

200718002A

---

生体内酸化ストレスによる老年性疾患の発症機構の解明と予防

---

厚生労働省科学研究費補助金 長寿科学総合研究事業

平成19年度 総括研究報告書

平成20年3月

研究代表者 石 井 直 明

東海大学医学部教授

生体内酸化ストレスによる老年性疾患の発症機構の解明と予防

主任研究者 石井 直明 東海大学医学部 教授

分担研究者 丸山 直記 東京都老人総合研究所 副所長

研究要旨：ミトコンドリアから生じる活性酸素が原因となる老年性疾患の発症機構を解明し、その予防方法を見出すことを目的とした。これまで、ミトコンドリアの電子伝達系複合体 II のサブユニットである SDHC の変異遺伝子を導入したマウス(*mev-1* マウス)はさまざまな臓器で過剰な活性酸素を発生し、アポトーシスを生じることで不妊や視力障害などの症状が見られることを報告した。平成 19 年度は、この *mev-1* マウスが生理的老化のモデル動物になりうるかを検証するために、野生型マウスの加齢による酸化ストレスの変化を調べ、*mev-1* マウスと同様なことが起こっていることを確認した。また線虫、*C. elegans* の研究から漢方的一种、大黄が活性酸素の発生を抑制し、寿命延長効果を示した。

A. 研究目的

酸素は生命活動に必要な ATP の生合成に不可欠だが、体内に取り込まれた酸素の数%はミトコンドリア電子伝達系（主に複合体 I と III）から漏出した電子により 1 電子還元を起こしスーパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ ) となる。そして  $O_2^-$  は代謝され過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) やヒドロキシラジカル ( $\cdot OH$ ) となる。これらは活性酸素種 (ROS) と呼ばれ、他の物質との反応性が非常に高く、細胞内構成成分を酸化することで機能異常を引き起こし、老化の促進や様々な疾患の原因となるとされる。本来、ミトコンドリアで発生した  $O_2^-$  は抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) により  $H_2O_2$  となり、さらにカタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-Px) により無害な  $H_2O$  へと代謝されることで、生体は ROS による障害を防ぎつつ ATP を合成している。

生理的老化とは、加齢とともに徐々に進行していく臓器の機能の低下と、生体の内部を一定にしようとする働き（ホメオスタシス）の機能減退から生じる現象である。近年のトランスジェニックあるいはノックアウト動物における研究より、ミトコンドリアにおける  $O_2^-$  発生と抗酸化酵素のバ

ランスが老化や老年性疾患に重要であると推測される事例が多数報告されている。しかし、哺乳動物における生理的な老化がこのような機構により生じることを明確に説明するにはまだ不十分である。 $O_2^-$  と生理的老化の因果関係は、加齢における様々な器官での上記機構の総合的な変化について研究することなしには評価できない。ここで我々は、近交系マウス (C57BL/6J) の脳、心臓、筋肉、眼、腎臓におけるミトコンドリアからの  $O_2^-$  発生量、ミトコンドリアの抗酸化酵素活性、ミトコンドリア電子伝達系複合体活性、アポトーシスの誘導やエネルギー代謝の指標となりえる体温の加齢変化を総合的に明らかにしたことを述べる。そして、ミトコンドリアから発生する  $O_2^-$  が生理的老化を引き起こす最初のステップである仮説を支持する。さらに我々は加齢においてミトコンドリアから発生する  $O_2^-$ 、酸化障害そしてアポトーシスの誘導が密接に関与し生理的老化を引き起こしていることを示唆する結果を得たので報告する。

生薬や漢方薬の中には、まだ未解明ではあるが、ヒトの健康維持・増進や疾患の治療に有用なものが多数含まれていると考えられる。個々の漢方薬についての研究は精力的に行われているが、多く

の試料を網羅的におこなうような研究は少ない。

表皮、神経、筋肉、消化器系、生殖系など、動物としての必要最低限の体制を整えている線虫の一種である *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) は、最長寿命が約 30 日であることから老化の研究に盛んに用いられている。本研究では、*C. elegans* の寿命を簡易に測定するシステムを開発し、それを用いた生薬や漢方に含まれる抗老化活性物質の探索を目的とした。

## B. 研究方法

### 1. マウス

#### (1) 実験動物

マウスは 2、6、12、24 ヶ月齢の C57BL/6J を使用した。実験動物は 22±1°C、湿度 40% の SPF 環境下、12 / 12 時間の明暗サイクルで常に飼育しているものであり、飼料は滅菌済み CE-2 (水分 9.3%、粗蛋白 25.8%、粗脂肪 4.5%、粗繊維 4.5%、粗灰分 6.7%) (CLEA Japan, Inc.)、水は塩素による殺菌水を任意に与えた。我々は生後 28 日で親マウスから仔マウスを隔離し、雄および雌をそれぞれ別ゲージに 4 匹ずつ集め飼育した。またマウスは毎日チェックをして、死が差し迫ったと判断したマウスは苦しみを減らすために実験動物ガイドラインにしたがって安楽死を行った。さらに実験は動物実験ガイドラインに従い適正に行われた。

#### (2) ミトコンドリアおよび細胞質画分の単離

前日より断食させたマウスをネブタール麻酔下で頸椎脱臼させ、断頭、放血して速やかに開腹し、各臓器を取り出した。氷冷した PBS で洗浄後、各組織の 9 倍量の MS buffer (210mM マンニトール、70mM スクロース、0.1mM EDTA、5mM Tris-HCl、pH 7.4) 中で細切した。その後、ルーズなテフロンホモジナイザーを用いて 300–800rpm で 10–30 ストロークホモジナイズし、350×g で遠心し、粗雑物を除去した。上清を別のチューブに移し、17500×g で 10 分遠心し上清を細胞質画分とした。そして遠心後の沈殿を 1ml の MS buffer で洗ったのち、TE buffer (50mM Tris-HCl、pH 7.4、0.1mM EDTA)

で懸濁し、ミトコンドリアに富んだ粗ミトコンドリア画分サンプルとした。蛋白質量は BCA protein assay kit (PIERCE, ROCKFORD, IL) を用いて測定した。

#### (3) マンガン・スーパーオキシドジスムターゼ (Mn-SOD) 活性の測定

Mn-SOD の酵素活性は、SOD assay kit-WST (DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC.) を用いて測定した。測定には 40 μg の粗ミトコンドリア画分を用いた。

#### (4) スーパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ ) の測定

スーパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ ) は酸素の 1 電子還元によりミトコンドリアで産生される。 $O_2^-$  産生量の測定には、化学発光プローブとして MPEC (2-methyl-6-p-methoxyphenylethynyl-imidazopyrazinone) (ATTO Co., Tokyo, Japan) を使用した。MPEC は従来の方法の MCLA (ウミホタルルシフェリン類似化合物) よりスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) と特異的に反応し、溶存酸素との反応性が低い利点がある (28)。60 μg の粗ミトコンドリア画分を 1ml の assay buffer (50mM HEPES-NaOH, pH 7.4, 2mM EDTA, 0.7 μM MPEC) に加え、光子計数器である AB-2200 type Luminescencer-PSN (ATTO Co., Tokyo, Japan) を用いて 37°C にて測定した。

#### (5) ウェスタンブロッディング

粗ミトコンドリア画分および細胞質画分を等量の 2×sample buffer (0.125M Tris-HCl (pH 6.8), 10% 2-Mercaptoethanol, 4% SDS, 10% Sucrose, 0.004% Bromophenol blue) と懸濁し、12.5% のポリアクリルアミドゲルにて泳動を行い、PVDF 膜 (polyvinylidene difluoride 膜) (ATTO CO., Tokyo, Japan) へトランスファーし、抗体反応を行った。抗体は GAPDH (IMGENEX)、および Cytochrome c (BD Pharmingen) を用いた。二次抗体には一次抗体に対する HRP 標識抗体を用いた。その後 ECL plus western blotting detection system (GE Healthcare) を用いて発光させ LAS-3000 mini (Fji

film, Co., Tokyo Japan) で検出した。GAPDH および Cytochrome c は細胞質画分 20  $\mu$ g–60  $\mu$ g を使用した。

#### (6) シトクローム c オキシダーゼ (COX) 活性の測定

ミトコンドリアの内膜には、電子伝達系を構成する 4 つの複合体がある。電子は最終的に複合体 IV であるシトクローム c オキシダーゼ (COX) へと送られ ATP が合成される。

40  $\mu$ g の粗ミトコンドリア画分を 0.02% の laurylmaltoside (DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES, INC) を含んでいる 50  $\mu$ l の 0.1M リン酸カリウム buffer (pH 7.4) に懸濁した。そして 100  $\mu$ l の基質溶液 (4mM DAB (3,3' - Diaminobenzidine Tetrahydrochloride)、100  $\mu$ M 還元型シトクローム c、2  $\mu$ g/ml カタラーゼ) を加え分光光度計 (Spectra Max 250) (Molecular Devices) を使用し 450nm にて 20 分にわたり測定した(3, 30)。

#### (7) カルボニル化蛋白質の測定

250ng の粗ミトコンドリア画分を 100  $\mu$ l の 50mM NaHCO<sub>3</sub> に懸濁しエライザプレート (Caster) にて 12 時間 4°C で固相化した。上清を除き blocking buffer (3% BSA, 0.1% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in PBS) を 1 well あたり 100  $\mu$ l 入れ 1 時間、37°C でブロッキングした。上清を捨て、buffer G (0.1% BSA, 0.1% gelatin, 0.1% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub> in PBS) で DNPH 抗体を希釈したものを 1 well あたり 100  $\mu$ l 入れ 1 時間、37°C で抗体反応を行った。上清を除いて PBS で 4 回洗い、二次抗体を 0.05% Tween 20 - PBS で希釈し 1 well あたり 100  $\mu$ l 入れ 1 時間、37°C で抗体反応を行った。上清を捨て PBS で 4 回洗い、ELISA 発色液 (0.0156 mol/l C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>, 0.1 mol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-12H<sub>2</sub>O, 0.4 mg/ml o-Phenylenediamine dihydrochloride, 0.2  $\mu$ l/ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) を 1 well に 100  $\mu$ l ずつ入れ室温で 5–40min 反応させた。ストップソリューション (1mol/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) を 100  $\mu$ l 入れ反応を止め、分光光度計 (Spectra Max 250) (Molecular Devices)

を使用し 492nm にて吸光度を測定した。

#### (8) 免疫組織染色

マウス組織を速やかに摘出後、免疫組織化学的解析のため optimal cutting temperature (OCT) compound (Lab-Tek) に包埋し、ドライアイス - エタノール液で氷冷したイソペンタンの中に入れ氷結させた。蛍光標識のために、凍結切片 (7  $\mu$ m) を冷アセトンで固定し、ヤギ血清でブロッキングした。その後、二次抗体である  $\alpha$  - Mouse Ig Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) と前もって結合させた 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG) 抗体 (Nikken SEIL, Shizuoka, Japan) にてウェットチャンバー内で 4°C、12 時間反応させ、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510 META) (Carl zeiss Co., Ltd.) で確認した。

#### (9) 体温測定

マウスの体温は、直腸温度を指標として行った。直腸温度の測定には直腸検査プローブ (Microprobe thermometer BAT-12) (Muromachi Kikai CO., LTD.) を使用した。マウスの不快とストレスを最小限にするため、測定は一日に一度とし、同個体で複数回測定を行うときは 3 日間以上の休息を与えた。さらに測定は全て同時刻に行った。

### 2. *C. elegans*

*C. elegans* は雌雄同体であるために自家受精により次世代が産まれてしまう。これまでは、それを防ぎ、寿命測定に必要な同調培養を行うために、生殖機能を阻害する薬剤である FudR を用いてきた。この薬剤の線虫に対する目的以外の作用を排除するため、*fer-15* 突然変異体を用いた。*fer-15* は低温飼育 (20°C) では野生株の性質を示すが、高温 (25.5°C) で飼育すると次世代の産生が抑制される突然変異体である。この利点を利用し、増殖時には 20°C で飼育し、寿命測定を 25.5°C でおこなった。飼育は大腸菌を餌として液体培地中でおこなった。それぞれのフラスコには約 2,000

匹の第1期幼虫を加え、4日後成虫に育った時点で、測定する物質とともに、餌の量を一定にするためにアンピシリンを加えて、大腸菌の増殖を抑制した。数日ごとに一部を取り虫の生死の割合を調べた。このシステムを利用して、(株) ツムラより提供された26種類の漢方薬と生薬の寿命を指標とした抗老化作用を調べた。

## C. 研究結果

### 1. マウス

#### (1) ミトコンドリアから発生する $O_2^-$ と Mn-SOD 活性の加齢変化

まず始めに、我々は2、6、12、24ヶ月齢のマウスの脳、心臓、筋肉、眼、腎臓を用いてミトコンドリアから発生する  $O_2^-$  量の加齢による変化を  $O_2^-$  特異的発光物質(MPEC)を用いて測定した(図1A)。その結果、脳では2ヶ月齢に比べ6、12、24ヶ月齢それぞれにおいて  $O_2^-$  の有意な増加を確認した。さらに眼、腎臓では2ヶ月齢に比べ12、24ヶ月齢それぞれで  $O_2^-$  の有意な増加を確認し、これらの臓器では加齢に伴い  $O_2^-$  発生量が有意に増加したことを明らかにした。一方で、心臓では加齢によりその発生量は変化せず、筋肉では24ヶ月齢において他の月齢と比べその発生量は有意に低下した。

次に抗酸化酵素の一つであるミトコンドリアのSOD活性(主にMn-SOD活性)の加齢変化を測定した(図1B)。その結果、脳では12、24ヶ月齢において2ヶ月齢に比べほんの数%であるが有意な低下を示した。心臓では24ヶ月齢で、筋肉では6、12ヶ月齢で2ヶ月齢に比べその活性は有意な上昇を示したが、これら臓器においてMn-SOD活性は加齢に準じた増減を示さなかった。また、眼、腎臓では加齢による変化は認められなかった。

#### (2) シトクロームcオキシダーゼ(COX)活性の加齢変化

ミトコンドリアの内膜には、電子伝達系を構成する4つの複合体がある。電子は最終的に電子伝達系複合体IVであるシトクロームcオキシダーゼ(COX)へと送られATPを合成する。ゆえに、ミト

コンドリアの機能を評価する上でCOX活性は重要な指標となるため、この酵素活性の加齢による変化を測定した。

その結果、脳、心臓、筋肉においてその酵素活性の加齢による変化は認められなかった(図2A, B, C)。一方で、眼および腎臓においては加齢によりその活性は有意に低下し続け、24ヶ月齢では2ヶ月齢に比べ約20%その活性は低下していた(図2D, E)。

#### (3) ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)の加齢変化

ミトコンドリアから発生する  $O_2^-$  を起因としたDNAの酸化損傷の指標として各臓器における8-OHdG蓄積量の加齢変化を免疫組織染色により測定した。その結果、脳では大脳皮質、海馬共にその蓄積量は加齢により増加していた。さらに小脳においても同様の変化を示した(data not shown)。心臓、筋肉(大腿二頭筋)では変化は小さいながら8-OHdGの加齢による増加が確認された。眼では網膜色素上皮層、感覚網膜、および角膜上皮層において加齢による8-OHdGの蓄積増加が顕著であった。さらに腎臓においても加齢に伴った増加が確認された(図3)。

#### (4) カルボニル化蛋白質の加齢変化

カルボニル化蛋白質は酸化蛋白質の指標として用いられている。 $O_2^-$ の大部分がミトコンドリアより産生されることからミトコンドリア自身は障害を受けやすく、細胞質よりミトコンドリアのカルボニル化蛋白質は蓄積しやすいという概念のもと、粗ミトコンドリア画分におけるカルボニル化蛋白質蓄積量を測定した。その結果、2ヶ月齢の弱齢マウスにおける各臓器のカルボニル化蛋白質蓄積量は脳、心臓、筋肉に比べ、眼、腎臓で約2倍であった(data not shown)。この蓄積量は、加齢により脳と心臓で増加傾向を示したが有意な差は認められなかった(図4A, B)。一方、筋肉、眼、腎臓では加齢による有意な蓄積増加が確認された。2ヶ月齢と24ヶ月齢を比較すると、筋肉では約1.2倍、

眼では約 2.3 倍、腎臓では約 1.5 倍の有意な蓄積増加が確認された (図 4 C, D, E)。

#### (5) アポトーシス誘導の加齢変化

正常な生細胞においてシトクローム c はミトコンドリアに分布している。ところが、酸化障害や薬剤等によりアポトーシスのシグナルが誘導されると、シトクローム c はミトコンドリアから細胞質へ移動する。そしてタンパク分解カスパーゼカスケードを活性化し、最終的にアポトーシスを導く。

そこでアポトーシス誘導の指標となるミトコンドリアからのシトクローム c の細胞質へのリリース量の加齢変化を測定した。その結果、脳、眼、腎臓において細胞質におけるシトクローム c 存在量は加齢に伴い有意に増加した。2 ヶ月齢と 24 ヶ月齢を比較すると、脳では 2.2 倍、眼では 13.3 倍、腎臓では 3.5 倍の増加が確認された (図 5 A, D, E)。一方で心臓、筋肉ではそのリリース量の加齢での変化は認められなかった (図 5 B, C)。

#### (6) 体温の加齢変化

エネルギー代謝を熱産生量とすると、体温はエネルギー代謝の指標の一つとなり得る。そこで、マウス直腸における温度の加齢変化を測定した。その結果、体温は加齢に伴い有意な低下を示した。12 ヶ月齢では 6 ヶ月齢と比べて約 0.53°C、24 ヶ月齢では 12 ヶ月齢と比べて約 0.55°C の低下が認められた (表 1)。

### 2. *C. elegans*

この 26 種類の中の多くは *C. elegans* の寿命に変化をもたらさなかったが、生薬である大黄 (ダイオウ) が寿命を延長させる効果を示した (図 6)。初期実験であるが、大黄にはミトコンドリアから発生する活性酸素 (superoxide) の量を抑制する強い抗酸化能がある可能性が示唆された。

一方、数種類が寿命を短縮させる作用を持っていた。この作用を示すものには生薬が多く、抗菌作用を示す芍薬 (シャクヤク) や牡丹皮 (ボタン

ピ)、抗ウイルス作用を示す麻黄 (マオウ) が含まれており、さらに解熱や解毒作用をもつ甘草 (カンゾウ)、生姜 (ショウキョウ)、柴胡 (サイコ)、黄芩 (オウゴン)、麻黄 (マオウ) が含まれるという興味ある結果が得られた。

### D. 考察

生理的老化とは、加齢とともに徐々に進行していく臓器の機能の低下と、恒常性維持機構の減退から生じる生体機能の低下である。早老や老年性疾患の発症促進は  $O_2^-$  を始めとする ROS と抗酸化酵素のバランスが崩れることが一因となり生じることが遺伝子改変動物を用いた研究により明らかになりつつある。しかし、このような研究だけでは、生理的な老化が上記機構によるものであるかを明確に説明するには不十分となる。 $O_2^-$  と生理的老化の因果関係は、加齢における様々な器官での  $O_2^-$  を中心とした上記機構の総合的な変化について研究することなしには評価できない。そこで我々は、近交系マウス (C57BL/6J) の脳、心臓、筋肉、眼、腎臓におけるミトコンドリアからの  $O_2^-$  発生量、ミトコンドリアの抗酸化酵素活性、ミトコンドリア電子伝達系複合体活性、アポトーシスの誘導やエネルギー代謝の指標となりえる体温の加齢変化を総合的に明らかにし、 $O_2^-$  と生理的老化の関係性を見出すことを目的とした。

まず始めに我々は、ミトコンドリアから発生する  $O_2^-$  量の加齢変化を確認した。 $O_2^-$  の加齢変化を測定した例は家蠅、線虫においては報告がある (5, 33)。我々のマウスを用いた解析結果では、脳、眼、腎臓において加齢によりミトコンドリアから発生する  $O_2^-$  量は増え、心臓では変化せず、筋肉では有意に減少した (図 1 A)。脳、腎臓は組織 g あたりの血流量が非常に多く、体内で消費される酸素の約 20% が脳、腎臓それぞれにおいて消費される。このような臓器はエネルギー代謝量が高くミトコンドリアでの  $O_2^-$  生成が促進されていることが考えられる。また眼においては、生体外からの酸素ストレスおよび紫外線の影響が直接反映される臓器であることから、 $O_2^-$  が加齢においてより

増加したひとつの要因ではないかと推察される。現に、高濃度酸素下におかれたマウス早産児は、未熟児網膜症を起こし、紫外線が一因となる黄斑変性症の発症率は加齢に伴い増加する。このように、脳、腎臓、眼では過剰に発生した $O_2^-$ が抗酸化酵素の消去能力を超え逸脱し酸化障害を引き起こす。そしてその障害が更なる $O_2^-$ 発生量の増加を引き起こす悪循環に陥り、加齢により $O_2^-$ 発生量が増加する要因になったものと考えられる。また、筋肉では24ヶ月齢の老齢マウスで $O_2^-$ 発生量は低下した(図1A)。24ヶ月齢では筋肉(大腿二頭筋+ヒラメ筋)の湿重量が他の月齢のマウスに比べ約33%低下しており( $P < 0.001$ ) (data not shown)、 $O_2^-$ 発生量の低下は筋線維量の低下によるエネルギー代謝の低下で生じたと考えられる。筋肉での加齢による筋肉湿重量の低下、エネルギー代謝量の低下は以前の報告(4)と一致する上に、エネルギー代謝を熱産生量と考えると我々の研究において体温が加齢により低下したことからもこの考察は正しいと思われる(表1)。心臓においては、活性酸素発生量は加齢により変化しない(図1A)ことから、心臓の加齢による機能低下、あるいは疾患発症に $O_2^-$ は直接関与していないように思える。

$O_2^-$ の大部分はミトコンドリアから発生する。すなわち、この $O_2^-$ を即座に消去するのがミトコンドリアに局在している抗酸化酵素 Mn-SOD であり、その重要性は大きい。そこで加齢における Mn-SOD の活性変化を測定した。その結果、脳において、加齢によりほんの数%の活性低下がみられたが、心臓、筋肉、眼、腎臓においては加齢に準じた活性の増加あるいは減少は示さなかった。これまでの報告より、ヒト白血球における Mn-SOD は加齢により殆ど変化せず、さらにラットにおける幾つかの臓器でも Mn-SOD 活性は、加齢により殆ど変化していない。このように Mn-SOD はつねに臓器固有のある一定量の活性を常に維持し、ミトコンドリアから発生する $O_2^-$ を一定量消去するものであり、加齢によりその活性は大きく変化はしないと考えられる。我々の解析結果から、各臓器における $O_2^-$ 発生量の加齢変化と Mn-SOD 活性の加齢変化が一致して

いないことから Mn-SOD がミトコンドリアからの $O_2^-$ 発生量を規定するものでは無いことが示された(図1A, B)。

脳、眼、腎臓では Mn-SOD 活性は加齢により著しい変化を示していないため、これら臓器の加齢による $O_2^-$ 発生量の増加は、ミトコンドリア電子伝達系の損傷による機能低下が一因で生じることが考えられた。シトクローム c オキシダーゼ (COX) は電子伝達系複合体IVであり、この活性はしばしばミトコンドリア機能の指標として使われる。そこで、COX 活性の加齢による変化を測定したところ、 $O_2^-$ が加齢により著しく増加した眼、腎臓において COX 活性の加齢に伴う有意な低下が確認された(図2D, E)。このことから眼、腎臓の $O_2^-$ 増加はミトコンドリア電子伝達系から発生し、消去し切れなかった $O_2^-$ が電子伝達系複合体構成蛋白質自身を障害し $O_2^-$ 発生量をさらに増加させるという悪循環の結果であろうと推測された。このように、眼、腎臓における加齢にともなうミトコンドリア機能の低下は臓器機能の低下を意味し、生理的老化を引き起こす重要な要因のひとつになりえる。

$O_2^-$ は近傍の DNA、蛋白質、脂質を酸化させ老化を進行させる。そこで、様々な動物種の組織において、加齢と共に増加するとされている、老化マーカー(8-OHdG、カルボニル化蛋白質)の加齢変化を調べた。その結果、我々の実験においてもすべての臓器で酸化 DNA の指標である 8-OHdG の加齢に伴う増加が定性的に確認された(図3)。興味深いことに、 $O_2^-$ 発生量が加齢により増加した脳、眼、腎臓で加齢によるその蓄積の増加は顕著であった(図3A, B, E, F, G)。眼に関しては、特に網膜色素上皮、感覚網膜および角膜の上皮層に変化は顕著であり(図3, E, F)、この結果はドライアイモデルマウス、および Cu/Zn-SOD ノックアウトマウスの結果と一致する。次に、酸化蛋白質の指標であるカルボニル化蛋白質の定量的な測定を行った。その結果、加齢による $O_2^-$ の増加および COX 活性の低下が著しかった眼、腎臓で顕著な増加が確認された。また筋肉においても若干の有意な増加が認められた。脳、心臓においては加齢による

増加傾向はあったが有意ではなかった (図 4)。酸化障害についてのこれらの結果は、常に発生している  $O_2^-$  による障害の蓄積と、加齢によりその発生量が増加したことによる障害蓄積増加の 2 つの現象を総合的に表しているものと考えられる。さらに眼、腎臓におけるカルボニル化蛋白質は、2ヶ月齢の弱齢マウスにおいて脳、心臓、筋肉に比べ約2倍と高い蓄積量を示していた (data not shown)。このことは、潜在的に眼、腎臓が  $O_2^-$  による酸化障害を蓄積しやすい臓器であることを意味している。

細胞内構成成分に  $O_2^-$  による酸化障害が蓄積すると、細胞は機能異常、機能低下を引き起こす。そのような細胞はプログラム細胞死であるアポトーシスを誘導し、正常な状態を保とうとする防御機構が働く。そこで我々は各臓器でのアポトーシスの誘導の加齢変化を確認したところ、脳、眼、腎臓において有意にアポトーシス誘導が増加していた (図 5 A, D, E)。非常に興味深いことにこの結果は、加齢による  $O_2^-$  発生量の増加、および、酸化障害の蓄積増加と高い相関性があった。

これまでの哺乳動物における老化研究は単一臓器あるいは単一因子を対象として行うことが多く、研究対象の臓器特性により結果の相違が生じることがしばしば有り不明瞭の部分が多かった。しかし、我々が行った多臓器多因子の比較解析により、 $O_2^-$  と生理的老化との関係を明確に示すことができた。

我々の研究より、生理的老化はミトコンドリアの  $O_2^-$  発生量の増加に起因した酸化障害の蓄積、その蓄積によるアポトーシスの過剰誘導による臓器萎縮、機能低下により生じると結論づけられた。そしてこの機構は、臓器によりその度合いは区々であり、脳、眼、腎臓といった臓器では上記機構が強く影響し、生理的老化を引き起こしていると考えられた。ミトコンドリアより  $O_2^-$  を過剰発生させた線虫、細胞株ではこれら一連の機構が著しく促進し、早老あるいは細胞老化が促進することが明らかであることから、 $O_2^-$  が生理的な老化を引き起こす起因となる因子であることが示唆された。また、線虫においては加齢による著しいエネルギー

一代謝の低下により  $O_2^-$  発生量は増加しない。我々の研究においても加齢により体温の低下を示したことから (表 1)、筋肉のみならず他の臓器のエネルギー代謝も同様に低下している可能性が考えられ、 $O_2^-$  発生量を抑制する方向に働く現象も加齢により同時に生じているのかもしれない。

我々が開発した、「線虫の寿命を指標とした、新規生理活性物質スクリーニング法」により、coenzyme  $Q_{10}$  や漢方的一种である大黃ミトコンドリアから発生する活性酸素 ( $O_2^-$ ) の発生量を抑制することを見出した。また漢方や生薬の中には寿命を短縮する効果があるものも見出され、寿命に変化をもたらす生理的活性を持つ物質の探索に有用なシステムであることが示唆された。

## E. 結論

今回の結果は他の臓器についても一般化できるかは不明確であり、臓器特性やエネルギー代謝もより考慮する余地があるため、更なる研究が望まれる。最後に、我々のこの研究は生理的老化のプロセスにおいて基礎をなしているメカニズムを理解するために提供する。

また、生体内の活性酸素量の発生量の8割がミトコンドリアから発生していることを考えると、ここから発生する活性酸素の量を抑制する物質を見出すことが重要と思われる。我々が *C. elegans* で開発したシステムを使い、すでに漢方的一种である大黃がミトコンドリアからの活性酸素量を抑制し、寿命を延長させる効果を持つことを見出したことから、このシステムがそのような物質の探索に最適であることが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Miyazawa M, Ishii T, Kirinashizawa M, Yasuda K, Hino O, Hartman PS, Ishii N: Cell growth of the mouse SDHC mutant cells was suppressed by apoptosis throughout mitochondrial pathway, *BioScience Trends*, 2: 22-30, 2008



- Yamaguchi T, Onodera A, Yasuda K, Nishio Y, Arai M, Tsuda M, Miyazawa M, Hartman PS, Ishii N: A low cost and quick assay system using the free-living nematode *Caenorhabditis elegans* to determine the effects of Kampo medicine on life span, AATEX 13: 1-10, 2008
- Ishii N, Ishii T, Hartman PS: The role of the electron transport SDHC gene on lifespan and cancer, Mitochondrion 7: 24-28, 2007
- Tuda M, Sugiura T, Ishii T, Ishii N, Aigaki T: A *mev-1* life dominant-negative SdhC increases oxidative stress and reduces lifespan in *Drosophila*, Biochem. Biophys. Res. Com. 363: 342-346, 2007
- Ishii N: Role of oxidative stress from mitochondria on aging and cancer, Cornea 26: S3-S9, 2007
- Sakashita T, Hamada N, Suzuki M, Ikeda DD, Yanase S, Ishii N, Kobayashi Y: Effects of  $\gamma$ -ray irradiation on olfactory adaptation to benzaldehyde in *Caenorhabditis elegans*, Biological Sciences in Space 21: 117-120, 2007
- Sakashita T, Hamada N, Ikeda DD, Yanase S, Suzuki M, Ishii N, Kobayashi Y: Modulatory effect of ionizing radiation on food-NaCl associated learning: the role of  $\gamma$  subunit of G protein in *Caenorhabditis elegans*, FASEB J. 22: 713-720, 2007
- 石井直明 寿命および寿命関連遺伝子 医学のあゆみ、222 : 299-303、2007
- 石井直明、桑平一郎（監修） 専門医がやさしく教える老化予防&アンチエイジング P H P 出版、2007
2. 学会発表
- 石井直明：老化のメカニズム、第27回 日本医学会総会、大阪、2007、4、8
- 石井直明：ミトコンドリアから活性酸素を過剰発生させたモデル動物の解析。エイジング・バイオストレス・メタボリズム研究会、京都市 2007.4.
- 宮沢正樹、石井恭正、安田佳代、切無沢美香、石井直明：加齢に伴うレドックス制御と酸化障害の変化、日本基礎老化学会 第30回大会、札幌、2007、6
- 須田斎、正山哲嗣、尾崎貴美、石井直明：線虫 *C. elegans* における老化・寿命の定量的解析、日本基礎老化学会 第30回大会、札幌、2007、6
- Onodera A, Yanase S, Ishii T, Yasuda K, Miyazawa M, Hartman PS, Ishii N: X rays-irradiation-mediated hormesis of post-dauer life span, 16<sup>th</sup> International *C. elegans* meeting, LA, USA, 2007, 6
- Shouyama T, Oxaki T, Ishii N, Shuda H: Quantitative analysis between longevity and aging in *C. elegans*, 16<sup>th</sup> International *C. elegans* meeting, LA, USA, 2007, 6
- Yanase S, Ishii N: HOrmesis-indeuced lifespan extention decreased mitochondrial superoxide radical levels via Ins/IGF-1 signaling pathway in *C. elegans*, 16<sup>th</sup> International *C. elegans* meeting, LA, USA, 2007, 6
- Yasuda K, Hartman PS, Suda H,

Akatsuka A, Ishii T, Ishii N: The role of mitochondrial fusion in aging and oxidative stress in *C. elegans*, 16<sup>th</sup> International *C. elegans* meeting, LA, USA, 2007, 6

Ishii N: Mitochondrial dysfunction and aging, Neuro 2007, Yokohama, 2007, 9

Ishii N: The role of oxidative stress from mitochondria on aging, The 8<sup>th</sup> Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology and Geriatrics, Beijing, China 2007, 10

石井直明、石井恭正、宮沢正樹：細胞傷害におけるミトコンドリアからの酸化ストレスの影響、第30回日本分子生物学会・第80回日本性科学会合同大会、横浜、2007,12

網野比佐子、栗野睦美、石井直明、飯野雄一、北潔、第30回日本分子生物学会・第80回日本性科学会合同大会、横浜、2007,12

Shoyama T, Ishii N: Quantitative analysis between longevity and aging in *C. elegans*, 第30回日本分子生物学会・第80回日本性科学会合同大会、横浜、2007,12

平田哲也、瀬崎真理子、石井直明、山口（藤田）陽子：線虫の寿命に対するエタノール効果について、第30回日本分子生物学会・第80回日本性科学会合同大会、横浜、2007,12

宮沢正樹、石井恭正、石井直明：生理的老化へのレドックス制御と酸化障害の影響、第30回日本分子生物学会・第80回日本性科学会合同大会、横浜、2007,12

栗野睦美、網野比佐子、石井直明、北潔：線虫短寿命変異株 *mev-1* 複合体 II（コハク酸一ユビキノン還元酵素）の生化学的解析、第30回日本分子生物学会・第80回日本性科学会合同大会、横浜、2007,12

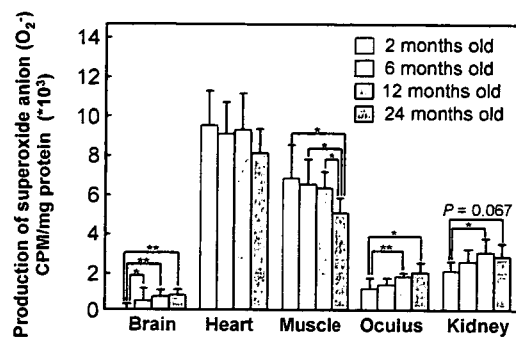
安田佳代、須田斎、赤塚明、石井恭正、石井直明： *C. elegans* におけるミトコンドリア融合阻害による酸化ストレス・老化への影響、第30回日本分子生物学会・第80回日本性科学会合同大会、横浜、2007,12

築瀬澄乃、小野寺章、テデスコ パット、ジョンソン トーマス、石井直明：線虫 *C. elegans* における SOD-1 欠失の細胞内 ROS 局在への分子的寄与、第30回日本分子生物学会・第80回日本性科学会合同大会、横浜、2007,12

切無沢美香、宮沢正樹、石井恭正、安田佳代、石井直明：A-Rafによるミトコンドリアからの活性酸素発生および神経分化、第7回日本ミトコンドリア学会年会、鹿児島、2007、12

石井直明：ミトコンドリアを起因とする活性酸素と疾患、第24回臨床フリーラジカル会議、京都、2008、3

A



B

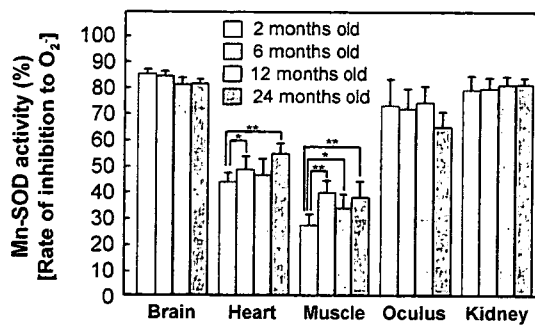


図 1

(A) 2、6、12、24ヶ月齢マウスの脳、心臓、筋肉、眼、腎臓におけるミトコンドリアから発生するスーパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ ) の測定 (mean  $\pm$  S.E.,  $n \geq 6$ , \* $P < 0.04$ , \*\* $P < 0.001$ )。 (B) 2、6、12、24ヶ月齢マウスの脳、心臓、筋肉、眼、腎臓におけるMn-SOD活性の測定 (mean  $\pm$  S.E.,  $n \geq 6$ , \* $P < 0.05$ )。

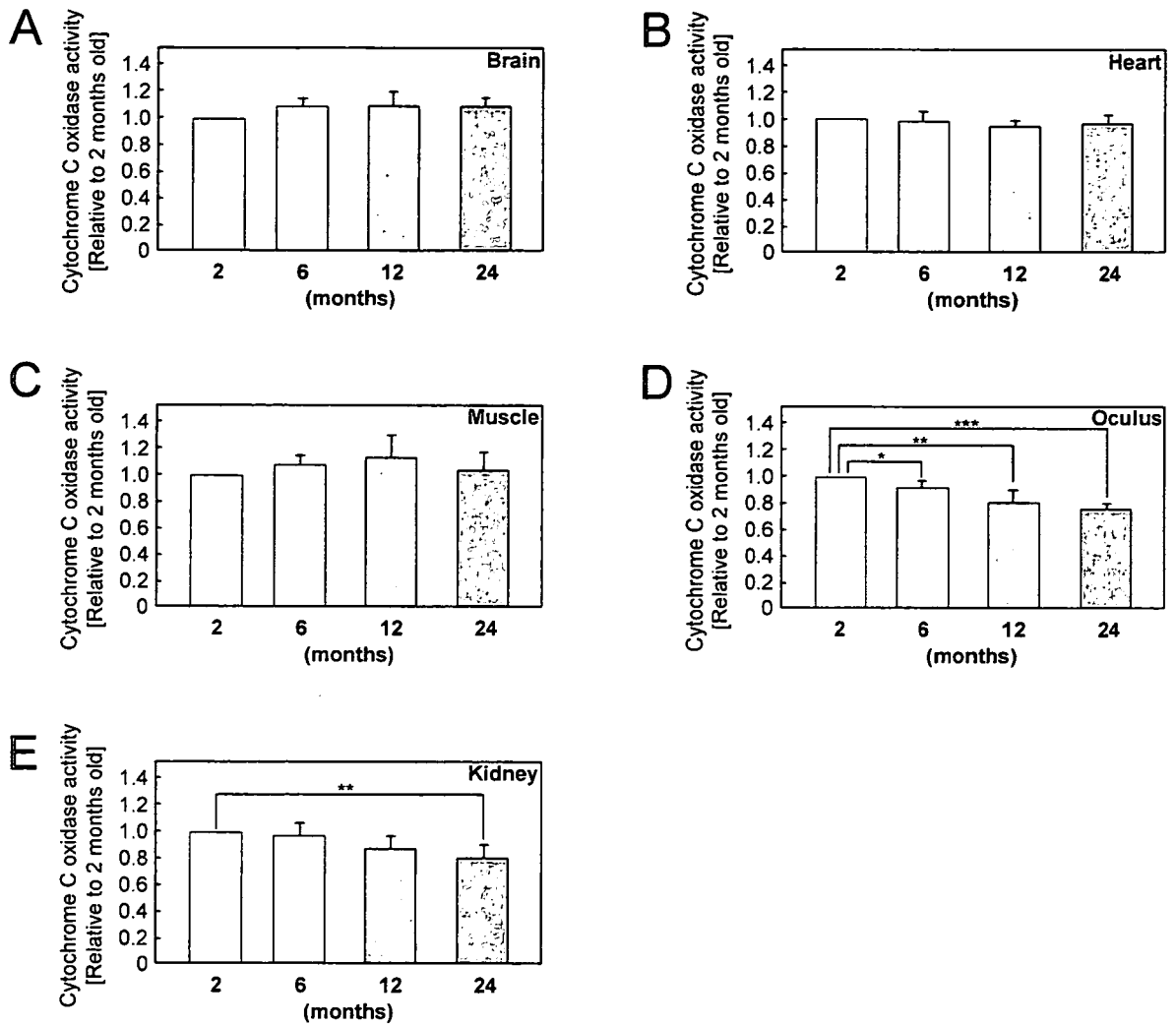
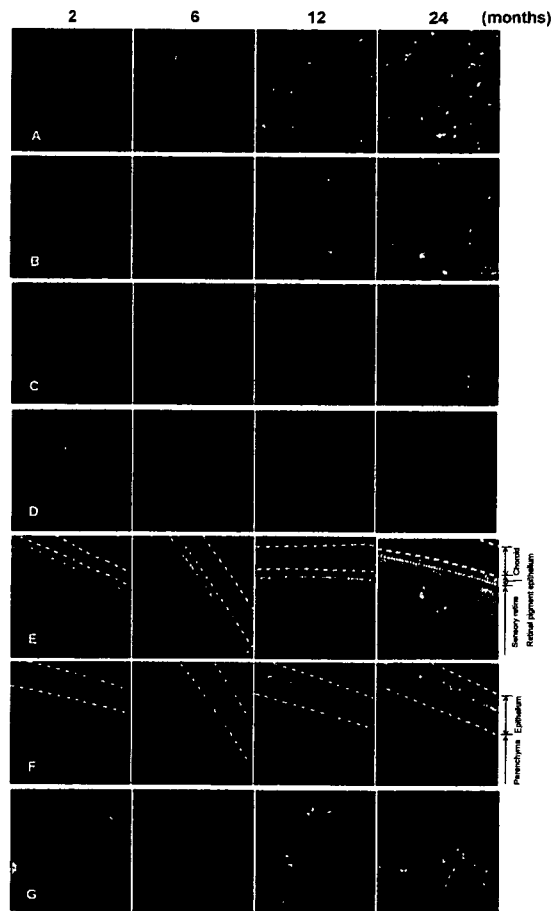


