

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861454

研究課題名(和文) 糖尿病網膜血管透過性亢進に対する病態解明と新しい治療戦略

研究課題名(英文) Investigation and new therapeutic strategy for the hyperpermeability of the diabetic retinal vessels

研究代表者

有田 量一 (Arita, Ryoichi)

九州大学・大学病院・その他

研究者番号：30621289

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)：糖尿病黄斑浮腫は糖尿病によって視力障害をきたす頻度の高い疾患です。この病気は網膜毛細血管のバリアー機能が壊れてしまい(血管透過性亢進)、血管の中の水が外に漏れ出てしまいます。本研究によって、ROCKが血管透過性のバリアー機能(tight junction)に重要な役割をしており、培養した微小血管内皮細胞を用いた透過性試験においても、ROCK阻害剤は糖尿病によるバリアー機能破綻を回復させ、血管透過性を正常な状態に戻すことが分かりました。本研究からROCK阻害剤は、糖尿病による血管透過性亢進を改善するというメカニズムを有した糖尿病黄斑浮腫に対する新しい治療法となり得る可能性が示唆されました。

研究成果の概要(英文)：Diabetic macular edema is well-known ocular complication and the leading cause of poor visual impairment in diabetes. Diabetic macular edema breaks down the blood-retinal barrier, leading to fluid leakage from abnormal retinal capillaries. This study investigates that ROCK plays a significant role for barrier functions of vascular permeability. ROCK inhibitor recovered diabetes-induced barrier disruption and vascular hyperpermeability. These data indicates ROCK inhibitor has the ameliorating effect on diabetes-induced macular edema via blockade of vascular permeability.

研究分野：糖尿病網膜症

キーワード：血管透過性亢進 糖尿病網膜症 Rho kinase

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病黄斑浮腫は糖尿病によって視力障害をきたす頻度の高い疾患であります。しかしながら、糖尿病網膜血管透過性のメカニズムの全容は未だ明らかとなっておらず、網膜血管透過性亢進に対して現在使用されている VEGF 阻害剤は生理的な VEGF をも中和してしまうことから心脳血管障害などの有害事象が懸念されることから、新しい治療方法が期待されています。

### 2. 研究の目的

本研究ではこれまで明らかとなっていない網膜血管透過性亢進メカニズムへの Rho kinase (ROCK)の関与を解明し、“網膜血管透過性をターゲットとした ROCK 阻害剤の病態制御”の可能性を模索することです。

### 3. 研究の方法

ヒト培養網膜微小血管内皮細胞を用いた MTT assay において VEGF 刺激による網膜血管内皮細胞の増殖、遊走への ROCK 阻害剤の効果を検討しました。また、閉鎖帯 (tight junction)は、血管内皮細胞において水溶性小分子に対するバリアーとして機能し血管壁の透過性を制御しており、そのバリアー機能に tight junction 関連蛋白である claudin(特に claudin-5)が重要であると考えられています。免疫染色および western blotting によって VEGF 刺激による閉鎖帯における claudin-5 の変化と ROCK 阻害剤による効果を検討しました。更に VEGF 刺激以外の糖尿病状態による血管への影響を評価するため、培養網膜微小血管内皮細胞を高血糖刺激や糖尿病網膜症患者血清、Rho activator リゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid) で刺激することによる claudin-5 発現への影響を評価しました。

In vitro における透過性試験は、網膜微小血管内皮細胞をコンフルエントになるまで培養し、VEGF 刺激を行ったのちに内層に FITC-dextran を添加し、外層に漏出した FITC-dextran を経時的に ELISA 法で測定することで ROCK 阻害剤による透過性亢進抑制効果を検討しました。

