

# 網膜静脈塞栓症に対する納豆食の予防/治療効果

群馬大学大学院 医学系研究科

柴崎 貢志

網膜静脈閉塞症は高血圧や動脈硬化が原因で網膜静脈が閉塞されることにより浮腫や眼底出血などをきたし、急激な視力低下や視野欠損が引き起こされる疾患である<sup>1,2</sup>。網膜静脈閉塞症の患者数は世界において1億6000万人と推定され、日本人の場合40才以上では50人に1人の割合で罹患し、年齢と共に有病率が増加していく。抗VEGF抗体薬のみが現在承認されている唯一の対策薬であり、症状を食い止める効果はあるが、治療効果は乏しいという問題がある。

納豆にはナットウキナーゼが含まれており、血管閉塞の予防や治療効果があることが広く知られている。動物実験やヒューマンスタディの結果から、動脈硬化や脳梗塞などに対する予防・治療効果が報告されている。この点に着目し、網膜静脈閉塞症に対する納豆食の治療効果をモデルマウスにおいて調べ、新たな治療法や予防法の確立を目指した。

## 実験方法

### モデルマウス作製

血管動態を蛍光により可視化出来るマウス(血管をFlt1-tdsRedで赤色蛍光ラベル)に対して、眼底内静脈にレーザー照射(波長; 532 nm, スポットサイズ; 50  $\mu$ m, レーザー出力; 50 mW, 照射回数; 15回)を行い、静脈を閉塞した。この静脈閉塞マウスを網膜静脈塞栓症のモデルとして実験を行った。

### 血管閉塞の評価

上記のモデルマウスを4群(無処置でコントロール食、無処置で納豆食。静脈閉塞でコントロール食、静脈閉塞で納豆食)に分けた。そして、コントロール食と納豆食を3週間給餌し、網膜静脈塞栓症の病態回復の程度をコントロール食に対して比較した。マウスの食餌はコントロール食に凍結乾燥・粉碎した納豆を全体成分のうち10%分添加。そして、マウスからflat-mount網膜組織を作製し、Flt1-tdsRedの共焦点レーザー顕微鏡像を観察し、静脈の閉塞具合を定量化し、評価した。

### TRPC5発現解析

上記のマウスから網膜を単離した後、網膜組織を作製した。そして、RNA発現をin situ hybridization法と免疫組織化学法にて解析した。免疫組織化学法では市販の抗TRPC5抗体(ウサギポリクローナル)を500倍希釈にて用いた。

## 実験結果

### 静脈閉塞マウスの血管閉塞度合

実験方法に示したような照射条件で網膜内静脈にレーザーを照射し、血管の閉塞を引き起こした(図1)。そして、その血管の閉塞度合をFlt1-tdsRedの赤色蛍光観察により行い、網膜組織の単位面積当たりのFlt1-tdsRedの赤色蛍光が占める割合(血管密度)を算出して比較した(図2)。その結果、本実験条件のレーザー照射により十分な静脈の閉塞が引き起こされていることが確認出来た。納豆食の投与を行った場合(申請時には2か月投与する予定を記したが、研究実施者が異動となり、研究実施期間が大きく短縮してしまったため、摂食期間は3週間に変更した)、静脈閉塞の有意な改善が起こっていることを見出した。

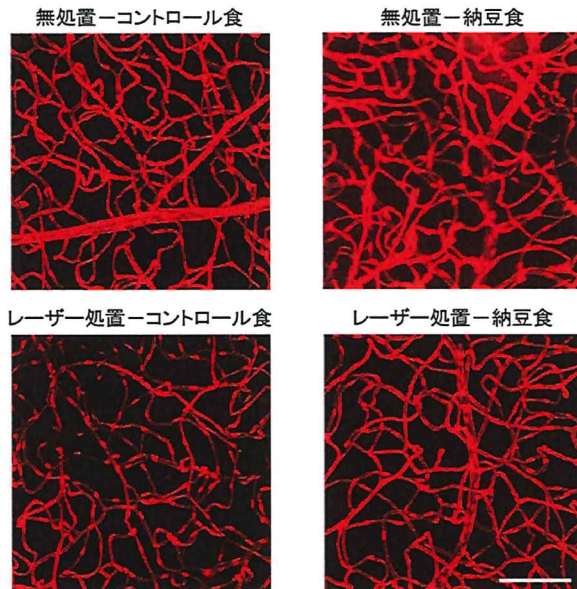


図 1

### 納豆食が網膜静脈塞栓に及ぼす影響

実験方法の項目で述べた方法にて、レーザー照射し、網膜静脈塞栓症モデルマウスを作製した。コントロール食、納豆食の給餌後に網膜を単離し、Flt1-tdsRedの蛍光像を共焦点レーザー顕微鏡にて撮影し、比較した。

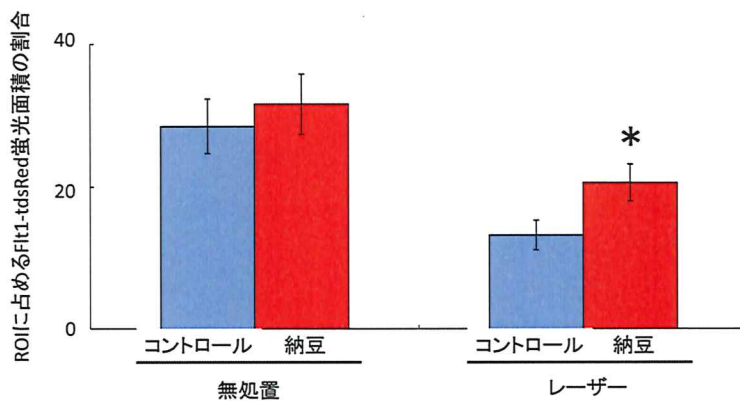


図 2

### グラフ化による評価

図1の結果を定量比較した。納豆食摂取により、静脈閉塞の有意な改善を認めた。

## 網膜神経節細胞には TRPC5 が発現する

上述したように納豆食の給餌により、網膜の静脈閉塞に有意な改善が起こることを見出した。この改善メカニズムを探るべく、血管新生因子である VEGF などの遺伝子発現変動を調べたが、それらに有意な変化は認められなかった。この遺伝子発現検索の過程で、マルチモーダル受容体（細胞内 Ca<sup>2+</sup>枯渇、機械刺激、NO、低温などで活性化する）TRPC5 が網膜神経節細胞（以下、RGC と略す）に特異的に発現していることを見出した（図 3）。さらに、RGC の TRPC5 は神経回路形成を抑制する役割を担っていることも見出した。この発見を米国科学誌、Laboratory Investigation (2020) に発表した<sup>3</sup> (Takano Life Science Research Foundation からのサポートを受けたことを謝辞記載)。さらに、この業績に絡んで総説の執筆依頼があり、これも Laboratory Investigation (2020) に発表した<sup>4,5</sup> (Takano Life Science Research Foundation からのサポートを受けたことを謝辞記載)。

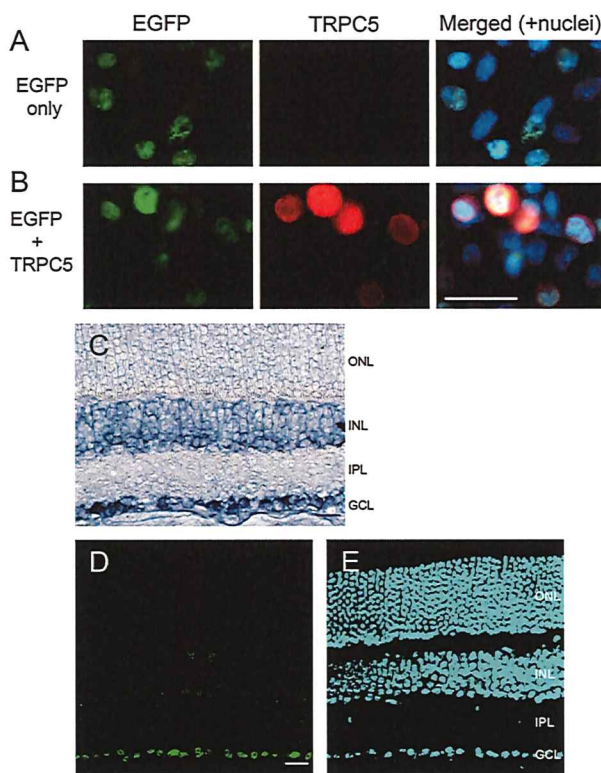


図 3  
RGC における TRPC5 発現

A, B; TRPC5 抗体の特異性を EGFP のみを発現、あるいは EGFP+TRPC5 の共発現をした細胞にて検証した。TRPC5 抗体が特異的に TRPC5 のみを認識していることを確認した。C; 網膜組織切片における TRPC5 RNA 発現。TRPC5 が RGC に発現していることを見出した。D; TRPC5 抗体による網膜組織切片の染色。図 C と一致し、TRPC5 タンパク質も RGC 特異的に検出された。E; 図 D 網膜組織のヘキストによる核染色。

## 考察

今回の研究により、レーザー照射に伴う網膜静脈塞栓症モデルマウスにおいては、3週間の納豆食給餌により静脈の血管閉塞度合が有意に改善することを見出した(図1、2)。申請時にはこのメカニズムにナットウキナーゼが関与する可能性を考え、モデルマウスへのナットウキナーゼ摂取を行い、納豆食の動態と比較する予定であった。しかしながら、研究実施者の異動と新型コロナウイルス蔓延に伴い、その実施が不可能になってしまった。納豆食による改善メカニズムの候補としては、ナットウキナーゼ、大豆タンパク質、大豆イソフラボン、あるいはそれらの複合的相乗効果と多角的な可能性が考えられる。今後、再び貴財団への研究応募を行い、今回見出した納豆食により有意な改善が起こるメカニズムの解明を進めていきたいと考えている。

応募時点ではモデルマウスを用いた研究に加えて、群馬大学病院にて被検者を募り、患者さんに納豆食を摂取してもらい、その効果も調べる計画であったが、これについても研究実施者の異動と新型コロナウイルス蔓延に伴い、その実施が不可能になってしまった。是非、将来この研究計画についても実施し、今回見出した知見がマウスにのみ適用されるのではなく、患者さんの病態改善に役立つことをヒューマンリサーチを行い証明したい。

## 要約

網膜静脈閉塞症は高血圧や動脈硬化が原因で網膜静脈が閉塞されることにより浮腫や眼底出血などをきたし、急激な視力低下や視野欠損が引き起こされる疾患である。網膜静脈閉塞症の患者数は世界において1億6000万人と推定され、日本人の場合40才以上では50人に1人の割合で罹患し、年齢と共に有病率が増加していく。抗VEGF抗体薬のみが現在承認されている唯一の対策薬であり、症状を食い止める効果はあるが、治療効果は乏しいという問題がある。

納豆にはナットウキナーゼが含まれており、血管閉塞の予防や治療効果があることが広く知られている。動物実験やヒューマンスタディの結果から、動脈硬化や脳梗塞などに対する予防・治療効果が報告されている。この点に着目し、網膜静脈閉塞症に対する納豆食の治療効果をモデルマウスにおいて調べ、新たな治療法や予防法の確立を目指した。

マウスの網膜内静脈にレーザーを照射し、血管の閉塞を引き起こした。これを網膜静脈閉塞症のモデルとして用いた。このモデルマウスを4群(無処置でコントロール食、無処置で納豆食、静脈閉塞でコントロール食、静脈閉塞で納豆食)に分けた。そして、コントロール食と納豆食を3週間給餌し、網膜静脈塞栓症の病態回復の程度をコントロール食に対して比較した。マウスの食餌はコントロール食に凍結乾燥・粉碎した納豆

を全体成分のうち 10%分添加。そして、マウスから flat-mount 網膜組織を作製し、Flt1-tdsRed の共焦点レーザー顕微鏡像を観察し、静脈の閉塞具合を定量化し、評価した。その結果、本実験条件のレーザー照射により十分な静脈の閉塞が引き起こされていることが確認出来た。そして、納豆食の投与を行った場合、静脈の閉塞に有意な改善が起きていることを見出した。

## 謝辞

本研究を進めるうえでとても親切で丁寧に対応下さったタカノ農芸化学研究助成財団の皆様に深く感謝申し上げます。本文中でも述べましたように自身の異動や新型コロナウイルス問題で研究実施や報告書作成など、なにかと困難がありました。なんとか本研究課題を終了することが出来ました。

喜ばしいことに、本課題の遂行中に網膜内の新たな遺伝子発現パターンも見出すことが出来、これらは 3 本の論文業績として本課題の研究期間中に発表することが出来ました。全てタカノ農芸化学研究助成財団の皆様のサポートによるものと心より御礼申し上げます。

本命の納豆食による網膜静脈閉塞症の改善という大きな知見につきましても、論文業績として発表出来るように継続して研究を続けて参ります。今後ともご支援よろしくお願い申し上げます。

## 文献

- 1 Mruthyunjaya P, Wirostko WJ, Chandrashekhar R, *et al.* Central retinal vein occlusion in patients treated with long-term warfarin sodium (Coumadin) for anticoagulation. *Retina* 2006;26(3):285-291.
- 2 Hsu HY, Chao AC, Chen YY, *et al.* Reflux of jugular and retrobulbar venous flow in transient monocular blindness. *Ann Neurol* 2008;63(2):247-253.
- 3 Oda M, Yamamoto H, Matsumoto H, *et al.* TRPC5 regulates axonal outgrowth in developing retinal ganglion cells. *Lab Invest* 2020;100(2):297-310.
- 4 Shibasaki K. TRPV4 activation by thermal and mechanical stimuli in disease progression. *Lab Invest* 2020;100(2):218-223.

- 5 Shibasaki K, Yamada K, Miwa H, *et al*. Temperature elevation in epileptogenic foci exacerbates epileptic discharge through TRPV4 activation. *Lab Invest* 2020;100(2):274-284.