

アポトーシス細胞死誘導と活性酸素生成との関わり

福井医科大学第一病理学講座

三好 憲雄

1 はじめに

最近、細胞の死に至るプロセスには、壊死 (Necrosis) とプログラム化されたアポトーシス死 (Apoptosis) と異なるタイプが存在すると言われ、特に後者に対する分子生物学的な研究が盛んになされています。従来の癌治療法のひとつである放射線療法でも白血病細胞が良くこのアポトーシス死の誘導を受けやすいと言われています。また、放射線照射による水分子の電離作用により水酸化 (OH) ラジカルが生成すると言われていたことから、OHラジカルが直接的あるいは間接的にアポトーシス細胞死を誘導する可能性があるように思われます。近年の健康食品の報道にも有りますように、種々の疾患を誘発する活性酸素種に対する消去剤つまり抗酸化剤が多く含まれている食品ほど重要視されています。逆に“毒を持って毒を制す”と言った具合に、癌治療にも活性酸素生成する治療法が適用され、その治療メカニズムも極く最近になり徐々に明らかになっ

て来ています。アポトーシス細胞死の誘導の掛かり安さは活性酸素の至適生成量つまり放射線の至適な照射量に依存しているのではないかとする予測で、本学RIのX線照射装置を使ってアポトーシス細胞死に関する若干の知見を得ましたので、この記念すべき創刊号に紹介します。

2 実験方法

①ヒト白血病由来培養細胞 (HL-525) に0.1 mMの5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を取り込ませたグループと含まないグループに対して、②X線をそれぞれ3 Gyと30 Gy照射群及び未照射群の細胞を24時間の培養後に、③アポトーシス細胞死特有の膜タンパク質であるAnnexin-Vに蛍光物質FITCをラベルした蛍光プローブとPropidium iodide (PI) の生体二重染色したサンプルをフローサイトメーターにて、二次元の解析データに文献に従ったゲートを掛けて、壊死 (Necro) とアポトーシス死 (Apo) の細胞の割合を求めました。また、④同じX線照射装置で同じ条件で照射した溶液内の相対的OHラジカル濃度を、OHラジカルの特異的補足剤DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide) のラジカル錯体DMPO-OHの電子スピン共鳴 (ESR) シグナル強度から求めました。

