

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09448

研究課題名(和文) ルテイン投与による還元型チオール増加を介した抗酸化能力の増強

研究課題名(英文) Studies on how lutein administration enhances antioxidant capacity by increasing reduced thiols

研究代表者

大平 明弘 (OHIRA, Akihiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員教授

研究者番号：00169054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ルテインなどの抗酸化物質は、網膜変性モデルマウスの変性過程を遅延させる。可視光で生じる視細胞障害を保護することも知られている。これにはチオール含有量とチオール依存性過酸化物代謝が直接関係する。本研究によりフリー体のルテインが青色LEDによる細胞障害に対して、ROS産生抑制作用を介して網膜光障害に対する保護作用を示すことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究より、ルテインが光障害によって視細胞に誘導される酸化ストレス障害に対して保護作用を示すことが明らかになった。ルテインエステル体とルテインフリー体を健康人20名に投与し、3ヶ月間の反復摂取を行い、計9ヶ月間の追跡を行った。その結果、ルテイン服用で、健康人の血清BAP(Biological Antioxidant Potential)とSH(Sulfhydryl)は上昇し、第二鉄(Fe³⁺)イオンを第一鉄(Fe²⁺)イオンに還元できる抗酸化力を高め、さらにチオールの機能を高める事は重要な発見となった。D-ROMsテストではヒドロペルオキシド低下傾向を示し、酸化ストレスの状況緩和を示した。

研究成果の概要(英文)：Antioxidants such as lutein delay the degenerative process in retinal degeneration model mice. It is also known to protect against photoreceptor damage caused by visible light. This is directly related to thiol content and thiol-dependent peroxide metabolism. In this study, it was clarified that free-lutein shows a protective effect against cytotoxicity caused by blue LED by inhibiting ROS production.

Lutein ester form and lutein-free form were administered to 20 healthy subjects, repeated intake for 3 months, and follow-up for a total of 9 months. As a result, lutein intake increased the serum BAP (Biological Antioxidant Potential) and SH (Sulfhydryl) in healthy subjects, and enhanced the antioxidant ability to reduce ferric (Fe³⁺) ions to ferrous (Fe²⁺) ions. Furthermore, enhancing the function of thiol was an important discovery. The D-ROMs test showed a tendency to lower hydroperoxides, indicating alleviation of oxidative stress.

研究分野：眼科学

キーワード：酸化ストレス 網膜光障害 ルテイン 抗酸化酵素 活性酸素 黄斑色素 ポリフェノール

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ルテインは、眼の中の水晶体や黄斑部などに元々存在している成分であり、強力な抗酸化作用を持つ黄色の天然色素として知られる。黄斑部のルテイン・ゼアキサンチンは網膜色素上皮細胞の SR-B1 を介して細胞中に取り込まれ、interphotoreceptor Retinoid Binding Protein を介して視細胞に取り込まれることが分かっている。また、申請者らの過去の研究成果から、エステル型ルテインとフリー型ルテインの双方を健常者が内服投与することで、血清ルテイン濃度と黄斑色素密度 (Macular pigment optical density: MPOD) が上昇することが明らかになっている。すなわち、ルテインは経口摂取により網膜に対して保護作用を示す可能性が十分に想定される。

2. 研究の目的

研究代表者らは過去にルテインをラットに投与すると網膜光障害が抑制されるという結果を得ている。しかしながら、臨床試験を展開するためには、さらに多角的な基礎研究が必要である。そこで本研究では、各種 *in vitro* 及び *in vivo* 実験モデルを用いて、ルテインの有効性を検証することとした。多様な実験モデルを用いて、ルテインの効果の程度及びそれぞれのモデルで認められる分子メカニズムを解明することは、ルテインの作用を包括的に検証する上で重要である。

3. 研究の方法

(1) *In vitro* 青色 LED 光誘発視細胞障害モデルを用いたルテインの評価

青色 LED 光誘発視細胞障害に対するルテイン-P80 及びフリー体ルテインの保護作用を明らかにすることを目的に検討を行った。マウス視細胞株 (661W) を 96 well プレートに 3,000 cells / well で播種し、24 時間培養した。その後ルテイン-P80 もしくはフリー体ルテインを処置し、6 時間インキュベートした後、青色 LED 光を 24 時間 300 lux で照射した。

