

新規糖尿病モデルマウス ( $\text{Ins2}^{\text{Akita}}\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ 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

たぐち まんぞう

田口 万藏

(眼科学専攻)

防衛医科大学校

令和元年度

# 目 次

第 1 章 背景と目的	1 頁
-------------	-----

## 第 2 章 $\text{Ins2}^{\text{Akita}}$ IFN- $\gamma^{-/-}$ マウスの作成

第 1 節 緒 言	7 頁
-----------	-----

第 2 節 材料と方法	8 頁
-------------	-----

第 3 節 結 果	1 1 頁
-----------	-------

## 第 3 章 $\text{Ins2}^{\text{Akita}}$ IFN- $\gamma^{-/-}$ マウスの免疫細胞バランス

第 1 節 緒 言	1 4 頁
-----------	-------

第 2 節 材料と方法	1 5 頁
-------------	-------

第 3 節 結 果	1 8 頁
-----------	-------

## 第 4 章 $\text{Ins2}^{\text{Akita}}\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ マウスの網膜変化

第 1 節 緒 言	2 1 頁
-----------	-------

第 2 節 材料と方法	2 4 頁
-------------	-------

第 3 節 結 果	2 8 頁
-----------	-------

## 第 5 章 $\text{Ins2}^{\text{Akita}}\text{IFN-}\gamma^{-/-}$ マウスのサイトカイン動態

第 1 節 緒 言	3 1 頁
-----------	-------

第 2 節 材料と方法	3 2 頁
第 3 節 結 果	3 4 頁
第 6 章 考 察	3 5 頁
第 7 章 総 括	4 2 頁
第 8 章 参考文献	4 4 頁
謝 辞	5 3 頁
略 語	5 5 頁
図 表	5 8 頁



# 第 1 章

## 背景と目的

糖尿病（DM; diabetes mellitus）は、インスリン欠乏またはインスリン抵抗性によるグルコースの代謝障害によって特徴付けられる慢性疾患であり、持続的な高血糖症により血管および神経の障害が生じる<sup>1,2</sup>。DM 患者数は発展途上国でも先進国でも増え続けており、日本では約 830 万人と推定されている<sup>3</sup>。DM に関連した合併症は身体のほぼ全ての組織で出現し、DM の重篤な合併症の 1 つである糖尿病網膜症（DR; diabetic retinopathy）は、進行性の網膜血管の循環障害および神経機能不全から生じる。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（PDR; proliferative diabetic retinopathy）と段階的に進行し（表 1）<sup>4</sup>、日本における後天性失明原因の第 2 位である<sup>5</sup>。

DR における血管障害は長期間持続した高血糖状態による代謝異常や生理活性因子の発現異常によって生じるものなのでその成因は複雑だが、近年の研究で「高血糖」や「酸化ストレス」の他に「慢性炎症」が病態に関わっていることが明らかとなってきた（図 1）。これまでにさまざまな全身性および局所性炎症因子が DR の病態及び PDR への進行に関与していることが知られている<sup>6-9</sup>。炎症誘発性サイトカインは、リンパ球およびマクロファージのような免疫細胞の他にも内皮細胞や線維芽細胞等から分泌される一種のシグナル伝達分子であり、体内での過剰産生は様々な疾患の原因となる<sup>10</sup>。炎症誘発性サイトカインは DR 患者の眼内でも増加しており<sup>11,12</sup>、血液網膜関門（BRB; blood-retinal barrier）崩壊、毛細血管の無灌流域の形成、網膜血管新生、網膜グルタミン酸代謝機能障害、および網膜神経細胞のアポトーシスを惹起する<sup>6,7,11,13</sup>。

DR の炎症性の病態にはマクロファージを主体とする自然免疫の機能不全が関与していると考えられているが、T 細胞によって主導される獲得免疫の関与についてはよく知られていない。T ヘルパー (Th) 細胞は、脊椎動物において免疫の恒常性を維持し、急性および慢性の免疫応答において中心的な役割を果たす (図 2) <sup>14</sup>。Th 細胞は、産生サイトカインによりサブクラスに分類され、その機能異常は種々の炎症性疾患を引き起こすことが知られている。Th1 細胞は IFN- $\gamma$ , IL (interleukin) -2, および TNF  $\beta$  を産生し、臓器特異的自己免疫疾患に関与し、Th2 細胞は IL-4, IL-5, IL-13, および IL-31 を産生し、液性免疫疾患に関わる。そして IL-17 (A-F) <sup>15</sup>、IL-21、および IL-22<sup>16</sup>を産生する Th17 細胞は、自然免疫と獲得免疫を橋渡しする作用を有し、その異常は関節リウマチ等いくつかの自己免疫疾患や炎症性疾患の原因となっている <sup>17</sup>。

PDR 患者の硝子体液中において血清中の IL-17 濃度が健常者よりも上昇しており <sup>18-20</sup>、申請者ら及び他のグループは PDR を発症している眼の硝子体液中で IL-17A が増加していることを明らかにした <sup>21-23</sup>。これは、DM 患者の DR 進行における免疫反応が Th17 細胞優位に変化していることを示している。そして、高血糖状態では網膜内の IL-17A 産生および IL-17A レセプター発現が増加し、IL-17A は網膜ミューラー細胞機能を低下させることが in vitro の研究で示されている <sup>24</sup>。さらには、DR モデルマウスにおける抗 IL-17A 抗体または抗 IL-17A レセプター抗体の硝子体内注射は、網膜におけるミューラー細胞機能障害、白血球停滞、血管漏出、タイトジャンクションタンパクの下方制御および神経節細胞のアポトーシスを減少させる <sup>25</sup>。これらの結果は、IL-17A が潜在的に網膜ミ

ユラー細胞機能を損なうことによって直接的または間接的に DR を悪化させる役割があることを示唆している。

疾患の病態研究には動物モデルが不可欠であり、DM モデルには以下のものがある。1 型 DM モデルには Ins2<sup>Akita</sup> (Akita) マウス・NOD マウス・SDT (spontaneously diabetic Torii) ラットなどがあり、2 型 DM モデルには ob/ob マウス・db/db マウス・GK ラットなどがある。ストレプトゾトシン (STZ; streptozotocin) やアロキサンのような薬剤を用いた DM 誘発モデルもみられる。

Akita マウスは、7 番染色体上にある Mody4 遺伝子座のインスリン (Ins; insulin) 2 遺伝子に点突然変異を有し、DM を自然発症するモデル動物である<sup>26-28</sup>。ヘテロ接合体遺伝子変異雄マウスは、出生後 4 週間で高血糖症および低インスリン血症を発症し、神経細胞の変性、血管透過性の亢進、毛細血管無灌流域の僅かな増加、白血球停滞の増加<sup>29</sup>、並びにアマクリンおよび神経節細胞の喪失<sup>30</sup>を示す。このようにヒトにおける DM 合併症の初期と類似の病態を示すが<sup>31-33</sup>、ヒトの DR にみられる網膜浮腫、視神経萎縮、硝子体出血ならびに網膜前新生血管形成まで進行した段階に至ることはない<sup>34</sup>。Akita マウスと同様に、他の小型 DM 動物モデルの DR も軽微である<sup>35-38</sup>。STZ 誘発 DM マウスでは新生血管や pericyte loss を生じるまでには 8 ヶ月以上の期間を要する<sup>39, 40</sup>。SDT ラットも網膜血管無灌流域を形成するのに 20 ヶ月を要し、およそ 10 ヶ月齢から成熟白内障を呈するため眼底観察が困難となる<sup>41</sup>。いずれも早期 (9 週齢程度) からの蛍光眼底造影に

よる血管からの蛍光漏出は認めない。表 2 に代表的な小型 DM モデル動物と網膜変化を示す<sup>42-48</sup>。一方、Akita マウスと血管内皮増殖因子 (VEGF; vascular endothelial growth factor) を過剰発現する Kimba マウスを掛け合わせた Akimba マウス<sup>49</sup>も DR モデルとして使用されている。しかし、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、DM とは無関係に網膜血管に変化が生じるマウスである。従って、Akimba マウスも VEGF 以外の要因が複雑に絡み合っている生じる DR の研究に適合したモデルとはいえない。

IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> (GK0; interferon-gamma knock out) マウスは 10 番染色体の exon2 にネオマイシン耐性遺伝子を挿入し、IFN- $\gamma$  の合成を阻害したマウスである<sup>50</sup>。GK0 マウスでは、Th1 細胞への分化が低下しており、相対的に Th2 および Th17 細胞の分化および活性が優位になっている<sup>50-53</sup>。本研究では、Akita マウスと GK0 マウスを交配させ、Th17 細胞性免疫応答を誘導した新しい DR モデルマウス (Ins2<sup>Akita</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> マウス; Akita-GK0 マウス) を作成した。そしてこのマウスに生じた Th 細胞バランスと DR の病態及び眼内サイトカイン動態について野生型 (C57BL/6J; WT) 、Akita、および GK0 マウスと比較し、DR 発症における Th17 細胞の関与、そして DR モデル動物としての有用性について検討することを目的とした。

## 第 2 章

Ins2<sup>Akita</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスの作成

## 第 1 節 緒 言

Ins2 遺伝子のホモ接合体変異雄マウスは、成長不全を来とし生後 3 ヶ月以内に死亡するため、Ins2(+/-)・IFN- $\gamma$ (-/-)マウスの作成を試みた。また、Akita マウスはアメリカ国立衛生研究所のコロニー由来であり、アメリカ国立衛生研究所のコロニー由来のマウスには Crb1 (crumbs family member 1) 遺伝子にある rd8 に変異を有するマウスが混在する。rd8 変異のあるマウスは特徴的な白斑を網膜に生じるため<sup>54</sup>、実験から除外することとした。従って、Ins2(+/-)・IFN- $\gamma$ (-/-)・Crb1(wt/wt) を Akita-GKO マウスとし、その体重及び血糖値を測定した。

## 第 2 節 材料と方法

### 1 実験動物

以下、本研究における全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と ARVO Statement for Use Animals<sup>55</sup> に則って実施した。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。実験動物はイソフルラン（Wako, Osaka, Japan）の吸入麻酔下で、過量のペントバルビタール（ソムノペンチル®；共立製薬, Tokyo, Japan）を腹腔内注射して sacrifice した。全ての実験において 9 週齢の雄マウスのみを使用した。血糖値はマウスを 16 時間絶食させ、LAB Gluco®血糖測定器（bio medical science, Tokyo, Japan）を用いて測定した。実験動物として WT、Akita マウス、GK0 マウス、及び Akita-GK0 マウスを用いた。WT 及び Akita マウスは SLC（Shizuoka, Japan）から購入した。GK0 マウスは東京理科大学生命医科学研究所岩倉研究室から購入した。GK0 マウス、Akita マウスおよびそれらの仔を 2 世代にわたり交配させて Akita-GK0 マウスを作製した。血糖値及び体重 (BW; body weight) はいずれも 10 匹ずつ測定した。



## 2 getnotyping

Ins2 遺伝子変異の genotyping は既報に従って実施した<sup>56</sup>。GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) を用いて抽出した genomic DNA に共通の上流プライマー「TGGTCCCACATATGCACATG」及び、下流プライマー「TGCTGATGCCCTGGCCTGCT」を加えサーマルサイクラーで増幅した後に制限酵素 Fnu4HI (New England Biolabs, Massachusetts, USA) を加え、電気泳動を行なった。WT 由来の PCR 産物は制限酵素で全て切断され 140 bp の 1 本のバンドのみが形成されるが、Ins2 遺伝子にヘテロ変異がある Akita マウスのものは半数が切断されず、140 bp と 280 bp の 2 本のバンドを示すことで識別した。

IFN- $\gamma$  遺伝子変異の genotyping も既報に従って実施した<sup>50</sup>。上記と同様に抽出した genomic DNA に共通の上流プライマー「AACAGAGGATGGTTTGCATCTGGG」、WT の下流プライマー「AAAGCCAAGATGCAGTGTGTAGCG」、及び GKO の下流プライマー「ACGTGCATGGATCTGCAACATGTC」を加えてサーマルサイクラーで増幅した後に、電気泳動を行なった。WT 由来の PCR 産物は 1.6 kbp の 1 本のバンドのみが形成されるが、IFN- $\gamma$  遺伝子ホモノックアウトマウスのものは 1.7 kbp に 1 本のバンドを示し、IFN- $\gamma$  ヘテロノックアウトマウスのものは 1.6 kbp と 1.7 kbp に 2 本のバンドを示すことで識別した。

rd8 変異の genotyping も既報に従って実施した<sup>54</sup>。上記と同様に抽出した genomic DNA に WT の上流プライマー「GTGAAGACAGCTACAGTTCTGATC」、rd8 変

異を検出する上流プライマー

「GCCCCTGTTTGCATGGAGGAACTTGGAAGACAGCTACAGTTCTTCTG」、及び共通の下流プライマー「GCCCCATTTGCACACTGATGAC」をそれぞれに加えてサーマルサイクラーで増幅した後に、電気泳動を行なった。WT 由来の PCR 産物は 220 bp の 1 本のバンドのみが形成されるが、ホモ rd8 変異をもつマウスのものは 244 bp に 1 本のバンドを示し、ヘテロ rd8 変異をもつマウスのものは 220 bp と 244 bp に 2 本のバンドを示すことで識別した。

### 3 統計解析

JMP®Ver. 14 (SAS, North Carolina, USA) を用いて統計解析を行った。4 つのグループのデータはそれぞれ正規分布していたため (Shapiro-Wilk の検定)、ANOVA とそれに続く Tukey の検定を用いて比較した。全てのデータは平均±標準偏差で表示した。0.05 未満の P 値を統計学的に有意とみなした。

### 第 3 節 結 果

#### 1 Akita-GK0 マウスの作成

方法で述べた通り、Akita マウスと GK0 マウスを 2 世代掛け合わせたところ、いずれの世代でも繁殖は可能であり、Akita-GK0 マウスの出生に至った。出生した Akita-GK0 マウスに明らかな形体異常や異常行動はみられなかった(図 3)。Akita-GK0 マウス同士もまた繁殖可能であった。Akita-GK0 マウスにおける Ins2、IFN- $\gamma$ 、Crb1 遺伝子の genotyping の結果を図 4-1~3 にそれぞれ示す。

#### 2 血糖値

血糖値(平均値 $\pm$ SD)は WT マウスで  $133.8 \pm 11.9$  mg/dL、GK0 マウスで  $124.1 \pm 29.8$  mg/dL、Akita マウスで  $382.7 \pm 42.9$  mg/dL、Akita-GK0 マウスにおいて  $369.5 \pm 68.7$  mg/dL であった。Akita-GK0 マウスおよび Aktia マウスで血糖値が高値であり、同週齢の WT マウスまたは GK0 マウスよりも有意に高かった。WT マウスと GK0 マウスとの間、Akita マウスと Akita-GK0 マウスとの間には血糖値に統計学的有意差はなかった(図 5)。

### 3 BW

BW（平均±SD）は、WT マウスにおいて  $22.3 \pm 0.820$  g、GKO マウスにおいて  $21.8 \pm 1.18$  g、Akita マウスにおいて  $18.7 \pm 0.691$  g、Akita-GKO マウスにおいて  $20.3 \pm 1.29$  g であった。Akita マウスまたは Akita-GKO マウスの BW は、同週齢の WT マウスまたは GKO マウスより有意に低かった。WT マウスと GKO マウスとの間、Akita マウスと Akita-GKO マウスとの間に、統計学的有意差はなかった（図 6）。

## 第 3 章

Ins2<sup>Akita</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスの免疫細胞バランス

## 第 1 節 緒 言

申請者は次に、Akita-GK0 マウスが GK0 マウスの免疫細胞活性の特性を有しているか確認するため、Th 細胞分化プロファイリングを行うこととした。網膜およびナイーブ T 細胞がエフェクター T 細胞に分化する二次リンパ組織の 1 つである脾臓における Th1/2/17 細胞の転写因子の発現および産生するサイトカインを RT-PCR (real-time reverse transcription-polymerase chain reaction) 及びフローサイトメトリーにより解析することとした。

## 第 2 節 材料と方法

### 1 卵白アルブミンによる免疫反応の活性化

網膜と脾臓のサンプルを用いて RT-PCR 及びフローサイトメトリーを実施するにあたり全身の免疫反応を活性化させるために、各群のマウスを鶏卵卵白から作製したアルブミン (OVA; ovalbumin, Wako, Osaka, Japan) - (CFA; complete Freund's adjuvant, Becton Dickinson, New Jersey, USA; 以下 BD) で免疫した。400  $\mu$ g の OVA を 1 ml の PBS に溶解し、1 ml の CFA を加え 30 分間激しく混合することによって乳化した<sup>57</sup>。次に、調製したエマルジョン 100  $\mu$ l を各群のマウスの 7 週齢および 8 週齢時に 2 回頸部皮下に注射した。フローサイトメトリーに用いる脾臓の採取では、さらに OVA (5  $\mu$ g/ml in PBS) の腹腔内注射を解析の 2 日前に行った<sup>58</sup>。

### 2 網膜および脾臓における転写因子の発現解析

前項の通り免疫した WT、Akita、GKO、および Akita-GKO マウスから網膜及び脾臓を採取し、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Tokyo, Japan) を用いて全 RNA を抽出した。次いで、SuperScript II Reverse Transcriptase Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) を用いて RNA に対応する cDNA に逆転写した。使用したプローブ (Applied Biosystems, Massachusetts, USA) は以下の通りである。T-bet (Tbx21、Mm00450960\_m1)、GATA-3

(Gata3、Mm00484683\_m1) 、ROR- $\gamma$  T (Rorc、Mm01261022\_m1) 、18S rRNA (Rn18s、Mm03928990\_g1) を内因性コントロールとして用いた。T-bet は Th1 細胞への、GATA-3 は Th2 細胞への、ROR- $\gamma$  T は Th17 細胞への分化をそれぞれ促進する転写因子である。7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Massachusetts, USA) を用いて  $\Delta\Delta$ CT 法により RT-PCR 解析を行った。各因子の mRNA レベルは 18S rRNA を基準とした相対発現量で示した。Akita、GKO および Akita-GKO マウスにおける発現は、WT マウスを基準として示した。網膜、脾臓は各群 9 サンプルずつ測定した。

