

## 糖尿病ラット角膜における Mn-SOD mRNA の発現

別府 英明, 中村 誠, 片上千加子, 山本 節

神戸大学医学部眼科学教室

## 要 約

糖尿病ではしばしば角膜上皮障害がみられるが, その原因については未だ不明な点が多い。一方, 高血糖状態では非酵素的糖結合反応(グリケーション)の過程でアマドリ化合物は自動酸化を起こし, フリーラジカル的一种であるスーパーオキシドを生成する。また, 重要な抗酸化酵素であり, manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) と相補的に働く copper, zinc-superoxide dismutase (Cu, Zn-SOD) は糖化によって活性が低下することが明らかになっている。今回, 我々は糖尿病角膜上皮障害の発症における抗酸化能の低下の関与の有無を検討する目的で, ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット角膜における Mn-SOD mRNA (伝令リボ核酸) 発現につい

て *in situ* hybridization 法を用いて検討した。その結果, 糖尿病ラット角膜上皮細胞, 内皮細胞に Mn-SOD mRNA の発現を認め, 角膜上皮細胞における発現は対照ラット角膜に比し減弱していた。以上の結果から, 糖尿病角膜上皮症の発症に Mn-SOD 活性の低下が関与している可能性が示唆された。(日眼会誌 100:599-604, 1996)

キーワード: グリケーション, スーパーオキシド, スーパーオキシドジスムターゼ, 糖尿病角膜上皮症, ハイブリダイゼーション

Expression of Mn-SOD mRNA in Streptozotocin-induced Diabetic Rat Cornea by *In Situ* Hybridization

Hideaki Beppu, Makoto Nakamura, Chikako Katakami and Misao Yamamoto

Department of Ophthalmology, Kobe University, School of Medicine

## Abstract

The pathogenesis of diabetic corneal epitheliopathy, one of the ocular complications frequently seen in diabetes patients, still remains to be elucidated. Hyperglycemia causes glycation of various proteins leading to the formation of superoxide radicals ( $O_2^-$ ). Copper, zinc-superoxide dismutase (Cu, Zn-SOD), a scavenger of superoxide radicals, whose function is complementary to manganese-SOD (Mn-SOD), is inactivated during glycation. As a first step to clarify whether depressed antioxidant activity is associated with diabetic corneal epitheliopathy or not, we investigated the expression of Mn-SOD mRNA (messenger ribonucleic acid) in streptozotocin-induced diabetic rat cornea by *in situ* hybridiza-

tion using a digoxigenin-labeled Mn-SOD cDNA probe. Mn-SOD mRNA was detected in epithelial cell layer and endothelial cell layer of both diabetic rat cornea and normal rat cornea. However, the expression of Mn-SOD mRNA in the epithelial cell layer of diabetic rat cornea was weaker than that of normal rat cornea. These results suggest that decreased Mn-SOD activity might be one of factors causing diabetic corneal epitheliopathy. (J Jpn Ophthalmol Soc 100:599-604, 1996)

Key words: Glycation, Superoxide, Superoxide dismutase, Diabetic corneal epitheliopathy, *In situ* hybridization

## I 緒 言

酸素は生体にとって必要不可欠な物質であり, 細胞内

呼吸に使われ, 食物に蓄積されたエネルギーを効率よく取り出して生命活動を営むために利用されている。しかし一方で, 酸素は体内での代謝過程において反応性に富

別刷請求先: 650 兵庫県神戸市中央区楠町7-5-2 神戸大学医学部眼科学教室 別府 英明  
(平成7年10月11日受付, 平成8年3月27日改訂受理)

Reprint requests to: Hideaki Beppu, M.D. Department of Ophthalmology, Kobe University, School of Medicine,  
7-5-2 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe-shi, Hyogo-ken 650, Japan

(Received October 11, 1995 and accepted in revised form March 27, 1996)

