

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791687

研究課題名（和文） 糖尿病網膜症モデルにおける HIF1- の役割

研究課題名（英文） Role of HIF1- in the model of diabetic retinopathy

研究代表者

持丸 博史 (MOCHIMARU HIROSHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90424168

研究成果の概要（和文）：

糖尿病網膜症は常に失明原因の上位を占めており、その予後改善策を開発することは社会的にも意義が大きい。その予防に役立つ介入方法の開発は、多くの糖尿病患者の予後を決めることにつながる可能性があり、重要である。糖尿病では虚血・低酸素が引き起こされることから HIF1- に着目して、網膜病態への関与を解析した。

研究成果の概要（英文）：

One of the leading causes for the blindness involves diabetic retinopathy. Preventing therapy is anticipated worldwide. In this study, we focused on HIF1- and analyzed its role in the retinal pathogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：網膜・糖尿病・低酸素

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症の病態には炎症が含まれることが知られ、その際に神経網膜から誘導され

る血管内皮増殖因子 (Vascular endothelial growth factor; VEGF) が血管や白血球動態に影響することが知られている。臨床的には、

この事実を応用して、VEGF を発現しているとされる網膜の無灌流領域をレーザーにより破壊する治療や、抗 VEGF 製剤を用いた治療が行われている。しかし、レーザーは視機能を決める神経網膜を破壊することにつながっていることが問題となる。抗 VEGF 製剤は眼内に注射投与方法がとられているが、効果が持続せず、何回も注射が必要であることが問題であるばかりでなく、VEGF は神経保護作用を持つので、その抑制が過剰になると視機能を脅かす可能性があることが問題となっている。

一方、糖尿病網膜症ではアンジオテンシン II シグナルにより視機能障害が生じたり (Kurihara Ozawa et al. Diabetes, 2008)、血管病変が誘導されることが報告された (Nagai et al. Investivative Ophthalmol Vis Sci, 2007)。

このように、糖尿病では様々な液性因子が病態に関与する可能性があり、一つの因子の抑制だけでは、病態を抑制しきれない可能性はあった。また、一つの分子だけを強く抑制する治療法は、正常組織への障害を引き起こす可能性があり、糖尿病のように長期にわたり治療を続ける必要のある疾患においては、このことは望ましくない。

むしろ、病的に亢進した液性因子の発現を抑制することのできる治療法が待たれていた。そのためには、これらの液性因子の誘導に関するデータが必要とされていたが、少なくとも研究開始時点までにはその情報はあまりなかった。

糖尿病網膜症の進行を左右するのは、高血糖による細胞ストレスと考えられる。糖尿病では、進行してきた血管閉塞がさらに病態を悪化させることが知られており、組織低酸素もストレスになると、広く考えられてきた。そこで、これらのストレスに応答する分子に着

目すれば、病的に過剰発現する分子を抑制し、生理的発現をしている分子を抑制しないで済む治療法を確立する可能性があった。

2. 研究の目的

炎症反応や低酸素により誘導され、VEGF およびアンジオテンシン II 発現を促進しうる転写因子、Hypoxia inducible factor 1- (HIF1-) の糖尿病網膜症における役割を解析した。HIF1- は、通常状態では常に分解される (図 1) ことが知られており、ストレスに応じて分解が低下することから、その下流遺伝子の発現が亢進することが知られている。下流の遺伝子群の中には、炎症に関する分子が多く含まれることが知られていた。また、これを抑制する他の分野のための薬剤が存在することは、将来の臨床応用に近い、という可能性があり、この分子を標的にすることを選擇した。

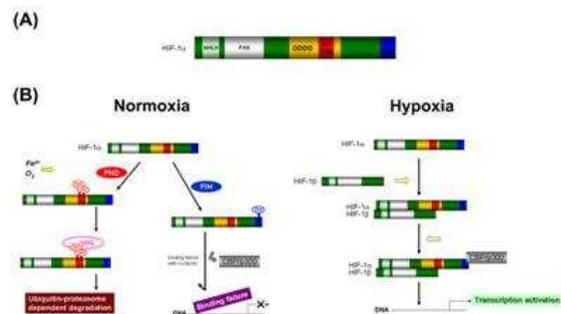


図 1 HIF1- の制御機構

3. 研究の方法

網膜特異的 HIF1- ノックアウトマウスを用いた糖尿病網膜症モデルを作成し、炎症性サイトカイン等の発現について解析した。糖尿

病網膜症モデルは、ストレプトゾトシンにより膵島ランゲルハンスでインスリンを産生するベータ細胞を選択的に破壊することで、作成されるものを用いた。網膜特異的 HIF1 - ノックアウトマウスの作成には、Alpha-Cre マウスを用いた(図2)。このマウスにおいては、Cre-リコンビナーゼは網膜の広範囲で発現しているが、眼以外では遺伝子異常がなく、糖尿病モデルは通常通りに作成することができた。