### 3 フローサイトメトリーによる脾細胞のサイトカイン発現解析

前項のとおり免疫した WT、Akita、GKO、および Akita-GKO マウスより脾臓を採取し、手動的にホモジナイズした後セルストレーナー (70  $\mu$ m) で脾細胞を精製した。次に、磁気ビーズを用いた細胞分離用キット ; MACS® (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) により CD3<sup>+</sup>T 細胞を単離した。10%ウシ胎児血清添加 RPMI1640 培地 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) で培養し<sup>59</sup>、ホルボールミリステートアセテート (50 ng / ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) およびイオノマイシン (500 ng / ml; Wako, Osaka, Japan) により 6 時間刺激した<sup>60</sup>。培養最後の 2 時間にブレフェルジン A (10  $\mu$ g / ml; Wako, Osaka, Japan) を加えた。刺激後、細胞を洗浄し、1x10<sup>6</sup>個の細胞に対し 0.02  $\mu$ g /  $\mu$ l の抗 CD4 抗体 (PerCP-Cy5.5) で細胞表面を染色し、Cytofix / Cytoperm™



Fixation / Permeabilization Solution Kit (BD) を用いて細胞膜処理を行ったのちに APC で標識した抗 IL-2、4、10、17、22、または TNF  $\alpha$  抗体 (eBioscience) 0.02  $\mu\text{g}$  /  $\mu\text{l}$  で細胞内染色を行った。全ての抗体は  $1 \times 10^6$  個の細胞に対し 0.02  $\mu\text{g}$  /  $\mu\text{l}$  で使用した。染色細胞を、BD FACS Canto II (BD) を用いてフローサイトメトリー (2 色法) により分析した。アイソタイプが一致した対照抗体を用いて、BD FACSDiva™ ソフトウェア (BD) によりデータを分析した。脾臓は各群 6 サンプルずつ測定した。

#### 4 統計解析

前章に記載

### 第 3 節 結 果

#### 1 網膜及び脾臓における転写因子の遺伝子発現

図 7 に示すように、網膜における ROR- $\gamma$ t 遺伝子の発現は、Akita マウス ( $1.49 \pm 0.26$ )、GK0 マウス ( $1.62 \pm 0.252$ ) および Akita-GK0 マウス ( $2.53 \pm 0.39$ ) で上昇していたが、WT マウスと比較した統計学的有意差は Akita-GK0 マウスでのみ観察された。GATA-3 遺伝子の発現は GK0 マウス ( $1.52 \pm 0.56$ ) および Akita-GK0 マウス ( $2.01 \pm 0.55$ ) で上昇し、WT マウスと比較した統計学的有意差は Akita-GK0 マウスで観察されたが、GK0 マウスでは観察されなかった。4 群間で T-bet の遺伝子発現に有意差はなかった。全てのデータを表 3 に示す。

図 8 に示されるように、脾臓においても同様の結果が観察された。Akita-GK0 マウスの ROR- $\gamma$ t の遺伝子発現は WT マウスよりも有意に高かった。一方、GATA-3 遺伝子の発現は WT または Akita マウスよりも GK0 および Akita-GK0 マウスで上昇していたが、それらの間に統計的有意差はなかった。全てのデータを表 4 に示す。

#### 2 フローサイトメトリー

磁気ビーズを用いた細胞分離用キットである MACS®を使用した negative selection によって 95%の精度で CD3<sup>+</sup>細胞が得られた。図 9 に示すように、

まず死細胞を除外した。次に、生細胞の中からダブレットや凝集塊及びリンパ球以外の細胞を除去後、CD4<sup>+</sup>細胞数を分母に、CD4 と各サイトカイン抗体染色共陽性細胞の数を分子とした割合を比較した。各群の IL-17 および IL-22 の代表的なドットプロットパターンを図 10 に、全てのデータを表 5 に示す。CD4<sup>+</sup>細胞のうちの IL-2<sup>+</sup>、IL-4<sup>+</sup>、IL-10<sup>+</sup>および TNF  $\alpha$ <sup>+</sup>細胞の割合には全ての群間で有意差はなかった（図 11-1, 2）。

しかし、図 10 及び 11-3 に示すように、CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>細胞および CD4<sup>+</sup>IL-22<sup>+</sup>細胞の割合は、それぞれ WT マウスでは 0.177  $\pm$  0.144%、0.107  $\pm$  0.144%、Akita マウスでは 0.251  $\pm$  0.136%、0.308  $\pm$  0.290%、GKO マウスでは 0.367  $\pm$  0.253%、0.340  $\pm$  0.321%であったが、Akita-GKO マウスでは 2.10  $\pm$  0.571%、1.66  $\pm$  0.396%と他の 3 群と比較して有意に上昇していた。

## 第 4 章

Ins2<sup>Akita</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスの網膜変化

## 第 1 節 緒 言

白血球停滞は DR の網膜に生じる炎症所見である。白血球停滞の最初のステップであるローリングは、セレクトインと呼ばれる糖結合性蛋白質と特殊な糖鎖の結合を介して行なわれる。実際には白血球は血管内皮細胞に接着したり離れたりしながら血管内壁を転がるが、この接着のオン・オフにはセレクトインと糖鎖との弱い結合が役立っていると考えられている。次に、白血球上のインテグリンという接着分子が様々なサイトカインにより活性化刺激を受ける。活性化刺激を受けた白血球は、血管内壁にへばりつくように血管内皮細胞に強固に接着する。このステップは粘着 (adhesion) と呼ばれる。この粘着は、白血球上のインテグリン分子と血管内皮細胞上の ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) や Vascular cell adhesion molecule-1 という接着分子との結合によって行なわれる (図 12) <sup>61</sup>。白血球の網膜血管内皮への接着が内皮細胞のアポトーシスや血管透過性を亢進する。VEGF の発現増加によって白血球停滞は亢進し、白血球停滞は VEGF の発現を増加させるという悪循環に陥る <sup>62</sup>。

マウスの網膜層構造はヒトと同じく 10 層からなり、硝子体側から内境界膜、神経線維層 (NFL; nerve fiber layer)、神経節細胞層 (GCL; ganglion cell layer)、内網状層 (IPL; inner plexiform layer)、内顆粒層 (INL; inner nuclear layer)、外網状層 (OPL; outer plexiform layer)、外顆粒層 (ONL; outer nuclear layer)、外境界膜、視細胞層、網膜色素上皮層である (図 13-1) <sup>63, 64</sup>。解剖学的に 3 つ

の VPL (vascular plexus layer) がマウスに存在する。NFL および GCL に存在する SVPL (superficial vascular plexus layer) 、 IPL と INL の境界に存在する IVPL (intermediate vascular plexus layer) 、最深層の INL と OPL の境界にある DVPL (deep vascular plexus layer) である (図 13-2) <sup>65, 66</sup>。

網膜毛細血管の基底膜の肥厚は、DR で最もよくみられる病理所見の 1 つである <sup>67</sup> DR において網膜毛細血管は透過性亢進、内腔閉塞、血管新生の順に進展し、透過性亢進は基底膜が肥厚する以前にみられる <sup>68</sup>。特に周皮細胞の外側の基底膜がびまん性に肥厚する。基底膜はⅣ型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ヘパラン、硫酸プロテオグリカンを主成分とするが、DR では前 3 者の増加がみられる <sup>69</sup>。基底膜肥厚の原因は単一ではなく、基底膜構成成分の合成更新及び分解低下、血漿蛋白の沈着等が挙げられる。

Akita マウスの網膜では、8 週齢で白血球停滞が増加し、12 週齢で網膜血管透過性が亢進する。22 週齢で IPL および INL の網膜神経節細胞の数が減少し、それにより網膜内層が菲薄化する <sup>30</sup>。線維性血管膜 (FVM; fibrovascular membrane) の形成はみられない。8 ヶ月齢以降には網膜血管新生 (フルオレセイン蛍光眼底造影による血管面積の増加) も生じるが <sup>29</sup>、眼底写真で局所的な白斑や萎縮巣を観察したという報告はない。上記の既報に基づき、Akita-GKO マウスの DR の程度を調べるため、白血球停滞、病理組織学的検討：ヘマトキシリンエオジン (HE; hematoxylin and eosin) 染

色及び免疫組織化学染色、眼底写真及びフルオレセイン蛍光眼底造影の評価を行い、他の 3 群：WT、Akita、GKO マウスと比較した。

## 第 2 節 材料と方法

### 1 白血球停滞

白血球停滞は既報に則って測定した<sup>9,31</sup>。はじめに赤血球および非付着性白血球を除去するために PBS (5 mL) を通常の心拍出量 (10~14 mL/min) で左心室より灌流し、次にフルオレセインイソチオシアネート-コンカナバリン A (FITC-ConA) (5 mg/kg; 20  $\mu$ g/mL in PBS [pH 7.4]; Vector, CA, USA) を付着白血球および血管内皮を染色するために灌流し、さらに PBS を同じ速度で灌流し洗浄した。網膜を脈絡膜および強膜から分離し、伸展標本を作成し、蛍光顕微鏡で撮影した。動脈または静脈は視神経乳頭周囲の血管およびその第 1 分枝の血管と定義し、それ以外のすべての血管は微小血管とみなした。動脈または静脈のいずれかに付着した白血球を数えたが、微小血管に付着したものは除外した。1 網膜あたりの血管壁に付着している白血球の総数を数えた。各群 8 網膜ずつ計測した。

### 2 HE 染色

各群のマウスをイソフルラン吸入下、過量のペントバルビタールによる深麻酔下で、リン酸緩衝 4%パラホルムアルデヒド液で灌流固定した。眼球を摘出し、角膜と水晶体を除去した後、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、HE 染色と後述の免疫組織化学染色に供した。

### 3 免疫組織化学染色

各群から得られたパラフィン切片を、キシレンで脱パラフィンした後、室温で 2 分間 Histo/Zyme (Diagnostic BioSystems, CA, USA) で処理した。標本を内因性ペルオキシダーゼ阻害剤 (Dako, Glostrup, Denmark) にて室温で 15 分間、さらに、2.5%のウマ血清と共に 45 分間インキュベートした。1 次抗体反応は、抗ペリオスチン抗体 (RSD, Minneapolis, USA) (1 : 200 希釈) を 4 °Cで一晩行った。PBS で洗浄した後、スライドをペルオキシダーゼ結合ポリマー二次抗体 (ImmPRESS reagent; Vector, CA, USA) と共に室温で 45 分間インキュベートし、3,3'-ジアミノベンジジンで発色させ、核をヘマトキシリンで対比染色した。

ペリオスチンは胚形成、骨組織・筋組織の修復、創傷治癒など、組織が再構成 (リモデリング) される際に、その発現が顕著に亢進する細胞外基質である。眼科領域においては、増殖組織の血管平滑筋細胞や筋線維芽細胞などの周囲に局在していることが確認されている。さらに近年では、PDR 患者の眼の FVM の形成に関与していると報告されている<sup>70-72</sup>。

#### 4 電子顕微鏡写真

各群のマウスをイソフルラン吸入下、過量のペントバルビタールによる深麻酔下で2%グルタルアルデヒドおよび2%パラホルムアルデヒドで灌流固定した。眼球を摘出し、角膜と水晶体を除去した後、同じ固定液に4℃で一晩浸漬固定した。次に2%四酸化オスミウム水溶液中で1.5時間固定した。Epon 812に包埋した後、酢酸ウラニルで染色した超薄切片を電子顕微鏡 (Type 1400plus; JOEL, Tokyo, Japan) で観察した。網膜の血管の基底膜は1血管につき異なる6点の平均を既報の通り計測し<sup>39</sup>、各群1眼につき3血管ずつ4眼、すなわち各群12血管ずつでSVPL、IVPL及びDVPLの3層でそれぞれ比較した。

#### 5 眼底写真とフルオレセイン蛍光眼底造影

WT、GKO、Akita、Akita-GKO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 (ミドリン-P®; 参天製薬, Osaka, Japan) を用いて散瞳した。ヒドロキシエチルセルロースゲル (スコピゾル®; 千寿製薬, Osaka, Japan) を眼に点入し、Micron IV®網膜 (Phoenix Research Laboratories, CA, USA) イメージング顕微鏡にて眼底の変化を観察した。その後、FITC (100 mg/ml) (Fluorescein®; ノバルティス ファーマ, Tokyo, Japan) を0.05 ml 腹腔内注射し、フルオレセイン蛍光眼底造影を施行した。

## 6 統計解析

2 章に記載

### 第 3 節 結 果

#### 1 白血球停滞

各群における FITC-ConA 灌流後の網膜伸展標本の代表的な所見を図 14-1 に示す。網膜血管に付着する白血球の数は、Akita マウスにおいて増加し、Akita マウス ( $14.9 \pm 4.22$  cells/retina) と WT ( $5.88 \pm 1.69$  cells/retina) または GK0 マウス ( $8.75 \pm 1.56$  cells/retina) との間にそれぞれ有意差があった。Akita-GK0 マウス ( $20.6 \pm 4.92$  cells/retina) では Akita マウスよりもさらに増加しており、他の 3 群全てのマウスの白血球の網膜血管への付着と比較して有意差がみられた。WT と GK0 の間で白血球停滞に有意差はなかった (図 14-2)。

#### 2 網膜の組織病理学的検討

各群の 9 週齢のマウス網膜の代表的な組織像を図 15a～c に示す。WT、Akita、または GK0 マウスでは異常な組織学的所見は観察されなかったが、Akita-GK0 マウスでは網膜表層に浮腫性変化が観察された (図 15a 矢印)。免疫組織化学染色では、Akita-GK0 マウスの NFL および GCL に抗ペリオスチン抗体による濃染がみられたが、他の群のマウスではみられなかった (図 15b 矢印)。SVPL / IVPL / DVPL 全ての層の網膜血管において Akita-GK0 マ

ウスは他の 3 群と比較して有意に血管基底膜の肥厚を認めた（図 16～18）。

いずれも 4 サンプル以上で再現性を確認した。

### 3 眼底写真とフルオレセイン蛍光眼底造影

各群のマウスの代表的な眼底写真およびフルオレセイン蛍光眼底造影の画像を図 19-1, 2 に示す。各グループの眼底写真とフルオレセイン蛍光眼底造影は同一眼である。Akita-GKO マウスでは網膜に白斑が観察されたが、WT、GKO および Akita マウスにはみられなかった。フルオレセイン蛍光眼底造影では、フルオレセインの蛍光漏出は Akita-GKO マウスの網膜の白斑の場所と一致して観察された（図 19-2）。Akita-GKO マウスの 10 眼中 8 眼に上記の所見がみられた。

## 第 5 章

Ins2<sup>Akita</sup>IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>マウスのサイトカイン動態

## 第 1 節 緒 言

VEGF は網膜血管内皮細胞に作用し、血管新生（増殖、遊走、管腔形成）を促進すると同時に血管透過性を強力に亢進させる。また、炎症細胞の遊走や停滞を介して血管閉塞・虚血に関与する。VEGF による BRB の破綻は、白血球の ICAM-1 を介した網膜血管への接着によっても起こる。VEGF をサル眼に投与すると、網膜出血、細動脈瘤、無血管野の出現など DR 類似の眼底所見を呈し<sup>73</sup>、VEGF 濃度は DR の活動性と強く相関している。

前章では Akita-GKO マウスにおいて白血球停滞の亢進及び、網膜血管からの蛍光漏出や血管基底膜の肥厚が見られ、血管透過性が亢進している状態にあると考えられた。従って本章では、各群のマウスの網膜における ICAM-1・VEGF 遺伝子の発現及び VEGF をはじめとする各種生理活性因子の眼内濃度を測定することとした。

## 第 2 節 材料と方法

### 1 眼サンプルの採取

3 章に記載のとおり免疫した、フローサイトメトリーに使用したマウスより眼サンプルを採取した。

### 2 網膜におけるサイトカイン遺伝子の発現解析

3 章 3 項の通り免疫した WT、Akita、GKO、および Akita-GKO マウスから網膜を採取し、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Tokyo, Japan) を用いて全 RNA を抽出した。続いて SuperScript II Reverse Transcriptase Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) を用いて RNA に対応する cDNA を作成した。使用したプローブ (Applied Biosystems, Massachusetts, USA) は以下の通りである。ICAM-1 (Icam1、Mm046023\_m1) VEGF (Vegfa, Mm00437304\_m1)。18S rRNA (Rn18s、Mm03928990\_g1) を内因性コントロールとして用いた。7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Massachusetts, USA) を用いて  $\Delta\Delta$ CT 法により RT-PCR 解析を行った。各因子の mRNA レベルは 18S rRNA を基準とした相対発現量で示した。Akita、GKO および Akita-GKO マウスにおける発現は、WT マウスを基準として示した。網膜、脾臓は各群 9 サンプルずつ測定した。



### 3 Bio-Plex™を用いたタンパク濃度の定量

WT、Akita、GK0、および Akita-GK0 マウスから眼球を採取し、2 眼球あたり 100  $\mu$ l の PBS を加え、18 G 針で穿刺後に電動ホモジナイザーでホモジナイズした。その後すぐに 10,000  $\times$  g で 10 分間遠心分離し、上清を採取した。Bio-Plex™ Pro Mouse Cytokine Assays® GI 8-Plex A Panel (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) 、VEGF Kit (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) 及び IL-17A Kit (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) を用いて、サンプル中の IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-17A、IFN  $\gamma$ 、および VEGF 濃度を測定した。標準曲線による検出下限はそれぞれ、IL-2 が 2.67 pg/ml、IL-4 が 3.54 pg/ml、IL-5 が 1.49 pg/ml、IL-10 が 0.67 pg/ml、IL-17A では 2.39 pg/ml、IFN  $\gamma$  では 0.88 pg/ml、VEGF では 6.39 pg/ml であった。各群 9 頭 18 眼ずつ測定した。

### 4 統計解析

2 章に記載

### 第 3 節 結 果

#### 1 網膜における VEGF 及び ICAM-1 の遺伝子発現

図 20 に示すように VEGF 遺伝子の発現は、Akita-GK0 マウスでは WT および GK0 マウスと比較して有意に発現が亢進していたが、Akita マウスでは WT や GK0 マウスと比較して有意差はなかった。Akita マウスおよび Akita-GK0 マウスにおいて ICAM-1 遺伝子の発現レベルは、共に WT マウスまたは GK0 マウスよりも有意に上昇していた。全てのデータを表 6 に示す。

#### 2 Bio-Plex™を用いたタンパク濃度定量の結果

4 つの群の眼における IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-17A、IFN $\gamma$ 、および VEGF の濃度を分析したが、これらの因子のうち VEGF のみが検量線の範囲内であり検出可能であった。その他の因子は全て検出下限未満であった。図 21 に示すように、眼内の VEGF の濃度は、WT マウス (279  $\pm$  106 pg/ml)、GK0 マウス (293  $\pm$  146 pg/ml) および Akita マウス (263  $\pm$  95.9 pg/ml) と比較して Akita-GK0 マウス (471  $\pm$  180 pg/ml) において有意に高値であった。

## 第 6 章

## 考 察

## 考 察

今回作成したマウスではインスリン分泌低下と Th17 細胞優位の免疫反応が同時に生じているが、正常に成獣に達しかつ繁殖可能であった。この結果から、この系統のマウスが DM と Th17 細胞活性に付随する合併症の解析に適する可能性があることが示された。

前述の Akimba マウスは 24 週齢で Akita マウスと血糖値に有意差はなくなるものの、8 週齢の時点では Akita マウスよりも血糖値は高かった<sup>49</sup>。一方、9 週齢の Akita マウスと Akita-GKO マウスの間、WT マウスと GK0 マウスのとの間の血糖値に有意差はなかった。このことは、IFN- $\gamma$  の欠損が血糖値に影響しないことを示唆している。

ob/ob マウスなどの 2 型 DM モデル動物は過食により BW 増加を呈し、Akita マウスなどの 1 型 DM モデル動物は、インスリンの分泌不全によりグリコーゲンの肝臓への貯蓄やアデノシン 3 リン酸の脂肪・筋組織への取り込みが減少するため BW が減少する<sup>42</sup>。BW 増加が生じ肥満を呈するモデル動物の場合は tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) や IL-6 に代表される炎症性アディポサイトカインの産生が亢進してしまうため<sup>74</sup>、Akita-GKO マウスではそれらのバイアスは除去できると考えられる。9 週齢の Akita マウスと Akita-GKO マウスの間、及び WT マウスと GK0 マウスの間で BW に有意差はなかった。このことはまた、IFN- $\gamma$  の欠損が BW に影響しないことも示唆している。しかしながら血糖値・BW い

ずれも 9 週齢時点でのデータのみであり、今後複数の時点で測定したデータが必要とされる。

1 型 DM を発症した患児からの末梢血 CD4<sup>+</sup>T 細胞は、健常人と比較してより高レベルの IL-17 および IL-22 を産生するが、IFN- $\gamma$  レベル、または Th1 細胞への分化を促進する転写因子である T-bet の発現は増加しない<sup>75</sup>。また、IL-10 の遺伝子多型は、DM の合併症の発症と関連し<sup>76</sup>、他のグループとともに申請者らも Th2 細胞関連サイトカインである IL-4 および IL-10 が PDR 患者の眼内で上昇していたことを報告した<sup>21,22,77</sup>。今回、Akita-GK0 マウスの眼および脾臓における Th1、Th2、Th17 細胞の転写因子の発現を解析したところ、Akita-GK0 マウスの ROR- $\gamma$ T 遺伝子発現は GK0 マウスのそれらより高く、WT マウスと比較して有意であった。かつ、Akita-GK0 マウスの脾臓 T 細胞における IL-17 および IL-22 の発現細胞の割合は、他の群のマウスよりも有意に高く、RT-PCR とフローサイトメトリーの結果は一致しており Akita-GK0 マウスでは Th17 細胞活性が高い状態にあることがわかった。これは、GK0 マウスの Th17 細胞優位の分化が Akita マウスの高血糖状態によりさらに促進されたためと考えられる。

Akita-GK0 マウスの GATA-3 遺伝子発現は脾臓において有意差はなく、またフローサイトメトリーにおいて IL-4 または IL-10 を産生する CD4<sup>+</sup>T 細胞の発現頻度は、Akita-GK0 マウスにおいてわずかに増加傾向にあったが、それらはいずれも他の群のマウスと比較して有意差はなかった。つまり、Akita-GK0 マウスの Th2 細胞活性の明確な上昇はみられなかった。眼内にリンパ節は存在しない

が、Th 細胞の転写因子の RT-PCR は眼球内に存在するわずかなリンパ球の発現を増幅したと考えられる。実際に眼内リンパ腫という眼原発のリンパ腫が存在することからも、眼内にリンパ球は少なからず存在している。

本研究では、DR と Th2 細胞誘導性サイトカインとの関連は確認できなかったが、Th17 誘導性サイトカインは DR の進行に強く関与していることが示された。Th17 細胞免疫にシフトしている GK0 に STZ 処理をしたマウスでは WT に STZ 処理をしたマウスよりも DM が悪化したとの既報があり、今回の結果と矛盾しない<sup>78</sup>。

白血球停滞は Akita マウスのみならず DM モデルマウス全般で亢進する<sup>61</sup>。GK0 マウスの白血球停滞は WT マウスと比較してわずかに多い傾向にあったが、有意差はなかった。これは、ぶどう膜炎や結膜炎と同様に DR においても IFN- $\gamma$  は網膜において抗炎症作用の役割を果たしている可能性を示唆している<sup>79</sup>。白血球停滞は Akita マウスで WT 及び GK0 マウスより有意に亢進していたが、Akita-GK0 マウスは Akita マウスよりもさらに亢進していた。従って、Akita マウスよりも進行した DR が観察された結果に矛盾しない。

9 週齢の Akita-GK0 マウスにおいて、網膜表層の浮腫性変化が観察された。一方で、加齢の Akita マウスでは、RGC の減少に関連して網膜の内層が薄くなるとの既報がある<sup>30,31</sup>。従って、Akita マウスと Akita-GK0 マウスでは DR 発症機序が異なることも考えられるが、網膜表層の変化が RGC の減少よりも早期に起こる病態である可能性もあるため、より長期観察期間での病理組織学的検討が必要である。抗ペリオスチン抗体染色では Akita-GK0 マウスの NFL および

GCL 中に濃染が観察されたが、Akita マウスを含む他の群の同齢マウスでは観察されなかった。したがって、FVM による硝子体方向への牽引が Akita-GK0 マウスの網膜表層における浮腫性変化に影響している可能性がある。内境界膜はミュラー細胞の基底膜であり、Akita-GK0 マウスにおいて Th17 細胞誘導性のサイトカインによりミュラー細胞が障害されたことによる影響の可能性が示唆された。

9 週齢の Akita-GK0 マウスにおいて、眼底写真にて網膜白斑、それと一致してフルオレセイン蛍光眼底造影にて蛍光漏出が観察された。血管透過性が亢進しているかを検討するために電子顕微鏡で網膜血管基底膜厚の測定したところ、Akita-GK0 マウスの網膜血管の基底膜は他の 3 群と比較して肥厚しており、血管透過性が亢進している状態にあると考えられた。通常硬性白斑は主に OPL に、軟性白斑は NFL にみられる。DR では主に血管漏出が DVPL で起こるとされているが<sup>80</sup>、Akita-GK0 マウスの血管基底膜の肥厚は全ての層でみられた。

ICAM-1 は血管内皮細胞のみならず単球、B および T リンパ球、胸腺細胞、樹状細胞、線維芽細胞、角化細胞、軟骨細胞でも活性化により発現が増加する。Akita-GK0 マウスの網膜において ICAM-1 遺伝子の発現が他の 3 群に対し有意に上昇しており、網膜白血球停滞が亢進していた結果と矛盾しない<sup>81</sup>。

Akita-GK0 マウスの網膜において VEGF 遺伝子の発現及び眼内濃度が他の 3 群に対し有意に上昇していたことも血管の透過性が亢進を強く裏付けるものであった。虚血を誘導したマウスにおける IFN- $\gamma$  の欠損は VEGF 発現を増強させ

<sup>82</sup>、また加齢の Akita マウスの網膜において VEGF 産生は上昇しているとの既報がある <sup>83</sup>。しかし今回、9 週齢の Akita マウスおよび GK0 マウスの眼内における VEGF 濃度は WT と比較して上昇がみられず、Akita-GK0 マウスにおいてのみ VEGF の眼内濃度が上昇していたことは、Akita マウスと GK0 マウスのそれぞれの特性の相乗効果がみられたと考えられる。VEGF は網膜血管の ICAM-1 発現を増加させることから <sup>84</sup>、ICAM-1 の遺伝子発現に同様の傾向がみられたことは過去の報告と矛盾しない。

現在 PDR 患者の主に黄斑浮腫による視力低下に対しては抗 VEGF 抗体の硝子体注射が行われ、一定の成績が収められている。ラニビズマブ（モノクローナル抗体の Fab 断片：VEGF-A と結合する）やアフリベルセプト（可溶性化受容体合成タンパク：VEGF-A, B, 胎盤増殖因子と結合する）等が保険適応となる前は、ベバシズマブ（モノクローナル抗体：VEGF-A と結合する）が硝子体注射に用いられてきた。いずれもステロイドテノン嚢下注射や網膜光凝固術単独の治療よりも良好な治療成績が得られている <sup>85</sup>。

しかしながら、臨床で申請者らは抗 VEGF 抗体治療に抵抗性の DR に少なからず遭遇する <sup>86</sup>。特に網膜黄斑部に FVM が形成された場合、網膜が硝子体側へ牽引されるため抗 VEGF 抗体の硝子体注射を行っても黄斑浮腫が改善しないことが多い。その場合、FVM 形成を未然に防ぐ事が重要である。Akita-GK0 マウスでは網膜表層に FVM 形成に関与するペリオスチンの集積及び形態学的な浮腫が認められており、ヒトの DR の所見により近いモデルであ



り、FVM 形成を防ぐ研究に用いられる可能性がある。つまり、現在のように VEGF が既に上昇してしまっている状態の対処療法として抗 VEGF 抗体硝子体注射を行うのではなく、VEGF 上昇の上流に位置するサイトカインカスケードを阻害することにより、VEGF 上昇の悪循環に到ることを未然に防ぐ治療の開発が望まれる。本研究から得られた知見は、DR に対する抗 VEGF 抗体以外の新しい分子標的療法やサプリメント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 7 章

### 総 括

## 総 括

以上より申請者は、既報の DR モデルマウスよりも早期に網膜症を発症する新しい DR モデルマウスの開発に成功した。このマウスは Th17 細胞の DR 発症における役割を研究する上でも新しいアプローチを提供するモデルと言える。本研究では網膜以外の組織は解析していないが、腎臓など他臓器における血管変化も大変興味深く、他の DM 合併症の研究にも使用できるものとする。

今後実施を検討すべき実験としては、Akita-GK0 マウス眼球への抗 IL-17 中和抗体投与によるノックダウン実験、9 週齢以降の phenotype 解析、視機能学的な変化の観察などが挙げられる。

ヒトの DR は、数年・数十年といった高血糖及び慢性炎症環境下によって生じるため、寿命の短い実験動物で再現することには自ずと限界がある。このような矛盾がある中でも、今回申請者の開発した Akita-GK0 マウスが、わずかにでも DR 治療進展に寄与することがあれば幸いである。

## 第 8 章

### 参考文献

1. Engerman R, Bloodworth JM, Jr., Nelson S. Relationship of microvascular disease in diabetes to metabolic control. *Diabetes* 1977;26:760-9.
2. Perkins BA, Bril V. Diagnosis and management of diabetic neuropathy. *Curr Diab Rep* 2002;2:495-500.
3. 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;55:1827-30.
4. 日本糖尿病眼学会. 改変 Davis 分類. 糖尿病眼手帳(第3版) 2014.
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. Tang J, Kern TS. Inflammation in diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res* 2011;30:343-58.
7. Gologorsky D, Thanos A, Vavvas D. Therapeutic interventions against inflammatory and angiogenic mediators in proliferative diabetic retinopathy. *Mediators Inflamm* 2012;2012:629452.
8. Meleth AD, Agron E, Chan CC, et al. Serum inflammatory markers in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:4295-301.
9. Joussen AM, Poulaki V, Le ML, et al. A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *FASEB J* 2004;18:1450-2.
10. Cavaillon JM. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2001;47:695-702.
11. Demircan N, Safran BG, Soylu M, Ozcan AA, Sizmaz S. Determination of vitreous interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor (TNF) levels in proliferative diabetic retinopathy. *Eye (Lond)* 2006;20:1366-9.
12. Murugeswari P, Shukla D, Rajendran A, Kim R, Namperumalsamy P, Muthukkaruppan V. Proinflammatory cytokines and angiogenic and anti-angiogenic factors in vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy and eales' disease. *Retina* 2008;28:817-24.
13. Hammes HP, Feng Y, Pfister F, Brownlee M. Diabetic retinopathy: targeting vasoregression. *Diabetes* 2011;60:9-16.
14. Amancha PK, Ackerley CG, Duphare C, et al. Distribution of Functional CD4 and CD8 T cell Subsets in Blood and Rectal Mucosal Tissues. *Sci Rep* 2019;9:6951.
15. Gaffen SL. Recent advances in the IL-17 cytokine family. *Curr Opin Immunol* 2011;23:613-9.

16. Qu N, Xu M, Mizoguchi I, et al. Pivotal roles of T-helper 17-related cytokines, IL-17, IL-22, and IL-23, in inflammatory diseases. *Clin Dev Immunol* 2013;968549.
17. Maddur MS, Miossec P, Kaveri SV, Bayry J. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am J Pathol* 2012;181:8-18.
18. Liu S, Lin YU, Liu X. Protective effects of SIRT1 in patients with proliferative diabetic retinopathy via the inhibition of IL-17 expression. *Exp Ther Med* 2016;11:257-62.
19. Hang H, Yuan S, Yang Q, Yuan D, Liu Q. Multiplex bead array assay of plasma cytokines in type 2 diabetes mellitus with diabetic retinopathy. *Mol Vis* 2014;20:1137-45.
20. Chen H, Ren X, Liao N, Wen F. Th17 cell frequency and IL-17A concentrations in peripheral blood mononuclear cells and vitreous fluid from patients with diabetic retinopathy. *J Int Med Res* 2016;44:1403-13.
21. Takeuchi M, Sato T, Tanaka A, et al. Elevated Levels of Cytokines Associated with Th2 and Th17 Cells in Vitreous Fluid of Proliferative Diabetic Retinopathy Patients. *PLoS One* 2015;10:e0137358.
22. Takeuchi M, Sato T, Sakurai Y, et al. Association between aqueous humor and vitreous fluid levels of Th17 cell-related cytokines in patients with proliferative diabetic retinopathy. *PLoS One* 2017;12:e0178230.
23. Chernykh VV, Varvarinsky EV, Smirnov EV, Chernykh DV, Trunov AN. Proliferative and inflammatory factors in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Indian J Ophthalmol* 2015;63:33-6.
24. Qiu AW, Bian Z, Mao PA, Liu QH. IL-17A exacerbates diabetic retinopathy by impairing Muller cell function via Act1 signaling. *Exp Mol Med* 2016;48:e280.
25. Qiu AW, Liu QH, Wang JL. Blocking IL-17A Alleviates Diabetic Retinopathy in Rodents. *Cell Physiol Biochem* 2017;41:960-72.
26. Izumi T, Yokota-Hashimoto H, Zhao S, Wang J, Halban PA, Takeuchi T. Dominant negative pathogenesis by mutant proinsulin in the Akita diabetic mouse. *Diabetes* 2003;52:409-16.
27. Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, et al. Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J Clin Invest*

2002;109:525-32.

28. Wang J, Takeuchi T, Tanaka S, et al. A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic beta-cell dysfunction in the Mody mouse. *J Clin Invest* 1999;103:27-37.

29. Lai AK, Lo AC. Animal models of diabetic retinopathy: summary and comparison. *Journal of diabetes research* 2013;2013:106594.

30. Gastinger MJ, Kunselman AR, Conboy EE, Bronson SK, Barber AJ. Dendrite remodeling and other abnormalities in the retinal ganglion cells of Ins2 Akita diabetic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:2635-42.

31. Barber AJ, Antonetti DA, Kern TS, et al. The Ins2Akita mouse as a model of early retinal complications in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:2210-8.

32. Gerritsen GC, Dulin WE. Characterization of diabetes in the Chinese hamster. *Diabetologia* 1967;3:74-84.

33. Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu* 1980;29:1-13.

34. Kern TS, Tang J, Berkowitz BA. Validation of structural and functional lesions of diabetic retinopathy in mice. *Mol Vis* 2010;16:2121-31.

35. 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;71:179-86.

36. Kramer JW, Nottingham S, Robinette J, Lenz G, Sylvester S, Dessouky MI. Inherited, early onset, insulin-requiring diabetes mellitus of Keeshond dogs. *Diabetes* 1980;29:558-65.

37. Lenzen S, Tiedge M, Elsner M, et al. The LEW.1AR1/Ztm-iddm rat: a new model of spontaneous insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 2001;44:1189-96.

38. Nakhooda AF, Like AA, Chappel CI, Murray FT, Marliss EB. The spontaneously diabetic Wistar rat. Metabolic and morphologic studies. *Diabetes* 1977;26:100-12.

39. Han Z, Guo J, Conley SM, Naash MI. Retinal angiogenesis in the Ins2(Akita) mouse model of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:574-84.

40. Kurihara T, Ozawa Y, Nagai N, et al. Angiotensin II type 1 receptor signaling contributes to synaptophysin degradation and neuronal dysfunction in the diabetic retina. *Diabetes* 2008;57:2191-8.
41. Sasase T. Pathophysiological characteristics of diabetic ocular complications in spontaneously diabetic torii rat. *Journal of ophthalmology* 2010;61:5641.
42. Olivares AM, Althoff K, Chen GF, et al. Animal Models of Diabetic Retinopathy. *Curr Diab Rep* 2017;17:93.
43. Lee S, Harris NR. Losartan and ozagrel reverse retinal arteriolar constriction in non-obese diabetic mice. *Microcirculation* 2008;15:379-87.
44. Kondo T, Kahn CR. Altered insulin signaling in retinal tissue in diabetic states. *J Biol Chem* 2004;279:37997-8006.
45. Bogdanov P, Corraliza L, Villena JA, et al. The db/db mouse: a useful model for the study of diabetic retinal neurodegeneration. *PLoS One* 2014;9:e97302.
46. Gong CY, Lu B, Sheng YC, Yu ZY, Zhou JY, Ji LL. The Development of Diabetic Retinopathy in Goto-Kakizaki Rat and the Expression of Angiogenesis-Related Signals. *Chin J Physiol* 2016;59:100-8.
47. Stitt A, Gardiner TA, Alderson NL, et al. The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits development of retinopathy in experimental diabetes. *Diabetes* 2002;51:2826-32.
48. Weerasekera LY, Balmer LA, Ram R, Morahan G. Characterization of Retinal Vascular and Neural Damage in a Novel Model of Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56:3721-30.
49. Rakoczy EP, Ali Rahman IS, Binz N, et al. Characterization of a mouse model of hyperglycemia and retinal neovascularization. *Am J Pathol* 2010;177:2659-70.
50. Huang S, Hendriks W, Althage A, et al. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* 1993;259:1742-5.
51. Luger D, Silver PB, Tang J, et al. Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category. *J Exp Med* 2008;205:799-810.
52. Jones LS, Rizzo LV, Agarwal RK, et al. IFN-gamma-deficient mice develop experimental autoimmune uveitis in the context of a deviant effector response.



