

吉永 礼香 氏の学位論文審査の要旨

論文題目: 低血糖による糖尿病網膜症の発症・進展に対するミトコンドリア由来活性酸素種 (mtROS) と脂肪酸酸化の関与 - 糖尿病網膜症発症の新たなメカニズムの可能性 -

(Hypoglycemia induces mitochondrial reactive oxygen species production through increased fatty acid oxidation and promotes retinal vascular permeability in diabetic mice: novel mechanism of hypoglycemia-induced diabetic retinopathy)

申請者の所属する研究室では高血糖下におけるミトコンドリア由来活性酸素種 (mtROS) 過剰産生が糖尿病合併症の発症に重要であるという仮説を提唱している。また低血糖下においても mtROS が増加し、大血管内皮障害を引き起こすことも報告しているが、低血糖による mtROS 産生が糖尿病網膜症発症に及ぼす影響については不明である。血液網膜関門の破綻による血管透過性の亢進は糖尿病網膜症の初期病態に関与している。本研究では低血糖による mtROS の増加が血管透過性に及ぼす影響について検討を行った。

ヒト網膜毛細血管内皮細胞を 5.5 mM (Normal 群)、2.5 mM (Low 群) のグルコース濃度で培養後、還元型 Mitotracker Red を用いて mtROS 産生について検討した。またアデノウイルスによる MnSOD (mtROS 特異的除去酵素) 過剰発現の効果、脂肪酸酸化の阻害剤である etomoxir の効果について検討した。低グルコース培養が VEGF mRNA 発現および血管透過性に及ぼす影響についても検討を行った。リン酸化 VE-cadherin の発現については Western blot 法、細胞内局在については免疫染色法にて検討した。野生型マウス (WT) と血管内皮特異的 MnSOD 発現マウス (Tg) に対してストレプトゾチン投与により糖尿病 (DM) を惹起し、発症 2 週間後より低血糖刺激を実施した。低血糖刺激後、網膜における酸化ストレスを 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 抗体、血管透過性を Albumin 抗体、VEGF 発現について蛍光免疫染色法により評価した。

Low 群では Normal 群に比し mtROS 産生増加、VEGF の mRNA 発現増加、血管透過性の亢進、VE-cadherin のリン酸化および細胞質内移行を認めた。MnSOD 過剰発現や etomoxir 添加は上記の変化を有意に抑制した。WT-DM-低血糖群では WT-DM 群に比し網膜における 8-OHdG、Albumin、VEGF の染色増強を認めた。Tg-DM-低血糖群、WT-DM-低血糖+etomoxir 群では、これら染色増強の抑制を認めた。以上の結果から、低血糖時の網膜血管内皮細胞においては脂肪酸酸化亢進を介して mtROS の産生が増加すること、また低血糖誘導 mtROS が VEGF の発現を亢進させ、血管透過性亢進の一因となりうる事が判明した。

審査の過程においては、低グルコース状態の網膜と他の組織での病態の比較、非糖尿病マウスへの低血糖刺激の影響、血糖変動や浸透圧の影響、NADPH oxidase への影響、細胞死への影響、低血糖刺激のタイムコース、低血糖による血管新生の可能性、VEGF 発現と虚血との関与、マウス網膜における VEGF 発現の主座、VEGF のアイソフォーム、VEGF 発現のタイムコース、ROS から VEGF が発現上昇する機序などについて、様々な質疑がなされ、申請者からは概ね適切な応答と考察がなされた。

本研究は、ヒト網膜毛細血管内皮細胞および DM モデルマウス網膜において、低血糖状態により脂肪酸酸化亢進を介して増加した mtROS が、血管透過性亢進を誘導するという新たな概念を呈示したものである。低血糖による mtROS が糖尿病網膜症を抑制するための新たな治療標的になり得ることを初めて示した報告であり、学位の授与に値するものと評価した。

審査委員長 病態生化学担当教授

山島 和也