

# 論文内容要旨

論文題目

網膜におけるジアシルグリセロールキナーゼの発現解析

～糖尿病における網膜の病態との関連～

責任講座：情報構造統御学視覚病態学分野

氏名： 佐藤さくら

## 【内容要旨】

ジアシルグリセロールキナーゼ (diacylglycerol kinase: DGK) は脂質性セカンドメッセンジャーであるジアシルグリセロール (diacylglycerol: DG) をリン酸化してフォスファチジン酸に変換する酵素である。これまでの研究により数種類のアイソザイムが単離され、中枢神経系における多彩な機能が推測されている。本研究では、糖尿病網膜における病態への関連を検討するために、まず、正常網膜および発達過程における DGK アイソザイムの発現局在を解析し、さらにストレプトゾトシンによる糖尿病モデルラットの網膜、および網膜由来のヒト網膜芽細胞腫株を用いて高グルコース、酸化ストレス負荷における DGK アイソザイムの発現解析をおこなった。

正常ラット網膜のノーザンブロット解析により DGK  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$ 、 $\zeta$ 、 $\iota$  の 5 つのアイソザイムの発現が認められた。in situ ハイブリダイゼーション法による組織学的解析において、これらのアイソザイムは、発達過程において網膜細胞の分化の進む生後 3-5 日において異なる網膜内局在を示した。DGK 酵素活性は、網膜細胞の分化が起こる生後 1-7 日に上昇し、それ以降、成獣になるにつれて減弱していた。また、RT-PCR 法を用いて 5 種の網膜芽細胞腫における DGK アイソザイムの発現を解析すると、正常網膜に発現の認められる DGK  $\gamma$  は全細胞株において検出されず、DGK  $\alpha$  および  $\beta$  に関しては、細胞株ごとに異なる発

現パターンが認められた。これらのことから、各 DGK アイソザイムが網膜細胞の分化に特有の役割を担っており、とりわけ DGK  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  のいわゆる I 型アイソザイムがヒト網膜細胞の分化あるいは腫瘍化に関連している可能性が示唆された。

糖尿病における網膜血管では、細胞内 DG 産生の上昇によるプロテインキナーゼ C (protein kinase C: PKC) の活性化や酸化ストレスなどによって血管新生促進作用をもつ vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現が上昇することが報告されている。糖尿病網膜症との関連において、網膜神経細胞における高グルコースおよび過酸化水素負荷による病態を検討するために、2つの網膜芽細胞腫株 (WERI-Rb-1 細胞、Y-79 細胞) を用いて実験を行った。その結果、高グルコースあるいは過酸化水素負荷により両網膜芽細胞腫における DGK 酵素活性値が有意に上昇し、同時に PKC の活性化および VEGF の発現上昇が認められた。これらの刺激による DGK アイソザイムの変化を検討すると、Y-79 細胞では DGK  $\alpha$  のみが変化を示し、刺激後 2-4 時間後に mRNA、蛋白レベルともに著しい発現の増加が認められた。しかしながら、通常培養条件下で DGK  $\alpha$  を発現する WERI-Rb-1 細胞では、高グルコースおよび過酸化水素負荷によっても発現に変化は認められなかった。

一方、生体レベルで糖尿病状態における網膜の DGK、PKC および VEGF の発現を検討したところ、糖尿病発症 2 週のごく早期においてのみ、DGK 酵素活性値の低下が認められたが、PKC の発現変化は検出されなかった。しかし、硝子体内 VEGF 濃度は罹病期間に比例して上昇を認め、糖尿病初期から網膜における VEGF の産生は上昇していると考えられた。

以上より、細胞レベルにおいて、網膜神経細胞においても網膜血管と同様に高グルコースおよび過酸化水素負荷によって PKC の活性化および VEGF の産生亢進が生じることが明らかになり、さらに、この現象には、DGK 酵素活性の