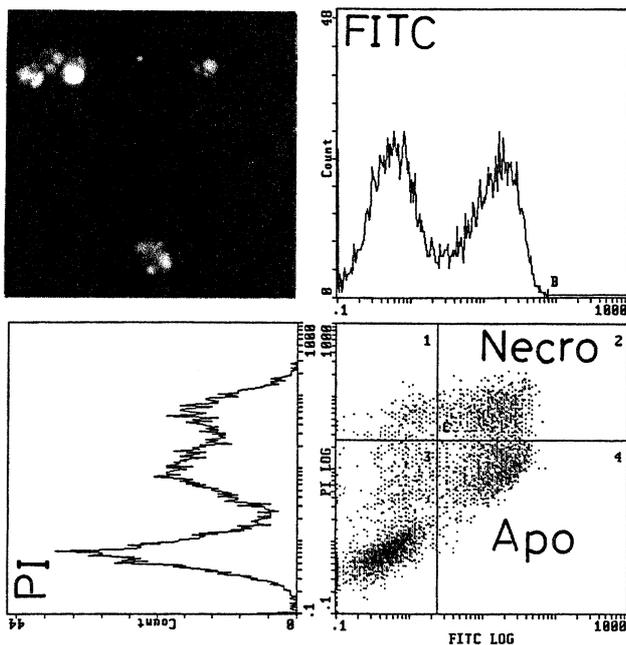


図1 フローサイトメーターの二次元グラフと各ヒストグラム及び蛍光顕微鏡写真

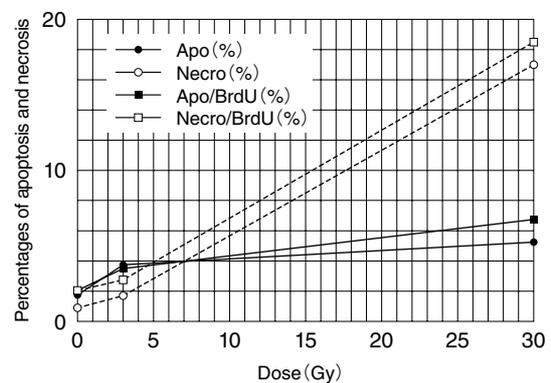


図2 壊死とアポトーシス死の割合の照射量依存性

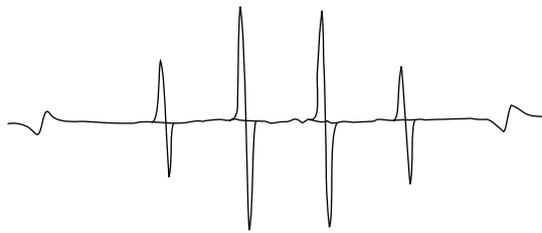


図3 OHラジカル錯体(DMPO-OH)のESRスペクトル

3 実験結果と考察

(1) フローサイトメーター分析の結果

図1で示す如く、Annexin-V/FITC(緑色蛍光=横軸)とPI(赤色蛍光=縦軸)の二次元グラフと蛍光の各ヒストグラフ及び蛍光顕微鏡写真が得られました。アポトーシス死に特徴の緑色蛍光のAnnexin-Vは壊死細胞にも同様に染まりますが、壊死の場合は細胞膜損傷のためPIの蛍光強度が強く示しますので区別できます。二次元のグラフを矩形で4分割したApoとNecroの表示領域の割合(縦軸)を、X線照射量(Dose: 0, 3, 30Gy:横軸)に対してプロットしますと図2のグラフになりました。壊死の細胞は照射量に対し直線的に増大しますが、アポトーシス死の方は3 Gy以上の量で飽和に達しています。また、どの場合も増感剤BrdUの共存の方が無い場合よりもやや増加傾向にありました。

(2) ESR計測の結果

照射したESRスペクトルは図3の如く、シグナル

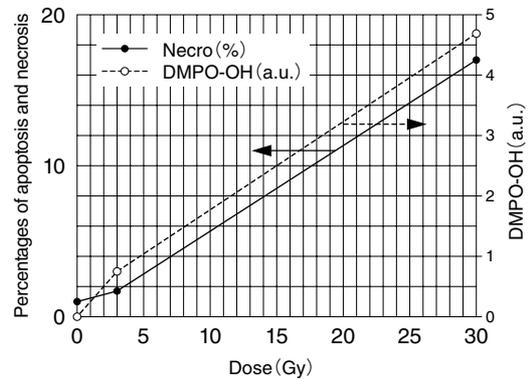


図4 壊死の割合と生成OHラジカル量の照射量依存性

強度比が1:2:2:1の特徴的OHラジカル錯体DMPO-OHのスペクトルでした。また、その相対シグナル強度(右側の縦軸)を照射量(横軸)に対してプロットすると図4の波線のように照射量に対して直線的増加を示しました。一方、このグラフに壊死(Necro)の割合(左側の縦軸)を再度プロットしますと、同様に直線的増加(実線)を示していますのでOHラジカルの増加と壊死の割合の増加は良い相関がありました。しかし、アポトーシス死の割合の方は、3 Gyで生成するミニマムのOHラジカル量(1 mM)で、ほぼ飽和に達することが分かりました。アポトーシス死には今回のように至適なOHラジカル量で十分誘導が可能ではないかと考えられました。

今後は、照射後経時的に壊死とアポトーシス死の割合の変動を検討予定です。この寄稿で、アポトーシス研究の良いきっかけが得られたことに感謝し、さらに本研究会の益々のご発展を祈念して、筆を置きます。