

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592043

研究課題名(和文) 糖尿病網膜血管病変の発生と進展に及ぼす網膜神経組織変性の影響

研究課題名(英文) The effect of retinal neurodegeneration on the development and progression of diabetic retinal microangiopathy

研究代表者

中村 誠 (NAKAMURA MAKOTO)

神戸大学・医学研究科・講師

研究者番号：80273788

研究成果の概要(和文)：糖尿病網膜症における毛細血管症と神経変性との関係を実験的・臨床的に検討した。実験的糖尿病ラット網膜では神経細胞のアポトーシスが増加する週令ころに、グリア細胞のアクアポリン水チャネルの発現様式に変化がみられ、グリアから神経細胞への水輸送障害の可能性と増殖性変化との関連が推察された。糖尿病乳頭症患者の光干渉断層計解析により、視神経乳頭のグリア細胞が第三の網膜血液柵として機能している可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The association of neurodegeneration with microangiopathy in diabetic retinopathy was investigated. Experimental diabetic rat retinas showed accelerated apoptosis of retinal neurons that coincided with altered expression of glial aquaporin water channels. These findings implicated in the impaired water transport from glia to neurons and vasoproliferative changes induced by diabetes. Optical coherent tomographic analysis of patients with diabetic papillopathy indicated that glial tissues of the optic nerve head may act as the third blood-retinal barrier.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：糖尿病網膜症、網膜神経節細胞、アポトーシス、アクアポリン

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症は激しい血管病変の発症・伸展のある一方で、それ以前から網膜神経細胞のアポトーシスやグリア細胞の機能障害も生じていることが報告されるようになりつつあった。しかし糖尿病の網膜グリア細胞に及ぼす影響と神経細胞死や網膜血管病変との関連については不明であった。

2. 研究の目的

糖尿病による網膜グリア細胞機能変化が網膜神経細胞死と血液網膜柵に与える影響を実験的ならびに臨床的に明らかにすること

3. 研究の方法

(1) Streptozotocin 静脈注射による薬物誘導糖尿病ラットならびに糖尿病自然発症ラットを用いて、網膜神経細胞のアポトーシスとアクアポリン(AQP)水チャネルの発現様

式の経時的関連を実験的に解析した。アポトーシスは網膜伸展標本の terminal dUTP nick endlabeling (TUNEL) 染色と薄切切片の活性型 caspase-3 免疫染色で定量した。

(2) 網膜と視神経における AQP0, 1, 4, 9 の発現を免疫染色と real-time RT PCR で解析した。免疫染色においては、グリア細胞 (GFAP)、神経細胞 (NeuN)、神経線維 (neurofilament)、蛋白リン酸化酵素 C α (PKC α) 等との共染色により、発現細胞を同定した。三本の上強膜静脈焼灼による慢性高眼圧ラットにおける変化と比較検討した。眼圧は反跳式眼圧計で経時的に測定した。

(3) 糖尿病性乳頭症患者に対する光干渉断層計解析によって、黄斑浮腫に対する網膜グリア細胞の影響を臨床的に観察した。

4. 研究成果

(1) 糖尿病自然発症トリイ (SDT) ラットでは、糖尿病を発症する 40 週の時点で網膜神経の TUNEL 陽性細胞数ならびに活性型 caspase-3 陽性細胞の数が増加した。正常では網膜内層の血管周囲のアストロサイトは AQP4 を発現しているが、40 週の時点では AQP1 を発現していた。

また同じ時期に、正常では発現のみられない AQP0 が網膜神経線維で発現していた。

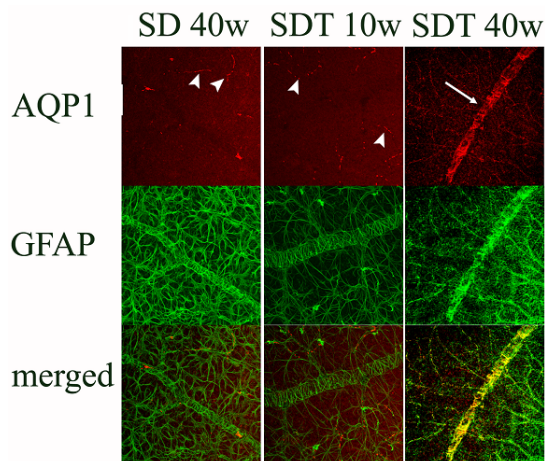


図 1. 糖尿病による AQP1 発現変化。SD, Sprague-Dawley ラット; SDT, 自然発症糖尿病トリイラット。SD ラットと糖尿病未発症の 10 週の SDT ラットでは赤血球 (矢頭) にしか AQP1 の発現は見られないが、糖尿病発症の 40 週の SDT ラットでは血管周囲のアストロサイト (GFAP 陽性細胞) が AQP1 を発現している。

