

氏名	田中 克明
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	乙第 792 号
学位授与年月日	令和 2 年 8 月 13 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	糖尿病網膜症モデル動物の開発とその定量評価方法検討
論文審査委員	(委員長) 教授 川島 秀俊 (委員) 准教授 井上 裕治 准教授 海老原 健

論文内容の要旨

1 研究目的

糖尿病網膜症の発症・進展メカニズムの解明のためには、ヒト糖尿病網膜症に類似した網膜症を発症する糖尿病モデル動物の開発が必要不可欠である。我々のグループから、自然発症 2 型糖尿病モデル動物、Spontaneously Diabetic Torii (SDT) ラットが重症糖尿病眼合併症を持つことをこれまでに報告している。この SDT ラットに肥満遺伝子を導入した SDT fatty ラットは、新しい肥満 2 型糖尿病モデル動物である。多くの代謝異常を同時に有する糖尿病臨床症例を再現するモデル動物として最適であると推測される。そこで本研究では、まず実験 1 で SDT fatty ラットに発症する糖尿病網膜症を免疫組織学的に定量解析することにより、SDT fatty ラットが SDT ラットよりも有用な糖尿病網膜症モデル動物であることを示す。さらに SDT fatty ラットに食塩負荷を行うことによって、著しい高血圧と腎障害を生じることが報告されているが、最近になって SDT fatty ラットに片腎摘出と食塩負荷を行ったモデル動物が作成された。食塩負荷に片腎摘出が追加されることにより、より早期にかつ著しい腎障害を生じることが期待される。腎障害が糖尿病網膜症にもたらす影響について検討するために、実験 2 ではこの片腎摘出と食塩負荷を行った SDT fatty ラットの糖尿病網膜症について、実験 1 と同様の解析法を用いて評価する。

2 研究方法

実験 1: SDT fatty ラット糖尿病網膜症の病理学的特徴とその定量評価

SDT fatty ラット:n=30、SDT ラット (対照動物) :n=30、Sprague Dawley (SD) ラット (正常対照動物) :n=25 をそれぞれ 8, 16, 24, 32, 40 週齢において体重測定・採血した上で眼球摘出を行った。作製した光顕標本を用いて、網膜厚、網膜鄒壁の数、脈絡膜厚を測定。また Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)、Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) の免疫染色を行い、それぞれ網膜の免疫染色陽性領域を面積率で定量解析した。

実験 2: 片腎摘出・0.3%食塩負荷 SDT fatty ラットの糖尿病網膜症

SDT fatty ラットの雄に対して 9 週齢で片腎摘出を行った。1 週間の術後回復期を経て 10 週齢から 23 週齢まで 0.3%食塩水投与を行った (Nx+0.3% salt SDT fatty 群)。その他、腎摘出なし/

通常水投与の SDT fatty ラット (SDT fatty 群、対照動物) と、SD ラット (SD 群、正常対照動物) を飼育した (各群 n=6)。SDT fatty 群・SD 群とも sham 手術は行っていない。すべてのラットを体重測定・採血した上で 23 週齢において眼球摘出を行い、眼球標本を作製した。HE 染色で網膜厚、網膜皺壁の数、脈絡膜厚を測定。次に網膜の GFAP、VEGF 免疫染色陽性領域を面積率で定量解析した。

3 研究成果

実験 1

- ・体重・血液データから、SDT fatty ラットは肥満、脂質化、およびインスリン抵抗性を呈し、SDT ラットよりも早期の高血糖発症が認められた。
- ・網膜厚は、SDT fatty ラットと SDT ラットは SD ラットよりも網膜が肥厚する傾向があった。SDT fatty ラットと SDT ラットの間には網膜厚の有意差は認められなかった。
- ・脈絡膜厚は、SDT fatty ラットは SD ラットよりも脈絡膜が肥厚する傾向があった。SDT fatty ラットと SDT ラットの間には概ね脈絡膜厚の有意差は認められなかった。
- ・網膜皺壁は、視神経乳頭から $1,500\ \mu\text{m}$ までの範囲で測定した。SD ラットでは認められなかったが、SDT ラットでは 32 週齢 1.2 ± 0.3 個をピーク。SDT fatty ラットでは、24 週齢 2.8 ± 0.5 個をピークに網膜皺壁が認められた。SDT ラットよりも SDT fatty ラットの方が早期に、かつ多くの網膜皺壁を認めた (24 週齢 SDT fatty vs. 32 週齢 SDT, $p < 0.05$)。
- ・免疫染色陽性領域は、視神経乳頭から $1,500\ \mu\text{m}$ までの範囲で測定し面積率で評価した。SDT ラットに比べて SDT fatty ラットは GFAP 及び VEGF 免疫染色陽性領域が広いことが示された (GFAP 40 週齢にて SDT fatty vs. SDT, $p < 0.01$ 、VEGF 40 週齢にて SDT fatty vs. SDT, $p < 0.05$)。

