

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670737

研究課題名(和文)涙液分泌とエネルギー代謝

研究課題名(英文)The energy metabolism and tear secretion

研究代表者

坪田 一男(Tsubota, Kazuo)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：40163878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病モデルであるdb/dbマウスを用いてメタボリックシンドロームがおよぼす涙液機能への変化を検討した。糖尿病モデルとしてdb/dbマウスを使用し体重および涙液量を測定した。涙液機能の検査はマウスを無麻酔で補綴後、綿糸を眼瞼下部に挿入し30秒間の涙液測定を行った。左右の涙液貯留量を測定し、涙液量とした。経時的に体重および涙液を測定した結果、db/dbマウスの体重はdb/mマウスと比べて高値を示した。db/dbマウスの涙液分泌量はdb/mマウスと比べて有意に低値を示した。血液生化学的検査の結果血糖値が有意に高値を示した。以上から涙液機能低下にはエネルギー代謝が変化していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The db/db mice were the animal model for a rodent model of type 2 diabetes. We investigated the molecular mechanism of tear secretion and metabolic changes. We used db/db mice and their non-diabetic db/m mice in all experiments. Measurement of tear secretion was performed once a month with a phenol red thread. It was placed on the temporal side of the lower eyelid margin for 30 seconds. After measurement, the mice were sacrificed, lacrimal gland extirpated and lacrimal gland were used all experiments. Serum samples were collected for biochemical analysis. Body weight of db/db mice were significantly increased than db/m mice. In the biochemical analysis of the serum, blood glucose were significantly higher in the db/db group than in the db/m. At the 3-month time-point of the experiment, tear secretion was decreased by the db/db mice compared to the db/m mice. We concluded those energy metabolism genes are key molecules for tear secretion.

研究分野：ドライアイ

キーワード：ドライアイ 涙腺 涙液

1. 研究開始当初の背景

高齢者の心身機能の低下を防ぐことは我が国における重要な政策課題となっており、加齢のメカニズムを系統的に理解して各種疾患の予防につなげる研究が求められている。特に感覚器は加齢の影響を非常に大きく受けることがわかっており、ドライアイ疾患もまたその影響によるところが大きい。これまでに加齢による涙液の安定性および分泌量の低下がドライアイを発症することが報告されている。さらに我々は SOD1 欠損マウスを用いて加齢性変化による酸化ストレス亢進が、ドライアイ様所見を呈することを証明した。これら加齢性変化と涙液分泌機構の分子メカニズムを解明することはドライアイの新しい予防療法、治療法を開発する上で重要と考えられる。

また、ライフスタイルの欧米化が進行し、過食や運動不足による高血圧・高脂血症・糖尿病などのいわゆる生活習慣病が増加していることが問題となっており、その予防は重要な政策課題となっている。その病態には、脂質代謝異常、酸化ストレスの関与、加齢の促進が明らかとなりつつあるものの、その詳細な分子メカニズムは明らかではない。降圧剤 (ACE 阻害剤) を服用している高血圧患者はドライアイ発症率が低いという疫学調査があり、生活習慣病とドライアイは密接に関係していると考えられる。一般的に生活習慣病の改善方法として摂食カロリーの制限 (カロリー制限) が重要と言われており、カロリー制限による活性酸素量の減少が、酸化ストレスの軽減による老化を抑制できることが明らかとなってきている。我々もカロリー制限で酸化ストレスの軽減による加齢性涙液分泌量の減少を抑制することを発見している。従って涙液分泌における加齢と酸化ストレスの関わりを明らかにすることはドライアイの予防および治療で極めて重要である。

2. 研究の目的

ドライアイは、Quality Of Vision (QOV) を低下させ、Quality Of Life (QOL) を損なわせる疾患である。しかし、その詳しい発症メカニズムが不明であるため、根治療法は存在せずその治療満足度は低い。そこで、本研究では、糖尿病に誘発される涙液分泌機能低下ドライアイの発症機序、分子メカニズムを解明し、これまでにないドライアイの新規治療法や薬剤開発の基盤構築を目指す。ドライアイの根治療法が確立され、患者の QOL が改善されれば、ドライアイによる社会経済的損失の縮小にも大きく貢献できると考える。

