

<平成24年度助成>

## クルクミンの抗老化作用の検討及びビタミンC不足が胎児の発生、成長、老化に及ぼす影響

石 神 昭 人

(東京都健康長寿医療センター研究所 老化制御研究チーム 分子老化制御)

### 緒 言

我々は、1991年、プロテオーム解析により、加齢に伴い肝臓や腎臓、肺で減少するタンパク質SMP30(日本名:加齢指標タンパク質30)を発見し、老化における重要性を明らかにしてきた<sup>1)</sup>。加齢に伴うSMP30の減少は生体機能の低下をもたらし、老年病、生活習慣病の発症リスクを高める。2005年、SMP30は哺乳類におけるビタミンC合成に必須な酵素、グルコノラクトナーゼ(GNL)であり、SMP30/GNL遺伝子を破壊したノックアウトマウスは体内でビタミンCを合成できず、このマウスをビタミンCの少ないエサ(マウスが1日に必要とするビタミンC量のわずか2.5%)で飼育したところ、ビタミンC不足状態が長期的に続くことと寿命が短くなること突き止めた<sup>2,3)</sup>。長期的なビタミンC不足による寿命短縮の原因が異常な活性酸素種の蓄積によるためか、他の原因かは明らかではない。ヒトは体内でビタミンCを合成できない。従って、このSMP30/GNL遺伝子破壊マウスは、ヒトに極めて近い老化促進モデル動物である。

本研究では、このSMP30/GNL遺伝子破壊マウスを用いて、妊娠期間中、母胎のビタミンC不足が胎児の発生や新生仔の成長に及ぼす影響を調べた。即ち、ビタミンCを合成できないSMP30/GNL遺伝子破壊マウスをビタミンC不足状態で交配し、母胎のビタミンC不足が胎児の発生・発達や出生後の新生仔への影響を病理学的、生化学的に解析した。また、高齢期からのク

ルクミンの摂取が抗老化、寿命の延長効果をもたらすかを検討した。即ち、高齢マウスにクルクミンを与え寿命の延長効果を調べた。

### 実験1 妊娠期間中、母胎のビタミンC不足が胎児の発生や新生児、小児の成長に及ぼす影響

「日本人の食事摂取基準(2010年版)」では新生児の壊血病を防ぐため、妊婦や授乳婦の付加量が設けられている。しかし、母体のビタミンC不足が胎児の発生や小児の成長に及ぼす影響を調べた報告は少ない。そこで、我々はビタミンCを体内で合成できないSMP30/GNL遺伝子欠損マウスを用いて、妊娠期間中、母体のビタミンC欠乏や不足が胎仔や新生仔の発達、成長に及ぼす影響を調べた。通常、マウスはヒトと異なり体内でビタミンCを合成できるため、ビタミンCの欠乏や不足状態を評価することができない。SMP30/GNL遺伝子欠損マウスは、ビタミンC生合成経路の最後から2番目の酵素、グルコノラクトナーゼ(GNL)遺伝子を人為的に破壊したため、ヒトと同様、ビタミンCを長期間摂取しないと、ビタミンC欠乏症である壊血病の症状を呈する<sup>3)</sup>。

はじめに、ビタミンCを十分に与えた(1.5g/LビタミンCを飲料水から自由摂取させた)雌と雄のSMP30/GNL遺伝子欠損マウスを交配し、膣栓の有無により妊娠を確認した。その後、雌マウスにビタミンCを十分に与える群[AA(+)]と全く与えない群[AA(-)]の2群に分けて妊娠の経過を観察した。その結果、妊娠期間中ビタミンCを全く与えなかったAA(-)群の雌マウスから

は、新生仔マウスが1匹も生まれてこなかった(図1)。一方、妊娠期間中ビタミンCを十分に与えた(1.5 g/L ビタミンCを飲料水から自由摂取させた)AA(+ )群の雌マウスからは、正常に新生仔マウスが生まれた(図1)。妊娠期間中、雌マウスの血中ビタミンC濃度を経時的に調べた結果、妊娠5日目のAA(- )群では、妊娠時のおよそ25%にまで血中ビタミンC濃度が低下し、出産予定日にあたる妊娠20日目には、血中ビタミンC濃度が枯渇状態であった(図2)。また、妊娠19日目に胎仔を摘出して観察したところ、AA(- )群の胎仔は既に死亡していた。

妊娠期間中、雌マウスのビタミンC欠乏は胎生致死となることがわかった。そこで、次に、妊娠期間中に少量のビタミンCを与え、妊娠期間中のビタミンC不足が胎仔や新生仔に及ぼす影響を調べた。予め雌のSMP30/GNL遺伝子欠損マウスを1か月間、1日必要量(7 mg)の2.5%のビ

タミンCを与えて飼育し、ビタミンC不足状態にした。次に、ビタミンCを十分に与えた(1.5 g/L ビタミンCを飲料水から自由摂取させた)雄のSMP30/GNL遺伝子欠損マウスと交配し、膣栓の有無により妊娠を確認した。その後、マウスが1日に必要とするビタミンC量の2.5%のビタミンC[AA(Low)]を与え、妊娠期間中のビタミンC不足が胎仔や新生仔に及ぼす影響を調べた(図3)。この量のビタミンCを与えた場合、壊血病の症状はみられない。妊娠確認時、AA(Low)群の血中ビタミンC濃度は、AA(+ )群の5%以下であり、妊娠20日目の血中ビタミンC濃度は、AA(+ )群のおよそ1%であった(図4)。AA(Low)群から生まれた新生仔マウスは、そのほとんどが出生後、数日以内に死亡した。死因を究明するため、出生後24時間以内の新生仔マウスから全身切片を作成し、病理学的解析を行った(図5)。その結果、AA(Low)群から生まれた新生仔

