

ミネラルならびに微量金属元素による ヒト血管内皮細胞への影響

長谷 真¹⁾
三浦 嘉子^{1)*} 三浦 沙紀^{1)*} 柳井 望^{1)*} 吉野 由有^{1)*}
荒木 聡彦²⁾

Effects of Minerals and Trace Metals on Apoptosis and Necrosis of Human Vascular Endothelial Cells

Makoto HASE¹⁾
Kako MIURA^{1)*} Saki MIURA^{1)*} Nozomi YANAI^{1)*} Yu YOSHINO^{1)*}
Satohiko ARAKI²⁾

【要 旨】

生体の構成成分としてや生理機能維持のためにミネラル（無機質）は重要な役割を担っている。本研究においては培養ヒト血管内皮細胞を用いて様々な金属元素について、その細胞障害性を中心に調査した。その結果、特にアルミニウムが内皮細胞に濃度依存的に細胞死を誘導し、その細胞死はアポトーシスの形態を示した。またその細胞死は内皮細胞特異的に誘導されていることを確認した。

【キーワード】

微量元素 血管内皮細胞 プログラム細胞死

緒言

栄養学においてミネラルは生体機能の維持・調節として重要な栄養素の一つである。それらは生体外からの食物を介して供給されており、適切な量を摂取することで健康維持の一端を担っている。厚生省による「日本人の食事摂取基準」（2010年版）をみると、多量ミネラ

ルとしてナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、リン、微量ミネラルとしては鉄、亜鉛、銅、マンガン、ヨウ素、セレン、クロム、モリブデン、について、性別や年齢に則した推定平均必要量や推奨量などが提示されている¹⁾が、それぞれの過剰摂取による中毒症などの作用機序は未だ明らかにされていない部分が多い。本研究では生体におけるミネラル類の影響について培養細胞を用いて基礎データの収

¹⁾ 別府大学短期大学部 ²⁾ 名古屋大学理学研究科

* These authors contributed equally to this work.

集を行った。

培養血管内皮細胞による本解析ではアルミニウムに顕著な細胞障害性が見受けられた。アルミニウムは古くから痴呆へのリスクファクターとして疑われており²⁾、例えば透析脳症と呼ばれる透析液中のアルミニウムによる痴呆症状の発現や *in vitro* 実験系におけるニューロン死など³⁾が報告されているが体内での動態については各器官・臓器による差異も含め不明な部分が多い。

生体内の一器官として血管は様々な役割を担っている。特に血管新生は発生時の脈管系、循環器系形成や成人期の性周期関連の血管形成といった正常個体において重要な意義を持つ。さらに腫瘍血管形成や創傷治癒などの病的条件下においても血管新生、特に血管内皮系の反応は数多くの情報をもたらしている^{4,5)}。このように内皮細胞の増殖、分化に関する制御機構を分子レベルで明らかにすることは生物学的にも、臨床、栄養学的見地からも重要である。

細胞障害によって誘導される細胞の死の形態には大きく2つのタイプがある。一つはネクロシスと呼ばれる細胞の「壊死」で、物理的損傷や外来性毒素等による受動的な細胞死である。一方アポトーシスは個体発生時や組織分化の過程、生体維持の為に起こる、自らのエネルギー代謝を伴うプログラム(された)細胞死のほとんどにおいてみられるものである。アポトーシスの形態的特徴としてはアポトーシス小体と呼ばれる原形質突出やクロマチン凝集、核DNAのヌクレオソーム単位での断片化などを示し、遺伝子レベルにおいても様々なアポトーシス関連遺伝子が見つかっている。アポトーシス誘導は様々な細胞で多様な誘導要因で起こっている。例えばニワトリ胚の後肢芽指形成における指間充織細胞のプログラム細胞死⁶⁾などは正常な生長に伴い制御されているものであり、増殖因子除去や虚血時といった異常な状況でのアポトーシス調節^{7,8)}も報告されている。これら致死因子の発見は臨床的立場からも疾病治癒に寄与するものとして非常に大きな期待が寄せられている。

