

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590122

研究課題名(和文)新規網膜症予防・治療戦略創出のための標的分子特定を指向した網膜循環調節機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanisms for regulating retinal circulation and identification of target molecule for novel preventive and/or therapeutic 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、一酸化窒素による網膜血管拡張反応には、アラキドン酸カスケードの活性化に伴う prostaglandin I₂ の産生増大と、電位依存性 K⁺ チャンネルを介する機序が関与することが示された。またアドレナリン beta 受容体には、高コンダクタンス Ca²⁺ 活性化 K⁺ (BKCa) チャンネル活性化を介する拡張機序が存在することも示唆された。さらに糖尿病時の酸化ストレスの亢進が BKCa チャンネルを介した網膜血管拡張能を低下させる可能性があること、抗酸化薬は糖尿病時の網膜血管拡張障害を改善する傾向が観察された。従って、強力な抗酸化薬が網膜循環障害に対する新規予防・治療薬となりうる。

研究成果の概要(英文)：This study demonstrated that nitric oxide (NO)-induced vasodilator response is mediated via cyclooxygenase/prostaglandin I₂/prostanoid IP/cAMP signaling pathway and voltage-dependent potassium channel in rat retinal arterioles. Moreover, our results suggested that the activation of large-conductance calcium-activated potassium (BKCa) channels is involved in stimulation of beta2-adrenoceptor-mediated vasodilation of rat retinal arterioles. Increased oxidative stress may contribute to attenuate retinal vasodilator responses induced by an activator of BKCa channels in diabetic rats. Furthermore, the dysfunction of retinal arterioles in diabetic rats tended to be suppressed by administration of an antioxidant drug. In conclusion, drugs that improve retinal circulation and possess antioxidative effect are considered to be novel candidates for prevention of retinopathy.

研究分野：薬理学

キーワード：薬理学 微小循環 糖尿病 血管生物学 網膜 血管内皮 一酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症はわが国の後天性視覚障害原因の第1位を占める疾患であり，社会の高齢化とグルメ化の進展により，多くの人々のQOLを大きく低下させるといって看過することができない．本疾患の発症機序として網膜循環障害が示唆されているが，その詳細は殆ど明らかにされておらず，健常者における生理的な網膜循環調節機構ですら，不明な点が数多く残されている．

2. 研究の目的

そこで本研究は，これまでに我々の研究室で蓄積されてきた特色ある研究成果を基礎とし，その継続的発展と更なる高度化を推進することにより，網膜血管における一酸化窒素(NO)の情報伝達経路の究明，アドレナリン β_2 及び β_3 受容体刺激を介する網膜血管拡張機序の相違の解明，そしてこれらの結果を基盤とした網膜循環障害改善薬の開発を目的とする．

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I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

一酸化窒素 (NO) による網膜血管拡張機序の解明-1 プロスタグランジンの関与 : NOによる網膜血管拡張反応は，アラキドン酸カスケードの活性化に伴う血管拡張性プロス

タグランジンの産生を介した，細胞内 cAMP 濃度上昇を介することが示唆されている．しかし，この機序に関与するプロスタグランジンは明らかではない．そこで NO によりどのプロスタグランジンが産生されるかを明らかにするため，血管内皮において重要な役割を演じているプロスタサイクリン (PGI₂) の関与について検討した．PGI₂ 合成酵素阻害薬 [U51605] あるいは IP 受容体遮断薬 [CAY10441] の静脈内投与は，NO 供与体 [NOR3] による網膜血管拡張反応を有意に減弱させた (図 1, 2)．この時の抑制は，プロスタグランジン合成の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ阻害薬 [indomethacin] による抑制とほぼ同程度であった (図 3)．従って，

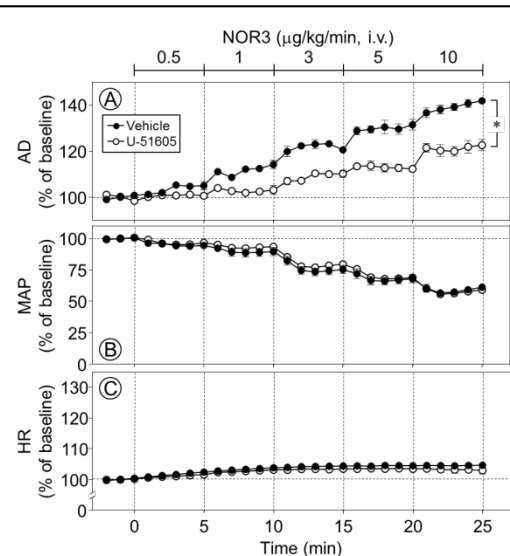


図 1: NOR3 による網膜細動脈径 (AD, A), 平均動脈圧 (MAP, B) 及び心拍数 (HR, C) の変化に及ぼす PGI₂ 合成酵素阻害薬 (U-51605) 静脈内投与の影響

NOR3 (0.5-10 µg/kg/min, i.v.) による網膜細動脈径の用量依存的な増大反応は，U-51605 (0.6 mg/kg, i.v.) の前投与により有意に減弱した (A)．一方，U-51605 は NOR3 による平均動脈圧の低下及び心拍数の変化に影響を及ぼさなかった (B, C)．値は平均値±標準誤差で示した (n=5 ずつ)．*p<0.05．

NO による網膜血管拡張反応は，PGI₂ 産生増大による IP 受容体刺激を介していることが示唆された．

また，培養ヒト網膜血管内皮細胞に NOR3 を添加すると，プロスタグランジン E₂ (PGE₂) ではなく，PGI₂ が産生された．この

結果は, *in vivo* の成果を支持するものである
と言える .

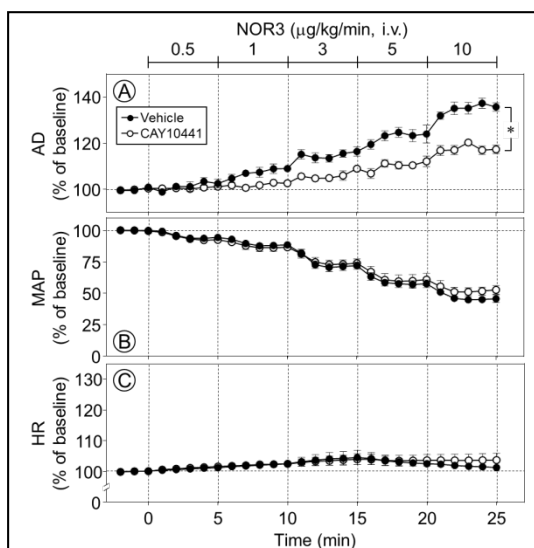


図 2: NOR3 による網膜細動脈径 (AD, A), 平均動脈圧 (MAP, B) 及び心拍数 (HR, C) の変化に及ぼす IP 受容体遮断薬 (CAY10441) 静脈内投与の影響

NOR3 (0.5-10 µg/kg/min, i.v.) による網膜細動脈径の用量依存的な増大反応は, CAY10441 (6 mg/kg, i.v.) の前投与により有意に減弱した (A) . 一方, CAY10441 は NOR3 による平均動脈圧の低下及び心拍数の変化に影響を及ぼさなかった (B, C) . 値は平均値±標準誤差で示した (n=6 ずつ) . *p<0.05 .

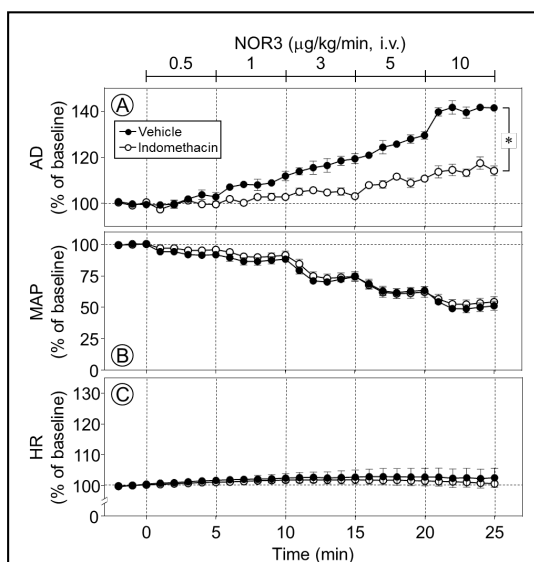


図 3: NOR3 による網膜細動脈径 (AD, A), 平均動脈圧 (MAP, B) 及び心拍数 (HR, C) の変化に及ぼす cyclooxygenase 阻害薬 (indomethacin) 静脈内投与の影響

NOR3 (0.5-10 µg/kg/min, i.v.) による網膜細動脈径の用量依存的な増大反応は, indomethacin (5 mg/kg, i.v.) の前投与により有意に減弱した (A) . 一方, indomethacin は NOR3 による平均動脈圧の低下及び心拍数の変化に影響を及ぼさなかった (B, C) . 値は平均値±標準誤差で示した (n=5 ずつ) . *p<0.05 .

一酸化窒素 (NO) による網膜血管拡張機序の解明-2 K⁺ チャネルの関与: 電位依存性 K⁺ (K_v) チャネルの関与を明らかにするため, K_v チャネル阻害薬である [4-aminopyridine (4-AP)] を用いて検討した . NO による網膜血管拡張反応は, K_v チャネル阻害薬の硝子体内投与により有意に減弱した . この反応は K_v チャネル阻害薬及び シクロオキシゲナーゼ阻害薬 [indomethacin] の同時投与により, 各単独よりもさらに抑制された . 従って, NO のよる網膜血管拡張機序に, PGI₂ の産生経路とは別に, K_v チャネルの関与が示唆された .

一酸化窒素 (NO) による網膜血管拡張機序の解明-2 ギャップジャンクションの関与: NO による血管拡張反応に, ギャップジャンクションの関与が報告されている . そこで, NOR3 誘発網膜血管拡張反応にギャップジャンクション阻害薬 [18β-glycyrrhetic acid] の硝子体内投与が影響を及ぼすか否かについて検討した結果, NOR3 による網膜血管拡張反応はギャップジャンクション阻害薬によって影響を受けなかった . このことから, ギャップジャンクションが NO による網膜血管拡張反応に及ぼす影響は少ないものと考えられた .

アドレナリン β₂ 及び β₃ 受容体刺激による網膜血管拡張機序の解明: β₂ 及び β₃ 受容体刺激網膜血管の拡張反応に, アデニル酸シクラーゼ-cAMP 経路非依存的な機序が関与するかを明らかにするため, 高コンダクタンス Ca²⁺ 活性化 K⁺ (BK_{Ca}) チャネル阻害薬 [iberiotoxin (IbTX)] を用いて検討した . BK_{Ca} チャネル阻害薬の硝子体内投与は, β₂ 受容体刺激薬 [salbutamol] による網膜血管拡張反応を有意に減弱させたが, β₃ 受容体刺激薬 [CL316243] による反応に影響を及ぼさなかった . 従って β₂ 受容体刺激による網膜血管拡張反応に BK_{Ca} チャネルの関与が示唆された .

(2) 糖尿病モデルラットを用いた検討

糖尿病の網膜血管障害に關与する因子の
同定: 糖尿病の血管障害に酸化ストレスの關
与が報告されているため, 糖尿病モデルラッ
トの網膜における酸化ストレスの亢進につ
いて検討した結果, 網膜神経組織中及び網膜
細動脈に過酸化脂質 [4-hydroxy-2-nonenal
(4-HNE)] の発現が増大していた.

過酸化脂質が網膜血管拡張機能に及ぼす
影響: 4-HNE を健常ラットの硝子体内に投与
すると, β_2 受容体刺激薬 [salbutamol] 及び
BK_{Ca} チャネル開口薬 [BMS-191011] による
網膜血管拡張反応が有意に減弱した. さらに,
糖尿病発症直後から抗酸化物質 [ascorbic
acid] を飲水投与すると, 糖尿病モデルラッ
トで観察される [salbutamol] 誘発網膜血管
拡張反応の減弱が抑制される傾向が示され
た.

本研究の成果を総合すると, 酸化ストレス
亢進に伴う 4-HNE などの眼内蓄積が, 糖尿
病における網膜血管拡張機能障害に關与し
ている可能性がある. したがって, 強力な抗
酸化薬が網膜循環障害に対する新規予防・治
療薬となる可能性があると言える.

