

神経細胞が分泌する酸化ストレスに対する保護因子の同定

同志社大学生命医科学研究科

野口 範子、斎藤 芳郎

The protection of neurons from cell death is a vulnerable strategy to prevent neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease, since neuronal cell death is one of the major events in pathology of these diseases. PC12D cells are subspecies of PC12 cells which have been used for a variety of neuronal studies. We found that PC12D cells were resistant against 6-hydroxydopamine (6-OHDA) -induced cell death and that PC12D cell-cultured medium had abilities to decompose hydrogen peroxide (H_2O_2). The molecular weight of H_2O_2 decomposing active compounds was estimated at about 1,000 Da by gel chromatography analysis. The study using ion exchange resin column showed that the candidate compounds are not charged. The activity was not abolished by a metal ion chelater, EGTA but significantly suppressed by a polphyrin inhibitor, NaCN. These data suggest that PC12D cells secrete polphyrin-like compounds possessing H_2O_2 decomposing activities, by which cells are protected from cell death induced by 6-OHDA.

1. 緒言

アルツハイマー病やパーキンソン病は代表的な神経変性疾患として知られ、その名前が示すように神経細胞が変性し死滅することが病気の発症に深く関わっている^{1,2)}。これらの疾患では、認知機能や運動機能の低下が深刻であるが、加えて患者の表情は硬く乏しくなり、コスメトロジーの観点からも問題となる。従って、神経細胞死のメカニズムやそれを防止する方法の開発に関する研究は重要である。我々は、神経細胞が特異的に産生するオキシステロールの1種である24S-hydroxycholesterolが、高濃度では細胞死を^{3,4)}、低濃度では神経細胞に適応反応を誘導して酸化ストレスに対する抵抗性を獲得させること⁵⁾を示した。1976年にGreenらによって樹立されたPC12細胞は、ラット副腎髄質クロム親和性細胞腫から樹立された細胞株である。神経成長因子(NGF)非存在下の培養では副腎髄質クロム親和細胞の形質を示すが、NGFを作用させることにより、神経突起を伸長して交感神経細胞様に分化する。そのため、PC12細胞は、神経細胞における分化機構の解明やNGFの作用機構解明の研究などに広く用いられている⁶⁾。本研究で注目するPC12D細胞はPC12細胞の亜種であり、NGFやスタウスポリンなどの刺激に素早く反応し神経突起を伸長する。また、RNA合成阻害剤の存在下でも、神経突起伸長が誘導されることが知られている細胞である^{7,8)}。先行の研究により、PC12D細胞は細胞を播種してからの時

間や細胞濃度によって、6-OHDAなどによる酸化ストレス刺激に対する耐性が変化することが明らかにされていた(未発表)。つまり、PC12D細胞は酸化ストレス誘導性細胞死に対して抵抗性を示すことがわかっていた。この結果から、PC12D細胞から培養液中に酸化ストレスから神経細胞を保護する物質が分泌されている可能性が考えられた。本研究は、PC12D細胞から分泌される神経細胞保護因子の性質を明らかに、その因子を同定することを目的としておこなった。

2. 実験

2.1. PC12細胞 / PC12D細胞

実験に用いたラットの副腎髄質由来褐色細胞腫のPC12細胞、その亜種であるPC12D細胞は、37℃、5%二酸化炭素の環境下で培養した。Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM)、10%非働化Horse Serum (GIBCO)、5%非働化Fetal Bovine Serum (Hyclone)と抗生物質Streptomycin 0.05 μg/ml (GIBCO)を添加して、実験に用いた。

2.2. 培養上清の作成FM、CM作成

DMEMに5% N2サプリメント(GIBCO)と1%抗生物質0.05 μg/mlを加えた培養液をFresh Medium (FM)とした。PC12D細胞を10 cm dishに70%コンフレントの状態から16時間FMで培養後、培養液を回収して1,000 rpm 5分24℃で遠心して得た上清をCultured Medium (CM)とし、使用時まで-80℃で保存した。FMとCMは必要に応じて遠心濃縮機を用いて20倍まで濃縮し、使用時まで-80℃で保存した。