活性酸素の一種であるスーパーオキシドとなり得る。スーパーオキシドは金属イオンの存在下で Haber-Weiss 反応により、強い組織障害力を持つヒドロキシラジカルを生じる。この危険なスーパーオキシドを不均化する役割を担っているのが superoxide dismutase (SOD) であり、Cu と Zn を含む Cu, Zn-SOD と、Mn を含む Mn-SOD が存在し、活性酸素により惹起される細胞障害に対し、生体防御の目的で働いている<sup>1)~4)</sup>。

一方、糖尿病などの高血糖状態では、生体中の蛋白質が Maillard 反応により非酵素的糖化反応(グリケーション)を受けることが知られている<sup>5)</sup>。Maillard 反応自体は生体に障害を及ぼすものではないが、特定の蛋白質の活性部位などが糖化を受けると活性を失い、機能が失われる。また、糖化蛋白が自らスーパーオキシドを出し、一方でスーパーオキシドを除去するべき Cu, Zn-SOD が不活化され、分子が分断されることが明らかになってきている<sup>6)~8)</sup>。すなわち、糖尿病状態においては酸化ストレスが増加する一方、酸化ストレスに対する防御能は低下していると考えられる。

糖尿病患者においてみられる眼合併症のうち、糖尿病角膜上皮症の発症機序についてはアルドース還元酵素の関与などが報告<sup>9)~11)</sup>されているが、不明な点が多く残されている。角膜上皮は涙液層を介して大気と接しており、紫外線に暴露されるため、フォトダイナミック作用によりスーパーオキシドが発生し得る<sup>12)</sup>。このため、角膜上皮はスーパーオキシドによる組織障害の危険にさらされており、それに対する防御機構の一部として、生理的条件下において SOD の合成が行われていることを我々は

すでに明らかにし報告<sup>13)</sup>した。糖尿病状態においては、先に述べたようにスーパーオキシドによる酸化ストレスは増加しており、生理条件下以上の防御能が必要と考えられる。

眼球における SOD の局在については、主として免疫組織化学的検討が行われてきたが、この方法ではグリケーションによって不活化された蛋白をも捕えることになり、抗酸化能を評価することは困難であると考えられる。今回、我々は糖尿病角膜上皮症の発症と抗酸化能の低下の関係を明らかにするため、ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット角膜における Mn-SOD mRNA 発現について *in situ* hybridization (ISH) 法を用いて検討した。

## II 実験方法

12 時間明(昼光ランプ下)/12 時間暗で飼育された Wistar 系ラット(雄、体重約 200 g) 5 匹にストレプトゾトシン 80 mg/体重 kg を腹腔内投与し、翌日の血糖測定において血糖値 300 mg/dl をもって糖尿病発症とした。以後、1 週毎に血糖測定し、血糖値 300 mg/dl 以上の持続を確認した。発症 3 か月後にラットをペントバルビタールナトリウム(ネプタール®)の腹腔内注射で致死麻酔後、眼球摘出し、OCT コンパウンドに凍結包埋した。クライオスタットを用いて、厚さ 10  $\mu$ m の凍結切片を作製した。凍結切片は、組織の脱落を防止するため、poly-L-lysine 被膜処理したスライドガラスに載せ、ドライヤーで 30 秒間、さらに伸展板上で 30 分間乾燥した後、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

