

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06704

研究課題名（和文）糖尿病網膜症における神経 グリア 血管連関破綻機序の解明とグリア標的治療薬の創出

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms of neurovascular unit disruption in diabetic retinopathy and development of glial cells-targeted therapeutics

研究代表者

森 麻美（Mori, Asami）

帝京大学・薬学部・講師

研究者番号：80453504

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病ラットの網膜において、神経細胞あるいはグリア細胞を介する血管拡張反応がどのような影響を受けるかについて検討した。糖尿病ラットでは、対照ラットと比較して NMDA 及び NO 供与体の硝子体内投与による網膜血管拡張反応が減弱すること、グリア細胞刺激により放出される EETs 誘発拡張反応も著しく減弱することが示された。また NO 供与体あるいは EETs による網膜血管拡張反応には、BKCa チャネル活性化が関与していることも明らかになった。これらの結果は、糖尿病初期の網膜神経あるいはグリア細胞を介する網膜血管拡張反応の減弱に BKCa チャネルの機能低下が関与することを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化や生活習慣病の増加に伴い、各種疾患に付随する網膜循環障害は、眼疾患領域においてますます大きな問題となることが予想される。特に高血糖による網膜循環障害は、長年、日本における後天性失明原因の上位を占める糖尿病網膜症の発症や進行に関与する。従って、その予防・治療薬の開発を目指した本研究には極めて大きな意義がある。このように、新たな医薬品の開発に繋がり、眼疾患患者の QOL 向上という社会的要請に貢献できる可能性を有する本研究は、基礎・臨床の両面から、医療の世界に極めて高いインパクトを与えることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to examine how neuronal cells and glial cell-mediated vasodilation is impacted in diabetic rat retinas. The dilation of retinal arterioles induced by intravitreal injection of NMDA and an NO donor were reduced in diabetic rats compared with non-diabetic rats. And intravitreal injection of EETs, a vasodilatory factor released by glial cells stimulation, dilated retinal arterioles, and the response was markedly diminished in diabetic rats. And BKCa channels activation is involved in the retinal vasodilation induced by intravitreal injection of the NO donor or EETs. These results suggest that impaired the function of BKCa channel in vascular cells is responsible for the diminished neuronal cell and glial cells-mediated dilation of retinal arterioles in the early stage of diabetes.

研究分野：薬理学

キーワード：微小循環 糖尿病 網膜血管 網膜神経 グリア 血管連関 プロスタグランジン エポキシエイコサトリエン酸 BKCa チャネル

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症の発症や進行には、高血糖に起因する網膜虚血が深く関与している。網膜血管の恒常性維持には血管構成細胞のみならず、その周囲に存在する神経細胞やグリア細胞との相互作用も重要である。そこで私たちは、健常ラットを用いて、1) 網膜神経傷害を引き起こさない少量の N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA, 6 nmol/eye) は、網膜神経節細胞またはアマクリン細胞の神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) を活性化することにより一酸化窒素 (NO) 産生/遊離を亢進させ、グリア細胞を刺激することによって網膜血管を拡張させること、2) NO はグリア細胞からエポキシエイコサトリエン酸 (EETs) の産生・遊離を亢進すること、3) NMDA は、上述経路に加え、血管拡張性プロスタグランジン (PGs) が関与する経路も活性化すること、を明らかにした。しかし、不明な点も未だ残されている。

このように、網膜における神経-グリア-血管連関 (neurovascular unit) を包括的に保護することが糖尿病網膜症の予防・治療のために重要であると考えられるが、この点に関して十分な検討がなされていない。健常時の網膜循環調節機構における網膜神経の役割の全貌を明らかにし、さらに網膜循環障害の発症機序の詳細を解明することは、網膜循環障害に起因する種々の眼疾患に対する新たな予防・治療薬の開発に繋がるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、私たちが独自に構築した各種網膜循環評価法を用い、網膜における neurovascular unit の詳細と糖尿病による neurovascular unit の破綻機序及びそれらにおけるグリア細胞の役割を解明し、最終的にはグリア細胞を標的とした糖尿病網膜症に対する新規予防・治療薬の創出を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 網膜血管反応性の評価：ラットの眼底を、独自に構築した小動物用眼底撮影デジタルマイクロスコープを用いて経時的に撮影した。実験終了後に撮影した眼底像の画像処理を行い、網膜血管径を測定することにより薬物投与による網膜血管反応性を評価した。

(2) 網膜神経傷害ラットを用いた検討：麻酔下のラットの硝子体に 200 nmol/eye の大量の NMDA を投与し、7日後に各種検討を行った。

(3) 糖尿病ラットを用いた検討：麻酔下のラットにストレプトゾトシン (STZ) を単回投与後に 5% グルコース水を飲水として与え続けることで重度の糖尿病 (随時血糖値: 700-1,000 mg/dL) を発症させた。STZ 投与 2 週間後に、各種検討を行った。

4. 研究成果

(1) 健常ラットの網膜神経細胞あるいはグリア細胞刺激による血管拡張機序

網膜神経細胞あるいはグリア細胞の刺激を介する網膜血管拡張作用における Ca^{2+} の関与：これまで、網膜神経細胞及びグリア細胞をそれぞれ NMDA 及び NO 供与体の硝子体内投与により刺激すると、いずれもアラキドン酸カスケード活性化に伴う EETs と PGs の産生・遊離により、網膜血管が拡張することを明らかにしている。アラキドン酸カスケードの活性化には、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が必要であるため、その機序として小胞体内 Ca^{2+} 放出に関わる IP_3 受容体及びリアノジン受容体の関与について検討した。健常ラットにおいて、NMDA 硝子体内投与による網膜血管拡張反応は、 IP_3 受容体遮断薬及びリアノジン受容体遮断薬により有意に抑制された。一方、NO 供与体硝子体内投与による網膜血管拡張反応はリアノジン受容体遮断薬により抑制される一方で、 IP_3 受容体遮断薬による影響を受けないことが示された。

EETs による網膜血管拡張機序の解明：網膜神経細胞あるいはグリア細胞を刺激すると、アラキドン酸カスケード活性化に伴う EETs の産生・遊離を介して血管が拡張することが明らかになっている。そこで、EETs による網膜血管拡張機序の詳細について検討した。EETs 硝子体内投与による網膜血管拡張反応は、EETs 構造類似体により著しく抑制された。同様に、EETs 誘発網膜血管拡張反応は、高コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ (BK_{Ca}) チャネル遮断薬により、著しく抑制された。

グリア細胞刺激を介する網膜血管拡張反応に關する PGs の同定：NO 供与体による網膜血管拡張機序は、プロスタグランジン E_2 (PGE_2) の作用するプロスタノイド EP_2 受容体を遮断すると抑制される一方で、プロスタグランジン I_2 (PGI_2) の作用するプロスタノイド IP 受容体を遮断しても影響を受けなかった。

(2) 網膜神経傷害ラットを用いた網膜神経細胞あるいはグリア細胞刺激に伴う網膜血管拡張能の検討

網膜神経傷害ラットにおける NMDA あるいは NO 供与体誘発網膜血管拡張反応に対するグリア毒の影響：これまでの研究により、網膜神経傷害ラットにおいて、NMDA 及び NO 供与体による網膜血管拡張反応が、対照ラットのそれら反応と比較して有意に減弱することが明らかになっている。そこで、網膜神経傷害ラットにおいて弱いながらも観察される NMDA 及び NO 供

与体による網膜血管拡張反応におけるグリア細胞の役割について検討した。その結果、網膜神経傷害ラットにおいて観察される NMDA 及び NO 供与体による網膜血管拡張反応は、いずれもグリア機能抑制薬により減弱することが示された。

(3) 糖尿病ラットを用いた網膜神経細胞あるいはグリア細胞刺激に伴う網膜血管拡張能の検討

糖尿病ラット網膜における神経細胞刺激を介した血管拡張機序：糖尿病ラットにおいて、NMDA 硝子体内投与による網膜血管拡張反応は、対照ラットの反応と比較して減弱した。

糖尿病ラット網膜におけるグリア細胞刺激を介した血管拡張機序：糖尿病ラットにおいて、NO 供与体硝子体内投与による網膜血管拡張反応は、対照ラットの反応と比較して減弱した。また、BK_{Ca} チャネル遮断薬存在下において NO 供与体による網膜血管拡張反応を比較したところ、糖尿病ラットと対照ラットとの間の差が消失した。さらに、EETs 硝子体内投与による網膜血管拡張反応は、糖尿病ラットにおいて著しく減弱した。なお、糖尿病ラットでは、BK_{Ca} チャネル刺激を介する網膜血管拡張反応が減弱することはすでに報告している。

以上の結果から、健常時には、1) グリア細胞において NO は、リアノジン受容体を活性化することで小胞体内に貯蔵されている Ca²⁺ を放出し、グリア細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇を介してアラキドン酸カスケードを活性化すること、2) 網膜神経細胞において、NO に依存しないアラキドン酸カスケード活性化に、IP₃ 受容体活性化を介する細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇機序が関与すること、3) グリア細胞において NO は、EETs を産生し、遊離した EETs が BK_{Ca} チャネルの活性化を介して網膜血管を拡張させること、4) グリア細胞において NO は、おそらく PGE₂ を産生・遊離し、プロスタノイド EP₂ 受容体を介して網膜血管を拡張させることが示唆された。また、網膜神経傷害時には、5) NMDA による網膜血管拡張反応が減弱し、残存する拡張反応にはグリア細胞が関与していることも明らかになった。さらに、糖尿病時には、6) 網膜神経細胞あるいはグリア細胞の刺激による網膜血管拡張反応が減弱すること、7) 上述反応の減弱は、網膜血管細胞における BK_{Ca} チャネル機能の低下に起因することも明らかになった。

糖尿病網膜では、網膜神経あるいはグリア細胞を介する拡張機能が障害され、このことが組織の低酸素をもたらす、糖尿病網膜症を進行させる可能性がある。また、糖尿病の病態が進行して網膜神経細胞が傷害された場合には、グリア細胞が代償的に血管緊張度を調節することも示唆された。したがって、網膜における neurovascular unit を包括的に保護することが糖尿病網膜症の予防・治療のために重要であり、特にグリア細胞を標的とした薬物が有用となりうる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Mori A, Namekawa R, Sakamoto K, Ishii K, Nakahara T | 4. 巻 43 |
| 2. 論文標題 4-Aminopyridine, a voltage-gated K ⁺ channel inhibitor, attenuates nitric oxide-mediated vasodilation of retinal arterioles in rats | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin | 6. 最初と最後の頁 1123 ~ 1127 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00220 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Mori A, Tani ai A, Hasegawa M, Sakamoto K, Nakahara T | 4. 巻 393 |
| 2. 論文標題 Involvement of Gi protein-dependent BKCa channel activation in 2-adrenoceptor-mediated dilation of retinal arterioles in rats | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology | 6. 最初と最後の頁 2043 ~ 2052 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00210-020-01895-1 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Mori A, Yano E, Sakamoto K, Ishii K, Nakahara T | 4. 巻 44 |
| 2. 論文標題 Role of epoxyeicosatrienoic acids in acetylcholine-induced dilation of rat retinal arterioles in vivo | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin | 6. 最初と最後の頁 82 ~ 87 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00635 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Mori A, Takei T, Suzuki N, Sakamoto K, Morita M, Nakagawa S, Nakahara T, Ishii K | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 L-Citrulline ameliorates the attenuation of acetylcholine-induced vasodilation of retinal arterioles in diabetic rats | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Heliyon | 6. 最初と最後の頁 e06532 ~ e06532 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2021.e06532 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Someya E, Akagawa M, Mori A, Morita A, Yui N, Asano D, Sakamoto K, Nakahara T | 4. 巻 20 |
| 2. 論文標題 Role of neuron-glia signaling in regulation of retinal vascular tone in rats | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Int J Mol Sci. | 6. 最初と最後の頁 1-16 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20081952. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Nakano A, Mori A, Arima S, Asano D, Morita A, Sakamoto K, Nagamitsu T, Nakahara T | 4. 巻 44 |
| 2. 論文標題 Attenuation of retinal endothelial vasodilator function in a rat model of retinopathy of prematurity | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Curr Eye Res. | 6. 最初と最後の頁 1360-1368 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/02713683.2019.1641825. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Mori A, Takeda K, Sakamoto K, Nakahara T | 4. 巻 393 |
