

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2006 ～ 2008
課題番号：	18591941
研究課題名（和文）	網膜・視神経乳頭循環の自動調節能における gap 結合の重要性と糖尿病による変化
研究課題名（英文）	Importance and diabetic changes of gap junction in autoregulation of retinal and optic nerve head circulation
研究代表者	
	杉山 哲也 (Sugiyama Tetsuya)
	大阪医科大学・医学部・講師
	研究者番号： 20298764

研究成果の概要：眼血流調節、特に眼圧が変動した際の調節において、gap 結合を介した網膜血管の細胞間連絡が重要な役割を果たしていること、さらに糖尿病では gap 結合に破綻を生じており、それが糖尿病における眼循環障害ひいては糖尿病網膜症の発症につながることで、またこれらの病態においてグリア細胞も深く関与していることなどを明らかにした。以上の知見は、糖尿病網膜症の病態解明や治療薬開発において重要なものであると考えている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,300,000	0	1,300,000
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	660,000	4,160,000

研究分野：緑内障、眼循環

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：gap 結合、視神経乳頭循環、自動調節能、レーザースペックル法、グリア細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) gap 結合は細胞間の 2-4nm の間隙であるが、単なる細胞間の接着組織ではなく、組織の発育、分化、増殖、さらに神経伝達など様々な機能を調節していることが知られている。gap 結合は 1000 Da 以下の分子の通過を許し、カルシウムイオン、cyclic AMP などの神経伝達物質や栄養物質は細胞質間で直接交通することが可能で、活動電位も瞬時に伝達可能である。細胞間の密接な機能連絡に gap 結合は必須であると考えられ、その機能異

常は種々の病態に関与している可能性が考えられる。

(2) 従来から骨格筋の血流維持に、gap 結合を介した情報が必須であるという報告が存在していた。脳など中枢神経系の血流制御における gap 結合の関与に関しては、まだ十分に理解されていないが、虚血時に増加する ATP の分解産物であるアデノシンは、強力に血管拡張をきたし、一方 ATP には血管収縮作用がある。ATP とその分解産物であるアデノシンの量的バランスは、組織の代謝状態を鋭敏に反

映するが、中枢神経系組織では、これらプリンヌクレオチドの細胞外濃度の変化により血流制御がなされている可能性が考えられてきた。実際に ATP は網膜血管を収縮させ、アデノシンは網膜や視神経乳頭の血流増加をもたらす。最近、脳では免疫組織化学的にプリン受容体がアストロサイトに存在し、また同部位に gap 結合の機能蛋白である Connexin 43 が発現しており、カルシウムイオンを介して血管組織と連絡していることが示され、グリア細胞がニューロンの代謝状態を感知して、血管運動を制御している可能性が示唆された。また今回の研究分担者（奥）は網膜血管の内皮細胞・周皮細胞が、gap 結合を介して密に連絡していることを組織化学的、電気生理学的に明らかにし、糖尿病では gap 結合を介した細胞間連絡が遮断されることを示している。一方、培養網膜血管周皮細胞を用いて、高濃度の糖が Connexin 43 の発現を減少させるという報告もみられる。

2. 研究の目的

筆者らは糖尿病における網膜・視神経乳頭循環の自動調節能障害の一因として、gap 結合を介したグリア細胞と血管組織、および血管内皮細胞・周皮細胞間連絡網の遮断が重要な作用をおよぼしていると考えている。

本研究の目的は、糖尿病眼における自動調節能の変化と gap 結合による細胞間連絡の障害との関連を示すため、糖尿病モデル動物における眼循環自動調節能の障害を明らかにし、ついで gap 結合あるいはグリア細胞の選択的阻害剤投与が自動調節能に及ぼす影響を検討することにより、gap 結合の重要性を明らかにすることである。また gap 結合構成蛋白 Connexin 43 の糖尿病における変化を、ラット網膜を用いて組織学的及び分子生物学的に明らかにすることも目的とする。

