

## ラット糖白内障の水晶体上皮細胞増殖に対する アルドース還元酵素阻害剤の抑制効果

森久保聡一, 高村 佳弘, 久保 江理, 都筑 昌哉, 赤木 好男

福井医科大学眼科学教室

### 要 約

**目 的**：ガラクトース含有食負荷ラットにおける水晶体上皮の糖アルコールの蓄積と、過剰な水晶体上皮細胞増殖に対するアルドース還元酵素阻害剤(ARI)の抑制効果を評価した。

**方 法**：ラットに 50% ガラクトース負荷食単独投与、もしくは 50% ガラクトース負荷食と ARI(SNK-860)の同時投与を行った。水晶体の組織学的変化を光学顕微鏡により観察し、水晶体上皮におけるガラクトール蓄積量を測定した。伸展標本に対する増殖細胞抗原(PCNA)の免疫組織染色を行い、水晶体上皮細胞の増殖能を解析した。

**結 果**：ARI を投与したラットでは、ガラクトース

単独投与のラットと比較して水晶体上皮へのガラクトールの蓄積と PCNA 陽性細胞数を抑制する効果がみられた。ガラクトース単独投与ラットの進行した白内障では上皮の多層化がみられたが、ARI 同時投与ラットではみられなかった。

**結 論**：ARI 投与により白内障性変化と水晶体上皮の過剰な細胞増殖が抑制される。(日眼会誌 107 : 565-570, 2003)

**キーワード**：アルドース還元酵素阻害剤, 細胞増殖, 糖白内障, 水晶体上皮

## The Inhibitory Effect of Aldose Reductase Inhibitor for Proliferation in the Lens Epithelial Cells of Rat Sugar Cataract

Soichi Morikubo, Yoshihiro Takamura, Eri Kubo, Shosai Tsuzuki and Yoshio Akagi

Department of Ophthalmology, Fukui Medical University

### Abstract

**Purpose** : To evaluate the inhibitory effect of aldose reductase inhibitor (ARI) for the accumulation of sugar alcohol and the enhanced proliferation of lens epithelial cells of rats fed a galactose diet.

**Methods** : Sprague-Dawley rats were fed a diet containing 50% galactose with or without ARI (SNK-860). Histological changes in the lenses were observed by light microscopy, and the amount of galactitol accumulated in the lens epithelium was measured by liquid-gas chromatography. Immunohistochemical staining of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in whole-mount preparations was performed to assay the proliferative ability of the lens epithelial cells.

**Results** : The amount of galactitol in the lens

epithelium and the number of PCNA positive cells in rats administered ARI were less than in rats fed the galactose diet. Multi-layered epithelium was observed in advanced cataract of rats fed the galactose diet, but not in the rats given ARI.

**Conclusion** : The administration of ARI can prevent cataractous changes and aberrant proliferation of lens epithelial cells.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 107 : 565-570, 2003)

**Key words** : Aldose reductase inhibitor, Proliferation, Sugar cataract, Lens epithelial cells

別刷請求先：910-1193 福井県吉田郡松岡町下合月 23-3 福井医科大学眼科学教室 赤木 好男  
(平成 14 年 11 月 14 日受付, 平成 15 年 3 月 5 日改訂受理)

Reprint requests to : Yoshio Akagi M. D. Department of Ophthalmology, Fukui Medical University, 23-3 Shimoaizuki Matsuoka-machi, Yoshida-gun, Fukui 910-1193, Japan

(Received November 14, 2002 and accepted in revised form March 5, 2003)

## I 緒 言

糖尿病の眼合併症の一つである糖白内障は比較的若年から発症し、手術加療が必要となることが多いが、術後に糖尿病網膜症の悪化や前嚢収縮といった合併症を生じる<sup>1)2)</sup>。よって、糖白内障の抑制または発症の遅延の可能性が望まれる。