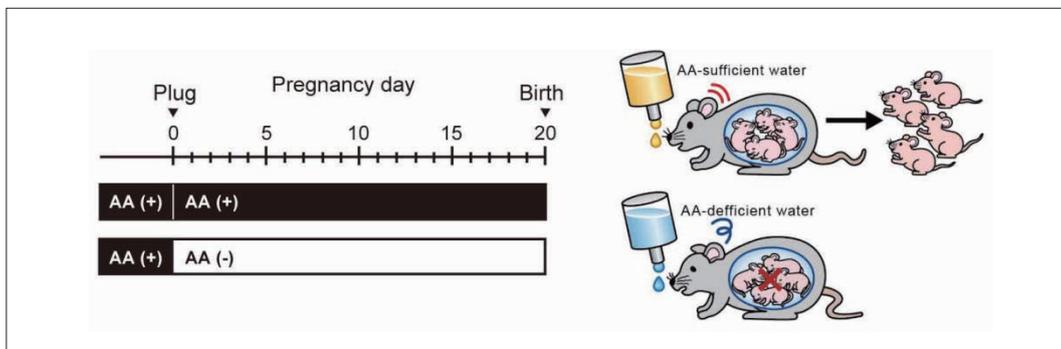


図1 妊娠期間中、母胎のビタミンC欠乏が胎仔の発生や新生仔に及ぼす影響

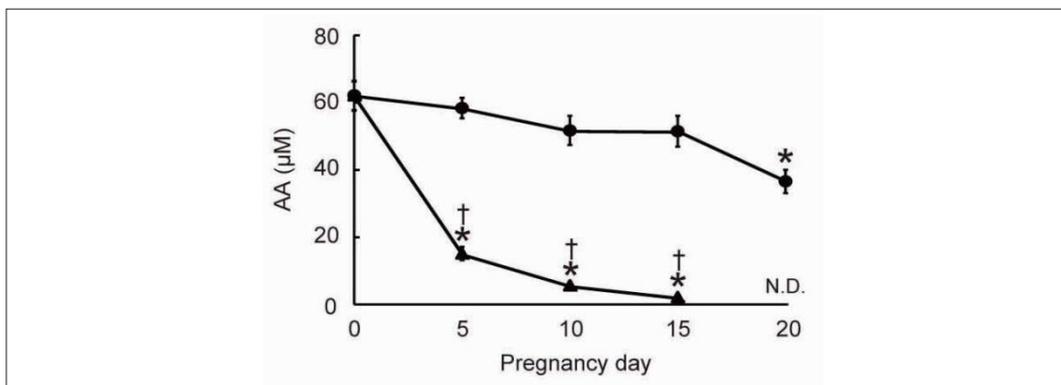


図2 ビタミンC欠乏による血中ビタミンC濃度の経時変化

ビタミンC欠乏条件に切り替えてから母体の血中ビタミンC濃度を経時的に調べた。  
 -●-, AA(+ )群、-▲-, AA(- )群。データは平均±標準誤差(各10 検体)を示す。  
 \* $p < 0.01$ , 妊娠0日目対妊娠5、10、15、20日目を比較した。† $p < 0.01$ ,  
 同日でのAA(+ )群対AA(- )群を比較した。N.D., 検出限界以下であった。

マウスは、AA (+) 群から生まれた新生仔マウスに比べて心臓の心室壁が菲薄化しており、心拡張が認められた(図6)。同時に、肝臓や肺で顕著なうっ血も認められた。これらの病理所見は、ヒトでの拡張型心筋症の所見とよく一致する。また、他の病理所見として、肺では肺胞が潰れ、骨形成の異常や無眼球症が認められた。直接的な死因ははっきりしないが、肺胞の萎縮による呼吸不全が原因ではないかと考えている。このように、妊娠

期間中、母体のビタミンC不足は、胎仔や新生仔に異常な心拡張を引き起こし、重篤な呼吸・循環障害を来すことがわかった。

**実験2 高齢期からのクルクミン投与による寿命延長効果の検討**

クルクミンの生理作用として①抗腫瘍作用、②抗酸化作用、③抗アミロイド作用、④抗炎症作用などが知られている。即ち、クルクミンは転写因子であるNF-κBの活性化を阻害すること

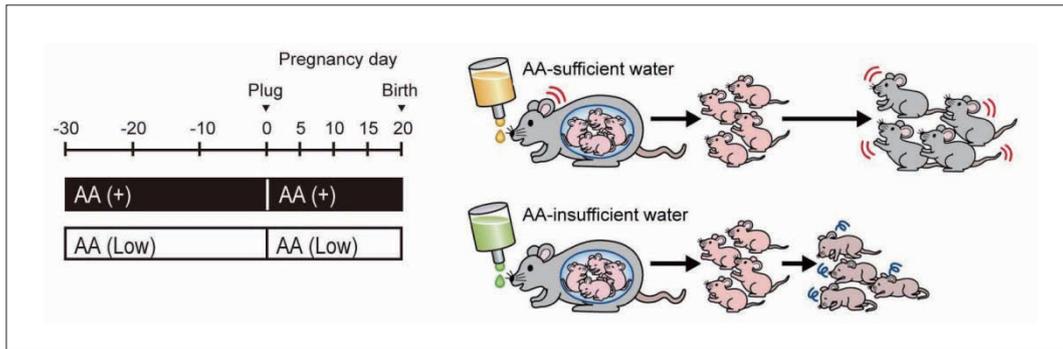


図3 妊娠期間中、母胎のビタミンC不足が胎仔の発生や新生仔の成長に及ぼす影響

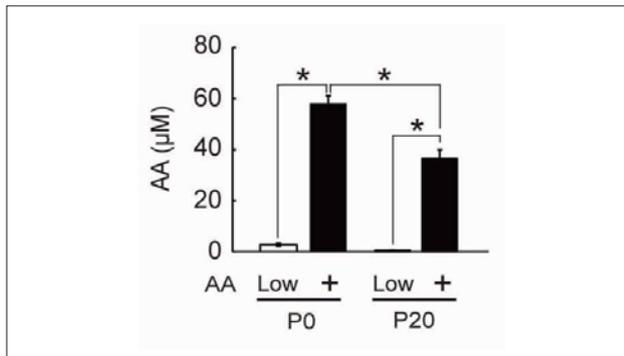


図4 ビタミンC不足による血中ビタミンC濃度の変化

ビタミンC不足条件で2カ月間飼育した時点で、血中ビタミンC濃度を測定した。比較対象には、ビタミンC十分条件で飼育したマウスの血中ビタミンC濃度を用いた。データは平均±標準誤差(各10検体)を示す。\* $p < 0.01$

