

F. 研究発表

1. 論文発表

Katou S, Mitsui Y, Kitani K and Suzuki T. Hyperoxia induces the neuronal differentiated phenotype of PC12 cells via a sustained activity of mitogen-activated protein kinase induced by Bcl-2. *Biochem J* 338 : 465-470, 1999.

Cui Ping Chen, Yokozawa K, and Kitani K. Beneficial effects of *sanguisorbae radix* in renal dysfunction caused by endotoxin *in vivo*. *Biol Pharm Bull* 22:1327-1330, 1999.

Kitani K. Lateral mobility of proteins and lipid of cell surface membranes during aging: do the data support 'The Membrane Hypothesis of Aging'? *Mech Ageing Dev.* vol.107, 3 : 299-322, 1999.

木谷健一 高齢者の薬動・力学—精神科領域の薬を中心として— 第7回箱根精神薬理シンポジウム=講演記録集= pp1-16, 1999.

Kitani K, Kanai S, Ivy G.O. and Carrillo M.C. Pharmacological modifications of endogenous antioxidant enzymes with special reference to the effects of deprenyl: A possible antioxidant strategy. *Mech Ageing Dev* 111:211-221, 1999.

Kitani K and Goto S.(eds.) Roles of Proteins in Ageing and Age-Associated Disorders "Proceeding of the Second International NILS Workshop on Longevity Sciences" *Mech Ageing Dev.* vol.107, 3 : 219-369, 1999.

Carrillo MC, Minami C, Kitani K, Maruyama W, Ohashi K, Yamamoto T, Naoi M, Kanai S and Youdim MBH. Enhancing effect of rasagiline on superoxide dismutase and catalase activities in dopaminergic system in the rat. *Life Sci* (in press), 2000.

2. 学会発表

木谷健一 日本医学会総会シンポジウム"人の老化をいかにして測るか" 司会 1999年4月2日 東京

Carrillo M C, Minami C, Kitani K, Maruyama W, Ohashi K, Yamamoto T, Naoi M, Kanai S and Youdim M B H. Enhancing effect of rasagiline on superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities in dopaminergic system in the rat. 28th Annual meeting, American Aging Association, June 4-8, 1999, Seattle, USA.

Kitani K, Kanai S and Miyasaka K. Potentialities and limitations of aging rodents as an animal model for studies on aging. 6th Asia Oceania Regional Congress of Gerontology, June 7-11th, 1999, Seoul, Korea.

Kitani K and Tanaka S. Lateral diffusion coefficients of proteins in surface membranes of skeletal muscle cells as well as brain cortical cells in rodents also decline with age as those in hepatocyte surface membranes. 6th Asia Oceania Regional Congress of Gerontology, June 7-11th, 1999, Seoul, Korea.

木谷健一, 南知予子, 丸山和佳子, 山本貴子, 大橋憲太郎, 直井 信, 金井節子, Carrillo M C. 加齢動物の生理・生化学的パラメーターの変化: 特に public vs. private 変化の相違について. 第22回日本基礎老化学会 1999年6月16日-18日 京都

南知予子, 丸山和佳子, 木谷健一, 直井 信, 大橋憲太郎, 山本貴子, Carrillo M.C, 金井節子 ラット, ドーパミン作動性組織の抗酸化酵素活性を修飾する薬物: 特にラサジリンの効果 第22回日本基礎老化学会 1999年6月16日-18日 京都

木谷健一 ラット大脳皮質細胞表面膜の蛋白側方拡散定数に対する加齢の影響. 第41回日本老年医学界学術集会 1999年6月16日-18日 京都

木谷健一 韓国生科学会特別講演 "Current and future strategies in gerontology research in Japan, October, 1, 1999, Pusan, Korea.

木谷健一 介入: 老化・老年病の予防を目指して (Introduction と司会) 日本基礎老化学会主催基礎老化シンポジウム 1999年10月9日 東京

Kitani K. Common properties for propargylamines of enhancing superoxide dismutase and catalase activities in the dopaminergic system in the rat: Implications for the life prolonging effect of (-)deprenyl. 8th Winter Conference on Neurodegeneration. Feb.9-13, 2000, Tegernsee, Germany.

Kitani K. Do antioxidant strategies work against aging and age-associated disorders? Propargylamines: A possible antioxidant strategy. Symposium IV: Practical approach for functional longevity. 8th Congress on International Association of Biomedical Gerontology. Feb.21-24,2000, Kyongju, Korea.

