 分間固定した。網膜を PBS で洗浄した後、透過処理/ブロッキング試液 [PBS + 0.3% Triton X-100 + 0.2% bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA)] と 5% 正常ヤギ血清の混合液中で室温のもと 1 時間穏やかに振盪させた。その後、Alexa Fluor 488-conjugated anti-claudin-5 antibody (352588; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) あるいは rabbit anti-ZO-1 antibody (61-7300; Invitrogen) のいずれかを透過処理/ブロッキング試液で 200 倍希釈して、網膜とともに  $4^{\circ}\text{C}$  のもと遮光下にて一晩穏やかに振盪させた。翌日、網膜を 0.3% PBT (PBS + 0.3% Triton) で遮光下にて 6 時間洗浄した。洗浄後、claudin-5 抗体を反応させた網膜に関しては、伸展させて VECTASHIELD (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて封入した。ZO-1 抗体を反応させた網膜に関しては、0.3% PBT で 200 倍希釈した Alexa Fluor 594-conjugated anti-rabbit antibody (ab150080; Abcam, Cambridge, UK) とともに室温のもと遮光下にて 1 時間穏やかに振盪させた後、0.3% PBT で 2 時間洗浄し上述の通り封入した。網膜伸展標本の観察は蛍光顕微鏡 (BZ-X810) を用いて行った。

## 2.7 遺伝子の発現解析

RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) を用いて網膜組織あるいは培養細胞の全 RNA を抽出した。続いて、RNA を SuperScript II Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて cDNA に逆転写した。使用したプローブ (TaqMan; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) は以下の通りである。claudin-5 (Mm00727012\_s1)、ZO-1 (Mm00493699\_m1)、VEGF (Mm00437304\_m1, Hs00900055\_m1)、VEGF receptor-2 (VEGFR-2; Hs00176676\_m1)。また、18S RNA (Mm03928990\_g1, Hs99999901\_s1) を内因性コントロールとして用いた。

7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて  $\Delta\Delta$  CT 法により逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR; reverse transcription-polymerase chain reaction) 解析を行った。各項目の mRNA レベルは 18S rRNA を基準とした相対発現量で示した。

## 2.8 OPN および VEGF のタンパク質濃度の定量

血清および網膜の OPN タンパク質濃度を OPN ELISA kit (Abcam) を用いて測定した。また、網膜の VEGF タンパク質濃度を Bio-PlexPro™ mouse cytokine group II VEGF kit® (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて測定した。

上述の通りマウスを麻酔し、左心室から血液サンプルを採取した。続いて、網膜を摘出した後、プロテアーゼ阻害剤を添加した 100  $\mu$ l の放射性免疫沈降



アッセイバッファーで溶解した。溶解した網膜サンプルを 10,000g で 10 分間遠心した後、上清を回収した。上清の OPN および VEGF のタンパク質濃度を上述した kit を用いて測定した。網膜の OPN および VEGF 濃度は、網膜の総タンパク質濃度で標準化し、ピコグラム/ミリグラム単位で表示した。総タンパク質濃度は DC™ protein assay kit (Bio-Rad Laboratories) を用いて定量化した。一方、血清の OPN タンパク質濃度の測定のために、血液サンプルを 4,000g で 15 分間遠心分離し、その上清の OPN タンパク質濃度を上述した kit を用いて測定した。血清中の OPN 濃度は、血清 1 ミリリットル当たりのナノグラム単位で表示した。

## 2.9 網膜におけるエバンスブルー色素漏出の解析

エバンスブルー色素が血清アルブミンと結合する性質を利用して(87)、網膜の血管からの漏出量を、既報(88)を参考に測定した。マウスの尾静脈からエバンスブルー (20 mg/kg; Sigma-Aldrich) を投与した。エバンスブルーを投与した 2 時間後に、イソフルランの吸入麻酔下で過量のペントバルビタールを腹腔内に投与して、左心室から血液サンプルを採取した。その後、左心室から 37°C の PBS を灌流した後に網膜サンプルを摘出した。網膜サンプルを乾燥させて重量を計測し、ジメチルフォルマミド中で 70°C のもと 18 時間インキュベーションしてエバンスブルーを溶出した。18,800g で 15 分間の遠心を行い、上清の吸光度 (740 nm-620 nm) を測定した。血液サンプルは 4,000g で 15 分間の遠心を行い、抽出した血清をジメチルフォルマミドで 1000 倍希釈した後、同様に吸光度を測定した。濃度はエバンスブルーのスタンダード曲線を元に算出し、血管透過性を以下の計算式を用いて定量した。透過性  $[\mu\text{L}/(\text{g}\cdot\text{h})] =$

[ 網膜のエバンスブルー (  $\mu\text{g}$  ) / 網膜の重量 (  $\text{g}$  ) ] / [ 血液のエバンスブルー濃度 (  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  )  $\times$  循環時間 (  $\text{h}$  ) ]

さらに定性的観察として、上述の通りエバンスブルーを投与して PBS 灌流後、眼球を摘出して 4% PFA で固定した。その後、網膜を摘出して伸展標本作製し蛍光顕微鏡 ( BZ-X810 ) で観察を行った。

## 2.10 細胞培養

HREC、endothelial cell medium、endothelial cell growth supplement およびペニシリン/ストレプトマイシン溶液を INNOPROT (Derio Bizkaia, Spain) から購入した。5%ウシ血清、1%ペニシリン/ストレプトマイシン溶液および 1% endothelial cell growth supplement を添加した培地で内皮細胞を培養した。培養は 37°C・湿潤・95%空気・5%二酸化炭素の状況下で行った。細胞が培養面積の 90%コンフルエントの状態に達した段階で、0.25%トリプシン/EDTA を用いて細胞を剥離して継代した。2 から 7 継代培養した細胞を実験に用いた。すべての実験は細胞が 90%以上のコンフルエントの状態を開始した。実験開始時に HREC を標準グルコース ( NG; normal glucose, 5 mM ) あるいは高グルコース ( HG; high glucose, 40 mM ) の培養液に暴露した。

## 2.11 バリア機能の評価

0.4  $\mu\text{m}$  の小孔をもつカルチャーインサート半透膜 ( Corning Inc., Corning, NY ) 上で培養された HREC 単層シートを種々の濃度の OPN ( 0, 100, 500 ng/mL ) を添加した NG あるいは HG の培養液に 48 時間

暴露した。過去の報告(89)をもとにして、以下の2つの方法で HREC 単層シート  
のバリア機能を評価した。

### 2.11.a 経内皮電気抵抗の測定

内皮細胞では、タイトジャンクションによって頂上側と基底側との間でイオ  
ンの透過が制限されているため、経内皮電気抵抗 (TEER; transendothelial  
electrical resistance) が生じる。TEER は測定法も簡便であることから、透過  
性の指標として広く用いられている(90)。

TEER は epithelial volt-ohm meter (EVOM; LMS Co., 東京) を用いて計測  
した。メーターに表示される値はインサートした半透膜のみの抵抗値も含んで  
いるため、TEER は測定値から細胞を含まないカルチャーインサート半透膜の  
みの抵抗値を差し引いて算出した。

### 2.11.b エバンスブルー色素の透過性

各条件に内皮細胞を 48 時間暴露した後に、エバンスブルー (0.67 mg/mL)  
を膜の上側に添加した。添加 2 時間後に膜の下側から採取した培養液を 10 倍  
希釈し、620 nm における吸光度を測定することで、膜を透過したエバンスブ  
ルーの量を評価した。

## 2.12 LDH の測定

OPN の細胞障害性を調べるために、培養細胞から培養液中に放出された  
Lactate dehydrogenase (LDH) を Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (Dojindo,  
熊本) を用いて測定した。

## 2.13 免疫細胞化学染色

HREC を NG、NG + OPN (500 ng/mL)、HG、または HG + OPN (500 ng/mL) に 48 時間暴露した後、claudin-5 および ZO-1 の免疫細胞化学染色を行った。

claudin-5 の染色については、細胞をメタノールで $-20^{\circ}\text{C}$ のもと 20 分間固定した後、1% BSA で室温のもと 1 時間反応させてブロッキングを行った。その後、細胞を 200 倍希釈した Alexa Fluor 488-conjugated anti-claudin-5 antibody (352588; Invitrogen) とともに  $4^{\circ}\text{C}$ のもと遮光下にて一晩インキュベートした。

ZO-1 の染色については、細胞を 4% PFA で室温のもと 20 分間固定し、PBS で 3 回洗浄した。固定した細胞を 0.1% PBT で室温のもと 15 分間透過処理した後、1% BSA で室温のもと 1 時間反応させてブロッキングを行った。次に、細胞を 300 倍希釈した rabbit anti-ZO-1 antibody (61-7300; Invitrogen) とともに  $4^{\circ}\text{C}$ のもと一晩インキュベートした。洗浄後、細胞を 300 倍希釈した Alexa Fluor 594-conjugated anti-rabbit antibody (ab150080; Abcam) と  $37^{\circ}\text{C}$ のもと 1 時間インキュベートした。

染色したサンプルの核を DAPI 入り Vectashield (Vector Laboratories) で対比染色し、蛍光顕微鏡 (BZ-X810) を用いて観察した。

## 2.14 統計解析

統計解析は JMP Pro 14 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて行った。データは平均±標準偏差または平均±標準誤差で示した。平均値の比較は、

2 群比較には Shapiro-Wilk 検定により正規性を確認したのち、Student の t 検定を用い、3 群間比較には対応のない一元配置分散分析により有意性を確認したのち、Tukey-Kramer 検定を用いた。有意水準は 5%未満とした。

## 第 3 章

### 結 果

### 3.1 STZ マウスの特徴

糖尿病網膜症における OPN の病態関与を調べるにあたって、我々は糖尿病網膜症モデルマウスとして STZ マウスを作製した。はじめに、糖尿病の発症の成否を確認するために、血糖値および体重を測定した。その結果、STZ マウスの血糖値は Ctrl マウスと比較して、STZ 投与後のいずれの時期においても有意に高かった (図 2-1)。体重はいずれのマウスも成長とともに増加していったが、STZ 投与後のいずれの時期においても、STZ マウスの体重は Ctrl マウスよりも有意に低かった (図 2-2)。一方で、STZ マウスは網膜形態の変化を生じることが報告されている(91)。そこで我々が今回作成した STZ マウスの網膜における形態変化を確認するために、網膜厚とアセラーキャピラリーの数を測定した。その結果、STZ マウスの網膜厚は Ctrl マウスと比較して有意に菲薄化していた (図 2-3)。さらに、STZ マウスの一視野あたりのアセラーキャピラリーの数は Ctrl マウスと比較して有意に増加していた (図 2-4)。以上から本実験で作成した STZ マウスは、糖尿病網膜症モデルマウスとして使用可能であることが示された。

### 3.2 糖尿病状態における OPN の増加

糖尿病網膜症患者における血漿(81)および硝子体内(79, 80)の OPN の増加が指摘されている。そこで我々は、Ctrl マウスと STZ マウスの血清および網膜における OPN mRNA の発現および OPN タンパク濃度を比較した。STZ マウスの血清の OPN 濃度は Ctrl マウスよりも有意に高値であった (図 3-1)。STZ マウスの網膜における OPN mRNA の発現も Ctrl マウスと比較して有意に上昇

していた（図 3-2）。同様に、STZ マウスの網膜における OPN 濃度も Ctrl マウスよりも有意に高値であった（図 3-3）。

### 3.3 網膜におけるエバンスブルー色素の血管外漏出

OPN の糖尿病網膜症における網膜血管透過性への関与を調べるために、Ctrl および STZ マウスの硝子体内に抗 OPN 中和抗体もしくは IgG を投与した。網膜組織に漏出したエバンスブルーを吸光度法により定量することで網膜血管透過性の評価を行った。図 4-1 で示された通り、STZ 群および STZ- IgG 群のエバンスブルーの漏出量は、Ctrl 群および Ctrl- IgG 群と比較してそれぞれ有意に高値であった。また、Ctrl-OPN Ab 群では、Ctrl 群および Ctrl-IgG 群と比較して、透過性に有意な変化は見られなかったが、STZ-OPN Ab 群では、STZ 群および STZ-IgG 群に比べ、透過性が有意に低下していた（図 4-1）。

エバンスブルー注入後の網膜伸展標本の蛍光顕微鏡観察においても同様の傾向がみられ、STZ 群および STZ-IgG 群では網膜血管からのエバンスブルーの漏出が観察されたが、STZ-OPN Ab 群では抑制されていた（図 4-2）。以上から、STZ マウスでは網膜血管の透過性が亢進しており、抗 OPN 中和抗体の硝子体内投与により透過性亢進が抑制されることが示された。

### 3.4 抗 OPN 中和抗体によるタイトジャンクションの変化

タイトジャンクションの維持は血管透過性を決定する重要な因子である(92)。OPN を阻害することで網膜血管のタイトジャンクションにどのような変化がみられるのかを調べるために、抗 OPN 中和抗体を硝子体内に投与したあ



