

論 文 要 旨

**Dehydroepiandrosterone increased oxidative stress
in a human cell line during differentiation**

〔ヒト由来細胞株の分化過程において Dehydroepiandrosterone は〕
細胞の酸化ストレスを亢進させる

出 雲 公 子

【背景および目的】

Dehydroepiandrosterone (DHEA) は副腎皮質から分泌され、種々のステロイドホルモンの前駆物質となる。血中の DHEA レベルは 25~30 歳にピークを迎え、その後加齢に従い減少するため老化の指標として注目されている。さらに補充による老化防止を謳いサプリメントとして広く販売・服用されている。しかし健康な人の服用については議論があり、また服用を中断したことによる影響については研究されていない。DHEA はペントースリン酸経路 (PPP) の律速酵素である Glucose 6 phosphate dehydrogenase (G6PD) の可逆的、非競合阻害剤である。PPP は活性酸素種の一つである superoxide (O_2^-) の産生、および細胞内の酸化還元状態を保つグルタチオンの還元に必要な、nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) の供給源である。DHEA には G6PD の阻害によって活性酸素種産生を減少させる、抗酸化剤としての効果も期待されている。しかし DHEA が酸化ストレスのメカニズムに与える影響について詳細な研究はされていない。ヒト白血病細胞株 HL60 は dimethylsulfoxide (DMSO) で好中球様細胞 (DMSO-HL60) に分化する。そして DMSO-HL60 は phorbol myristate acetate (PMA) 刺激により NADPH oxidase complex を形成し O_2^- を産生する。また分化過程で G6PD 活性が増加すると報告されている。本研究では O_2^- 産生能をもつ好中球様細胞に分化する、ヒト白血病細胞株 HL60 の分化過程における DHEA の影響について詳細な検討を行った。

【方 法】

DMSO で分化誘導した HL60 を対照群 (DMSO-HL60)、DHEA 存在下で分化誘導した HL60 を DHEA 群 (DMSO-HL60/DHEA) として実験を行った。分化誘導した細胞を洗浄した後、PMA 刺激時の O_2^- 産生量を測定した。また洗浄した細胞の溶解液を用いて、DHEA が活性阻害を示す G6PD、活性酸素種を消去する catalase、superoxide dismutase (SOD)、glutathione peroxidase (GPx) 活性を測定した。グルタチオンを還元する glutathione reductase (GR)、過酸化水素を基質としてより反応性の高い活性酸素種を産生する myeloperoxidase (MPO) の酵素活性も測定した。さらに G6PD と NADPH oxidase 構成タンパクである p47^{phox} のタンパク量を Western blot 法で定量した。分化誘導後洗浄した細胞について、代表的な酸化的 DNA 損傷である 8-oxo-deoxyguanosine (8-oxo-dG) レベルを PMA 刺激前後で、またグルタチオンの酸化還元状態

(GSH/GSSG) を過酸化水素の添加前後で、それぞれHPLCを用いて測定した。未洗浄の細胞からtotal RNAを抽出しcDNAを作成した後、G6PD、脂肪酸合成に関わるfatty acid synthase (FAS) とacetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1)、NADPH oxidase構成タンパクp47^{phox}・p67^{phox}・p22^{phox}・gp91^{phox}、抗酸化酵素のcatalaseのmRNA発現レベルをreal-time-PCRで測定した。O₂⁻産生量、G6PD活性、G6PDmRNAレベルについては各群内(DHEA存在下で分化誘導したDHEA群とDHEA非存在下で分化誘導した対照群)の分化誘導時の経時変化を追うとともに群間差を比較した。酵素活性並びにタンパク量、8-oxo-dGレベル、GSH/GSSG比は、O₂⁻産生量がピークに達する分化誘導5日後の細胞で、G6PD以外のmRNAレベルについては分化誘導3日後の細胞で群間差を比較した。

