

令和元年6月9日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00884

研究課題名(和文)キチン・キトサンオリゴ糖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) Inhibitory Effects of Chitosan Oligosacchride Supplementation on Retinal Degeneration Models

研究代表者

義澤 克彦 (YOSHIZAWA, Katsuhiko)

武庫川女子大学・生活環境学部・教授

研究者番号：70548396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：網膜色素変性症は最終的に失明を来す代表的な眼科疾患で、病態の理解と治療法の開発が必要である。N-メチル-N-ニトロソ尿素(MNU)誘発ラット網膜変性症及び遺伝性網膜変性症モデルでのキトサンオリゴ糖による病態抑制効果について検証した。その結果、COS水はMNU誘発視細胞障害及びC3Hマウスの遺伝性網膜変性を軽減させた。MNU並びにC3Hマウスの視細胞障害には酸化ストレスによる細胞死が知られており、COSによる酸化ストレスの軽減が病態抑制に関与していた。COSはヒト網膜色素変性症の病態抑制効果が期待できるものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト網膜色素変性症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、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、MNUを用いてヒト網膜色素変性症のラット・マウス動物モデルを確立し、その病態制御を試みてきた。キトサンは、日本人の日常生活で摂取する機会が多いカニやエビなどの甲殻類の甲羅・殻に含まれる多糖類の一種である。我々は甲殻類由来の抗酸化・抗炎症物質であるキトサンのオリゴ糖に着目し、MNU網膜色素変性症モデルと遺伝性網膜変性症モデルでの病態抑制効果を検証した。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である。

研究成果の概要(英文)：Retinitis pigmentosa (RP) is an ophthalmic disease that eventually leads to blindness. The development of new strategy for the therapy is necessary. The effects of chitosan oligosaccharide (COS) on N-methyl-N-nitrosourea (MNU) induced retinal degeneration in rats and hereditary retinal degeneration in C3H mice were examined. In the rats study, central retinal photoreceptor cell ratio was higher in the 4%COS combined group, than in the MNU treated group, and the retinal damage ratio was reduced. 2. At 18 days of C3H mice, the width of retinal outer layer decreased significantly in the DW group, compared to that of the COS combined group. In conclusions, COS suppressed photoreceptor damages in these rodent models involved in oxidative stress. Reduction of oxidative stress by COS may be important. COS appears to be effective in suppressing of human RP.

研究分野：毒性病理学

キーワード：網膜色素変性症 視細胞 抗酸化作用 酸化ストレス N-メチル-N-ニトロソ尿素 C3Hマウス 遺伝性網膜変性症モデル

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト網膜色素変性症は視細胞の進行性的変性・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、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)を用いてヒト網膜色素変性症のラット・マウス動物モデルを確立し、その病態制御を試みてきた。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とc-Fosの活性化、NF- $\kappa$ Bの発現低下、網膜細胞内カルシウム増加によるCalpain活性化、網膜視細胞における酸化ストレス発現が関与することを我々は解明した(Yoshizawa et al., 2005; Uehara et al., 2006; Kuro et al., 2011; Emoto et al., 2014)。これらの結果を踏まえ、Caspase-3阻害剤(Ac-DEVD-CHO)、アポトーシス実行因子であるCaspase-3に対し抑制的に働くPARP阻害剤(ニコチン酸アミド、3-アミノベンザマイド)、Calpain活性化を抑制するCalpain阻害剤(SNJ-1945)、および食品由来の抗酸化作用を有するポリフェノール(非フラボノイド骨格のクルクミン、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抽出物)による網膜変性症治療効果を実証した。さらに、網膜視細胞に豊富に存在するn-3系多価不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸(DHA)やn-6系多価不飽和脂肪酸であるアラキドン酸を併用することにより、MNU誘発病変の制御が可能であることを明らかにした(Yoshizawa et al., 2000; Kiuchi et al., 2002; Moriguchi et al., 2004; Miki et al., 2007; Yoshizawa et al., 2012)。眼科領域において、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を使うモデルはヒトの疾患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がわかっており(Tsuruma et al., 2012; Emoto et al., 2014)、ヒトの網膜色素変性症疾患モデルとして治療薬あるいは予防薬の開発に有用である。

