

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06617

研究課題名(和文) セレノール(SeH)を活性素子とする膜結合型抗酸化酵素の合成と細胞レスキュー効果

研究課題名(英文) Synthesis of selenol-bearing membrane-bound antioxidative enzyme and its rescue effect from cell death due to the GPx-4 knockdown

研究代表者

原武 衛 (HARATAKE, Mamoru)

崇城大学・薬学部・教授

研究者番号：40325668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：生体内において高い還元反応触媒活性を発現する抗酸化酵素グルタチオンペルオキシダーゼ-4(GPx-4)の擬似体の開発を目指して、GPx-4の触媒サイクルの中間体構造セレニルスルフィド(-Se-S-)を模倣した両親媒性化合物(OHSeP)を合成した。GPx-4の発現を抑制すると培養細胞はほとんど死滅した。しかし、GPx-4発現を抑制した培養細胞にリポソーム(脂質小胞)に再構成させたOHSePを細胞内へ導入すると、培養細胞は90%以上の生存率を示した。細胞内に導入されたOHSePは、GPx-4に代わって還元反応触媒活性を発揮し、それに基づいて“細胞レスキュー効果”を示すことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトは進化の過程において、呼吸によって不可避に生じる過酸化物を消去するためにセレン原子を利用する強力な還元能を獲得している。しかし、セレン原子の特性は未だ医薬品へは応用されていない。本研究で得られた成果は、セレン原子の比類なき特性を活かした医薬品開発を進めるための基礎的知見となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To obtain an effective glutathione peroxidase-4 (GPx-4) mimic under the physiological conditions, a lipid bilayer membrane-compatible selenenylsulfide derivative, 1-oxo-headecyl-seleno-L-cysteine-methyl-Se-yl-S-L-penicillamine methyl ester (OHSeP), was synthesized. The GPx-like catalytic activity of OHSeP in phosphatidylcholine (PC)-based colloidal liposomes was evaluated by the NADPH method using hydrogen peroxide as a substrate in physiological aqueous media. The OHSeP/PC liposomes preferably exerted in a GPx-like catalytic activity. A knockdown of the GPx-4 expression is lethal, since GPx-4 plays critical roles as a component of the antioxidant cell defense system. When siRNA-induced GPx-4 knockdown HepG2 cells were treated with the OHSeP/PC liposomes, the catalytic activity of OHSeP could successfully rescue from the cell death.

研究分野：衛生薬学

キーワード：セレノール グルタチオンペルオキシダーゼ セレン 抗酸化酵素

1. 研究開始当初の背景

ヒトは進化の過程で鉄やマンガン、セレンなどの元素を利用して、生体に対して有害な活性酸素・フリーラジカルを消去(無毒化)するための防御システムを創り出してきた。スーパーオキシドアニオンを消去するスーパーオキシドジスムターゼ、過酸化水素を消去するカタラーゼ、そして有機過酸化物の消去に威力を発揮するセレン含有グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)[GPx-1(細胞質型)およびGPx-2, GPx-3, GPx-4(細胞膜型), GPx-6]である。これらの酵素は、生体内の酸化還元バランスを維持することにより、がんを含めた活性酸素・フリーラジカルが関与する疾患の発症や進行を抑える中心的な働きを担っている。中でも、膜結合型リン脂質ヒドロペルオキシドGPx(GPx-4)は、生体膜に生じる過酸化脂質を直接還元できる唯一無二の酵素であり、その触媒機能は生命の発生・維持のためには最も重要かつ不可欠である。

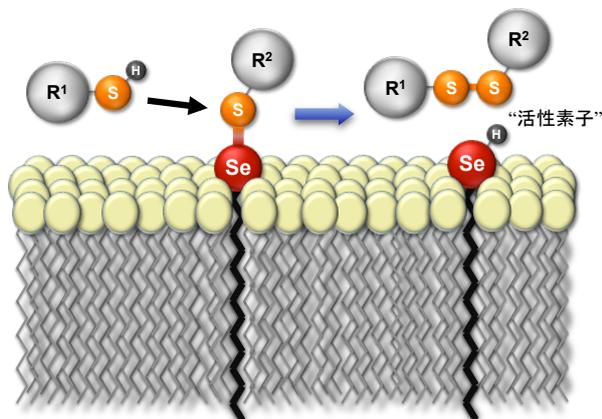
GPx-4の触媒活性は活性中心にあるセレンール(R-SeH)に基づいている。これまで天然型GPxの触媒機能の医薬への応用を目的として、多くの低分子性セレン含有GPx擬似体が合成されてきた。それらのほとんどは極難水溶性であり、天然型GPxと比較すると、水系溶媒中での触媒活性は著しく低いのが実状である。多くの研究報告は、GPx擬似体を医薬へ応用するためには、水への適度な溶解性が重要であることが指摘されていた。

2. 研究の目的

ヒトが進化の過程において、呼吸によって不可避に生じる過酸化物を消去するために獲得したセレン原子の強力な還元能は、未だ医薬へは応用されていない。本研究では、上述のような背景に基づいて、生体環境中でも高い触媒活性を発現することができるGPx-4様還元反応触媒の開発を目指した。

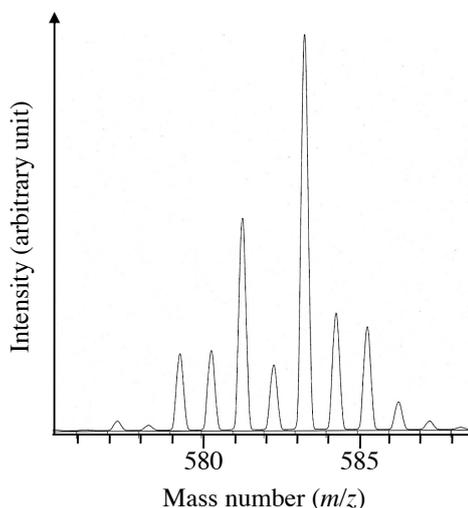
3. 研究の方法

本研究では、天然型GPxの触媒サイクルの中間体構造セレンニルスルフィド(-Se-S-)を模倣した両親媒性化合物1-oxo-hexadecyl-seleno-L-cysteine-methyl-Se-yl-S-L-penicillamine methyl ester (OHSeP)を合成した。次に、OHSeP分子をリン脂質二分子膜構造の中に配向させたOHSeP含有リポソームを調製した。続いて、インビトロにおいて、NADPH法により無機および有機過酸化物に対するOHSePのGPx-4様触媒活性などを測定した。さらに、GPx-4をノックダウンした培養細胞内へOHSePを導入し、OHSePによる細胞レスキュー効果を評価した。



4. 研究成果

(1) Seleno-L-cystinを出発物質としてOHSePを合成した。得られたOHSePは、セレン原子を一つ含む特徴的な質量分布を含んだ質量スペクトルを示した(右図)。また、X線光電子分光法による解析から、OHSeP分子のセレン原子および硫黄原子の酸化数はいずれも0価であり、所望の-Se-S-が形成されていることを確認した。さらに、¹H NMRやCHN元素分析などの分析結果も併せて、目的としたOHSePが合成されていることを確認した。



(2) OHSeP/PC(水素添加 egg phosphatidylcholine)混合リポソームおよびPCリポソームを合成した。リポソーム調製用のエクストルーダー(押し出し装置)を使って所望の形態・脂質組成を有するリポソームを調製するための手技・操作を確立した。リポソームの調製では、OHSePおよび飽和ア

シル鎖を有する PC を混合し、クロロホルムに溶解させた。有機溶媒を緩徐に留去し脂質薄膜を形成させ、ソニケーションによりリポソームを形成させた。さらに、エクストルーダー装置を使ってリポソームの形や大きさを調整した。OHSeP/PC 混合リポソームは、組成比の異なる 3 種類を調整した [OHSeP (XX)/PC (XX), 括弧内はそれぞれの混合モル%]。動的光散乱法により、得られた OHSeP/PC 混合リポソームの平均粒子径 (Mean particle diameter) が約 100 nm であることを検証した (右上表)。また、表面電位 (Zeta-potential) の測定結果から、OHSeP 分子がリポソームの外表面に配置されていることも検証された (右下表)。

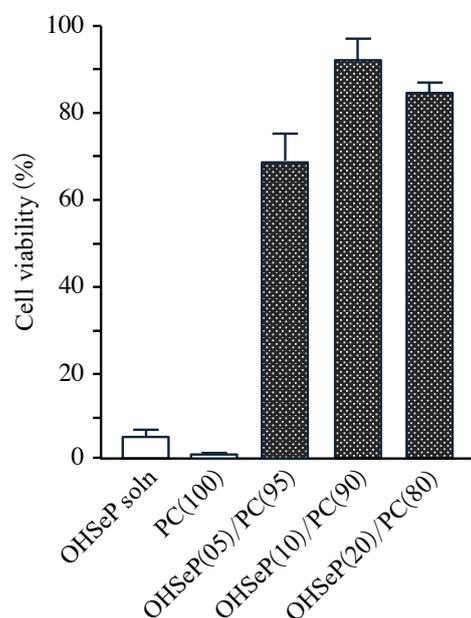
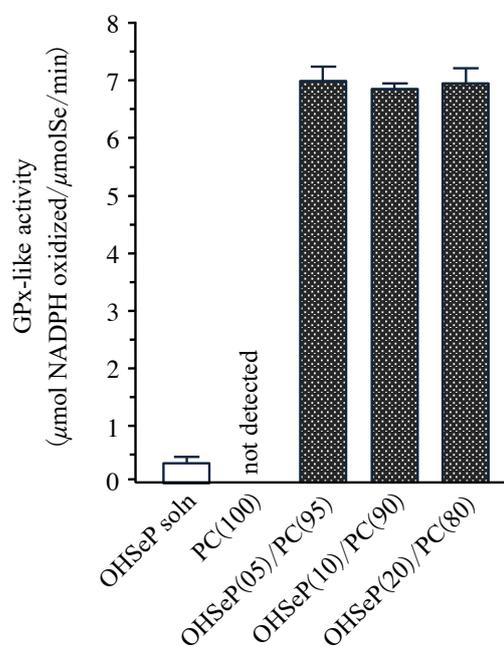
(3) 右上図に OHSeP/PC 混合リポソームの生理的条件の緩衝液中 (pH 7.4, 37°C) における GPx 様活性 (GPx-like catalytic activity) を示している。基質には過酸化水素 H₂O₂ を使用し、NADPH 法で測定した。OHSeP (OHSeP soln) および PC [PC (100)] だけでは、GPx 様活性の発現は全く観察されなかった。一方、OHSeP/PC 混合リポソームは、水系緩衝液中において極めて良好な GPx 様活性の発現が観察された。これまでに報告された水溶液中での数少ないデータと比べると、著しく高い活性であった。混合比の異なる 3 種類の OHSeP/PC 混合リポソームの GPx 様活性はほぼ同程度であり、混合比 5-20 モル%では顕著な差異は観察されなかった。

(4) GPx-4 をノックダウンした培養細胞内へ OHSeP を導入し、OHSeP による細胞レスキュー効果を評価した。培養細胞には HepG2 細胞を使用した。培地中に OHSeP/PC 混合リポソーム [OHSeP (XX)/PC (XX), 括弧内はモル%] を添加し、一定時間培養した後、細胞生存率 (Cell viability) を MTT 法で測定した。右下図に示すような細胞生存率の測定結果が得られた。また、細胞内のセレン量の測定結果から、OHSeP/PC 混合リポソームを加えて培養したことにより細胞内のセレン量の増大が観察され、OHSeP が細胞内に導入されていることが確認された。したがって、GPx-4 をノックダウンしたがん細胞に導入された OHSeP が、GPx-4 に代わる還元反応触媒機能を発揮し、それに基づいて細胞生存率の改善 (“細胞レスキュー効果”) を示したものと考えられた。

(5) 本研究において、細胞外から与えた OHSeP 分子が生細胞内において GPx 様の還元反応触媒活性を発現することが示された。膜結合型リン脂質ヒドロペルオキシド GPx-4 は細胞内のミトコンドリア膜に存在し、その酵素機能を発揮している。今後の研究展開において、OHSeP 分子を天然型 GPx-4 が局在するミトコンドリア膜へ効率よくターゲティングすることができれば、効果の向上に繋がるものと期待される。また、細胞死の様式の一つであるフェロトーシス (Ferroptosis) には GPx-4 が深く関与し、フェロトーシスによる細胞死を防ぐためには GPx-4 が不可欠であることが知られている。このような場合にも、OHSeP 分子が GPx-4 の代替機能を発揮し、細胞死からのレスキュー効果を発現できるのではないかと期待される。

Item	Mean particle diameter (nm)
OHSeP(05)/PC(95)	103.7 ± 3.9
OHSeP(10)/PC(90)	105.4 ± 3.5
OHSeP(20)/PC(80)	102.2 ± 1.9
PC(100)	80.8 ± 1.0
OHSeP soln	173.5 ± 2.5

Item	Zeta-potential (mV)
OHSeP(05)/PC(95)	-5.54 ± 1.00
OHSeP(10)/PC(90)	-8.77 ± 2.61
OHSeP(20)/PC(80)	-12.40 ± 1.47
PC(100)	-1.56 ± 0.18
OHSeP soln	-12.00 ± 2.76



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 E. Randarova, H. Nakamura, R. Islam, M. Studenovskiy, M. Haratake, J. Fang, P. Chytil, T. Etrych	4. 巻 106
2. 論文標題 Highly effective anti-tumor nanomedicines based on HPMA copolymer conjugates with pirarubicin prepared by controlled RAFT polymerization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 256 - 266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.actbio.2020.02.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 T. Fuchigami, N. Ishikawa, I. Nozaki, Y. Miyanari, S. Yoshida, M. Yamauchi, A. Soejima, M. Haratake, M. Nakayama	4. 巻 111
2. 論文標題 Discovery of INCENP-derived small peptides for cancer imaging and treatment targeting survivin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1357-1366
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14330	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田 さくら, 山本 明典, 増本 博司, 堀 恵里子, 浦 東子, 淵上 剛志, 原武 衛, 中山 守雄
2. 発表標題 亜セレン酸還元代謝種と反応するラット脳由来タンパク質の同定
3. 学会等名 フォーラム2020衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sakura YOSHIDA, Ryosuke MORI, Risako HAYASHI, Takeshi FUCHIGAMI, Mamoru HARATAKE, Morio NAKAYAMA
2. 発表標題 Investigation of selenium absorption from selenotrisulfide compounds in cultured cells
3. 学会等名 第30回金属の関与する生体関連反応シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Enoch APPIAH, Hideaki NAKAMURA, Robert POLA, Tomas ETRYCH, Mamoru HARATAKE
2. 発表標題 Bradykinin conjugates of N-(2-hydroxypropyl)methacryl amide based polymer for enhancing tumor delivery of nanomedicines
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中村 秀明 (NAKAMURA Hideaki) (30435151)	崇城大学・薬学部・講師 (37401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------