

論文の内容の要旨

氏名：花 栗 潤 哉

専攻分野の名称：博士（医学）

論文題名：Retinal blood flow dysregulation precedes neural retinal dysfunction in type 2 diabetic mice

（2 型糖尿病マウスでは網膜血流調節不全が網膜神経機能障害に先行する）

糖尿病網膜症は糖尿病細小血管症の一つであり、現在でも成人の失明原因の主因となっている。長期経過で病期が進行する糖尿病網膜症では早期からの血糖コントロールが重要となるが、眼科的な介入は網膜症が進行して虚血がある程度進行してからの網膜光凝固術や硝子体手術、黄斑浮腫に対する薬物の硝子体注射などの侵襲的治療のみである。また、進行した増殖糖尿病網膜症に対してこれらを施行しても、すでに廃絶した視機能を回復させることは現状困難である。私は糖尿病網膜症の予防および低侵襲的な早期治療介入により糖尿病患者が良好な視機能を保ち天寿を全うできることを理想とし、その実現の一步として糖尿病網膜症の早期診断および病態解明を目指した。

糖尿病網膜症は細小血管障害に基づくと考えられてきたが、最近では網膜症発症前から神経細胞で構成される網膜の菲薄化を認めることが報告されている^{1,2}。さらに 1 型および 2 型糖尿病患者において網膜症発症前から網膜血流障害を認めることも報告されている^{5,6,7}。網膜循環障害の早期発見、治療は糖尿病網膜症の発症予防に重要と考えられるが、糖尿病の進行過程における網膜循環と網膜神経機能の相互関係については不明のままである。網膜血流は、適切な網膜機能を維持するために本質的に調節されていることが知られている^{8,9}。網膜血流調節には神経細胞やグリアが密接に関与しており、この現象は神経血管連関（neurovascular coupling）として認知されている¹³。糖尿病ではこれらが障害されていると考えられているが、詳細は不明である。私は 2 型糖尿病で網膜血流調節不全が網膜神経機能障害に先行するという仮説を立て、網膜神経、網膜グリア、網膜血流の中で、特にこれまで評価困難であった網膜グリア機能をフリッカー刺激と高酸素負荷の 2 つの負荷試験を用いて非侵襲的に評価し、網膜電図（ERG）を用いた神経機能評価と併せて経時的に検討することとした。

1 実験系の樹立

疾患における検討を行う前に、まずは実験系の樹立を目指した。実験動物には、モデル作成が容易であり、さらに週齢を揃えることで罹病期間と病態の関連の解明に利点があるマウスを用いた。マウスは眼球サイズが非常に小さいため、これまで網膜血流測定の報告がなされていなかったが、私は血流測定機器として眼科において臨床で汎用されている Laser Speckle Flowgraphy (LSFG) を小動物用に改良した LSFG-micro を用いることで、マウス網膜血流の定量的測定を実現したことを報告した。この先行研究では、生後 8-20 週齢の正常マウス 8 頭で安静時網膜血流およびフリッカー刺激による網膜血流増加反応、高酸素負荷による網膜血流減少反応、さらに ERG による網膜神経機能が測定期間中に変化せず長期的に安定していたことが確認できた。LSFG-micro を用いてマウス網膜血流の長期的な評価を可能にしたこの報告は世界で初めてであり、疾患動物や治療効果判定などの次なる検討の基盤となるものとなった。

