

平成22年 6月 11日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19700605

研究課題名（和文） 脂質過酸化物による細胞老化メカニズムと細胞内抗酸化系

研究課題名（英文） Cellular senescence mechanisms and cellular antioxidant systems by lipid hydroperoxides

研究代表者

山中 裕佳子（YAMANAKA YUKAKO）

武庫川女子大学・生活環境学部・助手

研究者番号：80434934

研究成果の概要（和文）：現在、日本を始め世界中で高齢社会を迎えており、高齢者疾患である老人性認知症が問題となっている。本研究目的は、老化メカニズムを明らかにし、認知症への対応策への足がかりとすることである。その目的のため、神経細胞モデルのPC12細胞への脂質過酸化物添加による影響を検討した。その結果、脂質過酸化物は細胞、特に細胞膜を損傷させた後、微小管の機能を抑制していた。また、細胞膜に影響を及ぼした脂質過酸化物はさらに細胞内抗酸化系酵素活性を上昇させることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The aged society has come in the world including Japan. Then senile dementia lies as the problem to be conquest. The purpose of this investigation is to make clarify the aging mechanism of living cells and the results obtained would give the solution against a senile dementia. The effect of lipid hydroperoxides on PC12 cells, which is a model of nerve cells, was examined. Lipid hydroperoxides injured cell membrane and the cell functions were lost. Especially it was shown that lipid hydroperoxides damaged to the function of microtubules. Moreover, it was found that lipid hydroperoxides raised some enzyme activities of antioxidation system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	0	1,500,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	450,000	3,450,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：食と栄養 細胞老化

1. 研究開始当初の背景

現在、日本をはじめ世界中で高齢社会を迎えており、高齢者疾患である老人性認知症が問題となっている。厚生労働省が発表した平成 20 年簡易生命表によると、日本の平均寿命は男性 79.29 年、女性 86.05 年と過去最高を更新し続けている。こうした高齢化の進展に伴い、認知症患者数の増加が深刻化している。2003 年に高齢介護研究会が介護に必要な手間という観点から「認知症高齢者の日常生活自立度 2」以上の高齢者数を 149 万人とはじき出し、このデータと日本の将来推計人口から、2015 年には 250 万人になるとされた。しかし厚生労働省は、医学判定に基づく認知症の正確な患者数について把握していないことを認め、2009 年度から認知症の正確な患者数など大規模調査を実施し、あわせて介護サービスや医療の詳細な実態調査も行うと取り決めた。また、厚生労働省の「認知症の医療と生活の質を高める緊急プロジェクト」では、今後 5 年以内に、アルツハイマー症の促進因子、予防因子を解明し、有効な予防方法を見出すことを目標とした研究を促進するといったように、アルツハイマー型認知症の原因の解明および治療法の確立が急がれている。

2. 研究の目的

本申請者は、細胞外から与えられた成分によって細胞機能が損なわれ、老化していくという考えに立って「老化メカニズム」を明らかにし、認知症への対応策が見いだせるものと考えている。

生体膜を構成しているリン脂質は、食品由来過酸化物質や生体内で生じた活性酸素によって容易に酸化される。生成されたリン脂質過酸化物質は、細胞内成分の機能を阻害することによって細胞機能を劣化させ、生体を老化させると考えられている。

本申請者が所属する研究室でのこれまでの研究は、細胞外より摂取した脂質過酸化物質が細胞膜リン脂質を酸化し、その細胞膜脂質過酸化物質が細胞質成分を酸化することによって細胞機能を劣化させるものと仮定したものである。そこでは細胞質成分として細胞骨格との相互作用について *in vitro* で検討し (J. Am. Oil Chem. Soc., 75, 635-641, 1998)、両者が疎水性相互作用を起こすことならびに相互作用によってチューブリンの重合が阻害され、微小管形成が抑制されることを証明した (Lipids, 35, 205-211, 2000)。

そこで、本研究では、食事から摂取したリン脂質過酸化物質が、細胞内でどのような影響を与えるかということ念頭におき、培地中に添加したリン脂質過酸化物質が神経細胞モデルの PC12 細胞の細胞膜および、抗酸化系への影響を中心に研究を進めた。

老化のしくみが明らかにされるといことは、老化と関連の深い病気が克服され、そして寝たきりや認知症といった高齢者に多くてしかも望ましくない状態を予防する方法が見出されることになりうる。また、認知症は要介護状態に陥る 3 大原因疾患の一つを占めており、認知症が予防できるのであれば、個人にとっても社会にとっても大きな恩恵をもたらすことになる。こういった点からもこの研究に大きな意義がある。

3. 研究の方法

(1) 実験細胞および生育方法

細胞は、ラット副腎由来褐色細胞である PC12 細胞 (大日本製薬 (株)) を使用した。CO₂ インキュベーターを用い生育し、CO₂ ガス 5%、37°C になるように調節した。培地は、RPMI-1640 培地 (GIBCO 社) に馬血清 (ICN 社) 10%、牛胎児血清 (ICN 社) 5% に調製した。培地は 2~3 日に 1 回交換した。PC12 細胞は浮遊細胞のため、培養はコラーゲンコ

ートしているものを使用した。

細胞を分化させる際は、神経成長因子 (Nerve Growth Factor-7S) (SIGMA 社) を培地に 100ng/ml になるよう調製して添加し、72 時間培養することで分化させた。

(2)リン脂質過酸化物質 (PO) の調製

PO は大豆由来リン脂質である Lipoid S-100 (日清オイル (株)) を光酸化して得た。調製方法は、Lipoid S-100 をメタノールに溶解し、酸化促進剤であるメチレンブルーを加え、低温下で 60W レフレクタランプを 30cm の高さから必要時間照射した。得られた照射脂質からメチレンブルーを取り除き、233nm での吸光度を測定することでヒドロペルオキシド濃度を算出し、PO として使用した。

(3)リン脂質過酸化物質の PC12 細胞生育への影響

細胞生育への影響は WST-8 法で行った。細胞を 96well プレートに 4×10^5 cells/ml になるよう播種した。PO を各濃度添加して 24 時間、48 時間培養した。Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所) 溶液を各ウェルに培地の 1/10 量添加しつつ添加し 5 時間インキュベートし定色反応を行った。マイクロプレートリーダーを用い 450nm (参照波長: 600nm) の吸光度を測定した。また分化後細胞への影響をみるため、24well プレートに細胞を 1×10^5 cells/ml になるよう播種し、NGF を添加することで分化させ、同様の操作を行い、3 時間インキュベートすることで定色反応を行い、450nm の吸光度を測定した。

細胞形態への影響は、細胞を 6well プレートに 4×10^5 cells/ml になるように播種し、PO を各濃度になるよう調製し、添加して 24 時間、48 時間後に位相差顕微鏡 ((株) ニコン ECLIPSE Ti) を用いて観察した。また、チューブリン・微小管系の存在形態も抗体染色

法を用いて蛍光顕微鏡 ((株) ニコン ECLIPSE Ti) を用いて観察した。1 次抗体に Monoclonal-anti- α -Tubulin Clone B-5-1-2 を用い、2 次抗体に Anti-mouse IgG (Whole Molecule) Cy3 Conjugate Antibody developed in Sheep F(abN)₂ Fragment of Affinity Isolate Antigen Specific Antibody Adsorbed with Human Serum Proteins を用いて染色した。GTPase 活性測定は Kawakami らの方法 (Bull. Mukogawa Woman's Nat. Sci., 42, 17-23(1994)) を用いて行った。簡潔には、細胞を 5×10^5 cells/ml になるようにシャーレに播種した。24 時間、48 時間 PO を曝露した後、細胞をシャーレからはがし、PBS で洗浄した後遠心分離した。上清を取り除き、Mini-Beadbeater (Biospec products) を用いて細胞を粉砕し、遠心分離し、上清をサンプルとした。10mM (Na) Phosphate buffer, with 0.5mM MgCl₂, 3.4M glycerol and 0.1mM GTP, (pH 7.0) にサンプル液を加え、37°C でインキュベートし、0, 10, 20, 30 分後に 3M HClO₄ を加え反応を呈しさせ、遠心分離し、その上清と 3M KOH, 1M K₂HPO₄・0.5M CH₃COOH を加え中和した。遠心分離し、上清をフィルターろ過し HPLC にて測定し、活性時間に伴う GTP, GDP の増減を測定し微小管形成の指標とした。

(4)リン脂質過酸化物質の PC12 細胞膜への影響

細胞中の膜脂質への影響は電気化学検出器を備えた HPLC を用いて測定した。方法は、細胞を 2.5×10^5 cells/ml になるように播種し、PO を 24 時間、48 時間添加した後、添加した後、シャーレから外し、PBS で洗浄した後遠心分離した。沈殿した細胞にクロロホルム:メタノール (1:1) を添加し上層を取り除いた。下層中のクロロホルムを飛ばし、メ

タノール：水を添加し、フィルターでろ過し化学検出器を備えた HPLC に供した。

また、乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を用いることで細胞膜損傷の指標とした。細胞を 4×10^5 cells/ml になるように播種し、PO を各濃度になるよう調製し、添加して 24 時間、48 時間後に細胞を well からはがし、遠心分離し、上清を sup. サンプルとした。沈殿物に 0.4% Triton X-100 を含む PBS を加え遠心分離し、上清を ppt. サンプルとした。ラクトレートデヒドロゲナーゼ CII テストワコー (株) 和光ケミカルを用い LDH の活性測定を行い、膜損傷率を算出した。

(5) リン脂質過酸化物の PC12 細胞の抗酸化系への影響

抗酸化系への影響としては、抗酸化系酵素として代表的であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、カタラーゼ (CAT) とグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) について測定した。SOD 活性測定での細胞は、 3×10^5 cells/ml になるように播種し、PO を各濃度になるよう調製し、添加して 24 時間、48 時間後培地を取り除き Nonidet P-40 lysis buffer に置き換え、4°C で静置し、遠心分離して上清をサンプル溶液とした。活性測定は SOD Assay Kit-WST (同仁化学研究所) を用いた。次に GPx 活性測定は BIOXYTECH® GPx-340™ (OxisResearch™) を用いて測定した。細胞を 1×10^5 cells/ml になるように播種し、PO を各濃度になるよう調製し、添加して 24 時間、48 時間培養した。シャーレから細胞をはがし、PBS で洗浄した後、遠心分離した。上清を取り除き溶解液 (5mM EDTA, 0.01% digitonin, 0.25% sodium chlorate) で攪拌し、遠心分離した。上清をサンプル溶液とし、BIOXYTECH® GPx-340™ を用いて測定した。そして、CAT 活性測定方法は、細胞を必要濃度播種し、PO

添加培地で 24 時間、48 時間培養した。細胞を培養器からはがし遠心分離した。細胞を PBS で洗浄し、遠心分離し、上清をサンプル溶液とした。PBS、メタノール過酸化水素水を添加して攪拌し、サンプル溶液を添加し、20°C で 30 分反応させる。Purpald を添加し、20 分水中で反応させ、Potassium Periodate を加え攪拌し、550nm の吸光度を測定し、カタラーゼ活性を算出した。

4. 研究成果

(1) リン脂質過酸化物の PC12 細胞生育への影響

PC12 細胞生育への影響では、分化前細胞では PO 70 μ M 以上、分化後細胞では 50 μ M 以上において生育阻害が認められた。また、細胞生育ならびに形態の変化としては、分化前細胞においては、50 μ M 以下の変化はあまり見られなかったが、70 μ M 以上では細胞が凝集し、黒くなった死細胞が確認され PO の細胞形態の影響が確認できた。また、分化後細胞においては 20 μ M 以上で細胞の凝集、浮遊細胞や死細胞が確認された。さらに 20 μ M で神経突起の崩壊が少しみられ、50 μ M 以上では完全に崩壊しており、PO の細胞形態への影響が認められた。これら、いずれの測定でも、分化後細胞がより損傷をうけることが示された。このことは、表面積の広い分化後細胞がより多くの損傷を受けたことが示唆された。さらに PO 暴露時間が長くなるとより損傷がみられることが確認された。さらにチューブリン・微小管系の存在形態を観察した結果、分化後細胞を抗体で染色したチューブリン部位が 50 μ M 以上では明らかな損傷を受けて崩壊していることが明らかになった。また、暴露時間が長くなるとより損傷を受けていることが明らかとなった。細胞抽出液の GTPase 活性低下が認められ、微小管の形成阻害を受けたことが考えられる。

以上から PO は Tb をターゲットとし、細胞生育に阻害的に働いていることが明らかとなった。

(2)リン脂質過酸化物の PC12 細胞膜への影響

分化前細胞・分化後細胞とともに、電気化学検出器を備えた HPLC で測定した結果、細胞中の過酸化脂質量が PO 濃度依存的に増加していた。また、24 時間の測定よりも 48 時間の測定のほうがより過酸化脂質量が増加していた。この結果は、脂質の多くが細胞膜中に存在するので細胞膜が酸化されたと考えられた。

次に LDH 活性測定での膜損傷率を測定した。細胞膜に障害が起きると、培地中に乳酸脱水素酵素 (LDH) が逸脱するために、培地中の LDH 活性測定が増加する。これを利用し細胞内部および細胞中の LDH 活性値を測定し、比較検討した結果、分化前細胞では 100 μM で膜損傷が認められた。分化後細胞では PO 濃度依存的に膜損傷が見られた。また、PO 暴露時間が長くなると膜損傷率も大きくなっていった。

これらの結果より PO は細胞膜を損傷していることが明らかとなった。

(3)リン脂質過酸化物の PC12 細胞の抗酸化系への影響

抗酸化系への影響については、影響の大きかった分化後細胞のみについて測定を行った。

細胞内には、活性酸素種の生成が増加すると、傷害の除去と修復、そして抗酸化系が働き、活性酸素を消去・防御すると考えられる。

PO 存在下で培養した PC12 細胞の SOD は、スーパーオキシドの不均化を触媒する酵素である。ラジカル反応の出発点の 1 つとなるスーパーオキシドの過剰に対してスーパーオキシドのラジカルを消去する作用を

SOD が担っているため、SOD 活性値を測定した。その結果、分化前細胞、分化後細胞ともに PO 濃度が増加すると 50 μM 以上で細胞あたりの酵素活性は上昇した。

次に GPx は細胞内で常時生成している過酸化水素を水に還元して消去する役割のみならず、細胞膜の脂質過酸化反応に伴って生成する膜脂質構成脂肪酸のヒドロペルオキシドを還元し、細胞内構成成分が酸化的に変性するのを防ぎオルガネラ膜が安定化する役割を果たしている。GPx を測定した結果、PO 添加後 24 時間培養では、PO70 μM から GPx 活性が大幅に上昇していたが、48 時間培養では PO50 μM から PO 添加濃度依存手的に活性が上昇した。この結果から PO 自体が基質となり、CAT の活性が誘導されたと考えられる。

最後に CAT は過酸化水素の不均化反応を触媒する酵素である。過酸化水素を PC12 細胞に添加してその消去状況を検討した。CAT 活性を測定した結果、24 時間、48 時間培養のいずれでも PO 添加濃度依存的に CAT 活性は上昇していた。この結果は、細胞への暴露時間の長短にかかわらず、PO 濃度と CAT 活性との間の相関を示している。つまり、PO が CAT の基質として働き、活性を誘導したためと考えられる。となる細胞に添加され残った過酸化水素量が PO 濃度依存的に多くなることが観察された。

これらの結果より、細胞内に入った活性酸素を消去するため細胞内抗酸化活性は上昇し、細胞防御機能が働いたと考えられる。

以上、研究成果をまとめると、PO は細胞、特に細胞膜を損傷させた後、細胞質中のチューブリンと相互作用し、微小管の機能を抑制するものと考えられた。また、細胞膜に影響を及ぼした PO はさらに細胞内抗酸化系を上昇させることが明らかとなった。

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 1 件)

- ① NGF-induced neurite outgrowth of PC12 cells in the presence of phosphatidylcholine hydroperoxide: Implication for ageing, Yukako Yamanaka, Shumi Yoshida, Hiroshi Doi, Mechanisms of Aging and Development 129 (2008) 215-222

[学会発表] (計 5 件)

- ① リン脂質過酸化物により劣化した分化 PC12 細胞への抗酸化剤の効果,山中裕佳子,2010 年度日本農芸化学会大会,2010 年 3 月 29 日,東京大学
- ② 分化 PC12 細胞の抗酸化系へのリン脂質過酸化物の影響と抗酸化剤の効果,山中裕佳子,2009 年度日本農芸化学会大会,2009 年 3 月 29 日,福岡国際会議場
- ③ リン脂質過酸化物存在下で培養された分化 PC12 細胞の抗酸化系への影響,山中裕佳子,日本食品科学工学会第 55 回大会,2008 年 9 月 7 日,京都大学
- ④ 脂質過酸化物添加による PC12 細胞の抗酸化系への影響,山中裕佳子,日本栄養・食糧学会中・四国・近畿支部合同大会 2007 年大会,2007 年 11 月 18 日,広島大学
- ⑤ 脂質過酸化物添加培地で生育した PC12 細胞への抗酸化剤の影響,山中裕佳子,日本生物高分子学会 2007 年大会,2007 年 10 月 19 日,海峡メッセ下関国際貿易ビル

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山中 裕佳子(YAMANAKA YUKAKO)

武庫川女子大学・生活環境学部・助手

研究者番号：80434934