

称号及び氏名	博士（獣医学） 笠原 恵美子
学位授与の日付	平成18年2月20日
論文名	「Dynamic Aspects of Antioxidant Metabolisms and Transport」 (生体内における抗酸化物質代謝と輸送の動的様相)
論文審査委員	主査 小森雅之 副査 中野長久 副査 津山伸吾 副査 竹中重雄

## 論文要旨

### 第1章 緒言

好気性生物は生命維持に大量のエネルギー（ATP）を必要とし、ヒトではそのために1日に約500 Lの酸素を代謝利用している。体内で消費される酸素の殆どはミトコンドリアの電子伝達系により最終的に $H_2O$ に代謝されるが、その数%は活性酸素種（ $^1O_2$ ,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ ）に代謝されている。生体内で必要以上の活性酸素が産生されると、脂質、たんぱく質、DNAなどと反応して細胞傷害やアポトーシスを誘起する。生体内にはこれに対抗する種々の抗酸化酵素や抗酸化物質が存在し、レドックス制御系を介して活性酸素代謝のバランスを維持している。生体内での酸化反応と抗酸化能のバランスが崩れて活性酸素が優位になる酸化ストレスは、生体の機能制御や病態発現に深く関与している。

生体内の抗酸化物質の多くは常に代謝回転により再生されて抗酸化能力を維持し続けている。血中のグルタチオン（GSH）濃度は臓器のそれに比べて2桁低いのが、肝腎を主とする臓器間サイクルにより代謝回転しているので、循環血液中へのGSH動員量は臓器内と同程度である。アスコルビン酸（AA）も同様に臓器間輸送と酸化還元サイクルにより循環血液中の濃度を一定に維持しているが、その動的様相は不明な点が多い。また、これらの水溶性抗酸化物質はビタミンE（VE）などの脂溶性抗酸化物質の還元再生にも利用され、生体内で抗酸化ネットワークを形成している。従って、生体内におけるこれら水溶性抗酸化物質の動的様相を知ることは、酸化ストレス病態を理解するうえで重要である。

本研究では、水溶性抗酸化物質であるGSHとAAに着目し、様々な酸化ストレス下におけるその動態と病態生理化学的意義を解析した。

## 第2章 グルタチオンとアスコルビン酸の共役作用

生体内ではグルタチオン（GSH）とアスコルビン酸（AA）が共役して抗酸化ネットワークを形成し、抗酸化機能を発揮している。GSHは自身が抗酸化能を発揮するのみでなく、AAの還元再生にも働いており、両者のネットワークは酸化ストレスに対する生体防御に重要である。

ラットやマウスなどと異なり、ヒトではAA合成能がない。本研究では、AA合成不能のODSラットを用い、生体内でのGSHとAAの動的相互作用を検討した。ODSラットをアスコルビン酸欠乏食で飼育 [ODS (-)] すると、約2週間で臓器中のAA濃度が著明に低下した。このとき、肝腎のGSH濃度には変化がみられなかった。GSH合成阻害剤（L-buthionine sulfoximine, BSO）を投与してGSH動員量を解析した結果、ODSラットでは肝ミトコンドリアと腎サイトゾルのGSH動員量が著明に増加していた。通常食で飼育したODS (+)ラットに比べ、アスコルビン酸欠乏食を与えたODS (-)ラットでは肝腎のGSH動員量が増加傾向を示した。一方、生体内GSHの低下は主に肝AAの *de novo* 合成を促進させるが、ODS (+)ラットではBSO投与によるGSHの低下に伴い肝のAAが著明に低下した。

以上のことより、AA欠乏状態では肝腎のGSH代謝回転が代償的に加速されること、及びGSH低下状態では細胞内AAが代償的に代謝亢進することにより、酸化ストレスから生体を防御していることが示唆された。

