

ホモシステイン誘発動脈硬化に及ぼす
ビタミン B₆ の効果

遠藤 直子

2006

目 次

第1章 序 論	1
第2章 ラットのホモシステイン誘発アテローム性動脈硬化症に対するビタミン B ₆ 欠乏の効果	10
1. 緒 言	
2. 材料および方法	
3. 結 果	
4. 考 察	
5. 小 括	
第3章 ウシ大動脈血管内皮細胞 (NM-1) に対するビタミン B ₆ の効果	23
1. 緒 言	
2. 材料および方法	
3. 結 果	
4. 考 察	
5. 小 括	
第4章 総合考察	42
引用文献	49
謝 辞	65

第1章 序 論

日本人の死因別死亡率は 1 位 悪性新生物 (30.1%)、2 位 心疾患 (16.0%)、3 位 脳血管疾患 (12.3%) であり、全体の死亡率の 3 分の 1 は血管病変を主体とする循環器疾患が占めている [厚生労働省、2005]。社会環境の変化や長寿社会の到来などによってこれらの循環器疾患は今後ますます増加することが予想される。循環器疾患の多くは動脈硬化症を基盤としていると考えられるので、動脈硬化症のメカニズムを解明し、予防法や治療法を開発していくことはきわめて重要である。

動脈硬化性疾患とは血管の狭窄や閉塞、動脈瘤、拡張、解離あるいは破裂することにより組織や臓器全体に血行障害を起こす病気を総称したものである。動脈硬化の発生の仕方や発生する部位により次の 3 種類に分類される。(1) 大動脈や冠動脈など中等大の筋型動脈で起こりやすく、内膜に脂質をコアとするアテローム (粥腫) ができ、次第に肥厚して動脈の内腔を狭めるアテローム性 (粥状) 動脈硬化、(2) 大動脈や下肢の動脈、頸部の動脈に起こりやすく、中膜にカルシウムが沈着して脆くなる中膜硬化、(3) 脳や腎臓の細い動脈に起こりやすく、内膜硝子化や内膜増生などを示す細動脈硬化がある。なかでもアテローム性動脈硬化は致命的な疾病を引き起こす病変形成と深い関係にある。冠動脈ではアテローム性動脈硬化により主として内腔の狭窄ないし閉塞をきたして虚血性心疾患を発症し、脳動脈では高度狭窄、血栓性閉塞などが起こり、臨床的に脳梗塞が発生する。

アテローム性動脈硬化は、まず血中の low-density lipoprotein (LDL) が血管内皮下に侵入し、血管壁において活性酸素あるいは内皮細胞やマクロファージに由来する 15-リポキシゲナーゼ (15-LO) などにより酸化変性を受け酸化

LDL となることが発端となる [Kühn et al., 1997]。血管壁内に侵入したマクロファージは酸化 LDL を貪食して細胞内に蓄積し（泡沫細胞）、内皮下に泡沫細胞の集簇という特徴的な病変を形成する。さらに泡沫化したマクロファージおよび活性化した内皮細胞からのシグナルにより中膜の平滑筋細胞が遊走・増殖し、プラーク（線維性肥厚）の形成を促進する。プラークが脆弱化して破綻すると動脈の血栓、閉塞を生じ心筋梗塞や脳梗塞などの重篤な疾病を引き起こす。アテローム性動脈硬化の危険因子として加齢や喫煙、高血圧などがあるが、これまで主要な原因と考えられてきたのは高コレステロール血症である。30 数万人規模の介入試験 MRFIT の結果から、虚血性心疾患死亡率は血清総コレステロール値と強い正の相関を示し、喫煙や高血圧などの危険因子の重複によって加速的に増加することが示された [Stamler et al., 1986]。すなわち、高コレステロール血症はアテローム性動脈硬化の主要な原因であり、喫煙による酸化ストレス亢進や高血圧がアテローム性動脈硬化発症リスクを高めると考えられた。しかし、Kozaki らは冠動脈疾患患者と健康成人で血清中の脂質量を比較した結果、総コレステロールやトリグリセリドの量は両群間に有意差はなかったが、酸化 LDL の量は冠動脈疾患患者が $20.1 \pm 1.1 \mu\text{g/dl}$ であったのに比較して健康成人が $11.2 \pm 0.3 \mu\text{g/dl}$ で、2 倍近く高い値であることを報告している [Kozaki et al., 1997]。さらに、酸化 LDL に対する特異的なモノクローナル抗体を用いて、ヒトおよび高コレステロール血症モデル動物のアテローム性動脈硬化部位に酸化 LDL が局在して存在すること [Witztum & Steinberg, 1991]、ならびに抗酸化作用をもつ薬剤が高コレステロール血症モデル動物のアテローム性動脈硬化を抑制したこと [Kita et al., 1987] などが明らかにされ、単に血清コレステロール値が高いことは動脈硬化の発症と関連がなく、酸化 LDL が高値であることがより重要であることが示唆されてきた [Steinberg, 1997]。一

方、日本人の心筋梗塞患者を調査すると高コレステロール血症を示す割合は男女とも 3 分の 1 以下であり、高コレステロール血症以外にも動脈硬化の危険因子の存在が考えられてきた。

約 40 年前に McCully は、ホモシステイン代謝酵素欠損あるいはビタミン B₁₂ 代謝異常によりホモシステイン尿症を発現する患者が幼児期より動脈硬化を発症していたことから、高ホモシステイン血症が動脈硬化のリスクを増加させる可能性を指摘している [McCully, 1969]。以来、動脈硬化の新たな危険因子としてホモシステインが注目された。ホモシステインは SH 基をもち、動物性タンパクに多く含まれる必須アミノ酸であるメチオニンの代謝過程で産生される。ホモシステインの代謝は、メチオニンへの再メチル化とシスタチオニンへの硫黄転移の 2 つの経路によりなされる (図 1)。ホモシステインのメチオニンへの再メチル化は、空腹時血漿ホモシステイン濃度を規定する系で、ビタミン B₁₂ が補酵素として働く。肝臓ではベタインがメチル基供与体として利用されてベタイン-ホモシステイン-メチル基転移酵素により再メチル化される。一方、他の組織では 5-メチルテトラヒドロ葉酸をメチル基供与体としてメチオニン合成酵素によりホモシステインが再メチル化されるが、5-メチルテトラヒドロ葉酸の生成には食事性葉酸由来の 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸 (MTHF) と 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素 (MTHFR) が必要である。もう一つの経路であるシスタチオニンへの硫黄転移反応はメチオニン過剰状態あるいはシステイン需要が亢進した場合に起こり、ホモシステインはビタミン B₆ を補酵素とするシスタチオニンβ合成酵素 (CBS) の働きによってシスタチオニンを経てシステインへ変換される。システインはさらに硝酸塩まで代謝された後、尿中に排泄される。

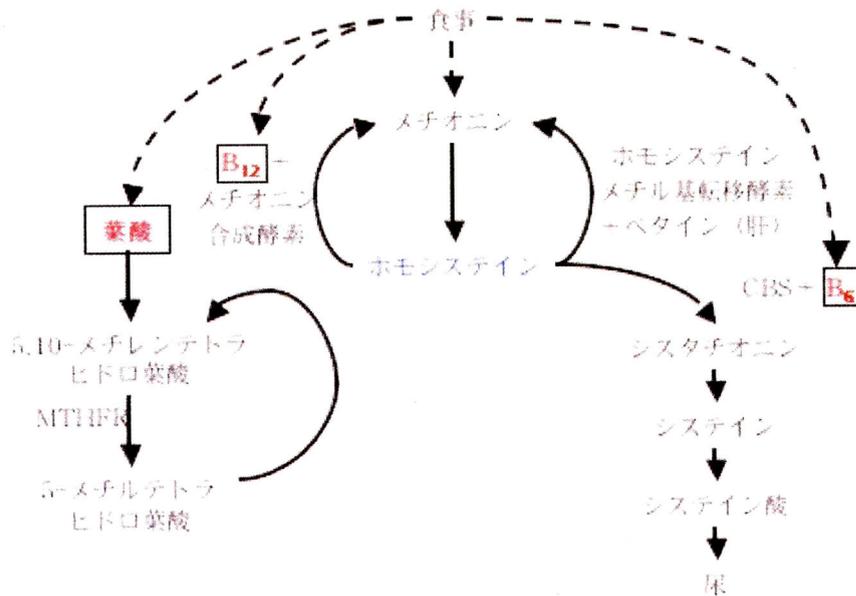


図1 ホモシステインの代謝

CBS: シスタチオニンβシターゼ、MTHFR: 5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素

血漿中のホモシステイン濃度の基準値は男性 8.2~16.92 $\mu\text{mol/l}$ 、女性 6.4~12.22 $\mu\text{mol/l}$ である。血中のホモシステイン濃度を増加させる要因として、遺伝的因子 (*MTHFR* 遺伝子変異 677C→T や *CBS* 遺伝子欠損など)、補酵素として働くビタミン B₆、ビタミン B₁₂ ならびに葉酸の摂取量低下、加齢、性差 (男性)、閉経、喫煙、腎疾患、甲状腺機能低下症、糖尿病などがある。

1966 年から 1999 年に 5073 名の虚血性心疾患患者と 1113 名の脳卒中患者の疫学調査についてメタ分析を行った結果、ホモシステイン高濃度は虚血性心疾患や脳卒中の危険因子であることが報告された [Homocysteine Studies Collaboration, 2002]。また、血漿総ホモシステイン濃度が 5 μM 上昇すると心血管疾患のリスクは 1.6 倍増加し、この現象はコレステロール濃度 5 mM の上昇に相当することが報告されている [Boushey et al., 1995]。ホモシステ

