慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	高脂肪食が加齢黄斑変性を引き起こすメカニズム
Sub Title	Pathogenesis of age-related macular degeneration related to high fat diet
Author	富田, 洋平(Tomita, Yohei) 小澤, 洋子(Ozawa, Yōko) 戸田, 枝里子(Toda, Eriko) 永井, 紀博(Nagai, Norihiro)
Publisher	
Publication year	2018
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2017.)
JaLC DOI	
Abstract	生後5週齢のマウスに対し, 購入した高脂肪餌(脂肪32%含有)もしくはコントロール餌(脂肪4.6%含有)を毎日摂取させた。その結果, 3か月後には, 体重は高脂肪餌群で, コントロール餌群に比べて明らかに増加していた。血糖は上昇したが, 観察期間内には明らかな糖尿病を発生しなかった。RPE - 脈絡膜サンプルに含まれる炎症性サイトカイン, マクロファージのマーカーは高脂肪餌により明らかに上昇した。 Five-week old male mice were constantly fed either with high fat diet (including 32% fat) or control diet (including 4.6% fat), both of which were commercially available. The body weight and blood sugar levels of the high fat diet-fed mice were increased compared with control diet-fed mice after 3 months, although the animals did not have diabetes. The inflammatory cytokines and macrophage markers were increased in the RPE-choroid samples of the high fat diet-fed mice compared with control diet-fed mice.
Notes	研究種目 : 若手研究(B) 研究期間 : 2016 ~ 2017 課題番号 : 16K20330 研究分野 : 眼科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K20330seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　３０　年　　６　月　　４　日現在

機関番号：　３２６１２
研究種目：　若手研究(B)
研究期間：　2016～2017
課題番号：　１６Ｋ２０３３０

研究課題名（和文）高脂肪食が加齢黄斑変性を引き起こすメカニズム

研究課題名（英文）Pathogenesis of age-related macular degeneration related to high fat diet

研究代表者
富田　洋平（Tomita, Yohei）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教

研究者番号：００５２８２００

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：生後5週齢のマウスに対し、購入した高脂肪餌(脂肪32%含有)もしくはコントロール餌(脂肪4.6%含有)を毎日摂取させた。その結果、３か月後には、体重は高脂肪餌群で、コントロール餌群に比べて明らかに増加していた。血糖は上昇したが、観察期間内には明らかな糖尿病を発生しなかった。RPE－脈絡膜サンプルに含まれる炎症性サイトカイン、マクロファージのマーカーは高脂肪餌により明らかに上昇した。

研究成果の概要（英文）：Five-week old male mice were constantly fed either with high fat diet (including 32% fat) or control diet (including 4.6% fat), both of which were commercially available. The body weight and blood sugar levels of the high fat diet-fed mice were increased compared with control diet-fed mice after 3 months, although the animals did not have diabetes. The inflammatory cytokines and macrophage markers were increased in the RPE-choroid samples of the high fat diet-fed mice compared with control diet-fed mice.

研究分野：　眼科学

キーワード：　高脂肪食　　網膜　　加齢

１．研究開始当初の背景

加齢黄斑変性（Age-related Macular degeneration; AMD）は、日本だけでなく世界においても失明原因の上位を占める疾患である（図1）。長寿に伴い増加し、国内では50歳以上の 1%以上に見られる疾患となった。AMD 発症の基盤には加齢に伴い蓄積する慢性変化があるとされ、発症のリスク因子には喫煙と共に、高BMIが含まれる。現代の患者増加の背景には、高脂肪食嗜好・肥満が深く関係すると考えられ、AMDは生活習慣病の一種であると言える。

