

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293352

研究課題名(和文) 網膜循環における神経-血管連関の調節機構の解明と糖尿病網膜症早期診断への臨床応用

研究課題名(英文) Elucidation of regulatory mechanism of neurovascular coupling interaction in retinal circulation and clinical application for early diagnosis of diabetic retinopathy

研究代表者

長岡 泰司 (NAGAOKA, Taiji)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00333691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,800,000円

研究成果の概要(和文)：1)ネコ生体実験・・・本研究のメインテーマである網膜循環における神経-血管連関におけるグリア細胞の役割に着目し、高酸素負荷時の網膜血流低下にグリア細胞が関与することをネコin vivo生体実験を用いて証明した。2)ブタ摘出血管実験・・・さらに、ヒスタミンによる網膜血管拡張においては、血管内皮由来過分極因子が関与することをはじめて明らかにした。3)レーザードップラー血流計を用いた臨床研究・・・臨床研究においては、喫煙が糖尿病患者における網膜循環に影響を及ぼすことを証明した。

研究成果の概要(英文)：We have revealed that 1) retinal glial cells may be involved with the retinal neurovascular coupling during systemic hyperoxia 2) EDHF may be involved with histamine-induced vasodilation in retinal porcine arterioles 3) habitual smoking may have some influences on retinal circulation in patients with diabetic retinopathy.

研究分野：眼科学

キーワード：網膜微小循環 糖尿病網膜症 神経-血管連関

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病網膜症の早期診断の重要性

糖尿病網膜症は、糖尿病患者の加速度的増加により年々その罹患患者数は増加の一途をたどっている。糖尿病網膜症は我が国における成人中途失明の主因であり、社会経済的損失も計り知れず、その病態解明と発症予防、治療法の確立は我が国の将来に大きな影響を与える。一方、ここ最近の眼科における外科的治療法の進歩はめざましいものがあるが、それでもなお糖尿病網膜症による失明者が年間 3000 人も増え続けているという事実は、現在の外科的治療法の限界を示している。私は、近い将来糖尿病網膜症による失明患者をなくすることが我々眼科医の責務と考え、その実現のために、**糖尿病患者の網膜症発症の予防に焦点を当てた糖尿病治療戦略を提唱したい**。具体的には、糖尿病発症から微小血管合併症である網膜症が発症するまでは少なくとも 5～10 年はかかるとされ、この時間的猶予を有効に生かし、糖尿病患者をきめ細かく経過観察して、早期に網膜の異常を鋭敏に検出することができれば、糖尿病網膜症の予防が可能になると考えている。

(2) 糖尿病網膜症における網膜循環の新しい非侵襲的評価法の開発

これまで我々は、我が国の糖尿病患者の大部分を占める 2 型糖尿病患者を対象として、レーザードップラー眼底血流計を用いて非侵襲的に網膜循環を評価し、**網膜動脈血流量が糖尿病網膜症発症前からすでに低値であることを報告した**(IOVS, 2010)。これらの新知見から、**早期から適切な介入を行い、眼循環障害を改善することで、その後の網膜症の発症・進展を予防できる可能性**が示唆された。また、眼循環障害を改善させる薬剤を探索し、新しい網膜硝子体疾患治療法の開発につながることを期待され、実際我々は摘出血管を用いた ex vivo 実験系で、脂質異常症改善薬スタチン(IOVS, 2007)およびフェノフィブラート(IOVS, 2012)、インスリン抵抗性改善薬ピオグリタゾン(IOVS, 2011)などの薬剤が、網膜細動脈を拡張させることを報告し、これら薬剤の網膜血流改善作用が、糖尿病網膜症の発症・進展予防に役立つ可能性を示してきた。しかしながら、**網膜血流が低下するよりもさらに早期の網膜血管の機能障害を臨床的に評**

価することができれば、より早期からの適切な介入により、さらに強力な糖尿病網膜症の予防法の確立につながると考えている。

この早期の網膜血管機能障害を評価する方法として、我々は Neurovascular coupling(神経-血管連関)という概念に着目した。この Neurovascular coupling は 1890 年に脳循環において提唱された概念で、神経活動の活性化により局所脳血流量を増加させ、脳機能を維持するための重要な循環調節メカニズムであり、**神経細胞-グリア細胞-血管というネットワークで循環が制御される**と考えられる。