【結果】

O₂⁻産生量、G6PD活性、G6PD mRNA発現レベルは分化に伴い両群ともに上昇した。5日後のO₂⁻産生量とG6PD活性は有意に相関していた。分化誘導5日後のDMSO-HL60にDHEAを添加し測定したところ、O₂⁻産生量ならびにG6PD活性はともに顕著に低下した。DHEA群では対照群と比較して、O₂⁻産生量ならびにG6PD活性は4、5日後で有意に高く、G6PD mRNA発現レベルは2～5日後で有意に高かった。NADPH oxidase構成タンパクのmRNA発現レベルは、p47^{phox}、p67^{phox}、gp91^{phox}はDHEA群では対照群と比較して有意に高かった。p22^{phox}では有意差はなかった。p47^{phox}のタンパク量はDHEA群が対照群より増加傾向を呈したが有意差はなかった。8-oxo-dGレベルは、PMA刺激後の細胞で両群とも顕著に上昇し、そのレベルはDHEA群で有意に高かった。GSH/GSSG比は、過酸化水素負荷後の細胞で両群とも顕著に低下し、その比はDHEA群で有意に低かった。catalase活性とGR活性はDHEA群では対照群と比較して有意に高かった。SOD様活性とGPx活性には群間に有意差はなかった。MPO活性はDHEA群では対照群と比較して有意に活性が高かった。FASおよびACC1のmRNA発現レベルはDHEA群で有意に低く、catalaseのmRNA発現レベルは有意に高かった。

【結論及び考察】

DHEAはG6PDを阻害し活性酸素種の産生を抑制することが知られている。しかしDHEAをG6PDが誘導される状況下で作用させると、G6PDの遺伝子発現、タンパク量ともに増加し、分化誘導後洗浄しDHEAを除去した細胞のG6PD活性もDHEA群で高かった。またG6PDが律速酵素であるPPPによって供給されるNADPHを基質として活性酸素種を産生するNADPH oxidaseの各構成タンパクの遺伝子発現とタンパク量も、DHEA群で高値もしくは高値傾向を示した。これらに伴いDHEA群で活性酸素種産生能が上昇したと考えられる。この活性酸素種産生能の上昇が、PMA刺激後の細胞の酸化的DNA損傷を増大させたと考えられる。抗酸化酵素の活性は一部上昇したが過酸化水素負荷時の細胞内のGSH/GSSG比はむしろ低下しており、抗酸化能が高まったとは言えない。また反応性の低い過酸化水素から反応性の高いヒドロキシラジカルを産生するMPOの活性が上昇したこともGSH/GSSG比の低下をもたらした可能性が示唆される。抗酸化効果による抗老化を期待してDHEAを服用することが、目的とは逆に酸化ストレスを増大させる結果をもたらす可能性が示唆され、その効果や安全性、服用方法については今後詳細に検討する必要がある。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 73 号		学位申請者	出雲 公子
審査委員	主査	嶽崎 俊郎	学位	博士 (医学)・歯学・学術)
	副査	秋葉 澄伯	副査	金蔵 拓郎
	副査	河野 嘉文	副査	丸山 征郎

Dehydroepiandrosterone increased oxidative stress in a human cell line during differentiation

(ヒト由来細胞株の分化過程において Dehydroepiandrosterone は細胞の酸化ストレスを亢進させる)