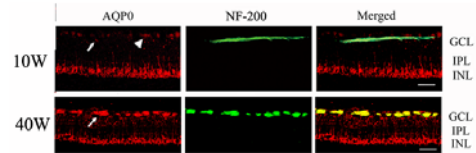


図 2. 糖尿病による AQP0 発現変化。糖尿病未発症の 10 週の SDT ラット (10W) では AQP0 は内顆粒層 (INL) に主に発現するが、神経節細胞層にはあまり発現が見られない。一方、糖尿病発症 40 週 (40W) では、neurofilament (NF-200) と AQP0 が共染色しており、神経線維での AQP0 の発現を示している。

AQP を介する細胞内外への水の移動は、細胞の生死に関わるだけでなく、神経細胞にあっては正常な活動電位の発生と伝達に必須である。活動電位の発生に伴う細胞内外へのイオンの移動は浸透圧勾配も大きく変化させるため、直ちに水分子が移動してこれを是正する必要があるからである。糖尿病では、アストロサイト・神経細胞ともに、この水の移動が妨げられ、正常な活動電位の発生・伝達が損なわれている可能性がある。さらに AQP1 はグリア細胞の遊走に、AQP0 は細胞接着に関与していることが知られているので、アストロサイトや神経線維における発現 AQP アイソフォームの変化は、糖尿病網膜症の増殖性変化にも関与している可能性がある。

(2). 慢性高眼圧ではこのような変化は見られなかった。代わりに慢性高眼圧では視神経における AQP9 の発現が減弱していた。AQP9 はエネルギー基質である乳酸をアストロサイトから神経細胞へ輸送していることが示唆されている。したがって、高眼圧では視神経における軸索へのエネルギー基質の輸送障害が生じている可能性があることを意味する。

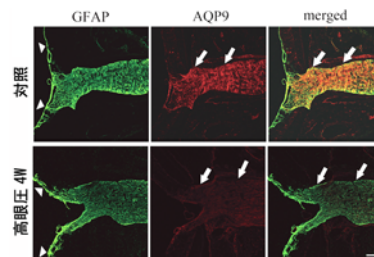


図 3. 慢性高眼圧ラットの視神経 AQP9 発現に及ぼす影響。対照では、視神経全長に渡り、AQP9 は発現しており、アストロサイトのマーカーである GFAP と共染色している。しかし眼圧上昇 4 週では GFAP の発現に変化はないものの、AQP9 の発現は著明に減弱している。矢頭は網膜硝子体境界面を、二本の矢印の間は球後の無髄視神経領域を表す。

(3) 一方、糖尿病乳頭症患者ではフルオセイン蛍光眼底造影では色素漏出が見られないにもかかわらず、光干渉断層計で顕著な黄斑浮腫を認め、視神経乳頭腫脹の消退に伴って、黄斑浮腫も消失した。

