

| | |
|---------|---|
| 氏名 | 豊田 文彦 ^{とよた ふみひこ} |
| 学位の種類 | 博士 (医学) |
| 学位記番号 | 乙第 717号 |
| 学位授与年月日 | 平成 28年 6月 20日 |
| 学位授与の要件 | 自治医科大学学位規定第4条第3項該当 |
| 学位論文名 | 糖尿病網膜症、脈絡膜症のモデル動物の開発と薬剤による糖尿病網膜症抑制効果の検討 |
| 論文審査委員 | (委員長) 教授 川島 秀俊 (委員) 教授 水上 浩明 准教授 海老原 健 |

論文内容の要旨

1 研究目的

現在糖尿病網膜症は本邦において失明原因の第2位となっている。糖尿病網膜症の予防、進展防止には血糖コントロールが重要であるが、しばしば血糖コントロールが難しい症例に遭遇する。血糖コントロールとは別に薬剤による網膜症予防が実現できれば理想的である。それにはまず理想的な糖尿病網膜症のモデル動物が必要である。Spontaneously Diabetic Torii(SDT)ラットはヒトの糖尿病患者に認められるような成熟白内障、増殖糖尿病網膜症を発症することが報告されているが、網膜浮腫や脈絡膜症については報告がなかった。今回の研究ではこのSDTラットにおける糖尿病網膜浮腫や脈絡膜症の特徴を明らかにし、糖尿病網膜症、脈絡膜症のモデル動物として確立したいと考える。さらに糖尿病網膜症発症に関係する因子として血管新生因子(Vascular Endothelial Growth Factor;VEGF)や最終糖化産物(Advanced Glycation End Products;AGEs)に着目し、SDTラットにおける糖尿病網膜症との関連を検討することとした。そして血糖コントロールとは独立した、薬剤による糖尿病網膜症抑制の可能性についても検討したいと考える。その候補として新しいアルドース還元酵素阻害薬 Ranirestat、AGE合成阻害薬 Aminoguanidine、ビタミンB₆の1つでAGE合成阻害効果が期待される Pyridoxamine、高脂血症治療薬で抗酸化作用が期待される Probucol について検討することとした。

2 研究方法

① SDTラットにおける糖尿病網膜・脈絡膜浮腫の検討

正常 Sprague-Dawley(SD)ラット(n=9)、及びSDTラット(n=8)の網膜、脈絡膜厚を測定した。SDTラットの眼球は糖尿病発症40週後に摘出して病理切片を作成した。同様に正常 Sprague-Dawley(SD)ラットの眼球においても病理切片を作成した。網膜厚、脈絡膜厚を視神経乳頭から一定距離で測定し、比較した。

② SDTラット眼内におけるVEGF、AGEsの蓄積についての検討

正常SDラット(n=10)、SDTラット(n=6)について、網膜におけるVEGF、AGEs(N(epsilon)-carboxymethyl-lysine;CML、pentosidine、pyrraline)免疫染色所見を検討した。SDTラットは全例糖尿病発症を確認し、週齢60週を過ぎてから眼球を摘出し、免疫組織検査を行った。網膜免疫染色の強さに従って3段階(Minimal、Moderate、Severe)に分類し、正常

SD ラットと SDT ラットで比較検討を行った。

③ SDT ラットにおける AGE 合成阻害薬 Aminoguanidine、抗酸化作用を伴う高脂血症治療薬 Probucol の糖尿病性白内障、網膜症抑制効果の検討

SDT ラットは糖尿病と診断された後に Aminoguanidine 治療群(n=5)、及び Probucol 治療群(n=4)、未治療群(n=4)に分けた。週齢 55 週を過ぎてから白内障の状態を観察し、眼球摘出を行い、蛍光造影眼底検査及び CML 免疫組織染色検査を行った。糖尿病網膜症の判定は蛍光造影眼底検査での視神経乳頭からの造影剤蛍光漏出を認めた場合に網膜症ありとした。各群で糖尿病性白内障、糖尿病網膜症の発生率を比較した。

④ SDT ラットにおけるビタミン B₆ の 1 つである AGE 合成阻害薬 Pyridoxamine の糖尿病性白内障、糖尿病網膜症抑制効果の検討

SDT ラットは糖尿病と診断された後に Pyridoxamine 治療 SDT ラット群(n=6)、無治療 SDT ラット群(n=6)、正常 SD ラット群(n=10)に分類し、週齢 60 週を過ぎてから白内障の状態を観察し、眼球摘出を行い、蛍光造影眼底検査及び CML 免疫組織染色検査を行った。各群で糖尿病性白内障、糖尿病網膜症の発生率を比較した。

⑤ アルドース還元酵素阻害薬 Ranirestat の SDT ラットにおける糖尿病網膜症抑制効果の検討
正常 SD ラット群(n=8)、未治療 SDT ラット群(n=9)、Ranirestat(0.1, 1.0, 10mg/kg/day)治療 SDT ラット群(n=7, 8, 6)、Epalrestat(100mg/kg/day)治療 SDT ラット群(n=7)において網膜厚、網膜における grial fibrillary acidic protein(GFAP)染色面積を測定した。GFAP 染色は網膜の神経障害を調べるための指標として用いた。SDT ラットの眼球は糖尿病発症 40 週後に摘出して病理切片を作成した。同様に正常 SD ラットの眼球においても病理切片を作成した。網膜厚、GFAP 染色面積は視神経乳頭から一定距離で測定した。体重、血糖値、HbA1c 値を SDT ラットが糖尿病を発症してから 4 週毎に測定した。正常 SD ラットにおいても同様に測定した。

3 研究成果

① SDT ラットにおける糖尿病網膜・脈絡膜浮腫の検討

平均網膜厚、脈絡膜厚ともに正常 SD ラットに比べ SDT ラットにおいて有意に(P<0.01、P<0.01)厚くなっていた。SDT ラットにおいては網膜、脈絡膜ともに細胞間隙が疎になっており、浮腫が確認された。網膜では、内境界膜から視細胞層にかけて全体的に浮腫が確認された。脈絡膜において拡張した脈絡膜大血管が確認された。

② SDT ラット眼内における VEGF、AGEs の蓄積についての検討

網膜における CML、VEGF 免疫染色は正常 SD ラットに比べ SDT ラットにおいて有意に強く染色されていた(P<0.05、P<0.001)。pyrraline、pentosidine 免疫染色は SDT ラットと正常 SD ラットの間で有意差は認められなかった。

③ SDT ラットにおける AGE 合成阻害薬 Aminoguanidine、抗酸化作用を伴う高脂血症治療薬 Probucol の糖尿病性白内障、網膜症抑制効果の検討

成熟白内障及び糖尿病網膜症は全ての未治療 SDT ラット及び Probucol 治療 SDT ラットで確認された(4/4, 100%)が、Aminoguanidine 治療 SDT ラットにおいては確認されなかった(0/5, 0%, P<0.05)。Aminoguanidine 治療 SDT ラットでは水晶体には全く CML が染色されている所見はなく、網膜においてはごくわずかに染色されているのみであった。一方 Probucol 治療 SDT ラット

においては水晶体、網膜の CML 染色は顕著であった。

④ SDT ラットにおけるビタミン B₆ の 1 つである Pyridoxamine の糖尿病性白内障、糖尿病網膜症抑制効果の検討

成熟白内障は無治療 SDT ラット、Pyridoxamine 治療 SDT ラットにおいて全例で確認された(6/6, 100%)。一方、正常 SD ラットでは白内障は全く確認されなかった(0/10, 0%)($P < 0.001$)。糖尿病網膜症は無治療 SDT ラット、Pyridoxamine 治療 SDT ラットにおいて 4 匹で確認された(4/6, 67%)。一方、正常 SD ラットでは糖尿病網膜症はまったく確認されなかった(0/10, 0%)($P < 0.01$)。Pyridoxamine は SDT ラットにおいて成熟白内障、糖尿病網膜症を抑制していなかった。正常 SD ラットでは水晶体、網膜に CML 染色は強く認められなかった。一方、無治療 SDT ラット、Pyridoxamine 治療 SDT ラットでは水晶体、網膜に強く CML 染色を認めており、その強さはほぼ同等であった。

⑤ アルドース還元酵素阻害薬 Ranirestat の SDT ラットにおける糖尿病網膜症抑制効果の検討
平均網膜厚は正常 SD ラット、Ranirestat(0.1, 1.0, 10mg/kg/day)治療 SDT ラットでは未治療 SDT ラットに比べ有意に薄くなっていた($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.05$)。GFAP 染色面積は正常 SD ラット、Ranirestat(1.0, 10mg/kg/day)治療 SDT ラットでは、未治療 SDT ラットに比べ有意に小さかった($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$)。Epalrestat(100mg/kg/day)治療 SDT ラットと未治療 SDT ラットとの間で網膜厚、GFAP 染色面積に有意差は認められなかった。糖尿病発症後、SDT ラットは薬剤の投与の有無に関わらず、正常 SD ラットに比べ有意に軽かった($P < 0.01$)。血糖値、HbA1c 値は薬剤の投与の有無に関わらず正常 SD ラットに比べ、SDT ラットにおいて有意に高かった($P < 0.01$)。未治療 SDT ラット、Ranirestat 治療 SDT ラット、Epalrestat 治療 SDT ラット各群の間で体重、血糖値、HbA1c 値に有意差は認められなかった。

4 考察

SDT ラットでは網膜・脈絡膜浮腫が出現することが確認された。SDT ラットの網膜で CML の蓄積と VEGF の産生が認められ、SDT ラットに発症する糖尿病網膜症の主要メカニズムと考えられた。Probucol や Pyridoxamine では網膜症発症予防効果は認められなかったものの、Aminoguanidine 及び Ranirestat にて強い予防効果が認められ、有望な糖尿病網膜症予防治療薬となる可能性が示された。

5 結論

SDT ラットは糖尿病網膜症、脈絡膜症モデル動物として理想的であり、治療法の研究や病態解明に利用しやすいことが確認された。特に網膜の厚みを測定することで治療効果を客観的に評価できることが確認された。今後 SDT ラットを使用し糖尿病網膜症に対する有効な治療薬が開発されることが期待される。

論文審査の結果の要旨

本学位論文は、本邦において失明原因の第 2 位である糖尿病網膜症の血糖コントロールとは別に、薬剤による網膜症予防が実現できないか？との着想が原点となっている。網膜症のモデル動物

SDTラットを対象にして、増殖網膜症の前段階の病態と言える網膜浮腫や脈絡膜症の評価を行い、併せて、治療候補薬剤の病態抑制効果を解析した。その結果、

1. SDTラットとSDラットの比較により、増殖網膜症の前段階である網膜厚・脈絡膜厚の膨潤が確認できた。（方法：組織標本を偏光顕微鏡とデジタル解析を組み合わせて評価）
2. 同様の比較で、VEGFの発現上昇およびadvanced glycation end products (AGEs)の一つCMLの網膜内沈着が確認できた。（方法：免疫組織検査）
3. AGE合成阻害剤 aminoguanidine、pyridoxamine、高脂血症治療薬 probucol、アルドース還元酵素阻害剤 ranirestat、epalrestat の網膜症抑制効果、併発白内障抑制効果を分析し、aminoguanidine及びranirestatにおいてより強力な治療効果を確認できた。（方法：ラット体重・血糖値・糖化ヘモグロビン値、免疫組織検査、蛍光造影眼底検査、細隙灯検査）

等々の結果が得られた。

本研究は、SDTラットが増殖糖尿病網膜症を発症するより早期の眼病態、すなわち網膜膨潤、脈絡膜膨潤などの変化を細かく解析評価し、モデル動物としての有用性を向上させた点に、新規性・独創性が見出せる。本モデルを駆使しての各種薬剤の病態抑制効果を提示した点にも、学問的意義が見出せる。ただし実験動物数の制約から、SDTラットの糖尿病発症前の網膜厚が直接測定されていない等の研究プランニングの問題も有ったが、前後の推論過程は信頼でき、結論の誘導も信用できるものであった。

論文審査の結果、いくつかの論文体裁に関するアドバイスがなされ、主要論文には記載の無い、さらに発展した言及や今後の課題も盛り込まれることとなった。提出された学位論文は、失明原因の最重要疾病の一つである糖尿病網膜症に焦点を当てた充実した内容となっており、学位論文に値すると全員一致で判断した。

試問の結果の要旨

申請者は、学位論文の内容を詳細に発表した。具体的には、

1. SDTラットとSDラットの比較により、網膜厚・脈絡膜厚の膨潤が確認できた。
2. 同様の比較で、VEGFの発現上昇およびadvanced glycation end products (AGEs)の一つCMLの網膜内沈着が確認できた。
3. AGE合成阻害剤 aminoguanidine、pyridoxamine、高脂血症治療薬 probucol、アルドース還元酵素阻害剤 ranirestat、epalrestat の網膜症抑制効果、併発白内障抑制効果を分析し、aminoguanidine及びranirestatの網膜症や白内障の抑制効果を確認できた。

とした。その後各委員から以下のような質問があり、申請者がそれぞれに応答をした。

1. VEGFの産生細胞、血管新生に対する影響は？
→主たる産生細胞は血管内皮、その他様々な網膜細胞で産生されており、血管透過性の亢進に加えて病的血管新生にも寄与している。
2. SDT ラットの高血糖の原因は？網膜病態の特徴は？

→膵ラ氏島が小さくなりインスリン分泌低下が認められている。網膜肥厚がその特徴であり、他のモデル動物と違っている。

3. ranirestatのSDTラットへの投与量はヒト換算では？

→ラットでは 1mg/day、ヒトは100倍の体重で100mg/dayとなる。ちなみに、ラットでの結果を以って直接ヒト糖尿病性神経症へ40, 80mg/dayで治療応用が検討されている。

4. 糖尿病発症前の時点の網膜厚は？

→実験動物数の制約から省略したが、考察にある弁明にその正当性を追記する。

5. ranirestat (他 epalrestatも)に治療効果は？併発白内障への影響は？ AGEs蓄積、VEGF発現への影響は？

→発症予防効果を認めたものの治療効果までは期待できない。白内障予防効果については同じ研究室からの成果が論文となっている（文献65）。AGEs蓄積, VEGF発現への効果は、一部解析したが解析していない項目もある。

6. 糖尿病増殖網膜症の発症前に、ヒトでおりおり見受けられる虹彩炎は存在したか？

→観察項目ではなかったが、ヒト糖尿病病態に近いという確証の一つとなり得る。今後の課題として、考察に加筆する。

今回の試問過程から、申請者が研究者として十分な資質と能力を有することは明らかで、医学博士号を受けるに値すると審査員全員が判断し、試問に合格とした。学位論文は審査委員のアドバイスに従って図表のナンバリング、文献の追加などを含めた構成・内容の修正を指示し、再提出後に審査委員全員が確認した上で合格とした。