キトサンは、日本人の日常生活で摂取する機会の多いカニやエビなどの甲殻類の甲羅・殻に含まれる多糖類の一種であり、畜産や漁業用の資料、殺虫・殺菌剤、汚水処理など様々な分野で利用されている。医療分野では人工皮膚・縫合糸に加えて、これらのオリゴ糖の創傷治療促進効果や抗癌作用・抗炎症作用が我々の共同研究者らのグループから報告され(Azuma et al., 2015)、極めて利用価値が高い食品由来物質といえる。我々は甲殻類由来の抗酸化・抗炎症物質であるキトサンのオリゴ糖に着目し、MNU網膜色素変性症モデルと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、本実験を立案した次第である。

## 2. 研究の目的

網膜色素変性症は未だ治療法の確立していない難病である。その動物モデルである *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) 誘発網膜変性症モデルと遺伝性網膜変性症モデルを用いて、食品由来抗酸化・抗炎症物質であるキトサンのオリゴ糖による病態制御の可能性を明らかにするとともに、病態抑制機構を明確にしたうえで、より有効で安全かつ画期的なヒト網膜色素変性症の治療法の確立を目指すことが本研究の目的である。本研究で得られる成果は、基礎的興味にとどまらず、臨床にも直ちに応用できる意義深いデータを提供できるものと考えられる。

### 3. 研究の方法

#### (1) MNU 誘発ラット網膜変性症モデルにおけるキトサンオリゴ糖の病態抑制効果：用量相関性と継時的変化

7週齢の雌 SD 系ラットに 40mg/kg MNU あるいは生理食塩水を単回腹腔内投与した。MNU 投与 7 日前から解剖前まで 1、4、8%キトサンオリゴ糖含有水(COS 水)を飲水投与した。さらに、MNU 投与後 6、12、24、72 時間および 7 日の眼球について、病理組織学的検査・画像解析検査を実施し、網膜厚による視細胞比率(辺縁部網膜、中心部網膜)並びに網膜障害率を算出した。COS 併用による網膜障害抑制効果を評価した。また、網膜の視細胞死(TUNEL、H2AX)、網膜機能保持率(PDE6)、酸化障害(HO-1、TG)の有無について免疫染色的手法を用いて検証した。

#### (2) MNU 誘発ラット網膜変性症モデルにおけるキトサンオリゴ糖の病態抑制効果：最適投与方法の確立

7週齢雌 SD ラットに 40 mg/kg MNU もしくは生理食塩水を単回腹腔内投与した。4%COS 水(2mL/匹)を MNU 投与 3 日前から投与後 7 日まで 1 日 1 回(MNU 投与日は投与 2 時間前及び 6 時間後)強制経口投与した。MNU 投与後 7 日に両側眼球と血清を採取し、眼球の病理評価を実施した。網膜の形態計測(網視細胞比率・網膜障害率)に加えて、d-ROMs テストにより血清中酸化ストレス度を測定した。

