

たけだ　ともや

氏 名（ ）　武田　知也（ ）

学　位　の　種　類　博士（農学）

学　位　記　番　号　農博第 1239 号

学　位　授　与　年　月　日　令和 2 年 3 月 25 日

学　位　授　与　の　要　件　学位規則第 4 条第 1 項

研　究　科　，　専　攻　東北大学大学院農学研究科（博士課程）応用生命科学専攻

論　文　題　目　有機ゲルマニウム化合物 Ge-132 による生体内抗酸化誘導効果の解明

博士論文審査委員　（主査）教授　麻生　久

教授　種村　健太郎

教授　白川　仁

博士論文要旨

有機ゲルマニウム化合物 Ge-132 による
生体内抗酸化誘導効果の解明

東北大学大学院農学研究科

応用生命科学専攻

武田 知也

指導教員 麻生 久 教授

第 1 章 序論

Poly-*trans*-[(2-carboxyethyl) germasesquioxane] (Ge-132) は、金属ゲルマニウムに炭素類が化学結合した有機ゲルマニウム化合物で、1967 年に世界で初めて合成に成功した水溶性有機ゲルマニウムである (図 1)。Ge-132 の結晶は Ge と酸素原子が 6 個ずつ Ge-O 結合で 12 員環の構造を形成し、シート状のポリマー構造をとる。また Ge 原子にカルボン酸を持つプロパニル基が上下に互い違いに結合し、各シートはカルボキシエチル間で水素結合をして積層している。Ge-132 は結晶性が高く、温度・湿度・光などに極めて安定で、水に溶解すると室温では約 1% が可溶で、飽和溶液では pH2~3 の酸性を呈し、アルカリを用いて中和をすると溶解度が増加する。加水分解を受けると Ge-O の結合が切断され、Ge に水酸基が 3 つとカルボン酸が結合した 3-(trihydroxygermyl) propanoic acid ($(\text{HO})_3\text{GeCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) (THGP) のモノマー構造をとる。生体は水が豊富なため、経口で摂取した後は Ge-132 が水解された THGP の形で存在し、生理作用を及ぼしていると考えられる。Ge-132 は経口摂取したおよそ 20-30% が腸管より吸収され、24 時間後には 80-90% が尿から排出される。また、48 時間後にはほぼ全量が排出され、体内に残存することはない。

Ge-132 の生理作用としては、インターフェロン γ の誘起、マクロファージ・NK 活性の誘導など、宿主の免疫を賦活させる作用が報告されている。また、リウマチ症状に対する抗炎症効果、四塩化炭素による肝臓障害モデルでの抗酸化作用、モルヒネ様の鎮痛作用、火傷の痛みの緩和などの生理作用も報告されている。また、THGP はシスジオール構造をもつ物質 (ATP、アデノシン、グルコース等) と錯体を形成する。その錯体形成を介してアデノシンデアミナーゼ酵素によるアデノシン基質分解反応の阻害、ATP 作動性チャネルのカルシウムイオン流入の阻害、糖異性化反応の促進などの作用があり、構造的な作用に着目した研究も行われているが、Ge-132 の生理作用には未だ不明な点が多く存在する。

Ge-132 摂取によって、動物において糞便色が変化し、誘導される色素は抗酸化能を持つことが報告されているが、その色素の変化のメカニズムやそ

の生理作用の全容は明らかになっていない。しかしながら、Ge-132 の糞便色素の変化機構を明らかにすることは、Ge-132 の生理作用の解明につながると考えられる。さらに皮膚への作用として火傷の緩和効果と創傷の修復効果が報告されているが、Ge-132 の皮膚吸収あるいは炎症による酸化ストレスに対する効果についても不明な点が多く存在する。よって、本研究では Ge-132 の生理作用を明らかにする目的で、経口摂取による糞便色素の変化に着目し、それに関係する作用および皮膚における抗酸化作用機構解明の研究を行った。

第 2 章 Ge-132 摂取による糞便色素の変化および抗酸化能誘導効果の解析

Ge-132 の経口摂取は便の色を黄色に変化させることが動物実験で確認されている。中村らは便色の変化を促す難消化性オリゴ糖（ラフィノース）と Ge-132 の作用について比較解析した。ラフィノースは腸内細菌層を変化させ、腸内環境で発酵を増加させることによる便色の変化であった。一方で Ge-132 は赤血球色素ヘムの代謝物であるビリルビンの胆汁排出の増加に加え、盲腸内容物中のステルコビリンの増加による便色の変化であることを確認している。

赤血球は骨髄で産生されてから分解されるまでヒトでおよそ 120 日といわれる（図 2）。老化した赤血球は脾臓や肝臓などのマクロファージやクッパー細胞などの貪食細胞によって捉えられ、分解される。赤血球の成分であるヘモグロ빈はヘムとグロビンに分解され、グロビンはアミノ酸として再度タンパク質合成の原料として利用される。さらにヘムはヘムオキシゲナーゼによって開裂し、鉄とビリベルジンに代謝され、さらにビリベルジンをビリルビンリダクターゼが還元することによってビリルビンが産生される。ビリルビンは水に溶けにくいいため、肝臓でグルクロン酸に抱合されることで、胆汁中に溶解込み、腸管へと排出される（図 3）。排出されたビリルビンは腸内細菌によって還元的に代謝されウロビリノーゲン（ステルコビリノーゲン：ウロビリノーゲンの構造異性体）を生成し、さらに大部分はステルコビリンに代謝され糞便に排出し、この色素が便の色を決めている。しかしながら、

Ge-132 経口摂取による糞便色の変化に伴う糞便中の色素量および抗酸化能については未だ明らかにされていない。本研究では Ge-132 摂取による便中に含まれる赤血球の代謝過程で生じる色素の量に着目し、抗酸化誘導能およびその関係する作用（赤血球分解・造血作用）について検討した。

マウスに 0、0.05%または 0.2%Ge-132 を含有させた餌を 5 日間与え、その糞便中の色素量を測定した。マウスの糞便色変化において、通常食を与えているマウスでは変化は認められなかったが、Ge-132 摂取マウスでは 3 日目より便色が明るい黄色になっていることが判明した（図 4）。次に、糞便中の赤血球代謝色素であるビリルビン、ステルコビリノーゲンおよびステルコビリニン量を測定した。ビリルビンは Ge-132 摂取による有意な増加は見られなかったが、Ge-132 摂取マウスの糞便中のステルコビリノーゲン、ステルコビリニンは摂取 4、5 日目に有意に増加した（図 5）。さらに、Ge-132 摂取により盲腸内容物の色も明るい黄色みを帯びることが判明した（図 6）。その色素成分量の分析を行ったが、Ge-132 摂取によってビリルビンおよびステルコビリノーゲンは有意な増加は確認できなかったが、ステルコビリニンは有意に増加していることが明らかになった（図 7A-C）。また、腸管に分泌された胆汁量を示す胆汁酸量は Ge-132 摂取によって有意な増加は得られなかった（図 7D）。そのため Ge-132 を摂取したマウスでは胆汁中のビリルビン排出量の増加によって、糞便中の色素の量が増加したものと考えられる。しかしながら盲腸内容物中にも糞便中にも Ge-132 摂取によるビリルビン量の増加を認めなかったのは、ビリルビンは糞便に排出される過程でほとんどがステルコビリニンやステルコビリノーゲンに代謝されてしまっているためと考えられる（図 5D）。

糞便中のラジカル消去活性に関して、Ge-132 摂取 2 日目に有意に上昇し、4 日目にも 0.2%Ge-132 含有摂取群で有意に上昇した（図 8A）。糞便中の抗酸化能は 4 日目に 0.05% Ge-132 含有摂取群で有意に上昇した（図 8B）。盲腸内容物中のラジカル消去活性も、0.2%Ge-132 摂取で有意に上昇した。高い抗酸化性をもつステルコビリノーゲンや本研究を通して一般の抗酸化物質と同等の抗酸化性を示すことが明らかとなったステルコビリニン色素が

Ge-132 摂取によって糞便中に増加したことにより、抗酸化能も増加した可能性が示唆された。

ところで、図 2 に示したように、赤血球の代謝色素は肝臓や脾臓のマクロファージやクッパー細胞が老化赤血球を貪食し、分解することで生成されることから、Ge-132 摂取によって赤血球の分解が促進されていることが示唆される。そこで Ge-132 処理がマクロファージの赤血球貪食能に与える影響について検討した。マウスに Ge-132 を 0、0.05%含有させた餌を 4 日間与えた後、各群のマウスの赤血球を採取した。マクロファージは RAW264.7 細胞を使用し、細胞に THGP を 500 μ M 添加処理を 1 日行い、採取した赤血球を細胞に播種した。赤血球貪食能に与える影響をマクロファージ 100 個当たりの総貪食個数と貪食しているマクロファージの平均貪食個数で評価した。マクロファージの貪食能は総数（図 9A）としても平均貪食個数（図 9B）としてもマクロファージに THGP 添加処理することで有意に増加した。さらにスカベンジャーレセプターである Sr-a1 や赤血球のヘム分解酵素である Hmox-1、Hmox-2 の遺伝子発現が THGP 添加処理することで増加することから（図 10）、Ge-132 はマクロファージを活性化させ、赤血球の貪食能を亢進させていることが示唆された。さらに Ge-132 摂取マウスの赤血球では通常マウスの赤血球と比較して、マクロファージに貪食される数が減少していたことから（図 9A）、間接的ではあるが Ge-132 摂取マウスでは体内において Ge-132 により活性化したマクロファージ（もしくはクッパー細胞）に貪食されてしまっていたため、貪食されやすい老化赤血球が減少していたのではないかと考えられる。

これまでの結果から Ge-132 を摂取することで赤血球分解が亢進することが明らかになったが、分解が亢進することで血液中の赤血球量が減少し、貧血になる可能性がある。そこで、Ge-132 摂取が赤血球の産生に与える影響を明らかにするため、骨髓細胞の赤芽球への分化誘導能について解析した。マウスに Ge-132 を 0.05%含有させた餌を 4 または 7 日間、および Ge-132 不含の餌を 7 日間与えた後、各々のマウスの骨髓細胞を採取した。細胞を赤芽球分化測定用のメチルセルロース培地に播種して、前期赤芽球系前駆細胞

のコロニー（BFU-E）をカウントした。糞便色素を測定したマウスのヘマトクリット値は Ge-132 摂取で有意な変化は見られず（図 11A）、さらに赤血球の元である赤芽球への分化誘導が Ge-132 摂取 4 日目の骨髓細胞で亢進されていた（図 11B）ことから、Ge-132 は造血能を亢進させ、赤血球量を維持していると示唆された。しかしながら Ge-132 摂取 7 日目の骨髓細胞では赤芽球の分化亢進が通常に戻っていることから（図 11B）、常に赤血球代謝回転が促進されているわけではなく、血液中の老化赤血球の分解が十分に行われた後は、赤血球の代謝の亢進が収束している可能性がある。

本研究によって、Ge-132 を摂取することで便の色の変化は赤血球代謝色素であるステルコビリノーゲン、ステルコビリンの増加であることに加え、色素の増加に伴う糞便中の抗酸化能が増加していることを明らかにした。これらの色素は排出される過程で抗酸化能力を発揮する可能性が示唆された。さらに Ge-132 摂取による赤血球の分解亢進はマクロファージの赤血球貪食能の亢進によることが示唆された。また Ge-132 摂取によって赤血球量の減少が認められないことに加え、赤芽球の分化誘導が亢進されていたことより、造血能も亢進し、全体を通して Ge-132 摂取は赤血球代謝回転を促進させる可能性が示唆された（図 12）。

第 3 章 Ge-132 の皮膚に対する生理作用の研究

Ge-132 は火傷の痛み軽減と症状緩和効果を有することが確認されている。また、Ge-132 は熱処理を与えたヒト皮膚由来正常繊維芽細胞の生存数が有意に増加させる作用を有することが報告されている。さらに、イヌ、ラットなどの皮膚の創傷実験モデルにおいても Ge-132 の修復効果が報告されている。このように Ge-132 の皮膚に対する生理作用はいくつか報告されているが、機構に関して未だ明らかになっていない点が多い。そこで、本章では始めに Ge-132 の皮膚への浸透性について解析し、炎症や損傷した組織で増加する酸化ストレスに対する防護効果について解析した。

Ge-132 の皮膚への浸透性は、ヘアレスマウスに Ge-132 を中和した 5% の水溶液を隔日塗布し、14 日後に塗布した部位を採材したサンプルを脱水、樹

脂で固定したのち、切片を作製して同位体顕微鏡を用いて Ge の存在を解析した。同位体顕微鏡とは、固体試料表面の同位元素分布をサブミクロンの分解能で三次元的に可視化が可能な装置である。測定した皮膚切片に、表皮、真皮、皮下組織が含まれるように調製した（図 13A,B）。表皮および真皮の細胞核に対応すると見られる領域からリンが検出された（図 13C）。リン原子は細胞の核に多く含まれており、皮膚表面の防御機能を担う表皮には細胞が密接に存在しているので多く検出された。Ge は通常生体にはほとんど存在していないが、Ge を塗布した表面の角質層から強く確認されただけでなく、真皮および皮下組織からも検出された（図 13D）。表皮層の Ge 信号強度は比較的低いいため、表皮からの拡散浸透で Ge が真皮まで到達するのではなく、異なる吸収経路があると考えられる。真皮まで到達している Ge は均一に存在しているのではなく、濃淡があり、一部リンの分析と一致している箇所が存在している。そのため、真皮に存在している線維芽細胞に Ge-132 が取り込まれる可能性が示唆された。

次に、ヒトの正常皮膚線維芽細胞（NHDF 細胞）を用いて、細胞の Ge-132 取り込みについて同位体顕微鏡を用いて解析した。まず Ge のマスのピークを調べるため、金属 ^{74}Ge のマスを調べた（図 14A）。Ge-132 を添加していない細胞では ^{74}Ge のマスは検出されなかったが、添加して培養した細胞には ^{74}Ge のマスを確認した（図 14B,C）。それぞれの ^{74}Ge マスのイメージを図 15A-D に示す。右上、左上、左下に見られる白い部分は測定上干渉として出てきた質量数 74 近辺の妨害シグナルであり、Ge が検出されたのではない。Ge-132 無添加の細胞では Ge が検出されなかったのに対し（図 15A）、Ge-132 を添加して培養した細胞では、細胞全体に Ge が取り込まれている様子が観察された（図 15B）。さらに、Ge が細胞の核にも局在していることを観察した（図 15C,D）。次に細胞への Ge-132 取り込みを異なる質量分析装置である LC/MS-MS 分析法で検討した。同位体顕微鏡では Ge-132 を Ge 原子として測定するが、LC/MS-MS では THGP（Ge-132 のモノマー）としての取り込みを測定することが可能であることより、吸収された Ge が分解されず THGP の形として取り込まれていることが確認できる。Ge-132 のモノマーである

THGP は、添加濃度依存的に NHDF 細胞に取り込まれることが明らかとなった（図 16）。2 つの異なる分析方法によって、THGP が NHDF 細胞内に取り込まれることを確認した。

次に、NHDF 細胞の酸化ストレスに対する THGP の効果について解析した。ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼで誘導される過酸化水素酸化ストレスによって NHDF 細胞の生存率が減少するが、THGP の添加濃度依存的にその生存率が高まることが明らかとなった（図 17）。さらに直接過酸化水素を加える酸化ストレスによる THGP の酸化ストレスに対する細胞死抑制効果について、生存率と細胞内 ATP 量で評価した。細胞生存率と細胞内 ATP 量は THGP 5.9mM 濃度添加によって酸化ストレスによる減少を抑制した（図 18A,B）。また抗酸化物質であるアスコルビン酸（AA）添加でも同様の効果が得られた。さらに長期酸化ストレスに対する THGP の細胞死抑制効果について PI/Hoechst 染色で評価した。長期酸化ストレスダメージにより細胞形態が悪くなるのに対し、THGP 5.9mM 添加によってその形態が改善されている様子が観察された（図 19A）。また死細胞の核が染色される PI 染色および生細胞・死細胞の両方で核が染色される Hoechst 染色を用いて、細胞死の割合を測定したところ、酸化ストレスによって死細胞の割合が 95.4% 増加するのに対し、THGP 添加によって 74.6% まで軽減した（図 19B）。THGP 添加によって様々な条件下での酸化ストレスによる細胞死が抑制することが明らかになった。

THGP の酸化ストレスに対する細胞死抑制効果のメカニズムを明らかにするため、細胞の抗酸化酵素活性および細胞内 ROS 量の変化について解析した。過酸化水素を除去する細胞内のカタラーゼ酵素は THGP 添加による影響は見られなかった（図 20A）。細胞内 ROS 量に関して、酸化ストレス処理によって増加するのに対し、THGP 添加に影響は見られなかったが、AA 添加によって有意に減少した（図 20B）。THGP 添加は AA 添加と同様に酸化ストレスの細胞死を抑制したのに対し、細胞内の ROS 量に直接影響はなく、既存の抗酸化物質とは異なるメカニズムで酸化ストレスによって誘導された細胞死を抑制している可能性が示唆された。

最後に、酸化ストレスおよび THGP 添加が与える細胞内遺伝子発現への影響について遺伝子の網羅解析を行った。2 倍以上発現が増減した遺伝子を変動した遺伝子として、群間比較した変動遺伝子数を図 21 に示した。酸化ストレス処理で変動した 402 個の遺伝子の中で、0.59mMTHGP 添加処理で変動した共通の遺伝子は 6 個、5.9mMTHGP 添加処理で変動した共通の遺伝子は 17 個存在した。酸化ストレス処理および 5.9mMTHGP 添加処理で変動した 17 個の遺伝子を表 1 に示した。その 17 個の遺伝子についてクラスター解析を行った結果から、Gene Ontology:1901700 は酸化化合物に対する反応性というクラスターであり、酸化ストレスを細胞にかけたことで生じたクラスターと示唆された（表 2）。そのクラスターに含まれる遺伝子の中で、酸化ストレスおよび 0.59mM あるいは 5.9mM の THGP 添加によって変動した NR4A2、IL-6、CXCL2 遺伝子の発現解析を定量 PCR 法で行った。細胞死を誘導する NR4A2 遺伝子、炎症性のサイトカインである IL-6 および CXCL2 の遺伝子は酸化ストレスによって発現が上昇するのに対し、THGP 添加によってその発現上昇が抑えられた（図 22）。さらに細胞当たりの IL-6 タンパク放出量も THGP 添加によって有意に減少した（図 23）。

本研究の結果によって、Ge-132 は皮膚表面から真皮および皮下組織まで浸透する様子を世界で初めて可視化することに成功した。また、皮膚線維芽細胞において、THGP を添加処理することで、THGP が細胞質および核内に存在することを明らかにした。THGP の酸化ストレスに対する防御効果は、細胞内の抗酸化酵素の誘導や酸化ストレス自体を軽減するのではなく、細胞死誘導因子や炎症性因子の発現を抑制して、細胞の生存率を増加させる可能性が示唆された。

第 4 章 総括

本研究では Ge-132 の経口摂取による赤血球代謝亢進作用および生体内抗酸化誘導効果について明らかになった点を以下に挙げる。

1. Ge-132 摂取で生じる糞便の色の変化は赤血球代謝色素（ステルコビリノーゲン、ステルコビリリン）が増加したためである。

2. Ge-132 摂取により糞便中の色素の増加に伴い、抗酸化能力が増加した。
3. Ge-132 の体内への吸収は経口摂取からだけでなく、皮膚からも吸収され、皮膚の繊維芽細胞において細胞の核内まで入り込むことが明らかとなった。
4. THGP は酸化ストレスによる細胞死誘導遺伝子および炎症性関連遺伝子の発現を抑制し、細胞生存を高めた。
5. 細胞死抑制メカニズムは酸化ストレス自体の軽減ではなく、細胞自身の防御メカニズムの活性によることが示唆された。

以上のことから、Ge-132 は生体分子の誘導または宿主の防御メカニズムを活性化させることによって生体内の抗酸化能を誘導することが判明した。赤血球代謝色素の誘導による抗酸化作用の増加に加え、酸化ストレス誘導の細胞死・炎症の抑制効果が Ge-132 の新たな生理作用として見出すことができた。体の酸化障害は様々な疾病の要因となる。例えば、DNA 酸化障害によるガン化、酸化によるタンパク質の変性、過酸化脂質の増加による動脈硬化と脳卒中、心疾患など、過度な酸化ストレスは健康を害する要因となることが多数報告されている。Ge-132 が種々の疾病に対して生理作用を示すのは、Ge-132 が宿主の酸化ストレス防御機構を活性化させることで、酸化障害による疾病を緩和させていることが一要因になっていることが明らかになった。

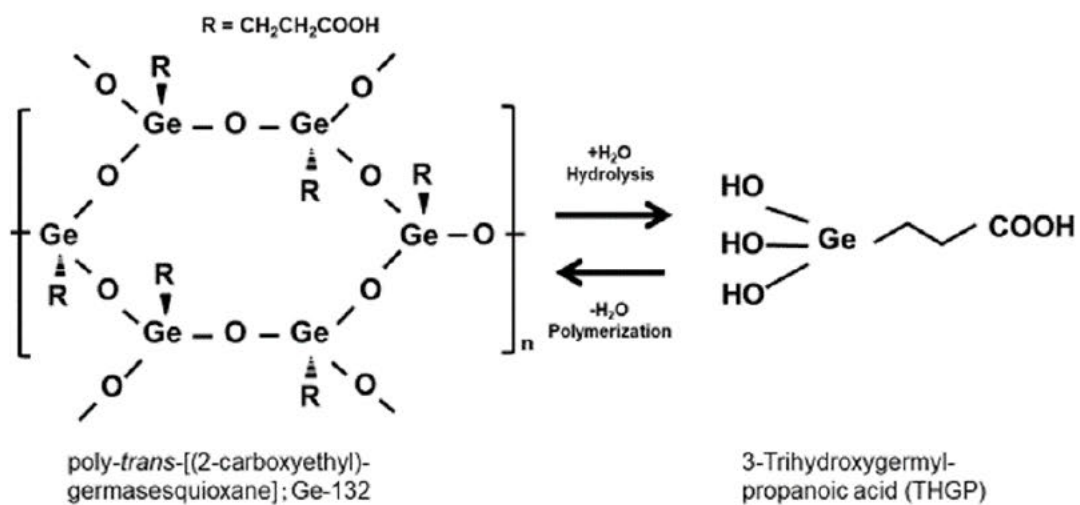


図 1 図 1 Ge-132 とその単量体 THGP の構造

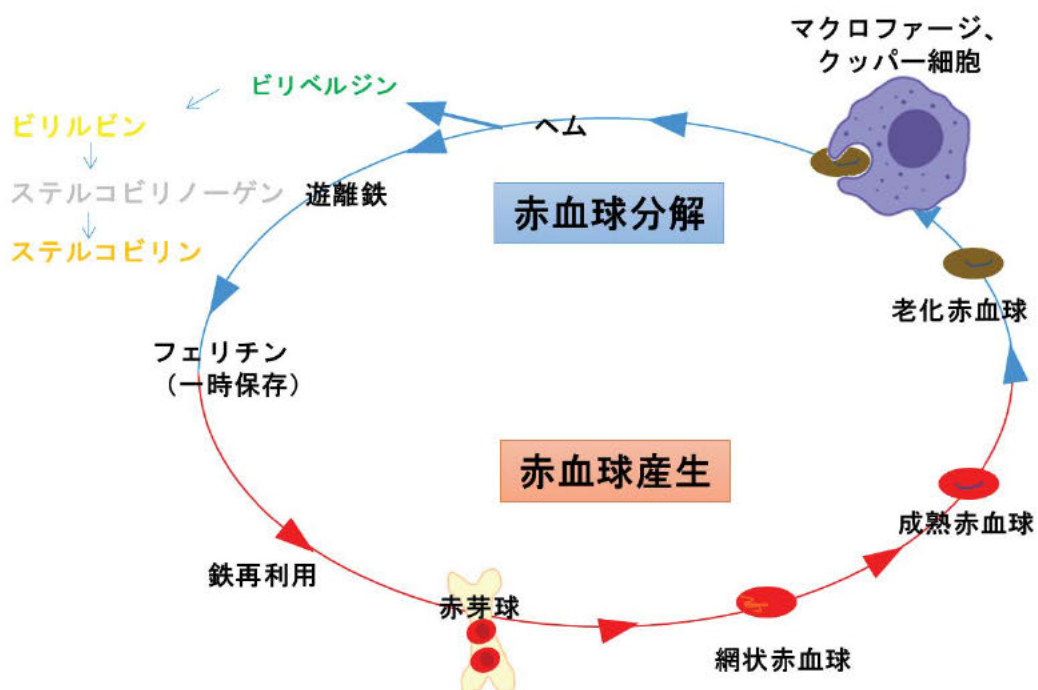


図 2 赤血球代謝回転作用

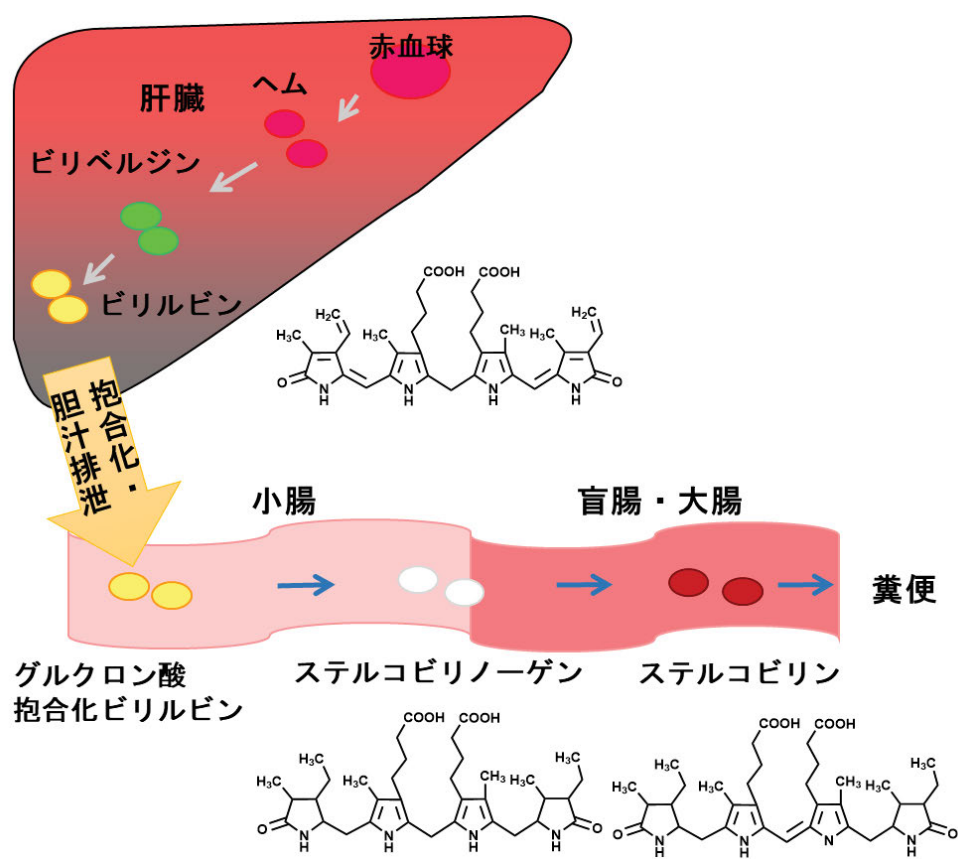


図 3 赤血球分解およびヘム代謝色素排出経路

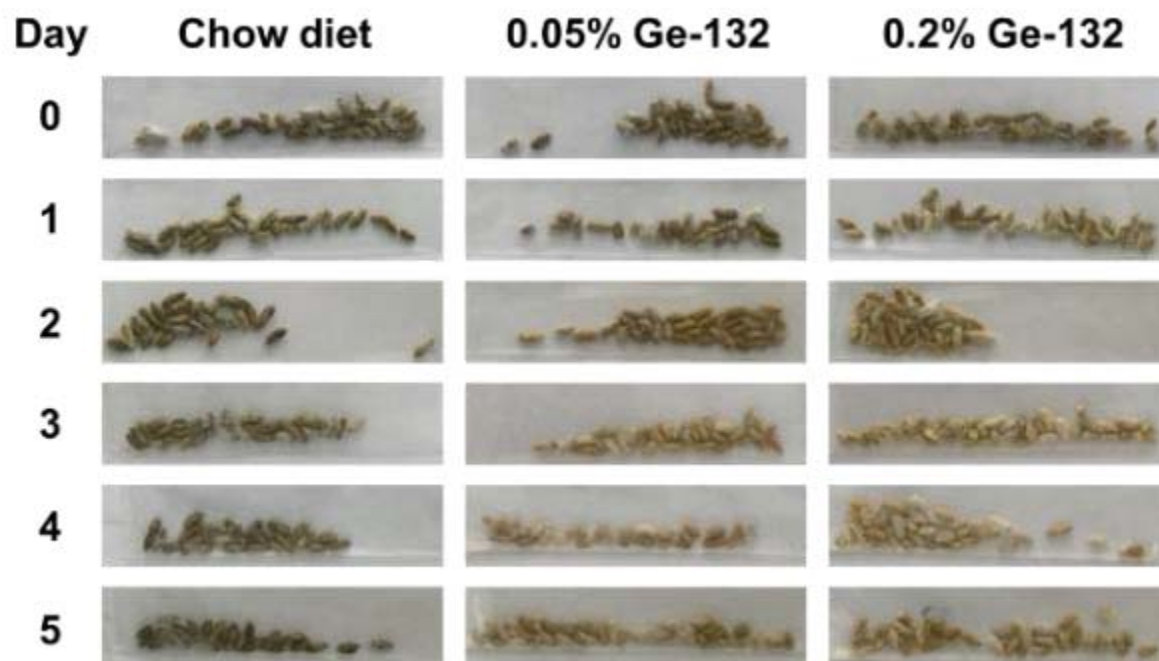


図 4 Ge-132 摂取した時のマウス糞便の色調変化
本飼育開始から毎日糞便を回収し、1 日ごとの糞便の様子を示す。

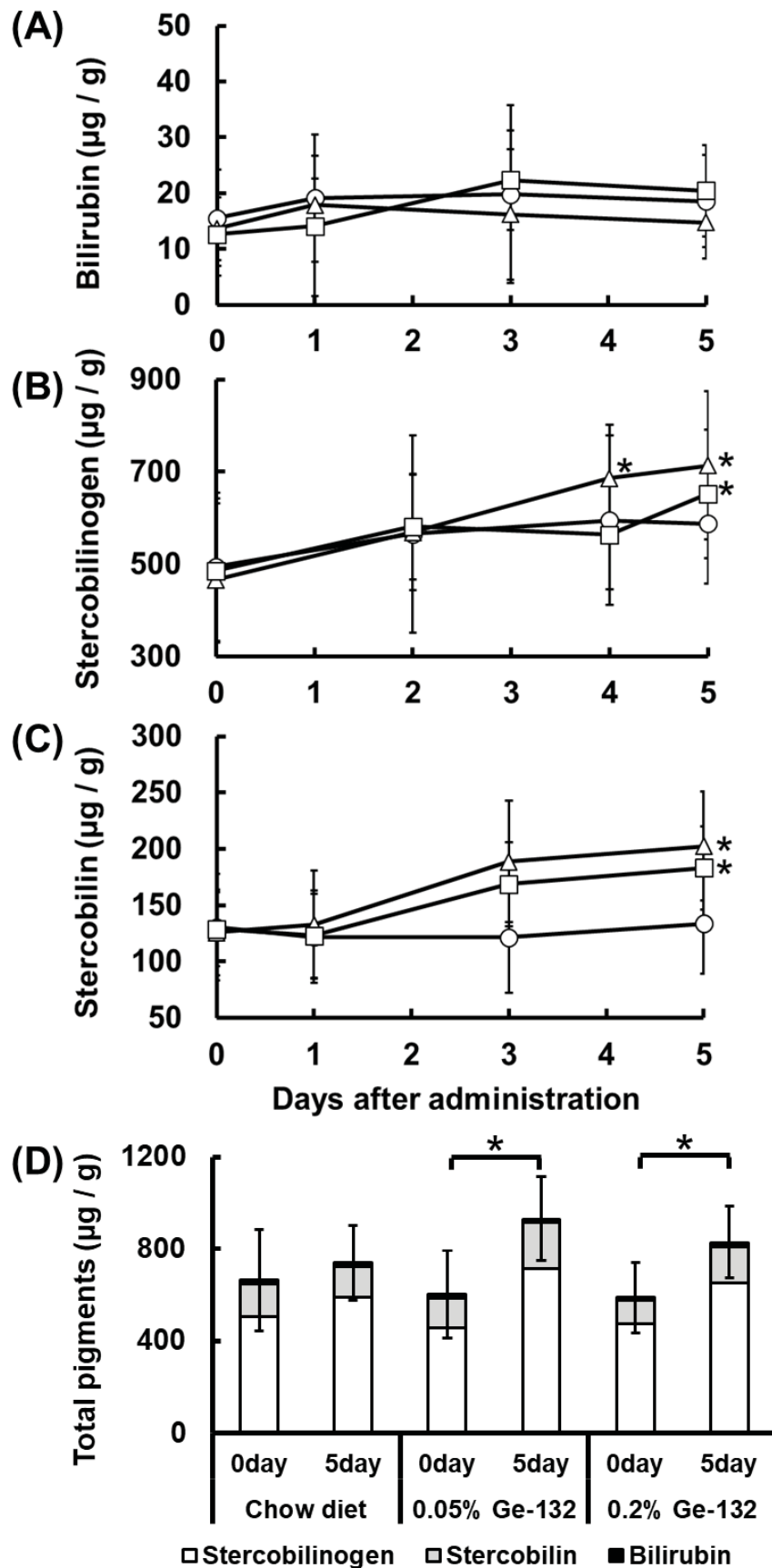


図5 マウス糞便中の赤血球代謝色素量の変化
マウス糞便中のビリルビン (A)、ステルコビリノーゲン (B)、ステルコビリリン (C)、0、5 日目の赤血球代謝色素の総量 (D) を示す。個体数は N=8。○は Chow diet 群、△は 0.05% Ge-132 群、□は 0.2% Ge-132 群を示す。



Chow diet 0.05% Ge-132 0.2% Ge-132

図 6 Ge-132 摂取した時のマウス盲腸内容物の色調変化
Ge-132 摂取 5 日目のマウス盲腸内容物の様子を示す。

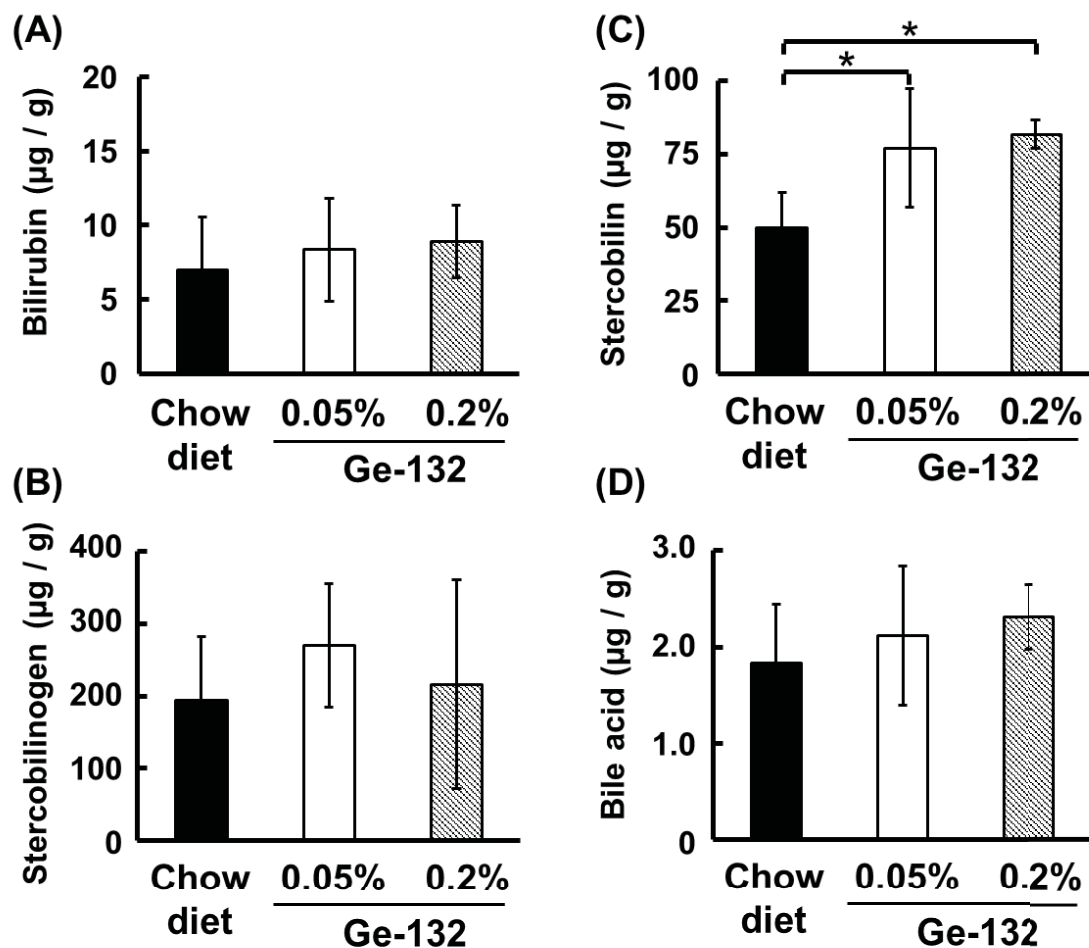


図 7 マウス盲腸内容物中の赤血球代謝色素量、胆汁酸量
マウス盲腸内容物中のビリルビン (A)、ステルコビリノーゲン (B)、
ステルコビリリン (C)、胆汁酸量 (D) を示す。個体数は N=6-8。

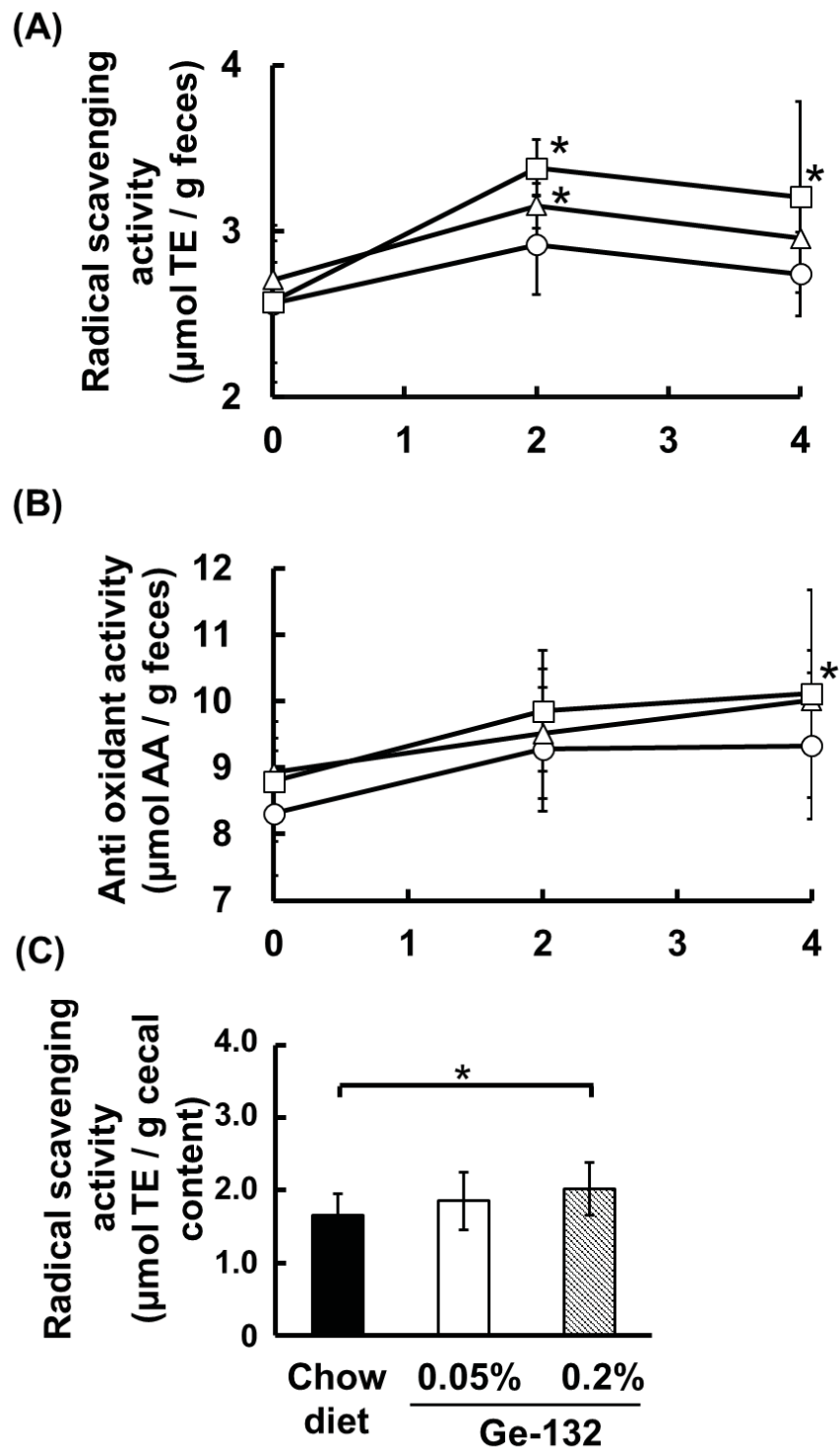


図 8 マウス糞便および盲腸内容物中の抗酸化活性の変化
 マウス糞便中のラジカル消去活性 (A)、総抗酸化活性 (B)、盲腸内容物中のラジカル消去活性 (C) を示す。個体数は N=7、8。○は Chow diet 群、△は 0.05% Ge-132 群、□は 0.2% Ge-132 群を示す。

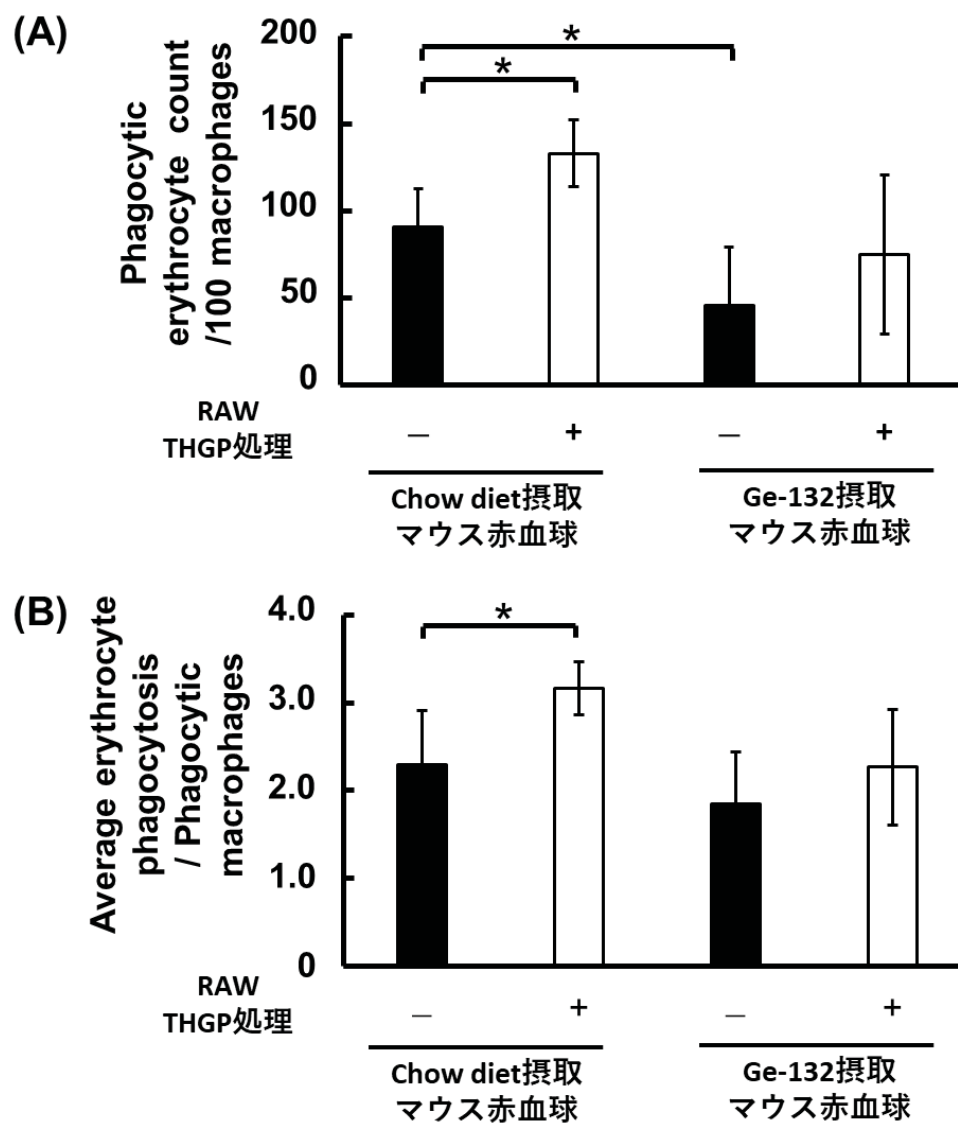


図 9 THGP 処理によるマクロファージ赤血球貪食能の変化
100 個当たりの RAW264.7 細胞の貪食赤血球総数 (A)、赤血球を貪食している RAW264.7 細胞の平均赤血球貪食個数 (B) を示す。個体数は N=6。

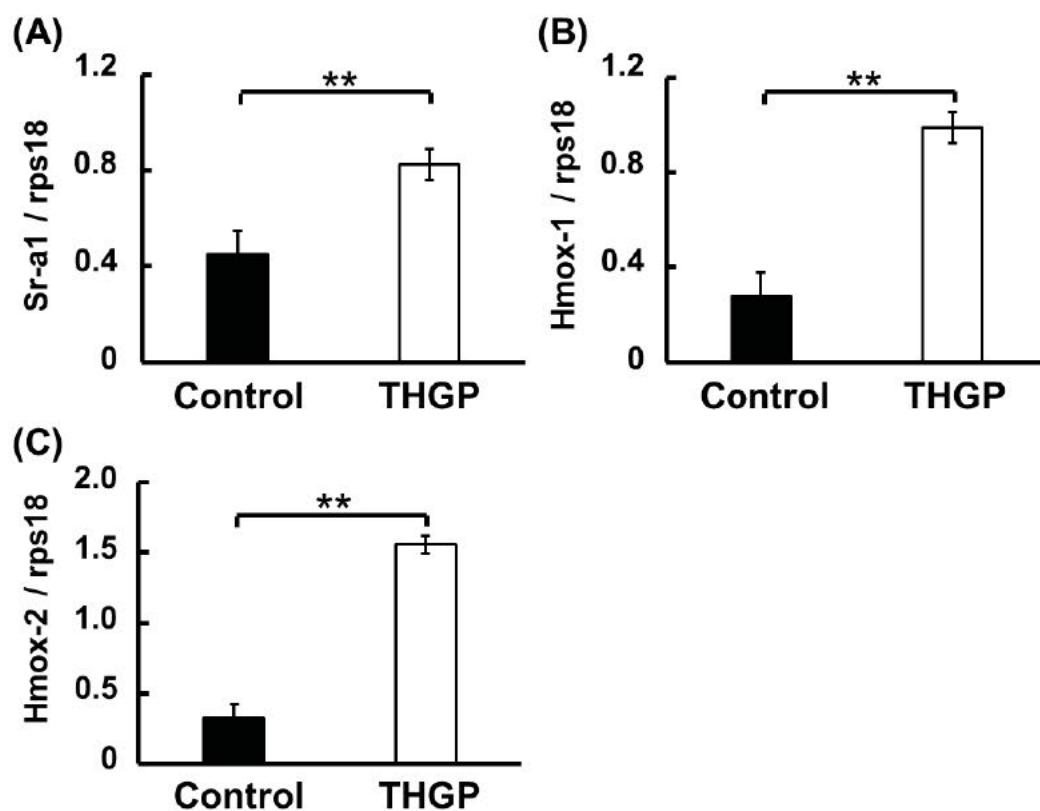


図 10 THGP 処理によるマクロファージ貪食能および赤血球分解に関わる遺伝子発現の変化

Sr-a1 (A)、Hmox-1 (B)、Hmox-2 (C) の遺伝子発現変化を示す。rps18 遺伝子を内部標準として用いて発現量を補正した。個体数 N=4-6。



