

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18852

研究課題名（和文）高脂肪食による視覚障害モデルを用いた加齢黄斑変性に対する新規神経保護治療の解析

研究課題名（英文）Analysis of neuroprotection in age-related macular degeneration using high fat diet-induced vision loss models

研究代表者

園部 秀樹（SONOBE, Hideki）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：00815821

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：加齢黄斑変性(age-related macular degeneration; AMD)は、眼底の中心である黄斑に病変を生じるため、重篤な視力障害をきたす。滲出型AMDでは治療をしても後遺症が残り、萎縮型AMDの治療法は現時点では世界的に無い。メタボリックシンドローム(Clemons et al. Ophthalmology 2005)がリスクといわれるが病態に関連するメカニズムは不明である。そこで、高脂肪食を継続して摂取させたメタボリックシンドロームモデルマウスを作製し、その網膜病変を解析した。これにより新規なAMD進行予防治療の開発につながった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢黄斑変性の根本的病態に迫る治療は、世界的に治療法が無く、そのメカニズムにも不明な点が多い。そこで本研究には、医学的な病態解明の一端を果たした点で学術的意義があり、世界初の治療法開発の可能性を目指した点で社会的意義があった。殊に、現代人が節制しきれず、避けて通れない高脂肪食に着目した研究であり、その病態意義を分子レベルで明らかにすることは、社会的メッセージが強く有意義であった。

研究成果の概要（英文）：Age-related macular degeneration (AMD) leaves after-effects even if it is treated, and some patients cannot be applied any treatment currently. In the current study, we generated a model of metabolic syndrome which is one of the main risks of AMD, and analyzed the pathogenesis and visual disorders in order to propose a future possibility of treating AMD with a new approach.

研究分野：医学

キーワード：生活習慣病 加齢黄斑変性 失明

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性(age-related macular degeneration; AMD)は、先進国における主要な失明原因の1つであり、眼底の中心である黄斑に病変を生じるため、重篤な視力障害をきたし Quality of life (QOL)を脅かす。抗血管内皮増殖因子(抗vascular endothelial growth factor; 抗VEGF)療法で治療される滲出型AMDに対し、原因不明で進行性の萎縮型AMDには世界的に治療法がない。AMDにはマクロファージの異常を伴う炎症が関連することは報告される(Sene, Apte et al. Cell metab 2013)が、その介入法は示されていない。そもそもAMDの治療開発に使えるようなAMDモデルマウスがないことが、研究を進めるハードルとなっているのである。

本疾患のリスク因子として、肥満や高血圧・動脈硬化に代表されるメタボリックシンドロームがあることが臨床研究により明らかにされた(Clemons et al. Ophthalmology 2005)(図1)。メタボリックシンドロームの説明にはメタボリックドミノという考え方がある。生活習慣の乱れによって肥満やインスリン抵抗性が上がると、食後高血糖や高血圧、脂質異常症が次々と発症し、最終的には全身合併症をきたすという考え方である。そして、その上流にあるシグナルの一つがレニン・アンジオテンシン系を含む炎症関連因子や炎症性サイトカインであり、それに慢性的に暴露されることで様々な疾患が発症への道を進むことになるという(Itoh Drug Today 2006)。

1. 加齢
2. 喫煙
3. high-BMI (肥満)
4. 高血圧
5. 動脈硬化
6. 光暴露
7. 補体の遺伝子異常

図1 AMDのリスク因子

AMDの病態には、このようなリスク因子に伴う慢性炎症と酸化ストレスの悪性サイクルがあり、その末に発症するものだということが知られている(Ozawa Redox Biology 2020)(図2)。そこで高脂肪食連日投与によるメタボリックシンドロームモデルマウスがAMDの所見の一部を示し、AMDモデルとして利用可能であれば、将来の新規治療法の開発の道を切り開くことになると考えた。



図2 AMDの病態の説明

申請者の研究室では、これまでにRASが糖尿病網膜症における網膜神経変性による視機能低下の原因であり、その抑制剤であるアンジオテンシンII 1型受容体拮抗剤(Angiotensin II Type 1 Receptor Blocker; AT1R blocker, ARB)が神経変性・視機能低下を抑制することを示した(Kurihara, Ozawa et al. Diabetes 2008)。また、RASは強い光に暴露された網膜において視細胞死を引き起こすシグナルの一つとなることも報告した(Narimatsu, Ozawa et al. Free Radical Biology and Medicine 2014)。さらに、それ以外の炎症性サイトカインの関連する網膜病態の研究を多数手がけてきた。そこで、今回の高脂肪食による萎縮型AMDモデルにおいてもRASやそのほかの炎症性サイトカインに着目した解析を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究は、加齢性失明疾患で現時点では治療法のない萎縮型AMDの病態メカニズムの解析をするために、高脂肪食を連日与えたマウスを用いることがAMDのモデルとなり得るかを解析するものであり、さらにその病態をRAS等の炎症関連分子に着目して解析するものである。RASは網膜だけでなくAMDの病態に関与しうるマクロファージ(上述)においても活性化して病態に関与(図3)しうると仮説を立て、両方について解析する。将来的には新規治療法の開発につなげるこ