J Immunol 1997;158:5997-6005.

53. Tagawa Y, Sekikawa K, Iwakura Y. Suppression of concanavalin A-induced hepatitis in IFN-gamma(-/-) mice, but not in TNF-alpha(-/-) mice: role for IFN-gamma in activating apoptosis of hepatocytes. J Immunol 1997;159:1418-28.

54. Mattapallil MJ, Wawrousek EF, Chan CC, et al. The Rd8 mutation of the Crb1 gene is present in vendor lines of C57BL/6N mice and embryonic stem cells, and confounds ocular induced mutant phenotypes. Invest Ophthalmol Vis Sci 2012;53:2921-7.

55. Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. at <https://www.arvo.org/About/policies/statement-for-the-use-of-animals-in-ophthalmic-and-vision-research/>.)

56. Yoshioka M, Kayo T, Ikeda T, Koizumi A. A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice. Diabetes 1997;46:887-94.

57. Koga MM, Bizzarro B, Sa-Nunes A, Rios FJ, Jancar S. Boosting Adaptive Immunity: A New Role for PAFR Antagonists. Sci Rep 2016;6:39146.

58. Bagheri M, Dong Y, Ono M. Molecular Diversity of Macrophages in Allergic Reaction: Comparison between the Allergenic Modes: Th1- and -Th2-Derived Immune Conditions. Iran J Allergy Asthma Immunol 2015;14:261-72.

59. Wohlleben G, Erb KJ. The absence of IFN-gamma leads to increased Th2 responses after influenza A virus infection characterized by an increase in CD4+ but not CD8+ T cells producing IL-4 or IL-5 in the lung. Immunol Lett 2004;95:161-6.

60. Brignall R, Cauchy P, Bevington SL, et al. Integration of Kinase and Calcium Signaling at the Level of Chromatin Underlies Inducible Gene Activation in T Cells. J Immunol 2017;199:2652-67.

61. Noda K, Nakao S, Ishida S, Ishibashi T. Leukocyte adhesion molecules in diabetic retinopathy. Journal of ophthalmology 2012;2012:279037.

62. Matsuoka M, Ogata N, Minamino K, Matsumura M. Leukostasis and pigment epithelium-derived factor in rat models of diabetic retinopathy. Mol Vis 2007;13:1058-65.

63. Remtulla S, Hallett PE. A schematic eye for the mouse, and comparisons

with the rat. *Vision Res* 1985;25:21-31.

64. Jeon CJ, Strettoi E, Masland RH. The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci* 1998;18:8936-46.

65. Usui Y, Westenskow PD, Kurihara T, et al. Neurovascular crosstalk between interneurons and capillaries is required for vision. *J Clin Invest* 2015;125:2335-46.

66. 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.

67. Ishibashi T, Tanaka K, Taniguchi Y. Disruption of blood-retinal barrier in experimental diabetic rats: an electron microscopic study. *Exp Eye Res* 1980;30:401-10.

68. Sato Y, Rifkin DB. Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J Cell Biol* 1989;109:309-15.

69. Murata T, Nagai R, Ishibashi T, Inomuta H, Ikeda K, Horiuchi S. The relationship between accumulation of advanced glycation end products and expression of vascular endothelial growth factor in human diabetic retinas. *Diabetologia* 1997;40:764-9.

70. Nakama T, Yoshida S, Ishikawa K, et al. Therapeutic Effect of Novel Single-Stranded RNAi Agent Targeting Periostin in Eyes with Retinal Neovascularization. *Mol Ther Nucleic Acids* 2017;6:279-89.

71. Kobayashi Y, Yoshida S, Nakama T, et al. Overexpression of CD163 in vitreous and fibrovascular membranes of patients with proliferative diabetic retinopathy: possible involvement of periostin. *Br J Ophthalmol* 2015;99:451-6.

72. Yoshida S, Nakama T, Ishikawa K, Nakao S, Sonoda KH, Ishibashi T. Periostin in vitreoretinal diseases. *Cell Mol Life Sci* 2017;74:4329-37.

73. Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, et al. Intravitreal injections of vascular endothelial growth factor produce retinal ischemia and microangiopathy in an adult primate. *Ophthalmology* 1996;103:1820-8.

74. Jaganathan R, Ravindran R, Dhanasekaran S. Emerging Role of Adipocytokines in Type 2 Diabetes as Mediators of Insulin Resistance and

- Cardiovascular Disease. Canadian journal of diabetes 2018;42:446-56.e1.
75. Honkanen J, Nieminen JK, Gao R, et al. IL-17 immunity in human type 1 diabetes. J Immunol 2010;185:1959-67.
  76. Shu Y, Chen Y, Luo H, et al. The Roles of IL-10 Gene Polymorphisms in Diabetes Mellitus and Their Associated Complications: A Meta-Analysis. Horm Metab Res 2018;50:811-5.
  77. Raczynska D, Lisowska KA, Pietruczuk K, et al. The Level of Cytokines in the Vitreous Body of Severe Proliferative Diabetic Retinopathy Patients Undergoing Posterior Vitrectomy. Curr Pharm Des 2018;24:3276-81.
  78. George JA, Bashir G, Qureshi MM, et al. Cholinergic Stimulation Prevents the Development of Autoimmune Diabetes: Evidence for the Modulation of Th17 Effector Cells via an IFN $\gamma$ -Dependent Mechanism. Front Immunol 2016;7:419.
  79. Magone MT, Whitcup SM, Fukushima A, Chan CC, Silver PB, Rizzo LV. The role of IL-12 in the induction of late-phase cellular infiltration in a murine model of allergic conjunctivitis. J Allergy Clin Immunol 2000;105:299-308.
  80. Gass JD, Norton EW. Cystoid macular edema and papilledema following cataract extraction. A fluorescein fundoscopic and angiographic study. Arch Ophthalmol 1966;76:646-61.
  81. Miyamoto K, Khosrof S, Bursell SE, et al. Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96:10836-41.
  82. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, et al. Absence of IFN- $\gamma$  accelerates thrombus resolution through enhanced MMP-9 and VEGF expression in mice. J Clin Invest 2011;121:2911-20.
  83. Chaurasia SS, Lim RR, Parikh BH, et al. The NLRP3 Inflammasome May Contribute to Pathologic Neovascularization in the Advanced Stages of Diabetic Retinopathy. Sci Rep 2018;8:2847.
  84. Lu M, Perez VL, Ma N, et al. VEGF increases retinal vascular ICAM-1 expression in vivo. Invest Ophthalmol Vis Sci 1999;40:1808-12.
  85. Bressler SB, Liu D, Glassman AR, et al. Change in Diabetic Retinopathy Through 2 Years: Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial

Comparing Aflibercept, Bevacizumab, and Ranibizumab. JAMA ophthalmology 2017;135:558-68.

86. Totan Y, Guler E, Guragac FB. Dexamethasone Intravitreal Implant for Chronic Diabetic Macular Edema Resistant to Intravitreal Bevacizumab Treatment. Curr Eye Res 2016;41:107-13.

## 謝 辭

## 謝 辞

稿を終えるにあたり御懇篤なるご指導並びに御校閲を賜りました防衛医科大学校腎臓内分泌学教室 熊谷裕生教授、防衛医科大学校再生発生学教室 伊藤正孝准教授、眼科学講座 唐沢容子助教、並びに資機材の準備・データの解析等にご尽力頂きました西尾佳明博士、田口麻美氏、GKO マウスをご提供頂きました東京理科大学の岩倉洋一郎教授に多大なる感謝の念を捧げたいと存じます。また、貴重なご指導を頂きました眼科学講座 竹内大教授を始め、ご協力下さいました眼科学教室の皆様から心から感謝を申し上げ結びの言葉とさせていただきます。

## 略 語

BRB; blood-retinal barrier : 血液網膜関門

BW; body weight : 体重

CFA; complete Freund' s adjuvant

Crb1; crumbs family member 1

DM; diabetes mellitus : 糖尿病

DR; diabetic retinopathy : 糖尿病網膜症

DVPL; deep vascular plexus layer

FVM; fibrovascular membrane : 線維性血管膜

GCL; ganglion cell layer : 神経節細胞層

GKO; interferon-gamma knock out

HE; hematoxylin and eosin

ICAM-1; intercellular adhesion molecule-1

IL; interleukin : インターロイキン

INL; inner nuclear layer : 内顆粒層

Ins; insulin : インスリン

IPL; inner plexiform layer : 内網状層

IVPL; intermediate vascular plexus layer

NFL; nerve fiber layer : 神経線維層

ONL; outer nuclear layer : 外顆粒層



OPL; outer plexiform layer : 外網状層

OVA; ovalbumin

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

RT-PCR; real-time reverse transcription-polymerase chain  
reaction

SDT; spontaneously diabetic Torii

STZ; streptozotocin : ストレプトゾトシン

SVPL; superficial vascular plexus layer

VEGF; vascular endothelial growth factor : 血管内皮増殖因子

VPL; vascular plexus layer

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 線維血管性増殖膜 牽引性網膜剥離

**表1 改変 Davis 分類**

(参考文献4より引用)

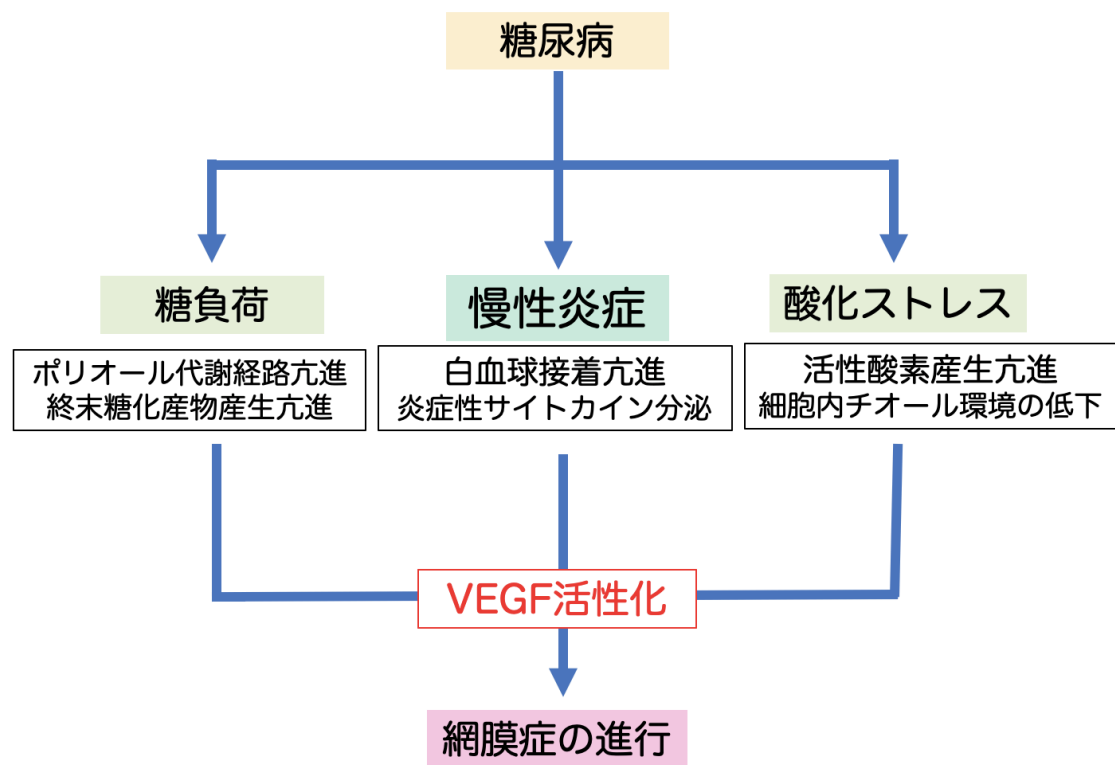


図1 糖尿病網膜症の成因

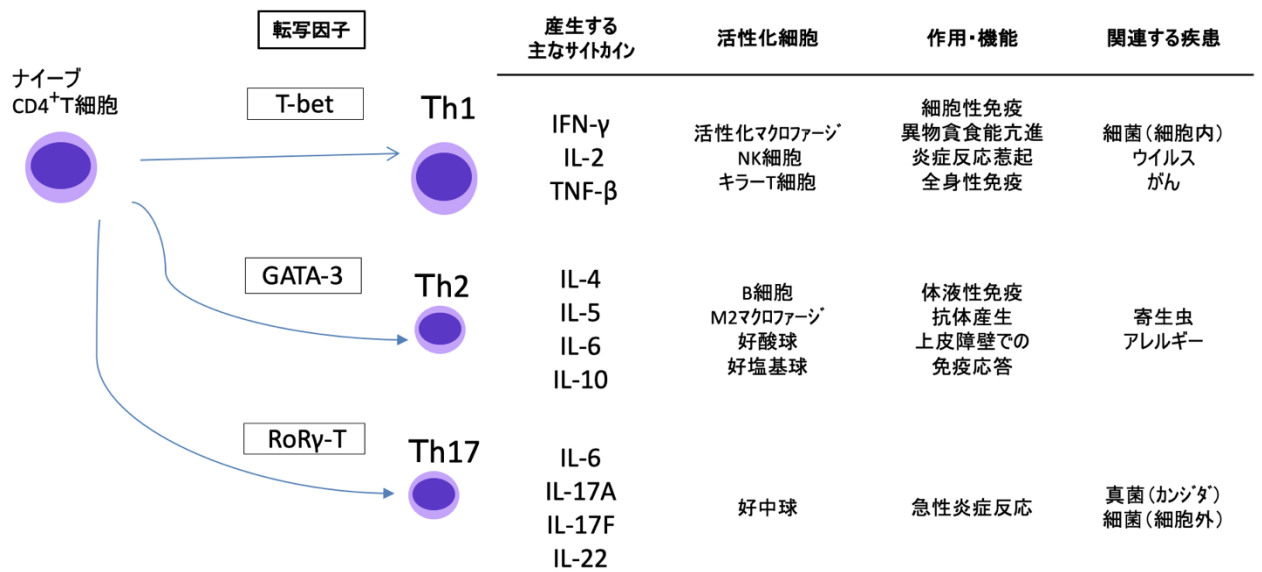


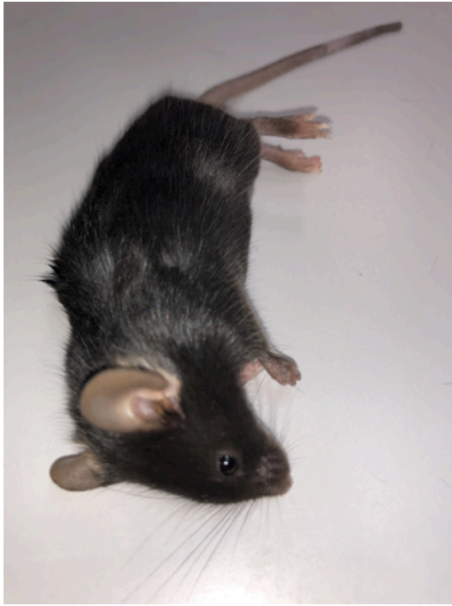
図2 ナイーブT細胞の分化とサイトカイン及び関連する各疾患の関係

		網膜症 <sup>42</sup>	
		発症時期	所見
1 型糖尿病	Akita マウス	8 ヶ月	血管面積の増加 <sup>39</sup>
	NOD マウス	7 ヶ月	網膜血流の変化 <sup>43</sup>
	SDT ラット	20 ヶ月	網膜血管無灌流域の出現 <sup>41</sup>
2 型糖尿病	ob/ob マウス	6 ヶ月	* 病理・神経学的変化 <sup>44</sup>
	db/db マウス	同上	同上 <sup>45</sup>
	GK ラット	6 ヶ月	血管面積の増加 <sup>46</sup>
薬剤性	ストレプトゾトシン	7 ヶ月	* 病理・神経学的変化 <sup>47</sup>
	アロキサン	同上	同上 <sup>48</sup>

