77　糖尿病網膜症における糖鎖の病態形成への関与	神田　敦宏

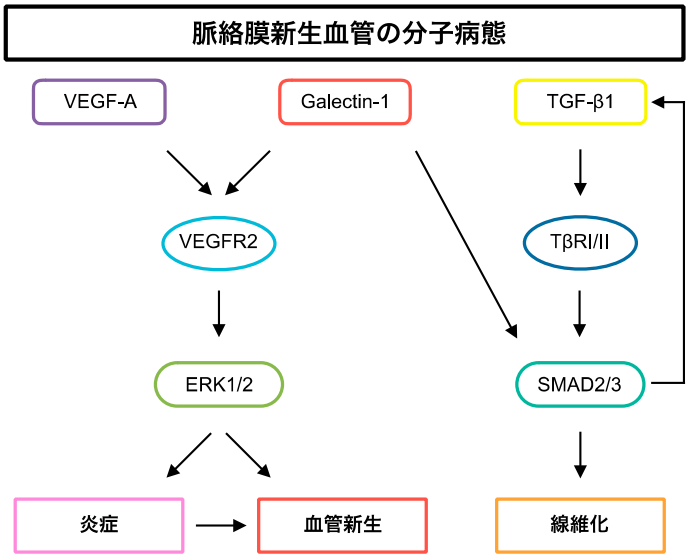
【目的】糖尿病網膜症や加齢黄斑変性は、主要な中途失明原因の網脈絡膜疾患であり、生活習慣病や加齢による慢性炎症性疾患と位置づけられる。しかしながら、いまだ根本的な治療法の開発・疾患発症機序の解明には至っていない。我々は、これまでに糖尿病網膜症患者と非糖尿病患者の硝子体中 N 型糖鎖量を比較し、糖尿病網膜症患者において有意に増加していることを明らかにし、さらに糖鎖結合タンパク質ガレクチン-1 が血管内皮増殖因子（VEGF）とは独立して増殖糖尿病網膜症眼内における血管新生を促進していることを明らかにした。ガレクチン-1 および糖鎖は、腫瘍転移やアポトーシスなど様々な病理的機能を持っていることから、他の網脈絡膜疾患の病態形成（血管新生・炎症など）にも関与している可能性は大きい。また、ガレクチン-1 の網膜における生理的な機能に関しては多くが不明である。そこで本研究では、網脈絡膜疾患における病態形成（血管新生、炎症、線維化など）でのガレクチン-1 および糖鎖の関与の解明を行う。

【方法】ガレクチン-1 欠損（*Lgals1*-KO）およびガレクチン-1 過剰発現（*Lgals1*-Tg）マウスを用いて、レーザーを眼底に照射して脈絡膜新生血管ならびに網膜下線維化モデルを作製した。そして、リアルタイム PCR、イムノブロット、免疫組織染色法などを用いて、種々の炎症性サイトカインや線維化関連分子の発現・局在を解析した。さらに *LGALS1* siRNA 遺伝子導入をした培養ヒト網膜色素上皮細胞を用いて、上皮間葉移行マーカーの発現変化を解析した。

また、2 型糖尿病による増殖糖尿病網膜症患者 20 例、糖尿病の既往がない特発性黄斑上膜および黄斑円孔患者 20 例から手術前に採取した血漿中における種々の血漿中タンパク質濃度をマルチプレックス解析システムと酵素免疫測定法を用いて測定した。