(2) 細胞死評価

細胞死亡率は Hoechst 33342 と Propidium iodide (PI) で二重染色することによって評価した。Hoechst 33342 はすべての細胞の核を染色し、一方 PI は死細胞のみを染色する。Hoechst 33342 及び PI をそれぞれ最終濃度 8.1 mM 及び 1.5 mM で添加し、15 分間インキュベートした。蛍光顕微鏡を用いて Hoechst 33342 及び PI 染色画像をそれぞれ撮影した後、Image J を使用して細胞の総数を自動的にカウントし、PI 陽性細胞の割合を検討した。

(3) Reactive Oxygen Species (ROS) 産生量評価

細胞内 ROS 産生を評価するために CM-H₂DCFDA を使用した。処置した細胞を CM-H₂DCFDA とともに 37°C で 30 分間培養した。マイクロプレートリーダーを使用して 495/527 nm で蛍光シグナルを測定し、Hoechst 33342 を用いて総細胞数を計測し、補正処置を行うことで ROS 産生量を評価した。

(4) *In vivo* 青色 LED 光誘発網膜障害モデルマウスに対するルテインの評価

8 週齢雄性 ddY マウスを 24 時間の暗順応後、散瞳薬を点眼し、800 lux の青色光を 2 時間照射した。青色光照射から 3 日後、ヘマトキシリン・エオジン染色による組織評価を行った。薬物投与は経口投与にて行い、溶媒 (オリーブ油) または 100、300 mg/kg のルテイン-P80 を青色光照射 10 日前から試験終了時まで 1 日 2 回 (午前 8 時、午後 8 時) 投与した。

(5) *In vitro* ヘミン誘発網膜色素上皮細胞モデルの作製

網膜色素上皮細胞 (ARPE-19 細胞) は、10% ウシ胎児血清、100 U/mL ペニシリン及び 100 µg/mL ストレプトマイシンを含む DMEM/F-12 を使用し、5% CO₂、37°C 条件下で培養した。細胞は、4 日または 5 日ごとにトリプシン処理を使用して継代した。ARPE-19 細胞を 12 または 96 ウェルプレートに 1.5 × 10⁵ 細胞/mL の密度で播種し、4 日間インキュベートした。ヘミンを DMSO に溶解し、滅菌水で、最終濃度 1、10、または 25 µM に希釈した。

(6) 細胞生存活性評価

細胞生存率は、Cell Counting Kit-8 (CCK-8) を使用して測定した。細胞をヘモグロビンヘミン添加後 24 時間インキュベートした後、CCK-8 試薬を各 well に添加した。添加直後及び 1 時間後に、450nm 波長でマイクロプレートリーダーを使用し、吸光度を測定した。

(7) 細胞内二価鉄蓄積の評価

細胞内鉄蓄積は、Fe²⁺を検出する蛍光鉄プローブである Si-RhoNox-1 を使用して評価した。ヘモグロビンまたはヘミンを処置し、3 時間培養した後、培地をリン酸緩衝液で洗浄し、5 µM Si-RhoNox-1 を含む培地に交換した。Si-RhoNox-1 処置 1 時間後に培地を交換し、蛍光顕微鏡を使用して蛍光を観察した。

(8) 過酸化脂質蓄積量の評価

ヘミンを 25 μM で 12 時間処理した後の脂質過酸化を評価するために、thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) assay を実施した。ヘミンを処置した細胞を 30% (w/v) の 1.15% 氷冷塩化カリウムでホモジナイズした。溶解物を 3,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清 200 mL を、40 mL の 8.1% ドデシル硫酸ナトリウム溶液及び 200 mL の 0.8% チオバルビツール酸溶液を含む 20% 酢酸緩衝液 (pH 3.6) とともに、100°C で 1 時間加熱した。冷却後、400 mL のブチルアルコールとピリジン (15 : 1) を添加し、サンプルを 5 分間振とうした。4,000 rpm で 10 分間遠心分離した後、TBARS を含むブチルアルコール-ピリジン相を分離し、その吸光度を 532 nm で測定した。TBARS 率は、ROS 産生量評価によって測定された総細胞数を使用して補正した。

4. 研究成果

(1) *In vitro* 青色 LED 光誘発視細胞障害モデルに対するルテイン-P80 の作用

青色 LED 光照射により、死細胞率が増加し、ルテイン-P80 (0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 添加により細胞死が抑制された。(図 1) 一方、ルテイン-P80 (0.1、0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) は ROS 産生量を抑制しなかった。(図 2)

