

令和元年6月14日現在

機関番号：82674

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18705

研究課題名(和文) ビタミンC、Eの同時不足がエストロゲン欠乏マウスの皮膚に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effect of vitamin C and vitamin E deficiency on skin of estrogen-deficient female mice

研究代表者

近藤 嘉高 (Kondo, Yoshitaka)

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・研究員

研究者番号：20507397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、青壮年期の女性(エストロゲン充分)や更年期以降の女性(エストロゲン欠乏)の皮膚におけるVC不足、VE不足、2重(同時)不足が紫外線による皮膚の黒化やシワの形成(光老化)に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。ビタミンCを体内で合成できないSMP30ノックアウト(KO)マウスと、エストロゲンを合成できないAromatase(Ar)-KOマウス、ヘアレスマウスを掛け合わせて、SMP30/Arダブルノックアウト(DKO)ヘアレスマウスを作出した。しかし、繁殖成績が悪く、実験に必要な匹数が得られなかった。今後は、SMP30-KOヘアレスマウスの卵巣摘出モデルに切り換えるべきである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚の老化は、加齢による内因性老化(自然老化)と環境要因による外因性老化(主に太陽光による光老化)に分けられる。ヒトの老化では、深いシワやたるみの特徴とする光老化の影響が大きいといわれている。光老化の病態は、紫外線照射によって生ずる活性酸素種を原因と言われており、光老化予防における抗酸化物質の重要性が注目されている。本研究では、更年期以降の女性(エストロゲン欠乏)の皮膚におけるVC不足、VE不足、2重(同時)不足が、紫外線による皮膚の黒化やシワの形成(光老化)に及ぼす影響を明らかにすることを目指した。

研究成果の概要(英文)：To clarify the effect of vitamin C and vitamin E deficiency on skin of estrogen-deficient mice, we generated SMP30/Aromatase-double knockout mice which are not able to synthesize vitamin C, vitamin E, and estrogen. However, we could not gain sufficient numbers of SMP30/Aromatase-double knockout mice for further experiments.

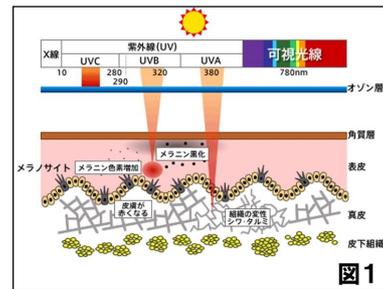
研究分野：栄養学

キーワード：ビタミンC

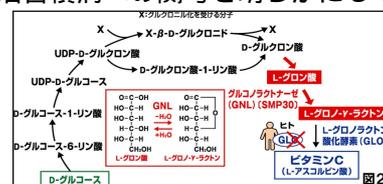
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

皮膚は、表皮、真皮、皮下脂肪という構造をとる。表皮の角質層は、保湿や異物の侵入を防ぐバリア機能を担う。真皮は、繊維芽細胞により産生される細胞外マトリクス（コラーゲン線維やエラスチン線維）が網目状に絡み合い、皮膚の強度、柔軟性、弾力性に寄与している。皮膚の老化は、加齢による内因性老化（自然老化）と環境要因による外因性老化（主に太陽光による光老化）に分けられる。自然老化は、細胞外マトリクスの網目構造が崩れることによる細かいシワが特徴であるが、ヒトの老化では、深いシワやたるみの特徴とする光老化の影響が大きいといわれている。地上に届く太陽光には、表皮から真皮上層までしか到達しない紫外線 UVB (280-320 nm) と、真皮深層まで到達する UVA (320-400 nm) が含まれる (図 1)。光老化の病態は、紫外線照射によって生ずる活性酸素種を原因として、NF- κ B や AP-1 の活性化、TGF- β の抑制を介して、炎症性サイトカインやマトリクスメタロプロテアーゼ (MMPs) の増加、プロコラーゲン産生抑制、エラスチンの発現増加によると考えられている (Biomolecule 5, 545 (2015))。また、紫外線照射は、表皮のメラニン細胞におけるメラニン合成を促し、皮膚の黒化をもたらす。従って、光老化予防における抗酸化物質の重要性が目まぐるしく注目されている。

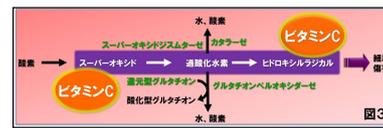


SMP30 (加齢指標タンパク質 30) は、我々の研究グループが発見し遺伝子をクローニングした加齢に伴い減少するタンパク質であり、老化や老年病、生活習慣病への関与を明らかにしてきた (Am J Pathol 161(4), 1273 (2002), Endocrinology 151(2), 529 (2010), PLoS ONE 8(6), e65698 (2013), Antioxid Redox Signal 19(10), 1063 (2013))。我々は、SMP30 がビタミン C (VC, L-アスコルビン酸) 生合成経路に必須の酵素グルコノラクタナーゼ (GNL) であることを突き止めた (Proc Nat Acad Sci USA 103, 5723 (2006)) (図 2)。

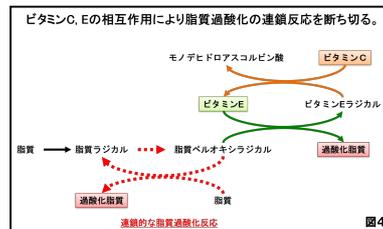


マウスなどほとんどの哺乳類は、VC を体内で合成できるが、我々が開発した SMP30 ノックアウト (KO) マウスは、ヒトと同様に VC を合成できない。VC は、水溶性の電子供与体であり、プロコラーゲンの水酸化反応において補因子として働き、コラーゲン繊維の重合に必須である。

また、強力な抗酸化物質として、老化や光老化の原因である活性酸素種を消去する (図 3)。我々は、VC 不足マウスは、全身の臓器における活性酸素種の増加 (J Agric Food Chem 62(38), 9286 (2014))、平均寿命の短縮 (BBRC 315, 575-580 (2004))、皮膚のコラーゲン減少と表皮の薄化 (BBRC 385, 478 (2009)) の他、様々な老化関連病態を報告してきた。さらに、VC が不足した SMP30-KO ヘアレスマウス (無毛、メラニン合成可) は、UVB 照射による表皮の肥厚 (防御反応) は抑制され、皮膚の黒化 (メラニン増加) が進行した (J Invest Dermatol 132(8), 2112 (2012))。また、VC はヒト正常繊維芽細胞におけるプロコラーゲンの発現と合成を促進する (BBRC 430, 579 (2013))。



ビタミン E (VE, α -トコフェロール) は、脂溶性の強力な抗酸化物質であり、生体膜で生じた脂質ペルオキシラジカルからラジカルを引き抜き、脂質過酸化の連鎖反応を断ち切ることができる (図 4)。全ての哺乳類は、体内で VE を合成できず、食餌由来の VE に依存している。従って、食餌から VE を与えなければ、血中および組織中の VE が枯渇するため、VE の光老化に対する予防効果を調べることができる。また、VC は、VE ラジカルを再び VE へと還元することで、VE の抗酸化力を維持している。しかし、VC と VE の同時不足モデルが存在しなかったため、生体内における相互作用の有無は未だはっきりしていない。



エストロゲンは、皮膚に対して様々な保護作用が知られている。約 50 歳以降の閉経した女性 (更年期と老年期) は、卵巣におけるエストロゲン合成が停止することから、皮膚の機能低下が問題となっている。閉経後女性のモデルである卵巣摘出ヘアレスマウスは、短時間の UVB 照射でも皮膚が黒化し、シワやたるみが増悪する (Int J Mol Sci 6, 7753 (2015))。しかし、卵巣摘出モデルは、侵襲性の高い外科手術を要する上、卵巣以外の組織ではエストロゲンが合成されている。Aromatase は、テストステロンからエストロゲンを合成する酵素である。Aromatase (Ar)-KO マウスは、エストロゲンを体内で合成できず不妊であることから (J Endocrinol 170, 99 (2001))、完全なエストロゲン欠乏マウスとして有用である。

2. 研究の目的

SMP30-KO マウスとヘアレスマウス、Ar-KO マウスを掛け合わせて、メスの SMP30/Ar ダブルノックアウト (DKO) ヘアレスマウスを作成する。エストロゲンが欠乏した SMP30/Ar-DKO ヘアレスマウスを用いて、VC 不足、VE 不足、同時不足が皮膚に及ぼす影響、VC 不足、VE 不足、同時不足が UVB および UVA 照射による皮膚の光老化に及ぼす影響を、皮膚の性状計測や組織学、

生化学、分子生物学的な解析により明らかにする。本研究は、青壮年期の女性（エストロゲン充分）や更年期以降の女性（エストロゲン欠乏）の皮膚における VC 不足、VE 不足、2重（同時）不足が、皮膚に及ぼす影響、特に紫外線による皮膚の黒化やシワの形成（光老化）に及ぼす影響を調べる。

3. 研究の方法

(1) SMP30/Ar-DKO ヘアレスマウスの作出

体内で VC を合成できない SMP30-KO マウスと Hos:HR-1 ヘアレスマウス（アルビノ、無毛のため皮膚の解析が容易）を交配し、SMP30-KO ヘアレスマウス [無毛で黒色（メラニン合成可）、VC、VE を合成できないが、エストロゲンは合成できる]を得た。次に、エストロゲンを合成できない Ar-KO マウスと交配し、SMP30/Ar-DKO ヘアレスマウス [無毛で黒色（メラニン合成可）、VC、VE、エストロゲンを合成できない] を作出した。

(2) VC 不足、VE 不足、同時不足がエストロゲン欠乏マウスの皮膚に及ぼす影響の解析（当初計画）

SMP30/Ar-DKO ヘアレスマウスを用いて、エストロゲン欠乏状態における VC、VE 不足が光老化に及ぼす影響を明らかにするため、8週齢まで VE 添加飼料と VC 水を与えて飼育後、VC、VE 不足群、VC 十分&VE 不足群、VC 不足&VE 十分群、VC、VE 十分群の4群（各群5匹）に分け、8週間飼育する。- の各群は、それぞれ、紫外線照射なし、UVB（280-320 nm）照射（週3回）、UVA（320-400 nm）照射（週3回）の試験を行う。紫外線の照射量は、事前に VC、VE 十分群を用いて決定した最小紅斑量（皮膚が赤くなる最低の照射量）の半量（やけどが起きない）に設定、照射時間は検討する。VC、VE 不足が紫外線照射による皮膚の性状に及ぼす影響を明らかにするため、1週間毎にマウス背部皮膚の紅斑量、経表皮水分蒸散量（TEWL）や角質水分量（バリア機能、肌荒れ）皮膚物理特性（柔軟性、弾力性）を測定する。皮膚の黒化は色彩色差計により皮膚の明度（L値）を、シワの形成は観察によりスコア化（0-4の5段階）する。照射4、8週間で各マウスを解剖し、背部の皮膚と血液を採取する。紫外線による表皮と真皮の肥厚は、皮膚のヘマトキシリン・エオジン染色画像からそれぞれの厚さを計測する。紫外線によるメラニン顆粒の沈着は、フォンタナ・マッソン染色で評価する。VC、VE 不足が光老化の病態および発症機序に及ぼす影響を明らかにするため、酸化ストレス指標、抗酸化物質、抗酸化酵素、細胞外マトリクス、細胞外マトリクスの分解系、活性酸素種によるシグナル伝達分子、炎症性サイトカインを解析する。

4. 研究成果

VC、VE、エストロゲンを合成できない SMP30/Ar-DKO ヘアレスマウスの作出は、自然交配では長期間を要する上、Ar-KO マウスは不妊のため、作出効率が著しく低い。そこで、各マウスから卵子と精子を採取して体外受精・胚移植することにより、不妊マウスの仔も得られ、短期間で交配を進めることを目指した。初めに、体内で VC を合成できない SMP30-KO マウスと Hos:HR-1 ヘアレスマウス（アルビノ、無毛のため皮膚の解析が容易）を交配し、SMP30-KO ヘアレスマウス [無毛で黒色（メラニン合成可）、VC、VE を合成できないが、エストロゲンは合成できる]を得た。次に、エストロゲンを合成できない Ar-KO マウスと交配し、SMP30/Ar-DKO ヘアレスマウス [無毛で黒色（メラニン合成可）、VC、VE、エストロゲンを合成できない] を作出した。しかし、実験群のマウスを作出するために必要なメスの SMP30/Ar-DKO ヘアレスマウスは、体外受精・胚移植を行うのに十分な匹数が得られなかった。そこで、雌雄の SMP30-KO/Ar ヘテロ KO ヘアレスマウスを自然交配させて、体外受精・胚移植用のマウスの作出を試みたが、繁殖成績が悪く、体外受精・胚移植に必要な匹数が得られなかった。今後は、SMP30-KO ヘアレスマウスから卵巣を摘出することにより、エストロゲン欠乏状態を作り出す方針に切り換えるべきである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

- (1) Lee W, Cho JH, Lee Y, Lee S, Kim DH, Ha S, Kondo Y, Ishigami A, Chung HY, Lee J. Dibutyl phthalate impairs neural progenitor cell proliferation and hippocampal neurogenesis. *Food Chem Toxicol* 査読有 129, 239-248, (2019)
DOI: 10.1016/j.fct.2019.04.040
- (2) Ito S, Sairenchi T, Machida T, Takino Y, Kondo Y, Mukai K, Kobashi G, Ishigami A, Senoo T. Reduced aqueous humour ascorbic-acid concentration in women with smaller anterior chamber depth. *Sci Rep* 査読有 9(1), 372, (2019)
DOI: 10.1038/s41598-018-36899-8
- (3) Jang B, Jeon Y, Shin H, Lee Y, Kim H, Kondo Y, Ishigami A, Kim Y, Choi E. Myelin basic protein citrullination, a hallmark of central nervous system demyelination, assessed by novel monoclonal antibodies in prion diseases. *Mol Neurobiol* 査読有 55(4), 3172-3184, (2018) DOI: 10.1007/s12035-017-0560-0

- (4) Takigawa M, Masutomi H, Kishimoto Y, Shimazaki Y, Hamano Y, Kondo Y, Arai T, Lee J, Ishii T, Mori Y, Ishigami A. Time-dependent alterations of vancomycin-induced nephrotoxicity in mice. *Biol Pharm Bull* 査読有 40(7), 975-983, (2017)
DOI: 10.1248/bpb.b16-00932
- (5) Amano A, Kondo Y, Noda Y, Ohta M, Kawanishi N, Machida S, Mitsuhashi K, Senmaru T, Fukui M, Takaoka O, Mori T, Kitawaki J, Ono M, Saibara T, Obayashi H, Ishigami A. Abnormal lipid/lipoprotein metabolism and high plasma testosterone levels in male but female aromatase-knockout mice. *Arch Biochem Biophys* 査読有 622, 47-58 (2017) DOI: 10.1016/j.abb.2017.03.007
- (6) 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* 査読有 21(5), 573-578 (2017) DOI: 10.1007/s12603-016-0841-8
- (7) Masutomi H, Kawashima S, Kondo Y, Uchida Y, Jang B, Choi EK, Kim YS, Shimokado K, Ishigami A. Induction of peptidylarginine deiminase 2 and 3 by dibutyryl cAMP via cAMP-PKA signaling in human astrocytoma U-251MG cells. *J Neurosci Res* 査読有 95(7), 1503-1512 (2017) DOI: 10.1002/jnr.23959
- (8) 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 K, Watanabe H, Nakagata N, Uchimura K, Kitamura K, Li J, Kai H. Pharmacological and genetic reappraisals of protease and oxidative stress pathways in a mouse model of obstructive lung diseases. *Sci Rep* 査読有 6, 39305 (2016) DOI: 10.1038/srep39305
- (9) 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* 査読有 36(12), 1379-1391 (2016)
DOI: 10.1016/j.nutres.2016.11.006
- (10) Kondo Y, Ishigami A. Involvement of senescence marker protein-30 in glucose metabolism disorder and nonalcoholic fatty liver disease. *Geriatr Gerontol Int* 査読有 16 (Suppl.1), 4-16 (2016) DOI: 10.1111/ggi.12722

〔学会発表〕(計 26 件)

- (1) Takigawa M, Masutomi H, Shimazaki Y, Kondo Y, Ishii T, Mori Y, Ishigami A. Vancomycin-induced nephrotoxicity in mice. 15th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology, Kyoto, Japan, 2017
- (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. The 21th IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics (IAGG 2017), San Francisco, USA, 2017
- (3) 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. International Conference on Frailty & Sarcopenia Research 2017 (ICFSR 2017), Barcelona, Spain, 2017
- (4) 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, Japan, 2017
- (5) Kondo Y, Kasahara Y, Ishigami A. SMP30/SOD1-double knockout mice manifest increased oxidative stress, hepatic steatosis, and premature death. The 45th Annual Meeting of the American Aging Association (AGE 2016), Seattle, USA, 2016
- (6) Amano A, Kondo Y, Kasahara Y, Ishigami A. Disruption of Cyp19 gene leads to hepatic steatosis in male aromatase-knockout mice. The 45th Annual Meeting of the American Aging Association (AGE 2016), Seattle, USA, 2016
- (7) Kondo Y. SMP30-deficient *Lepr^{db/db}* mice increases in small dense-LDL and severe fatty liver despite being fed a standard diet. The 4th Korea-Japan Joint Symposium for Young Scientists on Aging and Neuroscience, Tokyo, Japan, 2016
- (8) 赤阪啓子、灘中里美、近藤嘉高、石神昭人、北川裕之、萬谷博、遠藤玉夫 -Klotho マウスの肺におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの分泌抑制 .日本薬学会第 139 年会, 千葉, 2019
- (9) 赤阪-萬谷啓子、灘中里美、近藤嘉高、石神昭人、北川裕之、萬谷博、遠藤玉夫 -Klotho マウス肺で見られるヘパラン硫酸の発現変化 . 第 91 回日本生化学会大会, 京都, 2018
- (10) 瀧川正紀、近藤嘉高、島崎良和、石井敏浩、森淑子、石神昭人 ビタミン C によるバンコマイシン誘発薬剤性腎障害の予防効果 . 日本薬学会第 138 年会, 金沢, 2018
- (11) 近藤嘉高、青木仁史、笹原由雅、滝野有花、杉原伸郎、石神昭人 タンパク質摂取量の違いが中高齢マウスの血漿アミノ酸濃度に及ぼす影響 .2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸, 2017.

- (12) 滝沢晶子、近藤嘉高、滝野有花、船越智子、野田義博、町田修一、相垣敏郎、石神昭人 雌雄マウスでのアスコルビン酸欠乏が骨格筋に及ぼす影響 .2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸, 2017.
- (13) 河島早紀、滝野有花、近藤嘉高、永田喜三郎、斉藤紀、大澤肇、栗田克己、佐藤安訓、吉田雅幸、石神昭人 ヒト培養表皮を用いたアスコルビン酸の紫外線による細胞傷害抑制効果および関連遺伝子発現への影響 . 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸, 2017.12
- (14) 石神昭人、滝沢晶子、近藤嘉高 ビタミンC欠乏が骨格筋に及ぼす影響 . 第 153 回ビタミンC研究委員会, 名古屋, 2017
- (15) 成田昂平、近藤嘉高、野田義博、町田修一、吉田雅幸、石神昭人 Peptidylarginine deiminase 2 (PAD2) in mouse skeletal muscle . 第 40 回日本基礎老化学会大会, 名古屋, 2017
- (16) 滝沢晶子、近藤嘉高、町田修一、相垣敏郎、石神昭人 ビタミンCの欠乏が骨格筋に及ぼす影響 . 日本ビタミン学会第 69 回大会, 横浜, 2017
- (17) 近藤嘉高、青木仁史、笹原由雅、成田昂平、滝沢晶子、石神昭人 タンパク質摂取量の違いが中高齢マウスの筋再生に及ぼす影響 . 第 71 回日本栄養・食糧学会大会, 沖縄, 2017
- (18) 近藤嘉高、石神昭人 アルツハイマー病診断薬の開発 .TOBIR 第6回研究交流フォーラム, 東京, 2017
- (19) 近藤嘉高、成田昂平、石神昭人 新規に開発した抗化学修飾シトルリン化モノクローナル抗体を用いた脳におけるシトルリン化タンパク質の検出 . 第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2016
- (20) 成田昂平、近藤嘉高、増富裕文、吉田雅幸、石神昭人 マウス骨格筋におけるペプチジルアルギニンデアミナーゼ 2 (PAD2)の生化学的解析 . 第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2016
- (21) 近藤嘉高、石神昭人 SOD1 欠損とアスコルビン酸不足が脂質代謝に及ぼす影響 . 第 89 回日本生化学会大会 フォーラム 3F05「加齢性疾患とスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)」, 仙台, 2016
- (22) 成田昂平、近藤嘉高、増富裕文、吉田雅幸、石神昭人 マウス骨格筋でのペプチジルアルギニンデアミナーゼ 2 (PAD2)の局在性 . 第 89 回日本生化学会大会, 仙台, 2016
- (23) 天野晶子、近藤嘉高、野田義博、町田修一、尾林博、石神昭人 アロマターゼノックアウトマウスを用いたエストロゲン欠乏が肝臓での脂質代謝に及ぼす影響 . 第 89 回日本生化学会大会, 仙台, 2016
- (24) 近藤嘉高、増富裕文、野田義博、小澤祐介、高橋経太、半田節子、丸山直記、清水孝彦、石神昭人 SMP30/SOD1 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 . 第 39 回日本基礎老化学会大会, 伊勢原, 2016
- (25) 天野晶子、近藤嘉高、野田義博、町田修一、尾林博、石神昭人 エストロゲン合成酵素であるアロマターゼ(Cyp19)の遺伝子欠損による脂質代謝への影響 . 第 39 回日本基礎老化学会大会, 伊勢原, 2016
- (26) 天野晶子、近藤嘉高、石神昭人 シトルリン化タンパク質を検出する臨床検査試薬の開発 . TOBIRA 第 5 回研究交流フォーラム, 東京, 2016

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

東京都健康長寿医療センター研究所 老化制御研究チーム 分子老化制御

<http://www.aging-regulation.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。