

氏名（本籍）	安田 浩之（岐阜県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	甲 第161号
学位授与年月日	平成28年3月17日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当者
学位論文の題名	糖尿病網膜症の進展抑制に向けた抗酸化酵素の発現制御に関する研究
論文審査委員	主査 原 英彰 副査 保住 功 副査 北市 清幸

## 論文内容の要旨

糖尿病網膜症は不可逆的な病態の進行により失明に至る危険性をもち、患者の activities of daily living (ADL) を大きく損なう重篤な糖尿病合併症の一つである。現在、糖尿病網膜症の重症化は診断、治療技術の向上により減少傾向にあるものの、糖尿病患者数は増加しており、さらなる網膜症の病態解明・治療薬の開発が望まれている。糖尿病網膜症の発症原因の一つに活性酸素の異常産生、活性酸素の消去システムの破綻が誘因となる酸化ストレスが考えられている。活性酸素の消去酵素である extracellular-superoxide dismutase (EC-SOD) は血管壁に広く局在し、血管系疾患の発症・進展に対する防御システムとして重要な役割を担っている。本研究では糖尿病網膜症の病態と治療薬の新規薬効の解明を目指し、培養細胞での EC-SOD ならびにタイトジャンクション構成タンパク質の発現変動とその調節機構を明らかにした。

### 1. 培養ラット網膜血管内皮細胞層への小胞体ストレス負荷による EC-SOD 透過性亢進

増殖糖尿病網膜症患者の硝子体中において EC-SOD 濃度が高値を示す理由を明らかにするために、糖尿病網膜症の病態進展に関与するといわれている小胞体ストレスをラット網膜血管内皮細胞に負荷した場合の血管透過性の変化について検討した。その結果、小胞体ストレスは網膜血管内皮細胞層のタイトジャンクション構成タンパク質である claudin-5 の発現を低下させ、網膜血管内皮細胞層透過性を亢進させることが明らかになった。したがって、糖尿病網膜症において EC-SOD は網膜血管から硝子体に漏出し、それが血管系の酸化ストレスに対する恒常性維持機構の破綻につながると考えられた。

### 2. 小胞体ストレス負荷時の培養ヒト網膜血管内皮細胞層透過性亢進に関わるシグナル伝達経路

タイトジャンクション破綻のメカニズムを明らかにするために、ヒト網膜血管内皮細胞を用いて小胞体ストレス負荷時の細胞内シグナル経路を中心に検討した。その結果、

小胞体ストレス負荷により p38 MAPK と NF- $\kappa$ B シグナルが活性化されることでタイトジャンクション構成タンパク質 claudin-5 の発現が低下し、網膜血管内皮細胞層透過性が亢進することが明らかになった。さらに、デキサメタゾン<sup>®</sup>はグルココルチコイド受容体への結合を介した応答により claudin-5 の発現を亢進させ、透過性亢進を抑制することが判明した。

### 3. Exendin-4 によるエピジェネティクスを介した EC-SOD 発現制御

Glucagon like peptide-1 (GLP-1) 受容体の発現は膵臓以外でも様々な臓器・組織で確認されており、GLP-1 受容体アゴニストには多様な効果が期待されている。糖尿病治療薬 (GLP-1 受容体アゴニスト) である exendin-4 の EC-SOD 発現に与える影響についてエピジェネティクスの観点から明らかにするために、A549 細胞を用いて、特に EC-SOD 遺伝子の DNA メチル化を中心に検討した。その結果、本細胞では EC-SOD 遺伝子のプロモーター部位が高度にメチル化されているために本酵素の発現が非常に低いことが判明した。Exendin-4 は GLP-1 受容体への結合を介し、DNA methyltransferases 活性を阻害することで DNA 脱メチル化を促進し、EC-SOD の発現を亢進することが明らかになった。糖尿病網膜症において血管内腔から EC-SOD が漏出しやすくなることを考慮すると、この exendin-4 による EC-SOD 発現の誘導という結果は糖尿病網膜症の進展抑制を考える上で重要な知見と考えられた。

以上、本研究では EC-SOD をターゲット分子として、糖尿病網膜症の病態解明と糖尿病治療薬である exendin-4 の適用拡大に向け、有益な情報を提供することができた

## 論文審査の結果の要旨

本研究は糖尿病網膜症の病態と治療薬の新規薬効の解明を目的として、各種培養細胞を用いて extracellular-superoxide dismutase (EC-SOD) 並びにタイトジャンクション構成タンパク質の発現変動とその調節機構を明らかにした。培養ラット網膜血管内皮細胞層への小胞体ストレス負荷による EC-SOD 透過性亢進について検討を行い、小胞体ストレスは網膜血管内皮細胞層のタイトジャンクション構成タンパク質 claudin-5 の発現を低下させ、透過性を亢進させた。つぎに、タイトジャンクション破綻のメカニズムを明らかにするために、ヒト網膜血管内皮細胞を用いて小胞体ストレス負荷時の細胞内シグナル経路について検討した。小胞体ストレス負荷により p38 MAPK と NF- $\kappa$ B シグナルが活性化されることで claudin-5 の発現が低下し、網膜血管内皮細胞層透過性が亢進することを明らかにした。最後に糖尿病治療薬 exendin-4 によるエピジェネティクスを介した EC-SOD 発現制御について検討を行い、glucagon like peptide-1 (GLP-1) 受容体への結合を介し、DNA 脱メチル化を促進し、EC-SOD の発現を亢進することが明らかになった。以上、本研究では糖尿病網膜症の病態の一部に EC-SOD が関与していること、また exendin-4 の糖尿病網膜症に対する適用拡大の可能性を示唆したことから、博士 (薬学) 論文として価値あるものと認める。