図 2

2、6、12、24ヶ月齢マウスの脳 (A)、心臓 (B)、筋肉 (C)、眼 (D)、腎臓 (E) におけるシトクロームcオキシダーゼ (COX) 活性の測定。各臓器において2ヶ月齢のマウスの値を基準として算出している (mean ± S.E., n ≥ 3, \*P < 0.04, \*\*P < 0.02, \*\*\*P < 0.002)。



**図 3**

2、6、12、24ヶ月齢マウスの脳（大脳皮質(A)、海馬(B)）、心臓(C)、筋肉(大腿二頭筋)(D)、眼（網膜(E)、角膜(F)）、腎臓(G)における抗8-OHdG抗体による組織免疫染色。8-OHdGは白いドットとして検出されている。

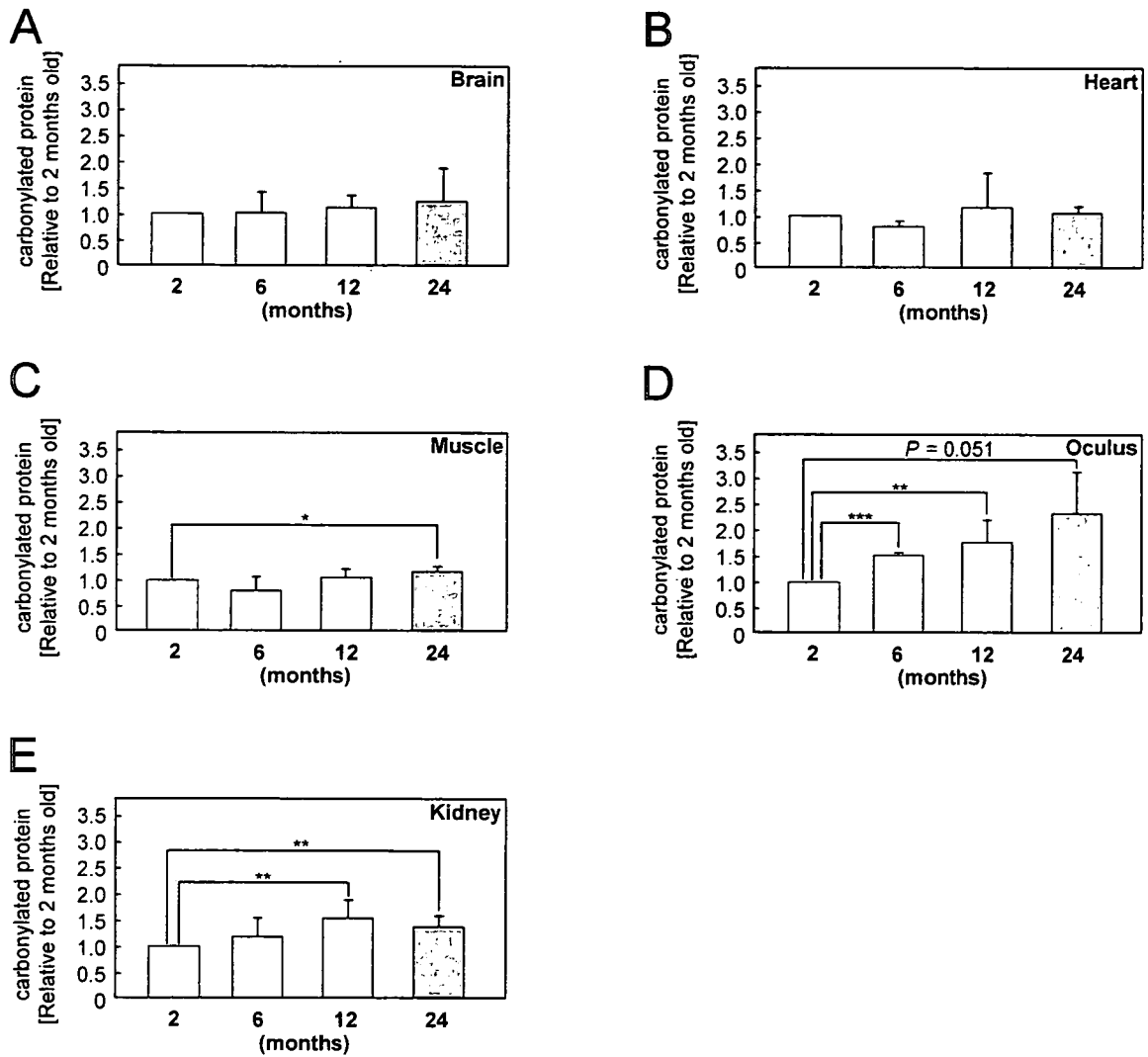


図 4

2、6、12、24ヶ月齢マウスの脳 (A)、心臓 (B)、筋肉 (C)、眼 (D)、腎臓 (E) におけるカルボニル化蛋白質蓄積量の測定。各臓器において2ヶ月齢のマウスの値を基準として算出している (mean ± S.E., n ≥ 3, \* $P < 0.04$ , \*\* $P < 0.02$ , \*\*\* $P < 0.001$ )。

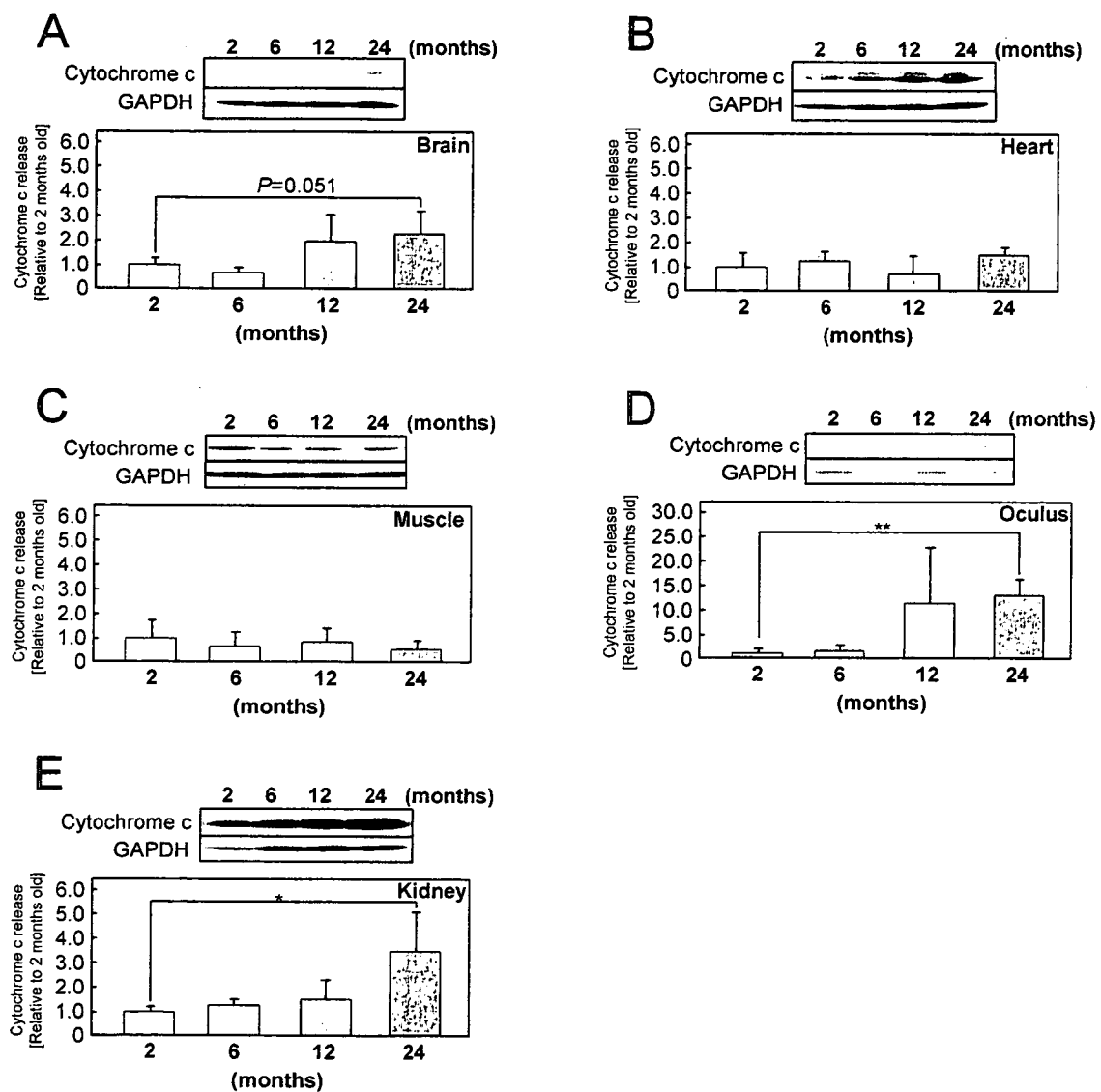


図 5

2、6、12、24ヶ月齢マウスの脳(A)、心臓(B)、筋肉(C)、眼(D)、腎臓(E)における細胞質画分へのシトクロームc放出の測定。各臓器において2ヶ月齢のマウスの値を基準として算出している(mean ± S.E., n = 4, \**P* < 0.04, \*\**P* < 0.001)。

	2 months old	6 months old	12 months old	24 months old
Temperature value (°C)	36.76±0.68	36.54±0.61	36.01±0.60 *	35.46±1.06 **

## 表1

2、6、12、24ヶ月齢マウスの直腸における体温。値は平均値±標準誤差である。雄および雌の2 (n = 26)、6 (n = 36)、12 (n = 48)、24 (n = 42)ヶ月齢マウスを用いた。\*6 vs. 12 months old,  $P < 0.001$ 、\*\*12 vs. 24 months old,  $P < 0.001$ 。



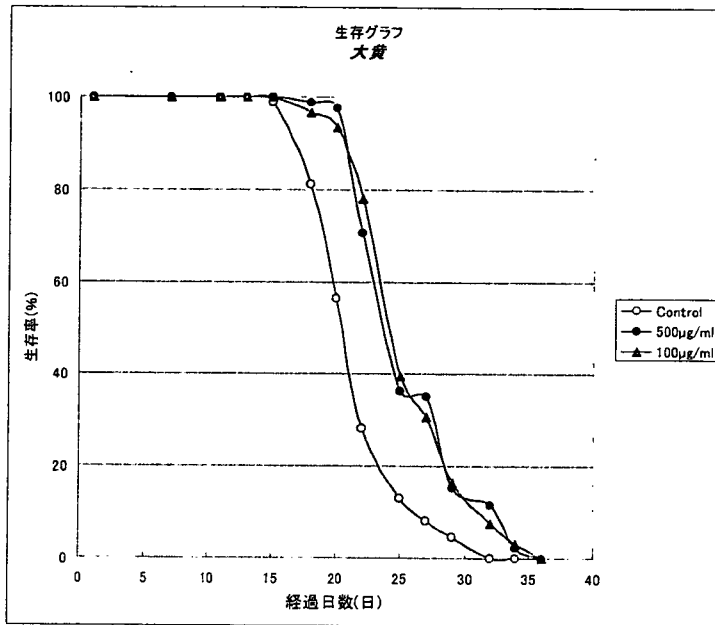


図 6

多黄による *C. elegans* の寿命延長効果

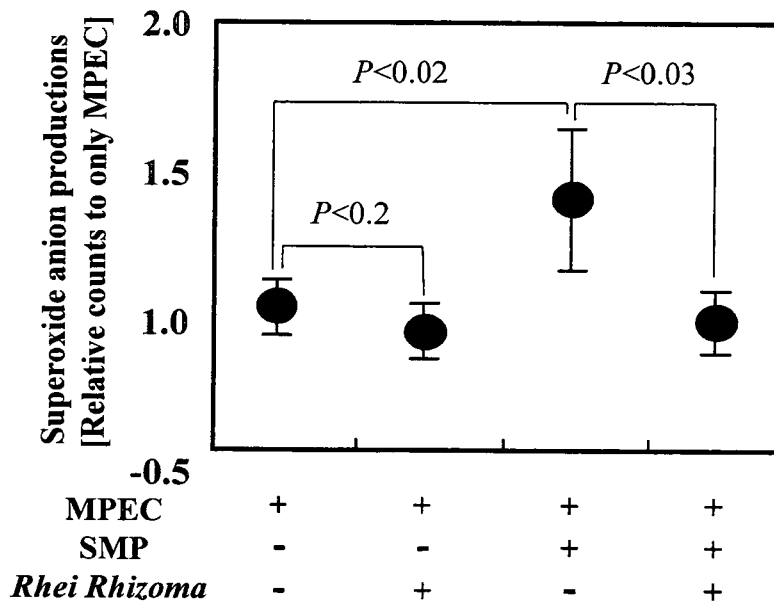


図 7

多黄によるミトコンドリアから発生する活性酸素 ( $O_2^-$ ) 量の抑制効果  
MPEC:  $O_2^-$  測定用蛍光物質、SMP: ミトコンドリア粒子

生体内酸化ストレスによる老年性疾患の発症機構の解明と予防

分担研究者 丸山 直記 東京都老人総合研究所 副所長

研究要旨：加齢に伴い亢進する生体内酸化ストレスの影響を分子病理学的に解析した。平成19年度はアスコルビン酸（ビタミンC）欠乏が脳内酸化ストレス発生に及ぼす影響を解析した。アスコルビン酸（ビタミンC）は酸化ストレスを軽減することはよく知られている物質である。SMP30はマウス・ラットではアスコルビン酸（ビタミンC）合成に関与する酵素グルコノラクトナーゼであることを我々は解明した。実験動物系ではSMP30遺伝子欠損マウスにおいてアスコルビン酸（ビタミンC）欠乏状態を誘導することができることから脳内アスコルビン酸（ビタミンC）欠乏によるスーパーオキシドの誘導を証明した。この亢進はアルツハイマー病を含めた中枢神経系の変性を促進する可能性がある。