#### (3) 遺伝性網膜変性症マウスモデルにおけるキトサンオリゴ糖の病態抑制効果

C3H 母マウスに出産日から解剖日まで 2%COS 水もしくは蒸留水を自由飲水させた。13 及び 18 日齢仔マウスの眼球を病理評価し、視細胞比率を算出した。

### 4. 研究成果

#### (1) MNU 誘発ラット網膜変性症モデルにおけるキトサンオリゴ糖の病態抑制効果：用量相関性と継時的変化

MNU 投与後 7 日では、MNU 単独群に比べて 4%COS 併用群で、中心部の網膜視細胞比率が有意に高く、視細胞障害の抑制がみられた。一方、辺縁部では 4%COS 併用群の網膜視細胞比率に有意な差はみられなかった。8%COS 併用群では、網膜視細胞比率が有意に減少し、増悪化がみられた。網膜障害率は MNU 単独群に比べて 4%COS 併用群で有意に軽減したが、8%COS 併用群では増悪化した。MNU 投与後 12 時間及び 24 時間において COS 併用群で TUNEL 陽性細胞数、H2AX 陽性細胞の出現程度が軽減した。MNU 投与後 24 時間において COS 併用群で HO-1 および TG 陽性細胞の出現が軽減した。MNU 投与後 7 日の PDE6 保持率は、COS 併用群で有意に高値を示した。以上の結果から、4%COS 水によって MNU 誘発の視細胞アポトーシスを構造的・機能的に抑制したものと考えられた。さらに、その抑制効果は COS による網膜での酸化ストレス抑制が関与していることが示唆された。一方、8%COS 投与群では体重減少が顕著であり、全身性ストレスが網膜障害の増悪化に関連したものと考えられた。適切な COS の投与量・投与方法を用いることにより、RP の発症や進行の改善に役立つ可能性が示唆された。

#### (2) MNU 誘発ラット網膜変性症モデルにおけるキトサンオリゴ糖の病態抑制効果：最適投与方法の確立

4%COS 水併用群では MNU 単独群に比べ中心部網膜視細胞比率が高く、網膜障害率は低下を示し、視細胞障害の抑制がみられた。MNU 投与群では血清 d-ROMs 値が高値を示したが、4%COS 水併用群では軽減した。4%COS 水強制経口投与では体重への影響は観察されなかった。COS 水強制経口投与は MNU 誘発視細胞障害を軽減させた。

(3) 遺伝性網膜変性症マウスモデルにおけるキトサンオリゴ糖の病態抑制効果  
18日齢 C3H マウスでは蒸留水群で網膜外層の減少が顕著であったが、2%COS 水併用群では網膜外層が残存した。COS 水強制経口投与は C3H マウスの遺伝性網膜変性を軽減させた。C3H マウスの視細胞障害には酸化ストレスによる細胞死が関与することが報告されており、COS による酸化ストレスの軽減が病態抑制に関与していると考えられた。

以上の結果より、COS はヒト網膜色素変性症の病態抑制効果が期待できるものと考えられ、安全性も含めたさらなる研究が必要であると思われる。

## 5. 主な発表論文等

### [ 雑誌論文 ] (計 5 件)

義澤克彦, 金瀬 茜, 行光由莉, 新家由実子, 平塚未夢, 平山由佳理, 三浦麻里安, 榎本祐子, 小山千尋, 竹之内明子 .

眼球毒性の観察された農薬についての文献的考察 .

武庫川女子大学紀要 (自然科学) 66, 1-8, 2018. 査読あり

Meg Ferrell Ramos, Julia Baker, Elke-Astrid Atzpodien, Ute Bach, Jacqueline Brassard, James Cartwright, Cynthia Farman, Cindy Fishman, Matt Jacobsen, Ursula Junker-Walker, Frieke Kuper, Maria Cecilia Rey Moreno, Susanne Rittinghausen, Ken Schafer, Kohji Tanaka, Leandro Teixeira, Katsuhiko Yoshizawa, Hui Zhang.

Review - Nonproliferative and Proliferative Lesions of the Rat and Mouse Special Sense Organs (Ocular [eye and glands], Olfactory and Otic).

J Toxicol Pathol 31(3 Suppl), 97S-214S, 2018. 査読あり

Yoshizawa K, Yuki M, Kinoshita Y, Emoto Y, Yuri T, Elmore SA, Tsubura A.

N-methyl-N-nitrosourea-induced schwannomas in male Sprague-Dawley rats with a literature review of inducible and spontaneous lesions.

Experimental and Toxicologic Pathology 68, 371-379, 2016. 査読あり

Yoshizawa K, Kinoshita Y, Emoto Y, Tsubura A.

Spontaneously occurring lymphohematopoietic tumors in three young Sprague Dawley rats.

Experimental and Toxicologic Pathology 68, 301-305, 2016. 査読あり

Yoshizawa K, Yuki M, Kinoshita Y, Emoto Y, Yuri T, Shikata N, Elmore SA, Tsubura A.

Characterization of mammary adenocarcinomas in male rats after N-methyl-N-nitrosourea exposure - Potential for human male breast cancer model.

