

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06594

研究課題名(和文) 糖尿病網膜症における神経変性に伴う視機能低下を運動によるAMPK活性化で制御する

研究課題名(英文) Aerobic exercise protects retinal function in type 2 diabetic mice

研究代表者

鴨下 衛 (Mamoru, Kamoshita)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：50528552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は糖尿病網膜症に対する有酸素運動の網膜神経保護効果を検討した。8週齢のレプチン受容体欠損(db/db)マウスおよびヘテロ(m/db)マウスをそれぞれ非運動群、運動群に分け普通食で飼育した。トレッドミルによる運動負荷を8週間行い、16週齢の時点での暗順応網膜電図および明順応網膜電図を測定した。その結果db/dbマウスの非運動群の網膜電図で、視細胞機能を反映するa波および網膜内層機能を反映するb波、Op波がそれぞれm/dbマウスと比較し低下がみられたが、運動群では有意に維持されており有酸素運動での神経保護効果が認められた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of exercise training on retinal function in type 2 diabetic mice. 8-week-old type 2 diabetic mice (db/db) and heterozygous controls (db/m) either underwent forced treadmill exercise training for 8 weeks. Visual function was analyzed by photopic and scotopic electroretinogram (ERG) at week 8, the end of the experimental protocol. The a-wave, b-wave, and OP amplitudes in scotopic ERG, and b-wave amplitudes in photopic ERG, which represents cone system function, were all reduced in the db/db sedentary groups compared with the db/m sedentary group at week 8. However, these changes in the db/db mice were attenuated by exercise. The db/m showed no difference in ERG responses with or without exercise. Exercise training for 8 weeks preserved retinal function in db/db mice, suggesting that exercise may be a potential therapeutic approach to protect visual function in diabetes.

研究分野：糖尿病網膜症

キーワード：糖尿病 運動 網膜神経保護 網膜電図 糖尿病網膜症

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症は失明原因の国内第2位を占める疾患で、現代の高齢化社会、飽食社会においては大きな社会問題である。この病態は、血糖(糖尿病)コントロールだけでは解決されない。現在では一般的に、microangiopathyの進行による血管増殖や出血・滲出性変化に対しては、レーザー治療・手術・抗血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)製剤による介入が行われている。しかし、糖尿病においては、血管病変とは独立して徐々に進行を続ける視機能低下が起こり得る。未だ血管病変が明らかになる以前の段階から、あるいは、血管病変が治療により落ち着いた後でも、徐々に視機能が低下し続けることが、古くからヒトで知られる(Yonemura et al. Acta Ophthalmologica 1962, Kizawa et al. Jpn J Ophthalmol., 2006)。この糖尿病による視機能低下は網膜の神経変性(neuropathy)のためであり失明につながり得るが、現時点では確立した介入法が無い(Ozawa et al. Experimental Diabetic Research, 2011, Review)。そこで、糖尿病による失明撲滅のための次なる治療ターゲットとして、網膜神経保護のための介入法が必要とされる。

### 2. 研究の目的

糖尿病網膜症による視機能低下には、microangiopathyより早期から生じ、徐々に進行する網膜神経細胞の変性(neuropathy)が大きく影響することが知られる。しかしangiopathyに対する治療は臨床的に確立されてきたものの、neuropathyに対する介入は未だ行われておらず、血管増殖を抑えても神経変性を克服できなければ、糖尿病による失明を撲滅することはできない。

近年、運動によるアルツハイマー病などの神経変性の進行抑制効果が報告されており、これらの効果の分子メカニズムには、運動によるBrain-derived neurotrophic factor(BDNF)の発現、シナプス小胞タンパク(シナプトフィシン)の維持などが関与するとされる。そこで我々は、2型糖尿病マウスモデルに有酸素運動をさせ、血糖コントロールとは独立して網膜の神経変性に介入し、視機能低下を抑制する効果を検討した。

### 3. 研究の方法

(1) 8週齢のレプチン受容体欠損(db/db)マウスおよびヘテロ(m/db)マウスを対象とし、それぞれ非運動群、運動群に分け、普通食で飼育した。運動群は週5日の10m/min、20分間のトレッドミルによる運動負荷を8週間行い、16週齢の時点での暗順応(scotopic)および明順応(photopic)網膜電図(ERG)を測定した。また体重、血糖値測定の全身評価も行った。