3. 研究の方法

視神経乳頭循環自動調節能については次の方法により検討した。すなわち、家兎眼の毛様体扁平部より BSS を灌流し、圧トランスデューサーを用いて灌流ボトルの高さで眼圧を 20, 50, 70 mmHg と変化させ、眼圧変動時の視神経乳頭組織血流量の変化をレーザースペックルフローグラフィにより測定した。

(1) 家兎にアロキサンを投与して糖尿病状態にし、8 週間後に眼圧変動に対する視神経乳頭循環自動調節能が維持されているか否か

を検証した。血流測定と同時に血圧も測定し、眼灌流圧を算出した。眼灌流圧を x 軸に、血流を y 軸にプロットすると、自動調節能が維持された状態であれば、血流は眼灌流圧にかかわらず一定であるから、x 軸に平行な血流分布が得られる。一方、自動調節能が障害されていると、血流は眼灌流圧に依存するので、x と y の間には正の相関が得られる。

(2) 正常家兎の硝子体内に gap 結合の選択的阻害薬である Octanol、Gap 27 などを注入して gap 結合を閉塞させた状態で、上述と同様の測定と検定を行い、gap 結合が視神経乳頭自動調節能に関与している可能性について検討を加えた。

(3) グリアを選択的に傷害するとされている L-2-aminoadipic acid (LAA) を家兎硝子体内に投与し (2~20mM, 0.5ml)、24 時間後に前述した方法で眼圧変動時の血流変化を測定し、グリア細胞の自動調節能におよぼす影響を検討した。また、網膜電図および組織学的評価により、グリアの選択的傷害を確認した。

(4) 網膜血管における gap 結合構成蛋白・Connexin 43 の発現変化を、正常ラットと自然発症糖尿病ラット (SDT ラット) を用いて免疫組織化学的に検討した。ラットを屠殺後、網膜を摘出してフラットマウントとし、Connexin 43 抗体、GFAP 抗体で免疫組織化学染色した上で、共焦点レーザー走査顕微鏡により Connexin 43、グリア細胞を 3 次元的に観察した。

(5) 網膜における Connexin 43 mRNA 発現量の変化を正常ラットと SDT ラットの網膜から抽出した蛋白を用い、real time RT-PCR (SYBR Green I 使用) により定量的に評価した。

4. 研究成果

(1) 白色家兎にアロキサンを投与して糖尿病モデルを作製した上で、実験した。対照として正常白色家兎を使用した。眼圧上昇時の視神経乳頭血流を測定した結果、正常では 50 mmHg への眼圧上昇では視神経乳頭血流が変わらなかったが、糖尿病モデルでは 50mmHg でも有意に低下した (図 1)。糖尿病モデルでは、眼灌流圧と視神経乳頭血流が有意に相関 (図 2) し、自動調節能の消失が示された。

(2) gap 結合の選択的阻害薬である Octanol (1, 3, 10 mM) を硝子体投与した上で眼圧上昇時の視神経乳頭血流を測定した結果、糖尿病モデルでみられたと同様に自動調節能が

減弱し、その作用は用量依存的に増強された (図3)。

(3) グリア選択的傷害薬である LAA (2mM-20mM, 0.5ml) を家兔硝子体内に投与した 24 時間後に網膜電図を記録した結果、b 波の振幅減少・潜時延長を認め (図4)、また視神経乳頭近傍のグリア細胞の障害を免疫組織化学染色 (GFAP 抗体) で検出した (図5)。その上で、LAA の用量依存的な視神経乳頭循環自動調節能の障害が示された (図6)。

(4) 網膜を免疫組織化学染色後に共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した結果、30 週齢以降の SDT ラット (糖尿病発症後、約 10 週以上経過) で正常ラットに比較して Connexin 43 の減少とグリアの変形が示された (図7)。

(5) Connexin 43 の mRNA 発現を real time RT-PCR で検討した結果、30 週齢の SDT ラットでは、その相対的発現量 (正常ラット (SD ラット) に対する) が 25 週齢と比べて有意に低下していた (図8)。

