

レスベラトロールのプロオキシダント作用発現とアポトーシス誘導

坪内涼子, 村上恵子, 羽根田みや子, 細川好孝, 吉野昌孝[‡]
(愛知医大・医・生化学*)

Generation of Reactive Oxygen Species and Induction of Apoptosis of HL60 Cells by Resveratrol

Ryoko TSUBOUCHI, Keiko MURAKAMI, Miyako HANEDA, Yoshitaka HOSOKAWA and Masataka YOSHINO
*Department of Biochemistry, Aichi Medical University School of Medicine,
Nagakute, Aichi 480-1195, JAPAN*

Summary

Prooxidant and apoptosis-inducing effects of a polyphenol resveratrol that is a principal constituent in grape epicarp on HL60 cells were examined. Resveratrol produced reactive oxygen species (ROS) in HL60 cells in a dose-dependent manner. ROS generation was enhanced by addition of transition metals. Treatment with 10 μ M resveratrol for 20 h induced an apoptotic cell death of HL60 cells, in a dose-dependent manner. Resveratrol induced depolarization of mitochondrial membrane in accordance with activation of caspase-3. These results indicate that resveratrol mediated intracellular production of ROS is closely related to the induction of an apoptosis of HL60 cells.

レスベラトロール (Res) は各種植物、とくにブドウに多く含まれるポリフェノールの一つであり抗酸化作用が知られている。適度な赤ワイン摂取は心血管症、脳卒中などの危険度と負の相関を示す、いわゆる「フレンチパラドックス」に関与する物質と考えられている。一方、ポリフェノール化合物は抗酸化物質として作用するとともに遷移金属の存在下においては、金属イオンの還元を介してスーパーオキシドを生成し、プロオキシダントとしても作用する¹⁾。これらの性質に基づき、今回、Resによる活性酸素生成能とアポトーシス誘導との関連を解析した。その結果、Res濃度依存的な細胞内活性酸素生成能を見出し、さらにアポトーシスの誘導と関連することを明らかにした。

実験方法

1. 試薬および細胞

レスベラトロール、DCFH-DA (2', 7'-dichlorofluorescein diacetate) はSigma-Aldrich-Japanより、JC-1 (5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodide) はCalbiochemより、アポトーシス測定キットApotagはIntergenより、カスパーゼ3測定キットはMBLより購入した。細胞は白血病細胞株HL60細胞を用いた。

2. 方法

1) Resの遷移金属還元能の測定

10 mM トリス塩酸 (pH 7.1) 中で0.05 mM硫酸銅, 0.5 mM塩酸ネオクプロインと各濃度のResを反応させ、450 nmの吸光度をプレートリーダーにて測定した。

*所在地：愛知県愛知郡長久手町岩作雁又21 (〒480-1195)

‡現所属：金城学院大・食環境栄養

‡ Present address : Department of Food and Nutritional Environment, Kinjo Gakuin University, Moriyama, Aichi 463-0021, JAPAN

2) Resによる細胞内活性酸素発生の測定

蛍光プローブDCFH-DAを用いて細胞内活性酸素を測定した。DCF蛍光強度は細胞内活性酸素レベルと平行していることはすでに証明されている。HL60細胞をPBSで洗浄し、DCFH-DA(最終濃度10 μM)で37 $^{\circ}\text{C}$ 遮光下30分間処理した。PBS洗浄後、各濃度のResを添加し細胞内活性酸素の発生を蛍光プレートリーダーにて励起波長475 nm 蛍光測定波長525 nmを用いて経時的に測定した。

3) Resによるアポトーシス惹起解析

Res処理した細胞を集めて、PBSで洗浄し、パラホルムアルデヒドさらにエタノールで固定後、TUNEL法に従い、3'末端を蛍光ラベルし、フローサイトメーターで解析した²⁾。

4) Res処理細胞内ミトコンドリア膜電位の測定

Res処理した細胞を集めて、培地中、親油性カチオン剤JC-1で15分間染色した³⁾。洗浄後、フローサイトメーターを用いて、正常細胞ミトコンドリア膜の赤色蛍光発色と脱分極ミトコンドリア膜の緑色蛍光発色を測定した。赤色蛍光は585 nmで緑色蛍光は530 nmで測定した。

