

Implication of diabetic retinopathy on the retinal ganglion cell: the role of calpain and oxidative stress

著者	AHMED Y. SHANAB
号	82
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	医博第3061号
URL	http://hdl.handle.net/10097/62161

氏名	アハメト ユセフ シヤナフ Ahmed Y. Shanab
学位の種類	博士 (医学)
学位授与年月日	2012年9月25日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	Implication of diabetic retinopathy on the retinal ganglion cell: the role of calpain and oxidative stress (網膜神経節細胞における糖尿病網膜症の影響：カルパインと酸化ストレスの働き)
論文審査委員	主査 教授 中澤 徹 教授 川瀬 哲明 教授 後藤 昌史

論文内容要旨

【Objective】

To describe how a high fat diet (HFD) and hyperglycemia initiate a sequence of calpain activation and oxidative stress associated with neuro-degenerative changes in diabetic retinopathy (DR).

【Methods】

Mice lacking the gene for calpastatin (CAST KO, C57Bl/6 background), and mice lacking the gene for NF-E2-related factor 2 (Nrf2 KO, C57Bl/6 background) were used. Age- and sex-matched wild-type (C57Bl/6) mice served as control mice, and were fed a HFD. Hyperglycemia was induced with streptozotocin (STZ). Retinal ganglion cell (RGC) density was estimated by labeling with fluorogold and immunohistochemistry. SNJ-1945, a potent calpain inhibitor, was administered daily until the animals were sacrificed. *In vitro*, oxidative stress-induced RGC loss was evaluated in a high glucose culture medium with and without SNJ-1945. Retinal mRNA of calpain-1 and calpain-2 were measured by quantitative RT-PCR. Pre-apoptotic substrates of cleaved β -fodrin and synaptophysin protein were quantified by immunoblot analysis. Axonal damage was examined in transverse sections of the optic nerve.

【Results】

A HFD and hyperglycemia significantly increased RGC and axonal degeneration four weeks into the experiment. Levels of cleaved α -fodrin were increased. In the CAST KO mice, the neurotoxicity was augmented significantly. Gene manipulation of calpastatin and orally administered SNJ-1945 successfully modified calpain levels in the retina and prevented RGC death. *In vitro*, a high-glucose culture of retinal cells without antioxidants showed more RGC death than that with SNJ-1945 and or antioxidant treatment. The expression of synaptophysin was significantly suppressed by SNJ-1945 treatment.

【Conclusions】

These results suggest that calpain plays a crucial role in HFD-induced RGC degeneration caused by hyperglycemia and oxidative stress. Inhibition of calpain and antioxidant offer important opportunities for future neuroprotective treatment against RGC death in various metabolic stress-induced diseases including DR.

審査結果の要旨

博士論文題目 Implication of diabetic retinopathy on the retinal ganglion cell: the role of calpain and oxidative stress（網膜神経節細胞における糖尿病網膜症の影響：カルパインと酸化ストレスの働き）

所属専攻・分野名 医科学専攻 眼科学分野

学籍番号 氏名 Ahmed Yousef Shanab

糖尿病網膜症は糖尿病の代表的な合併症の一つで失明につながる疾患である。成人病が蔓延する現代社会において解決すべき重要な疾患の一つである。糖尿病網膜症の病態は網膜血管障害に関連するという考え方が主流であるが、再生困難で視野障害に直結する網膜神経節細胞(RGC)も障害されることが報告されている。しかしながらこれらの詳細なメカニズムは依然明らかにされておらず、RGCを保護する治療法も確立されていない。

Ahmed Yousef Shanab氏は糖尿病に深く関連する酸化ストレスと、細胞死が起きる際に活性化して様々な蛋白質を切断するカルパインの役割に着目し、糖尿病網膜症におけるRGC死の病態解明とその抑制方法に関する研究を行った。まず酸化ストレス防御因子を制御する転写因子 Nrf2のノックアウトマウス(Nrf2-KOマウス)と、カルパインの活性を抑制するカルパスタチンのノックアウトマウス(CAST-KO)、さらに正常マウスにそれぞれストレプトゾトシンと高脂肪食を与え、生存RGC数を評価した。3種類のマウスすべてで生存RGC数の減少が認められ、Nrf2-KOおよびCAST-KOマウスでの生存RGC数の減少速度はともに正常マウスよりも有意に早かった。これらの結果はRGC死に酸化ストレスとカルパインの活性化が深く関連し、RGC保護創薬のターゲットであることを示唆する重要な知見と言える。

これらの成果をエビデンスとして、抗酸化物質やカルパイン活性化阻害薬SNJ-1945のRGC保護効果を検証した。まず糖尿病を模倣した高糖濃度の培養系で網膜細胞を培養し、薬剤をそれぞれ単独で添加すると、共に無添加の場合と比較して細胞の生存率が向上することを確認した。次にこれらを併用することで相乗的に生存率を向上させることが出来ることも明らかにした。さらにSNJ-1945を上記3種類のモデルマウスに経口投与し、生存RGC数を評価したところ、どのモデルにおいてもRGC保護効果を認めた。

これらの成果は糖尿病網膜症の病態の新しい理解の一助となるだけでなく、糖尿病網膜症に対する新しい薬剤治療の概念を提示するものである。

よって、本論文は博士(医学)の学位論文として合格と認める。