



Diabetes has an additive effect on neural apoptosis in rat retina with chronically elevated intraocular pressure

Kanamori, Akiyasu

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2004-03-31

(Date of Publication)

2013-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2927

(Rights)

©2004 Informa Healthcare

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002927>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 83 】

氏 名・(本 籍) 金森 章泰 (京都府)
博士の専攻分野の名称 博士 (医学)
学 位 記 番 号 博い第1543号
学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当
学位授与の 日 付 平成16年3月31日

【 学位論文題目 】

Diabetes has an additive effect on neural apoptosis in rat
Retina with chronically elevated intraocular pressure
(慢性緑内障ラット網膜における
神経細胞アポトーシスへの糖尿病の影響)

審 査 委 員

主 査 教 授 根 本 昭
教 授 前 田 盛
教 授 石 井 昇

目的:

緑内障は網膜神経節細胞 (RGC) や視神経線維の障害により特徴的な視野欠損を生じる視神経症であり、中途失明原因の第二位に位置する重要な眼疾患である。直接的な原因は未だ不明であるが、網膜神経節細胞死はアポトーシスによって生じる。高眼圧 (Ocular hypertension: OH) が危険因子の最たるものであり、慢性的な高眼圧負荷により臨床的病態に近い慢性緑内障モデルを作製することが可能である。一方、糖尿病網膜症は中途失明の第一位の原因疾患であるが、血管病変が出現する以前に、網膜内層の神経細胞 (RGC) や内顆粒層の細胞にアポトーシスが生じることは、ラットの実験モデルだけでなく人眼でも確認されている。同時にアストロサイトやミュラー細胞などのグリアの変化も観察され、神経・血管・グリアのバランスが崩れることによって糖尿病網膜症が出現、悪化するという指摘もある。

緑内障でもグリアと神経細胞死との密接な関係が示唆されており、糖尿病と緑内障は両者共に神経・グリアが関連した神経網膜疾患であるといえよう。

本研究は、慢性緑内障モデルラット眼において、糖尿病の発症が高眼圧による神経細胞死を促進するかどうかを検討したものである。

方法

雄の Sprague-Dawley ラットを2群に分け、1群はストレプトゾトシンの腹腔内注射により糖尿病を発症させた。1週間後、全血用の簡易血糖測定器を用い、血糖が 250 mg/dl 以上のラットを以降の実験に用いた。糖尿病誘導1ヶ月後、両群のラットの片眼において、3本の上強膜静脈を焼灼することで、眼圧上昇を誘導した。ウレタン麻酔下で、電子圧平式眼圧計であるトノペン®を用いて眼圧を測定した。3日後、眼圧上昇を確認し、2週間後、1ヶ月後、2ヶ月後で、血糖・体重・眼圧測定の後、ラットを安楽死させた。各時点において、9匹は伸展標本作製用に網膜を取り出した。2匹は網膜凍結切片作製用に眼球を摘出し、 -80°C で保存した。ラットでは糖尿病発症後、明らかな血管性病変が確認できるには約半年から1年かかり、従って本実験期間ではいわゆる糖尿病網膜症が出現する前に網膜を摘出することになる。以上の処置により、66匹のラット (33匹:糖尿病, 33匹:非糖尿病) の両眼 (132眼) が4つの群に分けられた。OH+DM:糖尿病+高眼圧, OH:高眼圧のみ, DM:糖尿病のみ, CNT:コン

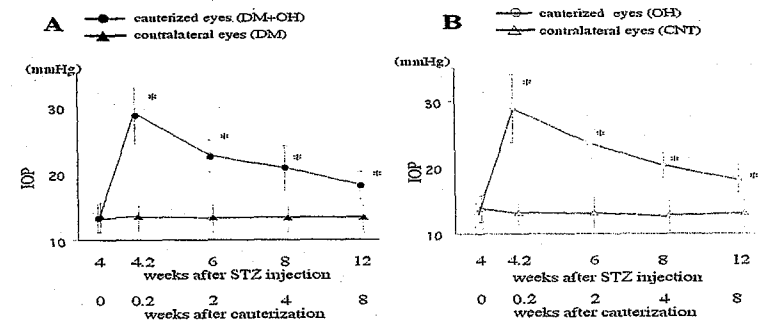
トロールと表記する。

TUNEL (Terminal dUTP nick end labeling) 染色を行い、網膜伸展標本にて網膜全体での TUNEL 陽性細胞をカウントし、単位面積あたりのアポトーシス細胞数を算出した。Two-way non-repeated ANOVA を用いて、各群を比較した。凍結切片ではヘーキストによる各染色を同時に行い、TUNEL 陽性細胞が網膜のどの層に出現しているかを確認した。