イン濃度を低下させる目的でビタミン B₆、B₁₂ あるいは葉酸を単独または組み合わせて摂取すると心血管疾患リスクが低下するという多くの研究結果が報告されている [Schwammenthal & Tanne, 2004; Schnyder et al., 2002]。また、高ホモシステイン血症は心疾患リスクだけではなく高齢者においてアルツハイマー病や認知症、脳萎縮などの神経変性疾患のリスクを高めることが報告されている。実際に血漿の総ホモシステイン濃度はコントロール群では 12.2 μ mol/l であったのに対してアルツハイマー病患者では 21.9 μ mol/l と有意に高値を示した [McCaddon et al., 1998]。55 歳以上の一般被験者 (5289 人) を対象とした Rotterdam Study のコホート研究において、ビタミン B₆ の食事摂取量の高さがパーキンソン病のリスクの有意な低下と相関していることが報告されている [de Lau et al., 2006]。神経変性疾患リスクについてはこれらのビタミン摂取は効果があるという報告と、効果がないという報告があり、さらなる大規模な調査が必要と思われる。

ホモシステインが動脈硬化を引き起こす過程として 3 つの作用機序が推測されている。第一に酸化ストレスが挙げられる。ホモシステインは反応性の高いチオール基をもち、自己酸化によって活性酸素種 (ROS) を産生する [Haltberg et al., 1995]。産生された ROS は LDL の酸化を促進する [Griffiths et al., 2006]。Ex vivo の実験では、ホモシステインによって細胞内のスーパーオキシドが増大し、血管の弛緩反応が弱まることが報告されている [Lang et al., 2000]。これはスーパーオキシドが NO と反応してペルオキシニトライトとなることで NO の生物活性が低下し、弛緩反応が制限されたのではないかと推測されている [Beckman et al., 1990]。また、血管内皮細胞をホモシステイン処理すると heme oxygenase-1 (HO-1) と glutathione peroxidase (GPx) の活性が低下し、細胞の耐酸化ストレス能が低下することが報告されている [Sawle

et al., 2001, Dayal et al., 2002]。第二にホモシステインが炎症性サイトカインの発現を誘導し、炎症反応を惹起することである。動脈硬化の病変は慢性の炎症反応によって形成される [Ross, 1999]。培養したヒトの血管内皮細胞と単球においてホモシステインは炎症反応の引き金となる前炎症性サイトカインの interleukin 8 (IL-8)、monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) の発現を増加させる [Poddar et al., 2001, Wang et al., 2001]。また、ホモシステインは intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) や vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) など接着分子の発現も増大させる [Postea et al., 2006, Li et al., 2006]。さらに、高ホモシステイン血症の ApoE (-/-) マウスから得た動脈硬化病変部では転写調節因子である NF- κ B の発現が増大していることから、ホモシステインは NF- κ B を活性化し、NF- κ B カスケードの下流に位置する炎症性サイトカインの遺伝子発現を増大させた結果、炎症反応を促進させたのではないかと示唆されている [Zhou et al., 2003]。第三に血栓形成性を上昇させることである。ホモシステインはヒトの血小板に酸化ストレスを誘導する [Signorello et al., 2002]。血小板の酸化還元状態が不安定になると、トロンボキサン B₂ の産生が増加して血小板は活性化状態となり血栓を形成しやすくなる [Signorello et al., 2002]。その他にも、血小板の機能は NO によって調節されているが、ホモシステインの NO 生物活性低下によって血小板凝集の阻害効果が失われることも血栓形成の原因となる [Mutus et al., 2001]。

一方、ビタミン B₆ は動物の成長や発生に必要な水溶性ビタミンであり、構造が密接に関連した三つのピリジン誘導体、すなわちピリドキシン (PN)、ピリドキサール (PL)、ピリドキサミン (PM) とそれぞれに相当するリン酸塩の総称である。主要な活性型はピリドキサールリン酸 (PLP) であり、そのアルデヒ

ド基と α -アミノ酸のアミノ基との間で Schiff 塩基結合をつくることによりアミノ基転移反応、脱炭酸反応などアミノ酸代謝に関わる 100 種類以上の酵素の補酵素として機能している。近年、ビタミン B₆ は補酵素としての機能以外に、リンパ球幼若化反応を亢進させるなどの免疫活性化作用を有すること [Doke et al., 1998]、抗炎症作用を有すること [Denisova & Rabotnikov, 1969]、そして大腸癌や乳癌などの抗癌作用を有すること [Komatsu et al., 2001; Shimada et al., 2005; Shimada et al., 2006] などが報告されているが作用機序については十分な解明に至っていない。これらの新しいビタミン B₆ の作用には補酵素としてだけではなく、PLP が転写調節因子と相互作用して遺伝子発現を抑制することや [Modak et al., 1975; Molina et al., 1997; Oka et al., 1993; Oka et al., 1994; Oka et al., 1995; Oka et al., 2001]、ビタミン B₆ の抗酸化活性が関与していることが示唆されている。特にビタミン B₆ の抗酸化活性については、Ehrenshaft らが PN が活性酸素種の一つである一重項酸素を消去することを見だし、その消去能は抗酸化ビタミンとしてよく知られているビタミン C や E に匹敵することを報告した [Ehrenshaft et al., 1999]。また、細菌や植物におけるビタミン B₆ の生合成系が明らかになるとともに、ビタミン B₆ の生合成に関わる遺伝子の機能の解明が進んでいる。ビタミン B₆ の生合成系には 3 経路あり、一つは 4-ホスホヒドロキシ-L-スレオニンと 1-デオキシキシルロース-5-リン酸 (DXP) が前駆体となる *de novo* 合成系 (DXP 依存性経路) でピリドキシン生合成タンパク質 A (PdxA) と PdxJ が触媒する。なおこの系は *Escherichia coli* などを含む真正細菌で行われる [Drewke et al., 1993; Drewke et al., 1996; Laber et al., 1999] (図 2(A))。二つ目は、細菌、真菌ならびに植物で行われるサルベージ経路で、PL や PM からビタミン B₆ オキシダーゼである PdxH およびビタミン B₆ キナーゼである PdxK によりピリドキサル-5'-リン

酸が合成される [Yang et al., 1996; Mittenhuber,2001] (図 2(B))。三つ目は、細菌、古細菌、真核生物で行われる DXP 非依存性経路である [Mittenhuber, 2001; Tambasco-Studart et al., 2005]。この生合成系は最近、Burns らによって植物においても PDX1 と PDX2 の働きによりグルタミン、リボース-5-リン酸ならびにグリセルアルデヒド-3-リン酸からピリドキサル-5'-リン酸が合成されることが報告された [Burns et al., 2005] (図 2(C))。Chen らはピリドキシン合成に関わる PDX-1 遺伝子をノックアウトした植物を用いて、ビタミン B₆ の合成がない植物では UV 照射による膜の脂質過酸化が顕著に起こり、根の成長が阻害されることを明らかにした。すなわち、植物の根の成長にはビタミン B₆ の抗酸化機能が必須であることを示した [Chen and Xiong, 2005]。

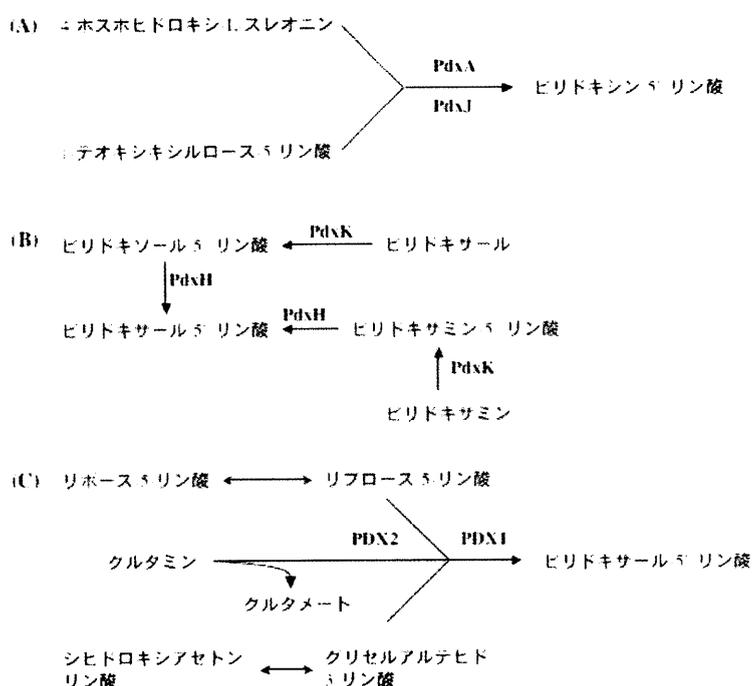


図2 ビタミン B₆ の生合成系 (Wagner et al., 2006 より引用)
 (A) DPX 依存性経路。 (B) サルベージ経路。 (C) DXP 非依存性経路。

本研究では、動脈硬化に関わる因子としてホモシステインとビタミン B₆ の因

果関係を明らかにするため、ラットにホモシステインチオラクトン塩酸塩を投与してアテローム性動脈硬化症を誘発し、病変形成に及ぼすビタミン B₆ の効果を検討した。また、ビタミン B₆ がホモシステインと銅による血管内皮細胞障害に直接どのような影響を及ぼすかを検討する目的で、ホモシステインと銅の処理により低下したウシ血管内皮細胞である NM-1 細胞の生細胞数に及ぼすビタミン B₆ の効果を検討した。

第2章 ラットのホモシステイン誘発アテローム性動脈硬化症に対するビタミン B₆ 欠乏の効果

1. 緒言

アテローム性動脈硬化症は心筋梗塞や脳卒中などの主要な原因である。これまで高コレステロール血症がアテローム性動脈硬化症の重要な危険因子であると考えられてきたが、心筋梗塞を発症した人の大部分は血中コレステロール濃度が正常である。高コレステロール血症以外の危険因子として McCully は高ホモシステイン血症の関連を示唆した [McCully, 1969]。それ以降、高ホモシステイン濃度がアテローム性動脈硬化症の重要な危険因子であることが数多く報告されている [Hankey & Eikelboom, 1999; Hofmann et al., 2001; Adachi et al., 2002]。血漿中のホモシステインが 65~72 歳の人々において心血管疾患の指標になるとの報告もある [Vollset et al., 2001]。ホモシステインは SH 基をもつアミノ酸で、メチオニンの代謝過程で産生される。ホモシステインが血管内皮細胞障害を引き起こすメカニズムとしてホモシステインの自己酸化の過程で産生される活性酸素種による影響 [Haltberg et al., 1995]、サイトカインや接着分子の発現増大による炎症反応の促進 [Poddar et al., 2001; Wang et al., 2001; Postea et al., 2006; Li et al., 2006] および血小板の凝集を引き起こし血栓形成性が上昇する [Signorello et al., 2002] などの報告がある。血中のホモシステイン濃度は遺伝的要素、加齢、喫煙、閉経あるいはビタミン B₆、ビタミン B₁₂、葉酸の摂取などによって調節されている。ビタミン B₁₂ および葉酸はホモシステインの再メチル化に、またビタミン B₆ はホモシステインの硫黄転移反応によるシステイン化に補酵素として働いている。したがって B 群ビタミンが不足すると、高ホモシステイン血症を引き起こしアテローム性動脈

硬化症を発症する危険性が高くなると考えられる [Verhoef et al., 1996, Verhoef et al., 1997; Siri et al., 1998]。興味あることに、ビタミン B₆ の活性型である PLP の低濃度が心血管疾患の独立した危険因子であるとの報告がある [Robinson et al., 1995]。実際に、初期の心血管疾患の予防に葉酸とビタミン B₆ の投与が有効であるとの報告もある [Rimm et al., 1998]。

一方、ビタミン B₆ は補酵素としての機能以外に新たに抗酸化機能をもつことが見出され、いずれの生物種においても重要なはたらきをしていることが示唆される [Ehrenshaft et al., 1999; Chen & Xiong, 2005]。さらに、B 群ビタミンは脳梗塞においてホモシステイン濃度低下作用とは別に抗酸化作用と抗炎症作用を発揮することが報告されている [Ullegaddi et al., 2004]。これらの報告を考え合わせると、循環血中のビタミン B₆ がホモシステイン単独の影響とは別に抗酸化作用を介してホモシステイン誘発アテローム性動脈硬化症の発生を抑制している可能性がある。本研究では、ラットにホモシステインチオラクトン塩酸塩を投与した群とビタミン B₆ 欠乏ラットにホモシステインチオラクトン塩酸塩を投与した群との間で血管内膜の組織学的検討を行い、動脈硬化発症に及ぼす効果を検討した。また、血清中のホモシステイン濃度および脂質過酸化物質濃度の測定を行うことでビタミン B₆ 欠乏がこれらのパラメーターに及ぼす効果を検討し、動脈硬化発症との関連性を検討した。

2. 材料および方法

2-1 実験動物

3 週齢のオス Wistar ラット (Kyudo, Kumamoto, Japan) を用いた (平均体重 45 g)。2 群に分け、一方の群には蒸留水を飲水として与え (コントロール群 n=5)、他群 (n=5) には蒸留水にホモシステインチオラクトン塩酸塩

(Sigma, St.Louis, MO, USA)を 50 mg/kgBW/day となるように加えたものを 42 日間投与した (図 1 (A))。食餌は両群ともに市販食 (CE-2; CLEA Inc., Tokyo, Japan) を与えた。詳細な飼料組成は表 1 に示した。次に低ビタミン B₆ 濃度がアテローム性動脈硬化症に与える影響を検討する目的で、3 週齢のオス Wistar ラット (平均体重 45 g) を用いて実験を行った (図 1 (B))。一方の群 (n=10) には市販食を 28 日間与え、他群 (n=10) にはビタミン B₆ 欠乏食 (Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) を与えてビタミン B₆ 欠乏ラット (B₆ 欠乏ラット) を作製した。飼育開始 15 日目に各群をさらに 2 つに分け、一方には蒸留水を与え、他方には蒸留水にホモシステインチオラクトン塩酸塩を加えたものを 14 日間投与した。室温を 23°C に調節し、明時間 12 時間、暗時間 12 時間とした室内で金網ケージの中で飼育した。摂食量、飲水量および体重は一日おきに計測した。なお、その他の取り扱いに関しては鹿児島大学動物実験指針に従った。

表 1 食餌組成

	B ₆ free	Control
Vitamin free casein	70.0	70.0
Sucrose	10.0	10.0
α-Corn starch	6.8	6.8
Soybean oil	8.0	8.0
Choline -Cl	0.2	0.2
Mineral mixture	4.0	4.0
Vitamin mixture	—	1.0
B ₆ free vitamin mixture	1.0	—
Total (%. W/W)	100.0	100.0

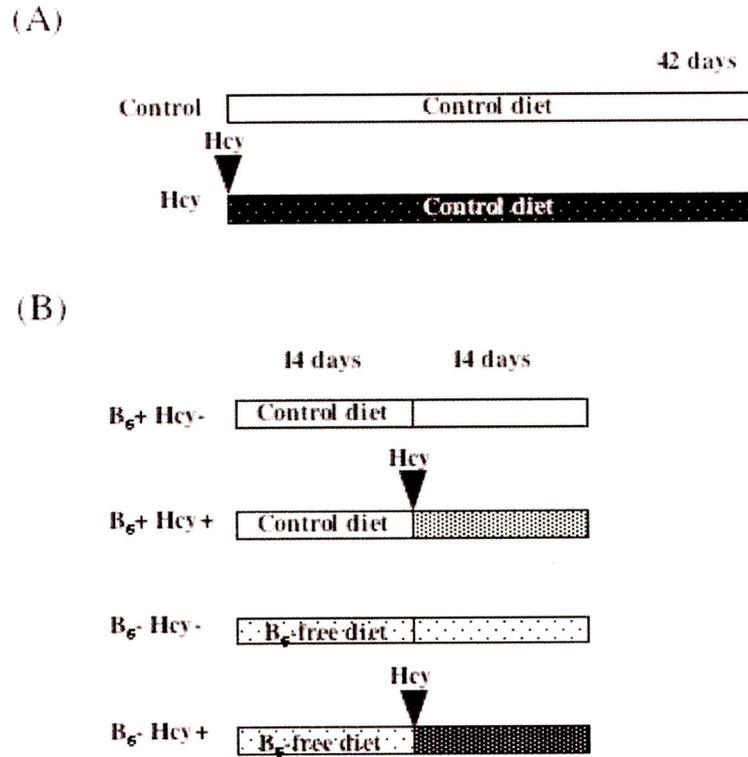


図1 実験プロトコール (A)コントロール (Control) 群には市販の餌と蒸留水を与えた。ホモシステイン (Hcy) 群には市販の餌を与え、飲水として蒸留水にホモシステインチオラクトン塩酸塩 (50 mg/kg body weight/day) を加えたものを42日間与えた。(B) B₆+群には市販の餌を与え、B₆-群にはビタミン B₆ 欠乏食を28日間与えた。さらに、実験開始から15日目に Hcy-群には飲水として蒸留水を与え、Hcy+群には蒸留水にホモシステインチオラクトン塩酸塩 (50 mg/kg body weight/day) を加えたものを14日間与えた。

ホモシステイン投与の効果を検討する目的で図1 (A)のラットは経時的に実験開始1日目、21日目、42日目にジエチルエーテル麻酔下で放血殺により安楽死させた。図1 (B)のラットは実験開始28日目に同様に安楽死させた。採血は後大静脈から行い、肝臓、胸大動脈は直ちに切除した。

2-2 生化学的検索

血液は採血後直ちにセパラピッドチューブ (Sekisui Chemical Co., Ltd.,

Tokyo, Japan) に移し、30 分間静置した後 3000 rpm、10 分間遠心し、血清を得た。血清のグルコースおよび総コレステロールは SPOTCHEM™ (Arkray Inc., Kyoto, Japan) を用いて測定し、血清 triacylglycerol (TG) 濃度はトリアシルグリセロール G-テストワコー (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を用いて測定した。肝臓のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 活性とアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 活性の測定は Okada&Ochi (1971) の方法で行った。総タンパクは BCA protein assay reagent (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA) を用いて測定した。血清ホモシステイン濃度は Homocysteine microplate substrate trapping enzyme assay kit (Diazyme Laboratories, San Diego, CA, USA) を用いて測定した。血清中脂質過酸化物質濃度の測定はチオバルビツール酸 (TBA) 法によって行った。1 ml の TBA 試薬の入ったチューブに 20 μ l の血清と 10 μ l の 5%ブチルヒドロキシトルエン/エタノール溶液を加え、ボルテックスした後、100 °C、45 分間加温した。650 \times g で 10 分間遠心し、その上清をフィルター (Millex-HV, 0.45 mm; Nihon Millipore Ltd., Tokyo, Japan) でろ過した。TBA 反応性物質 (TBARS) 濃度は C18 カラム装着 HPLC LC-10AD (Chromatopac, Shimadzu, Kyoto, Japan) で測定した。励起波長 515 nm、蛍光波長 553 nm を用いた。

2-3 組織学的検索

2-3-1 ヘマトキシリン・エオジン染色

ラットから採材した胸大動脈は直ちに 10% 中性緩衝ホルマリン液 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) で 24 時間 (室温) 固定した後、パラフィン包埋した。組織標本を 5 μ m の厚さで薄切し、脱パラフィン、

