

日本財団補助金による

1999 年度日中医学協力事業報告書

— 中国人研究者・医療技術者招聘助成 —

財団法人 日 中 医 学 協 会

理 事 長 中 島 章 殿

2000 年 3 月 8 日

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文等のコピーを添付

1. 招へい責任者 近藤 隆 
- 所属機関 富山医科大学医学部 職名 教授
- 所在地 〒930-0194 富山市杉谷2630 電話 076-434-7265
- 招へい研究者氏名 李 富 君
- 所属機関 中国医科大学公共衛生学院労働衛生学教授 職名 講師
- 研究テーマ 環境毒性物質によるアポトーシスの分子機構

2. 日本滞在日程

1999年9月1日～2000年8月31日 本学医学部
放射線基礎医学講座にて研究に従事。
この間 2000年6月17, 18日 明治大学リバティホール
で開催される第22回磁気共鳴医学会・第4回SFRR Japan
合同学会に発表予定

3. 研究報告

別紙書式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当っては、日中医学協会—日本財団補助金による旨を明記して下さい。

研究テーマ 環境毒性物質によるアポトーシスの分子機構

来日研究者氏名 李 富君

中国での所属・役職 中国医科大学公共衛生学院労働衛生学教室・講師

招聘者氏名・所属・役職 近藤 隆

富山医科薬科大学医学部放射線基礎医学講座・教授

要旨

フリーラジカルを誘発する物理・化学的因子が遺伝毒性を示すことは知られているが、アポトーシス誘発の機構についてはかならずしも十分に解明されているとはいえない。本研究では温度依存性にフリーラジカルを生成するアゾ化合物 (AAPH, 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride) のアポトーシスに及ぼす影響について検討した。フリーラジカル生成を電子スピン共鳴-スピン捕捉法で測定したところ、その生成量はAAPH濃度、処理時間、および温度に依存して増加した。ヒト白血病細胞株 U937を用いて、アポトーシス動態 (形態学的変化、DNA断片化、ホスファチジルセリン発現)、アポトーシス関連蛋白質発現、ミトコンドリア膜電位、脂質過酸化、および細胞増殖速度について調べたところ、温熱処理(44℃, 10分) 6時間後のアポトーシス発現は温熱単独処理では僅かであったが、AAPH併用により顕著に増加した。また、併用により脂質過酸化量は増加し、ミトコンドリア膜電位の低下は促進し、細胞増殖の遅延が観察された。以上の結果はフリーラジカル生成による脂質過酸化およびミトコンドリア損傷がアポトーシスの原因となることを示唆した。

KEY WORDS アポトーシス、アゾ化合物、フリーラジカル毒性、脂質過酸化

研究報告

目的

環境汚染化学物質の生物学的毒性の特徴として、極微量で作用するため、検出の困難さから、広範な人々が知らないうちに長期間の暴露を受けた後、その影響が発現することが懸念されている。特に極めて低濃度で内分泌機構を攪乱するという観点から生殖毒性の研究が進んできた。一方、生殖細胞以外での細胞毒性に関する研究は必ずしも多くなく、環境汚染化学物質の生体影響を考えると、生殖細胞以外の細胞毒性の検討も必須と思われる。

アポトーシスは遺伝子で制御された能動的細胞死で形態形成、生体制御、生体防御の3点で極めて重要な働きをしており、その破綻は多くの疾患を引き起こすことが知られている。アポトーシスの分子機構は現在急速に進みつつあり、FasやTNF等受容体を仲介するアポトーシス機構については詳細が解明されてきたものの、物理・化学的因子によるアポトーシス機構については未だその解明が進んでいるとはいえない。環境毒性物質にはフリーラジカルを生成する化学物質があり、フリーラジカル生成が多くの細胞傷害を引き起こすことが知られているものの(1)、アポトーシスへの影響は未だ十分に解明されていない。

そこで、本研究では特に温度依存性にフリーラジカルを生成するアゾ化合物2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), のアポトーシスに及ぼす影響について検討し、アポトーシスを細胞毒性の指標とし環境汚染化学物質の評価に役立てることおよび併せてそのアポトーシスの分子機構を解明することを目的とする。

