原 著

HL-60 細胞 protein kinase C 活性に

及ぼすアスベストの作用

ラジカルの役割

植 木 絢 子*, 津 島 弘 文*, 兵 藤 文 則*
絹 川 敬 吾*

THE EFFECTS OF ASBESTOS FIBERS ON THE PROTEIN KINASE C ACTIVITY IN HL-60 CELLS

The Role of Free Radicals

Ayako UEKI,* Hirobumi TSUSHIMA,* Fuminori HYODOH*
and Keigo KINUGAWA*

It was confirmed that the function of DMSO as an inducer of cell differentiation was suppressed by co-culture of crocidolite asbestos, using the activity of protein kinase C as indicator, because DMSO reacted with $\cdot\text{OH}$ radical released by stimulation with crocidolite and wasted itself. SOD inhibited the effect of crocidolite, because SOD reacted with $\cdot\text{O}_2^-$ released by stimulation with crocidolite and inhibited the subsequent development of $\cdot\text{OH}$.

Key words: asbestos; crocidolite; radical; HL-60; DMSO; protein kinase C

I. は じ め に

アスベストの生体への作用が詳しく知られるようになったが、その一つに、アスベストの刺激によってマクロファージや好中球から放出される活性酸素種と疾病との関係がある¹⁾。Mossman らはアスベストによって生じる細胞傷害性のいくつかは $\cdot\text{O}_2^-$ や $\cdot\text{OH}$ に対するスカベンジャーを投与することによって抑制できると報告している²⁾。例をあげると、superoxide dismutase (SOD) や vitamin A などによる気管粘膜 metaplasia の抑制³⁾、繊維芽細胞およびマクロファージに対する毒性の阻止⁴⁾などがある。われわれは HL-60 細胞を DMSO を用いて好中球へ分化誘導する際に、アスベストが混在すると分化が抑制されることを先に報告した⁵⁾。細胞が正常の分化を遂げるための引き金である DMSO や vitamin A 等の物質には、ラジカル・スカベンジャーとしての機能

を併せもつものが多い。したがって、細胞の分化誘導を促す物質の働きに、アスベストがラジカル発生を介して抑制的に働くならば、ここにもアスベストによる生体傷害作用の一つが見出される。

HL-60 細胞は骨髄性白血病患者より分離された cell line で、DMSO や合成 vitamin A (retinoic acid) を添加すると好中球に分化誘導される^{6,7)}。その結果、いくつかのマーカーが出現するが、protein kinase C は α , β , γ の三つのアイソザイムともに活性が上昇し、少なくとも 2 倍の活性が認められるようになる。この鋭敏な感度をもつ酵素活性を指標として測定したところ、分化誘導中の系にアスベストが混在するとラジカル発生を介して DMSO を消費し、これによって分化誘導の強さを低下させると考えられる所見を得たので報告する。

II. 実験材料および方法

1. 試 薬

Fluorescein diacetate (FDA), dimethyl sulfoxide (DMSO), propidium iodide (PI), dimethyl pyrrolone oxide (DMPO), superoxide dismutase (SOD), phorbol

* 川崎医科大学衛生学教室

平成 3 年 2 月 5 日受付

* Department of Hygiene, Kawasaki Medical School

Received for publication, February 5, 1991

myristate acetate (PMA), nonidet P-40 はそれぞれ Sigma 社製を使用した。Ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA), ethyleneglycol bis (2-aminoethylether) tetraacetic acid (EGTA), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) は Nacalai Tesque 社製を使用した。RPMI 1640 培地 (Flow Lab.), 牛胎児血清 (Flow Lab.) を使用し, また, アスベスト (crocidolite) は, 南アフリカ連邦 The National Center for Occupational Health, Pneumoconiosis Research Unit より供与いただいたものを滅菌して使用した。

2. 細胞培養

HL-60 細胞は 15% 牛胎児血清を含む RPMI 1640 培地に 2×10^5 /ml の濃度に浮遊させ, プラスチックシャーレに分注して, 5% CO₂, 37°C にて培養維持した。

