

令和 4 年 10 月 26 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09425

研究課題名(和文) 網膜色素変性モデルに対する水素水飲用による視細胞保護効果

研究課題名(英文) Neuroprotection of photoreceptor by drinking hydrogen water on retinitis pigmentosa model

研究代表者

五十嵐 徹 (Igarashi, Toru)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30232151

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)：本研究では、本邦の失明原因2位の疾患であり有効な治療法のない網膜色素変性に対して、モデルマウスに対する水素水飲用により視細胞保護効果について検討した。網膜色素変性モデルである rd6マウスに対して、生後4週より水素水を飲用させた。高い水素濃度維持のため、新たな給水口の開発を行い本研究に用いた。網膜厚、視細胞数、視細胞特異的ロドプシン/オプシン陽性細胞数、網膜電図において有意に視細胞保護効果を認めた。水素水飲用は、rd6マウスにおいて視機能の低下を遅らせ、視細胞の保護効果を認めた。網膜色素変性の臨床的な治療に向けて応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、本邦の失明原因2位の疾患であり有効な治療法のない網膜色素変性に対して、モデルマウスに対する水素水飲用により視細胞保護効果について検討し、水素水飲用による視細胞保護効果を示した。今後、臨床的な治療に向けて応用が期待される。

本研究は、2022年、Scientific reportsにて報告を行った。(https://www.nature.com/articles/s41598-022-17903-8)

研究成果の概要(英文)：Retinitis pigmentosa (RP) is a genetically heterogeneous group of inherited retinal disorders involving the progressive dysfunction of photoreceptors and the retinal pigment epithelium, for which there is currently no treatment. The rd6 mouse is a natural model of autosomal recessive retinal degeneration. We hypothesized that ingestion of H2 water may delay the progression of photoreceptor death in rd6 mice. H2 mice showed significantly higher retinal thickness as compared to controls on optical coherence tomography. Histopathological and morphometric analyses revealed higher thickness of the outer nuclear layer for H2 mice than controls, as well as higher counts of opsin red/green-positive cells. Our results show that drinking water high in H2 (1.2-1.6 ppm) had neuroprotective effects and inhibited photoreceptor death in mice, and suggest the potential of H2 for the treatment of RP.

研究分野：神経分野

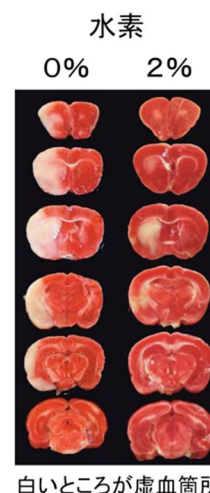
キーワード：網膜色素変性 水素 治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

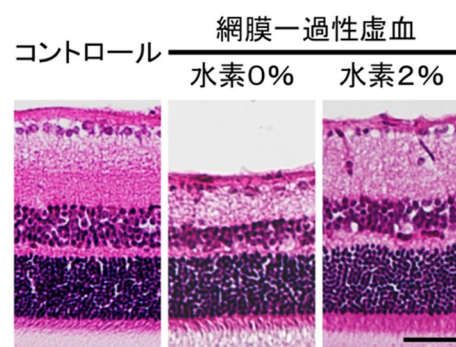
網膜色素変性(RP)とは長い年月をかけて網膜の視細胞が退行変性していき、主に進行性夜盲、視野狭窄、羞明を認める疾患群である。進行度合や症状には大きな個人差があり、成人中途失明原因2位で現在有効な治療法はない。遺伝性疾患であるが孤発例も多く見られる。本疾患の遺伝形式には常染色体優性遺伝、常染色体劣性遺伝、伴性劣性遺伝の3つのタイプがある。現在までに明らかになった原因遺伝子にはロドプシン、ペリフェリンなどあるが、これは網膜色素変性の原因遺伝子のごく一部にすぎず、50%以上の患者における原因遺伝子は同定されていない。現在、効果的な治療法はなく、遺伝子治療などが試されているが、原因遺伝子が数多く有り、同定されていないため遺伝型が不明な患者が多数いるため、網膜色素変性全般に効果的な新たな治療法の開発が望まれているところである。