Dehydroepiandrosterone (DHEA) は副腎皮質から分泌されるステロイドホルモンの前駆物質である。血中の DHEA レベルは加齢に従い減少するため補充による老化防止を謳いサプリメントとして広く販売・服用されているが、その効果については議論がある。DHEA はペントースリン酸経路 (PPP) の律速酵素である Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) の可逆的・非競合阻害剤で、PPP は活性酸素種の一つである superoxide (O_2^-) の産生に必要な NADPH の供給源であるため、DHEA には G6PD の阻害によって O_2^- 産生を減少させる抗酸化剤としての効果も期待されているが、DHEA が酸化ストレスに与える影響について詳細な研究はされていない。そこで学位申請者らは DHEA を、dimethylsulfoxide (DMSO) で O_2^- 産生能をもつ好中球様細胞に分化し分化過程で G6PD が誘導される、ヒト白血球細胞株 HL60 の分化誘導時に作用させ、DHEA の影響について詳細に検討した。DMSO で分化誘導した HL60 を対照群、DHEA 存在下で分化誘導した HL60 を DHEA 群として、 O_2^- 産生量、G6PD・myeloperoxidase (MPO)・抗酸化系の酵素の活性、G6PD のタンパク量、8-oxo-deoxyguanosine (8-oxo-dG) レベル、グルタチオンの酸化還元状態 (GSH/GSSG)、G6PD・fatty acid synthase (FAS)・acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1)・NADPH oxidase 構成タンパク・catalase の mRNA 発現レベルを測定した。

その結果、以下の知見が明らかになった。

- 1) DHEA 群では対照群と比較して、 O_2^- 産生量ならびに G6PD 活性・タンパク量・mRNA 発現レベルが有意に高く、 O_2^- 産生量と G6PD 活性は相関していた。
- 2) NADPH oxidase 構成タンパクの mRNA 発現レベルも一部 DHEA 群で有意に高かった。
- 3) 8-oxo-dG レベルは DHEA 群で有意に高く、GSH/GSSG 比は有意に低かった。
- 4) 抗酸化系酵素の活性の上昇は一部にとどまった。一方、MPO 活性は DHEA 群で有意に高かった。
- 5) FAS および ACC1 の mRNA 発現レベルは DHEA 群で有意に低く、catalase の mRNA 発現レベルは有意に高かった。

G6PD を阻害し O_2^- 産生を抑制する DHEA を、G6PD が誘導される分化誘導時に作用させるとむしろ G6PD の発現や活性が増加し、これらに伴い O_2^- 産生能が上昇し、酸化的 DNA 損傷を増大させたと考えられる。抗酸化能については高まったとは言えず、より反応性の高い活性酸素種を産生する MPO 活性の上昇により GSH/GSSG 比の低下した可能性が示唆される。抗酸化効果を期待して DHEA を服用することが、目的とは逆に酸化ストレスを増大させる結果をもたらす可能性が示唆された点で非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 73 号		学位申請者	出雲 公子
審査委員	主査	嶽崎 俊郎	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	秋葉 澄伯	副査	金蔵 拓郎
	副査	河野 嘉文	副査	丸山 征郎

主査および副査の5名は、平成21年8月21日、学位申請者 出雲 公子 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) HL60 を使用した理由は何か？

(回答) 今回は DHEA の酸化ストレスへの影響に焦点をあてたため、刺激により活性酸素種を産生する好中球様細胞に分化し、活性酸素種の研究によく用いられている HL60 を選択した。また DHEA が活性を阻害する G6PD が HL60 の分化過程で誘導されるため、本来誘導される酵素の活性が阻害された場合どのような影響が出現するかを明らかにしたかった。

質問2) Cell line を用いた実験結果は、*in vivo* での DHEA の効果や影響と異なるか？

(回答) 分化誘導するために DMSO を添加したため、自然に分化する好中球と異なり、DHEA 単独の影響ではなく DMSO との相互作用による影響が出現した可能性はある。

質問3) DHEA 100 μ M という濃度はヒト血中濃度よりかなり高いが、これまでに DHEA 投与による副作用の報告はあるのか？

(回答) 酸化ストレスとの関連を検討した文献中には、DHEA の副作用は報告されていなかった。推奨量以上の摂取で男性ホルモン作用によると思われる副作用の報告はある。

質問4) DHEA は G6PD 欠損症へ影響を及ぼすか？

(回答) 調べた文献中には見あたらなかった。

質問5) 好中球への分化の確認はどのようにしたか？

(回答) 今回は活性酸素種の産生能の獲得のみで確認したが、文献では今回の条件で分化誘導させた場合、HL60 が桿状核球や分葉核球に分化すると報告されている。

質問6) Fig.1 に示されている細胞増殖の抑制について、培地の pH の低下が原因ではないのか？

(回答) pH の変化は培地に含まれるフェノールレッドの色の変化で確認していたが、増殖に適さないほどの pH の低下は起こってなかったと考えられる。

質問7) NADPH oxidase complex の p47^{phox} について、ウエスタンブロットで検出した分子量はリン酸化による影響を受けていなかったか？

(回答) ウエスタンブロットのバンドは予想した所に泳動されていた。p47^{phox} は PMA 刺激等により NADPH oxidase complex を形成する際にリン酸化されるが、ウエスタンブロットの実験には刺激を行わない細胞を用いたため、リン酸化による分子量の変化はなかったと考えている。

最終試験の結果の要旨

質問 8) ホルモンが酵素と結合して阻害を示すことはめずらしいが、阻害の様式はわかっているのか？

(回答) DHEA が G6PD のどの部位と結合し、阻害するかは判っていない。

質問 9) 今回みられた現象は他の細胞でも起こりうると言えるのか？

(回答) 他の細胞による実験を行っていないので現時点ではわからないが、今後の研究として他の細胞への影響も検討してみたい。

質問 10) mRNA レベルの増加は、ホルモンによる mRNA の安定化によるものではないのか？

(回答) 転写への影響か、安定化によるものなのか確認はしていない。しかし測定した全ての mRNA が増加したのではないので、転写への影響によるのではないかと考えている。

質問 11) 生存率の減少はアポトーシスによるものか？

(回答) 細胞死は増加したが、アポトーシスによるものであるかは確認していない。

質問 12) DHEA の anti-oxidant と pro-oxidant 作用は容量に依存するという報告があるが、本研究の実験系ではどうか？

(回答) DHEA 50 μ M で予備実験をした際、活性酸素種産生能の亢進は 100 μ M のときほど大きくなかった。一方、PMA 刺激時に DHEA を添加した場合、anti-oxidant 作用は容量依存的に低下した。DHEA が分化のどの時点でどの程度作用したかによって、anti-oxidant 優位か pro-oxidant 優位かが変わる可能性がある。100 μ M 以上の濃度については実験していない。

質問 13) DHEA の効果に血清依存性はないのか？

(回答) 血清は HL60 の増殖に適したものを選んだ。DHEA の効果が血清のロットや濃度の影響を受けるかどうかについては検討を行わなかったため、判らない。

質問 14) DHEA とビタミン E やビタミン C との相互作用はどうか？

(回答) 本研究では検討していないので、相互作用があるかどうかは判らない。

質問 15) DHEA をサプリメントとして用いた場合の効果について、疫学的報告はないのか？

(回答) 骨密度等に改善が見られたという報告もあるが、144 名を対象とした二重盲検試験において有益な影響は見られなかったという報告もある。

質問 16) DHEA はステロイドの前駆体だが、前立腺がん患者へのリスクはあるのか？

(回答) 長期間あるいは大量の摂取が前立腺がんや乳がんなどのリスクを高める危険性が指摘されている。

質問 17) 今回見られた pro-oxidant 作用は分化時に何が変化したためと考えているか？

(回答) 今回の酸化ストレスの亢進は、DHEA による G6PD や NADPH oxidase complex 構成タンパクの発現増加並び myeloperoxidase 活性の増加が原因であると考えている。

質問 18) 転写活性への影響として、DHEA は Nrf2 へ影響を与えるか？

(回答) 今回は検討していないので判らない。

質問 19) 副腎腫瘍などで DHEA の産生が増えているという報告はないか？

(回答) 調べた文献中には見あたらなかった。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。