2. 研究の目的

2 型糖尿病患者では網膜動脈血流量が糖尿病網膜症発症前からすでに低値であり、網膜血流低下が網膜症発症に関与すると考えられるが、網膜血流は血糖コントロールや血圧など多くの全身因子に影響をうけ、個体差があり、疾患群と正常群をクリアカットに区別する基準値の設定が難しく、広く一般的に普及した臨床検査法としては課題がある。そこで本研究では、より早期の網膜血管機能の評価を目指し、網膜循環における**神経-血管連関(Neurovascular coupling)**に着目した、新しい網膜血管機能評価法の開発を試みたい。

3. 研究の方法

(1) フリッカー刺激による網膜循環への影響とその調節メカニズムの解明

ネコを用いた in vivo 血流実験系により、フリッカー刺激による網膜循環への影響とその調節メカニズムを詳細に検討する。具体的には、我々が試作したフリッカー刺激装置により、周波数と光量をそれぞれ 0-64 Hz、0-30000 ルクス の範囲内で変化させ、**最大の網膜血流量増加反応が得られる条件設定**を設定する。

上記により設定されたフリッカー刺激条件下で、網膜血流増加における血流調節因子の関与を検討する。具体的には、重要な血管拡張因子である一酸化窒素(NO)、プロスタサイクリン(PGI2)の関与に着目し、それぞれの阻害剤である L-NAME、インドメタシンを硝子体内に投与し、投与前後でフリッカーによる血流増加反応が減弱するか検討する。

さらに NO の役割についても、血管内皮由来か神経由来かを調べるため、神経型 NO 合成

酵素(nNOS)を特異的に阻害する 7-NI を硝子体内局所投与し、その結果から、nNOS と血管内皮型 NOS(eNOS)の関与について詳細に検討する。

(2) フリッカー刺激に対する網膜循環調節におけるグリア細胞の役割

フリッカー刺激による網膜血流増加反応が、神経細胞-グリア細胞-血管のネットワークを介した、いわゆる **Neurovascular coupling** による反応かどうかを確認するため、グリア細胞の働きを障害するグリアトキシンを硝子体に注入し、投与前後でのフリッカー刺激に対する網膜循環反応を評価する。

グリアトキシンは一過性にグリア細胞の突起を減弱させる薬剤であるため、最適な濃度と時間の設定が必要である。これを証明するため、我々は組織学的な検討を行う。

上記により設定された条件下でグリアトキシンを硝子体内に投与し、フリッカー刺激による網膜血流増加反応が抑制されるかどうか検討する。同時に ERG を用いて網膜神経活動の評価も行う。実験終了後速やかに眼球を摘出し、組織学的にグリア細胞の障害の程度を評価する。

4. 研究成果

(1) ネコ生体実験

ネコを用いた生体実験では、網膜循環の神経-血管連関の調節機構の解明を目指し、神経由来 NO が重要であること、グリア細胞が関与することをあきらかにした。また、高酸素負荷時の網膜血流低下におけるグリア細胞の関与も明らかにした。

(2) ブタ摘出実験

強力な血管拡張物質であるヒスタミンの網膜血管拡張作用には血管内皮由来過分極因子 EDHF が関与することをはじめて報告した。

(3) 臨床研究

糖尿病患者の網膜血流低下に関与する全身因子の検討を行い、腎機能や喫煙などが関与することを明らかにした。

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 33 件)

