

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2012～2014
課題番号：24592651
研究課題名(和文) AMPKに着目した涙液分泌機構の解明とその制御

研究課題名(英文) tear secretion and AMPK

研究代表者

川島 素子 (Kawashima, Motoko)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：00327610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：型糖尿病モデルマウスにおいて、持続運動により涙液分泌量低下を抑制できることを発見した。またAMPK活性化剤を投与によっても、同様に涙液分泌低下を抑制できることがわかった。また、涙液中の酸化ストレスマーカーについても、運動介入により減少することがわかった。これらの結果より、運動およびAMPK活性化剤の投与は型糖尿病モデルマウスにおいて糖代謝のみならず、涙液分泌に対しても有効であることが示された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of exercise on tear secretion in type 2 diabetic mice, and also investigated the effect of the adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR). Exercise training for 8 weeks increased tear secretion volume in db/m and db/db mice. The levels of oxidative stress markers in tears were less in the exercise group than in the control group. In C57BL/6JJc1 mice, the tear secretion volumes in both the AICAR 125 mg/kg and AICAR 250 mg/kg groups were significantly larger than in the PBS group. Additionally, in db/db mice, tear secretion volume in the AICAR 125 mg/kg group was also significantly larger than in the PBS group. The results suggest that exercise may be a potential therapy to modulate tear secretion.

研究分野：眼表面

キーワード：涙腺 涙液 ドライアイ

1. 研究開始当初の背景

現在わが国では、ドライアイ患者は増加しており、全国で800万人のドライアイ患者が存在すると推測されている。ドライアイは眼表面の乾燥により眼不快感、痛みなどの症状だけでなく視力障害も起こし、患者のQOLを低下させる疾患である。加齢とともに涙液分泌能が低下することが知られており、加齢とドライアイの関係は極めて大きい。また、我が国は世界一の平均寿命を誇り、急速に超高齢化社会に突入しつつある。さらに、近年のライフスタイルの欧米化により増加した高血圧・高脂血症・糖尿病などのいわゆる生活習慣病、メタボリックシンドロームが蔓延しつつある今日の日本は、中高齢者の健康維持とQOLの向上が現代社会における重要な政策課題となっており、そのメカニズムを系統的に理解して各種疾患の予防につなげる研究が求められている。

これらの背景より、申請者は、「加齢」の側面から涙液分泌機構を解明することを目的とし、老化制御のエビデンスのあるものとして「カロリー制限」という手法に注目した。加齢マウスに対しカロリー制限を行い、涙液分泌能が維持できることを明らかにした。さらに申請者は平成22-23年度科学研究費補助金事業(若手B)において、涙液分泌機構の分子メカニズムを解明するために、機能低下をきたす疾患での解析を行うべく、メタボリックシンドロームにおける涙液分泌機能低下をテーマに研究を行ってきた。これらの研究により、カロリー制限によって酸化ストレスや炎症の軽減をもたらし、涙腺機能が維持されること、逆にメタボリックシンドロームモデルマウスでは酸化ストレスの増加や炎症の増悪がもたらされ、涙腺機能低下が生じていることが示唆された。

これらの成果により、涙腺の機能維持を図るためには全身の代謝メカニズムからのアプローチも重要であると考え、エネルギーセンサーとして中心的役割を持つAMPKに注目したのが直接的な経緯である。

AMPKは細胞の中でのエネルギーの消費をコントロールしているだけでなく、体全体のエネルギーバランスの調整のために非常に大きな役割を果たしていると考えられる。ドライアイの病態を細胞の代謝機構の変化、エネルギー産生の変化により活性酸素の上昇、涙液分泌の低下がもたらされているのではないかと考えた。さらにはAMPKが直接的に涙液分泌に関与する可能性もあると考えた。このAMPKの涙腺における役割を明らかにするために、まず、AMPKの活性を上げることで知られている「運動」介入を行い、カロリー制限と同様に涙腺機能維持に効果があると仮説をたて実験を行うことにした。カロリー

制限での結果を踏まえ、共通のメカニズムにAMPKが関与しているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

将来的なドライアイの新規治療方法開発を目指して、AMPK(AMP-activated kinase)に着目して涙液分泌機構の分子メカニズムを解明し、その制御機構を明らかにすること。