方法

細胞培養と薬剤処理

アポトーシスを検討するためのモデル細胞としてヒト組織球性リンパ腫細胞株U937を用いた(2)。細胞は10%牛胎児血清を添加したRPMI1640培地にて、37°C, 5%CO₂条件で維持培養された。AAPHは使用前に10%牛胎児血清を添加したRPMI1640培地に溶解され、温熱処理直前に細胞に加えられた。細胞増殖の測定については経時的に細胞数を血球計算盤で測定した。

温熱処理

温熱処理は細胞浮遊液(3 ml)を所定の温度に設定した恒温水槽に浸漬することで行われた。試料の温度は熱電対を装着したデジタル温度計(YOKOGAWA 7563)で測定された。

フリーラジカル生成の測定

AAPHが熱分解されて生じるフリーラジカルはスピン捕捉法で調べられた。電子スピン共鳴装置としてラジカルリサーチ社製RFR-30, Free Radical Analyzerを用いた。スピン捕捉剤として5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO)およびN-tert-butyl-phenylnitron (PBN)を用いた(3)。

アポトーシスの検出

アポトーシスにともなう細胞核の形態学的な変化はギムザ染色された標本の光学顕微鏡による観察により調べられた。DNAの断片化については細胞からDNAを抽出し、アガロースのゲル電気泳動によって検出した。DNAの断片化の定量はSellins およびCohenの方法(4)により、13,000 g 遠心後の上清および沈殿物のDNA量を化学的定量し、(上清の吸光度/上清の吸光度+沈殿物の吸光度) X 100により計算した。細胞膜表面へのホスファチジルセリン発現はFITC標識したAnnexin-Vで染色した細胞を、また、ミトコンドリア膜電位の変化については3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC₆(3))で染色した細胞をフローサイトメータで調べた。アポトーシス関連蛋白質発現についてはWestern ブロット法で調べた。

脂質過酸化の測定

脂質過酸化については細胞あるいは細胞培養液中のチオバルビツール酸反応物質を生化学的に定量した。

細胞内 Ca²⁺ 濃度の測定

Fura 2-AMを負荷した細胞について蛍光画像解析装置 (Argus 50/CA)で検討した。方法の詳細は既報に従った(5)。

結果

1. フリーラジカル生成の測定

AAPHが熱分解されて生じるアルコキシルラジカルはスピン捕捉法で調べられた。スピン捕捉剤としてDMPOを用いて付加体を調べたところ、図1(a)に示すESRスペクトルがまたPBNを用いた場合には図1(b)に示すESRスペクトルが得られた。ラジカル付加体の生成量はAAPH濃度、処理時間、および温度に依存して増加した。酸素を除い