2 2 型糖尿病モデルマウスへの応用

本研究では、この独自の評価法を糖尿病モデルマウスに応用した。糖尿病群としてレプチン受容体遺伝子変異による過食で肥満を誘発させた 2 型糖尿病モデル db/db マウスを 6 頭用いた。対照群にはヘテロタイプ db/m を 6 頭用いた。8-20 週齢までの偶数週に、安静時網膜血流測定、フリッカー刺激および高酸素負荷下での網膜血流測定、ERG、さらに体重、随時血糖、血圧、眼圧、眼灌流圧を測定した。実験は 3 日に渡って行い、第 1 日目に行った高酸素負荷試験では、100%酸素を吸入させ 10 分間の吸入中および終了後 10 分間、1 分毎に網膜血流を連続測定した。第 2 日目に行ったフリッカー刺激負荷試験では、フリッカー白色光を 12Hz に設定し 3 分間の刺激中および終了後 3 分間、20 秒毎に網膜血流を連続測定した。そして第 3 日目に ERG を施行した。両負荷試験では安静時網膜血流からの変化率を毎時算出しグラフ化した。群間比較の統計解析には Two-way Repeated Measured ANOVA を用いた。

体重および随時血糖は実験期間中の全ての週齢において糖尿病群で有意に高値であった。血圧、眼圧、眼灌流圧には両群間で有意差はなかった。刺激負荷前の安静時網膜血流は両群いずれも実験期間を通じて安定しており、両群間での有意差は認めなかった。高酸素負荷試験では8週齢の対照群において網膜血流は有意に減少し、負荷終了後に徐々にベースラインまで戻った。この血流反応は20週齢まで持続した。一方で8週齢の糖尿病群では網膜血流減少が観察されたものの対照群の反応と比較して有意に減弱しており、さらに10週齢、12週齢、14週齢では血流減少はみられず、それ以降の週齢では逆に血流が増加する傾向にあった。フリッカー刺激負荷試験では8週齢の対照群において網膜血流は有意に増加し、刺激終了後に徐々にベースラインまで戻った。この血流反応は20週齢まで持続した。一方で8週齢、10週齢の糖尿病群では網膜血流増加が観察されたものの対照群の反応と比較して有意に減弱しており、12週齢では血流増加はみられず、それ以降では逆に血流が減少する傾向にあった。ERG波形解析では、a波およびb波の振幅と潜時は両群間で変化しなかった。律動様小波(OP)はOP3の潜時とOPの振幅の総和には両群間に有意差はみられなかったが、OP1の潜時に関しては14週齢、OP2の潜時に関しては14週齢以降の糖尿病群で対照群と比較して有意な延長を認めた。

本研究結果は、db/dbマウスの糖尿病進行過程において、ERGで捉えられる網膜神経障害発症に先行して、網膜血流負荷試験に対する網膜血流調節障害を認めたことを示唆する。

本研究ではdb/dbマウスで安静時網膜血流は観察期間中に変化しなかった。既報では、STZで糖尿病を誘発した1週間後のラットで安静時網膜血流減少の報告^{19,20}がある一方、Akita1型糖尿病マウスでは5-13週齢の間で変化がないという報告²¹や、10週齢では変化がなく30週齢で減少するという報告²²などもあり様々である。これらの違いが動物の種や週齢の違いによるものかどうかは不明であるが、本研究で採用したマウスの週齢(8-20週齢)は、ヒトではおよそ幼少期から若年成人の時期に相当すると考えられ、本研究結果はヒトで成人早期に相当すると考えられる20週齢のdb/dbマウスではまだ安静時網膜血流に影響を与えなかったことを示していると推測される。

本研究ではdb/dbマウスで高酸素負荷に対する網膜血流反応が8週齢の段階から既に障害されていた。高酸素負荷では、グリアからの強力な血管収縮剤ET-1の放出とET-1タイプA受容体(ETAR)の活性化を介して、網膜血流の減少を伴うことが知られている^{10,11,24,25,26,27}。糖尿病ラットでは網膜動脈においてET-1に対する血流反応の減弱が報告されている^{35,48}。また糖尿病患者において高酸素吸入に対する網膜血流反応が、網膜症の有無に関わらず減弱したことも報告されている^{24,51,52}。本研究結果における詳細なメカニズムは不明であるが、これらの基礎研究や臨床研究と一致した結果が得られたと言える。

フリッカー刺激による血流増加反応には神経細胞やグリアからの神経型一酸化合成(Nitric oxide:NO)酵素(nNOS)を介したNOやアラキドン酸代謝物の関与が知られているが^{53,54}、糖尿病網膜症における網膜血流調節不全の根底にある詳細なメカニズムは不明なままである。本研究では8週齢の時点のdb/dbマウスで既に高血糖を認め、同時にフリッカー誘発網膜血流反応も障害されており、糖尿病初期から網膜血流調節不全が始まっていたことが考えられる。このことは1型糖尿病誘発後わずか2週間で網膜の血流調節不全を認めた過去の報告からも裏付けられる^{56,57,29}。さらに既報では16週齢と24週齢のdb/dbマウスで神経網膜の形態変化が報告されており¹⁸、本研究で12週齢以降にフリッカー誘発網膜血流反応がさらに悪化したことから、糖尿病進行期で網膜血流調節がさらに障害された可能性が考えられる。

本研究ではERGにおいてdb/dbマウスで14週齢からOPの潜時が延長した。ERGは眼科の実臨床で古くから汎用されている機器である。被験者を十分に暗順応させた後に暗所で眼前に光を照射することで得られる波形は、網膜内の神経細胞の光受容体が光を感受することで生じる電気信号を捉えたものである。最初の陰性波であるa波は網膜外層の桿体・錐体視細胞の過分極を、次に現れる陽性波のb波は中間層の双極細胞などの脱分極を反映する。b波の立ち上がりに関与する律動波であるOPは、アマクリン細胞などを含む網膜内層の機能を反映していると認知されている。このようにERG成分は網膜内でその起源が異なるため、各ERG成分を評価することで網膜各層の機能を判定することが可能である。OPの波形に関与するアマクリン細胞は高血糖に感受性があり、糖尿病患者で潜時が延長することが知られている^{60,61}。本研究結果はこれらと合致する。また既報ではdb/dbマウスでb波の振幅低下と潜時延長を認めた報告がされているが¹⁸、本研究ではa波、b波の振幅と潜時に変化はみられなかった。本研究の検討では既報と比べサンプル数が少なかったため、統計差が検出されにくかった可能性がある。しかしながら、本研究の結果ではOPの潜時延長が14週齢から出現しており、網膜神経機能障害が網膜血流調節不全に遅れて出現したことが言える。

本研究にはいくつかの限界がある。ERGにおけるOPの潜時延長が網膜血流反応障害と直結して引き起

こされたか、或いは独立してやや遅れて生じたかについては現時点では明らかでない。また本研究では全ての測定にイソフルラン吸入麻酔を用いている。イソフルランは他の全身麻酔薬と同様に、中枢神経系や心血管系の活動を抑制するため、高濃度下では循環への幅広い影響が予想されるが、イソフルランが網膜血流調節に与える影響は不明である。しかしながらマウスの **ERG** 波形に関しては、イソフルラン麻酔下とケタミン麻酔下で差が生じなかったことは既に報告されている⁶²。また本研究では全ての測定結果が、同濃度の麻酔条件下で群間比較されており、全身血圧や眼局所パラメーターを変化させなかった。このことから本研究では、イソフルラン麻酔の影響はたとえあったとしても僅かではないかと予想している。過食により糖尿病を誘発する **db /db** マウスは、2 型糖尿病研究に汎用されている動物モデルの 1 つであるが、**db /db** マウスと進行した糖尿病患者との間には表現型や病態生理にいくつかの相違があるため、本研究結果を拡張してヒトへ応用することには注意が必要である⁶³。また、高血糖による糖毒性がもたらす影響においては不明であるが、その解明には血糖降下薬にて血糖を改善させた群との比較など、今後さらなる研究が必要と考えている。

本研究で私は、2 型糖尿病マウスの糖尿病初期段階において網膜血流調節不全が網膜神経機能障害に先行するということを発見した。糖尿病における網膜血流調節不全の早期発見は網膜症の発症予防に役立つ可能性がある。