

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592640

研究課題名(和文) セミカルバダイズ感受性モノアミノオキシダーゼ阻害剤による加齢性眼疾患の抑制

研究課題名(英文) Effect of semicarbazide-sensitive monoamine oxidase inhibitors on age-related eye disease

研究代表者

橋爪 公平 (Hashizume, Kohei)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：50407095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：セミカルバダイズ感受性モノアミノオキシダーゼ阻害剤の白内障抑制の効果を2つの動物モデルで確認した。(1)ステロイド誘発鶏胚白内障モデルにおいてSSAO阻害剤を投与することによって、水晶体中のグルタチオン濃度の低下を抑制し、水晶体混濁を抑制した。(2)ストレプトゾトシンによる糖尿病ラットにおいてSSAO阻害剤の点眼によって白内障発生の程度を抑制した。対照群の混濁は7週間後に 2.28 ± 1.07 、9週間後に 2.89 ± 1.16 で、治療群では7週間後に 1.33 ± 1.32 ($p = 0.023$)、9週間後に 1.78 ± 1.15 ($p = 0.017$)の混濁で、混濁の抑制がみられた。

研究成果の概要(英文)：I confirmed suppressive effect of Semicarbazide-sensitive mono-amine oxidase (SSAO) inhibitor on cataract formation in two animal models. (1) In the chick embryo model of steroid-induced cataract, administration of SSAO inhibitor decreased the lens opacity (lens opacity score: 3.47 ± 0.97 versus 2.80 ± 1.00 , $p = 0.016$), and recovered the amounts of reduced glutathione in lens (3.98 ± 0.68 nmol / lens versus 4.88 ± 0.88 nmol / lens, $p < 0.001$). (2) In the streptozotocin (STZ) induced diabetic rat model, administration of SSAO inhibitor by eye drops suppressed diabetic cataract formation. In control group lens opacity scores were 2.28 ± 1.07 at 7 weeks, 2.89 ± 1.16 at 9 weeks, and 3.56 ± 0.51 at 12 weeks after STZ injection. In treated group lens opacity scores were 1.33 ± 1.32 ($p = 0.023$) at 7 weeks, 1.78 ± 1.15 ($p = 0.017$) at 9 weeks, and 3.28 ± 1.02 ($p = 0.668$) at 12 weeks after STZ injection, administration of SSAO inhibitors decreased the lens opacity at 7 and 9 weeks.

研究分野：医歯薬学

キーワード：加齢性眼疾患 酸化ストレス 白内障 SSAO VAP-1

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、老視などが含まれる。これらは視機能の低下を招き、視機能の低下は高齢者のQOLの低下の原因となるため、非常の重要な疾患と言える。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、疫学研究により、特に白内障や加齢黄斑変性の病態に酸化ストレスが深く関わっていることが明らかになってきた。

白内障は加齢性眼疾患の中で最も多い疾患で60歳以上の70%、70歳以上の90%、80歳以上ではほぼ100%の人で視力障害を来すと言われている。白内障に対する治療は、安全で短時間の外科的手術(水晶体再建術)が既に確立されているが、その一方で発症そのものや、発症後の進行を抑制するような手段は得られていない。また先進国では外科的治療によって視力改善を得ることができるが、発展途上国では手術を受けることができずに失明に至る人口も多く、未だに世界の失明原因の一位となっている。近年疫学研究で、紫外線、喫煙、ビタミンC/Eの低摂取が白内障の危険因子であることが報告され、白内障の病態への酸化ストレスの関与が明らかになっている。また組織学的検討では老人性白内障や糖尿病白内障を生じた水晶体中にはAGEsが蓄積していることが明らかになっている。

一方、Semicarbazide-sensitive mono-amine oxidase (SSAO)は様々な機能を持つ酵素で、血管内皮に存在する膜結合型Vascular adhesion protein (VAP-1)と血清中に存在する遊離型の2つに分けることができる。前者は白血球やリンパ球との接着分子の機能を持ち炎症に関連し、後者はアミノオキシダーゼ活性により(生体内の)モノアミンを酸化することで脱アミン化する酵素である。モノアミンは脱アミン化により、アル

デヒド、アンモニア、過酸化水素などとなる。これらは細胞毒性を持ち、advanced glycation end-products (AGEs)の産生、アポトーシスなどに関与するとともに活性酸素を産生し酸化ストレスを生じる。

