

## 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 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591950

研究課題名（和文） 糖尿病モデルマウスにおける抗酸化物質ルテインによる網膜神経保護効果の解析

研究課題名（英文） Neuroprotective effect of an antioxidant, lutein in the retina of a murine model of diabetes.

研究代表者

佐々木 真理子 (SASAKI MARIKO)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：60276342

研究成果の概要（和文）：糖尿病網膜症は進行性の神経変性疾患という側面を持つが、そのメカニズムは明らかでない。その原因として糖尿病網膜に生じる酸化ストレスに着目し、抗酸化剤であるルテインを用い網膜神経変性への影響を解析した。ルテインは糖尿病網膜に生じた活性酸素種を抑制し、視機能低下を回避した。ERK (extracellular Signal-regulated Kinase)の活性亢進と、それに起因する網膜内におけるシナプトフィシン、BDNF (brain-derived neurotrophic factor)の発現低下を認めたが、それらすべてがルテインの摂取により抑制された。さらに、糖尿病誘導後に見られた神経細胞死に起因する病理組織学的変化も、ルテインの摂取により回避された。

本研究により、糖尿病網膜における酸化ストレスを起点とする視機能低下、網膜神経変性のメカニズムの一端を明らかにすることができ、抗酸化剤ルテインが、糖尿病により生じる視機能低下を抑制する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Diabetic retinopathy is a progressive neurodegenerative disease, but the underlying mechanism is still obscure. Here, we focused on oxidative stress in the retina, and analysed its influence on retinal neurodegeneration, using an antioxidant, lutein. Lutein prevented ROS (reactive oxidative species) generation in the retina and the visual impairment induced by diabetes. ERK (extracellular Signal-regulated Kinase) activation, the subsequent synaptophysin reduction, and the BDNF (brain-derived neurotrophic factor) depletion in the diabetic retina were all prevented by lutein. Moreover, histological changes caused by apoptosis in the retina of diabetic mice were inhibited by feeding the lutein-supplemented diet. The results indicated that local oxidative stress that has a neurodegenerative influence in the diabetic retina is prevented by constant intake of a lutein-supplemented diet. The antioxidant, lutein may be a potential therapeutic approach to protect visual function in diabetes.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2012年度 | 700,000   | 210,000 | 910,000   |
| 総計     | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：網膜神経保護、抗酸化剤、ルテイン、糖尿病、網膜神経変性

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症は重症例では失明に至ることもあり、初期からすでに、視機能低下をきたしていることが、網膜電図 (ERG) の反応低下としてヒトで知られている。しかし、その神経網膜の障害メカニズムは未知の部分が多い。網膜は中枢神経系の一部であり、一度障害されると通常は再生しない。そこで、網膜病変の進行を、特に初期から予防することは、多くの症例の視機能予後を守ることに貢献し重要である。一方、糖尿病では全身性に酸化ストレスが蓄積し、これが病態に関与するとされる (Danfona et al. 1996)。

生理的にも生体内にとりこまれ機能する抗酸化物質、ルテインは、その光学異性体であるゼアキササンチンと共に、カロテノイドのキサントフィル類であり、元来、光合成細菌や植物が持つ遮光保護物質である。ヒトにおいては水晶体と網膜に備わる唯一のカロテノイドであり、黄斑色素とも呼ばれる。高エネルギーを持つ青色光を初めとした光は網膜に到達し、活性酸素を多く発生させるが、青色光に対してフィルター効果を持つルテインとゼアキササンチンはこれを抑制する。最近、米国の大規模疫学調査により、加齢黄斑変性症に対する予防効果の可能性が示され、現在では大規模な臨床試験、Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2)が行われ、眼科分野で注目の集まる物質である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病における神経網膜

障害や視機能障害に対し、酸化ストレスがいかに関与するかを、抗酸化物質ルテインを用いて解析し、将来的に、糖尿病網膜症に対する視機能保護のための新しい予防療法の開発につなげることである。

## 3. 研究の方法

(1) 糖尿病網膜内酸化ストレスの亢進、およびルテインによる抑制

生後6週の成体C57/B6マウスにSTZ 60mg/kgを3日間腹腔内投与することで糖尿病モデルマウスを作成する。ルテインは通常の餌を粉末にしたものに混合し、継続的に摂取させる。網膜内酸化ストレスの亢進を確認するとともに、継続的ルテイン摂取により網膜内酸化ストレスが抑制されるかを解析する。網膜内酸化ストレスは、ジヒドロエチジウムやBODIPY-C11を用いて計測する。ジヒドロエチジウムは、組織内スーパーオキシドアニオンと反応して蛍光を発し、BODIPY-C11はヒドロキシラジカルがlipid peroxidationを引き起こすと緑の蛍光を発する。いずれも組織切片と反応させることにより、網膜内酸化ストレスを解析可能である。