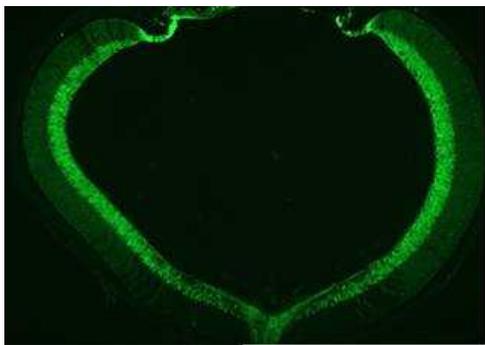


図2 Alpha-Cre トランスジェニックマウスにおける Cre-リコンビナーゼの発現を GFP で表したものの。

4. 研究成果

まず、網膜特異的 HIF1 - ノックアウトマウスの表現型を解析した。その結果、ノックアウトマウスでは特に目立った網膜構造の違いを認めないことが確認された。ただし、出生直後の網膜血管が形成される時期においては、血管の分岐伸長がやや遅れることが明らかになった。この血管は網膜内層の栄養をつかさどるが、成体になるまでに、この血管形成の抑制が網膜内層の構造を変化させるほどの影響を持つものではないことが明らかにされたことになった。

次に、網膜電図(図3)を測定したところ、いずれの遺伝子型においても明らかな変化

が見られないことが示された。網膜内層の機能の測定も行ったが、野生型と比べて明らかな差は認めなかった。これらの結果から、このノックアウトマウスにおいては、発達段階での大きな異常は認められないことが示され、これを用いて病態モデルを作成した研究は、妥当であるといえた。

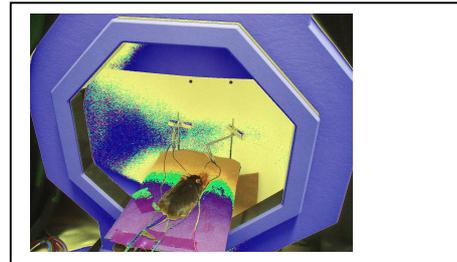


図3 網膜電図の撮影風景

そこで、さらにこのノックアウトマウスと野生型マウスにおいて糖尿病網膜症モデルを作成した。まず、血糖測定等、糖尿病の状態を確認したところ、いずれの遺伝子型のマウスでも同様に、著しい高血糖が誘導されていた。本モデルマウスで特徴的な、体重減少も同様に生じていた。

そこで次に、これらのマウスの網膜サンプルを採取し、各種炎症性サイトカインの解析を行った。今回は、サンプルの mRNA を抽出したのち cDNA を作成し、リアルタイム PCR を用いて評価した。その結果、今回用いた週齢では、少なくとも VEGF およびレニンアンジオテンシンシグナル(プロレニン、アンジオテンシノーゲン、アンジオテンシン変換酵素アイソフォーム1及びアイソフォーム2、アンジオテンシン II 1型受容体に関して解析した)については、個体間のばらつきがあり有意な差を検出しえなかった。しかし、別の網膜特異的 HIF1 - ノックアウトマウスでは、糖尿病誘導時の網膜内 VEGF の発現に差が見られたという報告もあり、さらなる検討が必要と考えられた。現在は、本ノックアウトマ

ウスにおける糖尿病モデルマウスを用いて、網膜構造や機能の変化が見られるか続けて解析するべく、さらに動物飼育等を行っているところである。

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1件)

第50回日本網膜硝子体学会総会 川島弘彦, 篠田肇, 持丸博史, 厚東隆志, 永井紀博, 小沢洋子, 坪田一男. 東京, 東京国際フォーラム, 2011/12/2
内境界膜剥離併用硝子体手術で中心窩網膜分離が改善したX染色体性若年性網膜分離の1例

〔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〕

ホームページ等

<http://www.keio-eye.net/research/rcb.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

持丸 博史 (MOCHIMARU HIROSHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 90424168