

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790261

研究課題名(和文) 網膜循環障害に関与する因子の同定と網膜循環改善薬の探索

研究課題名(英文) Identification of factors involved in retinal circulation dysfunction and exploration therapeutic drugs that improve disorders of retinal circulation.

研究代表者

森 麻美 (MORI, Asami)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：80453504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、網膜血管において、エポキシエイコサトリエン酸が内皮由来過分極因子のひとつであることが示唆された。また、内皮由来過分極因子の拡張には、ギャップジャンクションを介する機序も存在することが示された。さらに、糖尿病や緑内障モデルラットの網膜神経や網膜血管では、酸化ストレスが亢進し、それに伴う網膜血管拡張機能障害が生じることも明らかになった。従って、強力な抗酸化薬が網膜循環障害に対する有用な予防・治療薬となりうる。

研究成果の概要(英文)：This study suggested that the candidate mediator for endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in retinal blood vessels may be epoxyeicosatrienoic acid. Moreover, in retinal blood vessels, gap junction has been played a key role in EDHF-mediated vasodilation. Furthermore, our study suggested that increased oxidative stress, such as 4-hydroxy-2-nonenal, in retinal blood vessels and retinal neuronal cells of diabetes and glaucoma rats may be an important mechanism responsible for impairment of the vasodilator mechanisms in retinal blood vessels. In conclusion, potent antioxidative drugs may be novel candidates for prevention and/or treatment of glaucoma and diabetic retinopathy.

研究分野：薬理学

キーワード：薬理学 微小循環 緑内障 糖尿病 血管生物学 網膜 内皮由来過分極因子 beta アドレナリン受容体

1. 研究開始当初の背景

緑内障及び糖尿病網膜症は、いずれも網膜神経傷害を生じることが広く知られており、わが国の後天性失明原因の第一位と第二位を占めている。これら疾患の発症や進行には網膜循環障害の関与が示唆されているが、その機序は十分明らかにされていない。それどころか、正常時の網膜循環調節機構においても不明な点が多い。このように、糖尿病網膜症や緑内障で生じる網膜循環障害を正常化することによってこれら病態の発症や進行を抑制し、網膜神経傷害をも改善することが重要と考えられるが、まずは正常時の網膜循環調節機構の不明な点を解明することが必須であると言える。

2. 研究の目的

本研究は、我々が独自に構築した各種網膜循環評価法を用いて、「正常時の網膜循環調節機構を解明」すると共に、「病態時の網膜循環障害に関与する因子を同定」し、その障害を正常化するための「網膜循環改善薬の探索」を最終的な目的としている。

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評価した。

(2) N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 硝子体内投与とモデルラットを用いた検討：麻酔下の硝子体に 200 nmol/eye の NMDA を投与し、14 日後に血管反応性を同様に評価した。

(3) 糖尿病モデルラットの作製：ラットにストレプトゾトシン (65 mg/kg, i.v.) を単回投与し、かつ 5% ブドウ糖水溶液を飲水として与える方法により重度の I 型糖尿病を発症

させた。糖尿病発症 2 週間後に網膜血管反応性を評価した。

4. 研究成果

(1) 健常ラットを用いた検討

網膜循環調節機構に関与する内皮由来過分極因子 (EDHF) の同定-1: 内皮依存性血管拡張薬である [acetylcholine (ACh)] を静脈内投与すると、EDHF、一酸化窒素 (NO) 及びプロスタグランジンが産生され、網膜血管を拡張することが明らかになっている。しかし、網膜血管における EDHF の実態は明らかになっていない。そこで、EDHF による網膜血管の拡張反応に、他の血管床で報告されているギャップジャンクションが関与しているか否かを明らかにするために、ギャップジャンクション阻害薬 [18β-glycyrrhetic acid] 及び [carbenoxolone] を用いて検討した。内皮依存性血管拡張薬 [ACh] による網膜血管拡張反応は、2 種のギャップジャンクション阻害薬硝子体内投与によりいずれも有意に減弱した。そこで、NO 合成酵素阻害薬 [L-NAME] 及び シクロオキシゲナーゼ阻害薬 [indomethacin] 存在下の内皮依存性血管拡張薬 [ACh]、つまり EDHF 様刺激による網膜血管拡張反応についても検討した結果、この反応はギャップジャンクション阻害薬の硝子体内投与により有意に減弱した。以上の結果から、EDHF による網膜血管拡張反応にギャップジャンクションの関与が示唆された。

網膜循環調節機構に関与する EDHF の同定-2: ラット網膜血管において、EDHF が高コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ (BK_{Ca}) チャネルを介する機序を介して拡張反応を示すことが明らかになっている。そこで BK_{Ca} チャネルを活性化させる EDHF 候補のエポキシエイコサトリエン酸 (EETs) について検討した。その結果、EETs 阻害薬 [17-ODYA, 14,15-EE5(Z)E] の硝子体内投与により、内皮

依存性血管拡張薬 [ACh] による網膜血管拡張反応は有意に減弱した。このことから、ACh による網膜血管拡張反応は、EETs の放出を介していることが示唆された。

β_2 -アドレナリン受容体 (AR) を介した網膜血管拡張機序の解明： β_2 、 β_3 -AR を介した網膜血管拡張機序の相違の解明のうち、 β_2 -AR 刺激を介した網膜血管拡張機序について検討した。 β_2 -AR 刺激薬 [salbutamol] による網膜血管拡張反応は、BK_{Ca} チャンネル遮断薬 [iberiotoxin] の硝子体内投与により有意に減弱した (図 1)。一方、 β_2 -AR 以外の AC-cAMP 経路を介する薬物として、 β_3 -AR 刺激薬 [CL316243]、PGI₂ 及び アデニル酸シクラーゼ活性化薬 [forskolin] を用いて同様に検討したが、これら薬物による網膜血管拡張反応は BK_{Ca} チャンネル遮断薬による影響を受けなかった。以上の結果から、 β_2 -AR 受容体刺激は BK_{Ca} チャンネルを活性化させ、網膜血管を拡張させることが示唆された。

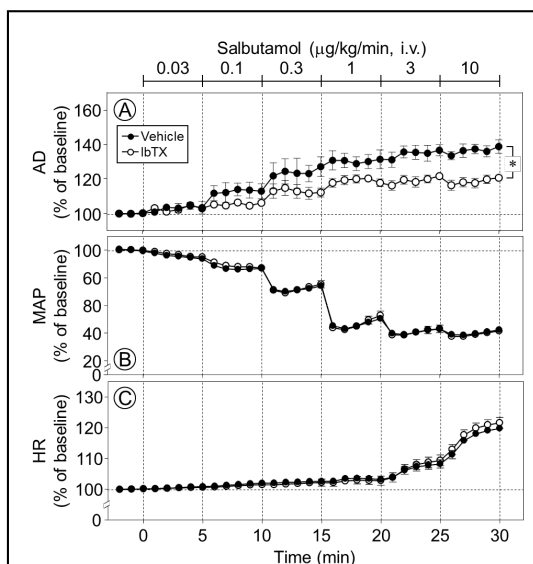


図 1: Salbutamol による網膜細動脈径 (AD, A), 平均動脈圧 (MAP, B) 及び心拍数 (HR, C) の変化に及ぼす高コンダクタンス Ca²⁺ 活性化 K⁺ チャンネル遮断薬 iberiotoxin (IbTX) 硝子体内投与の影響

Salbutamol (0.03-10 μg/kg/min, i.v.) による網膜細動脈径の用量依存的な増大反応は、IbTX (20 pmol/eye) の硝子体内投与により有意に減弱した (A)。一方、IbTX は salbutamol による平均動脈圧の低下及び心拍数の上昇反応に及ぼさなかった (B, C)。値は平均値±標準誤差で示した (n=5-6)。*p<0.05。

以上のように、網膜血管において EDHF はギャップジャンクションを介した拡張反応を示すこと、また EETs が BK_{Ca} チャンネルを介した機序における EDHF の候補となりうることが示唆された。さらに、 β_2 -AR 刺激による網膜血管拡張反応には、EDHF の作用点であり、かつ糖尿病時に障害される BK_{Ca} チャンネルを介する機序が関与していることが示唆された。

(2) 緑内障モデルラットを用いた検討

NMDA 誘発網膜神経傷害モデルラットにおける血管拡張機能の変化: 緑内障モデルラットでは、内皮依存性血管拡張薬 [ACh]、[adenosine] 及び EDHF 様網膜血管拡張反応が減弱することが明らかになっている。今回、 β_2 -AR 刺激薬 [salbutamol] 及び β_3 -AR 刺激薬 [CL316243] による網膜血管拡張反応性についても検討した結果、これら反応は健常ラットと同様であった。以上の結果より、緑内障モデルラットでは NO 及び EDHF 放出能の低下を含む網膜血管内皮機能障害が生じるものの、 β -AR を介した平滑筋機能は変化しないことが示された。糖尿病時には、NO や EDHF 放出能ではなく、EDHF の作用点である BK_{Ca} チャンネルによる拡張機能障害が生じる。このように、病態によって網膜血管拡張機能障害機序が異なることが示唆された。

網膜血管拡張機能障害及び網膜神経傷害に關する因子の同定: 緑内障モデルラットの網膜組織切片を作製し、脂質過酸化のマーカである [4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE)] の発現について観察した結果、NMDA 投与 6 時間後という緑内障処置後早期の段階で網膜血管及び網膜神経における 4-HNE の発現増大が観察された。

