

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861609

研究課題名(和文)糖転移ヘスペリジンによる糖尿病網膜症新規治療薬の開発

研究課題名(英文)The development of a new therapy in diabetic retinopathy by application of alpha-glucosylhesperidin

研究代表者

横田 陽匡 (Yokota, Harumasa)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：60431417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究によって分散ヘスペレチンが網膜における虚血再還流によって惹起される神経節細胞死を抑制することを明らかになった。分散ヘスペレチンは虚血再灌流によって発生する酸化ストレスや活性化したミクログリアによる慢性炎症を抑制し、結果として神経網膜におけるアポトーシスを減少させる。過剰な酸化ストレスや慢性炎症を発症基盤とする糖尿病網膜症に対して、分散ヘスペレチンが神経網膜を保護する可能性があると考えられた。またミュラー細胞におけるグリオシスも抑制することから糖尿病黄斑浮腫に対しても有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study for the first time demonstrated that water-dispersible hesperetin (WD-Hpt) decreased the number of cell death in the ganglion cell layer after ischemia reperfusion (I/R) injury in the retina. This beneficial protective effect of WD-Hpt on the retina derived from reduction of oxidative stress. Consequently, this led to alleviation of activated microglia and reduction of chronic inflammation. Therefore, WD-Hpt is likely to protect neural cells in the retina from diabetes by reducing oxidative stress and chronic inflammation. Moreover, WD-Hpt was shown to reduce I/R-induced gliosis in Muller cells. This also indicates that WD-Hpt can be used for the treatment in diabetic macular edema.

研究分野：眼科学

キーワード：糖尿病網膜症 虚血性網膜症 神経保護 血管保護 分散ヘスペレチン 糖転移ヘスペリジン

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症は持続的な高血糖に伴う酸化ストレスや慢性炎症によって発症すると考えられている。糖尿病網膜症の発症を予防するためには、血糖コントロールが最も重要であることは言うまでもないが、年余に渡って良好な血糖コントロールを維持することは容易なことではない。したがって血糖コントロールには依存しない、新たな治療法の確立が待たれる。

ヘスペリジンは天然に存在するフラボノイドの一種で高い抗酸化作用と抗炎症作用を有し、その安全性と相まって将来様々な分野において臨床応用されることが期待されている。一般的な低分子医薬とは異なり、天然に存在するフラボノイドであることから、副作用の心配がない。実際に、市販されているサプリメントや特定保健用食品の成分の一部として既に利用されている。江崎グリコはさらにその効果をより高めるための研究を重ね、従来のものに比べて高い吸収効率を実現した糖転移ヘスペリジンと分散ヘスペレチンを開発した。これらを服用すると、皮膚の血流が増加し、冷え性が改善することを報告している<sup>①</sup>。

我々は以前に糖尿病患者では網膜症を発症する以前から網膜循環が悪化することを報告している<sup>②</sup>。さらに *in vivo* の実験で、高血糖は網膜血管内皮細胞を傷害し、血管内皮依存性の血管拡張作用が低下することを報告した。実際に、ヘスペリジンが糖尿病網膜症に対して有効であるかは報告がなされていなかった。

2. 研究の目的

糖転移ヘスペリジンと分散ヘスペレチンが網膜において抗酸化作用、抗炎症作用を発揮し、神経網膜を保護できるかを明らかにし、糖尿病網膜症の治療として将来の臨床応用の可能性を探ること

3. 研究の方法

(1) 本研究では糖尿病モデルに代わって網膜虚血再灌流モデルを用いる。その理由として、糖尿病モデルは網膜病変が観察されるまでに数ヶ月を要し、経済的、時間的な制約が生じる。網膜虚血再灌流モデルは糖尿病網膜症と酷似した病変を1週間で観察できる。糖尿病網膜症と完全に一致するわけではないが、高血糖を除けば、糖尿病網膜症と同様に神経節細胞変性、血管透過性の亢進、周細胞の消失が観察される<sup>③</sup>。

(2) 酸化ストレスの定量

虚血再灌流 (I/R) 後6時間で網膜を採取し、ウエスタンブロット法によってニトロタイロシン化した蛋白を定量する。また網膜切片に対して DHE 染色を行い、蛍光強度を測定する

(3) ミクログリアの形態観察

I/R 後24時間の網膜切片に対して Iba-1 染色を行う。共焦点レーザー顕微鏡でミクログリアを撮影しその形態を評価する。

(4) 神経節細胞数の測定

I/R 後7日目の網膜に対して NeuN 染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で神経節細胞層における神経細胞を数値化する。それを僚眼の同じ面積における神経細胞数で除する事によって比を算出する。

(5) アポトーシスの定量

I/R 後24時間の網膜に対して cleaved-caspase3 の免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察する。その蛍光強度を視覚的に評価する。また I/R 後3日目の網膜に対して TUNEL 染色を行い、TUNEL 陽性細胞を定量する。

