

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20283

研究課題名(和文)加齢黄斑変性の前駆変化である細胞間接着破綻に対するルテインによる回復機構

研究課題名(英文)Protective effects of lutein in tight junction disruption that promotes progression of age-related macular degeneration

研究代表者

成松 俊雄(Narimatsu, Toshio)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：00570350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：光照射により破たんした網膜色素上皮のタイトジャンクションは、徐々に自然回復したがルテイン投与は組織内ROSの蓄積を抑制し回復を促進した。組織内ではルテイン投与により、光照射後の抗酸化酵素SOD1およびSOD2のmRNA発現亢進が延長され、SOD活性の上昇も得られた。また、光照射による組織内炎症性サイトカインMCP-1 mRNAの発現亢進はルテインにより抑制された。これはARPE19細胞株にルテインを作用させたときにも再現された。ルテインは光暴露により破たんした細胞間接着を、スカベンジャーとしての機構のみならず抗酸化酵素誘導の機構を通して酸化ストレスを軽減することで修復を促進すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Photo-induced disruption of tight junction in the retinal pigment epithelium was recovered only slowly. However, lutein administration reduced tissue ROS levels and promoted the recovery. Lutein prolonged photo-induced mRNAs of antioxidative enzymes, SOD1 and SOD2, and SOD activity. Tissue mRNA levels of a photo-induced inflammatory cytokine, MCP-1, was suppressed by lutein. Similar effect was observed in ARPE19 cell line. Lutein promoted recovery of disrupted tight junction reducing oxidative stress most likely by both scavenging ROS and inducing antioxidative enzymes.

研究分野：網膜

キーワード：網膜 加齢黄斑変性 抗酸化酵素 タイトジャンクション ルテイン

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration; AMD) は、先進国における主要な失明原因の 1 つであり (米国では第 1 位、日本では第 4 位)、加齢とともに増加することから、現代の高齢化社会においては、加齢黄斑変性による視力障害は社会的な問題と言える。両眼に発症することもあり、患者自身の社会活動が妨げられるだけでなく、介護者の負担増加も考えられる。加齢黄斑変性の中でも新生血管を伴う滲出型については治療薬として抗血管内皮増殖因子製剤 (anti-vascular endothelial growth factor drugs; anti-VEGF drugs) が開発されたが、治療をしても視機能の回復には限度があり、後遺症が残り得ることから、最近では発症・進行の予防への関心が高まっている。

滲出型加齢黄斑変性は、加齢に伴う網膜色素上皮 (RPE) での酸化ストレスが原因で、最終的に網膜色素上皮に隣接する組織であり血管豊富な組織である脈絡膜からの新生血管 (choroidal neovascularization: CNV) が誘導されると発症する。すなわち酸化ストレスにより網膜色素上皮から炎症性サイトカインの分泌が亢進すると、マクロファージ浸潤が促進され、脈絡膜新生血管が誘導される。その脈絡膜新生血管が網膜色素上皮のバリア破綻部位を通過して網膜下へと進展すると、視力は著しく低下する。萎縮型加齢黄斑変性についても同様な酸化ストレスがもとで網膜及び脈絡膜の変性が生じ、著しい視機能低下が引き起こされることが知られる。萎縮型に対しては現時点で治療法はない。

加齢黄斑変性の発症・進行予防にはルテインを含む抗酸化サプリメントが有効であることが、米国の大型臨床試験 (Age-related Eye Disease Study; AREDS2) で示された (AREDS2 Research Group JAMA Ophthalmol 2014)。これを受けて、日本眼科学会でも公式に加齢黄斑変性の治療および予防ガイドラインの一部としてサプリメント摂取を推奨している (日本眼科学会会誌 116 巻 12 号)。ただし、AREDS2 は、それまでの食餌調査でルテイン

摂取の多いヒトでは加齢黄斑変性発症が少ないという疫学的結果を元に計画・実行されたが、その分子メカニズムははっきりしていない。予防治療は元来、よくなるためというより、変化させない (悪化しない) ことを目的に長期間継続する必要がある。継続のモチベーションのためには、その摂取の意義を確信する必要がある。しかし、ルテインが神経網膜の酸化ストレスを抑制することは、申請者の研究室で示されているものの (Sasaki, Ozawa et al. Investigative Ophthalmol Vis Sci 2009 および Diabetologia 2010)、網膜色素上皮での効果は、よくわかっていなかった。ルテインの効果の分子メカニズムの解析が必要とされていた。