## 第3章 循環血液中におけるアスコルビン酸還元再生機構

AAはGSHやVEなどと共役して抗酸化代謝を制御しているが、その体内動態には不明な点が多い。AAはラジカル反応や酸化反応により、モノデヒドロアスコルビン酸（MDA）やデヒドロアスコルビン酸（DAA）に代謝される。このためAAを合成できないヒトなどでは、MDAやDAAからAAを還元再生するシステムが重要である。*in vitro* の実験系では、細胞外のDAAがグルコーストランスポーターを介して細胞内に取り込まれ、GSHやNADPH存在下でAAに還元再生されることにより細胞内のAAを高濃度に維持することが知られているが、生体内での挙動は不明である。本研究では、ラットの体外循環系を構築し、electron spin resonance (ESR) により循環血液中のアスコルビン酸ラジカルを経時的に検出するシステムを確立した。また、生体内でのAA還元再生機構を知る目的で、循環血中のAAを瞬時に酸化させる長時間循環型AA酸化酵素（PEG-AOase）を開発し、循環血中のAAおよびその酸化代謝産物の挙動を動力学的に解析した。

解析の結果、循環血中のAAは1 U/kgのPEG-AOaseを投与することにより

常時ラジカルに代謝されるが、驚くことにAAの血中濃度は一定に維持されていた。このとき臓器内のアスコルビン酸濃度は変化しないことより、循環血液中で酸化されたAAは驚異的な速度でAAに還元再生され、その濃度を一定に維持していることが示唆された。

腎臓はアスコルビン酸のろ過や再吸収などに関与する臓器であるが、腎臓摘出ラットにおいても、AAの還元再生能は維持されており、血中AA濃度の維持に腎臓の関与は少ないと考えられた。一方、BSO投与により肝腎のGSH濃度を低下させたラットでは、PEG-AOaseによる血中AAの酸化が加速された。これらのことより、循環血液中のAA還元再生機構には肝のGSHが重要であることが示唆された。

#### 第4章 高血圧と高脂血漿病態における内因性抗酸化物質動態

多くの動物では、肝腎をはじめとする臓器間GSH代謝輸送システムが存在し、細胞内外のレドックス状態を制御している。動脈硬化や高血圧などにおける血管の生理的機能変化や血管病態には活性酸素代謝の歪みに関与している可能性が考えられるが、その実体は不明な点が多い。各種病態における酸化ストレスの実体とレドックス制御機能の関与を知る目的で、自然発症高血圧ラット（SHR）及び高脂質血症家兔（WHHL）におけるGSHとAAの代謝動態を解析した。両動物の体内GSHレベルには変化がみられなかった。GSH合成阻害剤であるBSOを投与してGSH代謝回転動態を解析した結果、両病態動物（SHR, WHHL）では、GSHの代謝回転量がいずれも約50%低下している事が判明した。また、循環血中へのGSH動員量やAA代謝も低下しており、血流空間での酸化防御能の低下が示唆された。更に、SHRの高血圧はGSHの静脈内投与により改善されることより、循環血中へのGSH動員量の低下が高血圧に関与している可能性が示唆された。これらの結果から、高血圧や動脈硬化症においては、生体内のGSHやAAの代謝能力が低下し、両抗酸化物を有効利用できないことにより酸化ストレスが増強し、病態を増悪させている可能性が示唆された。

#### 第5章 内分泌攪乱物質による生殖細胞のアポトーシスと酸化ストレス

精巣は酸化ストレス、温度、炎症、放射線などのストレスに対して感受性が高い。酸化ストレスは生殖細胞の分化異常や機能低下を引き起こす重要な因子であるため、精巣にはGSHやAAなどの抗酸化物質が高濃度に存在している。

現代の生活環境は膨大な種類の合成化学物質により汚染されており、生殖細胞への影響が社会的に大きな問題となっている。プラスチック製のパッケージや医療器具などの可塑剤として汎用されているフタル酸ジエステル（DEHP）は、精巣萎縮や精子数の減少など、生殖組織に影響する内分泌攪乱物質の一つであるが、その作用機構は不明な点が多い。本研究では、DEHPによる精巣萎縮と酸化ストレスの関与を明らかにした。

