

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
勝村 ちひろ	主査 教授 池田 恒彦 副査 教授 花房 俊昭 副査 教授 林 秀行 副査 教授 宮崎 瑞夫 副査 教授 古谷 榮助
主論文題名 Effects of Advanced Glycation End Products on Hyaluronan Photolysis :A New Mechanism of Diabetic Vitreopathy (最終糖化産物のヒアルロン酸光分解に及ぼす影響:糖尿病硝子体症における新しいメカニズム)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究目的》</p> <p>加齢によって生じる硝子体の変化には、光化学反応によるコラーゲンの架橋形成とヒアルロン酸の脱重合が関与しており、その反応にはさまざまな光感受性物質の関与が指摘されている。一方、蛋白糖化反応の最終過程で生成される最終糖化産物 (advanced glycation end products: AGEs) は、加齢や糖尿病などにより組織に蓄積されることが知られており、糖尿病患者では血中および硝子体中において有意に増加することが報告されている。日常臨床において、糖尿病網膜症患者では正常人に比べ硝子体の液化が比較的若年齢で進行する傾向があることから、糖尿病網膜症患者の硝子体中には、硝子体の液化を促進させる何らかの因子が存在する可能性がある。過去にはAGEsには光増感作用があること、AGEs存在下の試験管内でヒアルロン酸の脱重合が促進することが報告されている。本研究では、糖尿病網膜症患者におけるAGEsの硝子体液化作用をみる目的で、照射によるヒアルロン酸の分子量変化過程において、AGEsが及ぼす影響を及ぼすか、高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography: HPLC) を用いて検討した。</p> <p>《材料と方法》</p> <p>被検物質として、分子量1×10^6のヒアルロン酸ナトリウム (参天製薬)、光増感物質としてはAGEs (蛋白濃度 86.987 mg/ml) を用いた。分子量マーカーとしてPullulan standards (昭和電工) を使用した。照射には、分光光度計 SHIMADZU UV-2200 A、照射装置 JASCO M-M3型、Xeランプ 浜松ホトニクス 300 Wを使用した。分子量測定には、HPLCシステム HITACHI L-6320 Pump, L-7420 UV Detector, AS-4010 Autosampler, SHIMADZU 557 Column oven, CHROMATOPAC C-R7A plus(E/RD/0104)を使用した。測定条件として、ColumnにはTSK G6000PW, 7.5mm I.D. \times 30 cm (TOSOH) を使用し、DetectorはUV 210 nmとした。</p> <p>予備実験として、ゲル濾過クロマトグラフィーによりプルラン (分子量既知) のretention time (RT) を測定し、検量線を求めた。</p> <p>本実験として、0.02%ヒアルロン酸水溶液を用い、AGEs添加群・非添加群各々に照射群・暗所対照群を設定し、計4群について検討した。光源にはXeランプ (300 W、白色光) を用いた。2-4時間の処理後、RTを測定し、分子量変化を推定した。各サンプル量は2 mlとし、AGEs添加</p>	

群には、20 μ lのAGEs溶液を添加後、処置を行った。処置は、光照射群・暗所対照群ともに37℃条件下で行った。各群毎にn=4とし、合計48サンプルについて検討した。

また、塩との混合によりヒアルロン酸の低分子量化が促進されることが知られているため、塩の影響をみる目的で追加実験を行った。本実験に使用したヒアルロン酸溶液は溶媒として、リン酸緩衝液（以下、PBS）を用いているため、その対照として、ヒアルロン酸水溶液を用いた。AGEs非添加でヒアルロン酸水溶液を4時間処置した後、光照射群・暗所対照群について、HPLCでRTを測定し、本実験の結果と比較検討した。本実験に準じ、試料濃度は0.02%、容量は2 mlとした。各群毎にn=6とし、合計12サンプルについて測定した。