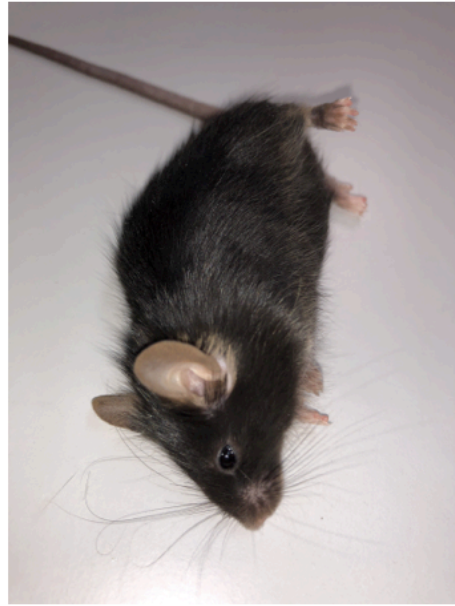
**表2 糖尿病モデル動物のまとめ(マウス・ラット)**

\* …明らかな眼底変化はないが、網膜電図上の波形異常などの神経学的変化や病理組織上アポトーシス細胞の増加などがみられる。

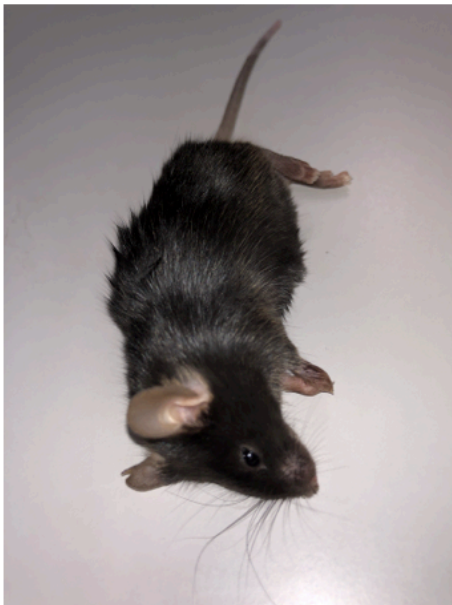
WT



GKO



Akita



Akita-GKO

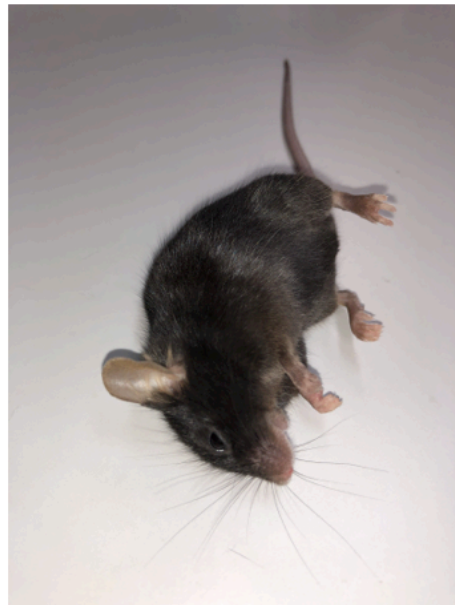


図3 各群のマウスの外見

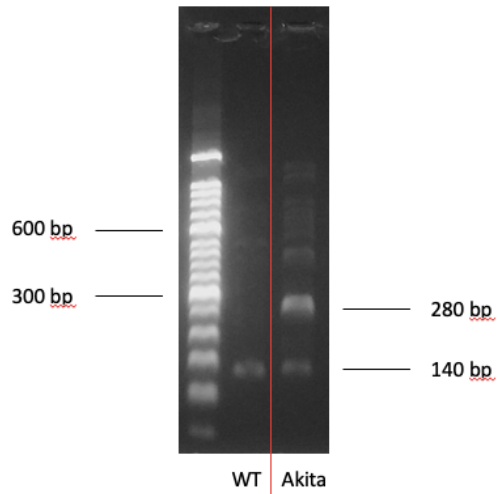


図4-1 Ins2 遺伝子の genotyping

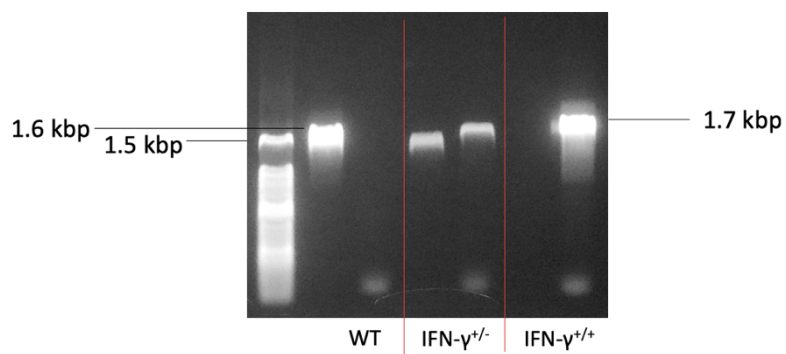


図4-2 IFN- $\gamma$  遺伝子の genotyping

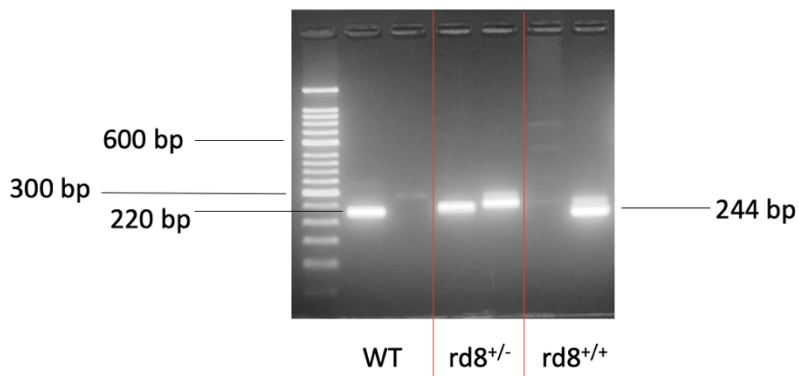


図4-3 Crb1 遺伝子 (rd8 変異検出) の genotyping

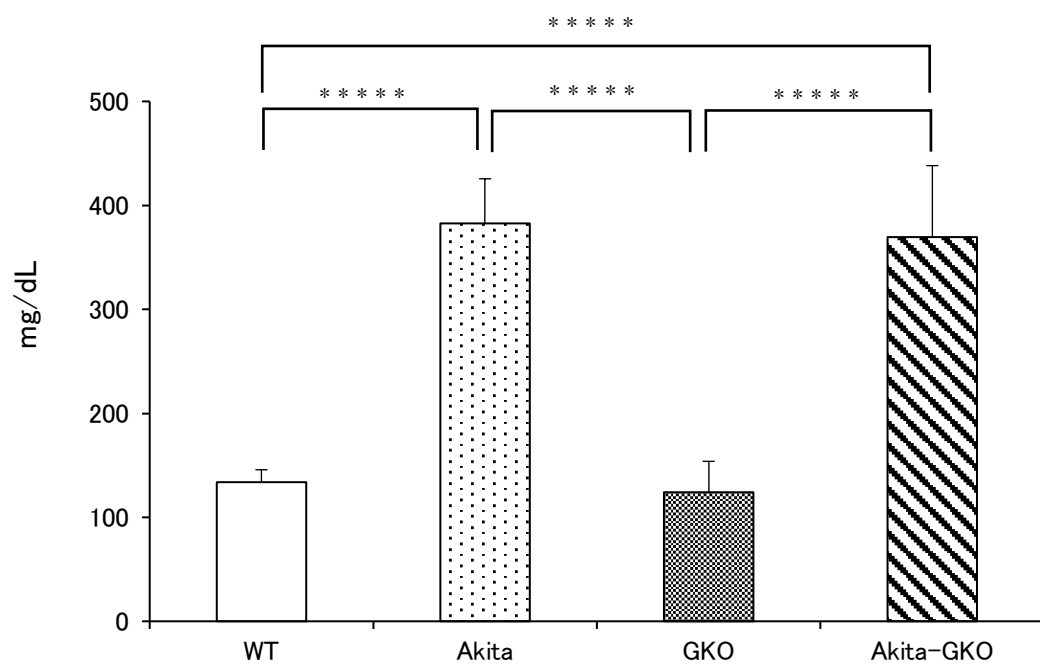


図5 各マウスの血糖値(9週齢)

Akita-GKO 及び Akita マウスは、WT 及び GKO マウスと比較して血糖値が有意に高値であった。

\*\*\*\*P < 0.0001, n=10. Tukey's test



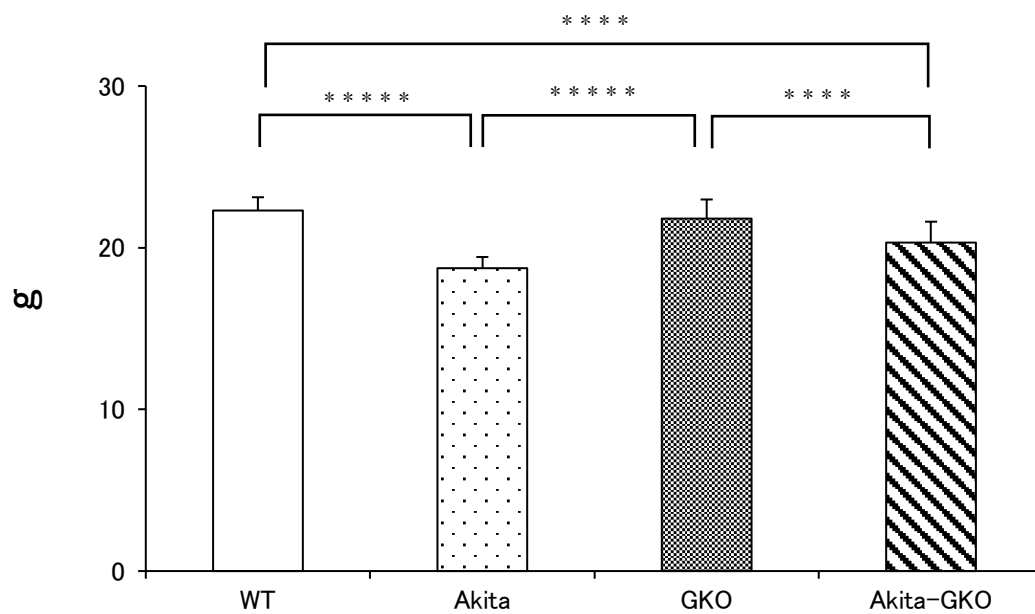


図6 各マウスの BW(9週齢)

WT 及び GKO マウスと比較して、Akita-GKO 及び Akita マウスの BW は、有意に低値であった。

\*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ ,  $n=10$ . Tukey's test

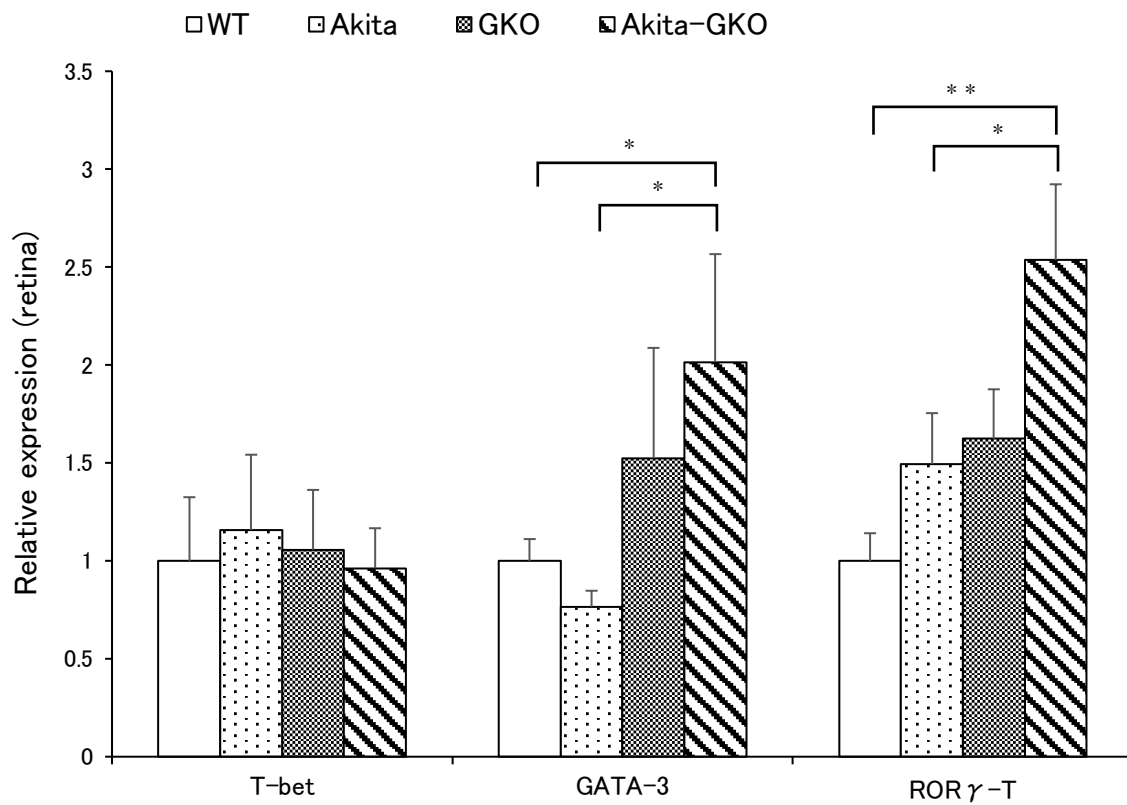


図7 網膜における転写因子遺伝子の発現

Akita-GKO マウスにおいて ROR  $\gamma$ -T 及び GATA-3 遺伝子の発現が WT 及び GKO と比較して亢進していた。 \*P < 0.05; \*\*P < 0.01, n=9. Tukey's test

表3 網膜における転写因子およびサイトカイン遺伝子の発現(平均±SD)

	ROR $\gamma$ -T	GATA-3	T-bet
WT	1.00 ± 0.141	1.00 ± 0.111	1.00 ± 0.325
Akita	1.49 ± 0.259	0.765 ± 0.0819	1.16 ± 0.384
GKO	1.62 ± 0.252	1.52 ± 0.564	1.06 ± 0.306
Akita-GKO	2.54 ± 0.387	2.02 ± 0.551	0.962 ± 0.205

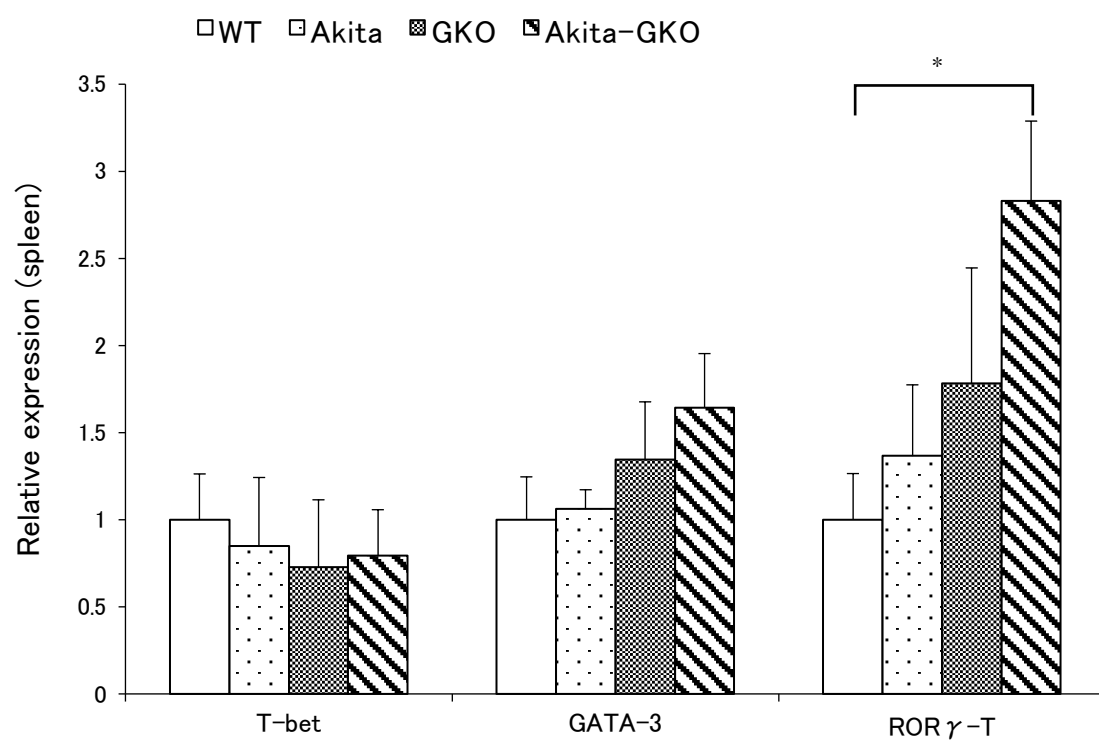


図8 脾臓における転写因子遺伝子の発現

Akita-GKO マウスにおいて WT と比較して ROR  $\gamma$ -T 遺伝子の発現が亢進していた。

\* $P < 0.05$ ,  $n=9$ . Tukey's test

表4 脾臓における転写因子およびサイトカイン遺伝子の発現(平均±SD)

	ROR $\gamma$ -T	GATA-3	T-bet
WT	1.00 ± 0.265	1.00 ± 0.246	1.00 ± 0.263
Akita	1.37 ± 0.408	1.06 ± 0.111	0.848 ± 0.263
GKO	1.78 ± 0.663	1.35 ± 0.330	0.728 ± 0.387
Akita-GKO	2.83 ± 0.459	1.64 ± 0.311	0.793 ± 0.264

## 解析手順

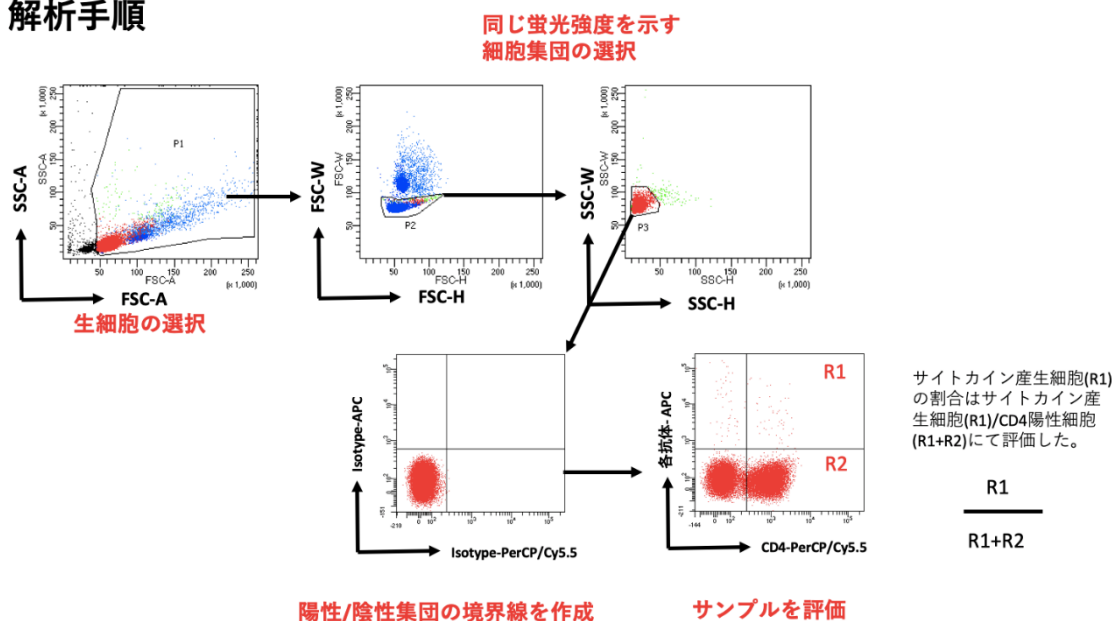


図9 フローサイトメトリの gating

死細胞を除外し、生細胞の中からダブレットや凝集塊及びリンパ球以外の細胞を除外した。そして、CD4<sup>+</sup>細胞数を分母に、CD4 と各サイトカイン抗体染色共陽性細胞の数を分子とした割合を比較した。