3. 研究の方法

初年度は糖尿病マウスの眼組織における病態を把握する事に注力する。特に涙液分泌量の変化などを、眼科的検査により詳細に解析し、ドライアイの病態変化を経時的に比較

検討した。二年目には、ドライアイ発症のより詳細な分子メカニズムを明らかにするため、糖尿病マウスの涙腺で変動している遺伝子を同定し、遺伝子の機能を制御する薬剤探索および薬効評価を実施した。ドライアイ発症のより詳細な分子メカニズムを明らかにすることにより、糖尿病モデルマウスの涙腺で変動している遺伝子を検討した。

具体的には糖尿病によるドライアイ発症の詳細な分子メカニズムを明らかにするために、糖尿病モデルで変化が報告されているエネルギー代謝関連遺伝子の変化を real-time PCR を用いて mRNA レベルの変化を確認し、涙腺における種々代謝関連遺伝子の変化を検討した。

最終的に、エネルギー代謝関連遺伝子の変化がドライアイ発症に寄与する可能性が示され、病態進行で明らかになった因子を活性化もしくは抑制する薬剤を局所もしくは全身投与し、涙液分泌能などのドライアイ病態の改善効果を検討する計画である。

4. 研究成果

レプチン受容体変異マウス (db/db) マウスが、ドライアイ病態を示すかを検討した。6 週齢の雌性 db/db マウスを経時的に体重および涙液を測定した。db/db マウスの体重 (図 1) は db/m マウス (コントロールマウス) と比して高値を示した。涙腺重量に顕著な差は認められなかったが db/db マウスの涙液分泌量は db/m マウスと比して有意に低値を示した (図 2)。

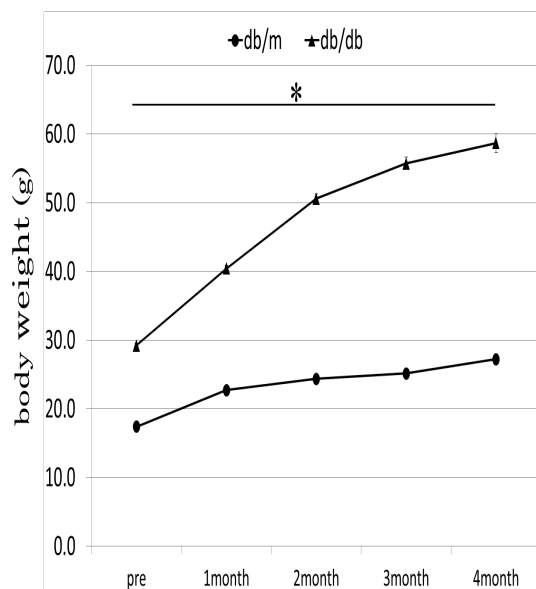


図 1 経時的な体重変化

血液生化学的検査の結果、db/db マウスは有意に血糖値およびコレステロール関連の数値が高値を示した (図 3)。

一方で、レプチン受容体は、リガンドであるレプチンが結合することで活性化され、

AMPKの活性化を介して、エネルギー代謝を制御する(Minokoshi Y, et al. Nature., 2002)。活性化したAMPKはPGC1およびNAMPTを活性化させ、それぞれの下流因子であるPPARと相互作用することで、抗炎症作用など様々