近年、ヒドロキシラジカル(OH \cdot)などの活性酸素種が、網膜色素変性の視細胞死に重要な役割を担っていると数多く報告されている(Carmody et al., Cell Death Differ. 2000; Komeima et al., Free Radic Biol. 2008; Yu et al., Investig Ophthalmol Vis Sci. 2004, Yu et al., Exp Eye Res. 2005)。活性酸素種の中でもOH \cdot は最も強力な活性酸素種であり、無差別に核酸、脂質、蛋白質に反応し、細胞のアポトーシスを誘導している。網膜色素変性では、活性酸素種はNF-kBやAP-1などアポトーシス制御因子を介して視細胞死を惹起する(Shen et al., J cell Physiol. 2005)。従って、細胞傷害性の活性酸素種を無力化するような、抗酸化防御システムが重要であると考えられる。

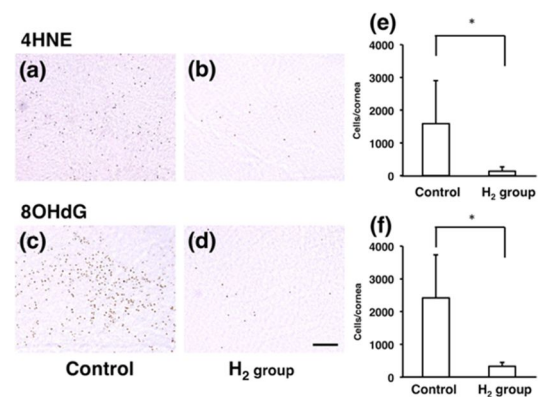


連携研究者の大澤らは、水素ガスが組織・細胞種を問わず自由に拡散してOH \cdot を選択的に還元する新しい概念の抗酸化物質であり、ラット脳の虚血再灌流モデルにおいてOH \cdot による酸化ストレス障害を抑制することを報告した(Ohsawa I, et al., Nat Med, 2007; 右図)。

これを受けて、我々はラット網膜の虚血再灌流障害モデルを用いて水素ガスを溶解した点眼液の効果を検討したところ、水素ガスは速やかに硝子体から網膜に到達して網膜厚の菲薄化を抑制した(Oharazawa H, et al., Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010; 右図)。現在日本医科大学付属病院薬物治験審査委員会の許可を得て、網膜動脈閉塞症に対する臨床研究を行っている。その他一連の実験から、水素ガスはOH \cdot のみを抑制しその他の生理的な活性酸素分子種を阻害しないことがわかっており、各種組織への安全性も確認されている。



OH・の観点から考えると、白内障手術でも OH・が生じる。すなわち、白内障手術において超音波を用いて水晶体の破碎を行うが、その際超音波より生じる OH・が角膜内皮障害を起こし、長時間超音波発振を必要とする進行性の白内障の場合、水疱性角膜症に至る。日本における角膜移植の最大の原因はこの白内障手術による水疱性角膜症である。我々は、OH・をトラップする水素ガスを眼内灌流液に溶解し、ウサギで実験を行ったところ、有意に角膜混濁を低下させ、酸化ストレスマーカーである 4HNE や 8OHdG を低下させることに成功した(Igarashi T, et al., Sci Rep. 2016 ; 右図)。



順天堂神経内科からの報告では、パーキンソン病患者に対し、48週水素水を飲用することで、Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS)にて有意に改善を示した(Yoritaka et al., Move Disord. 2013)。基礎実験の結果も含めると、中脳黒質のメラニン含有神経細胞で皮質過酸化物の産生を抑制していると考えられた。現在多施設での臨床研究が進行している(Yoritaka et al., BMC Neurol. 2016)。

以上より、活性酸素種が視細胞死に關与する網膜色素変性に対して、水素応用という着想に至り、網膜色素変性モデルマウスに対する水素水飲用による神経保護効果について研究を開始した。

2. 研究の目的

近年網膜色素変性の研究において、炎症や酸化ストレスによる報告が数多くされるようになってきた。そこで我々は、網膜色素変性モデルである rd6 マウスに対し、抗酸化作用を持つ水素水の飲用により視細胞の保護が可能か否か検討する。

3. 研究の方法

rd6 マウスに対し、4週齢より水素水を飲用させた。高い水素濃度維持のため、新たな給水口の開発を行い本研究に用いた。生後47週までERG及びOCTの経過観察を行い、生後49週にて眼球を摘出し病理学的検討、RNA sequencing (RNA-seq) を行った。水素水飲用群と通常の水を飲用させる群との比較検討を以下のように行った

(1) 光干渉断層撮影による網膜厚の計測 (OCT)

光干渉断層計 (OCT) を用いて網膜の断層像を撮影する。網膜色素変性では視細胞の死滅により網膜が徐々に菲薄化していくため、経時的に視細胞層厚の計測をおこなう。

(2) 電気生理学的解析 (ERG)

網膜電図 (ERG) とは、光刺激に伴って生ずる感覚網膜および網膜色素上皮の電気的活動を眼底の広い範囲から集めて得られる電位である。ERGにはいくつかの波形が存在し、主にa波は視細胞由来、b波はミュラー細胞由来の波形である。網膜色素変性では視細胞が消失するため、a波が徐々に減弱し、それに伴いb波も減弱していく。神経保護効果により波形の維持がなされているか経時的にERGを施行して検討する。

(3) 病理学的解析 (H&E 染色、免疫染色)

眼球を摘出し病理切片を作製する。切片を HE 染色後、視細胞層厚の比較検討を行う。また視細胞特異的のマーカ―や炎症系マーカ―の免疫染色を行い、比較検討する。

(4) 発現解析 (RNA-seq)

水素飲用群と非飲用群の神経網膜から RNA を抽出し、遺伝子発現について比較検討を行う。

4 . 研究成果

水素群において、OCT では 21 週以降有意に網膜外層厚の菲薄化を抑制し、ERG では 10 週以降有意に波形の低下を抑制した。病理学的には水素群において有意に網膜外層厚の菲薄化および視細胞数・ロドプシン/オプシン陽性細胞数の減少を抑制した。マクロファージ・マイクログリア細胞数は両群間の差を認めなかった。RNA-seq により得られたデータの pathway 解析では、水素群において有意に光情報伝達 (phototransduction) 遺伝子群の発現が上昇していた。

水素水飲用は、rd6 マウスにおいて視機能の低下を遅らせ、視細胞の保護効果を認めた。網膜色素変性の臨床的な治療に向けて応用が期待される。本研究は、2022 年、Scientific reports にて報告を行った。 (<https://www.nature.com/articles/s41598-022-17903-8>)

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 1件）

1. 著者名 Igarashi Tsutomu, Ohsawa Ikuroh, Kobayashi Maika, Miyazaki Kai, Igarashi Toru, Kameya Shuhei, Shiozawa Asaka Lee, Ikeda Yasuhiro, Miyagawa Yoshitaka, Sakai Mashito, Okada Takashi, Sakane Iwao, Takahashi Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Drinking hydrogen water improves photoreceptor structure and function in retinal degeneration 6 mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-17903-8	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 五十嵐勉、小林舞香、宮川世志幸、酒井真志人、高橋浩
2. 発表標題 網膜色素変性モデルマウスに対する水素水飲用による視細胞保護効果の検討
3. 学会等名 第 90 回日本医科大学医学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林 舞香, 五十嵐 勉, 大澤 郁郎, 宮崎 海, 五十嵐 徹, 亀谷 修平, 塩澤 朝香, 池田 康博, 宮川 世志幸, 酒井 真志人, 岡田 尚巳, 坂根 巖, 高橋 浩
2. 発表標題 網膜色素変性モデルマウスに対する水素水飲用による視細胞保護効果の検討
3. 学会等名 第11回 日本分子状水素医学生物学会
4. 発表年 2022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	高橋 浩 (Takahashi Hiroshi) (00188046)	日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授 (32666)	
研究分担者	五十嵐 勉 (Igarashi Tsutomu) (10421190)	日本医科大学・医学部・准教授 (32666)	
研究分担者	奥田 貴久 (Okuda Takahisa) (20620305)	日本医科大学・医学部・准教授 (32666)	

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