(2) 16週齢の各群のマウスの網膜サンプルを採取し、たんぱく質をウエスタンブロット

ティングで解析。遺伝子発現をリアルタイムPCRにて解析した。

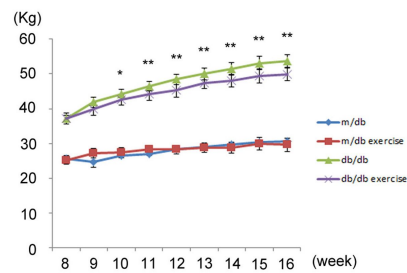
(3) 16週齢の各群のマウスの網膜切片を作成し、網膜の形態学的変化をHE染色で比較した。またRhodopsin, PKC, calbindin, シナプトフィジンの免疫染色を行い、各層の神経細胞を観察した。

(4) 16週齢以降、非運動群に同様の負荷で運動を行い、低下したERGに改善がみられるか、また運動群は運動を中止した場合はERGが維持されるかどうかを検討した。

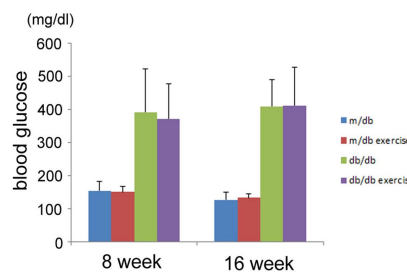
### 4. 研究成果

(1) 16週齢のdb/dbマウスの血糖値は、非運動群では410 ± 80mg/dl、運動群412 ± 115mg/dlと高血糖であり差はみられなかったが、体重は非運動群53 ± 1.8g、運動群49 ± 1.7gと8週間の運動負荷により減少が認められた。

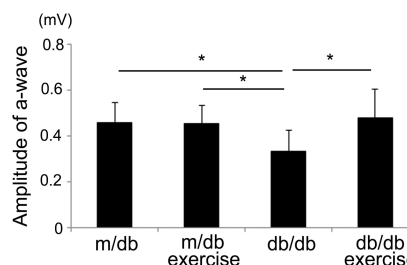
体重

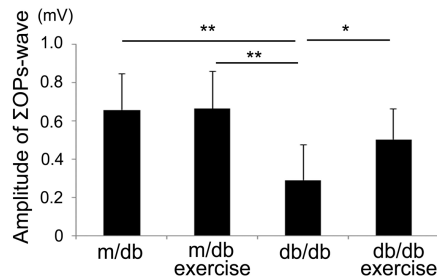
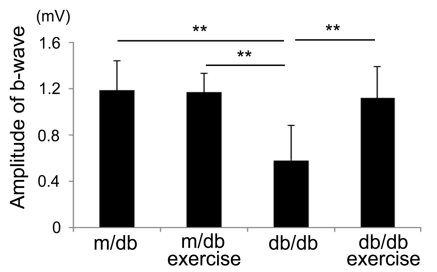


血糖値

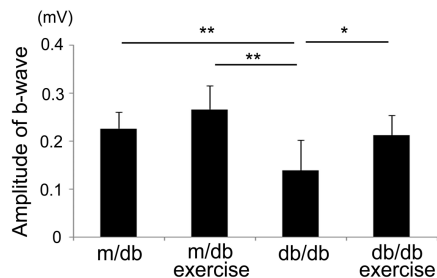


(2) 16週齢のscotopic ERG測定では、db/dbマウスの非運動群では視細胞機能を反映するa波および網膜内層機能を反映するb波、Op波がそれぞれm/dbマウスと比較し低下がみられたが、運動群では有意に維持されていた。

