

酸化ストレスに対する生体の新たな 防御機構としてのビリルビンの機能の 解明とその栄養学的制御

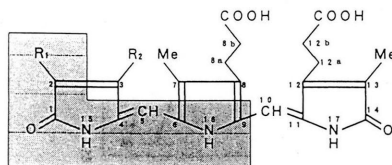
堀 尾 文 彦 (名古屋大学農学部助教授)

緒 言

生体内には様々な抗酸化物質あるいはフリーラジカスカベンジャーが存在し、生体あるいは細胞を活性酸素やフリーラジカルによる障害から防御している。この中には、必須栄養素(ビタミンC, ビタミンE, ビタミンA), 生体内で生合成される物質(グルタチオン, 尿酸など), 酵素(superoxide dismutase, catalase など)などがある。そして、それぞれが特有の性質を有し、特異的な局在をして、その機能を発揮していると推定される。しかし、上記の抗酸化物質においても生体内での抗酸化機能が明確に把握されているとはいえない。抗酸化物質の機能はin vitroでの追求が先走り、最も重要な生体内での機能についてはまだまだ解明されていかなければならないのが

現状であろう。

我々は、生体内のほとんど全ての細胞種で生合成されるビリルビン(BR)が生体内抗酸化物質として機能しているという新たな概念を推論し、この実証を試みている。BRが生体内に近い低酸素濃度下では、ビタミンEをしのぐ抗酸化能を有していることは以前より報告されている¹⁾。しかし、生体を用いた系では、その証明はなされていなかった。我々は、哺乳類の生涯において最も激しい酸化ストレス負荷と考えられる出生時においてBR性の黄疸がみられることに着目した。この現象は強力な酸化ストレスに対して、抗酸化能を有するBRの生合成を増加させた結果ではないかと推論した。すなわち、BR生合成系は酸化ストレスに対する生体防御系であり、BR自身は有効な生体内抗酸化物質ではないかと考えてい



Biotripyrrin-a (X1): $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = -\overset{a}{\text{C}}\text{H}=\overset{b}{\text{C}}\text{H}_2$

1, 14, 15, 17-Tetrahydro-2, 7, 13-trimethyl-1, 14-dioxo-3-vinyl-16H-triopyrrin-8, 12-dipropionic acid

Biotripyrrin-b (X2): $R_1 = -\overset{a}{\text{C}}\text{H}=\overset{b}{\text{C}}\text{H}_2$, $R_2 = \text{Me}$

1, 14, 15, 17-Tetrahydro-3, 7, 13-trimethyl-1, 14-dioxo-2-vinyl-16H-triopyrrin-8, 12-dipropionic acid

図1 ビリルビン酸化分解物である biotripyrrin-a 及び -b の構造

る。BRはヘムより生合成されるが、この律速酵素は heme oxygenase (HO) であり、その一つの isoform である HO-1 は酸化ストレス応答タンパク質であることが最近注目されている。そして、細胞内の酸化ストレスの負荷状態のマーカーともなっている。

近年、山口ら²⁾によってヒトの尿中に数種の BR 酸化分解物が存在していることが明らかにされた。そのうちの2種は、トリピロール構造を持ち、biotripyrrin-a と biotripyrrin-b と命名された。その構造を図1に示した。また、BR 分解物を認識する単クローン抗体も開発され、生体サンプル中での BR 分解物の定量が可能となった。

本研究では、第一に、酸化ストレスの一つと考えられるエンドトキシン投与を行った際における BR 酸化分解物の産生の変動と、BR 生合成系の変化を捕らえることにより生体内抗酸化物質としての BR の機能を探求した。第二に、BR 分解物の産生は生体内でのフリーラジカルと BR との反応の産物であると考え、BR 分解物の産生増加がフリーラジカルの産生によって引き起こされる疾患の発症の代謝的予知マーカーにならないかと

いう可能性について検討した。

I. 酸化ストレス負荷時の生体内抗酸化物質としてのBRの機能

<目的>

酸化ストレスの一つと考えられるエンドトキシン投与をラットに行うと、血中や各組織細胞内の活性酸素が増加すると考えられる。この時の尿中 BR 酸化分解物のレベルを測定することにより、BR の生体内抗酸化物質としての機能を推定した。さらに、我々³⁾が初めて栄養学実験に導入したビタミンC合成不能ラットを用いて、生体内抗酸化物質と考えらるビタミンCの摂取により BR 酸化分解物の産生が抑制されるかについても検討した⁴⁾。肝臓での BR 合成系の変動についても検討した⁴⁾。

<方法>

遺伝的にビタミンC (アスコルビン酸: AsA) 合成能を欠損した ODS-od/od (ODS) ラット (9週齢) を用いて、AsA 無添加飼料群 (AsA 欠乏群) と AsA 添加 (1,000mg/kg) 飼料群 (AsA 摂取群) をもうけた。ODSラットにおいて、外見上は AsA 欠乏症状の見られない14日間飼育の

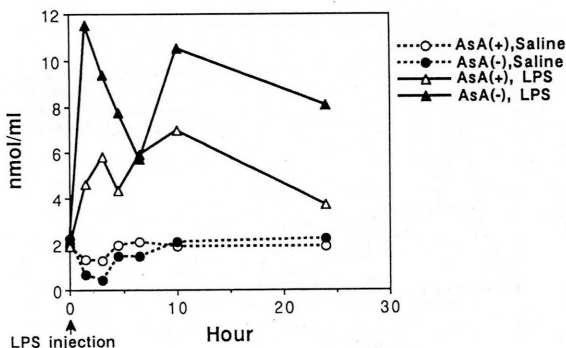


図2 LPS投与後の尿中ビリルビン酸化分解物レベルの変動。
AsA(+)はアスコルビン酸摂取群、AsA(-)はアスコルビン酸欠乏群。
LPSはLPS投与群、salineは生理食塩水投与群。

後、両群の中にエンドトキシン (lipopolysaccharide: LPS) を腹腔内投与 (1mg/kg体重) する群と生理食塩水を投与する群 (対照群) をもうけた。これらの投与後、3, 5, 7.5, 14, 24時間後にラットを屠殺した。この間、各群のラットの尿を経時的に採取し、そのBR酸化分解物のレベルを特異抗体 (mAb 24G7) を用いたELISA²⁾によって測定した。

<結果及び考察>

図2にLPS投与後の尿中BRレベルの経時的变化を示した。AsA欠乏群にLPS投与を行うと、尿中BR酸化分解物レベルの二峰性の著しい上昇が観察された。この上昇はAsAの摂取により顕著に抑制された。これらの結果は、酸化的ストレスの負荷により生体内でBRの酸化的分解が促進し、その酸化分解は生体内抗酸化物質であるAsAの摂取により抑制されることが明らかとなった。BRは生体内で酸化的ストレスの負荷により酸化的分解が促進されることが初めて示された。さらに解析を進め、尿中のBR分解物を分離したところ、ラットの尿中にもヒトの尿中に存在するbiotripyrrin-a及び-bが存在することが明らかとなり、それらはLPSの投与により増加し、AsA

の摂取によりその増加が抑制されることが明らかとなった。

BR生合成の律速酵素であり、酸化的ストレスの負荷によりその発現が誘導されるHO-1の肝臓での発現の変動を解析した。図3に示すように、AsA欠乏群ではLPS投与によりHO-1 mRNAレベルは急激に上昇した。この上昇もまた、AsAの摂取により明らかに抑制された。mRNAレベルで観察された各群の変動は、HO-1タンパク量及びその活性のレベルでも同様に観察された。これらの結果は、BR生合成系は酸化的ストレスの負荷に対応して惹起される経路であり、その結果生合成されたBRは生体内抗酸化物質として機能することが推測された。そして、この経路の誘導はAsAの摂取により抑制されることも明らかとなった。

本研究により、BRが酸化的ストレス負荷時に生体内抗酸化物質として機能している可能性が初めて示され、AsAという水溶性生体内抗酸化物質と協調して機能していることが示された。

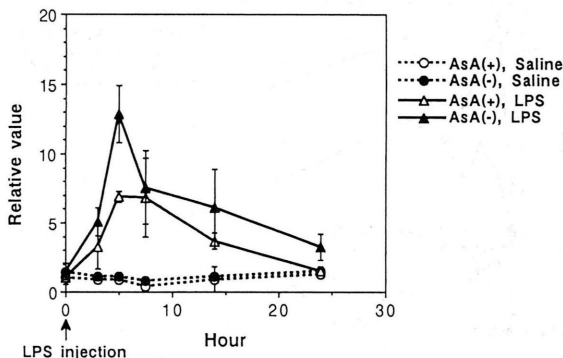


図3 LPS投与後の肝臓home oxygenase-1 mRNAレベルの変動。
各群の表示は図2と同じ。

II. 自己免疫疾患であるインスリン依存性糖尿病の発症の予知マーカーとしての尿中B R分解物の上昇

<目 的>

インスリン依存性糖尿病モデルマウスであるNODマウスの発症過程における膵ラ氏島細胞の破壊は、ラ氏島細胞内に活性酸素種や酸化窒素が増加することにより起こることが推定されている。このような機構で引き起こされる膵ラ氏島の破壊は、リンパ球系細胞の浸潤を伴い、これは膵島炎 (insulinitis) と呼ばれている。我々はNODマウスにsuperoxide dismutaseやcatalaseを投与すると膵島炎の進行が抑制されることを報告し⁵⁾、このことも上記の仮説を支持している。一方、我々はビリルビン (B R) が生体内で活性酸素をはじめとするフリーラジカルのスカベンジャーとして機能していると考えている。本研究では、NODマウスの膵ラ氏島破壊の過程においてこのB R分解物の産生増加が起こるのではないかと考え、尿中のB R分解物濃度を指標にして検討した。そ

して、尿中B R分解物の濃度の上昇がNODマウスの高血糖発症の予知マーカーとして役立つのではないかと考えて実験を行った。

<方 法>

実験動物

雌のNODマウス12匹を市販固形飼料 (日本農産工業: MR13) にて飼育し、6週齢から27週齢まで毎週1回の採尿と摂食時血糖値の測定を行った。対照系統として、C3HマウスとICRマウスを用いて同様の測定を行った。

膵ラ氏島の単離

雌のddyマウスを用いて、コラゲナーゼ法による膵ラ氏島の単離を行い、10% FCS 含有RPMI 1640培地で1日培養後、無血清培地に交換して実験を行った。

BR分解物の定量

B R分解物を認識するmAb 24G7²⁾を用いたELISAにより、マウス尿中及び培地中のB R分解物を定量した。尿中B R分解物レベルは尿中クレアチニン濃度に対する相対値として表現した。

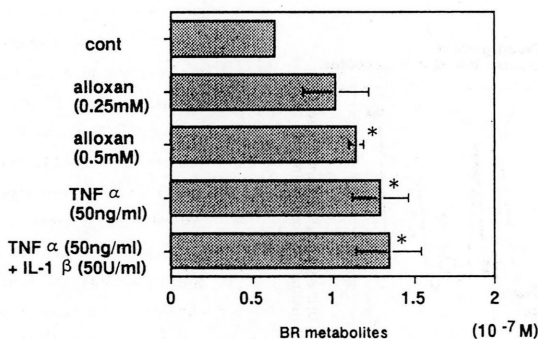


図4 ddyマウスより単離した膵臓ラ氏島の培地中のビリルビン分解物の濃度。alloxan (0.25mM, 0.50mM), TNF-α (50ng/ml), IL-1 (50units/ml) を培地に添加して、6時間培養した時の培地中のビリルビン分解物の濃度 (10⁻⁷M) を示した。

cont: 対象群

* : 対象群の値に対して有意 (危険率5%以下) に差があることを示す。

<結 果>

ddyマウスのラ氏島を培養すると、培地中にB R分解物が検出され、その量は経時的に24時間まで増加することが明らかとなった。培地中にalloxan (0.25 mM、0.5 mM)あるいは腫瘍壊死因子 (TNF- α) (50 ng/ml)を添加して培養(6時間)したところ、培地中のB R分解物量は増加した(図4)。

NODマウスの各個体における血糖値と尿中B R分解物レベルの経時変化を比較したところ、27週齢までの高血糖(200mg glucose/100dl serum 以上)の発症の有無にかかわらず、9週齢から16週齢の間にほとんどの個体において尿中B R分解物レベルの上昇が観察された。そして、その上昇は高血糖の発症に先行して現れた。その一例を図5に示した。対照系統であるC3HマウスおよびICRマウスにおいては、そのような9-16週齢に限った尿中B R分解物の上昇は観察されなかった。

<考 察>

単離腓ラ氏島の実験結果から、腓ラ氏島はB R分解物産生能を有することが明らかとなった。細

胞内に活性酸素を発生させるalloxanやTNF- α の処理によってB R分解物産生量は増加したことにより、B R分解物は細胞内B Rと活性酸素との反応によって生成されたものと推定された。

NODマウスの9週齢から16週齢は膵島炎が顕著に進行する時期と考えられ、本実験の結果において膵島炎の進行と尿中B R分解物濃度の上昇との間に相関性が示された。尿中B R分解物濃度の上昇は、腓ラ氏島細胞内でのフリーラジカルの増加を指し示しているものと考えている。

NODマウスにおける高血糖発症の予知マーカーとしての尿中B R分解物の妥当性を明らかにするためには、検体数をさらに増すことや血中の自己抗体のレベルの変動との比較が必要であると考えられた。

文 献

- 1) Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, et al: Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*, 235: 1043-1046(1987)
- 2) Yamaguchi T, Shioji I, Nakajima H, et al: Chemical structure of a new family of bile pigments from human urine. *J.Biochem.* 116: 298-303(1994)
- 3) Horio F, Ozaki K, Yoshida A, et al: Requirement for ascorbic acid in a rat mutant unable to synthesize ascorbic acid. *J.Nutr.*, 115: 1630-1640(1985)
- 4) Yamaguchi T, Horio F, Hashizume T, et al: Bilirubin is oxidized in rats treated with endotoxin and acts as a physiological antioxidant synergistically with ascorbic acid in vivo. *Biochem. Biophys.Res.Comm.*, 214: 11-19(1995)
- 5) Horio F, Fukuda M, Katoh H, et al: Reactive oxygen intermediates in autoimmune islet cell destruction of the NOD mouse induced by peritoneal exudate cells (rich in macrophages) but not T cells. *Diabetologia*, 37: 22-31(1994)

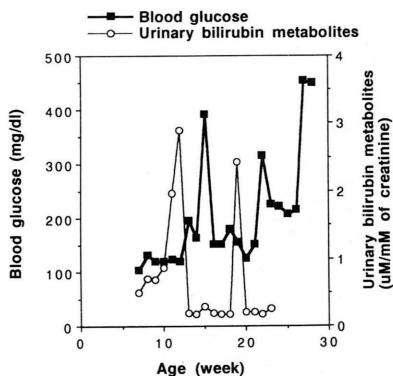


図5 Nonobese diabetic マウスにおける尿中ビリルビン分解物レベルと血糖値の経時変化。

The role of bilirubin as a physiological antioxidant against oxidative stress

Fumihiko Horio (School of Agricultural Sciences, Nagoya University)

Bilirubin (BR) is synthesized from heme, and has an activity to scavenge free radicals such as reactive oxygen species (ROS). Recently, BR oxidative metabolites (BOM) were isolated from human urine, and two of them were named as biotripyrrin-a and -b. In this study, (I) we investigated the physiological role of BR as an antioxidant against oxidative stress, and (II) we examined the possibility that BOM in urine could be a metabolic marker to predict the onset of disease that is caused by the production of ROS.

(I) The ODS rat that is a rat mutant with a hereditary defect in ascorbic acid (AsA) synthesis was intraperitoneally injected with lipopolysaccharide (LPS) whose treatment caused an oxidative stress. LPS treatment markedly increased BOM in urine, and this increase was significantly suppressed by feeding ascorbic acid. Hepatic heme oxygenase-1, which is a rate-limiting enzyme in bilirubin synthesis and is known as a protein induced by oxidative stress, was markedly induced by the LPS treatment. This induction was also suppressed by feeding ascorbic acid. These results indicated that BR acts as a physiological antioxidant synergistically with ascorbic acid against oxidative stress.

(II) Insulin-dependent diabetes (IDDM) is an autoimmune disease, and seems to be developed by the destruction of pancreatic islets caused by the production of intracellular ROS. Nonobese diabetic (NOD) mouse is a mouse model for IDDM. The increase of urinary BOM was observed in each NOD mouse between 9-week-old and 16-week-old before the development of hyperglycemia. This result suggests the possibility that the increase of BOM in urine is a metabolic marker for predicting the onset of IDDM.