

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791827

研究課題名(和文) 抗炎症・抗酸化作用による正常眼圧緑内障モデル動物の網膜神経節細胞死抑制

研究課題名(英文) Retinal ganglion cell protection in normal tension glaucoma model mice by anti-oxidant and anti-inflammatory carotenoid.

研究代表者

新田 卓也(Nitta, Takuya)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：90507576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：目的：アスタキサンチンによる網膜神経節細胞(RGC)保護効果を調べるために、正常眼圧モデル動物であるGLASTノックアウトマウスに、アスタキサンチンを経口投与し、網膜神経節細胞死の抑制効果を調べた。アスタキサンチンは用量依存性にRGCの保護作用を示し、投与されたマウス網膜において酸化ストレスのマーカである4-hydroxy-2-nonenal(HNE)の減少がみられた。しかしNF- κ Bの抑制はみられず、抗炎症作用についてはみられなかった。アスタキサンチンは緑内障の有力な治療薬の候補であり、その神経保護作用は抗酸化作用によって生じていることが、今回明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Purpose: To investigate the cytoprotective effect of astaxanthin (ASX) on retinal ganglion cell (RGC) degeneration using a normal tension glaucoma (NTG) mouse model which lacks glutamate/aspartate transporter (GLAST) in Muller cells. Methods: Three-week old GLAST \pm mice were given intraperitoneal injection of ASX (60, 30, and 10 mg/kg/day, respectively) or vehicle alone, and the wide type (WT) mice were given vehicle alone for 14 days, respectively. At the 5th week, the number of RGC 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in retinas was analyzed with Western blotting, and NF- κ B was measured using an EIA assay kit. Results and Conclusion: The number of RGC of GLAST \pm mice significantly decreased, as compared to that of WT mice. However, RGC loss was suppressed by administration of ASX at a dose dependent manner. Following ASX administration, HNE was significantly down-regulated, but NF- κ B was steady. Our data suggest that ASX may be applicable for NTG as a promising therapeutics.

研究分野：眼科学

キーワード：神経保護 網膜神経節細胞 緑内障 抗酸化物質 海産物

1. 研究開始当初の背景

緑内障では、網膜神経節細胞が何らかの原因によりアポトーシスを起こすことで、慢性進行性の視神経障害が引き起こされる。アスタキサンチン (ASX) は生体を傷害せずに熱ショック蛋白質を誘導して、神経保護作用を持つ。

2. 研究の目的

ASX による新たな緑内障に対する神経保護治療の可能性を検討する。

3. 研究の方法

正常眼圧緑内障モデル動物であるグルタミン酸トランスポーター (GLAST) の機能異常を持つ遺伝子欠損マウスを用いて、アスタキサンチン (ASX) の網膜神経節細胞のアポトーシス抑制効果を調べる。

(1) ASX の用量依存性を検討

3 週齢の GLAST^{+/-}-マウスを使用

GGA 投与群とコントロール群に分ける

コントロール群 : 0.1%DMSO in PBS

ASX 投与群 : ASX (10, 30, 60mg/Kg/day)