(2) 糖尿病網膜における、ルテインの視機能への効果

ヒト糖尿病網膜症では、網膜電図(ERG)の網膜内層機能を示すOscillatory Potentials (OPs)の変化を初期からきたすことが知られる。STZ誘導糖尿病モデルマウスにおいても、ERGのOPsが早期から障害される。そこで、ERGを用い、STZ誘導糖尿病モデルマウスに

において、ルテインの視機能への効果を評価する。

### (3) 糖尿病網膜機能障害の分子メカニズム解析

我々は、糖尿病マウスの網膜機能障害の一因として AT1R (Angiotensin II receptor, type 1) シグナリングの下流で生ずる ERK 活性化による網膜内シナプトフィシンの低下が関与していることを既に報告した (Kurihara et al. 2008)。そこで、シナプトフィシンの発現量、および活性化 (リン酸化) ERK をイムノブロット法により計測する。また、糖尿病網膜内層の細胞死の原因の一つに BDNF の不足があるとされる (Seki et al. 2004)。そこで、網膜内 BDNF 量もイムノブロットにより計測する。いずれにおいても、ルテイン摂取による抑制効果を解析する。

### (4) 糖尿病網膜における、神経細胞死および組織学的変化の解析

STZ 誘導糖尿病網膜症モデルにおいて、網膜神経節細胞を含む網膜内層細胞が細胞死を起こすことはすでに報告されているが (Barber et al. 1998)、これを確認する。神経節細胞数および網膜内層の厚み、TUNEL 染色によるアポトーシス細胞数を組織学的に比較する。その上で、ルテインが、これらを抑制するかを解析する。この組織学的変化を見るには、上述の分子メカニズムの変化より、長期の糖尿病モデルマウスの観察を要する可能性があると考ええる。

## 4. 研究成果

(1) ルテインは糖尿病誘導後のマウスの血糖値などの代謝状況に変化を与えなかった。網膜内活性酸素種の測定により、糖尿病誘導後

の活性酸素種の増加が確認されたが、ルテインの継続摂取により抑制された。

(2) 糖尿病マウスの網膜では ERG において、OPs が既報のごとく低下しており、網膜内層の機能が低下することが確認された。しかし、ルテインの継続摂取により、視機能低下は回避された。

(3) イムノブロット法により計測した網膜内タンパクの解析により、糖尿病網膜において、ERK の活性亢進と、それに起因すると考えられるシナプトフィシンの発現低下、さらに BDNF の発現低下を認めた。それらすべてがルテインの摂取により抑制された。これにより、酸化ストレスを起点とする糖尿病網膜の機能低下のメカニズムの一端が明らかとなった。

(4) 糖尿病による網膜神経変性の解析を行うため作成した長期の糖尿病モデルマウスにおいて、網膜内網状層、内顆粒層の菲薄化、および神経節細胞数の減少などの病理学的変化が認められた。さらに、TUNEL 染色により、アポトーシス細胞数の増加が確認された。これら神経細胞死に起因すると考えられた病理学的変化は、ルテインの摂取により回避され、病態への酸化ストレスの関与が示唆された。

(5) 本研究により、糖尿病網膜における酸化ストレスを起点とする視機能低下、網膜神経変性のメカニズムの一端を明らかにすることができた。抗酸化剤ルテインが、糖尿病により生じる視機能低下を抑制する可能性が示された。

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3件)

- ① Ozawa Y, Sasaki M, Takahashi N, Kamoshita M, Miyake S, Tsubota K.: Neuroprotective effects of lutein in the retina. *Curr Pharm Des.* 18(1):51-6, 2012. 査読あり
- ② Ozawa Y, Kurihara T, Sasaki M, Ban N, Yuki K, Kubota S, Tsubota K. *Exp Diabetes Res.*: Neural degeneration in the retina of the streptozotocin-induced type 1 diabetes model. 2011; 2011:108328. Epub 2011 Nov 17. 査読あり
- ③ Sasaki M, Ozawa Y, Kurihara T, Kubota S, Yuki K, Noda K, Kobayashi S, Ishida S, Tsubota K.: Neurodegenerative influence of oxidative stress in the retina of a murine model of diabetes. *Diabetologia.* 53(5):971-9, 2010. 査読あり

[学会発表] (計1件)

- ① Sasaki M, Yuki K, Kubota S, Miyake S, Kobayashi S, Ishida S, Tsubota K, Ozawa Y.: Neuroprotective effect of an antioxidant lutein in the diabetic retina. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Annual Meeting, 2011年5月2日 Fort Lauderdale, USA

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.keio-eye.net>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 真理子 (SASAKI MARIKO)  
慶應義塾大学・医学部・特任助教  
研究者番号：60276342

(2) 研究分担者

小澤 洋子 (OZAWA YOKO)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：90265885

(3) 連携研究者

なし