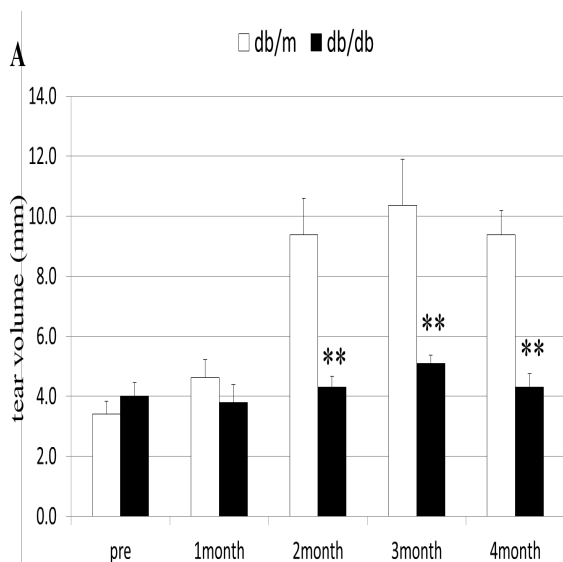


図2 継続的な涙液量の変化

	db/m	db/db	p value
TP(g/dL)	4.6±0.1	6.0±0.2	0.002**
ALB(g/dL)	3.1±0.1	3.7±0.0	0.001**
BUN(mg/dL)	24.5±0.9	20.3±1.1	0.044*
CRE(mg/dL)	0.1±0.0	0.1±0.0	0.189
Na(mEq/L)	154.0±0.0	156.0±2.0	0.374
K(mEq/L)	4.8±0.1	4.9±0.2	0.573
Cl(mEq/L)	102.0±1.0	97.7±2.9	0.231
Ca(mg/dL)	7.9±0.0	9.1±0.1	0.000***
IP(mg/dL)	15.3±0.3	14.7±1.6	0.718
AST(IU/L)	67.3±6.2	146.0±8.2	0.002**
ALT(IU/L)	30.7±4.2	193.0±40.4	0.016*
LDH(IU/L)	1905.3±98.8	1880.7±214.0	0.922
AMY(IU/L)	1861.0±116.5	2641.3±349.2	0.101
r-GT(IU/L)	3>	3>	-
T-CHO(mg/dL)	70.0±4.5	156.0±18.0	0.010*
F-CHO(mg/dL)	11.0±0.6	21.7±3.7	0.047*
E-CHO(mg/dL)	59.0±4.0	134.3±14.4	0.007**
E/T(%)	84.3±0.3	86.3±0.9	0.101
TG(mg/dL)	41.0±6.0	71.7±19.1	0.201
PL(mg/dL)	123.0±8.1	234.0±22.8	0.010*
NEFA(μEq/L)	1098.7±103.2	2057.7±283.5	0.034*
LDL-C(mg/dL)	9.0±0.0	16.7±3.8	0.117
HDL-C(mg/dL)	44.3±3.2	99.7±4.3	0.001**
T-BIL(mg/dL)	0.1±0.0	0.1±0.0	0.507
TBA(μmol/L)	5.7±0.7	2.0±0.6	0.014*
TL(mg/dL)	206.3±9.0	437.3±48.5	0.009**
GLU(mg/dL)	72.3±5.2	515.7±121.6	0.022*
T-KB(μmol/L)	214.3±22.3	309.0±128.9	0.509

図3 血液生化学検査

な役割を發揮する(Mihaylova MM, Shaw RJ. Nat Cell Biol., 2011)。db/dbマウスでは代謝関連遺伝子の低下(図1)が認められた。以上の結果から、レプチン受容体が智者関連遺伝子を介して、涙液に分泌に影響を示していることを明らかにし、ドライアイ発症の分子メカニズムを解明しつつある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- (1) Sano K, Kawashima M, Ito A, Inaba T, Morimoto K, Watanabe M, Tsubota K. Aerobic exercise increases tear secretion in type 2 diabetic mice. Invest Ophthalmol Vis Sci. 査読あり May 29;55(7):4287-94. 2014 doi: 10.1167/iovs.13-13289.

〔学会発表〕(計 2 件)

- (1) Inaba T, Kawashima M, Ito A, Watanabe M, Shimura K, Kawakita T, Tsubota K Change of tear secretion in the lacrimal glands of high-fat diet-fed C57BL/6J mice. ARVO2013, 2013/5/5-5/9, Seattle, Washington, USA
- (2) 稲葉隆明、川島素子、川北哲也、坪田一男。肥満を伴う糖尿病モデルマウスにおける涙液機能の変化第34回日本肥満学会, 2013/10/11-12, 東京国際フォーラム(東京都・千代田区)

〔図書〕(計 0 件)

特になし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
坪田 一男 (TSUBOTA KAZUO)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号: 40163878
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者

鳥居 秀成 (TORII HIDEMASA)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50445326