加齢性眼疾患の発症にSSAOの作用が関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、加齢性眼疾患の動物モデルに対して、SSAO阻害剤を投与することによって、病態にSSAOが関与するか、あるいはSSAO阻害剤が加齢性眼疾患を抑制するかどうかを解析する。このことによりSSAOや酸化ストレスが加齢性眼疾患の病態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。また治療実験も兼ねているため、加齢性眼疾患の新しい治療法や予防法の解明に貢献できる可能性がある。

3. 研究の方法

研究期間における実験として2つの動物モデルを用いた。すなわちステロイド誘発鶏胚白内障モデルと、ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットである。前者に対してはSSAO阻害剤を鶏卵の気質部に、後者に対しては点眼で投与した。それぞれの方法に関して以下に記す。

ステロイド誘発鶏胚白内障モデルに対するSSAO阻害剤の効果の検討

15日齢の受精鶏卵の気室部にヒドロコルチゾンを0.50 μmol / eggで投与し、白内障モデルを作成した。ヒドロコルチゾン投与後3時間後、10時間後、20時間後にSSAO阻害剤であるU-V002 (0.13mg / mL) およびU-V002類縁体 (0.14mg / mL) をそれぞれ200 μL 気質部に投与した。また対照群には同量の生理食塩水を投与した。ヒドロコルチゾン投与48時間後に解剖を行い、水晶体を抽出した。水晶体混濁は抽出水晶体を肉眼にて観

察し1~5のスコア化し評価した。スコアリングは、スコア1を混濁なし、スコア3は核周囲帯の白色リング、スコア5は核部の中心まで白濁とし、核周囲帯のわずかな白色リングをスコア2、核部の中心に白濁が及んでいない核部の混濁をスコア4とした。

また摘出水晶体を用いて還元型グルタチオン量の測定も行った。鶏胚1個体分(2個の水晶体)を1検体とし、冷却した蒸留水0.4 mlを加え、水中で超音波破碎した。ただちに冷却した20%トリクロロ酢酸 0.1mlを加えた。10000rpmで5分間遠心分離し、上清100 μ lを取り、1M トリスバッファー (pH8) 95 μ lとジチオニトロ安息香酸(メタノール溶解) 5 μ lを加え、15分室温で反応させた後、415nmで吸光度計にて測定した。1, 2, 5, 10 nmol/wellのシステインを同様に反応させ検量線を作成した。

ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットにおける糖白内障にたいするSSAO阻害剤の効果の検討

鶏胚モデルの続きの実験として糖尿病ラットに生じる糖白内障に対するSSAO阻害剤(U-V002類縁体)の効果調べた。5週齢のWistar ratに対してストレプトゾトシン(STZ)を60 mg/kgで尾静脈からの静脈注射で投与し、STZ糖尿病モデルラットを作成した。STZ投与翌日から治療群としてU-V002類縁体溶液を、対照群として溶媒を1日3回で両眼に点眼した。またSTZ投与後1週間後に血糖値測定を行い、血糖値が500 mg/dl以上の個体のみを実験の対象とした。ミドリンPで散瞳し細隙灯を用いて7週間後、9週間後、12週間後に水晶体混濁の様子を観察し、カメラで撮影した。水晶体混濁の程度を0~4でスコア化し、評価した。

4. 研究成果

ステロイド誘発鶏胚白内障モデルに対するSSAO阻害剤の効果の検討

ヒドロコルチゾン投与しない群では水晶体に混濁は生じなかった。ヒドロコルチゾン投与後 48 時間の水晶体混濁のスコアは、対照群: 3.47 ± 0.97 に対して U-V002: 2.79 ± 1.03 ($p=0.035$)、U-V002 類縁体: 2.80 ± 1.00 ($p=0.016$)と有意に低く、SSAO 阻害剤によって水晶体混濁が抑制された

