

機関番号：31201

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2008～2010

課題番号：20592057

研究課題名（和文）ビタミンCノックアウトマウスの眼科学的解析

研究課題名（英文）Ophthalmological analysis of vitamin C knockout mice

研究代表者

黒坂 大次郎 (KUROSAKA DAIJIRO)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：20215099

研究成果の概要（和文）：

(1) ビタミンCノックアウトマウス（SMP30ノックアウトマウス）は0.0375 g/Lの低濃度ビタミンC水投与下で水晶体中ビタミンCは野生型マウスの約3分の1に減少した。ビタミンCノックアウトマウスは1.5 g/Lの濃度のビタミンC水投与により水晶体ビタミンC濃度が野生型マウスと同等であった。従ってこれらの二つの濃度のビタミンC水投与によって、ビタミンCノックアウトマウスの水晶体中のビタミンCを欠乏状態、十分状態にすることができた。

(2) SMP30ノックアウトマウス（ビタミンC欠乏）はUVB負荷による水晶体混濁（前囊下白内障）が、SMP30ノックアウトマウス（ビタミンC十分投与）や野生型マウスと比べて有意に広がった。ビタミンCの欠乏がUVBによって惹起された酸化ストレスに対する水晶体の感受性を増加させたことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

(1) In vitamin C knockout mice (SMP30 knockout mice) given the 0.0375 g/L aqueous solution of vitamin C, the lens vitamin C level decreased to approximately 1/3 of that in wild type mice. In vitamin C knockout mice given the 1.5 g/L aqueous solution of vitamin C, the lens vitamin C level was similar to that in wild type mice. Thus, the 2 V vitamin C doses can be viewed as appropriate for achieving V vitamin C deficiency and sufficiency, respectively, in the vitamin C knockout mouse lens.

(2) In SMP30 knockout mice (vitamin C deficiency) group lens opacities induced by UVR-B were significantly more extensive than in SMP30 knockout mice (vitamin C sufficiency) group or in wild type mice group. It was suggested that vitamin C deficiency increases lens susceptibility to UVR-B induced oxidative stress in mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

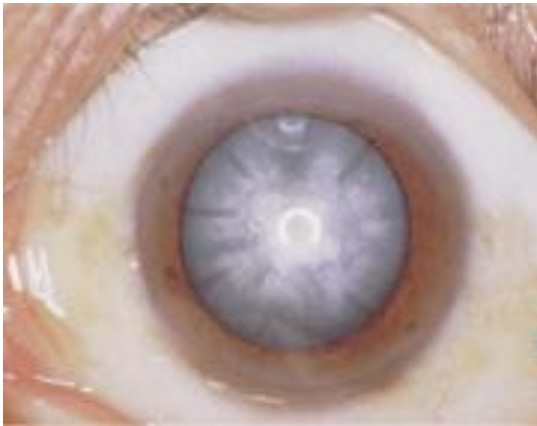
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：ビタミンC、ノックアウトマウス、加齢性眼疾患、酸化ストレス、白内障

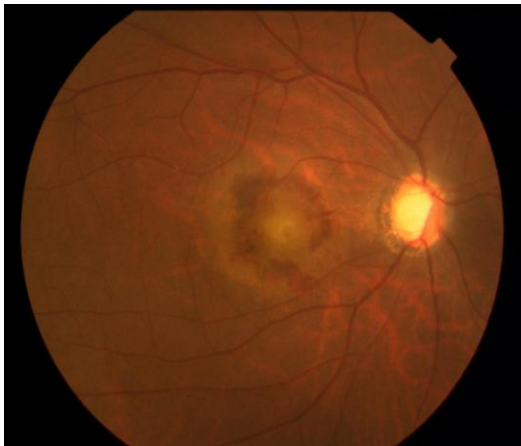
## 1. 研究開始当初の背景

加齢性眼疾患は眼科領域で最も頻度の高い疾患で白内障、緑内障、加齢黄斑変性などが含まれる。これらは視機能の低下により、高齢者のQOLの低下を招く非常に重要な疾患である。これらの加齢性眼疾患の詳細な病態に関しては未だ不明な点が多いが、近年の基礎研究・臨床研究により、特に白内障や加齢黄斑変性で酸化ストレスが病態に関与することが明らかになってきた。

