

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592588

研究課題名(和文)高脂肪食の網膜および視機能への影響の分子メカニズムの解析

研究課題名(英文)Influence of high fat diet in the retina

研究代表者

篠田 肇 (Shinoda, Hajime)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：30306766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：生活習慣病は今や社会的な問題であり、失明原因の上位を占める糖尿病網膜症・加齢黄斑変性など、眼科領域でも注目される疾患を含む。生活習慣病の危険因子に肥満・高脂肪食があり、これらは糖尿病網膜症・加齢黄斑変性のリスクファクターとして知られるが、その網膜疾患との関連についてはまだあまりよくわかっていない。そこで、本研究では、マウスに高脂肪食を摂取させ網膜への影響を、分子レベルで解析した。全身血中および網膜における炎症性サイトカインシグナルについて、解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Recent increase in the prevalence of metabolic syndrome, which includes vision threatening diseases such as diabetic retinopathy and age-related macular degeneration, is a social issue. Metabolic syndrome includes obesity and high fat diet, which are also known risk factors of diabetic retinopathy and age-related macular degeneration. However, the underlying mechanisms of the relationship between obesity and high fat diet, and retinal diseases were still obscure. In this study, we analyzed the influence of high fat diet in the retina of mice; we evaluated systemic and retinal inflammatory cytokines.

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 生活習慣病 肥満 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症および加齢黄斑変性などの失明原因の上位を占める疾患は、生活習慣病の範疇に含まれ、今後世界レベルで予防に努める必要のある分野である。そのためには、その病態メカニズムを各方面から深く解析する必要がある。生活習慣病では、その発症前の慢性変化が重要であり、疾患予防の観点からは、発症前状態の解析は、欠かせない。

一方、生活習慣病の原因として、肥満・高脂肪食が上げられる。現代的食物の嗜好を考えると、その増加は間違いない。そこで、本研究では、高脂肪食負荷下の網膜の慢性変化を中心に解析する。

高脂肪食はインスリン抵抗性を誘発し、それは糖尿病の大きなリスクになる (Yamauchi, Kadowaki et al. *Nature* 2001)。アディポサイトカインとよばれる脂肪細胞から分泌される、tumor necrosis factor (TNF)- α や、angiotensinogen、leptin、plasminogen-activator inhibitor type 1 (PAI-1) などといった因子が血中を運ばれて、各臓器で代謝に悪影響を及ぼすと考えられている。これらのうちでも、とくに TNF- α や angiotensinogen から変換されるアンジオテンシン II については、炎症性網膜疾患モデル (糖尿病網膜症・加齢黄斑変性・ぶどう膜炎モデルなど) において、病態に大きく関わることを、申請者らは既に報告してきた (Nagai, Shinoda, Ozawa et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005, Kurihara, Ozawa et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006, Nagai, Ozawa et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006, Kurihara, Ozawa et al. *Diabetes*, 2008)。高脂肪食だけでも、これら炎症性サイトカインの発現が眼内で増加している可能性があり、その慢性炎症状態が疾患発症の素地となっている可能性があると考えた。

一方、申請者らはこれまで、炎症性網膜疾患で視機能障害を生じる分子メカニズムを解析してきた。その中で、糖尿病網膜

症モデルでは、angiotensinogen から変換されるアンジオテンシン II は、その 1 型受容体が網膜細胞にあり、網膜神経障害をきたしうることを報告した (Kurihara, Ozawa et al. *Diabetes*, 2008)。また、TNF- α の発現が亢進するぶどう膜炎モデルでは、インターロイキン 6 (IL-6) の発現も亢進しており、その下流で転写因子の STAT3 が活性化するとロドプシンの発現が低下し、視機能が低下することを報告した (Ozawa et al. *J. Biol. Chem.* 2008)。興味深いことに leptin は STAT3 を活性化しうる。