ラット Mn-SOD cDNA プローブは、既報<sup>13)</sup>に準じて

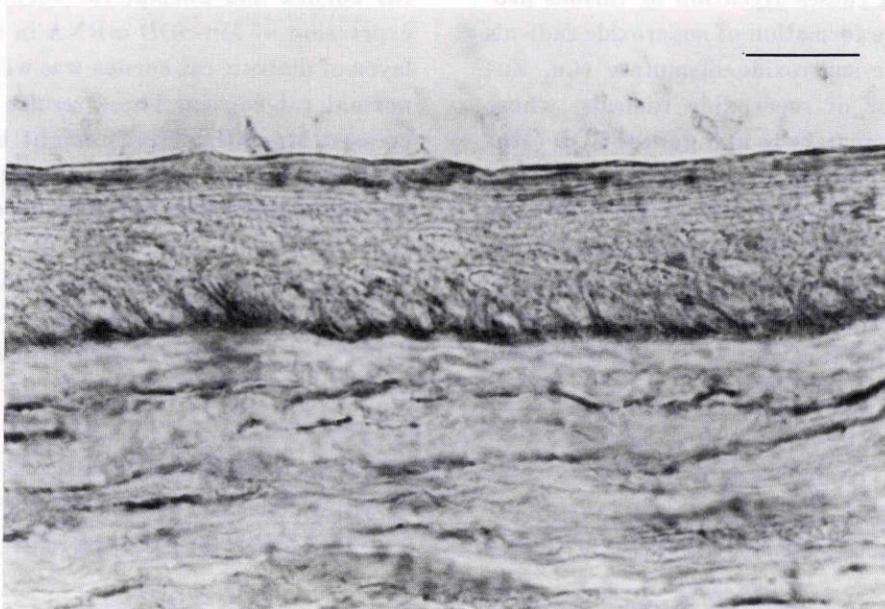


図1 糖尿病ラット角膜に対する manganese-superoxide dismutase (Mn-SOD) cDNA プローブを用いた *in situ* hybridization (ISH)。

角膜上皮層の基底細胞層を中心に Mn-SOD mRNA (伝令リボ核酸)の軽度の発現が認められた。角膜実質層における発現は明らかでなかった。バーは 20  $\mu$ m

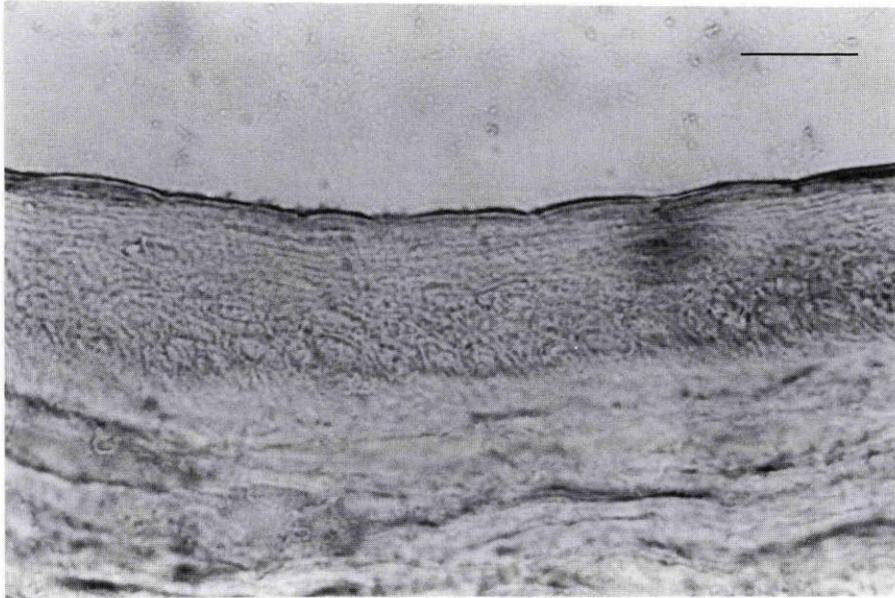


図2 糖尿病ラット角膜に対する pBR 322 プローブを用いた ISH.  
角膜上皮層, 実質層ともに陽性所見は認められなかった. バーは 20  $\mu$ m

既知のヒト Mn-SOD DNA を鋳型として polymerase chain reaction (PCR) 法により合成した. この cDNA をランダムプライム法 DNA 標識法でジゴキシゲニン標識し (Random Primer DNA Labeling Kit, Takara Bio-medicals), プローブとした. 次に, ラット眼球から total RNA (リボ核酸) を抽出しニトロセルロース膜に吸着させ, 先に標識した cDNA プローブを用いてフィルターハイブリダイゼーションを行い, 合成した cDNA プローブがラット RNA と hybrid を形成することを確認した<sup>13)</sup>.