加齢黄斑変性の原因となる酸化ストレスの誘因としては、光暴露がある (AREDS Research Group Ophthalmology 2000)。申請者はこれまでの大学院時代の研究テーマとして、加齢黄斑変性のリスクとなる光暴露時の網膜色素上皮の病的変化を研究してきた (Narimatsu Ozawa et al. Invest Ophthalmol Vis Sci 2013)。その中で、マウスを光に暴露させると、網膜色素上皮で酸化ストレスが蓄積し、Rho/ROCK シグナルが活性化して、tight junction 等の細胞間接着が破綻するとともに IL-6、CCL-2、MCP-1 等の炎症性サイトカインの発現が異常亢進して、マクロファージの遊走が促進することを示した。培養上皮細胞間接着の破綻に過酸化水素による酸化ストレスが関与していることは既報がある (Inumaru, Saya et al. Genes to Cells 2009)。しかし、加齢黄斑変性発症・進行に関連する光暴露により生体網膜色素上皮で生じる変化としては申請者らの報告が初めてであった。

2. 研究の目的

国内失明原因の第 4 位を占める加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration; AMD) は、光暴露等の酸化ストレスの影響で、網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium; RPE) に病的変化を生じ、発症する疾患である。大型臨床試験の結果を受けて、加齢黄斑変性発症・進行予防のためにはルテインを含む抗酸化サプリメントを

摂取することが、日本眼科学会の治療ガイドラインで推奨されているが、その効果の分子メカニズムはほとんどわかっていない。本研究では光暴露による酸化ストレスが網膜色素上皮に及ぼす加齢黄斑変性関連病的变化を、ルテイン摂取が抑制する効果を分子レベルで解析する。そのためにマウスモデルと培養細胞株を用いて解析した。

3 . 研究の方法

申請者の研究室から報告した上述の Narimatsu らの方法(Narimatsu, Ozawa et al. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013)で光暴露による網膜色素上皮の病的変化モデルを作成し、ルテインを投与することでその変化を抑制可能であるかを分子レベルで解析した。

具体的には、まず 7 週齢の BALB/c マウスを 12 時間の暗順応の後に点眼剤を用いて散瞳し、2000 ルクスの白色光に 3 時間暴露した。そして、12 時間後にルテイン 100 mg/kg body weight を腹腔内注射により 1 回投与した。比較対象のために別のマウスには、光照射 12 時間後にルテインの溶媒である DMSO を同量投与した。

ルテインが活性酸素種の蓄積を抑制するかどうかについては、網膜色素上皮-脈絡膜複合体サンプル内の活性酸素種を、DCFH-DA に反応させて測定した。この方法は成松の既報(Narimatsu, Ozawa et al. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013)に基づいたものである。

tight junction 等の細胞間接着の破綻については、成松の既報(Narimatsu, Ozawa et al. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013)に基づき、網膜色素上皮が上面に現れるように作成したフラットマウントサンプルを準備し、tight junction マーカーである ZO-1 などの抗体を用いて染色し観察した。そして、すべての細胞膜面に染色が見られる網膜色素上皮細胞の数をカウントして、すべての網膜色素上皮細胞の中で tight junction が破綻していない細胞の割合を解析した。

ルテインが炎症性サイトカイン誘導を抑

制できるかどうかについては、各群の網膜色素上皮-脈絡膜複合体サンプル内を採取して、リアルタイム RT-PCR を行った。マクロファージの遊走を促進する MCP-1 およびマクロファージマーカーの F4/80 を解析した。

また、その際の抗酸化効果の分子メカニズムを抗酸化酵素に着目して明らかにした。上述の各群の網膜色素上皮-脈絡膜複合体サンプルにおける抗酸化酵素 superoxide dismutase 1 および superoxide dismutase 2 のリアルタイム RT-PCR を行った。さらに、各群の網膜色素上皮-脈絡膜複合体サンプル内の superoxide dismutase 活性を、専用キットを用いて解析した。

一方、生体内の MCP-1 発現変動の結果が、ルテインの網膜色素上皮への作用によるものかどうかを確認するために、網膜色素上皮の培養細胞株 ARPE19 を用いて、ルテインの細胞に対する直接的作用についても解析した。その方法は研究室の Miyake らの方法 (Miyake Ozawa et al. Biochemical and biophysical research communications 2014)に基づいて行った。培養細胞にルテインを各濃度(25 および 50 マイクロ M)で作用させ、サンプルにおけるリアルタイム RT-PCR により解析した。

このように、組織学的手法に加え、各分子に対するリアルタイム PCR、蛍光色素を用いた ROS 測定、酵素活性測定等により証明した。

4 . 研究成果

光照射により破たんした tight junction は、時間がたつと徐々に自然回復したが、その途中である 12 時間後にルテインを投与すると、回復が促進された。これは光照射から 48 時間経過した時点の ZO-1 陽性細胞の全細胞に対する割合を比較することで明らかにされた。ルテインを投与した群の割合は、対照である光照射を行ったがルテインを投与していない群に比べると明らかに大きかった。

また、光照射後 24 時間後の網膜色素上皮-

脈絡膜複合体サンプル内の活性酸素種をDCFH-DAを用いて計測したところ、12時間後にルテインを投与した群では明らかにその蓄積が少ないことが明らかにされた。すなわちルテイン投与が光照射後の活性酸素種の蓄積を抑制することが明らかにされた。