糖白内障の成因の一つに、アルドース還元酵素(AR)を介するポリオール経路の亢進がある。それは、ARがグルコースを糖アルコールであるソルビトールに変換し、糖アルコールの蓄積が生じるため、水晶体線維細胞内の浸透圧が上昇し、細胞が膨化・崩壊に至るためと考えられている<sup>3)4)</sup>。糖白内障の有効な実験動物モデルとしてラットガラクトース白内障がある。それは3週齢以下の幼若ラットで、かつ高濃度のガラクトース負荷を受けている場合、白内障は赤道部から発症、急速に前・後皮質に進展するが、より成熟した7週齢以上のラットで低濃度のガラクトース負荷を受けている場合には、白内障は前・後皮質から発症し、その進展は緩徐であることがわかっている<sup>5)~7)</sup>。そして、糖白内障の形成は、ポリオール経路の中心的酵素であるARを抑制することにより防ぐことができ、この理論の正しさを裏付けている<sup>8)~11)</sup>。水晶体上皮細胞は赤道部付近の増殖帯において終生増殖を繰り返し、水晶体線維細胞へと分化し、皮質、核の一部となり、これはラットにおいても同様である。通常は増殖帯においてのみ増殖能を有するが、ガラクトース負荷により増殖帯以外の領域も含めびまん性に増殖が惹起される<sup>12)~17)</sup>。増殖能の上昇の程度は餌に含まれるガラクトースの濃度に依存することから、ARにより細胞内に蓄積する糖アルコールが大きく関与していると考えられている<sup>13)</sup>。今回、我々はAR阻害剤(ARI)を同時投与して糖アルコールの蓄積を抑制することで、上皮細胞の過剰な増殖がどのように変化するかを検討した。

## II 対象および方法

動物実験は福井医科大学動物実験指針に従って行われた。6週齢のSprague-Dawley(SD)系雄ラットに50%ガラクトース含有食(gal群)、もしくは50%ガラクトース含有食+ARI(SNK-860, [(2S, 4S)-6-fluoro-2',5'-dioxospiro(chroman-4,4'-imidazolidine)-2-carboxamide] (三和化学研究所)(gal+ARI群)を連続投与し、負荷前、負荷後3, 5, 7, 14日目に致死量以上のエーテル麻酔処置後、眼球を摘出し、視神経から切開を加え眼球後方から水晶体を採取した<sup>18)</sup>。SNK-860は過去の報告で<sup>10)</sup>検眼鏡的に白内障を抑制し得る量である0.025%となるように濃度を調整し投与した。各日それぞれの群において8匹ずつ、計72匹使用した。8匹の内訳であるが、2匹は組織切片用に、残り6匹の片眼は糖アル

コール(ガラクトール)の定量に、もう片眼は水晶体上皮細胞の増殖能の解析に用いた。増殖細胞抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)は細胞周期のG1からS期にかけて増加するため、細胞増殖の指標となる<sup>19)</sup>。水晶体上皮細胞の増殖能を解析するべく、伸展標本においてPCNAに対する免疫組織染色を行った。

白内障の組織的観察を行うべく、水晶体を4%パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液(PBS)で2日間固定後、アルコール系列で脱水しメタクリル樹脂で包埋した。2 $\mu$ mの薄切切片を作製し、トルイジン青染色後、光学顕微鏡で観察した。

上皮細胞が蓄積したガラクトールを計測するため、摘出した水晶体を後嚢側から切開し、水晶体上皮層と被膜のみを一塊として取り出し、重量を測定、-80°Cで冷凍保存した。ガラクトールの定量は液体ガスクロマトグラフィ法に従って測定した<sup>20)</sup>。

増殖能の解析のため、採取した上皮細胞+被膜を2日間メタノール固定し、PBSで置換後、上皮側を上向きに伸展標本を作製した。一次抗体に抗PCNAモノクローナル抗体(NC-012, Novocastra Lab., UK, mouse monoclonal antibody)を用い、avidin-biotin-peroxidase complex(ABC)法に従ってヒストファインSAB-PO(M)キット<sup>®</sup>(ニチレイ)を用いて免疫抗体反応を行い、0.02% 3,3'-diaminobenzidin tetrahydrochloride(DAB)で発色させた。伸展標本の前嚢中央部および増殖帯である周辺部のそれぞれにおいて6か所ずつ無作為に撮影し、MacSCOPE(ver. 2.5)を用いて1mm<sup>2</sup>当たりのPCNA陽性細胞数を計測し、平均値を算出した。