図 11 ヘマトクリット値および骨髄細胞の赤芽球分化能に与える影響
マウス血液中のヘマトクリット値 (A)、骨髄細胞の成熟 BFU-E
コロニー形成数 (B) を示す。個体数は N=6-8。

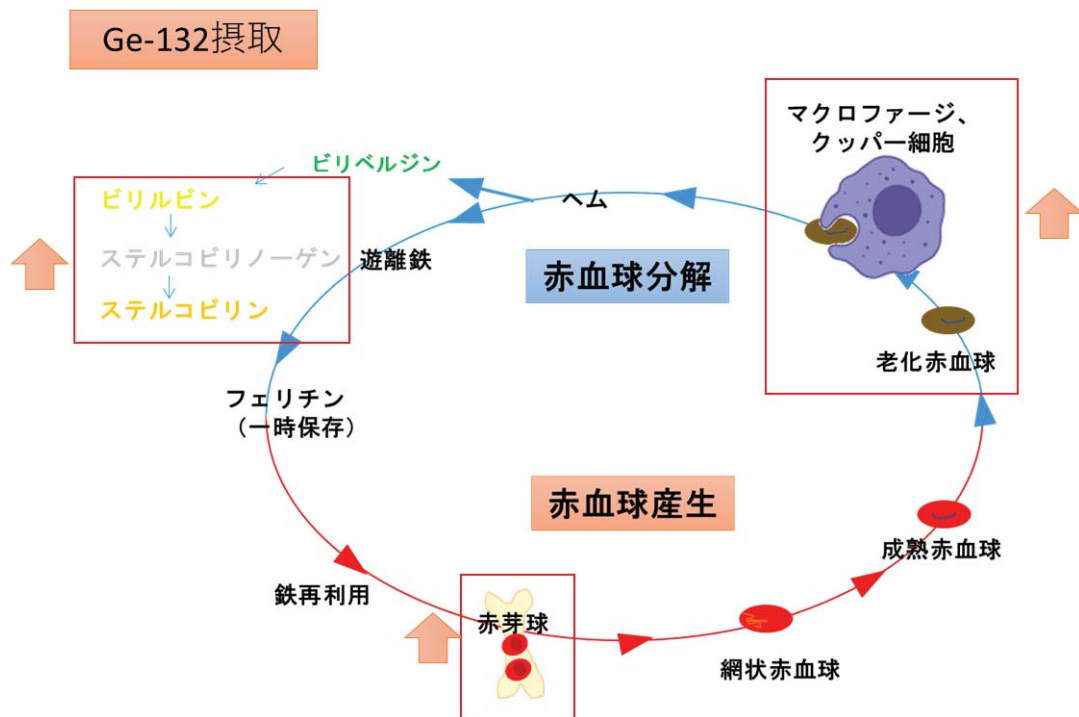
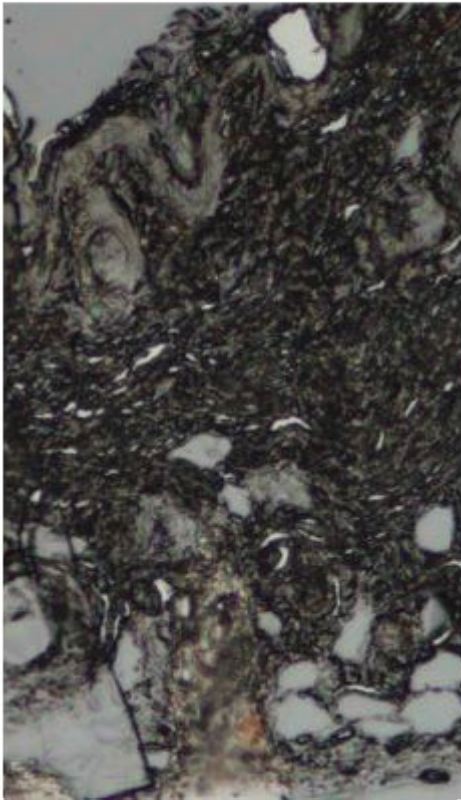
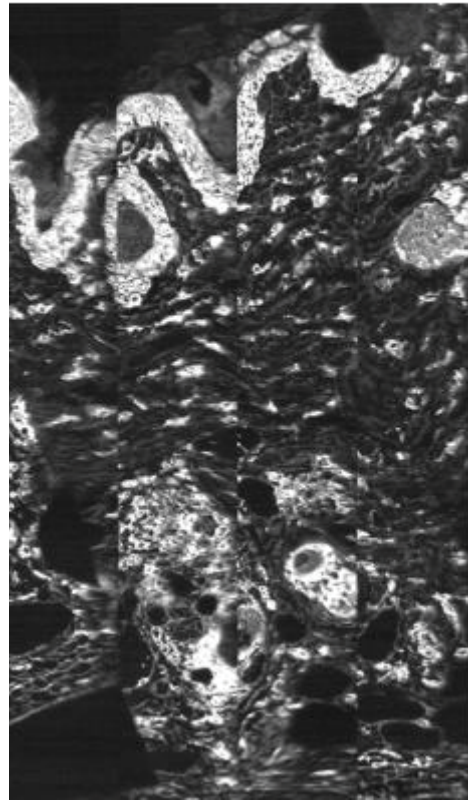


図 12 Ge-132 による赤血球代謝回転促進作用

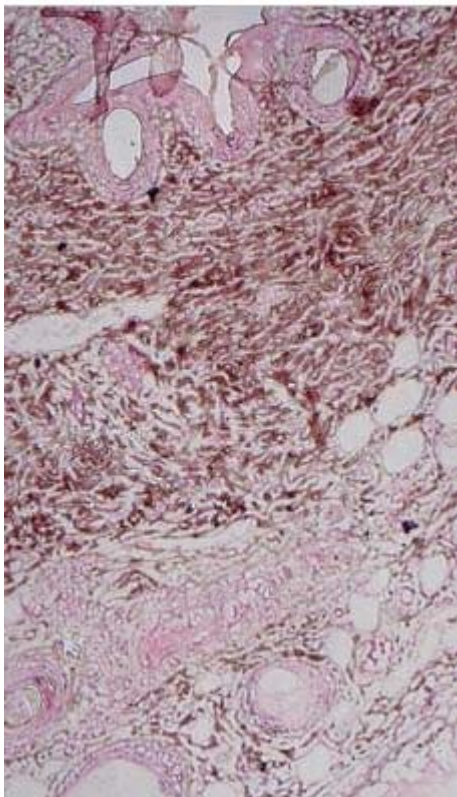
(A) 同位体顕微鏡
分析切片の光顕画像



(C) リン元素の画像



(B) HE染色画像



(D) Ge元素の画像

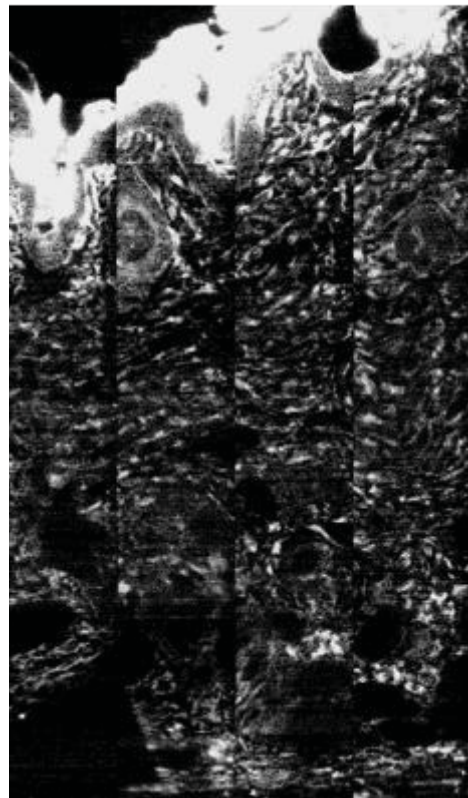


図 13 同位体顕微鏡分析によるマウス皮膚組織の元素分析画像
ヘアレスマウス組織の光顕画像 (A)、ヘマトキシリン・エオシン染色
画像 (B) およびリン、ゲルマニウム元素分析画像 (C、D) を示す。

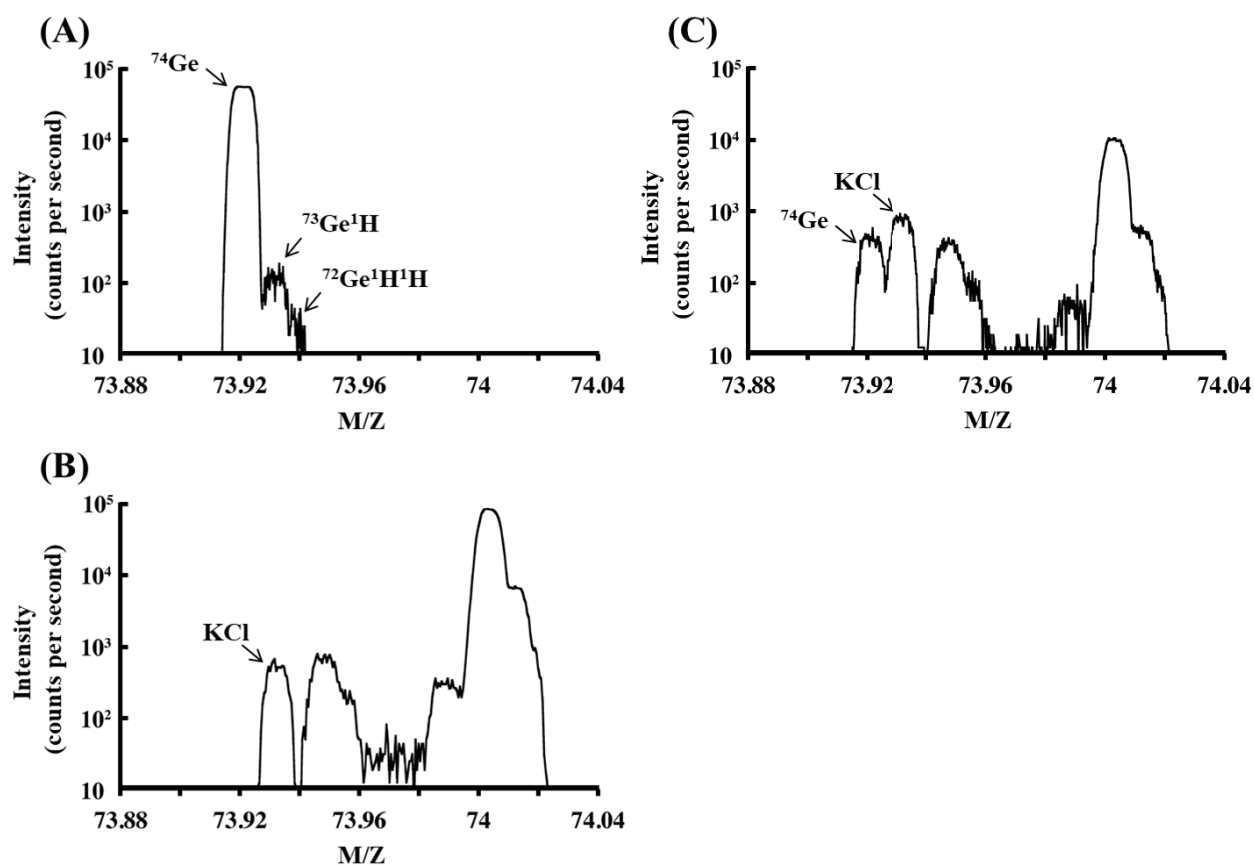
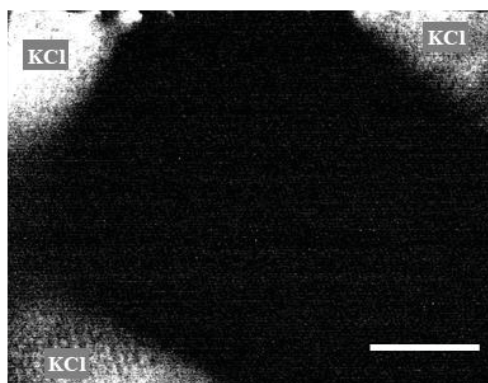
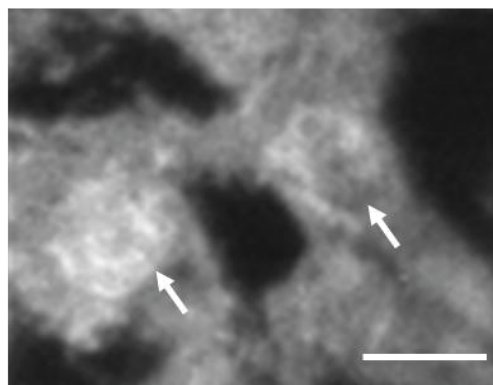


図 14 金属 Ge と正常ヒト皮膚線維芽細胞（NHDF 細胞）を同位体顕微鏡で分析したマスデータ
 金属 Ge のマスデータ (A)、Ge-132 添加培養していない細胞のマスデータ (B)、添加培養した細胞のマスデータ (C) を示す。

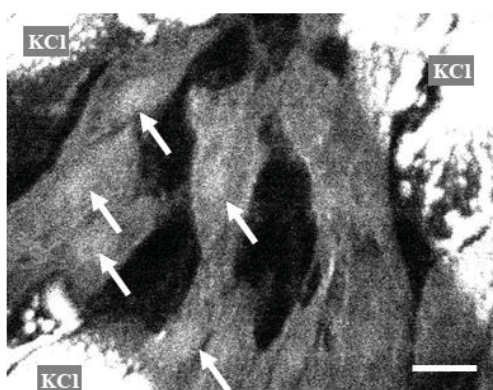
(A)



(C)



(B)



(D)

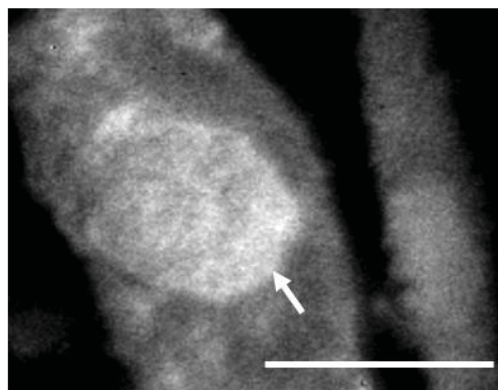


図 15 正常ヒト皮膚線維芽細胞（NHDF 細胞）を同位体顕微鏡で Ge をイメージ化した画像
Ge-132 添加培養していない細胞の Ge をイメージ化した画像（A）、
添加培養した細胞の Ge をイメージ化した画像（B、C、D）を示す。
スケールバーは 25 μ m。

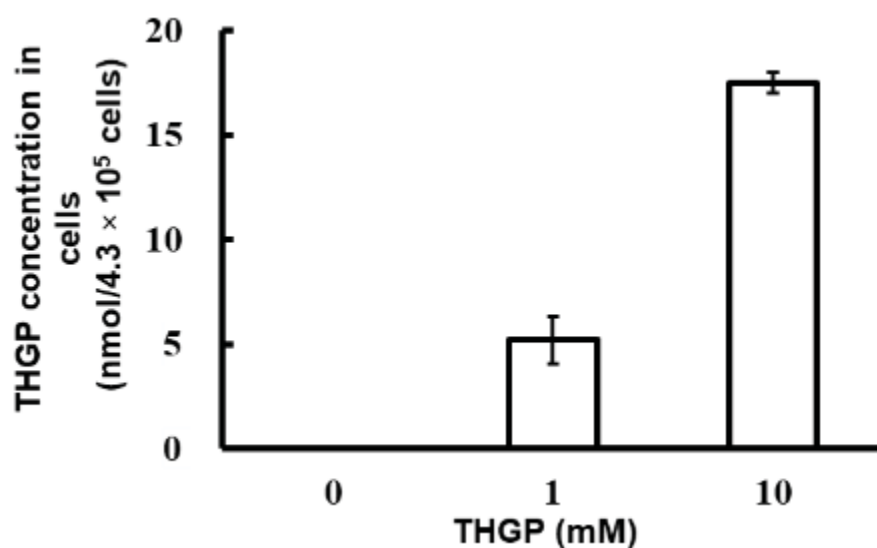


図 16 NHDF 細胞の THGP 取り込み量

THGP を添加培養した細胞の THGP の取り込み量を LC/MS-MS 分析で測定した結果を示す。個体数は N=3。

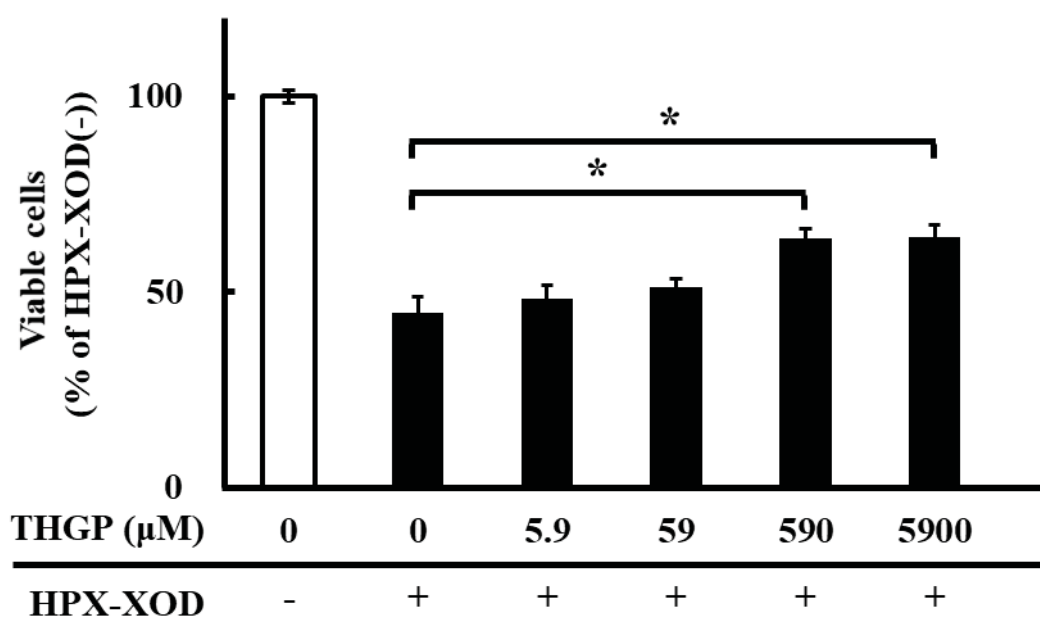


図 17 酵素誘導酸化ストレスに対する NHDF 細胞の生存率

ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ酵素による酸化ストレスに対する NHDF 細胞生存率を示す。個体数は N=8。

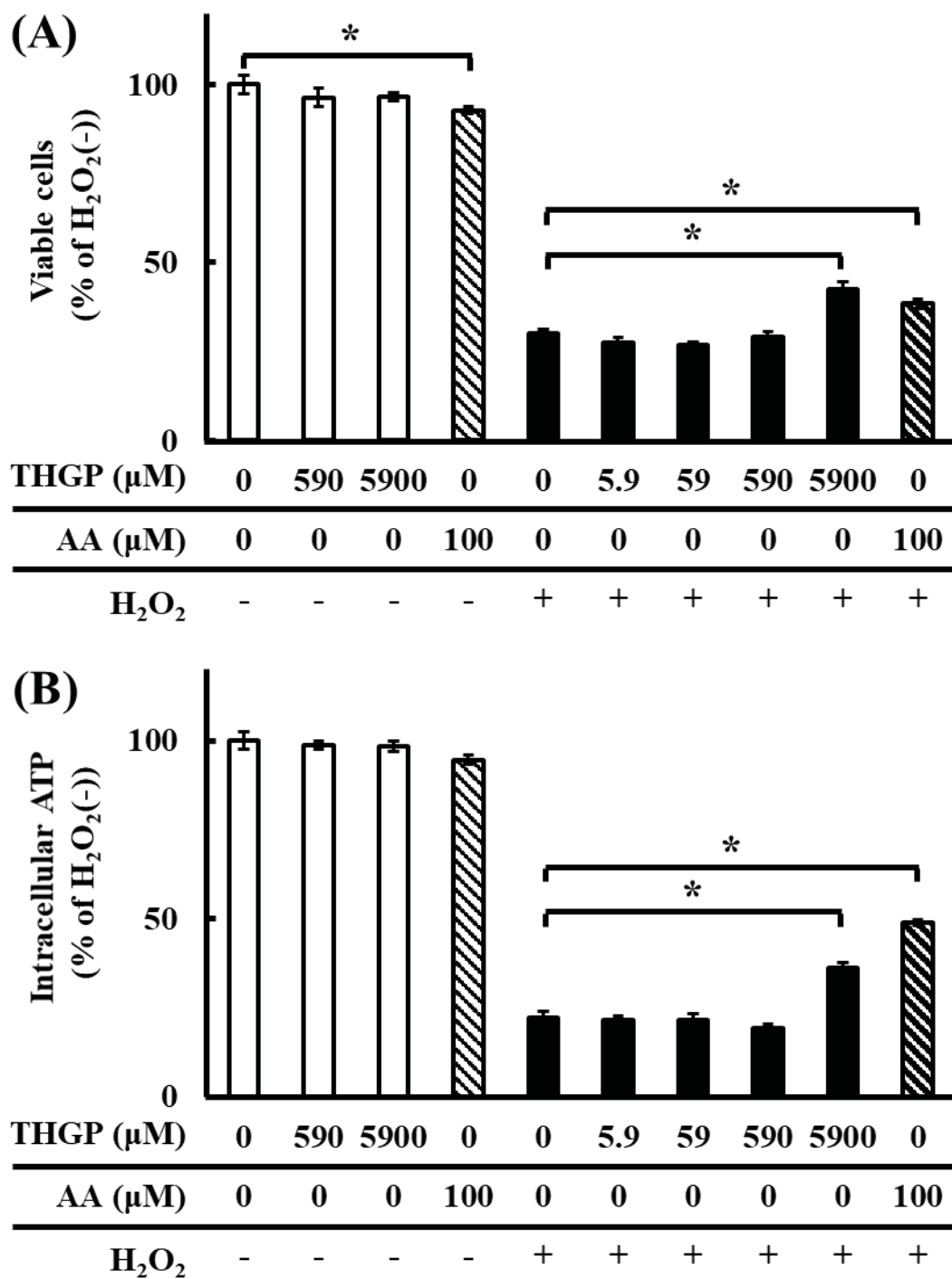


図 18 過酸化水素酸化ストレスに対する NHDF 細胞の生存率と細胞内 ATP 量
直接過酸化水素を培地に加えた時の酸化ストレスに対する NHDF 細胞生存率 (A) および細胞内 ATP 量 (B) を示す。個体数は N=8。

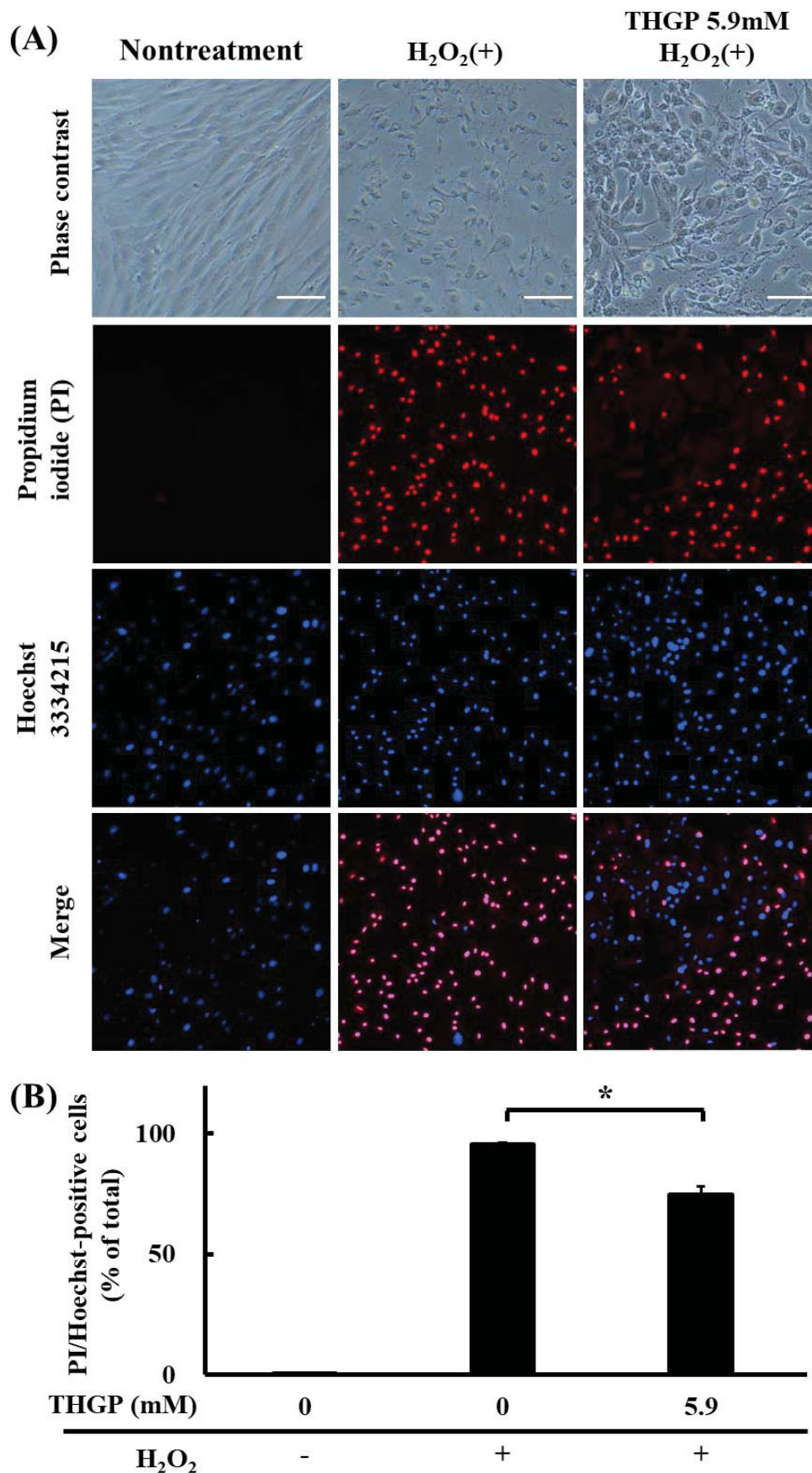
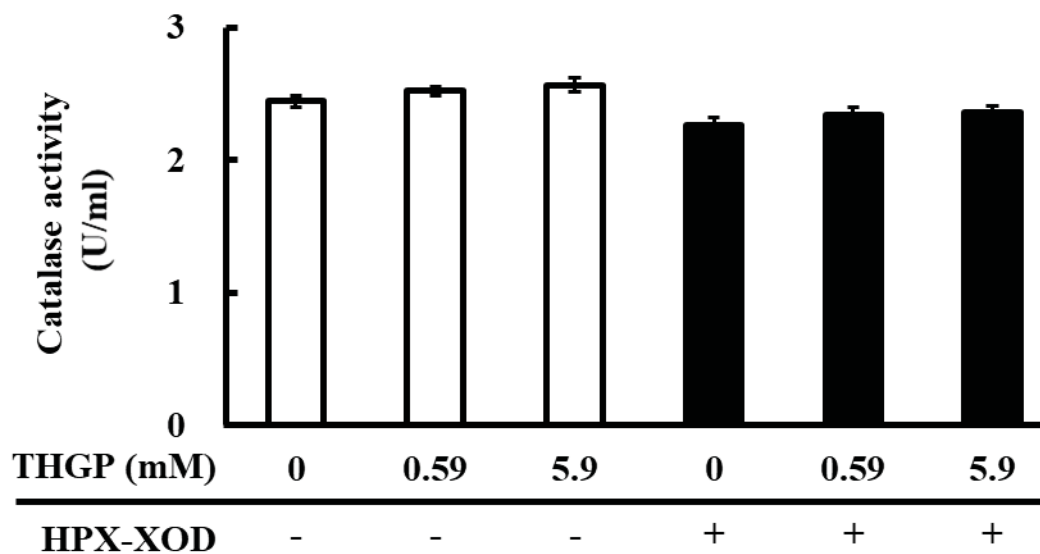


図 19 長期過酸化水素酸化ストレスに対する NHDF 細胞の生存率
長期酸化ストレスに対する NHDF 細胞の形態画像および PI/Hoechst
染色画像 (A) および PI/Hoechst 正染色した割合 (B) を示す。個体
数は N=6-8。スケールバーは 100 μ m。

(A)



(B)

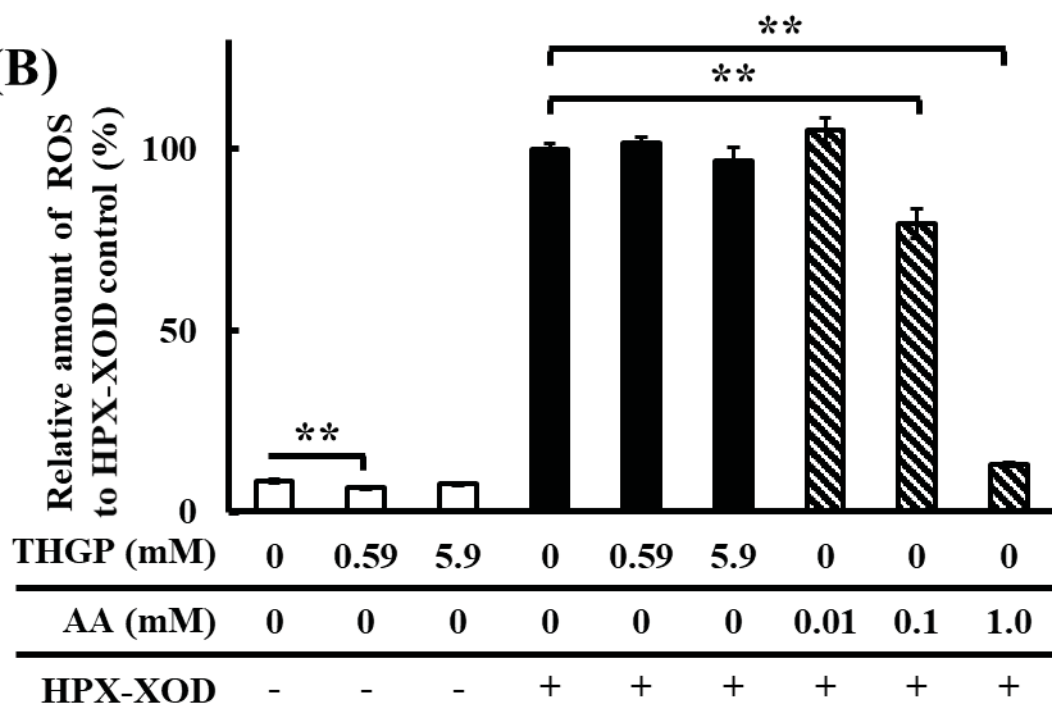


図 20 酸化ストレス及び THGP 処理による NHDF 細胞の抗酸化酵素活性、細胞内 ROS 量の変化
酸化ストレスに対する NHDF 細胞のカタラーゼ活性(A)、細胞内 ROS 量 (B) を示す。個体数 N=6-8

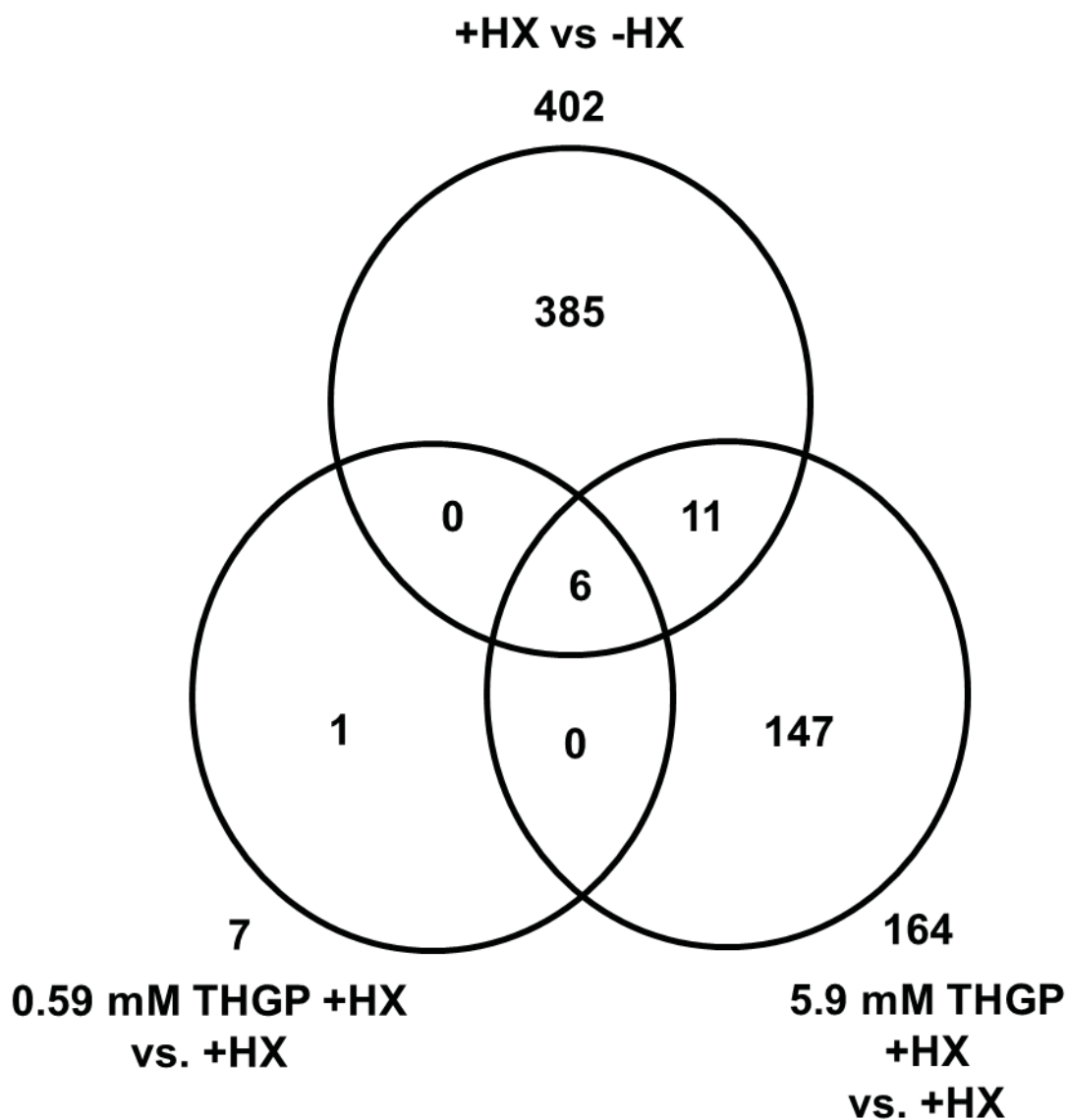


図 21 酸化ストレスおよび THGP 処理による NHDF 細胞の発現変化した遺伝子数

酸化ストレス無処理群 (-HX)、酸化ストレス処理群 (+HX)、0.59 mM THGP-酸化ストレス処理群 (0.59 mM THGP +HX)、5.9 mM THGP-酸化ストレス処理群 (5.9 mM THGP +HX) の群間比較をし、発現が 2 倍以上変動した遺伝子数をベンダイアグラムで示した。

表 1 酸化ストレスおよび 5.9mM THGP で処理し、2 倍以上発現変動した遺伝子（17 個）

Probe ID	Gene Symbol	Public ID	Gene Name	Fold changes in gene expression		
				+HX vs -HX	0.59 mM THGP vs +HX	5.9 mM THGP vs +HX
204622_x_at	NR4A2	NM_006186	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	3.84	0.10	0.12
216248_s_at	NR4A2	S77154	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	4.00	0.13	0.13
204621_s_at	NR4A2	AI935096	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	3.57	0.13	0.13
205207_at	IL6	NM_000600	interleukin 6	3.01	0.44	0.36
209774_x_at	CXCL2	M57731	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	5.85	0.42	0.39
219228_at	ZNF331	NM_018555	zinc finger protein 331	5.14	0.37	0.41
202340_x_at	NR4A1	NM_002135	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	2.26	0.54	0.48
209324_s_at	RGS16	BF304996	regulator of G-protein signaling 16	8.62	0.70	0.48
220987_s_at	AKIP1	NM_030952	A kinase (PRKA) interacting protein 1	4.33	0.68	0.50
205925_s_at	NUAK2		NUAK family, SNF1-like kinase, 2			
220253_s_at	RAB3B	NM_002867	RAB3B, member RAS oncogene family	0.33	1.90	2.16
215092_s_at	LRP12	NM_013437	low density lipoprotein receptor-related protein 12	0.47	1.62	2.18
220342_x_at	NFAT5	AJ005683	nuclear factor of activated T-cells 5, tonicity-responsive	0.23	1.59	2.41
211380_s_at	EDEM3	NM_017992	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 3	0.33	1.19	2.59
220484_at	PRKG1	D45864	protein kinase, cGMP-dependent, type I	0.46	1.62	2.60
201856_s_at	MCOLN3	NM_018298	mucopolip 3	0.48	1.31	2.77
211090_s_at	ZFR	BC000376	zinc finger RNA-binding protein	0.47	1.99	2.97
	PRPF4B	Z25435	pre-mRNA processing factor 4B	0.38	1.29	5.01

表 2 酸化ストレスおよび 5.9mM THGP で処理し、2 倍以上発現変動した遺伝子（17 個）のクラスター解析結果

Gene Ontology (GO) term	Genes altered by 5.9 mM THGP	P-value	Genes			
GO:0045444 fat cell differentiation	3	0.010	IL6	NR4A1	NR4A2	
GO:0016477 cell migration	5	0.011	IL6	NR4A1	NR4A2	CXCL2 PRKG1
GO:0071383 cellular response to steroid hormone stimulus	3	0.015	IL6	NR4A1	NR4A2	
GO:0060326 cell chemotaxis	3	0.016	IL6	NR4A1		CXCL2
GO:0048870 cell motility	5	0.016	IL6	NR4A1	NR4A2	CXCL2 PRKG1
GO:0051674 localization of cell	5	0.016	IL6	NR4A1	NR4A2	CXCL2 PRKG1
GO:0071375 cellular response to peptide hormone stimulus	3	0.021	IL6	NR4A1	NR4A2	
GO:1901700 response to oxygen-containing compound	5	0.022	IL6	NR4A1	NR4A2	CXCL2 EDEM3
GO:1901653 cellular response to peptide	3	0.024	IL6	NR4A1	NR4A2	
GO:0040011 locomotion	5	0.026	IL6	NR4A1	NR4A2	CXCL2 PRKG1
GO:0033993 response to lipid	4	0.027	IL6	NR4A1	NR4A2	CXCL2
GO:0048545 response to steroid hormone	3	0.034	IL6	NR4A1	NR4A2	
GO:0043434 response to peptide hormone	3	0.039	IL6	NR4A1	NR4A2	
GO:0006928 movement of cell or subcellular component	5	0.043	IL6	NR4A1	NR4A2	CXCL2 PRKG1
GO:0045944 positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	4	0.043	IL6	NR4A1	NR4A2	
GO:1901652 response to peptide	3	0.046	IL6	NR4A1	NR4A2	NFAT5

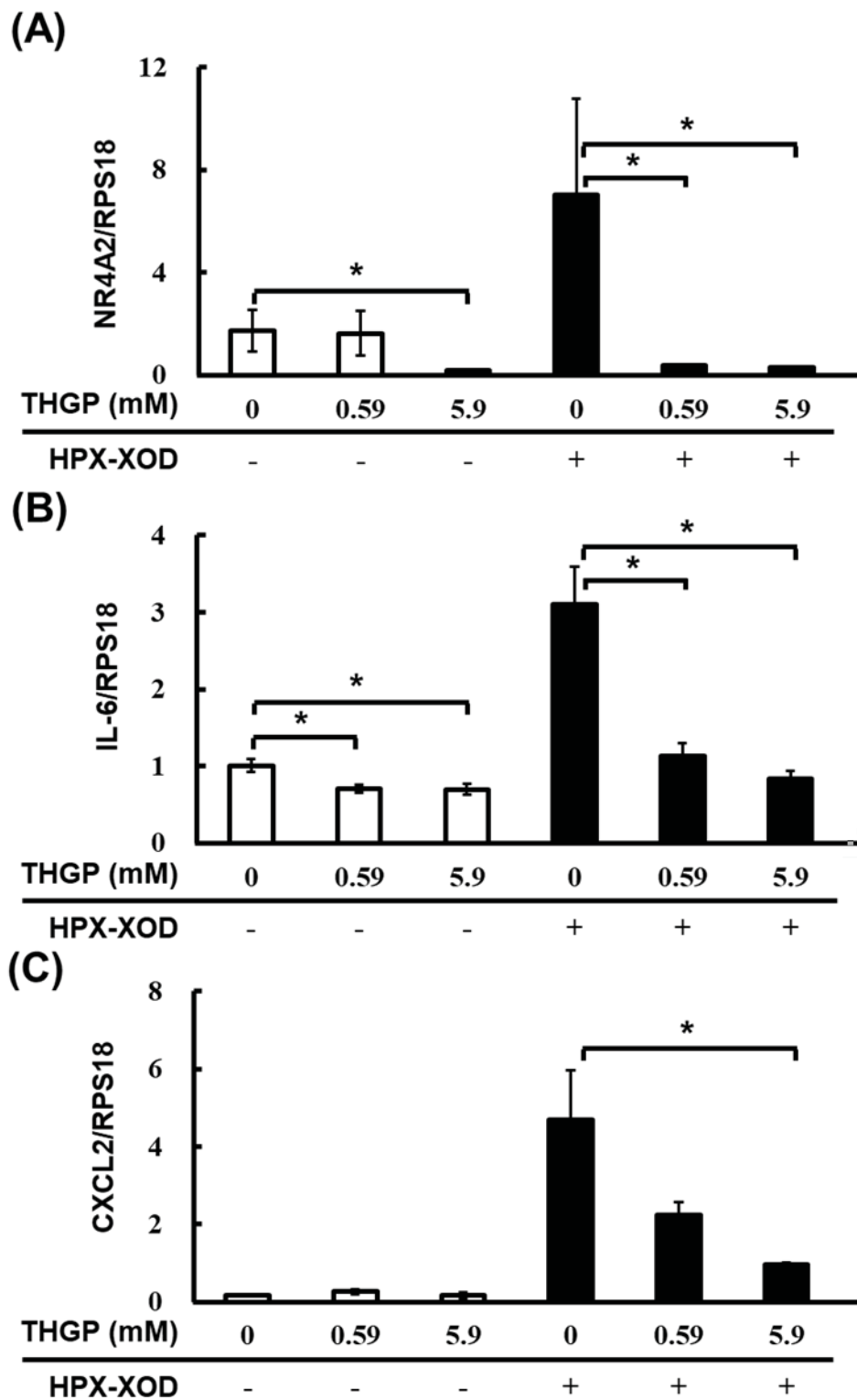


図 22 酸化ストレス及び THGP 処理による NHDF 細胞の NR4A2、IL6、CXCL2 遺伝子発現の変化
NR4A2 (A)、IL6 (B)、CXCL2 (C) の遺伝子発現変化を示す。RPS18 遺伝子を内部標準として用いて発現量を補正した。個体数 N=5-6。

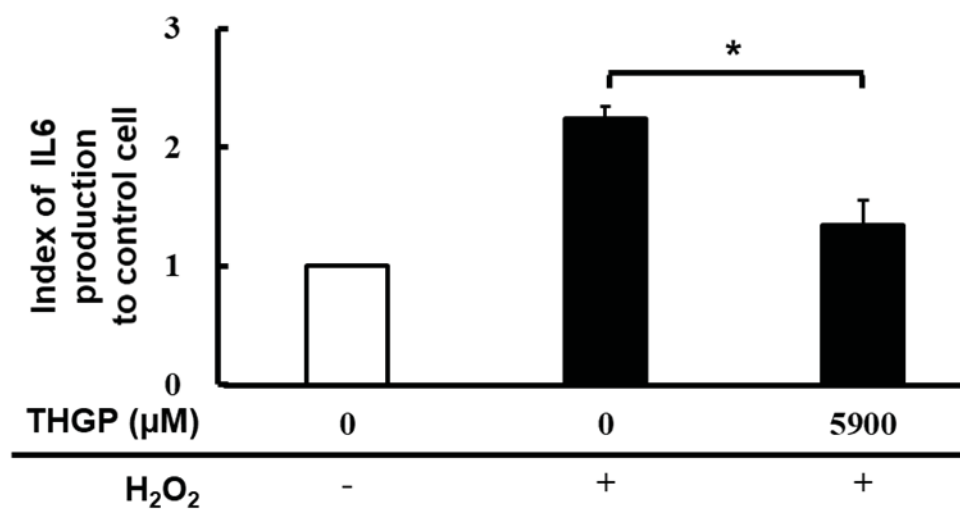


図 23 酸化ストレスおよび THGP 処理による培養上清中に放出された IL6 量
 酸化ストレスおよび THGP 処理によって培養上清中に放出された IL6 量を示す。値は生細胞率で補正した。個体数 N=6-8。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名	武田 知也
審 査 委 員	主査：教授 麻生 久 副査：教授 種村 健太郎 教授 白川 仁
学 位 論 文 題 目	有機ゲルマニウム化合物 Ge-132 による生体内抗酸化誘導効果の解明
論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨	
<p>有機ゲルマニウム化合物 (Ge-132: poly-trans-[(2-carboxyethyl) germasesquioxane]) の結晶は Ge と酸素原子が 6 個ずつ Ge-O 結合で 12 員環の構造を形成してシート状のポリマー構造をとるが、加水分解を受けると Ge-O の結合が切断され、Ge に水酸基が 3 つとカルボン酸が結合した 3-(trihydroxygermyl) propanoic acid (THGP) のモノマー構造をとる。Ge-132 は経口摂取したおよそ 20-30%が腸管より吸収され、48 時間後にはほぼ全量が排出されて体内に残存することはない。Ge-132 の生理作用としては、宿主の免疫賦活作用、抗酸化作用、鎮痛作用、火傷の痛み緩和と水疱形成阻害などの報告されている。また、Ge-132 はシスジオール構造をもつ物質と錯体形成し、アデノシンデアミナーゼ酵素によるアデノシン基質分解反応の阻害、ATP 作動性チャネルのカルシウムイオン流入の阻害、糖異性化反応の促進などの作用等の報告がある。本研究では Ge-132 の生理作用を明らかにする目的で、経口摂取による糞便色素の変化機構および抗酸化能の誘導効果の解明および皮膚における抗酸化作用機構解明の研究を行った。</p> <p>本研究では、Ge-132 の経口摂取による赤血球代謝亢進作用および生体内抗酸化誘導効果の解析を行い、1) Ge-132 摂取で生じる糞便の色の変化は赤血球代謝色素のステルコビリノーゲンおよびステルコビリンの増加することが要因である。2) Ge-132 摂取により糞便中の色素の増加に伴って抗酸化能力が増加する。3) Ge-132 の体内への吸収は経口摂取に加えて皮膚からも吸収されることを発見し、皮膚繊維芽細胞において細胞の核内まで入り込むことが明らかにした。4) THGP は酸化ストレスによる細胞死誘導遺伝子および炎症性関連遺伝子の発現を抑制して細胞の生存率を高めることを発見した。5) 細胞死抑制メカニズムは酸化ストレス自体の軽減ではなく、細胞自身の防御メカニズムの活性によることを明らかにした。これらの研究成果によって、これまでほとんど報告がなかった有機ゲルマニウム化合物 Ge-132 に関する新たな知見が得られた。</p> <p>本研究より得られた知見は、生体内の抗酸化機構の全容を解明する手掛かりとなり、本研究領域の進展に大きく貢献をもたらすことが大いに期待される研究であることを高く評価し、審査員一同は、本研究成果が博士(農学)の学位を授与するに値する研究であると認定した。</p>	