

令和 3 年 2 月 22 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00878

研究課題名（和文）抗酸化物質の飲み頃を探る

研究課題名（英文）Determination of when to take antioxidants.

研究代表者

大澤 要介（Ohsawa, Yosuke）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教

研究者番号：50528429

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では擬似赤血球の酸化還元リズムの発生に効果的な物質として、ピルビン酸を同定した。ピルビン酸は酸化還元リズムを作り出す過酸化水素を消去する抗酸化物質であり、ビタミンEやセレンと同様に活性酸素から細胞を保護していた。一方、ピルビン酸はミトコンドリアを介した過酸化水素の発生にも関与していた。また、疑似赤血球の酸化還元リズム測定の再現性を得るために、疑似赤血球の作製方法と測定条件を改良した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

患者の酸化還元リズムの測定により、新たな角度から疾患の病態生理を理解できる。また、酸化還元リズムの特性に疾患特異性があれば、新規診断法の確立につながる。さらに、健常人の酸化還元リズムと比較することで、特定の疾患へのかかりやすさや健康の維持・増進に関わる指標となるリズムの特性が得られる。本研究によって、酸化還元リズムの共鳴に効果的な抗酸化物質をin vitroで同定することで、過酸化水素を多く産生する患者の酸化還元リズムを強固にする新しい治療法の開発につながる。

研究成果の概要（英文）：In this study, pyruvate was identified as an effective antioxidant for the generation of redox rhythm of pseudo-erythrocytes. Pyruvate is an antioxidant that eliminates hydrogen peroxide, which generates a redox rhythm. Pyruvate also protects cells from reactive oxygen species as well as vitamin E and selenium. However, pyruvate was also involved in the generation of hydrogen peroxide via mitochondria. Moreover, I improved the production of pseudo-erythrocytes and the measurement conditions to reinforce the reproducibility of the redox rhythm.

研究分野：概日リズム

キーワード：ペルオキシレドキシン スルフィレドキシン 概日リズム 酸化還元リズム BRET 抗酸化物質 ピルビン酸 無血清培養

1. 研究開始当初の背景

本研究では個体の酸化還元リズムにしたがって、抗酸化物質を摂取するタイミングを決定することを目的とする。これまでの疫学研究では、ビタミンCやビタミンEのような抗酸化物質の摂取が特定の疾患に有効であるという報告から、無効あるいはむしろ有害であるという報告¹まであり、いまだに明確な結論が出ていない。その理由として、研究に用いた抗酸化物質の摂取量が不足あるいは過剰であるとする考察が多く、これまで摂取のタイミングについて議論されることがあまりなかった。

適切な時機に抗酸化物質を摂取することは、抗酸化作用を最大限に発揮させる上で重要である。例えば、運動前に抗酸化物質を摂取したアスリートは、かえって運動による効果が得られない²。摂取した抗酸化物質が運動によって産生される活性酸素を消去したためである。さまざまな疾患の引き金となる活性酸素も適切なタイミングで産生されることが身体活動にとって重要である。

申請者は赤血球のペルオキシレドキシンの過酸化状態を測定する実験系を開発し、個体の酸化還元リズムの測定を試みている。ペルオキシレドキシンのファミリーは過酸化水素を水に還元する抗酸化タンパク質である。ペルオキシレドキシンの過酸化水素を還元する際、自身のシステイン残基は酸化される。酸化されたペルオキシレドキシンは約12時間かけて還元され、元の状態に戻る。ペルオキシレドキシンの約24時間周期のリズム(概日リズム・サーカディアンリズム)は、真核生物で発現する時計遺伝子よりもその起源は古く、古細菌からヒトにいたるあらゆる生物で見つかっている³。申請者はペルオキシレドキシンの酸化還元リズムが時計遺伝子の発現リズム以上に根源的な概日リズムとして生命の根幹を形成していると考えている。

赤血球は60兆個ある体細胞の約3分の1を占め、全身に酸素を供給している。末梢でヘモグロビンから酸素が解離する際に、解離した酸素の数%がスーパーオキシドを経て、過酸化水素になる。ペルオキシレドキシンの過酸化水素から赤血球の細胞膜を保護している。ペルオキシレドキシンのファミリーはヘモグロビン・炭酸脱水素酵素に次いで赤血球に多く存在する。過酸化水素は細胞膜を透過する性質があり、活動期には組織内で処理しきれなかった過酸化水素が血中にあふれ出す。そのため、赤血球のペルオキシレドキシンのファミリーは末梢組織に由来する過酸化水素の受け皿としても機能する。申請者はペルオキシレドキシンのファミリーのリズムが全身の酸化還元状態を反映していると考えている。

活性酸素は運動や個体の基礎代謝が高まる夕方の高体温期に多く発生することから、ペルオキシレドキシンの酸化は日中の活動期に増加し、夜間の休息期に減少する。決まった時刻に運動する習慣は酸化還元リズムの周期に合わせて、過酸化水素を増加させる。増加のタイミングと周期が一致すると、リズムの波は振幅が増大し、より強固なリズムを形成する。これを共鳴という。逆に、過酸化水素が過剰に産生される個体では、むしろ適切な時機に過酸化水素を減少させることで、共鳴を起こすことができるのではないかと？活性酸素の発生に関連した疾患をわずらう患者は運動が困難な者が多い。しかし、適切なタイミングで抗酸化物質を摂取することにより、太古の昔から我々生物に備わっている酸化還元リズムを強固にし、適切な過酸化水素レベルに戻すことで、病気に対する自己治癒力を高めることができる。患者の酸化還元リズムを共鳴させる抗酸化物質を同定することは、活性酸素が関与する疾患の治療につながると考える。

2. 研究の目的

本研究では個体の酸化還元リズムにしたがって、抗酸化物質を摂取するタイミングを決定することを目的とする。適切な時機に抗酸化物質を摂取することは、抗酸化作用を最大限に発揮させる上で重要である。赤血球のペルオキシレドキシニン2の酸化還元リズムは全身の酸化還元状態を反映する。個体の酸化還元リズムは活動時間帯や過酸化水素の発生量によって異なる。酸化還元リズムの測定によって、個々の抗酸化物質の摂取に適切な時機がわかる。患者の赤血球の酸化還元リズムの特性は新規診断法の確立や予防法の発見につながる。酸化還元リズムの共鳴に効果的な抗酸化物質を同定し、患者の摂取時刻を決定することは、抗酸化物質を用いた新たな治療法の開発につながる。

3. 研究の方法

(1) 酸化還元リズムの振幅の増大に効果的な抗酸化物質を *in vitro* で同定する。

最初に測定原理について述べる。生物発光共鳴エネルギー移動 (Bioluminescence Resonance Energy Transfer: BRET) はタンパク質間距離が 50 Å 以内になると、ウミシイタケのルシフェラーゼ RLuc (ドナー) の発光が蛍光タンパク Venus cp173 (アクセプター) が励起する現象である。スルフィレドキシニン (Srx) がペルオキシレドキシニン 2 (Prx2) のスルフィン酸基に結合すると、BRET が起こる。この反応はゆっくり進むため、長時間、結合が維持される。

次にプローブの作製について述べる。Srx に RLuc を融合させた配列をコードするドナーベクターと、Prx2 に Venus cp173 を融合させた配列をコードするアクセプターベクターを等量ずつ赤白血病細胞株 K562 細胞にエレクトロポレーションにて遺伝子導入する。2日後、K562 細胞に酪酸ナトリウムを加え、ヘモグロビンを合成する赤芽球系細胞に分化させる。4日後、サイトカラシンBを加え、脱核させた K562 細胞をプローブとする。脱核後は温度シフトによる同調を行う。

温度シフトによる同調方法について述べる。ジェランガムを含む培地で懸濁したプローブを 0.6mL チューブに移し、サーマルサイクラーに入れる。ジェランガムの粘性がプローブの懸濁状態を維持する⁴。32 °C 12時間・37 °C 12時間の温度シフトを 2日~1週間繰り返す。プローブは温度シフトに同調して、37 °C 12時間の終わりに頂点位相がくる酸化還元リズムをもつ

抗酸化物質の同定方法について述べる。32 °C 12時間の開始時間を 3時間ずつ遅らせた (位相が 3時間後退した) 8通りの位相パターンをもったプローブを作製する。ルミノメーターは 1度に 8個まで測定できる。8通りのプローブ 1×10^5 個にルシフェリンと抗酸化物質を添加し、ルミノメーターでルシフェラーゼによる発光を 5分おきに測定する。測定は 37 °C で 1週間行う。ヒトの体内にあるものは血漿中の抗酸化物質の濃度を参考にし、植物由来のものは文献を参考に決定する。水素は空気を 100%水素ガスに置換した培地 (溶存水素濃度 1.6ppm) を用いる。

8通りのプローブのうち、特定の位相パターンを共鳴させた抗酸化物質を有効であると判断する。共鳴は抗酸化物質の添加が、リズムの最下点位相と一致したときに見られる。しかし、実際にはパターンとパターンの間が 3時間離れているので、最下点位相にタイミングが合わない可能性が高い。共鳴が見られない抗酸化物質は、元のリズムの位相と比べて、位相がシフトしているか調べる。抗酸化物質が作用すれば、位相はシフトする。位相のシフトが見られたパターンを中心に 30分~1時間おきの位相パターンのプローブを作製し、最下点位相の範囲を狭めていく。位相のシフトが見られない抗酸化物質は無効と判断する。共鳴が起こった位相パターンに抗酸化物質を添加したタイミングが、有効濃度の抗酸化物質が血液中出现する時刻とする。

(2) 健常者の酸化還元リズムの最下点位相を算出する数式を導く。

位相のシフトの程度から最下点位相を算出する。30分～1時間おきの位相パターンを24時間全体で作製したプローブと、健常者の赤血球を干渉させ、酸化還元リズムの振幅と位相のシフトの程度を詳細に計測する。計測データから酸化還元リズムの最下点位相を算出する数式を導く。算出に必要な最小の位相パターンを決定する。

健常者から採血を行う前に、活動・休息の時間帯を記載した1日のスケジュール表や抗酸化物質の摂取の有無に関するアンケートを行う。アンケート終了後、クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として、1mL採血し、採血時刻を記録する。研究室以外での採血は37℃に保温して研究室に運ぶ。血液を室温に戻すと過酸化水素のリズムが遅延するため、すぐに測定が開始できるようにプローブを準備しておく。全血をLeukoCatch II (Watson)に通し、白血球を除いた血漿・赤血球・血小板が含まれる素通り画分を得る。活性酸素を産生する好中球はフィルターに吸着する。素通り画分10 μ L (5 \times 10⁷個)をプローブ90 μ L (1 \times 10⁵個)と混合し、ルミノメーターで発光を測定する。

(3) 患者の酸化還元リズムの最下点位相から抗酸化物質の摂取時刻を決定する。

上記で決定した位相パターンのプローブと患者の赤血球を干渉させ、酸化還元リズムを測定する。最下点位相を求め、吸収・分布に要する時間を差し引いて、摂取時刻を決定する。健常者と患者の酸化還元リズムを比べ、疾患特異性や健康の指標となるリズムの特性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 酸化還元リズムの振幅の増大に効果的な抗酸化物質の同定

過酸化水素による酸化型ペルオキシレドキシンの過酸化とスルフィレドキシンの還元によって形成される擬似赤血球の酸化還元リズムの発生に効果的な物質として、ピルビン酸を同定した。測定培地中のピルビン酸濃度を増加させると、容量依存的に酸化還元リズムの振幅が増大した。ピルビン酸は酸化還元リズム形成の引き金となる過酸化水素自体を消去する抗酸化物質であるため、リズムの発生に必要な過酸化水素は非常に低濃度であると考えられる。また、ピルビン酸をエネルギーとして利用することで、ミトコンドリアが活性化しており、過酸化水素の産生量が増えた可能性が考えられた。

