

氏 名	大須賀 翔
(ふりがな)	(おおすか しょう)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第1150号
学位審査年月日	令和2年7月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Effects of an Aquaporin 4 Inhibitor, TGN-020, on Murine Diabetic Retina (糖尿病ラット網膜におけるアクアポリン4阻害剤 の影響)
論文審査委員	(主) 教授 今川 彰久 教授 朝日 通雄 教授 高井 真司

学位論文内容の要旨

《目的》

糖尿病性網膜症は、黄斑浮腫を生じ、視力を脅かす主要な疾患である。黄斑浮腫の成因として、血管透過性亢進の一因となる血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF) の増加、細胞内外で生じた活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) などの酸化ストレス、終末糖化産物の高度な蓄積、サイトカインの増加など様々な因子が影響していると考えられている。現在黄斑浮腫に対しては抗 VEGF 薬の硝子体注射による治療が主流となっているが、約 30% に治療抵抗性を示すなど奏効しない症例も散見される。

アクアポリン4 (aquaporin4: AQP4) は、浸透圧によって駆動される最も豊富な膜貫通水チャンネルで、網膜ではアストロサイトおよびミュラー細胞に発現し、水の恒常性に不可欠である。しかし、高血糖状態の反応性ミュラー細胞では、AQP4 発現の再分布があり、

この変化は VEGF、ROS、および AQP4 が網膜で密接に関連しており、それらの間の不均衡が糖尿病黄斑浮腫の発症を惹起している可能性があると考えられる。我々は以前、糖尿病モデルラットと培養ミュラー細胞を使用し、高血糖下では網膜内の VEGF 発現が亢進しており、ミュラー細胞の増大に AQP4 と VEGF が関与する可能性を報告した。AQP4 を標的とした研究は様々な分野において報告があり、虚血後の脳浮腫モデルの実験において、AQP4 阻害剤 (TGN-020) の投与により約 10%脳容積の減少を認めたとの報告があり、糖尿病黄斑浮腫に対しても新たな治療戦略となる可能性があると考えられる。

以上のような背景から、糖尿病における TGN-020 の網膜組織に与える影響および網膜浮腫抑制の可能性について検討した。

《方 法》

<in vivo>

9 週齢雄の Wistar ラット (SLC Inc. Shizuoka, Japan) の尾静脈よりストレプトゾシンを静脈内投与し糖尿病 (DM) ラットを作製し、2 か月後にラットを①control 群②DM 群③DM+TGN-020 投与群④DM+bevacizumab 投与群の 4 群に分けて各薬剤を硝子体注射した。投与 2 日後に網膜組織の免疫組織化学染色および Western Blot 解析にて検討した。また、網膜凍結切片の網膜厚を測定し、TGN-020 硝子体注射の網膜厚に与える影響を検討した。続いて糖尿病の網膜血管外漏出に対する TGN-020 の抑制効果を見るため、DM 群と DM+TGN-020 硝子体注射群に対してエバンスブルーを使用し、レーザー蛍光顕微鏡にて網膜血管外漏出を観察した。

<in vitro>

高グルコースへの暴露が培養網膜ミュラー細胞 (TR-MUL5, Fact, Inc. Sendai, Japan) の容積変化と ROS の細胞内産生に与える影響を検討するために、TR-MUL5 を高グルコース (HG: 25 mM) または生理的濃度の低グルコース (LG: 5.5 mM) 培地で 2~3 日間培養した。次に、①無添加 LG 群②無添加 HG 群③HG+bevacizumab 添加群④HG+TGN-020 添加群の 4 群に分けて細胞容積および細胞内の ROS レベルの変化を、蛍光プローブのハ

イドロエチヂンを用い488 nm 励起および590～610 nm 発光波長のフローサイトメトリー (EC800 Analyzer, Sony Biotechnology, Inc., Tokyo, Japan) を使用してFACS解析した。また、TR-MUL5におけるVEGFおよびAQP4の発現に対するTGN-020の効果を調べるために免疫細胞化学染色を行い検討した。

《結 果》

<in vivo>

免疫組織化学染色の結果は control 群に比べ DM 群で VEGF、AQP4 とともに蛍光強度の増強が認められ、この増強は TGN-020 投与群において、VEGF 阻害剤である bevacizumab 投与群と同様に抑制された。また、いずれもグリア細胞のマーカーである GFAP と共染色された。Western Blot 解析でも control 群に比べ DM 群で VEGF の発現レベルの増加を認めたが、この増加は TGN-020 投与群において、bevacizumab 投与群と同様に低下した。網膜厚に関する実験では、総網膜厚は、control 群と比較し、DM 群で有意に高値であった。網膜の各層別の変化では、内境界膜と内顆粒層の間と外網状層を除くすべての層で有意な増加を認めた。DM 群で観察された網膜厚の増加は、TGN-020 硝子体注射により抑制された。エバンスブルーの網膜血管外漏出に関する実験の結果は、DM 群と DM+TGN-020 硝子体注射群いずれの群も血管分岐部にて蛍光漏出を認めたが、漏出の程度は TGN-020 投与群において抑制された。

<in vitro>

LG 群と比較して HG 群において有意に細胞容積と細胞内 ROS レベルの増加を認めたが、bevacizumab および TGN-020 投与いずれにおいても細胞容積、ROS レベルともに有意に抑制された。また免疫細胞化学染色において VEGF および AQP4 に対する免疫染色は、LG 群のものと比較して、HG 群で増強された。HG 群での反応性の増加は、TGN-020 添加によって抑制された。

《考 察》

In vivo の実験において免疫組織化学染色の結果として網膜全層を縦方向に横断する GFAP 発現の増加を認め、また、網膜の厚さが増加したことから、糖尿病ラット網膜ではミュラー細胞が黄斑浮腫の発症に深く関連していると考えられた。黄斑浮腫の成因として血管外漏出の亢進による血管原性浮腫とミュラー細胞の膨化による細胞性浮腫が考えられているが、今回エバンスブルーの実験において TGN-020 硝子体注射により血管外漏出を抑制できたことや、さらに in vitro の実験において高血糖状態の培養ミュラー細胞の膨化を TGN-020 添加により抑制できたことより両方の機序で糖尿病黄斑浮腫を抑制できる可能性があると考えられた。また、高血糖状態にて ROS はミトコンドリア機能不全を起し、VEGF などのサイトカインやアポトーシスを介し血液網膜関門の破綻を起し血管原性浮腫の要因となることは報告されてきたが、今回 in vitro の実験において高グルコースにより膨化したミュラー細胞には過剰な ROS の産生が認められ、この ROS の増加は TGN-020 添加によって抑制された。これらの変化は ROS が AQP4 チャネルを介してミュラー細胞の膨張を媒介し細胞性浮腫にも関与している可能性を示唆するものであった。

《結 論》

TGN-020 の硝子体内投与は、糖尿病網膜症で生じる細胞性浮腫と血管原性浮腫の両方の側面から、糖尿病黄斑浮腫の抑制効果を有する可能性があると考えられた。

(様式 甲 6)

論文審査結果の要旨

本研究は、糖尿病における黄斑浮腫に対して AQP4 阻害剤 (TGN-020) の網膜浮腫抑制効果について検討している。

in vivo の実験においては、ラット糖尿病モデルを使用し、糖尿病における網膜組織の変化や TGN-020 の網膜組織に与える影響を明らかにするため免疫組織化学染色や Western Blot 解析で検討している。その結果、糖尿病では AQP4 は VEGF と同様に増加することを示し、また共染色された GFAP の網膜全層にわたる発現パターンから網膜浮腫の首座がミュラー細胞にあることを示している。また、エバンスブルーを使用し血管外漏出への影響も確認し、糖尿病では血管分岐部に漏出所見を認めること、TGN-020 投与にて漏出が抑制される結果を得ている。

また、in vitro の実験において、培養ミュラー細胞を使用し、高グルコースへの暴露が細胞容積に与える影響や ROS の細胞内産生を誘発することを明らかにするため、細胞容積および細胞内 ROS レベルを FACS 解析している。その結果、高グルコースにて培養した場合、有意に細胞容積と細胞内 ROS レベルの増加を認め、TGN-020 投与において抑制されることを示している。

以上の結果は、AQP4 阻害剤である TGN-020 が血管バリアの破綻による側面（血管原性浮腫）とグリア細胞の変性による側面（細胞性浮腫）の両面から糖尿病による網膜浮腫を治療しうる可能性を示している。また、ROS が AQP4 チャンネルを介して細胞性浮腫に関与している可能性を示唆する新たな知見も報告している。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

International Journal of Molecular Sciences 21(7): 2324, 2020 Apr

doi: 10.3390/ijms21072324 〈オンライン掲載〉