白内障は最も多い加齢性眼疾患で、60歳以上の70%、70歳以上の90%、80歳以上ではほぼ100%の人で視力障害をきたすと言われている。白内障に対する治療は、外科的治療が既に確立されていて、比較的安全で短時間の手術（水晶体再建術）によって視力の改善が得られるが、その一方で発症や進行の予防法はあまりない。白内障に関する疫学調査で、



紫外線や喫煙が発症の危険因子になること、ビタミンC・ビタミンE摂取、βカロテンの摂取が発症や手術を要する率を低下させることが明らかになり、酸化ストレスが白内障形成において役割を担っていることが示唆されてきた。また房水中のビタミンC濃度が血液中の約10倍で水晶体における透明性の維持に重要な役割をはたしていることが古



くから推測されている。

加齢黄斑変性は網膜の中心部分である黄

斑に加齢に伴って変性をきたす疾患である。脈絡膜から新生血管が浸入してくる滲出型（wet type）と、新生血管は発生せずに変性のみをきたす萎縮型（非滲出型、dry type）の2つのタイプに分類することができる。特に滲出型では、黄斑部の出血、滲出性変化、網膜剥離をきたし、物が歪んで見える変視症や著しい視力低下をきたす。加齢黄斑変性の有病率は我が国では50歳以上の約1%、欧米では約2%とされている。有病率は高くはないが、高度かつ永続的な視力低下をきたす疾患で、我が国を含めた先進国において中途失明の上位を占める非常に重要な疾患である。現在のところ加齢黄斑変性症に対する、根本的な治療法はまだない。外科的治療、経瞳孔温熱療法、光線力学療法、抗VEGF抗体療法などが行われているが、依然として決定的な治療法は存在しない。基礎研究では網膜色素上皮細胞で活性酸素のメジャーな消去因子であるSOD1（Super Oxide Dismutase 1）遺伝子のノックアウトマウスで、ヒトのAMDと同様の網膜変性および脈絡膜新生血管が生じることを明らかになるなど、酸化ストレスの関与が示唆されている。また加齢黄斑変性に対する、ビタミンC、βカロテン、銅、亜鉛大量サプリメントを用いた臨床試験（AREDS study）では、これらの抗酸化物質がAMDの進行を抑制することが示された。

一方、都立老人総合研究所の石神らが作成したSMP30ノックアウトマウスは、ビタミンCの合成ができない、いわゆるビタミンCノックアウトマウスで、壊血病様の変化をきたすことが既に分析されている。SMP30ノックアウトマウスを使った様々な解析（肝、腎、肺、骨など）がなされているが、眼科領域の解析は未だなされていない。このノックアウトマウスを用いて、加齢性眼疾患を発症させ、その病態の究明への可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、ビタミンCノックアウトマウスであるSMP30ノックアウトマウスの眼所見の解析を行う。抗酸化物質のひとつであるビタミンCがない状態で、水晶体の混濁、網膜変性が発症するかどうか、あるいは紫外線や光負荷による酸化ストレスによって病変が誘導できるかどうかを解析し、酸化ストレスや抗酸化物質が加齢性眼疾患の発症に関与することを明らかにし、病態の解明へ貢献することを目的とする。またこれらの疾患を動物実験レベルで発症させる一方で、それをビタミンCや他の抗酸化物質でレスキューすることができれば、ヒトにおける治療法・予防法の開発を可能にし、加齢性眼疾患の視力予後改善に貢献すると考えられる。

### 3. 研究の方法

研究期間における負荷実験としては、光負荷および紫外線 (UVB) 負荷を行った。光負荷実験においては1ヶ月の光負荷によって水晶体混濁・網膜変性を来すことができなかった。従って、紫外線負荷についての方法について以下に記す。

