

## C6 Glioma cell death after gliotoxins

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9327">http://hdl.handle.net/2297/9327</a>

## グリア毒によるC6グリオーマ細胞死の比較研究

金沢大学医学部附属神経情報研究施設情報伝達研究部門 (主任: 加藤 聖教授)

石 田 外 樹

神経細胞死研究に比べてグリア細胞死研究は大きく立ち遅れている。そこで、グリア細胞に選択的な障害を起こすグリア毒を用いて、その毒性を探ることによりグリア細胞死の分子機序解明を試みた。モデル系としてC6グリオーマ細胞を用い、DL- $\alpha$ -アミノアジピン酸 (DL- $\alpha$ -aminoadipic acid, DL- $\alpha$ -AAA) と6-アミノニコチン酸アミド (6-aminonicotinamide, 6-AN) の2種類のグリア毒を加えて培養し、その影響を検討した。10mM DL- $\alpha$ -AAAの添加によりC6細胞は培養14~16時間以降次第に萎縮し始め、24~36時間でほぼ大部分の細胞が死滅した。一方、1mM 6-ANの添加によりC6細胞は20~24時間以降次第に膨化し始め、48時間でほぼ65%が死滅した。また、DL- $\alpha$ -AAA添加により、細胞内グルタチオン (glutathione reduced form, GSH) 量は速やかに減少し、16時間以降ほぼ完全に枯渇した。一方、6-AN添加では、GSH量の減少は比較的ゆっくり起こり、24時間以降でも対照値の25%は残存した。DL- $\alpha$ -AAA処理C6細胞では、16時間で対照の約3倍の活性酸素種 (主としてH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) の蓄積が認められた。一方、6-ANでは活性酸素の蓄積はいずれの時点においても認められなかった。また、膜の過酸化脂質量を測定したところ、DL- $\alpha$ -AAA添加により16時間で対照の約2倍の蓄積が認められた。一方、6-AN添加では対照値と同じであった。更に、抗酸化剤ビタミンE (100  $\mu$ M) の影響を見たところ、DL- $\alpha$ -AAA誘発細胞死は完全に抑制されたが、6-AN誘発細胞死には無効であった。6-AN細胞死のメカニズムを探るため、NADPHの主要な生成過程であるペントースリン酸回路の代謝物中間体である6-ホスホグルコン酸 (6-phosphogluconate, 6-PG) の細胞内濃度を測定した。その結果、6-AN処理20時間で6-PGは対照の30~50倍増加することがわかった。更に細胞内ATP含量は6-AN処理20時間で対照の20%に減少し、それ以降ほぼ完全に枯渇した。ニコチン酸アミド (1.5mM) の同時添加により、6-AN処理による細胞死、6-PGの異常蓄積、ATP含量の減少は、完全に抑制された。次に細胞核DNAの染色像を検討したところ、DL- $\alpha$ -AAA処理20時間で顕著なDNAの濃縮、凝集、断片化が観察された。一方、6-AN処理では、そのような濃縮、凝集、断片化は認められず代わりに核の膨潤化が観察された。以上の結果から、DL- $\alpha$ -AAAの毒性機序はシスチン/グルタミン酸交換輸送系を介したシスチン取り込みの阻害によりGSHの減少枯渇、それに続く活性酸素の細胞内蓄積による酸化的ストレス死が考えられた。一方、6-ANの毒性機序は酸化的ストレス死ではなく、6-ANから6-アミノ-NADPの生成によるNADPH産生阻害、6-PGの蓄積およびそれに続く解糖系の阻害に基づくATPの減少枯渇による細胞死が考えられた。

**Key words** DL- $\alpha$ -aminoadipic acid, 6-aminonicotinamide, glial cell death, glutathione depletion, ATP depletion

### 緒 言

最近のアポトーシス研究の発展には目覚ましいものがあり、この傾向は神経系においても例外ではない。特に脳虚血に端を発したグルタミン酸受容体のサブタイプであるN-メチル-D-アスパラギン酸 (N-methyl-D-aspartic acid, NMDA) を介した神経細胞死研究は爆発的である<sup>1) 2)</sup>。その結果Ca<sup>2+</sup>イオン<sup>3)</sup>、一酸化窒素<sup>4)</sup>、活性酸素<sup>5)</sup>等の関与が次々と明らかにされてきた。一方神経系におけるもう一つの細胞要素であるグリア細胞についての細胞死研究は神経細胞と比べて大きく立ち遅れているのが現状である。我々は数年来、C6グリオーマ細胞を用いたモデル系や網膜グリア細胞 (ミュラー細胞) を対象としてこの

グリア細胞死の研究に取り組んできた。上述のグルタミン酸がNMDA受容体ではなく、比較的グリオーマ細胞やグリア細胞に豊富に発現しているシスチン/グルタミン酸交換輸送系 (細胞内のグルタミン酸を細胞外に、逆に細胞外のシスチンを細胞内に取り込むアミノ酸輸送系) を介して細胞死を引き起こすことを見出した<sup>6) ~ 8)</sup>。つまり細胞外へのグルタミン酸添加により、シスチン取り込みが阻害され細胞内の主要な還元物質グルタチオン (glutathione reduced form, GSH) が減少枯渇し細胞死に到ると考えられる。他方、従来よりグリア細胞に選択的な細胞障害を起こす種々の物質、すなわちグリア毒として記載される一群が知られている<sup>9) ~ 12)</sup>。しかしながら、これらグリア毒の研究は主として形態学的な研究に限られ、その毒性に関する

平成9年3月7日受付, 平成9年3月19日受理

Abbreviations: 6-AN, 6-aminonicotinamide; DCF, 2', 7'-dichlorofluorescein; DCFH-DA, 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; DL- $\alpha$ -AAA, DL- $\alpha$ -aminoadipic acid; G-6-P, glucose-6-phosphate; GSH, glutathione reduced form; GSSG, glutathione oxidized form; LDH, lactate dehydrogenase; LPO, lipid

細胞内あるいは分子機序は多くは不明のままである。そこで、これらグリア毒によるグリア細胞死の機序を解明するために、DL- $\alpha$ -アミノアジピン酸 (DL- $\alpha$ -aminoadipic acid, DL- $\alpha$ -AAA)<sup>13)</sup> と6-アミノニコチン酸アミド (6-aminonicotinamide, 6-AN)<sup>14)</sup> を選び検討した。DL- $\alpha$ -AAAはグルタミン酸と比べて側鎖の炭素が一個だけ多いアミノ酸であり、先に述べたトランスポーター系を介してGSHを減少、枯渇させることが予想される。また、6-ANは生体内の補酵素NADやNADPの構成成分として重要なニコチン酸アミドの類似物質で、NADPHの産生を阻害する<sup>15)</sup> と言われている。GSHはグルタチオンペルオキシダーゼ (glutathione peroxidase) により酸化型グルタチオン (glutathione oxidized form, GSSG) になり、このGSSGはNADPH依存性にGSHに還元される。それ故6-ANによりGSSGからGSHへの還元量が減少することが予想される。以上の理由からこの2種のグリア毒による細胞死機構がGSHの減少枯渇ひいては活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) の蓄積による酸化的ストレスで説明できるか否かを比較検討した。