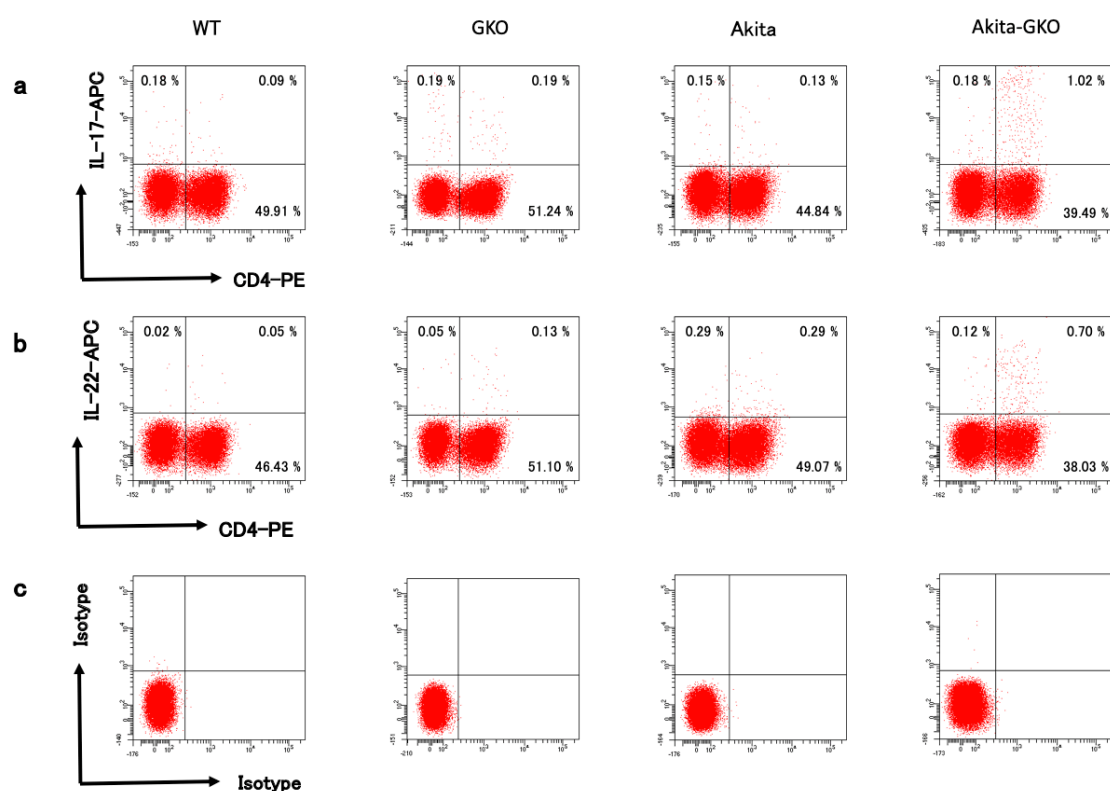


図10 脾細胞フローサイトメトリーの代表的なドットプロットパターン

(a) IL-17, (b) IL-22, (c) Isotype control.

表5

CD4+T 細胞のフローサイトメトリー (平均±SD; %)

	IL-2	IL-4	IL-10	IL-17A	IL-22	TNF- $\alpha$
WT	26.2±5.08	0.133±0.0516	0.217±0.0752	0.177 ± 0.144	0.107± 0.144	33.7±5.38
Akita	28.2±4.28	0.150±0.104	0.227±0.163	0.251 ± 0.136	0.308 ± 0.290	27.3±12.0
GKO	24.6±6.51	0.250±0.226	0.233±0.234	0.367 ± 0.253	0.340 ± 0.321	27.7±21.3
Akita-GKO	20.5±3.90	0.183±0.183	0.550±.0302	2.10 ± 0.571	1.66 ± 0.396	29.8±8.71

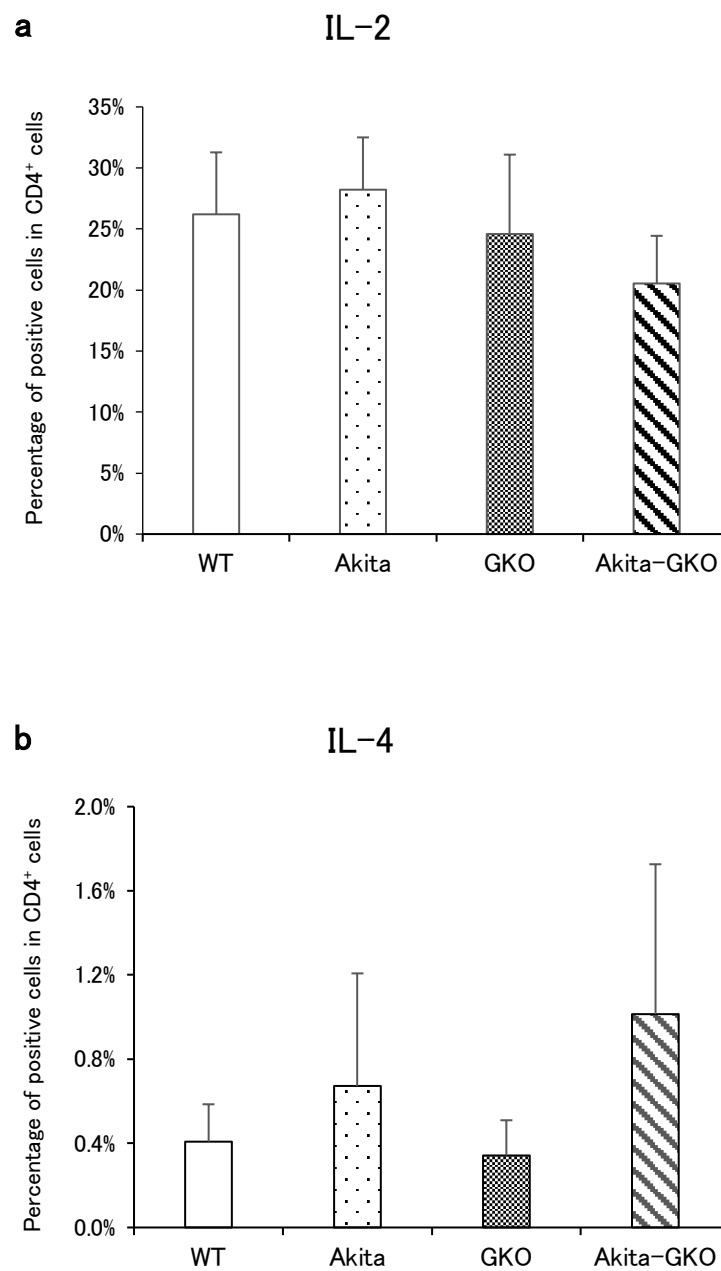


図11-1 脾細胞のフローサイトメトリー

(a) IL-2, (b) IL-4.

いずれの群間にも統計学的有意差はなかった。 n=6.

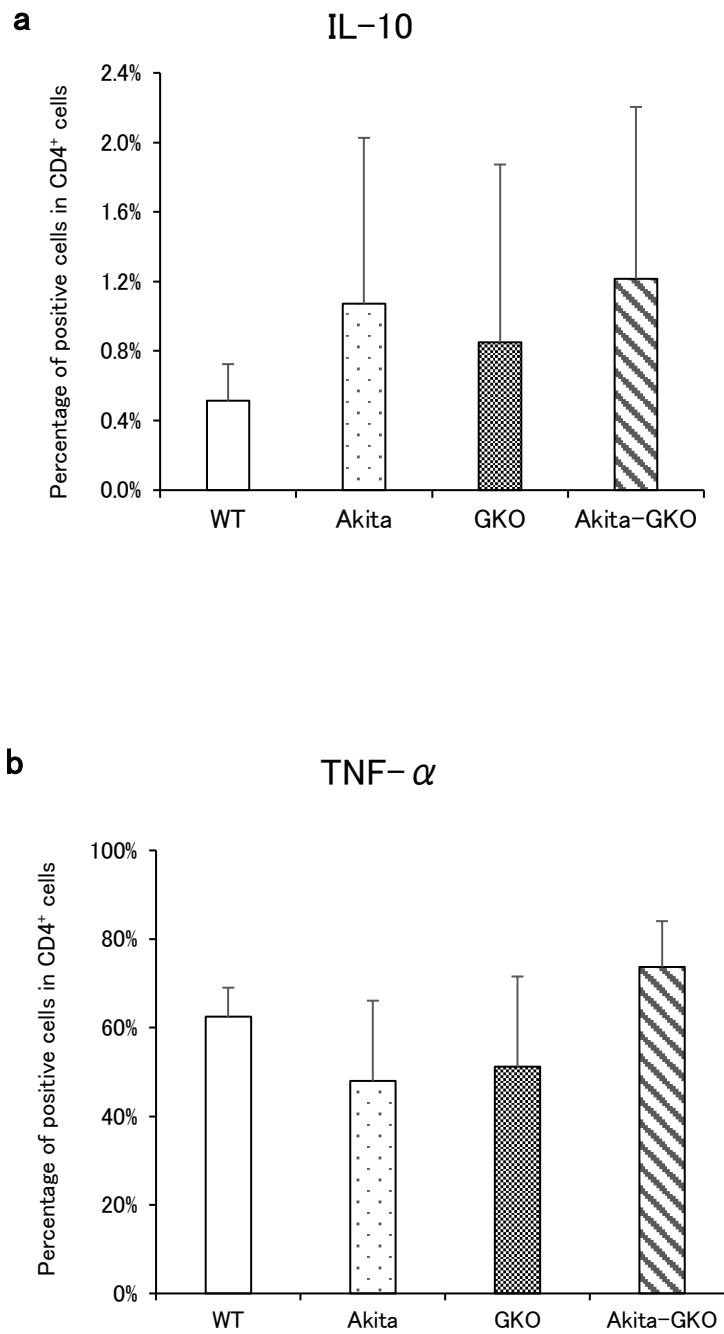


図11-2 脾細胞のフローサイトメトリー

(a) IL-10, (b) TNF  $\alpha$  .

いずれの群間にも統計学的有意差はなかった。 n=6.

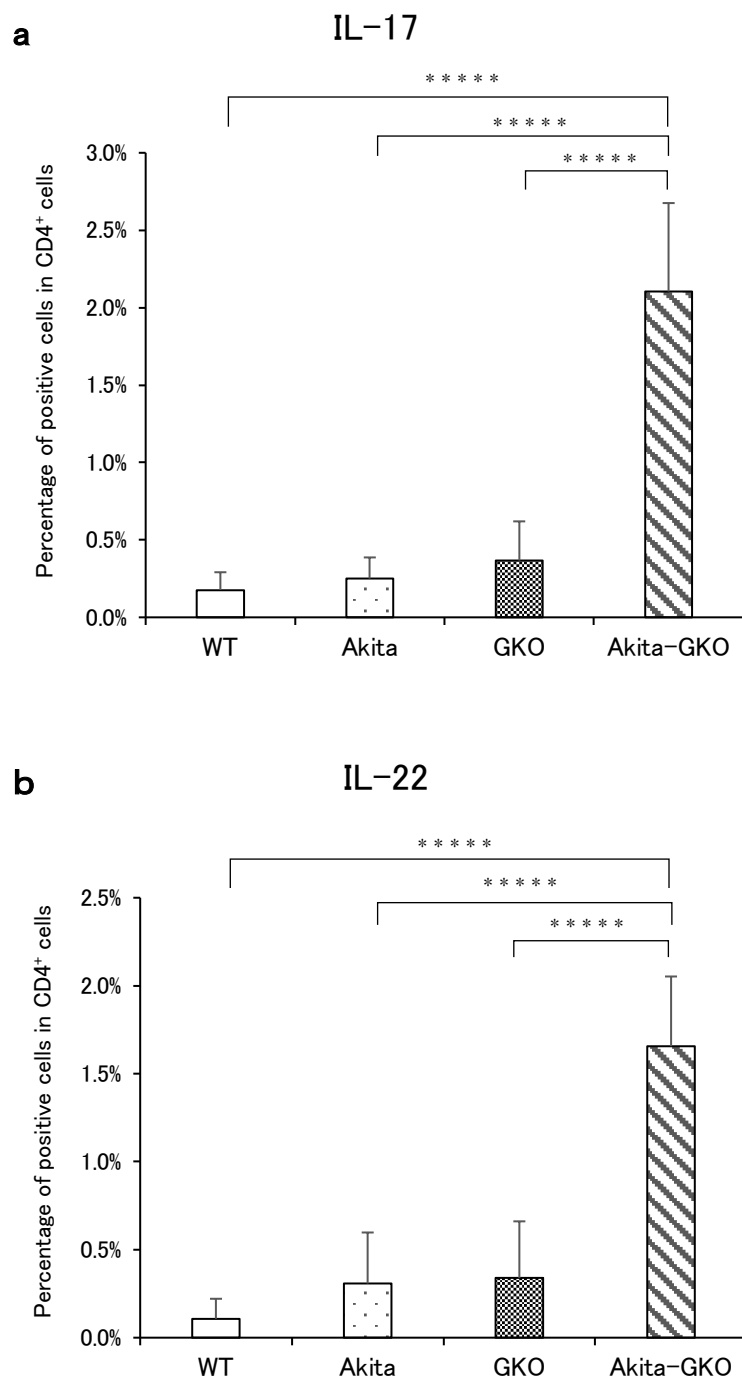


図11-3 脾細胞のフローサイトメトリー

(a) IL-17, (b) IL-22.

Akita-GKO マウスの脾臓 T 細胞における CD4<sup>+</sup>IL-17 および IL-22 の発現細胞の割合は、他の群のマウスよりも有意に高かった。 \*\*\*\*P < 0.0001, n=6. Tukey's test