#### (1) 動物

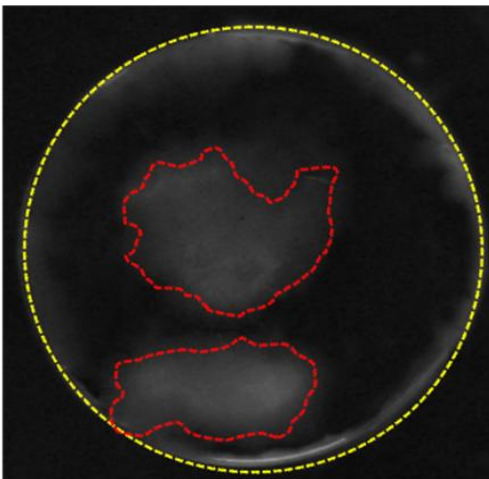
野生型マウス (C57BL/6) およびビタミン C ノックアウトマウスである SMP30 ノックアウトマウスを用いた。SMP30 ノックアウトマウスは生後 30 日で離乳し、その後はビタミン C 十分投与群として飲水で 1.5 g/L のビタミン C 水、ビタミン C 欠乏群として壊血病を発病しない最低限の投与量 (通常の 2.5%) である 0.0375 g/L のビタミン C 水を投与した。なお野生型マウスにはビタミン C を含まない通常の水を与えた。飼育は 12 時間ごとの light-dark サイクルで、空調によって管理した飼育室内にて行った。全ての実験は、Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research に順じて行った。

#### (2) 紫外線負荷

負荷実験には 14 週齢のマウスを使用し、各群 10 匹ずつ合計 30 匹を UVB 照射実験に用いた。紫外線 (UVB) は波長 302nm、強度 200mW/cm<sup>2</sup>、1 回 100 秒間の照射を週 2 回、3 週間行い、合計照射線量は 6 回の照射で 1200mJ/cm<sup>2</sup> とした。右眼に UVB を照射し、左眼は照射せずコントロールとした。

#### (3) 水晶体の評価

UVB 照射後から 48 時間後にマウスの眼球を摘出し、水晶体を取り出した。摘出水晶体を、実体顕微鏡写真撮影システムを用い白内障の形態を記録し、National Institutes of Health Image J software を用いて、水晶体混濁面積率 (混濁面積/前囊面積×100) を測定した。



#### (4) 組織

眼球に 23G 針にて穿刺し、Superfix (Kurabo, Nagoya, Japan) にて固定した。パラフィン切片 3 μm を作成し、HE 染色にて観察した。

#### (5) 水晶体中のビタミン C 濃度の測定

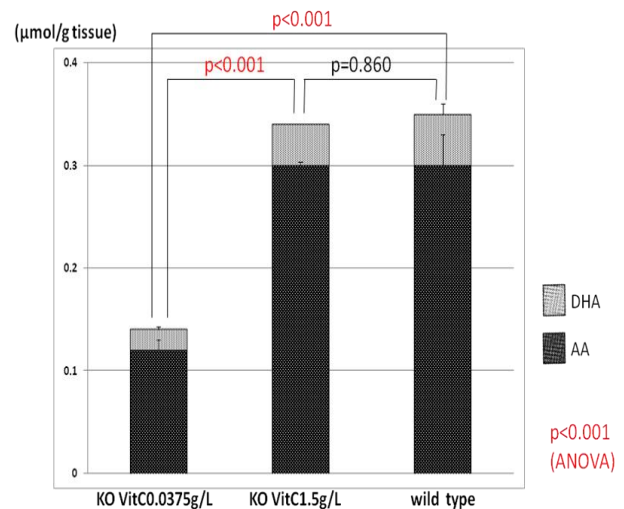
紫外線照射を行っていない 14 週齢マウスから摘出した水晶体に 19 倍量のメタリン酸を加え handy homogenizer (Mojimokun; Nippon Genetics, Tokyo, Japan) にて均質化し、遠心分離し上清をサンプルとして用いた。ビタミン C 濃度の測定には HPLC 法にて測定した。

#### (6) 水晶体中の蛋白濃度およびグルタチオン濃度の測定

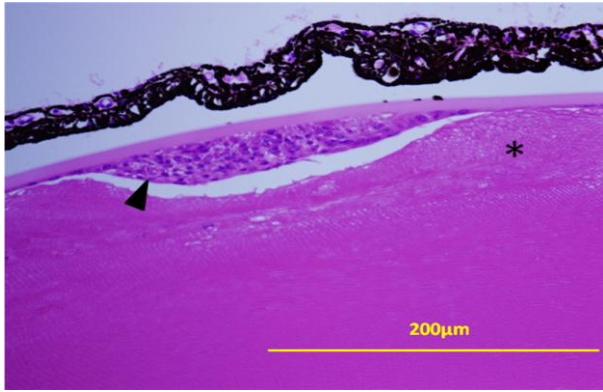
紫外線照射後の水晶体を用いて蛋白濃度およびグルタチオン濃度の検索を行った。摘出水晶体に RIPA buffer を加え破碎し、遠心し上清をサンプルとして使用した。蛋白濃度は Protein Assay (BioRad) にて測定し、グルタチオン濃度はチオール活性を測定して求めた。

### 4. 研究成果

(1) ビタミン C ノックアウトマウス (SMP30 ノックアウトマウス) は 0.0375 g/L の低濃度ビタミン C 水投与下で水晶体中ビタミン C は野生型マウスの約 3 分の 1 に減少した。ビタミン C ノックアウトマウスは 1.5 g/L の濃度のビタミン C 水投与により水晶体中ビタミン C 濃度が野生型マウスと同等であった。従ってこれらの二つの濃度のビタミン C 水投与によって、ビタミン C ノックアウトマウスの水晶体中のビタミン C を欠乏状態、十分状態を作成できることが確認された。

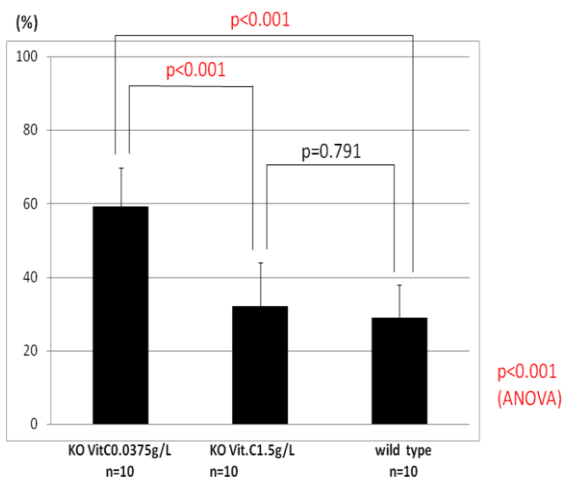


(2) 全ての群で水晶体混濁がみられた。組織学的検索にて前囊下混濁であることが確認された。



(3) 紫外線負荷による水晶体混濁面積率

紫外線負荷による水晶体混濁面積率は野生群 29.0±9.0%、SMP30 ノックアウトマウス・ビタミンC 十分投与群 32.2±11.7%であったのに対し、SMP30 ノックアウトマウス・



ビタミンC 欠乏群 59.3±10.6%で、SMP30 ノックアウトマウス・ビタミンC 欠乏群は他の2群の約2倍の混濁率を認めた(p<0.0001)。また前2者の間には有意差はなかった。

これらの結果から、水晶体ではVit.Cが欠乏することで酸化ストレスであるUVBの障害を受けやすくなり水晶体混濁が進行したと考えられる。Vit.Cは水晶体における抗酸化作用、恒常性・透明性の維持に重要な役割をはたしている可能性が考えられた。

(4) 水晶体中の蛋白濃度・グルタチオン濃度

水晶体中の蛋白濃度・グルタチオン濃度に関しては、野生群、SMP30 ノックアウトマウス・ビタミンC 十分投与群、SMP30 ノックアウトマウス・ビタミンC 欠乏群の間で有意な差は認めなかった。紫外線負荷による混濁は水晶体全体において前囊下に限局するため水晶体全体をサンプルとした今回の実験では差が出づら可能性が考えられた。

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0件)

〔学会発表〕(計2件)

(1) 石川陽平、橋爪公平、黒坂大次郎、手塚優、岸本成史、西郡秀夫、近藤嘉高、石神昭人、山本直樹、光負荷によるSMP30ノックアウトマウスの水晶体変化、第47回日本白内障学会、東京国際フォーラム、2008年6月20日

(2) 石川陽平、橋爪公平、黒坂大次郎、手塚優、岸本成史、西郡秀夫、近藤嘉高、石神昭人、山本直樹、UVBによるSMP30ノックアウトマウスの水晶体変化、第48回日本白内障学会、東京国際フォーラム、2009年6月21日

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒坂 大次郎 (KUROSAKA DAIJIRO)  
岩手医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20215099

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし