

令和元年5月30日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11302

研究課題名(和文) 高脂肪食による加齢黄斑変性発症のレニン・アンジオテンシン系による制御

研究課題名(英文) Regulation of high fat diet-induced age-related macular degeneration development by renin-angiotensin system

研究代表者

永井 紀博 (Nagai, Norihiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：10327611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウスに高脂肪食を摂取させ、その網膜への影響を分子生物学的・組織学的に解析すると共に、視機能への影響を解析した。酸化LDL、サイトカインの発現を解析し、炎症性細胞浸潤も評価する。酸化LDL、レニン・アンジオテンシン系、サイトカインに着目して、高脂肪食による視機能障害に寄与するシグナル経路も解析した。本研究の結果として、高脂肪食における酸化LDLの影響は眼内でも生じ、炎症細胞浸潤と炎症性サイトカインの発現増加によって網膜色素上皮細胞への蓄積物が増加し視機能障害が生じることが明らかになった。そしてレニン・アンジオテンシン系を介したマクロファージの制御によって視機能障害を軽減することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果として、高脂肪食における酸化LDLの影響は眼内でも生じ、炎症細胞浸潤と炎症性サイトカインの発現増加によって網膜色素上皮細胞への蓄積物が増加し視機能障害が生じることが明らかになった。そしてレニン・アンジオテンシン系を介したマクロファージの制御によって視機能障害を軽減することが示された。高脂肪食の弊害を説明することにつながり、患者、ひいては国民全体に、疾患予防のために食生活を是正することを訴えかける根拠となる。加齢黄斑変性という眼のメタボリックシンドロームでは高脂血症がその進行のリスクファクターであることを考えると、高脂肪食自体の網膜の影響を解析する研究意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, mice were fed high fat diet or normal diet and effects of high fat diet on the retina and choroid were investigated by molecular and histological analyses. Additionally, visual function was recorded by electroretinogram. Signal pathway of high fat diet-induced retinal dysfunction were analyzed by focusing on oxidized low density lipoprotein (oxLDL), renin-angiotensin (RA) system and cytokines. High fat diet induced upregulation of oxLDL and RA system in the retina and choroid, induced macrophage infiltration and cytokine upregulation, resulting in accumulation of RPE deposit and visual dysfunction. Regulation of macrophage infiltration by RA system could suppress visual dysfunction.

研究分野：網膜

キーワード：高脂肪食 加齢黄斑変性 網膜 レニン・アンジオテンシン系

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性はわが国における失明原因の上位を占め、近年患者が急増している疾患である。網膜の中央に位置する黄斑には網膜視細胞が最も密に存在し、視力は黄斑の機能に依存する。視細胞の後方にはバリア機能、サイトカインの分泌などの多彩な役割をもつ網膜色素上皮細胞、血管に富む脈絡膜が存在する。網膜色素上皮細胞は光曝露により変性した視細胞外節を貪食して消化処理を行い、リポ蛋白として脈絡膜側に放出している。酸化変性した視細胞外節はライソゾームの消化酵素に抵抗しやすく、リポフスチンとして網膜色素上皮細胞内に蓄積し、リポ蛋白の輸送を障害してブルッフ膜に脂質が沈着する。これらの沈着物によって慢性炎症が持続し、視細胞を傷害され加齢黄斑変性が発症すると考えられているが、詳細なメカニズムは不明である。加齢黄斑変性は新生血管による出血や浮腫を生じる滲出型、脈絡膜と網膜視細胞の萎縮が生じる萎縮型に分けられるが、萎縮型に対する治療は未だない。

加齢黄斑変性の危険因子として生活習慣病があり、特に高脂肪食により加齢黄斑変性のリスクは約5倍に上昇する (Polanut study, Delcourt C et al. Eur J Clin Nutr. 2007)。高脂肪食で増加する酸化 LDL (low density lipoprotein) は動脈硬化の形成に中心的な役割を示すほか、血中の酸化ストレスマーカーとしても重要である。研究代表者らはヒトの血清酸化 LDL 濃度が黄斑を保護する因子である黄斑色素密度と負の相関することを示した (Nagai et al. Retina 2015)。

酸化 LDL は動脈硬化の形成においては血管内皮細胞の障害、接着分子の誘導、単球の分化誘導、マクロファージの泡沫化など多彩な細胞に作用する。酸化 LDL の受容体の一つに LOX - 1 があり、酸化 LDL はアンジオテンシン II (AngII) や TNF などのサイトカインによって誘導される (Sawamura et al. Nature 1997)。しかしながら高脂肪食による酸化 LDL を介したシグナルの網膜に対する作用は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、高脂肪食の動物モデルを用いて、高脂肪食で上昇し動脈硬化を制御する酸化ストレスマーカーである酸化 LDL、レニン・アンジオテンシン系に着目して、高脂肪食による加齢黄斑変性発症のメカニズムを検索し、新たな予防法の開発を検討する。

高脂肪食	酸化 LDL	脂質沈着	炎症細胞浸潤	サイトカイン	視機能障害
AngII					

3. 研究の方法

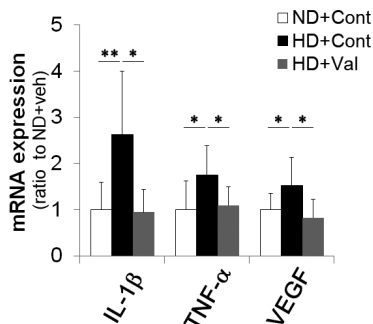
マウスに高脂肪食を摂取させ、その網膜への影響を分子生物学的・組織学的に解析すると共に、視機能への影響を解析する。酸化 LDL、サイトカインの発現を解析し、炎症性細胞浸潤も評価する。酸化 LDL、レニン・アンジオテンシン系、サイトカインに着目して、高脂肪食による視機能障害に寄与するシグナル経路も同定する。

