

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24年 4月 1日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究 B

研究期間：2010～2011

課題番号：22791681

研究課題名（和文）ビタミン C ノックアウトマウス網膜変性の解析

研究課題名（英文）Analysis of retinal degeneration in vitamin C knockout mice

研究代表者

橋爪 公平 (HASHIZUME KOHEI)

岩手医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50407095

研究成果の概要（和文）：(1) ビタミン C ノックアウトマウス（SMP30 ノックアウトマウス）は 0.0375 g/L の低濃度ビタミン C 水投与下で眼球内のビタミン C は野生型マウスの約 3 分の 1 に減少した。ビタミン C ノックアウトマウスは 1.5 g/L の濃度のビタミン C 水投与により眼球内のビタミン C 濃度が野生型マウスと同等であった。従ってこれらの二つの濃度のビタミン C 水投与によって、ビタミン C ノックアウトマウスの眼球内のビタミン C を欠乏状態、十分状態にすることができた。(2) SMP30 ノックアウトマウス（ビタミン C 欠乏）は UVB 負荷による網膜損傷や水晶体混濁が、SMP30 ノックアウトマウス（ビタミン C 十分投与）や野生型マウスと比べて有意に強かった。ビタミン C の欠乏が UVB によって惹起された酸化ストレスに対する網膜・水晶体の感受性を増加させたことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：(1) In vitamin C knockout mice (SMP30 knockout mice) given the 0.0375 g/L aqueous solution of vitamin C, the eye vitamin C level decreased to approximately 1/3 of that in wild type mice. In vitamin C knockout mice given the 1.5 g/L aqueous solution of vitamin C, the eye vitamin C level was similar to that in wild type mice. Thus, the 2 V vitamin C doses can be viewed as appropriate for achieving V vitamin C deficiency and sufficiency, respectively, in the vitamin C knockout mouse eye. (2) In SMP30 knockout mice (vitamin C deficiency) group retina damage and lens opacities induced by UVR-B were significantly larger than in SMP30 knockout mice (vitamin C sufficiency) group or in wild type mice group. It was suggested that vitamin C deficiency increases retina and lens susceptibility to UVR-B induced oxidative stress in mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：ビタミン C、網膜変性、加齢性眼疾患、酸化ストレス、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

加齢性眼疾患は眼科領域で最も頻度の高い疾患で白内障、緑内障、加齢黄斑変性などが含まれる。これらは視機能の低下により、高齢者の QOL の低下を招く非常に重要な疾患である。これらの加齢性眼疾患の詳細な病態に関しては未だ不明な点が多いが、近年の基礎研究・臨床研究により、特に白内障や加齢黄斑変性で酸化ストレスが病態に関与することが明らかになってきた。

加齢黄斑変性は網膜の中心部分である黄斑に加齢に伴って変性をきたす疾患である。脈絡膜から新生血管が浸入してくる滲出型 (wet type) と、新生血管は発生せずに変性



のみをきたす萎縮型 (非滲出型, dry type) の 2つのタイプに分類することができる。特に滲出型では、黄斑部の出血、滲出性変化、網膜剥離をきたし、物が歪んで見える変視症や著しい視力低下をきたす。加齢黄斑変性の有病率は我が国では 50 歳以上の約 1%、欧米では約 2%とされている。有病率は高くはないが、高度かつ永続的な視力低下をきたす疾患で、我が国を含めた先進国において中途失明の上位を占める非常に重要な疾患である。現在のところ加齢黄斑変性症に対する、根本的な治療法はまだない。外科的治療、経瞳孔温熱療法、光線力学療法、抗 VEGF 抗体療法などが行われているが、依然として決定的な治療法は存在しない。基礎研究では網膜色素上皮細胞で活性酸素のメジャーな消去因子である SOD1 (Super Oxide Dismutase 1) 遺伝子のノックアウトマウスで、ヒトの AMD と同様の網膜変性および脈絡膜新生血管が生じることを明らかにするなど、酸化ストレスの関与が示唆されている。また加齢黄斑変性に対する、ビタミン C、βカロテン、銅、亜鉛大量サプリメントを用いた臨床試験 (AREDS study) では、これらの抗酸化物質が AMD の進行を抑制することが示された。