との網膜の claudin-5 と ZO-1 の遺伝子発現解析および免疫組織化学染色を行った。

#### 3.4.a タイトジャンクションの遺伝子発現の変化

図 5-1 の通り、Ctrl 群、Ctrl-IgG 群および Ctrl-OPN Ab 群間においては claudin-5 と ZO-1 の発現量に有意差はなく、STZ 群および STZ-IgG 群では、claudin-5 と ZO-1 の発現量が Ctrl 群および Ctrl-IgG 群と比較してそれぞれ有意に低下していた。一方、STZ-OPN Ab 群では、STZ 群および STZ-IgG 群と比較して、claudin-5 および ZO-1 の発現が有意に上昇していた（図 5-1）。

#### 3.4.b タイトジャンクションの免疫組織化学染色の変化

Ctrl マウスでは、claudin-5 と ZO-1 の局在は明瞭かつ内皮細胞の細胞境界に一致していた。STZ マウスでは、claudin-5 の局在は点状に分布し、ZO-1 の免疫染色は減弱していた（図 5-2）。これらの変化は、抗 OPN Ab を STZ マウスの硝子体内に投与することで抑制された（図 5-2）。

### 3.5 網膜における VEGF の遺伝子およびタンパク質の発現

VEGF は、糖尿病網膜症の主要な悪化因子であり、タイトジャンクションを変化させて血管透過性を促進することが報告されている(93)。そこで我々は、Ctrl 群、Ctrl-IgG 群、Ctrl-OPN Ab 群、STZ 群、STZ-IgG 群、STZ-OPN Ab 群の間で網膜の VEGF 遺伝子およびタンパク質の発現を比較した。STZ 群、STZ-IgG 群、STZ-OPN Ab 群における網膜の VEGF 遺伝子発現は、Ctrl 群、Ctrl-IgG 群、Ctrl-OPN Ab 群と比較してそれぞれ有意に上昇し、STZ 群、

STZ-IgG 群、STZ-OPN Ab 群の間にも有意差はみられなかった（図 6a）。同様に、STZ 群、STZ-IgG 群、STZ-OPN Ab 群間の網膜における VEGF タンパク濃度も有意差はみられなかった（図 6b）。

### 3.6 HREC 単層細胞シート培養液への OPN 添加の影響

OPN の網膜内皮細胞の血管透過性に対する直接的な影響を調べるために、NG あるいは HG 培地に OPN を添加して、HREC 単層シートのバリア機能、タイトジャンクションの構造、VEGF の発現を評価した。

#### 3.6.a OPN 添加によるバリア機能の変化

HREC シートのバリア機能が OPN によって変化するかどうかを調べるために、OPN を添加した NG あるいは HG 培地で細胞シートを培養した後、TEER とエバンスブルーの透過性を測定した。TEER は NG 培地下に比べて HG 培地下では経時的に有意に減少し、NG 培地、HG 培地のいずれにおいても OPN の添加濃度が 500 ng/mL の場合、TEER を有意に減少した（図 7-1）。一方、48 時間培養後のエバンスブルー透過性は、NG 培地下に比べて HG 培地下では有意に増加し、OPN の添加濃度が 500 ng/mL の場合、NG 培地、HG 培地のいずれにおいても有意な増加がみられた（図 7-2）。細胞障害の指標となる LDH 放出量に関しては、NG あるいは HG 培地下、OPN の添加による有意差は認められなかった（図 7-3）。

#### 3.6.b OPN 添加によるタイトジャンクションの構造変化

HREC 単層細胞シートにおけるタイトジャンクション構造変化への OPN の影響を調べるために、OPN (500 ng/mL) を NG あるいは HG 培地に添加してから 48 時間後に claudin-5 抗体および ZO-1 抗体を用いた免疫細胞化学染色を行った。NG 培地で培養した細胞では線状の連続した接合が観察されたが、NG+OPN 培地、HG 培地、HG+OPN 培地で培養した細胞では不連続な接合による点状分布を呈していた (図 7-4)。

### 3.6.c OPN 添加による VEGF 遺伝子発現への影響

HREC 単層細胞シートにおける VEGF への OPN の影響を調べるために、OPN (500 ng/mL) を NG あるいは HG 培地に添加してから 48 時間後に VEGF およびそのレセプターである VEGFR-2 の遺伝子発現を解析した。NG および HG のいずれの培地においても、OPN 添加による HREC の VEGF および VEGFR-2 遺伝子の相対的発現量に有意差はみられなかった (図 7-5)。

## 第 4 章 考 察

糖尿病網膜症患者の硝子体中で OPN の発現が上昇しているという先行研究 (79, 80) はあるが、糖尿病網膜症における OPN の病態生理学的役割は十分には解明されていない。本研究では、OPN が糖尿病網膜症の血管透過性に及ぼす影響を検討した。そして我々は、糖尿病マウスの硝子体内に抗 OPN 中和抗体を投与することでタイトジャンクションの発現や機能が維持され、血管透過性亢進が抑制されることを示した。加えて、培養液に OPN を添加することでヒト網膜内皮細胞のバリア機能が障害されることを示した。

STZ マウスは、最も汎用されている糖尿病実験動物モデルの一つである。本研究では、網膜厚の減少、網膜のアセラーキャピラリーの増加を確認した上で、この動物モデルを使用した。これらの網膜の形態変化は、以前に報告された変化と同じであった (94)。また、本研究における STZ マウスは、以前の報告 (41) と同様に、血管透過性亢進と血管バリア機能の破綻がみられた。

Katakam らは STZ ラットの血清中で OPN 濃度が上昇していることを示した (95)。また、Duan らは STZ マウスの網膜において OPN 遺伝子の発現が上昇していることを報告した (76)。これらの報告から予想された通り、本研究においても STZ マウスの血清および網膜における OPN 濃度の上昇に加え、網膜の OPN 遺伝子の発現の上昇が示された。これらは、糖尿病網膜症を含む糖尿病患者における血中および硝子体中の OPN 濃度が上昇していたという報告を裏付ける結果である (79-81, 96)。

抗 OPN 抗体を STZ マウスの硝子体内に投与したことで血管透過性亢進が抑制された。また、タイトジャンクションの遺伝子発現と組織学的な分子機能の改善もみられた。以上から、糖尿病網膜症において OPN は血管透過性亢進に関与していることに加え、タイトジャンクション機能および構造障害を引き起こすことが示唆された。

OPN は活性化マクロファージや T 細胞などの全身を循環する細胞から分泌されているが、ミュラー細胞(97)および網膜色素上皮細胞(75)などの網膜局所細胞からも分泌されている。糖尿病網膜症患者(37)および STZ マウス(41)の網膜血管透過性は亢進しているが、本研究の *in vivo* 実験により OPN を阻害することで網膜血管透過性亢進およびタイトジャンクションの構造変化が抑制されることが示された。一方で、OPN を培地に添加することによりヒト肺微小血管内皮細胞の単層シートを透過するアルブミンの量が増加すること、および内皮細胞接合部の構造が変化することが報告されている(98)。以上の先行研究および本研究の *in vivo* 実験の結果に基づいて、我々は、糖尿病網膜症において増加している細胞外 OPN は網膜内皮細胞におけるタイトジャンクションの接合部構造の破綻を招いて、血管透過性亢進を直接引き起こしているのではないかと考えた。このことを検証するために、*in vitro* 実験では HREC の培地に OPN を添加した。その結果、高グルコースの培養下では HREC シートのバリア機能の低下がみられたが、OPN を添加することで HREC シートのバリア機能はさらに低下することが示された。さらに、HREC の細胞境界に連続的に分布している claudin-5 および ZO-1 が、OPN を添加することで点状の不連続な分布に変化することがわかった。このタイトジャンクションの点状の不連続な分布は、バリア機能の障害に関連していることが報告されており(99, 100)、細胞外の OPN が網膜内皮細胞のタイトジャンクションの接合部構造の変化および機能障害を引き起こして血管透過性を亢進させることが示唆された。

VEGF は糖尿病網膜症の主要な血管透過性因子であり、抗 VEGF 療法は糖尿病黄斑浮腫の主要な治療法である(101)。そのため、抗 OPN 中和抗体の硝子体内への投与による血管透過性亢進の抑制は、VEGF を介した抑制効果ではないかと予想した。しかし、抗 OPN 中和抗体を STZ マウスの硝子体内に投与して

も網膜の VEGF の遺伝子発現やタンパク濃度に変化はみられなかった。また、HREC の培地に OPN を添加しても細胞の VEGF や VEGFR-2 の遺伝子発現に変化はみられなかった。VEGFR-2 は、血管内皮細胞の表面に発現する主要な VEGF 受容体であるとともに、内皮細胞の透過性を促進する主要なシグナル受容体である(102)。これらの結果は、OPN が VEGF を介さずにタイトジャンクションに作用している可能性があることを示している。しかし、OPN をヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC; human umbilical vein endothelial cell) の培地に添加すると VEGF の発現が亢進するという報告もある(103)。この相違は、培養条件や添加した OPN 濃度が異なることに起因している可能性が考えられる。一方で、HUVEC の培地に VEGF を添加すると OPN の発現が上昇するという報告がある(104)。したがって、OPN と VEGF の相互作用を検討するためには、さらなる調査が必要である。

いくつかの研究で、OPN の網膜への影響が検討されている。Hikita らは、マウスに OPN を静脈内投与することで、網膜組織へのマクロファージの流入とミクログリアの活性化が起こることを報告した(105)。Del Río らは、マウスのミュラー細胞から分泌された OPN が光受容体保護に関与していることを示した(73)。Hollborn らは、高浸透圧または低酸素条件下において培養 RPE 細胞から分泌された OPN が網膜の主要な神経保護因子である RPE 由来の塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF; basic fibroblast growth factor) の分泌を促進することを明らかにした(75)。これらの報告から、OPN は網膜の炎症促進や神経保護に関与していることが知られている。本研究は新たに、高血糖下において増加した OPN が網膜内皮細胞のタイトジャンクションの破壊や血管透過性亢進に関与することを示した。糖尿病網膜症の網膜局所における OPN 濃度の上昇の

原因、および OPN の網膜血管内皮細胞タイトジャンクションに対する機能抑制の作用機序に関しては今後さらなる解明が必要である。

糖尿病網膜症の診療において、視機能維持のために血管透過性亢進のコントロールが重要であり、現在 VEGF が主な治療標的となっている。本研究から得られた知見は、OPN が糖尿病網膜症に対する抗 VEGF 抗体以外の新しい治療の開発にもつながる可能性を秘めており、今後の研究の発展が期待される。



# 第5章

## まとめ

## 5.1 研究成果のまとめ

高血糖状態が続くことで網膜組織の血管バリア機能が破綻すること、および血管透過性が亢進することはよく知られている。近年、糖尿病網膜症では主に VEGF が血管バリア破綻や血管透過性亢進に重大な影響を与えていることがわかっており、糖尿病黄斑浮腫に対して VEGF を標的とした抗体治療が行われるようになった。しかし抗 VEGF 抗体治療に不応性の症例や再発例もみられることから、新たな病態メカニズムの解明も待望されている。以前から糖尿病網膜症患者の全身や眼内で OPN が上昇していること、および糖尿病網膜症の重症度に相関していることが報告されている。我々は、これらの報告を参考にマウスと培養細胞を用いた研究を行い、さらなる知見を得ることができた。

マウスを用いた研究では、高血糖によって生じた網膜の病理組織学的変化のうち、血管バリアについて詳細な観察を行った。高血糖状態では血管透過性が亢進しているが、抗 OPN 中和抗体の硝子体内投与によって抑制されることを発見した。また、抗 OPN 中和抗体の投与によってタイトジャンクションの発現が改善されることを認めた。

続いて、*in vivo* でみられた OPN の網膜血管内皮細胞のタイトジャンクション抑制による血管透過性亢進作用が内皮細胞への直接的な作用かに焦点を当て、*in vitro* での HREC を用いた研究を行った。その結果、高グルコースおよび高 OPN 状態により HREC のタイトジャンクションの局在が変化し、高グルコース状態のみでもバリア機能は低下するが、高 OPN 状態が加わるとさらにバリア機能の低下が進むことを明らかにした。

これらの研究成果を総合した結果、糖尿病網膜症による OPN の血管透過性への影響として、高血糖状態により全身および眼局所で増加した OPN が内皮

細胞に発現するタイトジャンクションタンパクの局在を変化させることで、バリア機能を低下させ、血管透過性を亢進していることが示された。

## 5.2 本研究による貢献

本研究は糖尿病網膜症における血管透過性亢進の病態メカニズムの解明の一端を担うものである。糖尿病網膜症において血管透過性亢進は発症後まもなくしてみられ、糖尿病網膜症の病期に関わらず網膜浮腫を形成することで視力の低下を引き起こす。これまでに臨床研究を中心に糖尿病網膜症における OPN の上昇が指摘されていたが、それが血管透過性亢進の病態修飾に関与しているのかを調べた研究はなかった。さらに、OPN の上昇は網膜虚血(106)や網膜光障害(107)などの糖尿病網膜症以外の網膜疾患においても指摘されている。すなわち、本研究で確認された通り、OPN が網膜血管のバリア破綻および血管透過性亢進の病態に関与していることを明らかにしていくことは、糖尿病網膜症の病態メカニズムの解明に貢献するだけでなく、他の網膜疾患に対する基礎的知見の一助となる可能性も期待される。