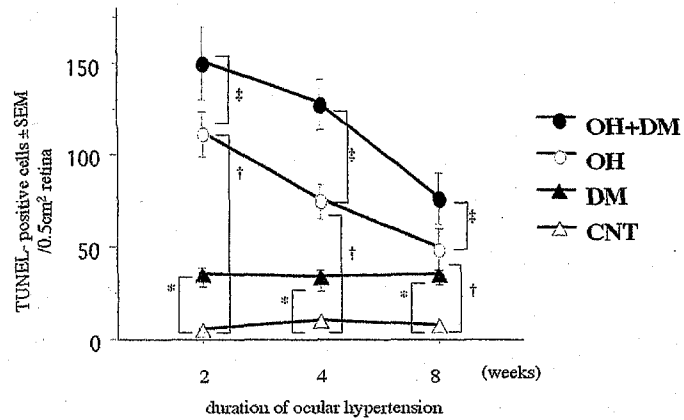
結果

ストレプトゾトシンを腹腔内注射1週間後のラットの血糖値は 398.6 ± 95.6 mg/dl (mean \pm SD) であり、非注射群 (112.4 ± 8.1 mg/dl) に対し有意に上昇していた。以後高眼圧誘導後2週間、1ヶ月、2ヶ月においても有意であった (Mann-Whitney 検定)。高眼圧誘導後2週間での糖尿病ラットの体重は 359.5 ± 35.8 g で非糖尿病ラットは 465.6 ± 65.8 g であり、以後も糖尿病ラットの方が有意に軽かった (Mann-Whitney 検定)。

眼圧は上強膜静脈焼灼3日後で、OH+DM が 28.7 ± 4.1 mmHg, OH が 29.0 ± 5.1 mmHg, DM が 13.4 ± 2.1 mmHg, CNT が 13.9 ± 2.0 mmHg であった。上強膜静脈焼灼眼では反対眼に比べ有意に眼圧上昇を認めた。OH+DM と OH, DM と CNT の間に有意差はなかった (Mann-Whitney 検定) ことは、焼灼眼同士、ならびに非焼灼眼同士の間には、血糖コントロールのいかんにかかわらず眼圧に有意差はなかったことを示している。その後、上強膜静脈焼灼眼では徐々に眼圧が下降したが、2ヶ月の時点で、反対眼に比べ有意な眼圧上昇を認めた。眼圧推移を下に示す。



網膜伸展標本での TUNEL 陽性細胞数の変化を下に示す (それぞれ n=9). DM, OH での TUNEL 陽性細胞は全期間にわたり, CNT に比べ有意に多く (two-way non-repeated ANOVA), 糖尿病と高眼圧は両者共に網膜内アポトーシスを引き起こしていることが確認できた. ただし, 糖尿病眼では経過中で一定の TUNEL 陽性細胞数を認めたのに対し, 高眼圧眼では時間経過による眼圧下降に伴って TUNEL 陽性細胞数は減少した. また, OH+DM では OH に比べ, 全期間で有意に TUNEL 陽性細胞数を多く認めた. これらの陽性細胞の増加分はおおよそ DM における陽性細胞数であった. 網膜凍結切片では, TUNEL 陽性細胞は, 網膜内層, 特に RGC で多く確認された.



考按

本研究により, 糖尿病と高眼圧を併発した眼では, 高眼圧のみの眼よりも網膜内でアポトーシス細胞が多く出現し, また, その増加数はおおよそ糖尿病のみ眼のアポトーシス細胞数であることが証明された. また, 糖尿病は眼圧動態に影響を示さず, これらの結果より, 糖尿病は慢性緑内障網膜のアポトーシスに眼圧を介さない直接的相加作用を有すると考えられた.

相加作用が発現するには, 3つの仮説が考えられる. 糖尿病・緑内障がそれぞれ異なる神経細胞死を誘発している可能性, あるいは両者ともに同様のアポトーシスカスケードを介し, 同じ神経細胞の死を早めるという可能性, また, 異なるアポトーシスカスケードを有するものの, 同じ神経細胞を標的としている可能性がある. 糖尿病眼の網膜神経細胞では BAX を介したアポトーシス促進系や Akt を介した抑制系が証明されているが, 緑内障ではその制御に関わる細胞内シグナルに関しては全く解明されていないといってよい. 従って, 本実験の結果からはさらなる推察は不可能であるが, 今後, 緑内障眼でのアポトーシスの細胞内シグナルを探求する予定である.

本研究はラットを用いた基礎実験であるが, 臨床的意義をおおいに有すと思われる. 臨床的には, 緑内障の危険因子として糖尿病が以前より指摘されているが, 数多くの大規模な疫学調査をもってしても未だその結論はだされていない. 本実験は, 網膜神経細胞死という観点から, 糖尿病は緑内障の危険因子であるとの傍証となった. 従って, 糖尿病患者では, 眼圧・視神経の状態に, より注意を払うべきであり, 緑内障を有する場合は, 糖尿病を持たない患者よりもさらに強力な眼圧下降治療を行う方が良いと思われた.