【結果】ガレクチン-1 は、網膜色素上皮および脈絡膜における血管新生および線維化の両方で病態形成に関わる重要な促進因子として機能していることが示唆された。

ガレクチン-1 の脈絡膜新生血管と網膜下線維化への病態形成関与



77. 糖尿病網膜症における糖鎖の病態形成への関与

神田　敦宏

北海道大学 大学院医学研究院 眼科学教室

Key words：ガレクチン-1，血管新生，炎症，線維化，網脈絡膜

緒　言

超高齢社会を迎えた我が国では、臓器の健康を維持することはますます重要課題となっている。生活習慣病や慢性炎症が危険因子となり、糖尿病のみならず高血圧・動脈硬化などを引き起こし、さらには網脈絡膜疾患（糖尿病網膜症や加齢黄斑変性）や心腎障害（糖尿病腎症）を誘発し、それらが失明などの臓器機能低下・損失の上位を占めている。これら網脈絡膜疾患や心腎障害は終末病態として炎症・血管新生・線維化をきたし、生活習慣病に合併した血管症と位置づけられる。糖尿病網膜症は、壮年期における主要な中途失明原因の一つである。近年では、硝子体手術などの既存療法の改良に加え、本症の病態責任分子「血管内皮増殖因子（VEGF）」に対する生物学的製剤「抗 VEGF 製剤」が実臨床に導入され、その治療成績も向上しつつある。しかしながら、抗 VEGF 製剤の使用には複数の合併症リスクがあり、さらに抗 VEGF 製剤に対して反応性の乏しい・抵抗性を示す症例も報告されて来ているため、本症に対する新規治療の探索は現在もなお幅広く展開されている［1］。

近年、核酸、蛋白質に続く第三の鎖状生命分子として、糖鎖分子が注目されている。ヒトゲノム計画によって遺伝子配列が決定された結果、蛋白質の半数以上が糖鎖修飾を受けることが明らかとなり、糖鎖修飾は蛋白質の機能調節に重要な役割を持つ「翻訳後修飾」の中でも重要な現象として広く認識されるようになった。また、糖鎖構造の変化がタンパク機能に影響を与えることはよく知られており、intercellular adhesion molecule（ICAM）-1 などの分子は糖鎖構造の変化によってその機能が亢進すると報告されている［2］。また、糖鎖特異的に結合する分子（ガレクチンなど）も存在し、それらは一般的なサイトカインのように特異的レセプターは存在しないが、糖鎖に結合し、細胞内シグナル伝達の活性化などを行うほか、恒常性機能維持やアポトーシスなどの様々な生理的機能のみならずガンなどの病態形成に関与する病理的機能も持つ［3，4］。我々は、これまでに糖尿病網膜症患者と非糖尿病患者の硝子体中 *N*型糖鎖量を比較し、糖尿病網膜症患者において有意に増加していることを明らかにし［5］、さらに糖鎖結合タンパク質ガレクチン-1 が血管内皮増殖因子（VEGF）とは独立して増殖糖尿病網膜症眼内における血管新生を促進していることを明らかにした［6，7］。そこで本研究では、網脈絡膜疾患（糖尿病網膜症や加齢黄斑変性）における病態（血管新生、炎症、線維化など）の形成でのガレクチン-1 および糖鎖の関与の解明を行った［8，9］。

方　法

ガレクチン-1 欠損（*Lgals1*-KO）およびガレクチン-1 過剰発現（*Lgals1*-Tg）マウス（オス、生後 6～8 週齢）を用いて、レーザーを眼底に照射して脈絡膜新生血管（choroidal neovascularization：CNV）ならびに網膜下線維化モデルを作製した。そして、リアルタイム PCR、イムノブロット、免疫組織染色法などを用いて、種々の炎症性サイトカインや線維化関連分子の発現・局在を解析した。さらに *LGALS1* siRNA 遺伝子導入をした培養ヒト網膜色素上皮（retinal pigment epithelial：RPE）細胞を用いて、上皮間葉移行（epithelial-mesenchymal transition：EMT）マーカーの発現変化を解析した。

また、2 型糖尿病による増殖糖尿病網膜症患者 20 例、糖尿病の既往がない特発性黄斑上膜および黄斑円孔患者 20 例から手術前に採取した血漿中における種々の血漿中タンパク質濃度をマルチプレックス解析システムと酵素免疫測定法を用いて測定した。

結果および考察

1. ガレクチン-1 欠損による網膜の生理的機能への影響

ガレクチン-1 の網膜における生理的な機能に関しては未だ報告がない。そこでまず、*Lgals1*-KO マウスを用いてガレクチン-1 欠損による網膜機能への影響を検討した。ガレクチン-1 は、正常マウスでは網膜の網膜色素上皮・内顆粒層・外顆粒層・神経細胞層などに幅広く発現分布していた。一方、*Lgals1*-KO マウスではそれらのシグナルが消失していた。そして、HE 染色による組織学的な解析、網膜電図による機能的解析を行ったが、正常マウスと *Lgals1*-KO マウスで有意な差は認められなかった（図 1）。その他、網膜血管・網膜細胞の発生などを免疫組織染色法などにても解析したが、有意な差は認められなかった。このことは、ガレクチン-1 は網膜の発生や機能に必須ではないと考えられる。

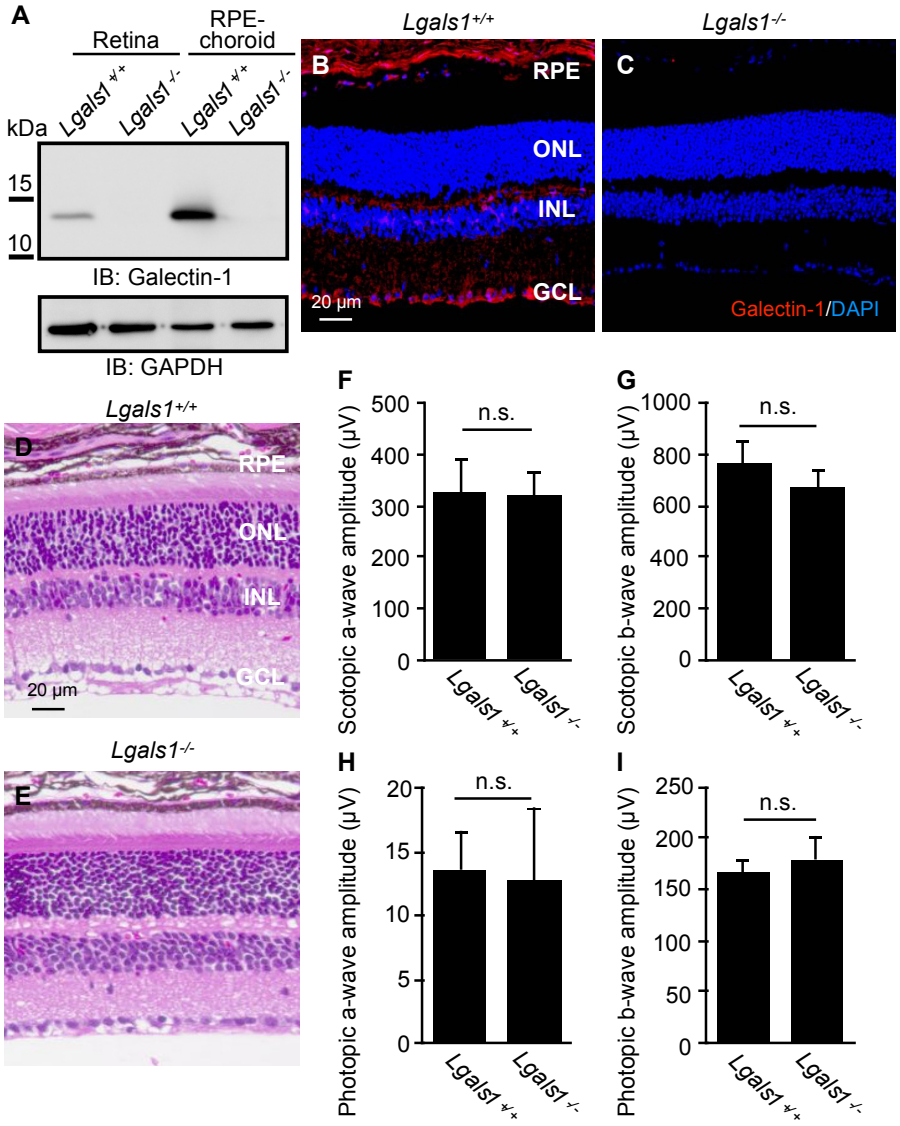


図 1. *Lgals1*-KO マウスにおける網膜生理的機能解析

A) 正常および *Lgals1*-KO マウス網膜におけるガレクチン-1 タンパク質の発現解析。

B, C) 正常および *Lgals1*-KO マウス網膜におけるガレクチン-1 の局在解析。
抗ガレクチン-1 抗体（赤色）、DAPI（青色）にて染色。

D, E) 正常および *Lgals1*-KO マウスにおける網膜組織の HE 染色。

F～I) 正常および *Lgals1*-KO マウスにおける網膜電図。
（n = 4～10）n.s. = no significant（Student's t-test）。

2. *Lgals1*-KO マウスにおける脈絡膜新生血管（CNV）

CNV へのガレクチン-1 の関与を明らかにするため、レーザー誘導 CNV を *Lgals1*-KO マウスを用いて作製した。結果、コントロールマウスに比べ *Lgals1*-KO マウスでは CNV サイズは有意に小さく、RPE・脈絡膜複合体における白血球走化因子-1（MCP-1、別名 CCl2）や ICAM-1 の遺伝子発現量、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ（ERK）1/2 タンパク質のリン酸化が有意に減少していた（図 2）。また、RPE・脈絡膜複合体におけるガレクチン-1 発現量は、正常マウスに比べレーザー誘導 CNV モデルで上昇していた。これまでに我々は、ガレクチン-1 は VEGF 受容体 2 の細胞外ドメインに存在する糖鎖を認識・結合して、VEGF 非依存的に受容体を活性化することを報告している［6, 7］。これらのことから、CNV の誘導により発現が亢進したガレクチン-1 が VEGF 受容体 2 と結合して、その下流シグナル（ERK1/2）を活性化して MCP-1 や ICAM-1 の発現が上昇したと示唆される。

3. *Lgals1*-KO マウスにおける網膜下線維化

今日の臨床において加齢黄斑変性などで CNV 形成後の瘢痕化（線維化）が視力予後改善の妨げとなっており、問題になっている。そこで、網膜下線維化へのガレクチン-1 の関与を明らかにするため、レーザー誘導 CNV を *Lgals1*-KO マウスを用いて作製した。結果、コントロールマウスに比べ *Lgals1*-KO マウスでは網膜下線維化サイズは有意に小さく、RPE・脈絡膜複合体における線維化マーカーのトランスフォーミング増殖因子-1（TGF-β1）、α-平滑筋アクチン（SMA）、タイプⅠ型コラーゲン（COL1A1）などの遺伝子発現量、SMAD2 タンパク質のリン酸化が有意に減少していた（図 3）。既報で、ガレクチン-1 は SMAD2 タンパク質と結合して、SMAD2 タンパク質の核内移行を補助する機能があると報告されている［10］。これらのことから、網膜下線維化の誘導により発現が亢進した TGF-β1 により活性化された SMAD2 シグナル経路を促進していると考えられる。

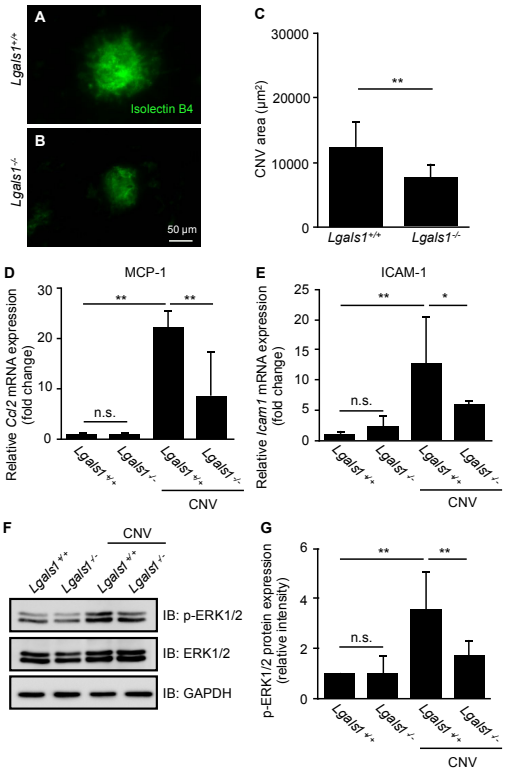


図 2. *Lgals1*-KO マウスにおける CNV

A～C）正常および *Lgals1*-KO マウスにおける CNV サイズ比較。CNV を Isolectin-B4（緑色）にて染色。（n＝8～9）

D、E）正常および *Lgals1*-KO マウスの RPE・脈絡膜複合体におけるレーザー誘導 CNV による MCP-1（別名 Ccl2）と ICAM-1 遺伝子発現解析。（n＝4～5）、 **P＜0.01

F、G）正常および *Lgals1*-KO マウスの RPE・脈絡膜複合体におけるレーザー誘導 CNV によるリン酸化 ERK1/2 タンパク質発現解析。（n＝4）、 *P＜0.05、**P＜0.01 （Student's t-test）。

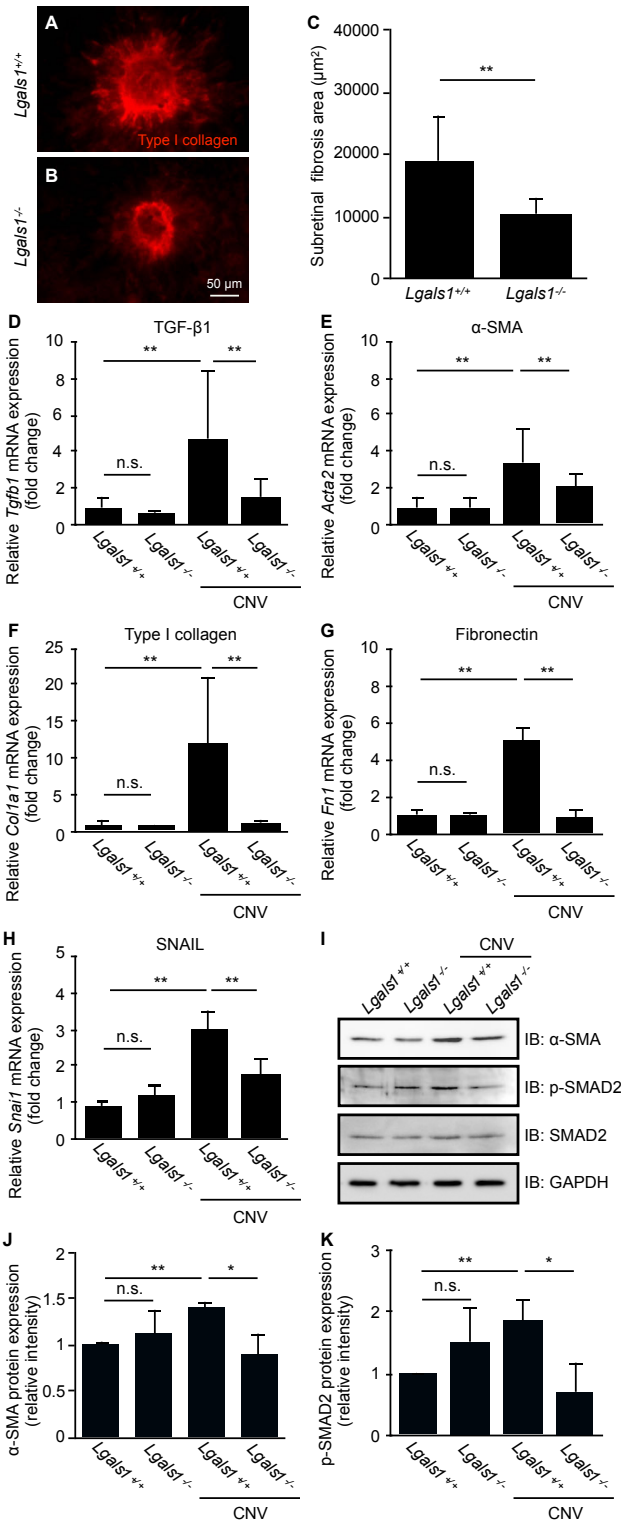


図 3. *Lgals1*-KO マウスにおける網膜下線維化

A～C）正常および *Lgals1*-KO マウスにおける網膜下線維化サイズ比較。網膜下線維化をタイプⅠコラーゲン（赤色）にて染色。（n = 8～9）

D～H）正常および *Lgals1*-KO マウスの RPE・脈絡膜複合体におけるレーザー誘導 CNV による EMT マーカー遺伝子発現解析。（n = 4～5）

I～K） 正常および *Lgals1*-KO マウスの RPE・脈絡膜複合体におけるレーザー誘導 CNV による α-SMA とリン酸化 SAMD2 タンパク質発現解析。（n = 3～4） *P < 0.05、**P < 0.01、（Student's t-test）。

4. *in vitro* におけるガレクチン-1 の線維化への関与

上記で得られた結果を検証するため、培養 RPE 細胞とガレクチン-1 に対する siRNA（*LGALS1* siRNA）を用いて上皮間葉転換（EMT）への関与を検討した。ガレクチン-1 ノックダウン RPE 細胞では、TGF-β1 誘導の EMT マーカー発現および SMAD2 リン酸化が抑制された（図 4）。さらに、ガレクチン-1 ノックダウン RPE 細胞では、TGF-β1 誘導の細胞運動性（移動、増殖、浸潤）が抑制された。このことは、ガレクチン-1 が仲介する網膜下線維化は、SMAD2 / SNAIL シグナル伝達を介した TGF-β活性化 RPE 細胞による EMT によるものだと示唆された。

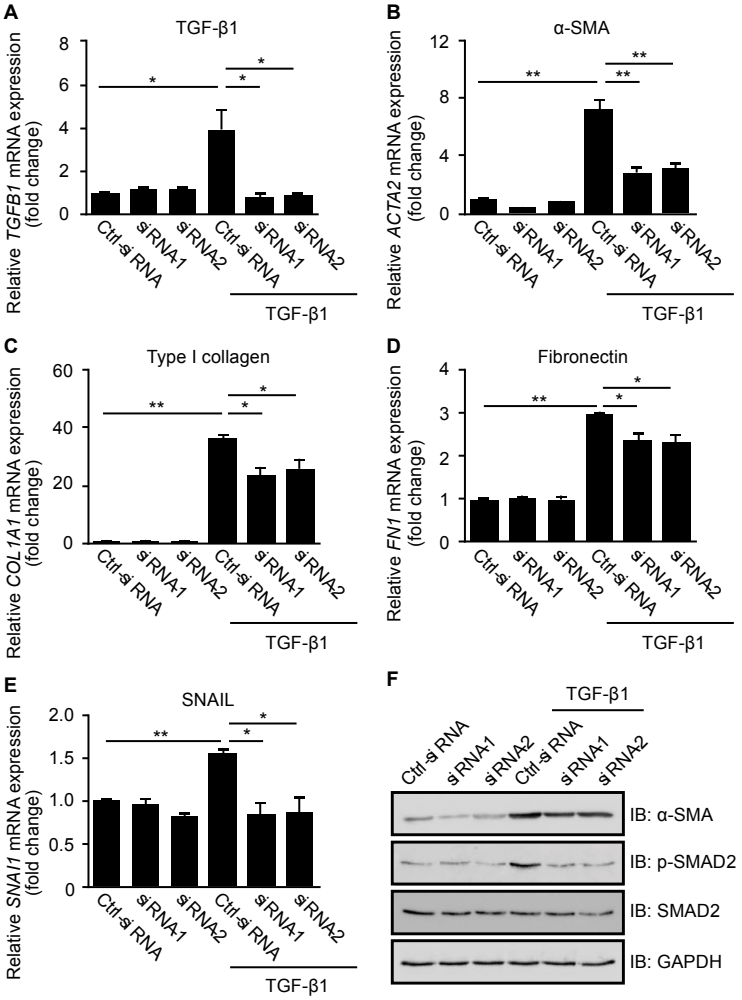


図 4. *LGALS1* ノックダウン RPE 細胞における TGF-β1 誘導 EMT

A～E）正常および *LGALS1* ノックダウン RPE 細胞における EMT マーカー遺伝子発現解析。

（n = 6～8）、 *P < 0.05、**P < 0.01（Student's t-test）。

F）正常および *LGALS1* ノックダウン RPE 細胞におけるリン酸化 SAMD2 タンパク質発現解析。

5. ガレクチン-1 過剰発現（*Lgals1*-Tg）における CNV と網膜下線維化

さらに我々は、*Lgals1*-KO マウスで得られた新たな知見を検証するため、CAG プロモーター制御下マウスガレクチン-1 を過剰発現するマウスを作製した。*Lgals1*-Tg マウスは、網膜や RPE・脈絡膜複合体において正常マウスより 20～50 倍のガレクチン-1 発現量を示したが、ガレクチン-1 過剰発現による組織学的・電気生理的な変化は認められなかった。そして、本 *Lgals1*-Tg マウスを用いて、レーザー誘導 CNV モデルを作製したところ、正常マウスに比べ CNV と網膜下線維化サイズは増加した（図 5）。本結果からも、ガレクチン-1 は、RPE 脈絡膜における血管新生および線維化の両方で病態形成に関わる重要な促進因子として機能していることが示唆された。

