

磁気共鳴と医学

VOL. **13** **2002**

MAGNETIC RESONANCE IN MEDICINE

編集 **大和田 滋**

吉川 敏一

執筆者名

表題

日本医学館

βアミロイドタンパクによる培養細胞系 でのラジカル発生

林 要人¹、植田 勇人¹、中島 暉²、横山 秀克³、
大矢 博昭³、鎌田 仁³、三山 吉夫¹

¹)宮崎医科大学精神医学講座、²)宮崎医科大学化学、³)生物ラジカル研究所

Free radical generation from PC12 cells by beta amyloid peptide stimulation

Yoshihito Hayashi¹), Yuto Ueda¹), Akira Nakajima²), Hidekatsu Yokoyama³),
Hiroaki Ohya-Nishiguchi³), Hitoshi Kamada³), Yoshio Mitsuyama¹)

1)Dept. of Psychiatry, 2) Dept. of Chemistry, Miyazaki Med. College 5200 Kihara,
Kiyotake, Miyazaki 889-1692, Japan 3) Div. of ESR tech., Inst. for Life Support Tech.,
Yamagata Tech. Foundation, 2-2-1 Matsuei, Yamagata 990-2473, Japan

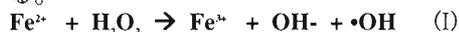
There is few direct electron paramagnetic resonance (EPR) evidence of supporting the hypothesis of lipid peroxidation induced by beta amyloid. Hence in this study EPR measurement was performed in the cultured PC12 cells using two kinds of spin trapping agents (DMPO, POBN) to test the hypothesis. Spin adduct of DMPO in the cells stimulated by beta amyloid (25-35 400uM) revealed characteristically four line spectra, for which the hfc were aN=14.9G and aH=14.9G; its hfc were corresponded to DMPO-OH. The EPR signal from the PC12 cells cultured with beta amyloid were characteristically six-line spectra, for which the hfc were aN=15.7G and aH=2.5G; its hfc were corresponded to that of lipid radical. This study presents the direct EPR evidence of hydroxyl radical formation in PC12 cell cultured with beta amyloid 25-35 peptide. Generation of hydroxyl radical results in abstraction hydrogen from polyunsaturated lipid acid, and plays a causative role in lipid peroxidation. This result might be important evidence of initiation of lipid peroxidation and the growing lipid peroxidation in the cascade of neurotoxicity induced by beta amyloid 25-35 peptide.

KEY WORDS

Beta amyloid peptide, PC12 cell, lipid peroxidation,
hydroxyl radical, lipid radical

【緒言】

アルツハイマー病(AD)は進行性の認知障害によって特徴付けられる痴呆性疾患の代表であり、著しい神経細胞脱落と多数の神経原線維変化、老人斑などの神経病理学的所見を示す。ADの原因としては老人斑に存在するベータアミロイド蛋白(以下A β)による神経細胞毒性が考えられている。A β の毒性機構にはフリーラジカルや酸化ストレスの関与が挙げられているが^{1,7)}、A β のラジカル発生機構については尚も不明な点が多く異なる仮説が提唱されている^{8,9)}。A β のラジカル産生機構としては、式(I)で示されるFenton反応が有力視されている。この反応系では、鉄(II)がH₂O₂により化学量論的に酸化され鉄(III)となりhydroxyl radical(•OH)を産生するものである。



細胞内では内在性の還元剤により鉄(III)から鉄(II)へのレドックスサイクルの存在があり、上記Fenton反応を促している。AD脳における老人斑や神経原線維変化には鉄(II)/IIIが存在することが確かめられており、それら遷移金属に関連したAD脳における病的代謝過程の変化も報告されている^{7,10)}。AD脳における神経細胞脱落過程や老人斑、神経原線維変化の形成過程では細胞障害性に働くラジカル種が産生されている可能性がある。これまでのA β を用いた実験系に於いて直接的にその細胞毒性に寄与するフリーラジカルを捕らえたものは今までのところ認めないため今回我々はElectron Paramagnetic Resonance (EPR)法を使用しフリーラジカル捕捉剤として5,5'-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO), alpha-(4-pyridyl)-1-oxide-N-tert-butyl nitron (POBN)を用いて検討した。

【方法】

2-1. 試薬

A β 25-35 peptideはペプチド研究所より購入した。agingを行うために4mM水溶液を作成し、37°Cのインキュベーターにて6日間放置した後各実験に使用した。DMPOはLabotecより購入した。POBN, Propidium Iodide(PI)はSigmaより購入した。

2-2. 培養細胞

rat pheochromocytoma cell(PC12細胞)はYoshidaら¹¹⁾の方法にて培養、継代した。培地にはDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Fe(NO₃)₃ 0.25 μ M 含有)に7% fetal bovine serum (FBS), 7% horse serum(HS), 1 μ g/ml penicillin, 1 μ g/ml streptomycinを加えた培地で37°C、5%CO₂インキュベーターにて培養し、実験に使用する直前にDMEM中に懸濁さ