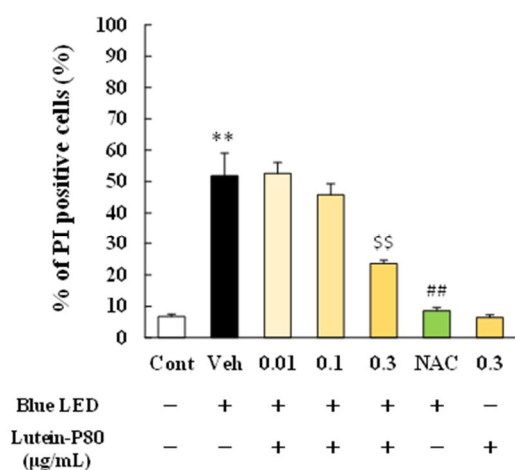


図 1. 青色 LED 誘発細胞死に対するルテイン-P80 の作用

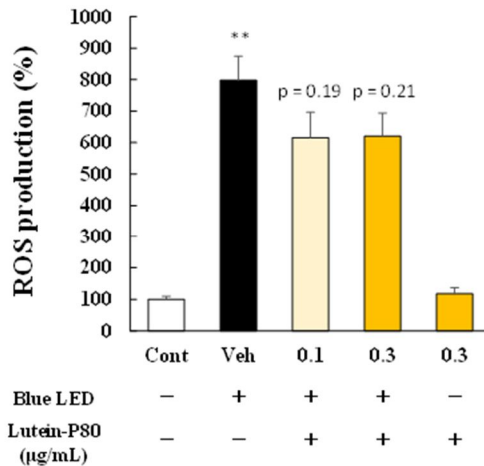


図 2. 青色 LED 誘発 ROS 産生に対するルテイン-P80 の作用

Data are shown as mean \pm S.E.M. (n = 3 or 6). **P < 0.01 vs. Control group (Student's t-test). \$\$ P < 0.01 vs. Vehicle group (Dunnett's t-test). ## P < 0.01 vs. Vehicle group (Student's t-test).

(2) *In vitro* 青色 LED 光誘発視細胞障害モデルに対するフリー体ルテインの作用

661W への青色 LED 光照射により、死細胞率が増加し、フリー体ルテイン (30 及び 60 μM) 添加により細胞死が抑制された。(図 3) また、フリー体ルテイン (3-30 μM) 処置群において Blue LED 光照射に伴う ROS の産生が抑制された。(図 4)

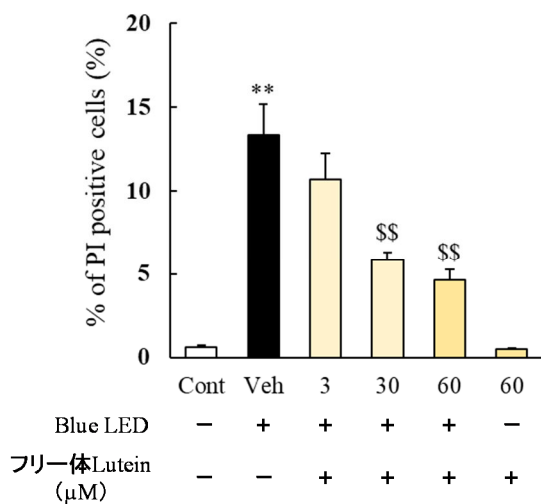


図 3. 青色 LED 誘発細胞死に対するフリー体ルテインの作用

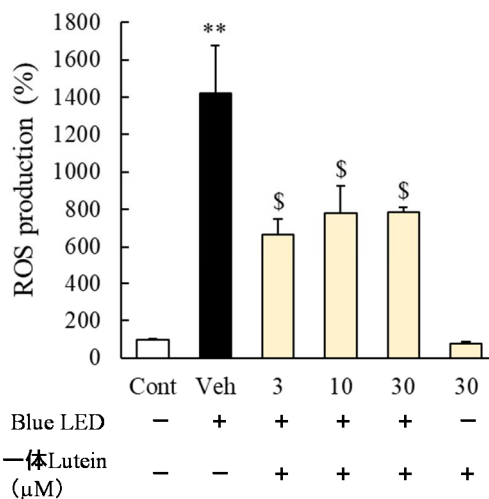


図 4. 青色 LED 誘発 ROS 産生に対するフリー体ルテインの作用

Data are shown as mean \pm S.E.M. (n = 3 or 6). **P < 0.01 vs. Control group (Student's t-test). \$ P < 0.05, \$\$ P < 0.01 vs. Vehicle group (Dunnett's t-test). ## P < 0.01 vs. Vehicle group (Student's t-test).