## III 結 果

### 1. 水晶体上皮細胞におけるガラクトールの計測

gal群、gal+ARI群においてガラクトース負荷前、負荷後の水晶体上皮細胞内に蓄積された単位重量当たりのガラクトール量の変化を図1に示す。ガラクトース負荷前ではガラクトールは検出されなかった。負荷後3日目ではガラクトールは両群において検出され、gal群では5日目、gal+ARI群では7日目においてそれぞれ最大量となり、以降減少した。ARIを同時投与することによりガラクトール蓄積量は負荷後3, 5, 7, 14日目においてそれぞれ63, 40, 71, 77%に抑制された。

### 2. 糖白内障の進行

糖白内障は、gal群ではガラクトース負荷後7日目で赤道部から皮質の膨化・液化で初発し、前・後皮質に向かって拡大していった。負荷後14日目、水晶体皮質は液化し、多層化領域が観察された(図2A)。一方、gal+ARI群では負荷後14日目でも皮質表層に軽度の浮腫があるのみで、多層化領域は観察されなかった(図2B)。

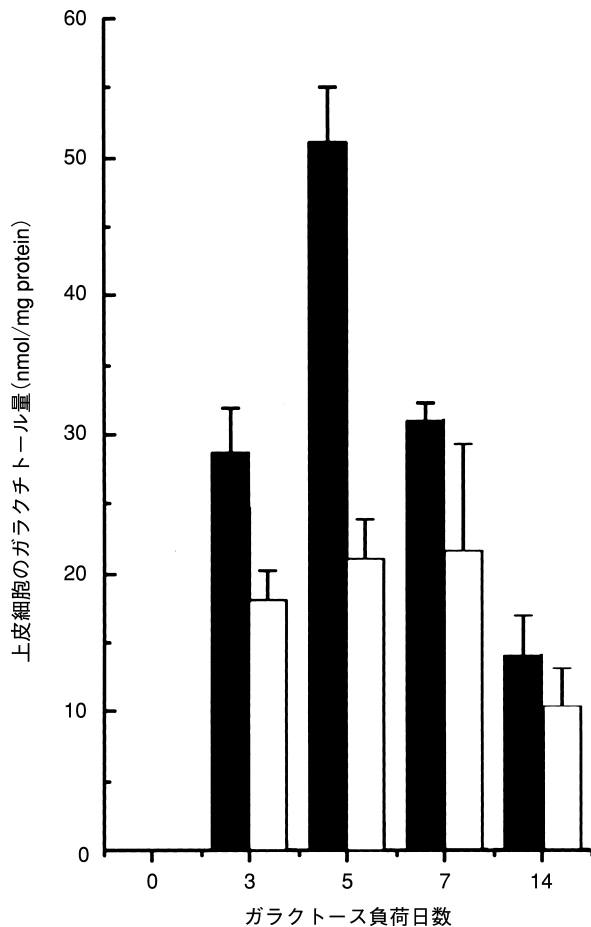


図 1 水晶体上皮細胞に蓄積された水晶体蛋白当たりのガラクトール量の経時変化。

50% ガラクトース含有食(gal 群: ■), 50% ガラクトース+SNK-860 負荷ラット (gal+ARI 群: □) における測定値を平均値±標準誤差(n=6)で示す。

### 3. 水晶体上皮細胞における増殖能

線維細胞の伸展標本の前囊中央部, 増殖帯における PCNA 陽性細胞数のガラクトース負荷後の経時的な変化を図 3 に示す。ガラクトース負荷前は増殖帯に多くの PCNA 陽性細胞(増殖細胞)が観察された。過去の報告通り, ガラクトース負荷後に中央部, 増殖帯それぞれにおいて PCNA 陽性細胞数は増加し 5 日目にピークを迎えた。gal+ARI 群においては負荷後 3, 5, 7, 14 日目で gal 群と比較して, 中央部では 50, 44, 90, 29%, 増殖帯では 66, 54, 93, 44% にそれぞれ PCNA 陽性細胞数は減少した。gal+ARI 群においては PCNA 陽性細胞数のピークは負荷後 7 日目であった。進展標本でも, 負荷後 14 日目の gal 群では多層化領域は観察され, PCNA 陽性細胞が集積していたが, gal+ARI 群では PCNA 陽性細胞の集積はなく, まばらに観察されるのみであった(図 2 C, D)。