(3) 糖尿病モデルラットを用いた検討

糖尿病モデルラットの網膜血管機能障害に

関与する因子の同定：糖尿病モデルラットの網膜組織切片を作製し、脂質過酸化マーカー [4-HNE] の発現を観察した結果、糖尿病モデルラットにおける網膜血管（特に網膜細動脈）及び網膜神経全体に 4-HNE の発現が増大していた。

(4) 過酸化脂質が網膜血管拡張機能に及ぼす影響

(2) の緑内障モデル、(3) の糖尿病モデルラットの結果から、酸化ストレスの亢進に伴う過酸化脂質 (4-HNE) が網膜血管拡張機能に影響を及ぼす可能性が関挙げられた。そこで、健常ラットに 4-HNE を硝子体内投与した際

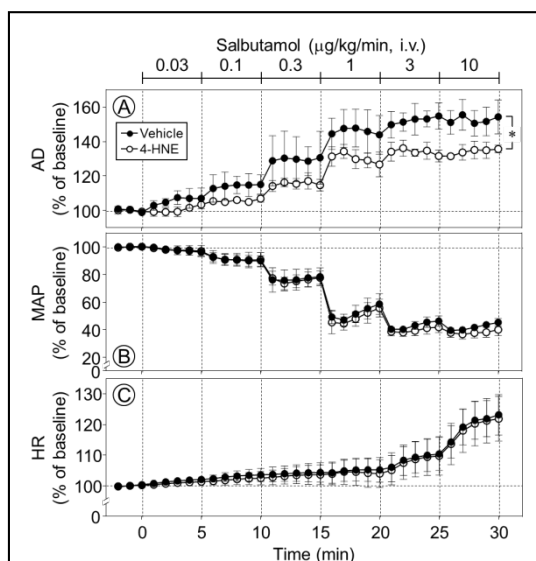


図 2: Salbutamol による網膜細動脈径 (AD, A), 平均動脈圧 (MAP, B) 及び心拍数 (HR, C) の変化に及ぼす 4-hydroxy-2-nonal (4-HNE) 硝子体内投与の影響

Salbutamol (0.03-10 µg/kg/min, i.v.) による網膜細動脈径の用量依存的な増大反応は、4-HNE (6.6 nmol/eye) の硝子体内投与により有意に減弱した (A)。一方、4-HNE は salbutamol による平均動脈圧の低下及び心拍数の上昇反応に影響を及ぼさなかった (B, C)。値は平均値±標準誤差で示した (n=5 ずつ)。*p<0.05。

の網膜血管拡張能について検討した。その結果、salbutamol による網膜血管拡張機能が 4-HNE により抑制された (図 2)。さらに、糖尿病時に障害される BK_{Ca} チャンネルの刺激薬 [BMS-191011] による網膜血管拡張反応も 4-HNE の存在下で減弱した (図 3)。これらの結果は、少なくとも糖尿病モデルで観察

される網膜血管機能障害は、4-HNE の蓄積により生じる可能性が示された。緑内障モデルで観察される内皮依存性網膜拡張機能に 4-HNE がどのような影響を及ぼすかについては、今後検討していく必要がある。

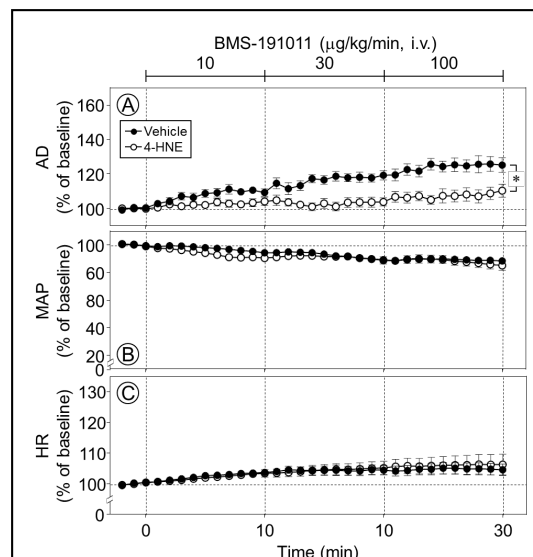


図 3: BMS-191011 による網膜細動脈径 (AD, A), 平均動脈圧 (MAP, B) 及び心拍数 (HR, C) の変化に及ぼす 4-hydroxy-2-nonal (4-HNE) 硝子体内投与の影響

BMS-191011 (10-100 µg/kg/min, i.v.) による網膜細動脈径の用量依存的な増大反応は、4-HNE (6.6 nmol/eye) の硝子体内投与により有意に減弱した (A)。一方、4-HNE は平均動脈圧及び心拍数の変化に影響を及ぼさなかった (B, C)。値は平均値±標準誤差で示した (n=6 ずつ)。*p<0.05。