これらの結果より、フリー体のルテインが青色 LED による細胞障害に対して、ROS 産生抑制作用を介して保護作用を示すことが明らかになった。

(3) *In vivo* 青色 LED 光誘発網膜障害モデルマウスに対するフリー体ルテインの作用

青色 LED 照射により、モデルマウスにおける視細胞層の菲薄化が誘導された。フリー体ルテインの投与群において、視細胞層の菲薄化に対する抑制傾向が示された。この結果は、ルテインの経口投与は青色 LED による視細胞障害に対して保護作用を有する可能性を示している。

(4) ヘミン誘発細胞障害モデルの検討

これまで評価してきた視細胞に対する評価に加え、網膜色素上皮細胞に対するルテインの作用を検討した。網膜色素上皮細胞は血液網膜関門形成による脈絡膜血管から網膜への物質移行制御、視細胞外節の貪食作用、ビジュアルサイクルに必要な酵素を有する等、視覚情報の伝達を行う神経網膜の機能維持に重要な役割を担っている。様々な眼内血管障害によって網膜下出血を伴い網膜色素上皮細胞に障害を誘導する症例が散見される。血液成分に含有されるヘミンやヘモグロビンによる細胞障害は酸化ストレスが関与することが知られ、ルテインがヘミン誘発細胞障害に対して保護作用を示すと仮説を立てた。そこで、まずはヘミン誘発網膜色素上皮細胞障害モデルの作製に取り組んだ。

ヘミン添加 24 時間後においてヘモグロビンと同様に細胞生存活性が濃度依存的に低下した。(図 5) 細胞死に関してはヘミン 10 及び 25 μM 添加 24 時間後から有意な増加が認められ、72 時間までに著しい死細胞率の増加が認められた。(図 6)

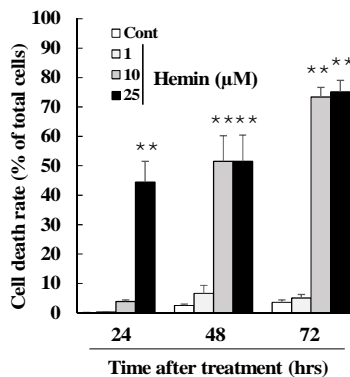


図 5. ヘミン添加後の細胞死率の経時的変化

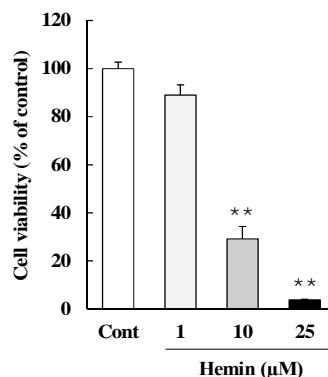


図 6. ヘミン添加後の細胞生存活性

Data are shown as mean \pm S.E.M. ** $p < 0.01$ vs. Control (Dunnett's test).

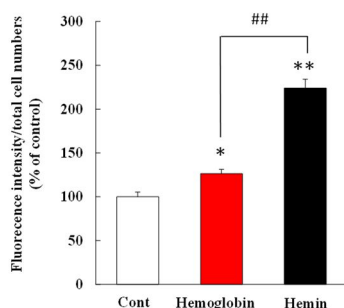
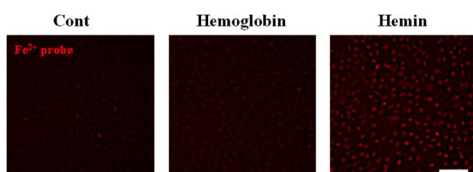


図 7. ヘモグロビン及びヘミン添加後の細胞内 2 価鉄の発現変化

ヒト網膜色素上皮細胞において、ヘモグロビン及びヘミン添加後の細胞内鉄蓄積を検討するため、N-オキシド化学に基づく二価鉄を特異的に検知可能な新規二価鉄検出プローブである Si RhoNox-1 を用いて、細胞内鉄蓄積を評価した。ヘモグロビン 25 μM 添加 3 時間後において蛍光鉄プローブの発現が増加し、ヘミン 25 μM 添加群では更に顕著に二価鉄プローブの蛍光が認められた。(図 7)

Data are shown as mean \pm S.E.M. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ vs. Control (Tukey's test). ## $p < 0.01$ vs. Hb (Student's t-test). Fe^{2+} probe; red. Scale bar = 100 μm .