## IV 考 按

水晶体上皮細胞は, 水晶体嚢を基底膜とする一層から

成る細胞であり, 前房水から水晶体への糖代謝を行っている。よって, この水晶体上皮細胞の細胞動態の変化は水晶体の代謝や種々の遺伝子レベルの変化を来し得る。これまでに我々が報告してきたラット糖白内障における水晶体上皮細胞増殖能の変化は, 以下のようにまとめられる<sup>14)</sup>。まず, 負荷後直ちにびまん性に上皮細胞の増殖能は惹起され, 増殖帯以外の領域においても増殖細胞は観察されるようになる。その後 4~5 日でピークを迎えるが, その後低下し, 増殖帯においても増殖細胞数は負荷前以下にまで減少する。びまん性の増殖がピーク後に正常以下にまで減少する一方で, 局所的に増殖細胞は集積し, 通常一層である上皮細胞は多層化領域を形成する。多層化領域は 50% ガラクトース含有食を負荷した場合は負荷後約 2 週で観察され, その後経時的に拡大する。つまり, ガラクトース負荷ラットにおいてはびまん性と多層化を特徴的な局所的な増殖パターンの 2 つがあると考えられている。

ガラクトースの濃度が高いほど, びまん性の増殖は速やかにかつ強度に惹起されることから, 上皮細胞内に蓄積される糖アルコール(ガラクトース負荷ラットの場合はガラクトール)が増殖を惹起させる直接的な要因と考えられている<sup>13)</sup>。糖アルコールは AR により生成されることから, 今回我々は ARI を同時投与することで糖アルコールの蓄積を抑え, その結果, 上皮細胞の増殖能がどのように影響を受けるかを検討した。

その結果, 以下の知見が得られた。

- ① 上皮細胞内のガラクトール量が抑制されるとともに, 増殖能の上昇も抑えられた。
- ② 増殖の程度は抑制されたが, いったん増殖が惹起されてピークを形成し, その後正常以下まで低下するというパターンは, ガラクトース単独投与ラットと同じであった。

③ 糖白内障の形成過程で生じる上皮細胞の多層化領域は, ARI を同時投与されたラットにおいては観察されなかった。

①の結果から, 上皮細胞の増殖能の上昇が糖アルコールの細胞内蓄積に依存することが再確認された。上皮細胞の増殖能の上昇は, 水晶体皮質の膨化に先行する鋭敏な変化であるが, この理由としてはもともと上皮細胞に AR が多く存在するためと考えられている<sup>21)</sup>。ARI を同時投与しても水晶体線維細胞への糖アルコールの蓄積を完全に抑制することは不可能に近い。わずかな蓄積量でも増殖能は惹起され, 結局はその後に正常以下のレベルまで増殖能は低下する。それでも, ARI を同時投与したラットにおいては, 糖アルコールの蓄積による皮質の崩壊が強力に抑制されるため, 水晶体の混濁はほとんど観察されなかった。しかし, いったん亢進するが, その後正常以下にまで低下するという水晶体上皮細胞の増殖動態異常が糖白内障の進行にどれだけの影響を与え

