

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19500369

研究課題名（和文） 活性酸素を起因とするガン発症モデルマウスの構築と解析

研究課題名（英文） Construction and analysis of a model mouse of cancer caused by reactive oxygen species

研究代表者

石井 直明（ISHII NAOAKI）

東海大学・医学部・教授

研究者番号：60096196

研究成果の概要：

家族性傍神経腫(パラングリオーマ)の患者のミトコンドリア内電子伝達系複合体 II のサブユニットであるSDHCやSDHD遺伝子に変異が見ついている。SDHC遺伝子に変異を持つ線虫や培養細胞はミトコンドリアから活性酸素を過剰発生させることから、この遺伝子に点変異を持つ transgenic なマウスを作成し、活性酸素をガンの関係を調べた。その結果、このマウスにガンの発生は見られなかったものの、多臓器において過剰な細胞死が観察された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物・実験動物学（病態モデル）

キーワード：ミトコンドリア、活性酸素、パラングリオーマ、SDHC、トランスジェニックマウス、Tet-On/Off システム、アポトーシス、角膜

1. 研究開始当初の背景

真核細胞に必須の細胞内小器官であるミトコンドリア内に存在する電子伝達系は、エネルギー産生のみならず、活性酸素の主要な産生の場として細胞傷害に関係していることが知られている。さらに、ミトコンドリアが細胞死にも大きな役割を果たしていることが明らかになっている。ミトコンドリアからエネルギー代謝の副産物として生じる活性酸素がガンや種々の疾患の原因とされながらも、それを直接証明する手段が存在しなかった。そのため、外部から酸化剤で酸化スト

レスを与える、あるいは細胞毒である電子伝達系阻害剤を用いて強制的に内部から酸化ストレスを起こさせるなど正常細胞ではありえない条件下での実験がおこなわれてきた。

申請者は、線虫の一種である *C. elegans* から、電子伝達系の複合体 II のサブユニットであるシトクローム b 大サブユニットの遺伝子(マウスやヒトではSDHC遺伝子)が欠損した *mev-1* 突然変異体を分離し、このミトコンドリアから活性酸素が過剰に産生され、その結果、過剰な細胞死や

高い頻度で突然変異が引き起こされることを明らかにした(Nature, 1998; J. Biol. Chem, 2001; J. Biol. Chem, 2003, Hartman, 2004)。さらに、SDHC遺伝子に欠損を持つ *mev-1* マウス培養細胞 (NIH3T3 細胞株) を作成すると、線虫と同様にミトコンドリアから活性酸素の発生量が増大し、これが細胞死やガンを引き起こすことを見出した。これはミトコンドリアから発生する活性酸素がガンの原因になることを直接証明した世界で初めての例である(Can. Res., 2005)。すでにSDHC遺伝子に変異を持つ *mev-1* マウス個体の構築にも成功し、生体内部から自然な生体環境に近い状態で酸化ストレスを負荷することに成功した。この変異マウスは筋力の低下や視力の低下といった老人性の疾患が野生型に比べて早期に認められるようになった。しかしこのマウスが不妊だったことから、ミトコンドリアからの活性酸素の発生量や発生時期をテトラサイクリンにより生体外部から任意に制御可能なコンディショナル・トランスジェニックマウス (Tet-*mev-1* マウス) を作製した。

2. 研究の目的

家族性傍神経節腫 (パラガングリオーマ) の患者のSDHCや複合体IIの他のサブユニットであるSDHD遺伝子に変異が見つかり(Nat. Genet., 2000)、電子伝達系がガンの発生に強く関与していることが示唆されたことから、これらの遺伝子が腫瘍抑制遺伝子として定義された(Nat. Rev. Can., 2005)。本研究では、Tet-*mev-1* マウスを生化学的あるいは病理学的な手法で解析することにより、パラガングリオーマを始めとする、ガンの発症メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、科学研究費補助金 (基盤C) の平成14年度~16年度「電子伝達系複合体IIの疾患モデル動物の構築と解析」と平成17年度~18年度「活性酸素を起因とするガン発症モデルマウスの構築と解析」を継続したものである。これまで *mev-1* マウス培養細胞の研究において、ミトコンドリアから発生する活性酸素が細胞死や形質転換を引き起こすことを証明した (Cancer Research, 2005)。さらに生体内部から自然な生体環境に近い状態で酸化ストレスを負荷する *mev-1* マウス個体の構築に成功した。この変異マウスは筋力の低下や視力の低下といった老人性の疾患が野生型に比べて早期に認められるようになったが、残念ながらこのマウスが不妊であったために、詳細な研究は不可能

であった。そこでミトコンドリアからの活性酸素の発生量や発生時期をテトラサイクリンにより生体外部から任意に制御可能なコンディショナル・トランスジェニックマウス (Tet-*mev-1* マウス) を作製し、ようやく実験に必要な数のホモ個体を得られつつある段階に達している。本研究において、実質的なマウスの生化学的および病理学的な解析をおこなった。

【平成19年度】

Tet-*mev-1* マウスが加齢にともないガンを形成するかどうかを病理学的解析により調べた。

現在、Tet-*mev-1* マウスを14系統、1、500匹を飼育しているので、それぞれの系統で臓器ごとにSDHC遺伝子とその発現タンパク質の発現量を測定し、多数の臓器で高い発現を示す系統を選択した。

具体的には;

- (1) マウスのホモ化と、実験に必要な個体の大量増殖。
- (2) テトラサイクリンによる遺伝子発現の誘導の有無と発現量をNorthern解析法により調べる。
- (3) 一部のマウスを解剖し、病理学的 (各臓器の形態および組織観察) を解析をおこなった。
- (4) 高齢期での個体観察のため次年度までマウスの飼育を継続した。

【平成20年度】

Tet-*mev-1* マウスの中で、SDHCを多数の臓器で高い発現を示す系統のマウスを一定期間ごとに解剖して生化学的解析をおこない、腫瘍発生の有無を病理学的解析から明らかにした。

具体的には

- (1) 一定期間ごとにマウスを解剖し、病理学的解析をおこなった。特に酸化ストレスが顕著に現れると思われる目に関して詳細な研究をおこなった。

4. 研究成果

条件付変異遺伝子組換えTet-*mev-1* マウス

(1) SDHC タンパク質の発現量
間脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、胃、性腺、筋肉における発現量を調べたところ、No.37 系統のマウス(Tg/-)ではドキシサイクリンを摂取させたグループで、すべての臓器・器官で発現量の増加が確認された。しかし、No.48 系統マウス(Tg/-)では変化は確認されなかった。

(2) 酸化タンパク質の蓄積量

生後2~3ヶ月齢のマウスの間脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、胃、小腸、卵巣、

筋肉、新生児個体で測定した。蓄積量は臓器・器官で異なり、ドキシサイクリンを摂取させなかった対象でも、肺、脾臓、卵巣で蓄積量が増加していた。

No.37 系統マウス(Tg/Tg)では肺と卵巣、筋肉のみで蓄積が観察されたが、No.48 ではすべての臓器・器官で差は確認されなかった。

(3) 活性酸素発生量

活性酸素量も臓器・器官で異なり、脳、肝臓、胃で少なく、心臓と小腸で増加していた。

No.37 のマウス(Tg/Tg)では、ドキシサイクリンを摂取により、脳、肺、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、卵巣で増加が確認された。

(4) 受胎数

No.37 系統マウス(Tg/Tg)の母親を交配前からドキシサイクリンを摂取させると、 3.83 ± 3.93 匹の子を作り、妊娠後の摂取では野生株マウスと同じ、 5.33 ± 1.15 匹であった。一方、No.37 系統マウス(Tg/Tg)では交配前の摂取では子は生まれず、妊娠後の摂取であっても 2.13 ± 2.1 匹と減少した。

(5) 卵巣の詳細解析

変異 SDDHC 遺伝子を常時発現させたマウスは不妊であり、その原因が卵胞の成熟不全が疑われた。ドキシサイクリンを摂取させた No.37 系統マウス(Tg/Tg)の卵巣ではミトコンドリアからの活性酸素の発生量、酸化タンパク質の蓄積ともに上昇していた。卵胞の成熟不全も観察され、卵巣外細胞ではアポトーシスも観察された(図1)。

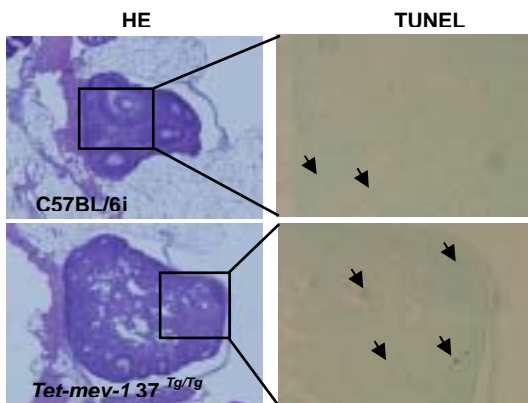


図1 Tet-*mev-1*Tg/Tg マウスにおける卵巣の形態形成不全と卵巣外細胞のアポトーシス

また、子宮卵管脛部に多数のアポトーシス、caspase 3 の活性が観察された(図2 8)。

(6) 成長率

ドキシサイクリンを摂取させた No.37 系統マウスは、ヘテロマウス(Tg/-)では野生株と同

じように成長する。しかし、ホモマウス(Tg/Tg)は成長が遅れ、離乳期で一番顕著であった(図2)。この遅れは生後12週間で野生株と同じ大きさまで回復した(図3)。

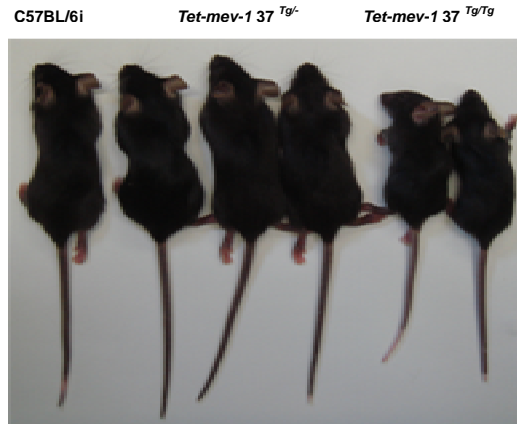


図2 生後6週間の体のサイズ

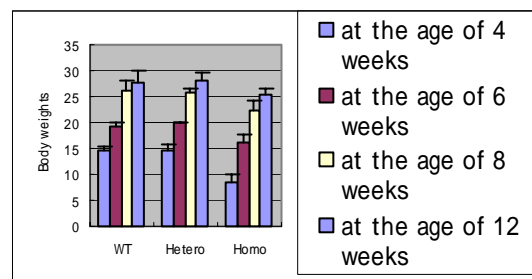


図3 加齢による体重変化

(7) 新生児における詳細解析

妊娠確認後に母親にドキシサイクリンを摂取させた No.37 系統マウスの Tg/Tg 新生児は、体が小さく体重の減少が見られた。興味あることに、尾の先端で多数のアポトーシスが観察された。

変異 SDHC の発現が上昇し、酸化タンパク質の増加も確認された。終脳、脳、肺、皮膚、筋肉・脂肪細胞、肝臓、腎臓、直腸、副鼻腔粘膜で多数のアポトーシスが観察された。Caspase 3 の活性を肺で調べたところ、上昇していることが確認された。

(8) 6ヶ月齢マウスの組織病理学的解析

6ヶ月齢マウス(Tg/-)の組織病理学的解析をおこなったが、特に異常を見出すことができなかった。本研究の結果から、加齢とともに野生型マウスでは目と腎臓に大きな酸化ストレスがかかることが明らかになった。そこで1年6ヶ月の *mev-1* マウスの目を調べた。網膜に異常は見られないものの、角膜の表面の細胞が野生株に比べて強く脆弱化している組織像が観察された(図4)。DNA の酸化ストレスマーカーである 8-OHdG の蓄積の増加も観察された(図5)。

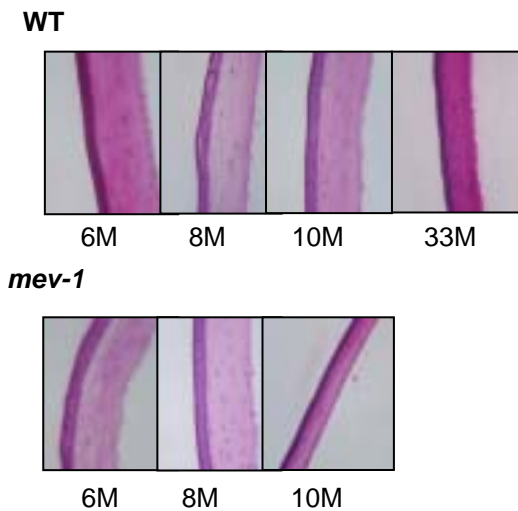


図4 角膜の厚さ

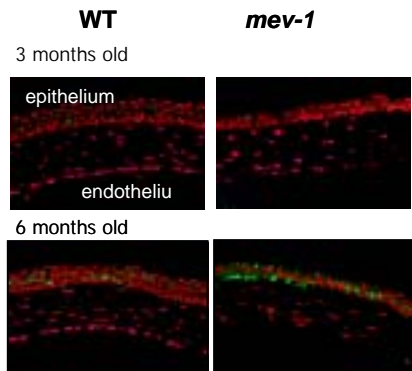


図5 角膜中の 8-OH-dG の蓄積

結論

mev-1 マウスにおいてガンの発生は見られなかったが、多臓器においてアポトーシスの増加が観察された。成熟前には体のサイズが野生型に比べて小さいが、成熟までに野生型の大きさまで復帰した。これは成熟期の細胞数の増加がアポトーシスによる細胞減少を補償した結果と推測できる。これがガン発生を増加させない一因になっている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