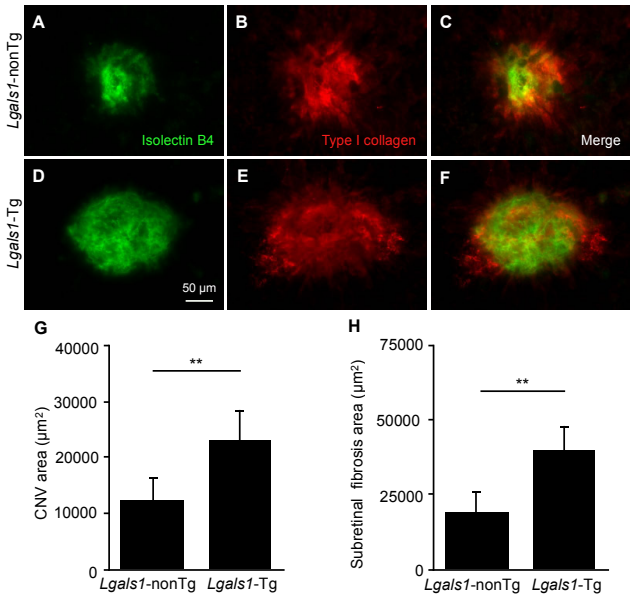


図 5. *Lgals1*-Tg マウスにおける CNV と網膜下線維化

A～F）正常および *Lgals1*-Tg マウスにおける CNV および網膜下線維化サイズ比較。CNV を Isolectin-B4（緑色）、網膜下線維化をタイプⅠコラーゲン（赤色）にて染色。（n＝6～9）、**P＜0.01、（Student's t-test）。

以上の結果より、糖鎖結合タンパク質ガレクチン-1 は網脈絡膜疾患（糖尿病網膜症や加齢黄斑変性）の病態形成に関わる重要な鍵分子であると示唆される。抗 VEGF 製剤抵抗性を示す症例では、眼内のサイトカインの発現量のみならず、様々なタンパク質の糖鎖構造やガレクチン-1 のような糖鎖結合タンパク質の発現が変化し、それらが VEGF 非依存的な炎症および血管新生などを惹起している可能性がある。

6. 増殖糖尿病網膜症患者における血漿ガレクチン-１と炎症関連分子との相関解析

我々は血管新生因子ガレクチン-1 が増殖糖尿病網膜症患者の眼内において血管内皮増殖因子非依存的に増加していること、ガレクチン-1 の発現制御に低酸素以外に終末糖化産物（AGEs）およびインターロイキン（IL）-1β が関与していることを明らかにした。そこで、血漿中ガレクチン-1 と低酸素誘導および炎症関連分子との相関について検討を行った。

増殖糖尿病網膜症患者血漿中のガレクチン-1、AGEs、IL-1β 濃度は、非糖尿病群に比べ有意に高値であった（P＜0.01）。さらに、増殖糖尿病網膜症患者群では血漿ガレクチン-1 は AGEs や IL-1β と正の相関を示したが（P＜0.01）、非糖尿病群では相関はなかった（P＞0.05）。また、増殖糖尿病網膜症患者群と非糖尿病群の両者ともに血漿中におけるガレクチン-1 は VEGF ならびに低酸素誘導分子（IL-6、エリスロポエチンなど）との相関は認められなかった。

眼内と関与する細胞成分は異なるが、血漿中ガレクチン-1 も AGEs-IL-1β の経路を介した発現制御系が存在し、他の糖尿病合併症における様々な臓器での病態形成に関与していると示唆される。

一連の研究結果は論文として取りまとめ、国際科学雑誌に投稿して受理された（Wu D, Kanda A, *et al.*, 2019 *FASEB J*）および（Hase K, Kanda A, *et al.*, 2019 *Int J Ophthalmol*）。

共同研究者および謝辞

本研究の共同研究者は、北海道大学大学院医学研究院眼科学教室の吴迪大学院生、長谷敬太郎大学院生、石田晋教授および文献［8，9］の共著者である。本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

1) Daniel E, Toth CA, Grunwald JE, Jaffe GJ, Martin DF, Fine SL, et al. Risk of scar in the comparison of age-related macular degeneration treatments trials. Ophthalmology. 2014;121(3):656-66. Epub 2013/12/10. doi: 10.1016/j.ophtha.2013.10.019. PubMed PMID: 24314839; PubMed Central PMCID: PMCPMC3943618.

2) Scott DW, Dunn TS, Ballestas ME, Litovsky SH, Patel RP. Identification of a high-mannose ICAM-1 glycoform: effects of ICAM-1 hypoglycosylation on monocyte adhesion and outside in signaling. American journal of physiology Cell physiology. 2013;305(2):C228-37. Epub 2013/05/25. doi: 10.1152/ajpcell.00116.2013. PubMed PMID: 23703526; PubMed Central PMCID: PMCPMC3725629.

3) Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. Galectin-1: a small protein with major functions. Glycobiology. 2006;16(11):137R-57R. Epub 2006/07/15. doi: 10.1093/glycob/cwl025. PubMed PMID: 16840800.

4) Croci DO, Cerliani JP, Dalotto-Moreno T, Mendez-Huergo SP, Mascanfroni ID, Dergan-Dylon S, et al. Glycosylation-dependent lectin-receptor interactions preserve angiogenesis in anti-VEGF refractory tumors. Cell. 2014;156(4):744-58. Epub 2014/02/18. doi: 10.1016/j.cell.2014.01.043. PubMed PMID: 24529377.

5) Inafuku S, Noda K, Amano M, Ohashi T, Yoshizawa C, Saito W, et al. Alteration of N-Glycan Profiles in Diabetic Retinopathy. Investigative ophthalmology & visual science. 2015;56(9):5316-22. Epub 2015/08/11. doi: 10.1167/iovs.15-16747. PubMed PMID: 26258617.

6) Kanda A, Dong Y, Noda K, Saito W, Ishida S. Advanced glycation endproducts link inflammatory cues to upregulation of galectin-1 in diabetic retinopathy. Sci Rep. 2017;7(1):16168. Epub 2017/11/25. doi: 10.1038/s41598-017-16499-8. PubMed PMID: 29170525; PubMed Central PMCID: PMCPMC5700925.

7) Kanda A, Noda K, Saito W, Ishida S. Aflibercept traps galectin-1, an angiogenic factor associated with diabetic retinopathy. Sci Rep. 2015;5:17946. Epub 2015/12/10. doi: 10.1038/srep17946. PubMed PMID: 26648523; PubMed Central PMCID: PMCPMC4673700.

8) Wu D, Kanda A, Liu Y, Kase S, Noda K, Ishida S. Galectin-1 promotes choroidal neovascularization and subretinal fibrosis mediated via epithelial-mesenchymal transition. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2019;33(2):2498-513. Epub 2018/10/03. doi: 10.1096/fj.201801227R. PubMed PMID: 30277820.

9) Hase K, Kanda A, Noda K, Ishida S. Increased plasma galectin-1 correlates with advanced glycation end products and interleukin-1β in patients with proliferative diabetic retinopathy. International journal of ophthalmology. 2019:12(4):692-694. PubMed PMID: 31024829

10) Lim MJ, Ahn J, Yi JY, Kim MH, Son AR, Lee SL, et al. Induction of galectin-1 by TGF-beta1 accelerates fibrosis through enhancing nuclear retention of Smad2. Exp Cell Res. 2014;326(1):125-35. Epub 2014/06/15. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.06.001. PubMed PMID: 24928277.