本研究ではミネラルの中でも特にアルミニウム(と鉄)が血管内皮細胞にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的として行った。

材料と方法

(1) 材料

線維芽細胞増殖因子(FGF)はウシ脳からLobbの方法⁹⁾により抽出した。ヘパリンはシグマ社より購入。MCDB-104は極東製薬から、MEMは日水製薬から購入した。ウシ胎児血清(FBS)はGIBCO(ニューヨーク)から購入した。ヒト臍帯内皮細胞はJaffeの方法¹⁰⁾により臍帯より分離し、培養し使用した。細胞は第八抗原関連因子抗体により血管内皮細胞である事を確認した。ラット平滑筋細胞(RSMC-3)は加治和彦博士より提供をうけた。プロテイナーゼK、RNアーゼA、エチジウムブロマイド、ビタミンE(DL- α -トコフェノール)、ならびに塩化アルミニウムをはじめとする各種金属塩化物はすべて和光純薬(大阪)より購入した。

(2) 方法

1) 細胞培養

ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)の培養ならびにラット平滑筋細胞の培養は既報¹¹⁾により行った。

2) 細胞数の計測

コンフルエント、あるいはサブコンフルエント状態の細胞の通常培養液をカルシウム、マグネシウム無添加リン酸バッファー(PBS-)で洗浄後、FGF無添加(あるいは1/10量添加)培養液に交換、各実験に使用する薬剤を添加、所定期間培養後、PBS-で洗浄し培養皿に付着している細胞(生細胞)のみをトリプシンではがしコールターカウンターで計測した。アッセイは3サンプル以上を計測し平均値、標準偏差をとり薬剤等無添加培養液での生細胞数を100%として生存率を計算した。

全ての添加試薬は純水、エタノール、MCDB-104培地を溶媒としたストックソリューションを作製し使用時の最終濃度が1%以下になるように調節した。

3) 細胞形態の観察

細胞の形態観察はDIAPHOT-TMD位相差顕微鏡(ニコン社)を用い100倍、あるいは200倍にて検鏡し写真により記録した。

4) DNA ラダーの検出

アポトーシスに伴うDNAの断片化の検出は既報¹¹⁾により行った。採取したDNAはMUPIDミニゲル装置(コスモバイオ)を用い2%アガロース電気泳動を行った。泳動後、エチジウムブロマイドによってDNAを染色し、UVトランスイルミネーターで蛍光写真を撮影した。

結果と考察

(1) 各種金属イオンの内皮細胞への影響

金属イオンによる細胞への影響は非常に多く知られている。例えば各々のチャンネルを選択的に通過するイオンと同価の類似イオンによるチャンネル阻害や細胞内情報伝達物質としてのカルシウムなどを挙げる事が出来る。生体レベルにおいても各ミネラルそれぞれにおいて欠乏症や過剰摂取による健康への影響が報告されている。そこで各種イオンの内皮細胞に対する影

響について調べた(表1)。カルシウム、マグネシウム、ガドリニウム、亜鉛、マンガン、バリウム、ストロンチウム等について塩化物1mMを培養液中に添加し観察を行った。その結果、カルシウム、ガドリニウム、亜鉛イオン以外では細胞死の誘導はほとんど見られなかった。わずかにみられる細胞死も明らかに形態上ネクロシスであった。

カルシウム、ガドリニウム、亜鉛についてはさらにタンパク合成阻害剤であるシクロヘキシミド(CHX)による細胞死抑制効果の有無を調べた。多くのアポトーシスシグナルではその過程においてタンパク質合成が要求される。それ故タンパク合成阻害剤によってアポトーシス死が抑制されることが知られている。しかしカルシウム、ガドリニウム、亜鉛による内皮細胞死はCHXによって抑制されなかった(データ未掲載)。

今回の実験は培養細胞による結果であり濃度等を含め、生体における添加物の動態を完全に反映しているわけではない。しかし単純な細胞障害であるネクロシスでなく細胞の「能動的な」死であるアポトーシスが観察されるならそこには生理的な意味合いを反映していると考えられる。そこで他のイオンについても検索を行いアルミニウムにアポトーシス細胞死誘導能を見出した。

(2) アルミニウムによるアポトーシスの誘導

1) 内皮細胞へのアルミニウムの影響

培養内皮細胞にアルミニウムを投与すると細胞死が起こることを確認した。添加濃度と生存率の相関を添加後24時間でみてみると(図1A)、塩化アルミニウムの投与において3 μ M以上加えると細胞死が誘導され始める。また50%致死濃度は約100 μ M付近であった。アルミニウム添加による細胞の形態変化をみてみると(図1B)、1mM $AlCl_3$ の投与によりコントロール(無添加)と比較して明らかに多数の細胞の死が誘導されている。24時間後で比較するとコントロール(c)でも生存因子(FGF, FBS)が無添加な条件なので若干の細胞死(細胞の剥

表1 各種金属塩化物(1mM、添加後24h)におけるヒト血管内皮細胞死の誘導

	VIABILITY (%)	SD (%)
CTL	100.0	2.78
CaCl ₂	57.14	3.71
MgCl ₂	73.92	8.75
GdCl ₂	27.87	3.38
ZnCl ₂	4.40	2.08
MnCl ₂	75.89	7.93
BaCl ₂	70.08	6.59
SrCl ₂	90.00	3.26

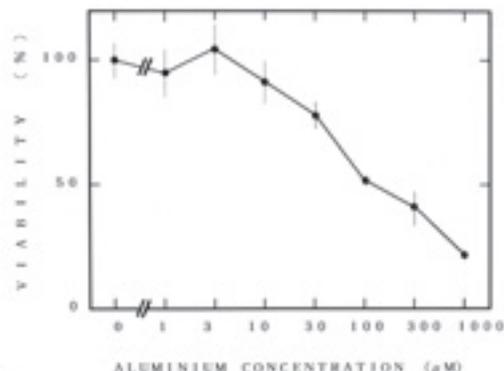


図1 A アルミニウムにおける細胞死の誘導
縦軸を生存率（アルミニウム無添加を100%）、横軸をアルミニウム濃度としてプロット。インキュベーションは24時間

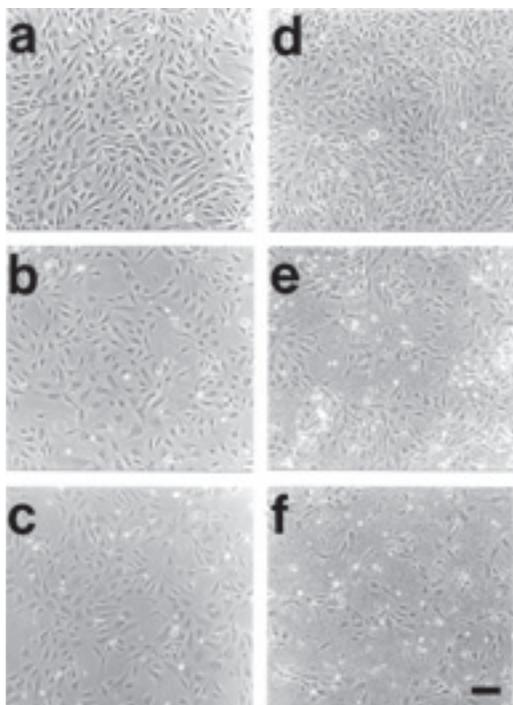


図1 B アルミニウムによる細胞死における細胞の形態変化（光学顕微鏡像）
アルミニウム（1 mM）添加時の内皮細胞への影響を観察した。コントロール（a, b, c）はアルミニウム無添加（培養液のみ）、d, e, fにはアルミニウムを添加。0時間（a, d）、12時間（b, e）、24時間（c, f）インキュベーション。縮尺は100μm。

離）がみられるがアルミニウム添加（f）の場合、明確に（c）より細胞死が進行している事がわかる。さらにその死細胞は基底面からの剥

離、細胞収縮、アポトーシス小体などが観察され、形態上、アポトーシス死の様相を呈していた。

以上のようにアルミニウムによって内皮細胞にプログラム細胞死が誘導されている可能性が示唆された。そこでさらに薬理的、生化学的手法によってアルミニウム誘導の細胞死がアポトーシスかどうか検討した。

（3）CHX による細胞死の抑制

アルミニウムによってアポトーシスが誘導されているのならばその細胞死はタンパク質合成阻害剤で阻害されるはずである。CHXはHUVECのアポトーシスにおいてその効果が顕著であるので本研究でもその効果を試した。その結果（図2）、CHXによってアルミニウムによる細胞死が抑制された。1 μg/mLのCHXと1 mMのアルミニウムを同時に添加し18時間後の生存率（培養液のみでの18時間での生細胞数を生存率100%のコントロールとした）をみると1 mMアルミニウム単独で誘導される細胞死をほぼ100%阻害した。これらの結果はアルミニウム誘導細胞死がタンパク質合成を必要とするシグナル伝達系であることを示している。

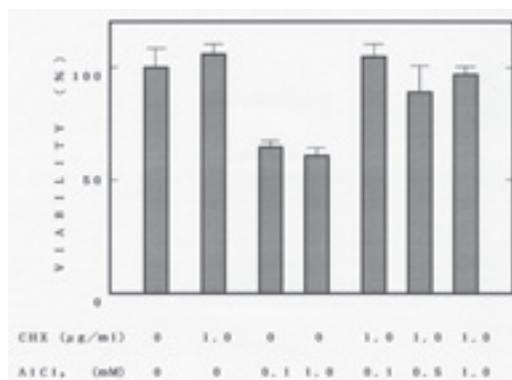


図2 シクロヘキシミドによるアルミニウム誘導死の抑制

1 μg/mL シクロヘキシミド（CHX）の各濃度アルミニウムへの影響を生存率で示した。培養液交換と同時にCHX、アルミニウムを添加、18時間後の細胞数を計測。コントロールは培養液のみ18時間での生細胞数（この値より生存率を算出）。

(4) DNA ラダーの確認

さらにアルミニウムによる細胞死がアポトーシスであるという確証を得るために死細胞からDNAを抽出し、電気泳動を行った。図3はその泳動像である。コントロールであるレーン1（無添加、2h）、レーン2（無添加、4h）ではDNAの断片化、そしてそれに伴うDNAラダー像は見られない。アルミニウム添加（レーン3、4）の場合、レーン3（2h）ではわずかに、レーン4（4h）では明確なDNA断片化に伴うDNAラダーが見られた。又、CHXの細胞死抑制効果に対しても、本当にCHXによってDNA断片化が阻害されているのかアガロース電気泳動によって確認した（データ未掲載）。DNAラダーはアルミニウム単独添加の時には確認できたが、CHX存在下ではラダーは形成されなかった。



図3 アルミニウム（1 mM）添加時のDNA断片化の検出

各条件の細胞よりDNAを抽出し、アガロースゲル電気泳動にてDNA断片化の有無を観察した。レーン1. コントロール、生存因子無添加培養液に交換後2時間、レーン2. コントロール、生存因子無添加培養液に交換後4時間、レーン3. アルミニウム添加後2時間、レーン4. アルミニウム添加後4時間。