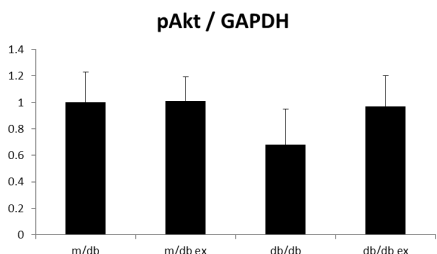




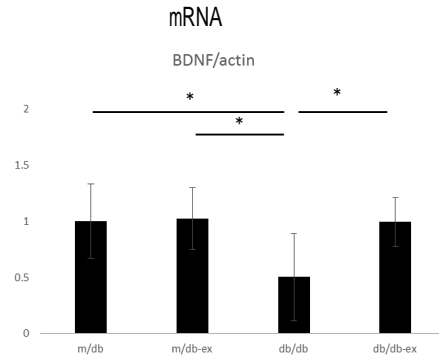
(3) 錐体機能を反映する photopic ERG も同様に運動群では非運動群と比較し有意に維持されていた。



(4) 網膜組織のウェスタンブロッティングの結果。pAkt のたんぱく質が db/db 非運動群では低下を認めていたが、運動群で有意に維持されていた。この結果より運動によるインスリン抵抗性の改善が網膜神経保護に関与していると考えられた。さらにインスリンシグナル(プロインスリン、インスリンレセプター、Irs2、GLUT4)についての解析を行ったが、こちらは有意な結果は得られていない。またインスリン抵抗性の改善に伴う糖の取り込みの促進に着目し、解糖系酵素の測定も施行したが、両者に差は認めなかった。Akt の変化と網膜神経保護の関係についてはいまだ検討課題である。

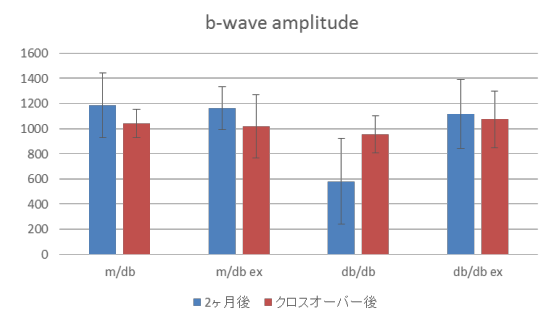
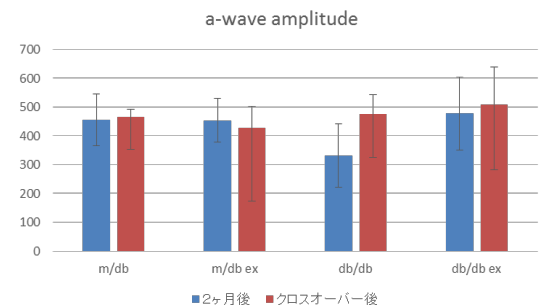


(5) 網膜組織の遺伝子発現の解析結果では、神経栄養因子である BDNF の mRNA が db/db 非運動群で低下がみられたが、運動群では有意に維持されていた。



(6) 8 週間のエクササイズのプロトコルを終えた 16 週齢のマウスに対し、運動群・非運動群を入れ替え、4 週間後に ERG を測定した。すると db/db 非運動群に 16 週以降に運動させることにより、一度低下した網膜機能は回復がみられた。また db/db 運動群に 16 週以降は運動を中止させた場合もその網膜機能は維持されることが判明した。

Scotopic ERG  
青：16 週齢 赤：20 週齢 (16 週以降に運動群と非運動群を入れ替え)



(7) HE 染色による網膜切片のサンプルを解析した結果、運動群・非運動群間での明らかな形態学的変化は認めなかった。また各神経細胞の免疫染色の結果でも、明らかな変化は見られなかった。そこで運動による神経機能保護のメカニズムを追求するため、現在我々は細胞のエネルギー変化に着目し、電子顕微

鏡によるミトコンドリアの形態変化を解析中である。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Mamoru Kamoshita 「Aerobic exercise protects retinal function in type 2 diabetic mice」

The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2016 Annual meeting (2016.5.1-4) Seattle, USA

鴨下衛 「2型糖尿病モデルマウスに対する有酸素運動による網膜神経保護効果」

第54回網膜硝子体学会総会 2015年12月4-6日 東京国際フォーラム(東京都・千代田区)

〔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 0 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

特になし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

鴨下 衛 (KAMOSHITA, Mamoru)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 50528552

研究者番号:

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号:

(4)研究協力者

( )