

氏名	おざき ひろのり 尾崎 弘典
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	富生命博甲第96号
学位授与年月日	平成30年3月23日
専攻名	認知・情動脳科学専攻
学位授与の要件	富山大学学位規則第3条第3項該当
学位論文題目	Serine racemase deletion attenuates neurodegeneration and microvascular damage in diabetic retinopathy (セリンラセマーゼの欠失により糖尿病網膜症における神経変性と血管障害が軽減される)
論文審査委員	
(主査)	教授 服部 裕一
(副査)	教授 井村 穰二
(副査)	教授 戸邊 一之
(副査)	教授 嶋田 豊
指導教員	教授 森 寿

[目的]

糖尿病網膜症は網膜の微小血管障害が主な病態であり、網膜毛細血管の基底膜の肥厚、周皮細胞の脱落が初期に認められ、成人の失明の主な原因である。また、毛細血管の内皮細胞の脱落により基底膜が残存した acellular capillaries と呼ばれる退縮血管の出現が認められ、糖尿病網膜症における不可逆性の変化と考えられている。糖尿病のモデル動物を用いたこれまでの研究により、糖尿病網膜症の病態には網膜の神経変性が関与していることが示唆されている。糖尿病の患者を対象とした研究では、網膜内層の厚みの減少が初めて観察された時期には網膜の毛細血管障害が生じていないことから、糖尿病網膜症では神経変性が血管障害に先行して生じることが示唆されている。糖尿病網膜症における神経変性には N-メチル D-アスパラギン酸受容体(NMDAR)を介した神経興奮毒性が関与していると考えられている。D-セリンは NMDAR のコアゴニストであり、セリンラセマーゼ(SRR)によって L-セリンから合成される。SRR を遺伝学的に欠損した SRR-KO マウスを用いた過去の研究により、SR が NMDA 受容体の神経興奮毒性を調節していることが報告されている。また、糖尿病の網膜において SRR の発現が増強しているとの報告があるが、SRR が糖尿病における網膜の神経変性と血管障害の両者に関与するかは明らかでない。本研究では、野生型マウスと SRR-KO マウスにおいて糖尿病モデルを作製し、糖尿病における網膜神経細胞障害と網膜血管障害を両群で比較した。

[方法並びに成績]

・糖尿病モデル動物の作製と薬剤の投与

動物実験は学内委員会の承認(A2015-MED61)を受け実施した。11週齢の野生型(WT)およびSRR-KOマウスにストレプトゾトシンを腹腔内投与し、投与1週後の血糖値が300mg/dl以上のものを糖尿病マウスとした。未処置のマウスをコントロール群とした。

・網膜におけるSRRの発現の評価

ウェスタンブロッティングおよび免疫組織染色により野生型マウスの網膜におけるSRRの発現を確認した。SRRは網膜神経節細胞層に発現し、糖尿病マウスにおいて増強していた。

・網膜の神経変性・血管障害の組織学的評価

糖尿病発症6か月後にマウスを深麻酔し眼球を摘出後、網膜のフラットマウントおよび凍結切片作製により網膜神経細胞障害、網膜血管障害の解析を行った。網膜のフラットマウントにおいて、神経節細胞のマーカーであるBrn3の陽性細胞の数は糖尿病においてWTおよびSRR-KOマウスともに減少を認めたが、糖尿病発症群においてはWTよりSRR-KOマウスの方が有意にBrn3陽性細胞数が多かった。また、網膜凍結切片に対しHematoxylin Eosin(HE)染色を行い、網膜内層厚の評価を行った。糖尿病群ではWTおよびSRR-KOマウスともに網膜内層厚の減少を認めたが、WTと比較してSRR-KOでは網膜内層厚の減少の程度が小さかった。また、糖尿病発症6か月における網膜のフラットマウントにおいて退縮血管の数を計測したところ、WTと比較しSRR-KOマウスにおいて退縮血管数が少なかった。

[総括]

今回の研究において、WTおよびSRR-KOマウスにおいて糖尿病モデルを作製し、糖尿病における網膜神経変性および網膜血管障害がSRR-KOマウスにおいて軽減された。NMDA受容体介在性の興奮毒性の差が糖尿病におけるWTとSRR-KOマウスの神経変性の違いを生じていると考えられ、それはD-セリンの量の差から生じていると推測される。今回の研究で、網膜の神経節細胞層においてSRRの発現を認め、糖尿病において発現の上昇を認めた。網膜におけるSRRの発現は過去に報告されているが、今回の研究ではSRR-KOマウスを使用し網膜におけるSRRの発現検出の特異性を示した。今回の研究では初めてSRR-KOマウスにおいて糖尿病による網膜血管障害が軽減することを見出したが、その機構は明らかでない。網膜において神経節細胞が血小板由来増殖因子(PDGF)-Aを分泌し、PDGF受容体をもつアストロサイトに作用し、血管内皮細胞の生存を促進するとの過去の報告があり、網膜神経節細胞の障害が血管内皮細胞の障害を悪化させ、退縮血管の形成を促進している可能性が考えられた。

本研究より、糖尿病網膜症においてSRRの活性を抑制することが、網膜神経細胞障害および血管障害に対して保護的に働く可能性が示唆された。

【論文審査の結果の要旨】

糖尿病網膜症は糖尿病に特徴的な合併症であり進行すれば視力障害をきたし、その有病率は1型糖尿病では15～19年の罹病期間で81%に、2型糖尿病では同罹病期間で57%に認められると報告されている。現時点で糖尿病網膜症の発症・進展を確実に抑制する治療薬はなく、黄斑浮腫や増殖網膜症に対する眼局所の薬物治療として、ステロイド硝子体注射や後部テノン嚢下注射、血管内皮増殖因子VEGFの抗体の硝子体注射などが試みられているが、その治療効果や合併症などに関してはまだ不明な点も多く慎重な投与が求められている。

糖尿病のモデル動物を用いた研究では、糖尿病網膜症の病態には網膜の神経変性が関与していることが示唆されており、その神経変性にはN-メチルD-アスパラギン酸型グルタミン酸受容体(NMDAR)を介した興奮毒性が関与していると考えられている。D-セリンは、NMDARのグリシン結合部位に作用して受容体機能を促進する選択的アゴニストであり、内在性D-セリンは、セリンラセマーゼによってL-セリンから合成される。

そこで尾崎弘典君は、セリンラセマーゼノックアウトマウスを用いて、糖尿病を作成し、糖尿病性網膜症の病態機構におけるグルタミン酸/D-セリン系が果たす役割について明らかにしようとした。

【方法および結果】

11週齢の野生型(wild type)およびSRRノックアウトマウスに、膵臓ランゲンハルス島のβ細胞を特異的に破壊するストレプトゾトシン (60 mg/kg, 3 days)を腹腔内投与し、1型糖尿病を作成した。投与1週後の血糖値が300 mg/dL以上のものを糖尿病マウスとし、未処置のマウスを非糖尿病群とした。

野生型マウスの網膜において、セリンラセマーゼが存在していることは、ウェスタンブロットティングおよび免疫組織化学染色法により確認した。セリンラセマーゼは、網膜神経節細胞層に発現しており、糖尿病によりその発現は増大した。

ストレプトゾトシン投与後6ヶ月で、眼球を摘出、網膜のフラットマウントおよび凍結切片を作製して、網膜神経細胞障害ならびに網膜血管障害の解析を行った。網膜のフラットマウントにおいて、神経節細胞のマーカであるBrn3の陽性細胞の数は、野生型およびセリンラセマーゼノックアウトマウスともに、糖尿病病態において減少したが、その程度は、セリンラセマーゼノックアウトマウスにおいて、有意に軽減していた。網膜凍結切片でヘマトキシリン・エオジン染色を行い、網膜内層厚の評価をしたところ、糖尿病により、野生型およびセリンラセマーゼノックアウトマウスともに、減少を認めたが、網膜内層厚の減少の程度はセリンラセマーゼノックアウトマウスで有意に小さかった。さらに、糖尿病発症6ヶ月における網膜のフラットマウントにおいて退縮血管の数を計測したところ、野生型に比較し、セリンラセマーゼノックアウトマウスで退縮血管数が有意に少なかった。

【総括】

尾崎弘典君は、セリンラセマーゼノックアウトマウスを用いて、1型糖尿病モデルを作成し、糖尿病における網膜神経変性および網膜血管障害がセリンラセマーゼ欠損下で軽減されていることを示した。グルタミン酸/D-セリン系を介したNMDARの活性による興奮毒性が、糖尿病病態における網膜神経細胞障害および網膜血管障害の発症メカニズムに関与しているという直接的証拠を示したもので新規性に富んでおり、糖尿病における網膜の神経興

奮毒性の不活化が網膜血管障害を軽減させる分子機構についてはより多角的視点から解析すべき課題は残されているが、セリンラセマーゼの活性を抑制することが、糖尿病病態での網膜に保護的に働くことを示したことは、学術的意義も大きく、糖尿病網膜症の今後の新規治療法の開発にも繋がる可能性のある知見有していることから、その内容は高く評価できる。よって本審査員会は、審査の結果より本論文が博士（医学）の学位に十分値すると判定した。