

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791688

研究課題名（和文） 加齢黄斑変性に対する水素ガスによる抗酸化療法の効果の解析

研究課題名（英文） Effect of hydrogen gas in the age-related macular degeneration

研究代表者

厚東 隆志 (KOTO TAKASHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60464814

研究成果の概要(和文): 加齢黄斑変性は近年高い有病率が報告され非常に重要な視力障害の原因疾患である。脈絡膜新生血管とそれに伴う炎症・滲出性変化が疾患本態であるが、その背景の発症メカニズムには加齢に伴う酸化ストレスの蓄積が含まれることが広く認識されている。しかし、現時点では認可を受けた有効な予防治療法はない。そこで水素ガスが加齢黄斑変性の予防に役立つ可能性があるかを検討するため、疾患モデルを用いて動物実験を行った。

研究成果の概要(英文): Age-related macular degeneration (AMD) is one of the leading causes of blindness in the aged population. The choroidal neovascularization and the related exudative changes are the main findings of AMD. It has been believed to be caused by oxidative stress, however, there was no established preventive therapies. In this study, we explored the possibility to use hydrogen gas to suppress oxidative stress in the retina, using an animal model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：加齢黄斑変性、酸化ストレス、水素ガス

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性は、近年、我が国でも欧米人に近い有病率が報告され (Ohshima Y et al. *Br J Ophthalmol* 2001)、超高齢化社会の進行とともに患者が増加してきている非常に重要な視力障害の原因疾患である。その本態は、

脈絡膜新生血管とそれに伴う滲出性病変であり、網膜の中心にあたる黄斑の網膜神経細胞が二次的に損傷されることで、中心の視力を失っていく疾患である。長年、認可を受けた治療法がなかったが、2004年に光線力学的療法、2008年に抗血管内皮増殖因子療法(抗VEGF療法)が認可されてからは、多くの症例

に治療が施されるようになった。しかしこれらの治療法は、治療時既に生じていた網膜神経細胞の二次的障害を回復させるためのものではなく、進行を防ぎ、現状維持をもくろんだものであった。すなわち、一度罹患すると、元の状態に戻るための治療法があるわけではなかった。そして、これらの治療法により、一度病変が落ち着いても、時間をおいて再燃・再発することが比較的多いことも知られていた。

一方、本疾患においては、脈絡膜新生血管の発生する以前に、前駆病態があることが知られるようになり、発症以前から病態が進行してきていることが臨床的に考えられてきた。これを受けて、細胞生物学的手法により近年その分子メカニズムが研究され、発症メカニズムには酸化ストレスが含まれることが広く認識されるようになってきた。しかし、現時点では有効な予防治療法はあまりない。日本・欧米ともに抗酸化剤のサプリメントの適応が注目され、米国には Age-related Eye Disease Study (AREDS) および AREDS2 (現在進行中) という大規模臨床試験がある。AREDS では、抗酸化物質(ビタミンC, ビタミンE, カロチン) 及び亜鉛のサプリメントの加齢黄斑変性の進行予防に対する有用性が報告されており、加齢黄斑変性の病態に酸化ストレスが関与することが示唆された (AREDS group, *Arch Ophthalmol.* 2001)。AREDS2 では、これらの抗酸化物質に加え、ルテインや EPA/DHA などの成分の効果を現在検証中である。この結果も有望視されている。しかし、これらだけで加齢黄斑変性の予防に関して十分な効果が得られるかどうかは明らかではなく、またこれらのサプリメントにおいては、組織移行・安全性など、様々な課題が残されている。一方、生体内で作用する分子としてある種のガスがあるが、これは低分子でありほとんどの臓器に拡散可能であること、摂取の開始・中断により体内レベルをコントロールしやすいことが知られている。水素水は抗酸化作用を持つ。これは、過剰の活性酸素は除くが、その除去能が強すぎないことが特徴で、疾患治療に向いていると考えられていた。水素水はこれまでに、がん予防等に用いる研究が行われてきたが、その加齢黄斑変性に対する効果についての報告は未だ無かった。

2. 研究の目的

マウス加齢黄斑変性モデルにおいて、水素ガスが脈絡膜新生血管の抑制に役立つかどうかを解析すること。

3. 研究の方法

レーザー誘導脈絡膜新生血管モデルマウスを作成し、水素ガスの前投与が新生血管形成の抑制に有効かどうかを組織学的に解析した。また、関連する炎症性シグナルが抑制されるかどうかも解析した。

4. 研究成果

レーザー照射前のマウスに対し水素水を0.3 μg 経口投与施行した。胃管を用いて経口投与を行い、レーザー照射7日後にFITC レクチンによる灌流ラベル法を用いて脈絡膜新生血管の体積を評価した。評価には、以前から当研究室で用いてきた方法を用いた。次のような手順で行った。まず、眼球を取り出し、脈絡膜新生血管をレクチンで染色する。脈絡膜のフラットマウントを作成し、脈絡膜新生血管を位相差顕微鏡FV1000 (オリンパス) を用いて1 μm 毎に撮像する。ImageJソフトを用いて脈絡膜新生血管の面積を測定し、面積和から脈絡膜新生血管体積を算出する。今回の解析では、新生血管の抑制の傾向は認められたが、明らかな差は認めなかった。同様のフラットマウントにおけるマクロファージ浸潤に関する組織染色 (図2) も行ったが、差は見られなかった。関連する炎症性サイトカイン等 (VEGF アイソフォーム 120, 164, ICAM, MCP-1, IL-6, TNF- α など) の発現に関しては、今回の実験条件では、水素水投与による明らかな差を認めなかった。1回に投与する水素水の投与の量を変えた検討も行ったが、水素水の効果を示す結果を得ることはできなかった。水素水は、活性酸素の除去能が大きすぎないことが臨床応用のためにメリットだと考えられてきたが、今回の動物モデルで生じた活性酸素量が多すぎて、これを解消できなかった可能性があった。ただし、別のモデルを用いたり、水素水の投与の方法や期間等を変えたりすることで、効果が見ら

れる可能性もあり、今回の結果では、水素水は加齢黄斑変性には効果がないという判断は必ずしもできないと考えている。今後さらなる研究が必要であると考えた。

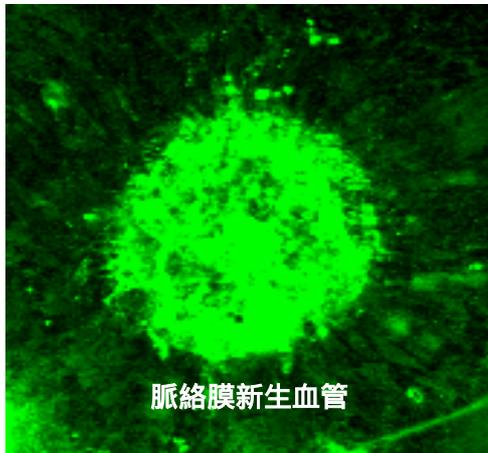


図1 フラットマウントサンプルにおける脈絡膜新生血管のレクチン染色像。

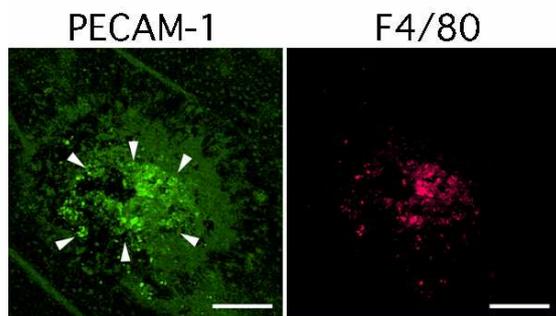


図2 フラットマウントサンプルにおける脈絡膜新生血管の内皮の染色 (PECAM-1) とマクロファージ (F4/80) の染色像。

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5件)

- 1) Oshima CR, Yuki K, Uchida A, Dogru M, Koto T, Ozawa Y, Tsubota K. The Vision

Van, a Mobile Eye Clinic, Aids Relief Efforts in Tsunami-stricken Areas. Keio J Med. 2012; 61:10-14. 査読有

- 2) Sasaki M, Shinoda H, Koto T, Uchida A, Tsubota K, Ozawa Y. Use of micronutrient supplement for preventing advanced age-related macular degeneration in Japan. Arch Ophthalmol. 2012; 130: 254-255. 査読有
- 3) Shinoda H, Koto T, Fujiki K, Murakami A, Tsubota K, Ozawa Y. Clinical findings in a choroideremia patient who underwent vitrectomy for retinal detachment associated with macular hole. Jpn J Ophthalmol. 2011; 55: 169-171. 査読有
- 4) Ishida S, Koto T, Nagai N, Oike Y. Calcium channel blocker nilvadipine, but not diltiazem, inhibits ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis. Jpn J Ophthalmol. 2010; 54: 594-601 査読有
- 5) Ozawa Y, Kubota S, Narimatsu T, Yuki K, Koto T, Sasaki M, Tsubota K. Retinal aging and sirtuins. Ophthalmic Res. 2010; 44: 199-203. 査読有

〔学会発表〕(計2件)

- 1) 第50回日本網膜硝子体学会総会 川島弘彦, 篠田肇, 持丸博史, 内田敦郎, **厚東隆志**, 永井紀博, 小沢洋子, 坪田一男. 東京, 2011/12/2-4
内境界膜剥離併用硝子体手術で中心窩網膜分離が改善した X 染色体性若年性網膜分離の1例
- 2) 第34回日本眼科手術学会総会 西恭代, 篠田肇, 結城賢弥, 内田敦郎, **厚東隆志**, 小沢洋子, 坪田一男. 東京, 2011/1/28-30
視力 1.0 以上の網膜上膜に対する実用視力測定の有効性

〔図書〕(計1件)

- 1) **厚東隆志**. 【眼に良い食べ物】「海の幸」
編 魚(オメガ3 多価不飽和脂肪酸) あ
たらしい眼科 2010; 27: 35-38 メディ
カル葵出版

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

厚東 隆志 (KOTO TAKASHI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 60464814