

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570290

研究課題名(和文) 食事制限による生体内酸化ストレス低減：機能的潜在性の再獲得

研究課題名(英文) Reduction of oxidative stress by dietary restriction: reacquiring of the functional potentials

研究代表者

河野 比良夫 (KOHNO, hirao)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：30148522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：食事制限の生体内酸化ストレス低減効果の分子基盤を解明するために、培養細胞株を用いた *in vitro* の実験系において、酸化ストレス低減たんぱく質の一つであるメタロチオネインの遺伝子が発現誘導される培養条件の探索を行った。培地に含まれる主要栄養成分である ウシ胎仔血清 アミノ酸 グルコースの欠乏した培地中で、ヒト肝臓がん由来のHepG2細胞を培養し、リアルタイムPCR法によりメタロチオネイン遺伝子の発現レベルの変動を検討した結果、メタロチオネイン遺伝子の発現は インスリン・シグナルの低下 システインの欠乏 解糖系の阻害という三つの異なる機構によって制御されていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular basis of stress-resistance induced by dietary restriction, an *in vitro* evaluating system for the effects of nutrient-deficiency on the induction of oxidative-stress related genes was established in this study. The expression of metallothionein-1a (MT-1a) gene in human hepatoma cells was significantly enhanced by culture in media which lack either fetal calf serum, or cysteine. The treatment with an inhibitor of glycolysis, 2-deoxyglucose, also induced the expression of MT-1a gene. From these results, it was suggested that human cells have potential to resist against oxidative stress by three different mechanisms, which could be reacquired by dietary restriction.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：人類学・応用人類学

キーワード：食事制限 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

人類はその長い歴史において、自然環境に対して様々な適応してきた。なかでも食環境に関しては、時には生命を脅かす飢饉などに直面することもあったが、人類は自らの生体をこの栄養ストレスに適応させることにより生存してきた。一方で人類は、産業革命以後急速に人為的食環境を作り上げてきた。この急速に作り上げられた人為的食環境に生体が十分適応していないことは、過食とそれに関連する生活習慣病の増加によって証明されている。生体にとって栄養ストレスのない環境下での生活は、人類が自然環境のもとで長い期間をかけて形成してきた諸々の生体機能の応答能を低下せしめるものである。また、人為的環境下での食環境の急変は、生体機能に新たな栄養ストレスを加えようとしている。

食事制限は老化を遅らせ寿命を延長させる唯一確実な方法であると考えられており、カロリー制限の寿命・老化に対する効果は、酵母のような単細胞生物からマウスやラットなどのげっ歯類に至るまで幅広い生物種において科学的に実証されている。食事制限の老化遅延および寿命延長効果については様々な仮説が提唱されているが、特に食事制限による生体内酸化ストレスの低減が、寿命延長に重要な役割を果たしていることが、酵母からげっ歯類までの幅広い生物種において報告されている。

食事制限は、生体を飢餓という栄養ストレスの状態に置くものであるが、生体には常にホメオスタシスが働いており、飢餓状態に対応できるよう応答する。この過程において、免疫機能・内分泌機能・代謝機能・遺伝子発現等がダイナミックに変動し、結果として、現代の食環境によって失われた機能的潜在性が再獲得されるのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

食事制限による生体内酸化ストレスの低減が、老化遅延および寿命延長に重要な役割を果たしていることが幅広い生物種において報告されている。本研究は、食事制限が生体の生理機能にどのような影響をおよぼすのかについて、生体内酸化ストレスの低減への関与が推測されている各種たんぱく質群に焦点を絞り、その遺伝子発現誘導機構を検討するとともに、食事制限の機能的潜在性への影響を、酸化ストレス低減関連遺伝子群の発現誘導を指標として評価することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 6週齢雄性 Donryu ラットをオリエンタル酵母社製飼料を1週間自由摂取させた後、自由摂取群と絶食群の2群に分け、絶食群については48時間絶食後、自由摂取による再給餌を行った。体重測定後、液体窒素を用いて肝臓を急速凍結した。

(2) ラットおよびヒトの肝がん由来培養細

胞株は主要な栄養成分であるウシ胎仔血清(FCS)、アミノ酸、グルコースをそれぞれ欠乏するように調製した Dulbecco's Modified Eagle Medium(D-MEM)中で48時間培養した。(3) 肝組織および培養細胞よりRNAを抽出し、リアルタイム RT-PCRにて酸化ストレス関連たんぱく質遺伝子の mRNA 量を定量し、各栄養成分の欠如していない培地中で培養した細胞の場合と比較した。

4. 研究成果

(1) 短期絶食ラットの肝臓における酸化ストレス関連たんぱく質遺伝子の発現誘導

48時間の絶食条件下で飼育したラット肝臓における、各種酸化ストレス関連たんぱく質遺伝子の発現レベルの変動を検討した。その結果、メタロチオネイン(MT)-1a、熱ショックたんぱく質(HSP)70、HSP 27、HSP 60、HSP 90、Heat Shock Cognate Protein 70、チオレドキシン・レダクターゼ、ヘム・オキシゲナーゼ-2の発現レベルが、48時間の絶食後に有意に上昇していた。

さらに、絶食の後に48時間の再給餌を行い、絶食による発現レベル上昇率が最も顕著であった MT-1a 遺伝子の、絶食前、絶食後、再給餌後の肝臓における発現レベルの変動を検討した。その結果、絶食によって上昇した発現レベルは再給餌後に絶食前のレベルにまで低下した。この結果から、ラットの肝臓における絶食による酸化ストレス関連たんぱく質遺伝子の発現誘導は、可逆的なプロセスであることが明らかになった。絶食による MT たんぱく質の増加は、ラットおよびマウスを用いた研究において報告されている。本研究の結果は、MT たんぱく質の増加が MT 遺伝子の発現増加によることを示唆している。

(2) 「食事制限の in vitro モデル」の確立

短期絶食ラットの肝臓において観察された、酸化ストレス関連たんぱく質遺伝子の発現誘導現象の分子基盤を解明するためには、実験動物を用いた in vivo における解析では困難であると考え、培養細胞を用いた in vitro の実験系において、絶食ラットの肝臓と同様に酸化ストレス関連たんぱく質遺伝子が発現誘導される培養条件の探索を行った。培地に含まれる主要栄養成分として、FCS アミノ酸 グルコースを選択し、肝臓がん由来の H35 細胞(ラット)および HepG2 細胞(ヒト)を、培地中の各栄養成分が欠乏した条件下で培養し、リアルタイム PCR 法により酸化ストレス関連たんぱく質遺伝子の発現レベルの変動を検討した。

まず、種々の細胞増殖因子が含まれている FCS について検討を加えた。その結果、ラット H35 細胞を FCS 欠乏条件下で培養することによって MT-1a 遺伝子の発現が有意に増加することを見出した。また、絶食ラットの肝臓の場合と同様に、HSP70、Heat Shock Cognate Protein 70、チオレドキシン・レダクターゼ、ヘム・オキシゲナーゼ-2の発現レベルも有意

に上昇していた。

次に、ヒト肝臓がん由来の HepG2 細胞を用いて同様の検討を行った結果、FCS 欠乏条件下での培養によって MT-1a 遺伝子および MT-1a と並んで主要なアイソフォームである MT-11a 遺伝子の発現も有意に増加していた。さらに、FCS 欠乏条件下での培養による MT-1a 遺伝子の発現誘導は、FCS 濃度低下の度合いおよび培養時間に依存していた。これらの結果から、ヒト肝臓がん由来 HepG2 細胞の栄養成分欠乏条件下での培養は、酸化ストレス関連たんぱく質遺伝子の発現誘導現象の分子基盤を解明するために有用な、invitro モデルであると考え、この実験系を用いたより詳細な検討を行った。

(3) 濃度低下によって MT-1a 遺伝子の発現を誘導する、FCS 中に含まれる成分の同定

FCS 中には既知および未知の多数の細胞増殖因子が含まれていると考えられており、特定の細胞増殖因子を欠乏させた培養系の構築は不可能である。そこで、FCS を全く含まない無血清条件下での培養に、細胞の無血清培養時に用いられる FCS 代替添加物の ITS (インスリン・トランスフェリン・亜セレン酸ナトリウムの混合物) を添加し、MT-1a 遺伝子の発現誘導に及ぼす影響について検討した。ITS の添加は無血清培養による MT-1a 遺伝子の発現誘導を約 50% 低下させたことから、ITS に含まれる成分のいずれかが欠乏することにより、MT-1a 遺伝子の発現が誘導されると推察された。従来より、欠乏によって遺伝子発現を変動させると報告されているのは、インスリンのみであったので、無血清条件下での培養に、ヒトのリコンビナント・インスリンを添加し、MT-1a 遺伝子の発現誘導に及ぼす影響について検討した。その結果、インスリンは濃度に依存して MT-1a 遺伝子の発現誘導を抑制することが示され、FCS 中に含まれているインスリンの濃度低下が MT-1a 遺伝子の発現誘導を惹起していることが明らかになった。

インスリン・シグナルの低下による酸化ストレス関連遺伝子の発現誘導機構については、線虫、ショウジョウバエ、マウスの遺伝子変異体を用いた研究により、下流のシグナル伝達経路を構成する AKT キナーゼの活性低下が関与することが報告されている。そこで、HepG2 細胞を AKT キナーゼの阻害剤である MK2206 の存在下で培養したところ、MT-1a 遺伝子の発現が有意に誘導された。この結果から、ヒト細胞における MT-1a 遺伝子の発現誘導にも、同様のシグナル伝達経路が関与することが推察された。

(4) アミノ酸の欠乏による MT-1a 遺伝子の発現誘導

D-MEM には 15 種類のアミノ酸がふくまれている。まず、全アミノ酸を欠乏した培地を調製して培養を行ったが、細胞は死滅した。そこで、グルタミンのみを欠乏したグルタミン以外の 14 種類のアミノ酸を欠乏、の 2 種類

の培地を調整して検討した結果、グルタミン以外の 14 種類のアミノ酸を欠乏した培地で培養することによってのみ、MT-1a 遺伝子の発現が誘導された。次に 14 種類のうちの 1 種類のアミノ酸のみを欠乏した培地を調整して検討した結果、システインを欠乏した培地において、MT-1a 遺伝子の発現が有意に誘導された。

アミノ酸の欠乏による遺伝子の発現誘導機構としては、多種類のアミノ酸の欠乏によって、アミノ酸の合成および細胞内輸送に関わる遺伝子群の発現を制御するアミノ酸応答系(AAR)が知られているが、本研究における MT-1a 遺伝子の発現は、システインを欠乏した場合においてのみ誘導されたことから、AAR とは異なる制御機構が関与すると推察された。

(5) グルコースの欠乏による MT-1a 遺伝子の発現誘導

まず、グルコースを欠乏した培地を調製して培養を行ったが、細胞は死滅した。そこで、グルコースのアナログであり解糖系の阻害剤である 2-デオキシグルコース(2-DG)を用いて培養を行った。高グルコース(4.5g/l)D-MEM においては、2-DG は MT-1a 遺伝子の発現に影響しなかったが、低グルコース(1.0g/l)D-MEM において MT-1a 遺伝子の発現を有意に誘導した。

(6) 本研究において得られた結果から、ヒトの肝臓がん由来培養細胞株において、MT-1a 遺伝子の発現はインスリン・シグナルの低下、システインの欠乏、解糖系の阻害という三つの異なる機構によって制御されていることが明らかになった。食事制限の方法としては、カロリー制限と間歇的(一日おき)絶食が知られている。カロリー制限においては、アミノ酸とグルコースの欠乏は部分的であるため、インスリン・シグナルの低下による制御が主に作動すると考えられる。一方、間歇的絶食においては、~ の全てによる制御が同時に作動すると推察される。このような食事制限法による酸化ストレス関連たんぱく質遺伝子の発現制御特性の違いを考慮することで、生体内酸化ストレスの低減に最も効果的な食事制限法を選択し、結果として生活習慣病の予防と健康寿命の延長に寄与できる可能性がある。また、生理人類学的な視点からは、ヒトが潜在的に有している飢餓条件下におけるストレス耐性能の生理学的な役割を解明するための基礎的な知見となることが期待される。

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)

[学会発表](計 6 件)

河野比良夫、甲田勝康、佐々木豊、園田精昭、培地栄養成分の欠乏によるメタロチオネイン遺伝子の発現誘導、日本衛生学会第 84 回学術総会、2014 年 5 月 27 日、岡山。

河野比良夫、甲田勝康、中村晴信、藺田精昭、食事制限によるストレス耐性の増強
アミノ酸の影響、日本生理人類学会第 69
回大会、2013 年 10 月 26 日、京田辺。

河野比良夫、甲田勝康、佐々木豊、藺田精昭、無血清培養によるメタロチオネイン遺
伝子の発現誘導機構、日本衛生学会第 83 回
学術総会、2013 年 3 月 25 日、金沢。

河野比良夫、甲田勝康、中村晴信、藺田精昭、食事制限によるストレス耐性の増強
インスリンの影響、日本生理人類学会第 67
回大会、2012 年 11 月 17 日、東京。

河野比良夫、甲田勝康、藺田精昭、食餌
制限の in vitro モデル：ヒト Hepatoma 細胞
を用いた検討、第 82 回日本衛生学会学術総
会、2012 年 3 月 25 日、京都。

河野比良夫、石原敬康、甲田勝康、中村
晴信、藺田精昭、食事制限によるストレス耐
性の増強 - in vitro モデルの構築、日本生
理人類学会第 65 回大会、2011 年 11 月 27 日、
吹田。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野比良夫 (KOHNO, Hirao)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：30148522