

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791976

研究課題名（和文）

脂肪細胞由来因子を標的とした虚血性網膜症の病態解明

研究課題名（英文）

Elucidation of role of adiponectin in regulation of ischemic retinopathy

研究代表者

樋口 暁子 (HIGUCHI AKIKO)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50599032

研究成果の概要（和文）：

糖尿病網膜症などの虚血性網膜症は病的網膜血管新生を伴い視覚障害をきたす重篤な疾患である。脂肪由来分泌蛋白であるアディポネクチンは2型糖尿病や糖尿病の大血管障害に対して防御作用を有する分子である。我々は、アディポネクチン欠損・過剰発現マウスに対して酸素誘発性網膜症マウスを作製し、アディポネクチンが炎症性反応を抑制し、病的新生血管の進行を抑制することにより虚血性網膜症網膜障害を改善することを明らかにした。従って、アディポネクチンは虚血性網膜症の治療法開発の標的分子になりうる可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：

Ischemic retinopathy such as diabetic retinopathy is one of serious blinding diseases. Adiponectin is an adipose-derived secreted protein that has beneficial effects on type 2 diabetes and its macrovascular complications. Our study with gain of function and loss of function genetic manipulations demonstrated that adiponectin protects against the development of ischemic retinal injury in a mouse model of oxygen-induced retinopathy through its ability to attenuate inflammatory response and pathological neovascularization in the retina. Thus, adiponectin may represent a molecular target for the prevention and treatment of ischemic retinopathy.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科

キーワード：虚血性網膜症、血管新生、炎症、アディポサイトカイン

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症や未熟児網膜症といった虚血性網膜症は病的網膜血管の発生を伴う、高

頻度に失明や視覚障害をきたす重篤な疾患である。未熟児網膜症の病態として、未熟児

の網膜血管は網膜周辺部に到達しておらず、高濃度酸素を投与すると、網膜周辺部は低酸素状態となり、病的新生血管が生じる。糖尿病網膜症では、高血糖が内皮細胞の障害、網膜血管の途絶と虚血、血管内皮への白血球の接着増加を引き起こし、それに伴って、血管新生増殖因子や炎症惹起性サイトカインの産生が高まり、最終的に病的新生血管が生じる。しかし、増殖因子や炎症性サイトカインのクロストークは複雑であり、その病態は十分には解明されていない。

虚血性網膜症の病態において、網膜の病的血管新生や血管障害を防ぐことは視力低下を予防することにつながるため、血管新生阻害療法、炎症抑制療法は有効であると、国内外で認められている。近年、血管増殖因子である VEGF を阻害する薬剤が増殖糖尿病網膜症や未熟児網膜症の治療に臨床応用されているが、効果は一過性であり、確立された薬物療法が期待されている。

アディポネクチンは脂肪細胞から分泌される血中蛋白で、その血中濃度は2型糖尿病で著明に低下している。これまでの研究成果によると、アディポネクチンは糖尿病の発症進展に対して、防御的に作用するのみならず、糖尿病合併症である大血管障害、特に動脈硬化、虚血性心疾患に対しても防御作用を有する分子である。また、アディポネクチンの抗糖尿病作用、抗動脈硬化作用機序として抗炎症作用が関与していることが注目されている。

以前に、アディポネクチン欠損マウスに酸素誘発性網膜症モデルを作製し、内因性アディポネクチンが虚血性網膜障害に対して抑

制的に作用する可能性を報告した (Circ Res 2009)。しかし、アディポネクチンの糖尿病網膜症に対する詳細な解析やその作用機序は十分には解明されていない。そこで、本研究では、虚血性網膜症発症進展に対するアディポネクチンの作用と分子機構を明らかにし、糖尿病網膜症などの虚血性網膜症の病態解明と治療法の開発を企図するものである。

2. 研究の目的

虚血性網膜症である糖尿病網膜症は糖尿病の最小血管合併症であり、高頻度に失明や視覚障害を伴う重篤な疾患で、その病態解明と治療法の開発は最重要課題である。本研究では、糖尿病大血管合併症に防御的に作用する脂肪細胞由来血漿蛋白であるアディポネクチンに着目し、虚血性網膜症発症進展に対するアディポネクチンの作用と分子機構を明らかにし、糖尿病網膜症などの虚血性網膜症の病態解明と治療法の開発を企図するものである。

3. 研究の方法

虚血性網膜症におけるアディポネクチンの役割を個体レベルで解明し、その作用機序を明らかにするため、以下の解析を行った。(1) アディポネクチン過剰発現マウスを用いて酸素誘発性網膜症マウスモデルを作製し、網膜傷害を詳細に評価する。(2) アディポネクチン欠損マウスとアディポネクチン過剰発現マウスを用いて、虚血性網膜傷害とシグナル伝達経路を比較検討する。(3) アディポネクチンによる網膜傷害調節における受容体の役割の解明のため siRNA を用いて解析する。

方法

① 酸素誘発性網膜症モデル：

新生児マウスを生後 7 日から 12 日まで高酸素濃度（75%）で飼育する。生後 12 日より 17 日まで大気下での飼育に戻すことにより、網膜は相対的な虚血に陥り、病的血管新生と炎症性変化を伴う、虚血性網膜症の状態となる。

マウスは脂肪組織特異的アディポネクチン過剰発現マウス、アディポネクチン欠損マウスと野生型マウスを用いた。

② 網膜血管新生の解析：

生後 17 日に網膜を取り出し、レクチン染色により内皮細胞を同定後、蛍光顕微鏡にて観察し、病的血管新生（vascular tufts）を定量化する。

③ 炎症性変化の評価：

白血球の網膜血管への接着を ConA 染色で評価、定量した。

④ 血管増殖性因子や炎症性サイトカインの評価：

VEGF, Angiopoietin 1, Angiopoietin 2, TNF α , IL-1, IL-6 など定量的 PCR 法で解析した。

⑤ アディポネクチンの下流シグナルの検討：既知のシグナル（AMPK, COX-2）をウエスタンブロット法で検討した。

⑥ 網膜局所における、受容体の役割を検討：アディポ R1、アディポ R2、カルレティキュリンに対する siRNA とコントロール siRNA をマウスの硝子体腔に導入する。

4. 研究成果

(1) アディポネクチン過剰発現マウスを用いて虚血性網膜症の動物モデルである酸素誘発性網膜症マウスを作製した。アディポネクチン過剰発現マウスと野生型マウスを生後 7 日から 12 日まで高酸素濃度（75%）で飼育する。生後 12 日より 17 日まで大気下での飼育に戻すことにより虚血性網膜症の状態を誘導した。生後 17 日に網膜を単離し、レク

チン染色にて網膜新生血管を評価すると、アディポネクチン過剰発現マウスでは、野生型に比し、有意に病的血管新生が減少していた。さらに、炎症性変化の評価として、ConA 染色法にて白血球の網膜血管への接着を検討したところ、アディポネクチン過剰発現マウスにおいて、接着白血球の数は有意に減少していた。従って、アディポネクチン過剰発現マウスでは、酸素誘発性の網膜血管障害が軽減していた。

(2) アディポネクチン過剰発現マウス、アディポネクチン欠損マウスを用いて酸素誘発性網膜症マウスを作製した。アディポネクチン欠損マウスでは、野生型に比し、有意に病的血管新生が増加していた。アディポネクチン過剰発現マウスにおいて、野生型に比し、網膜での TNF, IL-1, IL-6 の発現は低下していた。一方で、VEGF, Angiopoietin 1, Angiopoietin 2 の発現に変化は認めなかった。また、アディポネクチン欠損マウスにおいては野生型に比し、網膜での TNF の発現は増加していた。

(3) アディポネクチン過剰発現マウスにおいては野生型に比し、網膜での AMPK のリン酸化は亢進していた。アディポネクチン欠損マウスの網膜では AMPK のリン酸化は減弱していた。一方で、COX-2 の発現は変化なかった。

(4) 網膜局所にアディポ R1、アディポ R2、カルレティキュリンに対する siRNA を濃度を変えて導入を試みたが、コントロールの siRNA と比べて有意な遺伝子の低下を認めることができなかった。

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 6 件）

(1) Shibata R, Ouchi N, Takahashi R, Terakura Y, Ohashi K, Ikeda N, Higuchi

- A, Terasaki H, Kihara S, Murohara T. Omentin as a novel biomarker of metabolic risk factors. *Diabetol Metab Syndr*. 査読有 26;4(1):37. 2012
doi: 10.1186/1758-5996-4-37.
- (2) Qin F, Siwik DA, Luptak I, Hou X, Wang L, Higuchi A, Weisbrod RM, Ouchi N, Tu VH, Calamaras TD, Miller EJ, Verbeuren TJ, Walsh K, Cohen RA, Colucci WS. The polyphenols resveratrol and s17834 prevent the structural and functional sequelae of diet-induced metabolic heart disease in mice. 査読有 *Circulation*. 125(14):1757-64, 2012.
doi:
10.1161/CIRCULATIONAHA.111.067801.
- (3) Wanninger J, Bauer S, Eisinger K, Weiss TS, Walter R, Hellerbrand C, Schäffler A, Higuchi A, Walsh K, Buechler C. Adiponectin upregulates hepatocyte CMKLR1 which is reduced in human fatty liver. 査読有 *Mol Cell Endocrinol*. 26;349:248-54, 2012.
doi: 10.1016/j.mce.2011.10.032
- (4) Shimano M, Ouchi N, Nakamura K, van Wijk B, Ohashi K, Asaumi Y, Higuchi A, Pimentel DR, Sam F, Murohara T, van den Hoff MJ, Walsh K. Cardiac myocyte follistatin-like 1 functions to attenuate hypertrophy following pressure overload. 査読有 *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25;108:E899-906, 2011.
doi: 10.1073/pnas.1108559108.
- (5) Enomoto T, Ohashi K, Shibata R, Higuchi A, Maruyama S, Izumiya Y, Walsh K, Murohara T, Ouchi N. Adipolin/Clqdc2/CTRP12 protein functions as an adipokine that improves glucose metabolism. 査読有 *J Biol Chem*. 286:34552-8, 2011.
doi: 10.1074/jbc.M111.277319.
- (6) Shimano M, Ouchi N, Nakamura K, Oshima Y, Higuchi A, Pimentel DR, Panse KD, Lara-Pezzi E, Lee SJ, Sam F, Walsh K. Cardiac myocyte-specific ablation of follistatin-like 3 attenuates stress-induced myocardial hypertrophy. 査読有 *J Biol Chem*. 286:9840-8, 2011.
doi: 10.1074/jbc.M110.197079.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口 暁子 (HIGUCHI AKIKO)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50599032

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし