

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 12 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590102

研究課題名（和文） 糖尿病に起因する網膜循環異常発症の分子基盤解明と
網膜症の新規予防戦略研究課題名（英文） Elucidation of the molecular basis attributed to onset of abnormal
retinal hemodynamics and strategy of novel prevention drugs for retinopathy.

研究代表者

石井 邦雄（ISHII KUNIO）

北里大学・薬学部・教授

研究者番号：90137993

研究成果の概要（和文）：本研究では、糖尿病ラットにおいて早期の段階に高コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ (BK_{Ca}) チャネルの活性化を介した網膜血管拡張反応が減弱することを示した。また、糖尿病ラットの網膜血管において、酸化ストレスが亢進していることも示唆された。このように、 BK_{Ca} の機能障害と酸化ストレスの亢進が糖尿病における網膜循環障害に寄与しており、糖尿病網膜症の発症に重要な役割を演じている可能性がある。従って、網膜循環を改善し、さらには酸化ストレスを抑制するような薬物が、糖尿病時の網膜循環障害に対する新規予防薬となり得る。

研究成果の概要（英文）：This study demonstrated that retinal vasodilator responses mediated through the mechanism involving activation of the large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ (BK_{Ca}) channel was diminished at the early stage of diabetes in rats. Furthermore, it was suggested that the oxidative stress was increased in retinal blood vessels of diabetes rats. Thus, impairment of BK_{Ca} channel function and increased oxidative stress may contribute to abnormal retinal hemodynamics in diabetes and consequently play an important role in the pathogenesis of diabetic retinopathy. In conclusion, drugs that improve retinal circulation and possess antioxidative effect are considered to be novel candidates for prevention of retinopathy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：薬理学・微小循環・糖尿病・血管生物学・網膜

1. 研究開始当初の背景

社会の高齢化とグルメ化が急速に進行しつつある我が国において、糖尿病の患者数は増加の一途をたどっている。糖尿病は様々な合併症を伴うが、中でも網膜症は失明の危険

性が極めて高く、QOL を著しく低下させる疾患として、その病態の解明と予防法・治療法の確立が待ち望まれている。これまでの研究により、糖尿病網膜症の発症には網膜血管病変に起因する網膜循環障害が大きく関与

していること、そして二次的に生じる網膜の虚血ならびに低酸素状態がさらに病態の悪化を招くという、悪循環が示されている。従って、網膜循環の正常化こそが、糖尿病網膜症の発症と進行を抑制する上で最優先されるべき治療法と言っても過言ではないが、現在のところ、網膜循環を改善する有効な手段は存在しない。その原因として、網膜循環調節機構に対する理解が不十分なため、糖尿病に起因する網膜循環調節異常の分子基盤が未だ解明されていないという点を挙げる事ができる。

2. 研究の目的

本研究は、申請者らが構築した各種網膜循環評価法を用いて、糖尿病初期に観察される網膜循環調節異常に焦点を絞ってその分子基盤を解明し、網膜循環の正常化に基づく糖尿病網膜症の新規予防戦略を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 網膜血管反応性の評価：ラットの眼底を、申請者らが製作した小動物眼底撮影用デジタルマイクロスコープを用いて経時的に撮影し、画像処理して網膜血管径を測定することにより行った。

(2) 糖尿病モデルラットの作製：ラットにストレプトゾトシン (65 mg/kg, i.v.) を単回投与し、かつ 5% ブドウ糖水溶液を飲水として与える方法により重度の 1 型糖尿病を発症させた。発症 2 週間後に網膜血管反応性を評価した。

4. 研究成果

(1) 健常ラットを用いた検討

①内皮由来過分極因子 (EDHF) の網膜血管拡張機序：一酸化窒素 (NO) 合成酵素阻害薬及びcyclooxygenase (COX) 阻害薬を前投与した条件下において、acetylcholine (ACh) の EDHF を介する網膜血管拡張作用は、高コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ (BK_{Ca}) チャネル遮断薬により抑制された。従って、EDHF による網膜血管拡張反応には BK_{Ca} チャネルの活性化が関与していることが示唆された。

②交感神経作動薬の血管反応性：[i] β_2 受容体刺激薬と β_3 受容体刺激薬のいずれもが網膜血管を拡張させることを明らかにした。[ii] β_2 受容体刺激薬による網膜血管拡張反応は BK_{Ca} チャネル阻害薬により一部抑制された。一方、 β_3 受容体刺激薬による反応は BK_{Ca} チャネル阻害薬による影響を受けなかった。このように、糖尿病時の β_2 受容体刺激による網膜血管拡張反応の減弱には、 BK_{Ca} チャネルの障害が関与している可能性を示唆した。

(2) 糖尿病モデルラットを用いた検討

①EDHF の網膜血管拡張機序：[i] 糖尿病モデルラットの網膜血管において、 K_{ATP} チャネル開口薬による拡張反応は正常ラットと同程度であったことから、EDHF による網膜血管拡張反応に K_{ATP} チャネルの寄与が少ない可能性が示唆された。[ii] 糖尿病モデルラットにおいて、NO 合成酵素阻害薬及び COX 阻害薬存在下、ACh の EDHF 様網膜血管拡張反応は減弱していた。さらに、 BK_{Ca} チャネル開口薬による網膜血管拡張反応も糖尿病モデルラットにおいて減弱していた。従って、EDHF を介する網膜血管拡張反応の減弱に、 BK_{Ca} チャネルを介する血管拡張機序の障害が関与している可能性がある。

②交感神経作動薬の血管反応性：糖尿病モデルラットでは、 β_2 受容体を介する網膜血管拡張反応は減弱するが、 β_3 受容体を介する反応は影響を受けないことが示唆された。

③網膜血管拡張障害におけるポリオール経路の意義：糖尿病モデルラットで観察される ACh による網膜血管拡張障害は、ポリオール経路の律速酵素であるアルドース還元酵素阻害薬を糖尿病発症と同時に投与しても改善することはなかった。一方、糖尿病モデルラットにおける白内障の発症や進行は、網膜血管障害に適用した約 1/6 量のアルドース還元酵素阻害薬の投与で抑制された。以上の結果から、糖尿病時の網膜血管障害におけるポリオール経路活性化の関与は少ないのかもしれない。

④網膜血管及び網膜神経における酸化ストレスマーカーの発現変動解析：網膜凍結切片を作製し、脂質過酸化マーカーである

4-Hydroxy-2-nonenal (4-HNE) の発現を免疫染色法により観察したところ、糖尿病モデルラットの網膜血管及び網膜神経細胞において、健常ラットでは観察されなかった 4-HNE の発現が著しく増加していた。従って、糖尿病時には網膜血管のみならず網膜神経の酸化ストレスが亢進し、網膜循環障害及び網膜神経傷害が生じている可能性が示された。

(3) 総括

糖尿病時の網膜循環障害は、 BK_{Ca} を介する機能障害に伴う網膜血管拡張能が低下により生じること、このことが網膜神経傷害を悪化させる一因となる可能性を示唆した。さらに、糖尿病時には網膜血管の酸化ストレスが亢進することから、網膜循環を改善し、かつ酸化ストレスを抑制するような薬物が、糖尿病時の網膜循環障害に対する有用な予防・治療薬となり得る。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Mori A, Hanada M, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. Noradrenaline contracts rat retinal arterioles via stimulation of α_{1A} - and α_{1D} -adrenoceptors. *Eur J Pharmacol.* 673: 65-69. 2011.12 査読有
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.10.012>
- ② Mori A, Nakahara T, Sakamoto K, Ishii K. Role of β_3 -adrenoceptors in regulation of retinal vascular tone in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 384: 603-608. 2011.12 (査読有)
<http://dx.doi.org/10.1007/s00210-011-0682-2>
- ③ Mori A, Suzuki S, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. Vasodilation of retinal arterioles induced by activation of BK_{Ca} channels is attenuated in diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 669: 94-99. 2011.11 (査読有)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.07.042>
- ④ Mori A, Suzuki S, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. BMS-191011, an opener of large-conductance Ca²⁺-activated potassium channels, dilates rat retinal arterioles in vivo. *Biol Pharm Bull.* 34: 150-152. 2011.1 (査読有)
<http://dx.doi.org/10.1248/bpb.34.150>
- ⑤ Mori A, Suzuki S, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. Role of calcium-activated potassium channels in acetylcholine-induced vasodilation of rat retinal arterioles in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 383: 27-34. 2011.1 (査読有)
<http://dx.doi.org/10.1007/s00210-010-0570-1>
- ⑥ Mori A, Miwa T, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. Pharmacological evidence for the presence of functional β_3 -adrenoceptors in rat retinal blood vessels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 382: 119-126. 2010.8 (査読有)
<http://dx.doi.org/10.1007/s00210-010-0526-5>
- ⑦ Nakahara T, Mori A, Sakamoto K, Ishii K. Drugs for improving retinal circulation: current status and future perspectives. *日本薬理学雑誌*. 135(4): 146-148. 2010. 4 査読無
<http://dx.doi.org/10.1254/fpj.135.146>
- ⑧ Mori A, Saigo O, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. Hyperglycemia impairs acetylcholine-induced vasodilation of retinal arterioles through polyol pathway-independent mechanisms in rats. *J Pharmacol Sci.* 112: 336-342. 2010.3 (査読有)
<http://dx.doi.org/10.1254/jphs.09312FP>