(6) グリオシスの比較

I/R 後5日目の網膜に対して GFAP 染色を行い、蛍光強度を評価する。またウエスタンブロット法によって GFAP の発現を定量することにより、グリオシスの強度を評価する。

(7) ERK のリン酸化

I/R 後6時間の網膜を採取し、全ての ERK とリン酸化した ERK をウエスタンブロット法で評価した。またコントロールとしてチューブリンを用いた。

4. 研究成果

(1) 分散ヘスペレチン (WD-Hpt) は酸化ストレスを抑制する

網膜虚血再灌流 (I/R) 6時間後に眼球を摘出して酸化ストレスを評価した。ニトロタイロシンのウエスタンブロットでは (図1)、I/R によりニトロタイロシン化したタンパクが増加しているのに対し、WD-Hpt はニトロタイロシン化を抑制した。また DHE 染色においても、同様の結果が得られた。

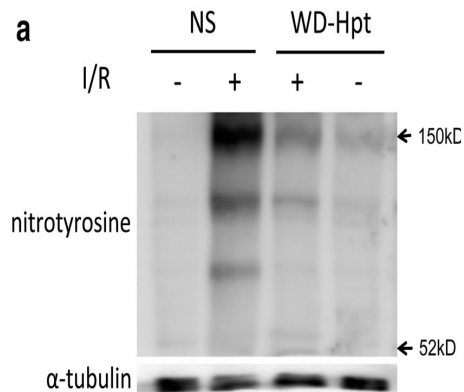


図1. I/R 後6時間のニトロタイロシン

### (2) WD-Hpt はミクログリアの活性化を抑制する

I/R 24 時間後に眼球を摘出し、Iba-1 でミクログリアを染色し、その形態を観察した (図 2)。同年齢の正常なマウスの網膜では、ミクログリアが樹状に突起を伸ばしている ramified 型であるのに対して、I/R によってミクログリアの形態が amoeboid 型 (活性化している状態) に変化している。WD-Hpt によりミクログリアの形態は I/R 後も ramified 型をある程度維持していることから、WD-Hpt はミクログリアの活性化を抑制していると考えられた。

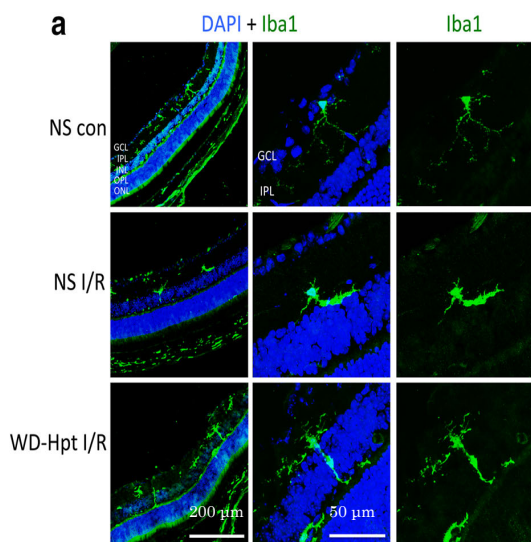


図 2. I/R 後 24 時間のミクログリア

### (3) WD-Hpt は網膜神経節細胞を保護する

I/R 後 7 日目に眼球を摘出し、網膜フォームラウントを作成した。NeuN 染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で神経節細胞層の神経細胞を観察した (図 3)。I/R 眼では、僚眼と比べて神経細胞が 37% 減少していたが、WD-Hpt 投与群では 5% の減少にとどまった。

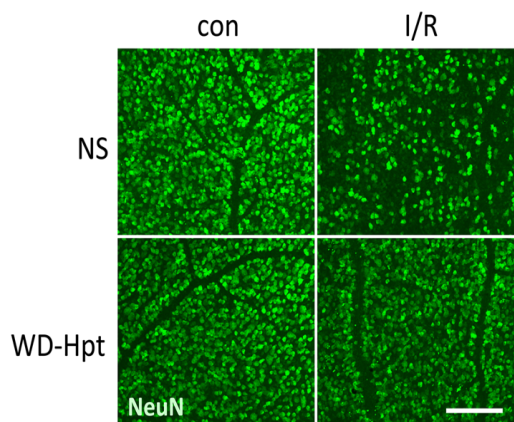


図 3. I/R 後 7 日目の神経節細胞

### (4) WD-Hpt はアポトーシスを抑制する

神経保護効果を確認するために I/R 後のアポトーシスを評価した。I/R 後 24 時間では cleaved caspase3 の発現が神経節細胞層で顕著になるが、WD-Hpt 投与によりその発現が著しく抑制された。また I/R 後 3 日目に TUNEL で実際のアポトーシスを評価した。TUNEL 陽性細胞は神経節細胞層と内顆粒層に多数確認されたが、WD-Hpt を投与することにより TUNEL 陽性細胞は有意に減少した。

