第20回 日本臨床薬理学会年会 1999年12月3~4日 横浜

Desferrioxamineの酸化的ストレスを介した
酵素活性障害メカニズム岡部 栄逸朗*¹ 清瀬 雅則*¹ 李 昌一*¹
川口 充*²

【緒言】

鉄キレーター-desferrioxamine (DFX) は *Sterptomyces pilosus* から産生され、鉄過剰症の治療薬として用いられている¹⁾。過剰な鉄はフリーラジカル、特に反応性の高いヒドロシキルラジカル ($\text{HO}^\bullet$) の生成に関与するため、脂質過酸化を促進し細胞に障害を与える²⁾。DFXは、これらの細胞障害を防衛する目的で使用されてきた³⁾。また、DFXは鉄をキレートするという性質とは別に、抗酸化物質としてフリーラジカルをスカベンジする作用をもつ⁴⁾。しかし、一方ではDFXが脂質過酸化を促進するという報告もあり⁵⁾、DFXの多様な作用に関する議論がなされている。議論の対象は、DFXが一電子酸化を受けることによりnitroxide free radical (DFX radical) を生成することである。したがって、DFXの鉄キレーターとは独立した多様な作用を知るためには、DFX radicalの作用について検討する必要がある。本研究は、生体膜モデルとして骨格筋小胞体を用い、DFX radical関与の可能性を精査したものである。

【実験方法】

筋小胞体 (SR) の分離: sodium pentobarbital (25 mg/kg, i.v.) 麻酔下で雑種成犬から咬筋を摘出、microsome分画としてSRを分離・調整した。

Ca²⁺-ATPase活性の測定: Ca²⁺-ATPase活性は、一定のインキュベーション時間で得られる無機リン(Pi)の遊離速度として決定した。

電子スピン共鳴 (ESR) 法: 反応メディウム中で生成するフリーラジカルをESR (JES-RE3X, X band, JEOL, Tokyo, Japan) で検出した。spin trap剤としては、DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide)を用いた。測定条件は、modulation amplitude, 0.063 mT; recording range, 5 mT; recording time, 2 min; time constant,

0.1 sec (DMPO), 0.03 sec (DFX radical); microwave power, 8 mW (DMPO), 21 mW (DFX radical); magnetic field, 334.2 mT であった。DFX radicalのスピン濃度は、1.0 mM TEMPOL (4-hydroxyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl) を標準試薬として、スペクトルの2回積分で求めた⁶⁾。

試薬: 実験に使用した試薬は、DFX (Desferal, Ciba-geigy Pharmaceutical Division, Hyogo, Japan), H₂O₂ FeSO₄ (Wako Chemicals, Osaka, Japan), horseradish peroxidase (HRP; Sigma, St. Louis, MO, USA), DMPO (Labotec, Tokyo, Japan; 99–100% pure), TEMPOL (Aldrich, Milwaukee, WI, USA) である。

有意差検定: 得られた結果は、平均±標準誤差 (mean±S.E.M.) で表わし、検定にはSuperANOVA (Acacus Concepts, Inc. Berkeley, CA, USA) による Student's *t*-testを用いた。P < 0.05を有意差有りとした。

【結果・考察】

Fenton反応(H₂O₂/FeSO₄)から生成するHO[•]は、Ca²⁺-ATPase活性を抑制する。仮にDFXが鉄キレーターとして作用するとすれば、当然、Fenton反応の効果を消失させなければならない。確かにDFXはFenton's reagentで生成するDMPO-OHアダクトを消失させたが、しかし、Ca²⁺-ATPase活性に対するFenton反応の効果を増強させるものであった。

このようなDFXのもつFenton反応増強作用がDFX radicalの生成に依存しているとするれば、Ca²⁺-ATPase測定条件で反応メディウム中にDFX radicalが生成検出されなければならない。また、DFX radical自身、Ca²⁺-ATPase活性を抑制する効果をもつはずである。HRPとH₂O₂によるDFXの酵素的・一電子酸化反応を用いて得られた結果をFig. 1に示す。HRPとH₂O₂の共存下にDFXをインキュベートすると、明瞭な9本線のシグナルを有するnitroxide free radical (g = 2.0065, AN = 0.79 mT, AH = 0.64 mT)のESRスペクトルが得られた (Fig. 1)。また、生成されたDFX radicalは非常に安定

*¹ 神奈川歯科大学薬理学教室・ESR 研
〒238-0003 横浜須賀町 82

*² 東京歯科大学薬理学教室

な (20分間) ラジカルであった。DFX radicalの生成濃度は、HRP ($r = 0.996$, $P < 0.01$) あるいは、H₂O₂ ($r = 0.992$, $P < 0.01$) 両基質濃度との間に直線的な相関を示した。

SR濾胞存在下でDFXをH₂O₂とインキュベートした場合、DFX radicalのESRシグナルを検出することができた。このシグナルは、SRを等量タンパク濃度のアルブミンと置換した場合には検出することができなかった。また、検出されたESRシグナルは、DFXをHRPとH₂O₂共存下でインキュベートした場合のシグナル強度に匹敵するものではなかったが、同じ超微細結合定数をもつnitroxide free radicalであった。この結果は、SR microsome濾胞自身、peroxidase活性を保有していることを示唆するとともに、Ca²⁺-ATPase活性に対するDFXのFenton反応増強作用が、DFX radical生成に依存したものであることの傍証ともなる。この可能性を直接的に証明するため、予めHRPとH₂O₂共存下でDFXからnitroxide free radicalを形成し、形成されたDFX radicalの直接的効果を検討した。予期したように、Ca²⁺-ATPase活性は著明に抑制された。これらの結果は、少なくともH₂O₂存在下でperoxidase活性を保有する試料が共存する場合には、DFXは鉄キレーターとして機能し得ないことを示唆するとともに、ラジカル反応を介する作用を発現するという可能性を推測させる。

Morehouseら⁷⁾は、100 μM以下のDFXを用いるならば鉄キレーターとして鉄由来脂質過酸化障害を防御できる試薬として有用であると報告しているが、本研究で用いた実験系のように、peroxidase活性が存在し、フリーラジカル産生系としてH₂O₂を用いる場合にはDFX radicalが生成する (Fig. 1)。

DFX radicalはSR膜の機能酵素タンパクの-SH基を酸化し、活性中心機能を低下させ、したがって、骨格

筋興奮-収縮連関を破綻に導く可能性がある。DFXの毒性は、このようなラジカルへの変換によってもたらされると推論することができる。

【文 献】

- 1) Klaassen, C. D.: Heavy metals and heavy-metal antagonists, In *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Hardman, J. G. and Limbird, L. E. eds) pp.1649-1671, McGraw-Hill, New York, 1996.
- 2) Norisue, M., Todoki, K. and Okabe, E.: Inhibition of hydroxyl radicals of calcitonin gene-related peptide-mediated neurogenic vasorelaxation in isolated canine lingual artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **280**: 492-500, 1997.
- 3) Williams, R. E., Zweier, J. L. and Flaherty, J. T.: Treatment with deferoxamine during ischemia improves functional and metabolic recovery and reduces reperfusion-induced oxygen radical generation in rabbit hearts. *Circulation* **83**:1006-1014, 1991.
- 4) Hartley, A., Davies, M. and Rice-Evans, C.: Desferrioxamine as a lipid chain-breaking antioxidant in sickle erythrocyte membranes. *FEBS Lett.* **264**:145-148, 1990.
- 5) Braugher, J. M., Chase, R. L. and Pregenzer, J. F.: Stimulation and inhibition of iron-dependent lipid peroxidation by desferrioxamine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**: 933-938, 1988.
- 6) Kawakami, M. and Okabe, E. Superoxide anion radical-triggered Ca²⁺ release from cardiac sarcoplasmic reticulum through ryanodine receptor Ca²⁺ channel. *Mol. Pharmacol.* **53**: 497-503, 1998.
- 7) Morehouse, K. M., Flitter, W. D. and Mason, R. P. The enzymatic oxidation of desferal to a nitroxide free radical. *FEBS Lett.* **222**: 246-250, 1987.