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第1544号	氏名	金森 章泰
論文題目	Diabetes has an additive effect on neural apoptosis in rat Retina with chronically elevated intraocular pressure. 慢性緑内障ラット網膜における神経細胞アポトーシスへの糖尿病の影響		
審査委員	主査 根木 昭 副査 新田 登 副査 石井 昇		
審査終了日	平成 15 年 12 月 26 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

<p>緑内障は網膜神経節細胞 (RGC) や視神経線維の障害により特徴的な視野欠損を生じる視神経症であり、中途失明原因の第二位に位置する重要な眼疾患である。直接的な原因は未だ不明であるが、網膜神経節細胞死はアポトーシスによって生じる。高眼圧が緑内障を発症する危険因子の最たるものである。一方、糖尿病網膜症は中途失明の第一位の原因疾患であるが、血管病変が出現する以前に、網膜内層の神経細胞 (RGC) や内顆粒層の細胞にアポトーシスが生じることは、ラットの実験モデルだけでなく人眼でも確認されている。</p> <p>本研究は、慢性緑内障モデルラット眼において、糖尿病の存在が高眼圧による神経細胞死を促進するかどうかを検討したものである。</p> <p>方法は、雄の Sprague-Dawley ラット用い、2群に分け、1群はストレプトゾトシンの腹腔内注射により糖尿病を発症させた。糖尿病誘導1ヶ月後、両群のラットの片眼において、3本の上強膜静脈を焼灼することで、眼圧上昇を誘導した。2週後、1ヶ月後、2ヶ月後で、血糖・体重・眼圧測定の後、ラットを安楽死させ、各時点において、9匹は伸展標本作製用に網膜を取り出し、2匹は網膜凍結切片作製用に眼球を摘出した。ラットでは糖尿病発症後、明らかな血管性病変が確認できるには約半年から1年かかり、従って本実験期間ではいわゆる糖尿病網膜症が出現する前に網膜を摘出することになる。以上の処置により、66匹のラット (33匹:糖尿病, 33匹:非糖尿病) の両眼 (132眼) が4つの群に分けられた。OH+DM:糖尿病+高眼圧, OH:高眼圧のみ, DM:糖尿病のみ, CNT:コントロールと表記する。</p> <p>TUNEL (Terminal dUTP nick end labeling) 染色を行い、網膜伸展標本にて網膜全体での TUNEL 陽性細胞をカウントし、単位面積あたりのアポトーシス細胞数を算出した。Two-way non-repeated ANOVA を用いて、各群を比較した。凍結切片ではヘーキストによる各染色を同時に行い、TUNEL 陽性細胞が出現している網膜の層を確認した。</p> <p>ストレプトゾトシンを腹腔内注射1週間後のラットは、非注射群に対し、血糖値は有意に高く、かつ体重が軽かった。上強膜静脈焼灼眼では、反対眼に比べ有意な眼圧上昇を認めた。OH+DM と OH, DM と CNT の間に有意差はなかったことより、焼灼眼同士、ならびに非焼灼眼同士の間には、血糖コントロールのいかんにかかわらず眼圧に有意差はないことがわかった。その後、上強膜静脈焼灼眼では徐々に眼圧が下降したが、2ヶ月の時点で、反対眼に比べ有意な眼圧上昇</p>
--

を認めた。

網膜伸展標本での TUNEL 陽性細胞数は、DM、OH での TUNEL 陽性細胞は全期間にわたり、CNT に比べ有意に多く、糖尿病と高眼圧は両者共に網膜内アポトーシスを引き起こしていることが確認できた。ただし、糖尿病眼では経過中で一定の TUNEL 陽性細胞数を認めたのに対し、高眼圧眼では時間経過による眼圧下降に伴って TUNEL 陽性細胞数は減少した。また、OH+DM では OH に比べ、全期間で有意に TUNEL 陽性細胞数を多く認めた。陽性細胞の増加分はおおよそ DM における陽性細胞数であった。

網膜凍結切片では、TUNEL 陽性細胞は、網膜内層、特に RGC で多く確認された。

本研究により、糖尿病と高眼圧を併発した眼では、高眼圧のみの眼よりも網膜内でアポトーシス細胞が多く出現し、また、その増加数はおおよそ糖尿病のみ眼のアポトーシス細胞数であることが証明された。また、糖尿病は眼圧動態に影響を示さず、これらの結果より、糖尿病は慢性緑内障網膜のアポトーシスに眼圧を介さない直接的相加作用を有すると考えられた。

本研究はラットを用いた基礎実験であるが、臨床的意義をおおいに有すと思われる。臨床的には、緑内障の危険因子として糖尿病が以前より指摘されているが、数多くの大規模な疫学調査をもってしても未だその結論はだされていない。本実験は、網膜神経細胞死という観点から、糖尿病は緑内障の危険因子であるとの傍証となった。従って、糖尿病患者では、眼圧・視神経の状態に、より注意を払うべきであり、緑内障を有する場合は、糖尿病を持たない患者よりも強力な眼圧下降治療を行う方が良いと思われた。

本研究は、緑内障の網膜神経細胞死について、糖尿病の関連性を研究したものであるが、従来このような実験系の報告はない。臨床的にも糖尿病患者の眼合併症について重要な知見を得たものとして、価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。