

光化学反応によるフリーラジカルの産生と 表皮培養細胞に対する影響

— Dithranol を例として

東京大学医科学研究所

金ヶ崎 士 朗

Radical species probably formed during autooxidation of dithranol, 1,8-dihydroxy-9-anthrone, are considered to be responsible for antipsoriatic effect of this drug. By using spin-trapping ESR spectroscopy, we investigated whether or not radical species, such as oxygen radical and organic radical, were generated in the presence of dithranol in organic solvent, in aqueous solution or after incorporation of the drug into keratinocytes. In DMSO, O_2^- was found to be formed from molecular oxygen with the aid of dithranol. The reaction was greatly enhanced by near-UV irradiation. In DMSO-PBS mixture, O_2^- was also formed but it rapidly converted to $\cdot OH$. After incubation of the drug with keratinocytes, organic radical was formed from dithranol. Microsome and mitochondria were found to be responsible for the formation. Although dithranol exhibited cytotoxicity, no indicative of lipid peroxidation was found. Since oxygen radical scavengers prevent cytotoxic effect of dithranol, at least a part of the cytotoxic effect is due to oxygen radical species.

1. 緒 言

Dithranol (1,8 dihydroxy-9-anthrone) はヒフの増殖性病変である乾癬の治療薬として古くから用いられている¹⁾。この化合物は強い還元作用を持ち、光や酸素によって容易に酸化されて 10-anthranyl radical に変化し、同時に一重項酸素あるいはスーパーオキシドアニオンのような活性酸素を生ずる。そしてこれらのラジカルや活性酸素が Dithranol の抗乾癬作用の要因であると報告されている^{2) 3)}。しかしながら、これまでの報告においては、Dithranol の酸化に際し生成される活性酸素種の正確な同定はなされていない。また、産生されるフリーラジカル種と細胞に対する生理活性との相関性も充分には解明されていない。

一方、ある種の anthraquinone 系化合物には発癌性・発癌 promotor 性のあることが知られており⁴⁾、それらの生理活性にフリーラジカルの関与を示唆するデータが蓄積されつつある^{5) 6)}。anthraquinone の一種である Dithranol には抗乾癬作用だけでなく、発癌 promotor 作用⁷⁾ や突然変異原性のあることも報告されている⁸⁾。

そこで本研究では、ESR 法によって、Dithranol の酸化過程で生成されるフリーラジカル種を同定し、それらのラジカル種の生成に対する光照射の影響を調べると共に、培養ケラチノサイト細胞を用い、Dithranol の細胞障害性とフリーラジカルの相関性を検討した。

OXYGEN RADICAL FORMATION DURING OXIDATION OF DITHRANOL AND ITS EFFECT ON KERATINOCYTES

Shiro Kanegasaki

2. 実 験

Dithranol (Sigma 製) は使用直前に暗所で dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解した後、適当な溶媒で希釈した。

Dithranol 由来の有機フリーラジカルの生成は直接 ESR スペクトルを測定した。

活性酸素ラジカル種は DMPO (5,5'-dimethyl-pyrroline-1-oxide) を用いたスピントラップ ESR 法⁹⁾ により検出した。

細胞内過酸化脂質ラジカルの生成を測定するためには、あらかじめ細胞に取り込ませた DHA (docosahexaenoic acid) 由来の過酸化脂質から生じるアルキルラジカルを POBN (2-(4-pyridyl-1-oxide)-1-N-tertbutylnitrone) でトラップし、その ESR スペクトルを測定する方法¹⁰⁾ を用いた。

フリーラジカル生成に対する光照射の実験には、キセノンランプ (Cermax 社 (米) 製, LX150-300, 150W, 10A, 波長範囲 300nm-900nm) を使用した他、昼光色蛍光灯も使用した。対照実験は完全に遮光した状態で行った。

細胞系としては、マウス皮膚上皮細胞由来のケラチノサイト (BALB/MK-2) を用いた。FBS 培養液中で 4 日間培養した細胞をトリプシン処理し、遠心沈殿したペレットを PBS (-) で洗浄後同溶液に懸濁した。この細胞懸濁液に Dithranol を加え、添加直後および一定時間 incubate した後、直接並びにスピントラップ剤を加え ESR スペクトルを測定した。

Dithranol ラジカル生成に関与する細胞分画の検討に当たっては、上記の方法で集めたケラチノサイトを等張溶液中で超音波処理した後、遠心分離法によって mitochondria, microsome および cytosol の各分画を採取した。これらの分画に Dithranol を加えて incubate した後、細胞の場合と同様の方法で ESR スペクトルの測定を行った。

Dithranol の細胞障害性は、ケラチノサイト

に取込ませた ^{51}Cr の放出を指標とした。96 穴のプラスチックプレートにケラチノサイト (10^3 /穴) を移植し、3 日間培養した。この細胞に ^{51}Cr -sodium chromate を加え 37°C 90 分間 incubate した。細胞外の ^{51}Cr を培養液で洗浄除去した後、Dithranol を含む培養液で一定時間 incubate した後、培養液中の放射能と細胞中の放射能を別々に測定した。

Dithranol の細胞障害にフリーラジカルが関与するか否かを調べる実験では、上記のごとく ^{51}Cr を取込ませた細胞を各種のフリーラジカルスカベンジャーないしはスピントラッパー存在下で Dithranol 処理し、 ^{51}Cr 放出量を比較した。

3. 結果および考察

1. Dithranol の自動酸化によるスーパーオキシドラジカルの生成とそれに由来する活性酸素種の生成

1.1 DMSO 中での反応

Dithranol を DMSO に溶解した直後に測定した ESR スペクトルを Fig. 1a に示す。スペクトルには O_2^- のスピニアダクトである DMPO-OOH のシグナルのみが観察された。スピニアダクトの生成は、嫌気的条件下では観察されず光照射の有無にかかわらず認められた。反応液を長時間暗所に放置した場合には DMPO-OOH のシグ

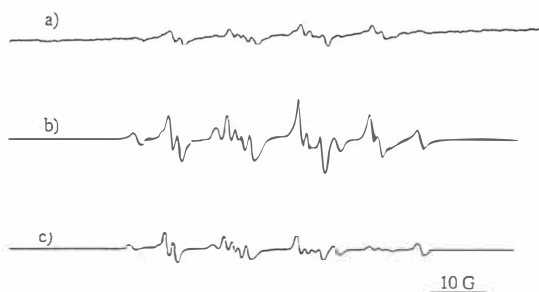


Fig. 1 Dithranol の DMSO 溶液に DMPO を添加した時に観察される ESR スペクトル
5mM Dithranol 溶液に 180mM DMPO を添加して測定。a) DMPO 添加直後, b) 暗所に 6 時間放置後, c) 蛍光灯下に 6 時間放置後。但し感度を 1/20 にして測定

ナルの他に $\cdot\text{OH}$ の生産を示唆する DMPO-CH_3 の小さなシグナルが見られた(Fig. 1b)。光照射条件下に放置した場合には DMPO-OOH のシグナル強度は約10倍近くまで増加し(Fig. 1c)、光照射が O_2^- 産生を著しく増強させることを示した。また、上記DMSO溶液中では、以下のDMSO-PBS(1:1)混合反応溶液中とは異なり、長時間光照射して放置しても $g=2.0$ の有機ラジカルは観察されなかった。この結果は O_2^- が直接には有機ラジカルの生成に関与しないことを示している。

1.2 DMSO-PBS(pH7.4)(1:1)混合液中での反応

Dithranol 溶液を調整した直後のスペクトルを Fig. 2a に示す。この場合主なシグナルは $\cdot\text{OH}$ 由来と思われる DMPO-CH_3 のシグナルで、この他に O_2^- 存在を示す DMPO-OOH の小さなシグナルが観察された(Fig. 2a)。反応液中にSODを加えておいた場合には DMPO-OOH のシグナルは観察されず(Fig. 2b)、catalase 存在下では DMPO-CH_3 のシグナル強度は $1/4$ に低下した(Fig. 2c)。さらに反応液中にSODとcatalaseを加えた場合には、 DMPO-OOH のシグナルも DMPO-CH_3 のシグナルも現れなかつ

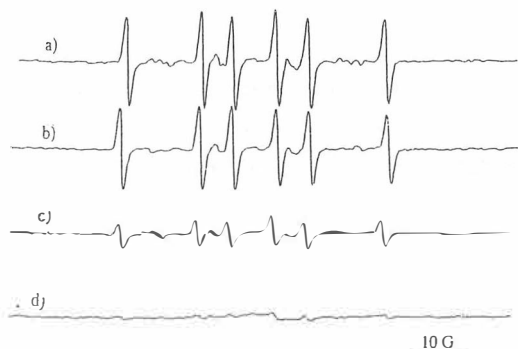


Fig.2 Di thr anol のDMSO-PBS(1:1)溶液にDMPOを添加した時に観察されるESR スペクトルと活性酸素スカベンジャーの影響
5mM Di thr anol 溶液に180mM DMPOを添加して測定。a) 対照； b) 1000U/ml SOD 添加, c) 5000U/ml catalase 添加 d) SOD とcatalase 添加

た(Fig. 2d)。反応液に鉄のキレーターを加えた場合には DMPO-CH_3 シグナル強度がやや低下した。これらの結果から、Dithranol は水溶液中でも自動酸化されて O_2^- を生成する。しかし、水溶液中ではDMSO中と異なり、生成された O_2^- は、これから生じた H_2O_2 とのHarber-Weiss反応あるいは、反応液中に微量に含まれる鉄を触媒とするFenton反応によってすみやかに $\cdot\text{OH}$ に変換されることが示された。

反応溶液を長時間暗所に放置した場合には DMPO-OOH と DMPO-CH_3 のシグナルが観察されたのに対して昼色光下で放置した場合には、これらのシグナルに加えて $g=2.0$ に有機ラジカルが観察された(Fig. 3a)。反応液中にSODを添加しておくとのシグナルの強度は増大し(Fig. 3b)、catalase があると減少した(Fig. 3c)。DMSO100%の反応液中では反応液を長時間光照射することによって O_2^- 産生量が増加しても有機ラジカルは観察されなかったこと(Fig. 1c)および上記DMSO-PBS混合反応液中にcatalaseを加えておくとの有機ラジカルの強度が半減したことを合わせて考えると、 $g=2.0$ の有機ラジカルの

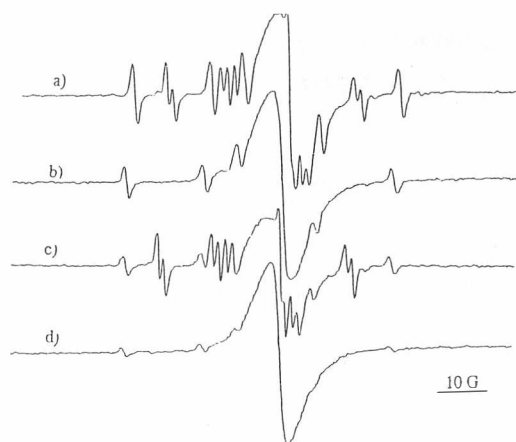


Fig.3 Di thr anol 有機ラジカル生成に対する光照射の影響
60mM Di thr anol 溶液(DMSO-PBS(1:1))に a) 無添加, b) 1000U/ml SOD, c) 5000U/ml catalase, d) SOD とcatalase をそれぞれ加え、蛍光灯下に6時間放置後180mM DMPOを加えて測定。

生成には光が必要であるが O_2^- は直接関与せず、 H_2O_2 が関与していると考えられた。

昼色光下で見られた反応が近紫外光線によることを確かめるために、キセノンランプ(300nm以上)を用いて同様の実験を行った。結果はFig. 2の結果と同様で、反応液調製直後にはまずDMPO-OOHとDMPO-CH₃のシグナルが観察された(Fig. 4a)。この液を暗所に20分放置した場合のESRスペクトルは、調製直後のものとはほとんど変わらない(Fig. 4b)が、光照射下20分放置した場合にはDMPO-CH₃のシグナル強度は1/2に低下し、代って $g=2.0$ の有機ラジカルのシグナルが観察された。したがって昼色光下で観察されたフリーラジカルの生成が近紫外光線下で生じることが確かめられた(Fig. 4c)。

2. ケラチノサイト存在下でのフリーラジカルの生成とDithranolの細胞障害作用

2.1 培養ケラチノサイト細胞にDithranolを加えた反応液を室温でincubateした後DMPOを加えてESRスペクトルを測定したところ、DMPO-OOHのシグナルもDMPO-CH₃のシグナルも観察されず、 $g=2.0$ の有機ラジカルのシグナルのみが観察された。



Fig. 4 Dithranol溶液にキセノンランプを照射した時に観察されるESRスペクトル。
5mM Dithranol溶液(DMSO-PBS(1:1))に
a) 調製直後、b) 20分間暗所に放置後、および
c) 20分間キセノンランプ照射後180
mM DMPOを添加して測定。

そこで、このラジカル生成に細胞成分が関与しているか否かを調べるために、細胞をhomogenateした後遠心分画し、mitochondria, microsome, cytosolおよびcell debrisの分画についてDithranolを加え、上記と同様の実験を行った。結果は、mitochondria, microsomeおよびcell debrisの存在下で有機ラジカルが観察され、Cytosolを加えた系ではラジカルのシグナルは観察されなかった。

2.2 ケラチノサイト中で脂質の過酸化反応が生じるか否かを調べた。Dithranolは水溶液中で O_2^- 、 $\cdot OH$ 、 H_2O_2 を生成することが明らかになったので、これらの活性酸素種存在下でケラチノサイト細胞膜において過酸化脂質が生成されるか否かを調べた。このため、あらかじめDHAを取り込ませたケラチノサイトにDithranolを作用させ、DHAから過酸化脂質が生成される時にまず産生されると考えられているアルキルラジカルをPOBNでトラップする方法で検討した。その結果、対照として二価鉄を加えた反応系ではPOBNのスピンアダクトが観察されたが、Dithranol添加反応系ではPOBNのスピンアダクトは観察されず、この条件下では細胞の脂質の過酸化反応が起こっているという証拠は得られなかった。

2.3 Dithranolの細胞障害性を ^{51}Cr の放出を指標として調べた。あらかじめ ^{51}Cr を取り込ませたケラチノサイトにDithranolを加えてincubateし、その間に放出される ^{51}Cr 量を対照の細胞の値と比較した。0.5mM Dithranolで4時間後から有意に ^{51}Cr 放出の増加が見られ(Fig. 5)、この濃度でDithranolに細胞障害性のあることが確かめられた。