また、本研究によって抗 OPN 中和抗体の硝子体内投与によって血管透過性亢進は抑制されたが、VEGF の発現に変化はみられなかった。この結果は OPN が新たな治療標的となり得ることを示している。糖尿病黄斑浮腫の治療薬として用いられている抗 VEGF 製剤には血管バリア破綻抑制効果があるが、VEGF は血管の恒常性維持に不可欠な因子であり、長期間の抗 VEGF 製剤の全身投与によって虚血性心疾患、脳梗塞、創傷治癒遅延など生命に関わる重篤な合併症の発生が懸念される(108)。抗 VEGF 抗体の局所投与によっても全身の副作用を呈する可能性があることや、抗 VEGF 抗体硝子体内投与による治療 5 年目の

患者の 3 割に網膜の萎縮や菲薄化がみられたことが報告されている(109)。一方で、抗 VEGF 抗体治療に抵抗性の糖尿病黄斑浮腫症例も存在する。これらの理由から、VEGF 以外の血管バリア破綻に関わる治療が模索されている。本研究において抗 OPN 中和抗体投与による血管透過性亢進の抑制が VEGF を介さなかったことは、今後 OPN を標的とした新たな治療戦略の開発につながる可能性があることを期待させるものである。

### 5.3 研究の限界と今後の課題

本研究では糖尿病網膜症動物モデルとして STZ マウスを用いた。このマウスは糖尿病網膜症の動物モデルとして最も汎用されているモデルの 1 つであり、血管透過性の亢進(110, 111)、白血球停滞の増加(112)、神経節細胞の喪失を示す(113, 114)。このようなヒトにおける糖尿病網膜症の初期と類似の病態を示すが、ヒトの糖尿病網膜症にみられる繊維血管増殖、新生血管ならびに硝子体出血まで進行した増殖糖尿病網膜症の段階に至ることはない(115)。STZ マウスと同様に、他の従来的小型動物モデルの糖尿病網膜症も軽微である(116-123)。一方、Ins2<sup>Akita</sup> マウスと VEGF を過剰発現する Kimba マウスを掛け合わせた Akimba マウス(124)は網膜浮腫や出血変化がみられるが、Kimba マウスは出生時から全身に VEGF を過剰発現しているため、VEGF 以外の要因が複雑に絡み合っ生じる糖尿病網膜症に適合した動物モデルとは言い難い。これらのことから、実際に薬物治療が必要な糖尿病網膜症患者の状態と動物モデルの状態に少なからずの乖離があり、ヒトに対する抗 OPN 中和抗体投与の効果が病期によって異なる可能性があることに留意しなければならない。また、本研究における細胞実験ではタイトジャンクションを発現している網膜内皮細

胞に対する OPN の影響を検討した。タイトジャンクションは血管バリア機能および血管透過性を規定する重要な因子ではあるが、内側 BRB は内皮細胞の他にペリサイトやミュラー細胞で構成されている。本研究ではペリサイトやミュラー細胞を用いた実験は行っていない。より多くの動物種や細胞腫を用いた実験を行い、糖尿病網膜症の血管バリア破綻のメカニズムをさらに詳細に検討する必要がある。

さらに本研究では、糖尿病網膜症によるバリア破綻の原因として OPN に注目したが、糖尿病網膜症における血管障害の成因は複雑であり、近年の研究ではさまざまな全身性および局所性炎症因子が糖尿病網膜症の病態に関与していることが知られている(125-128)。OPN は、T ヘルパータイプ 1 サイトカインとしての活性(129)、およびインテグリン受容体や CD44 を介して炎症部位における白血球の動員あるいは活性化を媒介することが報告されている(130)。今後は糖尿病網膜症における血管バリア破綻に対して作用する炎症性サイトカインと OPN との関連を探るべく、抗 OPN 中和抗体を投与した網膜サンプルにおける各種サイトカインの解析を含めた更なる研究が望まれる。

最後に、超高齢社会の突入とともに我々を取り巻くさまざまな生活システムが急速に変わっていく現代において、我々自身その変化に適応していくことが求められている。糖尿病網膜症においては、抗 VEGF 製剤の硝子体内投与を含めた内科的・外科的治療の進歩により視力の維持や改善が得られるようになったが、近年では硝子体内投与を継続することによる患者への負担だけでなく医療経済や医療資源への影響が新たな問題として提起されて、解決策が模索されている。このような状況の中で、本研究が糖尿病網膜症の新たな治療戦略となること、さらに現代社会における問題に対する解決の一端に寄与することがあれば幸いである。

## 謝 辭

## 謝 辞

本論文は筆者が防衛医科大学校医学研究科眼科学専攻に在籍中の研究成果をまとめたものです。稿を終えるにあたり、本研究実施の機会を与えていただき、また、貴重なご指導をいただきました防衛医科大学校眼科学講座 竹内大教授に多大なる感謝の念を捧げます。同内科学講座 木村文彦教授には審査委員長としてご助言をいただき、また、同免疫・微生物学講座 木下学教授には審査委員として本論文の細部にわたりご指導をいただきました。ここに深謝の意を表します。

資機材の準備や実験の手伝いにご尽力いただいた西尾佳明助教、田口麻美氏に感謝の意を表します。

## 略 語



BRB; blood-retinal barrier

VEGF; vascular endothelial growth factor

VEGFR-2; vascular endothelial growth factor receptor-2

OPN; osteopontin

BSP-1; bone sialoprotein I

BNSP; bone sialoprotein I

SPP1; secreted phosphoprotein 1

BPP; bone phosphoprotein

ETA-1; early T lymphocyte activation-1

STZ; streptozotocin

OPN Ab; anti-osteopontin neutralizing antibody

HREC; human retinal endothelial cell

WT; wild type

Ctrl; control

PFA; paraformaldehyde

PBS; phosphate buffered saline

RT-PCR; reverse transcription- polymerase chain reaction

NG; normal glucose

BSA; bovine serum albumin

HG; high glucose

TEER; transendothelial electrical resistance

EVOM; epithelial volt-ohm meter

LDH; lactate dehydrogenase

HUVEC; human umbilical vein endothelial cell

bFGF; basic fibroblast growth factor

## 引用文献

1. Yokono K. [Diabetes mellitus in the extremely elderly society]. *Nihon Ronen Igakkai Zasshi*. 2011;48(1):14-9.
2. Goto A, Noda M, Inoue M, Goto M, Charvat H. Increasing Number of People with Diabetes in Japan: Is This Trend Real? *Intern Med*. 2016;55(14):1827-30.
3. Animaw W, Seyoum Y. Increasing prevalence of diabetes mellitus in a developing country and its related factors. *PLoS One*. 2017;12(11):e0187670.
4. Morizane Y, Morimoto N, Fujiwara A, Kawasaki R, Yamashita H, Ogura Y, Shiraga F. Incidence and causes of visual impairment in Japan: the first nation-wide complete enumeration survey of newly certified visually impaired individuals. *Jpn J Ophthalmol*. 2019;63(1):26-33.
5. 厚生労働省. 平成 17 年度脈絡膜・視神経萎縮症に関する研究. 厚生労働科学研究報告書. 2005.
6. Sakata K, Funatsu H, Harino S, Noma H, Hori S. Relationship between macular microcirculation and progression of diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2006;113(8):1385-91.
7. Simo R, Stitt AW, Gardner TW. Neurodegeneration in diabetic retinopathy: does it really matter? *Diabetologia*. 2018;61(9):1902-12.
8. Wong TY, Cheung CM, Larsen M, Sharma S, Simó R. Diabetic retinopathy. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16012.
9. 日本糖尿病眼学会. 糖尿病網膜症病期分類 (改变 Davis 分類). 糖尿病眼手帳 (第 4 版). 2020.
10. Ciulla TA, Amador AG, Zinman B. Diabetic retinopathy and diabetic macular edema: pathophysiology, screening, and novel therapies. *Diabetes Care*. 2003;26(9):2653-64.
11. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*. 1998;352(9131):837-53.
12. Progression of retinopathy with intensive versus conventional treatment in the Diabetes Control and Complications Trial. Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *Ophthalmology*. 1995;102(4):647-61.
13. Ohkubo Y, Kishikawa H, Araki E, Miyata T, Isami S, Motoyoshi S, Kojima Y, Furuyoshi N, Shichiri M. Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with

non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study. *Diabetes Res Clin Pract.* 1995;28(2):103-17.

14. Early photocoagulation for diabetic retinopathy. ETDRS report number 9. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Ophthalmology.* 1991;98(5 Suppl):766-85.

15. Early vitrectomy for severe vitreous hemorrhage in diabetic retinopathy. Two-year results of a randomized trial. Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study report 2. The Diabetic Retinopathy Vitrectomy Study Research Group. *Arch Ophthalmol.* 1985;103(11):1644-52.

16. Someya H, Muraoka T, Kanda T, Takeuchi M. [Results and Prognostic Factors for Visual Outcome Following Micro Incision Vitrectomy Surgery in Proliferative Diabetic Retinopathy]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi.* 2016;120(10):682-8.

17. Someya H, Takayama K, Takeuchi M, Yokoyama H, Kimura T, Morioka M, Takamura Y, Sameshima S, Ueda T, Ogata N, Tashiro M, Kitano S, Sakamoto T. Outcomes of 25-Gauge Vitrectomy for Tractional and Nontractional Diabetic Macular Edema with Proliferative Diabetic Retinopathy. *J Ophthalmol.* 2019;2019:5304524.

18. Takayama K, Someya H, Yokoyama H, Kimura T, Takamura Y, Morioka M, Sameshima S, Ueda T, Ogata N, Kitano S, Tashiro M, Sugimoto M, Kondo M, Sakamoto T, Takeuchi M. Prognostic factors of revitrectomy for complications in eyes with proliferative diabetic retinopathy: a retrospective multicentre study. *Acta Ophthalmol.* 2020;98(4):e434-e9.

19. Wisniewska-Kruk J, Hoeben KA, Vogels IM, Gaillard PJ, Van Noorden CJ, Schlingemann RO, Klaassen I. A novel co-culture model of the blood-retinal barrier based on primary retinal endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Exp Eye Res.* 2012;96(1):181-90.

20. Törnquist P, Alm A, Bill A. Permeability of ocular vessels and transport across the blood-retinal-barrier. *Eye (Lond).* 1990;4 ( Pt 2):303-9.

21. Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol.* 1963;17(2):375-412.

22. Yang L, Sun X, Meng X. Differences in the expression profiles of claudin proteins in human gastric carcinoma compared with non-neoplastic mucosa. *Mol Med Rep.* 2018;18(2):1271-8.

23. Liu H, Jiang F, Jia X, Lan J, Guo H, Li E, Yan A, Wang Y. Cycling hypoxia affects cell invasion and proliferation through direct regulation of

claudin1 / claudin7 expression, and indirect regulation of P18 through claudin7. *Oncotarget*. 2017;8(6):10298-311.

24. Sun J, Wang X, Shi Y, Li J, Li C, Shi Z, Chen Y, Mao B. EphA7 regulates claudin6 and pronephros development in *Xenopus*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;495(2):1580-7.

25. Senga K, Mostov KE, Mitaka T, Miyajima A, Tanimizu N. Grainyhead-like 2 regulates epithelial morphogenesis by establishing functional tight junctions through the organization of a molecular network among claudin3, claudin4, and Rab25. *Mol Biol Cell*. 2012;23(15):2845-55.

26. Avanthi SU, Ravi Kanth VV, Agarwal J, Lakhtakia S, Gangineni K, Rao GV, Reddy DN, Talukdar R. Association of claudin2 and PRSS1-PRSS2 polymorphisms with idiopathic recurrent acute and chronic pancreatitis: A case-control study from India. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015;30(12):1796-801.

27. Hayashi D, Tamura A, Tanaka H, Yamazaki Y, Watanabe S, Suzuki K, Suzuki K, Sentani K, Yasui W, Rakugi H, Isaka Y, Tsukita S. Deficiency of claudin-18 causes paracellular H<sup>+</sup> leakage, up-regulation of interleukin-18, and atrophic gastritis in mice. *Gastroenterology*. 2012;142(2):292-304.

28. Miyamoto T, Morita K, Takemoto D, Takeuchi K, Kitano Y, Miyakawa T, Nakayama K, Okamura Y, Sasaki H, Miyachi Y, Furuse M, Tsukita S. Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice. *J Cell Biol*. 2005;169(3):527-38.

29. Ben-Yosef T, Belyantseva IA, Saunders TL, Hughes ED, Kawamoto K, Van Itallie CM, Beyer LA, Halsey K, Gardner DJ, Wilcox ER, Rasmussen J, Anderson JM, Dolan DF, Forge A, Raphael Y, Camper SA, Friedman TB. Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration. *Hum Mol Genet*. 2003;12(16):2049-61.

30. Gow A, Southwood CM, Li JS, Pariali M, Riordan GP, Brodie SE, Danias J, Bronstein JM, Kachar B, Lazzarini RA. CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in *Osp/claudin-11* null mice. *Cell*. 1999;99(6):649-59.

31. Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol*. 2003;161(3):653-60.

32. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. Claudin-based tight junctions are crucial for the

mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol.* 2002;156(6):1099-111.

