

機関番号：34517

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500731

研究課題名（和文） 細胞老化メカニズムに基づいた老化予防のための食資源開発

研究課題名（英文） Development of foodstuffs for the prevention of ageing based on the cell deterioration mechanism

研究代表者

土井 裕司（DOI HIROSHI）

武庫川女子大学・生活環境学部・食物栄養学科・教授

研究者番号：50106267

研究成果の概要（和文）：

本研究では、リン脂質過酸化物による細胞の老化メカニズムを検討し、それに対応した食品成分を選択して、その細胞老化への効果を検討した。細胞としては、神経細胞モデルである PC12 細胞を使用した。リン脂質過酸化物は細胞培養時に培地に添加された。細胞外から与えられたリン脂質過酸化物は、細胞膜を過酸化させ、次いで、細胞質の細胞骨格であるチューブリン-微小管系に作用して、その機能を劣化させていた。また、抗酸化酵素系へも影響を及ぼし、更には DNA の酸化損傷も招いていた。これらの事実から、リン脂質過酸化物は先ず、細胞膜を酸化させ、そこで生じた過酸化物および添加したリン脂質過酸化物がチューブリンと相互作用して、その GTPase 活性を低下させ微小管形成能を抑制することによって、微小管の機能を劣化させていた。また、これらの活性酸素種は抗酸化系や遺伝子へも影響を及ぼしていたのである。そこで、食品由来抗酸化物質による劣化機能の回復を試みた。その結果、チューブリンおよび抗酸化系酵素の機能回復が認められ、細胞生育が回復した。活性酸素種による細胞機能の劣化に対して抗酸化剤が有効であることが明らかとなり、食品由来抗酸化物質の摂取が老化に対して予防効果を有することが示された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, the cell deterioration mechanism by phospholipid hydroperoxides was examined first, and the effect of some food constituents for the deterioration was shown. PC12 cell line was initially derived from rat adrenal pheochromocytoma. PC12 cells differentiate into sympathetic neuron-like phenotypes in response to the nerve growth factor. PC12 cells were cultured in collagen-coated dishes in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated horse serum, 5% heat-inactivated fetal bovine serum and penicillin/streptomycin in the presence of adequate amounts of phospholipid hydroperoxides. Phospholipid hydroperoxides oxidized cell membrane and next deteriorated tubulin by the interaction. The effects on antioxidant enzyme activities and the oxidative damage of DNA were observed also. The interaction between phospholipid hydroperoxides and tubulin introduced the decrease of microtubule assembly, and the functions of microtubule were deteriorated. Dosed and derived reactive oxygen species influenced antioxidant enzyme activities and DNA. Therefore, the recovery effects by antioxidants from foodstuffs were examined. Antioxidants made functions tubulin and antioxidant enzyme to recover. The facts indicate antioxidants effective on the ageing by reactive oxygen species.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活

キーワード：リン脂質過酸化物，チューブリン-微小管系，抗酸化剤，活性酸素種，PC12

### 1. 研究開始当初の背景

現在、日本をはじめ世界中で高齢者の増加がみられ、特に日本では65歳以上人口が総人口の20%を超え、完全な高齢社会を迎えている。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年となっており、毎年更新してきている。このように高齢者人口が増加していることは周知の事実であり、それに伴って認知症高齢者数および割合も増加し続けている。

認知症発症に対するメカニズムの中でもアミロイドカスケード仮説は、老人班の主成分がアミロイドβタンパク質であり、認知症患者の場合、凝集しやすいアミロイドβタンパク質が合成されるため、蓄積が起これると考えている。アミロイドβタンパク質の蓄積は脳神経細胞の萎縮となる。それは細胞骨格の異常を意味している。

また、酸化ストレスはタウタンパク質の高リン酸化を招き、神経原繊維変化を来し、脳神経細胞の萎縮を導いている。タウタンパク質はチューブリンからの微小管形成を促進するものだが、高リン酸化タウは異常微小管を形成し、細胞骨格の異常をきたすのである。