上昇が関与する可能性が示唆された。これより、網膜神経細胞における DGK の活性化が、糖尿病網膜症の増悪要因となることが推測された。

平成 17 年 1 月 30 日


山形大学大学院医学系研究科長 殿


## 学位論文審査結果報告書

申請者氏名：佐藤 さくら

論文題目：網膜におけるジアシルグリセロールの発現解析

審査委員：主審査委員 加藤 宏司 

副審査委員 富永 真琴 

副審査委員 加藤 丈夫 

審査終了日：平成 16 年 12 月 24 日

### 【 学位論文審査結果の要旨 】

我が国の後天性失明の原因の第一位は糖尿病性網膜症である。糖尿病患者はおよそ700万人であり、網膜症は患者のおよそ40%に発症する。本症の予防・治療のためには、病因・病態の解明は急務であり必須である。糖尿病性網膜症は、高血糖に暴露された網膜血管に障害が始まる。この病態の機序として、高血糖に曝された網膜血管で、protein kinase C(PKC)の活性化が起こり、血管透過性の亢進が進むことが知られている。PKC活性化は、血管新生促進因子vascular endothelial growth factor (VEGF)も誘導することが知られている。

本研究の目的は、糖尿病性網膜症の網膜で、PKCを活性化するジアシルグリセロールDGの代謝酵素DGKに焦点をあて、VEGFの動態を調べ、ことに網膜の神経細胞に着目して、網膜症における神経細胞の関与を明らかにすることである。

実験には各種の標本と測定法を用いた。In vivoの標本としては、正常成熟ラットと生後直後のラット、ヒト正常網膜、およびstreptozotocinを腹腔投与した糖尿病モデルラットを用いた。in vitroの標本としては、ヒト網膜芽細胞腫RBのY-79細胞とWERI-Rb-1細胞の培養標本を用いた。測定は、ノーザンブロット法、in situハイブリダイゼーション法、イムノブロット法、RT-PCR法、酵素活性法、免疫組織学法等で行った。また、RB細胞では高グルコースに過酸化水素による酸化ストレスを負荷し、DGK・VEGF等を検討した。実験の結果は以下のようであった。

1. 正常ラットの網膜神経細胞では、DGK $\gamma$ 以外の5種類のDGKアイソザイムの発現が認められた。
2. DGKの酵素活性は、生後に網膜細胞の分化が進むにつれ(1-7日)増強し、それ以降は成長と共に低下した。
3. ヒト正常網膜ではラットと同様、DGK $\gamma$ 以外の5種類のDGKアイソザイムの発現が認められた。
4. 高グルコース負荷を加えると、Y-79細胞ではDGK $\alpha$ の発現が著明に認められた。また、正常のグルコース濃度下、あるいは酸化ストレス負荷によってもDGK $\alpha$ の発現が認められた。VEGFの発現も高グルコース負荷で増強し、同様に酸化ストレス負荷でも誘導された。
5. DGK $\alpha$ の免疫組織化学の解析では、Y-79細胞ではイムノブロット法と同様、高グルコースおよび酸化ストレスで反応の増強が認められた。WERI-Rb-1細胞で認められたDGK $\alpha$ の分布は細胞全体に瀰漫性小顆粒状に分布し、刺激により細胞内の分布に変化は認められなかった。
6. 7週齢の糖尿病モデルラットでは、VEGFの発現部位の拡大が見られ、さらに硝子体中のVEGF濃度の上昇が見られた。

以上の結果から著者は、①ヒトの網膜の神経細胞においても脳と同様にDGKアイソザイムが発現していること、②糖尿病の神経細胞で、DGKの活性化が起こることを明らかにした。これによりDGK-PKC-VEGFの経路が神経細胞でも活性化され、網膜症の血管障害の増悪因子になる可能性を指摘した。この実験結果は、網膜症の病態に新しい知見を加えたものであり、臨床的意義が大きいと評価した。従って、本研究の著者が博士(医学)の学位を取得するに値するものと判断した。