33. Venugopal S, Anwer S, Szász K. Claudin-2: Roles beyond Permeability Functions. *Int J Mol Sci.* 2019;20(22).

34. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol.* 1993;123(6 Pt 2):1777-88.

35. Poritz LS, Garver KI, Green C, Fitzpatrick L, Ruggiero F, Koltun WA. Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. *J Surg Res.* 2007;140(1):12-9.

36. Saker S, Stewart EA, Browning AC, Allen CL, Amoaku WM. The effect of hyperglycaemia on permeability and the expression of junctional complex molecules in human retinal and choroidal endothelial cells. *Exp Eye Res.* 2014;121:161-7.

37. Antonetti DA, Lieth E, Barber AJ, Gardner TW. Molecular mechanisms of vascular permeability in diabetic retinopathy. *Semin Ophthalmol.* 1999;14(4):240-8.

38. Gianni-Barrera R, Di Maggio N, Melly L, Burger MG, Mujagic E, Gürke L, Schaefer DJ, Banfi A. Therapeutic vascularization in regenerative medicine. *Stem Cells Transl Med.* 2020;9(4):433-44.

39. Bates DO. Vascular endothelial growth factors and vascular permeability. *Cardiovasc Res.* 2010;87(2):262-71.

40. Titchenell PM, Antonetti DA. Using the past to inform the future: anti-VEGF therapy as a road map to develop novel therapies for diabetic retinopathy. *Diabetes.* 2013;62(6):1808-15.

41. Arima M, Nakao S, Yamaguchi M, Feng H, Fujii Y, Shibata K, Wada I, Kaizu Y, Ahmadieh H, Ishibashi T, Stitt AW, Sonoda KH. Claudin-5 Redistribution Induced by Inflammation Leads to Anti-VEGF-Resistant Diabetic Macular Edema. *Diabetes.* 2020;69(5):981-99.

42. Calvo P, Abadia B, Ferreras A, Ruiz-Moreno O, Verdes G, Pablo LE. Diabetic Macular Edema: Options for Adjunct Therapy. *Drugs.* 2015;75(13):1461-9.

43. Franzén A, Heinegård D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J.* 1985;232(3):715-24.

44. Bellahcène A, Castronovo V, Ogbureke KU, Fisher LW, Fedarko NS. Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(3):212-26.
45. Kanayama M, Xu S, Danzaki K, Gibson JR, Inoue M, Gregory SG, Shinohara ML. Skewing of the population balance of lymphoid and myeloid cells by secreted and intracellular osteopontin. *Nat Immunol*. 2017;18(9):973-84.
46. Chen Q, Shou P, Zhang L, Xu C, Zheng C, Han Y, Li W, Huang Y, Zhang X, Shao C, Roberts AI, Rabson AB, Ren G, Zhang Y, Wang Y, Denhardt DT, Shi Y. An osteopontin-integrin interaction plays a critical role in directing adipogenesis and osteogenesis by mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2014;32(2):327-37.
47. Pullig O, Weseloh G, Gauer S, Swoboda B. Osteopontin is expressed by adult human osteoarthritic chondrocytes: protein and mRNA analysis of normal and osteoarthritic cartilage. *Matrix Biol*. 2000;19(3):245-55.
48. Xie Z, Singh M, Siwik DA, Joyner WL, Singh K. Osteopontin inhibits interleukin-1beta-stimulated increases in matrix metalloproteinase activity in adult rat cardiac fibroblasts: role of protein kinase C-zeta. *J Biol Chem*. 2003;278(49):48546-52.
49. Lund SA, Giachelli CM, Scatena M. The role of osteopontin in inflammatory processes. *J Cell Commun Signal*. 2009;3(3-4):311-22.
50. Tokairin T, Nishikawa Y, Watanabe H, Doi Y, Omori Y, Yoshioka T, Yamamoto Y, Yoshida M, Nishimura T, Li Q, Arai H, Ishida A, Takada G, Enomoto K. Osteopontin expression in the liver with severe perisinusoidal fibrosis: autopsy case of Down syndrome with transient myeloproliferative disorder. *Pathol Int*. 2008;58(1):64-8.
51. Sodhi CP, Phadke SA, Batlle D, Sahai A. Hypoxia stimulates osteopontin expression and proliferation of cultured vascular smooth muscle cells: potentiation by high glucose. *Diabetes*. 2001;50(6):1482-90.
52. Zanotti S, Gibertini S, Di Blasi C, Cappelletti C, Bernasconi P, Mantegazza R, Morandi L, Mora M. Osteopontin is highly expressed in severely dystrophic muscle and seems to play a role in muscle regeneration and fibrosis. *Histopathology*. 2011;59(6):1215-28.
53. Singh K, Balligand JL, Fischer TA, Smith TW, Kelly RA. Glucocorticoids increase osteopontin expression in cardiac myocytes and



microvascular endothelial cells. Role in regulation of inducible nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1995;270(47):28471-8.

54. Davis RL, Lopez CA, Mou K. Expression of osteopontin in the inner ear. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;760:279-95.

55. Shin SL, Cha JH, Chun MH, Chung JW, Lee MY. Expression of osteopontin mRNA in the adult rat brain. *Neurosci Lett.* 1999;273(2):73-6.

56. Nemir M, Bhattacharyya D, Li X, Singh K, Mukherjee AB, Mukherjee BB. Targeted inhibition of osteopontin expression in the mammary gland causes abnormal morphogenesis and lactation deficiency. *J Biol Chem.* 2000;275(2):969-76.

57. Reza S, Shaukat A, Arain TM, Riaz QS, Mahmud M. Expression of osteopontin in patients with thyroid dysfunction. *PLoS One.* 2013;8(2):e56533.

58. Zhang ZX, Shek K, Wang S, Huang X, Lau A, Yin Z, Sun H, Liu W, Garcia B, Rittling S, Jevnikar AM. Osteopontin expressed in tubular epithelial cells regulates NK cell-mediated kidney ischemia reperfusion injury. *J Immunol.* 2010;185(2):967-73.

59. Sato W, Tomita A, Ichikawa D, Lin Y, Kishida H, Miyake S, Ogawa M, Okamoto T, Murata M, Kuroiwa Y, Aranami T, Yamamura T. CCR2(+)CCR5(+) T cells produce matrix metalloproteinase-9 and osteopontin in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Immunol.* 2012;189(10):5057-65.

60. Agnholt J, Kelsen J, Schack L, Hvas CL, Dahlerup JF, Sørensen ES. Osteopontin, a protein with cytokine-like properties, is associated with inflammation in Crohn's disease. *Scand J Immunol.* 2007;65(5):453-60.

61. Wong CK, Lit LC, Tam LS, Li EK, Lam CW. Elevation of plasma osteopontin concentration is correlated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford).* 2005;44(5):602-6.

62. Xu L, Ma X, Wang Y, Li X, Qi Y, Cui B, Li X, Ning G, Wang S. The expression and pathophysiological role of osteopontin in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(11):E1866-70.

63. Raja R, Kale S, Thorat D, Soundararajan G, Lohite K, Mane A, Karnik S, Kundu GC. Hypoxia-driven osteopontin contributes to breast tumor growth through modulation of HIF1 $\alpha$ -mediated VEGF-dependent angiogenesis. *Oncogene.* 2014;33(16):2053-64.

64. Tilli TM, Franco VF, Robbs BK, Wanderley JL, da Silva FR, de Mello KD, Viola JP, Weber GF, Gimba ER. Osteopontin-c splicing isoform contributes to ovarian cancer progression. *Mol Cancer Res.* 2011;9(3):280-93.

65. Takafuji V, Forgues M, Unsworth E, Goldsmith P, Wang XW. An osteopontin fragment is essential for tumor cell invasion in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2007;26(44):6361-71.
66. Waller AH, Sanchez-Ross M, Kaluski E, Klapholz M. Osteopontin in cardiovascular disease: a potential therapeutic target. *Cardiol Rev*. 2010;18(3):125-31.
67. Liaw L, Lombardi DM, Almeida MM, Schwartz SM, deBlois D, Giachelli CM. Neutralizing antibodies directed against osteopontin inhibit rat carotid neointimal thickening after endothelial denudation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17(1):188-93.
68. Bruemmer D, Collins AR, Noh G, Wang W, Territo M, Arias-Magallona S, Fishbein MC, Blaschke F, Kintscher U, Graf K, Law RE, Hsueh WA. Angiotensin II-accelerated atherosclerosis and aneurysm formation is attenuated in osteopontin-deficient mice. *J Clin Invest*. 2003;112(9):1318-31.
69. Psarras S, Mavroidis M, Sanoudou D, Davos CH, Xanthou G, Varela AE, Panoutsakopoulou V, Capetanaki Y. Regulation of adverse remodelling by osteopontin in a genetic heart failure model. *Eur Heart J*. 2012;33(15):1954-63.
70. Nomiya T, Perez-Tilve D, Ogawa D, Gizard F, Zhao Y, Heywood EB, Jones KL, Kawamori R, Cassis LA, Tschöp MH, Bruemmer D. Osteopontin mediates obesity-induced adipose tissue macrophage infiltration and insulin resistance in mice. *J Clin Invest*. 2007;117(10):2877-88.
71. Kiefer FW, Zeyda M, Gollinger K, Pfau B, Neuhofer A, Weichhart T, Säemann MD, Geyeregger R, Schleder M, Kenner L, Stulnig TM. Neutralization of osteopontin inhibits obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Diabetes*. 2010;59(4):935-46.
72. Chang SW, Kim HI, Kim GH, Park SJ, Kim IB. Increased Expression of Osteopontin in Retinal Degeneration Induced by Blue Light-Emitting Diode Exposure in Mice. *Front Mol Neurosci*. 2016;9:58.
73. Del Río P, Irmeler M, Arango-González B, Favor J, Bobe C, Bartsch U, Vecino E, Beckers J, Hauck SM, Ueffing M. GDNF-induced osteopontin from Müller glial cells promotes photoreceptor survival in the *Pde6brd1* mouse model of retinal degeneration. *Glia*. 2011;59(5):821-32.
74. Chidlow G, Wood JP, Manavis J, Osborne NN, Casson RJ. Expression of osteopontin in the rat retina: effects of excitotoxic and ischemic injuries. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(2):762-71.

75. Hollborn M, Brück R, Kuhrt H, Wiedemann P, Bringmann A. Osmotic and hypoxic induction of osteopontin in retinal pigment epithelial cells: Involvement of purinergic receptor signaling. *Mol Vis.* 2020;26:188-203.
76. Duan P, Chen S, Zeng Y, Xu H, Liu Y. Osteopontin Upregulates Col IV Expression by Repressing miR-29a in Human Retinal Capillary Endothelial Cells. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2020;20:242-51.
77. Huang Q, Sheibani N. High glucose promotes retinal endothelial cell migration through activation of Src, PI3K/Akt1/eNOS, and ERKs. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008;295(6):C1647-57.
78. Poggio P, Grau JB, Field BC, Sainger R, Seefried WF, Rizzolio F, Ferrari G. Osteopontin controls endothelial cell migration in vitro and in excised human valvular tissue from patients with calcific aortic stenosis and controls. *J Cell Physiol.* 2011;226(8):2139-49.
79. Abu El-Asrar AM, Imtiaz Nawaz M, Kangave D, Siddiquei MM, Geboes K. Osteopontin and other regulators of angiogenesis and fibrogenesis in the vitreous from patients with proliferative vitreoretinal disorders. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:493043.
80. Kase S, Yokoi M, Saito W, Furudate N, Ohgami K, Kitamura M, Kitaichi N, Yoshida K, Kase M, Ohno S, Uede T. Increased osteopontin levels in the vitreous of patients with diabetic retinopathy. *Ophthalmic Res.* 2007;39(3):143-7.
81. Zhang X, Chee WK, Liu S, Tavintharan S, Sum CF, Lim SC, Kumari N. Association of plasma osteopontin with diabetic retinopathy in Asians with type 2 diabetes. *Mol Vis.* 2018;24:165-73.
82. Lai AK, Lo AC. Animal models of diabetic retinopathy: summary and comparison. *J Diabetes Res.* 2013;2013:106594.
83. Sergeys J, Etienne I, Van Hove I, Lefevere E, Stalmans I, Feyen JHM, Moons L, Van Bergen T. Longitudinal In Vivo Characterization of the Streptozotocin-Induced Diabetic Mouse Model: Focus on Early Inner Retinal Responses. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2019;60(2):807-22.
84. Schlecht A, Zhang P, Wolf J, Thien A, Rosmus DD, Boneva S, Schlunck G, Lange C, Wieghofer P. Secreted Phosphoprotein 1 Expression in Retinal Mononuclear Phagocytes Links Murine to Human Choroidal Neovascularization. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:618598.
85. Yu H, Zhong H, Li N, Chen K, Chen J, Sun J, Xu L, Wang J, Zhang M, Liu X, Deng L, Huang P, Huang S, Shen X, Zhong Y. Osteopontin activates

retinal microglia causing retinal ganglion cells loss via p38 MAPK signaling pathway in glaucoma. *Faseb j.* 2021;35(3):e21405.

