

Gallic acid誘導体によるHL60細胞のアポトーシスの誘導

HLA HLA HTAY, 坪内涼子, 羽根田みや子, 村上恵子, 吉野昌孝

(愛知医大・医・生化*)

Induction of Apoptosis of HL60 Cells by Gallic Acid Derivatives

Hla Hla Htay, Ryoko Tsubouchi, Miyako Haneda, Keiko Murakami and Masataka Yoshino

Department of Biochemistry, Aichi Medical University School of Medicine, Nagakute, Aichi 480-1195, Japan

Summary

Induction of apoptosis of HL60 cells by gallic acid derivatives was analyzed in relation to its prooxidant action. Gallic acid esters with long hydrophobic alcoholic chain showed potent apoptotic activity. Octyl- and laurylgallates induced apoptotic cell death of HL60, whereas gallic acid, ethyl-, propyl- and butylgallates caused only a little apoptosis. Octylgallate inactivated aconitase prior to the induction of apoptosis of the cells. Treatment of cells with antibodies to Fas and TNF did not affect the octylgallate-mediated apoptosis, suggesting that Fas or TNF signaling pathway is not responsible for the apoptosis by gallate derivatives. Gallic acid esters with hydrophobic chains can generate superoxide radical and then hydroxyl radical through the inactivation of aconitase in cells. Gallate esters-dependent formation of reactive oxygen species may participate in the apoptosis of HL60 cells.

植物由来ポリフェノールのGallic acid (没食子酸) はタンニンの構成成分であり, 代表的な抗酸化物質として知られており, そのアルキル化エステルのpropylgallateは食品の品質保持の目的で, 食品添加物に利用されている。さらに長鎖エステルであるbutylgallate, octylgallateもEU諸国では同様の目的で食品添加物として認可されている¹⁾。一方, Gallic acid及びそのエステルが腫瘍細胞や原虫に対して細胞毒性, 増殖阻害を示す例が報告され, 抗酸化作用以外の生理機能として, プロオキシダントとしての作用が推測されている^{2,3)}。今回Gallic acidについて鎖長の異なるアルコールとのアルキルエステルのHL60細胞に対する作用を検討し, アポトーシスを誘導することを見出した。さらにアポトーシスの誘導に対する構造・活性相関を検討し, エステル部分の疎水性の大きさがアポトーシス誘導の重要因子であることを解析した。

実験方法

HL60細胞の培養とアポトーシスの誘導

仔牛血清を添加したメディウムでHL60細胞を培養し, gallic acid誘導体を加えることによってアポトーシスを誘導した。アポトーシスによる細胞死はフローサイトメトリーによる解析, 及びDNA断片化²⁾により同定した。

アコニターゼ活性の測定

HL60細胞を凍結融解によって破碎し, 基質クエン酸から生成するイソクエン酸をイソクエン酸脱水素酵素と共役させ, NADPHの生成を340nmの吸収増加で測定した⁴⁾。

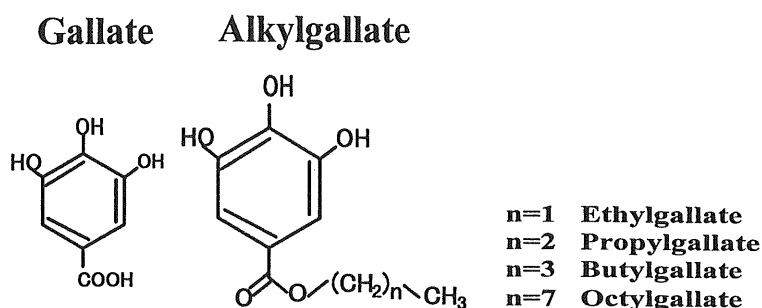
*所在地: 愛知県愛知郡長久手町岩作 (〒480-1195)

結 果

Gallic acid及びその誘導体として, ethyl-, propyl-, butyl-, octyl-, laurylgallate (Scheme 1) をHL60細胞に添加し, アポトーシスの指標としてのDNA断片化を検討した (Fig. 1A)。鎖長の長いアルコールのエステルほど濃度依存的に強力にDNA断片化を引き起こした。Octylgallateは最も強力であり, 200 μ Mの添加30分後にDNAのラダーが観察され, アポトーシスの誘導を認めた (Fig. 1B)。同条件でGallate, Ethylgallateはアポトーシスを誘導しなかった。

アポトーシスの誘導には活性酸素の関与が想定されているが, 活性酸素に対する最も鋭敏な指標としてアコニターゼの失活が知られている。アコニターゼはその活性中心に[4Fe-4S]の鉄/硫黄クラスターをもち, 活性酸素のスーパーオキシドにより, 鉄イオンが酸化・除去されることにより, 失活する⁵⁾。Octylgallate処理を行ったHL60細胞のアコニターゼ活性を測定し, アポトーシスに先立ってアコニターゼが経時的, 濃度依存的に失活することを認めた (Fig. 2)。このことはoctylgallateが細胞内において活性酸素を生成することを示唆している。

Octylgallateによるアポトーシス細胞の出現をフローサイトメトリーによって定量した。Octylgallateの添加によってHL60細胞は70%以上のアポトーシス細胞の出現が観察されたが, このアポトーシスはFas抗体の添加によって影響されなかった (Fig. 3)。さらにTNFR抗体の添加によってもアポトーシス細胞の出現は影響を受けなかった (Fig. 4)。これらの結果はoctylgallateが直接細胞内へ入り, 活性酸素を生成することによって, アポトーシスを誘導するものであり, 細胞膜のFas, TNFR受容体に作用して引き起こすタイプではないことを示唆する。



Scheme 1 Structure of gallate and its alkylesters

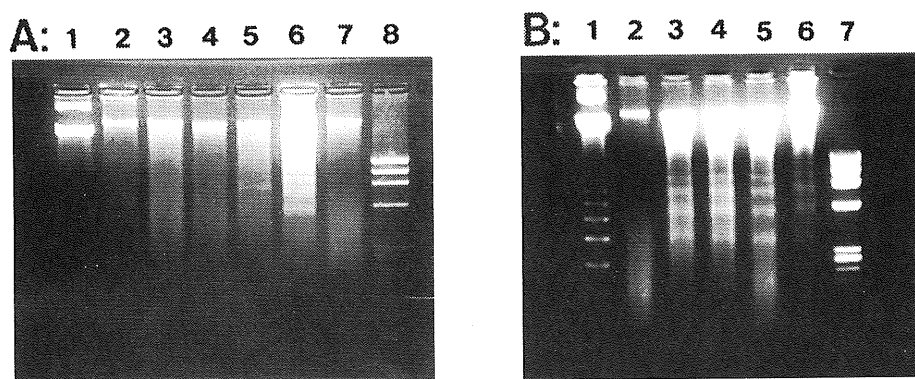


Fig. 1. Gallate compounds-mediated DNA fragmentation in HL60 cells. A. Effect of alkylgallates on DNA fragmentation. HL60 of 2×10^6 cells was incubated with gallate, ethyl-, propyl-, octylgallates for 3 hr. Lane 1, marker of 123 bp; Lane 2, control; Lane 3, gallic acid of 200 μ M; Lane 4, propylgallate of 200 μ M; Lane 5, ethylgallate of 200 μ M; Lane 6, octylgallate of 200 μ M; Lane 7, octylgallate of 25 μ M; Lane 8, standard (ϕ X174-Hae III). B. DNA fragmentation by octylgallate in HL60 cells. HL60 cells were treated with octylgallate of μ M. DNA was extracted at appropriate intervals and subjected to electrophoresis on a 1.5% agarose gel for analyzing DNA fragmentation. Lane 1, marker of 123 bp; Lane 2, 0 hr; Lane 3, 2 hr; Lane 4, 1.5 hr; Lane 5, 1 hr; Lane 6, 30 min; Lane 7, standard (ϕ X174-Hae III).

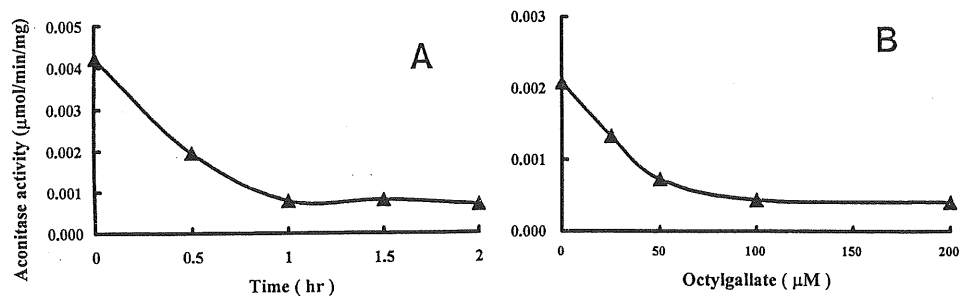


Fig. 2. Inactivation of aconitase by octylgallate in HL60 cells. A, Time dependent inactivation of aconitase. HL60 cells (2×10^7) were treated with $200 \mu\text{M}$ octylgallate for 2 hr, and the enzyme activity was measured at appropriate intervals. B, Concentration dependent inactivation of aconitase. HL60 cells (2×10^7) were treated with 25, 50, 100 and $200 \mu\text{M}$ octylgallate for 6 hr, and the enzyme activity was measured. Enzyme activity was determined in cellular extract prepared by freezing-thawing. Cell pellet was discarded by centrifugation at $12,000 \times g$ for 30 min, and the supernatant was used for the determination of aconitase activity.

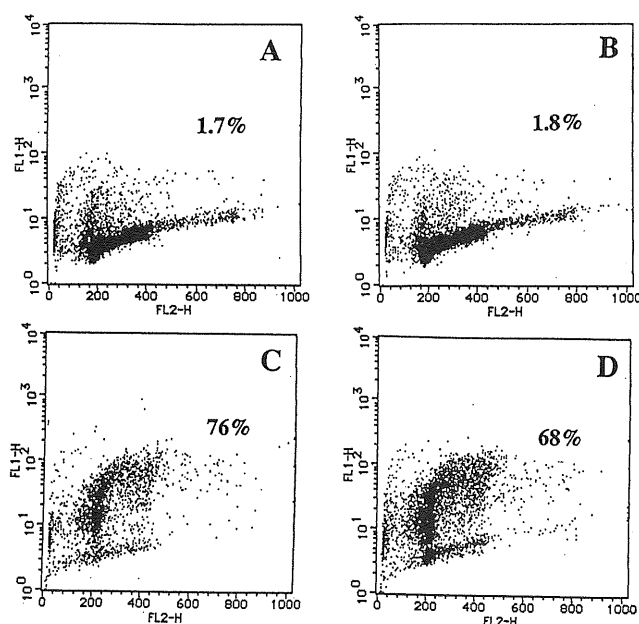


Fig. 3. Flow cytometric analyses of Fas independent apoptosis of HL60 cells by octylgallate. HL60 cells (2×10^6) were treated with $0.5 \mu\text{g/ml}$ of anti-human Fas monoclonal antibody for 2 hr, and octylgallate of $200 \mu\text{M}$ was added and incubated for 1.5 hr. Cells were collected and analyzed by flow cytometry. A, Control; B, Fas antibody ($0.5 \mu\text{M}$ /ml) added; C, $200 \mu\text{M}$ octylgallate added; D, $200 \mu\text{M}$ octylgallate with Fas antibody ($0.5 \mu\text{g/ml}$) added.

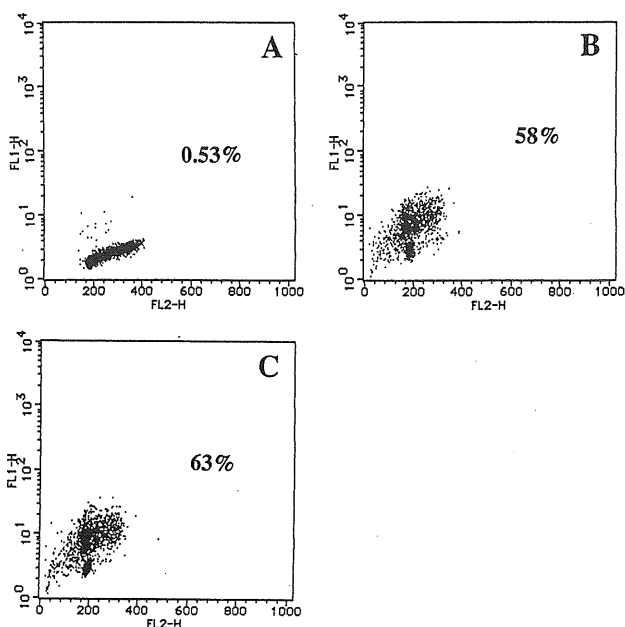


Fig. 4. Flow cytometric analyses of TNF independent apoptosis of HL60 cells by octylgallate. HL60 cells (2×10^6) were treated with $1 \mu\text{g/ml}$ of sTNFR1 for 30 min, and octylgallate of $25 \mu\text{M}$ was added and incubated for 6 hr. Cells were collected and analyzed by flow cytometry. A, Control; B, $25 \mu\text{M}$ octylgallate added; C, $25 \mu\text{M}$ octylgallate with sTNFR1 ($1 \mu\text{g/ml}$) added.

考 察

Gallate誘導体はポリフェノールとしての抗酸化性を特徴とし、食品の品質保持の目的で食品添加物として応用されてきた。とくにアルキル化エステルの propylgallate, butylgallate, octylgallate がその代表である。その一方で、最近 gallate 誘導体による細胞毒性が見出されてきている。腫瘍細胞、リンパ球、あるいは原虫の増殖阻害^{2,3)}、さらに遊離肝細胞のDNA傷害⁶⁻⁸⁾などが報告されている。この細胞毒性の原因として、gallateはポリフェノールとしての還元性を有するため、活性酸素傷害を引き起こすことが想定されている。我々は先に gallate によるアコニターゼの特異的失活を見出し、その機構として gallate による活性酸素の生成による可能性を指摘した⁹⁾。さらに gallate 誘導体の抗酸化作用、プロオキシダント作用の構造・活性相関を解析し、脂質過酸化反応の抑制はアルキル部分の疎水性の強さに依存する一方で、プロオキシダントとなる条件は還元性の強さに由来することを見出した¹⁰⁾。本報においては Gallate 誘導体の細胞毒性の一つとして、HL60細胞のアポトーシスの誘導に対する構造活性相関を解析した。

Gallate 誘導体は HL60 細胞にアポトーシスを誘導した。このアポトーシスはアルキルエステルの鎖長の長いもののほど強力であり、その疎水性によって細胞膜に吸着し、細胞内に取り込まれることが最初の引き金であることを示唆した。またアポトーシスの出現に先立ってアコニターゼの失活が認められ、細胞内に入った gallate 誘導体が遷移金属のレドックスサイクルを介して活性酸素、スーパーオキシドを生成し、アコニターゼを失活させたものと推測された。アコニターゼはスーパーオキシドの鋭敏なセンサーとして働くのみならず、スーパーオキシドによって、アコニターゼの活性中心から遊離した鉄イオンからさらに、ヒドロキシルラジカルを生成することに働くことが示されており、アコニターゼの失活を引き金として連続的に活性酸素、ヒドロキシルラジカルを生成するサイクルを構成していると考えられている¹¹⁾。Gallate 誘導体、とくに側鎖の疎水性の高いアルキルエステル化合物は細胞膜に結合、細胞内に取り込まれて、細胞内においてスーパーオキシドを生成し、アコニターゼの失活、レドックスサイクルを介して、ヒドロキシルラジカルなどの活性酸素を生成する結果、アポトーシスのスイッチをいれることになるかと解釈された。

文 献

- 1) Serrano, A., Palacios, C., Roy, G., Cespón, C., Villar, M.L., Nocito, M. and Gonzalez-Porqué, P. (1998) Arch. Biochem. Biophys. 350: 49 - 54.
- 2) Inoue, M., Suzuki, R., Koide, T., Sakaguchi, N., Ogihiro, Y. and Yabu, Y. (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun. 204: 898 - 904.
- 3) Koide, T., Nose, M., Inoue, M., Ogihiro, Y., Yabu, Y. and Ohta, N. (1998) Planta Medica 64: 27 - 30.
- 4) Rose, I. A. and O'Connell, E. L. (1967) J. Biol. Chem. 242: 1870 - 1879.
- 5) Gardner, P.R. and Fridovich, I. (1992) J. Biol. Chem. 267: 8757 - 8763.
- 6) Nakagawa, Y., Nakajima, K., Tayama, S. and Moldeus, P. (1995) Mol. Pharmacol. 47: 1021 - 1027.
- 7) Nakagawa, Y., Moldéus, P. and Moore, G.A. (1996) Toxicology 114: 135 - 145.
- 8) Nakagawa, Y., Moldeus, P. and Moore, G.A. (1997) Arch. Toxicol. 72: 33 - 37.
- 9) Iwata, S., Murakami, K., Haneda, M. and Yoshino, M. (1999) Biomedical Res. 20: 81 - 86.
- 10) Murakami, K., Ito, M., Htay, H.H., Tsubouchi, R., Iwata, S. and Yoshino, M. (2000) Biomedical Res. 21: 291 - 296.
- 11) Vasquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B. and Kennedy, M.C. (2000) J. Biol. Chem. 275: 14064 - 14069.