ラットにDEHPを投与すると、生殖細胞がアポトーシスを起こして精巣が萎縮し、

成熟した精子が殆ど見られなくなった。酸化ストレスは種々の細胞でアポトーシスを誘起することから、これと本現象との関係を解析した。DEHP投与ラットの精巣内GSHとAA濃度はコントロール群に比べて有意に減少していた。また、酸化ストレスにより代償的に上昇してくる酵素であるglutathione peroxidase (GPx)やcatalase (CAT)の活性、及び酸化ストレスのマーカーである脂質過酸化物質 (TBARS) などが有意に上昇していた。L012を用いた化学発光法により精巣細胞の活性酸素産生動態を解析した結果、DEHP経口投与6時間後より $O_2^-$ や $H_2O_2$ などの産生が上昇していた。DEHPの代謝産物であるフタル酸モノエステル (MEHP) は精巣ミトコンドリアからチトクロームC遊離を強く促進しており、活性酸素によるミトコンドリア傷害がアポトーシス誘導に関与していることが示唆された。

以上の結果より、DEHPの加水分解産物であるMEHPが活性酸素代謝を介して精細胞系列のアポトーシスを特異的に誘起し、精巣萎縮に関与することが示唆された。

## 第6章 総括

抗酸化代謝系はネットワークを介して活性酸素代謝を制御し、酸化ストレスから生体を防御するのみならず、細胞のシグナル機能をレドックス制御している。従って、抗酸化代謝系による生命の制御機構を解明すると同時に、それを有効に制御することにより様々な疾患に対する新たな治療戦略を確立しうると考えられる。

## 審査結果の要旨

好気性生物の体内で消費される酸素の殆どはミトコンドリアの電子伝達系により最終的に $H_2O$ に代謝される。しかし、わずか数%の酸素は $O_2^-$ などの活性酸素種に変換され、生体内で様々な生体高分子と反応して細胞傷害やアポトーシスを誘起する。生体内にはこれに対抗する種々の抗酸化酵素や抗酸化物質が存在し、レドックス制御系を介して活性酸素代謝のバランスを維持している。生体内での酸化反応と抗酸化能のバランスが崩れて活性酸素が優位になる酸化ストレスは、生体の機能制御や病態発現に深く関与している。アスコルビン酸 (AA) はグルタチオン (GSH) と同様に肝腎を主とする臓器間輸送と酸化還元サイクルにより循環血液中の濃度を一定に維持しているが、その動的様相は不明な点が多い。また、これらの水溶性抗酸化物質とビタミンEなどの脂溶性抗酸化物質は生体内で抗酸化ネットワークを形成している。従って、生体内における水溶性抗酸化物質の動的様相を知ることは、酸化ストレス病態を理解するうえで重要である。本研究では、GSHとAAに着目し、様々な酸化ストレス下におけるその動態と病態生理化学的意義を解析し、以下のような成果を得た。

1. ヒトのように AA 合成能がない ODS ラットをアスコルビン酸欠乏食で約 2 週間飼育 [ODS(-)] すると、臓器中の AA 濃度が著明に低下したが、肝腎の GSH 濃度には変化がみられなかった。GSH 合成阻害剤 (L-buthionine sulfoximine, BSO) を投与して GSH 動員量を解析したところ、ODS ラットでは肝ミトコンドリアと腎サイトゾルの GSH 動員量が著明に増加していた。通常食で飼育した ODS(+)ラットに比べ、ODS(-)ラットでは肝腎の GSH 動員量が増加傾向を示した。また、コントロールラットでは生体内 GSH の低下は主に肝 AA の *de novo* 合成を促進させるが、ODS(+)ラットでは BSO 投与による GSH の低下に伴い肝の AA が著明に低下した。これらの結果より、AA 欠乏状態では肝腎の GSH 代謝回転が代償的に加速されること、及び GSH 低下状態では細胞内 AA が代償的に代謝亢進することにより、酸化ストレスから生体を防御していることが示唆された。
2. ラットの体外循環系を構築し、electron spin resonance により循環血液中のアスコルビン酸ラジカルを経時的に検出するシステムを確立した。また、生体内での AA 還元再生機構を知る目的で、循環血中の AA を瞬時に酸化させる長時間循環型 AA 酸化酵素 (PEG-AOase) を開発し、循環血中の AA およびその酸化代謝産物の挙動を動力学的に解析した。その結果、循環血中の AA は 1 U/kg の PEG-AOase を投与することにより常時ラジカルに代謝されるが、AA の血中濃度は一定に維持されていることが分かった。すなわち、循環血液中で酸化された AA は驚異的な速度で AA に還元再生され、その濃度を一定に維持していることが示唆された。また、腎臓摘出ラットにおいても、AA の還元再生能は維持されており、血中 AA 濃度の維持に腎臓の関与は少ないと考えられた。一方、BSO 投与により肝腎の GSH 濃度を低下させたラ

ットでは、PEG-AOase による血中 AA の酸化が加速された。これらの結果より、循環血液中の AA 還元再生機構には肝の GSH が重要であることが示唆された。

3. 各種病態における酸化ストレスの実体とレドックス制御機能の関与を調べるために、自然発症高血圧ラット (SHR) 及び高脂質血症家兎における GSH と AA の代謝動態を解析した。両動物の体内 GSH レベルには変化がみられなかった。両病態動物に BSO を投与して GSH 代謝回転動態を解析したところ、いずれも代謝回転量が約 50% 低下している事が判明した。また、循環血中への GSH 動員量や AA 代謝も低下しており、血流空間での酸化防御能の低下が示唆された。更に、SHR の高血圧は GSH の静脈内投与により改善されることより、循環血中への GSH 動員量の低下が高血圧に関与していると考えられた。これらの結果から、高血圧や動脈硬化症においては、生体内の GSH や AA の代謝能力が低下し、両抗酸化物を有効利用できないことにより酸化ストレスが増強し、病態を増悪させている可能性が示唆された。
4. ラットにフタル酸ジエステル (DEHP) を投与したところ、生殖細胞がアポトーシスを起こして精巣が萎縮し、成熟した精子が殆ど見られなくなった。DEHP 投与ラットの精巣内 GSH と AA 濃度はコントロール群に比べて有意に減少していた。また、酸化ストレスにより代償的に上昇してくる酵素である glutathione peroxidase や catalase の活性、及び酸化ストレスのマーカーである脂質過酸化物質などが有意に上昇していた。L012 を用いた化学発光法により精巣細胞の活性酸素産生動態を解析した結果、DEHP 経口投与 6 時間後より  $O_2^-$  や  $H_2O_2$  などの産生が上昇していた。DEHP の代謝産物であるフタル酸モノエステル (MEHP) は精巣ミトコンドリアからチトクローム C 遊離を強く促進しており、活性酸素によるミトコンドリア傷害がアポトーシス誘導に関与していることが示唆された。

以上のように本研究は、GSH と AA の共役作用により酸化ストレスから生体を防御していること、循環血液中の AA 還元再生機構には肝の GSH が重要であること、高血圧や動脈硬化症では酸化ストレスに対する両抗酸化物の防御能が低下していること、DEHP の加水分解産物である MEHP が活性酸素代謝を介して精細胞系列のアポトーシスを特異的に誘起し、精巣萎縮に関与することを示唆するものである。これらの成果は、人や動物医学に貢献するところが大きく、本論文の審査および学力確認の結果から、博士 (獣医学) の学位を授与することを適当と認める。