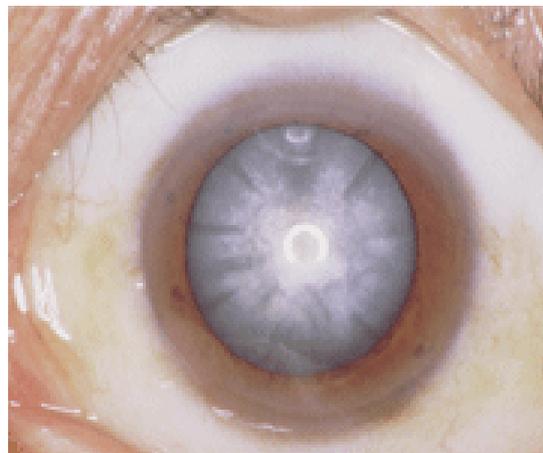
一方、都立老人総合研究所の石神らが作成した SMP30 ノックアウトマウスは、ビタミン C の合成ができない、いわゆるビタミン C

ノックアウトマウスで、壊血病様の変化をきたすことが既に分析されている。SMP30 ノックアウトマウスを使った様々な解析 (肝、腎、肺、骨など) がなされているが、眼科領域の解析は未だなされていない。このノックアウトマウスを用いて、加齢黄斑変性などの加齢性眼疾患を発症させ、その病態の究明への可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、ビタミン C ノックアウトマウスである SMP30 ノックアウトマウスの網膜変性所見の解析を行う。抗酸化物質のひとつであるビタミン C がいない状態で、網膜変性が発症するかどうか、あるいは紫外線や光負荷による酸化ストレスによって病変が誘導できるかどうかを解析し、酸化ストレスや抗酸化物質が加齢性眼疾患の発症に関与することを明らかにし、病態の解明へ貢献することを目的とする。またこれらの疾患を動物実験レベルで発症させる一方で、それをビタミン C や他の抗酸化物質でレスキューすることができれば、ヒトにおける治療法・予防法の開発を可能にし、加齢性眼疾患の視力予後改善に貢献すると考えられる。

本研究の主なターゲットは網膜変性であるが、紫外線負荷は水晶体に対しても影響を及ぼすことが既に知られている。水晶体混濁すなわち白内障も大変重要な加齢性眼疾患であるので、同マウスにおける紫外線負荷実験においては網膜のみではなく、水晶体の解析も行い、白内障と抗酸化物質 (ビタミン C)



との関連に関して検索を行い、病態の解明や治療法・予防法の可能性を探る。

3. 研究の方法

研究期間における負荷実験としては、光負荷および紫外線 (UVB) 負荷を行った。光負荷実験においては 1 ヶ月の光負荷によって網膜変性を来すことができなかった。紫外線負荷では網膜変性を生じ、また水晶体前囊下に混濁を生じることができた。従って、紫外線

負荷についての方法について以下に記す。

(1) 動物

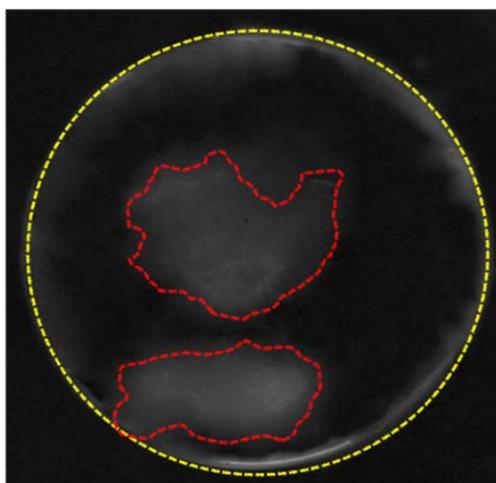
野生型マウス(C57BL/6)およびビタミン C ノックアウトマウスである SMP30 ノックアウトマウスを用いた。SMP30 ノックアウトマウスは生後 30 日で離乳し、その後はビタミン C 十分投与群として飲水で 1.5 g/L のビタミン C 水、ビタミン C 欠乏群として壊血病を発病しない最低限の投与量 (通常の 2.5%) である 0.0375 g/L のビタミン C 水を投与した。なお野生型マウスにはビタミン C を含まない通常の水を与えた。飼育は 12 時間ごとの light-dark サイクルで、空調によって管理した飼育室内にて行った。全ての実験は、Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research に順じて行った。

