

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390085

研究課題名（和文） 加齢制御の分子機構解明

研究課題名（英文） Molecular mechanism for aging control

研究代表者

白澤 卓二 (SHIRASAWA TAKUJI)

順天堂大学大学院医学研究科 客員教授

研究者番号：80226323

研究成果の概要（和文）：

脂肪肝を自然発症し、肝臓酸化ストレスが亢進した CuZn-SOD 欠損マウスにさらなる栄養負荷を行い、酸化ストレスが非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）の初期病態にどのような役割を果たすか調べた。その結果、メチオニン・コリン欠乏食や肥満モデルマウスとの交配実験において、肝臓病態の増悪は認められず、逆に CuZn-SOD 欠損が NASH 負荷に対し、耐性を示すことが明らかとなった。酸化ストレスと NASH 発症の関連に対し、複雑なメカニズムの存在を提起した。

研究成果の概要（英文）：

To investigate pathological role of oxidative stress on nonalcoholic steatohepatitis (NASH), we used CuZn-SOD-deficient mice, which developed spontaneous fatty liver with increased oxidative stress. Although methionine and choline-deficient (MCD) diet induced NASH-like pathologies in wild-type mice, CuZn-SOD-deficient mice failed to show typical hepatic injuries, suggesting that CuZn-SOD deficiency prevented from MCD-diet induced by hepatic stress. Furthermore, we crossbred CuZn-SOD-deficient mice with ob/ob mice to investigate pathological role of obesity on hepatic CuZn-SOD deficiency. Interestingly, double mutant mice also failed to show apparent hepatic abnormalities, suggesting that CuZn-SOD deficiency does not accelerate hepatic pathologies induced by impaired leptin signaling and obesity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,000,000	2,400,000	12,400,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	22,020,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：加齢、酸化ストレス、脂肪肝、NASH、モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

活性酸素の蓄積が、加齢による緩やかな生体機能の低下、すなわち老化を進行させる原因であるという「活性酸素説（フリーラジカル説）」が提唱され、最も有力な説として支持されている。しかし、個体老化の進行と活性酸素の関連は個体レベルで実証されていない。活性酸素の大部分はミトコンドリア呼吸の副産物として産生され、タンパク質、核酸、脂質といった生体物質を酸化することで機能不全を起こす結果、細胞毒性を発生させると考えられている。CuZn-SOD は細胞質で発生する活性酸素を処理する主要な酵素である。CuZn-SOD 欠損マウスは正常に発育するが、詳細な表現型解析の結果、脂肪肝や加齢黄斑変性症、筋萎縮を示すことが明らかとなった。肝臓や骨格筋での細胞質活性酸素の病理学的役割が注目されている。一方、非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の発症機構は脂肪蓄積を「first hit」とし、酸化ストレスなどの肝細胞傷害因子「second hit」が加わり発症する「two hit」説が広く信じられている。さらにNASHは進行性の疾患であることから、細胞内酸化ストレスによる増悪化が強く示唆されている。そこで、CuZn-SOD 欠損マウスに高脂肪負荷や肥満モデルマウスとの交配により、NASH の発症機序と病態解明を着想するに至った。

2. 研究の目的

(1) 脂肪肝を自然発症する CuZn-SOD 欠損マウスを用いて、栄養素欠乏食や肥満負荷が肝臓の炎症や線維化を増悪し、肝炎や肝硬変に進行するか明らかにする。

(2) 細胞質酸化ストレスによる肝臓老化の分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) CuZn-SOD 欠損マウスにメチオニン・コリン欠乏食（MCD 食）を与え、肝障害負荷を与えることで、細胞質酸化ストレス亢進下での脂肪肝が炎症と繊維化を併せ持つ肝炎や肝硬変へ増悪するかどうか調べた。

(2) 肥満による肝障害における CuZn-SOD の役割を明らかにするために、CuZn-SOD 欠損マウスと ob/ob マウスを交配し、2 重変異体マウスの作製し肝臓病態を解析した。

4. 研究成果

(1) CuZn-SOD 欠損マウスに MCD 食を 10 週間与え、脂肪肝が炎症と繊維化を併せ持つ肝炎や肝硬変へ増悪するかどうか調べた。組織学的・生化学的解析の結果、予想外に CuZn-SOD 欠損マウスは脂肪肝、繊維化および炎症に対し、耐性であることが明らかとなった。

(2) 肥満による肝障害における

CuZn-SOD の役割を明らかにするために、CuZn-SOD 欠損マウスと ob/ob マウスを交配し、2 重変異体マウスを作製した。

(3) ob/ob, CuZn-SOD 2 重変異体マウスは ob/ob マウスに比べて、体重が減少傾向であったが、ob/ob マウスと同様に肥満を呈した。肝臓中のトリグリセライド量を調べたところ、ob/ob マウスに比べ、著しく蓄積量が少ないことが明らかとなった。