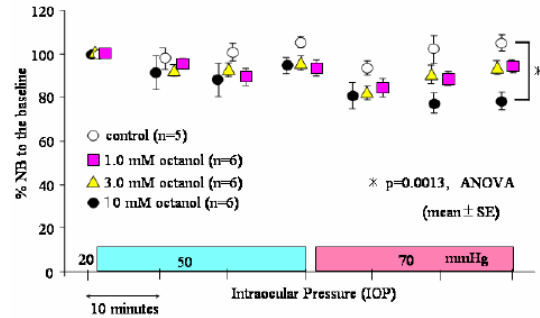


図3 Octanol の正常家兔・視神経乳頭血流変化 (眼圧上昇時) に及ぼす影響

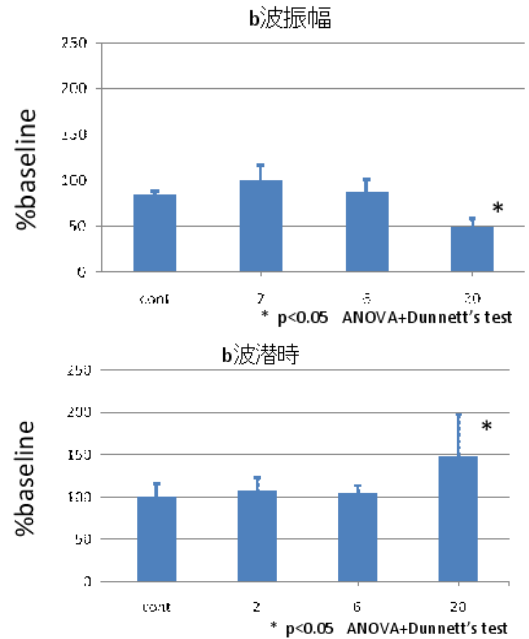


図4 LAA (横軸の数字は濃度 (mM)) 硝子体投与 24 時間後の家兔 ERG b 波の変化 (振幅と潜時) a 波は有意な変化なし。

<図とその説明>

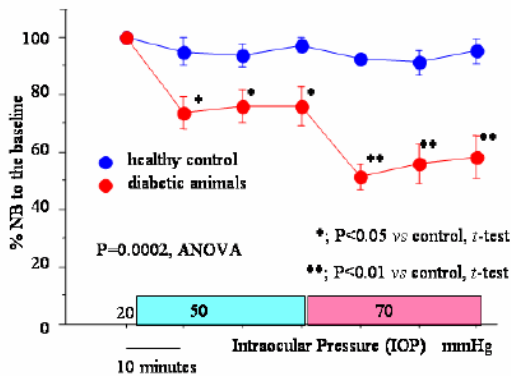


図1 正常家兔 (青) 及び糖尿病家兔 (赤) における眼圧上昇に対する視神経乳頭血流の変化

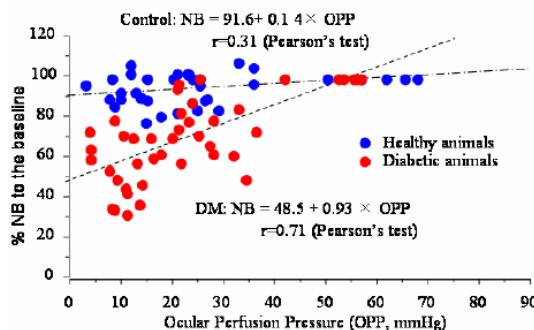


図2 正常家兔 (青) 及び糖尿病家兔 (赤) における眼灌流圧と視神経乳頭血流・相対値の関連性

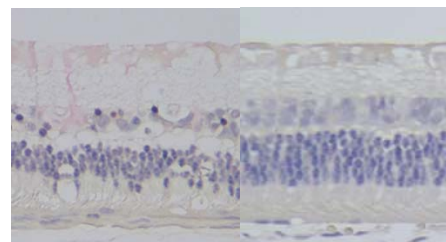


図5 LAA 20mM (左)、生理食塩液 (右) 硝子体投与 24 時間後の家兔網膜組織写真 (GFAP による免疫組織化学染色)

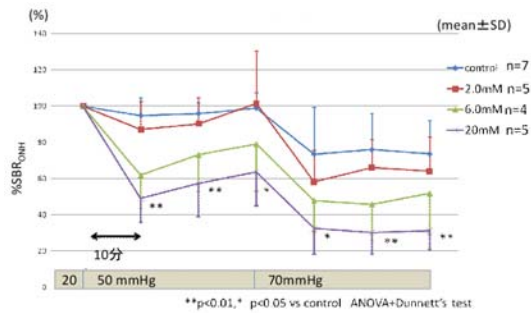


図6 LAA 硝子体投与 24 時間後の眼圧上昇に対する家兎視神経乳頭血流の変化

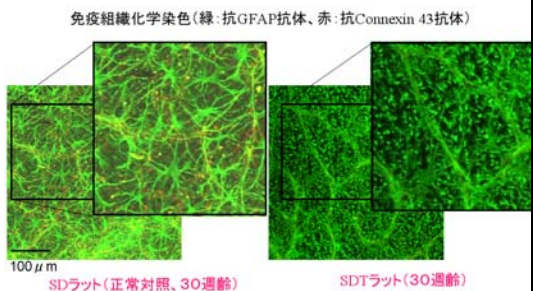


図7 正常ラット及び糖尿病モデル (SDTラット) 網膜におけるグリア細胞、Connexin 43 の免疫組織化学染色 (共焦点レーザー走査顕微鏡による 3 次元的観察)

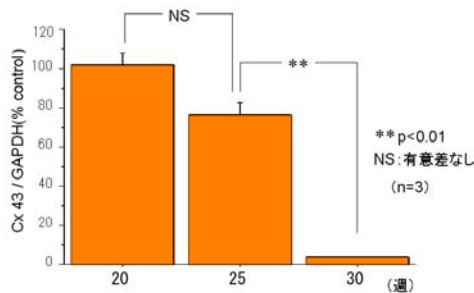


図8 SDT ラット網膜内 Connexin 43 mRNA 発現量の変化 (SD ラットに対する相対値)

以上の研究成果から、網膜血管は gap 結合を介して運動し、血流を調節していること、組織の代謝状態を反映して血管運動を制御するためグリア (おそらくアストロサイト) と網膜血管組織間の gap 結合を介した機能的連絡も必須であることが示された。さらに、糖尿病によって gap 結合が障害され、血流調節が破綻することも示された。これらのことは糖尿病網膜症発症において大きな役割を果たしており、治療を考える上で極めて重要な知見であると思われる。

さらに、ラットや家兎では糖尿病網膜症が発症しにくく、種々の治療効果を動物実験で判定するのに限界があるのが現状である。糖尿病によって網膜における Connexin 43 発現

が減少することが明らかになったため、その解析がアンジオテンシン変換酵素阻害薬、A II 阻害薬、Protein Kinase C 阻害薬等、糖尿病網膜症の治療薬として期待されているさまざまな薬剤の治療効果判定に利用できる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)
現在執筆中のもの 3 件

〔学会発表〕 (計 3 件)

(1) 杉山哲也、小寫祥太、福原雅之、柴田真帆、奥 英弘、池田恒彦. 糖尿病ラット網膜における gap 結合構成蛋白とグリア細胞の変化. 第 113 回日本眼科学会. 平成 21 年 4 月. 東京

(2) 柴田真帆、杉山哲也、小寫祥太、奥野高司、小林崇俊、平尾真実、奥 英弘、池田恒彦. 視神経乳頭循環自動調節能に対するグリア細胞の関与. 第 113 回日本眼科学会. 平成 21 年 4 月. 東京

(3) Kobayashi T, Oku H, Hirao M, Sugiyama T, Komori A, Ikeda T. Effects of disruption of gap junction communication on autoregulatory mechanism in the optic nerve head blood flow. ARVO meeting, 2007.5, Fort Lauderdale, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 哲也 (Sugiyama Tetsuya)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：20298764

(2) 研究分担者

奥 英弘 (Oku Hidehiro)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90177163

小寫 祥太 (Kojima Shota)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：10388259

池田 恒彦 (Ikeda Tsunehiko)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：70222891