2.4 Dithranol細胞障害性に対するフリーラジカルスカベンジャーの影響を調べた。2.3と同様の系に0.5mM Dithranol添加直前にSOD、

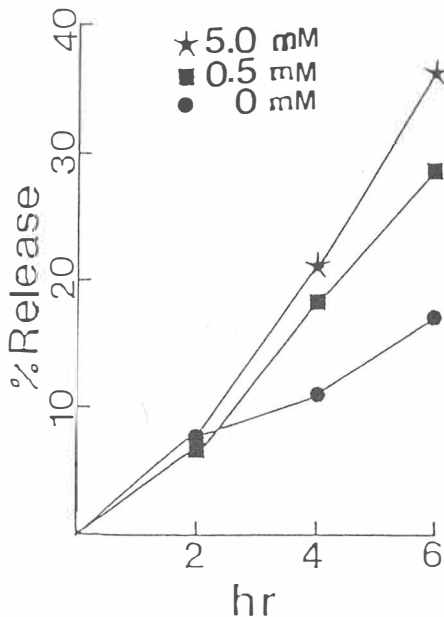


Fig. 5 培養ケラチノサイト細胞からの ^{51}Cr release に対する Dithranol の影響。

catalase, POBN, DMPO等を加え, Dithranol による ^{51}Cr 放出の促進がこれらのフリーラジカルスカベンジャーの処理によって抑制されるか否かを調べた。この結果, SOD 処理の場合にのみ約30%の低下が見られ, O_2^- 産生がDithranolの細胞障害性の一部に関与していることが明らかになった。

以上の結果から, Dithranol は水溶液中で自動酸化して O_2^- を産生し, 近紫外波長の光線はこの O_2^- 産生を促進すること, O_2^- からは $\cdot\text{OH}$ が速やかに産生されることが明らかになった。さらに ^{51}Cr 放出を用いた実験でケラチノサイトは, 低濃度のDithranolによって傷害され, その原因の一部にはDithranol存在下で生成される O_2^- に関与していることが示された。

総括

- 1) Dithranol は酸素存在下で自動酸化によって O_2^- を生成する。
- 2) 近紫外部から可視部に至る光線の照射は O_2^- 産生を増大させる。

- 3) 水溶液中でDithranol自動酸化により生成された O_2^- は H_2O_2 をへて $\cdot\text{OH}$ に変換される。
- 4) H_2O_2 存在下で光を照射するとDithranolから有機ラジカルが生成される。
- 5) ケラチノサイト存在下では, O_2^- , $\cdot\text{OH}$ は検出されず有機ラジカルの生成が観察された。
- 6) ケラチノサイトにおける有機ラジカルの生成には細胞の mitochondria, microsome 中の酵素の関与が推定された。
- 7) Dithranol は0.5mM, 4時間処理でケラチノサイトの ^{51}Cr 放出を促進した。
- 8) Dithranol による ^{51}Cr 放出の促進がSODによって低下したことからDithranolによる細胞障害性に O_2^- が関与すると考えられる。
(研究実施者 上野郁子, 于徳山)

参考文献

- 1) Ashton, R. E., Andre, P., Lowe, N. J. and Whitefield, M. J. Am. Acad. Dermatol. 9, 173-192(1983).
- 2) Bruce, J. M., Kerr, C. W. and Dodd, N. J. F. J. Chem. soc. Faraday Trans, 1, 83 85-89 (1978)
- 3) Fuchs, J. and Packer, L. J. Invest, Dermatol. 92, 677-682(1989).
- 4) Uraguchi, K., Saito, M., Noguchi, Y., Takahashi, K., Enomoto, M. and Tatsuno, T., Food Cosmet. Toxicol. 10, 193-207(1972).
- 5) Akuzawa, S., Yamaguchi, H., Masuda, T. and Ueno, Y., Mut. Res. 266, 63-69(1992).
- 6) Ueno, I., Hoshino, M., Maitani, T., Kanegasaki, S. and Ueno, Y., Free Radical Res. Com. in press.
- 7) Boch, F. G. and Burns, R., J. Natl. Cancer Inst. 30, 393-397(1963).
- 8) Gillberg, B. O., Zetterberg, G. and Swanbeck, G., Nature 214, 415(1967).
- 9) Ueno, I., Kohno, M., Mitsuta, K., Mizuta, Y. and Kanegasaki, S. J. Biochem. 105, 905-910 (1989).
- 10) North, J. A., Spector, A. A. and Buettner, G. R. J. Biol. Chem. 267, 5743-5746(1992).