

67. 神経血管連関とワクチンに着目した糖尿病網膜症治療

長岡 泰司

日本大学 医学部 視覚科学系 眼科学分野

Key words : 糖尿病網膜症, 網膜神経障害, 網膜血流調節, ワクチン治療

緒言

我が国における成人中途失明の主因である糖尿病網膜症は糖尿病細小血管合併症の一つであり、眼血流障害が病態の本質であるため、研究代表者はこれまで糖尿病網膜症の眼循環動態について基礎および臨床研究を行ってきた。そして2型糖尿病患者では網膜血流量が糖尿病網膜症発症前からすでに低値であることを報告した [1]。これらの知見から、早期から適切な介入を行い、眼循環障害を改善することで、その後の網膜症の発症・進展を予防できると考えている。すなわち、眼循環を定量的に評価し早期循環障害を捉え、適切な時期から循環改善治療を行うことにより、糖尿病網膜症・黄斑浮腫の早期治療につながると考えられる。実際に研究代表者はブタ摘出血管を用いた *in vitro* 実験から、実臨床から用いられている内服薬（スタチン、フィブラート、シロスタゾールなど）が網膜血管拡張作用を有することを見出しており、これら薬剤による循環改善が網膜症予防につながる可能性があると考えている。

一方で、糖尿病網膜症発症前から網膜電位図（ERG）に異常が認められ、網膜症発症前から網膜神経活動の異常が起こることが知られている。最近の臨床研究では、光干渉断層計（OCT）で糖尿病患者では網膜症のない病期ですでに網膜神経線維層の厚みが減少するとの報告もなされており、糖尿病早期から網膜神経組織が障害されている可能性が示唆されている。私は近年脳神経科学の分野で注目されている神経細胞-グリア細胞-血管のネットワーク（Neurovascular coupling : NC）の網膜での重要性に着目し、フリッカー刺激による網膜代謝活動の亢進に伴う網膜血流増加反応（フリッカー反応）が網膜のNCを評価する良い指標であり [2]、神経細胞のみならずグリア細胞も網膜のNCに重要な役割を果たすことを初めて報告した。しかし正常動物での検討にとどまっており、糖尿病など疾患動物モデルにおいてこの網膜のNCが糖尿病網膜症の病態にどのように関与するかは明らかではない。そこで本研究では、2型糖尿病モデルマウスである db/db マウスと、糖尿病網膜症発症することが報告されている *MODY3* 遺伝子改変糖尿病ブタを用いて、糖尿病網膜症における眼循環動態の経時的変化を、特に網膜神経血管連関に着目して検討した。さらに、我々は血中プロレニン値が高い糖尿病患者は高率に糖尿病網膜症を発症することを報告した。さらに糖尿病モデル動物では網膜におけるプロレニンと（プロ）レニン受容体の発現が亢進し、慢性炎症を介して糖尿病網膜症の病態に深く関与していることが報告された。我々はペプチドワクチン技術を応用してプロレニンに対するペプチドワクチンの作製に成功しており、このプロレニンワクチンを糖尿病動物に投与して網膜循環および網膜機能の改善効果を検討したい。

方法

1. 2型糖尿病モデルマウス（db/db マウス）を用いた網膜神経血管連関障害の経時的検討

db/db マウスを用い、経時的に網膜血流とフリッカー反応をレーザースペックル血流計（LSFG） [3] を用いて測定すると同時に、ERGにて網膜機能、OCTにて網膜形態を経時的に評価し、糖尿病による網膜神経血管連関障害を評価した。

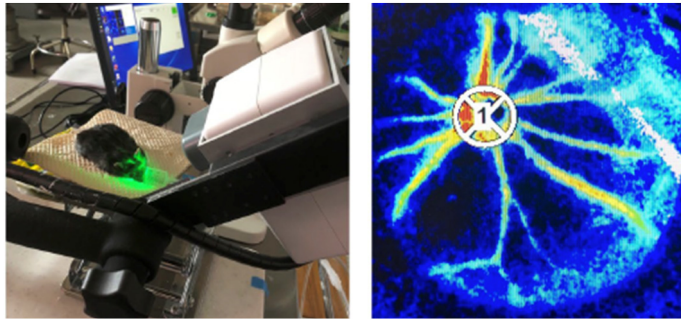


図1. LSFG を用いたマウスの *in vivo* 網膜血流測定
寒色系は血流低値、暖色系は血流高値を表している（文献 [3] より引用）。

2. db/db マウスにおける網膜神経血管連関障害の新規治療法としてのプロレニンワクチンの開発

プロレニンワクチンを db/db マウスに投与し、経時的に網膜循環と網膜機能を LSFG と ERG を用いて評価し、糖尿病による網膜循環障害のワクチンによる改善効果を評価した。