86. Chou JC, Rollins SD, Fawzi AA. Trypsin digest protocol to analyze the retinal vasculature of a mouse model. *J Vis Exp.* 2013(76):e50489.

87. Wolman M, Klatzo I, Chui E, Wilmes F, Nishimoto K, Fujiwara K, Spatz M. Evaluation of the dye-protein tracers in pathophysiology of the blood-brain barrier. *Acta Neuropathol.* 1981;54(1):55-61.

88. Inada M, Taguchi M, Harimoto K, Karasawa Y, Takeuchi M, Ito M. Protective effects of dexamethasone on hypoxia-induced retinal edema in a mouse model. *Exp Eye Res.* 2019;178:82-90.

89. Inada M, Xu H, Takeuchi M, Ito M, Chen M. Microglia increase tight-junction permeability in coordination with Muller cells under hypoxic condition in an in vitro model of inner blood-retinal barrier. *Exp Eye Res.* 2021;205:108490.

90. Wilhelm I, Fazakas C, Krizbai IA. In vitro models of the blood-brain barrier. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2011;71(1):113-28.

91. Robinson R, Barathi VA, Chaurasia SS, Wong TY, Kern TS. Update on animal models of diabetic retinopathy: from molecular approaches to mice and higher mammals. *Dis Model Mech.* 2012;5(4):444-56.

92. Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. Endothelial claudin: claudin-5/TM6CF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol.* 1999;147(1):185-94.

93. Simó R, Sundstrom JM, Antonetti DA. Ocular Anti-VEGF therapy for diabetic retinopathy: the role of VEGF in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes Care.* 2014;37(4):893-9.

94. Olivares AM, Althoff K, Chen GF, Wu S, Morrisson MA, DeAngelis MM, Haider N. Animal Models of Diabetic Retinopathy. *Curr Diab Rep.* 2017;17(10):93.

95. Katakam AK, Chipitsyna G, Gong Q, Vancha AR, Gabbeta J, Arafat HA. Streptozotocin (STZ) mediates acute upregulation of serum and pancreatic osteopontin (OPN): a novel islet-protective effect of OPN through inhibition of STZ-induced nitric oxide production. *J Endocrinol.* 2005;187(2):237-47.

96. Barchetta I, Alessandri C, Bertocchini L, Cimini FA, Taverniti L, Di Franco M, Fraioli A, Baroni MG, Cavallo MG. Increased circulating osteopontin levels in adult patients with type 1 diabetes mellitus and association with dysmetabolic profile. *Eur J Endocrinol.* 2016;174(2):187-92.

97. Wahl V, Vogler S, Grosche A, Pannicke T, Ueffing M, Wiedemann P, Reichenbach A, Hauck SM, Bringmann A. Osteopontin inhibits osmotic swelling of retinal glial (Müller) cells by inducing release of VEGF. *Neuroscience*. 2013;246:59-72.
98. Psallidas I, Stathopoulos GT, Maniatis NA, Magkouta S, Moschos C, Karabela SP, Kollintza A, Simoes DC, Kardara M, Vassiliou S, Papiris SA, Roussos C, Kalomenidis I. Secreted phosphoprotein-1 directly provokes vascular leakage to foster malignant pleural effusion. *Oncogene*. 2013;32(4):528-35.
99. Onken MD, Mooren OL, Mukherjee S, Shahan ST, Li J, Cooper JA. Endothelial monolayers and transendothelial migration depend on mechanical properties of the substrate. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 2014;71(12):695-706.
100. Stroka KM, Aranda-Espinoza H. Endothelial cell substrate stiffness influences neutrophil transmigration via myosin light chain kinase-dependent cell contraction. *Blood*. 2011;118(6):1632-40.
101. Dervenis N, Mikropoulou AM, Tranos P, Dervenis P. Ranibizumab in the Treatment of Diabetic Macular Edema: A Review of the Current Status, Unmet Needs, and Emerging Challenges. *Adv Ther*. 2017;34(6):1270-82.
102. Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*. 2019;176(6):1248-64.
103. Dai J, Peng L, Fan K, Wang H, Wei R, Ji G, Cai J, Lu B, Li B, Zhang D, Kang Y, Tan M, Qian W, Guo Y. Osteopontin induces angiogenesis through activation of PI3K/AKT and ERK1/2 in endothelial cells. *Oncogene*. 2009;28(38):3412-22.
104. Yao XX, Lu JB, Ye ZD, Zheng L, Wang Q, Lin ZQ, Liu H, Wan H, Fu FY, Huang XY, Xiu JC, Liu ZJ, Hu YW. Hairy/enhancer of Split Homologue-1 Suppresses Vascular Endothelial Growth Factor-induced Angiogenesis via Downregulation of Osteopontin Expression. *Sci Rep*. 2017;7(1):898.
105. Hikita ST, Vistica BP, Jones HR, Keswani JR, Watson MM, Ericson VR, Ayoub GS, Gery I, Clegg DO. Osteopontin is proinflammatory in experimental autoimmune uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(10):4435-43.
106. Takagi H, Suzuma K, Otani A, Oh H, Koyama S, Ohashi H, Watanabe D, Ojima T, Suganami E, Honda Y. Role of vitronectin receptor-type integrins and osteopontin in ischemia-induced retinal neovascularization. *Jpn J Ophthalmol*. 2002;46(3):270-8.

107. Chen L, He HY, Li HM, Zheng J, Heng WJ, You JF, Fang WG. ERK1/2 and p38 pathways are required for P2Y receptor-mediated prostate cancer invasion. *Cancer Lett.* 2004;215(2):239-47.
108. Kamba T, McDonald DM. Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer. *Br J Cancer.* 2007;96(12):1788-95.
109. Amadio M, Govoni S, Pascale A. Targeting VEGF in eye neovascularization: What's new?: A comprehensive review on current therapies and oligonucleotide-based interventions under development. *Pharmacol Res.* 2016;103:253-69.
110. Kim JH, Kim JH, Yu YS, Cho CS, Kim KW. Blockade of angiotensin II attenuates VEGF-mediated blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29(3):621-8.
111. Kim YH, Kim YS, Roh GS, Choi WS, Cho GJ. Resveratrol blocks diabetes-induced early vascular lesions and vascular endothelial growth factor induction in mouse retinas. *Acta Ophthalmol.* 2012;90(1):e31-7.
112. Li G, Tang J, Du Y, Lee CA, Kern TS. Beneficial effects of a novel RAGE inhibitor on early diabetic retinopathy and tactile allodynia. *Mol Vis.* 2011;17:3156-65.
113. Yang Y, Mao D, Chen X, Zhao L, Tian Q, Liu C, Zhou BL. Decrease in retinal neuronal cells in streptozotocin-induced diabetic mice. *Mol Vis.* 2012;18:1411-20.
114. Martin PM, Roon P, Van Ells TK, Ganapathy V, Smith SB. Death of retinal neurons in streptozotocin-induced diabetic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(9):3330-6.
115. Hammes HP. Diabetic retinopathy: hyperglycaemia, oxidative stress and beyond. *Diabetologia.* 2018;61(1):29-38.
116. Barber AJ, Antonetti DA, Kern TS, Reiter CE, Soans RS, Krady JK, Levison SW, Gardner TW, Bronson SK. The Ins2Akita mouse as a model of early retinal complications in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(6):2210-8.
117. Gerritsen GC, Dulin WE. Characterization of diabetes in the Chinese hamster. *Diabetologia.* 1967;3(2):74-84.
118. Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu.* 1980;29(1):1-13.

119. Kern TS, Tang J, Berkowitz BA. Validation of structural and functional lesions of diabetic retinopathy in mice. *Mol Vis*. 2010;16:2121-31.
120. Conaway HH, Brown CJ, Sanders LL, Cernosek SF, Farris HE, Roth SI. Spontaneous diabetes mellitus in the New Zealand white rabbit: history, classification, and genetic analysis. *J Hered*. 1980;71(3):179-86.
121. Kramer JW, Nottingham S, Robinette J, Lenz G, Sylvester S, Dessouky MI. Inherited, early onset, insulin-requiring diabetes mellitus of Keeshond dogs. *Diabetes*. 1980;29(7):558-65.
122. Lenzen S, Tiedge M, Elsner M, Lortz S, Weiss H, Jörns A, Klöppel G, Wedekind D, Prokop CM, Hedrich HJ. The LEW.1AR1/Ztm-iddm rat: a new model of spontaneous insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2001;44(9):1189-96.
123. Nakhooda AF, Like AA, Chappel CI, Murray FT, Marliss EB. The spontaneously diabetic Wistar rat. Metabolic and morphologic studies. *Diabetes*. 1977;26(2):100-12.
124. Rakoczy EP, Ali Rahman IS, Binz N, Li CR, Vagaja NN, de Pinho M, Lai CM. Characterization of a mouse model of hyperglycemia and retinal neovascularization. *Am J Pathol*. 2010;177(5):2659-70.
125. Tang J, Kern TS. Inflammation in diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res*. 2011;30(5):343-58.
126. Gologorsky D, Thanos A, Vavvas D. Therapeutic interventions against inflammatory and angiogenic mediators in proliferative diabetic retinopathy. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:629452.
127. Meleth AD, Agrón E, Chan CC, Reed GF, Arora K, Byrnes G, Csaky KG, Ferris FL, 3rd, Chew EY. Serum inflammatory markers in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(11):4295-301.
128. Jousen AM, Poulaki V, Le ML, Koizumi K, Esser C, Janicki H, Schraermeyer U, Kociok N, Fauser S, Kirchhof B, Kern TS, Adamis AP. A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *FASEB J*. 2004;18(12):1450-2.
129. Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S, Rittling SR, Denhardt DT, Glimcher MJ, Cantor H. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science*. 2000;287(5454):860-4.

130. Kahles F, Findeisen HM, Bruemmer D. Osteopontin: A novel regulator at the cross roads of inflammation, obesity and diabetes. *Mol Metab.* 2014;3(4):384-93.



## 図 表

表 1 糖尿病網膜症病期分類(改変 Davis 分類)

網膜症病期	眼底所見
単純網膜症	毛細血管瘤 網膜点状・斑状・線状出血 硬性白斑・網膜浮腫 (少数の軟性白斑)
増殖前網膜症	軟性白斑 静脈異常 網膜内細小血管異常 (網膜無血管野：蛍光眼底撮影)
増殖網膜症	新生血管(網膜・乳頭上) 網膜前出血 硝子体出血 纖維血管性増殖膜 牽引性網膜剝離

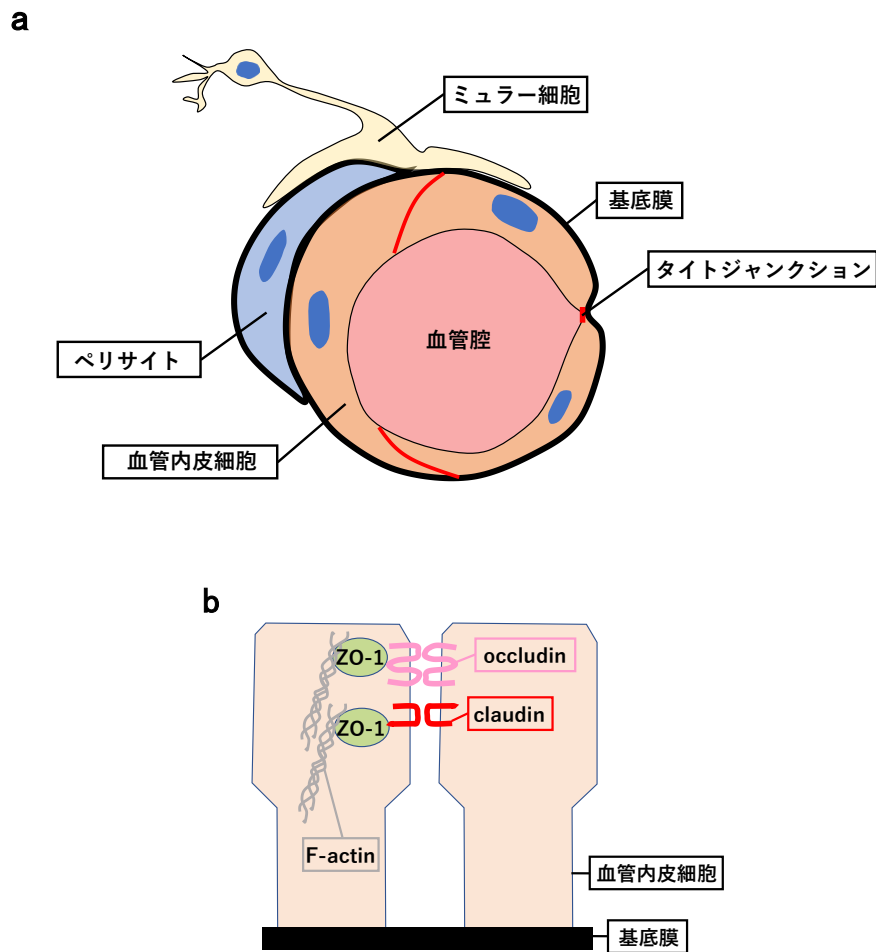


図 1 網膜における血管バリア構造

- a. 内側血液網膜関門の模式図。内側血液網膜関門は血管内皮細胞（橙色）のタイトジャンクション（赤色）を中心に、ペリサイト（青色）、ミュラー細胞（黄色）から構成される。血管内皮細胞とペリサイトは直接接触しており基底膜を共有している。基底膜の外側はミュラー細胞の足突起で覆われている。
- b. タイトジャンクションの細胞間接着分子構造の模式図。タイトジャンクションは透過性バリアとして膜の内側と外側を隔てる機能を有する。タイトジャンクションを構成するもっとも代表的な分子が claudin と occludin である。さらに、ZO-1 が claudin および occludin に結合し細胞骨格アクチンに連結させることで細胞質側を裏打ちしている。

