

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：17401  
研究種目：若手研究  
研究期間：2018～2021  
課題番号：18K15422  
研究課題名(和文) 低血糖による糖尿病網膜症増悪におけるミトコンドリア由来活性酸素種の寄与解析  
  
研究課題名(英文) Hypoglycemia induces mitochondrial reactive oxygen species production and promotes retinal vascular permeability  
  
研究代表者  
梶原 伸宏 (Kajihara, Nobuhiro)  
  
熊本大学・病院・病院教員  
  
研究者番号：80814756  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：低血糖誘導性の糖尿病網膜症(DR)の背景にある機序として、低血糖時のミトコンドリア由来活性酸素(mtROS)産生による血液網膜関門(Blood-Retinal Barrier: BRB)の破綻が関連しているという仮説を立てた。そこで、低血糖がmtROS産生を増悪させ、BRB破綻を誘導するか否かを本研究の目的とした。糖尿病モデルマウス網膜において、反復する低血糖刺激は、酸化ストレスや血管透過性因子の発現、アルブミン漏出を増加させ、これらは血管内皮細胞特異的にMnSOD(mtROS特異的除去酵素)を発現させたトランスジェニックマウスで抑制された。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

低血糖時の網膜血管内皮細胞において脂肪酸酸化亢進を介してmtROS産生が増加すること、また低血糖由来mtROSがBRB破綻の一因になることを世界で初めて示した。低血糖時の脂肪酸酸化亢進の抑制は、低血糖による糖尿病網膜症発症・進展における新たな治療標的となりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：I hypothesized that the mechanisms underlying hypoglycemia-induced diabetic retinopathy are associated with blood-retinal barrier (BRB) breakdown due to mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) generation during hypoglycemia. Here, I aimed to determine whether hypoglycemia exacerbated mtROS production and induced BRB disruption. As the results, I observed that hypoglycemia induced mtROS production by increasing fatty acid oxidation (FAO), which was suppressed by overexpression of mitochondrial-specific manganese superoxide dismutase (MnSOD) in retinal endothelial cells. Furthermore, FAO blockade decreased the hypoglycemia-induced mtROS production. Recurrent hypoglycemia increased albumin leak in diabetic mice retina, which was suppressed in diabetic vascular endothelial cell-specific MnSOD transgenic mice.

研究分野：糖尿病合併症

キーワード：ミトコンドリア由来活性酸素種 低血糖 糖尿病網膜症 脂肪酸酸化 網膜血管内皮細胞 血管透過性

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病合併症の発症進展阻止のためには、合併症発症機序の解明が重要である。申請者らのグループではこれまでに、1) 高血糖が培養血管内皮細胞において mtROS の過剰産生を引き起こし、さらにこの mtROS がこれまで糖尿病合併症の成因と考えられていた細胞内代謝異常を引き起こすこと (Nature 2000)、2) 血管内皮細胞に特異的に MnSOD (mtROS 特異的除去酵素) を発現させたトランスジェニックマウス (eMnSOD Tg マウス) の開発に成功し、*in vivo* で mtROS の制御により、糖尿病網膜症の発症抑制が認められたこと (Biochem Biophys Res Commun 2008) 等を報告し、糖尿病およびその合併症発症において mtROS の関与が大きいことを明らかにしている。現在、合併症発症の機序は未だ一定の見解が得られていないが、申請者らの仮説である mtROS の関与が糖尿病合併症の最も重要な因子であることが世界中で認められつつある。

一方で、重篤な低血糖が細小血管合併症増悪のリスクを増加させる (N Engl J Med 2010)、低血糖が致死的な心血管障害をもたらす (Diabetes 2014) と報告されるなど、低血糖と糖尿病合併症の関連が近年注目されている。申請者らは、ウシ大動脈血管内皮細胞において、低グルコース状態による脂肪酸酸化亢進を介して mtROS が産生増加し、血管内皮障害を誘導することを世界で初めて報告した (J Diabetes Investig 2017)。また 1 型糖尿病患者において、低血糖は血管内皮障害や酸化ストレスを増大させるという報告もある (Diabetes 2012)。

2 型糖尿病患者を対象とした Kumamoto Study のサブ解析 (糖尿病合併症 1994) および 1 型糖尿病を対象とした DCCT (N Engl J Med 1993) の報告では、血糖是正開始後 1 年以内の網膜症進展症例が通常血糖管理群よりも厳格血糖管理群において多いという結果が報告され、その一因として低血糖の関与が強く疑われている。初期の糖尿病網膜症の病態は血液網膜関門のバリア機構破綻による血管透過性の亢進とされ、その病態に対し酸化ストレスの関与が報告されている (Diabetes 2010)。そこで、「低血糖による糖尿病網膜症の発症・進展機序においても、低血糖による脂肪酸酸化亢進を介した mtROS の増加が血管透過性の亢進に関与する」との仮説を立てた。低血糖による mtROS 過剰産生が急激な血糖是正や繰り返す低血糖による網膜症進展の主因であることを解明することにより、低血糖 - 脂肪酸酸化亢進 - mtROS 産生増加の経路を抑制することが、厳格な血糖コントロールを行う際の新規合併症治療法となりうることを証明したいと考えた。