凍結保存しておいた切片を phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4, 0.1 M で洗浄後, proteinase-K 処理 (0.5  $\mu$ g/ml, 3 min) を行った. 4% paraformaldehyde (PFA)/PBS で後固定後水洗し, 37°C, 2 時間プレハイブリダイゼーションを行った. プレハイブリダイゼーション溶液の組成は 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.6 M NaCl, 1mM Ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA) (pH 7.4), 50% deionized formamide, 1 $\times$ Denhard's, yeast-tRNA (0.5 mg/ml), salmon-sperm-DNA (0.25 mg/ml) であり, 5 分間沸騰後, 急冷処理後使用した. 次に, 37°C, 15 時間ハイブリダイゼーションを行った. ハイブリダイゼーション溶液の組成は, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.6 M NaCl, 1 mM EDTA (pH 7.4), 50% deionized formamide, 1 $\times$ Denhard's, yeast-tRNA (0.5 mg/ml), salmon-sperm-DNA (0.25 mg/ml), ジゴキシゲニン標識 cDNA プローブ (5  $\mu$ g/ml) である. この溶液を 5 分間沸騰浴後, 急冷処理し直ちに各切片に 200  $\mu$ l ずつを載せ, 湿箱中で 37°C, 15 hr ハイブリダイズさせた. ハイブリダイゼーション後, 50% ホルムアミド/2 $\times$ (0.3 M sodium chloride, 0.03 M sodium citrate) (SCC) で室温洗浄 1 時間 $\times$ 5 回, 2 $\times$ SSC で室温洗浄 15 分 $\times$ 2 回施

行した後, 免疫染色を行い鏡検した. 対照反応として, ジゴキシゲニン標識リニア化 pBR 322 を用いて同一条件でハイブリダイゼーションを行った. 以上の使用した各溶液には, 混入 RNase の活性を抑える目的で, RNase 阻害剤である diethylpyrocarbonate (DEPC: Sigma, St. Louis) を 0.02% 濃度で加えた. 対照として同週齢の正常ラットを用い, 同条件でハイブリダイゼーションを行った.

### III 結 果

糖尿病ラット, 対照ラットともに角膜上皮細胞に Mn-SOD mRNA の発現が認められた. 対照ラット角膜では, 上皮細胞のうち基底細胞層から翼細胞層にかけて強度の陽性所見を認めた (図 3) のに対し, 糖尿病ラットにおいては基底細胞層を中心にやや弱い陽性所見を認め, 対照に比し Mn-SOD mRNA の発現は減弱していた (図 1). 角膜実質細胞では糖尿病ラット, 対照ラットともに Mn-SOD mRNA の発現は明らかではなかった. ジゴキシゲニン標識リニア化 pBR 322 を用いた対照切片では, 糖尿病ラット, 対照ラットともに陽性所見を認めなかった (図 2, 4). 実験動物の個体差による発現の違いは認めなかった.

### IV 考 按

糖尿病角膜上皮症は, 糖尿病患者においてしばしばみられる眼合併症の一つである. 近年, 増殖糖尿病網膜症に対して積極的に硝子体手術が行われるようになってから重篤な糖尿病角膜上皮症が増加し, 臨床的に問題になっている. その発症機序については, アルドース還元酵素の関与が示唆され, 多くの報告<sup>9)~11)</sup>がみられる. アルドース