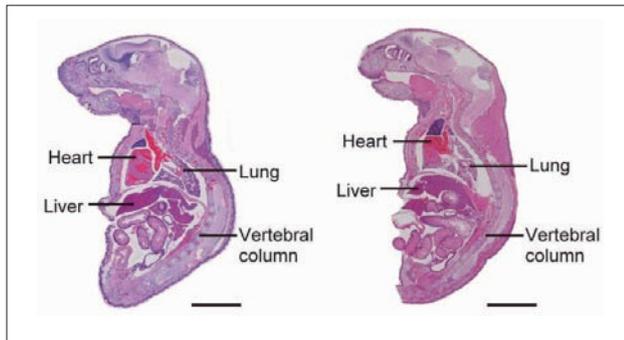


図5 新生仔の全身切片

新生仔は出生後24時間以内にホルマリン固定して全身切片を作製した。ビタミンC十分条件で産まれた新生仔(右)とビタミンC不足条件で産まれた新生仔(左)の全身切片を示す。

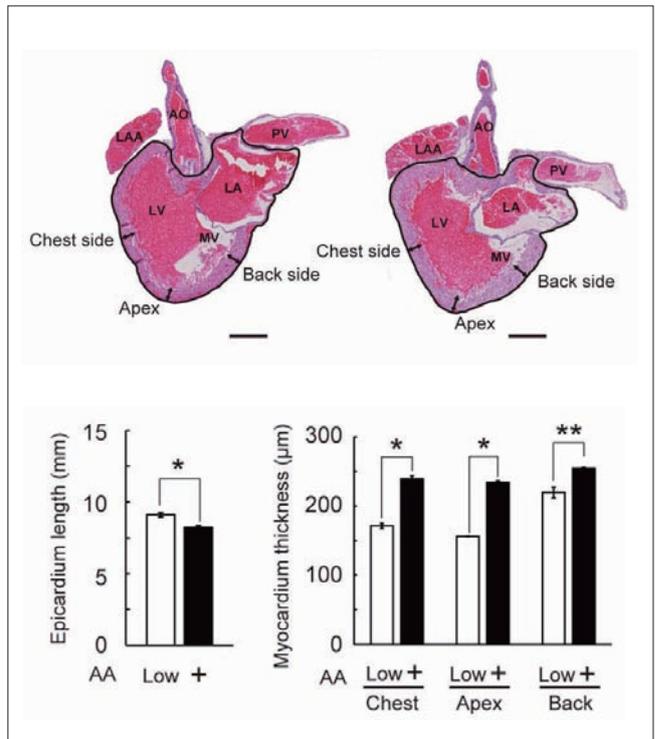


図6 心臓の形態観察及び心筋の厚さの計測

ビタミンC十分条件で産まれた新生仔の心臓(右上)とビタミンC不足条件で産まれた新生仔の心臓(左上)の病理切片を示す。切片深度を揃えたビタミンC十分条件で産まれた新生仔の心臓とビタミンC不足条件で産まれた新生仔の心臓の矢状断断面像を胸側、心尖部、および背側の3つの領域に分けた。それぞれの領域において画像解析ソフトで心筋の壁に対して垂線を引き、その長さを計測し、心筋の厚さとした。データは各10検体の平均値を示す。\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$