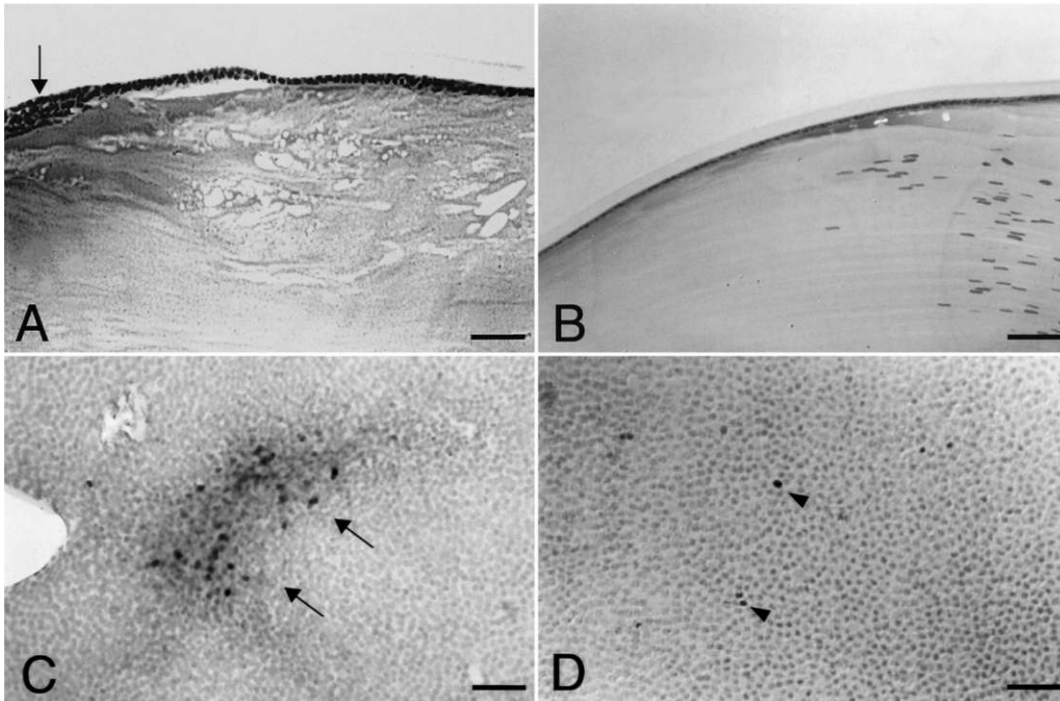


図 2 負荷後 14 日目の水晶体断面の組織像(A, B)と水晶体前囊の増殖細胞抗原(PCNA)染色例(C, D). 50% ガラクトース含有食負荷ラット(A)では上皮細胞の多層化領域があったが(矢印), 50% ガラクトース+SNK-860 負荷ラット(B)では観察されなかった. 50% ガラクトース含有食負荷ラット(C)ではPCNA陽性が多層化領域に集積していたが(矢印), 50% ガラクトース+SNK-860 負荷ラット(D)ではまばらにみられるのみであった(矢じり). バーは 100  $\mu$ m

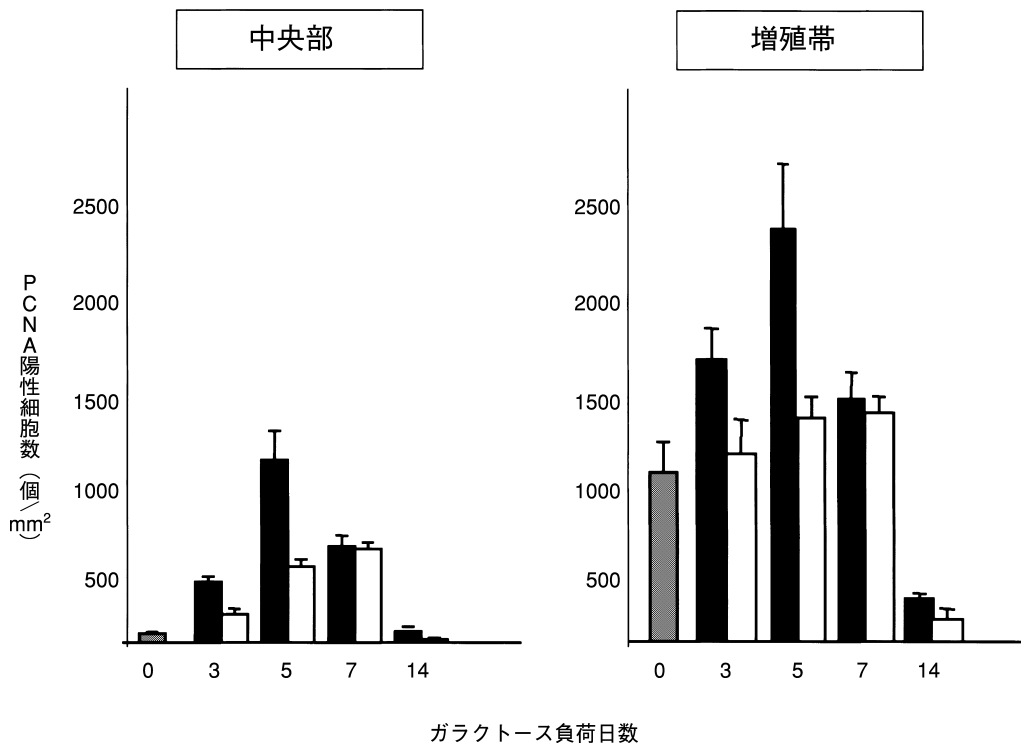


図 3 前囊中央部, 増殖帯における PCNA 陽性細胞数の経時的変化. 両群の負荷前における合計(gal 群と gal+ARI 群: ■), 50% ガラクトース含有食(gal 群: ■), 50% ガラクトース+SNK-860 負荷ラット(gal+ARI 群: □)における測定値を平均値±標準誤差(n=6)で示す.

るかは、今回の結果からは不明である。しかし、増殖帯における上皮細胞の増殖能が最終的に低下することは、新しい皮質線維の供給の低下を意味し、白内障の治癒 (reversal) の可能性の低下、および糖白内障進行の要因となると我々は考えている。

ガラクトース単独投与の場合、糖白内障が進行し皮質の液化が高度となった時期においては上皮細胞の多層化領域が観察されることが知られている<sup>14)</sup>。多層化領域の細胞の多くは PCNA 陽性であることから、局所的に増殖が高まる結果、通常は一層である上皮細胞が多層化すると考えられる。しかし、なぜ局所的に細胞増殖が惹起されるのかはこれまで不明であった。今回、我々が観察したラット水晶体においては、すべて多層化領域に接する水晶体皮質は液化していた。逆に ARI により皮質の液化がほとんど抑制され、これらの水晶体では多層化領域の形成が観察されなかった。以上の結果から、皮質が液化することで上皮細胞の多層化領域が形成されることが推定される。水晶体上皮細胞が多層化する前段階すでに細胞の増殖能が亢進しており、皮質線維の液化により、細胞の基底膜より上方、つまり線維側へと細胞の増殖・堆積が進行している可能性がある。上皮細胞の多層化領域を構成する上皮細胞の多くは盛んな増殖能を有することが知られているが<sup>14)</sup>、水晶体皮質が液化することでどのようにシグナルが伝達され、上皮細胞の増殖能が局所的に惹起されるのかは、今後解明されるべき課題と考えられる。

ヒトにおいても AR は主に水晶体上皮細胞に存在するが、ヒト糖白内障においても異常な細胞増殖が起きているのかどうかは不明である<sup>22)23)</sup>。しかし、糖尿病による水晶体上皮細胞の増殖動態の変化は生じており、過去の報告では白内障術後に水晶体上皮細胞の異常増殖による前囊収縮<sup>2)</sup>および後囊混濁発症率は高いといわれている<sup>24)25)</sup>。ARI により、糖アルコールの蓄積の抑制とともに、上皮細胞の異常な増殖動態も同様に抑制できれば、糖白内障の抑制および糖白内障術後の合併症予防も可能になるかもしれない。