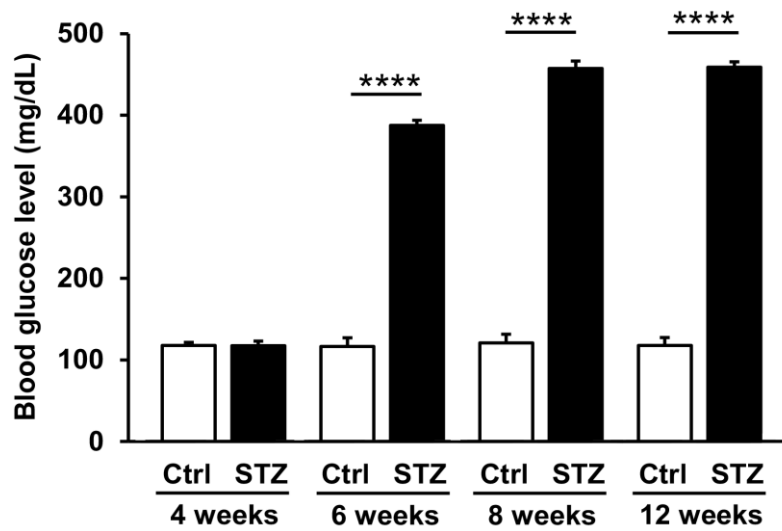


図 2-1 Ctrl マウスと STZ マウスの血糖値の推移

STZ マウスの血糖値は Ctrl マウスと比較して、STZ 投与後のいずれの時期においても有意に高値であった。

各値は平均±標準偏差で表示. n = 15. \*\*\*\* $P < 0.0001$  (Student t-test).

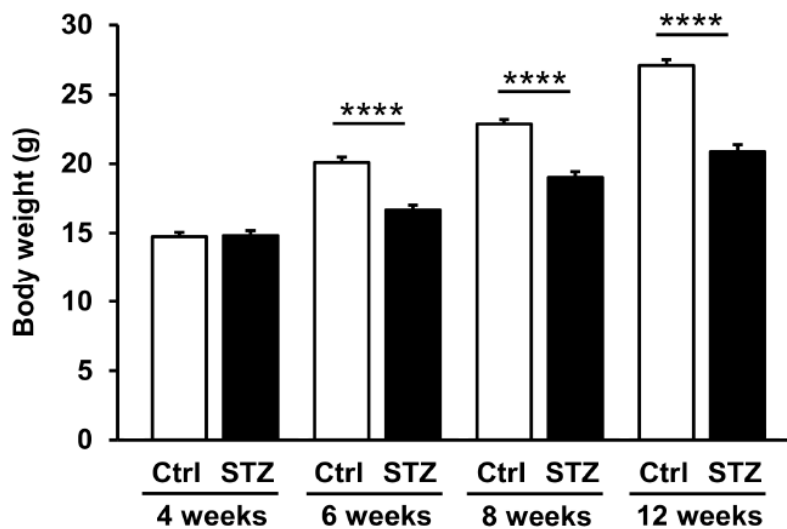
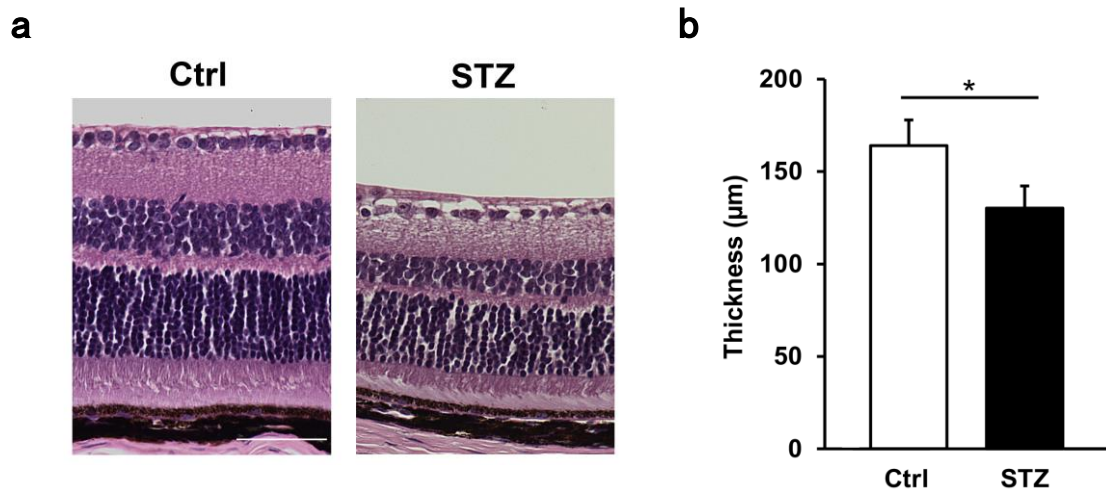


図 2-2 Ctrl マウスと STZ マウスの体重の推移

STZ マウスの体重は Ctrl マウスと比較して、STZ 投与後のいずれの時期においても有意に低値であった。

各値は平均±標準偏差で表示. n = 15. \*\*\*\* $P < 0.0001$  (Student t-test).

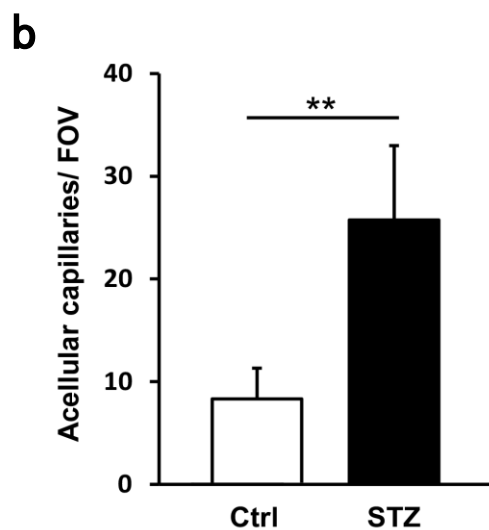
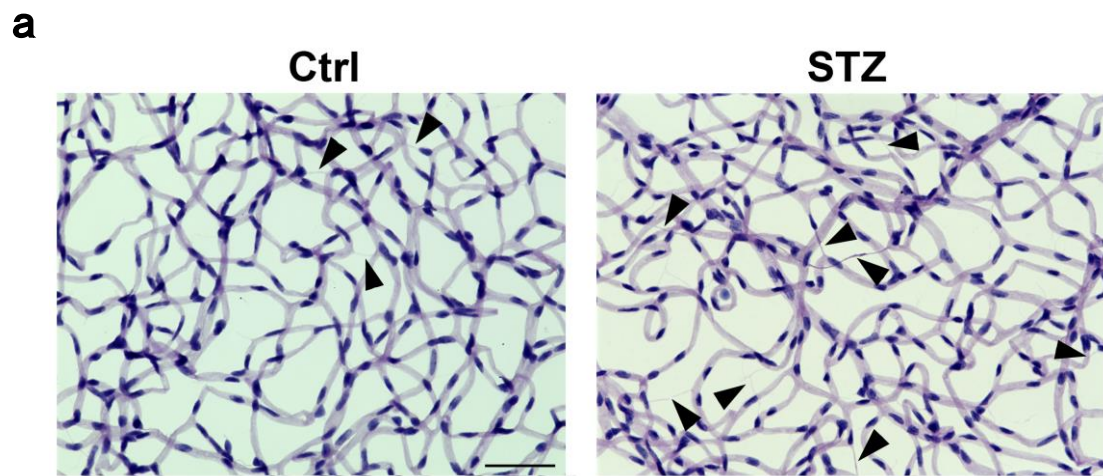


**図 2-3 Ctrl マウスと STZ マウスの網膜厚**

a. マウス網膜の病理切片画像。

b. 網膜全層の厚さの比較。STZ マウスの網膜厚は Ctrl マウスと比較して有意に低値であった。

Scale bar, 50 μm. 各値は平均±標準偏差で表示. n = 5. \* $P < 0.05$  (Student t-test).



**図 2-4 Ctrl マウスと STZ マウスのアセルラーキャピラリーの数**

a. マウス網膜のトリプシン消化標本画像。矢頭はアセルラーキャピラリー

b. STZ マウスのアセルラーキャピラリーの数は Ctrl マウスと比較して有意に高値であった。

Scale bar, 50  $\mu$ m. 各値は平均±標準偏差で表示. n = 5. \*\* $P < 0.01$  (Student t-test). FOV, 視野.

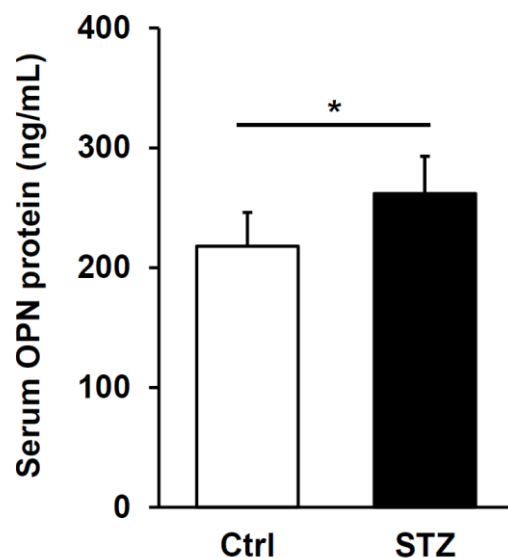


図 3-1 Ctrl マウスと STZ マウスの血清 OPN 濃度

STZ マウスの血清 OPN 濃度は Ctrl マウスと比較して有意に高かった。

各値は平均±標準偏差で表示.  $n = 7$ .  $*P < 0.05$  (Student t-test).

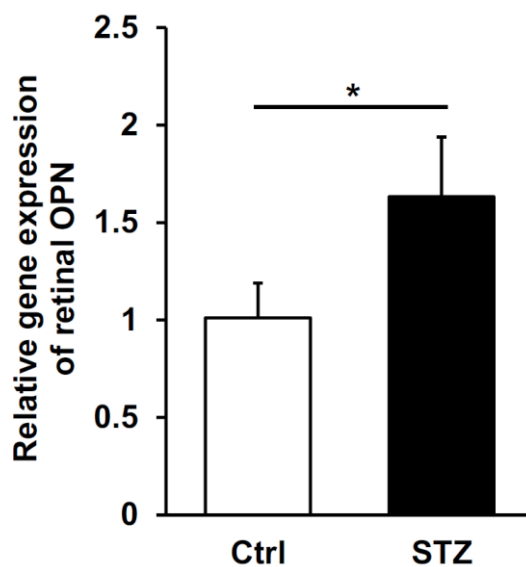
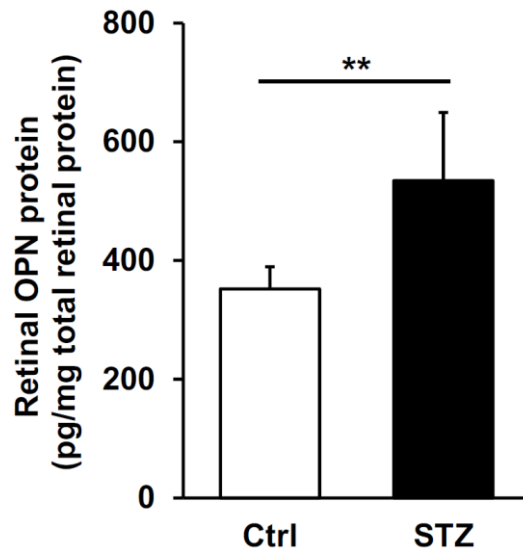


図 3-2 Ctrl マウスと STZ マウスの網膜における OPN 遺伝子の発現

網膜における OPN 遺伝子の発現。STZ マウスの網膜における OPN 遺伝子の発現は Ctrl マウスと比較して有意に高かった。

各値は平均±標準偏差で表示.  $n = 5$ .  $*P < 0.05$  (Student t-test).



**図 3-3 Ctrl マウスと STZ マウスの網膜における OPN 濃度**

網膜における OPN 濃度。STZ マウスの網膜における OPN 濃度は Ctrl マウスと比較して有意に高かった。

各値は平均±標準偏差で表示。n = 5 (Ctrl), 8 (STZ). \*\* $P < 0.01$  (Student t-test).



