

平成 27 年 6 月 27 日現在

機関番号：32305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700434

研究課題名(和文)ミトコンドリア酸化障害による酸化ストレス関連疾患の発症・悪化機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of oxidative stress-related disease mechanisms by oxidative damage of mitochondria

研究代表者

坂井 隆浩(Sakai, Takahiro)

高崎健康福祉大学・薬学部・助教

研究者番号：10418618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ミトコンドリア・OHによる酸化損傷がミトコンドリアの機能に及ぼす影響を明らかにするために、新規ミトコンドリア・OH標的抗酸化剤を開発してin vitroおよびin vivoにおける解析を行った。その結果、ミトコンドリア・OHは酸化ストレスの誘導に中心的な役割を担うことを見出した。さらに、ミトコンドリア・OHはミトコンドリア膜を酸化し、膜電位の低下を引き起こすことが明らかになった。これにより、ミトコンドリア融合不全および断片化の亢進し、機能低下が引き起こされた。

研究成果の概要(英文)：In this study, to elucidate the effects of oxidative damage caused by mitochondrial $\cdot\text{OH}$, we developed novel mitochondrial targeted antioxidant, and analyzed in vitro and in vivo. We found that mitochondria $\cdot\text{OH}$ plays a central role in the induction of oxidative stress. Mitochondrial $\cdot\text{OH}$ oxidized the mitochondrial membrane, and it caused a decrease in membrane potential, inhibition of fusion, increase of fragmentation, and dysfunction.

研究分野：実験動物学

キーワード：酸化ストレス 活性酸素 ミトコンドリア ヒドロキシラジカル 抗酸化剤

1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスは、細胞内における活性酸素種(ROS)の生成と消去のバランスが崩れ、ROS が過剰産生することによって生じる。ROS によって酸化損傷を受けた細胞は、機能不全を引き起こすと考えられている。近年、酸化ストレスは、老化の進行だけでなく、生活習慣病、神経変性疾患、がんなどの多くの疾患の発症、悪化に多大な影響を及ぼすことが明らかになってきた。生体内の90%以上のROSは、ミトコンドリアの電子伝達系において、酸化的リン酸化によるATP産生過程で生じる。ミトコンドリアで生成されるROSは、スーパーオキシド(O_2^-)を出発点に、過酸化水素(H_2O_2)、ヒドロキシラジカル($\cdot OH$)の3種類が順に生成される。 O_2^- と H_2O_2 は酸化力が弱くミトコンドリア膜を透過する一方で、 $\cdot OH$ は酸化力が強力で、ミトコンドリア膜を透過しない。また、 O_2^- と H_2O_2 はシグナル伝達因子として正の作用を示すが、 $\cdot OH$ はそのような報告がない。このことから、申請者は、ミトコンドリアで発生した $\cdot OH$ は、ミトコンドリアを酸化損傷する中心なROSであり、疾患の発症・悪化に多大な影響を及ぼすと考えた。しかしながら、これまでにミトコンドリア $\cdot OH$ だけを特異的に消去する方法が無いため、ミトコンドリア $\cdot OH$ がミトコンドリアの酸化損傷および酸化ストレス関連疾患の発症・悪化にどのように関与するのか不明瞭であった。

2. 研究の目的

本研究では、 $\cdot OH$ によるミトコンドリア酸化損傷が酸化ストレス関連疾患の発症・悪化にどのように関与するのか明らかにすることを目的とした。そのために、ミトコンドリア内の $\cdot OH$ を選択的に消去する新規ミトコンドリア $\cdot OH$ 標的抗酸化剤を開発する。さらに、開発した新規ミトコンドリア $\cdot OH$ 標的抗酸化剤を利用し、 $\cdot OH$ によるミトコンドリア酸化損傷が酸化ストレスに関連疾患に及ぼす影響を解明する。

3. 研究の方法

まず初めに、ミトコンドリア $\cdot OH$ だけに消去活性を持つ抗酸化剤を開発する。これを利用し、ミトコンドリア $\cdot OH$ が酸化損傷するミトコンドリア構成成分を同定する。これに加え、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 阻害薬 Antimycin A を用いることによって、ミトコンドリア ROS の誘導を行い、それに新規ミトコンドリア $\cdot OH$ 標的抗酸化剤を利用し、ミトコンドリア $\cdot OH$ による酸化損傷がミトコンドリア機能障害および酸化ストレスに及ぼす影響を解明する。

4. 研究成果

(1)ミトコンドリア $\cdot OH$ 標的抗酸化剤の開発：
新規抗酸化剤のリード化合物として天然の抗酸化物質であるアスコルビン酸を基

に、 $\cdot OH$ だけに強力な消去活性を有する新規 $\cdot OH$ 標的抗酸化剤を開発した。これに、膜電位依存的ミトコンドリア移行化合物である疎水性カチオン Triphenylphosphonium (TPP)を結合させることによって、ミトコンドリア $\cdot OH$ に特異的に消去活性を有する新規ミトコンドリア $\cdot OH$ 標的抗酸化剤を開発した。

