

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23655139

研究課題名（和文）長寿遺伝子を指標とした寿命に及ぼす環境化学物質の影響評価法の構築と解析

研究課題名（英文）Construction and analysis of the evaluation system of environmental chemical substances on longevity using a longevity gene as an index of assessment

研究代表者

蔵崎 正明（KURASAKI MASAOKI）

北海道大学・大学院地球環境科学研究院・助教

研究者番号：80161727

研究成果の概要（和文）：新規評価法構築のために環境汚染化学物質のサーチュインファミリーの 1 つである Sirt1 の発現に及ぼす影響を検討したところ、環境ホルモン様作用があるとされ、細胞内アポトーシスを増強する作用のあるフタル酸ジエチル投与、あるいは生体内過酸化状態を引き起こす銅および過酸化水素投与により Sirt1 の発現量が有意に増加していることが明らかになった。一方、妊娠中に低栄養曝露されたラットの産仔中では Sirt1 および Sirt2 がやや減少する傾向が認められた。以上の結果から長寿遺伝子を化学物質影響評価に用いることは妥当と結論された。

研究成果の概要（英文）：To construct a new evaluation system for environmental contaminants, we have examined effects of chemical contaminants on expression of sirtuin family using PC12 cell system. As results, expression of Sirt 1 was significantly up-regulated by treatment of diethyl phthalate (one of the potential endocrine disrupters and enhance element of apoptosis in the cell), copper or hydrogen peroxide in PC12 cells. In addition, the tendency that expression of Sirt1 and Sirt2 was decreased in the rat offspring from undernourished pregnant mothers was observed. From the results, it was concluded that measurement of Sirt1 and Sirt2 were useful tool for evaluation of chemical substances on organism.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・環境関連化学

キーワード：微量環境物質評価、影響評価法、長寿遺伝子、エピジェネチック、リアルタイム PCR、アポトーシス、フタル酸ジエチル、PC12 細胞

1. 研究開始当初の背景

従来、環境汚染化学物質の生体影響に関する研究は、直接的に生体に及ぼす有害性として評価されてきた。例えば、我々は遺伝子に定められた細胞死であるアポトーシスに着目し、数種の内分泌攪乱化学物質がアポトーシスに影響を与えることを見出してきた。すなわち、トリブチルスズはアポトーシスを抑

制し（Yamanoshita et al, Biochem Biophys Res Commun. 2000;272:557）、ノニルフェノールはアポトーシスを増強した（Aoki et al, Life Sci. 2004;74:2301）。しかし、従来の化学物質の毒性評価法では「生体の生存時間に及ぼす影響」、すなわち、寿命に及ぼす影響は評価されてこなかった。例えば、胎児期において細胞分化や増殖等にごく低濃度曝露された場合、出生後の寿命にどのような影響

を与えるかについてはほとんどわかっていない。

近年、サーチュインという長寿命関連遺伝子に関する研究が進んでいる。例えば、Sirt1はNAD依存性脱アセチル化酵素として、ヒストンやp53等のタンパク質を脱アセチル化する。アセチル化状態を調節することによってタンパク質の働きを制御している。さらに、Sirt1あるいはSirt2の寿命延長作用はインスリン/IGF-1シグナル伝達系を介することがわかっており、細胞のアポトーシスにも関与している。このように、Sirt1および2は老化プロセスのキーとして重要な働きを持っている。

そこで、我々は、寿命延長作用をもつこれら遺伝子群の発現と活性を指標として用いれば、環境汚染化学物質の寿命に及ぼす新規の影響評価法を構築できるのではないかとこの着想を得た。

2. 研究の目的

これまで、環境汚染化学物質の生体に及ぼす影響は、主として生き死に関わることを指標にその有害性を評価されてきたが、寿命や老化に及ぼす影響としては評価されてこなかった。我々は、化学物質等を与えた際のSirt1活性を指標として用いれば、環境汚染化学物質の寿命に及ぼす影響を評価できるのではないかとこの着想を基に、本研究では、化学物質投与による寿命や老化に及ぼす影響を明らかにし、その結果を基に長寿遺伝子を指標にした新規化学物質影響評価法を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) アポトーシスの制御において中心的な役割を果たす酵素「SIRT群」の活動レベルは環境ストレスによって下がり、このことで発ガン作用も引き起こされる。まず平成23年度にはSirt1および2の培養細胞系を用いた測定系を確立し、環境ホルモン様化学物質投与の細胞系への影響等を調べ、平成23年度には内分泌攪乱化学物質の低濃度曝露がSirt1および2の発現にどのような影響を与えるのかを確定させ、併せて細胞内酸化ストレス状態等によるSirt1および2の発現への影響も検討する。また動物実験の系を用いて、妊娠期低栄養のラット母親から生まれた新生仔が対照群に比べてどのように長寿遺伝子であるSirt1および2の発現量が変化するかを調べ、肥満との関連を検討する。