(2) 紫外線負荷

負荷実験には 14 週齢のマウスを使用し、各群 10 匹ずつ合計 30 匹を UVB 照射実験に用いた。紫外線(UVB)は波長 302nm、強度 200mW/cm²、1 回 100 秒間の照射を週 2 回、3 週間行い、合計照射線量は 6 回の照射で 1200mJ/cm²とした。右眼に UVB を照射し、左眼は照射せずコントロールとした。

(3) 組織

眼球に 23G 針にて穿刺し、Superfix (Kurabo, Nagoya, Japan)にて固定した。パラフィン切片 3μm を作成し、HE 染色にて観察した。



(4) 水晶体の評価

UVB 照射後から 48 時間後にマウスの眼球を摘出し、水晶体を取り出した。摘出水晶体を、実体顕微鏡写真撮影システムを用い白内障の形態を記録し、National Institutes of Health Image J software を用いて、水晶体

混濁面積率% (混濁面積/前囊面積×100) を測定した。

(5) 眼球内および水晶体中のビタミン C 濃度の測定

紫外線照射を行っていない 14 週齢マウスから摘出した眼球または水晶体に 19 倍量のメタリン酸を加え handy homogenizer (Mojimojikun; Nippon Genetics, Tokyo, Japan)にて均質化し、遠心分離し上清をサンプルとして用いた。ビタミン C 濃度の測定には HPLC 法にて測定した。

(6) 水晶体中の蛋白濃度およびグルタチオン濃度の測定

紫外線照射後の水晶体を用いて蛋白濃度およびグルタチオン濃度の検索を行った。摘出水晶体に RIPA buffer を加え破碎し、遠心し上清をサンプルとして使用した。蛋白濃度は Protein Assay(BioRad)にて測定し、グルタチオン濃度はチオール活性を測定して求めた。

4. 研究成果

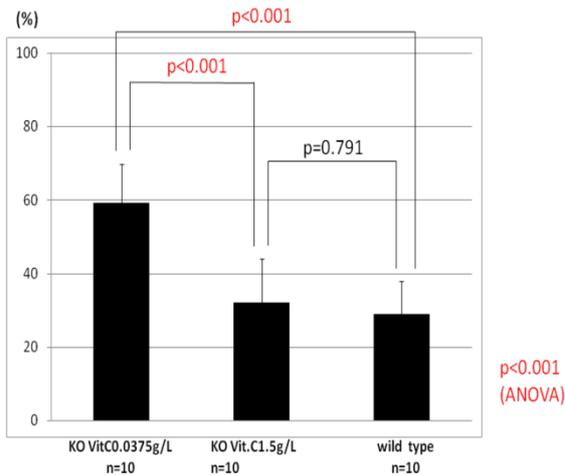
(1) 水晶体中および眼球内のビタミン C 濃度
ビタミン C ノックアウトマウス (SMP30 ノックアウトマウス) は 0.0375 g/L の低濃度ビタミン C 水投与下で水晶体中ビタミン C は野生型マウスの約 3 分の 1 に減少した。ビタミン C ノックアウトマウスは 1.5 g/L の濃度のビタミン C 水投与により水晶体ビタミン C 濃度が野生型マウスと同等であった。従ってこれらの二つの濃度のビタミン C 水投与によって、ビタミン C ノックアウトマウスの水晶体中のビタミン C を欠乏状態、十分状態を作成できることが確認された。また全眼球を用いた測定においても同様の結果で低濃度ビタミン C 投与のノックアウトマウスではビタミン C が欠乏状態であることが示された。