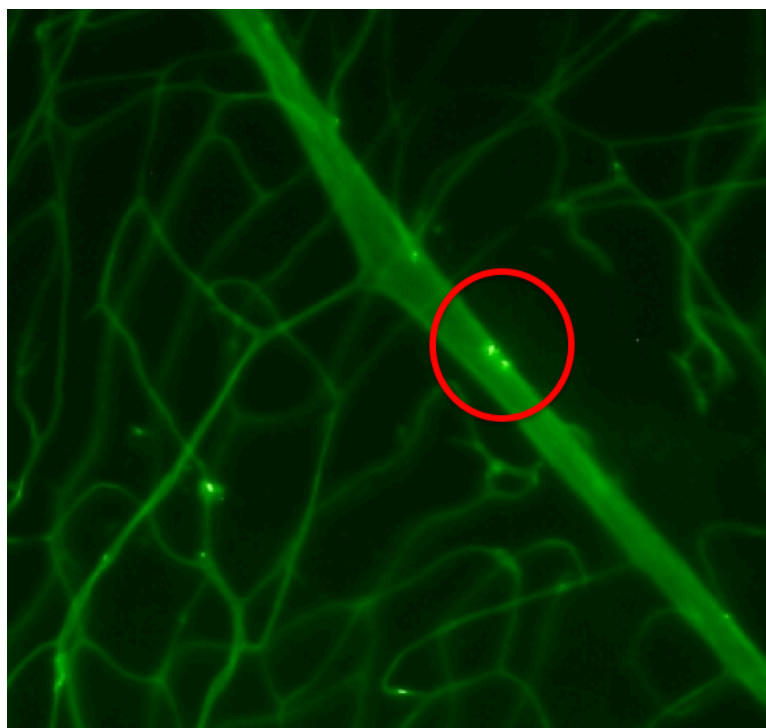


図12 FITC-コナカバリン A による血管壁に粘着した白血球の染色

赤丸は血管壁に接着した白血球を示す。

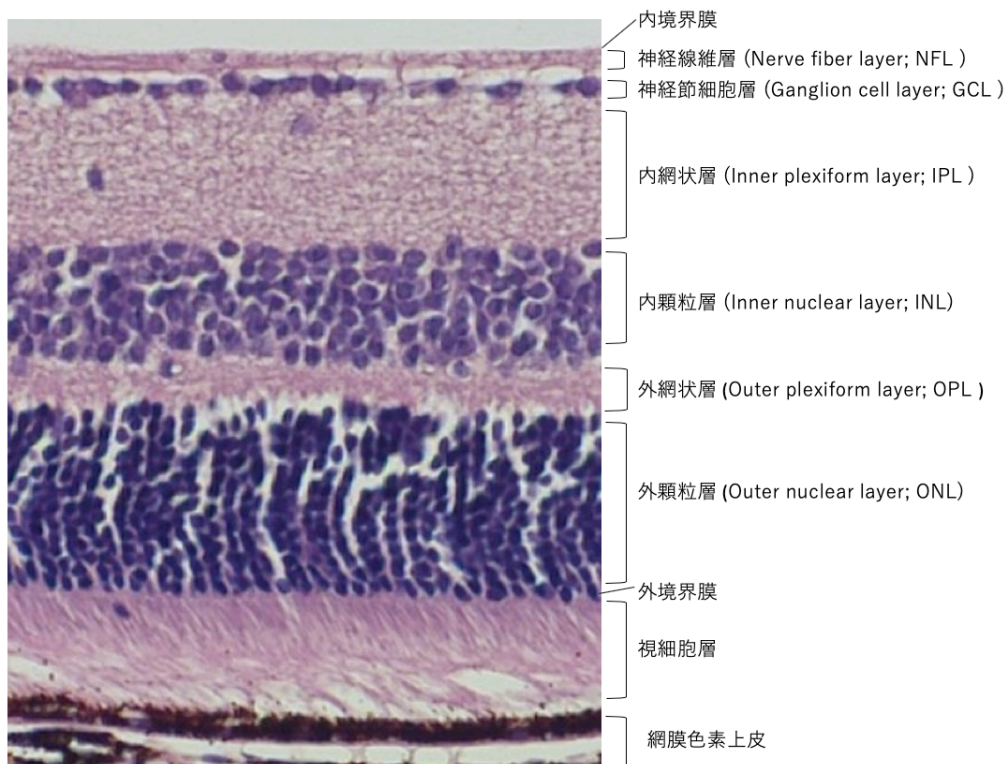


図13-1 マウスの網膜層構造

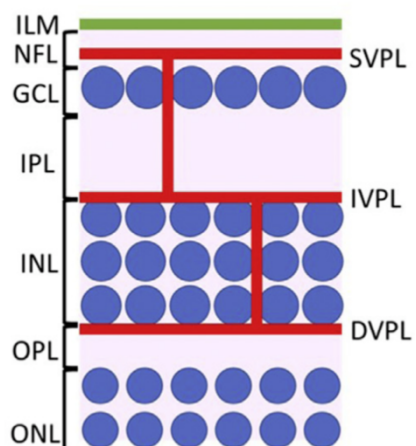
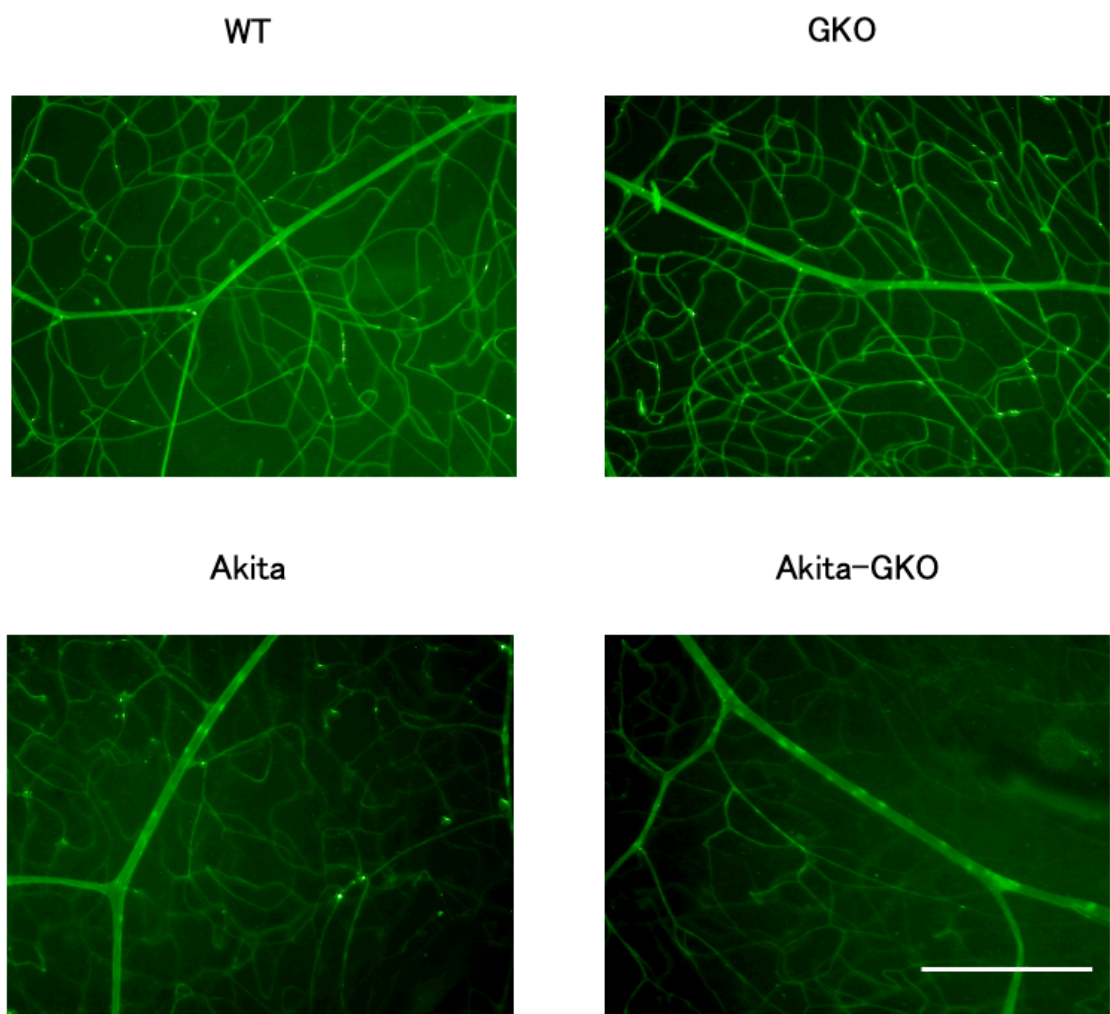


図13-2 マウスの網膜血管走行

(参考文献66より引用)



Scale bar = 300  $\mu$  m

#### 図14-1 白血球停滞

各群それぞれの代表的な網膜血管に白血球が停滞している図を示す。Akita-GKO マウスの血管壁には、粘着した多数の白血球が見られた。

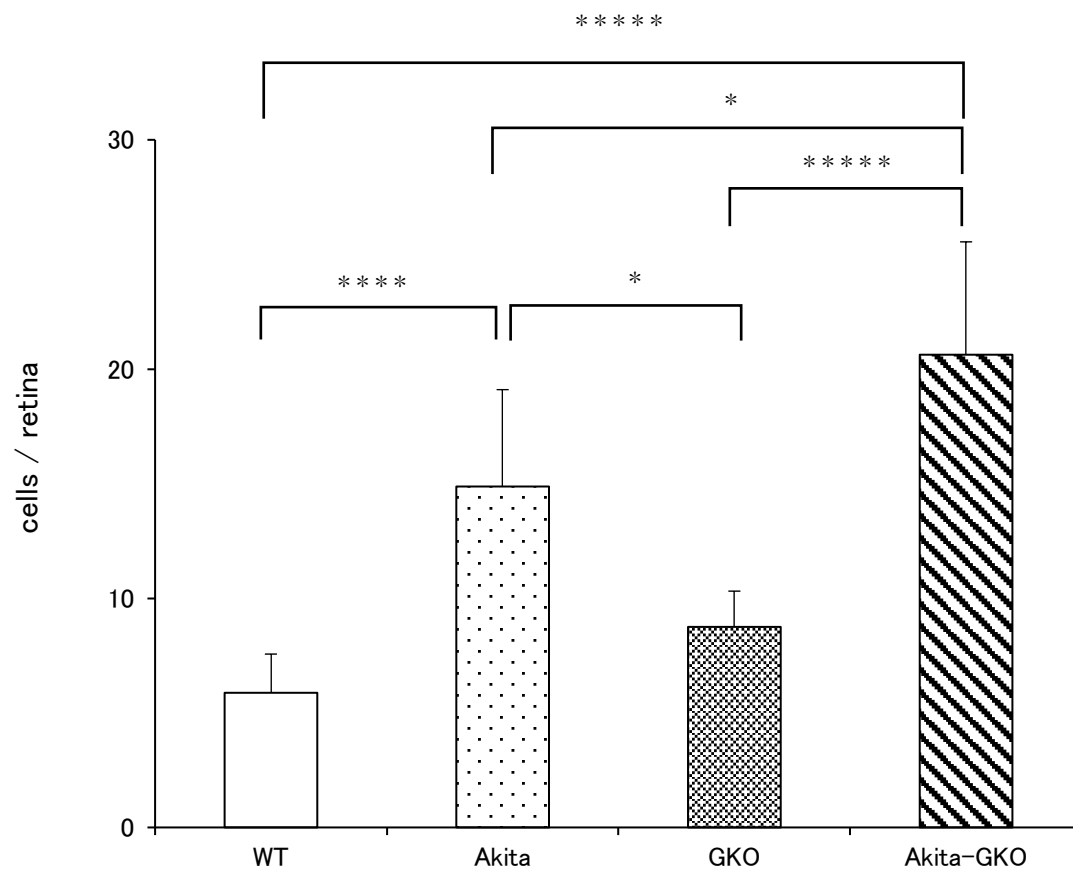
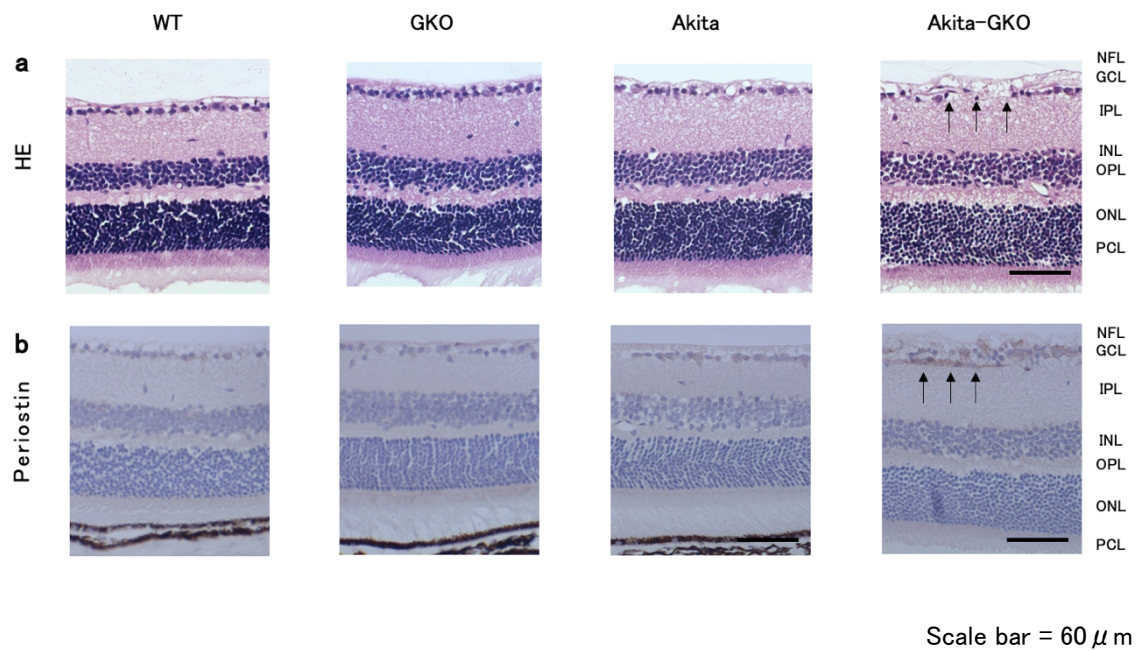


図14-2 白血球停滞の定量

Akita-GKO マウスにおいて白血球停滞が他の3群全ての群と比較して有意に増加していた。

\* $P < 0.05$ ; \*\*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\*\* $P < 0.0001$ ,  $n=8$ . Tukey's test



**図15 各マウスの病理組織**

- (a) HE 染色: Akita-GKO マウスの網膜で表層の浮腫が観察された。
- (b) 抗 Periostin 抗体による免疫組織化学染色: Akita-GKO マウスの網膜で NFL 及び GCL における濃染がみられた(黒矢印)。

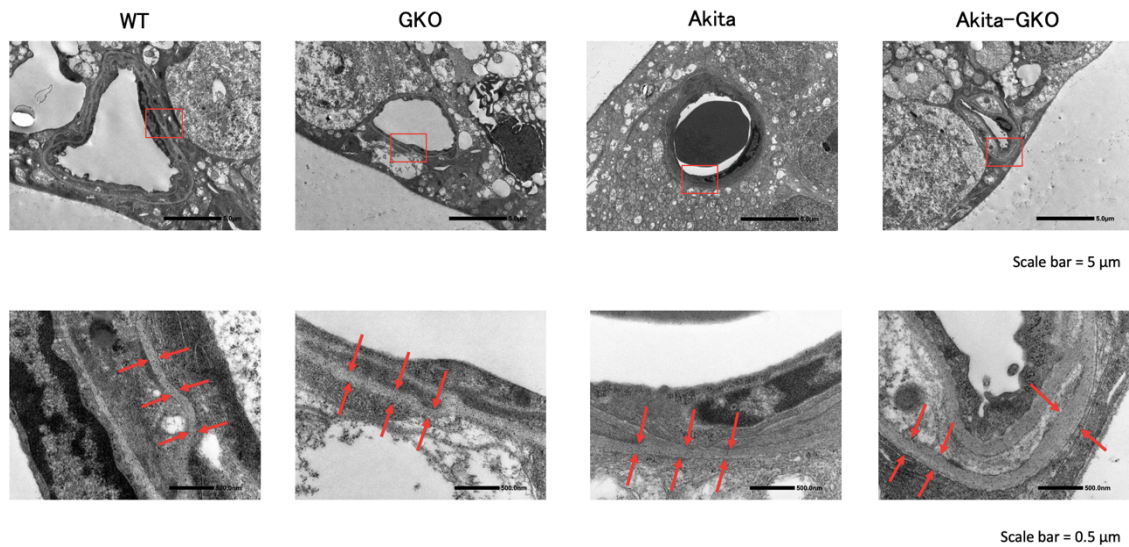


図 1 6-1 各マウスの網膜血管の電子顕微鏡写真（表層）

上段の赤枠は拡大箇所（下段）を、赤矢印は網膜血管の基底膜を示している。

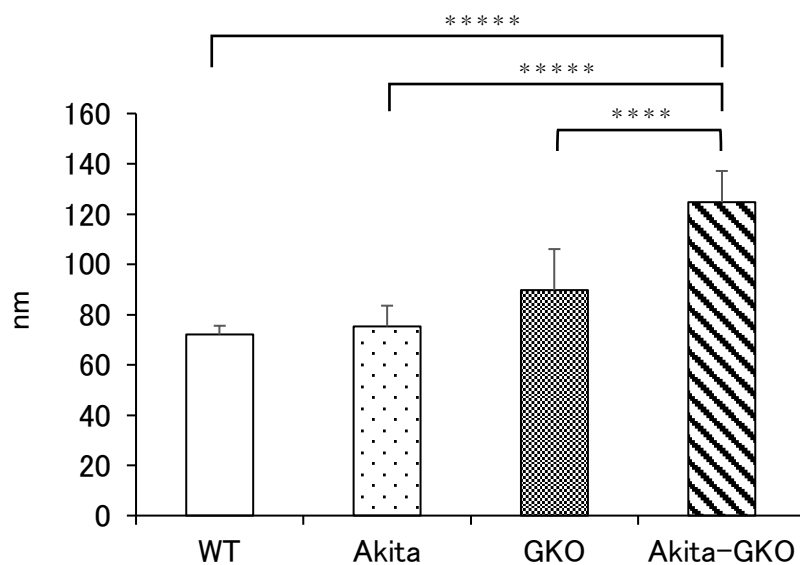


図16-2 各マウスの網膜血管の基底膜厚の定量解析（表層）

Akita-GKO マウスにおいて他の3群と比較して有意に基底膜の肥厚がみられた。

\*\*\*\* P < 0.001; \*\*\*\* P < 0.0001, n=12 (4 mice). Tukey's test



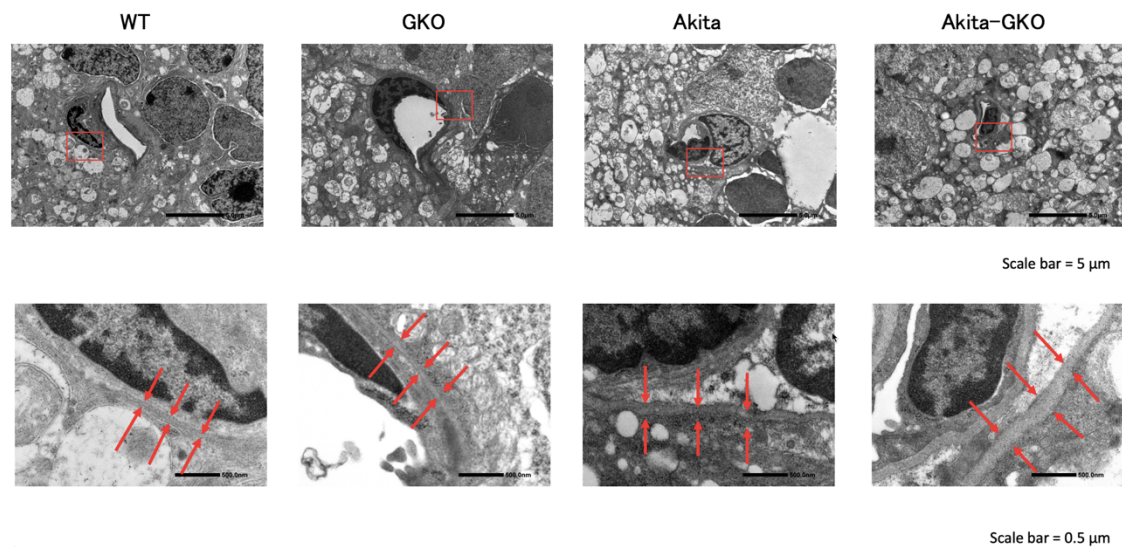


図 17-1 各マウスの網膜血管の電子顕微鏡写真（中層）

上段の赤枠は拡大箇所（下段）を、赤矢印は網膜血管の基底膜を示している。

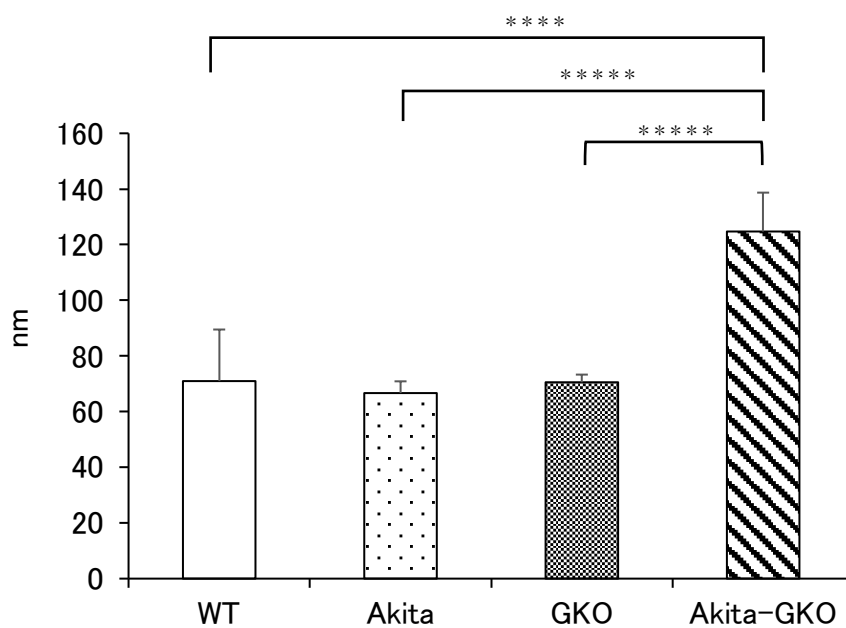


図17-2 各マウスの網膜血管の基底膜厚の定量解析（中層）

Akita-GKO マウスにおいて他の3群と比較して有意に基底膜の肥厚がみられた。

\*\*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\*\* $P < 0.0001$ ,  $n=12$  (4 mice). Tukey's test