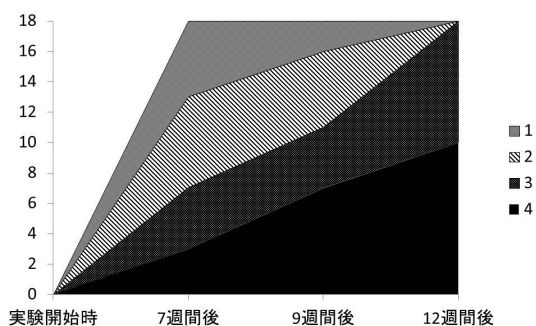
ヒドロコルチゾン投与しない群の水晶体中グルタチオン量は 7.81 ± 0.88 nmol/lens であった。ヒドロコルチゾン投与により 3.98 ± 0.68 nmol/lens と有意に低下した($p<0.001$)。この低下は、U-V002 投与群では 4.59 ± 0.80 nmol/lens、U-V002 類縁体投与群では 4.88 ± 0.88 nmol/lens ($p=0.028$)で、SSAO 阻害剤によって水晶体中グルタチオン濃度は有意に回復した。また水晶体混濁とグルタチオン濃度との間に有意な負の相関関係が認められた ($p<0.001$)。

このステロイド誘発鶏胚白内障モデルに対して、SSAO 阻害剤(U-V002、U-V002 類縁体)を投与し、有意に水晶体混濁を抑制した。さらに、SSAO 阻害剤投与により、水晶体中のグルタチオン量の低下が有意に抑制されたことから、この水晶体混濁を抑制するには、SSAOを介した酸化ストレスが関与していることが示唆された。さらに SSAO 阻害剤が白内障の治療薬となる可能性が考えられた。

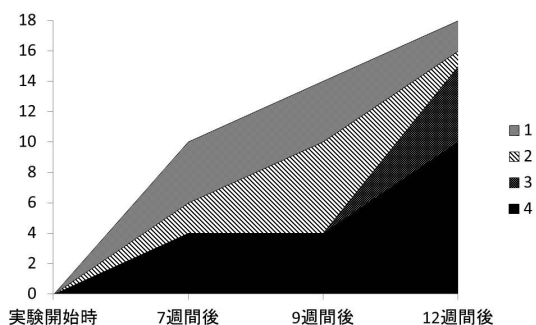
ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットにおける糖白内障にたいするSSAO阻害剤の効果の検討

水晶体混濁は対照群の混濁スコアは7週間後に 2.28 ± 1.07 、9週間後に 2.89 ± 1.16 、12週間後に 3.56 ± 0.51 であった。一方、治療群では7週間後に 1.33 ± 1.32 ($p = 0.023$)、9週間後に 1.78 ± 1.15 ($p = 0.017$)、12週間後に 3.28 ± 1.02 ($p = 0.668$)の混濁スコアだった。両群間の比較では7週間後と9週間後で混濁の抑制がみられた。

対照群の混濁の推移



治療群の混濁の推移



SSAO 阻害剤が糖白内障を抑制する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 S, Hashizume K, Nishigori H, Tezuka Y, Sanbe A, and Kurosaka D, Effect of astaxanthin on cataract formation induced by glucocorticoids in the chick embryo. *Curr Eye Res* 2015, 40, 535-540

〔学会発表〕(計4件)

橋爪公平、三部篤、西郡秀夫、黒坂大次郎、UVB 負荷による HSF1 ヘテロマウスの水晶体の変化、第 51 回日本白内障学会、東京国際フォーラム、2012 年 6 月 15 日

石川清乃、橋爪公平、三部篤、西郡秀夫、黒坂大次郎、UVB 負荷による HSF1 ヘテロマウス水晶体中のクリスタリン量の変化、第 52 回日本白内障学会、セラトングランドトーキ

ョーベイホテル、2013 年 6 月 27 日

Satoshi Ogasawara, Kouhei Hashizume, Kanako Maeda, Sayano Ishikawa, Hideo Nishigori, Atsushi Sanbe, Daijiro, Effect of green tea polyphenols on cataract formation induced by glucocorticoids in chick embryo, The association for research in vision and ophthalmology, 2015 年 5 月 5 日

石川清乃、橋爪公平、西郡秀夫、手塚優、三部篤、黒坂大次郎、アスタキサンチンの抗酸化作用による鶏胚グルココルチコイド誘発白内障の抑制、第 53 回日本白内障学会、TKP ガーデンシティ品川、2014 年 9 月 27 日

〔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：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし

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・助教

研究者番号：50407095

(2)研究分担者

(3)連携研究者