A. 研究目的

老化の成立には加齢に伴い生体内酸化ストレスが亢進することが最も重要な要因としてされている。その生体内酸化ストレスの亢進は老年病の成立に深く関わっている。従って生体内酸化ストレスによる老年病態の解析とその抑制は高齢者医療に大きく貢献するものである。特に中枢神経系においても酸化ストレスの亢進は加齢性変性疾患発症の要因であることは容易に想定される。昨年度の本分担研究においても酸化ストレスの亢進が神経細胞内で骨格系分子をシトルリン化することを証明した。今年度は酸化ストレス抑制物質であるアスコルビン酸（ビタミンC）が欠乏する実験系を用いて脳内酸化ストレスの発生について解析を行い、神経変性疾患の発症や予防法開発に貢献する研究成果を得ることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

アスコルビン酸（ビタミンC）欠乏マウスとしてはマウス体内でアスコルビン酸（ビタミンC）が産生されないSMP30/グルコノラクトナーゼ（GNL）ノックアウトマウスを用

いた。

4つの実験群を作製した。いずれも生後4週間まではアスコルビン酸（ビタミンC）を含む通常の飼料で飼育し、その後アスコルビン酸（ビタミンC）欠乏飼料を与えて飼育した。

野生型（WT）マウスは2群作製した。生後4週間後から通常の水を投与した群（WT-VC<sup>-</sup>）と1日必要量を与えた群（WT-VC<sup>+</sup>）である。ノックアウト（KO）マウス群はいずれも生後4週間は1日必要量を与えた後、通常の水を与えた群（KO-VC<sup>-</sup>）と引き続き1日必要量を与えた群（KO-VC<sup>+</sup>）である。1日必要量とは1.5 g/Lの飲料水で飼育する条件である。解析は以下の項目について行った。1）HPLC・電気化学的検出法による還元型および酸化型ビタミンC濃度の測定 2）培養脳スライスを用いたスーパーオキシドのリアルタイムイメージング 3）抗酸化系の解析～総SOD活性、Mn-SOD, CuZn-SOD, カタラーゼタンパク質、還元型および酸化型グルタチオン 4）酸化ストレス指標の測定～チオバルビツール酸反応物質（TBARS）、カルボニル化タンパク質

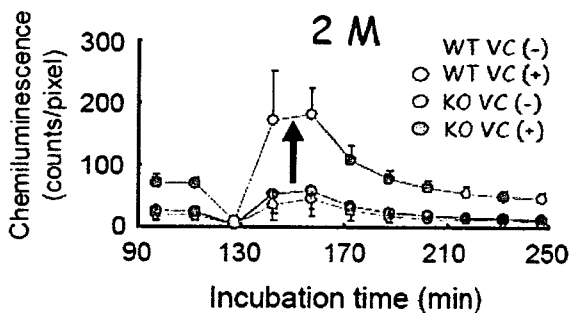
## C. 研究結果

### 1) 体重変化と総ビタミンC濃度

生後約60日齢では各群に大きな差はないが約80日齢ではKO-VC(-)群(ビタミンCが持続的に欠乏)では体重減少が著明となり壊血病の症状が出現した。脳内総ビタミンC濃度はKO-VC-群では他の群に比較して著明に減少していた。特に還元型ビタミンC濃度が低下していた。

### 2) 脳リアルタイムイメージングとビタミンC欠乏

各実験群から脳を摘出しスライスを作製し酸化ストレスを誘導した。方法は培養液に100分間酸素を供給し、その後、窒素で30分置換し、130分後に再び酸素に置換した。2ヶ月齢の各群のスーパーオキシドをリアルタイムイメージングにより測定した。その結果KO-VC-群では著しくスーパーオキシドが誘導された(図1)。



この結果はアスコルビン酸(ビタミンC)濃度の低下が脳内スーパーオキシド量増加させることを示す。

### 3) 抗酸化系の変化

アスコルビン酸(ビタミンC)欠乏により他の抗酸化系が変化(低下)してスーパーオキシドが効果的に消去出来なかった可能性を検討した。総SOD活性の変化は認められなかった。またCuZn-SOD、Mn-SODおよびカタラーゼ蛋白質をWestern blottingにより定量化した。いずれの

群間には有意の差が認められなかった。

また還元型および酸化型グルタチオン濃度も有意の差を認めなかった。

### 3) 酸化ストレス指標の評価

チオバルビツール酸反応物質(TBARS)はKO-VC(-)マウスで有意差は無いものの、むしろ減少していた。カルボニル化タンパク質の出現も有意の差を認めなかった。

## D. 考察

本研究において最も注目すべき所見として還元型アスコルビン酸(ビタミンC)はスーパーオキシドの量は増加するが、欠乏があっても顕著な酸化ストレスの亢進が認められなかったことである。その原因として他の抗酸化系が低下している可能性が考えられたが、明らかな原因を特定できなかった。他の可能性としては酸化ストレスはアスコルビン酸(ビタミンC)濃度の低下により酸化ストレスが亢進するもののミトコンドリアにおけるスーパーオキシドの亢進の可能性も残されている。いずれにしてもスーパーオキシドの由来を同定する必要がある。

## E. 結論

脳内においてアスコルビン酸(ビタミンC)はスーパーオキシドを消去することが明らかとなった。しかし脳内酸化ストレスの指標は有意の増加を認めなかった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Ohta K, Shigemoto K, Fujinami A, Maruyama N, Konishi T, Ohta M.: Clinical and experimental features of MuSK antibody positive MG in Japan. *Eur J Neurol* 14:1029-1034, 2007

Ishigami A, Maruyama N.: Significance of SMP30 in gerontology. *Geriatr Gerontol Int* 7:316-325, 2007

丸山直記、重本和宏：神経筋接合部位における抗 MuSK 抗体と病態機序. 臨床神経 47:842-844, 2007

佐藤 匡、瀬山邦明、石神昭人、丸山直記：肺の老化のメカニズム. The Lung Perspectives 15:155-160, 2007

Kimura Y, Kubo S, Koda H, Noguchi Y, Sawabe M, Maruyama N, Kitamura K. : Quantitative analysis of mRNA in human temporal bones. Acta Otolaryngol. 127:1024-1030, 2007

Shigemoto K, Kubo S, Jie C, Hato N, Abe Y, Ueda N, Kobayashi N, Kameda K, Mominoki K, Miyazawa A, Matsuda S, Maruyama N.: Experimentally induced myasthenia gravis with muscle-specific kinase. Ann N Y Acad Sci. 印刷中

Furusawa H, Sato Y, Tanaka Y, Inai Y, Amano A, Iwama M, Kondo Y, Handa S, Murata A, Nishikimi M, Goto S, Maruyama N, Takahashi R, Ishigami A.: Vitamin C is not essential for carnitine biosynthesis in vivo; Verification in vitamin c-depleted SMP30/GNL knockout mice. 投稿中.

Rath B, Pandeny RS, Debata PR, Maruyama N, Supakar PC.: Molecular characterization of senescence marker protein-30 gene promoter: Identification of repressor elements and functional nuclear factor binding sites. 投稿中

## 2. 学会発表

丸山直記：酸化ストレスによるシトルリン化蛋白質の誘導. 第96回日本病理学会総会 大阪市 2007.3.13-15

丸山直記：ビタミンCと老化制御. エイジング・

バイオストレス・メタボリズム研究会  
京都市 2007.4.9

丸山直記：老化のメカニズムと科学的アンチエイジング. 第5回「アルミニウムと健康」フォーラム 東京都 2007.4.21

丸山直記、重本和宏：神経筋接合部疾患における抗 MuSK 抗体と病態機序. 第48回日本神経学会総会 名古屋市 2007.5.16-18

丸山直記：実生活の中の老年学に向けて：基礎老化学の立場から. 第25回日本老年学会総会 札幌市 2007.6.20-22

丸山直記：老化のメカニズムと科学的アンチエイジング. 日本アルミニウム協会産学懇談会 東京都 2007.7.4

Maruyama N. : Scientific Anti-aging Strategy Challenge : Functional Aging and Well Being Busan Korea 2007.7.23

丸山直記：「レドックス研究の実用化に向けて」～ビタミンCと老化. 日本学術振興会 レドックス生命科学第170委員会第18研究会 山形市 2007.8.9-10

Maruyama N. : Reviewing Scientific Facts in Aging. The 8th Japan-Korea Joint Symposium on Cancer and Ageing Research. Gifu, 2007.8.10-11