腹膜細胞内活性酸素種産生に関する基礎的研究 Study on intracellular production of reactive oxygen species (ROS) ~ HPMC vs HUVEC ~

○松永 和也, 坂野 真利, 半澤 知佳, 宮本 啓一, の村 信介*, 堀内 孝

三重大学大学院工学研究科 分子素材工学専攻 生体材料化学研究室, *同医学部血液浄化療法部

Kazuya Matsunaga, Masatoshi Banno, Chika Hanzawa, Keiichi Miyamoto, *Shinsuke Nomura, Takashi Horiuchi
Dept. of Chemistry for Materials, Fac. of Eng., Mie University, *Medical School, Dept. of Blood Purif Ther.

【はじめに】

長期の持続的腹膜透析療法 (CAPD) において見られる腹膜劣化には、透析液中に含まれる D-グルコースにより誘導される活性酸素種 (ROS) が関与すると考えられている。

本研究では、細胞内 ROS 産生モデルとして H_2O_2 を用い、腹膜中皮細胞 (HPMC) と血管内皮細胞 (HUVEC) における酸化ストレスに対する挙動を比較し、腹膜劣化の原因解明を試みた。さらに、その対処法の検討も行った。

【方法】

(1) 細胞内に存在する遷移金属イオンと H_2O_2 が反応し、ヒドロキシラジカル ($HO\cdot$) を生成するモデルとして、ESR (電子スピン共鳴) (JES-RE1X, JEOL) を用いた ROS 産生を *in vitro* で確認した。

(2) 0.1mM の H_2O_2 曝露による細胞内の ROS 産生を測定した。測定には蛍光プローブ DCFH-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) を用い、DCF 蛍光を共焦点顕微鏡 (IX81, OLYMPUS) にて測定した。

(3) 0.1mM の H_2O_2 曝露による酸化ストレス下での細胞への影響を、膜間電気抵抗 (TER) 測定にて評価した。TER 測定は STX-2 電極と EVOM ボルトオームメーターを用い、電極両端の電圧測定から抵抗値を算出した。

(4) 抗酸化物質の評価として、 H_2O_2 の消去作用を有する細胞内グルタチオン (GSH) 量を、酵素リサイクリング法を用いて測定した。0.1mM の H_2O_2 を 24 時間曝露することによる GSH 変化量を測定することで、ROS による傷害に対する防御機能が細胞種により異なるか否かを評価した。

(5) ROS による酸化傷害の対処法として、抗酸化作用を有するアスコルビン酸の誘導体であるアスコルビン酸グルコシド (AAG) に注目した。細胞内に AAG を取り込ませることで、細胞の抗酸化能が変化するかどうかを H_2O_2 曝露を用いた ROS 測定、TER 測定、GSH 測定にて評価した。

【結果・考察】

(1) スピントラップ剤を用い、0.1mM の H_2O_2 と 1mM の Fe^{2+} (硫酸第一鉄) を反応させるとヒドロキシラジカル ($HO\cdot$) の発生を示す特徴的な ESR スペクトルが検出された。

(2) 細胞内 ROS 測定では、HPMC、HUVEC 共に H_2O_2 の濃度依存的に DCF 蛍光が増加することが分かった (Fig.1)。また HPMC での ROS 産生量は HUVEC のそれよりも約 3 倍の産生が確認できた。

Fig.1 Effects of exogenous H_2O_2 on intracellular reactive oxygen species (ROS) in HPMC and HUVEC.

(3) TER 測定の結果、HPMC では 0.1mM の H_2O_2 曝露により TER の減少が見られたが、HUVEC では減少が見られなかった。 (Fig.2)

Fig.2 TER change in HPMC (left) and HUVEC (right) due to exposure to 0.1mM H_2O_2 .

(4) 細胞内 GSH 量は、HUVEC の方が HPMC より約 1.7 倍の量を有していることが分かった。 (Fig.3)

Fig.3 Intracellular GSH and GSSG change in HPMC and HUVEC due to exposure to 0.1mM H_2O_2 .

(5) AAG を取り込ませることで、 H_2O_2 曝露による ROS 産生量 (HPMC)、TER 減少 (HPMC)、GSH 量 (HUVEC) を抑制するという結果が得られた。

【結論】

以上の結果から、HPMC と HUVEC とでは酸化ストレスに対する影響に差があることが分かり、HPMC の方が酸化傷害を受けやすいことが示された。このことから、腹膜劣化には HPMC での傷害に依存するのではないかと示唆できた。また AAG の抗酸化評価により、この腹膜劣化を予防できる可能性も示唆できた。