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 15 件)

Mori A, Nakahara T, Kurauchi Y, Sakamoto
K, Ishii K. Elucidation of dysfunctional
mechanisms of retinal circulation in the rat
models of glaucoma and exploration of
novel therapeutic drugs. *Yakugaku Zasshi.*
133:1343-1350, 2013. doi:
10.1248/yakushi.13-00228-2 (査読無)
Ichikawa A, Nakahara T, Kurauchi Y, Mori
A, Sakamoto K, Ishii K. Rapamycin
prevents N-methyl-D-aspartate-induced
retinal damage through an ERK-dependent

mechanism in rats. *J Neurosci Res.*
92:692-702, 2014. doi: 10.1002/jnr.23358.
(査読有)

Sakamoto K, Kuroki T, Okuno Y, Sekiya H,
Watanabe A, Sagawa T, Ito H, Mizuta A,
Mori A, Nakahara T, Ishii K. Activation of
the TRPV1 channel attenuates
N-methyl-d-aspartic acid-induced neuronal
injury in the rat retina. *Eur J Pharmacol.*
733:13-22, 2014. doi:
10.1016/j.ejphar.2014.03.035. (査読有)

Morita A, Nakahara T, Abe N, Kurauchi Y,
Mori A, Sakamoto K, Nagamitsu T, Ishii K.
Treatment of mid-pregnant mice with
KRN633, an inhibitor of vascular endothelial
growth factor receptor tyrosine kinase,
induces abnormal retinal vascular patterning
in their newborn pups. *Birth Defects Res B
Dev Reprod Toxicol.* 101:293-299, 2014.
doi: 10.1002/bdrb.21112. (査読有)

Asami Y, Nakahara T, Asano D, Kurauchi Y,
Mori A, Sakamoto K, Ishii K.
Age-dependent changes in the severity of
capillary degeneration in rat retina following
N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity.
Curr Eye Res. 30:1-5, 2014. doi:
10.3109/02713683.2014.933851. (査読有)

Yagasaki R, Nakahara T, Ushikubo H, Mori
A, Sakamoto K, Ishii K. Anti-angiogenic
effects of mammalian target of rapamycin
inhibitors in a mouse model of
oxygen-induced retinopathy. *Biol Pharm
Bull.* 37:1838-1842, 2014. doi:
10.1248/bpb.b14-00487 (査読有)

Yagasaki R, Nakahara T, Mori A, Sakamoto
K, Ishii K. Effects of mTOR inhibition on
normal retinal vascular development in the
mouse. *Exp Eye Res.* 129:127-134, 2014.
doi: 10.1016/j.exer.2014.11.005. (査読有)

Morita A, Nakahara T, Ushikubo H, Mori A,

Sakamoto K, Ishii K. Treatment of newborn mice with inhibitors of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase induces abnormal retinal vascular patterning. *Biol Pharm Bull.* 37:1986-1989, 2014. doi: 10.1248/bpb.b14-00540. (査読有)

Sakamoto K, Mori A, Nakahara T, Morita M, Ishii K. Effect of long-term treatment of L-ornithine on visual function and retinal histology in the rats. *Biol Pharm Bull.* 38:139-143, 2015. doi: 10.1248/bpb.b14-00491. (査読有)

Asano D, Nakahara T, Mori A, Sakamoto K, Ishii K. Regression of retinal capillaries following N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in the neonatal rat retina. *J Neurosci Res.* 93:380-390, 2015. doi: 10.1002/jnr.23492. (査読有)

Mori A, Hanada M, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. Impaired retinal vasodilator response to acetylcholine in a rat model of NMDA-induced retinal degeneration. *J Pharmacol Sci.* 127:211-216, 2015. doi: 10.1016/j.jphs.2014.12.014. (査読有)

Aoki Y, Nakahara T, Asano D, Ushikubo H, Mori A, Sakamoto K, Ishii K. Preventive effects of rapamycin on inflammation and capillary degeneration in a rat model of NMDA-induced retinal injury. *Biol Pharm Bull.* 38:321-324, 2015. doi: 10.1248/bpb.b14-00631. (査読有)

Mori A, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. Mechanisms underlying dysfunction of retinal blood vessels in diabetic rats. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 145:70-73, 2015. doi: 10.1254/fpj.145.70. (査読無)

