

機関番号：82674

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20608005

研究課題名（和文） 脳の酸化ストレスの分子機構解明および制御に関する研究

研究課題名（英文） Study on molecular mechanism of oxidative stress in brain and anti-oxidant interventions

研究代表者

佐々木 徹 (SASAKI TORU)

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・主任研究員

研究者番号：30158927

研究成果の概要（和文）：脳組織生スライスを対象に、リアルタイムバイオラジオグラフィを用いて、活性酸素の生成を解析して、以下の結果を得た。（1）活性酸素は低酸素後の再酸素時に、糖代謝は低酸素時に亢進する。（2）ミトコンドリアを活性酸素の生成の主要な場として明らかにした。（3）活性酸素制御法の開発を目的に、カロリー制限の活性酸素生成に対する影響を検討、カロリー制限は活性酸素生成に影響を与えないことを示唆した。

研究成果の概要（英文）：We examined reactive oxygen radical-dependent chemiluminescent signals in ex-vivo brain slices using a novel photonic imaging method "real-time bioradiography". Results are as follows. (1) Reactive oxygen radical generation and glucose metabolism was enhanced during hypoxia-reoxygenation and hypoxia, respectively. (2) Mitochondria are suggested as major sites of reactive oxygen radical generation. (3) To develop the interventions to decelerate oxidative stress, we examined effect of calorie restriction on reactive oxygen radical generation. However, calorie restriction did not change the reactive oxygen radical generation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：光生命科学

キーワード：酸化ストレス、分子イメージング、脳、老化

1. 研究開始当初の背景

老化の進行および加齢関連疾患の発症への「酸化ストレス」の関与が示唆されるが、未解明の点も多い。酸化ストレスの原因物質である活性酸素は生体分子と反応する性質が強く、寿命が極めて短いため、一般の物質の

ように体外に取り出して測定することはできない。そこで、活性酸素の測定のための方法論を確立して、その上で酸化ストレスの分子機序の解明を行う。

2. 研究の目的

(1) 酸化ストレス分子機構の解明に関する研究

老化の進行や寿命は身体内外の環境因子からの影響も受ける。その環境因子として有力視されるのが“酸化ストレス”である。酸化ストレスの原因物質である活性酸素・フリーラジカルは、外因（化学物質、食物、紫外線、放射線等）だけでなく内要因によっても生ずる。ミトコンドリアのエネルギー産生システムは極めて効率的だが、活性酸素という副生成物を生ずる。本研究は酸化的ストレスの原因物質である活性酸素の生成機序を明らかにすることを目的とした。

(2) 活性酸素の生成の細胞内位置情報に関する研究

酸化傷害の分子機序を解明するには、活性酸素とその制御を担う抗酸化物質・抗酸化酵素を考慮する必要がある。しかし、細胞内における活性酸素の生成と消去系の配置と量は明らかでない。本研究では、活性酸素の生成場所と量を類推することを目的とした。

(3) 酸化ストレスの制御法の検証と開発に関する研究

カロリー制限は老化遅延・寿命延長や脳神経変性疾患の予防に有効であることが知られている。カロリーを制限することなく同様の効果が期待される「カロリー制限模倣剤」が提案された。カロリー制限および模倣剤の作用機作に活性酸素制御がかかわっていると考え、その検証を試みた。

3. 研究の方法

(1) 酸化ストレス分子機構の解明に関する研究

低酸素 - 再酸素過程の脳組織生スライスにおける活性酸素($O_2^{\cdot-}$)の生成をルシゲニンによる化学発光画像から、糖代謝はFDGによる放射線画像から、検討した。さらに、活性酸素の発生に対する、ミトコンドリア電子伝達、キサンチン - ヒポキサンチンオキシダーゼ、NAD(P)H オキシダーゼの関与を、阻害剤（アロプリノール、シアン、ロテノン、アンチマイシン A）を用いて検討した。これにより、定常状態と脳虚血 - 再灌流における活性酸素の生成機序、脳内の活性酸素の生成の部位と時間変化を明らかにした。

(2) 活性酸素の生成の細胞内位置情報に関する研究

Mn-SOD (SOD2 : ミトコンドリア) と Cu, Zn-SOD (SOD1 : 細胞質) 欠失マウスを作成して、低酸素 - 再酸素過程の組織生スライスにおける活性酸素の生成と糖代謝を野生と比較検討することで、(a) 化学発光探索子の活性酸素反応特異性の確認、(b) 細胞内で生成されて

いる $O_2^{\cdot-}$ と SOD によって消去されている割合の確認、(c) ミトコンドリアと細胞質で生成している活性酸素の割合の確認を試みた。

(3) 酸化ストレスの制御法の検証と開発に関する研究

カロリー制限したラット脳生切片にルシゲニンを含むクレブス-リンゲル液中で低酸素-再酸素処理を施した。この間、切片より発生する $O_2^{\cdot-}$ 依存性化学発光をリアルタイムバイオラジオグラフィ法で画像収集・解析した。さらに、無処理のラット脳生切片を用いて、グルコース (Glc) 濃度低下および CR 模倣剤の候補である 2-デオキシグルコース (2-DG) 添加の化学発光強度に対する影響について検討した。

4. 研究成果

(1) 酸化ストレス分子機構の解明に関する研究

$O_2^{\cdot-}$ 依存性発光は再酸素処理時に著しく増強した。FDG の集積で評価した糖代謝は無酸素時に亢進した。 $O_2^{\cdot-}$ 依存性発光はロテノン、アンチマイシン A、シアン処理によって一過性に亢進したが、3-ニトロプロピオン酸、アロプリノールによって影響を受けなかった。以上の結果から、ミトコンドリアにおける $O_2^{\cdot-}$ 生成部位としては、Complex I、III、IV が示唆された。

(2) 活性酸素の生成の細胞内位置情報に関する研究

$O_2^{\cdot-}$ 依存性発光は膜透過性 SOD mimick (EUK-8) の処理によって低下したが、Cu, Zn-SOD では影響を受けなかった。Mn-SOD 欠損マウス (SOD2 (-/-))、Cu, Zn-SOD 欠損マウス (SOD1 (-/-)) をから作成した脳組織生切片の $O_2^{\cdot-}$ 依存性化学発光を野生と比較した。定常状態の $O_2^{\cdot-}$ 依存性発光は、SOD1 (-/-) と SOD2 (-/-) で野生に比べて亢進した。SOD1 (細胞質)、SOD2 (ミトコンドリア : Mt) の局在性から、細胞質と Mt の $O_2^{\cdot-}$ 量は同等か細胞質の方が多いと推察された。しかし、Mt の容量を考慮すると、 $O_2^{\cdot-}$ 濃度では Mt の方が高いと考えられた。再酸素時の発光亢進は SOD2 (-/-) で顕著で、再酸素時には Mt で $O_2^{\cdot-}$ 生成が亢進すると推察された。

(3) 酸化ストレスの制御法の検証と開発に関する研究

カロリー制限した脳組織切片の $O_2^{\cdot-}$ 依存性化学発光は無処置の切片の化学発光と変わらなかった。酸素存在時（定常状態）における化学発光は、Glc 濃度低下および 2-DG 添加によって減弱した。しかし、2-DG を添加による化学発光強度の減弱は Glc 濃度の低下時の減弱に比べ緩やかだった。(1) Glc 濃度低下お

よび 2-DG 添加が Glc 代謝を抑制すること、
(2) 2-DG による Glc 代謝抑制は Glc 濃度低下による抑制よりも劣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 8 件)

①Unno K, Yamamoto H, Ohtaki T, Ishikawa Y, Noda S, Maeda K, Fujitani K, Miyazaki H, Takabayashi F, Sasaki T, Hoshino M, Active component in green tea catechins and effective intake period for prevention of age-related brain dysfunction. *Anti-Aging Medicine*, 査読有 8(6) 75-81, 2011., https://www.jstage.jst.go.jp/article/jaam/8/6/8_6_75/_pdf

②Sasaki 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.*, 査読有 89(4):601-10, 2011., DOI: 10.1002/jnr.22581

③Sasaki T, Sato K, Umeda I, Tahara S, Kaneko T, Effects of aging and every-other-day feeding on the levels of oxygen radicals in rat brain slices. *Neuroscience Lett.*, 査読有 469(1):84-87, 2010., <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2009.11.049>

④ Kuramoto K, Tahara S, Sasaki T, Matsumoto S, Kaneko T, Kondo H, Yanabe M, Takagi S, Shinkai T, Spontaneous Dwarf Rat (SDR): a novel model for aging research, *Geriatr. Gerontol. Int.*, 査読有 10 (1) 93-100, 2010., DOI:10.1111/j.1447-0594.2009.00559.x

⑤ Unno K, Ishikawa Y, Takabayashi F, Sasaki T, Takamori N, Iguchi K, Hoshino M, Daily ingestion of green tea catechins from adulthood suppressed brain dysfunction in aged mice. *Biofactors.*, 査読有 34(4):263-271, 2008., [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1872-8081](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1872-8081)

⑥Kondo Y, Sasaki T, Sato Y, Amano A, Aizawa S, Iwama M, Handa S, Shimada N, Fukuda M, Akita M, Lee J, Jeong K, Maruyama N, Vitamin C depletion increases superoxide generation in brains of SMP30/GNL knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun.*, 査読有 5:377(1):291-296, 2008., <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.09.132>

⑦Sato Y, Kajiyama S, Amano A, Kondo Y, Sasaki T, Handa S, Takahashi R, Fukui M, Hasegawa G, Nakamura N, Fujinawa H, Mori T, Ohta M, Obayashi H, Maruyama N, Ishigami A. Hydrogen-rich pure water prevents superoxide formation in brain slices of vitamin C-depleted SMP30/GNL knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun.*, 査読有 24:375(3):346-350, 2008., <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.08.020>

⑧Sasaki T, Unno K, Tahara S, Shimada A, Chiba Y, Hoshino M, Kaneko T, Age-related increase of superoxide generation in the brains of mammals and birds. *Aging Cell*, 査読有 7: 459-469, 2008., DOI: 10.1111/j.1474-9726.2008.00394.x

[学会発表] (計 20 件)

①佐々木徹、山中正史、茂木翔一、新海正、小島周二、金子孝夫、活動亢進による低酸素の解除時における活性酸素の生成、第 64 回日本酸化ストレス学会、北海道留寿都村、2011 年 7 月 2-3 日

②佐々木徹、山中正史、加賀美信幸、茂木翔一、小島周二、新海正、金子孝夫、活性酸素の生成はエネルギー代謝率と逆相関か?、第 34 回日本基礎老化学会、東京、2011 年 6 月 15-17 日

③佐々木徹、山中正史、茂木翔一、新海正、小島周二、金子孝夫、酸素消費亢進に伴う低酸素の解除時における組織活性酸素の生成、日本薬学会第 131 年会、静岡、2011 年 3 月 28-31 日

④佐々木徹、大林茂男、茂木翔一、小島周二、青崎敏彦、新海正、金子孝夫、活性酸素の生成とエネルギー代謝の関係、第 33 回日本基礎老化学会、名古屋、2010 年 6 月 17-18 日

⑦茂木翔一、加藤真介、金子孝夫、小島周二、佐々木徹、サリチル酸のラジカル捕捉反応を用いた組織ヒドロキシラジカルの測定、第 33 回日本基礎老化学会、名古屋、2010 年 6 月 17-18 日

⑤佐々木徹、加賀美信幸、大林茂男、茂木翔一、新海正、青崎敏彦、小島周二、金子孝夫、活性酸素の生成とエネルギー代謝に関する研究、第 130 回日本薬学会、岡山、2010 年 3 月 28-30 日

⑥T. Sasaki, K. Unno, S. Tahara, A. Shimada, T. Kaneko, Age-related increase of superoxide generation in the brains of mammals and birds.

What is the meaning for aging and life span? 19th International Association of Gerontology and Geriatrics World Congress of Gerontology and Geriatrics, Paris, Jul. 5-9, 2009

⑦ Y. Kondo, T. Sasaki, S. Handa, N. Maruyama, A. Ishigami, Vitamin C depletion increases superoxide generation in brains of SMP30/GNL knockout mice. 19th International Association of Gerontology and Geriatrics World Congress of Gerontology and Geriatrics, Paris, Jul. 5-9, 2009

⑧ 茂木翔一、大林茂男、金子孝夫、小島周二、佐々木徹、活性酸素の代謝と老化に関する研究、平成21年オータムスクール、野田、2009年10月30日-11月1日

⑨ 佐藤安訓、佐々木徹、高橋良哉、丸山直記、石神昭人、高濃度水素溶解水の飲用による脳での活性酸素の増加抑制効果、第32回日本基礎老化学会、横浜、2009年6月19-20日

⑩ 茂木翔一、加賀美信幸、金子孝夫、小島周二、佐々木徹、サリチル酸のラジカル捕捉反応を用いた組織ヒドロキシラジカルの測定、第32回日本基礎老化学会、横浜、2009年6月19-20日

⑪ 佐々木徹、加賀美信幸、茂木翔一、青崎敏彦、金子孝夫、脳内の活性酸素の局在と生成機序に関する研究、第32回日本基礎老化学会、横浜、2009年6月19-20日

⑫ 石川雄一、海野けい子、佐々木徹、高林ふみ代、星野稔、中高年齢期からの緑茶カテキン摂取による脳老化抑制、第129回日本薬学会、京都、2009年3月26-28日

⑬ 近藤嘉高、佐々木徹、佐藤安訓、天野晶子、岩間水輝、半田節子、島田信子、福田貢、丸山直記、石神昭人、ビタミンC欠乏は脳における活性酸素の生成を増加、第81回日本生化学会大会、神戸、2008年12月9-12日

⑭ 加賀美信幸、茂木翔一、小島周二、佐々木徹、活性酸素の生成と代謝との関係、第52回日本薬学会関東支部大会、野田、2008年10月4日

⑮ 近藤嘉高、佐々木徹、佐藤安訓、天野晶子、岩間水輝、半田節子、島田信子、福田貢、丸山直記、石神昭人、脳におけるビタミンCの活性酸素消去能の検討、第60回日本ビタミン学会大会、仙台、2008年6月13-14日

⑯ 近藤嘉高、佐々木徹、佐藤安訓、天野晶子、岩間水輝、半田節子、島田信子、福田貢、丸山直記、石神昭人、脳におけるビタミンCの活性酸素消去能の解析、第31回日本基礎老化学会、松本、2008年6月11-13日

⑰ 茂木翔一、加藤真介、金子孝夫、小島周二、佐々木徹、サリチル酸のラジカル捕捉反応を用いた組織ヒドロキシラジカルの測定、第33回日本基礎老化学会、名古屋、2010年6月17-18日

⑱ 佐々木徹、酒井政伸、清水孝彦、白澤卓二、田原正一、金子孝夫、活性酸素の生成と制御のトポロジーに関する研究、第31回日本基礎老化学会、松本、2008年6月11-13日

⑲ 近藤嘉高、佐々木徹、佐藤安訓、天野晶子、岩間水輝、丸山直記、石神昭人、リアルタイムバイオグラフィー法を用いた脳におけるビタミンC活性酸素消去能の検討、第62回日本栄養・食糧学会大会、埼玉、2008年5月2-4日

⑳ 佐々木徹、酒井政伸、清水孝彦、白澤卓二、田原正一、金子孝夫、小島周二、細胞内の活性酸素生成部位と量の推定に関する研究、第127回日本薬学会、横浜、2008年3月26-28日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.tmghig.jp/J_TMIG/J_index.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 徹 (SASAKI TORU)

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・主任研究員

研究者番号：30158927

(2) 研究分担者

成相 直 (NARIAI TADASHI)

東京医科歯科大学・医学部付属病院・講師
研究者番号：00228090

(3) 連携研究者

田原 正一 (TAHARA SHOICHI)

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：70250199