

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月7日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04505

研究課題名(和文) ビタミンC、Eの同時不足が記憶、学習行動、脂質代謝、老化、加齢疾患に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of simultaneous deficiency of vitamins C and E on memory, learning behavior, lipid metabolism, aging and age-associated disease

研究代表者

石神 昭人 (Ishigami, Akihito)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長

研究者番号：50270658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンCを体内で合成できないSMP30遺伝子欠損マウスと脂溶性抗酸化物質であるビタミンEの細胞内輸送能が欠損したTTP(トコフェロール輸送タンパク質)遺伝子欠損マウスを掛け合わせ、新規にSMP30/TTP二重欠損マウスを作出した。SMP30/TTP二重欠損マウスを用いた行動解析実験により、ビタミンCとビタミンEの両方が不足すると、不安様行動が増加し、運動能力および記憶学習能力が低下することがわかった。また、ビタミンCとEの同時不足は、肝臓での脂質代謝に影響を及ぼすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We established SMP30/TTP double knockout mice as a novel double-deficient model for both vitamin C and vitamin E. SMP30/TTP double knockout mice showed impaired cue and context-dependent fear memory if both vitamin C and vitamin E were deficient. Moreover, simultaneous deficiency of vitamin C and E revealed that it affects lipid metabolism in the liver.

研究分野：老化

キーワード：老化 食品

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

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、肺で減少するタンパク質 SMP30 (日本名: 加齢指標タンパク質 30) を発見し、老化における重要性を明らかにしてきた。加齢に伴う SMP30 の減少は、生体機能の低下をもたらす、老年病、生活習慣病の発症リスクを高める。2005 年、SMP30 は哺乳類におけるビタミン C (VC) 合成に必須な酵素、グルコノラクトナーゼであり、SMP30 遺伝子を欠損したノックアウト (KO) マウスは、体内で VC を合成できず、このマウスを VC の少ないエサ (マウスが 1 日に必要とする VC 量のわずか 2.5%) で飼育したところ、VC 不足状態が長期的に続くと寿命が短くなることを明らかにした。しかし、長期的な VC 不足がどのようにして寿命の短縮をもたらすのか、その詳細なメカニズムはいまだ明らかではない。一方、私たちは、老化の原因のひとつと考えられている活性酸素種 (ROS) が VC 不足により、脳や肝臓、腎臓、心臓、胃、骨格筋など、ほとんどの臓器で顕著に増加していることを明らかにした。ヒトは体内で VC を合成できない。従って、この SMP30-KO マウスは、ヒトに極めて近い老化促進モデル動物である。

一方、VC と同様に強い抗酸化能力 (還元力) を持つ脂溶性のビタミン E (VE, α -トコフェロール) も生体内では細胞膜や脂質の過酸化を防いでいる。腸管から吸収された VE は、キロミクロンにより肝臓に運ばれて α -トコフェロール輸送タンパク質 (TTP) による細胞内輸送過程を経て、再び肝臓から血液循環に入る。TTP ノックアウト (TTP-KO) マウスは、(1)胎盤形成不全による不妊、(2)振戦を伴う進行性運動失調を発症する。不妊や運動失調は、VE 不足による酸化ストレスの増加が原因である。

水溶性 VC と脂溶性 VE は、共に強力な抗酸化剤として細胞を保護し、相互作用して還元状態を維持している。In vitro の実験では、酸化型 VE (VE ラジカル) は、VC により還元され、還元型 VE に再生される。しかし、生体内実験では、酸化型 VE が VC により再生される証明は、いまだない。その理由は、生体内で VC、VE を同時に不足、欠乏させることが不可能であったためである。本研究では、SMP30-KO と TTP-KO のダブルノックアウト (DKO) マウスを作出することにより、この問題を克服する。また、TTP-KO マウスは不妊のため、一度に十分な DKO マウスの個体数を得ることは不可能である。私たちは、体外受精 (IVF)・胚移植の技術を用いて、この点も克服する。即ち、SMP30/ TTP-DKO マウスの受精卵約 1,000 個を偽妊娠マウス (あるいは仮親) に移植して、帝王切開で出産させることで、出生日が同一の十分な個体数 (100 匹以上) の SMP30/ TTP-DKO マウスを得る。

