

学位論文題名

Weakened cellular scavenging activity
against oxidative stress in diabetes mellitus :
regulation of glutathione synthesis and efflux

(糖尿病患者における酸化ストレスに対する細胞性消去活性の低下 :
グルタチオンの合成と輸送の制御)

学位論文内容の要旨

I 研究目的

グルタチオン(GSH)は、ほとんどすべての細胞に存在し、代謝、輸送、細胞防御機構に重要な役割をはたしている。赤血球のGSHの主な役割は、低濃度の過酸化水素の解毒作用とヘモグロビンや酵素蛋白のSH基が酸化されるのを保護して機能維持に働くと考えられている。細胞内での高濃度GSH維持のために、合成系と細胞外への輸送機構の両方が重要である。輸送機構に関しては、酸化型グルタチオン(GSSG)のATP依存性の膜輸送機構が存在する。

また細胞にとって酸化ストレスの原因となる薬物などはグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)で、グルタチオンS-抱合体に解毒されるが分解機構がないために、ATP依存性の細胞外への輸送機構が存在している。糖尿病患者赤血球では細胞内GSH及びGSSGの膜輸送機構が低下してGSSG量が増加すると報告されている。細胞内でのS-抱合体の蓄積は重要な酵素活性を低下させ、発癌性などの細胞障害を引き起こすため、S-抱合体の輸送機構は細胞の防御機構上重要と考えられている。従ってヒト赤血球のS-抱合体の輸送機構の生理的意義を明らかにするために、GSH合成の律速酵素である γ -グルタミルシステイン合成酵素(γ -GCS)の発現調節とS-抱合体の輸送についてII型糖尿病患者赤血球と高濃度グルコースで培養した赤芽球系細胞(K562細胞)を用いて検討した。

II 対象と方法

北海道大学医学部附属病院第一内科通院中の未治療のII型糖尿病患者15名を対象とした。コントロールはage matchさせた正常人15名。糖尿病患者の平均年齢は57歳。臨床データは、空腹時血糖は平均220mg/dl。HbA_{1c}は平均10.5%で、罹病期間は1年から20年であった。

ここで次の項目を検討した。

(1) ヒト赤血球中のGSHはジチオビス安息香酸(DTNB)を基質としたenzyme-recycling法で求め、グルタチオン関連酵素のGST測定は1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン(CDNB)を基質として、またATP濃度はBeutlerの方法で測定。

- (2) ヒト赤血球のグルタチオンS-抱合体の輸送実験は、基質としてCDNBを添加し一時間インキュベーションして、細胞外へ輸送されるS-抱合体を測定。
- (3) ヒト赤血球を遠沈法にてreticulocyte-richグループとreticulocyte-poorグループに分けてS-抱合体輸送実験とグルタチオン関連酵素を測定。
- (4) 糖尿病患者赤血球のS-抱合体輸送活性の治療（経口血糖降下剤）による変化を測定。
- (5) K562細胞を高血糖（27mmol/l glucose）条件で7日間培養し [^3H] - glycineを加えCDNBを添加し、37°Cで1時間インキュベーションした後Dowex-1カラムにかけ、ギ酸で溶出したS-抱合体の輸送活性を測定。
- (6) γ -GCSに対する特異抗体を作製し、高血糖培養細胞の γ -GCSの発現をフローサイトメトリー法で測定。
- (7) 高濃度グルコースに糖化抑制剤アミノグアニジンを予め添加培養した細胞と γ -GCSの阻害剤ブチオニンスルホキシミン(BSO)を予め添加培養した細胞を用いて、S-抱合体の輸送実験と細胞毒性をMTTアッセイ法で測定。
- (8) ヒト胎盤のcDNAライブラリーよりヒト γ -GCSをクローニングして作製したcDNAをプローブとして、K562細胞を用いmRNAの発現をノーザンブロットで測定。