5) カスパーゼ3活性測定

Res処理した細胞を集めて、PBSで洗浄後、水中lysis bufferを加え細胞を破壊して、遠心して得られた上清の酵素活性を測定した。基質としてDEVD-pNAを用いて、1時間反応後、遊離するpNA(p-nitroanilide)の吸光度を波長405 nmで測定した⁴⁾。

結 果

Resを添加したHL60細胞内の活性酸素発生強度をDCFH-DA色素の前投与による蛍光法によって測定すると、1 μM でもかすかな活性酸素発生が認められ、濃度依存的な発生増加が確認された(Fig. 1)。

ResのHL60細胞に対するアポトーシスの誘導能を検討した。10 μM Res, 20時間添加で約5%の細胞にアポトーシスが誘導され、50 μM では40%以上の細胞にアポトーシスが誘導され(Fig. 2)、活性酸素発生に関連したアポトーシス誘導が推察された。さらに活性酸素発生に関して検討すると、Resに二価銅を添加すると、活性酸素の発生増加がみられ、さらに二価銅を高濃度にする、活性酸素発生の増加が確認された(Fig. 3)。ポリフェノール化合物は、遷移金属の存在下、金属イオンの還元を介してスーパーオキシドを生成する事実に基づき¹⁾、Resによる二価銅の還元についてネオ

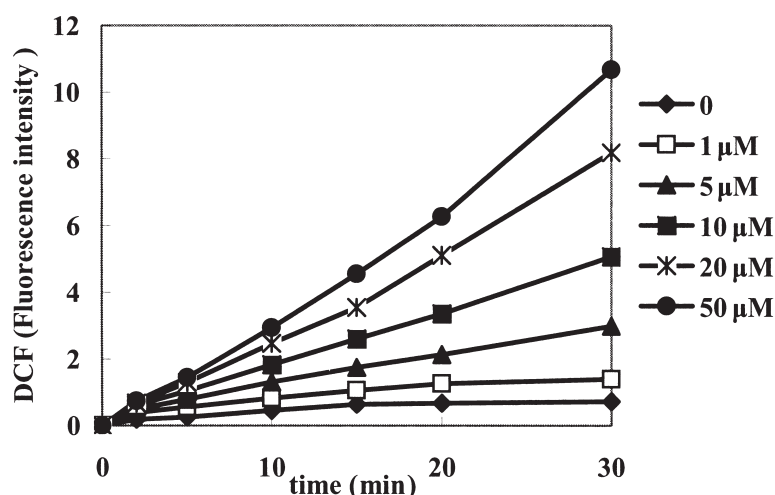


Fig. 1 Generation of intracellular reactive oxygen species in HL60 cells treated with resveratrol. Intracellular reactive oxygen species were determined by loading fluorescent chromophore DCFH-DA to cells. Vertical axis indicates DCF (Fluorescence intensity) and horizontal axis indicates incubation times with various concentration resveratrol.

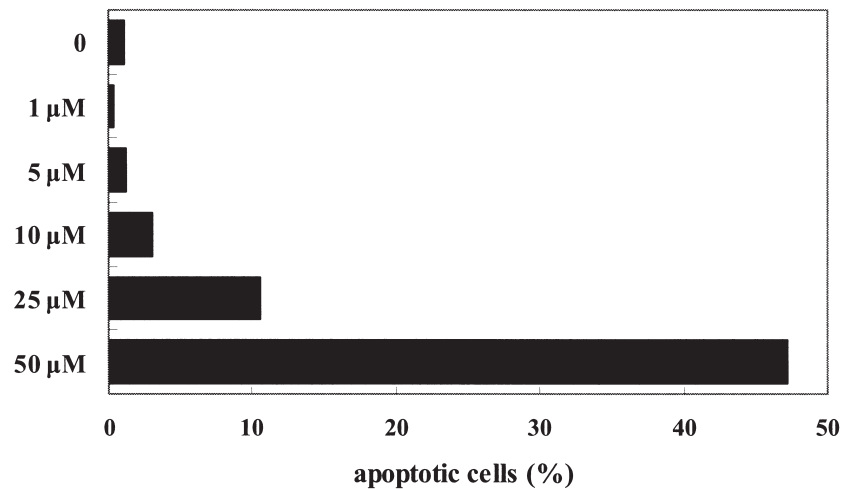


Fig. 2 Induction of apoptosis of HL60 cells treated with resveratrol. HL60 cells were treated with resveratrol at the indicated concentrations for 20 h. Detection of apoptosis was described previously²⁾.