により、炎症や発がんを促進する誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) やシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) の合成を抑え、がんの発生を抑制する<sup>4-6)</sup>。また、クルクミンにはプロスタグランジン、ロイコトリエンやトロンボキサンなどのエイコサノイド合成を阻害するなど抗炎症作用がある<sup>7)</sup>。さらに、クルクミンは抗酸化作用を持ち、脂質の過酸化や活性酸素種による DNA 酸化傷害を防ぐ作用がある<sup>8,9)</sup>。抗アミロイド作用に関して、カリフォルニア大学 (UCLA) の研究グループは、アルツハイマー病モデルマウスを用いて、クルクミンが脳での  $\beta$  アミロイド蓄積を抑制し、老人斑を減少させることを報告した<sup>10)</sup>。このようにクルクミンの生理作用は多岐に渡る。本研究では、クルクミンの抗老化作用を検討するため、ヒトでの高齢者を想定し、高齢 (24 月齢) マウスにクルクミンを与え寿命の延長効果を調べた。

24 月齢の C57BL/6 マウス (♂) 30 匹をクルク

ミン群 (15 匹) とコントロール群 (15 匹) の 2 群に分けて飼育した (図 7)。クルクミン群にはクルクミン 0.2% 含有 CRF1 (オリエンタル酵母) を自由摂取させた。また、コントロール群にはクルクミンを含まない CRF1 を自由摂取させた。図 8 に示すように 24 月齢から 30 月齢の間で餌の摂食量や摂水量に両者で違いは認められなかった。また、マウスの体重も両者で違いは認められなかった (図 9)。さらに、30 月齢での肝臓と脳の重量を比較したが、有意な違いは認められなかった (図 10)。

次に、30 月齢でのクルクミン群とコントロール群の血液生化学検査を行った。その結果、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、総コレステロール (T-CHO)、中性脂肪 (TG)、LDL コレステロール (LDL-C)、HDL コレステロール (HDL-C)、血糖 (GLU) にクルクミン群とコン

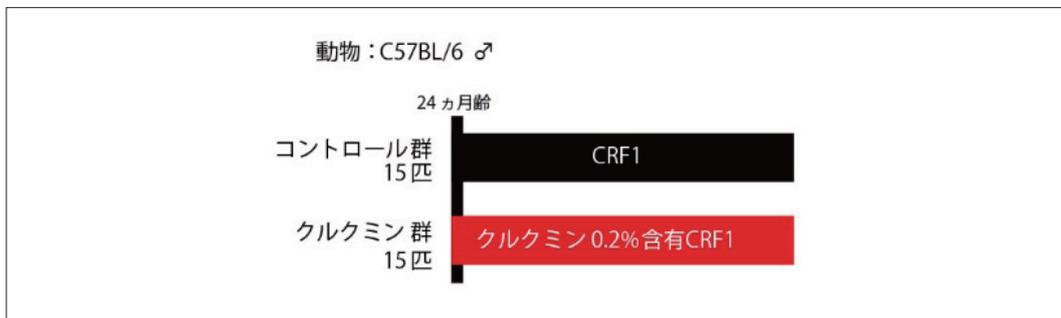


図 7 実験方法

24 月齢の C57BL/6 マウス (♂) をクルクミン群 (15 匹) とコントロール群 (15 匹) の 2 群に分けて飼育した。クルクミン群にはクルクミン 0.2% 含有 CRF1 (オリエンタル酵母) を自由摂取させ、コントロール群にはクルクミンを含まない CRF1 を自由摂取させた。