(4) レプチン受容体欠損マウスである db/db マウスと CuZn-SOD 欠損マウスを交配し、別の遺伝性 NASH モデルを作るために、2 重変異体マウスの作製を進めた。その結果、ob/ob, CuZn-SOD 2 重変異体マウスと同様に、db/db, CuZn-SOD 2 重変異体マウスでも肝臓トリグリセライドの蓄積量が少なく、脂肪肝の改善を示した。

(5) レプチンシグナル低下による NASH 様病態や CYP2E1 を介した肝障害に対し、CuZn-SOD 欠損に伴う細胞質酸化ストレスが間接的または直接的に保護的に作用していることが示唆された。以上の結果から、酸化ストレスと NASH 発症の関連に対し、複雑なメカニズムの存在を提起した。

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 8 件)

1. Sasaki, T., Shimizu, T., Koyama, T., Sakai, M., Uchiyama, S., Kawakami, S., Noda, Y., Shirasawa, T., Kojima, S. Superoxide dismutase deficiency enhances superoxide

levels in brain tissues during oxygenation and hypoxia-reoxygenation. *J Neurosci Res* 89, 601-610 (2011).

2. Shimizu, T., Kawakami, S., Nojiri, N., Shirasawa, T. Model mice for tissue-specific deletion of the manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) gene. *Geriatr Gerontol Int* 10, S70-S79 (2010).
3. Kuwahara, H., Horie, T. Ishikawa, S. Tsuda, C., Kawakami, S., Noda, Y., Kaneko, T., Tahara, S., Tachibana, T., Okabe, M., Melki, J., Takano, R., Toda, T., Morikawa, D., Nojiri, H., Kurosawa, H., Shirasawa, T., Shimizu, T. Oxidative stress in skeletal muscle causes severe disturbance of exercise activity without muscle atrophy. *Free Rad Biol Med* 48, 1252-1262 (2010).
4. Lustgarten, M., Jang, Y., Liu, Y., Muller, F., Qi, W., Steinhilber, M., Brooks, S., Larkin, L. M., Shimizu, T., Shirasawa, T., McManus, L., Bhattacharya, A., Richardson, A., Van Remmen, H. Conditional knockout of MnSOD targeted to type IIB skeletal muscle fibers increases oxidative stress and is sufficient to alter aerobic exercise capacity. *Am J Physiol* 297 C1520-1532 (2009).
5. Kawakami, S., Matsuda, A., Sunagawa, T., Noda, Y., Kaneko, T., Tahara, S., Hiraumi, Y., Adachi, S., Matsui, H., Ando, K., Fujita, T., Maruyama, N., Shirasawa, T., Shimizu, T. Antioxidant, EUK-8, prevents murine

dilated cardiomyopathy. *Cir J* 73, 2125-2134 (2009).

6. Murakami, K., Inagaki, J., Saito, M., Ikeda, Y., Tsuda, C., Noda, Y., Kawakami, S., Shirasawa, T., Shimizu, T. Skin atrophy in cytoplasmic SOD-deficient mice and its complete recovery using a vitamin C derivative. *Biochem Biophys Res Commun* 382, 457-61 (2009).

7. Takahashi, M., Shimizu, T., Moriizumi, E. & Shirasawa, T. *Clk-1* deficiency induces apoptosis associated with mitochondrial dysfunction in mouse embryos. *Mech Ageing Dev* 129, 291-298 (2008).

8. Hashizume, K., Hirasawa, M., Imamura, Y., Noda, S., Shimizu, T., Shinoda, K., Kurihara, T., Noda, K., Ozawa, Y., Ishida, S., Miyake, Y., Shirasawa, T. & Tsubota, K. Retinal dysfunction and progressive retinal cell death in SOD1-deficient mice. *Am J Pathol* 172, 1325-1331 (2008).

[学会発表] (計 1 件)

1. Shirasawa, T., Kawakami, S., Shimizu, T. Antioxidant, EUK-8, prevents murine dilated cardiomyopathy. Gordon Research Conferences, Les Diablerets, Switzerland, August 22-27 (2010).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

白澤卓二 (SHIRASAWA TAKUJI)
順天堂大学 医学研究科 客員教授
研究者番号 : 80226323

(2)研究分担者

清水孝彦 (SHIMIZU TAKAHIKO)
地方独立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
研究員
研究者番号 : 40301791

(2)研究分担者

富田謙吾 (TOMITA KENGO)
慶応義塾大学 医学部 助教
研究者番号 : 50317129