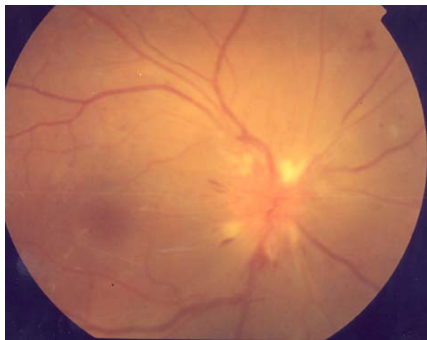


図 4. 糖尿病乳頭症の眼底写真。著明な視神経乳頭腫脹が見られる。

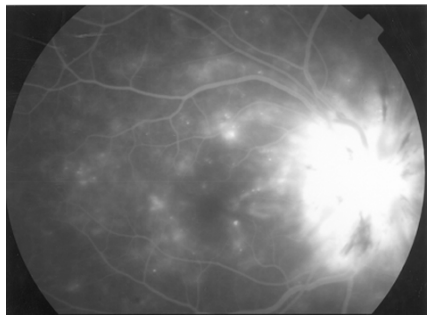


図 5. 糖尿病乳頭症の蛍光眼底造影写真。視神経乳頭からの色素漏出は顕著だが、黄斑部の網膜血管からの色素漏出は軽度で色素貯留も見られない。

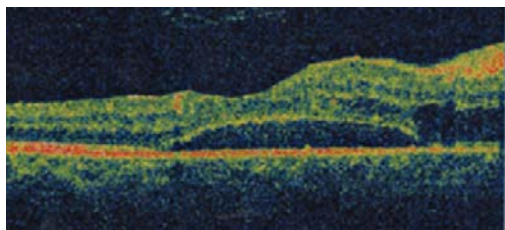


図 6. 糖尿病乳頭症の黄斑部光干渉断層計写真（水平断、右が視神経側）。著明な黄斑下液貯留を認める。

黄斑下液の源泉は、腫脹している視神経乳頭しか考えられない。Khunt の中間組織と呼ばれる視神経乳頭周囲のアストロサイトの機能低下がこの原因と考えられた。網膜毛細血管内皮と網膜色素上皮という、内外の血液網膜柵以外に、この組織が第三の網膜内血液脳関門を構成している可能性があり、糖尿病ではこの関門が破綻することで黄斑下液の貯留とそれに伴う視力低下を引き起こす可能性があることを提示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 9 件)

- ① Fukuda M, Naka M, Mizokami J, Negi A, Nakamura M. Diabetes induces expression of aquaporin-0 in the retinal nerve fibers of spontaneously diabetic Torii rats. *Exp Eye Res*, 査読有、92, 2011, 195-201.
- ② Naka M, Kanamori A, Negi A, Nakamura M. Reduced expression of aquaporin-9 in rat optic nerve head and retina following elevated intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 査読有、51, 2010, 4618-4626.
- ③ Fukuda M, Nakanishi Y, Negi A, Nakamura M (4 名省略、3～6 番目). Altered expression of aquaporins 1 and 4 coincides with neurodegenerative events in retinas of spontaneously diabetic Torii rats. *Exp Eye Res*, 査読有、90, 2010, 17-25.
- ④ Nakamura M, Kanamori A, Negi A (以下 3 名省略、3～5 番目). Serous macular detachment due to diabetic papillopathy detected using optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol*, 査読有、127, 2009, 105-107.
- ⑤ Kanamori A, Naka M, Fukuda M, Nakamura M, Negi A. Latanoprost protects rat retinal ganglion cells from apoptosis in vitro and in vivo. *Exp Eye Res*, 査読有、88, 2009, 535-541.
- ⑥ Tatsumi Y, Kanamori A, Negi A, Nakamura M (以下 3 名省略、3～5 番目). Nipradilol protects rat retinal ganglion cells from apoptosis induced by serum deprivation in vitro and by diabetes in vivo. *Curr Eye Res*, 査読有、33, 2008, 683-692.

〔学会発表〕(計 6 件)

- ① 溝上淳二他、ラット視神経及び網膜における、挫滅・慢性高眼圧・高血糖の各モデルでのアクアポリンチャンネルの局在、第 21 回日本緑内障学会、2010 年 9 月 25 日、福岡
- ② 中真衣子他、慢性高眼圧ラット視神経乳頭および網膜のアクアポリン 9 の局在、第 21 回日本緑内障学会、2010 年 9 月 25 日、福岡
- ③ Nakamura M. The role of aquaporin in glaucomatous optic neuropathy. 25th APAO Congress, 2010 年 9 月 18 日、北京
- ④ Nakamura M 他、Elevated intraocular

pressure reduces aquaporin-9 expression in rat optic nerve head and retina. World Ophthalmology Congress 2010, 2010年6月8日、ベルリン

- ⑤ Nakamura M 他、Optical coherence tomographic findings of macular lesions associated with diabetic papillopathy. World Ophthalmology Congress 2008, 2008年6月28日、香港
- ⑥ Nakamura M 他、Nipradilol protects rat retinal ganglion cells from apoptosis induced by serum deprivation in vitro and by diabetes in vivo. World Ophthalmology Congress 2008, 2008年6月27日、香港

[図書] (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/ophthal/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 誠 (NAKAMURA MAKOTO)
神戸大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：80273788

(2) 研究分担者

金森 章泰 (KANAMORI AKIYASU)
神戸大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：10444572

根木 昭 (NEGI AKIRA)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：00189359

(3) 連携研究者