

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462740

研究課題名(和文)食品由来抗酸化物質を用いた網膜色素変性症動物モデルでの新規治療法の確立

研究課題名(英文)Development of New Therapeutic Strategies for Animal Models of Retinal Degeneration by chitin and chitosan.

研究代表者

義澤 克彦(YOSHIZAWA, Katsuhiko)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：70548396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：網膜色素変性症動物モデルであるN-methyl-N-nitrosourea (MNU) 誘発網膜変性症モデルを用いて、食品由来の天然抗酸化物質であるクルクミン(CUR)と緑茶抽出物(GTE)の病態制御の可能性、抑制機構、さらに併用効果について検討した。雌SDラットに40mg/kg MNU単回腹腔内投与、3日前から屠殺前日まで計10日間CUR、200mg/kg腹腔内投与、またはGTE 250mg/kg経口投与した。その結果CUR、GTEともに酸化ストレス軽減による視細胞アポトーシスの抑制が認められ、ヒトRP治療に有効であることが示唆された。しかし、CURとGTEの併用効果は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study was to evaluate the efficacy of curcumin (CUR) and green tea extracts (GTE) as antioxidants against MNU-induced photoreceptor apoptosis. Furthermore, combinational effects were evaluated. Seven-week-old female Sprague-Dawley rats received a single intraperitoneal administration of 40 mg/kg MNU. Intraperitoneal administration of 200mg/kg CUR or oral administration of 250mg/kg GTE started 3 days prior to MNU exposure, and the administration was continued once daily for 10 days. Both CUR and GTE inhibited MNU-induced photoreceptor cell apoptosis by suppressing oxidative stress as seen by oxidative makers. These findings indicate that CUR and GTE may help to suppress the onset and progression of human RP. However, we could not confirm additive action and/or synergistic effect by CUR and GTE.

研究分野：実験病理学

キーワード：網膜色素変性症 視細胞 緑茶抽出物 クルクミン 酸化ストレス MNU 動物モデル 併用効果

1. 研究開始当初の背景

(1) 学術的背景

ヒト網膜色素変性症(RP)は視細胞の進行性の変性・消失を特徴とし、失明を来す遺伝性疾患で未だ治療法のない難病であり、日本では中途失明の3大原因の一つに数えられており、その病態の理解と治療法の開発には動物モデルの存在が必須である。

我々は、*N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU)によるヒトRPの動物モデルを確立し、その病態制御を試みてきた。MNUはげっ歯類を初め様々な動物種にヒトRPと同様に視細胞アポトーシスに起因した網膜変性症を誘発することができる。その発症機序はBcl-2の発現抑制、Baxの発現亢進、Caspaseファミリーの活性化に加えて、PARPの活性化、JNK、c-Jun並びにc-Fosの活性化、NF-κBの発現低下が関与することを我々は解明した(Yoshizawa et al., 2005; Uehara et al., 2006)。

酸化ストレス仮説は約半世紀前にHermanにより老化のメカニズムとして提唱され、ミトコンドリアから発生する活性酸素種(ROS)が生体内のDNAや蛋白質、脂質等に直接作用して組織障害を誘発することが知られている。眼科領域において、RPを含む網膜変性疾患や白内障などの病態発生や進行に酸化ストレスの関与が報告され(Ohira et al., 2008; Ishibashi, 2012)、近年遺伝性ならびに光傷害性網膜変性症モデルでの酸化ストレスの関与が証明された(Miranda et al., 2010; Rivas and Vecino, 2009)。我々が確立したMNU網膜色素変性症モデルはヒトRPとはその発症機構は異なるものの、網膜での酸化ストレス発生が関与した視細胞アポトーシスという共通機構を介して病態が進行することから(Tsuruma et al., 2012)、ヒトのRP疾患モデルとしてRP治療薬あるいは予防薬の開発に有用である。

我々は、日本人の日常生活で摂取する機会が多い食品由来の抗酸化物質であるポリフェノールに着目し、カレーの黄色色素の主成分である非フラボノイド骨格のクルクミンと、フラボノイド骨格を有するカテキン類を多量