2.3. 細胞死誘導とその評価

細胞死の誘導は100~200 μMの6-OHDAあるいは H_2O_2 を用いた。細胞生存率の測定はMTTアッセイ法を用い



Identification of neuron-derived protecting factors against oxidative stress

Noriko Noguchi

Faculty of Life and Medical Sciences,
Doshisha University

た。6-OHDA から生成するパラキノン (pQ) の生成は 360 nm の吸光度測定により求めた。培養液中の H₂O₂ の濃度はスコポレチン蛍光法を用いて測定した。スコポレチンが H₂O₂ 存在下で西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) により酸化され、蛍光物質が非蛍光物質に変化するため、この蛍光強度 (励起波長 366 nm、発光波長 460 nm) の減少から H₂O₂ を測定した。

2. 4. クロマトグラフィーを用いた分泌因子の特性解析

ゲル濾過カラムクロマトグラフィー：PD-10 カラム (GE Healthcare) を用いて、分子量 5,000 以上の物質と 1,000 以下の低分子物質とに分離した。また、分離能が高く高回収率担体である Superdex 30 prep grade (GE Healthcare) を用いて分子量 10,000 以下の分画を行った。

イオン交換樹脂：強酸性陽イオン交換樹脂 (交換基：-SO₃⁻) Hi Trap SP FF (GE Healthcare) および強塩基性陰イオン交換樹脂 (交換基：-NR₃⁺) Hi Trap Q FF (GE Healthcare) を用いて分泌因子の荷電性質を調べた。

2. 5. 阻害剤の添加効果

鉄をキレートするためにエチレンジアミン四酢酸 EDTA (2Na, 3Na) (WAKO) を用いた。ポルフィリン阻害剤として NaCN (WAKO) を用いた。

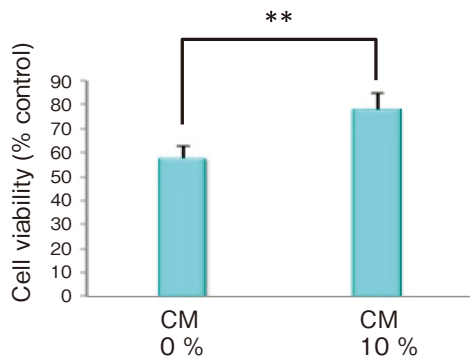


図1 PC12D 細胞の生存率に対する CM の添加効果
n=3, **P<0.01, Student t-test

3. 結果

3. 1. PC12D 細胞の培養液の細胞保護作用

PC12D を播種し、6-OHDA 100 μM で刺激をする 2 時間前に一旦培養液を FM に交換し、その 10 % 容量の CM を添加した。24 時間後に MTT アッセイ法により細胞生存率を測定したところ、CM を添加した細胞は添加しない細胞と比較して生存率が高かった (図 1)。次に、6-OHDA 誘導細胞死に対する CM の防御作用の容量依存性を調べた。6-OHDA 100 μM または 200 μM で刺激をする 2 時間前に培養液を FM 100 %、FM 50 %/CM 50 %、CM 100 % に交換し、24 時間後に MTT アッセイ法により細胞生存率を測定した。6-OHDA 誘導細胞死はいずれの濃度の場合も、CM の量に依存して抑制された (図 2)。

3. 2. 6-OHDA 由来の細胞死誘導物質

6-OHDA は水溶液中で速やかに分解し、パラキノン (pQ) とスーパーオキシド (O₂⁻) を生成し、O₂⁻ は不均化反応の結果 H₂O₂ が生成する。pQ や H₂O₂ はいずれも細胞死を誘導する可能性があるため、6-OHDA からこれらの生成に対する CM の影響を調べた。pQ は 360 nm に吸収波長をもつため、この波長の吸光度の経時変化を測定した。pQ の生成は FM 中と CM 中で差は見られなかった (図 3)。選

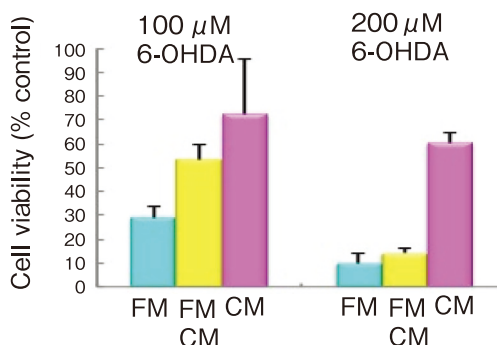


図2 PC12D 培養液の細胞死抑制効果
FM100% (FM), FM50%/CM50% (FMC), CM50% (CM) で培養したときの 6-OHDA による細胞死の抑制効果

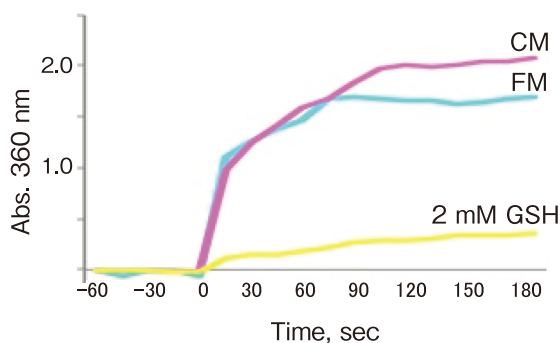


図3 6-OHDA からの pQ 生成に対する培養液の影響
6-OHDA の分解によって生成する pQ の吸収波長の吸光度を FM, CM, そして GSH を含む FM 中で測定した。

元型グルタチオン (GSH) は pQ と反応するため吸光度の増加は著しく抑制された。この結果から CM は 6-OHDA からの pQ の生成には影響を与えないことがわかった。

次に、FM 中と CM 中で 6-OHDA から生成する H₂O₂ 濃度をスコボレチン法で測定したところ、CM では有意に少なかった。また、既知の濃度の H₂O₂ を FM および CM に添加し、37℃ 15 分反応後、H₂O₂ 濃度を測定したところ、CM では FM より有意に減少していた (図 4)。この結果より、CM 中には H₂O₂ を分解する物質が含まれていることが示唆された。また、6-OHDA による PC12D 細胞の細胞死は、カタラーゼの添加によって抑制される結果も (data not shown)、CM 中の保護因子は H₂O₂ 消去によって細胞死を抑制することを示唆している。

3. 3. 神経細胞保護因子の分子量と荷電状態

PD10 と Sephadex 30 prep grade の 2 種類のゲルクロマトグラフィーを用いて CM の分画をおこない、H₂O₂ 消去能を指標に保護因子の分子量は約 1,000 Da であることを明らかにした (data not shown)。次に、陽イオン交換樹脂および陰イオン交換樹脂を用いてクロマトグラフィーを行い、保護因子の荷電状況に依存して吸着することにより H₂O₂ 消去能が失われるか検討したところ、いずれのイオン樹脂を通して H₂O₂ 消去能には変化がなかった (data not shown)。この結果から、保護因子はプラスにもマイナスにも帯電していないことが示された。

3. 4. H₂O₂ 消去能に対する阻害剤の効果

H₂O₂ の分解には Fe イオンが関与している可能性が考えられたため、Fe イオンをキレートする EGTA 2Na と EGTA 3Na を CM に添加して、H₂O₂ 分解能への影響を調べたが、いずれも分解能を抑制しなかった (data not shown)。次に、保護因子がポルフィリンである可能性を

考え、ポルフィリンの阻害剤である NaCN を CM に添加して H₂O₂ 分解能を調べた。可変量の NaCN を用いて調べたところ、5 mM 以上の NaCN によって CM の H₂O₂ 消去活性は抑制されることがわかった (図 5)。

4. 考 察

PC12D 細胞は、6-OHDA によって誘導される細胞死に抵抗性をもつことが先行の研究により示されていたが、本研究により、PC12D 細胞から培養液 (CM) 中に細胞保護因子が分泌されていることがわかった。培養液中では、6-OHDA から pQ と H₂O₂ が活性種として生成することが知られていたが、PC12D 細胞の培養液 (CM) は pQ 生成に影響を与えないことから、細胞死の抑制は H₂O₂ の分解によるものと考えられた。実際に CM に添加した H₂O₂ は速やかに分解された。また、6-OHDA による PC12D 細胞の細胞死は、カタラーゼの添加によって抑制されることから、CM 中の保護因子は H₂O₂ 消去によって細胞死を抑制することが示唆された。クロマトグラフィーの結果から、CM 中の保護因子の分子量は約 1,000 Da であることが突き止められた。H₂O₂ の分解には Fe や Cu などの遷移金属の関与が推測されたが、キレート剤が抑制効果を示さないことや、クロマトグラフィーの結果からもとめられた分子量などから、ポルフィリンが候補物質として考えられた。ポルフィリンの活性阻害剤である NaCN を添加すると、CM の H₂O₂ 分解能が抑制されることから、CM 中の活性物質はポルフィリンもしくはポルフィリン様の化合物である可能性が高い。ポルフィリン錯体の分子量は約 500 Da であるが、配位している金属イオンを介して、ポルフィリン錯体ダイマーを形成する。また、ポルフィリン錯体ダイマーは水溶性でカタラーゼ活性をもち、H₂O₂ と反応することが報告されている^{10, 11)}。以上より、PC12D 細胞の分泌する細胞保護因子は、ポルフィリン様物質であることが示唆された。

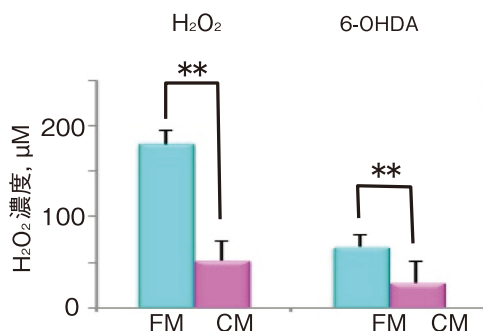


図 4 FM と CM の H₂O₂ 消去能の比較
H₂O₂ もしくは 6-OHDA を FM, CM に添加し、37℃ 15 分後の H₂O₂ 濃度を測定した。 n=5, **P<0.01, Student t-test

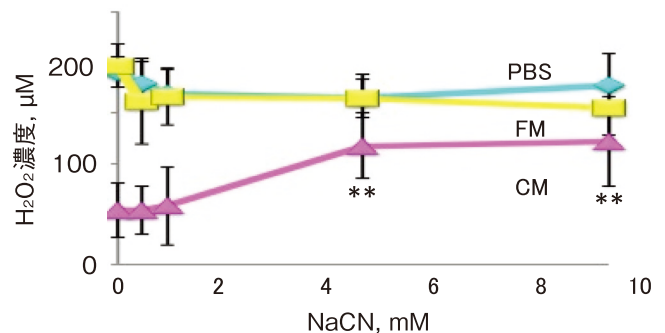


図 5 ポルフィリン阻害剤による CM の H₂O₂ 消去活性抑制
n=10, **P<0.01, Dunnett, compared with 0 mM

謝 辞

本研究の遂行にあたりコスメトロジー研究振興財団よりご援助いただきましたことに深謝いたします。

(引用文献)

- 1) Gomez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, Parisi JE, Hyman BT, : Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.*, 41, 17-24, 1997.
- 2) Forno LS, : Neuropathology of Parkinson's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 55, 256-272, 1996.
- 3) Yamanaka K, Saito Y, Yamamori T, Urano Y, Noguchi N, : 24S-Hydroxycholesterol induces neuronal cell death through necroptosis, a form of programmed necrosis. *J. Biol. Chem.*, 286, 24666-24673, 2011.
- 4) Yamanaka K, Urano Y, Takabe W, Saito Y, Noguchi N, : Induction of apoptosis and necroptosis by 24(S)-hydroxycholesterol is dependent on activity of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 1, *Cell Death Diseases*, 5, e990, 2014.
- 5) Okabe A, Urano Y, Itoh S, Suda N, Kotani R, Nishimura Y, Saito Y, Noguchi N, : Adaptive responses induced by 24S-hydroxycholesterol through liver X receptor pathway reduce 7-ketocholesterol-caused neuronal cell death, *Redox Biol.*, 2, 28-35, 2013.
- 6) Greene LA, Tischler AS, : Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73, 2424-2428, 1976.
- 7) Katoh-Semba R, Kitajima S, Yamazaki Y, Sano M, : Neuritic growth from a new subline of PC12 pheochromocytoma cells: cyclic AMP mimics the action of nerve growth factor. *J. Neurosci. Res.*, 17, 36-44, 1987.
- 8) Sano M, Kitajima S, : Activation of mitogen-activated protein kinases is not required for the extension of neurites from PC12D cells triggered by nerve growth factor. *Brain Res.*, 785, 299-308, 1998.
- 9) Miyama A, Saito Y, Yamanaka K, Hayashi K, Hamakubo T, Noguchi N, : Oxidation of DJ-1 induced by 6-hydroxydopamine decreasing intracellular glutathione. *PLoS One.*, 6, e27883, 2011.
- 10) Asayama S, Nakajima T, Kawakami H, : New water-soluble Mn-porphyrin with catalytic activity for superoxide dismutation and peroxynitrite decomposition. *Metallomics.*, 3, 744-748, 2011.
- 11) Ohse T, Nagaoka S, Arakawa Y, Kawakami H, Nakamura K, : Cell death by reactive oxygen species generated from water-soluble cationic metalloporphyrins as superoxide dismutase mimics *J. Inorganic Biochem.*, 85, 201-208, 2001.