アルツハイマー型認知症および細胞老化の原因としてチューブリンとリン脂質過酸化物との相互作用による細胞骨格異常を仮定し、試験管内での両者の相互作用を証明した(Lipids, 35, 205-211, 2000)。その後、in vitro 系の実験室から細胞培養のできる実験室への転換に努力を重ねてきた。現在PC12細胞を用いて、研究を行っている。リン脂質過酸化物はPC12細胞のチューブリンに相互作用して細胞骨格形成を阻害しているという成果はMechanisms of Aging and Development誌に投稿し、受理された。そこでは、逆説的には、微小管系の活性化あるいは機能維持によって老化を予防することが可能性を示唆している。

以上のような背景のもと、認知症患者の増加抑制に食品科学・栄養科学の立場からは、認知症発症原因・メカニズムを追究し、その生体での変化に対応した機能を有する

食品の開発へと進むのが妥当と考え、本研究の遂行となっている。

### 2. 研究の目的

筆者は、試験管内での抗酸化剤の有効性を既に証明した(J.Am.Oil Chem. Soc., 75, 635-641, 1998)。しかし、抗酸化剤の細胞骨格に対しての有効性は前記 Mechanisms of Aging and Development のレフリーも今後の課題と指摘していたように、まだ、まったく解き明かされていない。そこで、第1のステップは、細胞骨格異常と抗酸化系との関連を明らかにすることであり、抗酸化剤の細胞における有効性を検証することである。

第2のステップは、脂質過酸化物により細胞骨格(微小管系)が劣化させられたとしても、それをあらたに活性化することの有効性を検証することである。かねてより試験管内で微小管の形成を促進する成分の検索を行ってきた。その結果、大麦穀粒の外層部に微小管形成促進物質を見出した。その成果は、特許(特許公開平 11-12299)あるいは国際学会(Abstr.17th Internatl. Cong.Nutri., 431, 2001 他)そして「食品・臨床栄養」誌 2,27-34(2007)に掲載している。今回は、細胞劣化メカニズムについて今まで以上に詳細な検討を加えることを第一の目的とし、さらに、食品由来の抗酸化剤を培地に添加し、細胞の生育および生存への影響を検討し、健康増進・老化予防食品の開発への足掛かりとすることを第二の目的とした。

### 3. 研究の方法

本報告者は、細胞外から与えられたリン脂質過酸化物が直接的あるいは間接的に細胞骨格を攻撃することによって、細胞を劣化させていると考えている。未だ誰もその詳細なメカニズムについては明らかにしていない。本研究のように老化予防食品の開発をその最終目的とする場合、その原因・メカニズムを明らかにする必要がある。

したがって、本研究では老化メカニズムを追究する部分と老化した細胞への食品由

来物質の投与の影響を検討する部分の2正面的な検討が要求されている。

そこで、研究方法として、細胞劣化メカニズムに関連するものと、劣化した細胞に対する抗酸化剤の効果を検証するものとの2つに大別されるが、内容としては重複するところがある。

実験材料としてのリン脂質は、大豆由来のリン脂質Lipoid S-100で日清オイリオから恵与された。それをメチレンブルーの存在下で光酸化させた。細胞の生育・生存は顕微鏡観察とWST-8法を用いて検討した。細胞骨格への影響はチューブリンからの微小管形成を観察することの代用として、細胞抽出液のGTPase活性を測定することによった。リン脂質過酸化存在による遺伝子への影響を検討するため、8-OHdGをHPLCを用いて定量した。8-OHdGは、DNA中のグアニン塩基が活性酸素の作用により、酸化損傷を受け、8位の炭素が酸化されることにより生成される化合物で、活性酸素による生体損傷を鋭敏に反映する優れたバイオマーカーである。また、細胞膜の過酸化のみを選択的にとらえる試薬としてDiphenyl-1-pyrenylphosphineを用いて蛍光強度を測定した。細胞の抗酸化系としてスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)、グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)、カタラーゼの各酵素活性の変動を検討した。抗酸化物質としては、食品素材由来を原則として、アスタキサンチン、エピカテキン、ケルセチンを用いた。また、未精製品として、夏ミカンおよび八朔の果皮水抽出物を用いた。

#### 4. 研究成果

##### I 細胞老化メカニズムについて

報告者は先に、細胞外から投与されたリン脂質過酸化物が細胞の生育・生存を阻害するメカニズムとして、まず細胞膜を攻撃し膜脂質を過酸化させ、さらに細胞骨格タンパク質であるチューブリンを攻撃して、微小管形成を阻害することによって、細胞機能を劣化させていることを示した。細胞膜脂質の過酸化についてはシスパリナリン酸を用いての検討であり、選択性が弱いものであったので、今回、細胞膜を選択的に捉える試薬としてDPPPを用いたところ、やはり細胞膜の過酸化が確認された。また、リン脂質過酸化物の攻撃が細胞質物質までであるのか、それ以上に遺伝子まで及んでいるかどうかについての検討がなされてい

なかった。そこで、蛍光検出器を備えたHPLCで8-OHdGを定量した結果、その生成が示され、遺伝子が酸化され損傷されていることが明らかとなった。リン脂質過酸化物の暴露時間に拘わらず、培地への添加濃度依存的に検出された8-OHdG量が増加していた。この事実は、リン脂質過酸化物濃度とDNAの酸化損傷との正の相関を示すもので、リン脂質過酸化物が遺伝子を損傷していることを示している。そのことはまた、微小管形成阻害が遺伝子損傷によるタンパク質合成の減少によるものであるのか、生合成されたのちのチューブリンへの直接的なリン脂質の攻撃によるものであるかを明らかにするべきであるという今後の検討課題を生じさせることとなった。

また、DPPPの測定から、リン脂質過酸化物が細胞膜の過酸化をもたらしていることが明らかとなった。この事実は、以前にシスパリナリン酸を用いて検討した結果を確認するものであった。

以上の結果から、リン脂質過酸化物は細胞膜を過酸化し、さらに、細胞骨格形成を阻害して、細胞の生育を阻害していることを示すものであった。

##### II 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

過酸化物によって酸化損傷されているのであれば、抗酸化剤の添加によって細胞の劣化が防げるのではないかと考え、酸化損傷を受けた細胞への抗酸化剤添加の影響を検討した。リン脂質過酸化物で劣化した細胞へアスタキサンチン、エピカテキン、ケルセチンを1~10 $\mu$ Mとなるように培地へ添加した結果、いずれもWST-8法で観察した生細胞数を上昇させていた。これらの物質は細胞内抗酸化系酵素活性を回復させることにより、リン脂質過酸化物の影響を緩和するものと考えられた。

また、リン脂質過酸化物をPBS緩衝液で細胞から洗浄後、抗酸化活性を有するビタミンAまたはCの添加することによって、生育細胞数の減少は抑制された。ここでも、抗酸化物質の添加効果が認められた。

以上から、リン脂質過酸化物で劣化した細胞への抗酸化性物質の添加は、生細胞数を上昇させる効果があると言える。

##### III 結論

活性酸素種で老化した細胞では、抗酸化剤が機能回復に有効であることから、人にあ

っても抗酸化性物質の摂取が老化予防効果を発揮すると考えられる。本研究での最終目的である老化予防食資源としては、アスタキサンチン、エピカテキン、ケルセチンやビタミンA、ビタミンCなどの抗酸化活性を有する食品成分を含む食品ということで、結論したい。

なお、本研究成果については学術論文として現在執筆中であり、さらに、本研究とアルツハイマー病など神経変性疾患との関連についても現在執筆中であることを申し添えたい。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

- ① リン脂質過酸化物により劣化させた分化 PC12 細胞への抗酸化性水抽出物の効果, 土井 裕司, 日本農芸化学会 2011 年度大会, 2011 年 3 月 26 日, 京都女子大学
- ② 分化 PC12 細胞へのリン脂質過酸化物の影響, 土井 裕司, 第 14 回日本栄養・食糧学会大会, 2010 年 5 月 23 日, アスティ徳島
- ③ 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, 土井 裕司, 日本農芸化学会 2010 年度大会, 2010 年 3 月 29 日, 東京大学
- ④ 分化 PC12 細胞へ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, 土井 裕司, 日本農芸化学会 2009 年度大会, 2009 年 3 月 29 日, 福岡国際会議場
- ⑤ 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, 土井 裕司, 日本食品科学工学会第 55 回大会, 2008 年 9 月 7 日, 京都大学

[図書] (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

土井 裕司 (DOI HIROSHI)

武庫川女子大学・生活環境学部・教授

研究者番号: 5 0 1 0 6 2 6 7

### (3) 連携研究者

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: 8 0 4 3 4 9 3 4