Sakamoto K, Endo K, Suzuki T, Fujimura K, Kurauchi Y, Mori A, Nakahara T, Ishii K. P2X7 receptor antagonists protect against

N-methyl-d-aspartic acid-induced neuronal injury in the rat retina. *Eur J Pharmacol.* 756:52-58, 2015. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.03.008. (査読有)

Mori A, Takei T, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. 4-Hydroxy-2-nonenal attenuates β_2 -adrenoceptor-mediated vasodilation of rat retinal arterioles. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 388:575-582, 2015. doi: 10.1007/s00210-015-1099-0. (査読有)

[学会発表](計 11 件)

石井 邦雄 網膜循環調節機構の基礎的研究と糖尿病性眼疾患に対する新規予防治療戦略開拓の試み 第 32 回日本薬理学会学術集会(招待講演)2012.9.16 滋賀県大津市(ピアザ淡海)

Mori A, Nakahara T, Kurauchi Y, Sakamoto K, Ishii K. Role of β_3 -adrenoceptors in the regulatory mechanism of retinal vascular tone in rats. 第 86 回日本薬理学会年会 2013.3.23 福岡県福岡市(福岡国際会議場)

森 麻美, 中原 努, 倉内 祐樹, 坂本 謙司, 石井 邦雄 緑内障における網膜循環障害機序の解明と新規緑内障治療薬の探索 日本薬学会第 133 年会 2 013.3.30 神奈川県横浜市(パシフィコ横浜)

滑川 諒, 森 麻美, 坂本 謙司, 中原 努, 石井 邦雄 NO による網膜血管拡張反応における PGI_2 の役割 第 128 回日本薬理学会関東部会(東京)日本薬理学会 2013.7.14 [日本薬理学雑誌 142(4) 4P. 2012.10.1] 東京都新宿区(早稲田大学国際会議場)

Asami Mori, Kenji Sakamoto, Tsutomu Nakahara, Kunio Ishii. Mechanisms underlying dysfunction of retinal blood vessels in diabetes rats. 第 87 回日本薬理学会年会 2014.3.2 宮城県仙台市(仙台

国際センター)

Kentaro Higashi, Asami Mori, Kenji Sakamoto, Tsutomu Nakahara, Kunio Ishii.
Probucol ameliorates dysfunction of retinal circulation in diabetes rats. 第 87 回日本薬理学会年会 2014.3.21 宮城県仙台市 (仙台国際センター)

森 麻美, 滑川 諒, 坂本 謙司, 中原 努, 石井 邦雄 NO は電位依存性カリウムチャンネルを介してラット網膜血管を拡張させる 日本薬学会第 134 年会 2014.3.28 熊本県熊本市 (熊本市総合体育館)

森 麻美, 滑川 諒, 坂本 謙司, 中原 努, 石井 邦雄 ラット網膜血管における gap junction を介した拡張機序の解明 第 130 回日本薬理学会関東部会 (東京) 日本薬理学会 2014.7.5 [第 130 回日本薬理学会関東部会 プログラム・要旨集 P65] 東京都品川区 (星薬科大学 百年記念館)

森 麻美, 黒崎 航平, 牛久保 裕子, 坂本 謙司, 中原 努, 石井 邦雄 プロスタノイド EP2 受容体刺激薬の緑内障予防・治療薬としての可能性 第 34 回日本眼薬理学会 (岐阜) 日本眼薬理学会 2014.9.14 [第 34 回日本眼薬理学会抄録集 P68] 岐阜県岐阜市 (長谷川国際会議場)

森 麻美, 武井 俊明, 坂本 謙司, 中原 努, 石井 邦雄 4-ヒドロキシ 2-ノネナールはアドレナリン β_2 受容体刺激薬によるラット網膜細動脈拡張反応を減弱させる 第 88 回日本薬理学会年会 (名古屋) 2015.3.18 愛知県名古屋市 (名古屋国際会議場)

森 麻美, 須澤 弘典, 坂本 謙司, 中原 努, 石井 邦雄 エルカトニンのラット網膜循環に及ぼす影響 日本薬学会第 135 年会 (神戸) 2015.3.28 [日本薬学会第 135 年

会 DVD 要旨集] 兵庫県神戸市 (デザインクリエイティブセンター神戸)

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