せそれぞれの実験に使用した。非刺激 control 群(DMEM-A)とA β 刺激群(DMEM-B)を作成した。A β 刺激群ではA β の最終濃度が0.4mMとなるようにDMEMを調整した。非刺激control群ではA β 無添加のDMEMを使用した。それぞれを96穴の培養皿に100 μ lずつ播き(細胞数各10⁴~10⁵個/well, 各群 n=6) 37°C, 5%CO₂ インキュベーターで24時間培養した。実験前にPC12細胞は0.4% trypan blue生食液にて細胞数を計測した。

2-3. hydroxyl radical(•OH)の捕捉

各群24時間培養後、各sampleに100 μ lの20mM DMPO (LABOTEC, Japan)を添加し混和後、石英製のflat cell(LLC-04B, LABOTEC, Japan)に移しX帯域でEPR測定(JEOL TE-100)した。また•OHの活性を確認するため上記各sampleを50 μ lずつに分け1つのsampleにつき100%メタノールを1 μ lを加えるものと1 μ lの純水を加えるものを作成し、各々に50 μ l 20mM DMPOを添加し混和後同様の測定を行った。EPR測定は以下の条件で施行した。静磁場強度, 3354 G; 共振周波数, 9.42381GHz; micro波電力, 8 mW; 磁場掃引幅, 100G; 磁場掃引時間, 480秒; 磁場変調幅, 1.25G, gain 2500倍

2-4. lipid radical(•L)の捕捉

•Lを捕捉する方法はUedaら¹²⁾の方法を用いた。各群24時間培養後、各sampleに100 μ lの500mM POBN (Sigma, Aldrich)を添加し混和後、石英製のflat cell (LLC-04B, LABOTEC, Japan)に移しX帯域でEPR測定(JEOL TE-100)した。POBN-Lのspin adductのpositive controlとしてはlinoleic acid(LA)をlipoxygenase (LPO)で酸化して脂肪酸radicalを産生させるLPO/LA系を用いた¹³⁾。EPR測定は以下の条件で施行した。静磁場強度, 3354 G; 共振周波数, 9.42381GHz; micro波電力, 8 mW; 磁場掃引幅, 100G; 磁場掃引時間, 480秒; 磁場変調幅, 1G, gain 2500倍

2-5. Propidium iodide (PI)蛍光染色

A β による細胞膜の壊死性変化を捕らえるため10穴のガラスプレートに1x10⁵個/wellになるようにPC12細胞を播きDMEM-A, -Bにて24時間培養した。その後細胞は10mM PBS溶液にて調整したPI溶液(5 μ g/ml)で染色し蛍光顕微鏡下で形態の観察を行った。

【結果】

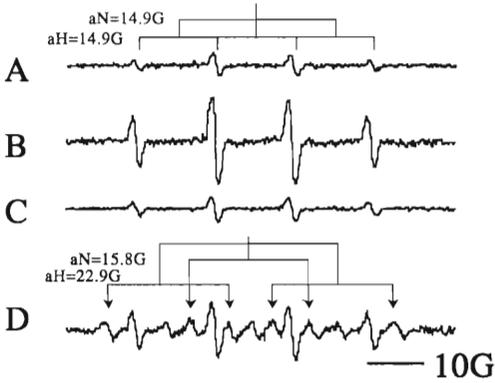


Fig.1 Hydroxyl radical generated from PC12 cells stimulated by 0.4mM A β 25-35

- A; PC12 cells +DMEM
- B; PC12 cells cultured with A β /DMEM
- C; PC12 cells +DMEM+MTOH
- D; PC12 cells cultured with A β /DMEM+ MTOH

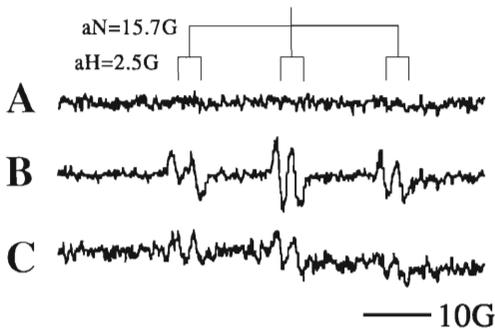


Fig.2 Lipid radical generated from PC12 cells stimulated by 0.4mM A β 25-35

- A; Non-stimulated PC12 cells
- B; PC12 cells stimulated by 0.4mM A β 25-35
- C; Positive/control of lipid radical generated from saline containing lipoxygenase/linoleic acid system

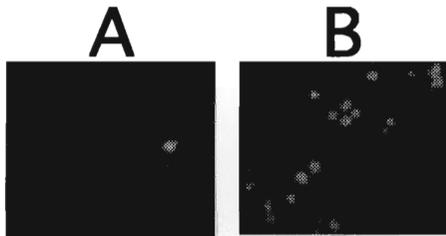


Fig.3 PI staining of PC12 cells stimulated by 0.4mM A β 25-35 magnitude X400

- A; Non-stimulated PC12 cells
- B; PC12 cells stimulated by 0.4mM A β 25-35

Fig. 1 は $\bullet\text{OH}$ が捕捉されたEPR signalの結果である。Fig. 1A はPC12細胞をDMEM-Aで培養したもので、Fig. 1BはPC12細胞を0.4mM A β 25-35を含むDMEM-Bにて培養した結果である。両者共に $a_N=14.9\text{G}$, $a_H=14.9\text{G}$ の超微細構造を有するためDMPO-OHのアダクト信号であると同定された。しかし、活性を有する $\bullet\text{OH}$ が生成していることを確かめるために、両グループの培養液にメタノールを添加した。A β を加えて培養したPC12細胞からは、 $\bullet\text{OH}$ によりメタノールから水素の引き抜き反応の結果生じたと考えられる $a_N=15.8\text{G}$, $a_H=22.9\text{G}$ の超微細構造を有するcarbon centered radical, DMPO-CH₂OHのアダクト信号が認められた。このためPC12細胞にA β 25-35を加えて培養した時にのみ活性を持つ $\bullet\text{OH}$ が生成されていることが判明した。Fig. 2は $\bullet\text{L}$ が捕捉されたEPR signalの結果である。Fig. 2Bは0.4mM A β 25-35の刺激によりPC12細胞からPOBNにより得られたEPR スペクトルである。このスペクトルのアダクト信号は $a_N=15.7\text{G}$, $a_H=2.5\text{G}$ の超微細構造を有するため、脂肪酸radical($\bullet\text{L}$)のアダクト信号であると同定された。Fig.2Cはlinoleic acidをlipoxygenase で酸化して脂肪酸radicalを産生させたpositive controlの結果である。一方DMEM-A で培養したPC12細胞からはEPRスペクトルは得られなかった (Fig.2A)。Fig.3ではA β で刺激したPC12細胞では多くの細胞で核に細胞膜の障害の結果を示すものと考えられる蛍光反応が強く認められた (Fig.3B)。

【考察】

A β の細胞障害過程ではfree radicalが関与しているという報告¹⁷⁾があるが実際に強い活性を持つラジカル種をその系で捕らえたという報告はない。また、これまでのA β の神経細胞毒性に関する実験ではA β 自体がラジカル化し障害を引き起こすというものがあったが、実際にはA β はラジカル化はしないという報告もあり何がA β による細胞障害を引き起こすのかについては未だ一定の見解は得られてはいない^{8,9)}。我々の今回の実験ではA β のみではEPRにてラジカル反応を得ることができなかった。しかし、我々はA β を添加して24時間後には強い活性を持つhydroxyl radical、脂質膜の障害の結果生じたと考えられる脂肪酸radicalをEPRにより初めて捕らえることに成功した。これは、A β 自体がラジカル化しなくてもA β が細胞と、培養液中及び細胞中に含まれる微量金属元素と作用することにより細胞障害性の高いラジカル種を産生し、細胞毒性を呈することを示す一つの重要な証拠であると考

える。AD脳においては微量金属の蓄積が認められる状況^{7,10)}はAD脳ではPhenton反応が働きやすい環境にあり \bullet OHが生成しているものと考えられる。実際A β が細胞とどのように反応するのか詳しい経路は未だ不明であり、今後A β の反応経路についてより詳細な検討が必要と思われる。

【参考文献】

- [1] Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D. (1994) *Cell*, 77 817-827.
- [2] Cafe C, Torri C, Bertorelli L, Angeretti N, Lucca E, Forloni G, Marzatico F. (1996) *Neurosci. Lett.*, 203 61-65.
- [3] Harris ME, Hensley K, Butterfield DA, Leedle RA, Carney JM. (1995) *Exp. Neurol.*, 131 193-202.
- [4] Hensley K, Hall N, Subramaniam R, Cole P, Harris M, Aksenov M, Aksenova M, Gabbita SP, Wu JF, Carney JM, et al. (1995) *J. Neurochem.*, 65 2146-2156.
- [5] Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA, Markesbery WR. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 88 10540-3.
- [6] Smith MA, Perry G. (1995) *J. Neurol. Sci.*, 134 Suppl 92-94.
- [7] Smith MA, Harris PL, Sayre LM, Perry G. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 94 9866-9868.
- [8] Hensley K, Carney JM, Mattson MP, Aksenova M, Harris M, Wu JF, Floyd RA, Butterfield DA. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 91 3270-3274.
- [9] Turnbull S, Tabner BJ, El-Agnaf OM, Twyman LJ, Allsop D. (2001) *Free Radic. Biol. Med.*, 30 1154-1162.
- [10] Connor JR, Menzies SL, St Martin SM, Mufson EJ. (1992) *J. Neurosci. Res.*, 31 75-83.
- [11] Yoshida, I., Tashiro K., Monji A., Nagata I., Hayashi Y., Mitsuyama Y. and Tashiro N., (1999) *J. Cell Physiol.*, 179 18-28.
- [12] Yuto Ueda, H. Yokoyama, R. Niwa, R. Konaka, H. Ohya-Nishiguchi, H. Kamada, (1997) *Epilepsy Research* 26 329-333,
- [13] Connor, H.D., Fischer, V., Mason, R.P., (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 141 614-621.