

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25年 6月 7日現在

機関番号：	34401
研究種目：	研究活動スタート支援
研究期間：	2011～2012
課題番号：	23890231
研究課題名（和文）	インスリンによる血管作動性因子を介した摘出網膜血管の反応性と加齢による影響
研究課題名（英文）	Insulin-induced nitric oxide production and high glucose in microvessels of rat retina
研究代表者	
	喜田 照代 (Kida Teruyo)
	大阪医科大学・医学部・講師(准)
研究者番号：	90610105

研究成果の概要（和文）：ラット網膜摘出血管を用いて一酸化窒素(NO)産生におけるインスリンに対する反応を検討し、高グルコースとインスリン、NOおよび網膜循環との関係を明らかにすることを目的とした。インスリン投与群、高グルコース群、高グルコース+インスリン投与群、対照群の4群に分け、共焦点レーザースキャン顕微鏡を用いてNOを蛍光標識しtime-lapse観察した。インスリン群では有意に蛍光が増強し、高グルコース群では蛍光強度は逆に有意に減弱した。高グルコース+インスリン投与群ではインスリン投与群でみられたような蛍光増強はみられなかった。4群の間に有意差はみられなかった。インスリンはNOを介して網膜微小循環に関与していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Insulin-induced nitric oxide (NO) production in retinal microvessels was evaluated. The retinal microvessels were incubated in different concentration of glucose with or without addition of insulin. Changes of NO production in the retinal microvessels were semiquantitatively determined by the time-lapse recording of fluorescent intensity of DAF using a laser scanning confocal microscope. In addition, cell viability of pericyte in each condition was assayed by trypan blue exclusion. Exposure of microvessels to insulin in 5.5 mM glucose, the fluorescent intensity was significantly increased, while the insulin-induced NO production was significantly suppressed when vessels were incubated in 20 mM glucose. Insulin increased production of NO and may contribute to the microcirculation of retina. However, this NO-mediated action of insulin is suppressed under high glucose condition. These results may account for impairment of retinal circulation under diabetic conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	1,200,000	360,000	1,560,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：眼科学

キーワード：一酸化窒素、網膜血管、高グルコース、インスリン

1. 研究開始当初の背景

インスリンは血糖値の恒常性維持に重要なホルモンである。一方、インスリン抵抗性は、糖尿病だけでなく高血圧や動脈硬化の進行にも重要な危険因子の一つである。これらの疾患の病因には、一酸化窒素(NO)、活性酸素、さらに血管内皮由来収縮因子であるエンドセリン(ET-1)などが関与しているといわれている。

眼内循環は眼灌流圧に依存しているが、その一方で、ある程度までの眼灌流圧低下(眼圧上昇)に対しては一定に保持されるといった自動調節機構を有している。網膜・視神経乳頭の自動調節機構を含めて眼内循環を調節する因子として、NO、ET-1、プロスタサイクリンといった血管内皮由来因子があげられる。

実際にインスリンは、血管弛緩因子として働く NO と関連して、眼内微小循環に影響をおよぼす。また NO や ET-1 など自動調節能に関与する血管内皮由来血管作動性因子の変化が、網膜血管や網膜自体の組織障害を引き起こし、糖尿病網膜症に代表されるインスリン抵抗性疾患の発症や、血管透過性亢進の原因として働いている可能性が考えられる。

また、その一方で、病的状態に陥らずとも、加齢によって血管に変化が現れる。末梢網膜毛細血管の基底膜の肥厚や周皮細胞の変化など加齢早期での変化や、血管における自動調節能が障害され血管内皮細胞一周皮細胞間の細胞連絡の低下など加齢晩期での変化が報告されており、加齢による網膜血管の変化も懸念される。

帰学後は、大学院での動物実験および米国での臨床研究の成果を生かして、再び基礎に立ち返り、血管内皮由来因子の高血糖状態とインスリンに対する反応について網膜血管レベルで検討を試みた。

2. 研究の目的

インスリンは、血管弛緩因子として働く一酸化窒素(NO)と関連して、眼内微小循環に影響をおよぼす。また、NO やエンドセリン

(ET-1)など自動調節能に関与する血管内皮由来血管作動性因子の変化が、網膜血管や網膜自体の組織障害を引き起こし、糖尿病網膜症に代表されるインスリン抵抗性疾患の発症や、血管透過性亢進の原因として働いている可能性が考えられる。

本研究では、網膜摘出血管を用いて NO 産生におけるインスリンに対する反応を検討し、pre-capillary レベルの網膜血管における高血糖とインスリン、NO および網膜循環との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) インスリンによる網膜血管の NO 合成 tissue-print 法にて摘出した pre-capillary レベルのラット摘出網膜血管を対象とする。インスリン投与群(100nM, 5.5mM glucose)、high glucose 群 (20mM glucose)、high glucose+インスリン投与群、対照群の 4 群に分け、共焦点レーザー顕微鏡(LSM 510 META, Carl Zeiss)を用いて、diaminofluorescein (DAF)により NO の発生を蛍光標識し time-lapse 観察する。DAF は一酸化窒素(NO)検出用蛍光試薬で、DAF のアミノ基が NO と反応し、励起波長 495 nm で励起すると波長 515 nm の緑色の蛍光を発する。共焦点レーザー顕微鏡と摘出網膜血管を用いた time-lapse 観察に関しては、本学で既に報告している。安楽死させたラットから素早く網膜を摘出し、0.5mM EDTA, 1.5mM CaCl₂, 1mM MgSO₄, 20mM glucose, 26mM sodium bicarbonate, 15U papain, 0.04% DNase, 2mM cysteine が入った 2.5ml Earle 緩衝液に浸し 30°C で 30 分間インキュベートする。その後網膜を 4 分割し、tissue-print 法にて pre-capillary レベルの網膜血管をカバーグラスに固定する。カバーグラスに固定された網膜血管を上記の 4 群に分けて culture dish に入れて各群暴露させる。そこへ DAF を加えて 30 分間遮光下にて反応させ、共焦点レ

ーザースキャン顕微鏡で time-lapse 観察した。

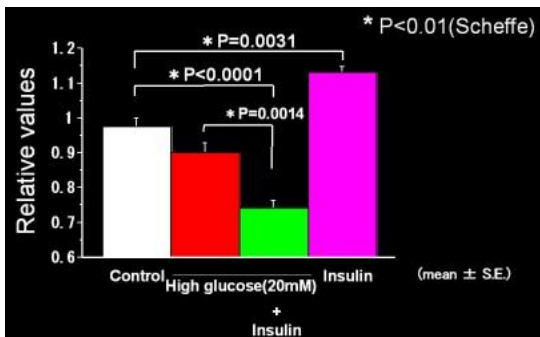
(2) 細胞死の関与

さらに、周皮細胞死による NO の不活化による影響についても検討する。NO の不活化に関しては、NO が活性酸素と結合し、ペルオキシ亜硝酸に変化する系が存在し、ペルオキシ亜硝酸による細胞傷害性が明らかになっている。したがって高濃度の糖負荷により活性酸素が発生している場合、インスリンにより NO が発生していても速やかに不活化され、逆に周皮細胞死を惹起することが予想される。そこで、トリパンプルーを用いて糖負荷による細胞死の関与について検討した。

ラット摘出網膜血管を記述 (1) と同様の 4 群に分け、各群の網膜血管をトリパンプルーにて染色し、各培地に 1 時間暴露後、染色されている細胞と染色されていない細胞を数えた。

4. 研究成果

(1) インスリンによる網膜血管の NO 合成



インスリン投与群では対照群に比べ 13.1% と有意に蛍光が増強した ($P=0.0031$, t-test)。high glucose+インスリン投与群ではインスリン投与群でみられたような蛍光増強はみられなかった。対照群、high glucose、high glucose+インスリン投与群の間に有意差はみられなかった。インスリンは網膜血管の NO レベルを増加させるが、high glucose 培地はその変化を抑制した。以上よりインスリンは NO を介して網膜微小循環に関与していると考えられた。

各群における実際の蛍光顕微鏡写真を下記に示す。網膜血管壁は均一ではないが、血管全体が染色された。

Figure 1. The micrographs of retinal microvessels by time-lapse recording: (A) control, (B) insulin

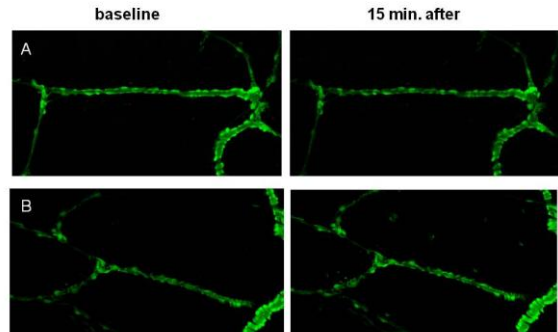
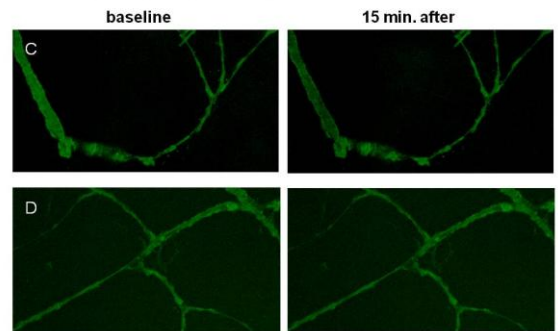


Figure 2. The micrographs of retinal microvessels by time-lapse recording: (C) high glucose (20mM), (D) high glucose + insulin



(2) 細胞死の関与

high glucose+インスリン投与群でみられた蛍光強度減弱の原因として細胞死が関与していないかも含め検討した。

対照群およびインスリン投与群では細胞生存率は 97% と有意差はみられなかった。一方、high glucose 群では 89.79%、high glucose+インスリン投与群では 87.77% と、対照群に比べ有意に減少した。

	Positive Cells (no.)	Negative Cells (no.)	Cell Survival (%)
Control	21	910	97.74
Insulin	28	1133	97.59
high glucose	126	1108	89.79
high glucose + Insulin	160	1148	87.77

* P<0.001, Scheffe

すなわち、インスリン投与群では対照群と同様の細胞生存率であった。一方、**high glucose** 群および **high glucose**+インスリン投与群では対照群に比べ有意に減少した。

以上実験（１）、（２）をまとめると、インスリンは網膜血管の NO レベルを増加させるが、**high glucose** 培地ではその変化は抑制された。その原因として、**high glucose** による細胞死や活性酸素による NO の消去などが考えられた。これらの機序については、さらに検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

1) Nakaizumi A, Horie T, Kida T, Kurimoto T, Sugiyama T, Ikeda T, Oku H. Cell Mol Neurobiol VOL.32, 95-106, 2012
DOI: 10.1007/s10571-011-9739-5

〔学会発表〕（計 2 件）

1) Kida T, Oku H, Kobayashi T, Ikeda T. High glucose inhibits insulin-induced nitric oxide production in microvessels of rat retina. Annual Meeting of ARVO (ARVO; The Association for Research in Vision and Ophthalmology) 2011年5月2日 フォートローダーデール(フロリダ)、米国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

喜田 照代 (Kida Teruyo)
大阪医科大学・医学部・講師(准)
研究者番号：90610105