G. 知的所有権の取得状況
なし

分担研究報告書

組織特異活性酸素制御法の開発と
血管源性加齢病態の解明

井上 正康

大阪市立大学 医学部 第一生化学教室 教授

分担研究報告書

組織特異的活性酸素制御法の開発と血管源性加齢病態の解明

分担研究者 井上 正康 大阪市立大学医学部 教授

研究要旨 加齢性脳心血管障害をはじめとする老化関連疾患にはスーパーオキシドや NO などの活性酸素フリーラジカルが関与することが示唆されているが、その実態は尚不明である。本研究は、活性酸素病態の解析により加齢現象の背景に潜む活性酸素の役割を解明すると同時に、新たな抗酸化代謝制御法を開発し、動脈硬化、心脳血管病変等の加齢関連疾患を阻止軽減する予防治療法を開発することを目的として行われた。解析の結果、アポトーシスの経路のうちミトコンドリア依存性シグナルが、加齢性変化と密接に関連し、その機構においてはライソゾーム系酵素が重要な役割を果たすことが判明した。また、各種の細胞におけるミトコンドリア依存性アポトーシスがカルニチンにより著明に軽減することが判明し、本薬剤が血管や神経細胞の加齢性病態を抑制しうる可能性が示唆された。

A. 研究目的

加齢性脳心血管障害をはじめとする老化関連疾患にはスーパーオキシドや NO などの活性酸素・フリーラジカルが関与することが示唆されている。これは生命維持に不可欠なエネルギー産生の過程で生じる腔反応性の分子種が DNA をはじめとする生体成分を攻撃し続ける為であるが、その実態は尚不明である。本分担研究者は、活性酸素病態の解析により、加齢の素過程における活性酸素の役割を解明すると同時に、新たな抗酸化代謝制御法を開発し、動脈硬化、心脳血管病変、パーキンソン病等の加齢関連疾患を阻止軽減する

予防治療法を開発することを目指している。高齢化社会の医学的問題が山積みされている日本において、加齢関連病態を阻止軽減し、健康な老人集団を確保することを目指す本研究プロジェクトの医学的および社会的意義は極めて大きい。

B. 研究方法

生体エネルギー代謝を活性酸素のクロストークが制御する様相を分子、ミトコンドリア、細胞、および組織のレベルで、オキシメーターや ESR による酸素関連代謝を中心に解析した。特に、Mt の加齢性変化に関しては老化

促進マウス(SAM-8)を用いて解析した。生体維持にはエネルギーを産生するミトコンドリアと情報を制御する遺伝子の機能が重要であり、老化ではこれらに対する活性酸素毒性が重要な鍵となるので、これを解析した。血管構成細胞の老化は高血圧や動脈硬化の原因となり、加齢性神経障害などの基盤ともなるので、その予防法を探した。特に、様々な細胞のアポトーシスに対する保護作用物質を検討した。

C. 結果

生体のエネルギー合成には酸素を運搬する動脈と末梢組織のミトコンドリアが重要であり、両者は活性酸素産生の主座でもある。解析の結果、NO とスーパーオキシドを主体とする酸素ラジカル間のクロストークが血流を介してエネルギー代謝をポジティブに、またミトコンドリアにおける ATP 合成反応をネガティブに制御し、両者のバランスにより局所のエネルギー産生量が精密に規定されていることが判明した。また、その代謝の歪みが高血圧や動脈硬化の病因に深く関与することが判明した。

SAM と正常マウスの肝ミトコンドリアを用いて解析した。肝や心のミトコンドリアを用いて解析した結果、SAM では加齢に伴い呼吸能や ATP 合成能が著しく低下していること、および加齢によりこの変化が増強することが判明した。特に、ミトコンドリア膜機能を保護してアポトーシスを抑制する発癌遺伝子産物 Bcl-2 は生後一年を過ぎると著明に低下していた。活性酸

素はミトコンドリアやリソゾーム膜の脂質過酸化を介してシトクローム c やプロテアーゼを漏出させ、カスパーゼ-3 を活性化することも判明した。

生殖能力の成熟点は老化の出発点でもあり、生殖系機能と活性酸素代謝系の加齢性変化は老化機構に重要である。In situ hybridization 法で解析した結果、卵巣や子宮における Mn-SOD の遺伝子発現が性周期に連動して変化すること、これが加齢により縮退すること、さらに精巣の glutathione peroxidase (GPX)の遺伝子発現が加齢により著明に低下することが判明した。