## 2. 研究の目的

網膜症は、急激な血糖是正を契機に一過性に進展することが知られており、その一因として、低血糖の関与が提唱されている (Diabetes J 1992)。しかしながら、低血糖による網膜症増悪の機序は未だ解明されない。初期の糖尿病網膜症の病態である血液網膜関門の破綻に着目し、低血糖により誘導された mtROS が血液網膜関門の破綻に寄与する可能性を明らかにすることを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

糖尿病モデル動物に対する低血糖刺激による網膜症発症への影響の検討：  
野生型マウスと申請者が作製した血管内皮特異的 MnSOD トランスジェニックマウスに対してストレプトゾトシンを腹腔内投与し糖尿病モデルマウスを作製する。インスリン腹腔内投与により低血糖刺激 (目標血糖 45 mg/dL、持続時間 60 分) を計 6 回 (3 回/週) 行い、低血糖が網膜へ及ぼす影響について検討する。低血糖刺激終了後に網膜切片を作製し、酸化ストレスマーカーである 8-OHdG、血管透過性の亢進を誘導する Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ならびに血管透過性への影響を検討する。

網膜血管内皮細胞における低グルコース刺激による mtROS 産生及び血管透過性への影響の検討：

ヒト網膜毛細血管内皮細胞を用いて、低グルコース刺激による mtROS 産生量の変化、脂肪酸酸化への影響を検討する。また、低グルコース刺激により増加した mtROS による血管透過性への影響、VEGF の発現や細胞間接着因子である VE-cadherin の発現や活性化への関与について検討を行う。

## 4. 研究成果

糖尿病モデルマウス網膜において、反復する低血糖刺激は、酸化ストレス、血管透過性因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) 発現、アルブミン漏出を増加させ、これらは血管内皮細胞特異的 MnSOD 発現トランスジェニックマウスでは抑制された。遊離脂肪酸のトランスポーターである carnitine palmitoyltransferase I (CPT1) の阻害剤 (etomoxir) を用いた薬理的脂肪酸酸化阻害もまた、糖尿病モデルマウス網膜において低血糖刺激による mtROS、VEGF の産生および血管透過性亢進を抑制した。

網膜毛細血管内皮細胞において、低グルコース状態は mtROS 産生増加を誘導すること、それらが mtROS 特異的除去酵素である manganese superoxide dismutase (MnSOD) を過剰発現させる

ことにより抑制されることを確認した。また、etomoxir を用いることで、低グルコース誘導 mtROS の産生が抑制された。このことから、低グルコース状態において、脂肪酸が mtROS 産生増加の基質であることが示唆された。さらに、低グルコース状態の網膜毛細血管内皮細胞で、VEGF 発現増加、細胞間接着因子 VE カドヘリン (vascular endothelial-cadherin) のリン酸化および細胞質内への移行の亢進、血管透過性の亢進を認めた。これらは、MnSOD 過剰発現または CPT1 阻害により抑制された。

以上の結果から、低血糖時の網膜血管内皮細胞において脂肪酸酸化亢進を介して mtROS 産生が増加すること、また低血糖由来 mtROS が BRB 破綻の一因になることを初めて示した。低血糖時の脂肪酸酸化亢進の抑制は、低血糖による糖尿病網膜症発症・進展における新たな治療標的となりうると考えられた。これらの結果を *Antioxid Redox Signal* (2021 Jun 1;34(16):1245-1259) にて報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshinaga Ayaka, Kajihara Nobuhiro, Kukidome Daisuke, Motoshima Hiroyuki, Matsumura Takeshi, Nishikawa Takeshi, Araki Eiichi	4. 巻 34
2. 論文標題 Hypoglycemia Induces Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production Through Increased Fatty Acid Oxidation and Promotes Retinal Vascular Permeability in Diabetic Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antioxidants & Redox Signaling	6. 最初と最後の頁 1245 ~ 1259
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ars.2019.8008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉永礼香, 梶原伸宏, 久木留大介, 本島寛之, 松村剛, 西川武志, 荒木栄一
2. 発表標題 低血糖による糖尿病網膜症の発症・進展に対するミトコンドリア由来活性酸素種 (mtROS) の関与
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉永礼香, 梶原伸宏, 久木留大介, 本島寛之, 松村剛, 西川武志, 荒木栄一
2. 発表標題 脂肪酸酸化を介した低血糖誘導ミトコンドリア由来活性酸素種 (mtROS) の血液網膜閉門への影響の検討
3. 学会等名 第35回日本糖尿病合併症学会・第26回日本糖尿病眼学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梶原伸宏
2. 発表標題 低血糖下の血管内皮細胞における脂肪酸酸化を介したミトコンドリア由来活性酸素種の産生増加 - 糖尿病合併症新規メカニズムの提唱 -
3. 学会等名 第71回日本体質医学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------