(2) 準備：現有の細胞培養システムを用いる。今回使用予定のラット副腎髄質腫由来のPC12細胞、ヒト胎盤細胞Bewoおよびヒト血管内皮細胞HUVECは、研究代表者の研究室において経常的な培養を行なっている。また、

研究分担者の齋藤は生体内因子のリン酸化の定量に多くの経験を有し、生体内因子のウェスタンブロットに習熟している。また連携研究者の佐藤は、Sirt1活性因子と考えられるポリフェノール類の生体影響に関する研究では国内でも権威であり、我々とこれまで共同研究を行ってきた。研究代表者の蔵崎は、本研究の要ともなるリアルタイムPCRの使用に習熟し、かつ内分泌攪乱化学物質のアポトーシスを用いた影響評価系を構築するなど細胞生物学的手法に長けている。

(3) 実験方法：

- ・培養細胞中の恒常的Sirt1およびSirt2発現量の測定をRT-PCRを用いて検討する。最適プローブおよびPCR条件の選定。

- ・環境ホルモン様作用があると考えられているフタル酸ジエチルがPC12細胞にどのような影響を与えているのか、研究代表者の研究室で開発されたアポトーシスを指標にした影響評価法系を用いて評価する。

- ・上記の結果を基にフタル酸ジエチル投与におけるSirt1および2発現量の変化を測定し、長寿遺伝子とアポトーシスとの関係を明らかにすることを試みる。

- ・細胞内の酸化状態を挙げた時にSirt1および2の発現量がどのように変化するかを調べる。酸化状態亢進には、銅あるいは過酸化水素を用いることとし、最適曝露状態等を検討する。

- ・以上の結果をまとめ、細胞内酸化状態亢進、アポトーシス誘導下及び化学物質曝露時のSirt1および2の発現量の変化より、長寿遺伝子を化学物質等の影響評価に用いることの妥当性を判定する。

- ・カロリー制限によりSirt1および2発現量が増えアポトーシスが抑制されるという報告があるが、同様の傾向が動物実験でも確認されるかどうかを連携研究者である佐藤の開発した系を用いて確かめる。つまり、妊娠期低栄養に晒された出産仔のSirt1および2の発現量を調べ、対照群との比較を行ないカロリー制限の及ぼす影響を判定する。

4. 研究成果

(1) 細胞およびSirt1およびSirt2発現量定量のためのリアルタイムPCR

3種の培養細胞中の恒常的Sirt1発現量をRT-PCRを用い予備的に検討したところ、PC12細胞で十分なSirt1の発現量が確認された。またプローブはそれぞれ数種を試したところSirt1ではS1-F CGCCTTATCCTCTAGTTCCTGTG、S1-R CGGTCTGTCAGCATCATCTTCCの組み合わせ、Sirt2ではS2-F CTCCCACCAACAGATGACC、S2-R ATTCAGACTCGGACACTGAGGの組み合わせが最も良好な成績を修めた。

(2) PC12細胞におけるフタル酸ジエチル曝露

PC12細胞に1~10,000 ppbの範囲でフタル酸ジエステル曝露したところ、細胞生残率はコントロールと比べてほぼ同程度であり、この範囲で細胞毒性は無いものと考えられた。同様に、フタル酸ジエチル曝露細胞より抽出したDNAの電気泳動からも大きなDNA損傷等の障害は認められなかった。しかし、PC12細胞から栄養因子を除いたアポトーシスを誘導する条件下でフタル酸ジエチルを曝露すると、DNAの電気泳動では誘導されたアポトーシスがフタル酸ジエチル曝露によりさらに増幅されているように観察された。この現象は、DNA損傷度を定量するTUNEL法によっても確かめられ、さらにアポトーシス実行因子酵素活性およびミトコンドリアから細胞質内に放出されるシトクロムC量がフタル酸ジエチル曝露でさらに有意に上昇していることから(図1)、フタル酸ジエチルが血清除去により誘導されたアポトーシスを増強させることが明らかになった。