たAr存在下で実験を行った場合には両スペクトルとも形は変わらないが、ラジカル付加体の生成量は減少した。

2. アポトーシスの検出

アポトーシスにともなう細胞核の形態学的を光学顕微鏡により観察したところ、温熱処理(44℃, 10分)で核の形態変化の割合が僅かに増加するが、AAPHおよび温熱併

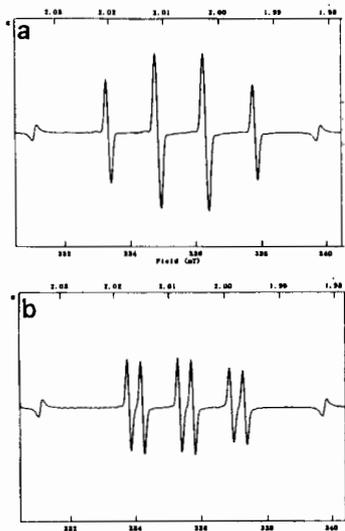


図1. DMPO (a)およびPBN (b)を用いて得られたESRスペクトル。

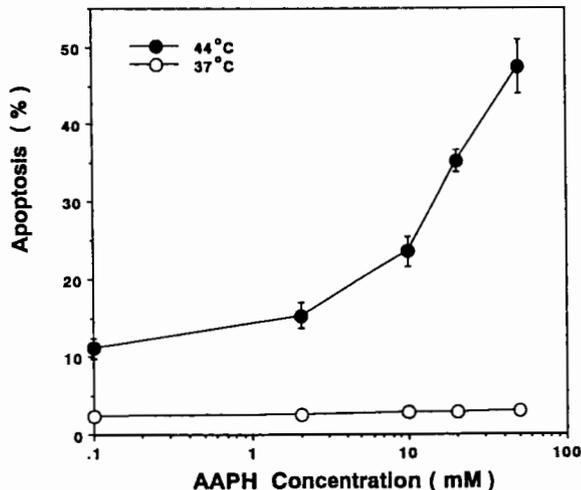


図2. AAPH濃度と核の形態学的変化を指標にして調べたアポトーシス誘発率との関係。

用群でその割合は濃度に依存して増加した(図2)。DNAのアガロースゲル電気泳動の結果においてAAPHおよび温熱併用群でより明瞭なDNAラダーが認められた。DNAの断片化を定量したところ、アポトーシスの変化と同様に温熱併用群で濃度依存性に増加した(図3)。フローサイトメータによる解析の結果ではFITC標識Annexin-Vでのみ染色される早期アポトーシス細胞の割合は10 mMのAAPHと温熱の併用群で有意に増加し、50 mMの併用群でさらに顕著となった。Western プロット法の結果はBcl-2の発現の低下およびBaxの発現上昇を示した(図4)。また、ミトコンドリア膜電位の変化を

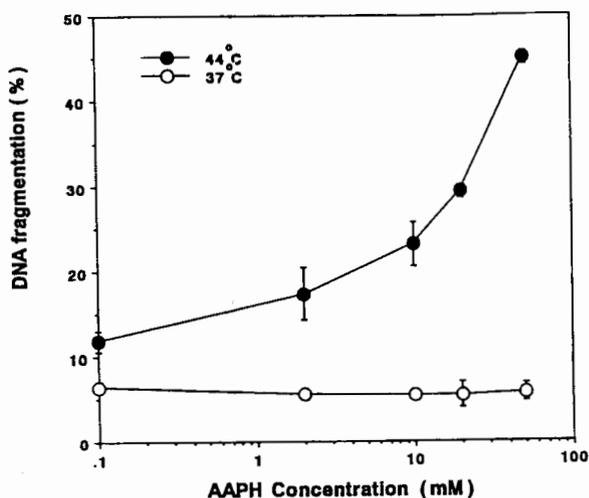


図3. AAPH濃度とDNA断片化の誘発率との関係。

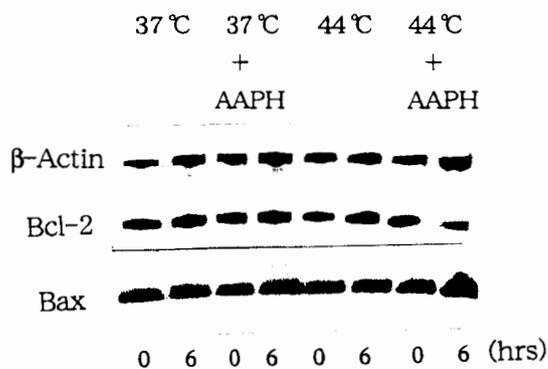


図4. Westernプロットによる蛋白質発現。

調べたところ、AAPHと温熱の併用群で顕著な低下を認めた(図5).