#### 材料および方法

##### I. 材料

培養細胞として、ラット由来C6グリオーマ細胞を用い、5%牛胎児血清を含んだダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM) (Gibco, Grand Island, USA) にて37°Cで培養した<sup>16)</sup>。DMEM中のシスチン濃度は200  $\mu$ Mであった。DL- $\alpha$ -AAA (Sigma, St. Louis, USA)、6-AN (Sigma) やその他の試薬は培養開始時に培地に添加した。

##### II. 細胞死の判定

細胞死の判定は全細胞中の乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase, LDH) 活性に対する培養液中に遊離したLDH活性の比率によった<sup>17)</sup>。培養した全細胞をかき集め、リン酸緩衝液 (pH7.4) でホモジナイズし、4°Cで20分間 12,000 xg遠心し、その上清の一部と、培養液中の一部をそれぞれ採取し、560nmの吸光度の増加を測定した。

##### III. グルタチオンの定量

細胞内のGSH量は、SH基に特異的な蛍光プローブ4-フルオロ-7-サルファモイルベンゾフラザン (4-fluoro-7-sulfamoylbenzofurazan) (和光, 大阪) を用いた高速液体クロマトグラフィー法にて測定した<sup>18)</sup>。

##### IV. 活性酸素種の定量

ROSの細胞内蓄積の測定には2', 7'-ジクロロフルオレッシンジアセテート (2', 7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA) (Molecular Probe, Eugene, USA) を用いた。これは細胞内に取り込まれた後、エステラーゼ (esterase) によって2', 7'-ジクロロフルオレッシン (2', 7'-dichlorofluorescein) に変化し、細胞内ROS、主にH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>により酸化され蛍光性の2', 7'-ジクロロフルオレセイン (2', 7'-dichlorofluorescein, DCF) を生ずる。C6グリオーマ細胞を薬物処理後、各時間に細胞を集め、ハンクス塩類溶液で洗浄後、DCFH-DA (10mM) を加え、37°Cで15分間取り込ませた。4°Cで5分間3000 xg遠心により、未結合のDCFH-DAを洗浄し、再びハンクス液を加え37°Cで60分間

インキュベーションした。この前後で蛍光強度 (488nm励起波長, 525nm蛍光波長) を測定した<sup>19)</sup> (蛍光分光光度計F-2000型, 日立, 東京)。細胞の自家蛍光は10%以下であった。DCFの標準曲線 (10-600nM; 和光) を用い各サンプルの蛍光強度から、単位時間および蛋白量あたり産生されるDCF値を計算し、ROSの細胞内蓄積量とした。蛋白量はLowryらの方法<sup>20)</sup> により定量した。

##### V. 過酸化脂質の定量

膜の過酸化脂質量はチオバルビツール酸 (thiobarbituric acid, TBA) との反応で生成するマロンジアルデヒド (malondialdehyde) を定量し評価した。対照および薬物処理したC6細胞を集め、TBA試薬を加え沸騰水浴中で60分間反応させた。この反応で生じた赤色の生成物を励起波長515nm, 蛍光波長553nmで測定した<sup>21)</sup> (F-2000型, 日立)。

##### VI. 6-ホスホグルコン酸の測定

6-ホスホグルコン酸 (6-phosphogluconate, 6-PG) 量は6-ホスホグルコン酸脱水素酵素 (6-phosphogluconate dehydrogenase, 6-PGDH) を用いる比色法で求めた。細胞浮遊液に0.6N過塩素酸 (1mM EDTAを含む) を加え4°Cで2分間 12,000 xg遠心し、上清を3M炭酸カリウム (potassium carbonate, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) で中和した。この中和上清に0.1Mグリシルグリシン緩衝液 (pH8.0), 7mM MgCl<sub>2</sub>, 11mM NADP (オリエンタル酵母, 東京), 6-PGDH (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) 0.24Uを加え37°Cで10分間反応させた。340nmの吸光度の増大から生成したNADPH量を求め、6-PG量を算出した<sup>21)</sup>。

##### VII. 細胞内ATPの測定

ATPの測定はルシフェリン・ルシフェラーゼ (luciferin-luciferase) を用いた生物発光法により行った。細胞浮遊液に0.6N過塩素酸 (1mM EDTAを含む) を加え攪拌後4°Cで2分間 12,000 xg遠心した。上清を3M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>で中和後、25mM HEPES緩衝液 (pH7.8) と発光試薬 (キッコマン, 野田) を加えて発光量をルミノメータBLR-201型 (アロカ, 東京) で測定した<sup>22)</sup>。ATP濃度は標準曲線 (0.1-100nM) より求めた。

##### VIII. 核DNAの蛍光染色

DNAに特異的な蛍光色素H33258 (Molecular Probe) を用いた核染色を行った。対照および薬物処理細胞を集め、10%中性ホルマリンにて5分間固定、蒸留水で洗浄後、H33258 (8  $\mu$ g/ml) で5分間染色し蒸留水で洗浄後、グリセリンで封入した。蛍光は励起波長370nm, 蛍光波長500nmで観察した<sup>23)</sup> (蛍光顕微鏡 UFX-IIA型, ニコン, 東京)。

##### VIII. 統計処理

生化学的定量実験では結果を平均値±標準偏差 ( $\bar{x}$ ±SD) で表わし、2群間の平均値の差はStudentのtテストにて検定した。

#### 成 績

##### I. C6グリオーマ細胞に対するグリア毒の影響

C6グリオーマ細胞 (1.5x10<sup>6</sup>細胞) にDL- $\alpha$ -AAA (10mM) を添加すると、24~36時間後には殆どの細胞が萎縮し死滅した (図1B)。一方、6-AN (1mM) を添加した場合、36~48時

間後、大部分の細胞は対照(図1 A)に比べて、薄くなり膨潤化した(図1 C)。次に細胞死の判定を培養液中に放出されるLDH活性により評価したところ、DL- $\alpha$ -AAA添加では培養14~16時間以降次第に細胞死が観察され、24時間後では25%、48時間では5%が生存するのみであった(図2)。6-AN添加では、細胞死はDL- $\alpha$ -AAAと比べて遅く24時間では70%、48時間でも32%が生存した(図2)。なお、DL- $\alpha$ -AAAの細胞死に対する

