

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861428

研究課題名(和文) 新たな網膜循環調節因子と網膜症治療法の確立

研究課題名(英文) New regulating factor of retinal circulation and establishment of treatment of diabetic retinopathy

研究代表者

大前 恒明 (OMAE, Tsuneaki)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：30451470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：体液量や血圧維持の役割をしているアルドステロンが強力な血管収縮能を持っていることが知られているが、今回、我々は、*in vitro* と *in vivo* 研究において、アルドステロンの網膜血管の収縮効果を示すことはできなかった。また、2型糖尿病患者においても、血中アルドステロン濃度と網膜循環に有意な相関は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：In vivo and in vitro, we did not show that aldosterone, a potent vasoconstrictor, elicited constriction of retinal arterioles. Furthermore, there are no significant relationship between retinal parameter and serum aldosterone concentration in patients with type 2 diabetes.

研究分野：医歯薬学

キーワード：網膜循環

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病網膜症は、糖尿病細小血管障害の1つで、成人失明の主な原因であり、その糖尿病網膜症の治療確立が急務である。糖尿病の発症には、遺伝素因だけでなく、高脂肪食・運動不足などの欧米型生活習慣病の環境因子も大きく関与している。そのため、エネルギー過剰に陥りやすい環境因子により、脂肪が蓄積し、肝臓や筋肉でのインスリンの感受性低下につながる。このインスリン抵抗性が原因で、肥満症・高血糖・高血圧・脂質異常が重積する病態つまりメタボリックシンドロームの発症が問題となっている。このように脂肪の過剰蓄積が、糖尿病をはじめ、メタボリックシンドロームの発症基盤となっており、さらには糖尿病網膜症の発症の一因と考えられる。最近、われわれは、2型糖尿病患者の眼循環の臨床研究を行い、網膜症発症前・発症早期に網膜血流が低下していることを見出した (IOVS 2010)。このことから、脂肪組織が網膜血管機能に影響を及ぼし、網膜症の病態に早期から関わっていると推測され、脂肪組織による循環調節に早期に介入することで、網膜循環を改善させ、**網膜症発症の予防につながる**ことが期待される。

脂肪組織は、余剰なエネルギーの貯蔵だけでなく、多くの生理活性物質(アディポサイトカイン)を合成・分泌することが明らかとなっており、最近、血圧調節機構の最重要因子の1つであるレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の最終シグナルである**アルドステロンの分泌を促進する因子を脂肪細胞が産生することが示された**(J. Am. Soc. Nephrol 2006)。実際、副腎から産生されるアルドステロンはインスリン感受性を低下させ、糖代謝に強く関与しており(Hypertension 2007)、さらにメタボリックシンドロームと血中アルドステロン濃度との間に密接な関連が報告されている

(Hypertension 2006)。また、アルドステロンは腎に存在するミネラルコルチコイド受容体(MR)を介し、水や電解質を再吸収し、体液量や血圧の維持をするだけでなく、心血管に発現しているMRを介し、直接心血管臓器に作用することが明らかとなってきた。この心血管臓器への直接作用の1つに血管収縮作用があり、多くの基礎実験で示されている(Endocrinology 2003)。最近、MRが網膜の血管に発現し、糖尿病の病態の1つである虚血網膜症モデルにおいてアルドステロンの関与が報告され(Cir Res 2009)、**脂肪が蓄積することで副腎からのアルドステロンの分泌を促進し、産生されたアルドステロンが網膜血管を収縮させ、眼循環に影響を与えている可能性がある**。さらに最近、細胞骨格の形成や機能を制御する低分子G蛋白であるRac1がMRの発現増加や活性亢進を引き起こすことが明らかとなり(Nat Med 2008)、実際2型糖尿病のモデルラットの膵臓の島細胞においてRac1が活性化する事が知られており(Diabetes 2011)、**MRがアルドステロン感受性制御に重要な役割**を果たしている可能性も示唆されるが、アルドステロンとMRが眼循環を調節しているかは不明である。さらにMR阻害薬は以前から臨床で使用され、臓器保護作用も示されている(N Engl J Med 2003)が、最近、脂質改善薬のシンバスタチンがRac1の活性を阻害することも報告(J Biol Chem 2009)されており、これらの薬剤による眼循環の影響を**検討するとともに、アルドステロンとMRの眼循環調節因子としての可能性も検討することで、アルドステロンやMRを標的とした新しい網膜血管治療法の開発を目指している**。本研究では、我々が確立した眼循環のin vitroおよびin vivo実験系を用いて以下の課題に対して検討を行いたい。