一方、過酸化水素の前駆体であるスーパーオキシドを消去するマンニトールは細胞の生存率を高めたが、リズムの形成を抑制した。しかし、抗酸化物質を何も添加しないコントロール群では活性酸素種によって生存率が低下し、リズムを発振する細胞が減ったため、振幅が短縮した。そのため、細胞膜の保護する抗酸化物質について調べた。ビタミンEやグルタチオンペルオキシダーゼの活性に必須のセレンによって細胞の生存率は上昇し、振幅が増大した。一方、グルタチオンの前駆物質であるN-アセチルシステインは細胞の生存率に変化がなかった。

(2) 健常者の酸化還元リズムの最下点位相を算出する数式の導出

32 12時間・37 12時間の温度シフトを2日～1週間繰り返す温度シフトによって疑似赤血球を同調させ、酸化還元リズムの測定を行ったところ、同様の処理を行ったサンプルの間で再現性が得られなかった。1週間にわたる測定の途中で培地が酸性化したために、疑似赤血球の生存率が低下し、発光が減弱していたために再現性が得られなかった。そのため、生存能を改善し、再現性よくリズムを発振する細胞の作製と測定条件を再検討した。

これまでは酪酸ナトリウムでK562細胞を分化させていたが、血清飢餓状態で酪酸ナトリウムを加えることで、より多くの細胞を休止期に移行させることができた。血清の代わりにウシ血清アルブミンやインスリン、トランスフェリン、上記で同定したビタミンEやセレンなどの微量元素を添加した無血清培地を用いることで、細胞の生存能を維持できるようになった。また、5%CO₂と炭酸水素ナトリウムによる重炭酸緩衝系を大気圧下でHEPESによる緩衝系に置き換えることで、培地の酸性化を防ぎ、良好なリズムを得ることができた。

一方、これまでペルオキシレドキシンのアクセプターとスルフィレドキシンのドナーはK562細胞に共遺伝子導入していたため、ドナーとアクセプターの両方を共発現した細胞に由来するBRETとドナーのみを発現した細胞に由来する発光が混在していた。そのため、ペルオキシレドキシンのアクセプターとIRESの下流にスルフィレドキシンのドナーを発現するようにデザインしたバイシストロニックコンストラクトを作製した。このコンストラクトをK562細胞に遺伝子導入して得た安定発現株はBRETの発光がより明瞭に観察できた。

以上の再検討によって、再現性よくリズムを発振する疑似赤血球の作製や測定条件を改良することができたが、健常者の赤血球の位相の測定には至らなかった。

(3) 患者の酸化還元リズムの最下点位相から抗酸化物質の摂取時刻を決定

本研究では、再現性よくリズムを発振する疑似赤血球の作製や測定条件を改良に時間を費やし、実際に健常人や患者の酸化還元リズムの最下点位相から抗酸化物質の摂取時刻を決定することができなかった。しかし、今後も疑似赤血球を用いて、被験者の酸化還元リズムの測定を行う計画である。

<引用文献>

1. JAMA 2007;297(8):842-57
2. J Physiol 2014;592(8):1887-901
3. Nature 2012;485(7399):459-64
4. Stem Cell Reports 2014;2(5):734-45

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 A Hida, Y Ohsawa, S Kitamura, K Nakazaki, N Ayabe, Y Motomura, K Matsui, M Kobayashi, A Usui, Y Inoue, H Kusanagi, Y Kamei, K Mishima	4. 巻 7
2. 論文標題 Evaluation of circadian phenotypes utilizing fibroblasts from patients with circadian rhythm sleep disorders	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Transl Psychiatry	6. 最初と最後の頁 e1106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/tp.2017.75	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----