結果

1. 高酸素負荷試験による網膜血流低下反応

100%酸素を10分間投与すると、網膜血流は30%程度減少した（図2）。

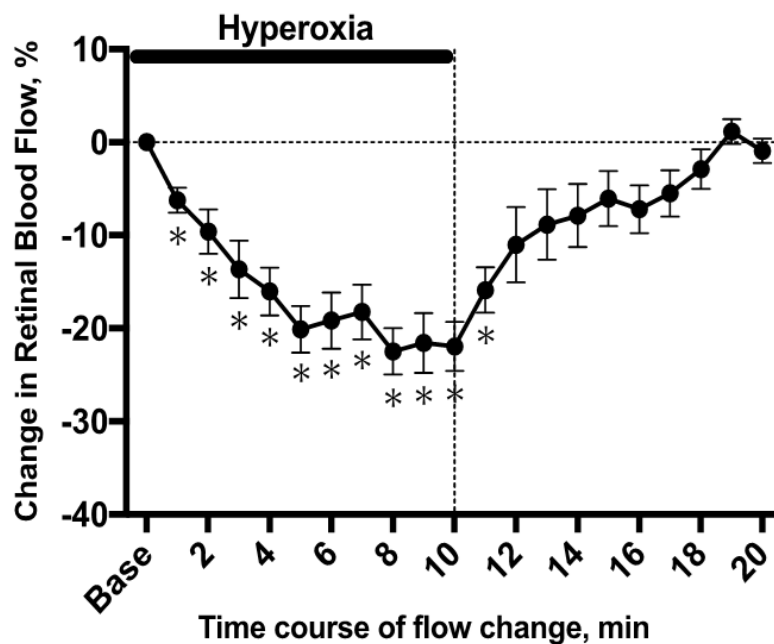


図2. 正常マウスにおける高酸素負荷試験（100%酸素吸入）による網膜血流低下反応
P<0.05、n=6（Two-way repeated measured ANOVA）。文献 [3] より引用、改変。