[学会発表] (計 14 件)

- ① Mori A, Takei T, Morita M, Nakagawa S, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. L-Citrulline dilates retinal blood vessels in rats. 第 85 回日本薬理学会年会 (京都) 日本薬理学会 2012.3.15
- ② Takei T, Mori A, Morita M, Nakagawa S, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. L-Citrulline ameliorates dysfunction of retinal circulation in diabetic rats. 第 85 回日本薬理学会年会 (京都) 日本薬理学会 2012.3.14
- ③ 森 麻美, 鈴木佐知, 坂本謙司, 中原 努, 石井邦雄 EDHF は BKCa チャネルを介してラット網膜血管を拡張させる 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2011 (東京) 日本薬学会薬理系薬学部会 2011.8.31
- ④ 森 麻美, 花田真幸, 坂本謙司, 中原 努, 石井邦雄 新規網膜血流量測定システムの構築とそれによる網膜循環改善薬の探索 第 12 回 Pharmacology-Hematology シンポジウム 2011.6.18
- ⑤ 森 麻美, 花田真幸, 坂本謙司, 中原 努, 石井邦雄 NMDA 誘発緑内障モデルにおける網膜血管反応性の変化 第 124 回日本薬理学会関東部会 2011.6.4
- ⑥ Hanada M, Mori A, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. Changes in responsiveness of the retinal blood vessels induced by intravitreal injection of NMDA in rats 第 84 回日本薬理学会年会 2011.3.24
- ⑦ 森 麻美, 鈴木佐知, 坂本謙司, 中原 努, 石井邦雄 ACh 誘発 EDHF 様ラット網膜血管拡張反応における BKCa チャネルの役割 第 20 回日本循環薬理学会 (札幌) 日本循環薬理学会 2010.11.11 [第 38 回薬物活性シンポジウム・第 20 回日本循環薬理学会口演要旨集 P94. 2010.11]
- ⑧ Kunio Ishii, A Mori, K Sakamoto, T Nakahara. NO dilates rat retinal blood vessels through the COX-1-dependent prostanoids-cAMP signalling pathway in vivo. 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology WorldPharma 2010. (Copenhagen, Denmark) 2010.6.17-23
- ⑨ 森 麻美, 西郷織江, 坂本謙司, 中原 努, 石井邦雄 高血糖はポリオール経路非依存性機序を介してアセチルコリンによるラット網膜細動脈拡張を障害する 日本薬学会第 130 回年会 (岡山) 日本薬学会 2010.3.30
- ⑩ Ishii K, Mori A, Sakamoto K, Nakahara T. Drugs for improving retinal circulation: Current status and future. 第 83 回日本薬理学会年会 (大阪) 日本薬理学会 2010.3.18
- ⑪ Mori A, Nakahara T, Hoshino M, Sakamoto K, Ishii K. NO dilates retinal arterioles through the COX-1 derived prostanoids-cAMP signaling pathway in rats *in vivo*. 第 83 回日本薬理学会年会 (大阪) 日本薬理学会 2010.3.16
- ⑫ 石井邦雄 1 型糖尿病モデルラットを用いた網膜循環障害発症機序の解析 日本薬

学会関東支部第 34 回学術講演会 (東京)
日本薬学会 2009.11.7

⑬石井邦雄、中原 努、坂本謙司、森 麻美
糖尿病モデルラットを用いた糖尿病性眼合併症の発症・進行機序の解析：ポリオール経路の意義 第 121 回日本薬理学会関東部会 (東京) 日本薬理学会 2009.10.10

⑭鈴木佐知、森 麻美、中原 努、坂本謙司、石井邦雄 ACh 誘発ラット網膜血管拡張反応における K_{Ca} channel の関与 第 120 回日本薬理学会関東部会 (東京) 日本薬理学会 2009.7.11

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

石井 邦雄 (ISHII KUNIO)

北里大学・薬学部・教授

研究者番号 : 90137993

(2)研究分担者

中原 努 (NAKAHARA TSUTOMU)

北里大学・薬学部・准教授

研究者番号 : 10296519

森 麻美 (MORI ASAMI)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号 : 80453504

(3)連携研究者 ()

研究者番号 :