に含有する緑茶成分について、MNU網膜色素変性症モデルならびに遺伝性網膜変性症モデルでの病態抑制効果を検証したい。新たな抑制機構を同定できれば、失明予防策の樹立に寄与するとともに治療法の提言も可能となり、臨床応用にも資するところが大きいと考える。

2. 研究の目的

クルクミンはカレーの黄色色素の主成分で、ウコンの根茎に多く含まれ、その肝臓機能改善効果から国内ではサプリメントとして使用されている。また、抗炎症効果、動脈硬化予防効果や各種がんでの治療・予防効果を実験的に立証され、クルクミンの抗酸化作用がそのメカニズムとして注目されている(Goel et al., 2008)。さらに、カテキン類を多量に含有する緑茶は保険薬として約800年前に中国から伝わり、現在では嗜好飲料として定着している。緑茶成分であるカテキン類も、その抗酸化作用により、クルクミンと同様の効果を有することが報告されている(Terashima and Yokogoshi, 2005; Yoshino et al., 2006)。近年、これら食品由来のポリフェノールの神経保護作用の研究が進み、神経培養細胞系を用いた薬剤誘発神経細胞死モデルやin vivo脳梗塞モデル・薬剤誘発神経壊死モデルを用いて、クルクミンや緑茶由来カテキン類の神経保護作用が立証された(Kelsey et al., 2010)。しかし、MNU誘発網膜変性症における食品由来のポリフェノールの網膜神経保護作用の研究はこれまでに報告されていない。本研究では、酸化ストレスがその病態形成に関与するMNU誘発網膜変性症モデルを用いて、非フラボノイド系ポリフェノールであるクルクミンと、フラボノイド系ポリフェノールであるカテキン類を多量に含有する緑茶抽出物について網膜変性症抑制効果を検証した。

3. 研究の方法

7週齢SD系雌ラットに40mg/kg MNU単回腹腔内投与、その3日前から屠殺前日まで計10日間CUR 200mg/kg腹腔内投与、またはGTE 250mg/kg経口投与し、MNU投与12, 24, 72時間並びに7日後の網膜について下記の項目を解析した。

- ・眼球の病理組織学的検査・画像解析検査[網膜厚(末梢網膜、中心網膜)、視細胞比率ならびに網膜傷害率を算出]
- ・網膜の免疫組織学的検査[Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-digoxigenin nick-end labeling (TUNEL)法、Activated caspase-3抗体, PDE6, Rodopsin]
- ・網膜8-OHdGレベルの測定(エライザ法)
- ・網膜Heme Oxygenase-1 (HO-1) mRNA量測定(パラフィン標本からのマイクロダイジェクション法によるRNA抽出)

また、CUR と GTE の併用効果を検証するため、7 週齢の MNU 処置 SD 雌ラットに、処置 3 日前より CUR は腹腔内投与、GTE は経口投与を開始し、屠殺前日まで連日計 10 回投与を行ない、同様に検討した。

4 . 研究成果

(CUR による抑制効果) CUR 投与後 72 時間では視細胞比率、網膜傷害率に差は認めなかった。投与後 7 日では MNU + CUR 併用群の中心部網膜の視細胞比率が MNU 単独群に比べて高く、さらに網膜傷害率は MNU 単独群 66.0% に対し MNU + CUR 併用群 37.3% と障害抑制傾向を示した。8OHdG レベルは MNU 投与後 12 時間でピークとなり、その時点で MNU + CUR 併用群では 8-OHdG レベルが有意に抑制された。さらに、TUNEL 染色でのアポトーシス陽性細胞率は酸化ストレスがピークとなった MNU 投与 12 時間後では MNU + CUR 併用群で有意に減少した。