In vivoでは、これまでの糖尿病モデル動物では認められなかった無灌流領域や網膜新生血管などの増殖性変化を生じる糖尿病モデルマウス(Akimbaマウス：自然発生糖尿病モデルマウス(Akitaマウス)とVEGFを網膜で高発現する遺伝子組み換えマウス(Kimbaマウス)を交配させた網膜症モデルマウス)を用いて、その眼内でROCKの発現あるいは作用を阻害することにより、実際に生体内において糖尿病網膜症でみられる血管透過性亢進の病態を制御し得るか検討を試みました。

### 4. 研究成果

本研究では糖尿病網膜症、特にこれまで明らかとなっていない網膜血管透過性亢進メカニズムへの Rho kinase (ROCK)の関与を解明し、“網膜血管透過性をターゲットとした ROCK 阻害剤の病態制御”の可能性を模索することです。

ROCK 経路は網膜血管内皮細胞の増殖、遊走は血管透過性亢進に深く関与しており、ヒト培養網膜微小血管内皮細胞を用いた MTT assay において ROCK 阻害剤は VEGF 刺激による網膜血管内皮細胞の増殖を抑制し、cell migration assay において網膜血管内皮細胞の遊走を抑制することを確認しました。また、免疫染色および western blotting の結果より、閉鎖帯に発現している claudin-5 は VEGF 刺激によって崩壊して細胞内に取り込まれていきますが、ROCK 阻害剤がこの claudin-5 の崩壊を抑制することを確認しました。更に

ROCK 阻害剤が高血糖刺激や糖尿病網膜症患者血清、Rho activator リゾホスファチジン (lysophosphatidic acid) 刺激による ROCK 活性化を抑制し、これらの刺激によって生じる閉鎖帯における tight junction 関連蛋白(claudin-5)の崩壊を抑制することが分かりました。このことから糖尿病網膜症における血管透過性制御に重要な閉鎖帯における claudin-5 発現維持にも ROCK が関与していることが分かりました。ヒト培養網膜微小血管内皮細胞を用いた In vitro における透過性試験においても、ROCK 阻害剤は VEGF 刺激による透過性亢進を有意に抑制することが分かりました。

In vivo では、糖尿病網膜症と同様な無灌流領域や網膜新生血管などの増殖性変化を発症する Akimba マウスを作成するために、自然発生糖尿病モデルマウス(Akita マウス)と VEGF 高発現マウス(Kimba マウス)との交配を続けましたが、生後まもなくして死亡してしまうために、実験可能な個体数を確保することができませんでした。

本研究において糖尿病網膜症における血管透過性制御に重要な閉鎖帯における claudin-5 発現維持にも ROCK が関与しており、ROCK 阻害剤が糖尿病刺激による claudin-5 の崩壊および透過性亢進を抑制することを確認しました。

網膜血管透過性亢進に対して現在使用されている VEGF 阻害剤は生理的な VEGF をも中和してしまうことから心脳血管障害などの有害事象が懸念されますが、ROCK 阻害剤は抗 VEGF 製剤とは異なり、VEGF を抑制することなく血管透過性を改善するという新しい観点からの治療法となり得る可能性があると考えられました。

#### 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)

Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016 Apr 1;57(4):2264-76.

Vascular Normalization by ROCK Inhibitor: Therapeutic Potential of Ripasudil (K-115) Eye Drop in Retinal Angiogenesis and Hypoxia.

Yamaguchi M, Nakao S, Arita R, Kaizu Y, Arima M, Zhou Y, Kita T, Yoshida S, Kimura K, Isobe T, Kaneko Y, Sonoda KH, Ishibashi T.

〔学会発表〕(計 2 件)

第 118 回 日本眼科学会 / World Ophthalmology Congress. 2014 年  
糖尿病網膜血管透過性亢進の病態に対する ROCK 経路の関与

ARVO 2014 annual meeting. 2014 年  
Therapeutic potential of topical ROCK inhibitor K-115 in diabetic retinopathy

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

有田 量一 (Arita Ryoichi)

九州大学眼科特任助教

研究者番号：30621289

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：