ヘモグロビン及びヘミン添加により ROS 産生量が増加することを明らかにした (図 8)。また、ヘモグロビン添加群において過酸化脂質の蓄積が増加し、ヘミン添加群で更に過酸化脂質の蓄積が増大した (図 9)。

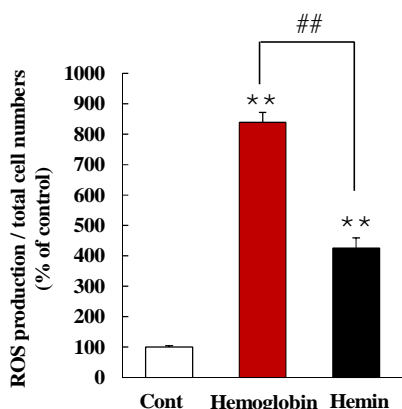


図 8. ヘモグロビン及びヘミン添加後の細胞内 ROS 産生量

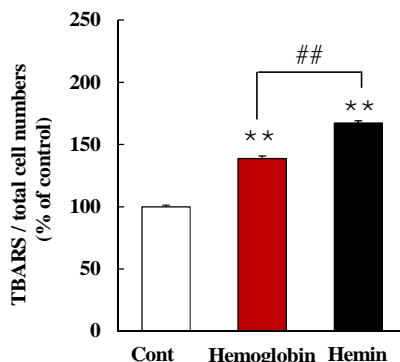


図 9. ヘモグロビン及びヘミン添加後の細胞内過酸化脂質蓄積

Data are shown as mean \pm S.E.M. ** $p < 0.01$ vs. Control (Tukey's test). ## $p < 0.01$ vs. Hb (Student's t-test).

(5) ヘミン誘発細胞障害モデルに対するルテインの作用

上記で示したヘミン誘発網膜色素上皮細胞障害モデルを用いて、ルテインの保護作用について検討した。

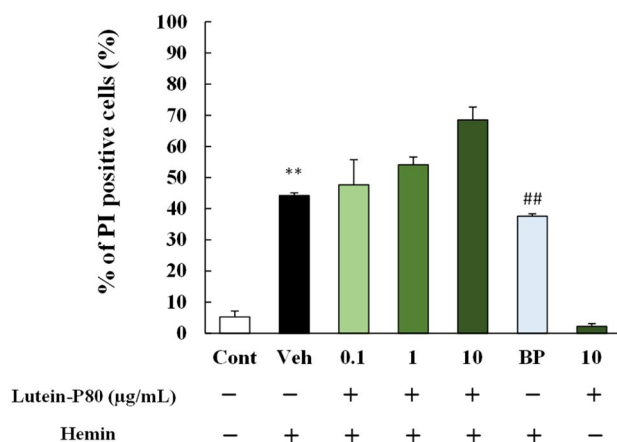


図 10. ヘミン誘発細胞障害に対するルテインの作用

Data are shown as mean \pm S.E.M. (n=6). ** $P < 0.01$ (Control group vs Vehicle group) (Student's t-test). ## $P < 0.01$ (Vehicle group vs BP group) (Student's t-test). BP; 2,2'-bipyridyl.

本研究より、ルテインが光障害によって視細胞に誘導される酸化ストレス障害に対して保護作用を示すことが明らかになった。これらの試験成績は、ヒトを対象にした臨床研究を進めるための重要な基礎データと考える。今後、ルテインの抗酸化作用に関する分子メカニズムについて、プロテオミクス解析により、詳細な検討を行う予定である。