とを目的とする。

3. 研究の方法

計画 1 高脂肪食を連日摂取させるモデルマウス(高脂肪食マウス)の作製

5 週齢の雄の BALB/c マウスに対し、高脂肪食もしくはコントロールとなる通常食を連日摂取させた。高脂肪餌は、日本クレア社が販売する脂肪を 32%含む餌を用い、コントロール餌は日本クレア社から購入した脂肪が 4.6%含まれるものを用いた。そして経時的に体重、血糖、血中インスリン値、血圧等を測定し、マウスの全身状態を解析した。

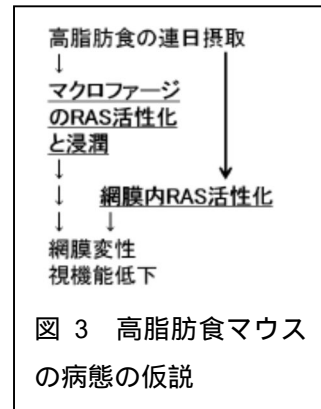


図 3 高脂肪食マウスの病態の仮説

計画 2 高脂肪食マウスの視機能測定

高脂肪食マウスとコントロールマウスの視機能を網膜電図 (Electroretinogram; ERG)を用いて経時的に測定した。ERG は研究室にある機器を用いて測定(図 4)した。

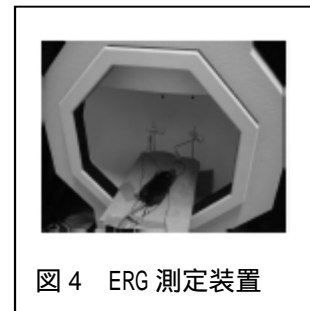


図 4 ERG 測定装置

計画 3 高脂肪食マウスの網膜組織学的解析

高脂肪食マウスとコントロールマウスの網膜を固定し、網膜切片を作成して、rhodopsin, glutamine synthetase, GFAP 等の染色をするとともに、マクロファージマーカーである F4/80 等も染色した。網膜および網膜に隣接する組織である脈絡膜を詳しく解析した。また、電子顕微鏡による解析も行った。

計画 4 高脂肪食マウスのマクロファージの解析

高脂肪食マウスとコントロールマウスの腹腔にチオグリコネートを投与し、集積したマクロファージを回収して、性質の違いを解析した。この手法はすでに研究室の平沢学訪問講師・永井紀博講師が確立しており、論文発表も行った方法である(Hirasawa, Nagai, Ozawa et al. J Biol Chem 2016)。特に、RAS のほか、マクロファージが産生する炎症性サイトカイン (IL-6, IL-1 など)や、脂質関連分子としてコレステロール排出に必要なトランスポーターの ABCA1 等の発現をリアルタイム PCR や ELISA を用いて解析した。

4. 研究成果

1 か月の継続摂取を行った高脂肪食マウスの全身状態は、コントロールマウスと比べて明らかに体重、血糖、血圧が上がっていた。しかし、血糖は上がっていたがマウスにおける糖尿病の基準となる 250mg/dl には及ばず、インスリン値も同等であったことから、糖尿病にはなっていないことが明らかとなった(図 5)。従来、BALB/c マウスでは耐糖能が保たれやすいことが知られ、それに合致した。