1. Yanase S, Ishii N
Hyperoxia exposure induced hormesis decreases mitochondrial superoxide radical levels via Ins/IGF-1 signaling pathway in a long-lived *age-1* mutant of *Caenorhabditis elegans*. **J. Radiat. Res.** 49: 211-228, 2008 (査読有)
2. Miyazawa M, Ishii T, Yasuda K, Noda

S, Onouchi H, Hartman PS, Ishii N
The role of mitochondrial superoxide anion (O_2^-) on physiological aging in C57BL/6J mice

J. Radiat. Res. 50: 73-82, 2009
(査読有)

3. 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
(査読有)
4. 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 (査読有)
5. Ishii N, Ishii T, Hartman PS
The role of the electron transport SDHC gene on lifespan and cancer
Mitochondrion 7: 24-28, 2007 (査読有)
6. 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 (査読有)
7. Ishii N
Role of oxidative stress from mitochondria on aging and cancer
Cornea 26: S3-S9, 2007 (査読有)
8. Sakashita T, Hamada N, Suzuki M, Ikeda DD, Yanase S, Ishii N, Kobayashi Y
Effects of γ -ray irradiation on olfactory adaptation to benzaldehyde in *Caenorhabditis elegans*,
Biological Sciences in Space 21: 117-120, 2007 (査読有)
9. 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 γ subunit of G protein in *Caenorhabditis elegans*,
FASEB J. 22: 713-720, 2007 (査読有)

10. 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 (査読無)
- [学会発表](計23件)
1. Yuichi Uchino, Masaki Miyazawa, Maya Tanigawa, Hiromi Onouchi, Kayo Yasuda, Mika Kirinashizawa, Naoaki Ishii, Kazuo Tsubota: A New Mouse Model Of Dry Eye Disease (*Tet-mev-1* Mice) : Oxidative Stress Affect Functional Decline In Lacrimal Gland, Salivary Glands & Exocrine Secretion (7th), Gordon Reseach Conferences, Galveston, Texas, USA, 2009年2月
 2. 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
 3. 宮沢正樹、石井恭正、安田佳代、切無沢美香、石井直明 : 生理的老化に対するミトコンドリアのスーパーオキシドアニオン(O_2^-)の役割、日本基礎老化学会第31回大会、松本、2008年6月
 4. 尾内宏美、宮沢正樹、石井恭正、安田佳代、切無沢美香、石井直明 : *Tet-mev-1*コンディショナルトランスジェニックマウスにおける眼球の加齢変化、日本基礎老化学会第31回大会、松本、2008年6月
 5. 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
 6. 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.
 7. 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
 8. 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
 9. Onodera A, Yanase S, Ishii T, Yasuda K, Miyazawa M, Hartman PS, Ishii N: X rays-irradiation-mediated hormesis of post-dauer life span, 16th International *C. elegans* meeting, LA, USA, 2007, 6
 10. Shouyama T, Oxaki T, Ishii N, Shuda H: Quantitative analysis between longevity and aging in *C. elegans*, 16th International *C. elegans* meeting, LA, USA, 2007, 6
 11. Yanase S, Ishii N: Hormesis-induced lifespan extension decreased mitochondrial superoxide radical levels via Ins/IGF-1 signaling pathway in *C. elegans*, 16th International *C. elegans* meeting, LA, USA, 2007, 6
 12. 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*, 16th International *C. elegans* meeting, LA, USA, 2007, 6
 13. Ishii N: Mitochondrial dysfunction and aging, Neuro 2007, Yokohama, 2007, 9
 14. Ishii N: The role of oxidative stress from mitochondria on aging, The 8th Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology and Geriatrics, Beijing, China 2007, 10
 15. 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回日本生化学会合同大会、横浜、2007、12
 16. 網野比佐子、粟野睦美、石井直明、飯野雄一、北潔、線虫ミトコンドリア複合体IIの生化学的解析、第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会合同大会、横浜、2007、12
 17. 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回日本生化学会合同大会、横浜、2007、12
 18. 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回日本生化学会合同大会、横浜、2007、12
 19. 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回日本生化学会合同大会、横浜、2007、12
 20. 粟野睦美、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 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回日本生化学会合同大会、横浜、2007,12

21. 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、30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会合同大会、横浜、2007,12
22. 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回日本生化学会合同大会、横浜、2007,12
23. 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

〔図書〕(計1件)

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 175pp

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 直明 (ISHII NAOAKI)

東海大学・医学部・教授

研究者番号: 60096196

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者