

Participation of Intracellular Anti-oxidant in Cell Death Induced by Arsenic and Cadmium

Masanobu UCHIYAMA¹⁾, Shiro JIMI²⁾, Aya TAKAKI³⁾,
Junji SUZUMIYA⁴⁾, Keita YAMAUCHI¹⁾, Shuuji HARA¹⁾,
Nobufumi ONO¹⁾ and Kazuo TAMURA⁴⁾

¹⁾ *Medicinal Informatics and Research Units, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University*

²⁾ *Central Laboratory for Pathology and Morphology, School of Medicine, Fukuoka University*

³⁾ *Department of Pathology, School of Medicine, Fukuoka University*

⁴⁾ *First Department of Internal Medicine, School of Medicine, Fukuoka University*

Abstract : Arsenic (As) and cadmium (Cd) are toxic metals found in humans. Recently, Arsenic trioxide has been used as a mitochondria-targeting drug in relapsed or drug-resistant acute promyelocytic leukemia (APL). In the present study, we examined the intracellular action of these metals using rat kidney tubular cells. The cells were cultured with DMEM + 5 % FBS, containing As₂O₃ (1-2.5 μM) or CdCl₂ (1-10 μM). Tolerant cells, called As2.5-R and Cd10-R, were thus obtained only for the cells which survived a toxic concentration of each metal. Both of these tolerant cells grew at a similar rate as that of control cells. As and Cd induced cell toxicity was accompanied by both fragmented DNA and a decreased mitochondria membrane potential. Intracellular metallothionein was strongly expressed after the addition of Cd, but not after the addition of As. Intracellular lipid peroxidation product was found to be accumulated in both of the cultures. Intracellular glutathione (GSH) increased in line with increases in the As and Cd concentrations. In As2.5-R and Cd10-R, GSH increased more than twice the level seen in the normal cells for both metals. When the metal tolerant cultures were exposed to different metals, the protective property of metal toxicity was still maintained. However, when DL-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO) was added to the cultures that were tolerant for each metal, apoptosis was restored. We therefore conclude that As and Cd induced apoptosis is mediated by GSH-reactive intracellular oxidation.

Key words : Arsenic, Cadmium, Apoptosis, Glutathione, Oxidation

ヒ素とカドミウムによる細胞死への細胞内抗酸化物質の関与

内山 将伸¹⁾ 自見 至郎^{*2)} 高木 文³⁾
鈴宮 淳司⁴⁾ 山内 惠太¹⁾ 原 周司¹⁾
小野 信文¹⁾ 田村 和夫⁴⁾

¹⁾ 福岡大学薬学部医薬品情報学教室

²⁾ 福岡大学医学部病態構造系総合研究室

³⁾ 福岡大学医学部病理学

⁴⁾ 福岡大学医学部内科学第一

要旨 : ヒ素 (As) やカドミウム (Cd) は中毒性疾患をひき起こす。一方, As は再発または薬物抵抗性のある急性前骨髄球性白血病 (APL) に臨床応用されている。今回, 我々は As と Cd の細胞死誘導作用

を明らかにするため、ラットの正常尿細管上皮細胞から金属耐性細胞株を作成し、細胞内グルタチオン (GSH) 濃度、細胞内メタロチオネイン発現、酸化フォスファチジルコリン (oxPC) の蓄積について検討を行った。As と Cd による細胞死は、DNA 断片化、核小片化、ミトコンドリア膜ポテンシャル低下などアポトーシスの特徴を示した。一方、樹立した両金属耐性細胞株の増殖能は正常細胞と変わらなかった。免疫組織化学的細胞内メタロチオネイン発現は、Cd では添加直後から強発現するが、As での発現は認められなかった。細胞内 oxPC は両金属添加により増加するが、両者間に差はみられなかった。それぞれの耐性細胞に異なった金属を添加しても、細胞死誘導の抑制効果は維持された。細胞内 GSH 濃度は両金属濃度依存性に増加した。一方、As と Cd の耐性細胞内 GSH 濃度は正常細胞の場合に比べ、2 倍以上増加した。しかし、GSH 合成阻害剤 DL-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO) を両金属耐性細胞に添加すると、両者とも細胞死が誘導された。以上より、As と Cd により惹起されるアポトーシスは、GSH が反応可能な細胞内酸化が最も重要で、これが両金属の細胞内共通反応経路であると考えられた。

Key words : ヒ素, カドミウム, アポトーシス, グルタチオン, 酸化

緒 言

ある種の金属は中毒症状を引き起こす。我が国ではカドミウム (Cd) による腎障害と骨軟化症を主症状とするイタイイタイ病が知られている。また、ヒ素 (As) もそれ自体の毒性はないが、その化合物、特に 3 価のもの (亜ヒ酸) は毒性が強く、アジア各国では、その強い毒性・発癌性が社会的な問題になっている。一方、亜ヒ酸は急性前骨髄球性白血病 (APL) においてオールトランス型レチノイン酸 (all-trans retinoic acid; ATRA) と同等の寛解導入率を示すことが報告された^{1,2)}。現在、米国において「Trisenox[®]」として、再発または薬物抵抗性の急性前骨髄球性白血病 (APL) 患者への治療に用いられているが³⁾、その詳細な作用機構は解明されていない。これまでの研究から As および Cd ともに、その細胞死 (アポトーシス) 誘導のメカニズムはミトコンドリアを介するとされるが^{4,5)}、両者の細胞内作用機序の違いは明らかになっていない。As や Cd のような金属によるアポトーシス誘起の要因の 1 つとして、活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) が挙げられる。活性酸素とは O^{2-} , $OH\cdot$, H_2O_2 , $HOCl$ など、好氣的代謝過程で産出される反応副産物である。ROS はレドックスポテンシャルを変化させ、糖質、脂質、タンパク質、核酸に障害を与えることにより、酵素活性や転写因子活性、細胞質内 Ca^{2+} 濃度を変化させる⁶⁾。この結果、細胞全体の代謝を変動させている。一方、生体内にはスーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx)、ペルオキシレドキシニンなどの抗酸化系酵素や、グルタチオンチオレドキシニン、ビタミン A、ビタミン E などの低分子抗酸化物質が消去系として存在し、酸化による障害を防いでいる。また、金属結合タンパク質であるメタロチオネイン (MT) も全体の

約 1/3 がシステイン残基であることから、活性酸素種を捕捉する能力を持つ^{7,8)}。これまでの研究から As や Cd は細胞内において、活性酸素を産生することが報告されている^{9,10)}。

As と Cd の細胞内作用機序の違いについて解明することは、抗癌剤に対し薬剤耐性獲得後の白血病を含めた癌治療において、新たな治療法開発に繋がる可能性がある。本研究は、As と Cd の細胞死誘導の作用機序を明らかにするため、ラットの培養正常尿細管上皮細胞から As および Cd に耐性を持つ細胞株を作成し、これら細胞を用い、細胞内での金属の捕捉および抗酸化作用のあるメタロチオネインの発現と抗酸化物質として酸化ストレスに対し細胞防御的に作用するグルタチオン (GSH) 濃度について検討を行った。

材 料 と 方 法

ラットの正常尿細管上皮細胞 (TEC: NRK52E Rat, ATCC, US) を用いた。NRK52E の Cd および As 耐性株は、長期間かけ各々の最大濃度で生存できる細胞のみを選択的に継続培養し、最終濃度は As が $2.5 \mu M$ (As-2.5R), Cd が $10 \mu M$ (Cd-10R) とした。これらの細胞は Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) に 5% fetal bovine serum (FBS) を加えたものを基本培地とし、5% CO_2 存在下、 $37^\circ C$ 、加湿条件下で培養した。As (As_2O_3) は $1, 2.5 \mu M$, Cd ($CdCl_2$) は $1, 10 \mu M$ の濃度で使用した。細胞の洗浄は Phosphate Buffered Saline (PBS (-), pH 7.4, 日水製薬) を使用した。細胞数はトリパンブルー色素染色によって、生細胞数をカウントした。細胞形態の観察は 5% ホルマリン固定後、トルイジンブルーで染色し行った。DNA 断片化は細胞から DNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動によって確認した。ミトコンドリア mass は Mito-

Tracker Green (Molecular Probes, OR) を, 膜電位は Rhodamine 123 (Molecular Probes, OR) を使用し, フローサイトメトリーによって検討した. アポトーシス細胞数は 4', 6 - Diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) にて染色後, カウントした. 細胞内グルタチオン (GSH) 濃度は Total Glutathione Quantification Kit (Dojindo Molecular Technologies Inc., Japan) を用いて測定した. チャンバースライド上に単層培養した細胞を用い, 免疫組織化学的メタロチオネイン (MT-1, MT-2) 発現は anti-metallothionein antibody (Dako, Denmark) を用い, 過酸化脂質の蓄積は anti-Oxidized phosphatidylecholine (oxPC) antibody (DLH 3) を用いて検討した. グルタチオン合成阻害剤 DL-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) は 1 mM で使用した.

結 果

Cytotoxic effects of As and Cd

As または Cd を培養液へ添加した NRK52E 細胞は添加後48時間, 濃度 $1 \mu\text{M}$ 以上で明らかな傷害が認められた (Fig. 1 A). 一方, As 耐性細胞 (As-2.5R) および Cd 耐性細胞 (Cd-10R) は正常細胞と比較し, 胞体は広く, 多核細胞の出現も認められた (Fig. 1 B). As と Cd が NRK52E に引き起こす細胞死は, DNA ラダーの検出および核クロマチンの凝縮・核の小片化で示され, アポトーシスの生化学的, 形態学的特徴を有していた. これら細胞死に伴い, ミトコンドリア膜ポテンシャルは低下した (date not shown). As と Cd によるアポトーシス出現頻度を検討したところ, 正常細胞に As または Cd を添加し48時間後には, 濃度依存性にアポトーシスが誘導された (Fig. 2a). 一方, As 耐性細胞および Cd

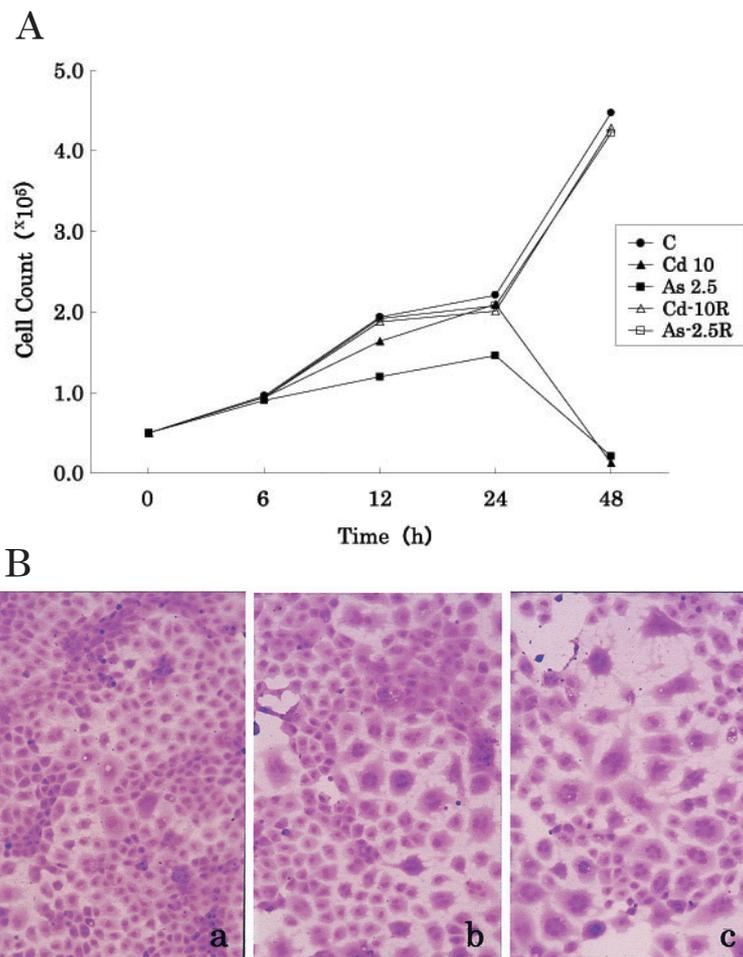


Figure 1. A : Growth activity of NRK52E cells cultures with As and Cd and $2.5 \mu\text{M}$ As-tolerant cells and $10 \mu\text{M}$ Cd-tolerant cells. (Data are mean of triplicated results.)

B : Appearance of the normal NRK52E cells (a), $2.5 \mu\text{M}$ As-tolerant cells (b) and $10 \mu\text{M}$ Cd-tolerant cells (c).

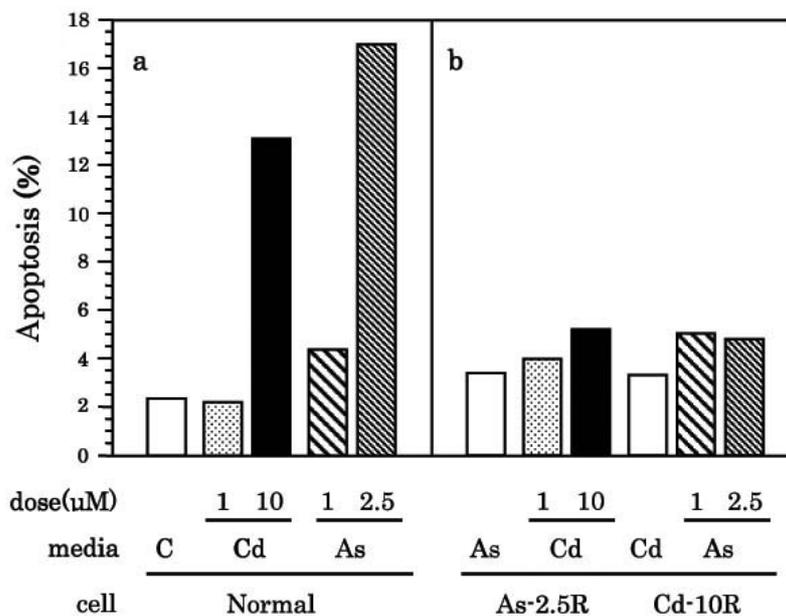


Figure 2. Induction of apoptosis by As and Cd in normal NRK52E cells and metal-tolerant cells. (Data are mean of triplicated results.)

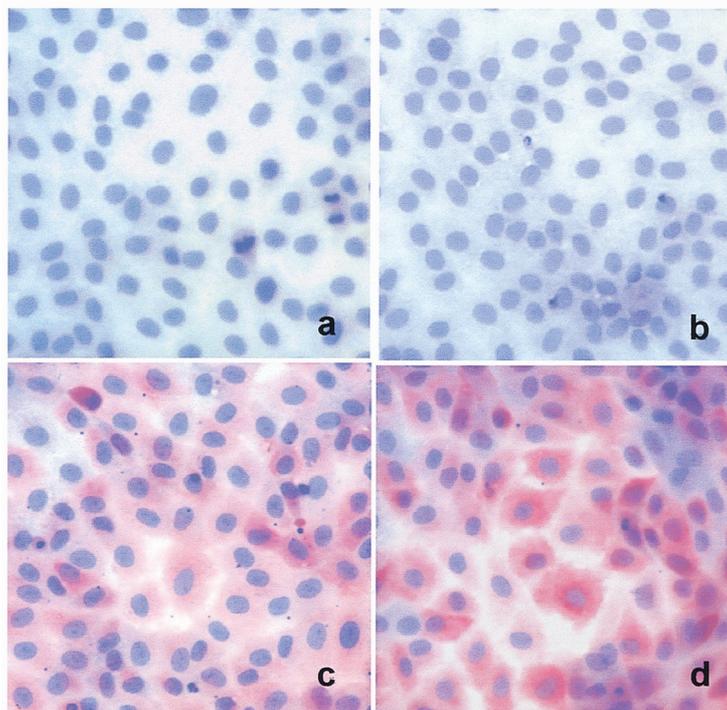


Figure 3. Immunohistochemical expression of metallothionein. Metallothionein expression in normal NRK52E cells exposed to 2.5 μ M As (a), and 10 μ M Cd (c), and 2.5 μ M As-tolerant cells (b) and 10 μ M Cd-tolerant cells (d).

耐性細胞の細胞増殖能は正常細胞と差はなく (Fig. 1A), また, アポトーシスも誘導されなかった (Fig. 2b). さらに As-2.5R に Cd 10 μ M, Cd-10R に As 2.5 μ M を添加してもアポトーシスは誘導されなかった.

Metallothionein (MT) expression

As および Cd を添加し, 24時間目の NRK52E 細胞および As 耐性細胞, Cd 耐性細胞での MT 発現を免疫組織化学的に検討した. 正常細胞および As 添加細胞 (As 2.5 μ M), As 耐性細胞 (As-2.5R) では MT の発現は

認められなかった。一方、Cd 添加細胞 (Cd 10 μ M) では添加直後より、MT は強発現した。また、Cd 耐性細胞 (Cd-10R) での発現は同濃度 Cd 添加の正常細胞 (Cd 10 μ M) より強く発現した (Fig. 3)。

GSH levels in cells exposed to As and Cd

As および Cd 添加, 6, 12, 48時間後の細胞内グルタチオン (GSH) 濃度について測定したところ, 細胞内 GSH 濃度は As および Cd 添加48時間後, 正常細胞と比較して, 有意な濃度依存性の増加を示した。その変動傾向はアポトーシス出現率 (Fig. 2) と類似していた (Fig. 4A)。一方, 金属耐性細胞内 GSH 濃度は正常細胞と比較して, Cd 耐性細胞では約2倍, As 耐性細胞においては約4.5倍に増加していた (Fig. 4B)。

Intracellular oxidation in cells exposed to As and Cd

フォスファチジルコリンは細胞膜を構成しているリン脂質の主要成分であり, 特にミトコンドリア膜に豊富に存在している。細胞内で As と Cd の添加により, 酸化が起きているかを確認するため, 抗酸化フォスファチジルコリン抗体 (DLH 3) を用い, 免疫組織化学的に検討した。正常細胞では細胞内に微量認めのみであったが, As または Cd を添加した場合, ともに細胞内に多量の酸化フォスファチジルコリンの蓄積が認められた。しかし, 両者に大きな差は認められなかった (Fig. 5)。

Effect of GSH inhibition on apoptosis in normal cells and metal-tolerant cells

グルタチオン合成阻害剤である BSO を用いて, 細胞

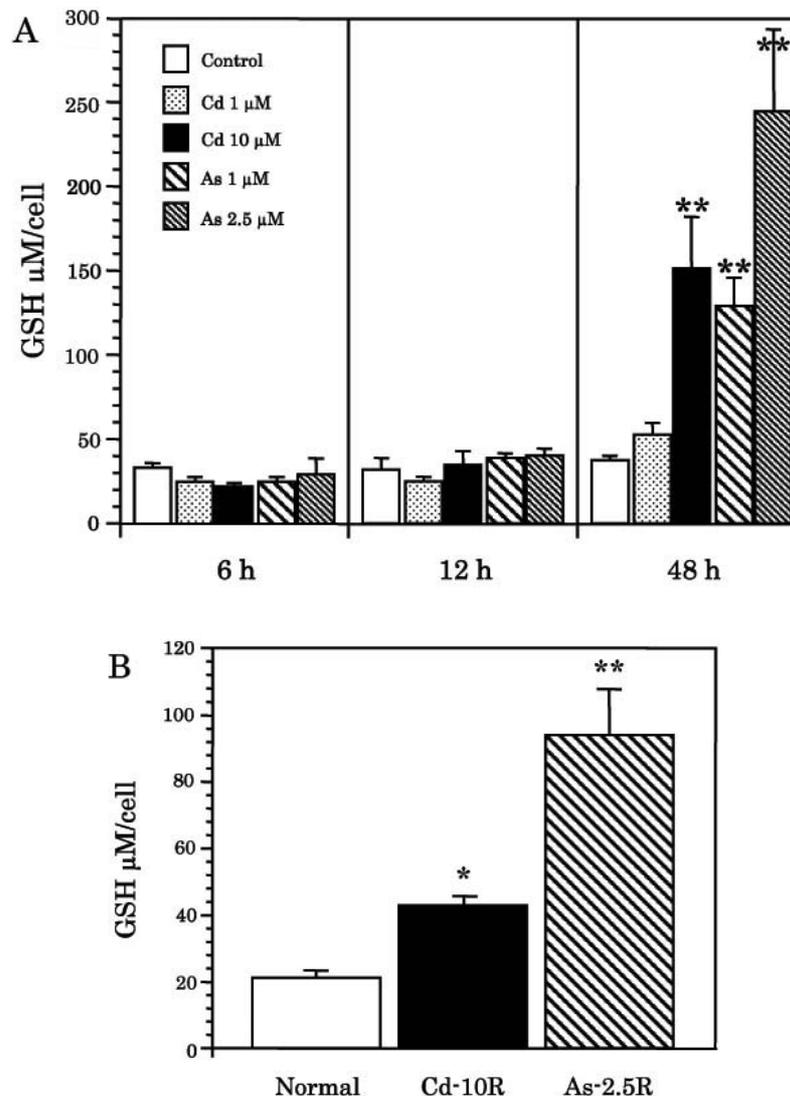


Figure 4. Intracellular glutathione (GSH) concentrations in NRK52E cells incubated with As and Cd (A), and in metal-tolerant cells (B). Data are mean \pm SD (n=3). *P<0.05, **P<0.01, compared with normal cells, by Student's *t*-test.

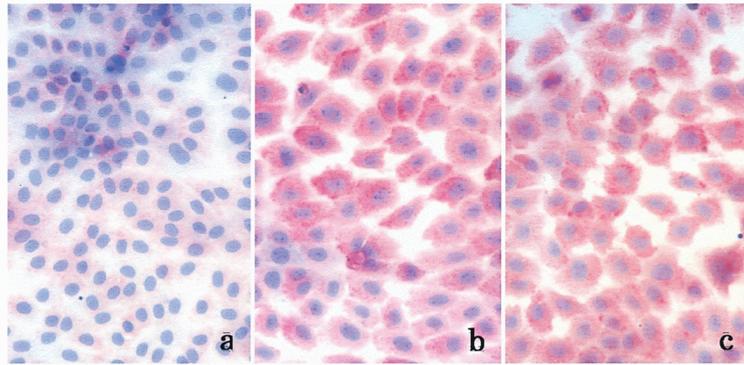


Figure 5. Immunohistochemical expression of a lipid peroxidation product (oxPC). Intracellular peroxidation in normal NRK52E cells (a), and cells exposed to 10 μ M Cd (b) and 2.5 μ M As (c).

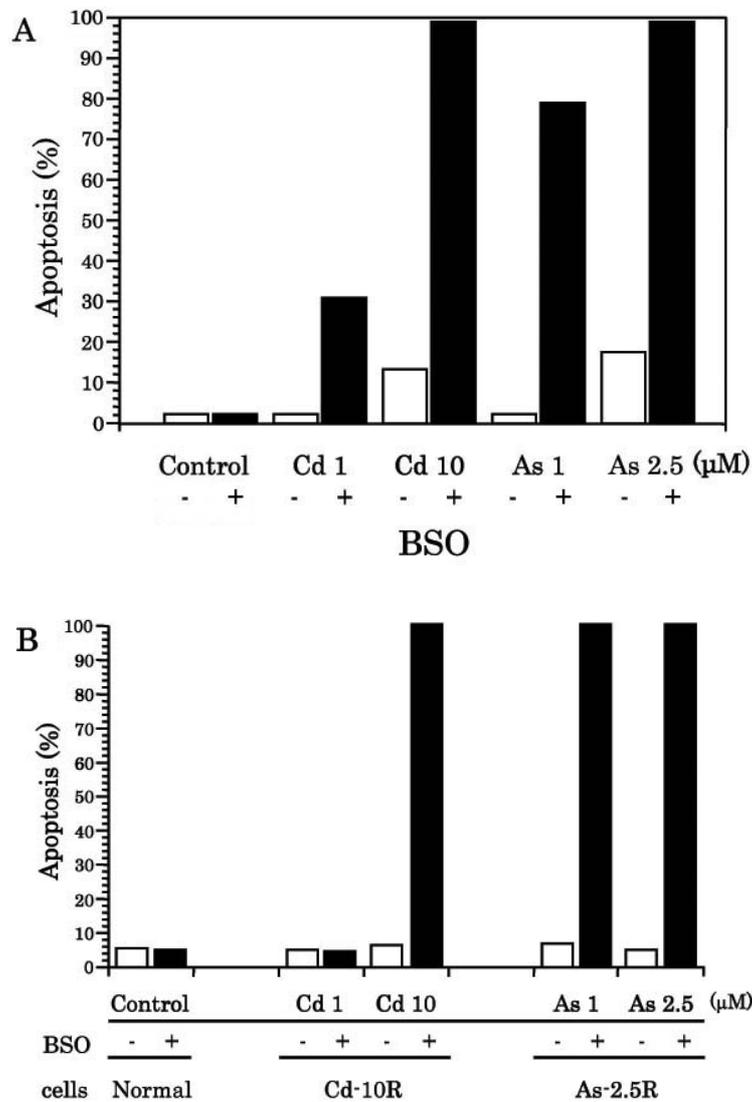


Figure 6. Effect GSH inhibition on apoptosis by DL-buthionine-(*S*, *R*)-sulfoximine (BSO) in NRK52E cells incubated with Cd and As(A), and in metal-tolerant cells(B) (Data are mean of triplicated results.)

内において酸化還元反応に深く関与しているグルタチオンを枯渇させた状態における As または Cd による細胞死について検討した。BSO のみを正常細胞へ添加してもアポトーシスは誘導されなかった。As と BSO を同時添加した場合、As 単独投与時に比べ、アポトーシスは約38倍に増強・誘導された。As 2.5 μ M 耐性細胞に As 1 μ M または 2.5 μ M と BSO を同時添加した場合、アポトーシスが誘導された。Cd と BSO とを同時添加した場合、Cd 単独投与時と比較し、アポトーシスは約14倍に増強・誘導された。Cd 10 μ M 耐性細胞では Cd 10 μ M と BSO を同時添加した場合、アポトーシスが誘導された。しかし、Cd 1 μ M と BSO を同時添加した場合、アポトーシスは誘導されず、同濃度の Cd 単独投与時と同程度だった。(Figs. 6 A and B)

考 察

オールトランス型レチノイン酸 (ATRA) による APL の分化誘導療法は、現在、APL 治療の標準的寛解導入療法として定着している。ATRA を含めた寛解導入療法により90%前後の症例で完全寛解が得られ、その後の化学療法により寛解例の60%以上に治癒が期待される。一方、APL に対する ATRA 耐性は比較的容易に出現するものと考えられている。現在、薬剤耐性となった APL の治療において亜ヒ酸の効果が示され、米国・中国・日本において、臨床応用されている¹¹⁻¹³⁾。しかし、これまでの抗癌剤と同様、亜ヒ酸もその詳細な作用機構が解明されないまま臨床応用されている。一方、塩化 Cd もラットに皮下投与した場合、白血病自然発生率が顕著に減少したとする報告がなされている¹⁴⁾

本研究は、NRK52E 細胞と As および Cd に耐性を持つ細胞株との比較から、As と Cd の作用機序の相違点と共通点を検討した。As および Cd による NRK52E の細胞死は両金属の濃度依存性に誘導された。また、As 耐性細胞に Cd を、Cd 耐性細胞に As を添加する交差実験を行ったところ、両者ともアポトーシスが起らなかった。このことは、細胞内作用機序において、As と Cd が共通する経路により細胞死を誘導することを示唆するものであった。

過酸化脂質である酸化フォスファチジルコリンは正常細胞に比べ、As および Cd 添加時に多量の蓄積が観察された。このことから、As または Cd の添加を受けた細胞内において、細胞内酸化が引き起こされていることが示唆されたが、両金属間に大きな差はみられなかった。

抗酸化物質である GSH の細胞内濃度は As および Cd 添加、48時間目で有意な濃度依存性の増加を示した。その変動傾向はアポトーシス出現率と一致していた。そこで、Table 1 に示すように、アポトーシス出現率に対する GSH 濃度 (GSH/Apoptosis) で検討したところ、低濃度金属 (As 1 μ M, Cd 1 μ M) では Control に対し増加し、高濃度 (As 2.5 μ M, Cd 10 μ M) では低下している。このことからアポトーシス誘発が弱い低濃度の As および Cd では GSH が反応性に過剰産生され、一方、アポトーシスが激しく誘発される高濃度の As および Cd では逆に GSH は低く、欠乏状態になっていると考えられた。さらに、BSO を用い、金属と同時添加したところ、それら単独投与と比較して、アポトーシスは増強された。一方、As 耐性細胞では As 1 μ M および 2.5 μ M と BSO を同時添加した場合、ともにアポトーシスが誘導されたのに対し、Cd 耐性細胞では Cd 10 μ M と BSO を同時添加した場合にのみ、アポトーシスが誘導された。Cd 耐性細胞において Cd 1 μ M と BSO を同時添加した場合、同濃度の Cd 単独投与時と比較し、アポトーシス誘発に差がみられなかったのは、その耐性獲得に GSH 以外の抗酸化系も関与していることが示唆され、その1つとして As 添加細胞と As 耐性細胞では発現せず、Cd 添加細胞および Cd 耐性細胞でのみ強発現したメタロチオネインの存在が考えられた。

以上の結果より、Cd 耐性細胞は GSH とメタロチオネインの強発現、As 耐性細胞では GSH の強発現により細胞内酸化を抑制し、アポトーシス抵抗性が獲得されたことが示唆された。また、両金属耐性細胞は GSH 合成阻害剤 BSO 添加でアポトーシス抵抗性は解除され、アポトーシスは再誘導された。この誘導は As 耐性細胞のみならず Cd 耐性細胞でも認められた。

以上より、As および Cd ともに細胞内で GSH が反応可能な酸化を起こさせ、その破綻がアポトーシスを誘発

Table 1. Variation of GSH/Apoptosis in normal NRK52E cells, and cells exposed to 1, 10 μ M Cd and 1, 2.5 μ M As.

Concentration (μ M)	Control	Cd 1	Cd 10	As 1	As 2.5
GSH (μ M/cell)	35.5	51.1	151.1	130	245.3
Apoptosis (%)	2.2	2.1	13.1	4.5	17.1
GSH/Apoptosis vs, Control	16.13	24.33 ↑	11.53 ↓	28.89 ↑	14.35 ↓

(Data are mean of triplicated results.)

する共通作用機序となっていることが示された。本実験から、特定の臓器や組織に対する As または Cd の毒性は GSH やメタロチオネインの発現の程度により左右されると考えられる。Cd は As 耐性細胞に対して効果はなく、作用機序が類似していることから臨床応用できる可能性は低い。一方、As と BSO を添加した場合、抗癌剤耐性後の APL に対し As 単独投与時よりも有効性が高いことが予想される。また、As 治療後に As 耐性になった場合でも BSO を併用することで、抗癌剤耐性を克服することも期待される。

文 献

- 1) Sun HD, Ma L, Hu XC, Zhang TD: Ai-Lin 1 treated 32 cases of acute promyelocytic leukemia. *Chin J Integrat chin West Med* 12 : 170-172, 1997.
- 2) Sun H, Ma L, Zhang T, et al: Treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. *Cancer Res* 61 : 5432-5440, 2001.
- 3) Shen ZX, Chen GC, Ni JH, et al: Use of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood* 89, 3354-3360, 1997.
- 4) Li M, Kondo T, Zhao QL, Li FJ, Tanabe K, Arai Y, Zhou ZC, Kasuya M: Apoptosis induced by cadmium in human lymphoma U937 cells through Ca^{2+} -calpain and caspase-mitochondria dependent pathways. *J Biol Chem* 275 : 39702-9, 2000.
- 5) Chen GQ, Zhe J, Shi XG, et al: In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: $AsAs_2O_3$ induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR/PML proteins. *Blood* 88 : 1052-1061, 1996.
- 6) McConkey DJ, Orrenius S: The role of calcium in the regulation of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 239 : 357-366, 1997.
- 7) Ramana Kumari MV, Hiramatsu M, Ebadi M: Free radical scavenging actions of metallothionein isoforms I and II. *Free Rad Res* 29 : 93-101, 1998.
- 8) Miles AT, Hawksworth GM, Beattie JH, Rodilla V: Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 35 : 35-70, 2000.
- 9) Shen ZY, Shen WY, Chen MH, Shen J, Zeng Y: Reactive oxygen species and antioxidants in apoptosis of esophageal cancer cells induced by As_2O_3 . *Int J Mol Med* : 479-84, 2003.
- 10) Moffatt P, Denizeau F: Metallothionein in physiological and physiopathological processes. *Drug Metab Rev* 29 : 261-307, 1997.
- 11) Niu C, Yan H, Yu T, et al: Studies on treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide: remission induction, follow-up, and molecular monitoring in 11 newly diagnosed and 47 relapsed acute promyelocytic leukemia patients. *Blood* 94 : 3315-3324, 1999.
- 12) Soignet SL, Frankel SR, Douer D, et al: United States multicenter study of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol* 19 : 3852-3860, 2001.
- 13) Ohnishi K, Yoshida H, Shigeno K, et al: Arsenic trioxide therapy for relapsed or refractory Japanese patients with acute promyelocytic leukemia: need for careful electrocardiogram monitoring. *Leukemia* 16 : 617-622, 2002.
- 14) Waalkes MP, Rhem S, Sass B, Konishi N, Ward JM: Chronic carcinogenic and toxic effects of a single subcutaneous dose of cadmium in the male Fischer rats. *Environ Res* 55 : 40-50, 1991.

(平成16. 3.31受付, 16. 6.14受理)