1. Nagaoka T, Tani T, Song YS, Yoshioka T, Ishibazawa A, Nakabayashi S, Akiba M, Yoshida A. Evaluation of Retinal Circulation Using Segmental-Scanning Doppler Optical Coherence Tomography in Anesthetized Cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 57(7):2936-2941, 2016.
2. Ishibazawa A, Nagaoka T, Yokota H, Takahashi A, Omae T, Song YS, Takahashi T, Yoshida A. Characteristics of Retinal Neovascularization in Proliferative Diabetic Retinopathy Imaged by Optical Coherence Tomography Angiography. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 57(14): 6247-6255, 2016.
3. Ono S, Takahashi A, Mase T, Nagaoka T, Yoshida A. En face Swept-Source Optical Coherence Tomographic Analysis of X-linked Juvenile Retinoschisis. *Am J Ophthalmol Case Rep.* 2:30-32, 2016.
4. Song YS, Nagaoka T, Omae T, Yokota H, Takahashi A, Yoshida A. Systemic Risk Factors in Bilateral Proliferative Diabetic Retinopathy Requiring Vitrectomy. *Retina.* 36(7):1309-1313, 2016.
5. Mase T, Ishibazawa A, Nagaoka T, Yokota H, Yoshida A. Radial Peripapillary Capillary Network Visualized Using Wide-Field Montage Optical Coherence Tomography Angiography. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 57(9):OCT504-OCT510, 2016.
6. Minami Y, Nagaoka T, Ishibazawa A, Yoshida A. Short-term effect of intravitreal ranibizumab therapy on macular edema after branch retinal vein occlusion. *Retina.* 36(9): 1726-1732, 2016.
7. Shimouchi A, Yokota H, Ono S, Matsumoto C, Tamai T, Takumi H, Narayanan SP, Kimura S, Kobayashi H, Caldwell RB, Nagaoka T, Yoshida A. Neuroprotective effect of Water-dispersible hesperetin in retinal ischemia reperfusion injury. *Jpn J Ophthalmol* 60(1):51-61, 2016.

8. Takahashi A, Nagaoka T, Yoshida A. Enhanced Vitreous Imaging Optical Coherence Tomography in Primary Macular Holes. *Int Ophthalmol*. Jun;36(3):355-363, 2016.
9. Sogawa K, Nagaoka T, Ishibazawa A, Takahashi A, Tani T, Yoshida A. En-face Optical Coherence Tomography Angiography of Neovascularization Elsewhere in hemi Central Retinal Vein Occlusion. *Int Med Case Rep J*. 2015;8:263-266.
10. Ishibazawa A, Nagaoka T, Minami Y, Kitahara M, Yamashita T, Yoshida A. Choroidal thickness evaluation before and after hemodialysis in patients with and without diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015 Oct;56(11):6534-6541.
11. Nakabayashi S, Kawai M, Yoshioka T, Song YS, Tani T, Yoshida A, Nagaoka T. Effect of Intravitreal Rho kinase inhibitor Ripasudil (K-115) on feline retinal microcirculation. *Exp Eye Res*. 2015 Oct; 139:132-135.
12. Utsunomiya T, Nagaoka T, Hanada K, Omae T, Yokota H, Abiko A, Haneda M, Yoshida A. Imaging of the Corneal Sub-Basal Whorl-Like Nerve Plexus: More Accurate Depiction of the Extent of Corneal Nerve Damage in Patients with Diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015 Aug;56(9): 5417-5423.
13. 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*. 2015;56(6): 4143-4149.
14. Tanano I, Nagaoka T^{*}, Ono S, Omae T, Otani S, Yoshida A. Vasodilatory mechanisms of unoprostone isoprophyl in isolated porcine retinal arterioles. *Mol Vis*. 2015;21:699-705.
15. Yokota H, Nagaoka T, Sato E, Takahashi A, Shimouchi A, Yoshida A. Serum prorenin levels are not associated with ocular diseases in non-diabetic subjects. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2015;16(1):153-158.
16. 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*. 2015;160(1):35-44.
17. Yoshioka T, Nagaoka T^{*}, Song YS, Yokota H, Tani T, Yoshida A. Role of Neuronal Nitric Oxide Synthase in Regulating Retinal Blood Flow during Flicker-Induced Hyperemia in Cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56(5):3113-3120.
18. Sogawa K, Nagaoka T, Tani T, Yoshida A. Anteroposterior tortuosity of the retinal vein at arterovenous crossings in healthy subjects. *Curr Eye Res* 2015 Oct; 40(10):1040-1045.
19. Song YS, Nagaoka T^{*}, Yoshioka T, Nakabayashi S, Tani T, Yoshida A. Role of Glial Cells in Regulating Retinal Blood Flow during Flicker-Induced Hyperemia in Cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 56(12):7551-7559, 2015.
20. Ono S, Nagaoka T^{*}, Omae T, Tanano I, Kamiya T, Otani S, Ishibazawa A, Yoshida A. Beraprost sodium, a stable prostacyclin analogue, elicits dilation of isolated porcine retinal arterioles: roles of eNOS and potassium channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55:5752-5759, 2014.
21. Nagaoka T^{*}, Sogawa K, Yoshida A. Changes in Retinal Blood Flow in Patients with Macular Edema Secondary to Branch Retinal Vein Occlusion Before and After Intravitreal Injection of Bevacizumab. *Retina*.34:2037-43, 2014.
22. Kamiya T, Nagaoka T^{*}, Omae T, Yoshioka T, Ono S, Tanano I, Yoshida A. Role of Ca²⁺-Dependent and Ca²⁺-Sensitive Mechanisms in Sphingosine 1-Phosphate-Induced Constriction of Isolated Porcine Retinal Arterioles in Vitro. *Exp Eye Res*. 121:94-101, 2014.
23. Tani T, Nagaoka T^{*}, Nakabayashi S, Yoshioka T, Yoshida A. Mechanisms Responsible for Autoregulation of