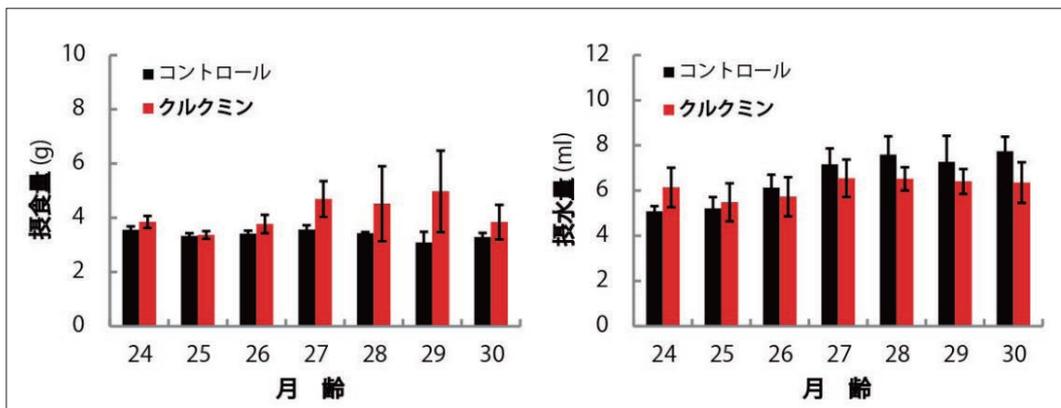


図 8 餌の摂食量と摂水量の比較

コントロール群で有意な違いは認められなかった(図11)。また、クルクミンの寿命延長効果を24月齢から30月齢の間で調べた。その結果、30月齢での生存率は両者共に33%で違いは認められなかった(図12)。しかし、コントロール群での50%生存率は、クルクミン群での50%生存率に比べて少しではあるが、長い傾向が認められた。今回の

実験では、マウスの匹数が十分ではないのと生存率が0%になるまで調べることができなかったため、クルクミン投与による寿命延長効果の有無を結論するまでには至らなかった。しかし、50%生存率が若干ではあるが延長する傾向がみられた。更なる検討が必要である。

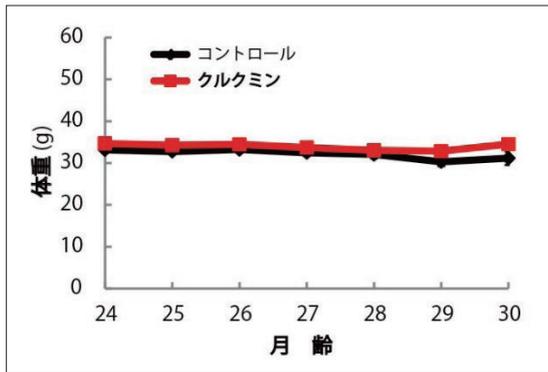


図9 体重変化

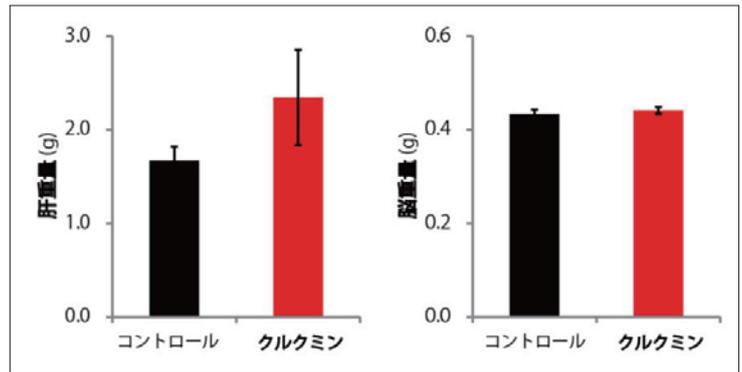


図10 30月齢での肝臓と脳の重量

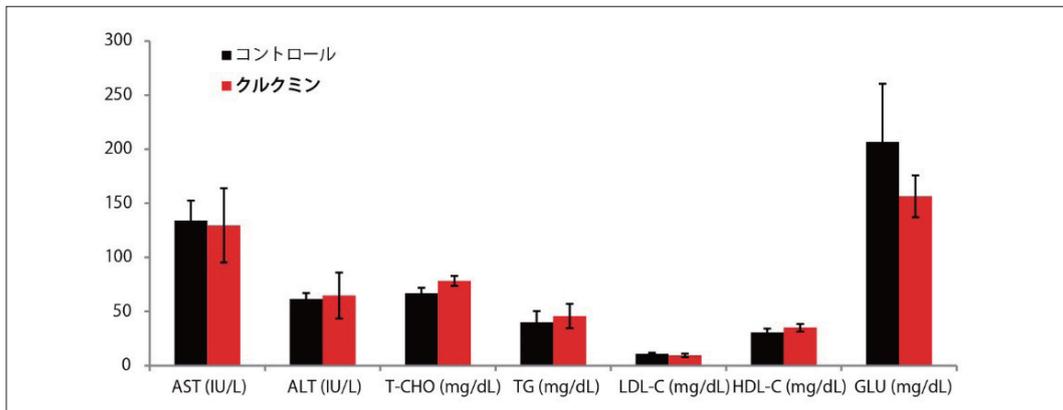


図11 30月齢でのマウス血漿の血液生化学検査

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、総コレステロール(T-CHO)、中性脂肪(TG)、LDL コレステロール(LDL-C)、HDL コレステロール(HDL-C)、血糖(GLU)

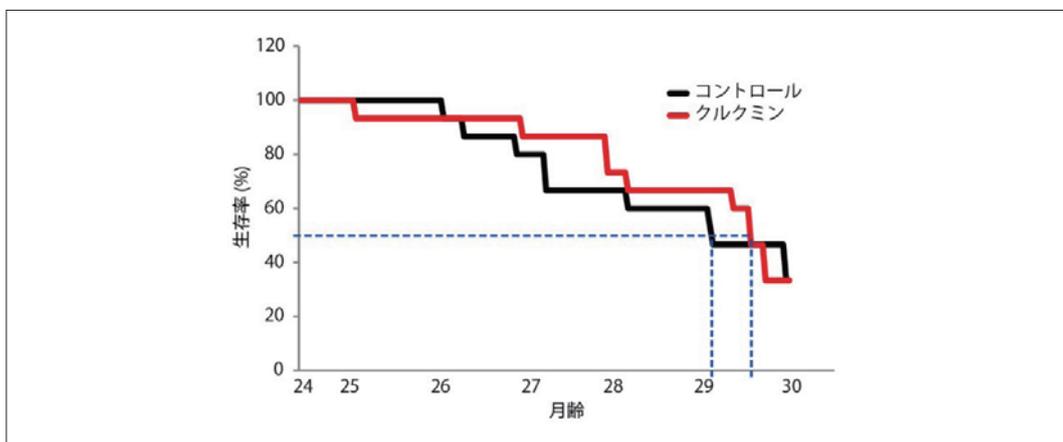


図12 クルクミンの寿命延長効果

マウスの生存率を24月齢から30月齢の間で調べた。

## 結 論

ビタミンCを体内で合成できない SMP30/GNL 遺伝子欠損マウスを用いた解析から、①妊娠期間中のビタミンC欠乏は胎生致死となる、②妊娠、出産時のビタミンC不足は新生仔に拡張型心筋症を招く可能性がある、ことなどが明らかになった。そのため、妊娠期間中、十分なビタミンCの摂取は、胎児や新生児の正常な発達、成長に必要な不可欠である。

また、高齢マウスを用いた解析から、高齢期からのクルクミンの摂取は、50%生存率を少し延長する可能性が示唆された。

## 謝 辞

本研究を実施するにあたり、研究助成を賜りました(公財)浦上食品・食文化振興財団ならびに関係各位の皆様にご心より感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Ishigami, A., Maruyama, N.: Significance of SMP30 in gerontology. *Geriatr. Gerontol. Int.* **7**: 316-325 (2007)
- 2) Ishigami, A., Kondo, Y., Nanba, R., Ohsawa, T., Handa, S., Kubo, S., Akita, M., Maruyama, N.: SMP30 deficiency in mice causes an accumulation of neutral lipids and phospholipids in the liver and shortens the life span. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**: 575-580 (2004)
- 3) Kondo, Y., Inai, Y., Sato, Y., Handa, S., Kubo, S., Shimokado, K., Goto, S., Nishikimi, M., Maruyama, N., Ishigami, A.: Senescence marker protein 30 functions as gluconolactonase in L-ascorbic acid biosynthesis, and its knockout mice are prone to scurvy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **103**: 5723-5728 (2006)
- 4) Bharti, A.C., Donato, N., Singh, S., Aggarwal, B.B.: Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor- $\kappa$ B and I $\kappa$ B $\alpha$  kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Blood* **101**: 1053-1062 (2003)
- 5) Deeb, D., Jiang, H., Gao, X., Hafner, M.S., Wong, H., Divine, G., Chapman, R.A., Dulchavsky, S.A., Gautam, S.C.: Curcumin sensitizes prostate cancer cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2L by inhibiting nuclear factor- $\kappa$ B through suppression of I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation. *Mol Cancer Ther* **3**: 803-812 (2004)
- 6) Mackenzie, G.G., Queisser, N., Wolfson, M.L., Fraga, C.G., Adamo, A.M., Oteiza, P.I.: Curcumin induces cell-arrest and apoptosis in association with the inhibition of constitutively active NF- $\kappa$ B and STAT3 pathways in Hodgkin's lymphoma cells. *Int J Cancer* **123**: 56-65 (2008)
- 7) Srivastava, K.C., Bordia, A., Verma, S.K.: Curcumin, a major component of food spice turmeric (*Curcuma longa*) inhibits aggregation and alters eicosanoid metabolism in human blood platelets. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **52**: 223-227 (1995)
- 8) Zhu, Y.G., Chen, X.C., Chen, Z.Z., Zeng, Y.Q., Shi, G.B., Su, Y.H., Peng, X.: Curcumin protects mitochondria from oxidative damage and attenuates apoptosis in cortical neurons. *Acta Pharmacol Sin* **25**: 1606-1612 (2004)
- 9) Srinivasan, M., Sudheer, A.R., Pillai, K.R., Kumar, P.R., Sudhakaran, P.R., Menon, V.P.: Modulatory effects of curcumin on  $\gamma$ -radiation-induced cellular damage in primary culture of isolated rat hepatocytes. *Environ Toxicol Pharmacol* **24**: 98-105 (2007)
- 11) Yang, F., Lim, G.P., Begum, A.N., Ubeda, O.J., Simmons, M.R., Ambegaokar, S.S., Chen, P.P., Kaye, R., Glabe, C.G., Frautschi, S.A., Cole, G.M.: Curcumin inhibits formation of amyloid  $\beta$  oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J Biol Chem* **280**: 5892-5901 (2005)

## Study of anti-aging effects of curcumin and the effects of a vitamin C's absence on embryonic and neonatal development during pregnancy

Akihito Ishigami

*Molecular Regulation of Aging, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology*

### Abstract

Vitamin C (L-ascorbic acid) is a water-soluble vitamin that functions as an electron donor to reduce the reactive oxygen species such as superoxide and hydroxyl radicals. Vitamin C is also a cofactor for numerous biosynthetic enzymes such as prolyl and lysyl hydroxylase for procollagen hydroxylation. Vitamin C is synthesized mainly in the liver of most mammalian species including mice and rats. However, humans, primates, and guinea pigs are unable to synthesize vitamin C *in vivo*. Vitamin C is thought to be required for the maintenance of pregnancy and fetal development. However, the effects of a vitamin C's absence on embryonic and neonatal development during pregnancy have not been determined. Therefore, we examined pregnant mice completely or partially deprived of vitamin C to test embryonic and neonatal development by using SMP30/GNL knockout mice which unable to synthesize vitamin C *in vivo*. As a result, we found that an absence or low intake of vitamin C during pregnancy induced multiple abnormalities in the developing tissues of SMP30/GNL knockout mice. Therefore, a diet that supplies an adequate amount of vitamin C is essential to provide optimal conditions for fetal and neonatal health.

We also examined anti-aging effects of curcumin by using elderly mouse. As a result, the intake of curcumin from old age showed the possibility to extend the 50% survival rate slightly.