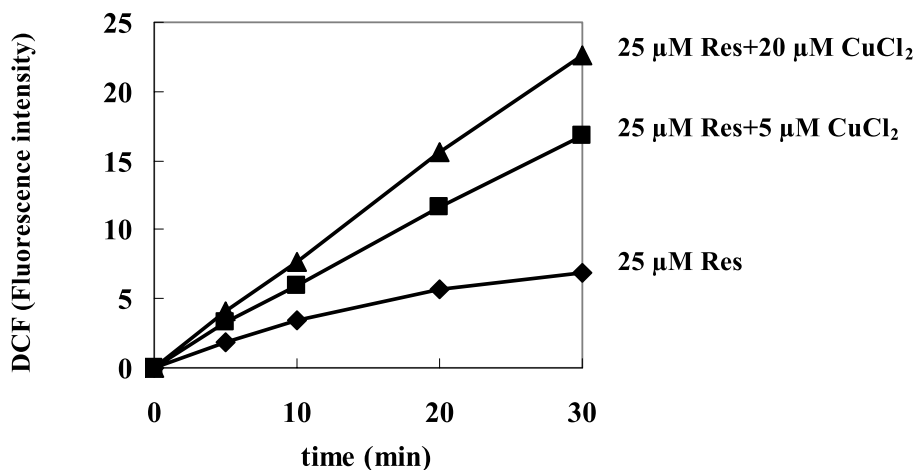


Fig. 3 Generation of intracellular reactive oxygen species in HL60 cells treated with resveratrol and transition metal. Determination of intracellular reactive oxygen species was similar to those described in Fig. 1.

クプロインを用いて検討した。Fig. 4に示すようにResはコントロールとして用いたアスコルビン酸の還元能とよく似た、遷移金属の還元能を示した。一方、Res (3, 5, 4'-trihydroxy-trans-stilbene)と同様にベンゼン核に水酸基を2個もつレゾルシン (1, 3-dihydroxybenzol)は遷移金属の還元能をほとんど示さず、還元能の発現にstilbene構造が関与することが推察された。次に、Resによるアポトーシス誘導に伴ったミトコンドリア膜電位の変化を検討した。JC-1はサイトゾールではモノマーの状態では緑色を呈するが、無傷の細胞膜は負に荷電しているためcationic dyeであるJC-1を引きつけて集積して赤色を呈する。Fig. 5に示すようにResは濃度依存的に赤色蛍光発色の減少を、すなわちミトコンドリア膜電位の低下を示した。アポトーシスの誘因シグナル、および決定機構は多種多様である。しかしカスパーゼ3はすべてのアポトーシスの実行酵素と考えられている。Res処理細胞のカスパーゼ3活性を測定すると、10~25 μM Res添加で酵素活性の増加が確認された (Fig. 6)。さらに50 μM添加で顕著な活性増加が認められ、このカスパーゼ3活性増加は、アポトーシス誘導とよく一致した。

