



HOKKAIDO UNIVERSITY

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 [全文の要約]
Author(s)	菊地, 香澄
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2686 他
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/2115/89020
Type	doctoral thesis
File Information	KIKUCHI_Kasumi_summary.pdf



学位論文（要約）

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)

2022年3月

北海道大学

菊地香澄

学位論文（要約）

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)

2022年3月

北海道大学

菊地香澄

学位論文内容の要約

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)

【緒言】

糖尿病の患者数は世界的に増加しており、今後も増加の一途をたどると予測されている。糖尿病は様々な眼合併症を引き起こすが、特に白内障と網膜症は有病率が高く、重篤な視力低下を惹起する疾患である。以下、両疾患の概要について記載する。

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。新規治療法の開発が望まれており、適切な動物モデルがその検討のために必要となる。糖尿病白内障では水晶体中のポリオール経路の亢進や酸化ストレスが発症に関与していることが知られて糖尿病白内障の治療薬研究に使用する動物モデルは、これらの機序を有している必要がある。

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、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。より早期の段階で糖尿病網膜症を予防・治療する薬物療法の開発は非常に重要であり、前述の糖尿病白内障の治療開発と同様に、同研究に適した動物モデルが望まれている。

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ラットの糖尿病白内障と網膜症について検討し、糖尿病動物モデルとしての有用性を検討することである。

【方法】

雄のSDT fattyラットと、コントロールに同週齢の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triglyceride 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週齢まで経時的に細隙灯顕微鏡を用いて白内障を観察した。白内障の程度は既報に基づいて下記の5段階で評価した。また、5、8、12、16週齢でラットを安楽死させ眼球を摘出し、水晶体のヘマトキシリン・エオジン（HE）染色により組織像を観察した。さらに生化学的な検討として、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、形態学的変化を調べるために24週齢でラットを安楽死させ眼球を摘出し、網膜厚を測定した。また、トリプシン消化法により網膜血管標本を作成し、毛細血管径を測定した。さらに、網膜血管標本をintercellular adhesion molecule-1（ICAM-1）とvascular cell adhesion molecule-1（VCAM-1）で免疫染色し、白血球接着因子の発現を評価した。同様に網膜血管標本を周皮細胞（ペリサイト）のマーカであるNG2を用いて蛍光免疫染色し、毛細血管におけるペリサイト/内皮細胞比（P/E比）を評価した。

また、24週齢のSDおよびSDT fattyラット網膜を用いて、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。どう結果に基づいて、5、8、12、16、24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。さらに、24週齢の網膜を用いてこれらの分子のタンパク量を測定した。

【結果】

SDT fattyラットの体重は、8週齢まではコントロール群のSDラットと比較して有意に高かったが、その後体重増加は停滞してコントロール群よりも低値を示した。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。血清triglyceride値は、5、8、12、16週齢でSDT fattyラットがSDラットと比較して有意に高値だった。

白内障は、7週齢から2型糖尿病患者に特徴的に認められる皮質白内障と後囊下白内障を徐々に発症し、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、液化などが認められた。水晶体中のglucose濃度は、5、8、12、16週齢においてSDT fattyラットがSDラットと比較して有意に増加していた。Sorbitol濃度は、5週齢ではSDラット、SDT fattyラットともに検出限界以下

であり、8、12、16週齢ではSDT fattyラットで有意に増加した。水晶体中 fructose濃度は5、8、16週齢でSDT fattyラットがSDラットと比較して有意に高値だった。一方で、SDT fattyラットの水晶体におけるglutathione濃度は全ての週齢においてSDラットと比較して有意に低下し、4-HNE 濃度は、12週齢および16週齢で、SDT fattyラットで有意に増加していた。

24週齢のSDT fattyラットの網膜厚はSDラットより有意に肥厚し、網膜毛細血管径は有意に拡張していた。網膜毛細血管の蛍光免疫染色では、SDT fattyラットの網膜血管壁はICAM-1とVCAM-1ともに網膜血管に沿って染色されたが、SDラットではどちらも染色されなかった。SDT fattyラットの網膜ではSDラットと比較して有意にP/E比が減少し、ペリサイトの脱落が示唆された。

マイクロアレイ解析では、SDT fattyラットの網膜において炎症関連分子である*Mcp1*、*Il1b*、*Icam1*、*Tnf*の遺伝子発現量がSDラットに比べて2倍以上上昇していた。一方、*Vegfa*および*Il6*の遺伝子発現量は、SDT fattyラットの網膜では上昇していなかった。real-time PCRでは、24週齢のSDT fattyラットの網膜では、*Mcp1*および*Il1b*のmRNA発現量がSDラットと比較して有意に上昇していた。SDT fattyラット網膜における*Icam1*の発現量は時間依存的に上昇する傾向が認められた。また、SDT fattyラットの*Tnf*のmRNAの発現は、SDラットと比較して24週齢で有意に増加していた。一方、*Vegfa*と*Il6*のmRNA発現量は上昇せず、マイクロアレイ解析の結果と同様であった。real-time 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】

SDT fattyラットの糖尿病白内障に関する検討

SDT fattyラットが生後2カ月以内に皮質白内障および後囊下白内障を発症した。皮質白内障と後囊下白内障は、ヒト糖尿病白内障によく見られる水晶体混濁の形式である。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。

糖尿病白内障の研究では、ストレプトゾトシン誘発糖尿病のげっ歯類が頻用されるが、同モデルの高血糖病態は2型糖尿病とは大きく異なる。さらに、STZモデルでは水晶体線維の膨潤による白内障を発症するため、ヒト糖尿病白内障を厳密に模しているとは言い難い。一方、SDT fattyラットは皮質白内障と後嚢下白内障というヒト糖尿病白内障と同様の発症形式をもち、ヒトと共通の発症機序を有することから、糖尿病白内障の治療薬研究に適した動物モデルであると考えられる。

SDT fattyラットの糖尿病網膜症に関する検討

糖尿病患者では網膜厚が減少するが、SDT fattyラットの網膜はコントロール群と比較して肥厚しており、ヒト糖尿病網膜症の初期変化とは一致しなかった。この網膜肥厚の機序について今後さらなる検討が必要である。

他の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、SDT fattyラットの網膜毛細血管構造に沿って白血球接着分子ICAM-1とVCAM-1が発現していた。糖尿病網膜症における非灌流領域の発生に血管内皮細胞と白血球の接着が関連していると考えられており、SDT fattyラットの網膜では血管内皮細胞への白血球接着やleukostasisが生じている可能性が示された。

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。本研究ではSDT fattyラットの網膜組織でMCP-1、ICAM-1、IL-1 β 、TNF- α の発現が亢進していることが明らかになった。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せず、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。このことは前述した毛細血管拡張やペリサイト脱落所見が糖尿病網膜症の初期から認められることや、IL-6の濃度が糖尿病網膜症の重症度と相関している可能性があることとも矛盾しない。

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。SDT fattyラットは、糖尿病の発症が早く、白内障や網膜症などの眼合併症も比較的早期に出現する。さらに、炎症関連分子の上昇や網膜毛細血管の変化などヒト糖尿病網膜症の初期変化に着目して検討を行うことができ、糖尿病網膜症の予防や早期治療の研究に有用性の高い動物モデルであると考えられる。

【結論】

SDT fattyラットがヒト糖尿病白内障と同様の機序を介して、ヒト糖尿病白内障と類似した白内障を呈することが明らかとなった。また、同ラットの網膜症では、ヒト糖尿病網膜症の初期病態に類似した変化が観察された。

これらのことから、SDT fattyラットは糖尿病白内障のさらなる病態機序の解明や創薬に貢献する可能性があると考えている。さらに、糖尿病網膜症の新たな予防薬および治療法の開発にも貢献できる可能性があると考ええる。