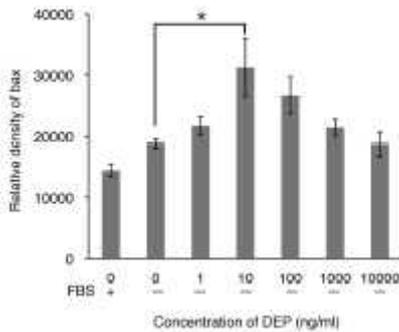


図1 ジエチルフタレート曝露(1~10,000 ppb)細胞質内に放出されたシトクロム量

(3) PC12細胞におけるフタル酸ジエチル曝露によるSirt1およびSirt2発現量

PC12細胞の培養液中から血清除去を行なうとアポトーシスが誘導される。この血清除去由来のアポトーシスが起きた際のSirt1およびSirt2発現量を調べてみると、コントロールと比べて有意の差は無いもののSirt1発現量は約50%増加し、Sirt2発現量は約20%減少している。通常アポトーシスが起るとSirt1発現量は減少すると言われているが、腫瘍細胞であるPC12細胞では逆の現象が起こるのかもしれない。さらにこの状態にフタル酸ジエチルを曝露すると、Sirt2発現量は変化しないにもかかわらず、Sirt1発現量はアポトーシスを増強する働きに伴って有意に上昇している(表1)。このアポトーシス増強はシトクロムCの有意な上昇等から考えると細胞内酸化ストレス増大に伴って起こっており、Sirt1発現量もそれに歩調を合わせて上昇している。

表1 フタル酸ジエチル投与によるSirt1発現量

フタル酸ジエチル	FBS	Sirt1発現量
0 ppb	マイナス	1.2 ± 0.07
10 ppb	マイナス	8.2 ± 3.2
1,000 ppb	マイナス	9.9 ± 3.7

(4) PC12細胞における銅および過酸化水素曝露によるSirt1およびSirt2発現量

血清除去培地で培養しているPC12細胞にフタル酸ジエチル曝露するとSirt1発現量が増加していたが、本研究のこれまでの結果から考えると、この際に細胞内酸化ストレスが向上してアポトーシスが增強されている。同様の効果を細胞に及ぼす銅および過酸化水素を細胞に曝露してアポトーシスが誘導されるか否かを確かめ、併せてSirt1およびSirt2の発現量を調べた。その結果、銅投与によりアポトーシスが誘導し、過酸化水素によりそのアポトーシスはさらに增強されていた。その際のSirt1発現量は銅投与により2倍に増加し、過酸化水素投与によりさらに4倍増加していた。Sirt2発現量も、フタル酸ジエチル投与の場合とは異なり、同様の傾向を示した。以上の結果をまとめると、腫瘍細胞にアポトーシスを誘導あるいは増強する化学物質を曝露した際に長寿遺伝子であるSirt1およびSirt2の発現量が増加する傾向が認められた。このことから、これら長寿遺伝子を化学物質の影響評価の指標として用いることが可能であると考えられた。

表2 銅および過酸化水素投与によるSirt1およびSirt2発現量

銅 mM	H ₂ O ₂ mM	Sirt1発現量	Sirt2発現量
0	0	0.022 ± 0.003	0.004 ± 0.001
0.5	0	0.048 ± 0.013	0.006 ± 0.002
0.5	0.25	0.21 ± 0.12	0.024 ± 0.009

(5) 妊娠期低栄養に晒された出産仔のSirt1およびSirt2の発現量

妊娠期のラットに8%カゼイン食を与えた群を低栄養群、20%カゼイン食を与えた群をコントロール群とし、授乳期には両群とも20%カゼイン食を与えた。この低栄養出産仔は脂質代謝系に変動を起こし、肥満する傾向が認められている。今回、出生後3週齢および23週齢時におけるSirt1およびSirt2の発現量を調べた。その結果、Sirt1およびSirt2共にやや減少する傾向が認められた。このことは、カロリー制限するとSirt1発現量が増加する従来の知見と反する結果のように思われるが、妊娠期低栄養および授乳期高栄養が肥満のきっかけになることを考えると長寿遺伝子発現量が減少するという本研究の結果は極めて妥当なように思われる。細胞に化学物質を曝露した際の結果と合わせ、長寿遺伝子を化学物質の毒性影響および栄養因子の健

康影響の指標に用いることは有益であると判断された。さらに、本動物実験の系に化学物質投与を組み合わせた際の評価指標としても有効であることが期待された。

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 7 件)

- ① Yongkun Sun, Zhikun Guo, Shouhei Iku, Takeshi Saito and Masaaki Kurasaki, Diethyl phthalate enhances expression of SIRT1 and DNMT3a during apoptosis in PC12 Cells, *Journal of Applied Toxicology*, 査読有、in press.
- ② Yuuka Mukai, Yongkun Sun and Shin Sato, Azuki bean polyphenols intake during lactation upregulate AMPK in male rat offspring exposed to fetal malnutrition, *Nutrition*, 査読有、Vol. 29, No. 1, 2013, pp. 291-297.
- ③ Shin Sato, Yuuka Mukai and Takeshi Saito, Quercetin intake during lactation modulates the AMP-activated protein kinase pathway in the livers of adult male rat offspring programmed by maternal protein restriction, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 査読有、Vol. 24, No. 1, 2013, pp. 118-123.
- ④ Yongkun Sun, Kumiko Takahashi, Toshiyuki Hosokawa, Takeshi Saito and Masaaki Kurasaki, Diethyl Phthalate Enhances Apoptosis Induced by Serum Deprivation in PC12 Cells, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 査読有、Vol. 111, No. 2, 2012, pp. 113-119.
- ⑤ Kumiko Takahashi, Yongkun Sun, Ikumi Yanagiuchi, Toshiyuki Hosokawa, Takeshi Saito, Miyako Komori, Tatsufumi Okino and Masaaki Kurasaki, Stevioside enhances apoptosis induced by serum deprivation in PC12 cells, *Toxicology Mechanisms and Methods*, 査読有、Vol. 22, No. 4, 2012, pp. 243-249.
- ⑥ Mari Egawa, Kentaro Aoki, Yongkun Sun, Toshiyuki Hosokawa, Takeshi Saito and Masaaki Kurasaki, Effects of parabens on apoptosis induced by serum

deprivation in PC12 cells, *Journal of Environmental Science and Health, Part B. Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 査読有、Vol. 47, No. 3, 2012, pp. 196-204.

- ⑦ Sayaka Seki, Miho Aoki, Toshiyuki Hosokawa, Takeshi Saito, Runa Masuma, Miyako Komori and Masaaki Kurasaki, Bisphenol-A Suppresses Neurite Extension due to Inhibition of Phosphorylation of Mitogenactivated Protein Kinase in PC12 Cells, *Chemico-Biological Interactions*, 査読有、Vol. 194, No. 1, 2011, pp. 23-30.

[学会発表] (計 5 件)

- ① Masato Tanaka, Mai Tsuruga, Norihito Takahashi, Aya Sasaki, Miki Miyajima, Ryo Nishimura, Naoko Hishioka, Yuuka Mukai, Shin Sato, Masaaki Kurasaki and Takeshi Saito, Effect of quercetin intake during lactation on the AMPK activation in the hypothalamus of adult male rat offspring programmed by maternal protein restriction, The 6th International Niigata Symposium on Diet and Health, October 16, 2012, Toki Messe (Niigata)
- ② Yongkun Sun, Yuuka Mukai, Shin Sato, Toshiyuki Hosokawa, Takeshi Saito and Masaaki Kurasaki, Effects of consumption of green tea during lactation on epigenetic factors in female infants of pregnancy rats with low-protein diet, The 6th International Niigata Symposium on Diet and Health, October 16, 2012, Toki Messe (Niigata)
- ③ Yongkun Sun, Miki Miyajima, Toshiyuki Hosokawa, Takeshi Saito, Masaaki Kurasaki, Changes of epigenetic factors in apoptotic status induced by copper in PC12 cells, 8th International Copper Meeting: Copper in Biology, October 2, 2012, Hotel Calabona (Italy)
- ④ 孫 永琨、佐藤 伸、向井友花、細川敏幸、齋藤 健、蔵崎正明、妊娠期緑茶投与の出産仔のエピゲネティック因子に及ぼす影響、第 82 回日本衛生学会 2012 年 3 月 25 日、京都大学 (京都市)

- ⑤ Yongkun Sun, Toshiyuki Hosokawa, Takeshi Saito and Masaaki Kurasaki, A Novel Study of Effects of Environmental Chemical Substances on Epigenetic Modification, Cell Symposia: Epigenetics and the Inheritance of Acquired States 2011, October 11, 2011, The Westin Boston Waterfront (USA)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

特になし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蔵崎 正明 (KURASAKI MASAOKI)
北海道大学・大学院地球環境科学研究院・
助教
研究者番号：80161727

(2) 研究分担者

齋藤 健 (SAITO TAKESHI)
北海道大学・大学院保健科学研究院・教授
研究者番号：40153811

(3) 連携研究者

佐藤 伸 (SATO SHIN)
青森県立保健大学・健康科学部・教授
研究者番号：40310099