(2) 組織学的な検討

紫外線照射した、全ての眼球において、水晶体混濁および網膜外顆粒層の細胞数減少がみられた。なお水晶体混濁は既報の紫外線負荷実験と同様に前囊下混濁であった。

(3) 紫外線負荷による水晶体混濁面積率

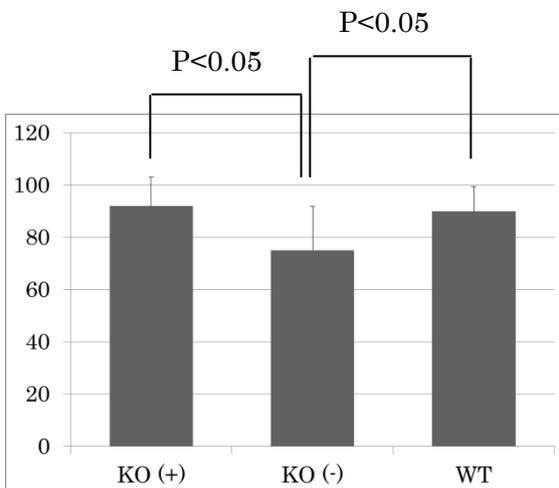
紫外線負荷による水晶体混濁面積率は野生群 29.0 ± 9.0%、SMP30 ノックアウトマウス・ビタミン C 十分投与群 32.2 ± 11.7% であったのに対し、SMP30 ノックアウトマウス・ビタミン C 欠乏群 59.3 ± 10.6% で、SMP30 ノックアウトマウス・ビタミン C 欠乏群は他の 2 群の約 2 倍の混濁率を認めた (p<0.0001)。また前 2 者の間には有意差はなかった。



これらの結果から、水晶体では Vit.C が欠乏することで酸化ストレスである UVB の障害を受けやすくなり水晶体混濁が進行したと考えられる。Vit.C は水晶体における抗酸化作用、恒常性・透明性の維持に重要な役割をはたしている可能性が考えられた。

(4) 網膜変性の評価

紫外線負荷の結果、ビタミン C 投与群・欠乏群、野生型ともに非照射眼と比べて外顆粒層の細胞数減少がみられた。なお内顆粒層の細胞数の減少は認められなかった。照射眼と非照射眼の外顆粒層細胞数の比は $92.0 \pm 11.1\%$ 、 $75.1 \pm 16.8\%$ 、 $89.9 \pm 9.5\%$ で、ビタミン C 欠乏群で有意な減少がみられた。このことから紫外線によって網膜内に生じる酸



化ストレスに対してビタミン C が保護的に働くことが示唆された。

(5) 水晶体中の蛋白濃度・グルタチオン濃度

水晶体中の蛋白濃度・グルタチオン濃度に関しては、野生群、SMP30 ノックアウトマウス・ビタミン C 十分投与群、SMP30 ノックアウトマウス・ビタミン C 欠乏群の間で有意な差は認めなかった。紫外線負荷による混濁は水晶体全体において前囊下に限局するため水晶体全体をサンプルとした今回の実

験では差が出づら可能性が考えられた。

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 1 件)

Ishikawa Y, Hashizume K, Kishimoto S, Tezuka Y, Nishigori H, Yamamoto N, Kondo Y, Maruyama N, Ishigami A, and Kurosaka D. Effect of vitamin C depletion on UVR-B induced cataract in SMP30/GNL knockout mice. *Exp Eye Res* 2012; 85-89

〔学会発表〕(計 1 件)

Ishikawa S, Ishikawa Y, Hashizume K, Kishimoto S, Tezuka Y, Nishigori H, Yamamoto N, Kondo Y, Ishigami A, and Kurosaka D. Effect of vitamin C depletion on UVR-B induced cataract in SMP30/GNL knockout mice. *International Conference on the Lens*. 2012 January 17th, Hawaii Kona, USA

〔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

橋爪 公平 (Hashizume Kohei)

岩手医科大学・医学部・研究員

研究者番号: 50704095

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者