- Retinal Blood Flow in Response to Reductions in Ocular Perfusion Pressure in Cats: Comparison of the Effects of Increased Intraocular Pressure and Systemic Hypotension. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55:360-7, 2014.
24. Ishibazawa A, Nagaoka T, Yokota H, Ono S, Yoshida A. Low shear stress up-regulation of proinflammatory gene expression in human retinal microvascular endothelial cells. *Exp Eye Res*. 116:308-11, 2013.
25. Nagaoka T, Yoshida A. Relationship between retinal fractal dimensions and retinal circulation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Curr Eye Res* 38:1148-52. 2013.
26. Omae T, Nagaoka T, Tanano I, Yoshida A. Adiponectin-induced dilation of isolated porcine retinal arterioles via production of nitric oxide from endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54:4586-94, 2013.
27. Omae T, Nagaoka T, Tanano I, Yoshida A. Homocysteine Inhibition of Endothelium-Dependent Nitric Oxide-Mediated Dilation of Porcine Retinal Arterioles via Enhanced Superoxide Production. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54:2288-95, 2013.
28. Tanano I, Nagaoka T, Omae T, Ishibazawa A, Kamiya T, Ono S, Yoshida A. Dilation of porcine retinal arterioles to cilostazol: roles of eNOS phosphorylation via cAMP/protein kinase A and AMP-activated protein kinase and potassium channel. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54:1443-9, 2013.
29. Tanano I, Nagaoka T, Sogawa K, Tani T, Omae T, Nakabayashi S, Ishibazawa A, Yoshida A. Impaired systemic endothelial function in patients with branch retinal vein occlusion. *Current Eye Research* 38:114-8, 2013.
30. Nagaoka T, Yoshida A. Relationship between Retinal Blood Flow and Renal Function in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Chronic Kidney Diseases.

Diabetes Care. 2013;36:957-61

〔学会発表〕(計5件)

1. NAGAOKA T., Role of Glial Cells in Regulating Retinal Blood Flow during Flicker-induced Hyperemia and Systemic Hyperoxia-induced Hypoxemia in Cats, 2016 European Association for Vision and Eye Research Annual Meeting, 2016.10.5, Nice, Paris
2. 3.Song YS, Nagaoka T, Yoshioka T, Nakabayashi S, Tani T, Yoshida A.
3. 長岡泰司、眼循環測定の近未来、日本臨床眼科学会総会(招待講演)、2013年10月29日~2013年11月03日、東京
4. 長岡泰司、ドップラー法を用いた眼循環測定、第30回日本眼循環学会(招待講演)、2013年07月19日~2013年07月20日、東京
5. 長岡泰司、谷智文、善岡尊文、中林征吾、十川健司、佐藤栄一、吉田晃敏、ドブプラ
6. -OCT血流計による網膜血流測定~ネコ眼での検討~、第117回日本眼科学会総会、2013年04月04日~2013年04月07日、東京

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

旭川医科大学眼科学教室ホームページ
http://www.asahikawa-med.ac.jp/dept/mc/ophtha/member/nagaoka_t.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

長岡 泰司 (NAGAOKA, Taiji)
旭川医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 00333691

(2)研究分担者

横田 陽匡 (YOKOTA, Harumasa)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号: 60431417

大谷 真一 (OHTANI, Shinichi)
旭川医科大学・大学病院・医員
研究者番号：70548841

高橋 淳士 (TAKAHASHI, Atsushi)
旭川医科大学・医学部・講師
研究者番号：90422047