

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11328

研究課題名(和文) 抗酸化剤・抗ストレス剤を用いた白内障の抑制

研究課題名(英文) Suppression of cataract by antioxidant and antistress agent

研究代表者

橋爪 公平 (Hashizume, Kouhei)

岩手医科大学・医学部・特任准教授

研究者番号：50407095

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)：ステロイド誘発鶏胚白内障モデルは、放卵後15日齢の受精卵にヒドロコルチゾン投与することにより生じる白内障モデルである。このモデルを用いて、緑茶ポリフェノールとピクノジェノールの2つのポリフェノールが抗酸化作用によって水晶体混濁を抑制することを確認した。ただし両者ともに、ヒドロコルチゾン投与後3時間、10時間、20時間後に投与する3回投与で水晶体混濁の抑制効果があったが、ヒドロコルチゾン投与の3時間前の単回投与では有意な水晶体混濁の抑制効果は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では日本人に馴染みのある緑茶由来のポリフェノール、サプリメントにも用いられるフランス産松皮由来のピクノジェノールを用いて、白内障の抑制を確認することができた。このことにより、白内障の予防、白内障進行の抑制目的で、2つのポリフェノールが薬剤やサプリメントとして、あるいは取り入れるべき生活習慣となり得る可能性が示唆された。白内障は加齢によって誰にでも生じる疾患であるが、本研究がその予防に貢献することによって、健やかな老後の生活、医療費や介護費用の抑制につながる。白内障になる機序として酸化ストレスが考えられているが、本研究はそれを強く支持する研究となる。

研究成果の概要(英文)：The steroid-induced chicken embryo cataract model is a cataract model to occur by a fertilized egg of the instar being given hydrocortisone after spawning on 15th. Using this model, we confirmed that green tea polyphenol and two polyphenol of Pycnogenol inhibited lenticular opacities by an antioxidant action. However, there was depression effect of the lenticular opacities by the three times administration that both gave after hydrocortisone administration together 20 hours later for ten hours for three hours, but the depression effect of the lenticular opacities that was significant by the single dose three hours before the hydrocortisone administration was not obtained.

研究分野：眼科学

キーワード：白内障 加齢性眼疾患 酸化ストレス 抗酸化 ポリフェノール ステロイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴って出現するいわゆる加齢性眼疾患は、眼科領域で最も頻度の高い疾患である。加齢性眼疾患には、加齢黄斑変性、緑内障、白内障などが含まれるが、これらは高齢者の視機能を低下させ生活の質(QOL)の低下を招き、経済的に大きな損失となる。特にこれから高齢化社会を迎える我が国においては加齢性眼疾患の克服が大きな経済効果をもたらすことに疑いの余地がない。なかでも白内障は最も罹患率が高く、最も患者数の多い加齢性眼疾患である。白内障は60歳以上の70%、70歳以上の90%、80歳以上のほぼ100%の人で視力障害をきたし、世界での失明原因の第一位を占める。先進国では水晶体の混濁を超音波で破碎しながら吸引し、代わりに人工の眼内レンズを挿入する外科的治療によって視力改善を得ることができるが、発展途上国では手術を受けることができずに失明に至る人口も多く、未だに世界の失明原因の第一位となっている。

これまでの疫学研究によって紫外線への暴露、喫煙、ビタミンCやビタミンEの摂取不十分、血中の低カロテン濃度が白内障発症の危険因子であることが明らかとなり、このことから白内障の形成に酸化ストレスが関与することが示唆されている