新規ミトコンドリア $\cdot OH$ 標的抗酸化剤のROS消去活性は、 O_2^- および $\cdot OH$ はX-band ESR法、 H_2O_2 はDetection of Peroxidase Activity Assay Kitによって検討した。その結果、新規ミトコンドリア $\cdot OH$ 標的抗酸化剤は、 O_2^- および H_2O_2 には、消去活性を示さなかったが、 $\cdot OH$ には消去活性を示すことが明らかになった。

次に、マウス繊維芽細胞株 MC57G 細胞をミトコンドリア呼吸鎖複合体 阻害薬 Antimycin A で刺激し、ミトコンドリア ROS を誘導した後、新規ミトコンドリア $\cdot OH$ 標的抗酸化剤を加えることによって、*in vitro*における新規ミトコンドリア $\cdot OH$ 標的抗酸化剤のミトコンドリア内におけるROS消去活性を調べた。ROSおよびミトコンドリアの検出は、 O_2^- 、 H_2O_2 、 $\cdot OH$ およびミトコンドリアをそれぞれ特異的に標識する蛍光プローブと共焦点レーザー顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡イメージングソフトウェアを利用した。その結果、新規ミトコンドリア $\cdot OH$ 標的抗酸化剤は*in vitro*においても、ミトコンドリア内の O_2^- および H_2O_2 には消去活性は示さず、ミトコンドリア内の $\cdot OH$ だけに特異な消去活性を示した。

これに加え、新規ミトコンドリア $\cdot OH$ 標的抗酸化剤の細胞毒性試験を検討したところ、新規ミトコンドリア $\cdot OH$ 標的抗酸化剤には著しい細胞毒性が無いことが確認された。

以上のことから、我々が開発された新規ミトコンドリア $\cdot OH$ 標的抗酸化剤は、ミトコンドリア内の $\cdot OH$ だけに消去活性化を示し、さらに細胞毒性が無いことから、ミトコンドリア $\cdot OH$ によるミトコンドリア酸化損傷の影響を調べるために有用であることが示唆された。

(2) *In vitro*におけるミトコンドリア $\cdot OH$ がミトコンドリアの酸化損傷に及ぼす影響：

(1)の*in vitro*のROS実験条件に基づき、ミトコンドリア $\cdot OH$ が酸化損傷するミトコンドリア構成成分を明らかにするため、*in vitro*におけるミトコンドリアDNA、タンパク質および脂質成分の酸化状態を検討すると、Antimycin A 処理細胞に新規ミトコンドリア $\cdot OH$ 標的抗酸化剤を加えると、DNAおよびタンパク質の酸化は抑制できなかったが、唯一、脂質の酸化を抑制できることが分かった。このことから、ミトコンドリア $\cdot OH$ はミトコンドリア膜成分である脂質を特異的に酸化することが示唆された。ミトコンドリア脂質成分の大半を示すミトコンドリア膜を

損傷すると、ミトコンドリア膜電位が低下することが知られている。このことから、ミトコンドリア膜電位を測定すると、ミトコンドリア・OH によるミトコンドリア膜が酸化損傷することによって、ミトコンドリア膜電位が消失することが明らかになった。さらにミトコンドリア挙動解析から、膜電位が消失した後にミトコンドリアの断片化が亢進することが明らかになった。これに加え、ミトコンドリア融合を制御する OPA1 バリエーションを、抗 OPA-1 抗体を用いて検出を試みた。その結果、Antimycin A 処理細胞は、融合不全が生じた際のショートフォーム OPA1 (S-OPA1) が出現するバンドパターンを示した。しかしながら、これに新規ミトコンドリア・OH 標的抗酸化剤を加えると、OPA1 バリエーションのバンドパターンは、正常のミトコンドリアと同様のロングフォーム OPA1 (L-OPA1) が発現するラダー状のバンドパターンを示すことが明らかになった。これらの結果から、・OH によるミトコンドリア膜の酸化損傷による膜電位の低下は、ミトコンドリアの融合不全を引き起こし、ミトコンドリアの断片化を亢進することが示唆された。さらに、ミトコンドリア DNA のコピー数を指標にミトコンドリアを定量した結果、Antimycin A 処理細胞では、著しいミトコンドリアの減少が確認された。しかしながら、これに新規ミトコンドリア・OH 標的抗酸化剤を加えると、ミトコンドリアの減少が抑制されることが明らかになった。そのため、我々は、断片化ミトコンドリアが一連のミトコンドリア品質管理機構によって排除されていると考え、マイトファジーの誘導因子である Parkin のミトコンドリア移行を検討した。その結果、Antimycin A 処理細胞では、Parkin のミトコンドリア移行が亢進していたが、新規ミトコンドリア・OH 標的抗酸化剤を加えた Antimycin A 処理細胞では、Parkin のミトコンドリア移行が抑制されることが明らかとなった。以上のことから、ミトコンドリア・OH によって酸化損傷を受け、機能不全を引き起こしたミトコンドリアは、マイトファジーによって排除されることが示唆された。