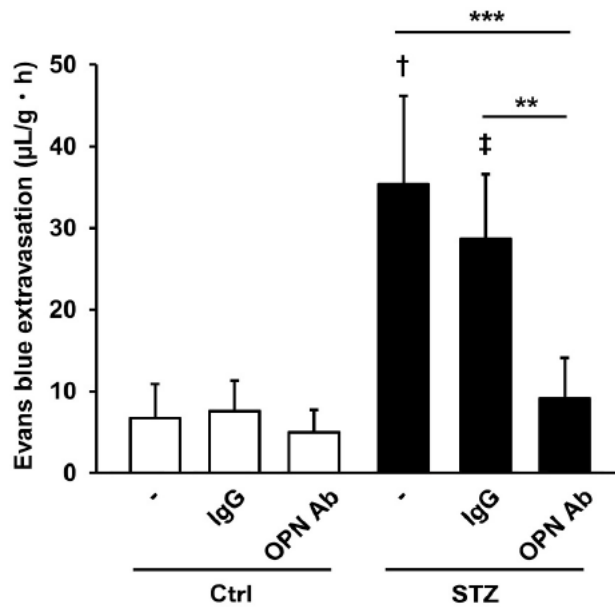
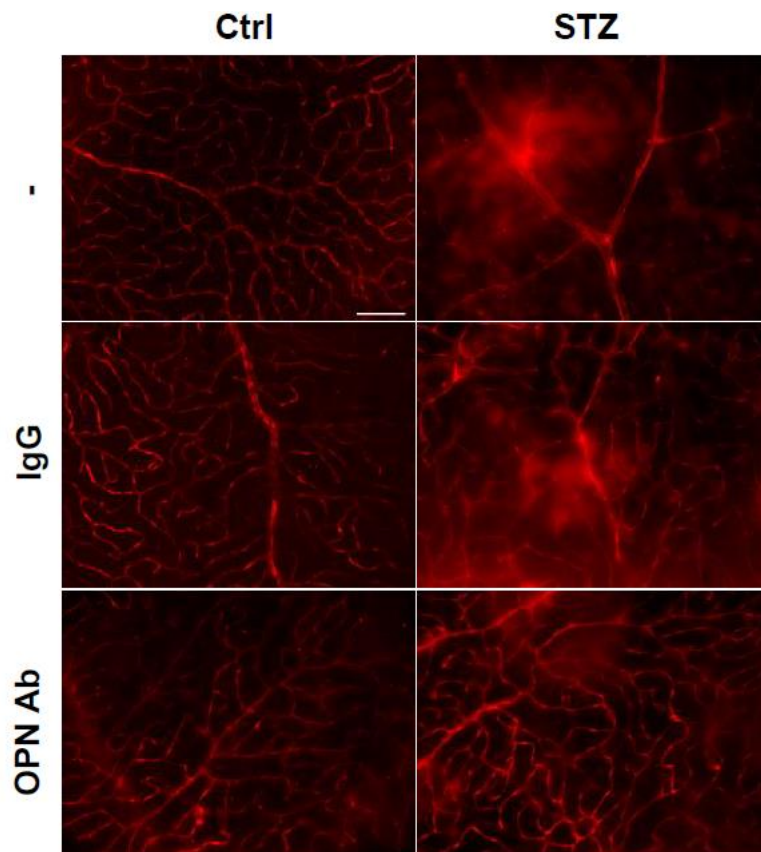


図 4-1 抗 OPN 中和抗体による網膜血管透過性亢進の抑制効果

網膜におけるエバンスブルー漏出量の比較。STZ 群および STZ-IgG 群のエバンスブルー漏出量は、Ctrl 群および Ctrl-IgG 群とそれぞれ比較して有意に高かった。STZ-OPN Ab 群のエバンスブルー漏出量は、STZ 群および STZ-IgG 群と比較して有意に低かった。

各値は平均±標準偏差で表示。n = 5. \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 (Tukey-Kramer test).

<sup>†</sup>P < 0.0001 (vs. Ctrl), <sup>‡</sup>P < 0.001 (vs. Ctrl-IgG) (Student t-test).



**図 4-2 抗 OPN 中和抗体による網膜血管透過性亢進の抑制効果**

網膜におけるエバンスブルー漏出の様子。Ctrl 群、Ctrl-IgG 群、Ctrl-OPN Ab 群ではエバンスブルーは血管内に留まっていた。STZ 群および STZ-IgG 群では局所的な血管からの漏出がみられたが、STZ-OPN Ab 群では漏出は抑えられていた。

Scale bar, 100  $\mu$ m.

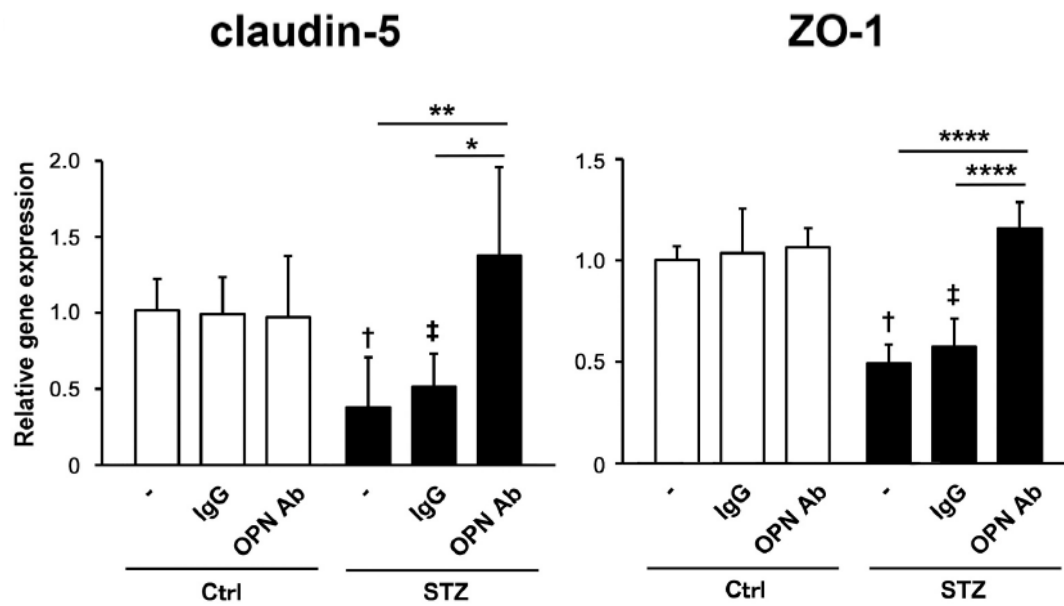


図 5-1 抗 OPN 中和抗体によるタイトジャンクション遺伝子発現の変化

網膜におけるタイトジャンクションの遺伝子発現。STZ 群および STZ-IgG 群の claudin-5 および ZO-1 の遺伝子発現量は、Ctrl 群および Ctrl-IgG 群とそれぞれ比較して有意に低かった。STZ-OPN Ab 群の claudin-5 および ZO-1 の遺伝子発現量は、STZ 群および STZ-IgG 群と比較して有意に高かった。

各値は平均 ± 標準偏差で表示。n = 5。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$

(Tukey-Kramer test). † $P < 0.05$  (vs. Ctrl), ‡ $P < 0.05$  (vs. Ctrl-IgG) (Student t-test).

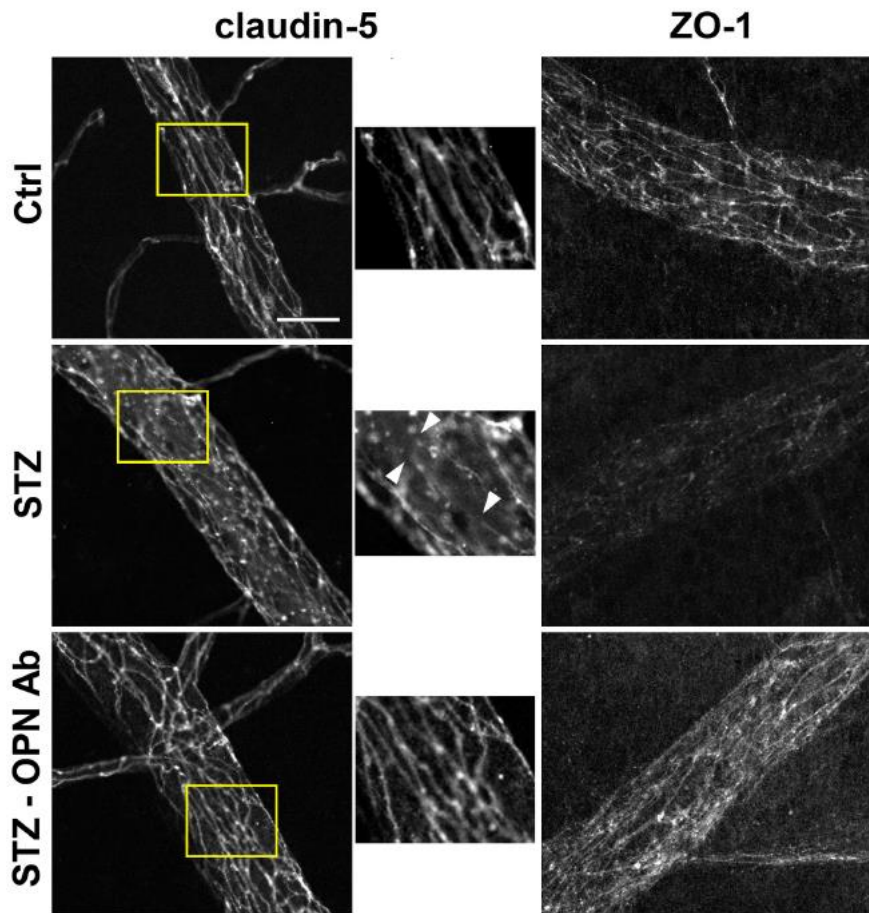


図 5-2 抗 OPN 中和抗体によるタイトジャンクションの構造変化

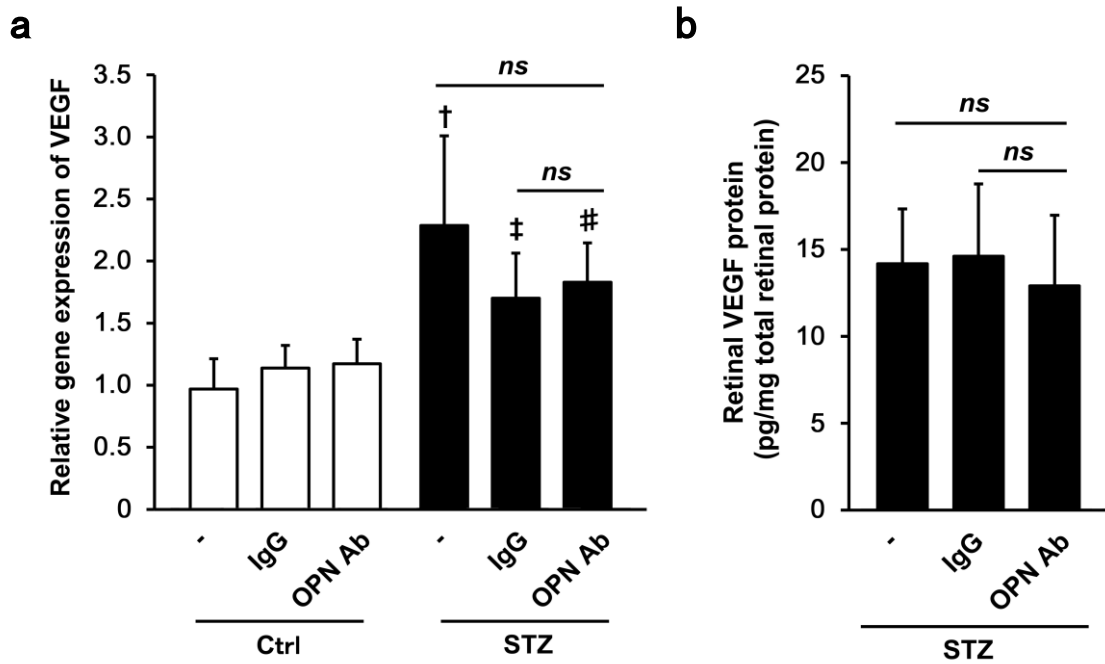
網膜伸展標本に対する claudin-5 抗体および ZO-1 抗体を用いた免疫組織化学染色。

(左段) claudin-5 の染色画像。STZ マウスでは局在が点状化していたが、抗 OPN 中和抗体投与例では点状化はみられなかった。

(中段) 左段の四角の領域を拡大した画像。STZ マウスでは細胞境界における免疫染色の途絶(矢頭)がみられたが、抗 OPN 中和抗体投与により細胞境界に一致した免疫染色が得られた。

(右段) ZO-1 の染色画像。STZ マウスでは全体的な免疫染色が減弱していたが、抗 OPN 中和抗体投与により免疫染色の回復が得られた。

Scale bar, 30  $\mu$ m.