## 2. 研究の目的

糖尿病網膜症は発症の背景に網膜血流の低下があり、その低下した血流の改善をターゲットとした新たな網膜症の治療が期待されている。近年、脂肪細胞は、体液量や血圧維持の役割をしているアルドステロンの分泌促進因子を放出することが知られている。さらに、網膜症の病態にアルドステロンの関与が示唆されており、脂肪が蓄積することで副腎から産生されるアルドステロンが網膜循環の調節因子の可能性もある。本研究では**アルドステロンの網膜循環への影響**を詳細に検討し、網膜症の原因となる網膜循環障害の改善につなげ、将来的には2型糖尿病患者における網膜症の発症進展を予防する集学的治療法の確立を目指したい。

### 3. 研究の方法

平成26年度の研究実施計画

1、**ブタ網膜摘出血管の in vitro 実験系にて、アルドステロンの網膜血管への収縮能の有無を確認する。**そこで網膜血管収縮が得られれば、血管内皮剥離モデル(IOVS 2007)および各種阻害剤を用い、その収縮のメカニズムを詳しく解明していく。

2、**ネコを用いた in vivo の血流実験系にて、アルドステロンを硝子体中に微量注入し、網膜循環への影響を測定する。**また、アルドステロン血中濃度の変化が、網膜循環にどのように影響するのか検討するため、脂肪細胞から産生されアルドステロン分泌促進因子としてその存在が示唆されている不飽和脂肪酸のリノール酸の酸化物(12,13-epoxy-9-keto-10(trans)-octadecanoic acid)を血中に投与し、副腎からのアルドステロンを産生させ、高アルドステロン血中濃度の状態での網膜循環を測定する。

**アルドステロンだけでなく、その受容体であるミネラルコルチコイド受容体(MR)自体の存在が重要**とされ、最近、培養研究においてウシ網膜血管内皮細胞または周皮細

胞にMRの存在が確認されており、研究1で、アルドステロンが網膜血管に収縮作用を示し、網膜循環へ影響が明らかとなった場合、MR阻害剤を用いアルドステロンの網膜循環におけるMRの関与を検討する。また低分子量GTP結合蛋白質Rac1の活性化がMRの発現増加や活性亢進を引き起こすことが知られており、糖尿病モデルマウスでRac1が活性化することやアディポサイトカインでもあるIL-6(Interleukin-6)やTNF- (tumor necrosis factor-)などの炎症性サイトカインがRac1の活性を亢進することも報告されていることから、高血糖負荷やIL-6やTNF- にて in vitro の網膜血管内皮細胞や周皮細胞の培養研究においてRac1の活性化とMRの発現が増加することを確認する。さらに我々が確立したネコを用いた in vivo の網膜血流実験系における高血糖負荷モデル(IOVS 2010)や硝子体内にIL-6やTNF- を微量注入し、Rac1活性化時での網膜循環への影響を確認する。

**脂質改善薬として広く臨床で使用されているシンバスタチンが Rac1 阻害薬**としても報告されており(J Biol Chem 2009)、これまでわれわれは、健常人における**シンバスタチン**による網膜血流量の増加作用効果を示している(Arch Ophthalmol 2007)。そこでRac1阻害剤としてのネコを用いた in vivo 実験系にて、Rac1阻害剤としての**シンバスタチン**の網膜循環調節作用を確認する。研究2で高血糖負荷や炎症性サイトカインにてRac1活性化によるミネラルコルチコイド受容体の発現が増加することを確認できれば、ネコに高血糖負荷やIL-6やTNF- の硝子体内に微量注入を行い、受容体発現増加時の**シンバスタチン**の効果を確認する。

平成27年度の研究実施計画

平成26年度の基礎研究の結果を重ねることでアルドステロンの眼循環に対する知識を深め、平成25年度では、主に、臨床研究を行い、血中及び硝子体中のアルドステロン濃度と網膜循環の関連性を検討したい  
**<平成27年度以降>**

**・2型糖尿病患者における血中および硝子体中アルドステロン濃度測定と網膜循環との関連性について**

アルドステロンは、網膜症の病態に関与していることが報告され、さらに血管収縮作用を示すことから、アルドステロンは、網膜血流低下を引き起こし、網膜症の発症・進展に関与している可能性がある。そこで、2型糖尿病患者における**網膜循環と血中および硝子体中のアルドステロン濃度の関連**を検討する。網膜循環の評価には、レーザードップラー眼底血流計を用い、同時に血中の濃度も測定し関連を調べる。さらに、増殖糖尿病網膜症や糖尿病黄斑浮腫を有し、硝子体手術の適応となった患者を対象に、術中に硝子体液を一部採取し、硝子体内のアルドステロン濃度を測定し、網膜循環との関連を調べる。

**・原発性アルドステロン患者におけるピオグリタゾンによる網膜循環におけるアディポネクチンの役割**

**アルドステロン分泌過剰状態を呈する典型的な疾患である原発性アルドステロン症患者では、インスリン感受性の低下のほか、血中アディポネクチン濃度も低くなる**ことが報告されている(Am J Hypertens. 2007)。この**アディポネクチンの網膜血管拡張作用**をブタ網膜摘出血管の in vitro 実験系にて、われわれは報告した(IOVS 2013)。つまり、アルドステロンは、血中のアディポネクチン濃度を低下させ、網膜血流に影響を及ぼしている可能性がある。さらに、**血中アディポネクチン濃度を増加させる薬剤が多数報告されているなかで、**

**その薬剤のひとつであるインスリン抵抗性改善薬ピオグリタゾンの網膜血管拡張作用も**ブタ網膜摘出血管の in vitro 実験系にて、われわれは報告した(IOVS 2011)。この**ピオグリタゾンによるアディポネクチン血中濃度増加が網膜循環に与える影響**も検討するため、原発性アルドステロン患者で糖尿病を合併した患者を対象に、ピオグリタゾン内服前後の血中のアディポネクチン濃度の変化を測定し、同時に網膜循環の変化も測定する。この網膜循環の評価には、レーザードップラー眼底血流計を用いる。

4. 研究成果

平成26年度

豚網膜血管のin vitro実験系を用いて、アルドステロンの網膜血管の収縮能の有無を検討したが、アルドステロンの有意な血管収縮は、認めなかった。ネコを用いたin vivoの血流実験系にてアルドステロンを硝子体中に微量注入し、網膜循環への影響を測定したが、in vivoにおいても有意な血流の変化は認めなかった。アルドステロンだけでなく、その受容体であるミネラルコルチコイド受容体(MR)自体の存在が重要とされ、最近、培養研究においてウシ網膜血管内皮細胞または周皮細胞にMRの存在が確認されている。また低分子量GTP結合蛋白質Rac1の活性化がMRの発現増加や活性亢進を引き起こすことが知られており、IL-6(Interleukin-6)やTNF- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ )などの炎症性サイトカインがRac1の活性を亢進することも報告されていることから、ネコを用いたin vivoの網膜血流実験系において、硝子体内にIL-6やTNE- $\alpha$ を微量注入し、Rac1活性化時での網膜循環への影響を検討した。IL-6やTNE- $\alpha$ の硝子体

注射後、前房内の炎症強まり、ネコの網膜血流の測定ができなかった。

平成27年度

レーザードップラー血流計を用いて、2型糖尿病患者における網膜循環と血中のアルドステロン濃度の関連を検討した。血中のアルドステロン濃度と網膜血流に有意な相関は認めなかった。また、アルドステロン分泌過剰状態を呈する典型的な疾患である原発性アルドステロン症患者では、インスリン感受性の低下のほか、血中アディポネクチン濃度も低くなることが報告されている。(Am J Hypertens. 2007)。このアディポネクチンの網膜血管拡張作用をブタ網膜摘出血管のin vitro実験系にて、われわれは報告した(IOVS 2013)。つまり、アルドステロンは、血中のアディポネクチン濃度を低下させ、網膜血流に影響を及ぼしている可能性がある。今回、糖尿病を合併した原発性アルドステロン症患者における研究予定だったが、この研究期間中に、1名しか糖尿病を合併した原発性アルドステロン症患者があらわれず、今後引き続き検討していきます。

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. Omae T, Nagaoka T, Yoshida A :  
Effects of Habitual Cigarette  
Smoking on Retinal Circulation in  
Patients with Type 2 Diabetes. Invest  
Ophthalmol Vis Sci. Invest  
57 :1345-51, 2016..
2. Song YS, Nagaoka T, Omae T,  
Yokota H, Takahashi A, Yoshida A :

SYSTEMIC RISK FACTORS IN  
BILATERAL PROLIFERATIVE  
DIABETIC RETINOPATHY  
REQUIRING VITRECTOMY.  
Retina. 2015 (in press).

3. Utsunomiya T, Nagaoka T, Hanada K, Omae T, Yokota H, Abiko A, Haneda M, Yoshida A : Imaging of the Corneal Subbasal Whorl-like Nerve Plexus: More Accurate Depiction of the Extent of Corneal Nerve Damage in Patients With Diabetes. Invest Ophthalmol Vis Sci 56 : 5417-5423, 2015.
4. Omae T, Nagaoka T, Yoshida A : Relationship Between Retinal Blood Flow and Serum Adiponectin Concentrations in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. Invest Ophthalmol Vis Sci 56 : 4143-4149, 2015.
5. Tanano I, Nagaoka T, Ono S, Omae T, Otani S, Yoshida A : Vasodilatory mechanisms of unoprostone isopropyl in isolated porcine retinal arterioles. Mol Vis 12 : 699-705, 2015.
6. Ishibazawa A, Nagaoka T, Takahashi A, Omae T, Tani T, Sogawa K, Yokota H, Yoshida A : Optical Coherence Tomography Angiography in Diabetic Retinopathy: A Prospective Pilot Study. Am J Ophthalmol 160 : 35-44, 2015.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大前 恒明(OMAE Tsuneaki)

旭川医科大学 医学部 助教

研究者番号： 3 0 4 5 1 4 7 0