具体的には、

C57BL/6マウスに長期高脂肪食負荷をかけ涙液分泌低下を生じるモデルおよび、¹型糖尿病モデルマウス(db/db)を利用して、低用量持続運動負荷により、涙液分泌が維持されることを確認すること。

またそのメカニズムとしてAMPKが関与することを証明すること。

同時にAMPKの活性化剤であるAICAR等の試薬を用いて投与実験を行い、涙液量の変化を調べ、そのメカニズムを明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) 長期高脂肪食負荷および¹型糖尿病モデルマウスにおける涙液分泌低下に対する低用量持続運動介入効果の確認とAMPK関与の証明

モデルマウス作成・飼育

雄のC57BL/6マウスを購入し、通常食群、高脂肪食負荷(60%ラード)群、高脂肪食+運動負荷群の3群にわけ飼育実験を開始し、8週目で解剖する。

糖尿病モデルマウス(db/db)についても運動負荷群、単純飼育群の2群で8週間飼育する。

ベースラインの評価

摂餌量、飲水量の計測、1週毎に体重測定を行い経時的に確認する。8週目で体重、血液データを測定し、全身状態を把握する。

涙液分泌量の経時的評価

負荷開始1週ごとに涙液分泌量を綿糸法(30秒)を用いて測定する。

涙腺のおよび角結膜の組織学的解析

a. 組織学的検討: マロリー染色、ヘマトキシリン・エオジン染色で、涙腺組織の構造変化、線維化の変化、浸潤細胞の程度を比較検討する。酸化ストレスマーカーの発現を8-hydroxy-2-deoxyguanosine, 4-hydroxy-2-nonenalの免疫染色を行い比較検討する。

タンパク発現、遺伝子解析

AMPKを中心とした関連する分子の発現変化をreal-time PCR, western blottingを用いてmRNAおよびタンパク質レベルで解析する。

(2) AICAR

(5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside) 投与による涙液分泌変化の解析とそのメカニズムの解析

C57BL/6マウスを用いて、AMPKの活性化剤

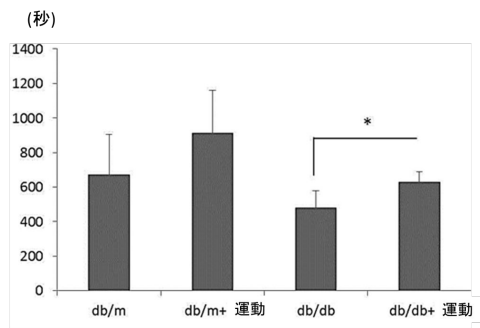
である AICAR の単回投与を行い、涙液分泌量への影響の有無を明らかにする。投与量の増減による違い、時間経過による変化を涙液量のほか、運動介入実験と同様に AMPK を中心とした発現解析を行う。血糖値をはじめとした全身状態の把握も行う。また、他臓器での既報をもとに、肝臓と筋肉のサンプリングも行い涙腺との比較解析も行う。

4. 研究成果

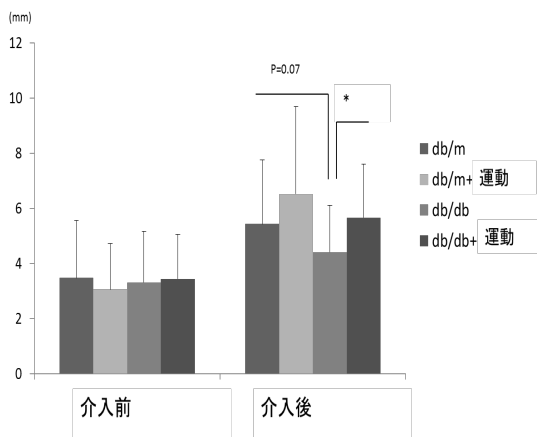
(1)糖尿病モデルマウス (db/db) の運動介入により、体重増加、血糖値上昇が抑制された。(db/db 群の体重 53.4 ± 3.7 g に対し、+運動負荷群の体重は 48.5 ± 8.9 g ($p < 0.05$), 血糖値は db/db 群 404.8 ± 53.3 、+運動負荷群 329.0 ± 89.7 ($p < 0.05$))

(2)db/db マウスに対する AICAR 単回投与により血糖値上昇が抑制された。(db/db 群 480.3 ± 32.8 , + AICAR 投与群 354.1 ± 163.0)

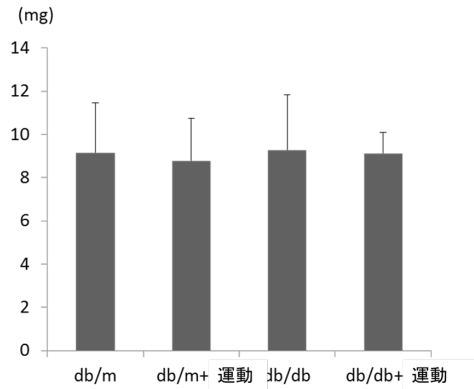
(3)運動能は運動介入群で有意に増加した。



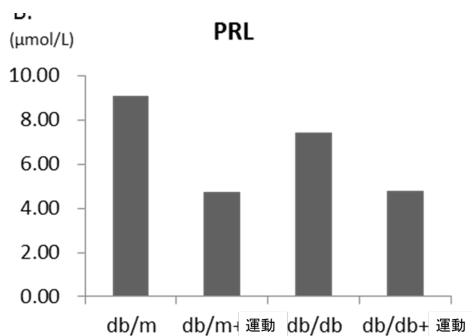
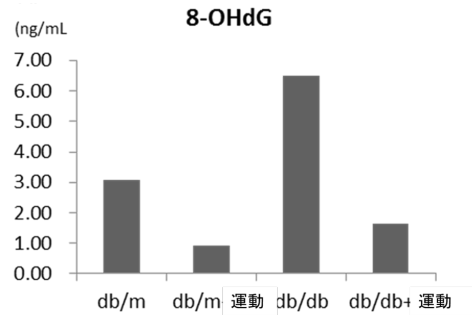
(4)db/db マウスにおいて運動介入により涙液量が有意に保持された。



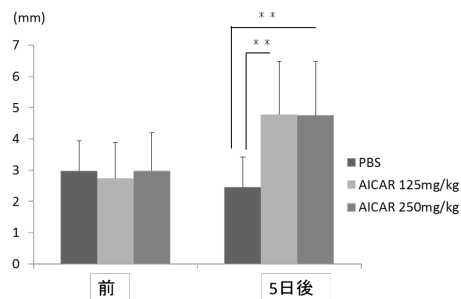
(5) 涙腺重量は変化を認めなかった。



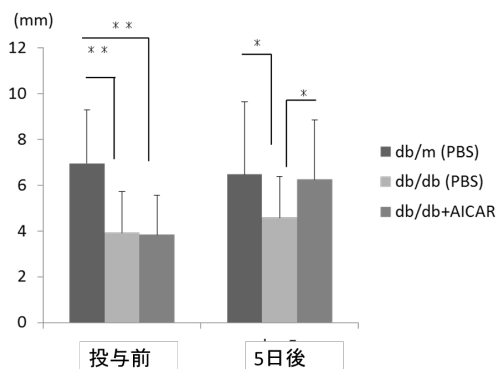
(6) 涙液中の酸化ストレスマーカーは運動群で低いようであった。



(7) AICAR 投与により、涙液量増加が認められた。



(8)db/dbマウスに対するAICAR投与においても涙液量の増加が認められた。



C57BL/6 マウスおよび 型糖尿病モデルマウス (db/db) に対する 8 週間の低等度持続運動介入により、血糖値、体重の増加抑制、耐糖能異常の改善、および、涙液量減少の抑制ができることが分かった。また、涙液中の酸化ストレスマーカーについても、運動介入により減少することがわかった。AMPK 活性化である AICAR 投与においても同様の結果を示した。これらの結果より、運動および AMPK 活性化剤の投与は 型糖尿病モデルマウスにおいて糖代謝のみならず、涙液分泌に対しても有効であることが示された。

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 1 件)

Sano K, Kawashima M, Ito A, Inaba T, Morimoto K, Watanabe M, Tsubota K. Aerobic exercise increases tear secretion in type 2 diabetic mice. Invest Ophthalmol Vis Sci. 査読有、2014 May 29;55(7):4287-94. doi: 10.1167/iovs.13-13289.

[学会発表](計 0 件)

[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：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川島 素子(Motoko Kawashima)
慶應義塾大学 医学部 (特任講師)
研究者番号：00327610

(2) 研究協力者

佐野こころ(Kokoro Sano)
慶應義塾大学 医学部 (大学院生)