

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）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：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792004

研究課題名（和文） 光障害に対するルテインの網膜保護効果の解析

研究課題名（英文） Neuroprotective effect of lutein against light-induced damage

研究代表者

馬渕 春菜 (MABUCHI HARUNA)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：70465011

研究成果の概要（和文）：網膜色素変性症では進行性に重度の視力障害をきたしうるが、有効な治療法は確立されていない。本疾患では、光に暴露すると増悪しやすいことが知られているが、光による網膜障害のメカニズムには未だ不明の点が多い。そこで今回、光障害による視細胞死のメカニズムに関し、酸化ストレスの観点から研究した。そのために抗酸化剤であるルテインを投与した際の、光暴露による網膜障害の予防効果を解析した。

研究成果の概要（英文）：Although retinitis pigmentosa is one of the leading causes of blindness worldwide, currently, no effective treatment is established. Light exposure is the traditionally known risk factor to exacerbate this disease through the photoreceptor death. But the mechanism of light-induced photoreceptor cell death was investigated from the viewpoint of oxidative stress. For this purpose, an anti-oxidant, lutein, was administered and its preventive effect against light-induced retinal damage was analyzed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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 光障害 酸化ストレス 細胞死 視細胞

## 1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性症は、遺伝子異常により網膜視細胞もしくは網膜色素上皮細胞の障害が徐々に進行性する疾患で、主に成人になってから重度の視力障害をきたしうる。中年期で診断がつくが、有効な治療法は確立されていない。病気の程度が軽いうちに発見をされた症例であっても、特別な進行予

防法がないまま、経過観察されるのが通常である。有病者は日本人の 4000-8000 人に一人といわれ、比較的大きな人口を占める上に、発症が労働年齢であることも多く、視機能障害者の増加は社会的資本の大きな損失につながる可能性がある。さらに、高齢化社会である現代においては、長寿であるがゆえに有病者の割合が高く産出されることになる。視覚は、外部環境の 80% の情

報入力されると言われ、これが障害されると活動が制限されることになり、本人の問題ばかりか、介護者のクオリティーオブライフにもかかわる重要な社会問題である。

視覚障害の進行は遺伝子異常によるものではあるが、光に暴露すると増悪しやすいことが知られている。しかしそのメカニズムには未だ不明の点が多い。また、光に暴露せずに生活することは不可能であり、その対策が必要なはずであるが、現時点では遮光眼鏡の使用しか方法がない。しかし、遮光眼鏡を用いると、網膜色素変性症による障害眼にとって視機能低下をより自覚させることになり、ジレンマがある。遮光眼鏡以外の予防法の確立が待たれている。

一方、光障害による視細胞死に関しては、マウスを用いた研究が古くからおこなわれており、実験系としては安定したものがあつた。暗順応後のマウスを、光照射専用ケージに入れて光暴露を受けさせる方法であつた。

これまでの報告では、光暴露による網膜視細胞死のメカニズムとして、光を受容したロドプシンの代謝サイクル(視サイクル)が過剰に回転すること、それにより酸化ストレスの増強が生じることが一因とされている。そこで、本実験系を用いて、網膜内酸化ストレスに着目して、視細胞の死に関して解析することとした。

## 2. 研究の目的

これまでの報告では、光暴露による網膜視細胞死のメカニズムとして、光を受容したロドプシンの代謝サイクル(視サイクル)が過剰に回転すること、それにより酸化ストレスの増強が生じることが一因とされている。そこで、網膜内酸化ストレスを予防することができれば、進行する視細胞死を抑制できる可能性があると考え、抗酸化療法により光障害による視機能低下を予防できるかどうか解析することを目的とした。

そのための介入方法として、今回は、元来光合成細菌や植物が持つ遮光保護物質であり、ヒトでは水晶体と網膜に備わる唯一のカロテノイドであるルテインを用いることとした。太陽光のうち主に青色光は網膜に到達し、活性酸素を多く発生させる。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ンチンは網膜内に存在する黄斑色素の構成成分であり、強力な抗酸化作用を有するとされている。

さらに、ルテインはその構造に、二重結合を豊富に持ち、活性酸素と反応してこれを消去しうることから、酸化ストレスを軽減する可能性があつた。

そこで、ルテイン投与が、光暴露後の視細胞死を抑制することができるか、視機能を保護できるか、を解析することとした。この研究の成果によっては、光障害の予防にルテインという、遮光眼鏡とは別のアプローチを導入できる可能性が生まれると考えた。

## 3. 研究の方法

(1)まず光障害モデルマウスを作成した。そのために図のような光照射ケージを準備し、その中に暗順応状態させておいたマウスを入れて急速に一定の照度の光源に一定時間、暴露することで、視細胞のアポトーシスを誘導した。マウスは光障害の研究に通常用いられる6-8週齢のBalb/cマウスを用いて行った。



光照射ケージ  
全面ガラス張りで空調を備える。

この方法におけるアポトーシス発現のピークは、光暴露後 36 時間であることは申請者の研究室ではすでに確認していたが、さらに自ら、これを確認した。アポトーシスの評価には、パラホルムアルデヒドにより還流固定をしたのちに、眼球を摘出して包埋し、凍結切片を作製して、これを TUNEL 法で染色し、一切片あたりの TUNEL 陽性細胞を数えることにより行った。

(2)次に、この系において、光照射の 5 日前から、ルテインを経口で前投与しておいたマウスと、コントロールを経口させておいたマウスにおける、光暴露後の視細胞のアポトーシス誘導の違いを解析した。ルテインの経口摂取は、ルテインを粉末状にして粉末餌に混ぜて与えることにより行った。コントロールとしては、ルテイン粉末を添加しない粉末餌を与えることで行った。

アポトーシス細胞の数は、光照射後 2 日目の動物にを用い、(1)で示したのと同様に、網膜切片を切って TUNEL 染色を行い、一切片あたりに含まれる TUNEL 陽性細胞の数のカウントすることで行った。

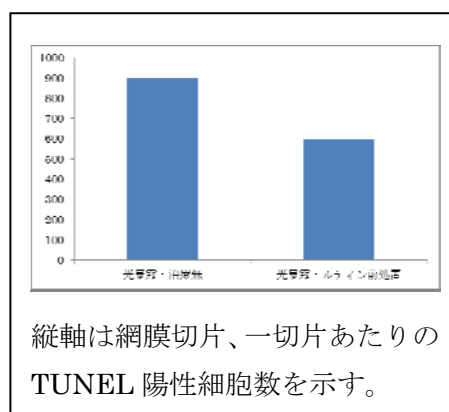
(3) (2)と同様の条件で準備したマウスにおいて、網膜電図(下図の機器を用いた)を記録し、その波形を解析することで視機能解析を行った。光照射後 6 日目のデータを解析した。

この方法は、網膜機能を客観的に測定する方法として、人でも日常診療に用いられる方法である。マウスを暗順応させておき、暗所における網膜全体の機能を測定した。

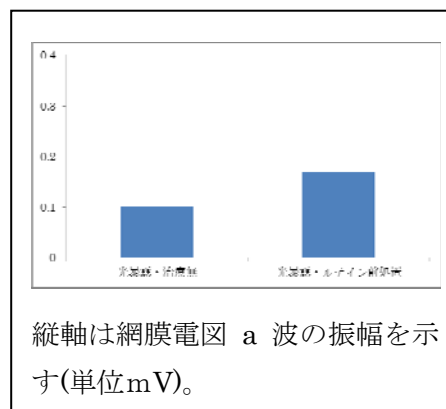


#### 4. 研究成果

光暴露により、TUNEL 陽性のアポトーシス細胞が誘導されるが、その細胞数が、コントロールに比べて、ルテイン前処置により減少した。すなわち、ルテインにより光暴露後のアポトーシスが予防されたことが明らかになった(図参照)。アポトーシス細胞は、いずれの群においても視細胞層に限局しており、特に光に暴露しやすい、網膜中心部分に多く検出された。



さらに、網膜電図も、光暴露後においてもルテイン前処置のある群では、無い群と比べて、維持されていた。網膜電図の波形のうち a 波は視細胞の機能を示すことが知られており、光暴露による a 波の振幅低下、すなわち視細胞の機能低下が、ルテインの前投与によって抑制されたことを示したのが、下図である。



以上の結果より、ルテインの全身性の前投与は、光暴露後の網膜視細胞のアポトーシスを一定レベルにおいて抑制し、網膜電図により測定した網膜機能の低下を、完全にではないが一定レベルにおいて抑制したことが示された。

今後は、さらなるメカニズムの解析に関する研究が必要と思われるが、ルテインが光暴露に対して網膜保護効果を持つことが少なくともマウスの実験系においては示された。

## 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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権] 該当なし

○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

馬渕 春菜 (MABUCHI HARUNA)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：70465011