(3) *In vivo* におけるミトコンドリア・OH がミトコンドリアの酸化損傷に及ぼす影響：

In vivo における新規ミトコンドリア・OH 標的抗酸化剤の効果を調べるために、Antimycin A をマウスに投与し、ミトコンドリア ROS を誘導した後、新規ミトコンドリア・OH 標的抗酸化剤の投与を行い、L-band ESR 法によって生体内酸化状態を検討した。その結果、ミトコンドリア ROS 誘導マウスで亢進した生体内酸化状態は、新規ミトコンドリア・OH 標的抗酸化剤を投与することによって著しく低下することが明らかになった。さらに、Keap1-Nrf2 システムに基づき酸化ストレスの誘導が起きるとルシフェラーゼが発現する酸化ストレス可視化トランスジェニック

(Tg)マウスを用い、ミトコンドリア・OH が酸化ストレスに及ぼす影響を *in vivo* イメージングによって検討した。その結果、ミトコンドリア ROS 誘導によって酸化ストレスが亢進したマウスに新規ミトコンドリア・OH 標的抗酸化剤を投与すると、酸化ストレスの亢進が著しく抑制された。これに加え、酸化ストレス可視化 Tg マウスから酸化ストレスが亢進していた臓器を同定し、生体試料 X-band ESR 法によって・OH を定量すると、Antimycin A によって生成されたミトコンドリア・OH は、新規ミトコンドリア・OH 標的抗酸化剤によって消去されることが明らかになった。また、これらの臓器の組織切片を作製し、ミトコンドリア構成成分の酸化状態を調べると、Antimycin A を投与したマウスではミトコンドリア DNA、タンパク質および脂質の酸化が亢進する一方で、新規ミトコンドリア・OH 標的抗酸化剤を投与したマウスでは、*in vitro* の結果と同様に、DNA およびタンパク質の酸化は抑制できなかったが、脂質の酸化を特異的に抑制することが明らかになった。さらに、これらの組織の OPA1 バリエーションのバンドパターンを調べると、Antimycin A を投与したマウスでは S-OPA1 が高発現するバンドパターンが見られたが、これに新規ミトコンドリア・OH 標的抗酸化剤を投与すると、L-OPA1 が高発現するラダー状のバンドパターンを示した。これに加え、Parkin のミトコンドリア移行においても、Antimycin A 処理を投与したマウスでは、Parkin のミトコンドリア移行が亢進していたが、新規ミトコンドリア・OH 標的抗酸化剤を加えたマウスでは、Parkin のミトコンドリア移行が抑制されていた。以上のことから、*in vivo* においても、ミトコンドリア・OH は、ミトコンドリアの脂質酸化を亢進し、これらのことから、*in vivo* においてもミトコンドリア・OH は酸化ストレスの中心的な役割を担い、ミトコンドリアの脂質を特異的に酸化することが明らかになった。

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1件)

竹部久美, 坂井隆浩, 今井 純: VEGF 系を標的とする分子標的薬. 群馬県薬剤師会会報, 2014, 148, 19-23.

〔学会発表〕(計5件)

平野和也, 今井純, 坂井隆浩, 八田慎一, 学校薬剤師の活動を想定した環境衛生実習, 日本薬学会大 134 回年会, 熊本, 3/27-30, 2015

坂井隆浩: 活性酸素の検出・評価と酸化ストレス, 群馬県第 24 回産学官交流出会いの場, 前橋, 3/10 2014

坂井隆浩, 高橋仁恵, 山本亮一, 宮下喜好,

宇井理生, 八田慎一: 生体試料からの活性酸素種検出と応用, 群馬県分析研究会第 38 回研究発表会, 前橋, 1/25 2013

坂井隆造, 高垣秀次, 設楽浩志, 米川博通, 宇井理生, 八田慎一: 酸化ストレスとミトコンドリア品質管理機構, 第 11 回生命科学研究会, 秋田, 6/29-30, 2012

坂井隆造, 高橋仁恵, 山本亮一, 宮下喜好, 宇井理生, 八田慎一: 新規抗酸化剤の開発と生物学的分析, 群馬県分析研究会第 37 回研究発表会, 前橋, 1/27, 2012

〔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:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.takasaki-u.ac.jp/faculty/yaku/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂井 隆造 (SAKAI TAKAHIRO)

高崎健康福祉大学・薬学部・薬学科・細胞生理化学研究室・助教

研究者番号: 10418618

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号: