

## アルミニウムのプロオキシダント作用とPC12D細胞のアポトーシスの誘導

坪内涼子, 村上恵子, HLA HLA HTAY, 伊藤正江, 吉野昌孝  
(愛知医大・医・生化学\*)

### **Induction of apoptosis of PC12D cells was analyzed in relation to prooxidant nature of aluminum ion.**

Ryoko TSUBOUCHI, Keiko MURAKAMI, Hla Hla Htay, Masae ITO, Masataka YOSHINO  
*Department of Biochemistry, Aichi Medical University School of Medicine,  
Nagakute, Aichi 480-1195, Japan*

Aluminum ion effectively enhanced the formation of thiobarbituric acid-reactive substances as a marker of lipid peroxidation of microsomes from rat liver under the acidic conditions. Aluminum ion also inhibited the autooxidation of ferrous ion, resulting in stabilization of reduced iron the initiating species for lipid peroxidation.

Addition of aluminum-maltol complex to PC12D cells induced a time-dependent and concentration-dependent growth inhibition and cell death. Aluminum-maltol induced apoptosis of differentiated PC12D cells, which was demonstrated by using terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated 2'-deoxyuridine-5'-triphosphate nick end labelling (TUNEL) technique to detect DNA strand breaks in situ. Increase in intracellular reactive oxygen species by aluminum-maltol administration was also assessed by the increased fluorescence of the oxidant-sensitive dye 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate. Aluminum ion incorporated to PC12D cells as a maltol complex causes apoptotic cell death by enhancing the generation of reactive oxygen species as a prooxidant.

アルミニウムは地球上で最も大量に分布する金属であり、中性領域における溶解度が低い<sup>1)</sup>ため、生体毒性については重視されていなかった。その一方でいくつかの神経変性疾患の病因としてアルミニウムの関与が示唆されている<sup>2)</sup>。我々は活性酸素消去系である還元型グルタチオンの再生系に働くNADPHの供給反応であるNADPイソクエン酸脱水素酵素がアルミニウムによって阻害されることから<sup>3), 4)</sup>、アルミニウムが活性酸素消去反応を抑制し、プロオキシダントとして働く可能性を指摘した。今回、アルミ

---

\* 所在地：愛知県愛知郡長久手町大字岩作字雁又21 (〒480-1195)

ニウムが活性酸素傷害としての鉄触媒型の脂質過酸化反応を促進するとともに、*in vivo*における毒性発現として、アルミニウムによる培養神経細胞PC12Dのアポトーシスの誘導を見出し、解析した。

## 実験方法

### ミクロソームの脂質過酸化

チオバルビツール酸によってマロンジアルデヒドを測定した<sup>5)</sup>。

### 鉄の自動酸化 ( $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$ )

$\text{Fe}^{2+}$  を bathophenan-throline disulfonate との結合により定量した<sup>6)</sup>。アルミニウム/マルトール複合体は Bertholf らの方法により合成し、再結晶化したものを用いた<sup>7)</sup>。

### PC12D細胞の培養とアポトーシスの誘導

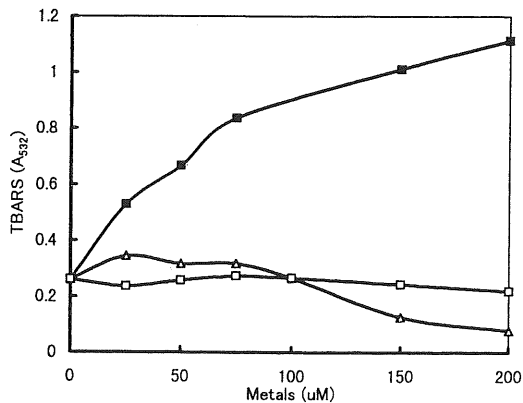
PC12D細胞を仔牛及び馬血清を添加したDMEMメEDIUMで培養し、神経成長因子 (NGF) を加えて分化させた後、アルミニウム/マルトールを添加し、アポトーシスによる細胞死を TUNEL法<sup>8)</sup> を用いたキット (Apoptosis *in situ* detection kit, 和光) により測定した。

### 培養細胞における活性酸素種の生成

細胞に2', 7'-ジクロロフルオレセインジアセテートを加えて取り込ませて3日間培養した後、細胞を破碎し、生ずる蛍光 (励起475nm, 蛍光525nm) を測定した。

## 結果及び考察

鉄触媒によるミクロゾームの脂質過酸化反応は弱酸性条件下においてアルミニウムの添加により促進された (図1)。この促進はアルミニウムに特異的であり、亜鉛、カドミウムではみられなかった。



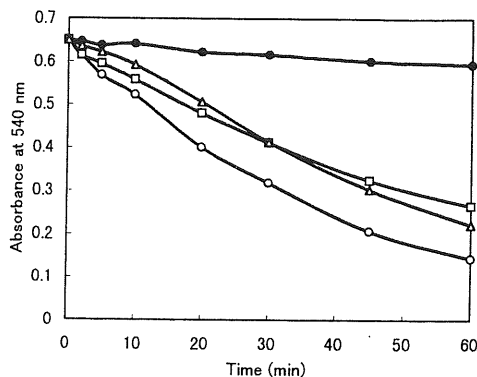
**Fig. 1** Effect of aluminum ion on the iron-induced lipid peroxidation of rat liver microsomes.

Lipid peroxidation was induced by  $10 \mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$ ,  $0.5 \text{ mM}$  ascorbic acid,  $0.2 \text{ mg}$  microsomal fraction and  $60 \text{ mM}$  Mops-KOH buffer (pH 6.8) in the presence of aluminum, zinc or cadmium ions in the reaction mixture of  $1 \text{ ml}$ . The mixture was incubated at  $37^\circ\text{C}$  for  $20 \text{ min}$ , and the reaction was stopped by addition of  $100\%$  trichloroacetic acid. Lipid peroxides were determined as the thiobarbituric acid-reactive substances<sup>5)</sup>. ■, aluminum; △, zinc; □, cadmium.

脂質過酸化反応の引き金はプロオキシダントである還元鉄イオンに大きく依存していることが知られている。二価鉄イオンの自動酸化を促進する性質の化合物はアンチオキシダントとなる性質をもつことを先に報告しているが<sup>9)</sup>、二価鉄の自動酸化に対してアルミニウムは逆に著明な抑制作用を示した(図2)。この結果脂質過酸化反応の引き金となる二価鉄イオンを還元状態に保つことによりプロオキシダントとして作用することを推測させた。

PC12D細胞の培地に対してアルミニウム/マルトール錯体は濃度依存的に細胞増殖を抑制した。培養3-5日における増殖の50%阻止濃度は40-50  $\mu\text{M}$ であった(図3)。一方、神経成長因子(NGF)を加えて分化させたPC12D細胞に対する100  $\mu\text{M}$ アルミニウム/マルトール添加効果をTUNEL法によって解析し、アポトーシス細胞の出現を検出した。アルミニウム/マルトール添加5日後のTUNEL染色を図3に示す。矢印で示したように細胞核クロマチンの凝縮が認められ、アポトーシスを示唆している。アルミニウム、マルトール単独の投与では増殖抑制作用、アポトーシスの誘導を引き起こさなかった。アルミニウム/マルトール投与細胞の細胞内酸化状態を酸化プローブDCFH-DAを検討した結果、75  $\mu\text{M}$ アルミニウム/マルトール添加の3日後に蛍光強度の増加を認め、活性酸素の生成を示唆した(図4)。

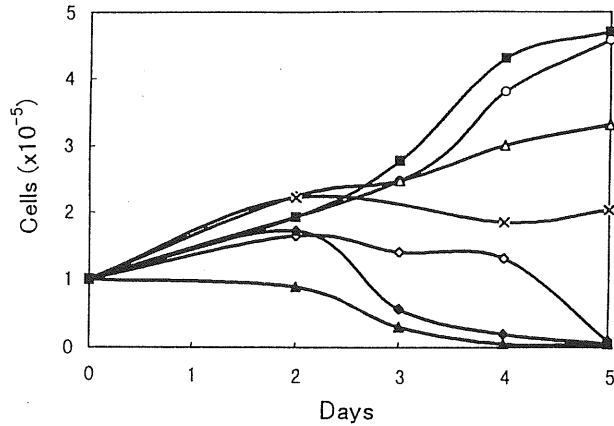
従来アルミニウム単独の動物、細胞への投与によっては顕著な毒性が見出されず、細胞内へ取り込まれないことを示している。本報で示したようにアルミニウムはマルトールとの錯体の形で効率的に細胞内に取り込まれることを示している。細胞へ取り込まれたアルミニウムは二価鉄をそのまま還元状態に維持するように作用し、プロオキシダントとして働くことにより、アポトーシスを誘導したと推定された。アルミニウムによるアポトーシスの誘導は神経変性疾患の発症と関連する可能性を示唆する。



**Fig. 2** Effect of metal cations on the autooxidation of ferrous ion.

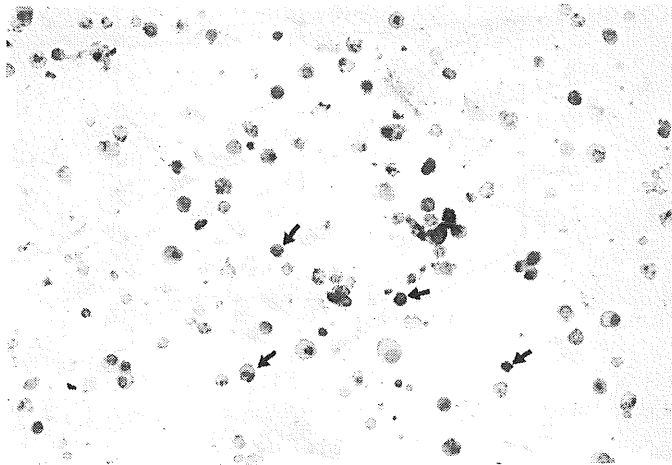
Iron autooxidation was followed by determining the ferrous ion concentration with the bathophenanthroline disulfonate<sup>6)</sup>. The samples of 1 ml contained 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.1), 0.05 mM FeSO<sub>4</sub>, and 0.1 mM metals as chloride salts. All incubations were carried out at 37°C. The reaction was started by addition of FeSO<sub>4</sub>. Aliquots of 0.2 ml were mixed with 0.1 ml of 1 mM bathophenanthroline disulfonate at appropriate intervals, and the absorbance at 540 nm was measured.

○, No addition; ●, AlCl<sub>3</sub> added; □, ZnCl<sub>2</sub> added; △, CdCl<sub>2</sub> added.



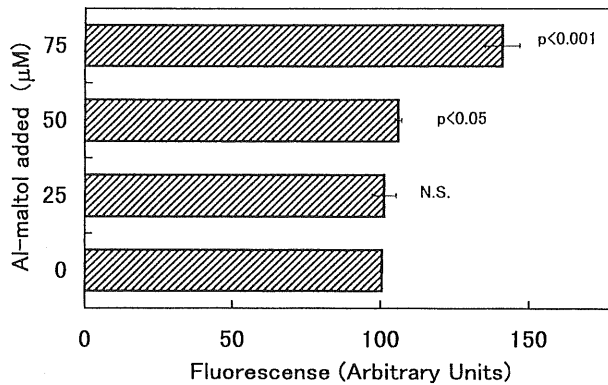
**Fig. 3** Effect of aluminum on the growth of PC12D cells.

PC12D cells were grown in DMEM medium supplemented with 5% fetal bovine and 10% horse serum in the absence and presence of different concentrations of aluminum chloride, aluminum-maltol complex and maltol. A. Aluminum-maltol complex added. ■, No addition; ○, 10  $\mu\text{M}$ ; △, 30  $\mu\text{M}$ ; ×, 50  $\mu\text{M}$ ; ◇, 60  $\mu\text{M}$ ; ◆, 80  $\mu\text{M}$ ; ▲, 100  $\mu\text{M}$  aluminum maltol. B. Aluminum chloride or maltol added. ▲, 20  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ ; ◇, 60  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ ; ◆, 80  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$ . △, 60  $\mu\text{M}$  maltol; ×, 120  $\mu\text{M}$  maltol; ▲, 180  $\mu\text{M}$  maltol.



**Fig. 4** TUNEL staining of differentiated PC12D cells.

Cells were seeded at a concentration of  $1 \times 10^5$  cells/ml, and NGF of 50 ng/ml was supplemented to the medium. Aluminum-maltol complex of 100  $\mu\text{M}$  was added to the medium, and cultured for 4 days. Magnification  $\times 200$ .



**Fig. 5** Generation of reactive oxygen species in PC12D cells 3 days after aluminum-maltol treatment. The fluorescence intensity was monitored at 3 days incubation with 75  $\mu$ M aluminum-maltol as described in Materials and Methods. Values were obtained from three separate experiments. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD, and significant difference is calculated between the aluminum maltol group and the control.

## 文 献

- 1) Martin, R. B. (1986) Clin. Chem. 32 : 1797-1806.
- 2) Ganrot, P. O. (1986) Environ. Health Perspect. 65 : 363-441.
- 3) Yoshino, M., K.Murakami, and Y.Yamada (1990) BioMetals 11 : 215-218.
- 4) Yoshino, M., Y. Yamada and K.Murakami (1992) Int. J. Biochem. 24: 1615- 1618.
- 5) Draper, H.H. and M.Hadley (1990) Methods Enzymol. 186 : 421- 431.
- 6) Yoshino, M., M. Ito, M. Haneda, R. Tsubouchi and K.Murakami (1999) BioMetals 12 : 237-240.
- 7) Berthof, R. L., M. M. Herman, J. Savory, R. M.Carpenter, B.C. Sturgill, S. R. van den Berg and M. R. Wills (1989) Toxicol. Appl. Pharmacol. 98 : 58-74.
- 8) Gavrielli, H. G., Y.Sherman and S. A.Ben-Sasson (1992) J. Cell. Biol. 119 : 193-501.
- 9) Yoshino, M. and K.Murakami (1998) Anal. Biochem. 257 : 40-44.