実験 2

- ・体重については、各群の間に有意差は認められなかった。
- ・血液データにおいて、Nx+0.3% salt SDT fatty 群は SDT fatty 群よりも腎障害の進行が認められたが、一方で血糖値は改善した。
- ・網膜厚、脈絡膜厚、網膜皺壁の数、免疫染色陽性面積率 (GFAP、VEGF) の評価項目はいずれも、Nx+0.3% salt SDT fatty 群と SDT fatty 群の間に有意差は認められなかった。
(網膜厚: Nx+0.3% salt SDT fatty vs. SDT fatty, $p=0.99$ 、脈絡膜厚: Nx+0.3% salt SDT fatty vs. SDT fatty, $p=0.95$ 、網膜皺壁の数: Nx+0.3% salt SDT fatty vs. SDT fatty, $p=0.78$ 、GFAP: Nx+0.3% salt SDT fatty vs. SDT fatty, $p=0.84$ 、VEGF: Nx+0.3% salt SDT fatty vs. SDT fatty, $p=0.32$)。

4 考察

実験 1 において、SDT ラットよりも SDT fatty ラットの方が早期に、かつ多くの網膜皺壁を認めた。網膜皺壁の数は糖尿病網膜症進展具合を定量評価する新たな指標になる可能性がある。ただし、網膜皺壁が何を表しているのかについては、さらなる解析が必要である。免疫組織化学の定量分析から、網膜の GFAP および VEGF 免疫陽性領域は SDT ラットよりも SDT fatty ラット

で有意に広いことが示された。SDT fatty ラットは、SDT のラットよりも早く、より重症の糖尿病網膜症を発症することが示唆された。ハイブリッドセルカウンターを用いた免疫染色陽性面積率による解析法は、糖尿病網膜症の評価に有用と考えられる。

実験2において、片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラットの腎機能障害進行を認めた。しかし、血糖値は SDT fatty ラットよりも改善していた。腎機能障害が進行したことで、インスリンクリアランス低下に伴う高インスリン血症が生じ、血糖値改善につながった可能性などが考えられる。糖尿病網膜症について実験1と同じ指標を用いて評価したが、SDT fatty ラットと比べ有意な差は認められなかった。血糖値が改善したことにより網膜症が進行しなかった可能性が考えられる。片腎摘出・食塩負荷後も SDT fatty ラットと同等の高血糖が維持されるような調整を行い、さらに高血圧の評価を行えば、高血圧と腎障害が糖尿病網膜症増悪に関与するメカニズムを解明するために有用な動物モデルとなる可能性がある。

5 結論

SDT fatty ラットはSDT ラットよりも早期により進行した糖尿病網膜症を発症すると考えられ、糖尿病網膜症研究での有用性が期待される。また網膜外層の皺壁、および免疫染色陽性面積率は糖尿病ラットにおいて糖尿病網膜症の進行を定量評価する新たな指標になると考えられた。

一方、腎障害が糖尿病網膜症にもたらす影響について検討するために、片腎摘出+0.3%食塩水 SDT fatty ラットを作成し評価したが、SDT fatty ラットと比べて有意な糖尿病網膜症の進行所見は認められなかった。今後は、さらに高週齢あるいは適切な食塩負荷により、高血圧を伴う SDT fatty ラットを作成し、よりヒトに近い糖尿病網膜症発現モデルの確立を期待したい。

