様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ６ 月　 ９ 日現在

機関番号：１１５０１
研究種目：若手研究
研究期間：2022～2024
課題番号：２２Ｋ１７４３５

研究課題名（和文）老化及び老化関連疾患と酸化ストレス「プロテアソーム機能低下と細胞ストレス応答」

研究課題名（英文）Aging and aging-related diseases and oxidative stress Proteasome Dysfunction and Cellular Stress Response.

研究代表者
村田　恵理（Murata, Eri）

山形大学・医学部・講師

研究者番号：７０７３８４７６

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、加齢の表現型を示すマウスモデルを用い、プロテアソーム機能低下が皮膚虚血再灌流障害（IRI）の初期段階の皮膚損傷が悪化することを示した。更に、細胞培養系を用いた検討により、プロテアソームの機能障害は低酸素/再酸素化（H/R）による酸化ストレスを増大し、活性酸素種（ROS)産生が増加するが、Nrf2経路の活性化による抗酸化応答が適切に機能しない可能性を示した。また、プロテアソーム機能低下により生じた酸化ストレスはフリーラジカルスカベンジャーであるエダラボン（EDA）が効果的に抑制した。高齢者の褥瘡の初期段階において、EDA投与は皮膚の保護効果をもたらす可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義
プロテアソーム機能低下における皮膚IRIの悪化は、①ROSの増加②Nrf2経路の活性化による抗酸化反応が十分に機能していない、という可能性が考えられる。①ではプロテアソーム機能障害がミトコンドリアに損傷を与え、ROSが増加するとの報告がある。②ではプロテアソーム機能障害がNrf2下流の抗酸化遺伝子のシグナル伝達に直接影響を与えるという報告はないが、Nrf2活性化経路は加齢により衰退するとの報告がある。プロテアソームはシグナル伝達やタンパク質恒常性の維持に重要であり、Nrf2のシグナル伝達系への影響の解析により、酸化ストレスと老化・老化関連疾患の病態形成メカニズムの解明の前進が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we show that proteasome dysfunction exacerbates skin damage in the early stages of cutaneous ischemia-reperfusion injury (IRI) using a mouse model that exhibits an aging phenotype. Furthermore, using a cell culture system, we showed that proteasome dysfunction increases oxidative stress by hypoxia/reoxygenation (H/R) and increases reactive oxygen species (ROS) production, but the antioxidant response by activation of the Nrf2 pathway may not function properly. In addition, oxidative stress caused by proteasome dysfunction was effectively suppressed by edaravone (EDA), a free radical scavenger. EDA administration may have a protective effect on skin in the early stages of pressure ulcers in the elderly.

研究分野：分子病理学、薬理学、分子生物学

キーワード：老化　老化関連疾患　酸化ストレス応答　虚血再灌流障害　褥瘡

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

プロテアソームはユビキチン化されたタンパク質を分解する巨大なプロテアーゼ複合体であり、生体の恒常性維持に重要な役割を果たす。加齢に伴いプロテアソーム機能が低下することが報告されており、プロテアソームの機能異常は様々な病態に関与すると推定されているが、20S プロテアソームサブユニット遺伝子のノックアウトは致死的であり、プロテアソーム機能低下の病態に及ぼす影響について個体レベルで詳細な解析を行うことはこれまで困難であった。一方、研究代表者が所属していた研究室ではプロテアソームの機能低下を示すモデルマウス（β5t-Tg）の開発に成功している。本マウスは老化の表現型を示し、組織内にはポリユビキチン化タンパク質や酸化変性タンパク質の蓄積を認める。更に、高脂肪食やタバコ煙等の環境因子を負荷すると、脂肪代謝異常や肺気腫等のヒトの老化関連疾患に類似した病態を示すことを明らかにしている（Am J Pathol, 2012; Lab Invest, 2015）。

環境要因は様々な細胞ストレスを引き起こすが、細胞ストレス応答もまた加齢により減弱することが知られている。老化によるプロテアソーム活性の低下と細胞ストレス応答の異常は相加的に老齢病態の形成に働くのであろうか？　代表的な細胞ストレスである酸化ストレスは、生体の酸化反応と抗酸化反応のバランスが崩れた状態を指し、呼吸や代謝で発生する内因性の活性酸素に加え，喫煙などの外的因子により発生する。Keap1-Nrf2 システムは酸化ストレスによって活性化され，高等動物における酸化ストレス防御に重要な役割を果たす。転写因子である Nrf2 はプロテアソームサブユニット遺伝子や様々な生体防御系遺伝子群の上流領域に存在する抗酸化剤応答配列（ARE: antioxidant response element）に結合し、これらの遺伝子群の発現を活性化し、プロテアソーム活性を上昇させるとともに細胞のストレス応答能を増強する。細胞ストレスにより変性タンパク質が増加すると、変性タンパク質のユビキチン化とプロテアソームによる選択的分解が起こるが、加齢によりプロテアソーム機能が低下した状態では変性タンパク質の処理が十分に進まず、細胞老化が促進されると推定されているが、詳細は明らかでない。本研究では、病態形成におけるプロテアソームと酸化ストレスの役割について詳細に検討し、予防並びに治療法とそれに付随する看護支援方法を開発する。

２．研究の目的

本研究の特色は老化の表現型を示すマウスモデル（β5t-Tg マウス）を研究に応用することである。また、プロテアソームと酸化ストレスの関連性を個体レベルで解析できる実験系はこれまで確立されていないが、本研究ではβ5t-Tg マウスと Nrf2 による転写誘導を可視化できるレポーターマウス（OKD マウス）を交配し、新たなマウスモデルを用いた研究を推進する。本研究の成果は生命科学や看護学に貢献するのみならず、加齢により発症リスクが高まるヒト疾患の病態解明を通じ、健康寿命の延長を目指した新しい予防法や治療法とそれに付随する看護支援方法の開発に貢献する。

３．研究の方法

本研究ではプロテアソームと酸化ストレスに着目し、糖尿病やメタボリック症候群、褥瘡等の老化関連疾患の病態形成について以下の研究を実施した。

1．酸化ストレス負荷によりプロテアソーム機能が細胞ストレスに及ぼす影響を明らかにした。

2．酸化ストレス負荷による病態形成におけるプロテアソーム機能と細胞ストレスの役割を明らかにした。

3．活性酸素種（ROS）を除去するとされるフリーラジカル消去剤を投与し、酸化ストレスを軽減することにより、上記 1,2 に改善を認めるか否かを確認した。

4．酸化ストレスが病態形成の一因とされる疾患の治療及び予防法及びそれに付随する看護支援方法について検討した。

具体的には以下の実験を実施した。

1) Nrf2 による転写誘導を可視化できるレポーターマウス（OKD マウス）とプロテアソーム機能低下マウス（β5t-Tg マウス）を交配し、OKD-β5t-Tg マウスを作製した。

2) プロテアソーム機能低下が細胞ストレスに与える影響について、in vitro の実験系で解析した。OKD 及び OKD-β5t-Tg マウスより初代培養細胞を分離し（線維芽細胞，血管内皮細胞）、酸化ストレスによるルシフェラーゼ発光を及び活性酸素種（ROS）をルミノメーターで計測した。酸化ストレス誘導には亜ヒ酸、高グルコース、高脂肪酸の負荷を行い、非負荷群との比較検討を行った。

3)プロテアソーム機能低下が細胞ストレスに与える影響について、in vivo の実験系で解析した。

3)-1　OKD-β5t-Tg マウス、及びコントロール OKD マウスの定常状態における酸化ストレスを

IVIS Imaging System を用いて解析し、ストレスの変化や組織によるストレス感受性の違いを解析した。
3)-2　OKD-β5t-Tg マウス、及びコントロール OKD マウスに高脂肪食負荷或いはストレプトゾシン（STZ）投与による糖尿病を誘発し、ストレスの変化や組織による感受性の違いを解析した。
4）ROS を消去するとされるフリーラジカル消去剤を投与し、酸化ストレスの軽減が上記 2)，3)の病態改善に寄与するか否かについて検討した。

４．研究成果

プロテアソーム機能低下を示す Tg では、WT に比較して皮膚 IRI における組織傷害が増悪した。IRI の病態形成に影響を与える炎症性サイトカインや接着分子の発現を検討した結果では、WT と Tg の間に有意差を認めなかった。Tg では IRI による酸化ストレスの亢進を認めたが、酸化ストレス応答に働く Nrf2 経路を活性化させた Keap-1-/+/Tg において IRI による組織障害は十分に改善されなかった。

FC を用いた検討では、プロテアソーム阻害剤の負荷は H/R 環境における細胞ストレスを増強し、ROS 産生を増加させた。酸化ストレス応答関連分子の発現は H/R　0h-12h にかけて増強したものの、24h では Nrf2 の活性化に引き続いて起こる抗酸化酵素群の発現を認めなかった。

また、フリーラジカル消去剤である EDA は Tg の皮膚 IRI を改善し、酸化ストレスを抑制した。EDA は FC に発生する酸化ストレスを抑制したが、酸化ストレス応答転写因子および抗酸化酵素群の発現に変化は見られなかった。

老化は褥瘡の重大な危険因子であるものの、褥瘡の病因として老化に焦点を当てた研究は殆どみられない。本研究では、加齢の表現型を示すマウスモデルを用いて、プロテアソーム機能低下が IRI の初期段階における皮膚損傷を悪化させることを示した。更に、細胞培養系を用いた検討により、プロテアソームの機能障害は H/R による酸化ストレスを増大させ、ROS 産生が増加する一方、Nrf2 経路の活性化による抗酸化応答が適切に機能しない可能性を示した。また、プロテアソーム機能低下により生じた酸化ストレスはフリーラジカルスカベンジャーである EDA により効果的に抑制された。これらの結果は、プロテアソーム機能が低下した高齢者の褥瘡の初期段階において、EDA 投与が保護効果をもたらす可能性があることを示唆している。

プロテアソーム機能低下モデルにおける皮膚 IRI の悪化の要因には、⑴ROS の増加、⑵Nrf2 経路の活性化による抗酸化反応が十分に機能していない、という 2 つの可能性が考えられる。ROS の増加に関しては、プロテアソーム機能障害がミトコンドリアに損傷を与えることにより、ROS を増加させることが報告されている。Nrf2 経路の活性化による抗酸化反応が十分に機能しない点にいついては、現在のところ、プロテアソーム機能障害が Nrf2 下流の抗酸化遺伝子のシグナル伝達に直接影響を与えるという報告はない。その一方で、Nrf2 活性化経路が加齢により衰退することが報告されている。プロテアソームはシグナル伝達やタンパク質恒常性の維持に重要な役割を果たしており、Nrf2 のシグナル伝達系への影響について解析を進めることで、酸化ストレスと老化・老化関連疾患の病態形成の分子メカニズムの解明が前進することが期待される。

プロテアソーム活性の加齢に伴う減少は、多数の臓器で報告されている。高齢者や老化した皮膚から分離された FC ではプロテアソーム活性が低いことが報告されており、皮膚 FC は IRI による酸化ストレスに対し感受性が高いことが推定される。加齢により発症リスクの高まる老化関連疾患の研究においては、加齢による生理的変化を反映するモデルを用いた病態解析を進めることが重要と考えられる。今後の展望として、加齢によるレドックスバランスの悪循環を改善する予防薬や治療薬の開発が望まれる。

本研究により、プロテアソームの機能低下は酸化ストレスの亢進による皮膚 IRI を増悪させることを明らかにした。プロテアソーム機能は加齢により低下することが報告されており、高齢者における褥瘡の病態発症に影響する可能性が考えられる。

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　0件／うちオープンアクセス　1件）

１．著者名 Eri Murata, Takuma Yoshida, Utano Tomaru, Saaki Yamamoto, Aya Fukui-Miyazaki, Akihiro Ishizu, Masanori Kasahara	４．巻 137
２．論文標題 Decreased proteasome function increases oxidative stress in the early stage of pressure ulcer development	５．発行年 2024年
３．雑誌名 Experimental and Molecular Pathology	６．最初と最後の頁 104891
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yexmp.2024.104891	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 －

〔学会発表〕　計10件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 村田恵理，大沼優衣，大井拓巳，佐竹美穂，佐藤梨花子，齋藤貴史，藤井順逸
２．発表標題 褥瘡の病態形成にAldehyde reductase (ALR) が与える影響
３．学会等名 第76回日本酸化ストレス学会学術集会
４．発表年 2023年

１．発表者名 木村未来，村田恵理，石田陽子，松田友美
２．発表標題 マウス圧迫創における温冷刺激の創傷治癒への影響～Heat shock Protein B1に着目して～
３．学会等名 第25回日本褥瘡学会学術集会
４．発表年 2023年

１．発表者名 村田恵理，大沼優衣，佐藤有依，千葉瑛里香，藤田有華，齋藤貴史，藤井順逸
２．発表標題 ビタミンCが老齢マウスの褥瘡形成に与える影響
３．学会等名 第21回コ・メディカル形態機能学会学術集会
４．発表年 2023年

１．発表者名
Eri Murata, Yui Onuma, Takumi Oi, Miho Satake, Rikako Sato, Takafumi Saito, Junichi Fujii

２．発表標題
Aldehyde reductase affects the pathogenesis of pressure ulcers

３．学会等名
第97回日本薬理学会年会

４．発表年
2023年

１．発表者名
Eri Murata, Yui Onuma, Takumi Oi, Miho Satake, Rikako Sato, Takafumi Saito, Junichi Fujii

２．発表標題
Influence of Aldehyde reductase (ALR) on the pathogenesis of pressure ulcers

３．学会等名
第113回病理学会総会

４．発表年
2023年

１．発表者名
村田恵理，大沼優衣，佐藤有依，千葉瑛里香，藤田有華，齋藤貴史，藤井順逸

２．発表標題
褥瘡の病態形成における加齢変化とアスコルビン酸（AsA）が与える効果

３．学会等名
第31回山形分子生物学セミナー

４．発表年
2023年

１．発表者名
Eri Murata, Takuma Yoshida, Saaki Yamamoto, Keishi Makita, Akihiro Ishizu, Utano Yomaru, Masanori Kasahara

２．発表標題
Decreased proteasomal activityaffects the pathogenesis of pressure ulcer

３．学会等名
The 95th Annual Meeting ofthe Japanese Pharmacological Society

４．発表年
2022年

１．発表者名 大井拓巳，大沼優衣，佐竹美穂，佐藤梨花子，齋藤貴史，藤井順逸，村田恵理
２．発表標題 Aldehyde reductase（ALR）が褥瘡の病態形成に与える影響
３．学会等名 日本生化学会東北支部第88回例会
４．発表年 2022年

１．発表者名 大井拓巳，大沼優衣，佐竹美穂，佐藤梨花子，齋藤貴史，藤井順逸，村田恵理
２．発表標題 Aldehyde reductase（ALR）が褥瘡の病態形成に与える影響
３．学会等名 第30回　山形分子生物学セミナー
４．発表年 2022年

１．発表者名 Eri Murata, Takumi Oi, Yui Onuma, Miho Satake, Rikako Sato, Takafumi Saito, Junichi Fujii
２．発表標題 Influence of Aldehyde reductase (ALR) on the pathogenesis of pressure ulcers
３．学会等名 The 112th Annual Meeting ofthe Japanese Society of Pathology
４．発表年 2023年

〔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

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関