

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592649

研究課題名(和文) 糖尿病網膜症におけるAMPKの役割

研究課題名(英文) Roles of AMP-activated protein kinase in diabetes-induced retinal inflammation.

## 研究代表者

持丸 博史 (Mochimaru, Hiroshi)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90424168

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)：糖尿病網膜症の病態には炎症が大きく関与し、抗炎症因子の活性低下が関与する可能性があり、細胞のエネルギー状態により制御されるAMP activated protein kinase (AMPK)は糖尿病網膜症の病態に関与する可能性がある。申請者らは糖尿病モデルマウスとしてストレプトゾトシン誘導1型モデルマウスを作製し、網膜組織内のAMPKレベルが低下すること、および糖尿病モデルマウスでは白血球接着が亢進することを見出した。そして、AMPK活性化剤であるレスベラトロールを投与した際の病態予防効果を見あることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The streptozotocin-induced diabetes were treated with resveratrol orally at 50 mg/kg for 7 days or with AICAR intraperitoneally at 100 mg/kg 24 hours before death. Induction of diabetes in mice led to retinal AMPK dephosphorylation, which was significantly reversed by either resveratrol or AICAR. Either resveratrol or AICAR significantly reversed SIRT1 deactivation and NF- $\kappa$ B phosphorylation, both of which were induced in the diabetic retina. Administration of resveratrol to diabetic mice significantly reduced diabetes-induced retinal leukocyte adhesion, together with retinal expression of ICAM-1 and VEGF. The present findings reveal that diabetes-induced retinal inflammation stems from downregulation of the AMPK pathway, leading subsequently to SIRT1 deactivation and NF- $\kappa$ B activation. The data also suggest the potential use of the AMPK activator resveratrol as a therapeutic agent for diabetic retinopathy.

研究分野：眼科

キーワード：網膜 糖尿病 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

炎症は様々な網膜疾患の基盤にある。生活習慣病や加齢性疾患にはその関与が必至であるとされる。たとえば糖尿病網膜症には炎症病態が関与し、早期から血管内皮増殖因子 (Vascular endothelial growth factor; VEGF) 産生が亢進していることが知られる (Nagai et al. *IOVS* 2007)。その治療として、従来は VEGF 産生源である神経網膜の光凝固が行われ、また最近では VEGF 阻害剤 (Adams et al. *Ophthalmology* 2006) が試されている。しかし、VEGF は生理的に血管維持・神経保護に働くことが知られ、VEGF 阻害剤の継続的投与が副作用を生む可能性は否めない。さらに、糖尿病網膜症ではそれ以外にもレニン・アンジオテンシン系などの多くの炎症起因性物質の発現亢進が関与することも知られ (Nagai et al. *IOVS* 2007, Kurihara et al. *Diabetes* 2008) VEGF だけを制御しても炎症病態を管理することはできないと考えられる。

炎症反応の亢進には、炎症性起因物質の発現亢進の他に、内因性の抗炎症分子の活性低下が関与する可能性がある。細胞内の ATP が減少すると活性化する細胞内酵素である AMP activated protein kinase (AMPK) は各臓器で様々な作用をすることが知られ、脂肪蓄積の抑制やミトコンドリア発生に重要な役割を持つことが知られる (Lage et al. *Trends Mol Med* 2008)。最近、AMPK が糖尿病における脂質蓄積抑制に関与する可能性が報告され (Um et al. *Diabetes* 2010) メタボリックシンドロームにおける役割も明らかにされつつある。このように AMPK はエネルギーのホメオスタシスを調節する分子として知られてきたが、メタボリックシンドロームに慢性炎症が関与することから、AMPK の抗炎症作用が研究され、細胞内炎症起因分子である

NF- $\kappa$ B の活性化を抑制することが明らかにされた (Salminen et al. *J Mol Med* 2011 Review)。

糖尿病網膜症の病的炎症メカニズムとして重要な役割を果たす分子に VEGF の他に NF- $\kappa$ B があることは、申請者の研究室でも報告した (Nagai et al. *IOVS* 2007)。その抑制は糖尿病網膜症の病態抑制に働く。しかし、AMPK の糖尿病網膜症における役割には未知の部分が多い。

一方、申請者の研究室では、酸化ストレスが糖尿病網膜症の病態に作用することを明らかにしてきた (Sasaki et al. *Diabetologia* 2010)。糖尿病では網膜における活性酸素レベルが上昇し、それを抗酸化剤投与で抑制すると、網膜神経機能障害、すなわち網膜電図 (ERG) で測定される視機能障害が予防されるのである。

これに対し、AMPK は mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP-2) の発現を抑制して、酸化ストレス発生を抑制することが明らかにされた (Xie et al. *Diabetes* 2008)。しかし、酸化ストレスの面からも、AMPK の糖尿病網膜症における役割は、まだ解析されていない。

このように、AMPK には抗炎症作用と抗酸化ストレス作用があり、糖尿病網膜症の病態形成において重要な役割を果たすと考えられた。そこで、その分子メカニズムを明らかにし、糖尿病網膜症の新規治療法・予防法の開発につながることを目的として研究する。

従来、神経細胞にはミトコンドリアが多く含まれることが知られ、特に網膜では、網膜神経節細胞と視細胞内節に多く存在することが知られている。これらの細胞では、神経活

動を行うためにエネルギーが必要であり、そのためにミトコンドリアは重要な働きをする。そこで、AMPKの重要な役割であるミトコンドリア生合成にも注目して解析する。ミトコンドリア生合成のマーカー分子としては、PGC1-alpha、チトクロームc、Tfam等が知られており、最近、全身疾患等においても盛んに解析されている分野である (Ventura-Clapier et al. *Cardiovasc Res* 2008, Santos et al. *Free Radical Biology and Medicine* 2011)。

## 2. 研究の目的

炎症は多くの網膜疾患の病態に含まれる。その網膜視機能への影響のメカニズムは、視機能保護治療の開発には欠かせない。炎症は加齢性網膜疾患や糖尿病網膜症などの生活習慣病などにおける視機能低下のメカニズムとして、重要な要素を持つことは疑う余地がない。糖尿病網膜症の病態には炎症が大きく関与し、血管病変に加え網膜神経変性を生じることが知られる。糖尿病網膜症は常に失明原因の上位を占めており、その予後改善策を開発することは社会的にも意義が大きい糖尿病の病態には、VEGFを含む様々な炎症性サイトカインの発現亢進が関与することが知られるが、それだけではなく、抗炎症因子の活性低下も関与する可能性がある。細胞のエネルギー状態により制御される AMP activated protein kinase (AMPK)は抗炎症作用を持ち、糖尿病網膜症の病態に関与する可能性があるが、そのメカニズムは明らかではない。そこで AMPK の糖尿病網膜症における役割を解析する。そして、その中でも特に、AMPK の網膜炎における役割を解析することとする。

## 3. 研究の方法

糖尿病モデルマウスを作成し、その網膜にお

ける炎症・酸化ストレスの亢進について評価し、そのときの AMPK の発現および活性を解析する。さらに、AMPK 活性化剤として知られる 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribotide (AICAR) を投与して、その網膜における効果を解析する。また、それらの効果が、ミトコンドリア生合成のマーカーの動向と関連しているかどうかを解析することで、病態の分子メカニズムを明らかにする。

### **(1)糖尿病モデルマウスを作成し、AICAR を投与する。**

生後6週のC57B/6マウス(オス)を購入し、3日に渡りストレプトゾトシン(STZ)60mg/kg BWを注射して、糖尿病網膜症モデルマウスを作成する。血糖250mg/dl以上をモデルとする。注射の手法、血糖チェックの方法などは、既に申請者の属する研究室で確立されており、論文発表にも用いられており (Kurihara, Ozawa et al. *Diabetes* 2007)、申請者も習得した方法であって問題ない。AICARの投与に関しては、脳炎モデルにおける効果を検討した既報 (Giri et al. *J Neurosci* 2004)を参考とし、20、50、100mg/kg BWについて検討する。

### **(2)糖尿病モデルマウスの網膜における AMPK レベルと活性化 AMPK レベルを測定する。**

糖尿病発症後の網膜内 AMPK タンパクレベルと活性化(リン酸化)AMPK タンパクレベルをイムノプロット法により解析する。AICAR投与後に、活性化 AMPK レベルが上昇しているときの AICAR の量を今後の解析に用いる条件とする。イムノプロット法に関しては、当研究室で確立された方法があり、申請者も既にこれまでの研究で経験・発表してきた方法である。

### **(3)本モデルマウスに ConA レクチンを灌流し、網膜炎と AICAR の効果を解析する。**

網膜血管炎症のために網膜血管に接着する白血球数を Con A レクチンによる灌流ラベル法で評価する。Con A レクチンは血管内皮細胞および白血球の細胞膜表面の糖鎖に結合するため、本法により血管系と血管内壁に接着した白血球（右図矢印）の両者が同時に描出できる。撮像は蛍光顕微鏡 IX71™（オリンパス）を用いる。本法はすでに当研究室、網膜細胞生物学研究室において頻繁に行われており（Ishida et al. *IOVS* 2003, Nagai et al. *IOVS* 2007）、確立された方法である。AICAR 投与後の白血球接着も解析する。

#### **(4)本モデルマウスの網膜で炎症関連分子の発現を測定し、AICAR の効果を解析する。**

糖尿病網膜症の病態に関連する分子として、VEGF の他に intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)、tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、およびレニン・アンジオテンシン系、NF- $\kappa$ B 等の分子がある。これらの発現を RT-PCR とイムノプロット法、ELISA などを用いて mRNA・蛋白質レベルで解析する。それらの手法は既に当研究室で確立されており、プライマーや抗体等の試薬は既に入手済みである。そのほとんどは申請者も論文発表したことのあるものである（Nagai et al. *IOVS* 2007, Mochimaru et al. *IOVS* 2009）。NF- $\kappa$ B に関しては、NF- $\kappa$ B p65 の核内移行分を ELISA で定量する。

#### 4 . 研究成果

本研究では、糖尿病網膜では活性化 AMPK が低下することを示し、そのために網膜血管に対する白血球接着が促進されて網膜炎症を来すことを示した。そして、活性化 AMPK を正常化するために AICAR を投与することでこの炎症病態が抑制されることを示した。酸化ストレスとミトコンドリア生合成については引き続き研究している。

本研究は、これまでの糖尿病研究で明らかにされてきた、炎症・酸化ストレスの網膜症・視機能に対する知見をふまえ、それを制御しうる分子として、AMPK に着目して解析するところが特色であった。これまでの多くの研究は糖尿病による炎症起因性物質の発現亢進を中心に行われてきたが、本研究は内因性炎症抑制性因子(AMPK)に着目しているところが独創的であった。また、近年、全身疾患においては糖尿病における AMPK に関する研究が盛んに行われているが、網膜症における解析をするところも特色といえた。その結果は、現存の VEGF 抑制とは異なるメカニズムの新規治療法・予防法の開発につながることであり、その意義は大きい。

#### 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5件)

(1)Nagai N, Izumi-Nagai K, Suzuki M, Shinoda H, Koto T, Uchida A, Mochimaru H, Tomita Y, Miyake S, Kobayashi S, Sasaki M, Tsubota K, Ozawa Y. Association of Macular Pigment Optical Density (MPOD) with serum concentration of oxidized low-density lipoprotein (oxidized LDL) in Healthy Adults. *RETINA*. 査読あり 2015 Apr; 35(4):820-6. doi: 10.1097/IAE.0000000000000382.

(2)Uchida A, Miwa M, Shinoda H, Koto T, Nagai N, Mochimaru H, Tomita Y, Sasaki M, Ikeda K, Tsubota K, Ozawa Y. Association of Maternal Age to Development and Progression of Retinopathy of Prematurity in Infants of Gestational Age under 33 Weeks. *J Ophthalmol*. 査読あり 2014; 2014:187929. doi: 10.1155/2014/187929.

(3)Suzuki M, Nagai N, Izumi-Nagai K, Shinoda H, Koto T, Uchida A, Mochimaru H, Yuki K, Sasaki M, Tsubota K, Ozawa Y. Predictive factors for non-responders to intravitreal ranibizumab treatment in age-related macular degeneration. *Br J*

*Ophthalmol.* 査読あり 2014 Sep;  
98(9):1186-91. doi:  
10.1136/bjophthalmol-2013-304670.

(4)Uchida A, Shinoda H, Koto T, Mochimaru H, Nagai N, Tsubota K, Ozawa Y. Vitrectomy for myopic foveoschisis with internal limiting membrane peeling and no gas tamponade. *Retina*. 査読あり 2014 Mar; 34(3):455-60. doi: 10.1097/IAE.0b013e3182a0e477.

(5)Nishi Y, Shinoda H, Uchida A, Koto T, Mochimaru H, Nagai N, Tsubota K, Ozawa Y. Detection of Early Visual Impairment in Patients with Epiretinal Membrane. *Acta Ophthalmologica*. 査読あり 2013 Aug; 91(5):e353-7. doi: 10.1111/aos.12060.

〔学会発表〕(計7件)

(1)鈴木美砂, 永井紀博, 永井香奈子, 篠田肇, 内田敦郎, 厚東隆志, 持丸博史, 富田洋平, 佐々木真理子, 坪田一男, 小沢洋子. 狭義加齢黄斑変性に対する pro re nata によるラニズマブ硝子体注射. 第67回日本臨床眼科学会 2013/10/31-11/3 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜

(2)佐々木真理子, 川崎良, 内田敦郎, 厚東隆志, 持丸博史, 篠田肇, 鈴木美砂, 永井香奈子, 永井紀博, 坪田一男, 小沢洋子. 片眼加齢黄斑変性患者における前駆病変と傍眼発症の関連 第116回日本眼科学会 2012/4/5-4/8 東京千代田区 東京国際フォーラム

(3)堀野武, 内田敦郎, 持丸博史, 厚東隆志, 永井紀博, 篠田肇, 篠田啓, 大出尚郎, 小沢洋子, 坪田一男. ポリコナゾール内服による視覚障害から視放線の病変が見つかった再生不良性貧血の一例. 第116回日本眼科学会 2012/4/5-4/8 東京千代田区 東京国際フォーラム

(4)鈴木美砂, 永井紀博, 永井 香奈子, 篠田肇, 内田敦郎, 厚東隆志, 持丸博史, 小

沢洋子, 坪田一男. 加齢黄斑変性に対するラニズマブ単独治療における導入期の有効性についての検討 第66回日本臨床眼科学会 2012/10/25-10/28 京都府京都市 国立京都国際会館

(5) 永井紀博, 小林文貴, 永井香奈子, 鈴木美砂, 持丸博史, 内田敦郎, 厚東隆志, 篠田肇, 三宅誠司, 小林沙織, 坪田一男, 小沢洋子. 健常者における黄斑色素密度と血清カロテノイド濃度の相関. 第66回日本臨床眼科学会 2012/10/25-10/28 京都府京都市 国立京都国際会館

(6)厚東隆志, 林李恵, 篠田肇, 永井紀博, 内田敦郎, 持丸博史, 坪田一男, 小沢洋子. 網膜静脈分枝閉塞症に伴う黄斑浮腫に対するベバシズマブテノン嚢下注射の効果の検討. 第66回日本臨床眼科学会 2012/10/25-10/28 京都府京都市 国立京都国際会館

(7) 持丸博史, 前田高宏, 厚東隆志, 内田敦郎, 永井紀博, 篠田肇, 坪田一男, 小沢洋子. 新規過活動膀胱治療薬ミラベグロン投与後早期に発症した網膜静脈分枝閉塞症の一例. 第66回日本臨床眼科学会 2012/10/25-10/28 京都府京都市 国立京都国際会館

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.keio-eye.net/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

持丸 博史 (Hiroshi Mochimaru)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：90424168

(2)研究分担者

永井 紀博 (Norihiro Nagai)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：10327611

小沢 洋子 (Yoko Ozawa)

慶應義塾大学医学部・講師

研究者番号：90265885

(3)連携研究者

該当なし