

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590925  
 研究課題名（和文）ビタミンC不足マウスを用いた慢性閉塞性肺疾患（COPD）発症機構の  
 解明  
 研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism for the development of chronic obstructive  
 pulmonary disease (COPD) by using vitamin C deficient mice  
 研究代表者  
 島田 信子（SHIMADA NOBUKO）  
 財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団・東京都老人総合研究所・助手  
 研究者番号：60158962

研究成果の概要：慢性閉塞性肺疾患（COPD）は喫煙が主な原因とされる肺の生活習慣病である。COPD 発症要因のひとつは肺での酸化ストレスの増加と考えられている。そこで本研究では、ビタミンCを合成できない遺伝子破壊マウス（SMP30/GNL ノックアウトマウスを用いて、ビタミンC不足が肺に与える影響を検討した。その結果、ビタミンC不足は肺における酸化ストレスの増大や肺胞径、肺胞破壊の増大を招くことが明らかになった。ビタミンCの不足はCOPD発症リスクを高めると考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：呼吸器、肺、COPD、ビタミンC、老化、肺気腫、喫煙、酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

私たちは、プロテオーム解析により、加齢に伴い肝臓や腎臓、肺で減少するたんぱく質 SMP30（日本名：加齢指標たんぱく質 30）を発見し、老化における重要性を明らかにしてきた。SMP30 の減少は生体機能の低下をもたらし、老年病、生活習慣病の発症リスクを高める。最近、SMP30 は哺乳類におけるビタミンC合成に必須な酵素グルコノラクトナーゼ（GNL）であり、SMP30（GNL と同じ）遺伝子を破壊したノックアウトマウスは体内でビタミンCを合成できず、このマウスをビタミンCの少ないエサ（マウスが1日に必要とする

ビタミンC量のわずか2.5%）で飼育したところ、普通のマウスの4倍のスピードで老化が進行することを突き止めた。ヒトは体内でビタミンCを合成できない。従って、このSMP30/GNL 遺伝子破壊マウスは、ヒトに極めて近い老化促進ヒトモデルマウスである。

## 2. 研究の目的

COPD（Chronic Obstructive Pulmonary Disease）は喫煙が主な原因とされる肺の生活習慣病である。気道および肺実質の慢性的炎症の結果、可逆性の乏しい気流閉塞を生じる慢性呼吸器疾患で、労作性の息切れ、咳、

痰、喘鳴などが特徴的な症状である。COPDは、世界の死亡原因の第4位にランクされ、日本でも約530万人の患者がいると推定される。しかし、その発症機構は未解明、予防・治療薬は全く開発されていない。

私たちは、1991年プロテオーム解析により、加齢に伴い肝臓や腎臓、肺で減少するたんぱく質SMP30（日本名：加齢指標たんぱく質30）を発見し、老化における重要性を明らかにしてきた。SMP30の減少は生体機能の低下をもたらし、老年病、生活習慣病の発症リスクを高める。最近、SMP30は哺乳類におけるビタミンC合成に必須な酵素グルコノラクトナーゼ（GNL）であり、SMP30（GNLと同じ）遺伝子を破壊したノックアウトマウスは体内でビタミンCを合成できず、このマウスをビタミンCの少ないエサ（マウスが1日に必要とするビタミンC量のわずか2.5%）で飼育したところ、普通のマウスの4倍のスピードで老化が進行することを突き止めた。これら研究成果はビタミンCの『抗老化作用』を科学的に裏付ける初めての報告である。ヒトは体内でビタミンCを合成できない。従って、このSMP30/GNLノックアウトマウスは、ヒトに極めて近い老化促進ヒトモデルマウスである。また、SMP30/GNLノックアウトマウスは同月齢の野生型マウスに比べて平均肺胞径が増大することも明らかにしている。このようにSMP30/GNLノックアウトマウスは、老化肺モデルマウスでもある。

COPDは高齢者に多いことから老年病として扱われているが、老化がCOPD発症にどのような役割を担っているのか、検討した科学的データはほとんどない。本研究では、私たちが開発したビタミンCを合成できないSMP30/GNL遺伝子破壊マウスを用いて、ビタミンC不足が肺に与える影響を酸化ストレス程度や肺の形態学的変化を指標として検討した。

### 3. 研究の方法

SMP30/GNLノックアウトマウスは生後30日齢で離乳後、ビタミンCを全く含まない餌（CL-2、日本クレア）や飲み水を与えて飼育した。また、比較のためビタミンC（1.5g/LビタミンC含有飲料水）を十分に与えるマウスと野生型マウスも用意した。ビタミンCの不足状態1ヶ月（生後2ヶ月齢）、2ヶ月（生後3ヶ月齢）目での肺の形態学的評価、そして酸化ストレスの評価を以下の項目で行った。

#### (1) 形態学的評価

- ・HE染色による肺病理組織像
- ・平均肺胞壁間距離：Mean alveolar cord length（Im）
- ・肺胞破壊指数：Destructive index（DI）

#### (2) 酸化ストレスの評価

- ・肺組織中のビタミンC濃度
- ・気管支肺胞洗浄液（BALF）中の細胞成分、総細胞数

BALFは生理食塩水を気管支肺胞に注入・回収を反復して局所の肺細胞、気道被覆液を採取する方法

- ・肺組織中の活性酸素種（ROS）量
- ROSはcarboxy-H<sub>2</sub>DCFDA（C400）を用いて測定
- (3) 統計学的解析（SPSSを使用）
- ・Single comparison：Student's t-test
  - ・Multiple comparison：ANOVA followed by Tukey

### 4. 研究成果

(1) ビタミンC不足状態1ヶ月（生後2ヶ月齢）、2ヶ月（生後3ヶ月齢）目でのビタミンCを与えないSMP30/GNLノックアウトマウスの肺ではビタミンC濃度がほとんど枯渇状態であった。また、ビタミンCを与えたSMP30/GNLノックアウトの肺では野生型マウスと同程度のビタミンCが存在していた。

(2) ビタミンC不足状態1ヶ月（生後2ヶ月齢）、2ヶ月（生後3ヶ月齢）目におけるSMP30/GNLノックアウトマウスの肺での肺胞径に相当する平均肺胞壁間距離（Im）はビタミンCを与えたSMP30/GNLノックアウトマウスや野生型マウスに比べて有意に増大していた。また、肺胞破壊指数（DI）も同様に増大していた。

(3) ビタミンC不足状態1ヶ月（生後2ヶ月齢）、2ヶ月（生後3ヶ月齢）目におけるSMP30/GNLノックアウトマウスの肺での活性酸素量はビタミンCを与えたSMP30/GNLノックアウトマウスや野生型マウスに比べて有意に増大していた。

(4) 体内でビタミンCを合成できないSMP30/GNLノックアウトマウスを用いて、ビタミンC不足が肺における酸化ストレスの増大や肺胞径、肺胞破壊の増大を招くことが明らかになった。また、SMP30/GNLノックアウトマウスに十分なビタミンCを与えることによりこれら影響がほとんど認められないことからビタミンCの影響であることが分かる。また、野生型マウスにビタミンCを与えると肺胞径や肺胞破壊の増大が見られたことからビタミンCの過剰摂取は肺の老化を促進させる可能性が示唆される。COPD発症要因の1つは肺における酸化ストレスの増加と考えられることからビタミンC不足はCOPD発症リスクを高めると考えられる。

### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

[雑誌論文] (計6件)

- ① Fukuda, M., Kanou, F., Shimada, N., Sawabe, M., Saito, Y., Murayama, S., Hashimoto, M., Maruyama, N. and Ishigami, A. : Elevated levels of 4-hydroxynonenal-histidine Michael adduct in the hippocampi of patients with Alzheimer's disease. *Biomed. Res.* (2009)
- ② Kondo, Y., Sasaki, T., Sato, Y., Amano, A., Iwama, M., Handa, S., Shimada, N., Fukuda, M., Akita, M., Lee, J., Jeong, KS., Maruyama, N. and Ishigami, A. : Vitamin C depletion increases superoxide generation in brains of SMP30/GNL knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377 291-296 (2008) 査読有
- ③ Park, JK., Jeong, DH., Park, HY., Son, KH., Shin, DH., Do, SH., Yang, HJ., Yuan, DW., Hong, IH., Goo, MJ., Lee, HR., Ki, MR., Ishigami, A. and Jeong, KS. : Hepatoprotective effect of Arazyme on CCL<sub>4</sub>-induced acute hepatic injury in SMP30 knock-out mice. *Toxicology* 256 132-142 (2008) 査読有
- ④ Ishigami, A. and Maruyama, N. : (REVIEW ARTICLE) Significance of SMP30 in Gerontology. *Geriatrics & Gerontology International* 7 316-325 (2007) 査読有
- ⑤ 石神昭人 : ビタミンC不足は慢性閉塞性肺疾患の発症リスクを高める. *ビタミン* 82 39-42 (2008) 査読有
- ⑥ 石神昭人 : ビタミンCの不足が老化に及ぼす影響. *ビタミン* 81 303-308 (2007) 査読有

[学会発表] (計15件)

- ① 半田節子、島田信子、天野晶子、福田貢、近藤嘉高、丸山直記、石神昭人 : マウス肝臓におけるSMP30/GNLの組織学的加齢変化. 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会, 神戸, 2008. 12. 9-12
- ② 石神昭人 : 未病における肺疾患とビタミンCの関係. 第15回日本未病システム学会学術総会, 東京, 2008. 11. 1-2
- ③ 五味恵子、島田信子、福田貢、榊原達哉、半田節子、高橋良哉、丸山直記、石神昭人 : 弱酸性域に至適pHを持つベータガラクトシダーゼ活性を用いた老化度測定法の開発. 第48回日本臨床化学会, 浜松, 2008. 8. 29-31
- ④ 石神昭人、半田節子、島田信子、丸山直記、真鍋幸子、高橋良哉、内田好昭 : アルツ

ハイマー病早期臨床検査試薬としてのシトルリン化GFAPサンドイッチELISA法の確立. 第48回日本臨床化学会, 浜松, 2008. 8. 29-31

- ⑤ 石神昭人、古澤元、佐藤安訓、井内陽子、錦見盛光、村田晃、半田節子、島田信子、福田貢、高橋良哉 : カルニチン合成系へのビタミンCの関与. 第60回日本ビタミン学会, 仙台, 2008. 6. 13-14
- ⑥ 近藤嘉高、佐々木徹、佐藤安訓、天野晶子、岩間水輝、半田節子、島田信子、福田貢、丸山直記、石神昭人 : 脳におけるビタミンCの活性酸素消去能の検討. 第60回日本ビタミン学会, 仙台, 2008. 6. 13-14
- ⑦ 天野晶子、島田信子、岩間水輝、福田貢、半田節子、丸山直記、相垣敏郎、石神昭人 : ビタミンC欠乏によるSVCT1およびSVCT2発現調節の検討. 第60回日本ビタミン学会, 仙台, 2008. 6. 13-14
- ⑧ 近藤嘉高、佐々木徹、佐藤安訓、天野晶子、岩間水輝、半田節子、島田信子、福田貢、丸山直記、石神昭人 : 脳におけるビタミンCの活性酸素消去能の解析. 第31回日本基礎老化学会, 松本, 2008. 6. 12-13
- ⑨ 古澤元、佐藤安訓、高橋良哉、石神昭人 : 生体内におけるカルニチン合成へのビタミンCの関与. 第128回日本薬学会, 横浜, 2008. 3. 26-28
- ⑩ 半田節子、久保幸穂、福田貢、丸山直記、石神昭人 : デジタル老化説—マウス肝臓におけるSMP30の加齢変化—. 第30回日本基礎老化学会, 札幌, 2007. 6. 20-22
- ⑪ 上川奈都子、島田信子、石神昭人、杉本昌隆、丸山直記、丸山光生 : 細胞老化関連遺伝子TARSH/Abi3bpの発現量低下と発癌の機能的関連. 第30回日本基礎老化学会, 札幌, 2007. 6. 20-22
- ⑫ 島田信子、朝倉(遊長)由希、半田節子、町田武生、石神昭人 : 脳におけるペプチジルアルギニンデアミナーゼ2(PAD2)の加齢変化. 第30回日本基礎老化学会, 札幌, 2007. 6. 20-22
- ⑬ 石神昭人、佐藤匡、佐藤安訓、近藤嘉高、瀬山邦明、丸山直記 : ビタミンC不足は慢性閉塞性肺疾患の発症リスクを高める. 第59回日本ビタミン学会, 長崎, 2007. 5. 24-25
- ⑭ 石神昭人、佐藤匡、佐藤安訓、近藤嘉高、瀬山邦明、丸山直記 : ビタミンCの不足は慢性閉塞性肺疾患(COPD)発症リスクを高める. 第61回日本栄養・食糧学会, 京都, 2007. 5. 17-20
- ⑮ 石神昭人、佐藤安訓、近藤嘉高、古澤元、天野晶子、島田信子、福田貢、半田節子、久保幸穂、丸山直記 : ビタミンC不足は老化を加速. 第127回日本薬学会, 富山, 2007. 3. 28-30

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 信子

財団法人東京都高齢者研究・福祉振興財団

東京都老人総合研究所・助手

60158962

(2) 研究分担者

石神 昭人

東邦大学・薬学部・准教授

50270658

(3) 連携研究者