Experimental and Toxicologic Pathology 68, 263-270, 2016. 査読あり

### [ 学会発表 ] (計 7 件)

小山千尋、竹之内明子、金瀬茜、行光由莉、榎本祐子、野口貴子、黒住誠司、佐藤公彦、岡本芳晴、義澤克彦

網膜色素変性症動物モデルにおけるキトサンオリゴ糖の抑制効果 .

第35回日本毒性病理学会学術集会 (東京) . 2019年 .

Takenouchi A, Yoshizawa K, Emoto Y, Kinoshita Y, Yuki M, Yuri T, Okamoto Y.

Inhibitory effects of chitosan oligosaccharide in green tea extract-induced

rat liver injury model.

14th International Chitin and Chitosan Conference & 12th Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symposium (Joint with 32nd Japanese Society for Chitin and Chitosan Conference). (Suita, Japan). 2018.

義澤克彦.

網膜毒性発症の分子学的メカニズム .

第38回比較眼科学会基礎部会研究会 (名古屋) . 2018年 .

義澤克彦.

毒性病理学会からのトピック - レギュラトリーサイエンス - (日本毒性病理学会合同シンポジウム) . 新規農薬の毒性病理学的評価のトピック - 農薬評価における毒性病理学専門家の役割 .

第45回日本毒性学会学術年会(大阪) . 2018年 .

義澤克彦、竹之内明子、榎本祐子、木下勇一、結城美智子、垾貴司、岡本芳晴 .

キトサンオリゴ糖を用いたN-メチル-N-ニトロソ尿素誘発ラット網膜変性症の抑制効果 .

第45回日本毒性学会学術年会 (大阪) . 2018年 .

竹之内明子、榎本祐子、木下勇一、浜崎 景、螺良愛郎、義澤克彦 .

緑茶抽出物誘発ラット肝臓障害モデルにおけるミード酸の抑制効果 .

第 34 回日本毒性病理学会学術集会(那覇) . 2018 年 .

竹之内明子、井崎汀、板倉小春、高橋亜実、友國成美、藤田明夢、藤原瑠香、義澤克彦 .

緑茶抽出物誘発ラット肝臓障害モデルにおけるキトサンオリゴ糖の抑制効果 .

第 5 回日本獣医病理学専門家協会学術集会 . 2018 年 .

#### **[図書](計3件)**

Yoshizawa K, Emoto Y, Kuwata M, Tsubura A.

Animal Models for the Study of Human Disease), 2nd edition. N-Methyl-N-nitrosourea animal models for retinitis pigmentosa.

Elsevier, 2017. 総ページ数 : 1187

Yoshizawa K, Kinoshita Y, Takenouchi A, Tsubura A.

Skin Permeation and Disposition of Therapeutic and Cosmeceutical Compounds.

Skin Damage Caused by Chemical Application.

Springer Japan, 2017. 総ページ数 : 428 .

義澤克彦.

新毒性病理組織学 感覚器系 眼および付属腺

西村書店, 2018年, 総ページ数 : **813**

#### **[その他]** ホームページなど

武庫川女子大学 教員一覧 教員情報 教育研究業績書

[http://www.mukogawa-u.ac.jp/gakuin/gyoseki/pdf/id\\_85206.pdf](http://www.mukogawa-u.ac.jp/gakuin/gyoseki/pdf/id_85206.pdf)

## **6. 研究組織**

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 : 垾 貴司

ローマ字氏名：(YURI,takashi)

所属研究機関：甲子園大学

部局名：栄養学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 50330212

研究分担者氏名：岡本 芳晴

ローマ字氏名：(OKAMOTO,yoshiharu)

所属研究機関：鳥取大学

部局名：農学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 50194410

研究分担者氏名：結城 美智子

ローマ字氏名：(YUKI,michiko)

所属研究機関：兵庫医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁): 60467587

研究分担者氏名：螺良 愛郎

ローマ字氏名：(TSUBURA,airo)

所属研究機関：関西医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 90098137

研究分担者氏名：竹之内 明子

ローマ字氏名：(TAKENOUCHI,akiko)

所属研究機関：武庫川女子大学

部局名：生活環境学部

職名：助手

研究者番号(8桁): 20779227

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。