



Title	Spontaneously Diabetic Torii fattyラットにおける糖尿病眼合併症に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	菊地, 香澄
Description	配架番号 : 2686
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14943号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85751
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	KIKUCHI_Kasumi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 菊地 香澄

学位論文題名

Spontaneously Diabetic Torii fattyラットにおける糖尿病眼合併症に関する研究
(Diabetic ocular complications in Spontaneously Diabetic Torii fatty rats)

【背景と目的】糖尿病は、白内障、網膜症、血管新生緑内障などの眼合併症を生じ、重篤な視覚障害を引き起こす疾患である。そして、糖尿病患者数は現在世界的に増加の一途を辿っているため、糖尿病眼合併症を有する患者数が今後増加することは自明である。

白内障は糖尿病患者における視覚障害の主要な原因の一つであるが、現時点で有効な治療は手術のみである。新規治療法の開発には糖尿病白内障の機序解明が重要となるが、詳細な病因はいまだに解明されていない。また、糖尿病網膜症は高血糖によって網膜微小血管障害を生じる疾患であり、現在でも本邦の失明原因の上位を占めている。しかしながら、糖尿病白内障と同様、その発症機序には未だ不明な点も多く、進行例ではレーザー治療や手術などの侵襲性の高い治療が必要となる。これらの疾患の病態および創薬研究を進めるためには適切な動物モデルが必要であると考え、本研究を開始した。

Spontaneously Diabetic Torii (SDT) fattyラットは肥満と2型糖尿病を発症するモデル動物である。レプチン受容体の変異のため、離乳直後から過食を呈し、早期に糖尿病を発症する。腎障害や神経障害などの糖尿病合併症を早期から発症するが、糖尿病眼合併症に関しては十分に検討されていない。

本研究の目的は、SDT fattyラットとヒトの糖尿病眼合併症を比較し、糖尿病眼合併症モデル動物としての有用性を検討することである。

【対象と方法】SDT fattyラットとコントロールとして同週齢のSprague Dawley (SD) ラットを使用した。5週齢から24週齢まで経時的に体重と随時血糖を測定した。血中トリグリセリドは5、8、12、16週齢で測定した。白内障に関する検討では、5週齢から16週齢まで細隙灯顕微鏡を用いて白内障の進行過程を経時的に観察した。また、生化学的な検討として5、8、12、16週齢でラットを安楽死させ眼球を摘出し、水晶体中のglucose、sorbitol、fructose、glutathione、4-hydroxynonenal (4-HNE) を測定した。

網膜に関する検討では、網膜の形態学的変化を調べるために24週齢で眼球を摘出して網膜厚を測定した。また、トリプシン消化法を用いて網膜血管を分離し、毛細血管径を測定した。さらに、網膜血管を周皮細胞(ペリサイト)のマーカーであるNG2で免疫染色し、毛細血管におけるペリサイト/内皮細胞比(P/E比)を評価し、網膜毛細血管標本をintercellular adhesion molecule-1(ICAM-1)とvascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1)で免疫染色することで白血球接着因子の発現を評価した。

また、24週齢の網膜サンプルを用いてDNAマイクロアレイ解析を施行し、SDT fattyラットの網膜において増加する炎症関連物質のスクリーニングを行った。同結果に基づいて、5、8、12、16週齢の網膜サンプルを用いてreal-time PCRを行い、monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1)、interleukin-1 β (IL-1 β)、ICAM-1、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、vascular endothelial growth factor-A(VEGF-A)、interleukin-6(IL-6)のmRNA発現量を定量した。また、24週齢の網膜を用いて各分子のタンパク量についても測定を行った。

【結果】SDT fattyラットの体重は8週齢まで著明な増加を示したが、その後漸減してコントロール群のSDラットよりも低値となった。SDT fattyラットの随時血糖は5週齢から24週齢までコントロール群よりも高値で維持された(p<0.01)。血中トリグリセリドは、5、8、12、16週齢でSDT fattyラットがSDラットよりも有意に高値だった(p<0.01)。

白内障は7週齢から後嚢下白内障が観察され、その後に皮質白内障を併発し、16週齢で成熟白内障に至った。水晶体の組織学的検討では、16週齢のSDT fattyラットにおいて上皮細胞の核の増加や空胞化、液化が認められた。水晶体中glucose濃度は、5、8、12、16週

齢でSDT fattyラットにおいて有意に高値であった。水晶体中sorbitol濃度は、5週齢ではSDラット、SDT fattyラット共に検出限界以下であり、8、12、16週齢ではSDT fattyラットで有意に増加していた ($p<0.01$)。水晶体中fructose濃度は、5、8、16週齢でSDT fattyで有意に増加していた (5、16週齢 ; $p<0.05$, 8週齢 ; $p<0.01$)。一方で、水晶体中glutathione濃度は、全ての週齢においてSDT fattyラットで有意に減少しており ($p<0.01$)、4-HNEは12、16週齢でSDT fattyラットで有意に増加していた ($p<0.01$)。

SDT fattyラットの網膜は24週齢においてSDラットより有意に肥厚し ($p<0.01$)、網膜毛細血管径は有意に拡張していた ($p<0.01$)。P/E比はSDT fattyラットで低下しており、ペリサイトの脱落を示していた ($p<0.01$)。網膜毛細血管の免疫染色では、SDT fattyラットで血管構造に沿ってICAM-1とVCAM-1の染色が認められる一方で、SDラットの網膜毛細血管は染色されなかった。

SDT fattyラットの網膜では、ICAM-1、IL-1 β 、MCP-1、TNF- α などの炎症性サイトカインのmRNA発現量が上昇していた。一方で、ヒト糖尿病網膜症患者の眼内で増加することが報告されているIL-6とVEGF-AのmRNA発現量は変化しなかった。PCRの結果と同様に、ICAM-1、IL-1 β 、MCP-1、TNF- α のタンパク量が24週齢のSDT fattyラットの網膜において有意に増加していたが、VEGF-Aは増加しておらず、IL-6は検出限界以下だった。

【考察】ヒト糖尿病白内障は後囊下白内障と皮質白内障を高頻度で呈するが、SDT fattyラットは早期からこの2つの白内障所見を示した。糖尿病白内障の発症機序としてポリオール経路の活性化と酸化ストレスが挙げられるが、SDT fattyラットの水晶体中ではglucose、sorbitol、fructoseといった糖が増加しており、ヒト糖尿病白内障と同様にポリオール経路の活性化が示唆された。さらに、水晶体中では抗酸化物質であるglutathioneが減少し、酸化ストレスマーカーである4-HNEが増加していたことから、酸化ストレスの亢進も明らかとなった。糖尿病白内障を呈するモデル動物としてストレプトゾトシン誘導糖尿病ラットが挙げられるが、同モデルの高血糖病態は2型糖尿病とは大きく異なり、また水晶体膨潤による白内障を呈するため、ヒト糖尿病を厳密に模しているとは言い難い。SDT fattyラットは2型糖尿病モデル動物であり、その白内障は皮質白内障と後囊下白内障というヒトと類似した形態を呈し、発症機序もヒトと多くの共通点を持つと考察されるため、糖尿病白内障研究に適したモデル動物であると考えられる。

糖尿病網膜症の初期変化として、網膜毛細血管におけるペリサイトの脱落と毛細血管径の拡張がよく知られている。本研究では、SDT fattyラットの網膜毛細血管径の拡張とペリサイトの脱落を示唆するP/E比の減少が明らかとなり、ヒト糖尿病網膜症の初期変化と同様の形態変化が生じていることが確認できた。また、ヒト糖尿病網膜症の病態機序には炎症の関与があることが知られているが、本研究ではSDT fattyラットの網膜組織においてICAM-1、IL-1 β 、MCP-1、TNF- α の発現が亢進していることを明らかにした。一方で、主に虚血によって発現が上昇し、網膜血管新生を誘導することが知られるVEGF-AはSDT fattyラット網膜では上昇していなかった。以上の結果から、SDT fattyラットの網膜では虚血状態や血管新生に至る以前の炎症病態を主体とした網膜症初期変化が生じていると推定された。現在、ヒト糖尿病網膜症を完全に再現したモデルは存在せず、研究の対象に応じて使い分ける必要がある。早期に糖尿病を発症し、糖尿病網膜症の初期変化を呈するSDT fattyラットは糖尿病網膜症の予防法や治療法の開発に有用なモデルであると考えられた。

【結論】SDT fattyラットはヒト糖尿病白内障と類似する白内障を早期から呈し、その発症機序もヒトと同様であると推察された。また、同ラットではヒト糖尿病網膜症の初期病態に類似した変化も観察された。これらのことから、SDT fattyラットは糖尿病白内障の治療薬開発や糖尿病網膜症の新たな予防法および治療法の開発に有用な動物モデルであると考えられた。