(GTE による抑制効果) MNU7 日後の視細胞比率は MNU 単独群で 9.98%(中心部)・31.96%(辺縁部)であったのに対して、GTE 併用群では 31.96%(中心部)・42.85%(辺縁部)であり、網膜障害率も MNU 単独群で 88.1% に対して GTE 併用群では 61.0% と有意に網膜障害を抑制した。MNU 投与 7 日後の PDE6・ロドプシン陽性像は GTE 併用群で有意に増加し、網膜保持率が高かった。TUNEL 染色では MNU 投与 24 時間後の陽性細胞数が GTE 併用群では有意に減少した。さらに、GTE 併用群では MNU 単独群に比べて、HO-1 mRNA の発現が有意に減少した。(CUR と GTE による併用効果) 今回の条件では併用投与による相加相乗効果は得られなかった。

以上の結果から、CUR、GTE とともに酸化ストレスを軽減させることによる視細胞アポトーシスの抑制が認められ、ヒト RP の治療に有効であることが示唆された。併用効果については、さらなる検討が必要と考えられた。

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 5 件)

1. Emoto Y, Yoshizawa K, Kinoshita Y, Yuki M, Yuri T, Tsubura A. Susceptibility to N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in different rat strains. J Toxicol Pathol, 29, 67-71, 2016. 査読あり
2. Emoto Y, Yoshizawa K, Kinoshita Y, Yuki M, Yuri T, Tsubura A. Green tea extract attenuates MNU-induced photoreceptor cell apoptosis via suppression of heme oxygenase-1. J Toxicol Pathol, 29, 61-65, 2016. 査読あり
3. Emoto Y, Yoshizawa K, Hamazaki K, Kinoshita Y, Yuki M, Yuri T, Kawashima H, Tsubura A. Mead acid supplementation does not rescue rats from cataract and retinal degeneration induced by N-methyl-N-nitrosourea. J Toxicol Pathol 28, 11-20, 2015. 査読あり
4. Emoto Y, Yoshizawa K, Kinoshita Y, Yuri T, Yuki M, Sayama K, Shikata N, Tsubura A. Green tea extract suppresses N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor apoptosis in Sprague-Dawley rats. Graefe Arch Clin Exp Ophthalmol 252, 1377-1384, 2014. 査読あり
5. Emoto Y, Yoshizawa K, Kinoshita Y, Yuki M, Yuri T, Yoshikawa Y, Sayama K, Tsubura A. Green tea extract-induced acute hepatotoxicity in rats. J Toxicol Pathol 27, 163-174, 2014. 査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 榎本祐子, 義澤克彦, 浜崎 景, 木下勇一, 結城美智子, 垾 貴司, 河島 洋, 螺良愛郎. MNU 誘発白内障ならびに網膜変性症モデルに対するミド酸補給の効果. 第 104 回日本病理学会(名古屋国際会議場, 名古屋). 2015 年 4 月 30 日~5 月 2 日.
2. 義澤克彦, 榎本祐子, 木下勇一, 垾 貴司, 結城美智子, 吉川 豊, 茶山和敏, 螺良愛郎. 緑茶抽出物によるラット肝臓毒性. 第 103 回日本病理学会(広島国際会議場, 広島). 2014 年 4 月 24 日~26 日.
3. 榎本祐子, 義澤克彦, 結城美智子, 木下勇一, 垾 貴司, 四方伸明, 螺良愛郎. MNU 誘発ラット網膜色素変性症モデルに対する緑茶抽出物の有用性. 第 103 回日本病理学会(広島国際会議場, 広島). 2014 年 4 月 24 日~26 日.

〔図書〕(計 1 件)

1. Yoshizawa K, Emoto Y, Tsubura A. N-Methyl-N-Nitrosourea-Induced Retinal

Degeneration in Rats: A Reliable Animal Model of Retinitis Pigmentosa for the Development of New Therapeutic Strategies. In: Recent Advances in Eye Research, Nova Science Publishers, pp.55-98. 2015. 査読あり

〔産業財産権〕
該当なし

〔その他〕
ホームページ等
<http://research.kmu.ac.jp/kmuhp/Koza?kyoinId=yssbyo>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

義澤 克彦 (YOSHIZAWA, Katsuhiko)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号：70548396

(2) 研究分担者

螺良 愛郎 (TSUBURA, Airo)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号：90098137

垓 貴司 (YURI, Takashi)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号：50330212

(3) 連携研究者

該当なし