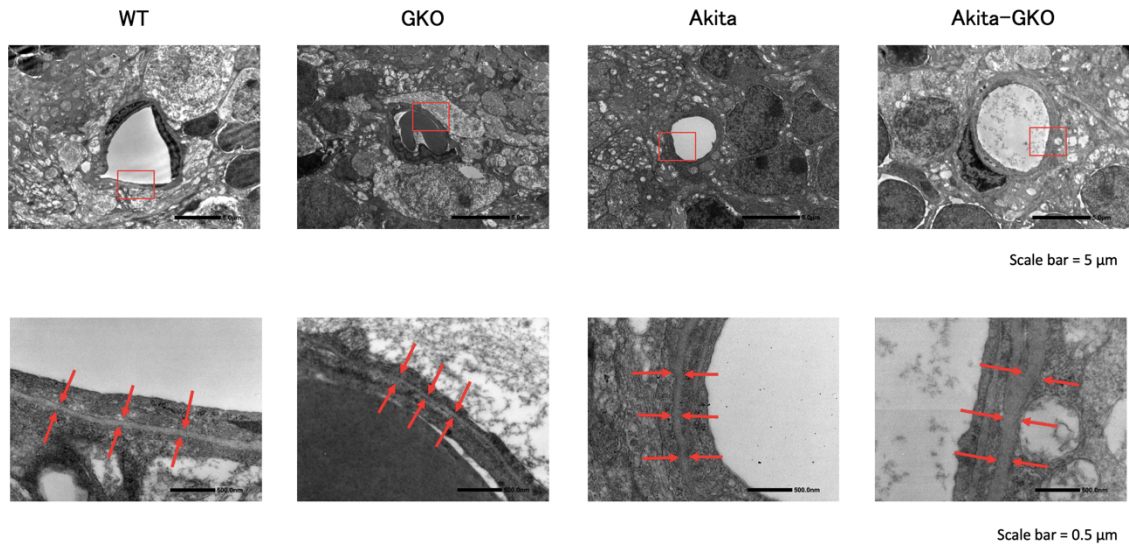


図 1 8-1 各マウスの網膜血管の電子顕微鏡写真（深層）

上段の赤枠は拡大箇所（下段）を、赤矢印は網膜血管の基底膜を示している。

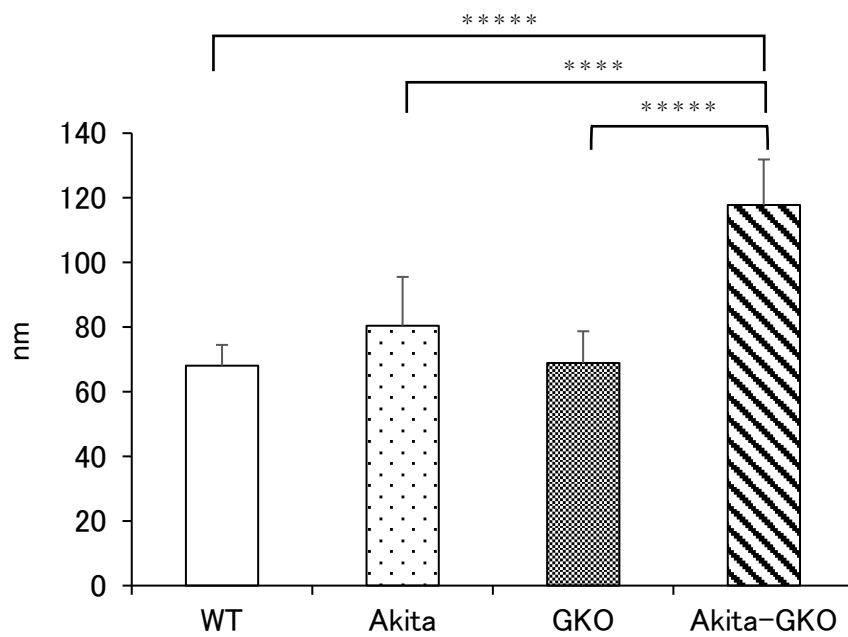


図18-2 各マウスの網膜血管の基底膜厚の定量解析（深層）

Akita-GKO マウスにおいて他の3群と比較して有意に基底膜の肥厚がみられた。

\*\*\*\*P < 0.001; \*\*\*\*\*P < 0.0001, n=12 (4 mice). Tukey's test



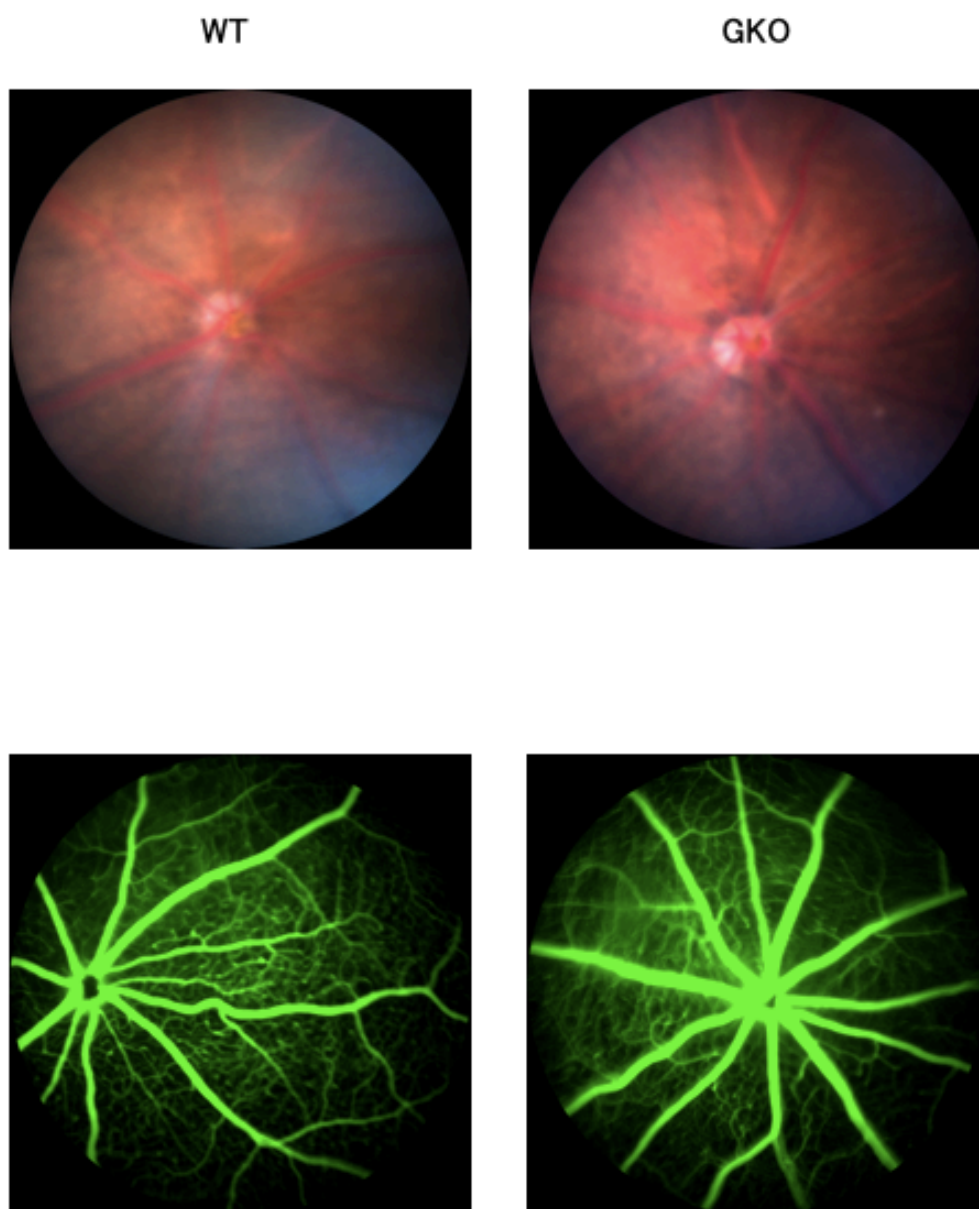


図19-1 眼底写真(上段), フルオレセイン蛍光眼底造影 (下段)

WT 及び GKO マウスにおいて異常は見られなかった。

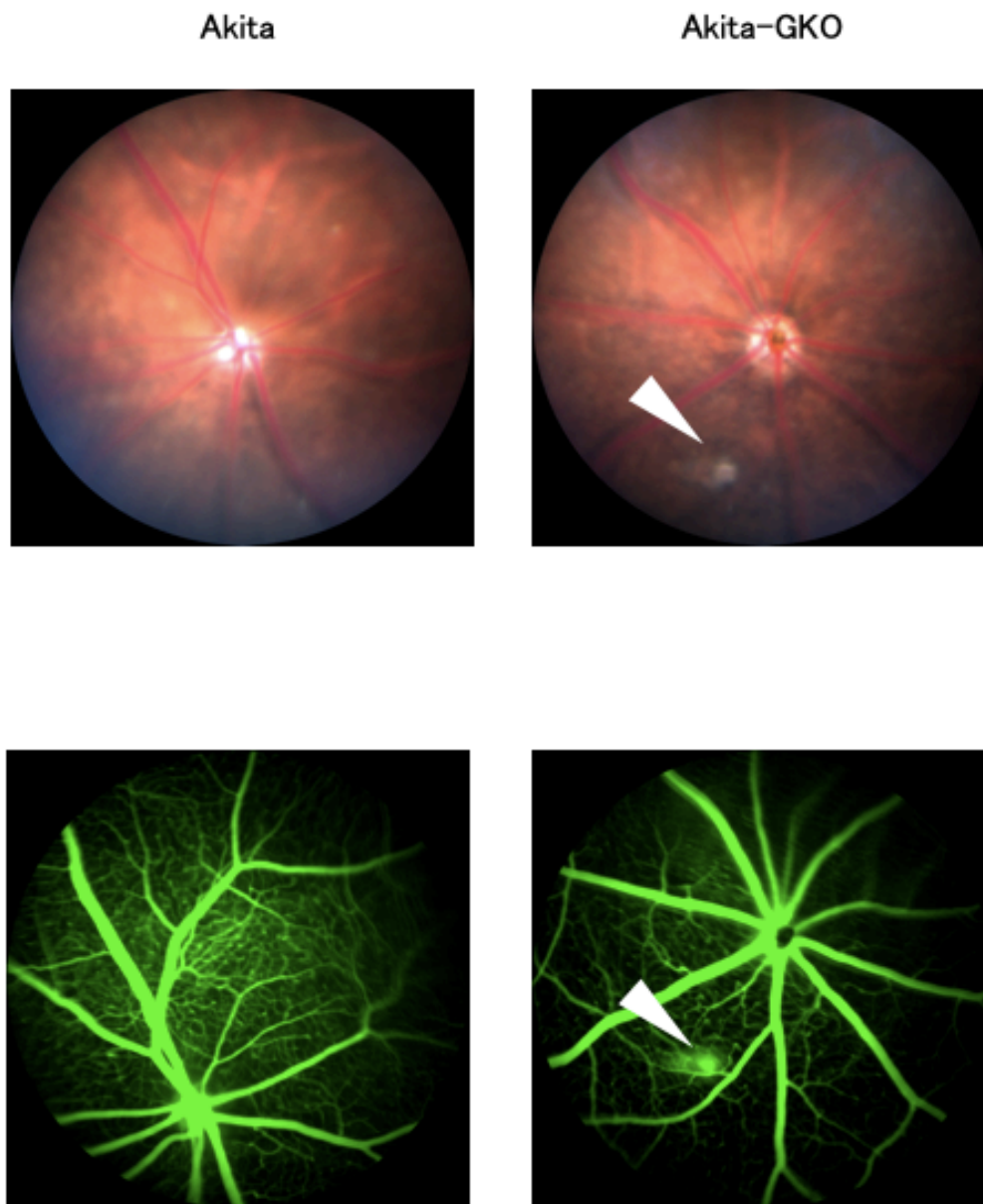


図19-2 眼底写真(上段), フルオレセイン蛍光眼底造影 (下段)

白矢印は Akita-GKO マウスに観察された白斑及び一致する箇所の網膜血管からの蛍光漏出を示す。

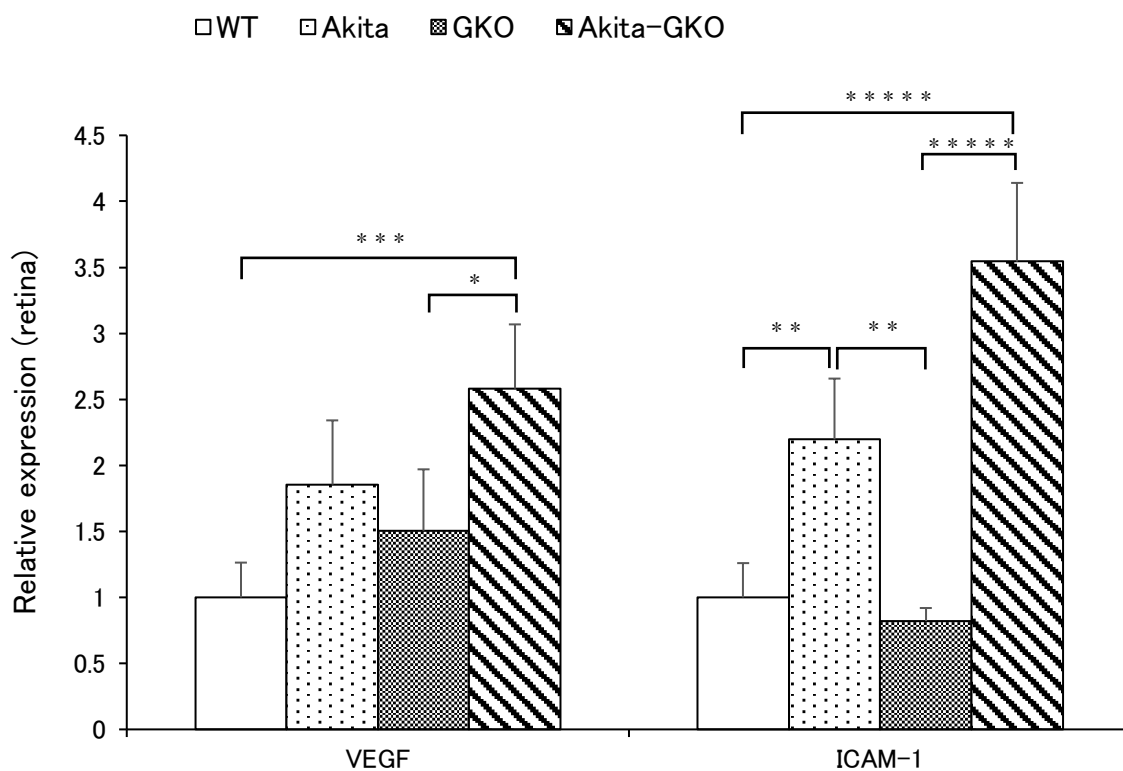


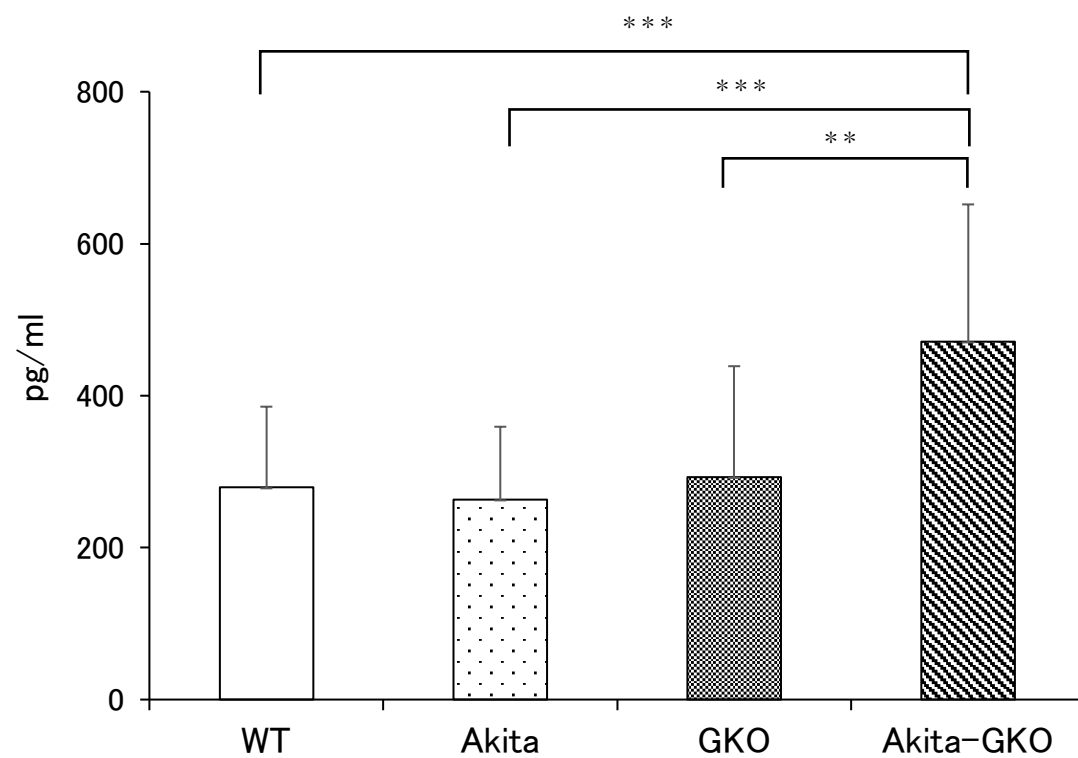
図20 網膜におけるサイトカイン遺伝子の発現

Akita-GKO マウスの網膜では VEGF 及び ICAM-1 遺伝子の発現が亢進していた。

\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.005$ ; \*\*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\*\* $P < 0.0001$ ,  $n=9$ . Tukey's test

表6 網膜における転写因子およびサイトカイン遺伝子の発現(平均±SD)

	WT	Akita	GKO	Akita-GKO
VEGF	1.00 ± 0.263	1.85 ± 0.486	1.50 ± 0.465	2.85 ± 0.486
ICAM-1	1.00 ± 0.260	2.20 ± 0.461	0.820 ± 0.0991	3.54 ± 0.596



**図21 眼内 VEGF 濃度**

Akita-GKO マウスにおいて、眼内 VEGF 濃度は他の3群と比較して有意に上昇していた。

\*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.005$ ,  $n=9$ . Tukey's test