III 結 果

未治療の糖尿病患者赤血球のグルタチオンS-抱合体輸送活性は、正常者に比較して約70%に低下。またATP濃度とGST活性及び細胞内で合成されるS-抱合体の量は、糖尿病患者と正常者と差はなかったが、細胞内GSH濃度と γ -GCS活性は糖尿病患者で有意に低下していた。未治療糖尿病患者の治療効果の結果では、S-抱合体輸送活性はHbA_{1c}の改善につれて増加し、 γ -GCS活性とGSH濃度は上昇していた。患者赤血球のS-抱合体輸送活性は、HbA_{1c}と有意の負の相関を示した。

比重差を用いた老、若2群に分けた赤血球分画では、若い細胞のS-抱合体輸送活性と γ -GCS活性は、古い細胞に比較して上昇していた。

赤血球膜の反転小胞を用いたS-抱合体輸送実験では、老、若赤血球を問わず、糖尿病患者は正常者より低かった。高血糖培養細胞のGSH濃度は、グルコース濃度が増加するにつれて低下した。S-抱合体の輸送活性は、コントロールに比較し約70%に、また γ -GCS活性も同程度に低下した。

高血糖培養細胞では、 γ -GCSの免疫学的発現は、コントロールに比較し約190%に増え、また γ -GCS mRNAの発現は数時間で増加し72時間過ぎて低下した。また γ -GCS活性は徐々に低下し、 γ -GCSのタンパク量は72時間過ぎて増加した。

さらに高血糖培養細胞では、患者赤血球と同様に、GSH濃度、 γ -GCS活性は低下していた。細胞毒性に関しては、高血糖培養細胞にCDNBを添加した細胞の死滅率（IC₅₀値）は、コントロールに比較して有意に増加した。その死滅率の増加は γ -GCSの阻害剤のBSOやS-抱合体輸送系の阻害剤のSodium fluorideを加えても見られた。アミノグアニジンを高濃度グルコースに添加したK562細胞のS-抱合体輸送活性はコントロールとほぼ同じで、死滅率は高血糖培養細胞に比較して減少した。

IV 考察ならびに結語

高血糖は糖化や酸化などをひきおこし、酸化ストレスに対して防御機構が低

下し、細胞障害と糖尿病性合併症を引き起こすと考えられている。我々は今までに糖尿病患者赤血球や実験的糖尿病家兎の大動脈血管内皮細胞の抗酸化機構低下を報告してきた。しかしGSH代謝障害の病因論から見た意義はまだ十分明らかになっていない。今回我々は糖尿病におけるGSH代謝調節をヒト赤血球とK562細胞を用いて研究し、患者赤血球の γ -GCS活性とS-抱合体輸送活性は治療で改善することを見出した。GSH濃度と γ -GCS活性は共にHbA_{1c}と負の相関を示した。以上の変化は赤血球内に存在するcarbonic anhydraseやCu-Zn-SODの糖化による変化と同じと思われる。

γ -GCSの防御機構における重要性は、heat shock proteinの発現に似て、mRNAの発現が酸化ストレスに対して高い反応性を示すことからわかる。高血糖培養細胞では、 γ -GCS活性は徐々に低下したが、 γ -GCS mRNAの発現は顕著な増加を示し、また γ -GCSの免疫学的レベルは増加した。さらに γ -GCSは糖尿病状態で不活化され、 γ -GCS mRNA発現の障害は γ -GCS活性とGSH濃度低下を引き起こすと考えられる。糖尿病患者赤血球と高血糖培養細胞におけるS-抱合体輸送活性低下は、GSHの代謝障害によると考えられている。アミノグアニジンを高濃度グルコースに添加培養した細胞では、 γ -GCS活性とS-抱合体輸送活性は影響されなかった。この事実によって γ -GCSとS-抱合体輸送系のグルコースによる修飾が、酵素活性低下の要因の一つと考えられる。GSH合成とS-抱合体の輸送系は、糖尿病患者赤血球と高血糖培養細胞で障害される。 γ -GCS活性低下は酵素蛋白の不活化とmRNA発現の低下によると考えられる。高血糖培養細胞では、酸化ストレスに対する防御機構が低下し、障害された細胞が血管内を循環する際に内皮細胞に接触し、内皮細胞の機能を侵襲する様な相互作用が惹起され则认为している。したがって、糖尿病患者赤血球の研究は他の細胞にも当てはまると思われ、酸化ストレスに対する防御機構の低下は糖尿病性合併症の病因の研究に寄与すると考えている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 上 義 和