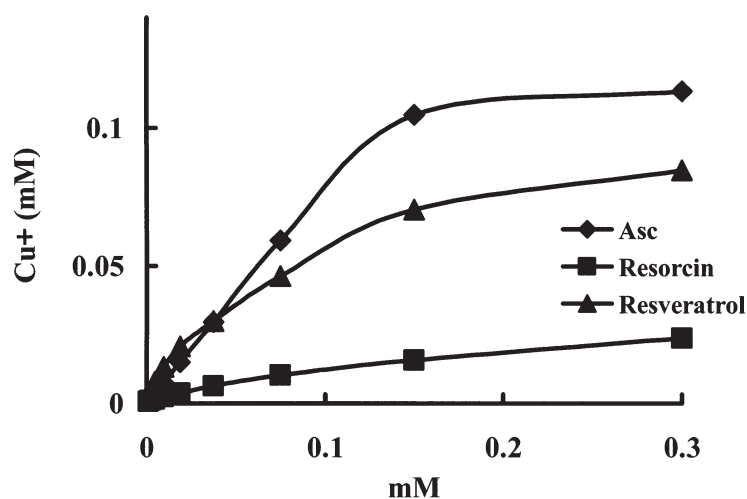


Fig. 4 Effect of resveratrol on the reduction of transition metals. CuSO_4 of 0.05 mM was incubated with 0.5 mM neocuproine and resveratrol at indicated concentration in 10 mM Tris.HCl (pH 7.1) at 37°C. The concentration of Cu^+ was determined by measuring of absorbance at 450 nm by micro plate reader.

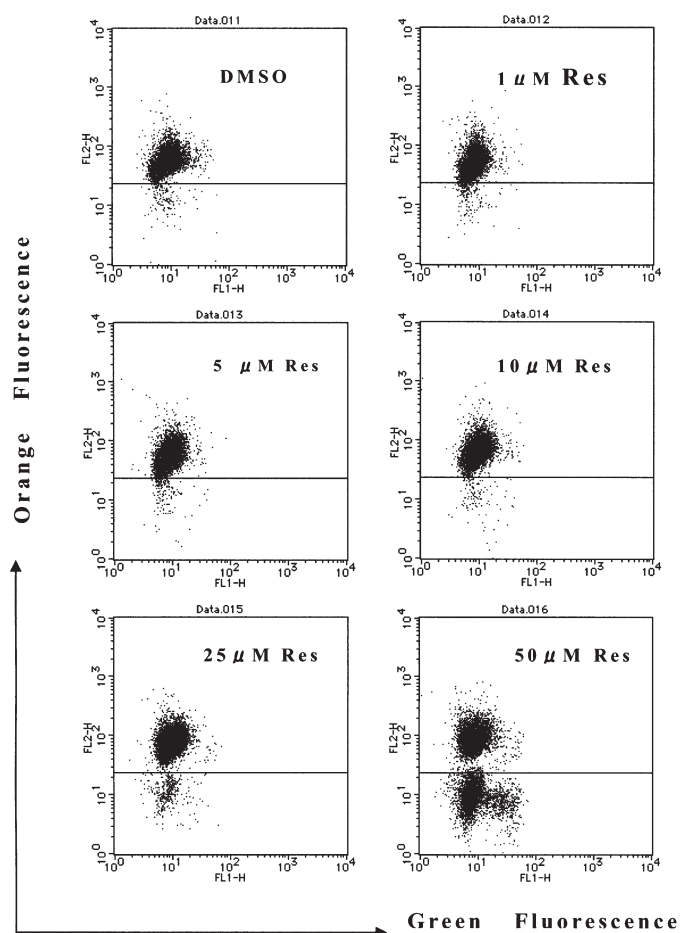


Fig. 5 Effect of resveratrol on the depolarization of mitochondrial membranes in HL60 cells. HL60 cells were treated with resveratrol at the indicated concentrations for 20 h. Cells were stained with the mitochondrial selective JC-1 dye, and analyzed by flow cytometer. Cells with normal polarized mitochondrial membranes emit green-orange fluorescence (top), and cells with depolarized mitochondrial membranes emit decrease orange fluorescence (under).