D. 考察

上記の所見から、アポトーシスの経路には TNF や Fas 等のサイトカイン依存性シグナルとミトコンドリア依存性シグナルが知られているが、後者にはライソゾーム系酵素が重要な役割を果たすことが判明した。これは加齢性に生じる難消化性の色素沈着現象などに関係する可能性が考えられる。また、各種の細胞におけるミトコンドリア依存性アポトーシスがカルニチンにより著明に軽減することが判明した。その機構として、フォスホリパーゼ A2 の活性化により生じる遊離の長鎖脂肪酸がミトコンドリアの膜電位を低下させ、シトクローム c の遊離を促進することによりカスパーゼカスケードを活性化していること、およびその初期反応をアシルカルニチン形成を介して阻止することが保護作用機構であることが示唆された。

また、老化現象における性差が生殖

器における活性酸素関連代謝と極めて密接な相関性を有することが示唆された。

E. 結論

本研究により、活性酸素代謝が生体の好氣的エネルギー代謝を制御する必須な因子であると同時に、その過程で誘起される酸化ストレスが血管、神経系、生殖系組織細胞のミトコンドリア、ライソゾーム、DNA、蛋白酵素系の加齢性変化の重要な原動力として作用していることが判明した。酸化ストレスを軽減する抗酸化剤などは血管や神経細胞の加齢性病態を抑制しうる可能性が示唆されているが、食事性や内因性のカルニチンも有効な保護作用を示す可能性が示唆された。加齢性変化は長期に渡りゆっくりと進行する不可逆的過程であり、その阻止軽減には日々のライフスタイルが重要と考えられる。したがって、日々の食物成分中に含まれる新規抗酸化成分、およびカルニチンのごとく既知の成分で有効な保護作用を有する因子が加齢性病変の抑制に有効であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

M. Kashiba, E. Kasahara, K. C. Chien, M. Inoue (1999). Fates and vascular action of s-nitrosoglutathione and related compounds in the circulation. *Arch Biochem Biophys* 363: 213-218

A. Kashiwagi, H. Hanada, M. Yabuki, T. Kanno, R. Ishisaka, J. Sasaki, M. Inoue,

K. Utsumi (1999). Thyroxine enhancement and the role of reactive oxygen species in tadpole tail apoptosis. *Free Radic Biol & Med.* 26: 1001-1009

Y. Takehara, H. Nakahara, S. Okada, K. Yamaoka, K. Hamazaki, A. Yamazato, M. Inoue, K. Utsumi (1999). Oxygen concentration regulates NO-dependent relaxation of aortic smooth muscles. *Free Rad. Res.* 30: 287-294

I. Imada, E. F. Sato, M. Miyamoto, Y. Ichimori, Y. Minamiyama, R. Konaka, M. Inoue (1999). Analysis of reactive oxygen species generated by neutrophils using a chemiluminescence probe L-012. *Anal Biochem* 271: 53-58

Y. Minamiyama, S. Takemura, T. Akiyama, S. Imaoka, M. Inoue, Y. Funae, S. Okada (1999). Isoforms of cytochrome P450 on organic nitrate-derived nitric oxide release in human heart vessels. *FEBS Lett* 452: 165-169

S. Takemura, Y. Minamiyama, S. Imaoka, Y. Funae, K. Hirohashi, M. Inoue, H. Kinoshita (1999). Hepatic cytochrome P450 is directly inactivated by nitric oxide, not by inflammatory cytokines, in the early phase of endotoxemia. *J. of Hepatology* 30: 1035-1044

M.Inoue, M. Nishikawa, E. F. Sato, K. Matsuno, J. Sasaki (1999). Synthesis of superoxide dismutase derivative that specifically accumulates in renal proximal tubule cells. *Arch Biochem Biophys* 368: 354-360

R. Konaka, E. Kasahara, W.C.Dunlap, Y. Yamamoto, K. Chien, M. Inoue (1999). Irradiation of titanium dioxide generates both singlet oxygen and superoxide anion. *Free Radic Biol. & Med.* 27: 294-300

M. Inoue, M. Nishikawa, E. F. Sato, P. AH-Mee, M. Kashiba, Y. Takehara, K. Utsumi (1999). Cross-talk of NO, superoxide and molecular oxygen, A majesty of aerobic life. *Free Rad. Res.* 31: 251-260

O. Pechanova, M. Kashiba, M. Inoue (1999). Role of glutathione in stabilization of nitric oxide during hypertension developed by inhibition of nitric oxide synthase in rat. *Jap J Pharmacol* 81:223-229

2. 学会発表

佐藤英介、山本祐司、樋口允子、井上正康：NO の消化器内の細菌に対する影響と感染防御、第 72 回日本生化学会、1999、10 横浜

西川 学、永富英彦、大平 豪、西島正剛、佐藤英介、井上正康、抗ガン剤腎毒性の分子機構と腎指向性

SOD による制御、第 72 回日本生化学会、1999、10 横浜

富田益弘、佐藤英介、井上正康：軟骨細胞に対する NO の影響、第 72 回日本生化学会、1999、10 横浜

吉良幸美、寺村めぐみ、佐藤英介、井上正康：家族性筋萎縮側索硬化症の病態と活性酸素代謝の細胞内局在特性、第 72 回日本生化学会、1999、10 横浜

今田伊助、佐藤英介、南山幸子、井上正康：新規化学発光試薬 L-012 による白血球活性酸素代謝動態と加齢との相関性の解析、第 72 回日本生化学会、1999、10 横浜

南山幸子、竹村茂一、今岡 進、豊国伸哉、船江良彦、井上正康：エンドトキシン肝障害におけるチトクローム P450 の役割と活性酸素・フリーラジカルの意義、第 72 回日本生化学会、1999、10 横浜

三好真美、西川 学、井上正康：胃粘膜細胞に対する NO の影響、第 72 回日本生化学会、1999、10 横浜

大西康代、西川 学、井上正康：NO の酸素依存性循環エネルギー制御能と生体チオールとの意義、第 72 回日本生化学会、1999、10 横浜

笠原恵美子、加柴美里、簡光章、井上正康：生体内アスコルビン酸の代謝動態、第72回日本生化学会、1999、10 横浜

井上正康、笠原恵美子、佐藤英介：酸化ストレスと疲労、第5回慢性疲労症候群研究会、2000、2 大阪

G. 知的所有権の取得状況

なし

分担研究報告書

老化による脳の虚血脆弱性に関する研究

—アデノウイルスベクターを用いたin vivo遺伝子導入による研究—

大星 博明

九州大学大学院 医学系研究科病態機能内科学 助手

分担研究報告書

老化による脳の虚血脆弱性に関する研究

- アデノウイルスベクターを用いた *in vivo* 遺伝子導入による検討 -

分担研究者 大星 博明 九州大学大学院医学系研究科病態機能内科

研究要旨 高血圧自然発症ラットを用いた血栓性遠位部中大脳動脈閉塞モデルにより、大脳皮質に局所脳虚血を作製し、adenoviral vector による遺伝子導入に対する局所脳虚血の影響について検討した。また、老齢高血圧自然発症ラットを用い、虚血脳への遺伝子導入効率を成熟動物と比較検討した。脳虚血後 90 分の時点で大腸菌 β -galactosidase の遺伝子を組み込んだ adenoviral vector を、大脳皮質内に注入し、脳内に導入された β -galactosidase の発現を組織化学的に判定した。導入遺伝子の発現は、虚血中心部では不良であったが、虚血辺縁部では発現が認められた。また、導入遺伝子発現の脳血流閾値は、安静時血流量の約 40% と考えられた。治療対象と想定される脳虚血辺縁部への遺伝子導入の有効性が示された。また、老齢動物の虚血脳での発現は、虚血 4 日後の時点では、成熟動物に比較して有意な差はなく、老齢動物の脳虚血に対しても、遺伝子導入が有効である可能性が示唆された。

A. 研究目的

我々はこれまでに高血圧自然発症ラットを用いて再現性の良い脳虚血モデルを開発し、脳虚血の病態生理についての基礎的検討を行うことで、虚血性細胞障害の抑制を目指した研究を進めてきた。また、高齢者では脳梗塞の発症が多いという事実から、加齢自体が脳虚血に及ぼす影響が重要な問題であると考え、老齢動物における脳虚血の病態について、形態学的あるいは生化学的な手法を用いて、成熟動物との比較検討を行ってきた。この結果、老化

に伴って虚血性脳神経細胞障害が増悪すること、すなわち、加齢による虚血脆弱性が存在することを認め、これを世界に先駆けて報告した。この老化による虚血脆弱性の機序については、さらに神経化学的・分子生物学的手法を用いた研究を継続し、脳内血行動態や脳虚血の際の神経伝達物質の大量放出、虚血に対するストレス応答蛋白の誘導などが関与していることを報告している。