2. 研究の目的

本研究では、私たちが独自に開発した VC、VE を合成、輸送できない SMP30/ TTP-DKO マウスを用いて、(1) VC、VE 不足による記憶、学習行動に及ぼす影響を明らかにする。即ち、体外受精・胚移植により作出した十分な個体数の SMP30/ TTP-DKO マウスを VC、VE 不足状態にして、オープンフィールド (不安行動、活動性)、明暗選択課題 (不安行動)、モリス水迷路課題 (空間記憶 (海馬)、長期記憶 (海馬)、遊泳能力)、恐怖条件づけ (短期記憶 (扁桃体)、長期記憶 (扁桃体および海馬)、刺激応答) など記憶、学習行動解析を行う。VC、VE の摂取は、認知機能やアルツハイマー病の改善効果があるという報告があることから、VC、VE 不足は認知機能を低下させ、記憶、学習行動に影響を及ぼすことが期待される。(2) VC、VE 不足が脂質代謝に及ぼす影響を明らかにする。私たちは、VC 不足により、コレステロール代謝、胆汁酸合成に重要な酵素 Cyp7a1 の活性が低下し、胆汁酸の合成量が顕著に減少することを以前に明らかにしている。また、VE 不足はアテローム性動脈硬化を引き起こすことが TTP/ApoE-KO マウスを用いた研究により報告されている。VC、VE 不足は、早期に脂質代謝異常を来し、非アルコール性脂肪肝 / 炎 (NAFLD/NASH) を発症する可能性が高い。SMP30/ TTP-DKO マウスの解析は、NAFLD/NASH 発症機構の解明に繋がる可能性も期待される。

3. 研究の方法

(1) VC、VE 不足による記憶、学習行動に及ぼす影響

体内で VC を合成できない SMP30-KO マウスと細胞内輸送能が欠損した TTP-KO マウスを掛け合わせ、SMP30/ TTP-DKO マウスを作出する。TTP-KO マウスの雌は、不妊のため、SMP30/ TTP-DKO マウス同士の交配ができない。また、同一出生日の DKO マウスを一度に 100 匹以上を得るため、体外受精・胚移植の技術を用いた DKO マウスの作出が必須である。作出した SMP30/ TTP-DKO マウス、および同系統の野生型マウス (C57BL/6Ncr) を 4 週齢で離乳し、それぞれ VC、VE 十分群、VC 十分 & VE 不足群、VC 不足 & VE 十分群、VC、VE 不足群の 4 群に分け、8 週間 (生後 12 週齢まで) 飼育する。行動実験のできる生後 12 週齢から オープンフィールド (不安行動、活動性)、明暗選択課題 (不安行動)、モリス水迷路課題 (空間記憶、長期記憶、遊泳能力)、恐怖条件づけ (短期記憶、長期記憶、刺激応答) などの記憶、学習行動解析を行う。

記憶、学習行動実験終了後、VC、VE 不足により海馬や扁桃体の神経細胞に障害があるかを組織学的、病理学的に解析する。また、脳や血漿中 VC、VE、過酸化脂質の定量など生

化学的解析も行う。VC, VE の定量は高速液体クロマトシステム(HPLC)-電気化学検出器、蛍光光度計を用いて行う。

(2) VC, VE 不足が脂質代謝に及ぼす影響

体外受精・胚移植の技術を用いて、同一出生日のDKOマウスを作出する。作出したSMP30/TTP-DKOマウス、及び野生型マウスをそれぞれVC, VE十分群、VC十分&VE不足群、VC不足&VE十分群、VC, VE不足群の4群に分けて飼育する。生後4週齢、8週齢、12週齢で脂質代謝に重要な肝臓、脂肪組織、脳、および血液を採取する。

VC, VE不足が脂質代謝にどのような影響を及ぼすかは、脂質成分の生化学的検査、脂質代謝に関与するタンパク質や遺伝子発現を包括的に調べる。NAFLD/NASHを発症しているかは、肝臓のヘマトキシリン・エオジン(HE)染色像からNASH activity score(脂肪肝、炎症、膨れ)によりNASHの程度を評価する。細胞内の脂肪滴を染めるOil Red O染色、線維化を評価するアザン染色など病理組織学的解析も行う。また、VC, VE不足が関与するNAFLD/NASH発症機構を解明するため、肝臓における脂質代謝および炎症、酸化ストレスに関連する遺伝子のmRNA発現量をリアルタイムPCR法により、タンパク質量をウェスタン法により定量する。

4. 研究成果

(1) VC, VE 不足による記憶、学習行動に及ぼす影響

VC, VEを合成、輸送できないSMP30/TTP-DKOマウスを体外受精・胚移植の技術を用いて、十分な個体数を作出することができた。そして、SMP30/TTP-DKOマウスをVC, VE欠乏状態にしてオープンフィールド(不安行動、活動性)明暗選択課題(不安行動)

モリス水迷路課題(空間記憶(海馬)、長期記憶(海馬)、遊泳能力)、恐怖条件づけ(短期記憶(扁桃体)、長期記憶(扁桃体および海馬)、刺激応答)などの記憶、学習行動解析を行った。その結果、VC, VE両方の欠乏は、不安様行動を増加し、運動能力および記憶学習を低下させる可能性を示唆するデータを得ることができた。

(2) VC, VE 不足が脂質代謝に及ぼす影響

SMP30/TTP-DKOマウスを用いた脂質代謝解析により、VCとVEの両方が同時に不足すると脂肪組織や血中遊離脂肪酸が減少することを明らかにした。また、SMP30/TTP-DKOマウスの肝臓では、脂肪酸や中性脂肪の合成を制御する転写因子(SREBP1c)、脂肪酸の酸化を制御する転写因子(PPAR)の遺伝子発現が亢進していた。これらの結果は、VCとVEの同時不足により、生体内の活性酸素が増加し、肝臓での脂質代謝に影響を及ぼす可能性を示唆している。

また、SMP30/TTP-DKOマウスを用いた寿

命解析から、VCとVEの両方が不足すると、VCまたはVE単独の不足よりも寿命が短くなることを明らかにした。

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17件)

1. Kodama, Y., Kishimoto, Y., Muramatsu, Y., Tatebe, J., Yamamoto, Y., Hirota, N., Itoigawa, Y., Atsuta, R., Koike, K., Sato, T., Aizawa, K., Takahashi, K., Morita, T., Homma, S., Seyama, K., Ishigami, A. : Antioxidant nutrients in plasma of Japanese patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), asthma-COPD overlap syndrome, and bronchial asthma. *Clin. Respir. J.* 11(6), 915-924, November 2017. doi: 10.1111/crj.12436 (査読あり)
2. Suzuki Y, Sato T, Sugimoto M, Baskoro H, Karasutani K, Mitsui A, Nurwidya F, Arano N, Kodama Y, Hirano SI, Ishigami A, Seyama K, Takahashi K. : Hydrogen-rich pure water prevents cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in SMP30 knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Oct 7;492(1):74-81. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.08.035. (査読あり)
3. Nishijima K, Ohno T, Amano A, Kishimoto Y, Kondo Y, Ishigami A, Tanaka S. : Bone Degeneration and Its Recovery in SMP30/GNL-Knockout Mice. *J Nutr Health Aging.* 2017;21(5):573-578. doi: 10.1007/s12603-016-0841-8. (査読あり)
4. Takahashi K, Takisawa S, Shimokado K, Kono N, Arai H, Ishigami A. : Age-related changes of vitamin E: α -tocopherol levels in plasma and various tissues of mice and hepatic α -tocopherol transfer protein. *Eur J Nutr.* 2017 Apr;56(3):1317-1327. doi: 10.1007/s00394-016-1182-4. (査読あり)
5. Sato Y, Uchida E, Aoki H, Hanamura T, Nagamine K, Kato H, Koizumi T, Ishigami A. : Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) Juice Intake Suppresses UVB-Induced Skin Pigmentation in SMP30/GNL Knockout Hairless Mice. *PLoS One.* 2017 Jan 23;12(1):e0170438. doi: 10.1371/journal.pone.0170438. (査読あり)
6. Shuto T, Kamei S, Nohara H, Fujikawa H, Tasaki Y, Sugahara T, Ono T, Matsumoto C, Sakaguchi Y, Maruta K, Nakashima R, Kawakami T, Suico MA, Kondo Y, Ishigami A. Takeo T, Tanaka KI, Watanabe H, Nakagata N, Uchimura K,

- Kitamura K, Li JD, Kai H. : Pharmacological and genetic reappraisals of protease and oxidative stress pathways in a mouse model of obstructive lung diseases. *Sci Rep.* 2016 Dec 16;6:39305. doi: 10.1038/srep39305. (査読あり)
7. Koizumi M, Kondo Y, Isaka A, Ishigami A, Suzuki E. : Vitamin C impacts anxiety-like behavior and stress-induced anorexia relative to social environment in SMP30/GNL knockout mice. *Nutr Res.* 2016 Dec;36(12):1379-1391. doi: 10.1016/j.nutres.2016.11.006. (査読あり)
 8. Kadowaki S, Shishido T, Sasaki T, Sugai T, Narumi T, Honda Y, Otaki Y, Kinoshita D, Takahashi T, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Miyamoto T, Watanabe T, Ishigami A, Takeishi Y, Kubota I. : Deficiency of Senescence Marker Protein 30 Exacerbates Cardiac Injury after Ischemia/Reperfusion. *Int J Mol Sci.* 2016 Apr 11;17(4):542. doi: 10.3390/ijms17040542. (査読あり)
 9. Takahashi R, Ishigami A, Kobayashi Y, Nagata K. : Skewing of peritoneal resident macrophages toward M1-like is involved in enhancement of inflammatory responses induced by secondary necrotic neutrophils in aged mice. *Cell Immunol.* 2016 Jun-Jul;304-305:44-8. doi: 10.1016/j.cellimm.2016.03.001. (査読あり)
 10. Yamauchi H, Miura S, Owada T, Saitoh S, Machii H, Yamada S, Ishigami A, Takeishi Y. : Senescence marker protein-30 deficiency impairs angiogenesis under ischemia. *Free Radic Biol Med.* 2016 May;94:66-73. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.020. (査読あり)
 11. Takahashi R, Totsuka S, Ishigami A, Kobayashi Y, Nagata K. : Attenuated phagocytosis of secondary necrotic neutrophils by macrophages in aged and SMP30 knockout mice. *Geriatr Gerontol Int.* 2016 Jan;16(1):135-42. doi: 10.1111/ggi.12436. (査読あり)
 12. Kondo Y, Ishigami A. : (REVIEW ARTICLE) Involvement of senescence marker protein-30 in glucose metabolism disorder and nonalcoholic fatty liver disease. *Geriatr Gerontol Int.* 2016 Mar;16 Suppl 1:4-16. doi: 10.1111/ggi.12722. Review. (査読あり)
 13. Ohta, M., Fujinami, A., Kobayashi, N., Amano, A., Ishigami, A., Tokuda, H., Suzuki, N., Ito, F., Mori, T., Sawada, M., Iwasa, K., Kitawaki, J., Ohnishi, K., Tsujikawa, M., Obayashi, H. : Two chalcones, 4-hydroxyderricin and xanthoangelol, stimulate GLUT4-dependent glucose uptake through the LKB1/AMP-activated protein kinase signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Nutr. Res.* 35 618-625 (2015) doi: 10.1016/j.nutres.2015.05.010. (査読あり)
 14. Uchio, R., Hirose, Y., Murosaki, S., Yamamoto, Y., Ishigami, A. : High dietary intake of vitamin C suppresses age-related thymic atrophy and contributes to maintenance of immune cells in vitamin C-deficient SMP30 knockout mice. *Br. J. Nutr.* 113 603-609 (2015) doi: 10.1017/S0007114514003857. (査読あり)
 15. Okada, H., Senmaru, T., Fukui, M., Kondo, Y., Ishigami, A., Maruyama, N., Obayashi, H., Yamazaki, M., Nakamura, N., Hasegawa, G. : Senescence marker protein-30/gluconolactonase deficiency exacerbates diabetic nephropathy through tubular injury in a mouse model of type 1 diabetes. *J. Diabetes. Invest.* 6 35-43 (2015) doi: 10.1111/jdi.12252. (査読あり)
 16. Jung, K.J., Lee, E.K., Kim, S.J., Song, C.W., Maruyama, N., Ishigami, A., Kim, N.D., Im, D.S., Yu, B.P., Chung, H.Y. : Anti-inflammatory activity of SMP30 modulates NF-κB through protein tyrosine kinase/phosphatase balance. *J. Mol. Med.* 6 35-43 (2015) doi: 10.1007/s00109-014-1219-1. (査読あり)
 17. Ishigami, A., Masutomi, H., Handa, S., Maruyama, N. : Age-associated decrease of senescence marker protein-30/gluconolactonase in individual mouse liver cells: Immunohistochemistry and immunofluorescence. *Geriatr. Gerontol. Int.* 15 804-810 (2015) doi: 10.1111/ggi.12347. (査読あり)
- [学会発表](計 13 件)
1. Ishigami, A. : Vitamin C deficiency leads to skeletal muscle atrophy. 2017 Aging Seminar between Korea and Japan, College of Pharmacy, Pusan National University, Busan, South Korea, 2017.8.24-25 (**Invited Lecture**)
 2. Kondo Y, Takisawa S, Noda Y, Machida S, Aigaki T, Ishigami A. : Vitamin C Deficiency Leads to Skeletal Muscle Atrophy and Muscle Fiber Transformation. IAGG 2017, Moscone West and the San Francisco Marriott Marquis, San Francisco, California, USA, 2017.7.23-27
 3. 石神昭人 : 抗酸化ビタミンC, Eによるアンチエイジング. 日本ビタミン学会第 69 回大会 シンポジウム「ビタミン

- ン・バイオフィクターでアンチエイジング」, 横浜市開港記念会館, 横浜, 2017.6.9
4. Kondo Y, Takisawa S, Noda Y, Machida S, Aigaki T, Ishigami A : Vitamin C deficiency in skeletal muscle switches muscle fiber types from slow to fast. ICFSR 2017, Hotel Crowne Plaza Barcelona, Barcelona, Spain, 2017.4.27-29
 5. Ishigami A, Kasahara Y, Kondo Y. : SMP30/SOD1-double knockout mice manifest increased oxidative stress, hepatic steatosis, and premature death. Asian Society of Aging Research Symposium 2017, Sapporo Grand Hotel, Sapporo (Hokkaido) Japan, 2017. 3.2-5
 6. 河島早紀、永田喜三郎、佐藤安則、吉田雅幸、石神昭人 : ヒト培養表皮を用いた紫外線照射による細胞傷害に対するビタミンCの効果. 第89回日本生化学会大会, 仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス, 仙台, 2016.9.25-27
 7. 河島早紀、永田喜三郎、吉田雅幸、斉藤紀克、大澤肇、栗田克己、石神昭人 : 経皮吸収したビタミンCによる紫外線(UVB)細胞傷害の抑制効果. 日本ビタミン学会第68回大会, 富山国際会議場, 富山, 2016.6.17-18
 8. 近藤嘉高、増富裕文、野田義博、小澤裕介、高橋経太、半田節子、丸山直記、清水孝彦、石神昭人 : ダブルノックアウトマウスは酸化ストレスが増加して脂肪肝を呈する. 日本基礎老化学会第39回大会, 神奈川県伊勢原市民文化会館(小ホール), 神奈川, 2016.5.27-28
 9. Ishigami, A., Kondo, Y., Masutomi, H., Noda, Y., Ozawa, Y., Takahashi, K., Maruyama, N., Shimizu, T. : Senescence marker protein-30/Superoxide dismutase 1 double knockout mice exhibit increased oxidative stress and hepatic steatosis. The 10th IAGG Asia/Oceania Regional Congress (IAGG 2015), Chiang Mai, Thailand, 2015.10.19-22
 10. 石神昭人、高橋経太、河野望、新井洋由 : マウスの様々な臓器、血漿中の - トコフェロール量及び肝臓での - トコフェロール輸送タンパク質 (- TTP) の加齢変化. 第18回 Vitamin E Update Forum, 東京, 2015.8.28
 11. 石神昭人 : 胎児の発生や小児の成長におけるビタミンCの必要性. 第39回日本産科婦人科栄養・代謝研究会 特別講演3, 東京, 2015.8.22
 12. 高橋経太、下門顕太郎、河野望、新井洋由、石神昭人 : マウス臓器、血漿中の - トコフェロール量及び肝臓

トコフェロール輸送タンパク質の加齢変化. 日本ビタミン学会第67回大会, 姫路, 2015.6.5-7

13. Ishigami, A. : Vitamin C study using SMP30/GNL knockout mice. ACN2015, Yokohama, Japan, 2015.5.14-18 (**Invited Lecture**)

〔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
<http://www.vit-c.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石神 昭人 (ISHIGAMI Akihito)
 地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)
 東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長
 研究者番号 : 50270658