- (1) 高脂肪食の動物モデルを作成する。Balb/C マウスに高脂肪食/コントロール食を1~3ヶ月間摂取させる。高脂肪食には High Fat Diet 32 (CLEA Japan, Inc., Japan) を使用する。高脂肪食モデルにおけるレニン・アンジオテンシン系の分子の発現を検討する。レニン・アンジオテンシン系を阻害するアンジオテンシン II 1型受容体 (AT1-R) 阻害薬であるバルサルタンを解析1週間前より投与する。
- (2) 高脂肪食モデルにおける酸化 LDL 発現を免疫組織化学染色で解析する。網膜色素上皮細胞マーカーである RPE65、炎症細胞マーカーである CD68 と共染色することで、加齢黄斑変性の病態を形成する細胞のいずれに発現しているかも検討する。
- (3) 脈絡膜における炎症性細胞の動向：マクロファージ浸潤を F4/80 の PCR で検索する。
- (4) 炎症性サイトカイン Interleukin (IL)1 β , VEGF, TNF- α の発現を PCR で解析し、対照群と比較する。
- (5) 電子顕微鏡による解析を行う。網膜色素上皮細胞、ブルッフ膜、脈絡膜毛細血管板における細胞内所見を詳細に観察するために電子顕微鏡標本作製し、細胞内構造について解析する。
- (6) 視機能をマウスの網膜電図 (ERG) で評価する
- (7) 腹腔マクロファージを採取し、酸化 LDL、サイトカイン発現を検討する。腹腔マクロファージを培養し、酸化 LDL を付加し、バルサルタンや AT1-R の siRNA を利用して、レニン・アンジオテンシン系の細胞への影響を確かめる。

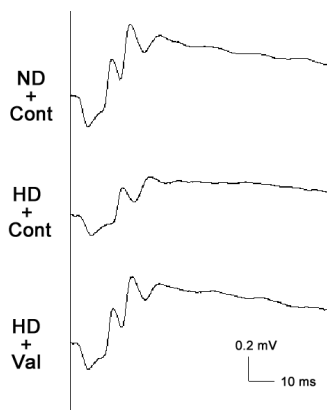
4. 研究成果

本研究の結果として、高脂肪食における酸化 LDL の影響は眼内でも生じ、炎症細胞浸潤と炎症性サイトカインの発現増加によって網膜色素上皮細胞への蓄積物が増加し視機能障害が生じることが明らかになった。そしてレニン・アンジオテンシン系を介したマクロファージの制御によって視機能障害を軽減することが示された。高脂肪食の弊害を説明することにつながり、患者、ひいては国民全体に、疾患予防のために食生活を是正することを訴えかける根拠となる。加齢黄斑変性という眼のメタボリックシンドロームでは高脂血症がその進行のリスクファクターであることを考えると、高脂肪食自体の網膜の影響を解析する研究意義は大きい。今後臨床的な検討が必要である。

- (1) 高脂肪食の動物モデルを作成する。Balb/C マウスに高脂肪食を 1~3 ヶ月間摂取させると対照群に比し、内臓脂肪、体重、空腹時血糖が増加した。また網膜色素上皮細胞・脈絡膜におけるアンジオテンシノーゲン、AT1-R の発現が増加した。
- (2) 高脂肪食モデルにおける酸化 LDL 発現を免疫組織化学染色で解析と網膜色素上皮細胞マーカーである RPE65、炎症細胞マーカーである CD68 と共染色され、これらの細胞に発現していた。
- (3) 高脂肪食投与により対照群に比し、脈絡膜における F4/80 の発現が増加しており、マクロファージ浸潤が増加した。マクロファージ浸潤はバルサルタン投与により減少した。
- (4) 高脂肪食投与により対照群に比し、網膜色素上皮細胞・脈絡膜に炎症性サイトカイン IL-1 β , TNF- α , VEGF の発現が増加しており、バルサルタン投与により減少した(下図)。



- (5) 電子顕微鏡による解析では高脂肪食投与により網膜色素上皮細胞内に異常タンパクの発現がみられ、バルサルタン投与により減少した。
- (6) 視機能をマウスの網膜電図(ERG)で評価したところ、高脂肪食(HD+cont)投与により対照群(ND+cont)に比し a 波の振幅低下がみられ、バルサルタン(HD+Val)投与により回復した(下図)。



- (7) 腹腔マクロファージでは高脂肪食投与により対照群に比し、酸化 LDL、炎症性サイトカイン IL-1 β , VEGF, TNF- α の発現が増加しており、バルサルタン投与により減少した。腹腔マクロファージの培養細胞に、酸化 LDL を付加するとサイトカイン発現が増加するが、バルサルタンや AT1-R の siRNA を利用して、AT1-R を阻害するとサイトカイン発現が減少した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- 1) 永井紀博、【Coming soon 新規治療】糖尿病網膜症の抗脂質治療(フィブラート薬剤)Retina Medicine 6(1), 22-26, 査読なし, 2017

〔学会発表〕(計2件)

- 1) 永井紀博、高脂肪食による視機能障害とマクロファージ、第39回日本炎症・再生医学会2018
- 2) 永井紀博、高脂肪食による網脈絡膜機能障害とレニン・アンジオテンシン系、第20回眼科分子生物研究会、2016

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

なし

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等:なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名:小沢 洋子

ローマ字氏名:OZAWA, Yoko

研究協力者氏名:川島 弘彦

ローマ字氏名:KAWASHIMA, Hirohiko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。