

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500881

研究課題名(和文) 老化・疾患の還元ストレス理論の実証に関する研究

研究課題名(英文) Demonstration of hyper-reduction theory on mechanism of aging and diseases

研究代表者

佐々木 徹 (SASAKI, Toru)

北里大学・医療衛生学部・准教授

研究者番号：30158927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、これまで開発したリアルタイムバイオリジオグラフィ法とマイクロセンサによる酸素濃度計測法を融合させた方法論を構築した。この方法論を用いて低酸素-再酸素過程の活性酸素と組織酸素濃度の変化を、脳組織スライスを用いて検討した。その結果、活性酸素の生成は供給する酸素の低下(供給性低酸素)に加え、活動亢進に伴う低酸素(需要性低酸素)の解除時にも活性酸素の生成が亢進することを見出した。マイクロセンサで計測した組織の酸素濃度は、供給性低酸素、需要性低酸素のいずれも低下していた。低酸素時には組織は還元になることが知られており、レドックスの過還元が再酸素時の活性酸素の生成亢進に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In our previous study, we found experimental results which contradict with the theory of aging that reactive oxygen species (ROS) generation increases with energy metabolism. In this study, we developed the combined apparatus, real-time bioradiography and oxygen micro-sensor in tissues slices. The ROS generation and tissue oxygen concentration were measured during hypoxia-reoxygenation using this system. ROS generation was enhanced during reoxygenation after the low oxygen supply caused hypoxic treatment. Similarly, enhanced energy demand in tissue caused hypoxia enhanced the ROS generation during reoxygenation. Low tissue oxygen concentration was confirmed in both of hypoxia models. The hypoxic condition would be cause of "hyper-reduction", therefore the as a future study, the relationship between ROS generation and redox state in tissue is required.

研究分野：分子イメージング

キーワード：分子イメージング 酸化ストレス 還元ストレス 活性酸素

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。先の研究では、活性酸素の生成がエネルギー代謝率とは一致しないという、これまでの老化、疾患のフリーラジカル説では説明できない結果を得た。この研究を通じて、酸化ストレスの原因には酸化ではなく、低酸素等に伴う還元が重要であるとの着想を得た。

本研究では、これまでのリアルタイムバイオラジオグラフィ法に酸素濃度とレドックス測定のマクロセンサを融合、低酸素-再酸素モデルを用いて、活性酸素の生成と組織酸素の関係を解析した。

2. 研究の目的

(1) 活性酸素の生成と組織酸素濃度計測を融合した装置の開発

従前の放射線と化学発光の複合計測に加えて、新たに組織酸素濃度の計測法を追加・融合させて、本イメージング法を発展させる。

(2) 供給性低酸素の再酸素過程における活性酸素の生成と組織酸素濃度の時間変化の解析研究

本研究は、組織に供給する酸素の低下に伴う低酸素の解除時(供給酸素供給低下-再開過程)の活性酸素の生成とその背景にある組織の酸素濃度を解析検討する。

(3) 需要性低酸素の再酸素過程における活性酸素の生成と組織酸素濃度の時間変化の解析研究

本研究は、活動亢進に伴う低酸素の解除時(活動-休止過程)の活性酸素の生成と組織酸素濃度を解析検討する。

3. 研究の方法

(1) 活性酸素の生成と組織酸素濃度計測を融合した装置の開発

化学発光と放射線計測の二次元実時間計測を行うことができる「リアルタイムバイオラジオグラフィ法」に酸素濃度測定のマクロセンサを融合した装置を開発した。

(2) 供給性低酸素の再酸素過程における活性酸素の生成と組織酸素濃度の時間変化の解析研究

供給性低酸素の実験は、計測中にチャンバ内の溶液に供給する気体のみ変更するバッチ方式で行った。作成した脳組織生スライスを無カルシウム溶液に浸け、酸素(95%O₂ + 5%CO₂)供給下、34℃に保った恒温槽で45分間加温した。プレインキュベーション終了後、脳組織生スライスを低カリウム溶液75mlが入ったアクリル製チャンバに配置した。この状態で低カリウム溶液に酸素(95%O₂ + 5%

CO₂)を供給し続け、計測を行った。計測は先端直径10μmの酸素センサを脳組織生スライス的大脑皮質に表面から200μm(脳組織生スライスの厚さ400μmの中心)までマニピュレータで挿入し行った。計測値の記録は、酸素センサ・レドックスセンサ共に、酸素(95%O₂ + 5%CO₂)供給下で120分間、供給している酸素を窒素(95%N₂ + 5%CO₂)に変更し、15分間、再び酸素を供給し120分間の計255分間を1分毎に行った。

(3) 需要性低酸素の再酸素過程における活性酸素の生成と組織酸素濃度の時間変化の解析研究

需要性低酸素の実験は、カリウム濃度の異なる2種類の溶液を時間ごとに置換するフロー方式で行った。低カリウム溶液と高カリウム溶液、それぞれ160mlを酸素(95%O₂ + 5%CO₂)供給下で、恒温槽で34℃に保った。チューブポンプを用いて低カリウム溶液を流速6ml/minで、アクリル製チャンバ内に還流・循環した。センサは脳組織生スライス的大脑皮質にスライス表面から200μmの位置に挿入した。酸素濃度の計測はセンサを挿入した状態で、低カリウム溶液下で45分間、チャンバの溶液を高カリウム溶液に置換して60分間、再び低カリウム溶液に置換して150分間行った。さらに、カリウム処理の濃度を段階的に変えることで、定常状態と再酸素時の活性酸素の生成量も解析した。

4. 研究成果

生体内の活性酸素種・フリーラジカルの主要な生成の場はミトコンドリアで、酸化リン酸化反応によるエネルギー産生の過程で、酸素分子の一部が反応性の高い活性酸素種となると考えられている。したがって、エネルギー代謝が亢進すれば、呼応して活性酸素種の生成も亢進すると一般には考えられる。本研究では、供給する酸素と低下させることによる低酸素と高カリウム処理により組織のエネルギー需要が亢進することによる低酸素とその後の再酸素下の組織スライスの活性酸素の生成と組織酸素濃度との関係を調べた。その結果、供給性低酸素と需要性低酸素いずれも再酸素過程において活性酸素の生成が亢進することを明らかになった(図1および2)。

生体組織は、生理的な状態においても活動-非活動を繰り返し、その都度、一種の低酸素と再酸素の状態が生じて考えられる。本研究結果は、血流が低下するような病的な低酸素の再酸素時に活性酸素の生成亢進が認められることを示す一方、活動亢進に伴う低酸素においてもその再酸素時にもその亢進が認められることを示唆した。

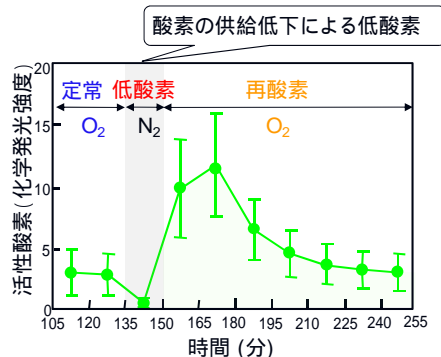


図1 虚血-再灌流(疾患モデル)における活性酸素生成の時間変化

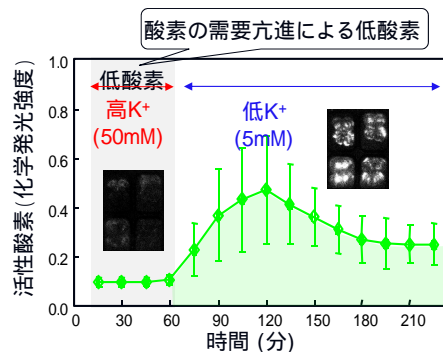


図2 エネルギー消費亢進-解除過程における活性酸素生成の時間変化

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Izuo N, Nojiri H, Uchiyama S, Noda Y, Kawakami S, Kojima S, Sasaki T, Shirasawa T, Shimizu T, Brain-specific superoxide dismutase 2 deficiency causes perinatal death with spongiform encephalopathy in mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article 査読有, ID 238914, 2015