論文審査の結果の要旨

本邦では、糖尿病網膜症（DR）は失明原因第3位である。DRの発症/進展メカニズムを解明することは、失明を未然に防いだり治療するための喫緊の課題である。当該論文はDRの発症・進展メカニズムを解明するため開発された自然発症2型糖尿病（DM）モデル Spontaneously Diabetic Torii (SDT) ラットに肥満遺伝子を導入した SDT fatty ラットを用い、発症する病態を様々な角度から分析し、モデル動物としての有用性を実証した。

実験1：SDT fatty ラットのDRの病理学的特徴の評価。方法1：SDT fatty ラット、SDT ラット、Sprague Dawley (SD) ラット（対象）を各週齢で比較検討（体重、採血ほか、網膜厚、網膜皺壁、脈絡膜厚、免疫染色陽性面積率～Grial Fibrillary Acidic Protein, Vascular Endothelial Growth Factor 染色しハイブリッドセルカウンターで面積率を計測）。結果1：SDT fatty ラットの方がSDT ラットより早期の高血糖発症を認め、網膜病態の解析の結果、網膜皺壁の増加、網膜免疫染色の陽性領域の増加により、SDT ラットより重度の病態をきたしていることが判明した。

実験2：SDT fatty ラットへの片腎摘出+食塩負荷 (Nx+0.3% Salt)。方法2：Nx+0.3% Salt SDT fatty ラット、SDT fatty ラット、SD ラット (対象) を23週齢で実験1と同様に比較解析。結果2：Nx+0.3% Salt SDT fatty ラットでは腎障害の進行はあるものの血糖値は改善し、網膜病態の程度にはSDT fatty ラットと差を認めなかった。

本研究では、SDT fatty ラットがSDT ラットより早く重度のDRをきたすことでモデル動物としての優位性を実証した。網膜病態の評価に免疫染色陽性面積率を導入し、新たな指標としての可能性を提示した。Nx+0.3% Salt SDT fatty ラットではDR重症化は確認できなかったものの、DRへの高血圧/腎障害の関与を分析する意義を討論した。

新規開発モデル動物の優位性を詳細に検討し、病態の定量的な評価法を導入した点に新規性を認める。ただし実験動物数が限られており、実験2におけるネガティブデータ解釈に稚拙さも残るが、他の考案展開の論理および帰着結論は正確である。ほか、論文体裁に関する有用なアドバイスもなされ、今後の課題を明記するよう指導があった。当該学位論文は、現在でも失明原因の最重要疾病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、全員一致で学位論文に値すると判断した。

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. 自然発症2型糖尿病 (DM) モデル Spontaneously Diabetic Torii (SDT) ラットに肥満遺伝子を導入した SDT fatty ラットを用いて、SDT ラットと比較研究した。
2. SDT fatty ラットにおいて、より早期により重度のDRが発症していた。
3. SDT fatty ラットへの片腎摘出+食塩負荷では、インスリンクリアランス低下のためか、高血糖が改善し、DRの重症化効果は認められなかった。

とした。その後、各委員からそれぞれ質問及びコメントがあり、申請者はそれぞれに的確に科学的に回答を披露した。そのうちのいくつかは、以下のような質疑応答であった。

1. シャムオペ、あるいはランゲルハンス島破壊による手術について質問があり、シャムオペは未実施である事、そして膵破壊では重篤なDRは発症しない、とした。
2. 網膜皺壁、網膜厚、あるいは免疫染色陽性の有無についての病態意義を問われ、不確定ながら炎症細胞との関係性、そして眼内サイトカインあるいはmRNAなどによるさらなる解析の必要性を述べ、考察に追加するとした。

3. SDT fattyラットにおける詳細な病態変化（血管透過性亢進、毛細血管瘤、毛細血管閉塞）が判明すれば、よりモデルとしての優位性が証明されるとのコメントに対し、トリプシン消化標本や蛍光眼底造影検査の評価を今後の実験課題として考慮してゆく旨、表明した。

今回の試問を通じて、申請者が研究者としての十分な資質、潜在性、そして向上心を有することが明らかとなり、医学博士号を授与するに値する研究者であると審査員全員が判断し、試問に合格とした。

学位論文は、今回提供された審査委員のアドバイスに従い、誤字・脱字を含め校正し、内容の修正が行われた。再提出後、審査委員全員が査読した上で最終的に合格とした。