《結果と考察》

予備実験では、RTと分子量の対数は負の相関（ $r=-0.995$ ）を示した。

本実験では、

- 1) AGEs添加群・非添加群ともに、光照射群は暗所群と比較し、時間依存的にRTの延長を認めた。
- 2) 光照射群のうち、AGEs添加群は非添加群と比較して、RTの有意な延長を認めた。
- 3) 暗所群ではAGEs添加群と非添加群の間に有意差は認めなかった。

追加実験では、光照射群・暗所対照群ではともに処置前と比較すると処置後にはRTの延長を認め、光照射群では暗所対照群よりもRTの延長を認めたが、両群間に有意差は認めなかった。また、AGEs非添加のヒアルロン酸溶液とヒアルロン酸水溶液において、処置前のRTには有意差は認めなかった。

今回の実験系では、ヒアルロン酸の低分子量化をRTの延長により推定した。光照射によりヒアルロン酸は低分子量化し、光照射時にAGEsを添加するとヒアルロン酸の低分子量化が促進されたことから、AGEsには光増感作用があり、ヒアルロン酸の光分解を促進すると考えられた。暗所対照群では、AGEsの有無による差を認めなかったことから、AGEs単独ではヒアルロン酸の分解を生じないと考えられた。AGEs非添加群では、PBSを溶媒とした場合には、光照射によりヒアルロン酸の低分子量化が生じたが、水溶液ではそれが生じなかったことより、PBSにも光増感作用があると考えられた。

本研究により、糖尿病網膜症患者の硝子体中で増加しているAGEsが、糖尿病患者の硝子体液化に関与している可能性が示唆された。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	勝村 ちひろ
論文審査担当者		主 査 教授 池 田 恒 彦 副 査 教授 花 房 俊 昭 副 査 教授 林 秀 行 副 査 教授 宮 崎 瑞 夫 副 査 教授 古 谷 榮 助	
主論文題名 Effects of Advanced Glycation End Products on Hyaluronan Photolysis :A New Mechanism of Diabetic Vitreopathy (最終糖化産物のヒアルロン酸光分解に及ぼす影響:糖尿病硝子体症における新しいメカニズム)			
論文審査結果の要旨			
<p>硝子体はゲル状の眼構造物であるが、加齢性変化として、光化学反応によるコラーゲンの架橋形成とヒアルロン酸の脱重合により液化が生じることが知られており、その反応にはさまざまな光感受性物質の関与が指摘されている。日常臨床において、糖尿病網膜症患者では正常人に比べ硝子体の液化が比較的低年齢で生じていることを経験することから、申請者は、糖尿病網膜症患者の硝子体中に、硝子体の液化を促進させる何らかの因子が存在すると仮定している。一方、蛋白糖化反応の最終過程で生成される最終糖化産物 (advanced glycation end products: AGEs) は、加齢や糖尿病などにより組織に蓄積されることが知られており、糖尿病患者の血中および硝子体中における AGEs の有意な増加が報告されている。AGEs には光増感作用があること、AGEs 存在下の試験管内でヒアルロン酸の脱重合が促進することが報告されている。今回申請者は、AGEs のヒアルロン酸光分解反応に及ぼす影響について、試験管内で検討している。</p> <p>光照射によるヒアルロン酸の分子量変化過程において AGEs がいかなる影響を及ぼすか、高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography: HPLC) を用いて検討し、その結果、AGEs 存在下では光照射によるヒアルロン酸の低分子量化が促進することを示している。</p> <p>糖尿病網膜症患者において、硝子体液化が進行し後部硝子体剥離が生じると、増殖性変化が生じにくいことや、硝子体手術時の操作が容易になることから、硝子体液化のメカニズムを解明することは臨床的に意義があると考えている。</p> <p>本研究により、糖尿病患者の硝子体の液化には、硝子体内で増加している AGEs が光増感物質として関与している可能性が示唆された。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第9条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。</p>			
主論文公表誌 Ophthalmic Research 36: 327-331, 2004			