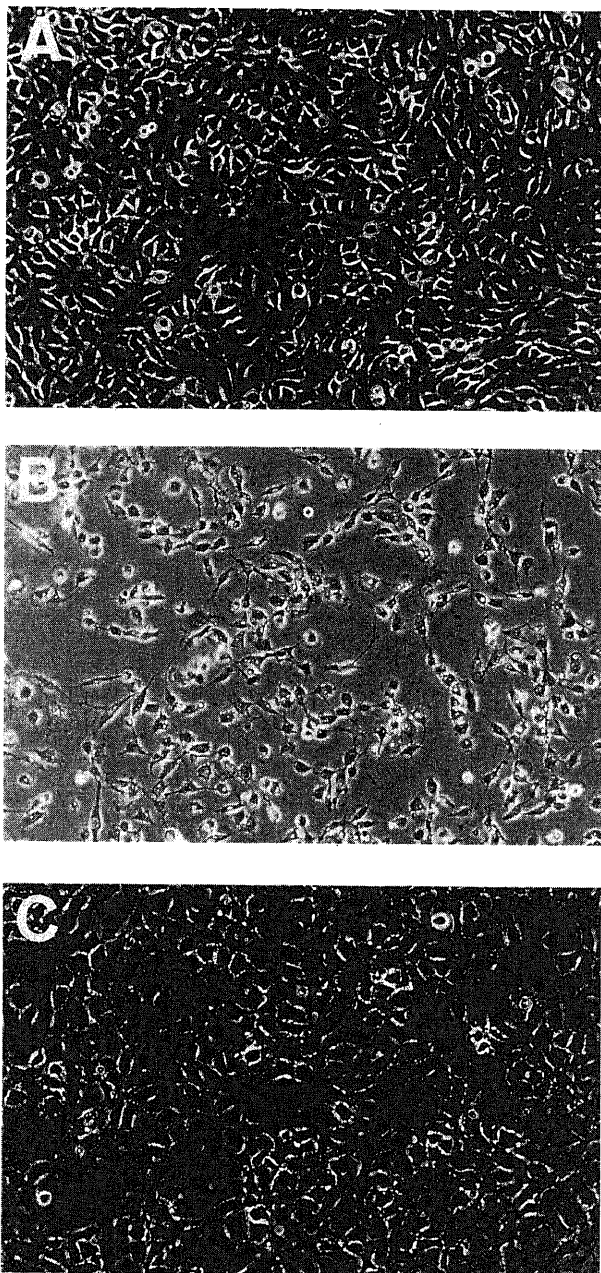


Fig. 1. Cell morphology of C6 glioma cells treated with gliotoxins. (A) In control culture. C6 glioma cells ( $1.5 \times 10^6$  cells) were cultured in the standard DMEM for 48 hr. (B) with 10 mM DL- $\alpha$ -AAA. Exposure of C6 cells to DL- $\alpha$ -AAA for 36 hr resulted in detachment from the surface of dishes and flotation of cells in the medium. Almost all cells died. (C) with 1 mM 6-AN. Exposure of C6 cells to 6-AN for 48 hr resulted in the conspicuous swelling of the cells as compared with control.  $\times 100$ .

ED<sub>50</sub>は約4mM、6-ANのED<sub>50</sub>は約0.1mMであった。したがって以後の実験は、通常10mM DL- $\alpha$ -AAA、1mM 6-ANを用いて行った。

## II. グルタチオンに対するグリア毒の影響

DL- $\alpha$ -AAAおよび6-AN誘発細胞死に対する生体内還元物質GSHの関与を探る目的で、各培養時間におけるGSH濃度を測定した。DL- $\alpha$ -AAA処理では、比較的早期から減少し、8時間では対照の約25%、16時間では10%以下に減少し、それ以降は枯渇した(図3)。一方、6-AN処理では8時間で対照の約50%、16時間で35%、24時間で25%に減少した(図3)。

## III. 細胞内活性酸素種蓄積に対するグリア毒の影響

C6グリオーマ細胞に対して、DL- $\alpha$ -AAAと6-ANのいずれもがGSHを減少させたので、その細胞内機序を探る目的で還元物質GSH減少による酸化ストレス負荷を想定し細胞内ROSの蓄積量を生化学的に検討した。DL- $\alpha$ -AAA処理では、8時間までは著変なく、16時間で約3.0倍、22時間では最大3.3倍に増加した(図4)。一方、6-AN処理では24時間以降においても有意なDCF産生は認められなかった(図4)。

## IV. 細胞膜過酸化脂質に対するグリア毒の影響

細胞内活性酸素種の細胞内ターゲットの1つは生体膜の不飽和脂肪酸である。そこで細胞障害として細胞膜過酸化脂質量(lipid peroxide, LPO)を測定した。DL- $\alpha$ -AAA処理によりLPOは、16時間で約2倍、22時間後で最大2.2倍の増加が認められた(図5)。一方、6-AN処理では、対照群と比べて24時間以降でも有意な増加は認められなかった(図5)。

## V. グリア毒による細胞死に対するビタミンEおよびニコチン

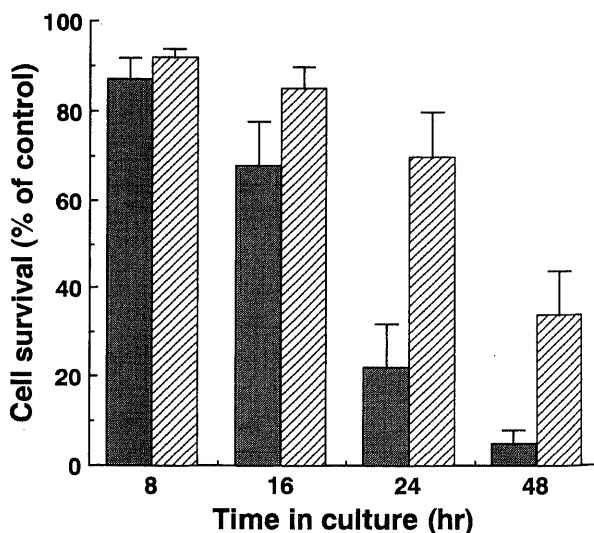


Fig. 2. C6 glioma cell death to gliotoxins. The cell death was estimated by a ratio of LDH activity released in the medium against the activity of total cells (see Materials and Methods). After 16 hr of 10 mM DL- $\alpha$ -AAA incubation, C6 cells were gradually deteriorated and then almost all cells died. The survival ratio of C6 cells at 2 day culture was less than 10%. In culture of 1 mM 6-AN, C6 glioma cells remained unchanged by 16 hr and thereafter the C6 cells died slowly. The survival ratio of C6 cells at 2 day culture was about 35%. ■, DL- $\alpha$ -AAA. ▨, 6-AN. Each value is  $\bar{x} \pm SD$  (n=4-6).

ン酸アミドの影響

DL- $\alpha$ -AAA 処理により GSH の枯渇, ROS の蓄積が認められたので, 抗酸化剤ビタミン E の細胞死に対する影響を検討した。その結果, DL- $\alpha$ -AAA 誘発細胞死はビタミン E 添加により完全

に抑制された (図 6)。6-AN による細胞死に対してビタミン E は無効であったが, ビタミン B 群の一種ニコチン酸アミド (nicotinamide, NA) を添加したところ, 6-AN 誘発細胞死は完全に抑えられた (図 6)。なお NA は DL- $\alpha$ -AAA による細胞死

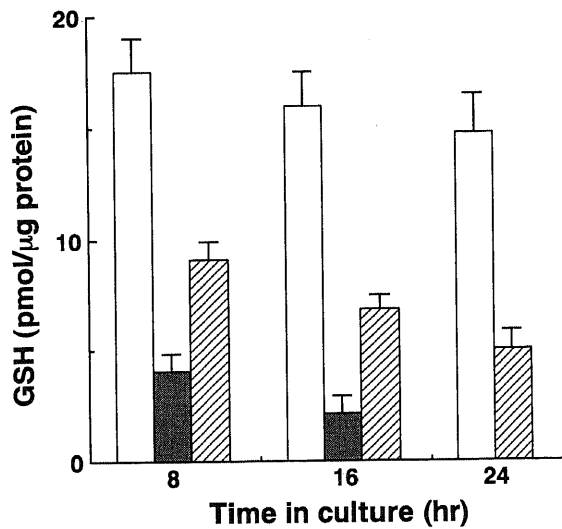


Fig. 3. Cellular level of GSH after treatment of gliotoxins. The cellular level of GSH was dramatically decreased by the culture of DL- $\alpha$ -AAA. The cellular content of GSH was less than 10% of control at 16 hr of incubation and thereafter completely depleted. In contrast to DL- $\alpha$ -AAA, the decrease of GSH level by 6-AN was slow and the cellular level of GSH after 24 hr remained to 30% of control. □, control. ■, DL- $\alpha$ -AAA. ▨, 6-AN. Each value is  $\bar{x} \pm SD$  (n=4-6).

