

氏 名	戸 邊 隆 夫
国 籍 ・ 本 籍	愛知県
学 位 の 種 別	博士（薬学）
学 位 の 番 号	甲第280号
学位授与の日付	平成29年 3 月17日
学位授与の要件	名城大学学位規程第 3 条第 3 項該当
学位論文題目	セレノ ジグルタチオンの細胞毒性発現機構 に関する研究
論文審査委員	主 査 神 野 透 人 副 査 二 改 俊 章 副 査 井 藤 千 裕

論 文 内 容 の 要 旨

生命活動には様々な元素が必要とされる。水素、炭素、窒素、酸素などの生体分子の基盤となる主要元素、体液や骨の成分となるマグネシウムやリンなどの無機質からなる準主要元素のほかに、酵素やホルモンなどの構造や活性に欠かせない微量元素と呼ばれる一群がある。この微量元素の摂取は空腹や味覚などの知覚による制御ができず、環境や食事の影響を受けやすい。世界各地で欠乏あるいは過剰による健康被害の事例が報告されており、現在の富裕国においても多くの人々が潜在的な過不足状態にあると考えられている。セレンは、ヒトを含む動物にとっての必須微量元素としては最後に発見された元素である。当初より抗酸化酵素グルタチオンペルオキシダーゼの構成成分として見出されたことから、抗酸化作用に欠かせない元素として認識されている。一方で、セレンには無機および有機の両形態があり、その酸化数も-2 価から+6 価まで多様に変化するため、その化学型によっては抗酸化作用のみならず酸化的傷害にも関与する。また、旧来は毒性元素として知られていたセレンであるが、必須微量元素としての再発見につづき、近年は抗がんなどの薬理作用への期待が高まっている。実際にいくつかの研究において、セレンによるがん細胞選択的な増殖抑制作用が報告されているが、その機序の詳細は明らかになっていない。

以上の背景のもと、私はセレンの毒性あるいは薬理作用の基盤となる細胞障害性について、その分子メカニズムを、重要な生体内還元物質であるグルタチオンとの相互作用の観点から解明することを目的として本研究を実施した。それぞれの結果の概要、およびそれらより明らかになった知見

を以下に述べる。

セレン源として実験および臨床において一般に用いられる無機セレンである亜セレン酸は、生理的条件下においてチオールとトリスルフィド結合 (S-Se-S) を形成する。最も豊富な生体内チオールであるグルタチオンとの反応で生成するトリスルフィド体として、セレノジグルタチオン (SDG) が細胞抽出液や摘出腸管を用いた実験系で検出されている。そこで、本研究の目的であるセレンの毒性基盤を解明するための第一歩として、亜セレン酸および SDG の生体分子に対する酸化損傷活性について調べた。両セレン型とも、単独では DNA 鎖を切断しなかったが、グルタチオンを加えることにより同程度に DNA 鎖を切断した。システインなどの還元型チオールでも同様の作用がみられたのに対し、酸化型グルタチオンや NADH などの非チオール還元剤では効果がなかった。この DNA 鎖切断は過酸化水素やヒドロキシルラジカルの捕捉剤を用いることで抑制された。セレンによる DNA 損傷は、一般に活性酸素種 (ROS) による DNA 鎖切断に不可欠な遷移金属イオンを必要としなかった。また反応性に乏しい最終産物と考えられてきた金属セレンも、グルタチオンを加えることで DNA 鎖を切断した。これらの結果から、セレンの酸化的 DNA 損傷においてグルタチオンは、亜セレン酸の還元代謝、ROS の生成、金属セレンの再活性化など、SDG 形成を機軸としながら複数の段階において作用することが明らかとなった。

次に、ヒト培養細胞に対する亜セレン酸および SDG の細胞毒性について検討した。細胞としては、セレンは母乳の重要な微量成分であり、母乳代替食品の栄養強化剤の目的で亜セレン酸ナトリウムが食品添加物として使用されていること、母乳中のセレンの一部が SDG の化学形態で存在するという報告があることなどを考慮に入れて、ヒト乳がん由来細胞株 MCF-7 を用いた。その結果、亜セレン酸が細胞障害作用を示さない 3~10 μM の濃度範囲において、SDG は細胞生存率を濃度依存的に低下させ、アポトーシスによる細胞死を引き起こした。さらに、SDG 処理によって、ヒドロキシルラジカルによる酸化的 DNA 損傷の指標である 8-オキシデオキシグアノシン量が濃度依存的に増加したことから、細胞内に取り込まれた SDG と内因性のグルタチオンの反応で生じる ROS が SDG による細胞障害に関与していることが示唆された。

亜セレン酸は SDG と同様に還元型チオールの共存化で ROS を産生するにも関わらず、10 μM 以下の濃度では MCF-7 細胞に対する細胞障害性は認められなかった。このような亜セレン酸と SDG の間にみられる細胞障害性の顕著な差異の原因を特定する目的で、亜セレン酸および SDG で処理した MCF-7 細胞の細胞内セレン蓄積量を調べたところ、SDG 処理では濃度依存的に細胞内蓄積量が増加したのに対し、亜セレン酸処理では対照細胞と比較して統計的に有意な蓄積量の増加はみられなかった。これらの結果から、亜セレン酸と SDG の MCF-7 細胞に対する細胞障害性の違いは、取り込みあるいは排泄の差異に起因する可能性が示唆された。

そこで、MCF-7 細胞における SDG の細胞内取込機構について検討した。細胞外に還元型グルタチオンを共存させると、SDG 処理した MCF-7 細胞の細胞内セレン蓄積量が減少した。さらに、酸化型グルタチオンあるいはシステインの共存化でも同様にセレン蓄積量が減少することから、この現象は SDG の還元によるセレン化水素の生成によるものではなく、SDG の細胞内取込に対す

るグルタチオン輸送機構の関与を示唆するものであると考えられた。

酸化型グルタチオンは γ -グルタミルトランスフェラーゼおよびジペプチダーゼによりシスチンまで代謝されたのちに、シスチン/グルタミン酸トランスポーター (xCT) とよばれるアンチポーターを介して細胞内に取り込まれることが知られている。そこで、xCT の特異的阻害剤であるスルファサラジンで MCF-7 細胞を前処理したところ、細胞内セレン蓄積量は統計的に有意に低下した。さらに、siRNA を用いて xCT をノックダウンした場合にも、阻害剤による前処理と同様に顕著な蓄積量の低下がみられた。これらの結果から、SDG の細胞内取り込みに xCT が関与することが明らかとなった。

以上の研究によって、

1) 無機セレン化合物と還元型チオール化合物との反応によって生成する ROS が酸化的な DNA 損傷を引き起こすこと

2) グルタチオン存在下で、無機セレン化合物および SDG から生成するセレン化水素はヒドロキシラジカルの生成を触媒する。この際に生じる金属セレンがグルタチオンにより還元されてセレン化水素を再び生じ、この反応が触媒的に繰り返されることによってセレンの細胞障害性が増幅されること

3) 無機セレン化合物が細胞障害性を示さない濃度範囲において、SDG は核 DNA の酸化的損傷を引き起こし、アポトーシスの誘導によって細胞障害性を発現すること

4) このような細胞障害性における無機セレン化合物と SDG の違いは、主に細胞内への取り込みメカニズムの差異に起因し、後者は細胞膜表面に存在する γ -グルタミルトランスフェラーゼによってセレノジスチンに代謝され、これが xCT を介して細胞内に取り込まれることを明らかにした。

一部のがん細胞においては γ -グルタミルトランスフェラーゼおよび xCT 発現量の亢進が報告されており、本研究はセレン化合物による細胞障害性の分子基盤を与えるのみではなく、がん細胞に選択的なセレン含有抗がん剤の創製においても有用な知見を含むものである。

論文審査の結果の要旨

本論文は、必須微量元素であるセレンについて、生体内還元物質グルタチオン (GSH) との相互作用に着目して、その細胞毒性発現機構を明らかにしたものである。

第一章では、亜セレン酸および亜セレン酸と GSH の反応生成物であるセレノジグルタチオン (SDG) が還元型チオールとの共存下で活性酸素種 (ROS) を産生して酸化性的な DNA 損傷を引き起こすこと、ROS として、SDG の代謝過程で副生する過酸化水素から金属非依存的な Fenton 様反応で生じるヒドロキシラジカルが重要な役割を果たしていることを明らかにした。

第二章では、ヒト乳がん由来細胞株 MCF-7 を用いた実験から、亜セレン酸が細胞毒性を示さない濃度範囲において、SDG は核 DNA の酸化損傷を引き起こし、アポトーシスの誘導によって細胞毒性を発現することを明らかにした。また、このような亜セレン酸と SDG の細胞毒性強度の差異は、細胞内セレン蓄積量の違いによって説明できることを見出した。

第三章では SDG の細胞内取込み機構について研究を行い、特異的な阻害剤および siRNA を用いた実験により、SDG はまず細胞膜表面に存在する γ -グルタミルトランスフェラーゼおよびジペプチダーゼによってセレノジシステインに代謝され、これがシスチントランスポーターである xCT を介して細胞内に取り込まれることを明らかにした。

本論文は、セレン化合物による細胞毒性の分子基盤を与えるのみではなく、xCT 発現量の亢進したがん細胞選択的なセレン含有抗がん剤の創製においても有用な知見を含むものであり、学位論文としての条件を備えていると評価できる。従って、学位を授与することを妥当なものと判断する。