

アポトーシスに関する研究（４） 食品とアポトーシス

Study on Apoptosis（４） Food and the Apoptotic Pathway

道家晶子
Shoko DOKE

Abstract

The purpose of this study is to investigate the effects of food on the apoptotic phenomena. Tomatoes were the most effective stuff for the enhance of the apoptotic reaction against A 172 cells. Green tea was the most effective stuff to prevent the normal cells from the damage by Etoposide. The results obtained indicate that the natural antioxidants may be considered as effective sources for combating damage to cells in healthy persons.

Key words: apoptosis, tomatoes, green tea

はじめに

アポトーシスに関する一連の研究で、アポトーシス誘導・実行経路に関わるシグナルと判定法、疾病との関連を右のチャートにまとめた。これまで、基礎的データを得るためアポトーシス誘導・実行過程に及ぼすビタミン B 6 の関与の検討¹⁾や食品成分との関係、特に抗酸化物質との関連²⁾について検討した。ビタミン B 6 ではアポトーシス経路に及ぼす間接的な関与が示唆された。カテプシン L を介したカスパーゼ 3 の活性化への影響、ミトコンドリア膜電位の変化による Bid や Bcl 2 への影響が考えられたが詳細な作用点については、いまだ明らかではない。一方、抗酸化成分との関連では特にポリフェノール類の関与を示す報告が多数見られた。こちらも詳細な作用機序については明らかではなかった。茶類、果物、野菜由来の抗酸化成分がそれぞれ異なる病理細胞にアポトーシスを誘導しているため全体的な比較検討が難しい。

本報では、その他の食品や成分でアポトーシス経路に直接関与している報告があるかどうか調べた。作用点をさぐるヒントにするため同一の細胞と同じ食品や食品成分を使った実験を交えて検討した。細胞のスイッチを ON する過程で、正常細胞と、がん細胞の場合では、同一の食品・食品成分が作用しても異なる反応を示すのではないかと予想をたてアポトーシス状態を形態学的観察、生化学的測定値から検討した結果を報告する。

細胞のスイッチ OFF
刺激(紫外線・熱・活性酸素・薬剤・ストレス)
細胞のスイッチ ON

タンパク質分解酵素（カスパーゼ）

アポトーシス実行

判定：顕微鏡による形態観察
細胞代謝酵素活性の測定

Bcl 2	抑制	がん 自己免疫疾患
Bax	促進	エイズ 肝炎 アルツハイマー病

方法

アポトーシスと食品、食品成分に関する国内外の文献を調べ、アポトーシスへの関与が示唆されるものを抽出した。次いで、それらの食品を試料として同一細胞で培養した時の反応の違いを実験した。アポトーシスを起こした細胞の判定には、トリパンブルー細胞分染法と乳酸脱水素酵素活性を用いた LDH 法で細胞膜破壊した死細胞を定量した。

試薬 0.4%トリパンブルーは400mg のトリパンブルー（ワコー、特級）を秤量し調製した0.85%生理食塩水に溶解して100 ml とした。LDH 法には、微量毒性試験用試薬 MTX LDH（極東製薬工業《株》）キットを購入した。アポトーシス誘導剤は、エトポシド（シグマ、特級）を用いた。培養液には、RPMI 1640 メディウム（シグマ、特級）を使用した。PBS（ ）は、KCl、KH₂PO₄、Na₂HPO₄・12H₂O を組成とするリン酸緩衝液を調製し、120、20分、オートクレーブ滅菌したものを用いた。0.4%

Tween20は、Tween20 (ナカライ、特級) を PBS () を用いて調製した。

器具 細胞培養用96穴平底および96穴丸底マイクロプレート、マイクロプレートリーダー(イワキガラス《株》、ウエルリーダー) および血球計算盤を準備した。

操作法 A172細胞(岐阜大学医学部より提供)を細胞濃度が $2.5 \sim 5 \times 10^5$ 個/mlになるよう細胞懸濁液を調製した。96穴平底マイクロプレートに50 μ l ウェルずつ加えた。37 条件下、5%CO₂インキュベーター(《株》ヒラサワ、CPE BABY)にて24時間培養した。6種類の食品から調製した試料液を50 μ l ウェルずつ加えた。37、5%CO₂条件下で5時間培養した。軽くピペティングして細胞を分散させた後、50 μ lの細胞分散液を96穴丸底マイクロプレートに移した。次いで、50 μ lの0.4%トリパンブルーを各ウェルに加えた。この溶液をカバーグラスを密着させた血球計算盤の間に静かに染み込ませ位相差顕微鏡(オリンパス光学工業《株》M021)にて検鏡し、トリパンブルーに青く染まる死細胞をカウンターで計数した。

LDHの測定には、マウス脾細胞を 2×10^6 個/mlになるよう細胞懸濁液を調製した。この細胞液を96穴平底マイクロプレートに50 μ l ずつ 5×10^5 細胞/ウェルに加え、37、5%CO₂条件下で24時間培養した。次いで、1%エトポシド溶液を50 μ l ずつ加え、CO₂インキュベーターにて5時間反応させた。エトポシド溶液を添加していないウェルにPBS()を100 μ l 加えた。その他の各ウェルには0.4%Tween 溶液を100 μ l ずつ加えた。室温で20分間反応後、各ウェルの上層部から50 μ lの上清を別のウェルに移し、基質発色試薬としてニトロテトラゾリウムブルーを、50 μ l ずつ加え、室温で45分間反応させた。次いで、反応を停止するため、1N塩酸溶液を含む反応停止液を100 μ l ずつ加えて混和した。マイクロプレートリーダーにて、590nmにおける吸光度を測定し死細胞率を算出した。

実験動物 Balb/c メスマウス3週令を購入しCE 2(クレア)食で4週間3匹飼育したものを実験に供した。

リンパ球浮遊液の調製 リンパ球機能検索法³⁾の手順にしたがって、Balb/c メス7週令マウスから調製した。すなわち、マウスから脾臓を取り出し、メディウム(PBS)中に浸し余分な結合組織を除いた後、ステンレスメッシュ上で押しつぶした細胞浮遊液を軽くピペティングしてから1000rpm、10分間遠心分離して上清を捨て再浮遊させた。

試料 トマト、玉ねぎ、しいたけ、大根、きゅうり、枝豆、もずく、緑茶の各市販品を1g用いて純水50mlで磨砕抽出し1000rpm、10分間遠心分離後、上澄み液を試料とした。ビタミンC、B6、E(シグマ、特級)は1%溶液に調製した。

結果および考察

食品成分をキーワードにアポトーシスとの関連を示す文献を

検索したところ、表1の結果を得た。

表1 食品成分とアポトーシス

- | | |
|---------------------------|---|
| 1. 海藻(紅藻) | 多糖類アガロースから生成される天然オリゴ糖のアガロオリゴ糖ががん細胞に対しアポトーシス作用をもつ。 |
| 2. 海藻(褐藻) | 多糖類U フコイダンが抗がん作用をもつ。 |
| 3. 水溶性キトサン | がん細胞にアポトーシス作用をもつ。 |
| 4. MSN(メチル・スルフォニル・メタン) | 脳神経のアポトーシスを抑制する。 |
| 5. CPL(環状重合乳酸) | 身体にマイナスに作用する細胞に特異的に作用してエネルギーを作れないようアポトーシスする。 |
| 6. ニンニク、7. アガリクス、8. メシマコブ | がん細胞のアポトーシスを起こす |
| 9. イソフラボン(ゲニステイン) | トポイソメラーゼIIを阻害して破骨細胞のアポトーシスに関与する。 |
| 10. カルシウム | 培養液中のカルシウム濃度の上昇は破骨細胞のアポトーシスを誘導する。 |
| 11. エピガロカテキン・エピガロカテキンガレート | 白血病細胞の増殖抑制にカテキン類によるDNAポリメラーゼ阻害によりアポトーシスを誘導する。 |

がん細胞の一種A172細胞を用いて、食品を純水で抽出した水溶液を加えて細胞のアポトーシス促進状態についてLDH活性と細胞形態観察から判定した。その結果、図1に示したように食品を加えなかったコントロールに比べて、アポトーシスを促進した食品・成分は、ビタミンCと、もずくであった。次いでビタミンE、B6が続き、緑茶は予想に反して本実験系では促進しなかった。これらの変化は、位相差顕微鏡による細胞の形態変化、すなわち、細胞の核内のクロマチンが凝縮し、断変化が起こり、アポトーシス小体が観察される結果ともよく一致した(細胞写真は掲載していない)。

次に、マウス脾臓細胞を用いて、食品のアポトーシス抑制率を検討した結果を図2に示した。図1の実験で使用した食品・成分と同一のものを、正常な脾臓細胞に加えたのち、抗がん剤エトポシドを添加して培養後の細胞のLDH活性と形態観察、細胞数計測を行った。食品を加えなかったコントロールに対し、ビタミンC、ビタミンE、もずく、ビタミンB6、緑茶の順にLDH活性は小さくなり、緑茶が最もアポトーシスを抑制することがわかった。緑茶に次いで、ビタミンB6が続き、もずく、ビタミンE、ビタミンCの順に抑制率が低くなった。細胞形

アポトーシスに関する研究(4)

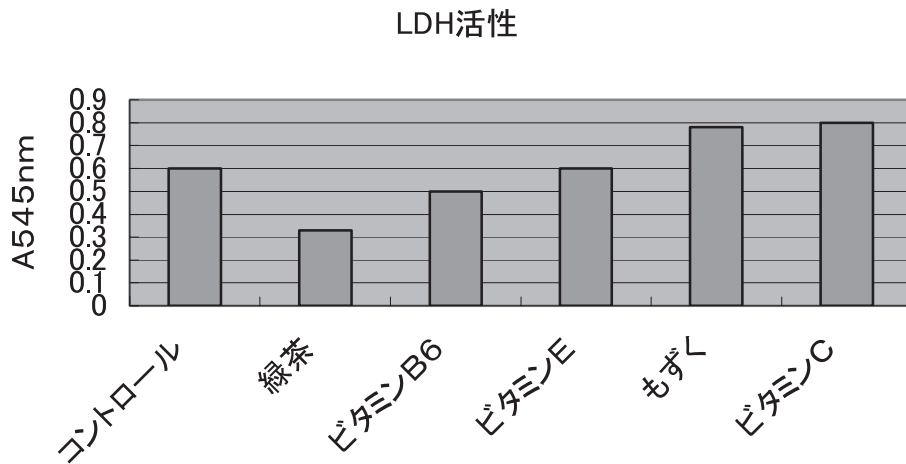


図1 食品・食品成分によるアポトーシス促進

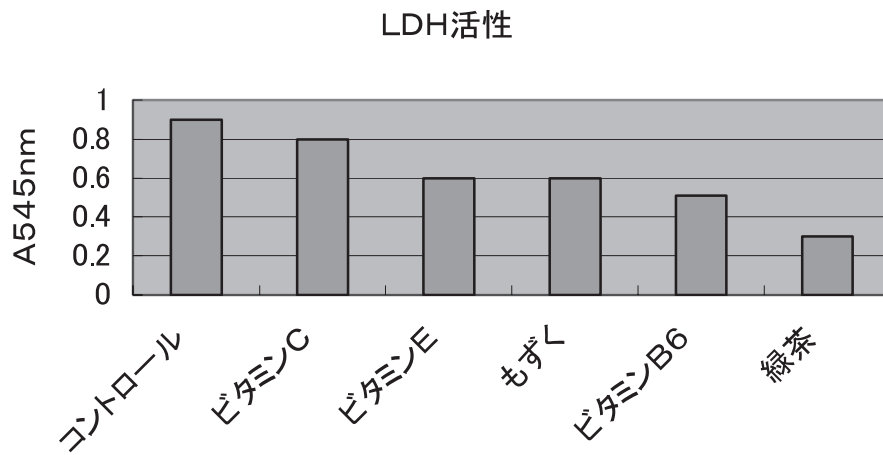


図2 食品・食品成分によるアポトーシス抑制

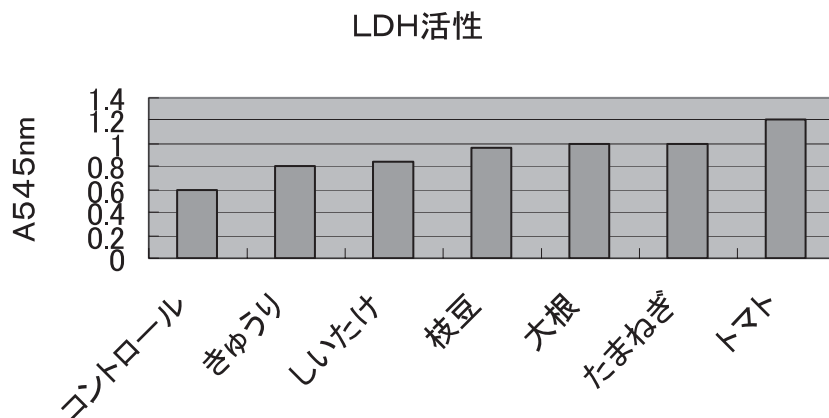


図3 食品によるアポトーシス促進

態と死細胞数も同様な結果となった。

表1で緑茶のカテキン類がDNAポリメラーゼ阻害により白血病細胞のアポトーシスを誘導したが、A172の場合は、DNAポリメラーゼとは異なる作用点をもつと考えられた。

ビタミンB6が緑茶に次いで2番目に位置したことは興味深い。これまでのがん細胞を用いたB6実験と異なる結果が得られたので、今後は、正常細胞を用いた実験系で詳細に検討する

必要がある。

図3では、その他の身近な食品を図1と同じ実験条件で比較した。A172細胞に、もずく、きゅうり、しいたけ、枝豆、大根、玉ねぎ、トマトの純水抽出溶液を加え、培養後のLDH活性を測定したところ、トマトが最も強くアポトーシスを誘導した。トマトにはカリウム、ビタミンCが多く含まれ、赤色素のカロテノイドのリコペンとカロテンがある。トマトの色素

成分であるリコペン、高い抗酸化活性作用をもつ。ビタミンCやカロテンも含まれるため、試験した食品の中で最も抗酸化力が高いことが推測できる。玉ねぎなどに含まれるケルセチンなどの硫黄化合物も抗酸化力が高いと言われている。大根にはビタミンCが豊富で、枝豆にもポリフェノール類のイソフラボンが含まれることが予想されるため、A172細胞のアポトーシスを促進するには、抗酸化力をもつ成分や多く含む食品が適していると考察された。

もずくは、褐藻類の仲間で、ぬめり成分が硫酸化多糖類のフコイダンである。特に、昆布に含まれるUフコイダンは、がん細胞にアポトーシス現象を誘導することが知られている。昆布の消費量が、一人あたり一日約1gと高い沖縄県では、がんによる死亡率も低いと言われ、フコイダンを豊富に含む沖縄モズクにも人気が集まっている。フコイダンの中でも、由来する海藻により構造に違いがあり、海藻類の抗酸化成分は、分画を進めると活性が下がることから複数の成分の相乗効果によるものと考えられている。どのような細胞にも効果があるのか今後の詳細な報告が待たれる。

また、位相差顕微鏡を用いた細胞形態観察の結果、アポトーシスを起こした細胞は黒く丸まって見えるが、細胞のアポトーシスの状態は、これらLDH活性結果とよく一致した。LDH活性の高いものほど、アポトーシス細胞が多く観察され、トリバンプルーで染色された。

これらの実験結果から、がん細胞をアポトーシスするのによい食品と、正常細胞がストレスによりダメージを受けた時、正常細胞がアポトーシスを受けるのを防ぐ働きをする食品は、異なることがわかった。アポトーシスに至る道筋は多数あり、Fasリガンドや腫瘍壊死因子のような生体内因子や、紫外線、ウイルス、薬物などの生体外因子でも誘導される。因子の種類により反応も異なることが推測される。今回使用した細胞以外では、本実験と同じ食品に対しても異なる反応を示すことも予想される。また、ストレスの条件によっても反応が異なることも考えられる。いろいろな食品を摂取することにより、これらの危険性を相互に回避し減弱することが大切であると考えられた。

アポトーシスへの食品の影響を検討したものは、もずくのフコイダン、抗酸化活性をもつカロテノイド、ビタミンC、ビタミンEなど、まだ報告事例が少ない。抗がん作用をもつ食品や成分については、リンパ球数の大小や活性の強弱など免疫学的知見に基づく報告に留まっている。アポトーシスは、亢進でアルツハイマーや自己免疫疾患、一方、抑制でがんの進行など生活習慣病から現代病のあらゆる疾患の原因に基本的に関与している。アポトーシスの仕組みについてはFas、カスパーゼ、p53関与など様々な仕組みが明らかにされているが、これらの作用経路に食品や成分がどのように関与しているかを示した報告はほとんどなく、食品や成分の影響を見ることは極めて重要

な結果である。アポトーシスの調節機構が免疫反応や生化学的变化を説明するものと予想できるため今後も詳細な検討が必要であると考えられた。

要約

A172細胞を用いて、食品によるアポトーシス誘導または実行経路に及ぼす影響について培養実験を用いて検討した。食品を純水で抽出した水溶液をA172細胞に加えた時、細胞のアポトーシス促進状態についてLDH活性を指標に判定した。その結果、食品を加えなかったコントロールに比べて、アポトーシスを促進した食品は、もずく、きゅうり、しいたけ、枝豆、大根、玉ねぎ、トマトで、トマトが最も強くアポトーシスを誘導した。

一方、マウスの脾臓細胞を用いて食品による正常細胞のアポトーシス抑制割合について検討したところ、脾細胞にエトポシドを加えた時、正常細胞におけるアポトーシス抑制は、緑茶が最も効果が高かった。

以上の結果より、がん細胞をアポトーシスするのに優れた食品と、正常細胞がストレスによりダメージを受けた時、正常細胞がアポトーシスを受けるのを抑制する働きをする食品は異なることがわかった。さまざまな食品摂取の重要性を再認識する結果となった。

参考文献

- 1) 道家晶子 アポトーシスに関する研究(2) 岐阜市立女子短期大学研究紀要 第51 p.127~133
- 2) 道家晶子 アポトーシスに関する研究(3) 岐阜市立女子短期大学研究紀要 第52 p.121~125
- 3) 矢田純一、藤原道夫編著 『リンパ球機能検索法』 p.419~422 中外医学社

(提出期日 平成15年12月10日)