2. フリッカー刺激による網膜血流増加反応

12 Hz、3 分間のフリッカー刺激により網膜血流は 30%程度増加した (図 3)。

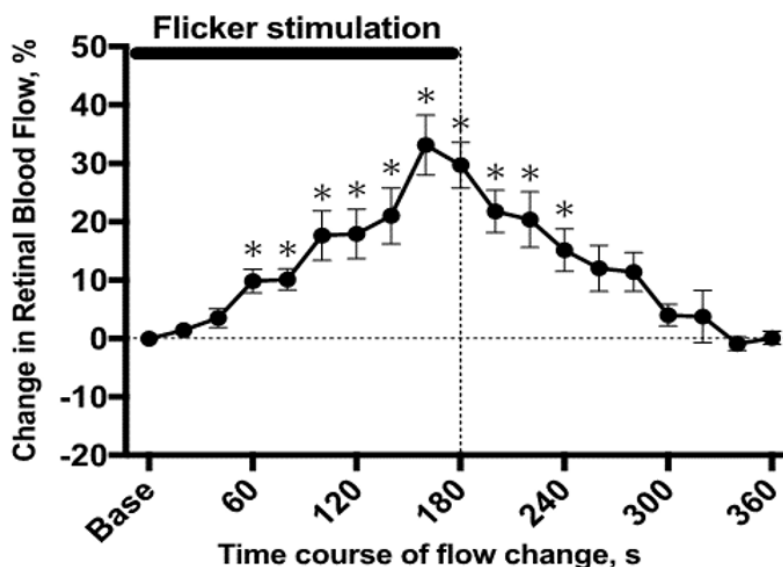


図 3. 正常マウスにおけるフリッカー刺激による網膜血流増加反応

P<0.05、n=6 (Two-way repeated measured ANOVA)。文献 [3] より引用、改変。

3. 糖尿病マウスにおける高酸素負荷時の網膜血流反応

糖尿病マウスでは正常血糖対照マウス (db/m) に比べて高酸素負荷刺激時の網膜血流反応は減弱した (生後 20 週) (図 4)。

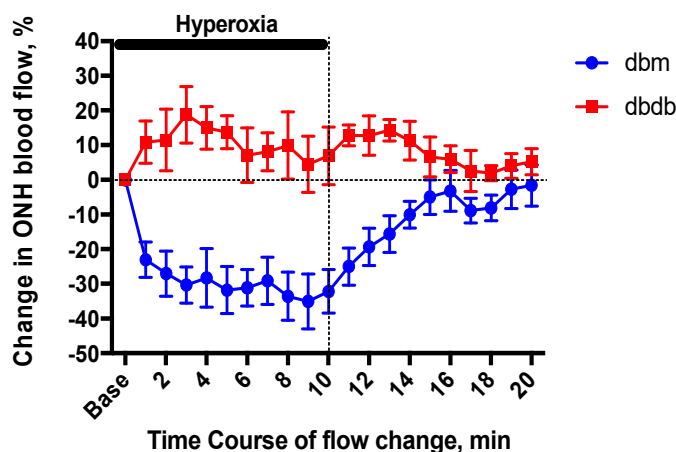


図 4. 糖尿病マウス (db/db) およびコントロールマウス (db/m) における高酸素負荷試験 (100%酸素吸入) による網膜血流低下反応

n=6。文献 [4] より引用、改変。

4. 糖尿病マウスにおけるフリッカー刺激時の網膜血流反応

糖尿病マウス (db/db) では正常血糖対照マウス (db/m) に比べてフリッカー刺激時の網膜血流反応は減弱した (生後 20 週) (図 5)。

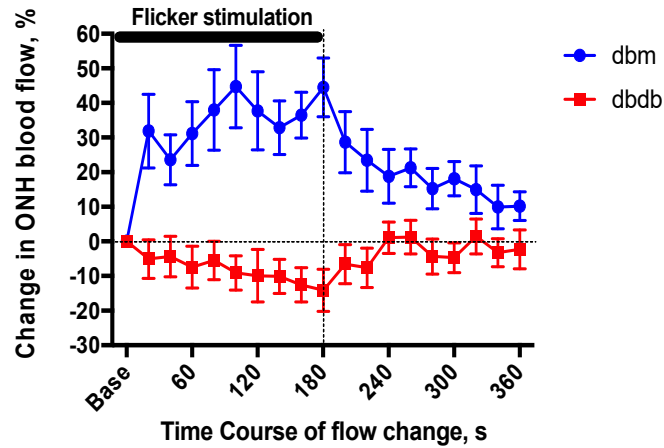


図 5. 糖尿病マウス (db/db) およびコントロールマウス (db/m) におけるフリッカー刺激による網膜血流低下増加反応
n=6。文献 [4] より引用、改変。

5. プロレニンワクチンによる網膜血流調節障害の改善効果

プロレニンワクチン (Vp) 投与により、糖尿病マウスにおける高酸素負荷およびフリッカー刺激による網膜血流反応障害は改善していた (図 6)。

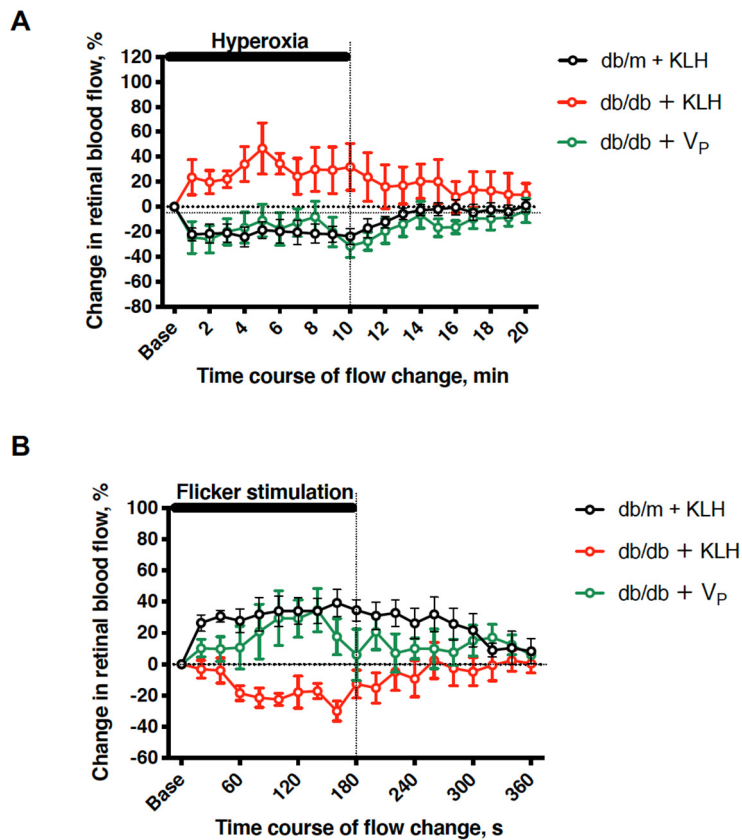


図 6. 糖尿病マウス (db/db) およびコントロールマウス (db/m) におけるプロレニンワクチン (Vp) の高酸素負荷試験 (100%酸素吸入) (A) およびフリッカー刺激 (B) による網膜血流反応
n=6。

考 察

本研究の結果から、我々が発見した高酸素負荷による血流低下反応 [3]、フリッカー刺激による血流増加反応のいずれもが糖尿病マウスでは障害され、それにはミュラー細胞の機能障害が関与することが明らかとなった。定常状態の眼血流は障害されていないことから、これらの負荷試験はより早期からの糖尿病網膜症機能障害を検出できる可能性があり、今後の臨床応用が期待できる。

さらに我々の開発したプロレニンワクチン投与により網膜循環調節障害が改善することも明らかとなった。糖尿病網膜症の病態は血管内皮増殖因子 (VEGF) を中心としたサイトカインに加えて血流障害・虚血、慢性炎症などが複雑に関与している。VEGF に対しては抗 VEGF 薬が頻用され、虚血に対しては光凝固、慢性炎症にはステロイドが有効と考えられるが、今回プロレニンが新たな治療ターゲットとなることは、現行の糖尿病網膜症治療に新しい選択肢をもたらす可能性がある。さらにワクチン療法を糖尿病網膜症に応用することができれば、災害やコロナなど感染症蔓延時の受診抑制にも有効な低侵襲治療手段といえよう。今後、本研究の成果を前臨床試験まで行い、臨床応用に結びつけたいと考えている。

結 語

糖尿病早期に起こる網膜血流調節障害をプロレニンワクチン投与により改善できる可能性が示唆された。

共同研究者

本研究の共同研究者は、大阪大学大学院医学系研究科健康発達医学講座の中神啓徳先生、林宏樹先生である。

文 献

- 1) Nagaoka T, Sato E, Takahashi A, Yokota H, Sogawa K, Yoshida A. Impaired retinal circulation in patients with type 2 diabetes mellitus: retinal laser Doppler velocimetry study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010 Dec;51(12):6729-34. doi: 10.1167/iovs.10-5364. Epub 2010 Jul 14. PMID: 20631236
- 2) Song Y, Nagaoka T, Yoshioka T, Nakabayashi S, Tani T, Yoshida A. Role of glial cells in regulating retinal blood flow during flicker-induced hyperemia in cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015 Nov;56(12):7551-9. doi: 10.1167/iovs.15-17676. PMID: 26618647
- 3) Hanaguri J, Yokota H, Watanabe M, Kuo L, Yamagami S, Nagaoka T. Longitudinal stability of retinal blood flow regulation in response to flicker stimulation and systemic hyperoxia in mice assessed with laser speckle flowgraphy. *Sci Rep.* 2020 Nov 13;10(1):19796. doi: 10.1038/s41598-020-75296-y. PMID: 33188259
- 4) Hanaguri J, Yokota H, Watanabe M, Yamagami S, Kushiyaama A, Kuo L, Nagaoka T. Retinal blood flow dysregulation precedes neural retinal dysfunction in type 2 diabetic mice. *Sci Rep.* 2021 Sep 15;11(1):18401. doi: 10.1038/s41598-021-97651-3. PMID: 34526573