網膜色素上皮-脈絡膜複合体サンプル内のSuperoxide dismutase 1及び2のmRNAレベルは、経時的に解析された。その結果、いずれのmRNAもルテインを投与しなくても光照射後18時間には上昇していたが、ルテインを投与しないとこの変化は48時間後には既に終わっており、通常レベルに戻っていた。しかし、ルテインを投与した群では、48時間後でもまだ、発現上昇が続いていた。ルテインがこれらの分子の発現上昇に貢献したと考えられた。この結果は、研究室のMiyakeら(Miyake Ozawa et al. Biochemical and biophysical research communications 2014)が示した、神経細胞株にルテインを投与することでこれらの酵素のmRNAが誘導されるという結果と矛盾しなかった。

また、網膜色素上皮-脈絡膜複合体サンプル内のSOD活性も、光照射により誘導されたが、そのレベルはルテインを投与された群ではより高かった。このメカニズムは現時点では不明であるが、ルテインがmRNAの発現のみならず機能型の抗酸化酵素発現の亢進を促進したと考えられた。

また、網膜色素上皮-脈絡膜複合体サンプル内の炎症性サイトカインMCP-1のmRNAの光照射による発現亢進もルテインにより抑制された。そして、MCP-1はマクロファージの浸潤を促進することが知られるが、マクロファージマーカーであるF4/80の光照射による増加も、ルテイン投与が抑制するという結果を得た。ルテインは光照射による網膜色素上皮-脈絡膜内の炎症を抑制したと言えた。加齢黄斑変性においては、この局所の炎症を抑えることが疾患の発症抑制につながると考えられていることから、ヒトにおけるルテインの効果の一端を示したと考えられる。

さらに行った網膜色素上皮細胞株である

ARPE19を用いた培養では、MCP-1 mRNAの発現制御が、ルテインを細胞に直接作用させたときにも再現された。すなわち、ルテインはdose dependentにMCP-1 mRNAの発現を抑制した。生体内の網膜色素上皮-脈絡膜複合体サンプルでは、網膜色素上皮細胞以外にもさまざまな細胞が混在しており、ルテインがどの細胞に作用し得たかは不明であった。これに対し、本実験結果からは、ルテインが網膜色素上皮細胞におけるMCP-1 mRNAの発現を促進しうることが示されたと考えられた。網膜色素上皮は加齢黄斑変性の病態の中心にあり、マクロファージ浸潤は病態の最も重要な要素であると言われていることから、ルテインが網膜色素上皮に直接作用しうるという結果は、ヒトにおけるルテインの効果を支える重要なデータであると考えられた。

このように動物モデルおよび細胞を用いた研究により、ルテインは光暴露により破たんした細胞間接着を、スカベンジャーとしての機構のみならず抗酸化酵素誘導の機構を通して酸化ストレスを軽減することで修復を促進するということが明らかとなった。また、ルテインは、光暴露という刺激により引き起こされる炎症性サイトカインの発現とそれによるマクロファージ浸潤を抑制した。そしてルテインは少なくとも網膜色素上皮細胞に直接作用しうることが示された。

本研究では光暴露による酸化ストレスが網膜色素上皮に及ぼす加齢黄斑変性関連病的变化を、ルテイン摂取が抑制する効果が、マウスモデルと細胞株を用いて分子レベルで示された。また、ルテインは光暴露の後で投与されたにもかかわらず効果を持っていた。現在、日本眼科学会をはじめとした各国のガイドラインでは、ルテインを含むサプリメントは発症前ではあるが前駆病変の人に対して推奨されている。これらの人はすでに酸化ストレスが蓄積され始めていると考えられるため、この研究の意義はその点でも大きいと言えた。

このように、ヒトにおけるルテインの効果のメカニズムの一端が示されたと考えられた。

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 1件)

Lutein acts via multiple antioxidant pathways in the photo-stressed retina.

Kamoshita M, Toda E, Osada H, Narimatsu T, Kobayashi S, Tsubota K, Ozawa Y.

Sci Rep. 査読有 2016 Jul 22;6:30226. doi: 10.1038/srep30226.

[学会発表](計 1件)

第 19 回眼科分子生物学研究会 十八楼(岐阜県岐阜市) 2015/2/28-3/1

鴨下衛、長田秀斗、成松俊雄、栗原俊英、永井紀博、坪田一男、小沢洋子. 光障害モデルにおける RPE タイトジャンクション破綻に対するルテインの保護効果.

[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:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://ophthal.med.keio.ac.jp/research/rcb.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

成松敏雄(NARIMATSU Toshio)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号:

00570350

(2)研究分担者

該当なし ()

研究者番号:

(3)連携研究者

該当なし

()

研究者番号:

(4)研究協力者

該当なし

()