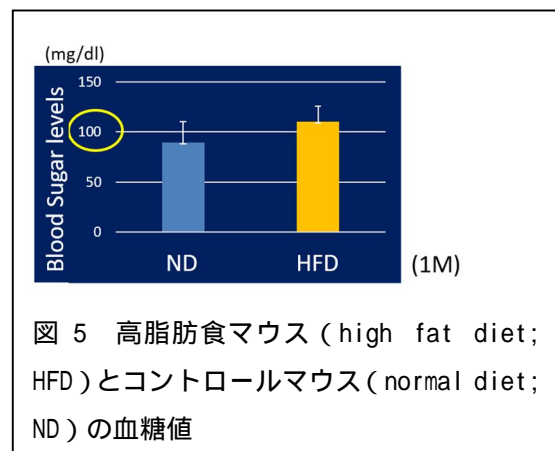


図 5 高脂肪食マウス (high fat diet; HFD) とコントロールマウス (normal diet; ND) の血糖値

同じく1か月の継続摂取を行った高脂肪食マウスの視機能(ERG 反応)は、コントロールマウスと比べて明らかに低下していた。しかし、免疫染色で明らかな網膜細胞の減少等は見られなかった。すなわち、細胞死というより、機能的障害をきたしていた。電子顕微鏡においては、網膜色素上皮細胞内に、異常な脂肪沈着があることが明らかとなった。

一方、マクロファージについては、1か月の継続摂取を行った高脂肪食マウスでは脈絡膜への浸潤があることが示され、腹腔内マクロファージではアンジオテンシン II 1型受容体や ABCA-1 の発現や VEGF 等の炎症性サイトカインの発現が上昇していることが示された。

このように、BALB/c 系統を用いた高脂肪食マウスは AMD の表現型の一端を再現し得ることが示され、今後の AMD に対する新規治療法の開発に用いることができる可能性が示された。これにより、AMD に対する新規治療法、殊に進行予防法の開発につながる可能性が開けたといえた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Nagai Norihiro, Suzuki Misa, Minami Sakiko, Kurihara Toshihide, Kamoshita Mamoru, Sonobe Hideki, Watanabe Kazuhiro, Uchida Atsuro, Shinoda Hajime, Tsubota Kazuo, Ozawa Yoko	4. 巻 9
2. 論文標題 Dynamic changes in choroidal conditions during anti-vascular endothelial growth factor therapy in polypoidal choroidal vasculopathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-47738-9	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 -
1. 著者名 Saito Sonoko, Tanaka Ryo, Sasaki Takashi, Aoki Satomi, Yasuraha Rieko, Nakayama Yuri, Nagai Toshihiro, Sonobe Hideki, Ozawa Yoko, Kubo Akiharu	4. 巻 47
2. 論文標題 Subclinical hypopigmentation of the skin and hair in a Japanese patient with Hermansky-Pudlak syndrome type 3	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e18-e20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138	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 -
1. 著者名 Suzuki Misa, Nagai Norihiro, Minami Sakiko, Kurihara Toshihide, Kamoshita Mamoru, Sonobe Hideki, Watanabe Kazuhiro, Shinoda Hajime, Tsubota Kazuo, Yoko Ozawa	4. 巻 258
2. 論文標題 Predicting recurrences of macular edema due to branch retinal vein occlusion during anti-vascular endothelial growth factor therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 49-56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00417-019-04495-9	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 -
1. 著者名 Minami Sakiko, Nagai Norihiro, Suzuki Misa, Kurihara Toshihide, Sonobe Hideki, Watanabe Kazuhiro, Shinoda Hajime, Takagi Hitoshi, Tsubota Kazuo, Ozawa Yoko	4. 巻 9
2. 論文標題 Spatial-sweep steady-state pattern electroretinography can detect subtle differences in visual function among healthy adults	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-54606-z	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 -

1. 著者名 Minami Sakiko, Shinoda Hajime, Shigeno Yuta, Nagai Norihiro, Kurihara Toshihide, Watanabe Kazuhiro, Sonobe Hideki, Takagi Hitoshi, Tsubota Kazuo, Ozawa Yoko	4. 巻 9
2. 論文標題 Effect of axial length and age on the visual outcome of patients with idiopathic epiretinal membrane after pars plana vitrectomy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-55544-6	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 -

1. 著者名 Nagai Norihiro, Asato Teru, Minami Sakiko, Suzuki Misa, Shinoda Hajime, Kurihara Toshihide, Sonobe Hideki, Watanabe Kazuhiro, Uchida Atsuro, Ban Norimitsu, Tsubota Kazuo, Ozawa Yoko	4. 巻 12
2. 論文標題 Correlation between Macular Pigment Optical Density and Neural Thickness and Volume of the Retina	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 888 ~ 888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu12040888	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 永井紀博, 鈴木美砂, 南早紀子, 栗原俊英, 園部秀樹, 渡邊一弘, 篠田肇, 坪田一男, 小沢洋子
2. 発表標題 健常者と加齢黄斑変性の傍眼の黄斑色素密度と視細胞外節長.
3. 学会等名 第73回日本臨床眼科学会
4. 発表年 2019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
---------	---------