**図 6 抗 OPN 中和抗体による VEGF の発現の変化**

- a. 網膜における VEGF の遺伝子発現。STZ 群、STZ-IgG 群、STZ-OPN Ab 群の VEGF の発現量は Ctrl 群、Ctrl-IgG 群、Ctrl-OPN Ab 群とそれぞれ比較して有意に高かった。STZ 群、STZ-IgG 群、STZ-OPN Ab 群の群間における発現量の有意差はみられなかった。
- b. 網膜の VEGF 濃度。STZ 群、STZ-IgG 群、STZ-OPN Ab 群の群間における濃度の有意差はみられなかった。

各値は平均±標準偏差で表示。n = 5。† $P < 0.0001$  (vs. Ctrl), ‡ $P < 0.05$  (vs. Ctrl-IgG), # $P < 0.05$  (vs. Ctrl-OPN Ab) (Student t-test). ns,  $P > 0.05$  (Tukey-Kramer test).

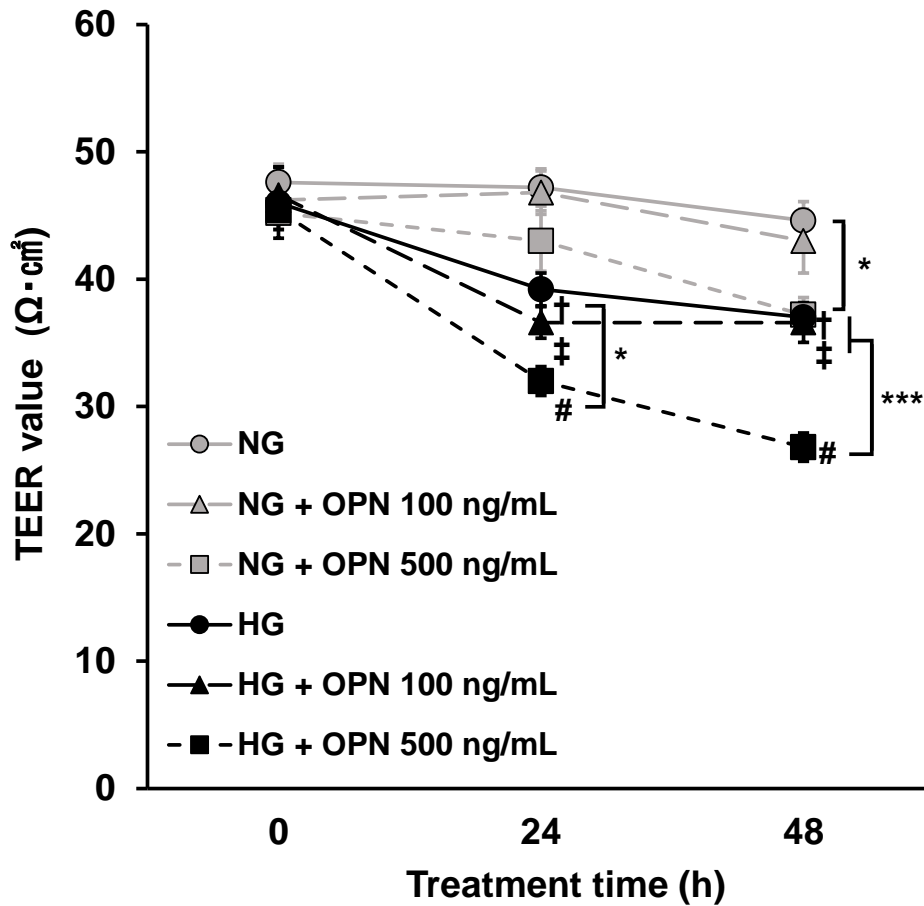


図 7-1 培養液への OPN 添加による HREC 単層細胞シートのバリア機能の変化

HREC 単層細胞シートにおける TEER。OPN の添加濃度に関わらず、HG 培地下の TEER は NG 培地下よりも有意に低下していた。OPN 添加濃度が 500 ng/mL の場合、NG 培地、HG 培地のいずれにおいても添加 48 時間後の TEER は OPN 添加なしの例と比較して有意に低下していた。

各値は平均±標準誤差で表示。n = 5。\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  (Tukey-Kramer test).

† $P < 0.01$  (vs. NG), ‡ $P < 0.01$  (vs. NG+OPN 100 ng/mL), # $P < 0.0001$  (vs. NG+OPN 500 ng/mL) (Student t-test).

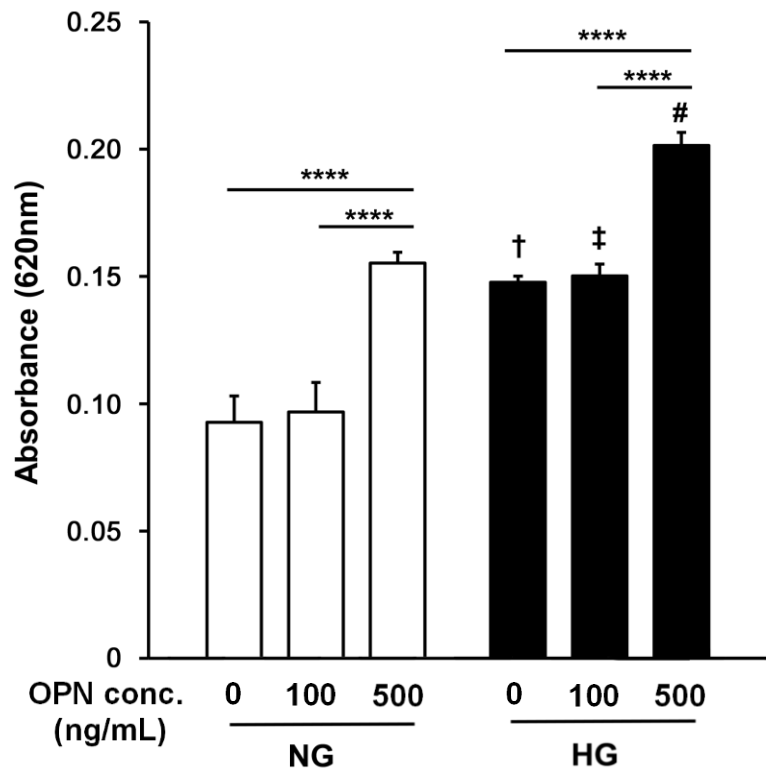


図 7-2 培養液への OPN 添加による HREC 単層細胞シートのバリア機能の変化

HREC 単層細胞シートにおけるエバンスブルーの透過性。OPN の添加濃度に関わらず、HG 培地下の透過性は NG 培地下よりも有意に上昇していた。OPN 添加濃度が 500 ng/mL の場合、NG 培地、HG 培地のいずれにおいても添加 48 時間後の透過性は添加なしの例と比較して有意に上昇していた。

各値は平均±標準偏差で表示。n = 4. \*\*\*\* $P < 0.0001$  (Tukey-Kramer test). † $P < 0.0001$  (vs. NG), ‡ $P < 0.0001$  (vs. NG+OPN 100 ng/mL), # $P < 0.0001$  (vs. NG+OPN 500 ng/mL) (Student t-test).

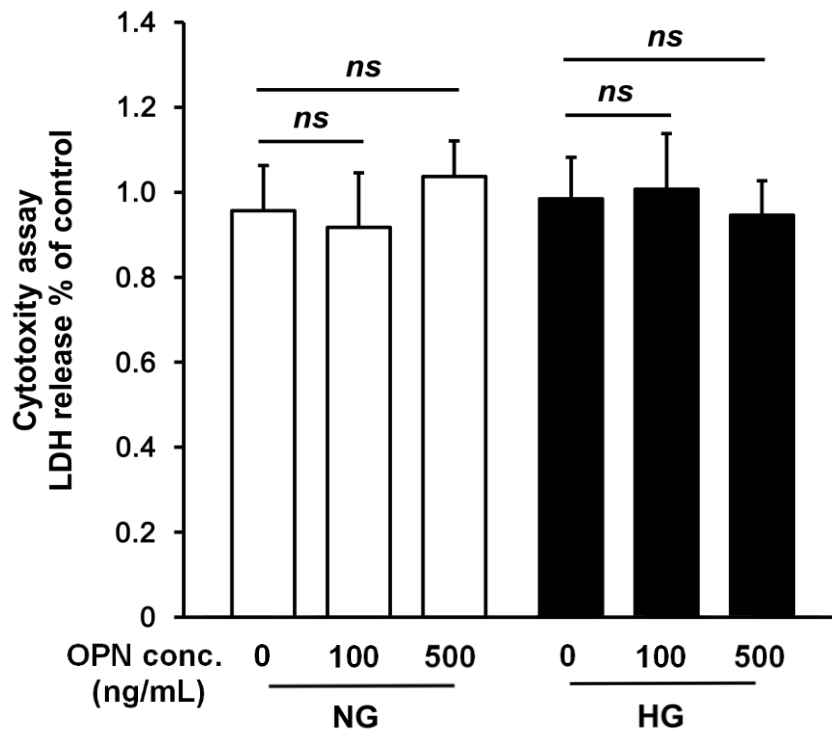
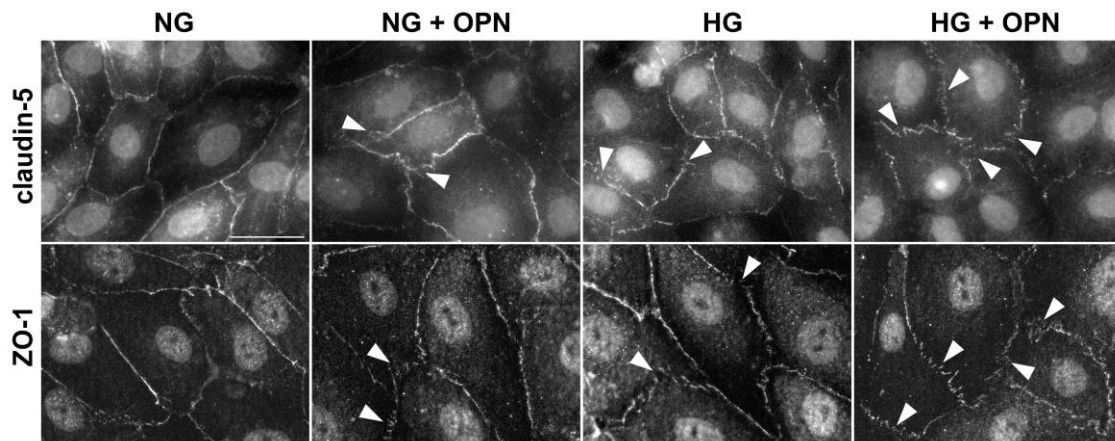


図 7-3 培養液への OPN 添加による細胞毒性

HREC における LDH 放出量の相対変化。OPN 添加による LDH 放出量(細胞障害の指標)に有意な変化は認めなかった。

各値は平均±標準偏差で表示.  $n = 4$ . *ns*,  $P > 0.05$  (Tukey-Kramer test).





**図 7-4 培養液への OPN 添加によるタイトジャンクションの変化**

HREC 単層細胞シートに対する claudin-5 抗体および ZO-1 抗体を用いた免疫細胞化学染色。NG 培地では線状の連続した接合が観察されたが、NG+OPN 培地、HG 培地、HG+OPN 培地では不連続な接合による点状分布を呈していた。

Scale bar, 30  $\mu$ m.

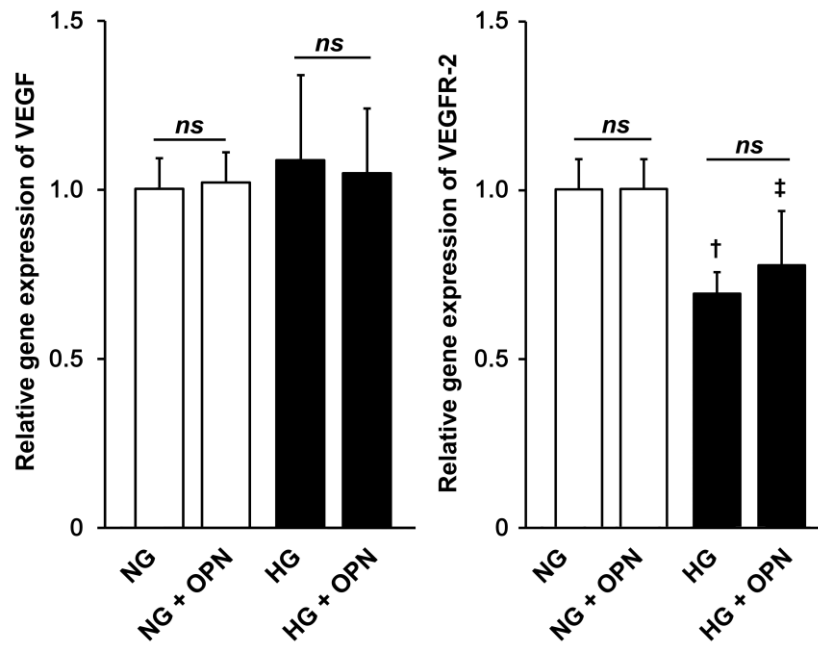


図 7-5 培養液への OPN 添加による VEGF および VEGFR-2 の発現の変化

HREC における VEGF および VEGFR-2 遺伝子の発現。OPN 添加による発現の有意な変化は認めなかった。

各値は平均±標準偏差で表示。n = 4. † $P < 0.01$  (vs. NG), ‡ $P < 0.05$  (vs. HG),

ns,  $P > 0.05$  (Student t-test).