## 文 献

- 1) Chung J, Kim MY, Kim HS, Yoo JS, Lee YC : Effect of cataract surgery on the progression of diabetic retinopathy. *J Cataract Refract Surg* 28 : 626—630, 2002.
- 2) Kato S, Oshika T, Numaga J, Hayashi Y, Oshiro M, Yuguchi T, et al : Anterior capsular contraction after cataract surgery in eyes of diabetic patients. *Br J Ophthalmol* 85 : 21—23, 2001.
- 3) Kinoshita JH : Cataracts in galactosemia. *Invest Ophthalmol* 4 : 786—799, 1965.
- 4) Kinoshita JH : Mechanisms initiating cataract formation. Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol* 10 : 713—724, 1974.
- 5) 赤木好男, 田坂 宏, 田辺稔邦, 宮谷博史, 糸井素一 : 幼若および成熟ラットガラクトース白内障発症様式. *眼紀* 37 : 803—808, 1986.
- 6) 赤木好男, 照林宏文, 池部 均, 岡本庄之助, 高橋幸男, 辻 俊明, 他 : ラットガラクトース白内障の発症・進展について. *眼紀* 40 : 1985—1991, 1989.
- 7) 茨木信博, 松本康宏, 照林宏文, 池部 均, 辻俊明, 赤木好男, 他 : ラットガラクトース白内障の発症・進展について その 2. *眼紀* 41 : 1004—1009, 1990.
- 8) Dvornik E, Simard-Duquesne N, Krami M, Sestanj K, Gabbay KH, Kinoshita JH, et al : Polyol accumulation in galactosemic and diabetic rats : Control by an aldose reductase inhibitor. *Science* 182 : 1146—1148, 1973.
- 9) Datiles M, Fukui H, Kuwabara T, Kinoshita JH : Galactose cataract prevention with sorbinil, an aldose reductase inhibitor : A light microscopic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 22 : 174—179, 1982.
- 10) Kubo E, Miyoshi N, Fukuda M, Akagi Y : Cataract formation through the polyol pathway is associated with free radical production. *Exp Eye Res* 68 : 457—464, 1999.
- 11) 長田正夫 : 白内障に対する抗酸化剤ならびにアルドース還元酵素阻害剤 (ARI) の効果. *あたらしい眼科* 11 : 575—580, 1994.
- 12) Terubayashi H, Tsuji T, Okamoto S, Tsutsumi M, Akagi Y : The proliferative ability of the lens epithelium in rat galactose cataracts —Examination using whole-mount preparations—. *Acta Histochem Cytochem* 24 : 315—322, 1991.
- 13) Kubo E, Takayanagi K, Tsuzuki S, Akagi Y : Cell growth of rat lens epithelium in galactose-induced cataracts. *Acta Histochem Cytochem* 30 : 243—249, 1997.
- 14) Takamura Y, Kubo E, Tsuzuki S, Yagi H, Sato M, Akagi Y : Increased expression of p21 (WAF-1/CIP-1) in the lens epithelium of rat sugar cataract. *Exp Eye Res* 74 : 245—254, 2002.
- 15) Grimes P, Von Sallmann L : Lens epithelium proliferation in sugar cataracts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 7 : 535—543, 1968.
- 16) 照林宏文, 赤木好男, Kador PF, Kinoshita JH : ラットガラクトース白内障の水晶体上皮細胞増殖能. (1) 50% ガラクトース食餌飼育ラットにおいて. *日眼会誌* 92 : 1869—1874, 1988.
- 17) 高柳克典, 久保江理, 都筑昌哉, 小林達治, 森和彦, 高橋幸男, 他 : ラットガラクトース白内障における水晶体上皮細胞の動態—顕微蛍光測光法による核 DNA の定量—. *日眼会誌* 99 : 1127—1132, 1995.
- 18) 日比千尋 : アルドース還元酵素阻害薬 SNK-860. *日本臨床* 55 (増刊) : 212—215, 1997.
- 19) Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC, Kel-

- lock DB, Watkins JA**, et al : Proliferating cell nuclear antigen(PCNA) immunolocalization in paraffin sections : An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 162 : 285—294, 1990.
- 20) **Gordon O Guerrant, C Wayne Moss** : Determination of monosaccharides as aldonitrile, O-methylxine, alditol, and cyclitol acetate derivatives by gas chromatography. *Anal Chem* 56 : 633—638, 1984.
- 21) **Akagi Y, Kador PF, Kinoshita JH** : Immunohistochemical localization for aldose reductase in diabetic lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28 : 163—167, 1987.
- 22) 赤木好男, 馬嶋清如, 田坂 宏, 茶本 薫, 照林 宏文, 茨木信博, 他 : ヒト糖尿病性白内障における Aldose reductase の局在. *眼紀* 38 : 366—370, 1987.
- 23) 照林宏文, 堤元 信, 岡本庄之助, 池部 均, 赤木好男 : 全伸展標本による水晶体上皮細胞増殖能の検討 その3 ガラクトース食餌負荷によるマウス水晶体上皮細胞増殖能の変化. *日眼会誌* 96 : 9—14, 1992.
- 24) 安藤展代, 大鹿哲郎, 木村博和 : 後発白内障の発生に關与する多因子の検討. *臨眼* 53 : 91—97, 1999.
- 25) **Hayashi K, Hayashi H, Nakao F, Hayashi F** : Posterior capsule opacification after cataract surgery in patients with diabetes mellitus. *Am J Ophthalmol* 134 : 10—16, 2002.
-