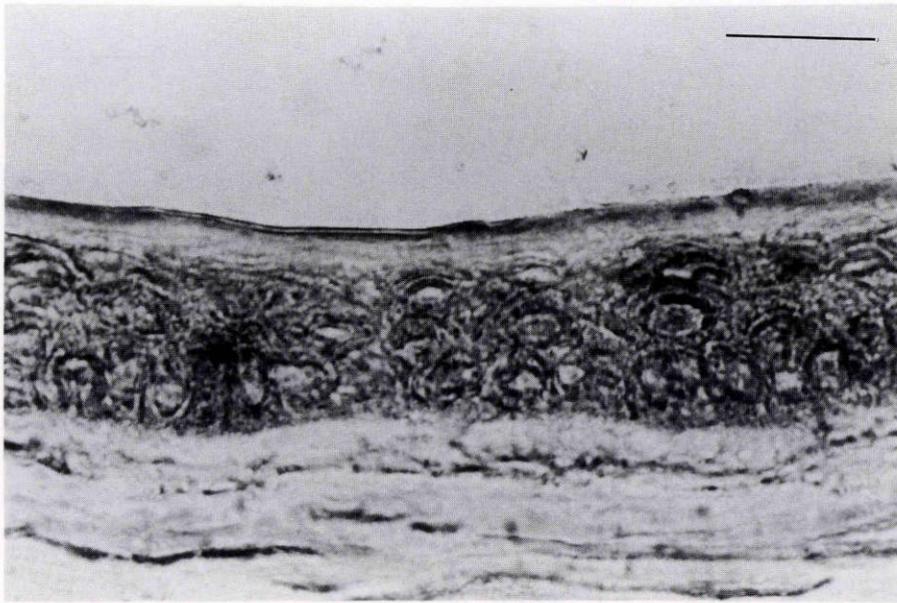


図3 正常ラット角膜に対する Mn-SOD cDNA プローブを用いた ISH.  
角膜上皮層の基底細胞層から翼細胞層にかけて Mn-SOD mRNA の強度の発現が認められた。角膜実質層における発現は明らかでなかった。バーは 20  $\mu\text{m}$

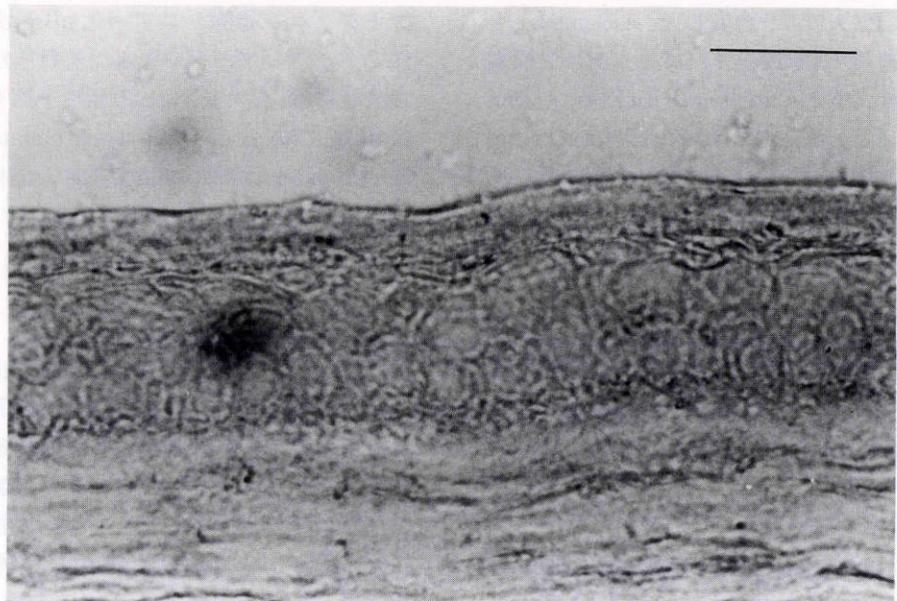


図4 正常ラット角膜に対する pBR 322 プローブを用いた ISH.  
角膜上皮層、実質層ともに陽性所見は認められなかった。バーは 20  $\mu\text{m}$

還元酵素はソルビトール経路の主酵素であり、糖尿病患者においてその活性が亢進している。このため、角膜上皮内にソルビトールが蓄積し細胞の破壊を招くと考えられている。しかし、アルドース還元酵素がソルビトール経路の異常を引き起こす詳細な機序など不明な点も多く残されている。

角膜上皮は涙液層を介して大気と接しており、酸化ストレスを受けやすい環境にある。また、紫外線に暴露されるため、フォトダイナミック作用によりスーパーオキシドが発生し得る<sup>12)</sup>。スーパーオキシド自身は強い組

織障害力を持たないが、角膜上皮内の微小環境で蓄積されると、金属の存在下で Haber-Weiss 反応により強い組織障害力を持つ過酸化水素、ヒドロキシラジカルの生成を促進する可能性がある。これらの活性酸素は核酸や蛋白質に変性を起こすため、角膜上皮細胞分裂に障害を来し、角膜上皮症発症の一因となると考えられる。この危険スーパーオキシドを平均化する役割を担っているのが SOD であり、Cu と Zn を含む Cu, Zn-SOD と Mn を含む Mn-SOD が存在し、スーパーオキシドから生ずる活性の高い活性酸素により惹起される細胞障害に対し生体

防御の目的で働いている<sup>1)~4)</sup>。

一方、高血糖状態では非酵素的結合反応(グリケーション)の過程でアマドリ化合物は自動酸化を起し、スーパーオキシドを生成する<sup>14)15)</sup>。また、Cu, Zn-SOD はグリケーションによって活性が低下し<sup>6)~8)</sup>、かつ、部位特異的に切断され、また、ランダムに分断化されることが明らかになっている<sup>16)</sup>。さらに、Cu, Zn-SOD の分子内の Cu<sup>2+</sup> はスーパーオキシドと Haber-Weiss 反応を引き起こし、ヒドロキシラジカルを生じ、Cu, Zn-SOD の分断化を促進する。このように、高血糖状態では蛋白のグリケーションにより、一方でスーパーオキシドの産生が亢進し、一方で Cu, Zn-SOD が不活化され分断されるため、酸化ストレスの増加した状態となっていると考えられる。

今回我々は、糖尿病角膜上皮症の発症と抗酸化能の低下との関係を検討するため、糖尿病ラット角膜上皮における Mn-SOD 蛋白合成能を評価し、正常ラットと比較した。Mn-SOD は Cu, Zn-SOD と相補的に働く抗酸化酵素で、ミトコンドリアに局在する。Tumor necrosis factor, interleukin-1 などのサイトカインにより mRNA が誘導されることが知られており<sup>17)18)</sup>、酸化ストレスに際して合成が促進され、酸化ストレスから生体を防御する重要な役割を担っていると考えられる。

従来、Mn-SOD の局在については免疫組織化学的検討が行われてきた。正常ラット眼球においては角膜上皮細胞、虹彩、水晶体、網膜視細胞内節、内網状層、外網状層での発現が報告<sup>19)</sup>されている。しかし、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) による免疫学的な定量と活性測定法を比較した報告によると、SOD は病的状態では活性が低下し、その状態で蓄積されることが示唆されている<sup>20)</sup>。すなわち、Mn-SOD 蛋白の生理活性部位と抗原部位は異なるため、糖尿病状態における発現を検討する場合には、従来の免疫組織化学的方法ではグリケーションによって不活化された蛋白をも捕えることになり、抗酸化能を評価することは困難であると考えられる。

そこで我々は、ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット角膜における Mn-SOD mRNA の発現を捕えた。一般に、蛋白は DNA → mRNA → スプライシング → 蛋白合成という過程で合成される。この過程の初期段階である mRNA を捕えることにより Mn-SOD 蛋白合成能を評価し、抗酸化能を推察した。その結果、正常ラット、糖尿病ラットともに角膜上皮、内皮に Mn-SOD mRNA の発現を認め、糖尿病ラット角膜上皮における Mn-SOD mRNA 発現は正常ラット角膜上皮における発現に比し減弱していた。すなわち、糖尿病状態において Mn-SOD 蛋白合成能は低下していると考えられた。さらに、Cu, Zn-SOD のグリケーションによる不活化も考慮すると、糖尿病状態における SOD 活性は低下していると考えられ、このため、不均化されなかったスーパーオキシドから生じた過酸化水素、ヒドロキシラジカルなどの活性酸素

により核酸や蛋白質が変性を起こし、角膜上皮細胞分裂に障害を来し角膜上皮症発症の一因となる可能性があると考えられる。

糖尿病角膜上皮症の原因については、アルドース還元酵素との関連をはじめ多くの報告<sup>9)~11)</sup>がみられるが、未だ不明な部分が多く残されている。今回の検討により、その原因の一部として抗酸化能の低下が関与していることを示唆する結果を得た。今後、さらに定量的な方法で検討する必要があると考えられる。

#### 文 献

- 1) 小林陽之助, 吉光千記, 白井朋包: Superoxide dismutase (SOD)と臨床. 最新医学 39: 1419—1424, 1984.
- 2) 谷口直之, 木下憲明: スーパーオキシドデイスムターゼ(SOD). 日本臨床 47: 303—305, 1989.
- 3) Oberley LW, Buettner GR: Role of superoxide dismutase in cancer: A review. Cancer Res 39: 1141—1149, 1979.
- 4) Thaete LG, Crouch RK, Specer SS: Immunolocalization of Copper-Zinc superoxide dismutase. J Histochem Cytochem 33: 803—808, 1985.
- 5) 加藤博通: 生体内におけるメイラード反応. 生化学 56: 245, 1984.
- 6) Taniguti N: Clinical significances of superoxide dismutases: Changes in Aging, diabetes, ischemia, and cancer. Adv Clin Chem 26: 1—59, 1992.
- 7) Arai K, Iizuka S, Tada Y, Oikawa K, Taniguchi N: Increase in the glycosylated form of erythrocyte Cu-Zn-superoxide dismutase in diabetes and close association of the nonenzymatic glycosylation with the enzyme activity. Biochem Biophys Acta 924: 292—296, 1987.
- 8) Arai K, Maguchi S, Fujii S, Ishibashi H, Oikawa K, Taniguchi N: Glycation and inactivation of human Cu-Zn-superoxide dismutase. J Biol Chem 262: 16969—16972, 1987.
- 9) Ohasi Y, Matsuda M, Hosotani H, Tano Y, Ishimoto I, Fukuda M, et al: Aldose reductase inhibitor (CT-112) eyedrops for diabetic corneal epitheliopathy. Am J Ophthalmol 15: 233—238, 1988.
- 10) 高橋幸男, 赤木好男, 秋宗万理, 田村邦嘉, 糸井素一: 糖尿病性角膜上皮障害と Aldose Reductase. 第2報. 実験的ガラクトース血症ラット角膜について. 日眼会誌 90: 336—340, 1986.
- 11) Tsubota K, Yamada M: The effect of aldose reductase inhibitor on the corneal epithelium. Cornea 12: 161—162, 1993.
- 12) 伊藤 敦: 紫外線による活性酸素の発生. 活性酸素フリーラジカル 4: 6—12, 1993.
- 13) 松尾裕文, 中村 誠, 片上千加子, 山本 節: In situ hybridization 法によるラット角膜 Mn-SOD mRNA の局在. 日眼会誌 99: 749—754, 1995.
- 14) Sakurai T, Tsuchiya S: Superoxide production from nonenzymatic glycosylated protein. FEBS Lett 236: 406—410, 1988.

- 15) **Mullarkey CJ, Edelstein D, Brownlee M**: Free radical generation by early glycation products: A mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 173: 932—939, 1990.
- 16) **Ookawara T, Kawamura N, Kitagawa Y, Taniguti N**: Site-specific and random fragmentation of Cu, Zn-superoxide dismutase by Glycation Reaction. *J Biol Chem* 267: 18505—18510, 1992.
- 17) **Matsuda A, Longo DL, Kobayashi Y, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K**: Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase by interleukin 1. *Faseb J* 2: 3087—3091, 1988.
- 18) **Wong GH, Elwell JH, Oberley LW, Goeddel DV**: Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell* 58: 923—931, 1989.
- 19) **Rao NA, Larry GT, Delmage JM, Sevanian A**: Superoxide dismutase in ocular structures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 1778—1781, 1985.
- 20) **鈴木啓一郎, 谷口直之**: 抗酸化酵素の発現と病態—SOD. *実験医学* 9: 1317—1330, 1991.