白内障形成に対する酸化ストレスの関与を裏付ける研究として、我々はビタミンCノックアウトマウスに対して紫外線負荷実験を行った。ビタミンCの生成に必要なSMP30をノックアウトされたマウスを生後1か月で離乳し、ビタミンCを十分に与える群(ビタミンC投与群)と、壞血病を発症しない必要最低限のビタミンCのみの群(ビタミンC欠乏群)の2群に分け飼育を行った。また野生型マウスを通常の条件下で飼育した。この3群に対して16週齢で紫外線負荷実験を開始した。照射は片眼にミドリンP散瞳下でUVB(波長302nm、2mW/cm²)を100秒×6回行い、最終照射の48時間後に眼球を摘出し組織学的検討を行った。非照射の片眼をコントロールとした。その結果、ビタミンC欠乏群ではビタミンC投与群や野生型と比べて強い水晶体混濁(前囊下白内障)を生じた。白内障面積率で59.3% ± 10% vs. 32.2% ± 11.7% or 29.0% ± 9.0%; $P < 0.01$ であった。(左図は混濁面積率の比較を表す)このことから紫外線によって水晶体内に生じる酸化ストレスに対してビタミンCが保護的に働くことが示唆された。

さらに我々はステロイド誘発鶏胚白内障モデルに対して、代表的な抗酸化剤のひとつであるアスタキサンチンの投与実験を行った。鶏胚ステロイド白内障モデルの水晶体混濁はアスタキサンチンの投与により、量依存的に抑制された。また水晶体中の還元型グルタチオン量はアスタキサンチンの投与量に対し、量依存的に回復を示した。このことからステロイドによって鶏卵内および水晶体内に生じる酸化ストレスに対してアスタキサンチンが保護的に働くことが示唆された。

以上のことから、酸化ストレスが白内障を促進すること、また抗酸化剤が白内障抑制を目的とした薬剤やサプリメントの候補になる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、ステロイド誘発鶏胚白内障モデルを用いて、白内障抑制の可能性のある抗酸化作用あるいは抗ストレス作用を持つ薬剤を投与し、薬剤のスクリーニングを行い、白内障予防や進行抑制に有用な薬剤やサプリメントの特定をすることを目的とする。また本研究によりこれまで原因が不明であった白内障の病態を酸化ストレスという概念から解明し、新たな治療法の開発および治療法の選択を可能にし、視力予後改善に貢献すると考えられる。

3. 研究の方法

鶏胚ステロイド白内障モデルを用いた。ステロイド誘発鶏胚白内障モデルは、放卵後 15 日齢の受精卵に代表的なグルココルチコイドであるヒドロコルチゾン投与すると、20 時間後から水晶体核周辺帯に白色リングが出現し、48 時間以内に 90% 以上の水晶体核質部が白濁する (Nishigori H, Lee JW and Iwatsuru M: An animal model for cataract research: cataract formation in developing chick embryo by glucocorticoid. *Exp Eye Res* 36, 617-621, 1983.)。これまでの研究から、水晶体混濁はグルココルチコイドの水晶体局所での作用で生じるのではないこと (Nishigori H, Kosano H, Umeda IO, et al.: Inhibition of glucocorticoid-induced cataracts in chick embryos by RU486: a model for studies on the role of glucocorticoids in development. *Life Sci* 75, 3027-3033, 2004.) 肝における過酸化反応亢進により過酸化脂質の増加をきたすことが報告され、この過酸化脂質が血流や房水を經由して水晶体内に入り酸化ストレスとなり水晶体の抗酸化能を超えると水晶体混濁が生じることがその機序と考えられている (Lee JW, Iwatsuru M and Nishigori H: Alteration of activities of hepatic antioxidant defence enzymes in developing chick embryos after glucocorticoid administration--a factor to produce some adverse effects? *J Pharm Pharmacol* 50, 655-660, 1998.)。従って、このステロイド誘発鶏胚白内障モデルは、抗酸化作用を持つ薬剤のスクリーニングとして有用なモデルであるとともに、その作成や薬剤投与が簡便な優れた実験モデルとされている。