このように、糖尿病や緑内障で観察される網膜血管拡張機能障害は、酸化ストレスの亢進に伴う過酸化脂質の蓄積がひとつの要因となるかもしれない。

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 4 件)

- Mori A, Nakahara T, Kurauchi Y, Sakamoto K, Ishii K. Elucidation of dysfunctional mechanisms of retinal circulation in the rat models of glaucoma and exploration of novel therapeutic drugs. *Yakugaku Zasshi*. 133: 1343-1350, 2013. doi: 10.1248/yakushi.13-00228-2 (査読無)
- Mori A, Hanada M, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. Impaired retinal

vasodilator response to acetylcholine in a rat model of NMDA-induced retinal degeneration. *J Pharmacol Sci.* 127:211-216, 2015. doi: 10.1016/j.jphs.2014.12.014. (査読有)

Mori A, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. Mechanisms underlying dysfunction of retinal blood vessels in diabetic rats. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 145:70-73, 2015. doi: 10.1254/fpj.145.70. (査読無)

Mori A, Takei T, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. 4-Hydroxy-2-nonenal attenuates β_2 -adrenoceptor-mediated vasodilation of rat retinal arterioles. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 388:575-582, 2015. doi: 10.1007/s00210-015-1099-0. (査読有)

[学会発表](計 10 件)

Mori A, Nakahara T, Kurauchi Y, Sakamoto K, Ishii K. Role of β_3 -adrenoceptors in the regulatory mechanism of retinal vascular tone in rats. 第 86 回日本薬理学会年会 2013.3.23 福岡県福岡市(福岡国際会議場)

森 麻美, 中原 努, 倉内 祐樹, 坂本 謙司, 石井 邦雄 緑内障における網膜循環障害機序の解明と新規緑内障治療薬の探索 日本薬学会第 133 年会 2013.3.30 神奈川県横浜市(パシフィコ横浜)

滑川 諒, 森 麻美, 坂本 謙司, 中原 努, 石井 邦雄 NO による網膜血管拡張反応における PGI_2 の役割 第 128 回日本薬理学会関東部会(東京)日本薬理学会 2013.7.14 [日本薬理学雑誌 142(4) 4P. 2012.10.1] 東京都新宿区(早稲田大学国際会議場)

Asami Mori, Kenji Sakamoto, Tsutomu Nakahara, Kunio Ishii. Mechanisms underlying dysfunction of retinal blood

vessels in diabetes rats. 第 87 回日本薬理学会年会 2014.3.2 宮城県仙台市(仙台国際センター)

Kentaro Higashi, Asami Mori, Kenji Sakamoto, Tsutomu Nakahara, Kunio Ishii. Probucol ameliorates dysfunction of retinal circulation in diabetes rats. 第 87 回日本薬理学会年会 2014.3.21 宮城県仙台市(仙台国際センター)

森 麻美, 滑川 諒, 坂本 謙司, 中原 努, 石井 邦雄 NO は電位依存性カリウムチャンネルを介してラット網膜血管を拡張させる 日本薬学会第 134 年会 2014.3.28 熊本県熊本市(熊本市総合体育館)

森 麻美, 滑川 諒, 坂本 謙司, 中原 努, 石井 邦雄 ラット網膜血管における gap junction を介した拡張機序の解明 第 130 回日本薬理学会関東部会(東京)日本薬理学会 2014.7.5 [第 130 回日本薬理学会関東部会 プログラム・要旨集 P65] 東京都品川区(星薬科大学 百年記念館)

森 麻美, 黒崎 航平, 牛久保 裕子, 坂本 謙司, 中原 努, 石井 邦雄 プロスタノイド EP2 受容体刺激薬の緑内障予防・治療薬としての可能性 第 34 回日本眼薬理学会(岐阜)日本眼薬理学会 2014.9.14 [第 34 回日本眼薬理学会抄録集 P68] 岐阜県岐阜市(長谷川国際会議場)

森 麻美, 武井 俊明, 坂本 謙司, 中原 努, 石井 邦雄 4-ヒドロキシ 2-ノネナールはアドレナリン β_2 受容体刺激薬によるラット網膜細動脈拡張反応を減弱させる 第 88 回日本薬理学会年会(名古屋) 2015.3.18 愛知県名古屋市(名古屋国際会議場)

森 麻美, 須澤 弘典, 坂本 謙司, 中原 努, 石井 邦雄 エルカトニンのラット網膜

循環に及ぼす影響 日本薬学会第 135 年
会(神戸)2015.3.28 [日本薬学会第 135 年
会 DVD 要旨集] 兵庫県神戸市(デザイ
ンクリエイティブセンター神戸)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 麻美 (MORI, Asami)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：80453504