



Title	糖尿病網膜症における不飽和アルデヒドの病的意義に関する探索的研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	福津, 佳苗
Description	配架番号 : 2781
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15463号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90010
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	FUKUTSU_Kanae_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 福 津 佳 苗

学 位 論 文 題 名

糖尿病網膜症における不飽和アルデヒドの病的意義に関する探索的研究

(Exploratory research on the pathological significance of an unsaturated aldehyde in diabetic retinopathy)

【背景と目的】糖尿病網膜症(diabetic retinopathy, DR)は重篤な視機能障害をきたすため、その病態解明は眼科学における重要な課題である。Müller 細胞は網膜特異的なグリア細胞であり、網膜全層にわたって網膜の支柱をなす形状で存在し、神経伝達物質の取り込みや網膜の栄養・代謝、血流調整などを担っている。一方、Müller 細胞は DR 病態において活性化され、血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)や種々のサイトカインおよびケモカインを分泌し、その病態形成において重要な役割を演じることも知られている。また、活性化された Müller 細胞は硝子体腔に遊走し、線維血管組織と呼ばれる網膜硝子体界面の増殖組織形成に寄与すると考えられているが、その詳細な機序は現在まで不明である。我々は過去に、増殖糖尿病網膜症(proliferative diabetic retinopathy, PDR)患者の線維血管組織に存在する網膜グリア細胞にアクロレインと呼ばれる物質の結合蛋白が蓄積すること、そしてアクロレインが Müller 細胞の遊走を惹起することなどを報告してきた。アクロレインは反応性が高い不飽和アルデヒドの一種であり、様々な蛋白と結合することでその機能異常を引き起こすため、神経変性疾患や悪性腫瘍などの疾患病態でも注目されている分子である。

今回、アクロレインが Müller 細胞の活性化・遊走を促進するメカニズムについて、rho-associated coiled-coil-containing protein kinase 1 (ROCK1) と monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) に着目して検討をおこなった。ROCK は細胞骨格のアクチン束に作用して細胞遊走を促進する分子であり、ROCK1 と ROCK2 の 2 つのアイソフォームが同定されている。DR 病態において ROCK 経路が活性化しているとする既報がある一方、MCP-1 は炎症細胞の遊走を促す炎症メディエーターとして DR 眼内での増加および病態への関与が報告されている。しかし、DR 病態における Müller 細胞の活性化とこれらの分子との関連はこれまで明らかになっていない。本研究の目的は、DR 病態においてアクロレインが果たす病的意義について検討することであり、1)アクロレインは、ROCK1 を介して Müller 細胞の遊走を惹起する、2)アクロレインは、Müller 細胞から MCP-1 の放出を促進して炎症細胞の遊走を促す、という 2 つの仮説を立てて研究を行った。

【材料と方法】

1) アクロレインと ROCK を介した Müller 細胞遊走に関する検討

PDR 患者から採取した線維血管組織を用いて、ROCK1/2 に対する免疫染色を行った。培養ラット Müller 細胞 TR-MUL5 にアクロレイン (10-50 μ M) を負荷し、ROCK1/2 および活性型 ROCK1 (cleaved ROCK1) の発現変化を real-time PCR および western blotting で解析した。さらに、アクロレインおよび ROCK 阻害剤リパスジル添加による TR-MUL5 の遊走能変化を Oris™ cell migration assay を用いて検討した。

2) アクロレインによる Müller 細胞の MCP-1 発現誘導に関する検討

PDR 患者から採取した硝子体液における MCP-1 およびアクロレイン結合蛋白 FDP-lys の濃度を ELISA によって測定し、両者の相関関係を解析した。また、TR-MUL5 にアクロレイン (10-50 μ M) を負荷し、MCP-1 の発現変化を real-time PCR、ELISA および western blotting で解析した。さらに、TR-MUL5 にアクロレインを添加し、Transwell® assay を用いて培養マクロファージ細胞株 RAW264.7