### (5) WD-Hpt はグリオシスを軽減する

グリア細胞に対する障害を軽減できるかを確認するために I/R 後 5 日目に GFAP 染色を行った (図 4)。I/R 後では、Muller 細胞に一致して GFAP の発現が亢進しており、グリオシスが確認された。一方、WD-Hpt を投与すると明らかに GFAP の発現が抑制された。Muller 細胞の障害は網膜浮腫と関連していることから、WD-Hpt は黄斑浮腫に対しても有効である可能性が示唆された。

### (6) WD-Hpt は ERK のリン酸化を抑制する

ERK は種々の生体反応に関与している代表的な細胞内シグナルであるが、I/R においては、細胞死に関与していることが報告されている。I/R 後 6 時間の網膜を採取してウエスタンブロット法でリン酸化 ERK (pERK) を定量した。I/R では pERK が有意に増加するが、WD-Hpt により ERK のリン酸化が減少した。この結果も WD-Hpt の網膜神経保護効果を示唆していると考えられる。

(7) 本研究は、高い抗酸化作用、抗炎症作用を有する糖転移ヘスペリジンに着目し、糖尿病網膜症に対する新たな治療法を開発することを目的とした。当初は糖転移ヘスペリジンを用いる予定であったが、江崎グリコから分散ヘスペレチンが糖転移ヘスペリジンより高い吸収効率を有していることが報告されたため、分散ヘスペレチンの投与へと変更した。また動物モデルとして、糖尿病網膜症に酷似した網膜病変を呈する網膜虚血再灌流モデルを用いた。網膜虚血再灌流モデルでは、過剰な酸化ストレスと慢性炎症により神経節細胞数の減少、周細胞の消失、血管透過性の亢進を観察することができるが、本研究では最も再現性の安定していた神経病変を中心に分散ヘスペレチンの有用性を評価し、分散ヘスペレチンに神経網膜を過剰な酸化ストレスや炎症から保護する能力があることを明らかにした。本研究の結果から、糖尿病網膜症を発症する以前から、分散ヘスペレチンを服用することによって、糖尿病網膜症の発症を抑制できる可能性が示唆された。また糖尿病では、網膜症の発症前からミクログリアが活性化していることが知られている。我々の実験結果では、分散ヘスペレチンが網膜のミクログリアの活性化を抑制した。この結果も分散ヘスペレチンが糖尿病網膜症の

発症予防に適していることを示唆していると考えられた。また興味深いことに分散ヘスペレチンは Muller 細胞におけるグリオーシスを強力に抑制した。Muller 細胞は網膜内の水分を調節していて、その機能異常が黄斑浮腫の発症に関与していることが知られている。したがって分散ヘスペレチンの Muller 細胞をはじめとするグリア細胞に対する効能は、糖尿病黄斑症に対する臨床応用の可能性を示唆しており、更なる検討が必要である。本研究の問題点として、腹腔内投与が挙げられる。一定量を確実に投与する点においては優れているが、実際の臨床応用を見据えた場合には、より実際の臨床に近い投与方法での検討が必要になる。本研究の結果に基づき、今後は点眼などの局所投与や飲用による有効性を検討していく必要があると考えられた。また小型の実験モデルでは糖尿病における網膜循環障害を測定することは不可能であるため、本研究の結果をもとに近い将来に臨床研究を計画し、分散ヘスペレチンが網膜循環障害を有する糖尿病患者に対して有効であるかを検討する必要があると考えられた。

#### <引用文献>

- ① Takumi H, Nakamura H, Shimizu T, Harada R, Kometani T, Nadamoto T, Mukai R, Murota K, Kawai Y, Terao J. Bioavailability of orally administered water-dispersible hesperetin and its effect on peripheral vasodilatation in human subjects: implication of endothelial functions of plasma conjugated metabolites. *Food Funct* 2012;3(4):389-98
- ② Nagaoka T, Sato E, Takahashi A, Yokota H, Sogawa K, Yoshida A. Impaired retinal circulation in patients with type 2 diabetes mellitus: retinal laser Doppler velocimetry study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(12):6729-34
- ② Zheng L, Gong B, Hatala DA, Kern TS. Retinal ischemia and reperfusion causes capillary degeneration: similarities to diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;48(1):361-7

#### 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 1 件)

Neuroprotective effect of water-dispersible hesperetin in retinal ischemia reperfusion injury. Shimouchi A, Yokota H, Ono S, Matsumoto C, Tamai T, Takumi H, Narayanan SP, Kimura S, Kobayashi H, Caldwell RB, Nagaoka T, Yoshida A. *Jpn J Ophthalmol* 2016;60:51-61

[学会発表] (計 2 件)

- ① 分散ヘスペレチンは虚血性網膜症の神経節細胞死を抑制する
- ② Water-dispersible hesperetin prevents ganglion cell loss in the retinal ischemia reperfusion injury

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

横田 陽匡 (YOKOTA HARUMASA)  
旭川医科大学・眼科学講座・助教  
研究者番号：60431417