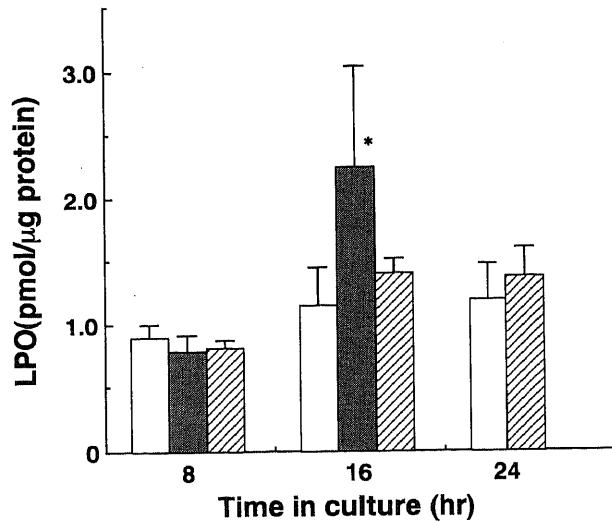


Fig. 5. Lipid peroxidation accumulation after treatment of gliotoxins. DL- $\alpha$ -AAA induced a two-fold increase of LPO accumulation 16 hr after treatment. In contrast, 6-AN did not induce the LPO accumulation at any cultivation times. □, control. ■, DL- $\alpha$ -AAA. ▨, 6-AN. Each value is  $\bar{x} \pm SD$  (n=4-6). \*P<0.01 as compared with control.

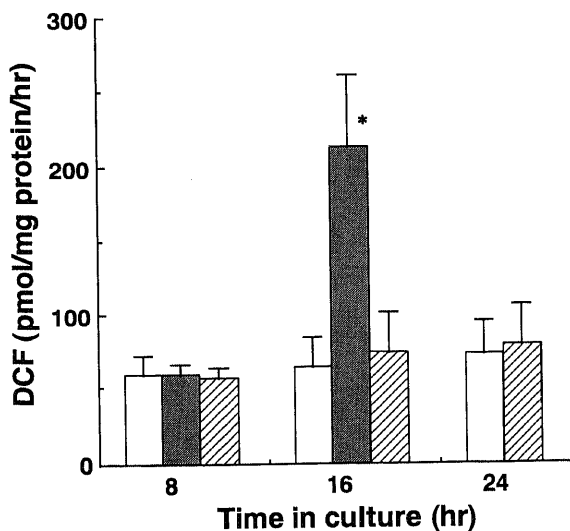


Fig. 4. 2', 7'-Dichlorofluorescein formation after treatment of gliotoxins. C6 glioma cells were cultured in DMEM with gliotoxin and DCF formation was measured with a fluorescent probe, DCFH-DA. The rate of DCF formation was significantly increased three times 16 hr after DL- $\alpha$ -AAA treatment. In contrast, the rate of DCF formation by 6-AN was not increased at any cultivation times. □, control. ■, DL- $\alpha$ -AAA. ▨, 6-AN. Each value is  $\bar{x} \pm SD$  (n=4-6). \*P<0.01 as compared with control.

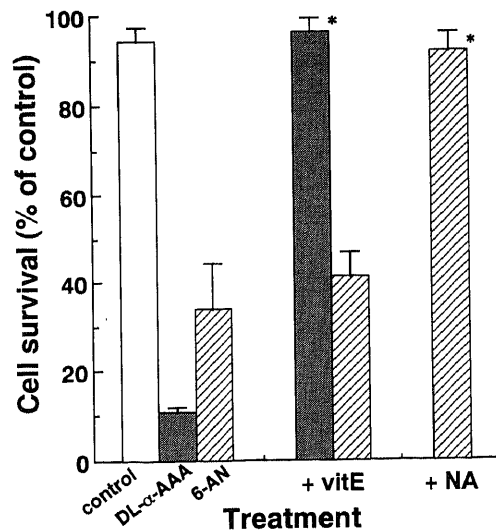


Fig. 6. Protective effect of vitamin E or nicotinamide on cell death induced by gliotoxins. C6 cells were cultured with gliotoxin alone or with gliotoxin plus vitamin E (+vit E) or nicotinamide (+NA). When 10 mM DL- $\alpha$ -AAA was added to the medium at the beginning of the culture, almost all cells died 20 hr later. The presence of vitamin E (100  $\mu$ M) completely suppressed the DL- $\alpha$ -AAA induced cell death, but not the 6-AN induced cell death. On the other hand, the presence of NA (1 mM) completely rescued the 6-AN induced cell death. □, control. ■, DL- $\alpha$ -AAA. ▨, 6-AN. Each value is  $\bar{x} \pm SD$  (n=4). \*P<0.01 as compared with gliotoxin alone.

には無効であった。

#### VI. 6-ANによる細胞内6-PGの蓄積

6-AN処理により、中等度のGSH減少が見られたが、ROSや細胞膜過酸化脂質の蓄積、抗酸化剤やラジカスカベンジャー

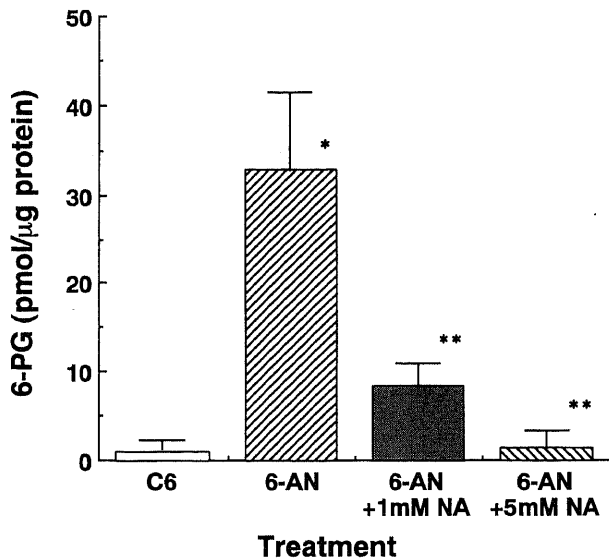


Fig. 7. Cellular level of 6-phosphogluconate after 6-AN treatment. C6 glioma cells were cultured with 1 mM 6-AN or with 1 mM 6-AN plus 1 mM NA for 20 hr. 6-AN increased a cellular level of 6-PG several ten times. Interestingly, this increase of 6-PG accumulated by 6-AN was completely restored to a control level in the coexistence of NA (1-5 mM). Each value is  $\bar{x} \pm SD$  (n=4). \*P<0.001 as compared with control. \*\*P<0.001 as compared with 6-AN treatment.

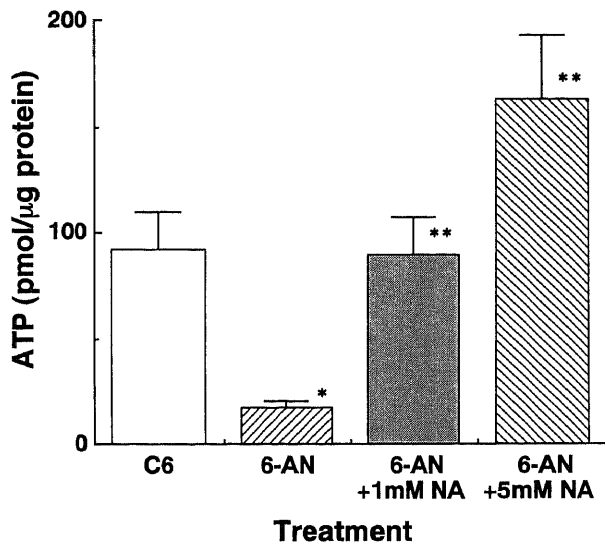


Fig. 8. Cellular level of ATP after 6-AN treatment. C6 cells were cultured with 6-AN or with 6-AN plus NA for 20 hr. The cellular level of ATP was drastically decreased by 6-AN. The decrease of cellular level of ATP was completely restored to a control or over control by the coexistence of 1 mM or 5 mM NA, respectively. Each value is  $\bar{x} \pm SD$  (n=4). \*P<0.001 as compared with control. \*\*P<0.001 as compared with 6-AN treatment.

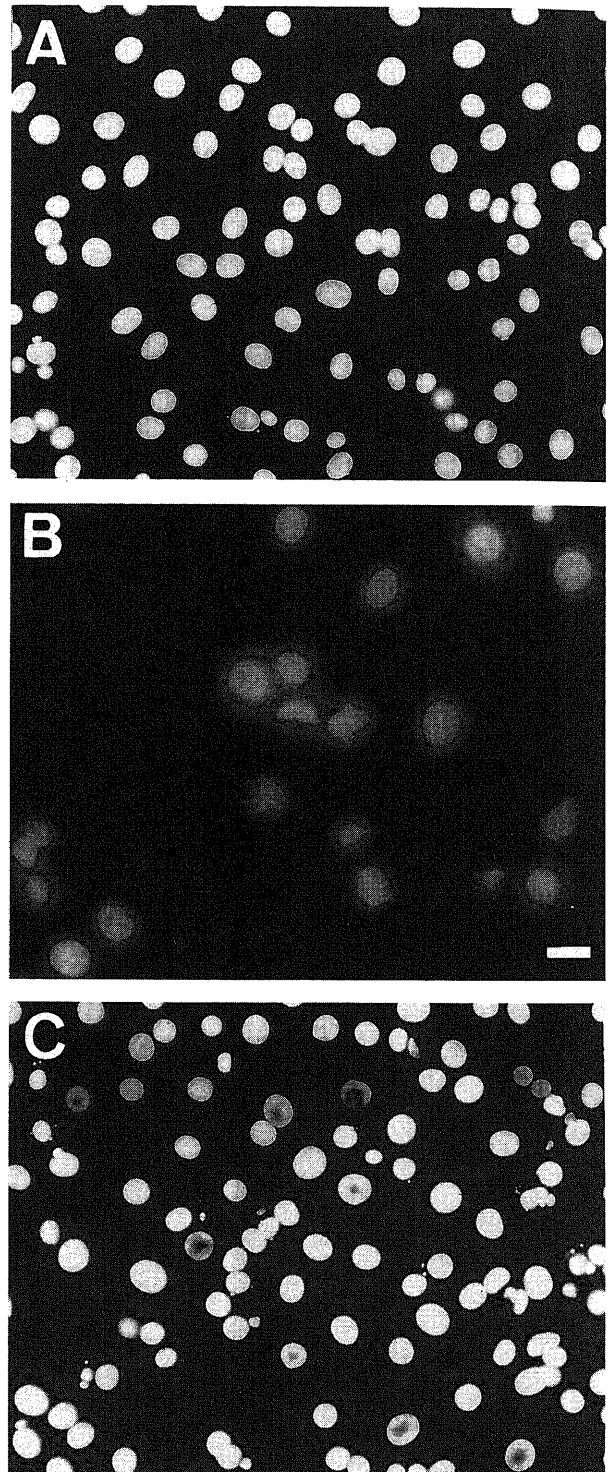


Fig. 9. DNA staining with H33258 after treatment of gliotoxins. (A) Cells ( $4.0 \times 10^5$ ) were plated and incubated in standard DMEM for 20 hr. (B) When 10 mM DL- $\alpha$ -AAA was added to the medium at the beginning of the culture, condensation of chromatin masses and aggregation at the nuclear membrane progressed and almost all nuclei changed 20 hr after treatment. (C) When 1 mM 6-AN was added to the medium for 20 hr, no apparent chromatin condensation and aggregation could be seen, whereas abnormally swollen nuclei could be seen conspicuously. Scale bar=10  $\mu$  m.

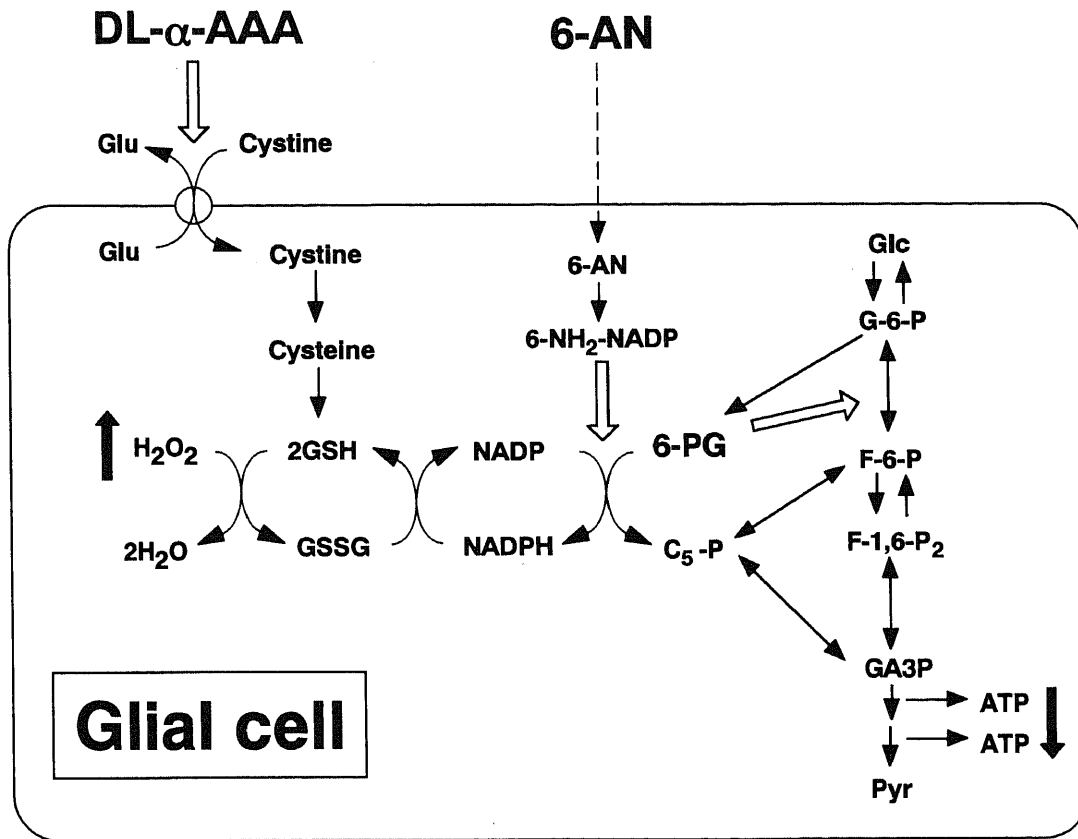


Fig. 10. Summary of gliotoxic mechanisms for DL- $\alpha$ -AAA and 6-AN. Left: DL- $\alpha$ -AAA inhibits cystine uptake through the cystine/glutamate antiporter leading to GSH depletion. Finally, this GSH depletion induces ROS accumulation, particularly H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (marked with  $\uparrow$ ) in response to oxidative stress, resulting in DL- $\alpha$ -AAA cell death of C6 glioma cells. Right: 6-AN is easily permeable to cell membrane ( $\downarrow$ ) and thus 6-amino-NADP (6-NH<sub>2</sub>-NADP) is formed. This 6-NH<sub>2</sub>-NADP inhibits NADPH production leading to accumulation of 6-PG, which is a major metabolite in the pentose phosphate cycle. The 6-PG accumulated further inhibits glycolysis from G-6-P leading to ATP depletion (marked with  $\downarrow$ ). Finally, the ATP depletion results in 6-AN cell death of C6 glioma cells. Thick white arrows ( $\downarrow$ ) indicate initial metabolic blockades of gliotoxins.

(radical scavenger) による細胞死の抑制は認められなかった。しかし、NAの同時添加により細胞死が完全に抑えられた。それ故、6-ANのC6細胞死にはROSの関与以外の機構が強く示唆された。そこでNAの細胞死抑制効果や6-ANがNADPH産生を阻害する<sup>19)</sup>ことを考慮して、生体内におけるNADPHの主要な生成過程であるペントースリン酸回路のグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (glucose-6-phosphate dehydrogenase) および6-PGDHの阻害<sup>11) 20)</sup>を想定して、6-PGの細胞内濃度を測定した。細胞内6-PG量は、6-AN処理により、20時間で対照の約30~50倍と著しく増加した(図7)。また、この6-PGの増加はNAの同時添加(1-5mM)により抑制された(図7)。

Ⅶ. 6-ANによる細胞内ATPの減少

次に6-AN処理により細胞内に顕著な蓄積が観察された6-PGは、グルコース-6-リン酸 (glucose-6-phosphate, G-6-P) のアナログであることから、G-6-P以降の解糖系を阻害し、その結果細胞内ATP量が減少することを想定した。ATP量は、6-AN処理により培養20時間で対照の20%にまで減少し、それ以降は枯渇した(図8)。NAを同時添加(1-5mM)すると、ATP量は対

照値またはそれ以上にまで回復した(図8)。

Ⅷ. 細胞核に対するグリア毒の影響

蛍光色素H33258により核染色を施し、核DNAの障害について観察した。対照群では比較的一様なクロマチン (chromatin) 染色像が見られた(図9A)。DL- $\alpha$ -AAA処理では、20時間では顕著なクロマチンの濃縮、凝集や断片化を認めた(図9B)。この変化は処理後14~16時間から認められ徐々に異常な濃縮像を示す核が増加した。一方、6-AN処理では培養20時間では、クロマチンの濃縮や凝集は認められず、むしろ核の膨潤化が観察された(図9C)。

考 察

DL- $\alpha$ -AAAは、興奮性アミノ酸であるグルタミン酸の類似物質であり、大脳、小脳、網膜のアストログリア (astroglia) に対する選択的なグリア毒として知られている<sup>24) ~29)</sup>。今回、その毒性の分子機序を探る目的でC6グリオーマ細胞を用い、グルタミン酸との構造類似性から、GSH枯渇・ROSの蓄積の観点から検討を加えた。DL- $\alpha$ -AAA (10mM) 処理により、C6

グリオーマ細胞は培養14～16時間以降死滅し始め、24～36時間では大部分の細胞が死滅した。GSHはDL- $\alpha$ -AAA添加後速やかに減少し培養後16時間以降ほぼ完全に枯渇した。GSHの枯渇に伴いROS特にH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の蓄積が認められた。C6グリオーマ細胞ではDL- $\alpha$ -AAAがグルタミン酸と同様<sup>35</sup>S-システインの取り込みを阻害<sup>6)</sup>し、DL- $\alpha$ -AAAの細胞死はシステイン(0.5-1.0mM)の同時添加により完全に抑えられる。このことから、DL- $\alpha$ -AAA毒性機序はシステイン/グルタミン酸交換輸送系を介したシステイン取り込みの阻害によるGSH合成の抑制(取り込まれたシステインは細胞内でシステインに還元され、GSH合成に使われる)であることが強く示唆された(図10)。次に、GSH枯渇以降のROSの産生・消去系におけるバランスの崩壊に基づく細胞障害について細胞膜、核それぞれに検討した。細胞膜の酸化障害の程度をLPOについて検討したところ、DL- $\alpha$ -AAA処理後、GSHの枯渇およびROSの蓄積と時を同じくして、LPOの蓄積量は対照の約2倍であった。更にH33258による核DNA像を観察したところ、核の濃縮、凝集、断片化が起こっていることが明らかになった。このDL- $\alpha$ -AAAによる細胞死や細胞障害のすべてが、ラジカルスカベンジャーや抗酸化剤により完全に抑制されることから、このグリア細胞死にはROS、特にH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の関与が強く示唆<sup>6)</sup>された。最近同様なメカニズムによりDL- $\alpha$ -AAAが網膜ミューラー細胞(グリア細胞)を障害することが報告されている<sup>7) 30)</sup>。

6-ANは、補酵素NAD、NADPの構成成分であるビタミンB群の一種NAの類似物質であり、大脳、脳幹、脊髄のアストログリアに対する選択的なグリア毒として知られている<sup>14) 15) 31)</sup>。6-AN誘発細胞死はDL- $\alpha$ -AAAと比較すると1)細胞死が比較的ゆっくり生じ、かつ、細胞死の形態が異なる。2)GSHの減少が中等度である。3)ROSやLPOの蓄積は認められない。4)核DNAの染色像において、濃縮、凝集、断片化が観察されない。5)ラジカルスカベンジャーの細胞死抑制効果が認められない。以上の違いはこの6-ANの細胞死はGSH減少、ROSの蓄積による酸化ストレスが主原因であるとは考えにくいことを示唆する。そこで別のメカニズムとして、NADPHの主要産生系であるペントースリン酸回路<sup>15) 24)</sup>における6-PGの細胞内濃度を測定したところ、6-AN処理で数10倍の蓄積が認められた。次にこの異常な6-PGの蓄積がその構造類似性からG-6-P以降の解糖系を抑制するのではないかとこの想定の下に、細胞内ATP含量を測定したところ、培養20時間で対照の5分の1以下に減少し、その後ほぼ完全に枯渇した。因に、DL- $\alpha$ -AAA処理ではATPの減少は30～40%と軽～中等度にとどまった。これら6-AN誘発性諸変化は、すべて1～5mMのNAにより完全に対照レベルに回復した。これらの事実は6-AN添加により細胞内で6-アミノ-NADPが作られ、6-PG代謝の阻害と蓄積による解糖系ひいてはクエン酸回路の抑制によるATP合成の阻害が、この6-AN毒性の主原因であることを示唆する(図10)。このATPの枯渇が種々の輸送系の障害を招来し、細胞や核の異常な膨潤となって細胞死に到るのではないかと考えられる。また、6-ANによる中等度のGSH減少はNADPH産生の抑制によるものと思われる。