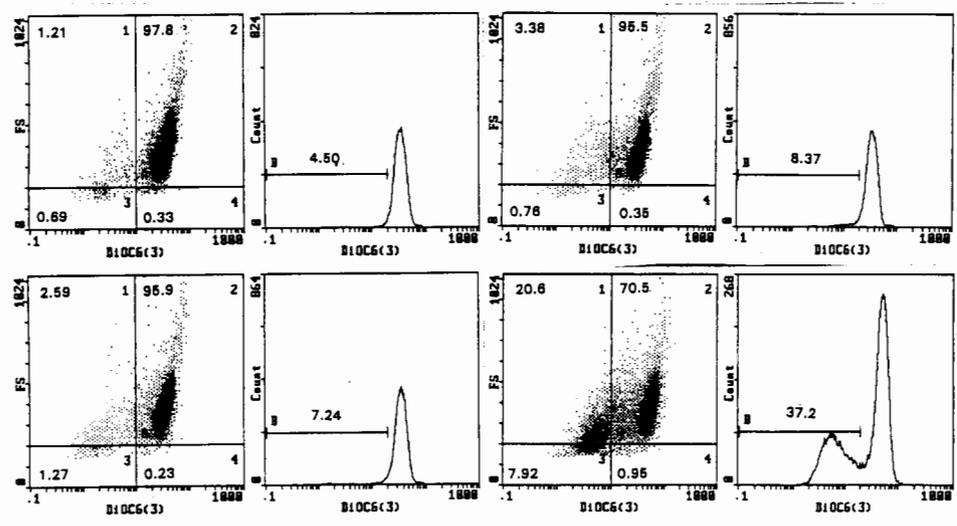


図5. ミトコンドリア膜電位の変化 (左上、37°C対照群、右上、37°C+AAPH、左下、44°C対照群、右下、44°C+AAPH)

3. 脂質過酸化の測定

脂質過酸化について、細胞あるいは細胞培養液中のチオバルビツール酸反応物質、マロンジアルデヒド(MDA)量を定量したところ、細胞内量の変化は僅かであった。一方、総量は加温6時間後 1.32 ± 0.07 (nM, 平均値 \pm SD, n=3)であり、AAPH単独処理群で 1.50 ± 0.05 、温熱処理群で 1.54 ± 0.08 と増加し、両者併用で顕著に増加した (1.93 ± 0.04).

4. 細胞内Ca²⁺濃度の測定

細胞内Ca²⁺濃度 (340 nm/380 nm蛍光比) を単一細胞について測定し、その分布を調べたところ、AAPHと温熱の併用群で細胞内Ca²⁺濃度の高い細胞が増加した(図6).

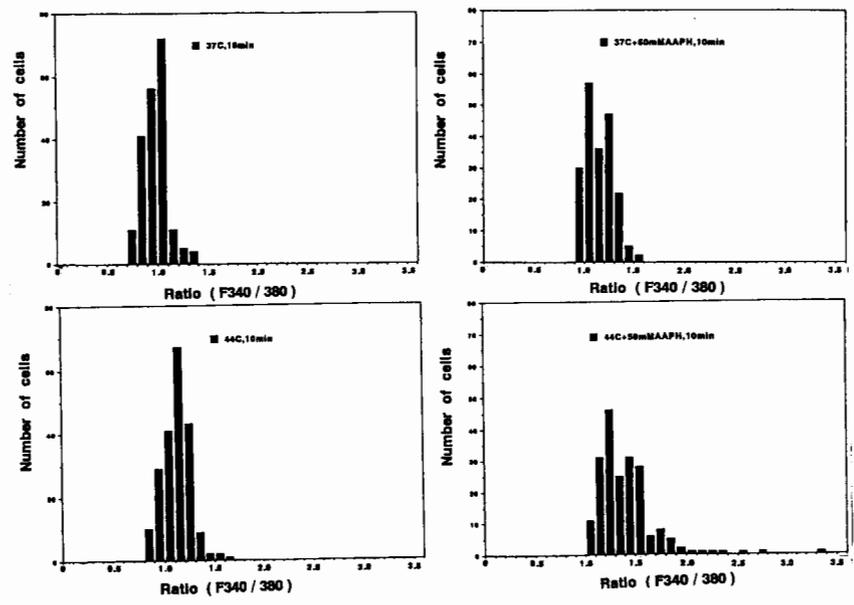


図6. 細胞内Ca²⁺濃度の分布 (左上、37°C対照群、右上、37°C+AAPH、左下、44°C対照群、右下、44°C+AAPH).

5. 細胞増殖の測定

細胞数の経時的変化を調べたところ、AAPH単独処理、温熱処理(44℃, 10分) 群は対照群と同様の細胞増殖を示したが、両者併用で顕著な細胞増殖の遅延を認めた。

考察

アポトーシスは遺伝子制御された自発的細胞死であり、多くの疾患に関係することが知られているが、環境毒性化学物質や重金属イオンによるアポトーシスの研究例は少なく、その機構はまだ不明な点が多く残されている。本研究では第一に温度依存性にフリーラジカルを生成するアゾ化合物AAPHのアポトーシスに及ぼす影響について検討した。AAPHは温度に依存して自発的に分解し、アルコキシルラジカルを生成する化学物質であり、温熱併用により細胞毒性を増強することが報告されている(6)。温熱処理(44℃, 10分) と併用することにより、6時間後に観察される早期アポトーシス発現を顕著に増強した。併用により脂質過酸化量は増加し、ミトコンドリア膜電位の低下は促進し、細胞増殖の遅延が観察された。また抗アポトーシスタンパク質であるBcl-2発現の低下およびアポトーシス誘導タンパク質Baxの発現上昇も認めた。また、細胞内Ca²⁺濃度の増加も認めた。結果はフリーラジカル生成による膜の脂質過酸化およびミトコンドリア損傷がアポトーシスの原因となることを示唆された。

また、同様の細胞を用いてイタイイタイ病の原因とされるカドミウム誘発アポトーシスについても検討した。その結果、DNA断片化は濃度依存性に誘発された。時間的には処理後6時間、70 μMの濃度で最もアポトーシスが誘導され、その後あるいはそれ以上の濃度では二次的ネクロシスとなった。各種阻害剤を用いた検討ではCa²⁺チャネルブロッカーであるベラパミール、カルパイン阻害剤I、カスパー3および8の阻害剤が抑制効果を示した。細胞外液のCa²⁺を除いた条件でカドミウム処理すると細胞内Fura 2の蛍光強度の高い細胞の割合が増えるが、ベラパミール処理によりその増加は抑制された。ミトコンドリアの膜電位の変化を検討したところ、アポトーシス発現に伴い膜電位の低下が認められ、また抗アポトーシスタンパク質であるBcl-2発現の低下も認めた。現在まで得られた結果より、カドミウムイオンは電位依存性Ca²⁺チャネルを経て細胞内に蓄積し、カスパー8活性化→ミトコンドリア損傷→カスパー3活性化経路およびCa²⁺増加によりカルパインが活性化される経路によりアポトーシスが誘発される可能性が示された。

以上の如く、環境汚染化学物質や重金属イオンは細胞内情報伝達機構に大きな影響を与え、アポトーシスを誘導する。アポトーシスは早期に発現する細胞死であり、その検出系も進歩してきた。今後選択的情報伝達機構を有するモデル系を用いることにより環境毒性物質の迅速評価の指標としてアポトーシスの利用が可能になると思われる。

謝辞

本研究実施にあたっては日中医学協会-日本財団補助金の援助受けました。また、放射線基礎医学教室 趙 慶利博士、田邊清司博士、公衆衛生学教室 加須屋 実教授、李 民氏、荒井陽子氏には実験遂行にあたり多くの協力を得ました。ここに感謝申し上げます。

文献

- (1) Halliwell ,B. and Gutteridge J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford: Clarendon Press; 1989.
- (2) Kimura, C., Zhao, Q.-L., Kondo, T. et al. Exptl. Cell Res. 239: 411-422; 1998.
- (3) Riesz, P. and Kondo, T. Free Radical Biol. Med. 13:247-270; 1992.
- (4) Selins, K. S. and Cohen, J. J. J. Immunol. 139: 3199-3206; 1987.
- (5) Kondo, T., Kano, E., Habara, Y. et al. Cell Calcium 14: 621-629; 1993.
- (6) Krishna, M. C., Dewhirst, M. W., Friedman, H. S. et al. Int. J. Hyperthermia 10: 271-281; 1994.