3. 顆粒球への分化誘導と生存率の測定

HL-60 細胞浮遊液に最終濃度が 0.4, 0.8, 1.25, 1.7 % になるように DMSO を添加して培養し, 4 日後の細胞生存率を FDA 染色性を指標として flow cytometry により測定した。crocidolite を添加した群も同様に測定した。また, 一部の細胞を経時的に取り出して細胞数の計測を行い, 培養上清は集めて放出された lactate dehydrogenase (LDH) の活性を Hill の方法⁹⁾ により測定した。

4. crocidolite の添加

高圧滅菌した crocidolite を最終濃度が 25, 50, 100, 200 μ g/ml になるように HL-60 細胞に添加した。一部の試料には 1.25% DMSO を同時に添加した。また, 必要に応じて無菌濾過した SOD 溶液を最終濃度が 50, 200, 400 U/ml となるように添加した。

5. 活性酸素種の測定

活性酸素の測定は electron paramagnetic resonance (EPR) spin-trapping 法を用いて行った。この時, radical-trapping 剤としては, 5, 5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide (DMPO) を使用した。HL-60 細胞は顆粒球への分化誘導を十分行うため 1.25% DMSO とともに 10 日間培養した。細胞を集めて Hanks 液で 2 回洗い, 細胞浮遊液 (1×10^7 /ml) とラジカル刺激剤 (100~500 ng/ml の PMA または 50 μ g/ml の crocidolite) および DMPO (1%) の混合液 150 μ l を石英製 EPR キュベットに入れて直ちに測定した。一部の試料には SOD を最終濃度が 100~400 U/ml になるように添加した。測定は EPR spectrophotometer (JEOL, JES-RE2X 型) を使用した。

6. protein kinase C (PKC) 活性の測定

HL-60 細胞 (1×10^7 個) を集めて EDTA-PBS で洗

Table 1. Effects of DMSO on the viability of HL-60 cells.

Concentration of DMSO (%)	Living cell	
	Exp. 1	Exp. 2
0	92.3 $\pm$ 2.1	93.9 $\pm$ 0.1
0.4	92.0 $\pm$ 1.2	89.8 $\pm$ 5.9
0.8	93.2 $\pm$ 0.8	96.8 $\pm$ 0.6
1.25	89.0 $\pm$ 3.2	95.4 $\pm$ 2.1
1.7	63.2 $\pm$ 4.4*	89.1 $\pm$ 1.8*

* $p < 0.05$, $n = 4$.

Cells were cultured with various concentrations of DMSO for 4 d. Cells were washed, stained with both FDA (5 μ g/ml) and PI (50 μ g/ml), and examined flow cytometrically as soon as possible. Values are mean $\pm$ SD.

浄して, 10 mm EGTA, 20 mm EDTA, 1 mm PMSF を含む PBS 中で 30 秒間超音波破碎し, $100,000 \times g$, 1 時間遠心して上清を集め cytosolic enzyme 測定用試料とした。この沈渣に 1% Nonidet P-40 を加えた上記試料用 PBS を加えて再び超音波破碎して 4°C, 30 分静置後, $100,000 \times g$, 1 時間遠心して上清を membrane bound enzyme 測定用試料とした。酵素活性は, PKC assay system (Amersham Co.) を用いて, ³²P 標識 ATP から蛋白への ³²P の移行を液体シンチレーションカウンターにて測定した。また, 蛋白濃度は Protein assay reagent (Pierce, Co.) を用いて測定した。

7. データの統計処理

得られたデータは, Wilcoxon 法により有意差の判定を行った。

III. 結 果

1. 細胞生存率と成長曲線

FDA と PI の二重染色後に flow cytometry を行うと, 生細胞, 死細胞, 変性しつつある細胞が既報のごとく明瞭に区別される⁵⁾。この時, FDA に染まる細胞を生細胞として全体に占める割合を計算したものが Table 1 である。DMSO 濃度が 1.7% になると生存率が有意に低下し, 一般に用いられる 1.25% では対照群に比して生存率に差が認められなかったため, 1.25% で以後の実験を行うことにした。また, Table 2 に示すごとく 1.25% DMSO と同時に添加する crocidolite の濃度が 50 μ g/ml までは細胞の生存率に差を示さないため, 以後の実験では主に 50 μ g/ml の濃度で使用した。

経時的にシャーレ内の細胞数を計測したところ Fig.1

Table 2. Viability of cells incubated with crocidolite.

DMSO	Concentration of crocidolite ($\mu\text{g/ml}$)				
	0	25	50	100	200
+	96.0 $\pm$ 0.6	94.9 $\pm$ 0.3	94.4 $\pm$ 0.3	92.2 $\pm$ 0.6*	90.8 $\pm$ 0.7*
-	95.9 $\pm$ 1.0	95.2 $\pm$ 0.4	94.2 $\pm$ 0.5	91.8 $\pm$ 0.7*	91.5 $\pm$ 1.1*

* $p < 0.05$, $n = 4$.

Viability of HL-60 cells incubated with various concentrations of crocidolite with or without addition of 1.25% DMSO for 4 d. Cell viability was calculated as in Table 1. Values are mean $\pm$ SD.

Fig.1. Absolute number of cells remaining at the end of incubation. HL-60 cells were incubated without any treatment (control) $\square$, with 1.25% DMSO $\circ$, or with both DMSO and 50 $\mu\text{g/ml}$ of crocidolite $\blacksquare$. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

に示すごとく、培養5日目では対照群に比して DMSO 添加群では細胞が好中球に分化するために細胞増殖が低下するので有意差をもって細胞数の増加が抑えられ、DMSO と crocidolite を同時に添加した群では中間の増加を示した。これにより DMSO は細胞の分化を促すに十分な作用を発揮していることが示された。また、crocidolite を添加しても、使用した濃度では特に細胞傷害性もなく、細胞増殖を妨げないことが確認された。

培養上清中に放出される LDH の活性を測定した結果、Table 3 に示すごとく、DMSO のみ加えた群と DMSO と crocidolite を同時に加えた群との間に有意差

Table 3. LDH assay of the culture supernate of HL-60 cells.

Incubation (d)	LDH activity (Unit)	
	Crocidolite (-)	Crocidolite (+)
2	69.5 $\pm$ 7.2	72.8 $\pm$ 8.90 ($n=6$)
3	105.5 $\pm$ 22.8	98.2 $\pm$ 11.9 ($n=6$)
4	124.0 $\pm$ 17.1	118.8 $\pm$ 42.0 ($n=6$)
Medium only	47.0	

Cells were cultured in a medium containing 1.25% DMSO, with or without the addition of crocidolite (50 $\mu\text{g/ml}$). The culture supernate was collected and assayed for LDH activity. Values are mean $\pm$ SD.

は認められず、したがって crocidolite の添加によって死亡し融解した細胞群はないものと考えられる。

2. 活性酸素種の測定

対照として用いた PMA の添加では、Fig.2 A に示すごとく典型的な $\cdot\text{O}_2^-$ の発生像がとらえられ、SOD (100 U/ml) によるほぼ完全な抑制と、1.25% DMSO による完全ではないが明らかな抑制が認められて、それぞれのラジカル・スカベンジャーが有効に働いていることが確認された。一方、crocidolite (50 $\mu\text{g/ml}$) の添加では、Fig.2 B にみるごとく強いラジカル発生がみられたが、その像は $\cdot\text{OH}$ の型であった。この時、 $\cdot\text{O}_2^-$ のスカベンジャーである SOD (100 U/ml) または $\cdot\text{OH}$ のスカベンジャーである DMSO (1.25%) の共存によってラジカルの発生はほぼ完全に抑制された (Fig.2 C)。

3. PKC 活性の測定

Table 4, 5 に示すごとく、DMSO 添加による細胞の分化誘導に伴って PKC 活性は3日後には数倍に上昇した。この時、cytosolic enzyme, membrane bound enzyme とともに活性の上昇が認められた。HL-60 細胞に DMSO とともに crocidolite (50 または 100 $\mu\text{g/ml}$) を

Fig. 2. EPR spectra of HL-60 cells. Each scan took 2 min. HL-60 cells were previously induced to differentiate with 1.25% DMSO for 10 d. A. EPR spectra with PMA. (1) Before addition of PMA, 10 min after addition of (2) PMA (100 ng/ml), (3) PMA and SOD (100 U/ml), (4) PMA and DMSO (1.25%) to HL-60 cell suspension (1×10^7 /ml) supplemented with 1% DMPO. B. EPR spectra with crocidolite. (1) Before stimulation, (2) 1 min, (3) 13 min, (4) 37 min after addition of crocidolite (50 μ g/ml) to HL-60 cell suspension (1×10^7 /ml) supplemented with 1% DMPO. C. Effect of radical scavengers on EPR spectra with crocidolite asbestos. (1) Before stimulation, 60 min after addition of crocidolite (50 μ g/ml) (2), (3) crocidolite and DMSO (1.25%), (4) crocidolite and SOD (100 U/ml) to HL-60 cell suspension (1×10^7 /ml) supplemented with 1% DMPO. D. Cell free controls. Hanks' solution with 1% DMPO (1), Hanks' solution with 1% DMPO and 50 μ g/ml crocidolite (2).

添加すると、PKC 活性は低下して、分化誘導を行わない対照群と DMSO 添加群の中間の値を示し、crocidolite の共存によって分化誘導が抑制される結果を得た。更にこの時、SOD を同時に加えると、crocidolite が存在するにもかかわらず PKC 活性は DMSO 群とほぼ同じレ

ベルに回復した。

IV. 考 察

アスベストが活性酸素種の発生を刺激することが広く知られるようになり⁹⁾、アスベストによる生体傷害作用

Table 4. Cytosolic PKC activity in HL-60 cells.

	cpm/10 ⁷ cells	cpm/mg protein
Control	18,526 ± 5,239	126,518 ± 45,371
DMSO	37,876 ± 11,961**	295,717 ± 66,201**
DMSO+cc	28,559 ± 11,501	227,014 ± 45,184*

cc: crocidolite.

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. $n = 6$.

HL-60 cells were incubated with 1.25% DMSO or both 1.25% DMSO and 100 μ g/ml of crocidolite (cc) for 3 d before PKC assay. Values are mean $\pm$ SD.

の重要な部分を占めていると考えられる。EPR spin-trapping 法によって測定したところ、私どもの実験においてもアスベスト (crocidolite) は $\cdot$ OH 発生を強く刺激することが示された。この時、 $\cdot$ OH のスカベンジャーとして知られる DMSO のみならず、 $\cdot$ O₂⁻ のスカベンジャーである SOD によっても $\cdot$ OH 発生が抑制されたのは、Ueno ら¹⁰⁾ が述べているように、検出された $\cdot$ OH は、それより早期に発生する $\cdot$ O₂⁻ に由来すること、したがって $\cdot$ O₂⁻ のスカベンジャーを投与すると $\cdot$ OH の発生も抑制されることを意味するものと思われる。

DMSO は溶剤として、また細胞凍結時の保護剤としても広く使用されており、顆粒球系細胞の分化誘導を促す作用をもち、 $\cdot$ OH スカベンジャーでもある。DMSO は $\cdot$ OH と反応するとメタン (CH₄) が発生する¹¹⁾。したがって $\cdot$ OH と反応することによって $\cdot$ OH スカベンジャーとしての DMSO が消費され、反応の場における分化誘導剤としての DMSO の濃度が低下する。このため本実験で HL-60 細胞の分化誘導が crocidolite の添加で抑制され、SOD の共存で抑制を失うという結果は理論的によく一致する。未分化な細胞が正常に分化を遂げる際に必要な分化誘導因子がラジカル・スカベンジャーとしての機能を併せもつ例は生体内での vitamin A にもみられ、また、vitamin A の分化誘導における作用機序は DMSO によく似ていることが報告されている。職場環境や生活環境によって体内に沈着したアスベストが活性酸素種の発生を介してこれらの因子を消費させ、このために周辺の細胞分化を妨げる可能性は、*in vivo* においても十分にありうるものと思われる。

PKC はセリン/スレオニン蛋白質磷酸化酵素であり、その反応は Ca²⁺ と協調的に作用し、ホルボレスターの受容体であることも知られている¹²⁾。HL-60 細胞に DMSO を加えて分化を誘導すると、酵素活性が 48 時間

Table 5. Effect of SOD on PKC activity.

	cpm/mg protein	
	Exp. 1	Exp. 2
Control	11,878	11,430
DMSO	85,176	35,883
DMSO+cc	63,750	20,039
DMSO+cc+SOD	82,600	36,142

cc: crocidolite.

Cells were incubated with 1.25% DMSO or both DMSO and crocidolite (cc) for 3 d. To some dishes 50 U/ml of SOD was added. Cytosolic enzyme activity was assayed as in 4 a.

以内に少なくとも 2 倍に上昇し、この時、cytosolic enzyme のみならず membrane bound-enzyme の活性も上昇することが報告されている¹³⁾。この際の細胞抽出液には myelocyte/monocyte phenotype に特徴的な磷酸化蛋白が出現する¹⁴⁾。このような細胞の分化に伴って活性が上昇する酵素を指標とすると、その感度の鋭敏さゆえに、分化誘導に及ぼす薬剤の作用がより鮮明に把握できることが、今回の実験から理解された。PKC 活性は鋭敏な指標として種々の目的に利用できるものと思われる。

文 献

- 1) Hansen K, Mossman BT. Generation of superoxide ($\cdot$ O₂⁻) from alveolar macrophages exposed to asbestiform and nonfibrous particles. *Cancer Res* 1987; 47: 1681-1686.
- 2) Mossman BT, Craighead JE, Macpherson BV. Asbestos-induced epithelial changes in organ cultures of hamster trachea: inhibition by retinyl methyl ether. *Science* 1980; 207: 311-313.
- 3) Shatos M, Doherty J, Mossman BT. Scavengers of active oxygen species ameliorate asbestos-associated injury in lung fibroblasts and alveolar macrophages. *J Cell Biol* 1985; 101: 234a.
- 4) Wood DC, Wood J. Pharmacologic and biochemical consideration of dimethyl-sulfoxide. *Ann NY Acad Sci* 1975; 243: 7-9.
- 5) 植木絢子, 兵藤文則, 絹川敬吾, 望月義夫. HL-60 細胞の DMSO による分化誘導の抑制—crocidolite の作用. *日本衛生学雑誌* 1990; 44: 1107-1111.
- 6) Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, Gallo RC. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 2458-2462.
- 7) Breitman TR, Selonick SE, Collins SJ. Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 2936-2940.

- 8) Hill BR. Some properties of serum lactic dehydrogenase. *Cancer Res* 1956; 16: 460-468.
- 9) 鏡森定信, 細田 裕. アスベストの毒性と活性酸素. *産業医学* 1990; 32: 439-447.
- 10) Ueno I, Kohno M, Mitsuta K, Kanegasaki S. Reevaluation of the spin-trapped adduct formed from 5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide during the respiratory burst in neutrophils. *J Biochem* 1989; 105: 905-910.
- 11) Repine JE, Eaton JW, Anders MW, et al. Generation of hydroxyl radical by enzymes, chemicals, and human phagocytes *in vitro*. *J Clin Invest* 1979; 64: 1642-1651.
- 12) Labarca R, Janowsky A, Patel J, Paul SM. Phorbol esters inhibit agonist-induced [³H] Inositol-1-phosphate accumulation in rat Hippocampal slices. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 123: 703-709.
- 13) Makowske M, Ballester R, Cayre Y, Rosen M. Immunochemical evidence in abundance during HL-60 differentiation induced by dimethyl sulfoxide and retinoic acid. *J Biol Chem* 1988; 263: 3402-3410.
- 14) Zylber-Katz E, Glazer RI. Phospholipid- and Ca²⁺-dependent protein kinase activity and protein phosphorylation patterns in the differentiation of human promyelocytic leukemia cells line HL-60. *Cancer Res* 1985; 45: 5159-5164.

著者への通信先: 植木 絢子, 〒701-01 倉敷市松島 577 川崎医科大学衛生学教室 *Reprint requests to* Department of Hygiene, Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki, 701-01 Japan (A. Ueki)