最後に、グリア毒のグリア細胞選択性について言及したい。DL- $\alpha$ -AAAについては、上述のシステイン/グルタミン酸交換輸送系の細胞発現についての報告によると、クローン化細胞としてはC6グリオーマ細胞<sup>6)</sup>、N18-RE105細胞<sup>32)</sup>(N18ニューロブ

ラストーマーラット網膜ハイブリッド細胞)、新生ラット大脳皮質由来のアストロサイト(astrocyte)<sup>33)</sup>、オリゴデンドロサイト(oligodendrocyte)<sup>34)</sup>および成熟網膜ミューラー細胞<sup>7)</sup>などが知られている。胎児ニューロン<sup>35)</sup>を除いては、神経細胞での発現は今のところ無い。次に6-ANのグリア細胞選択性についての報告は皆無であり、今回の実験結果に基づきNADPH産生における代謝系、酵素系の違いによるものと考え、現在検討している所である。

## 結 論

グリア細胞に選択的な細胞障害を起こす物質、すなわちグリア毒のうちDL- $\alpha$ -AAAと6-ANの毒性機序を探る目的でC6グリオーマ細胞をモデル系として培養実験を行なった。

- 10mM DL- $\alpha$ -AAAの添加により、C6細胞は培養14～16時間以降細胞が萎縮し始め、24～36時間でほとんどの細胞が死滅した。一方、6-ANの添加では、培養24時間以降細胞は膨潤し始め、48時間で約65%が死滅した。
- DL- $\alpha$ -AAAの添加後、速やかに細胞内GSHが減少し培養8時間で対照値の約20%、16時間で10%、それ以後枯渇した。一方、6-ANの添加では、GSHの減少は比較的ゆっくりと生じ、8時間で対照値の50%、16時間で40%、24時間で25%に減少した。
- GSH減少後のROS蓄積をDCF産生量で検討したところ、DL- $\alpha$ -AAA添加では培養16時間で対照の約3倍と増加した。一方、6-AN添加では、いずれの時期でもDCF蓄積は認められなかった。
- 膜の過酸化脂質量を測定したところ、DL- $\alpha$ -AAA添加では、培養16時間で対照の約2倍と増加した。一方、6-ANの添加では、いずれの時期においても有意な過酸化脂質量の蓄積は認められなかった。
- 抗酸化剤であるビタミンE(100 $\mu$ M)の同時添加で、DL- $\alpha$ -AAA誘発細胞死は抑制された。一方、6-AN誘発細胞死はNA(1.5mM)の同時添加で抑制された。
- 6-ANの毒性機序を探る目的で生体の主要なNADPH製造過程であるペントースリン酸回路のうち、6-PGの細胞内濃度を測定したところ、6-AN添加では20時間で対照値の約30～50倍と著明に増加した。この異常な6-PG蓄積はNAの同時添加により完全に抑制された。
- 細胞内ATP含量を測定したところ、6-AN添加では培養20時間で対照値の20%以下に減少しその後枯渇した。このATP枯渇はNAの同時添加により完全に対照値に復した。
- 核DNAの染色像を観察したところ、DL- $\alpha$ -AAA添加では培養14～16時間で核の濃縮、凝集、断片化が認められ、それ以降異常核の数が増大した。一方、6-AN処理では核の濃縮、凝集、断片化が認められずむしろ異常な膨潤化を示した。
- DL- $\alpha$ -AAAの毒性機序としては、システイン/グルタミン酸交換輸送系を介したGSHの枯渇、ROSの発生に基づく酸化ストレスによるものと思われた。
- 6-ANの毒性機序としては、NADPH産生系の阻害によりペントースリン酸回路の代謝物質6-PGの異常蓄積およびその蓄積による解糖系の阻害に基づくATPの枯渇によるものと思われた。



## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師加藤 聖教授に深甚なる謝意を捧げます。また本研究の遂行に際し御指導と御助言をいただきました金沢大学医学部保健学科馬渡一浩助教授に深謝の意を表します。さらに本研究に終始御協力と御援助を頂きました金沢大学医学部神経情報研究施設情報伝達部門の皆様へ深謝いたします。本論文の要旨の一部は第39回日本神経化学会（1996年10月、横浜）で口演発表した。

## 文 献

- 1) Rothman SM, Olney JW. Glutamate and pathophysiology of hypoxia-ischemic brain damage. *Ann Neurol* 19: 105-111, 1986
- 2) Choi DW, Rothman SM. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Ann Rev Neurosci* 13: 171-182, 1990
- 3) Choi DW. Glutamate neurotoxicity and disease of the central nervous system. *Neuron* 1: 623-634, 1988
- 4) Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HSV, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364: 623-632, 1993
- 5) Dugan LL, Sensi SL, Ganzoniero LMT, Handran SD, Rothman SM, Lin TS, Goldberg MP, Choi DW. Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J Neurosci* 15: 6377-6388, 1995
- 6) Kato S, Negishi K, Mawatari K, Kuo CH. A mechanism for glutamate toxicity in the C6 glioma cells involving inhibition of cystine uptake leading to glutathione depletion. *Neuroscience* 48: 903-914, 1992
- 7) Kato S, Ishita S, Sugawara K, Mawatari K. Cystine/glutamate antiporter expression in retinal Müller glial cells: Implications for DL- $\alpha$ -amino adipate toxicity. *Neuroscience* 57: 473-482, 1993
- 8) Mawatari K, Yasui Y, Sugitani K, Takadera T, Kato S. Reactive oxygen species involved in the glutamate toxicity of C6 glioma cells via  $x_c^-$  antiporter system. *Neuroscience* 73: 201-208, 1996
- 9) Bridges RJ, Hatalski C, Shim SN, Nunn PB. Gliotoxic properties of the Lathyrus excitotoxin  $\beta$ -N-oxalyl-L- $\alpha$ ,  $\beta$ -diaminopropionic acid. *Brain Res* 561: 262-268, 1991
- 10) Albrecht J, Norenberg MD. L-Methionine-DL-sulfoximine induces massive efflux of glutamine from cortical astrocytes in primary culture. *Eur J Pharmacol* 182: 587-589, 1990
- 11) Politis MJ. 6-Aminonicotinamide selectively causes necrosis in reactive astroglial cells in vivo: preliminary morphological observations. *J Neurol Sci* 92: 71-79, 1989
- 12) Huck S, Grass F, Hatten ME. Gliotoxic effects of  $\alpha$ -amino adipic acid on monolayer cultures of dissociated postnatal mouse cerebellum. *Neuroscience* 12: 783-791, 1984
- 13) Olney JW, Ho DL, Rhee V. Cytotoxic effect of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp Brain Res* 14: 61-76, 1971
- 14) Schneider H, Cervos-Navarro J. Acute gliopathy in spinal cord and brain stem induced by 6-aminonicotinamide. *Acta Neuropathol (Berlin)* 27: 11-23, 1974
- 15) Henken H, Lange K, Kolbe H. Brain disorders induced by pharmacological blockade of the pentose shunt. *Biochem Biophys Res Commun* 86: 93-100, 1969
- 16) Kato S, Higashida H, Higuchi Y, Hatakenaka S, Negishi K. Sensitive and insensitive states of cultured glioma cells to glutamate damage. *Brain Res* 303: 365-373, 1984
- 17) Shinagawa S. Serotonin protects C6 glioma cells from glutamate toxicity. *Neuroscience* 59: 1043-1050, 1994
- 18) Toyooka T, Uchiyama S, Saito Y, Imai K. Simultaneous determination of thiols and disulfides by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Chim Acta* 205: 29-41, 1988
- 19) Lebel CP, Bondy SC. Sensitive and rapid quantitation of oxygen reactive species formation in rat synaptosomes. *Neurochem Int* 17: 435-440, 1990
- 20) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
- 21) Moellering H, Bergmeyer HU. D-Gluconate and D-gluconate 6-phosphate. *In Methods of Enzymatic Analysis* 3rd ed, vol VI. Metabolites 1: Carbohydrates, p220-227, Verlag Chemie, Weinheim, 1984
- 22) Stanley PE, Williams SG. Use of the liquid scintillation spectrometer for determining adenosine triphosphate by the luciferase enzyme. *Anal Biochem* 29: 381-392, 1969
- 23) Oberhammer FA, Pavelka M, Sharma S, Tiefenbacher R, Purcho AF, Bursh W, Schulte-Hermann R. Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor b1. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5408-5412, 1992
- 24) Raivio KO, Lazar CS, Krumholz HR, Becker MA. The phosphogluconate pathway and synthesis of 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate in human fibroblasts. *Biochem Biophys Acta* 678: 51-57, 1981
- 25) Lund Karlsen R. The toxic effect of sodium glutamate and DL- $\alpha$ -amino adipic acid on rat retina: changes in high affinity uptake of putative neurotransmitters. *J Neurochem* 31: 1055-1061, 1978
- 26) Garthwaite J, Regan CM. Toxic effects of  $\alpha$ -amino adipate on cultured cerebellar cells. *Brain Res* 194: 603-607, 1980
- 27) Huck S, Grass F, Hatten ME. Gliotoxic effects of alpha-amino adipic acid on monolayer cultures of dissociated postnatal mouse cerebellum. *Neuroscience* 12: 783-791, 1984
- 28) Takada M, Hattori T. Fine structural changes in the rat brain after local injections of gliotoxin, alpha-amino adipic acid. *Histol Histopathol* 1: 271-275, 1986
- 29) Kato S, Sugawara K, Matsukawa T, Negishi K. Gliotoxic effects of  $\alpha$ -amino adipic acid isomers on the carp retina: a long-term observation. *Neuroscience* 36: 145-153, 1990
- 30) Kato S, Mawatari K, Sugitani K, Yasui Y. DL- $\alpha$ -Amino adipate is a toxin to Müller cells. *Prog Retinal Eye Res* 15: 435-456, 1996

- 31) Blakemore WF. Remyelination by Schwann cells of axons demyelinated by intraspinal injection of 6-aminonicotinamide in the rat. *J Neurocyto* 4: 745-757, 1989
- 32) Murphy TH, Miyamoto M, Sastre A, Schnaar RL, Coyle JT. Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron* 2: 1547-1558, 1989
- 33) Cho Y, Bannai S. Uptake of glutamate and cystine in C6 glioma cells and in cultured astrocytes. *J Neurochem* 55: 2091-2097, 1990
- 34) Oka A, Belliveau MJ, Rosenberg PA, Volpe JJ. Vulnerability of oligodendroglia to glutamate: pharmacology, mechanism and prevention. *J Neurosci* 13: 1441-1453, 1993
- 35) Murphy TH, Schnaar RL, Coyle JT. Immature cortical neurons are uniquely sensitive to glutamate toxicity by inhibition of cystine uptake. *FASEB J* 4: 1642-1663, 1990

**C6 Glioma cell death after gliotoxins** Sotoki Ishita, Department of Neurobiology, Neuroinformation Research Institute, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, **106**, 288—296 (1997)

**Key words** DL- $\alpha$ -aminoadipic acid, 6-aminonicotinamide, glial cell death, glutathione depletion, ATP depletion

#### Abstract

To investigate a cellular or molecular mechanism for glial cell death after treatment of gliotoxins, DL- $\alpha$ -aminoadipic acid (DL- $\alpha$ -AAA) and 6-aminonicotinamide (6-AN). C6 glioma cells were used as a glial cell model in vitro. Addition of 10 mM DL- $\alpha$ -AAA in the medium induced delayed type cell death of C6 glioma cells. The cells began to shrink at 14-16 hr after treatment and thereafter almost all cells died after 24-36 hr incubation. Addition of 1 mM 6-AN in the medium also induced delayed type cell death of C6 glioma cells. The cells began to swell at 20-24 hr after treatment and about 65% of cells died after 48 hr incubation. The cellular level of glutathione (GSH) was rapidly decreased by DL- $\alpha$ -AAA treatment and was completely depleted 16 hr after treatment. Furthermore the cellular level of GSH after 6-AN treatment was slowly decreased and was about 25% of the control 24 hr after treatment. Reactive oxygen species (ROS) were accumulated about 3-fold in incubation of DL- $\alpha$ -AAA, whereas no significant accumulation of ROS could be seen during 6-AN treatment. Membrane lipid peroxide (LPO) was also accumulated two fold after DL- $\alpha$ -AAA but not 6-AN. The cell death induced by DL- $\alpha$ -AAA was completely blocked by coexistence of vitamin E (100  $\mu$  M). Addition of 6-AN induced a drastic increase (30-50 fold) in the cellular level of 6-phosphogluconate (6-PG), which is a metabolite in the pentose phosphate cycle. Furthermore, the cellular level of ATP was rapidly decreased after 6-AN and was almost depleted 20 hr after treatment. The cell death and biochemical changes induced by 6-AN were completely blocked and restored to control level by coexistence of nicotinamide (1-5mM), respectively. Impairment of nuclear DNA after DL- $\alpha$ -AAA exposure was revealed by chromatin condensation with DNA fragmentations. In contrast, the exposure of 6-AN did not induce nuclear condensation with DNA fragmentations, but did induce abnormally swollen nuclei after treatment. Taken all together, the data strongly suggest that the DL- $\alpha$ -AAA cell death is due to GSH depletion through cystine/glutamate antiporter and ROS accumulation leading to oxidative stress, whereas the 6-AN cell death is due to 6-PG accumulation through inhibition of NADPH dependent enzyme and ATP depletion leading to disturbance of transport for various ions.