Sasaki T, Mogi S, Kaneko T, Kojima H, Katoh S, Sano A, Kojima S, Relationship between tissue hydroxyl radical and oxidatively modified macromolecule levels. *Geriatr. Gerontol. Int.*, 査読有, Vol.14, No.2, 2014, pp.498-507

Sasaki T, Tahara S, Shinkai T, Kuramoto K, Matsumoto S, Yanabe M, Takagi S, Kondo H, Kaneko T, Lifespan extension in the spontaneous dwarf rat and enhanced resistance to hyperoxia-induced mortality. *Exp Gerontol.* 査読有, Vol. 48, No. 5, 2013, pp. 457-463

Sasaki T., Yamanaka, M., and Kagami, N., Superoxide generation in different brain regions of rats during normoxia and hypoxia-reoxygenation. *Neurosci. Res.*, 査読有, Vol. 74, No. 3-4, 2012, 261-268

[学会発表](計9件)

織田圭一、石井賢二、佐々木徹、豊原潤、坂田宗之、今林悦子、石渡喜一、地方独立行政法人東京都健康長寿医療センターの新し

い PET 施設の紹介、第 54 回放射線管理研修会、2013 年 11 月 14 日、鹿児島市民文化ホール(鹿児島県鹿児島市)

佐々木徹、織田圭一、石井賢二、工藤善朗、海野泰、横川直樹、山川通隆、一元管理と個別管理を併用した複合放射線施設の安全管理体制の構築、第 54 回放射線管理研修会、2013 年 11 月 14 日、鹿児島市民文化ホール(鹿児島県鹿児島市)

佐々木徹、遠藤玉夫、織田圭一、石井賢二、工藤善朗、海野泰、山川通隆、研究用および診療用放射性同位元素・放射線発生装置取扱施設の安全管理体制の構築~地独)東京都健康長寿医療センターの新放射線施設~, 第 50 回 アイソトープ・放射線 研究発表会、2013 年 7 月 4 日、東京大学弥生講堂(東京都文京区)

佐々木徹、新海正、田原正一、倉本和直、立川靖、田中秀昭、矢鍋誠、高木勝平、金子孝夫、近藤昊、自然発症矮小ラット体脂肪および骨の加齢変化の小動物用 X 線 CT を用いた解析、第 133 回日本薬学会、2013 年 3 月 30 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

佐々木徹、海野けい子、田原正一、金子孝夫、岩本明憲、坪井寿、加藤徹、工藤寛之、加沢エリト、渡辺恭良、組織内活性酸素イメージングと発生要因のダイナミズム解析技術開発、第 2 回 TOBIRA 研究フォーラム、2013 年 2 月 5 日、東工大田町キャンパス(東京都港区)

飯島遼平、茂木翔一、金子孝夫、小島遥、佐野明、小島周二、佐々木徹、マウス組織ヒドロキシルラジカルレベルの加齢変化と酸化修飾マーカーとの比較、第 35 回日本基礎老化学会、2012 年 7 月 26 日、東邦大学津田沼キャンパス(千葉県船橋市)

佐々木徹、山村文子、山中正史、加賀美信幸、茂木翔一、小島周二、活性酸素の生成とエネルギー代謝との関係、第 35 回日本基礎老化学会、2012 年 7 月 26 日、東邦大学津田沼キャンパス(千葉県船橋市)

白川泰久、佐々木徹、宍戸知佳、丸山直記、東日本大震災直後の対応とその後の環境モニタリングに関する報告、エンライトニングセミナー、2012 年 7 月 12 日、東京理科大学森戸記念館(東京都新宿区)

白川泰久、佐々木徹、宍戸知佳、丸山直記、東日本大震災直後の対応とその後に起こったこと~地方独立行政法人東京都健康長寿医療センターにおける事例報告~, 第 49 回 アイソトープ放射線研究発表会、2012 年 7 月 10 日、東京大学弥生講堂(東京都文京区)

[図書](計1件)

The Senescence-Accelerated Mouse (SAM): Achievements and Future Directions. Unno K, Sasaki T, Takabayashi F, Hoshino M, Elsevier, 2013, pp.509-521

〔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

<http://www.kitasato-u.ac.jp/ahs/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 徹 (SASAKI, Toru)

北里大学・医療衛生学部・准教授

研究者番号：30158927

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：