このような研究の結果から、高脂肪食におけるアディポサイトカインの影響は、眼内でも生じると考えられる。その分子メカニズムを解析し、視機能への影響を解析することは、まず、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。また、高脂肪食・肥満の際の眼局所の病的微小環境を改善し、疾患予防をするための薬剤等開発に必要な基盤を成す研究となると考えた。

高齢化に伴う医療経済の危機が問題視されている現在、高齢者の視覚障害が増えれば、患者本人ばかりか介護者も含めた大きな人的および経済的損失を招くことになりかねない。高脂肪食の危険因子としてのメカニズムが明らかにされることは、一般国民に予防教育を普及させる根拠となり、多方面から非常に意義深い。

2. 研究の目的

生活習慣病は今や社会的な問題であり、失明原因の上位を占める糖尿病網膜症・加齢黄斑変性など、眼科領域でも注目される疾患を含む。生活習慣病の危険因子に肥満・高脂肪食があるが、その網膜疾患との関連は、まだあまり知られていない。そこで、本研究では、マウスに高脂肪食を摂取させ網膜への影響を、分子レベルで解析す

る。また、視機能への影響も解析する。眼生活習慣病の病態解明に役立つ研究を行う。

3. 研究の方法

生活習慣病に伴う網膜の病的状態を解明することを目的としているため、本研究では、マウスに高脂肪食を摂取させ網膜への影響を、分子レベルで解析した。

申請者らは生後5週齢のマウスを購入し、高脂肪含有となるよう調合された餌を購入し、毎日摂取させた。そして、高脂肪食を摂取させたマウスとコントロールマウスの網膜を採取し、各種炎症性サイトカインの発現を解析した。この解析にはPCRを用いたmRNAレベルの解析とELISAやイムノブロット法を用いたタンパクレベルの解析の両方を含めた。解析するサイトカインの種類に関しては、これまでストレプトゾトシン誘導糖尿病モデルマウス等において行ってきた、申請者らの研究室の実績をもとに行った。網膜には血液網膜関門があるが、病的状態ではこれが障害され、全身血中の炎症性サイトカインが網膜に影響する可能性があるが、同時に網膜神経細胞はサイトカインを発現しうる細胞であることから、局所の反応で視機能に影響が生じ得ると考え、この実験を行った。また、網膜電図による視機能測定や組織学的解析も行なった。

4. 研究成果

生後5週齢のマウスを購入し、高脂肪含有となるよう調合された餌を購入し、毎日摂取させ、体重、血糖等の全身状態を解析したところ、高脂肪食を摂取したマウスは摂取開始後早期から体重が増加し、少なくとも2か月時点で明らかな肥満を認めることを確認した。

そこでこのマウスにおける網膜内炎症性サイトカインの発現を解析するために、網膜サンプルを採取した。その結果、*vegf*、*angiotensinogen*のmRNAは明らかに上昇していた。また、マクロファージを集積させる*mcp-1*のmRNAは上昇傾向があった。

糖尿病モデルという全身状態の変化を持つ動物で、網膜内のサイトカイン発現の変化を表した結果は、これまでも申請者らを含め示した例はあったが、高脂肪食により、血中のサイトカインだけではなく、網膜局所でのサイトカイン産生が上昇することを示した例は、これまで海外を含めなく、新しい知見であった。

また、視機能を反映する網膜電図に関しては、糖尿病モデルにおいてはその変化は明らかに示されているが、高脂肪食に関しては未だ明らかにされてはいなかった。今回申請者らが得た結果では、統計学的に明らかな結果ではなかったものの、網膜電図の反応低下の傾向を示すこととなり、今後とのさらなる研究の必要性を示すこととなった。今後は、高脂肪食を摂取し始めてからの時間を追った網膜電図の解析が必要であると考えられる。

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 7件)

1. Suzuki M, Nagai N, Izumi-Nagai K, Shinoda H, Koto T, Uchida A, Mochimaru H, Yuki K, Sasaki M, Tsubota K, Ozawa Y. Predictive factors for non-responders to intravitreal ranibizumab treatment in age-related macular degeneration. Br J Ophthalmol. 査読有 2014 Apr 7. doi: 10.1136/bjophthalmol-2013-304670.
2. Sasaki M, Kawashima M, Kawasaki R, Uchida A, Koto T, Shinoda H, Tsubota K, Jie Jin Wang, Ozawa Y. Association of Serum Lipids with Macular Thickness and Volume in Type 2 Diabetes without Diabetic Macular Edema. Invest Ophthalmol Vis Sci. 査読有 2014 Mar 20;55(3):1749-53. doi: 10.1167/iovs.13-13035.
3. Uchida A, Shinoda H, Koto T, Mochimaru H, Nagai N, Tsubota K, Ozawa Y. Vitrectomy for myopic foveoschisis with internal limiting membrane peeling and no gas tamponade. Retina. 査読有 2013 Aug 2. [Epub ahead of

print] doi:
10.1097/IAE.0b013e3182a0e477.

4. Nishi Y, Shinoda H, Uchida A, Koto T, Mochimaru H, Nagai N, Tsubota K, Ozawa Y. Detection of Early Visual Impairment in Patients with Epiretinal Membrane. *Acta Ophthalmologica*. 査読有 2013 Aug;91(5):e353-7. doi: 10.1111/aos.12060. Epub 2013 Feb 7.
5. Yoshikawa N, Noda K, Shinoda H, Uchida A, Ozawa Y, Tsubota K, Mashima Y, Ishida S. Serum vascular adhesion protein-1 correlates with vascular endothelial growth factor in patients with type II diabetes. *J Diabetes Complications*. 査読有 27(2):162-6, 2012. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2012.09.001
6. Sasaki M, Shinoda H, Koto T, Uchida A, Tsubota K, Ozawa Y. Use of micronutrient supplement for preventing advanced Age-related Macular Degeneration in Japan. *Archives of Ophthalmology*. 査読有 2012 Feb;130(2):254-5. doi: 10.1001/archophthalmol.2011.1368.
7. Shinoda H, Koto T, Fujiki K, Murakami A, Tsubota K, Ozawa Y. Clinical findings in a choroideremia patient who underwent vitrectomy for retinal detachment associated with macular hole. *Jpn J Ophthalmol*. 査読有 55(2):169-171, 2011. doi: 10.1007/s10384-010-0911-0.

〔学会発表〕(計 15件)

1. 鈴木美砂, 永井紀博, 永井香奈子, 篠田肇, 内田敦郎, 厚東隆志, 持丸博史, 富田洋平, 佐々木真理子, 坪田一男, 小沢洋子. 狭義加齢黄斑変性に対する pro re nate によるラニズマブ硝子体注射. 第 67 回日本臨床眼科学会 神奈川 横浜 2013/10/31-11/3
2. 永井紀博, 永井香奈子, 鈴木美砂, 持丸博史, 富田洋平, 内田敦郎, 佐々木真理子, 篠田肇, 坪田一男, 小沢洋子. 抗 VEGF 療法に反応不良の滲出型加齢黄斑変性に対するアフリベルセプトの作用. 第 67 回日本臨床眼科学会 神奈川 横浜 2013/10/31-11/3

3. Sasaki M, Kawashima M, Kawasaki R, Kawai M, Uchida A, Koto T, Mochimaru H, Shinoda H, Jie Jin Wang, Tsubota K, Ozawa Y. Associations of Serum Lipids with Macular Morphology in Patients without Diabetic Macular Edema. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting: Washington State Convention & Trade Center Seattle, USA, 2013/5/5-9
4. Suzuki M, Nagai N, Izumi-Nagai K, Shinoda H, Koto T, Uchida A, Mochimaru H, Yuki K, Tsubota K, Ozawa Y. Baseline characteristics and response to intravitreal ranibizumab therapy for age-related macular degeneration. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting: Washington State Convention & Trade Center Seattle, USA, 2013/5/5-9
5. 鈴木美砂, 永井紀博, 永井 香奈子, 篠田肇, 内田敦郎, 厚東隆志, 持丸博史, 小沢洋子, 坪田一男. 加齢黄斑変性に対するラニズマブ単独治療における導入期の有効性についての検討. 第 66 回日本臨床眼科学会 京都 2012/10/25-10/28
6. 永井紀博, 小林文貴, 永井香奈子, 鈴木美砂, 持丸博史, 内田敦郎, 厚東隆志, 篠田肇, 三宅誠司, 小林沙織, 坪田一男, 小沢洋子. 健常者における黄斑色素密度と血清カロテノイド濃度の相関. 第 66 回日本臨床眼科学会 京都 2012/10/25-10/28
7. 厚東隆志, 林李恵, 篠田肇, 永井紀博, 内田敦郎, 持丸博史, 坪田一男, 小沢洋子. 網膜静脈分枝閉塞症に伴う黄斑浮腫に対するベバシズマブテノン嚢下注射の効果の検討. 第 66 回日本臨床眼科学会 京都 2012/10/25-10/28
8. 持丸博史, 前田高宏, 厚東隆志, 内田敦郎, 永井紀博, 篠田肇, 坪田一男, 小沢洋子. 新規過活動膀胱治療薬ミラベグロン投与後早期に発症した網膜静脈分枝閉塞症の一例. 第 66 回日本臨床眼科学会 京都 2012/10/25-10/28
9. Sasaki M, Kawasaki R, Uchida A, Koto T, Mochimaru H, Shinoda H, Tien Y. Wong, Tsubota K, Ozawa Y. Associations Between Early Signs Of Age-related Macular Degeneration (AMD) And Risk Of AMD In The Fellow Eye In Patients With Unilateral AMD. Association for

Research in Vision and Ophthalmology
(ARVO) Annual Meeting: Fort Lauderdale,
U.S.A., 2012/5/6-10

10. 佐々木真理子、川崎良、内田敦郎、厚東隆志、持丸博史、篠田肇、鈴木美砂、永井香奈子、永井紀博、坪田一男、小沢洋子。片眼加齢黄斑変性患者における前駆病変と傍眼発症の関連。第 116 回日本眼科学会 東京 2012/4/5-4/8
11. 堀野武、内田敦郎、持丸博史、厚東隆志、永井紀博、篠田肇、篠田啓、大出尚郎、小沢洋子、坪田一男。ポリコナゾール内服による視覚障害から視放線の病変が見つかった再生不良性貧血の一例。第 116 回日本眼科学会 東京 2012/4/5-4/8
12. 常吉由佳里、篠田肇、西恭代、厚東隆志、内田敦郎、永井紀博、坪田一男、小沢洋子。実用視力測定法を用いた特発性網膜上膜術後の視機能変化の評価。第 35 回日本眼科手術学会 愛知 名古屋 2012/1/27-29
13. 川島弘彦、篠田肇、持丸博史、内田敦郎、厚東隆志、永井紀博、小沢洋子、坪田一男。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。第 50 回日本網膜硝子体学会総会、東京、2011/12/2-4
14. 鈴木美砂、佐々木真理子、厚東隆志、持丸博史、内田敦郎、永井香奈子、永井紀博、篠田肇、坪田一男、小沢洋子。加齢黄斑変性に対するラニビズマブ治療における無効症例の検討。第 65 回日本臨床眼科学会、東京、2011/10/7-10
15. 西恭代、篠田肇、結城賢弥、内田敦郎、厚東隆志、小沢洋子、坪田一男。視力 1.0 以上の網膜上膜に対する実用視力測定の有効性。第 34 回日本眼科手術学会総会、京都、2011/1/28-30

〔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：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
<http://www.keio-eye.net/>

6. 研究組織

(1)研究代表者
篠田 肇 (Hajime Shinoda)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：30306766

(2)研究分担者
小澤 洋子 (Yoko Ozawa)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：90265885

(3)連携研究者
該当なし