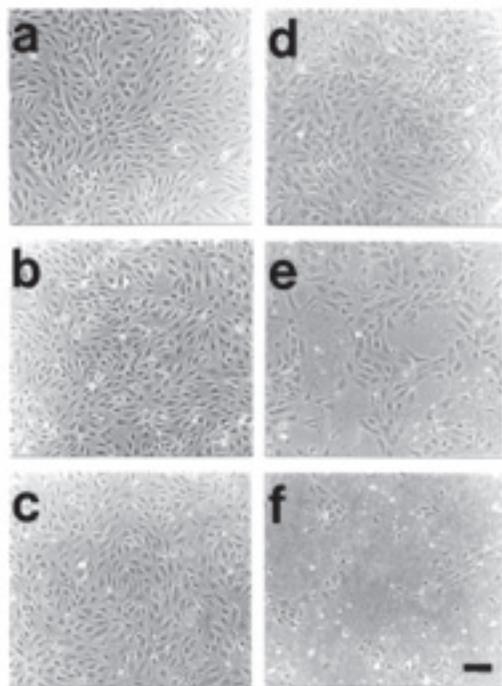
以上の結果からアルミニウムによる血管内皮細胞死はプログラム細胞死であることが示唆された。これまで特にアルミニウムの生体への影響については痴呆との関連から神経細胞を中心に調べられている。例えばラットの大脳皮質培

養細胞を用いてアルミニウムの長期投与が行われている。100 μ M アルミニウム投与によってカルシウムチャンネルの異常発火などがみられている。本研究では細胞死に焦点を絞ったため長期投与の効果の検討は行っていないが、少なくとも FGF, FBS 存在下、24時間では細胞の形態に変化はなかった。これからの研究として低濃度、長期投与の影響についても検討を予定している。

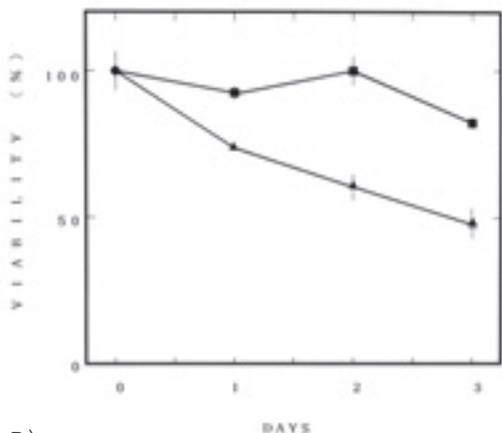
(5) アルミニウムによる細胞死誘導の特異性について

これまでの(2)～(4)の検討では培養液中の生存因子を加えていない培地中で行われた。この条件下での実験でもコントロールとの差は明確であり細胞死の検討には充分だと思われる。しかし以前の結果¹²⁾より、FGF, FBS 除去の条件下では長期培養時には（いわゆる生存因子除去シグナルによる）アポトーシスが誘導されることが知られている。これらの事実より生存因子除去培養液中へのアルミニウム投与によるアポトーシスは単に生存因子除去誘導アポトーシスの誘導にかかる時間等を加速しているだけではないのかという疑問が持ち上がる。そこで細胞が生存因子除去によるアポトーシスをおこさず、コンフルエントを維持できる条件（通常の十分の一量の FGF, FBS 存在下での培養）でのアルミニウムの内皮細胞への影響を調べた（図4）。

図4Aは、その時の細胞形態を示したものである。96時間維持条件においても、コントロールはコンフルエントを保っており生存因子除去誘導のアポトーシスは検出できなかった。しかしこの条件下でもアルミニウム添加によってプログラム細胞死が誘導出来た。生存率を計測しても（図4B）、細胞数の減少が見受けられた。これらの実験により、アルミニウム添加によるアポトーシスは生存因子除去による細胞死シグナルとは別の情報伝達系で働いている事が示唆された。



A)



B)

図4 コンフルエント状態維持条件下でのアルミニウムの影響

通常添加量の10分の1量のFGF(7µg/mL)、FBS(1%)の存在によってコンフルエントを維持している状態でのアルミニウムの影響。A) 光学顕微鏡像。a, b, c はアルミニウム無添加(10分の1量のFGF、FBSを含む培養液)、d, e, f にはアルミニウム(1mM)を添加。0時間(a, d)、48時間(b, e)、96時間(c, f)培養。縮尺は100µm。B) 10分の1量のFGF、FBS存在下でのアルミニウム添加による生存率の変化(実験開始前を100%生存率)。■はコントロール、▲は1mMアルミニウム同時添加。

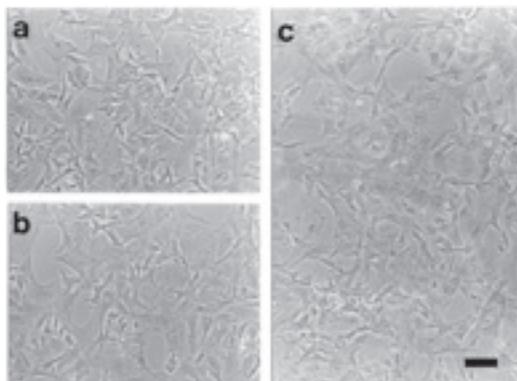


図5 平滑筋におけるアルミニウムの影響

ラット平滑筋細胞(RSMC-3)へのアルミニウム添加の効果を観察。a. コントロール、培養液交換前。b. コントロール、培養液交換後4日目。c. 1mMアルミニウム、培養液交換後4日目。縮尺は100µm。

また当研究におけるアルミニウム誘導アポトーシスが内皮細胞特異的なものかどうかについても検討を加えた(図5)。ラット平滑筋細胞(RSMC-3)を用いてアルミニウムの影響について調べた。内皮細胞とは異なり培養液交換後4日目においても、1mMアルミニウム添加によるアポトーシス誘導は見られなかった。また生存因子除去(通常添加する10%FBSの除去)によっても内皮細胞のようなアポトーシスは起こらなかった。つまり、アルミニウムは内皮細胞特異的にアポトーシスを誘導している可能性が見出された。

(6) 抗酸化剤の効果

アルミニウムは鉄輸送系によって細胞内に取り込まれていると考えられておりトランスフェリン受容体仲介輸送やトランスフェリン非依存性輸送などが知られている。特に非依存性輸送系によってアルミニウムや鉄の異常な細胞内蓄積がなされているといった報告もありこれらの経路とアポトーシスシグナルとの関係も興味深いところである^{13, 14, 15}。さらにアルミニウムによるニューロン死は抗酸化剤で阻害されることからアルミニウム毒性がフリーラジカル関与であるとする報告^{16, 17}もあり、本研究においても抗酸化剤であるビタミンEのアルミニウム誘導アポトーシスへの効果を調べた。様々な濃度

のビタミンEとアルミニウムの同時投与を行ったが(図6)、その生存率を好転させることはほとんどなく、内皮細胞におけるアルミニウムの致死効果にビタミンEは影響を与えないことがわかった。

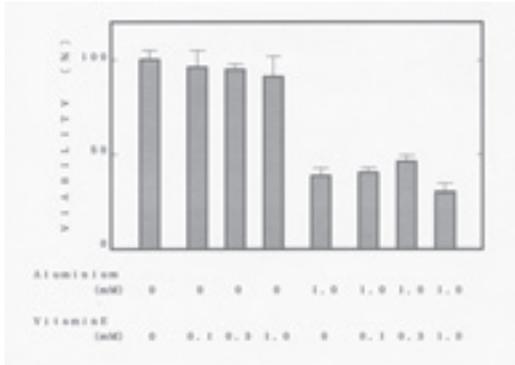


図6 アルミニウム存在下での抗酸化剤の効果

アルミニウムの有無に関わらず各種濃度のビタミンEを内皮細胞培養液に添加し、24時間後に生存細胞数を計測した。コントロール(100%生存率)は培養液のみのサンプルより算出。

筆者らは以前にアルツハイマー病における病因の一つと考えられているアミロイドβタンパクのペプチド断片が血管内皮細胞にアポトーシスを引き起こすことを報告している¹⁸⁾が、今回のアルミニウムの結果とともにいわゆる老化病のリスクファクター候補が血管内皮細胞に対して特異的にプログラム細胞死を誘導している事は非常に興味深く、今後は生体レベルでの影響についても調査していきたい。

引用文献

- 厚生労働省(平成21年5月29日)「日本人の食事摂取基準」(2010年版)
- 川原正博、黒田洋一郎: 公衆衛生研究、42、520-525, 1993
- Langui, D., Anderson, B. H., Brion, J. P., Ulrich, J. (1988) Effects of aluminium chloride on cultured cells from rat brain hemispheres. *Brain Res.*: 438, 67-76 (1988)
- Jaffe, E. A. (1984): *Biology of Endothelial Cells*, 1-456, Martinus Nijhoff Publishers, Boston
- Araki S, Simada Y, Kaji K, Hayashi H. (1990) Role of protein kinase C in the inhibition by fibroblast growth factor of apoptosis in serum-depleted endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 172, 1081-1085
- Saunders, J. W. Jr. (1966) Death in embryonic systems. *Science*, 154, 604-612
- Araki, S., Shimada, Y., Kaji, K., and Hayashi, H. (1990) Apoptosis of vascular endothelial cells by fibroblast growth factor deprivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 168, 1194-1200
- Martin, D. P., Schmidt, R. E., Distefano, P. S., Lowry, O. H., and Johnson, E. M., Jr. (1988) Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation. *J. Cell. Biol.* 106, 829-844
- Lobb, R. R. and Fett, J. W. (1985) Purification of two distinct growth factors from bovine neural tissue by heparin affinity chromatography. *Biochemistry*, 23, 6295-6296
- Jaffe, E.R., Nackman, R. L., Becher, C. G. and Minick, R. C. (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.*, 52, 2745-2756
- Araki, S., Tuna, I., Kaji, K., and Hayashi, H. (1994) Programmed cell death in response to alkyllysophospholipids in endothelial cells. *J. Biochem.*, 115, 245-247
- Hase, M., Araki, S., Kaji, K., and Hayashi, H. (1994) Classification of signals for blocking apoptosis in vascular endothelial cells. *J. Biochem.*, 116, 905-909
- Oshiro, S., Nakajima, H., Markello, T., Krasnewish, D., Bernardini, I. and Gahl, W. (1994) Redox, transferrin-independent, and receptor-mediated endocytosis iron uptake systems in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem.* 15; 268(29):21586-21591.
- Randell, E. W., Parkes, J.G., Olivieri, N. F. and Templeton, D. M. (1994) Uptake of non-transferrin-bound iron by both reductive and nonreductive processes is modulated by intracellular iron. *J. Biol. Chem.*, 269, 16046-16053
- Oshiro, S., Nakamura, Y., Ishige, R., Hori, M., Nakajima, H. and Gahl, W. A. (1994) Reduction site of transferrin-dependent and transferrin-independent iron in cultured human fibroblasts. *J. Biochem.*, 115, 849-852
- Ville, G.F. and Tyrrell, R. M. (1993) Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of

- human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin. *J. Biol. Chem.*, 268, 14678–14681
17. Cairo, G., Tacchini, L., Pogliaghi, G., Anzon, E., Tomasi, A. and Bernelli-Zazzera, A. (1995) Induction of ferritin synthesis by oxidative stress. Transcriptional and post-transcriptional regulation by expansion of the “free” iron pool. *J. Biol. Chem.*, 270, 700–703
18. Hase M, Araki S, Hayashi H (1997) Fragments of amyloid beta induce apoptosis in vascular endothelial cells. *Endothelium*, 5: 221–229 (1997)