| 2. 論文標題 Activation of transient receptor potential vanilloid 4 channels dilates rat retinal arterioles through nitric oxide- and BKCa channel-dependent mechanisms in vivo | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. | 6. 最初と最後の頁 35-41 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00210-019-01707-1. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Mori A, Sumida D, Kondo R, Nakano A, Arima S, Asano D, Morita A, Sakamoto K, Nagamitsu T, Nakahara T. | 4. 巻 146 |
| 2. 論文標題 Impairment of endothelium-dependent vasodilator function of retinal blood vessels in adult rats with a history of retinopathy of prematurity. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 J Pharmacol Sci. | 6. 最初と最後の頁 233-243 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2021.04.008. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Mori A, Namekawa R, Sakamoto K, Ishii K, Nakahara T. | 4. 巻 44 |
| 2. 論文標題 Involvement of gap junctions in acetylcholine-induced endothelium-derived hyperpolarization-type dilation of retinal arterioles in rats. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Biol Pharm Bull. | 6. 最初と最後の頁 1860-1865 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b21-00547. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 森 麻美, 武田 一輝, 坂本 謙司, 中原 努 |
| 2. 発表標題 TRPV4 チャネルの活性化は一酸化窒素の産生放出と高コンダクタンス Ca ²⁺ 活性化 K ⁺ チャネルの活性化を介してラット網膜細動脈を拡張させる |
| 3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 森 麻美, 染谷 英理子, 浅野 大樹, 森田 茜, 坂本 謙司, 中原 努 |
| 2. 発表標題 ラット網膜において神経由来の NO はグリア細胞のアラキドン酸カスケード活性化を介して血管を拡張させる |
| 3. 学会等名 第140回日本薬理学会関東部会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 森 麻美, 中野 歩希, 浅野 大樹, 森田 茜, 坂本 謙司, 中原 努 |
| 2. 発表標題 未熟児網膜症モデルラットにおいて網膜血管内皮依存性拡張反応が減弱する |
| 3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2019 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 隅田 大己, 森 麻美, 中野 歩希, 浅野 大樹, 森田 茜, 坂本 謙司, 中原 努 |
| 2. 発表標題 新規未熟児網膜症モデルラットにおいて生じる網膜血管拡張機能障害 |
| 3. 学会等名 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2019 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 森 麻美, 矢野 恵理佳, 浅野 大樹, 森田 茜, 坂本 謙司, 中原 努 |
| 2. 発表標題 ラット網膜におけるグリア-血管連関: BKCa チャネルの関与 |
| 3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 森 麻美, 中野 歩希, 隅田 大己, 近藤 諒, 浅野 大樹, 森田 茜, 坂本 謙司, 中原 努 |
| 2. 発表標題 未熟児網膜症モデルラットにおいて内皮依存性網膜血管拡張反応が減弱する |
| 3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 森 麻美, 江沢 佑菜, 浅野 大樹, 森田 茜, 坂本 謙司, 中原 努 |
| 2. 発表標題 Resveratrol は AMPK の活性化を介してラット網膜細動脈を拡張させる |
| 3. 学会等名 日本薬学会第140年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 森 麻美, 水山 和紀, 渡部 奈々枝, 浅野 大樹, 森田 茜, 坂本 謙司, 中原 努 |
| 2. 発表標題 ラットにおける眼内 endothelin-1 濃度上昇に伴う網膜血管の収縮機能亢進 |
| 3. 学会等名 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2018 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 森 麻美, 染谷 英理子, 浅野 大樹, 森田 茜, 坂本 謙司, 中原 努 |
| 2. 発表標題 ラット網膜におけるオピオイド μ 受容体刺激により生じる neurovascular coupling : グリア細胞の役割 |
| 3. 学会等名 第38回日本眼薬理学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 森 麻美, 浅野 大樹, 森田 茜, 坂本 謙司, 中原 努 |
| 2. 発表標題 ラット in vivo 網膜循環評価システムを用いたアドレナリン 受容体を介する拡張機序の解明 |
| 3. 学会等名 第3回トランスポーター研究会関東部会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 森 麻美, 武田 一輝, 浅野 大樹, 森田 茜, 坂本 謙司, 中原 努 |
| 2. 発表標題 TRPV4 チャネル活性化薬はラット網膜血管を拡張させる |
| 3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 森 麻美, 武田 一輝, 浅野 大樹, 森田 茜, 坂本 謙司, 中原 努 |
| 2. 発表標題 TRPV4 チャネル活性化薬は NO 産生・遊離を介してラット網膜細動脈を拡張させる |
| 3. 学会等名 日本薬学会第139年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 森 麻美 |
| 2. 発表標題 視覚障害を伴う眼疾患治療薬の開発を指向した網膜における神経-グリア-血管連関の解明 |
| 3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム 2021 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 森 麻美, 上園 崇, 森田 茜, 中原 努, 坂本 謙司 |
| 2. 発表標題 ラット網膜における神経 グリアを介した血管拡張機序 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第142年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|