具体的には放卵後の受精卵を 37℃、湿度 68% で孵置し、15 日齢で受精鶏卵気室部にヒドロコルチゾン 0.50 nmol/egg を投与することにより、鶏胚ステロイド白内障モデルを作成する。薬剤の投与は、半減期が短いものでは、ヒドロコルチゾン投与後 3 時間後、10 時間後、20 時間後に行い、ヒドロコルチゾン投与後 48 時間後に解剖を行う。また予防投与実験では、ヒドロコルチゾン投与 3 時間前に薬剤投与を行う。ヒドロコルチゾン投与してから 48 時間後に鶏卵から鶏胚を摘出し、角膜輪部に切開を加え水晶体を摘出し、摘出水晶体の混濁の程度を 1~5 にスコア化し評価する (スコア 1 を混濁なし、スコア 3 は核周囲帯の白色リング、スコア 5 は核部の中心まで白濁とし、核周囲帯のわずかな白色リングをスコア 2、核部の中心に白濁が及んでいない核部の混濁をスコア 4 とする) また摘出水晶体のチオール活性を測定することによって、水晶体中の還元型グルタチオン量を求めることができる。

本研究では緑茶ポリフェノールとピクノジェノールの 2 つのポリフェノールを用いて、このモデルでの水晶体混濁を抑制するか調べた。茶の渋味の成分はタンニンと総称されるが、タンニンは分子中に多数のフェノール性水酸基をもち、これを総称して緑茶ポリフェノール(GTP) と呼び、以前から健康維持のための摂取が推奨されている。ピクノジェノールはフランス産の松皮に含まれるポリフェノールの強い酸化作用があり、最近ではサプリメントに用いられている。

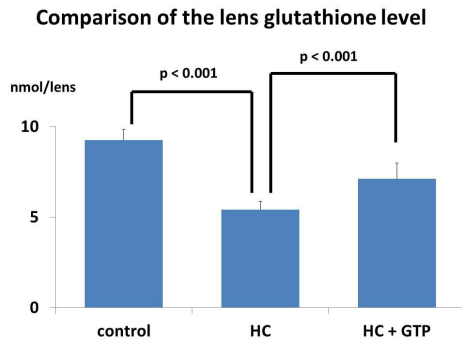
4. 研究成果

緑茶ポリフェノールとピクノジェノールの 2 つのポリフェノールが抗酸化作用によって水晶体混濁を抑制することを確認した。緑茶ポリフェノールの水晶体混濁抑制効果は表の通りで、また水晶体中の還元型グルタチオン量はグラフの通りであった。またピクノジェノールにおいても同様の結果であった。これらのポリフェノールは白内障防止や進行抑制

	I	II	III	IV	V
Non-HC (n=20)	20/20 (100%)	0/20 (0%)	0/20 (0%)	0/20 (0%)	0/20 (0%)
HC-alone (n=20)	2/20 (10%)	1/20 (5%)	2/20 (10%)	9/20 (45%)	6/20 (30%)
HC+GTP (n=19)	13/19 (68%)	4/19 (21%)	2/19 (11%)	0/19 (0%)	0/20 (0%)

体混濁を抑制することを確認した。緑茶ポリフェノールの水晶体混濁抑制効果は表の通りで、また水晶体中の還元型グルタチオン量はグラフの通りであった。またピクノジェノールにおいても同様の結果であった。これらのポリフェノールは白内障防止や進行抑制

を目的とした薬剤やサプリメントの候補になる可能性が示された。



両者ともに、ヒドロコルチゾン投与後、3 時間、10 時間、20 時間の 3 回投与では、上記のような水晶体混濁抑制効果を示したが、ヒドロコルチゾン投与の 3 時間前だけの単回投与では有意な水晶体混濁の抑制効果は得られなかった。これらのポリフェノールによる水晶体混濁抑制のためには、比較的継続的な摂取が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 前田 可奈子, 橋爪 公平, 石川 清乃, 小笠原 聡, 奥野 孟, 清野 太郎, 西郡 秀夫, 三部 篤, 黒坂 大次郎	4. 巻 69
2. 論文標題 Effect of green tea polyphenols on glucocorticoid-induced cataract formation in chick embryo	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 岩手医学雑誌	6. 最初と最後の頁 265-272
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 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0件

〔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	黒坂 大次郎 (Kurosaka Daijiro) (20215099)	岩手医科大学・医学部・教授 (31201)	