尚、ヘミン誘発網膜色素上皮細胞障害モデル確立に関する研究成果を論文として公表する準備を進めている。

ヒト網膜色素上皮細胞株 (ARPE-19) を 96 well プレートに 15,000 cells / well で播種し、4 日間培養した後ルテイン-P80 を前処置しヘミン (25 μ M) を添加した。ヘミン添加 24 時間後に Hoechst & PI 染色により死細胞率を算出した。結果、ルテイン-P80 はヘミン誘発細胞障害に対して保護作用を示さなかった。一方、陽性対照薬である 2,2'-bipyridyl は細胞障害を抑制した。(図 10)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Kaidzu S, Okuno T, Tanito M, Ohira A.	4. 巻 23(1)
2. 論文標題 Structural and Functional Change in Albino Rat Retina Induced by Various Visible Light Wavelengths.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23010309.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamano N, Kunisada M, Kaidzu S, Sugihara K, Nishiaki-Sawada A, Ohashi H, Yoshioka A, Igarashi T, Ohira A, Tanito M, Nishigori C	4. 巻 96
2. 論文標題 Long-term effects of 222 nm ultraviolet radiation C sterilizing lamps on mice susceptible to ultraviolet radiation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Photochem Photobiol	6. 最初と最後の頁 853-862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/php.13269	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 大平 明弘	4. 巻 Vol 72 No. 4
2. 論文標題 病気とくすり2020 基礎と実践 Expert's Guide A 眼疾患 黄斑症・網膜症 (加齢・糖尿病)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 薬局 増刊号	6. 最初と最後の頁 1068-1076
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 大平明弘	4. 巻 -
2. 論文標題 D. 紫外線・可視光線の眼に対する生物作用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床光皮膚科学	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takai Y, Tanito M, Sugihara K, Ohira A	4. 巻 Jun 2
2. 論文標題 The Role of Single-Layered Flap in Temporal Inverted Internal Limiting Membrane Flap Technique for Macular Holes: Pros and Cons.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 5737083
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/5737083.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Imamachi K, Stefanson E, Ohira A, Tanito M	4. 巻 97(8)
2. 論文標題 Treatment of non-infectious ophthalmic inflammatory diseases with 1.5% dexamethasone - cyclodextrin nanoparticle eye drops.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Ophthalmol.	6. 最初と最後の頁 824-827
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/aos.14119.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Koyama Y, Kaidzu S, Kim YC, Matsuoka Y, Ishihara T, Ohira A, Tanito M	4. 巻 8(4)
2. 論文標題 Suppression of Light-Induced Retinal Degeneration by Quercetin via the AP-1 Pathway in Rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antioxidants (Basel)	6. 最初と最後の頁 79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox8040079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 大平明弘	4. 巻 71(4)
2. 論文標題 12. 眼の病気とくすり 黄斑症・網膜症 (加齢・糖尿病)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 『薬局』 病気とくすり2020 基礎と実践 Expert's Guide	6. 最初と最後の頁 1052-1060
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大平明弘	4. 巻 33(1)
2. 論文標題 酸化ストレスに関連する網膜疾患	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 眼薬理	6. 最初と最後の頁 5-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuo M, Kuse Y, Takahashi K, Kuwahara K, Tanito M, Kaidzu S, Shimazawa M, Hara H, Ohira A	4. 巻 139(2)
2. 論文標題 Carteolol hydrochloride reduces visible light-induced retinal damage in vivo and BSO/glutamate-induced oxidative stress in vitro.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci.	6. 最初と最後の頁 84-90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2018.11.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishihara T, Kaidzu S, Kimura H, Koyama Y, Matsuoka Y, Ohira A	4. 巻 10(5)
2. 論文標題 Protective Effect of Highly Polymeric A-Type Proanthocyanidins from Seed Shells of Japanese Horse Chestnut (<i>Aesculus turbinata</i> BLUME) against Light-Induced Oxidative Damage in Rat Retina	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu10050593.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanito M, Sano I, Okuno T, Ishiba Y, Ohira A	4. 巻 1074
2. 論文標題 Estimations of Retinal Blue-Light Irradiance Values and Melatonin Suppression Indices Through Clear and Yellow-Tinted Intraocular Lenses.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol.	6. 最初と最後の頁 53-60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-319-75402-4_7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大平明弘
2. 発表標題 網膜とチオレドキシン
3. 学会等名 第2回 バイオストレス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大平明弘
2. 発表標題 糖尿病黄斑浮腫の最新治療
3. 学会等名 第56回山口県内科医会学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大平明弘
2. 発表標題 酸化ストレスと生体防御因子
3. 学会等名 第38回日本眼薬理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大平明弘
2. 発表標題 インテリジェント・ホスピタルの要は中材業務が担う いつ内科医は眼科へ送るべきか？
3. 学会等名 第15回首都圏滅菌管理研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大平明弘
2. 発表標題 New therapeutic strategies for diabetic macular edema (DME): Non-invasive treatment to replace vitreous injection
3. 学会等名 山東省第23回眼科学会(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	海津 幸子 (KAIZU Sachiko) (00325052)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教 (15201)	削除：2019年7月24日
研究分担者	和田 孝一郎 (WADA Koichiro) (90263467)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授 (15201)	
研究分担者	原 英彰 (HARA Hideaki) (20381717)	岐阜薬科大学・薬学部・教授 (23701)	追加：2019年7月24日
研究分担者	北岡 隆 (KITAOKA Takashi) (80234235)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授 (17301)	追加：2020年5月14日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------