今回の研究では、近年注目されている最新の分子生物学的手法である遺伝

子導入・遺伝子治療の技術を駆使することによって、さらに老化に伴う虚血脆弱性の機序を探求し、老年者の脳梗塞の病態解明、さらには治療へと結びつけていく重要な基礎データを得ることを目的としている。

B. 研究方法

成熟動物への遺伝子導入：雄性高血圧自然発症ラット (SHR 5-8 ヶ月齢) を使用して脳虚血を作製し、脳虚血部位への遺伝子導入の有効性を検討した。脳虚血の作製には、我々の教室で開発した krypton laser 照射と rose bengal の静注による血栓性遠位部中大脳動脈閉塞モデルを用いた。脳虚血作製前および後 10、30、60 分の時点で、後に vector を注入する皮質 (bregma 後方 1.5 mm の頭頂葉皮質、虚血側では正中より 2、3、4 mm、対側皮質では正中より 2 mm の部位) の脳血流量を laser Doppler flowmetry を用いて経時的に計測した。脳虚血作製後 90 分の時点で、前記の脳血流測定部位に 3×10^{10} pfu/ml の adenoviral vector を 5 μ l ずつ注入した。この adenoviral vector は、野生株が有する E1 遺伝子の部分を欠如しており、細胞内での増殖はできない。また、reporter gene として大腸菌の β -galactosidase 遺伝子である lacZ を E1 部分に組み込んでおり、CMV promoter によってその発現がコントロールされている。脳虚血作製後 1、4、7 日の時点で脳を灌流固定し、冠状切片を作製し、X-Gal 染色により β -galactosidase の発現を同定した。発現の程度は、肉眼的に 0-3

までの 4 段階に判定し、脳虚血との関係を検討した。

老齢動物への遺伝子導入：老齢雌性 SHR (19-21 ヶ月齢) を用い、脳虚血部位に対する遺伝子導入効率を成熟 SHR (5-7 ヶ月齢) と比較した。脳虚血作製には、既述の血栓性遠位部中大脳動脈閉塞モデルを用い、脳虚血作製後 60 分の時点で、皮質 (bregma 後方 1.5 mm の頭頂葉皮質、虚血側では正中より 2.7 および 4.0mm、対側皮質では正中より 2.7mm の部位) に adenoviral vector を 5 μ l ずつ注入した。脳虚血作製後 4 日の時点で非虚血部および虚血部位における標識遺伝子の発現を比較検討した。

C. 研究結果

成熟動物への遺伝子導入：脳虚血導入後の脳血流の変化は、虚血側では、虚血導入 10 分の時点ですでに血流低下がみられ、以後、虚血 60 分まで大きな変化は認めなかった。虚血の程度は、虚血中心部からの距離と相関し、正中から 2mm の部分 (I-2) では安静時の $74 \pm 7\%$ に、3 mm (I-3) で $38 \pm 5\%$ 、4 mm (I-4) では $21 \pm 2\%$ まで低下した。対側 2 mm (C-2) の血流は変化が認められなかった。

導入遺伝子の発現は、虚血 1 日後では、C-2 と I-2 の部分で著明に発現するが、虚血中心部に近い部分 (I-3, I-4) では発現は不良であった。しかし、虚血 4 日後では、虚血側の I-3 でも導入遺伝子の発現が著明に認められるものもあった。虚血 7 日では一般に虚血中心部に近い部分の発現は認めにくい

傾向があった。導入遺伝子の発現の程度を vector の注入部位別にみると、発現は虚血中心部に近いほど不良であったが、血流低下が認められる虚血辺縁部でも発現は認められた。また、発現の程度を、時間経過によって検討すると、虚血中心部での発現は各時間経過で不良であったが、虚血4日後に発現のピークがみられた。

虚血辺縁部に相当する I-3 の部分では、発現の程度と虚血 10 分での脳血流の関係をみると、score が 1 以下の発現不良な群では、score 2 以上の発現良好群に比し、脳血流が有意に低値であり ($32 \pm 2\%$ vs. $50 \pm 12\%$, $p < 0.05$)、安静時の 40%以下で発現が不良であることが示された。

老齢動物への遺伝子導入：老齢 SHR においても、vector 投与 4 日（虚血後 4 日）の時点で、非虚血部位への遺伝子導入は良好に認められた。虚血中心部での発現は不良であったが、虚血辺縁部では導入遺伝子の発現が認められた。老齢動物への導入遺伝子発現の程度は、成熟動物と比較して、明らかな違いは認められなかった。

D. 考察

アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入に対する脳虚血の影響を検討した結果、虚血中心部での導入遺伝子の発現は不良であるが、虚血辺縁部では発現が認められ、皮質での導入遺伝子の発現閾値が前値の約 40%であることが示された。また、今回の検討では、虚血辺縁部での導入遺伝子発現は認められたことから、ペナンプラ領域

に対する遺伝子導入が脳虚血の治療法として有効である可能性が示唆された。また、老齢動物と成熟動物の比較では、発現の程度に差は認められず、老齢動物の虚血脳においても遺伝子導入が、脳虚血の治療法として有効である可能性が示唆された。今後、導入遺伝子発現の時間経過や発現細胞についても詳細に検討し、治療可能な遺伝子の導入を行う予定である。

E. 結論

脳虚血に対する遺伝子導入において、虚血辺縁部ペナンプラ領域に対する遺伝子導入が脳虚血の治療法として有効である可能性が示唆され、老齢動物においても同程度の遺伝子導入の有効性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ooboshi H, Ibayashi S, Heistad DD, Fujishima M: Adenovirus-mediated gene transfer to cerebral blood vessels and ischemic brain - perivascular approach and ischemic threshold - . *Ischemic Blood Flow in the Brain*, Springer-Verlag, in press

Ooboshi H, Ibayashi S, Heistad DD, Fujishima M: Adenovirus-mediated gene transfer to cerebral circulation. *Mech Ageing Dev*, in press

大星博明: アデノウイルスベクターを用いた eNOS 遺伝子導入と血管反応. 血管と内皮 10: 35-41, 2000

大星博明: 脳血管障害における遺伝子治療の試み. pp69-74, Annual Review 神経 2000, 中外医学社, 2000

Lund DD, Faraci FM, Ooboshi H, Davidson BL, Heistad DD: Adenovirus-mediated gene transfer is augmented in basilar and carotid arteries of heritable hyperlipidemic rabbits. Stroke 30: 120-125, 1999

Christenson SD, Lund D, Ooboshi H, Faraci FM, Beverly, Davidson L, Heistad DD: Approaches to enhance expression after adenovirus-mediated gene transfer to the carotid artery. Endothelium 7: 75-82, 1999

大星博明, 井林雪郎, Donald D Heistad, 藤島正敏: 脳血管障害への遺伝子治療の試み - 非増殖性 adenoviral vector を用いた脳血管への遺伝子導入 -. Brain Hypoxia 13: 17-23, 1999

大星博明: 脳と分子生物学, 脳血管と遺伝子治療. 脳と循環 4: 373-377, 1999

大星博明, 井林雪郎, Donald D Heistad, 藤島正敏: 脳血管障害への遺伝子治療の試み. 最新医学 54: 326-330, 1999

大星博明, 井林雪郎, Donald D. Heistad, 藤島正敏: 脳血管障害への遺伝子導入の試み - アデノウイルスベクターを用いて -. 第76回日本生理学会大会: シンポジウム, 1999.3.28, 長崎

大星博明, 井林雪郎, 藤島正敏: アデノウイルスベクターを用いた eNOS 遺伝子導入と血管反応. 第8回生体内 NO フォーラム: シンポジウム. 1999.5.15, 神戸

Ooboshi H, Yao H, Ibayashi S, Fujishima M: Adenovirus-mediated gene transfer to ischemic brain - Ischemic flow threshold for transgene expression. XIXth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function (Brain '99), 1999.6.15, Copenhagen

大星博明: Prospect of gene therapy for cerebrovascular disease - Adenovirus-mediated gene transfer to brain and blood vessels -. 第9回脳血管シンポジウム: シンポジウム. 1999.9.4, 大阪

大星博明: アデノウイルスベクターを用いた動脈硬化血管への遺伝子導入. 第1回分子動脈研究会: 1999.9.16, 福岡

2. 学会発表

Ooboshi H, Ibayashi S, Heistad DD, Fujishima M: Adenovirus-mediated gene transfer to cerebral blood vessels and ischemic brain - Perivascular approach and Ischemic threshold -. The 6th Keio University International Symposia for Life Science and Medicine. Ischemic Blood Flow in the Brain: Symposium, 1999.11.25, 東京

Ooboshi H, Ibayashi S, Heistad DD, Fujishima M: Adenovirus-Mediated Gene Transfer to Cerebral Circulation. 第4回 NILS 国際ワークショップ: 1999.12.2, 大府

大星博明、豊田一則、井林雪郎、藤島正敏: アデノウイルスベクターを用いた脳血管への遺伝子導入. 日本心血管作動物質学会: シンポジウム, 2000.2.5, 福岡

G. 知的所有権の取得状況
なし

分担研究報告書

食物の抗酸化成分の探索と加齢病態の制御

大澤 俊彦

名古屋大学大学院 生命農学研究科食品機能科学研究室 教授

分担研究報告書

食物の抗酸化成分の探索と加齢病態の制御

分担研究者 大澤 俊彦 名古屋大学大学院生命農学研究科 教授

研究要旨 香辛料やハーブ、特に、「ゴマ種子」中の「抗酸化リグナン類」や、香辛料「ターメリック」として有名な「ウコン」中の「クルクミン類」とその抗酸化性代謝物「テトラヒドロクルクミン」の持つ老化制御機能について検討を進め、「抗酸化リグナン類」としては「セサミノール配糖体」の持つ遺伝的な動脈硬化発症の抑制、また、「クルクミン類」については抗酸化酵素や薬物代謝酵素誘導による生体防御能に対する予防効果の検討を行い、これらの食品因子の酸化ストレス制御機構について分子レベルからの解析を行った。

A. 研究目的

加齢病態の大きな原因の一つと考えられている「酸化ストレス」制御の可能性のある食品因子（フードファクター）の検索を進め、われわれが特に注目したのが「ゴマ」や「ターメリック」をはじめとするハーブやスパイスである。ゴマについては、「セサミノール」と命名した強力な抗酸化物質が、ゴマ油の精製工程で2次的に大量に生成するとともに、ゴマ種子の50%を占める脱脂粕中に存在する「セサミノール配糖体」を摂取したときに腸内細菌のもつβ-グルコシダーゼにより加水分解を受け、生体内で二次的に生産されることを明らかにしている。また、インド料理に不可欠な香辛料「ターメリック」は「ウコン」とも呼ばれ、沖縄では「うっちゃん茶」とか「ウコン茶」として広く愛飲されている。われわれ

は、この「ターメリック」の主成分である黄色色素が、摂取後、腸管吸収の際に還元されて強力な抗酸化物質「テトラヒドロクルクミン」に変換され、大腸がん予防効果を示すことを明らかにしてきた。

そこで、本年度は、これらの抗酸化活性体である「セサミノール」や「テトラヒドロクルクミン」の疾病予防の可能性として、第II相の酵素誘導も含めた抗酸化酵素誘導の可能性の検討を行うとともに、「セサミノール配糖体」については遺伝的な高脂血症のモデルである Watanabe Heritable Hyperlipidemia (WHHL) Rabbits を用いて、動脈硬化予防の可能性について検討を行った。

B. 実験方法

セサミノール配糖体は、n-ヘキサ

ンで脱脂後、熱水抽出により粗抽出物を得た後、分取用 HPLC で大量精製を行い、300 g のセサミノール配糖体 (SG) を得ることができた。また、動物は Watanabe Heritable Hperlipidemia (WHHL) Rabbits に対して 0.2% の SG を 12 週間投与した後に、種々の検討を行った。

また、クルクミン、テトラヒドロクルクミンは、ddY マウス (6 週令、雄) を 0.5% 含有餌を 4 週間投与した後に、種々の抗酸化酵素、薬物代謝系の誘導能を中心に検討を行った。

C. 研究結果

セサミノール配糖体 (SG) の投与により血清総コレステロールレベルには大きな差は見られなかったが、中性脂質レベルはコントロールに較べて有意に低下していた。

また、動脈硬化巢も、SG 投与群で有意に低下していた。脂質過酸化物の指標である TBARS の生成について検討を行ったところ、腎臓や肝臓では差は見られなかったが、血漿中では、SG 投与群で有意に低下しており、SG の酸化ストレス予防効果により、動脈硬化形成が抑制されたことが示唆された。さらに、SG 投与群では、解毒酵素として知られるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) を誘導される、という興味ある結果を得ることができた。

一方、クルクミンおよびテトラヒドロクルクミンのマウスへの投与の結果、抗酸化酵素である GPx はあまり変化しなかったが、SOD や Catalase には

有意な差が見られ、テトラヒドロクルクミンにより強い誘導能が見出された。さらに、解毒酵素誘導能である GST や NADPH キノンレダクターゼを有意に誘導し、特に、生体内代謝物である「テトラヒドロクルクミン」により強い誘導能が観測された。そこで、これらの誘導のメカニズムについて、蛋白、mRNA レベルでも検討を加え、NF- κ B の抑制にも関わることが明らかとなった。

D. 考察

われわれは、「フードファクター」(食品因子)としてのゴマリグナン類やクルクミン類に着目して研究を進め、本年度は、「セサミノール配糖体」が、コレステロール負荷による動脈硬化発症の抑制だけでなく、遺伝的な高脂肪血症に対しても「酸化ストレス」予防により抑制効果を示すことが明らかとなった。さらに、「クルクミン」や「テトラヒドロクルクミン」を用いて、最近、生体防御機構として注目を集めている「抗酸化酵素」や「解毒酵素」誘導の可能性について検討を行ったところ、クルクミン類、なかでも、「テトラヒドロクルクミン」に強力な酵素誘導能が見出された。

E. 結論

食品による加齢病態の制御の可能性は、ようやく、スタートしたばかりである。しかし、がんをはじめ動脈硬化や糖尿病合併症など生活習慣病とよばれる疾病の予防における食品への役割については、大きな期待が持たれてき

てええいる。実際の老化制御の可能性については、長期間の投与実験が必要となるが、われわれのグループは、本プロジェクトの主任研究者である長寿医療研究センター、木谷健一センター長のグループを中心に共同研究が既に進行中である。最終的な結論が出るまでにまだ時間を要するが、この分野の研究の進展に大きな期待がなされているものと確信する。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kato Y, Mori Y, Makino Y, Morimitsu Y, Hiroi S, Ishikawa T and Osawa T. Formation of N ϵ -(Hexanonyl)lysine in Protein Exposed to Lipid Hydroperoxide, A PLAUSIBLE MARKER FOR LIPID HYDROPEROXIDE-DERIVED PROTEIN MODIFICATION, The Journal of Biological Chemistry, 274 (29), pp20406-20414 (1999)

Okada K, Wangpoengtrakul C, Osawa T, Toyokuni S, Tanaka K and Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal-mediated impairment of intracellular Proteolysis during Oxidative Stress. J. of Biol. Chem., 274 (34), 23787-23793, (1999)

Uchida K, Shiraishi M, Naito, Y, Torii Y, Nakamura Y and Osawa T. Activation of Stress Signaling Pathways by the End Product of Lipid Peroxidation. J. of Biol. Chem., 274 (4), 2234-2242, (1999)

Inano H, Onoda M, Inafuku N, Kubota M, Kamada Y, Osawa T, Kobayashi H and Wakabayashi K. Chemoprevention by Curcumin during the Promotion Stage of Tumorigenesis of Mammary Gland in Rats Irradiated with Gamma-Rays, Carcinogenesis, 20, 1011-1018 (1999)

M-H, Kang *et al.*, Dietary Deffated Sesame Flour Decreased the Susceptibility to Oxidative Stress in Hypercholestrolemic Rabbits, J. Nutri., 129, 1885-1890 (1999)

Kang M-H, Naito M, Sakai K, Uchida K and Osawa T. Mode of Action of Sesame Lignans in Protecting Low-density Lipoprotein against Oxidative Damage *in vitro*, Life Sciences, 66, 161-171 (2000).

大澤俊彦、沖縄に特有のフードファクターと医食同源、FOOD STYLE 21、3(7), 30-34 (1999)

大澤俊彦、天然抗酸化物質の探索とその応用、化学と生物、37(9), 616-624 (1999)

大澤俊彦、リグナン類の機能性：特にゴマリグナンを中心に、日本油化学会誌、48, 1041-1048 (1999)

2. 学会発表

Osawa T. Physiological Activity of Dietary Phenolic Antioxidants, Functional Foods Symposium, 10th World Congress of Food Science and Technology, Sydney, Oct., 1999.

Okada K, Nakagawa S, Wangpoengtrakul C, Toyokuni S, Uchida K and Osawa T. Effects of Curcumin and Tetrahydrocurcumin on Induction of Antioxidative Enzymes. 2nd ICoFF Satelite Symposium "Oxidative Stress and Disease Prevention", December 19-20, 1999, Okinawa.

大澤俊彦、抗酸化ストレスシステムと食品、シンポジウム「食と健康/生命の研究フロンティア」、日本農芸化学会 1999 年度大会（福岡）、1999 年 4 月

大澤俊彦、色素と健康をめぐって、ifia JAPAN '99（東京）、1999 年 6 月

大澤俊彦、老化と脂質酸化、日本脂質栄養学会特別講演（福山）1999 年 9 月

G. 知的所有権の取得状況

なし

分担研究報告書

フリーラジカル由来腎障害における地榆の評価

横澤 隆子

富山医科薬科大学 和漢薬研究所 助教授