の遊走能変化を検討した。

【結果】

1) アクロレインと ROCK を介した Müller 細胞遊走に関する検討

免疫染色法を用いて、PDR 患者から採取した線維血管組織において Müller 細胞の細胞質に ROCK1 が存在することを明らかとした。TR-MUL5 へのアクロレイン負荷によって ROCK1 mRNA 発現が有意に上昇し、western blotting においても ROCK1 および活性型である cleaved ROCK1 が増加することを確認した。Oris™ migration assay を用いた実験では、アクロレイン負荷によって Müller 細胞の遊走能は有意に上昇し、ROCK 阻害剤リパスジルを添加することでその遊走は有意に抑制された。

2) アクロレインによる Müller 細胞の MCP-1 発現誘導に関する検討

PDR 患者の硝子体液においてアクロレイン結合蛋白 FDP-lys および MCP-1 の濃度は有意に増加しており、両者には有意な正の相関が認められた。また、アクロレイン負荷によって TR-MUL5 における MCP-1 産生が有意に増加することが real-time PCR および ELISA で確認された。さらに、Transwell® assay においてアクロレインを添加した TR-MUL5 から放出された MCP-1 はマクロファージの遊走を亢進させたが、MCP-1 受容体である C-C motif chemokine receptor type 2 (CCR2)に対する阻害剤 RS504393 でその遊走は抑制された。

アクロレイン刺激による TR-MUL5 からの MCP-1 放出促進のメカニズムについては high mobility group box 1(HMGB1)に着目した。HMGB1 は核内で転写制御などを担い、細胞へのストレスなどにより核外に放出されると damage-associated molecular patterns(DAMPs)として機能する分子である。HMGB1 に対する阻害剤グリチルリチンは、アクロレイン刺激によって亢進した TR-MUL5 における MCP-1 発現を有意に抑制した。また、免疫染色および細胞分画 western blotting によって、アクロレイン添加で HMGB1 の細胞内局在が変化することを明らかとした。

【考察】Müller 細胞において、アクロレインは ROCK1 を介してその遊走を亢進させることが明らかとなった。また、DR 眼内においてアクロレインと MCP-1 の濃度には正の相関があること、アクロレインは Müller 細胞において炎症性サイトカイン MCP-1 の発現を増加させること、そのメカニズムには HMGB1 の細胞内局在変化が関わっていること、なども明らかとした。

DR の病態形成に Müller 細胞を含む網膜グリア細胞が重要な役割を演じていることはよく知られており、重篤な糖尿病網膜症患者の剖検眼における Müller 細胞の遊走も報告されているが、その機序はこれまで不明であった。本研究では、DR の硝子体中で増加する不飽和アルデヒドアクロレインが Müller 細胞の遊走を促進し、その機構に ROCK1 が関与することを明らかとした。本検討結果は、すでに緑内障点眼薬として製剤化されている ROCK 阻害剤リパスジルが、DR 進行抑制効果を有する可能性を示した。

また、DR の眼内で MCP-1 が増加することは既に報告があり、MCP-1 は DR 組織へのマクロファージ遊走を促し、そのマクロファージから分泌される炎症性サイトカインが DR の初期病態形成に寄与すると考えられている。一方、MCP-1 は DR 病態下で活性化した Müller 細胞から分泌されることが知られているが、その産生および分泌の制御機構については不明な点が多い。本研究では、アクロレインが HMGB1 を介して、Müller 細胞からの MCP-1 産生を増加させることを明らかとした。アクロレインに対する阻害剤は悪性腫瘍治療製剤の副作用である膀胱障害に対する薬剤としてすでに臨床使用されている。今後、同薬剤を DR の進行予防に適用できるのか、さらなる研究を進めていきたい。

【結論】DR 病態における Müller 細胞の遊走および MCP-1 産生の亢進にはアクロレインが重要な役割を果たしており、アクロレインは DR に対する創薬研究において新たな治療標的分子となり得ることが示唆された。