副 査 教 授 北 畠 顕

副 査 教 授 宮 崎 勝 巳

学 位 論 文 題 名

Weakened cellular scavenging activity
against oxidative stress in diabetes mellitus :
regulation of glutathione synthesis and efflux

(糖尿病患者における酸化ストレスに対する細胞性消去活性の低下：
グルタチオンの合成と輸送の制御)

目的：細胞にとって酸化ストレスの原因となる薬物などは、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)で、グルタチオンS-抱合体に解毒されるが、赤血球においてはS-抱合体の分解機構がないためATP依存性の膜輸送機構が存在している。細胞内でのS-抱合体の蓄積は重要な酵素活性を低下させ、発癌性などの細胞障害を引き起こすことが報告され、S-抱合体の輸送機構は細胞の防衛機構上重要と考えられているが、S-抱合体の代謝過程はまだ明らかにされていない。本論文は、ヒト赤血球におけるグルタチオンS-抱合体の輸送機構の生理的意義を明らかにするために、グルタチオン合成の律速酵素である γ -グルタミルシステイン合成酵素(γ -GCS)の発現調節とS-抱合体の膜輸送機構についてⅡ型糖尿病患者赤血球と高濃度グルコース(27mMグルコース)で培養した赤芽球系細胞(K562細胞)を用いて検討した。また高濃度グルコースに糖化抑制剤アミノグアニジンを加えた培養系を用いてグルタチオンS-抱合体の輸送実験と細胞毒性をMTTアッセイ法で検討した。

結果：糖尿病患者赤血球においてグルタチオン(GSH)量、 γ -グルタミルシステイン合成酵素(γ -GCS)活性、グルタチオンS-抱合体(GSH-S-抱合体)の細胞外への輸送活性の低下が認められた。高濃度グルコースで培養した赤芽球系細胞(K562細胞)においても、GSH量、 γ -GCS活性、GSH-S-抱合体輸送活性の低下が認められ、GSH-S-抱合体に対する細胞毒性が増加していた。また γ -GCSに関しては、mRNAの発現が一過性に増加し、蛋白量が増加していたにもかかわらず活性は低下していた。

高濃度グルコースに糖化抑制剤アミノグアニジンを加えた培養系では、GSH量、 γ -GCS活性、GSH-S-抱合体の輸送活性の低下並びに細胞毒性は改善した。

結論：高血糖状態ではグルタチオン合成とグルタチオンS-抱合体の輸送機構は障害され、赤血球が血管内で高い抗酸化能を有していることから、これら防御機構の低下は、糖尿病性合併症の進展に関連すると考えられた。この防御機構低下の原因は、合成酵素や膜輸送体の糖化によると推測された。

口答発表にあたり、宮崎教授よりS-抱合体の膜輸送体の調節因子について、北畠教授よりS-抱合体の輸送活性と治療の内容との関連について、それぞれ質問があった。申請者は概ね妥当に答えたと思う。

また、宮崎教授、北畠教授より個別に審査を受け、合格との御返事をいただいている。

これまでにグルタチオンS-抱合体の生理的意義は明らかにされておらず、S-抱合体の膜輸送機構の意義の重要性を示したことは、意義あるものと考えられ、よって本論文は博士（医学）に相当するものと認めた。