

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16592

研究課題名(和文)酸化ストレスによるオートファジー/エネルギー代謝異常の分子機構の解明

研究課題名(英文) Studies on the physiological role of ascorbic acid in SOD1/Akr1a double knockout mice with increased oxidative stress

研究代表者

本間 拓二郎 (Homma, Takujiro)

山形大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70743566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレスは、各種代謝疾患をはじめ多彩な病態メカニズムとの関連が示唆されている。本研究では、活性酸素の消去を行う Superoxide dismutase 1 (SOD1)と抗酸化物質アスコルビン酸合成に関与する酵素 Akr1a を二重に欠損したマウスを用いて、酸化ストレスの生体影響を解析した。SOD1/Akr1a二重欠損マウスは、アスコルビン酸の投与を休止すると、週齢や性別に関わらず、約2週間以内に死亡した。アスコルビン酸投与休止により、血漿中ALT値の増加および肝細胞の腫大や軽度の炎症を認めた。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the physiological role of superoxide and ascorbic acid in vivo, we have established the SOD1/Akr1a double knockout (DKO) mice. The DKO mice had serious phenotype with heightened oxidative stress. After AsA withdrawal, all DKO mice died within two weeks. The AsA withdrawal for a week significantly increased plasma ALT levels but had no effect on cardiac function in the DKO mice.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：酸化ストレス スーパーオキシド ビタミンC

1. 研究開始当初の背景

申請者の所属する研究室では、活性酸素として最初に生じるスーパーオキシドの消去を担う酵素の一つ Superoxide dismutase 1 (SOD1)の欠損マウスを用いて、スーパーオキシドと各種疾患に関する研究を中心に進めてきた。例えば、SOD1 欠損マウスでは、赤血球中に活性酸素が増加し、さまざまな分子が酸化され赤血球の寿命が約6割に短縮する結果、貧血となることを明らかにしている (Iuchi et al, 2009)。最近申請者は、SOD1 欠損マウスの赤血球ではプロテアソーム分解系の障害により酸化ストレスによって分解されないタンパク質が蓄積し、赤血球の機能障害に関わることを報告した (Homma et al, 2015)。

肝臓はコレステロール、脂肪酸、中性脂肪 (TG)などの脂質を合成、貯蔵、分泌する脂質代謝の中心臓器である。内臓脂肪蓄積を背景とするメタボリックシンドロームでは、TGに富むリポ蛋白質の増加と肝臓にTGが蓄積した非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)や非アルコール性脂肪肝炎 (NASH)を合併することが多い。脂質代謝異常の発症機構に酸化ストレスや小胞体ストレスが密接に関与している。SOD1 欠損マウスは、野生型マウスと比較して内臓脂肪が少ないが、通常食飼育でも肝臓に脂肪滴が蓄積する (Uhiyama et al, 2006)。さらに肝臓からのVLDL分泌障害とともに、腸管からの脂質吸収異常に起因することが当研究室の成果から明らかになった (Kurahashi et al, 2012)。酸化ストレスは、小胞体におけるリポ蛋白質の酸化的折畳みとそれに続く分泌を抑制するため小胞体ストレスをもたらす。酸化ストレスに加えて小胞体ストレスは肝臓に脂肪滴の蓄積を引き起こす。また、小胞体ストレスにより、細胞の防御系として分子シャペロンなどの防御遺伝子の発現が誘導されるほか、小胞体膜に存在するステロール制御性の転写調節因子であるSREBPを活性化して脂肪合成が促進される。最近、我々はSOD1 欠損マウスから初代培養した肝細胞では小胞体ストレスが起こり、その下流にある脂肪合成遺伝子の発現亢進により、脂肪滴の蓄積が起こることを明らかにした (Lee et al, 2015)。また、栄養欠乏状態では主要エネルギー源は脂肪組織から供給される脂肪酸であるが、SOD1 欠損マウスは体脂肪が少ないにも関わらず、飢餓によって野生型よりも顕著に肝臓での脂肪滴の形成が促進されることを明らかにした (Kurahashi et al, 2016)。

Aldo-keto reductase 1a (Akr1a)はビタミンC合成反応を触媒し、Akr1a 欠損マウスはビタミンC合成能が著しく低下することから、その生合成に関わることが分かっている (Takahashi et al, 2012)。これまで、SOD1とAkr1aを両方も欠損したマウスは酸化ストレスが増大することにより非常に病的な症状 (脂肪肝など)を呈し、その多くが生後間

もなく死亡するという結果を得た。

2. 研究の目的

SOD1とAkr1aの二重欠損マウスはビタミンCの給水投与により、その致死的な表現型に改善が認められ、ビタミンC投与を止めることで2週間以内に死亡する。これまでの知見をふまえると、SOD1/Akr1a二重欠損マウスでは心臓や肝臓における酸化ストレスおよび小胞体ストレスの増加が、臓器障害の増悪化を引き起こし、個体死につながる可能性が示唆される。

そこで、このSOD1/Akr1a二重欠損マウスの表現型を詳細に解析し、ビタミンCを投与した場合と投与しない場合での酸化ストレスによる組織障害に着目してその分子機構の解明を行う。SOD1/Akr1a二重欠損マウスは、ビタミンCを体内で合成できず、酸化ストレスの亢進によるアポトーシスや老化を惹起することから、その分子基盤の解明は老化防止や各種疾患の予防ならびに治療法の開発につながり、社会的に重要な意義が期待される。また、NASHをはじめとする各種代謝疾患には活性酸素が深く関与することため、活性酸素を消去するビタミンCやその安定誘導体を摂取することにより、その予防・治療に有効な可能性を示すことができる。

3. 研究の方法

授乳期よりビタミンCを投与して成獣まで育てたSOD1/Akr1a二重欠損マウスを給水継続群および給水停止群に分け、心機能および肝障害への影響を中心に以下の項目を検討した。

【心機能への影響の検討】

- (1) 心臓重量脛骨長比を測定し、心肥大を評価した。
- (2) 心エコーにて心臓壁厚・左室径・左室収縮能を評価した。
- (3) カスパーゼ3活性化をウェスタンブロット法により検出した。

【肝障害への影響の検討】

肝障害の程度を組織学的解析 (H&E 染色)および血漿中ALT値の測定により比較した。

4. 研究成果

- (1) ビタミンC給水停止に伴い、二重欠損マウスの体重は顕著に低下した。
- (2) ビタミンC給水停止2週間以内に、二重欠損マウスはすべて死亡した。マウスの週齢および性別は死亡するまでの日数に影響しなかった。
- (3) 心エコー検査の結果、ビタミンC給水停止に伴う心機能の低下は認められなかった。心臓重量脛骨長比、血圧および心拍数は正常の範囲内であった。
- (4) ビタミンC給水停止に伴う心臓でのカスパーゼ3活性化は認められなかった。

- (5) ビタミン C 給水停止に伴う血漿中 ALT 値の増加が認められた。
- (6) H&E 染色の結果から、給水停止群で肝細胞の腫大や軽度の炎症を認めた。肝細胞の核腫大や核封入体が著明であった。
- 以上の結果から、ビタミン C は、SOD1/Akr1a 二重欠損マウスの生存にとって必須であり、生体内で酸化ストレスからの組織障害にビタミン C が保護的に働いていることが示唆された。

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 12 件)

- (1) Jaeyong Lee, Eun Sil Kang, Sho Kobayashi, Takujiro Homma, Hideyo Sato, Han Geuk Seo, Junichi Fujii. The viability of primary hepatocytes is maintained under a low cysteine-glutathione redox state with a marked elevation in ophthalmic acid production. *Exp Cell Res*, 361:178-191.
DOI:10.1016/j.yexcr.2017.10.017
(2017) 査読有
- (2) Shinji Hamashima, Takujiro Homma, Sho Kobayashi, Naoki Ishii, Toshihiro Kurahashi, Ren Watanabe, Naoko Kimura, Hideyo Sato, Junichi Fujii. Decreased reproductive performance in xCT-knockout male mice. *Free Radic Res*, 51:851-860.
DOI: 10.1080/10715762.2017.1388504
(2017) 査読有
- (3) Jaeyong Lee, Takujiro Homma, Junichi Fujii. Mice in the early stage of liver steatosis caused by a high fat diet are resistant to thioacetamide-induced hepatotoxicity and oxidative stress. *Toxicol Lett*, 277:92-103.
DOI:10.1016/j.toxlet.2017.06.005
(2017) 査読有
- (4) Eun Sil Kang, Jaeyong Lee, Takujiro Homma, Toshihiro Kurahashi, Sho Kobayashi, Atsunori Nabeshima, Sohsuke Yamada, Han Geuk Seo, Satoshi Miyata, Hideyo Sato, Junichi Fujii. xCT deficiency aggravates acetaminophen-induced hepatotoxicity under inhibition of the transsulfuration pathway. *Free Radic Res*, 51, 80-90.
DOI:10.1080/10715762.2017.1282157
(2017) 査読有
- (5) Takaya Shirato, Takujiro Homma, Jaeyong Lee, Toshihiro Kurahashi, Junichi Fujii. Oxidative stress caused by a SOD1 deficiency ameliorates thioacetamide-triggered cell death via CYP2E1 inhibition but stimulates liver steatosis. *Arch Toxicol*, 91:1319-1333.
DOI:10.1007/s00204-016-1785-9
(2017) 査読有
- (6) Takujiro Homma, Ryusuke Akihara, Satoshi Okano, Mototada Shichiri, Yasukazu Yoshida, Ken-ichi Yamada, Satoshi Miyata, Osamu Nakajima, Junichi Fujii. Heightened aggressive behavior in mice deficient in aldo-keto reductase 1a (Akr1a). *Behav Brain Res*, 319:219-224.
DOI:10.1016/j.bbr.2016.11.038
(2017) 査読有
- (7) Junitsu Ito, Naoki Ishii, Ryusuke Akihara, Jaeyong Lee, Toshihiro Kurahashi, Takujiro Homma, Ryo Kawasaki, Junichi Fujii. A high fat diet temporarily renders Sod1-deficient mice resistant to an oxidative insult. *J Nutr Biochem*, 40:44-52.
DOI:10.1016/j.jnutbio.2016.10.018
(2017) 査読有
- (8) Takujiro Homma, Junichi Fujii. Heat stress promotes the down-regulation of IRE1 in cells: An atypical modulation of the UPR pathway. *Exp Cell Res*, 349:128-138
DOI:10.1016/j.yexcr.2016.10.006
(2016) 査読有
- (9) Ryusuke Akihara, Takujiro Homma, Jaeyong Lee, Ken-ichi Yamada, Satoshi Miyata, Junichi Fujii. Ablation of aldehyde reductase aggravates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury involving oxidative stress and endoplasmic reticulum stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 478:765-771.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.08.022
(2016) 査読有
- (10) Toshihiro Kurahashi, Jaeyong Lee, Atsunori Nabeshima, Takujiro Homma, Eun Sil Kang, Yuka Saito, Sohsuke Yamada, Toshiyuki Nakayama, Ken-ichi Yamada, Satoshi Miyata, Junichi Fujii. Ascorbic acid prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice by ameliorating glutathione recovery and autophagy. *Arch Biochem Biophys*, 604:36-46.
DOI:10.1016/j.abb.2016.06.004
(2016) 査読有
- (11) Noriyuki Otsuki, Takujiro Homma, Hiroki Fujiwara, Kenya Kaneko, Yasukazu Hozumi, Mototada Shichiri, Mizuki Takashima, Junitsu Ito, Tasuku

Konno, Toshihiro Kurahashi, Yasukazu Yoshida, Kaoru Goto, Satoshi Fujii, Junichi Fujii. Trichloroethylene exposure aggravates behavioral abnormalities in mice that are deficient in superoxide dismutase. Regul Toxicol Pharmacol. 79:83-90 DOI:10.1016/j.yrtph.2016.05.007 (2016) 査読有

- (12) Noriyuki Otsuki, Tasuku Konno, Toshihiro Kurahashi, Saori Suzuki, Jaeyong Lee, Futoshi Okada, Yoshihito Iuchi, Takujiro Homma, Junichi Fujii, The SOD1 transgene expressed in erythroid cells alleviates fatal phenotype in congenic NZB/NZW-F1 mice. Free Radic Res, 50(7):793-800. DOI:10.1080/10715762.2016.1178388 (2016) 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

- (1) Takujiro Homma, Naoki Ishii, Sho Kobayashi, and Junichi Fujii. Heterozygous SOD1 deficiency causes male infertility by triggering autoimmune response in mice with the NZW background. 8th Joint Meeting of Society for Free Radical Research Australasia and Japan with International Symposium on Coenzyme Q10, Tokyo, Japan, 2017
- (2) 本間拓二郎、浜島真司、小林翔、倉橋敏裕、渡辺連、木村直子、佐藤英世、藤井順逸、シスチントランスポーター・xCT 欠損マウスは雄性生殖能が低下する、2017年度生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017年
- (3) 本間拓二郎、浜島真司、小林翔、倉橋敏裕、渡辺連、木村直子、佐藤英世、藤井順逸、シスチントランスポーター・xCT の男性生殖能における役割の検討、第70回日本酸化ストレス学会学術集会、筑波、2017年
- (4) Takujiro Homma, Takaya Shirato, Jaeyong Lee, Toshihiro Kurahashi, Junichi Fujii. SOD1-knockout mice are resistant to lethal effects of thioacetamide-induced hepatotoxicity. The 23rd Annual Meeting, a joint meeting with the Society for Free Radical Research International (SfRBM/SFRRI 2016) San Francisco, USA, 2016
- (5) 本間拓二郎、白土貴也、李在勇、倉橋敏裕、藤井順逸、SOD1欠損による酸化ストレスはシトクロムP450活性を抑制することで薬剤誘発性肝障害を軽減する、日本生化学会東北支部第82回例会・シンポジウム、弘前、2016年

- (6) 本間拓二郎、白土貴也、李在勇、倉橋敏裕、藤井順逸、SOD1欠損による酸化ストレスはシトクロムP450活性を抑制することで薬剤誘発性肝障害を軽減する、第69回日本酸化ストレス学会学術集会、仙台、2016年
- (7) 本間拓二郎、藤井順逸、熱ストレス障害に対する小胞体ストレス応答の解析；熱ストレスはIRE1発現を減少させる、第89回日本生化学会大会、仙台、2016年

〔図書〕(計 2 件)

- (1) Takujiro Homma, Junichi Fujii. Chapter 2; Indispensable Roles of Superoxide Dismutation in Mammalian Erythrocytes. In "Superoxide Dismutase (SOD): Sources, Therapeutic Uses and Health Benefits" Nova Science Publishers, Inc, 37-57 (2016) ISBN: 978-1-63485-481-8
- (2) Junichi Fujii, Takujiro Homma, Sho Kobayashi Chapter 11: Ascorbic Acid as a Multifunctional Nutrient in Mammals; Our Understanding based on Studies using Genetically Modified Mice. In "Ascorbic Acid: Properties, Synthesis and Applications" Nova Science Publishers, Inc, 239-265 (2016) ISBN: 978-1-63485-886-1

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.id.yamagata-u.ac.jp/Biochem1/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本間 拓二郎 (HOMMA, Takujiro)

山形大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70743566