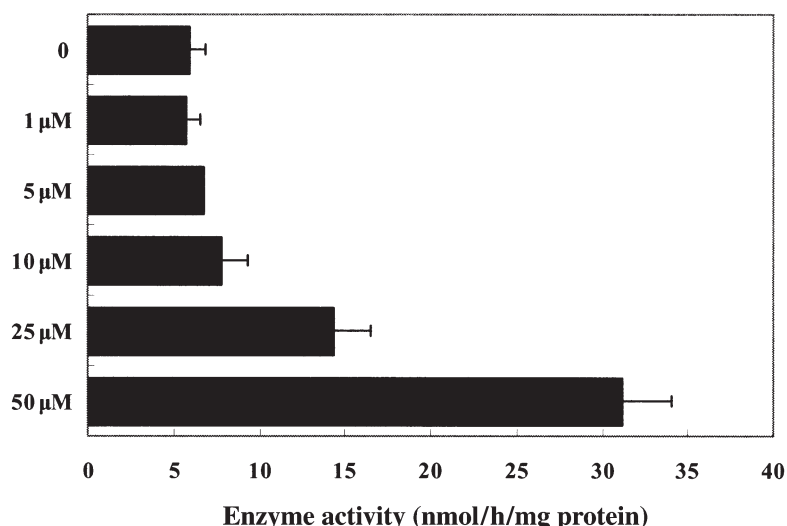


Fig. 6 Effect of resveratrol on the activity of caspase-3 in HL60 cells. HL60 cells were treated with resveratrol at the indicated concentrations for 20 h. The cell lysate extracts were adjusted for equal protein concentration using the Bradford assays. Enzyme activity was measured by colorimetric assay using DEVD-pNA as substrate. Data represents mean \pm S.D. of three samples.

考 察

活性酸素は膜脂質，蛋白質，DNA等に障害を与え，いろいろな疾患の発生に関与すると考えられているが，一方では，抗菌性，抗腫瘍性および細胞分化の制御因子としても作用している。植物由来のフラボノイドはポリフェノールとして抗酸化機能をもつが⁵⁾，遷移金属が存在すると，遷移金属の還元を介して，酸素分子を活性化することにより，活性酸素を生成する¹⁾。今回，赤ブドウ酒等に多く含まれるポリフェノールの一つであるレスベラトロールのプロオキシダント作用を検討し，レスベラトロールがHL60細胞でアポトーシスを誘導することを明らかにした。アポトーシス誘導は濃度依存的に増加を示し，細胞内の活性酸素生成の増加とも一致した。レスベラトロールによるアポトーシス誘因シグナルの一つとして，活性酸素の生成が推察される。酸化銅とレスベラトロールを反応させると一価銅を生じることがネオクプロインで確認された。さらに，HL60細胞で，レスベラトロールのみでも活性酸素を生じるが，酸化銅の存在下で，活性酸素の生成が増加することから，強い還元力をもつレスベラトロールが，遷移金属を還元し，生じた還元型遷移金属イオンは酸素分子と反応しスーパーオキシドを生成し，これがアポトーシスの誘因シグナルになるのではないかと考えられる。



スーパーオキシドは不均化反応によって過酸化水素となりさらに遷移金属存在下において，過酸化水素はフェントン反応によりヒドロキシラジカルを生成し細胞障害の原因になる。

近年，遷移金属の存在下，レスベラトロールがDNAを断裂することが報告され我々の結果を裏付けるデータと考えられる⁶⁾。

レスベラトロールは抗酸化物質として心血管症，脳卒中などの罹患率を減少する物質であると同時にプロオキシダントとしてアポトーシス誘導物質であることが確認された。レスベラトロールのアポトーシスを介した抗腫瘍効果が期待される。

参考文献

- 1) Yoshino M, Haneda M, Naruse M, Murakami K (1999) Prooxidant activity of flavonoids: Copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Mol Genet Metab* 68: 468 - 472.
- 2) Hla Hla Htay, Tsubouchi R, Haneda M, Murakami K, Yoshino M (2002) Induction of apoptosis of HL60 cells by gallic acid derivatives. *Biomedical Res* 23: 127 - 134.
- 3) Stephen TS, Martin R, Cristina MH, Mei L, Ann C, Thomas WS, Clenn DS, Jr, Lan BC (1991) Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic action JC-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3671 - 3675.
- 4) Thornberry NA, Rono TA, Peterson EP, Rasper DH, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman RT, Nicholson DW (1997) A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme. *B J Biol Chem* 272: 17907 - 17011.
- 5) Yoshino M, Ito M, Okajima H, Murakami K, Haneda M (1997) Role of baicalein compounds as antioxidant in the traditional herbal medicine. *Biomedical Res* 18: 349 - 352.
- 6) Fukuhara K, Nagakawa M, Nakanishi I, Ohkubo K, Imai K, Urano S, Fukuzumi S, Ozawa T, Ikota N, Mochizuki M, Miyata N, Okuda H (2006) *Bioorg Med Chem* 14: 1437 - 1443.