投与方法と期間 : 生後 3 週目から 5 週目まで連日腹腔内投与

評価項目 : 網膜神経節細胞数

網膜神経節細胞数は一方の鋸状縁から反対側の鋸状縁までの間の組織標本に含まれる神経節細胞をカウントして評価。

上丘から蛍光色素を注入して神経節細胞を逆行性に標識し、網膜フラットマウント標本を作製して評価。

(2) AST の網膜での作用機序を確認するため、酸化ストレスのマーカーである 4-hydroxynonenal (4-HNE) を測定。

(3) AST の網膜での抗炎症作用を確認するため、NF κ B の核内移行を評価。

4. 研究成果

(1) GLAST ノックアウトマウスにおいて AST は用量依存性に網膜神経節細胞死を抑制した。

図 1. ASX 投与後の網膜組織切片

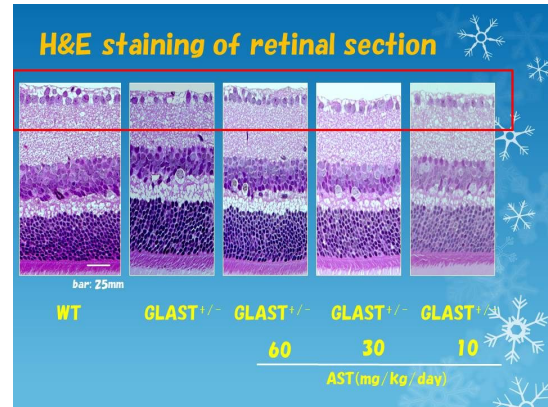


図 2. ASX 投与後の網膜神経節細胞数

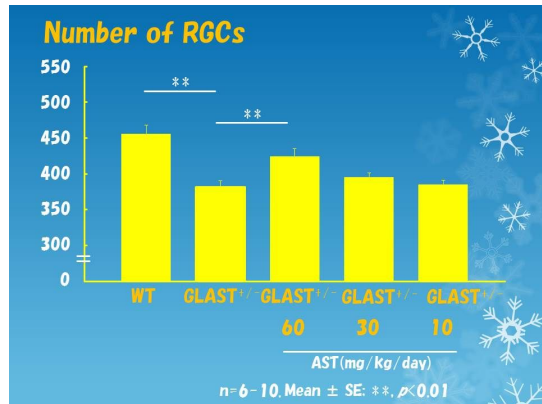


図 3. 網膜神経節細胞の逆行性染色

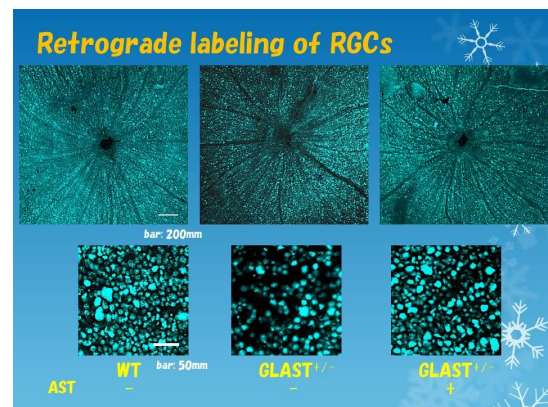
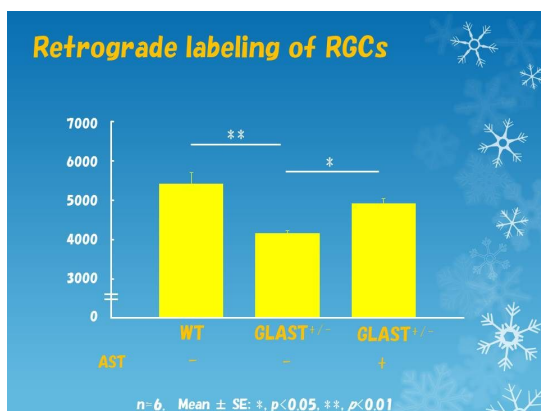
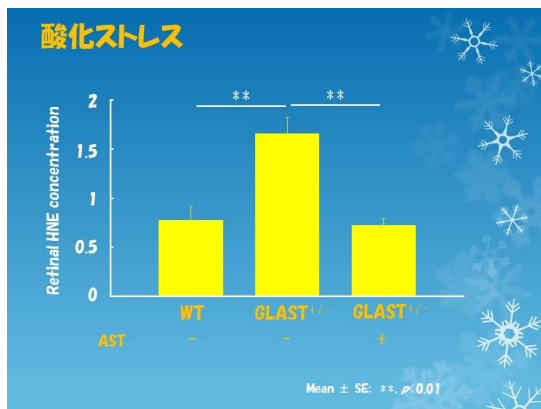


図 4. 逆行性染色によってカウントされた網膜神経節細胞数



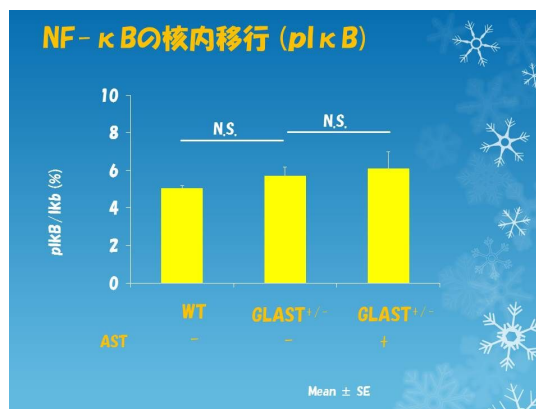
(1) 以上の結果により、網膜組織切片においても、フラットマウントによる逆行性染色による評価においても ASX 投与が網膜神経節細胞死を抑制することが明らかとなった。

図 5. 酸化ストレス



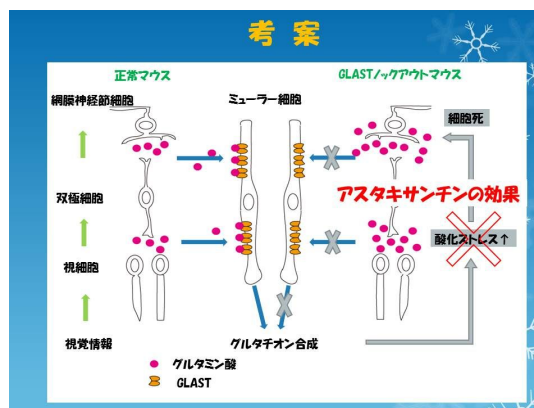
(2) ASX の投与により、GLAST ノックアウトマウス網膜の酸化ストレスが軽減されている。

図 6. NF-κB の核内移行



(3) GLAST ノックアウトマウスの網膜では炎症反応がみられず、網膜神経節細胞死が起きており、この点が網膜急性障害モデルと異なる点である。ASX の投与は NF-κB の核内移行に影響を与えない。

図 7. ASX による網膜神経節細胞死抑制のメカニズム



(4) グルタミン酸は、本来視覚情報の神経伝達物質として働くが、GLAST ノックアウトマウスではミュラー細胞のグルタミン酸の取り込みが低下しているため、細胞外のグルタミン酸濃度の上昇とともに、グルタミン酸の取り込み阻害により、抗酸化物質であるグルタチオンの合成が阻害されて酸化ストレスが亢進する。その結果、網膜神経節細胞

死が生じるが、アスタキサンチンの抗酸化作用は、この酸化ストレスを消去することで、網膜神経節細胞死を抑制すると考えられる。

北海道大学・大学院医学研究科・
客員研究員
研究者番号：90507576

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〕

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：

6．研究組織

(1)研究代表者

新田 卓也 (NITTA Takuya)