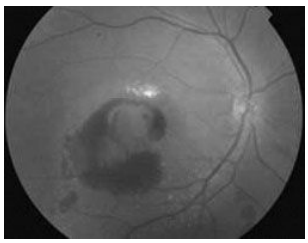

図1　AMD 眼底写真。眼底中心である黄斑部に病変を生じ、重篤な視力障害をきたす。

高 BMI/肥満が全身の生活習慣病である糖尿病(インスリン抵抗性)(Tabata, Oike et al. Cell Metabolism 2009)や動脈硬化(Horio, Oike et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2014) を引き起こすメカニズムについては、これまでにも数々の報告がある。疫学調査だけではなく、生物学的裏付けがあるのである。

しかし、AMD と高 BMI/肥満は、疫学的には関連が報告されており(Age-Related Eye Disease Study Research Group Ophthalmology, 2005)、事実、日本では食の欧米化に伴い患者が増加した経緯があったものの、裏付けとなる生物学的メカニズムは、明らかにされていない。脂肪食摂取下に生じる全身的生活習慣病のメカニズムには脂肪細胞から分泌され、全身を循環する炎症性サイトカインであるアディポサイトカイン(tumor necrosis factor [TNF]-α, angiotensinogen, Monocyte Chemotactic Protein-1 [MCP]-1, メカニズムには脂肪細胞から分泌され、全身を循環する炎症性サイトカインであるアディポサイトカイン(tumor necrosis factor [TNF]-α, angiotensinogen, Monocyte Chemotactic Protein-1 [MCP]-1, angiopoietin like protein [angptl] 2 など)などの異常発現が関与するとされ、これらが各臓器で炎症性サイトカインとして働くほか、マクロファージの異常活性化を通して全身臓器の炎症と酸化ストレス(活性酸素種 reactive oxygen species; ROS)の蓄積をきたし生活習慣病の基盤を形成しうることが知られる(図3) (Tabata Oike et al. Cell Metabolism 2009)。また、最近では生活習慣病と酸化変性した low-density lipoprotein (LDL)の関連が注目される(Steinberg et al. N Engl J Med 1989)。

AMD の病態メカニズムとしては、網膜視細胞のメンテナンスの役割を持つ網膜色素上皮細胞(retinal pigment epithelium; RPE)の老化による代謝不全と酸化ストレスが根幹をなすとされる。RPE が代謝しきれなかった産物が蓄積して酸化ストレスを引き起こすと RPE から炎症性サイトカインが異常に分泌され、マクロファージが遊走してくる。そのマクロファージがさらに炎症性サイトカインを分泌して炎症が継続すると酸化ストレスがさらに蓄積してその結果、脈絡膜新生血管(choroidal neovascularization; CNV)の形成を伴う滲出型 AMD、もしくは網膜の細胞死をきたす萎縮型 AMD を引き起こすとされる(Grisanti & Tatar, Progress in Retinal and Eye Research, 2008)。研究代表者らの研究室では、これまでに RPE から分泌された Angptl2 という炎症性サイトカインがマクロファージに働きかけ、マクロファージからの Angptl2 の発現を上昇させ、炎症の悪性サイクルを形成させ、CNV の形成を促進することを報告した(Hirasawa, Ozawa et al. JBC, 2016)。しかし、AMD における炎症と高脂肪食の関連の分子メカニズムには不明の点が多かった。

なお、滲出型 AMD で CNV が形成されることに対しては、治療法としては抗血管内皮増殖因子製剤の硝子体内注射があり、効果があるとされるが、再発が多いことが問題視されている。その原因の一つに、もともと慢性炎症があったという素地の上に CNV が形成されるわけであるが、血管自体は治療されるものの、慢性炎症の素地に対する介入をしたわけではないことがあると考えられる。さらに、萎縮型については治療法がないが、これ

も滲出型 AMD と同様に慢性炎症の基盤の上に発症するとされている。すなわち、発症の素地となる慢性炎症に関する知見を増やすことが、将来の AMD に対する多角的な介入法の開発に役立つものと考えられた。

２．研究の目的

生活習慣病は現代の社会的問題であり、失明原因の上位を占める加齢黄斑変性など、眼科領域でも注目される網膜疾患を引き起こす。これらの眼疾患は慢性炎症がその発症の基盤にあるとされ、食の欧米化が発症増加の一因であるとされる。しかし、高脂肪食・肥満が眼の網膜病態を引き起こす分子メカニズムには、不明の点が多い。そこで本研究では、高脂肪食を与えた際のマウス RPE での変化について、炎症性サイトカインの発現・マクロファージ遊走等に着目して解析することとした。これにより、食生活が AMD の発症にいかに関与しうるのかの一端を明らかにし、予防介入の可能性のメカニズムを解析することとした。高齢化社会における視機能低下という社会的問題の防止の一端として食事指導を社会に普及させるだけでなく、分子メカニズムが明らかになれば、それに対する新規予防治療介入の開発に向けた研究につながると考えた。

３．研究の方法

高脂肪食を継続的に摂取させモデルを作成した。生後 5 週齢のマウスに日本クレアより購入した高脂肪餌(脂肪 32%含有)もしくはコントロール餌(脂肪 4.6%含有)毎日摂取させ、その際の体重、血糖を経時的に解析するとともに、脂肪肝等の全身状態の解析を行った。

今回は、すでに購入可能な固形餌を用い、マウスが ad libitum で餌を摂取できる環境を整えた。また、マウスルームは 22±1 度の温度に保たれるようにし、2 群間で餌以外の条件の違いが出ないように心掛けた。

生後 5 週齢から継続的に高脂肪食を摂取したマウス(高脂肪食マウス)と、コントロール食マウスの、RPE と脈絡膜の lysate を高脂肪食摂取開始から 1 か月ごとに採取し、炎症性サイトカイン(アンジオテンシン II、のほか Angptl2、TNF-α、MCP-1、IL-6、IL-1 β等)の発現と酸化 LDL の蓄積につき、リアルタイム PCR、ウエスタンブロット、ELISA などを用いて解析することとした。

さらに、組織切片を用いて、RPE のマーカーである RPE65 と共染色しながらマクロファージマーカーである F4/80 の染色を行った。さらに RPE と脈絡膜の lysate を用いて F4/80 のリアルタイム PCR を用いた定量的解析も行った。また、マクロファージ以外の炎症性細胞が遊走している可能性があるかどうかについては、リアルタイム PCR で CD4、CD8 陽性細胞等の定量も行った。

４．研究成果

生後 5 週齢のマウスに日本クレアより購入した高脂肪餌(脂肪 32%含有)もしくはコントロール餌(脂肪 4.6%含有)毎日摂取させた。今回はオスのマウスに限って解析した。その結果、図 2 で示すとおり、3 か月後には、体重は高脂肪餌群で、コントロール餌群に比べて明らかに増加していた。

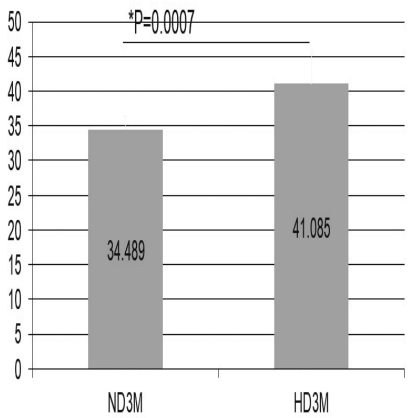

図 2　コントロール餌（ND） 群と高脂肪餌(HD)群の 3 か月次点の平均体重を示す(単位 g)。

血糖についても解析した。これは、経時的に採血をして、随時血糖を、市販の簡易血糖計で測定することで行った。その結果、図 3 で示すとおり、高脂肪餌群では、コントロール餌群とくらべて随時血糖は明らかに高いという結果であった。ただし、血糖値は、スト

レプトゾトシンにより膵ランゲルハンス細胞を破壊されたマウスや、Db/Db マウスのような、糖尿病モデルマウスのように、250mg/dl を超えることはなく、明らかな糖尿病を発症してはいないという結果であった。今回インスリン分泌が比較的保たれることが知られる Balb/c マウスを用いたため、高脂肪餌を継続摂取しても、少なくとも観察期間内には明らかな糖尿病を発生しなかったという結果につながったと考えられた。

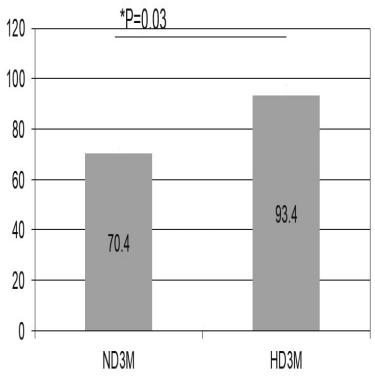

図 3 コントロール餌（ND） 群と高脂肪餌(HD)群の 3 か月次点の平均血糖値を示す(単位 mg/dl)。

体内の脂肪については、解剖の際に内蔵を観察したところ、高脂肪餌群では、コントロール餌群とくらべて、脂肪肝を発症していた。また、採血をして血中脂質を解析したところ、これについても明らかな差を検出することができた。

次いで、RPE－脈絡膜サンプルについてであるが、これら 2 つの組織は分離困難であるため、複合体として細胞を回収し、その中に含まれる炎症性サイトカイン、マクロファージ等を解析した。そして、予測通りに、3 か月間継続的に高脂肪餌を摂取させた群では、コントロール餌を継続摂取させた群に比べて、明らかに炎症性サイトカインの mRNA やマクロファージマーカーの mRNA の発現が高いことが示された。組織切片でも同様の結果が得られた。今回の解析では、マクロファージ以外の CD4、CD8 陽性細胞等の炎症細胞については、明らかな差が検出されなかった。ただし、この結果については、解析時期や方法などの問題があった可能性があり、今後さらなる解析をする必要があると考えられた。

今回の結果は、Quality of Vision (QOV)を低下させることで Quality of Life (QOL)を損なうために、高齢化社会では社会問題として認識されている AMD の発症基盤に、高脂肪食が関連しうる分子メカニズムの一端を明らかにするという結果であった。このことは、今後の AMD の新規予防介入のための重要な情報となった。今後さらなる解析を続けることで、世界的にも新しい治療法の提案につながる研究として発展する可能性があると考えられた。

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 3 件）

1. Sato S, Shinoda H, Nagai N, Suzuki M, Uchida A, Kurihara T, Kamoshita M, Tomita Y, Iyama C, Minami S, Yuki K, Tsubota K, Ozawa Y. Predictive factors of better outcomes by monotherapy of an anti-vascular endothelial growth factor drug, ranibizumab, for diabetic macular edema in clinical practice. Medicine. 2017 Apr; 96(16):e6459. 査読有 doi: 10.1097/MD.0000000000006459.

2. Tomita Y, Nagai Y, Suzuki M, Shinoda H, Uchida A, Mochimaru H, Izumi-Nagai K, Sasaki M, Tsubota K, Ozawa Y. Functional Visual Acuity in Age-Related Macular Degeneration. Optom Vis Sci. 査読有 2016 Jan; 93(1):70-6. doi: 10.1097/OPX.0000000000000755.

3. Suzuki M, Nagai N, Shinoda H, Uchida A, Kurihara T, Tomita Y, Kamoshita M, Iyama C, Tsubota K, Ozawa Y. Distinct responsiveness to intravitreal ranibizumab therapy in polypoidal choroidal vasculopathy with single or multiple polyps. Am J Ophthalmol. 2016 Jun; (166)52-9. 査読有 doi: 10.1016/j.ajo.2016.03.024.

〔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

６．研究組織

(1)研究代表者
富田　洋平（TOMITA, Yohei）
慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教
研究者番号：00528200

(2)研究分担者
該当なし（　　）

(3)連携研究者
該当なし（　　）

(4)研究協力者
小澤　洋子（OZAWA, Yoko）
戸田　枝里子（TODA, Eriko）
永井　紀博（NAGAI, Norihiro）