脱水をした後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

2-3-2 免疫組織化学染色

ラット胸大動脈切片における内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) を検出するために Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) を用いてアビジン・ビオチン免疫複合体による免疫酵素アッセイを行った。脱パラフィンした切片を 500 ml の 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) に入れ、500 W、15 分間マイクロウェーブで加温した。20 分間室温で冷却した後、脱イオン水で 5 分間洗浄した。続いて内因性のペルオキシダーゼ活性を抑制するために 0.3%過酸化水素/メタノール溶液で 30 分間インキュベートした。PBS (pH7.4)で洗浄後、1.5 % ヤギ血清で 1 時間 (室温) インキュベートした。その後、ウサギ抗ラット eNOS 抗体 (2 μ g/ml; Affinity BioReagents Inc., Golden, CO, USA) と一晩 (4°C) インキュベートした。PBS で洗浄した後、ビオチン化ヤギ抗ウサギ血清 (Dako Japan Co., Ltd., Kyoto, Japan) と 30 分間室温でインキュベートした。さらに、ABC 複合体と 30 分間インキュベートし、0.05% 過酸化水素を含む 3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド (DAB) を用いて発色させた。切片は最後に洗浄、対比染色、脱水し、キシレンで処理した後封入した。

2-4 統計学的解析

結果は平均値 \pm 標準偏差で示した。血清中のホモシステイン濃度と TBARS 濃度の統計的な差は Kruskal-Wallis 検定によって行い、 $p < 0.05$ を統計的に有意であると判断した。

3. 結果

3-1 ラット血管に与えるホモシステインの効果

ホモシステインチオラクトン塩酸塩を飲水に加えて投与したラットはコントロール群と同様の成長曲線を示した。また、血清中のグルコース、TG、総コレステロール濃度も両群間で差はみられなかった（表2）。

表2 血液生化学検査の結果

	Day 1	Day 21		Day 42	
		Control	Hcy	Control	Hcy
Glucose (mg/l)	660±52	750±102	706±85	658±112	724±132
TG (mg/l)	1480 ±102	1460 ±187	1580 ±163	1500 ±152	1600 ±175
Cholesterol (mg/l)	386±92	426±116	356±84	456±98	400±124

一方、胸大動脈のヘマトキシリン・エオジン染色を行った結果、コントロール群とホモシステイン投与 21 日目のラットの胸大動脈では変化はなかったが、ホモシステインを投与して 42 日目のラットの血管において内皮下腔に脂質の沈着と思われる泡沫化が観察された (図 2 ; 上段)。さらに胸大動脈血管内皮細胞における eNOS の発現を検討したところ、コントロール群とホモシステイン投与 21 日目のラットで変化はなかったものの、ホモシステインを投与して 42 日目のラットで eNOS の発現が増大していた (図 2 ; 下段)。

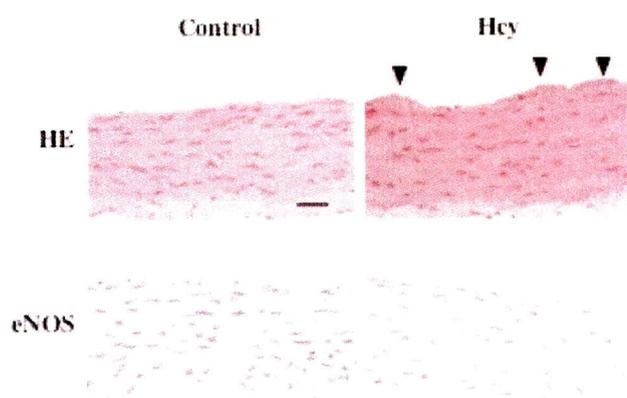


図 2 実験開始 42 日目の胸大動脈の組織学的検索の結果。上段 ; HE 染色。矢頭は内皮下腔の泡沫化した部位を示している。下段 ; eNOS の免疫組織化学染色。コントロール (Control) 群には飲水として蒸留水を与え、ホモシステイン (Hcy) 群にはホモシステインチオラクトン塩酸塩を加えて 42 日間投与した。(バーは 50 μ m)

3-2 ラット血管および血清中各成分濃度に与えるビタミン B₆ の効果

ビタミン B₆ が血管に与える効果を検討する目的で、3 週齢のラットに 14 日間ビタミン B₆ 欠乏食を与え B₆ 欠乏ラットを作製した。その後ホモシステインチオラクトン塩酸塩を飲水に加えて 14 日間投与し、ホモシステインのみが血管に与える効果と比較した。ビタミン B₆ 欠乏食を与えて 14 日目頃から B₆ 欠乏ラットの体重増加の遅延が観察されたが、これは B₆ 欠乏ラットにみられる特徴的

な所見である [Coburn et al., 1981]。さらに B₆ 欠乏ラットではビタミン B₆ を補酵素とする肝臓中の AST、ALT 濃度がビタミン B₆ を与えたラットに比べて顕著に低下していた (AST; B₆ 供給群 13.8±1.2, B₆ 欠乏群 8.7±0.7, ALT; B₆ 供給群 4.1±1.1, B₆ 欠乏群 1.4±0.6)。一方、血清中のグルコース、TG および総コレステロール濃度は 4 群間で有意差はみられなかった (表 3)。

表 3 血液生化学検査の結果

	B ₆ 供給群		B ₆ 欠乏群	
	Hcy-	Hcy+	Hcy-	Hcy+
Glucose (mg/l)	860±62	780±164	796±95	924±112
TG (mg/l)	1524 ±186	1652 ±194	1730 ±203	1695 ±159
Cholesterol (mg/l)	428±64	404±102	398±76	389±111

胸大動脈のヘマトキシリン・エオジン染色を行った結果、コントロール群、ホモシステイン投与群、B₆ 欠乏でホモシステインを投与しなかった群では変化がみられなかったものの、B₆ 欠乏でホモシステインを投与したラットの血管では内皮下腔の泡沫化が観察された (図 3 (A))。eNOS の免疫組織化学染色の結果も同様に B₆ 欠乏でホモシステインを投与したラットの血管内皮細胞で発現が増大していた (図 3 (B))。

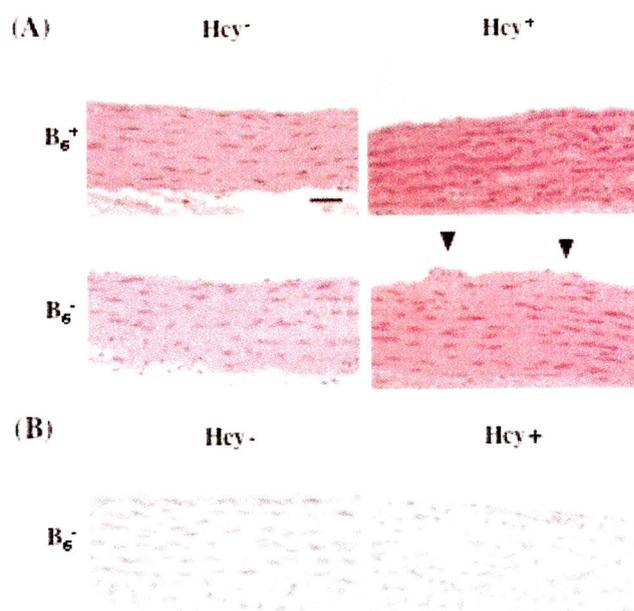


図 3 胸大動脈の組織学的検索の結果。(A) HE 染色。矢頭は内皮下腔の泡沫化した部位を示している。(B) eNOS の免疫組織化学染色。B₆ 供給 (B₆⁺) 群には市販の餌を与え、B₆ 欠乏 (B₆⁻) 群には B₆ 欠乏食を与えた。15 日目に各群をさらに二つに分けて、Hcy- 群には飲水として蒸留水を与え、Hcy+ 群にはホモシステインチオラクトン塩酸塩を加えて 14 日間投与した。(バーは 50 μm)

さらに血清中のホモシステイン濃度を測定したところ、ホモシステイン投与により血清ホモシステイン濃度が有意に増大したのに対し、ビタミン B₆ 欠乏によるホモシステイン濃度の変化は認められなかった (図 4)。一方、血清中の脂質過酸化物質濃度は B₆ 欠乏でホモシステインを投与したラットにおいて顕著に増

大していた (図 5)。これらの結果からアテローム性動脈硬化症の初期にみられる内皮細胞障害はビタミン B₆ 欠乏による脂質過酸化物濃度の増大が関与していることが推測された。

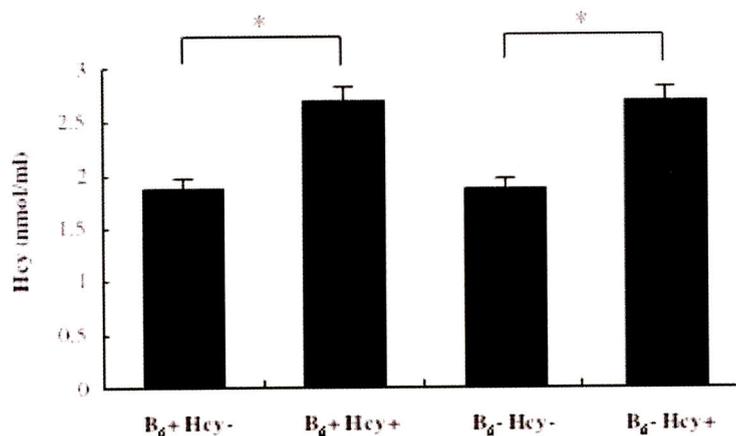


図 4 血清中ホモシステイン濃度

ホモシステイン投与 14 日後に屠殺し、採血後、血清を分離した。B₆+群、B₆-群を比較したところ、ホモシステイン投与により Hcy+ラットの血清で有意にホモシステイン濃度の増大がみられた (p<0.05; Kruskal-Wallis 検定)。一方、B₆+群、B₆-群間を比較してもビタミン B₆ 欠乏によるホモシステイン濃度の有意な増大はみられなかった。

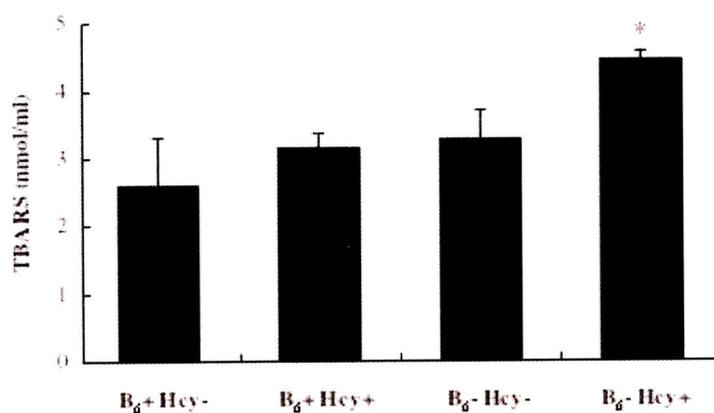


図 5 血清中脂質過酸化物 (TBARS) 濃度

ホモシステイン投与 14 日後に屠殺し、採血後、血清を分離した。B₆ 欠乏で Hcy を投与したラットにおいて TBARS 濃度の有意な増大が観察された (p<0.05; Kruskal-Wallis 検定)。

4. 考察

ホモシステインはアテローム性動脈硬化症の重要な危険因子であることが報告されている [McCully, 1969; Hankey & Eikelboom, 1999; Hofmann et al., 2001; Adachi et al., 2002]。ホモシステインが引き起こす細胞障害性はチオール基の自己酸化により活性酸素種 (ROS) が産生されること [Haltberg et al., 1995]、あるいは血栓形成性が上昇すること [Signorello et al., 2002] などがある。また、単球のセルラインである Mono Mac 6 細胞を高ホモシステイン濃度の培地で培養すると interleukin 6 (IL-6) の産生が増大し、さらに LPS の刺激に対して高い感受性を示したことから、急性炎症反応を促進することが示唆されている [van Aken et al., 2000]。しかしながら、ホモシステインがアテローム性動脈硬化症を引き起こす詳細な機序は未だ不明である。

一方、血中のホモシステイン濃度は B 群ビタミンにより調節されているため、これらのビタミンが不足すると高ホモシステイン血症を引き起こす可能性がある [Verhoef et al., 1996; Verhoef et al., 1997; Siri et al., 1998]。それに加え、ビタミン B₆ は新しい機能として抗酸化活性をもつことが報告されており [Ehrenshaft et al., 1999; Chen & Xiong, 2005]、ホモシステイン誘発アテローム性動脈硬化症の予防にホモシステイン代謝の補酵素としての機能だけでなく、ビタミン B₆ の抗酸化機能が有効である可能性が推測される。

本研究では、ホモシステイン投与したラットにおけるビタミン B₆ の効果を検討した。その結果、ホモシステインのみを投与したラットでは投与開始から 42 日目に血管内膜の形態に変化が見られた。一方、ビタミン B₆ 欠乏ラットにホモシステインを投与するとわずか 14 日間で同様の変化が観察された。血清中のホモシステイン濃度にビタミン B₆ 欠乏の影響はみられなかったが、血清中脂質過酸化物質濃度は B₆ 欠乏ラットで増大していた。ビタミン B₆ を欠乏させてホモシ

ステインを投与したにも関わらず血清ホモシステイン濃度の有意な増大が見られなかったのはビタミン B₆ 欠乏にした期間が合計 28 日間と短期間であったためと考えられる。このことに関して Zhou らは 18 週間ビタミン B₆ 欠乏食を与えてもコントロールの動物と血漿中のホモシステイン濃度に有意差はなかったことを報告している [Zhou et al., 2003]。本研究では eNOS の発現増大が観察された。Barua らは *in vitro* で ROS が eNOS の発現を増大させることを報告している [Barua et al., 2003] ことから、ビタミン B₆ 欠乏ラットでは生体の過酸化が亢進した結果、eNOS の発現誘導が起こったと思われる。

リアルタイム PCR 等を用いた mRNA 発現量ならびにウェスタンブロッティング等によるタンパク質の発現を検討する必要があるが、血中ホモシステイン濃度に変化が認められないことから、サイトカイン分泌亢進や ICAM-1 などの接着因子発現誘導が起こっていない可能性がある。今回観察されたホモシステイン投与による血管内膜形態の変化は、低ビタミン B₆ 濃度による抗酸化能の低下により起こる酸化ストレス亢進が関与していることが示唆される。

5. 小括

本研究において、ラットにホモシステインチオラクトン塩酸塩を投与してアテローム性動脈硬化症を誘発し、病変形成に及ぼすビタミン B₆ の効果を検討した。その結果、B₆ 欠乏ラットにおいてホモシステイン誘発アテローム性動脈硬化症の初期病変形成を促進させることが示唆された。また、B₆ 欠乏ラットにおいて血清中ホモシステイン濃度の有意な増大が認められなかったのに対し、脂質過氧化物濃度が増大していたことから、低ビタミン B₆ 濃度による抗酸化活性の低下が示唆され、このことがホモシステイン誘発アテローム性動脈硬化症の初期にみられる内皮細胞障害に関与している可能性を示している。

第3章 ウシ大動脈血管内皮細胞 (NM-1) に対するビタミン B₆ の効果

1. 緒言

近年、ホモシステインがアテローム性動脈硬化症の危険因子として注目されているが、疫学調査において、ホモシステインの動脈硬化病変形成性には血漿中の増加した銅濃度が関連している可能性があるとの報告がある [Mansoor et al., 2000; Dudman et al., 1983]。また *in vitro* において Starkebaum らは銅がホモシステインの酸化を促進し過酸化水素が発生することによりウシの血管内皮細胞が障害されることを報告した [Starkebaum et al., 1986]。その他、ヒトの培養血管内皮細胞においてホモシステインと銅は酸化ストレスを引き起こし細胞増殖と細胞内グルタチオン濃度を低下させると報告されている [Hultburg et al., 1997]。

一方、ホモシステインの代謝はビタミン B₆、B₁₂ および葉酸を含む B 群ビタミンが補酵素として働いているため、これらのビタミンが不足すると高ホモシステイン血症を引き起こし、アテローム性動脈硬化症の危険性を高めると考えられる。しかしながら、ビタミン B₆ はホモシステイン代謝の補酵素として働くだけでなく、自身がもつ抗酸化機能も重要な役割を果たしていると考えられる [Chumnantana et al., 2005; Chen and Xiong, 2005]。第 2 章のビタミン B₆ 欠乏ラットを用いた研究において、低ビタミン B₆ 濃度はホモシステイン誘発アテローム性動脈硬化症の初期病変形成性を促進させることを示した。ビタミン B₆ 欠乏にしても血清中のホモシステイン濃度に影響はなく、脂質過酸化物質濃度が増大していたことから、低ビタミン B₆ 濃度により抗酸化能が低下し、病変形成を促進させたと考えられた。しかし、これらの研究はあくまでも *in vivo* で行わ

れたものであり、ビタミン B₆ が直接細胞に影響を及ぼしたのか、あるいは生体内で間接的代謝を介して細胞に影響を及ぼしたのかは明らかでない。本研究ではウシの大動脈血管内皮細胞である NM-1 細胞に及ぼすホモシステインと銅の影響を検討し、さらにホモシステインと銅の影響にビタミン B₆ がどのような効果を及ぼすか検討した。

2. 材料および方法

2-1 細胞培養

NM-1 細胞は Health Science Research Resources Bank から供与された。37°C、5% CO₂ の環境で維持し、10% 牛胎児血清とペニシリン・ストレプトマイシン (2000U/L, Invitrogen K. K., Tokyo, Japan) を含む Eagle's MEM 培養液 (Invitrogen K. K., Tokyo, Japan) 中で培養した。継代数 7-10 の細胞を実験に用いた。

2-2 細胞増殖アッセイ

生細胞数の測定は WST-1 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を用いて行った。NM-1 細胞は 96 穴プレートに 1×10^4 cells/well の密度で播種し、24 時間培養した。その後、培養液を回収して 250 μ M のホモシステインと 2 μ M の銅存在下で 200 μ M あるいは 500 μ M の PL、PN、PM、2500U/ml のカタラーゼおよび 5 mM の EDTA を含む培養液 100 μ l と交換し、6 時間インキュベートした。培養液を交換して 2 時間後に WST-1 を 10 μ l ずつ添加した。インキュベート終了後にマイクロプレートリーダー (Immuno Mini NJ-2300, Cosmo Bio Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いて 450 nm (対照 620 nm) の吸光度を測定した。結果は培養液でインキュベート

した時の吸光度に対する割合で示した。アポトーシスの経路を検討する実験では、1 μ M のスタウロスポリンあるいは250 μ M のホモシステインと2 μ M の銅を含む培養液と交換すると同時に広域カスパーゼ阻害剤である Z-VAD-fmk (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) を終濃度50 μ M になるよう添加して6時間インキュベートした。

2-3 DNA ラダーの観察

DNA ラダーの観察は apoptotic DNA ladder kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) を用いて行った。NM-1 細胞を250 μ M のホモシステインと2 μ M の銅と6時間インキュベートした後、ディッシュに接着している細胞と浮遊している細胞を別に回収してDNAの抽出を行った。アポトーシスの陽性コントロールとして1 μ M のスタウロスポリンで6時間処理した。別の実験では250 μ M のホモシステインと2 μ M の銅存在下で500 μ M の PL、PN、PM あるいは50 μ M の Z-VAD-fmk と6時間インキュベートした後、浮遊細胞を回収してDNAの抽出を行った。DNAの抽出はキットの説明書の記述に従い、RNase を1 μ g/ml となるように加えた後37°C、30分間インキュベートした。精製したDNA(全量)はエチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲルで100V、40分間電気泳動を行い、紫外線で可視化した。

2-4 TUNEL アッセイ

ホモシステインと銅によって誘導される NM-1 細胞の細胞死がアポトーシスであることを検討する目的で TUNEL 法により断片化 DNA を標識ヌクレオチドで標識し、蛍光色素を用いて検出した。Apop Tag 蛍光 *in situ* アポトーシス

検出キット (Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA) を使って行った。NM-1 細胞にホモシステインおよび銅をそれぞれ 250 μ M および 2 μ M となるように添加し、6 時間インキュベートした後浮遊した細胞を回収して PBS で 3 回洗浄した。洗浄後、細胞 (5×10^6 cells/ml) を 1%パラホルムアルデヒド (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) で 10 分間(室温) 固定し、100 μ l の細胞懸濁液をシランコートのスライドグラスに滴下した。風乾後、PBS でスライドを洗浄し、プロテナーゼ K (20 μ g/ml) を加え 15 分間室温で反応させた。イオン交換水で洗浄し、terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) とジゴキシゲニン- dNTP を加え 37°Cで 60 分間インキュベートした。PBS で洗浄した後、抗ジゴキシゲニン-FITC と室温で 30 分間インキュベートした。PBS で洗浄した後、10 mg/ml RNase (Takara Biochemicals, Tokyo, Japan) と 20 分間、37°Cでインキュベートし、細胞内の RNA を除いた。続いて、プロピディウムイオダイド (PI) で核を染色し、ただちにレーザー共焦点顕微鏡 (Fluoview FV500, Olympus, Tokyo, Japan) で観察した。

2-5 ミトコンドリア膜電位の検出

ミトコンドリア膜電位は Mit-E- Ψ TM mitochondrial permeability detection kit (BIOMOL International LP, Plymouth Meeting, PA, USA) を用いて測定した。蛍光色素である JC-1 は陽性に荷電しており、ミトコンドリア膜電位にしたがい凝集して赤色の蛍光を発する (蛍光波長 590 nm)。一方、ミトコンドリア膜電位が失われると JC-1 は単量体として細胞全体に拡散して緑色の蛍光を発する (蛍光波長 527 nm、励起波長 490 nm)。NM-1 細胞をチャンバースライドに 4×10^4 cells/well の密度で播種し、24 時間培養した。その後、培養

液を回収して 250 μ M のホモシステインと 2 μ M の銅を含む培養液と含まない培養液（陰性コントロール）および 1 μ M のスタウロスポリンを含む培養液（陽性コントロール）と交換し、3 時間インキュベートした。インキュベート終了後に 5 μ M の JC-1 を含む培養液と交換し、37°C、15 分間インキュベートした。最後に培養液で洗浄した後、500 μ l の培養液を加えて、レーザー共焦点顕微鏡で観察した。結果は陰性コントロールの赤／緑の蛍光比に対する割合で示した。

2-6 シトクローム *c* 放出アッセイ

NM-1 細胞は 250 μ M のホモシステインと 2 μ M の銅を含む培養液と含まない培養液で 3 時間インキュベートした。また、カスパーゼ経路を介するアポトーシスの陽性コントロールとして 1 μ M のスタウロスポリンで 3 時間処理した。インキュベート後、培養液を集めて浮遊した細胞を回収した。さらに、セルスクレイパーを使って接着している細胞を回収した。細胞ペレットに 5 倍量のバッファーA (20 mM Hepes-KOH, pH7.5, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 250 mM sucrose, 1 mM DTT, 1 μ g/ml aprotinin, 100 μ g/ml PMSF) を加えてホモジナイズした。核画分を取り除くため 600 x g、10 分間遠心した後、上清をさらに 100,000 x g、60 分間遠心した。この上清を細胞質画分とした。ペレットにバッファーA を 100 μ l 加え 10,000 x g、10 分間遠心した後、上清を取り除き、ペレットにバッファーA を 50 μ l 加えたものをミトコンドリア画分とした。タンパク質は 15% の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分画し、ウェスタンブロッティングを行った。ニトロセルロース膜に転写した後、ブロックエース (Dainippon Sumitomo Pharma, Osaka, Japan) でブロッキングを行い (室温、15 分間)、

シトクローム c の一次抗体 (200 倍希釈 ; Santa Cruz, CA, USA) と一晩インキュベートした。膜を T-TBS で洗浄後、二次抗体と室温で 1 時間インキュベートした。バンドの検出は ECL キット (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) で発色させた後 Lumino Image Analyzer (LAS-1000 mini, Fuji Film, Tokyo, Japan) で行った。

2-7 細胞外過酸化水素濃度の測定

細胞外の過酸化水素濃度は BIOXYTECH H₂O₂-560 Assay (OXIS International, Inc., Portland, OR, USA) を用いて測定した。この測定法は、過酸化水素の存在下で Fe²⁺を添加すると、Fe³⁺に酸化されることを利用したものである。Fe³⁺はキシレノールオレンジと結合し、560 nm の波長で測定される。NM-1 細胞を 96 穴マイクロプレートに 1 × 10⁴ cells/well の密度で播種し、24 時間後に 250 μM のホモシステインと 2 μM の銅存在下で PL (200 μM および 500 μM) あるいはカタラーゼ (2500U/ml) を含む培養液 100 μl と交換した。10 分後、交換した培養液のうち 10 μl を取り、Fe²⁺とキシレノールオレンジを含む試薬 100 μl に加え、30 分間、37°C でインキュベートした。インキュベート後、マイクロプレートリーダー (波長 560 nm) で吸光度を測定し、検量線から濃度を求めた。データはホモシステインと銅を含まない培養液中の過酸化水素濃度に対する割合で示した。

2-8 細胞内活性酸素種 (ROS) レベルの測定

細胞内の ROS レベルは 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA, Sigma, St. Lois, MO, USA) による蛍光染色を行い検討した。H₂DCF-DA は細胞内に入り、過酸化水素などの ROS によって酸化されると DCF となり蛍光を

発する。NM-1 細胞をチャンバースライドに 4×10^4 cells/well の密度で播種し、24 時間後に 250 μ M のホモシステインと 2 μ M の銅存在下で PL (200 μ M および 500 μ M) あるいはカタラーゼ (2500U/ml) を含む培養液と交換し、1 時間インキュベートした。1 時間後、バッファー B (10 mM HEPES-KOH, pH7.5, 135 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM glucose, 37°C) で洗浄し、続いて 10 μ M の H₂DCF-DA を含むバッファー A と交換して 30 分間、37°C、遮光下でインキュベートした。その後、直ちに共焦点レーザー顕微鏡 (励起波長 485 nm、蛍光波長 530 nm) で観察した。データはコントロールの DCF 蛍光強度に対する割合で示した。

2-9 細胞外脂質過酸化物質 (TBARS) 濃度の測定

NM-1 細胞を 250 μ M のホモシステインと 2 μ M の銅存在下で PL (0, 200, 500 μ M) と 24 時間インキュベートした。24 時間後、細胞を回収し細胞内脂質過酸化物質濃度を TBARS Assay Kit (OXItek, Buffalo, NY, USA) を用いて測定した。細胞 (5×10^6) を PBS 250 μ l に懸濁し、40 V、5 秒間隔で 15 分間超音波処理した。遠心 (1,000 \times g、10 分間) 後、上清 100 μ l を 2.6 ml の thiobarbituric acid (TBA) 試薬に加え、60 分、100°C で加熱後遠心 (1,000 \times g、15 分間) した。そして得られた上清の吸光度を 532 nm で測定した。TBARS 濃度 (nmol/ml) はマロンジアルデヒドで作製した検量線から求めた。

2-10 統計学的解析

結果は平均値 \pm 標準偏差で示した。2 群間の統計的な差はスチューデントの t 検定 (両側検定) によって確認した。p<0.05 を統計的に有意であると判断した。3 群以上の比較は ANOVA 解析を行った後、チューキー・クレーマーの多重比

較検定で解析した。p<0.05 を統計的に有意であると判断した。

3. 結果

3-1 ホモシステインと銅が NM-1 細胞に及ぼす効果

NM-1 細胞を培養している培地に銅を 0~4 μM あるいはホモシステインを 0~500 μM 単独で加えても、生細胞数は低下しなかった。しかしながら、ホモシステイン 250 μM 存在下では銅の濃度依存的に生細胞数は低下した (図 1)。

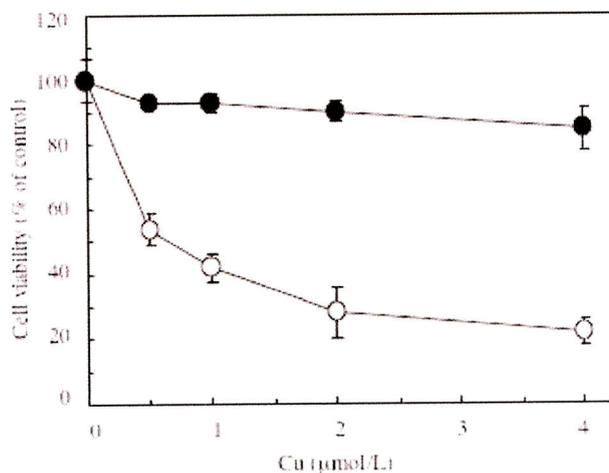


図 1 NM-1 細胞の生細胞数に及ぼすホモシステインと銅の効果

NM-1 細胞を 96 穴プレートに播種して 24 時間後に培地に銅のみ (●) を加えて 6 時間インキュベートしてもほとんど生細胞数は変化しないが、ホモシステイン 250 μM 存在下 (○) では銅の濃度依存的に生細胞数の割合が低下した。

3-2 ホモシステインと銅が誘導する細胞死

ホモシステインと銅が誘導する細胞死がアポトーシスであるか検討する目的で DNA ラダーの観察を行った。NM-1 細胞をホモシステインと銅で処理した後、ディッシュに接着している細胞と浮遊している細胞を分けて回収し、それぞれの細胞から DNA を抽出した。また、アポトーシスの陽性コントロールとして NM-1 細胞をスタウロスポリンで処理した細胞を用いた。その結果、接着して

いる細胞は DNA ラダーが見られなかったが、浮遊した細胞から抽出した DNA は陽性コントロールと同じようなラダーを示した (図 2(A))。次に、TUNEL 法により *in situ* でのアポトーシス細胞の検出を行った。ホモシステインと銅を含まない培養液で培養した細胞では TUNEL 陽性細胞が観察されず、PI による核染色でも滑らかで丸い核が観察された。一方、ホモシステインと銅で処理して浮遊した細胞では TUNEL 陽性細胞が多く観察され、PI 染色では特に TUNEL 陽性細胞において核が凝集している様子が観察された (図 2(B))。このことからホモシステインと銅によってアポトーシスが誘導されたことが示唆される。

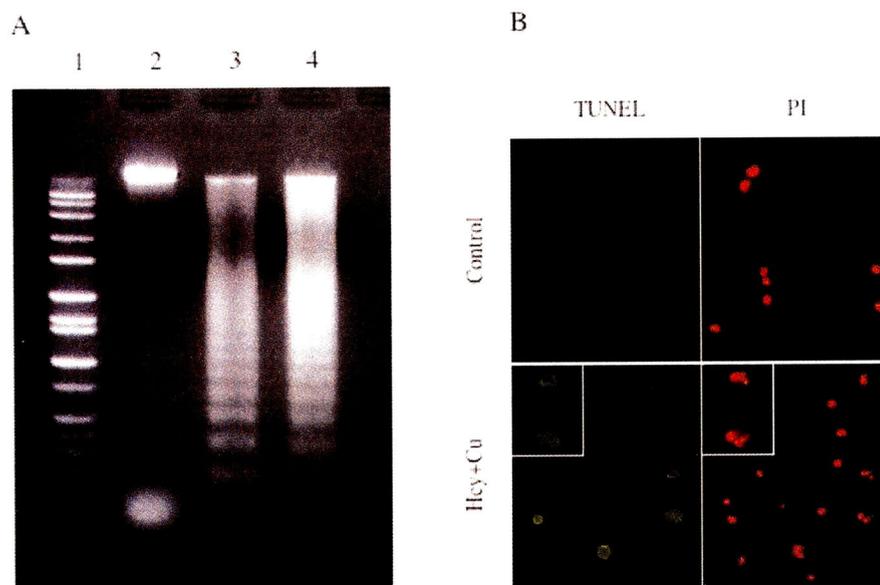


図 2 ホモシステインと銅が誘導する細胞死

(A) DNA ラダーの観察。1, マーカー; 2, ホモシステインと銅処理後ディッシュに接着している細胞; 3, ホモシステインと銅処理後浮遊している細胞; 4, スタウロスポリン処理した細胞。(B) *in situ* TUNEL 法によるアポトーシス細胞の検出。左の写真で緑色は TUNEL 陽性細胞であり、右の写真で赤色は PI により染色された核である。

3-3 ホモシステインと銅により誘導される細胞死の経路

ホモシステインと銅により誘導されるアポトーシスがカスパーゼ経路を介するか検討する目的で、広域カスパーゼ阻害剤である Z-VAD-fmk の添加が生細

胞数に及ぼす効果を検討した。アポトーシスの陽性コントロールとしてスタウロスポリンで処理すると生細胞数は約 20%まで低下したが、Z-VAD-fmk をともに加えると生細胞数は約 85%まで回復し、DNA ラダーも減少した。一方、ホモシステインと銅により約 30%まで低下した生細胞数は、Z-VAD-fmk を加えても回復しなかった (図 3)。さらに DNA ラダーも変化がみられなかった (図 7)。

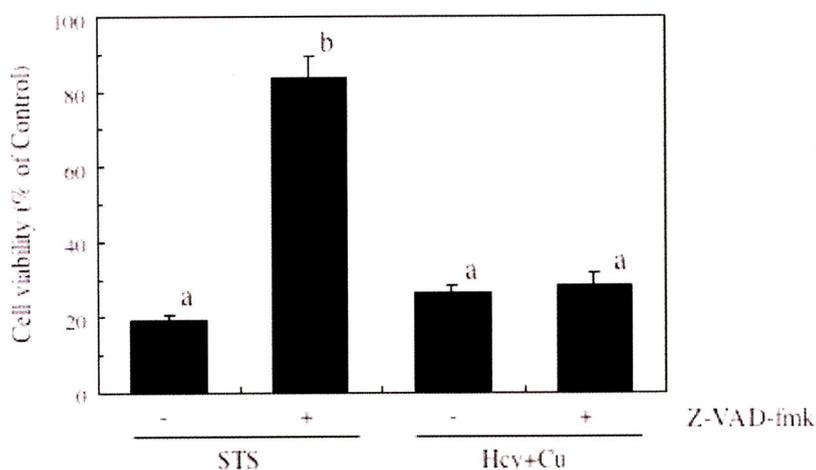


図 3 カスパーゼ阻害剤 (Z-VAD-fmk) の効果

NM-1 細胞を 96 穴プレートに播種して 24 時間後に培地に Z-VAD-fmk 存在または非存在下で、スタウロスポリン (STS) あるいはホモシステインと銅 (Hcy+Cu) を加えて 6 時間インキュベートした。STS 処理した細胞では Z-VAD-fmk 存在下で生細胞数が回復したが、ホモシステインと銅で処理した細胞では Z-VAD-fmk の効果はみられなかった。異なる文字間で統計的に有意差あり ($p < 0.05$)。

これらの結果から、ホモシステインと銅により誘導されるアポトーシスの経路はカスパーゼを介さないことが推測された。さらにカスパーゼを介さない詳細な経路を明らかにするためにミトコンドリア膜電位の変化と、ミトコンドリアからのシトクローム *c* の放出を検討した。正常な細胞ではミトコンドリアは陰性に荷電しており、陽性荷電をもつ色素である JC-1 はミトコンドリアに凝集

して赤色の蛍光を発するが、ミトコンドリアの膜電位が失われると JC-1 は細胞質内に単体で拡散し、緑色の蛍光を発する。スタウロスポリンで処理した陽性コントロールは赤／緑の比が陰性コントロールに比べて約 20%まで低下した。ホモシステインと銅で処理した細胞も、スタウロスポリン処理と同様に約 20%まで低下した (図 4)。これらの結果は、NM-1 細胞をホモシステインと銅で処理するとミトコンドリアの膜電位が失われることを示唆している。

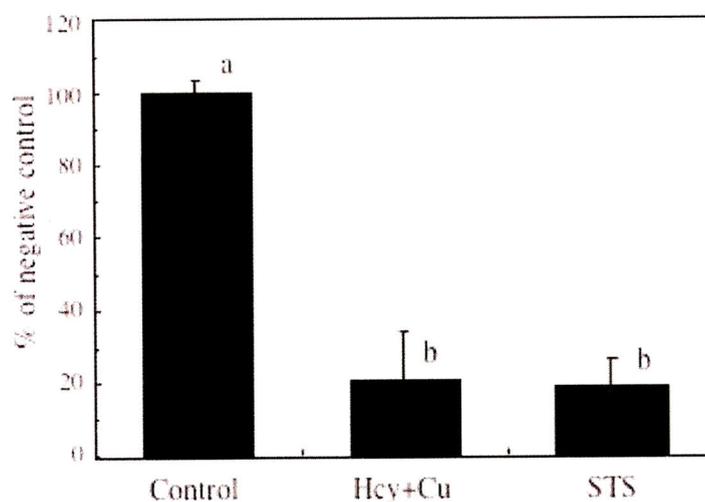


図 4 ミトコンドリア膜電位の変化

結果は陰性コントロールの赤／緑に対する%で示した。ホモシステインと銅 (Hcy+Cu) で処理した細胞はスタウロスポリン (STS) 処理の細胞と同様にミトコンドリアの膜電位が失われた。異なる文字間で統計的に有意差あり ($p < 0.05$)。

さらにシトクローム *c* についてミトコンドリア画分と細胞質画分のウェスタンブロッティングを行った。その結果、スタウロスポリンで処理した細胞は、ミトコンドリア画分に含まれるシトクローム *c* が減少し、細胞質画分に含まれるシトクローム *c* が増大した。しかしながら、ホモシステインと銅で処理した細胞ではシトクローム *c* のミトコンドリアから細胞質への放出は観察されなかった (図 5)。以上の結果から、細胞をホモシステインと銅で処理すると、ミトコンドリアの膜電位は失われるがシトクローム *c* の放出は生じず、カスパーゼ

を介さない経路でアポトーシスが誘導されることが示唆された。

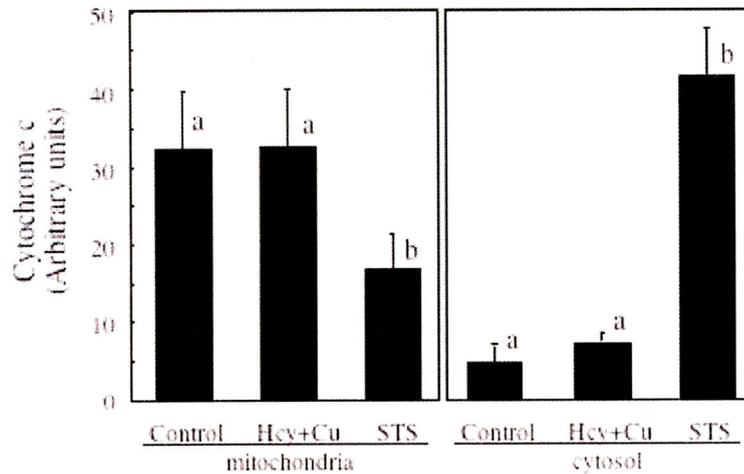


図5 シトクローム *c* の放出

スタウロスポリン (STS) 処理した細胞はシトクローム *c* のミトコンドリアから細胞質への放出がみられたが、ホモシステインと銅 (Hcy+Cu) で処理した細胞はシトクローム *c* の放出がみられなかった。異なる文字間で統計的に有意差あり ($p < 0.05$)。

3-4 ビタミン B₆ が NM-1 細胞に及ぼす効果

ビタミン B₆ がホモシステインと銅が誘導する NM-1 の細胞死を抑制するか検討する目的で、ホモシステインと銅を含む培養液にビタミン B₆ 化合物である PL、PN あるいは PM を加えて生細胞数に及ぼす効果を検討した。その結果、ホモシステインと銅により約 30% まで低下した生細胞数は、PL 200 μ M で約 45% まで回復し、500 μ M で約 60% まで有意に増大した。また、PN においても 200 μ M および 500 μ M で有意に生細胞数が増大した (約 45%)。しかし、PM ではその効果はみられなかった (図 6)。また、DNA ラダーを観察した結果、PL と PN ではラダーの減少が見られるものの、PM では変化が観察されなかった (図 7)。

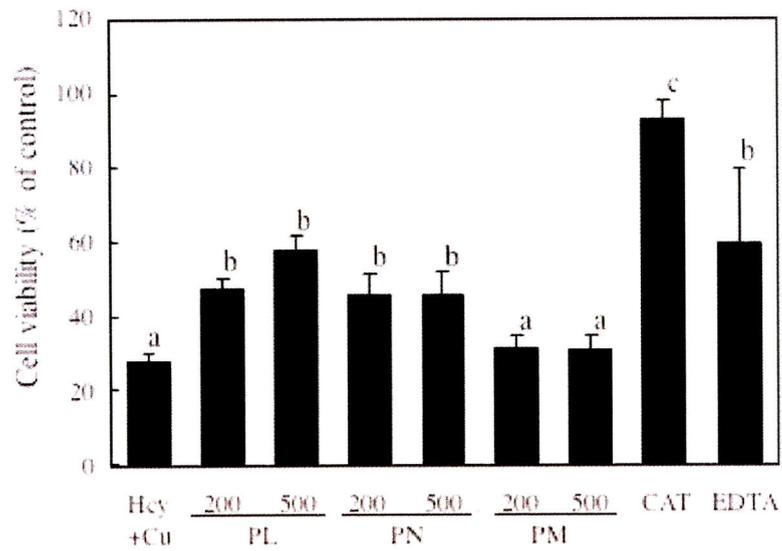


図6 ホモシステインと銅による細胞死に及ぼすビタミン B₆、カタラーゼ (CAT) または EDTA の効果

NM-1 細胞を 96 穴プレートに播種して 24 時間後に 250 μ M のホモシステインと 2 μ M の銅と共に PL、PN、PM (200 μ M または 500 μ M)、2500U/ml CAT あるいは 5 mM EDTA を加えて 6 時間インキュベートした。ホモシステインと銅を加えたときに減少した生細胞数は PL、PN、カタラーゼ、EDTA により有意に増大した。異なる文字間で統計的に有意差あり。p<0.05 (a vs b) and p<0.01 (a vs c)。

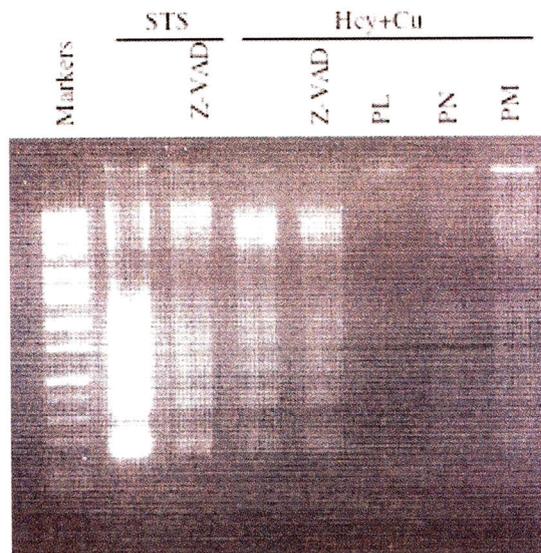


図7 DNA ラダーに及ぼすカスパーゼ阻害剤 (Z-VAD-fmk) とビタミン B₆ の効果
 NM-1 細胞を 96 穴プレートに播種して 24 時間後に 250 μ M のホモシステインと 2 μ M の銅と共に 50 μ M Z-VAD-fmk あるいは 500 μ M PL、PN、PM を加えて 6 時間インキュベートした。また、アポトーシスの陽性コントロールとして 1 μ M スタウロスポリンと Z-VAD-fmk を 6 時間インキュベートした後、浮遊した細胞から DNA を抽出し、1%アガロースゲルで電気泳動した。

3-5 PL が細胞外過酸化水素、細胞内 ROS および TBARS 濃度に及ぼす効果

ビタミン B₆ 化合物の中で最も細胞死抑制効果の大きかった PL について、ホモシステインと銅を加えた時の細胞外過酸化水素、細胞内 ROS および TBARS 濃度に与える効果について検討した。ホモシステインと銅を加えると、細胞外の過酸化水素濃度は非添加時の 5 倍に増加した (図 8 (A))。これらの結果から、ホモシステインと銅により産生された過酸化水素あるいは過酸化水素から発生した ROS を介して NM-1 細胞のアポトーシスを誘導したと考えられる。PL 200 μ M を加えると細胞外の過酸化水素は約 80%まで有意に低下し、500 μ M を加えると約 70%まで低下した。細胞外過酸化水素消去剤であるカタラーゼを加えると細胞外の過酸化水素はほとんど消失した (図 8 (A))。細胞内の ROS 濃度

もホモシステインと銅を加えると約 2.5 倍に増加するが、PL 200 μM の添加でコントロールの約 70%まで低下し、500 μM の添加で約 50%まで有意に低下した。一方、カタラーゼを添加すると細胞内の ROS はほとんど消失した (図 8 (B))。

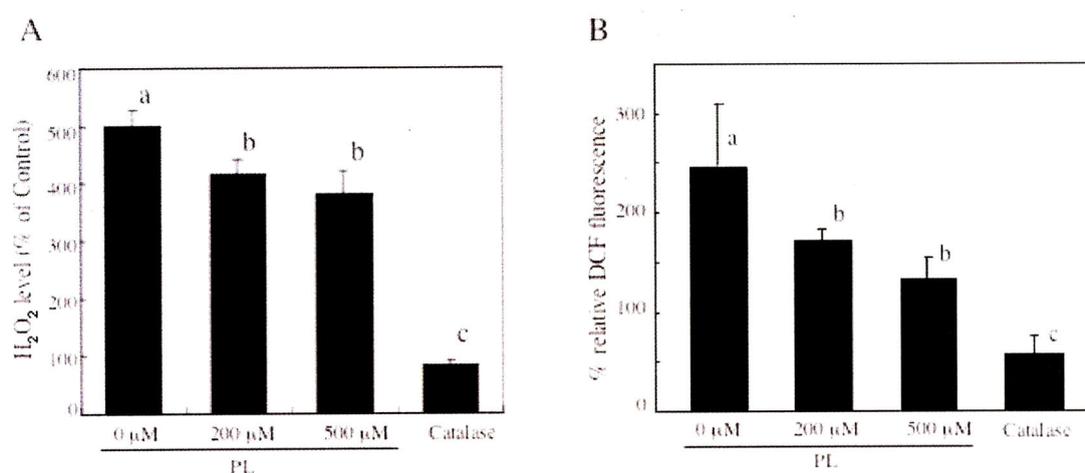


図 8 PL とカタラーゼが細胞外過酸化水素濃度と細胞内 ROS 濃度に与える影響 (A) 細胞外過酸化水素濃度。ホモシステインと銅により増加した細胞外の過酸化水素濃度は PL 200 μM 、500 μM で有意に低下し、カタラーゼ (2500U/ml) でほとんど消失した。(B) 細胞内 ROS 濃度。ホモシステインと銅で細胞内 ROS 濃度は増大したが、PL またはカタラーゼを加えると有意に低下した。異なる文字間で統計的に有意差あり。p<0.05 (a vs b) and p<0.01 (a vs c)。

さらにカタラーゼを加えると約 90%まで生細胞数が回復した (図 6) ことと考え合わせると、PL は細胞外の過酸化水素と細胞内の ROS 産生を抑制することで、ホモシステインと銅によるアポトーシスを抑制したと推測される。銅がホモシステインのようなチオール基の酸化を触媒するメカニズムとして銅-ホモシステイン複合体の形成が考えられている。銅のキレーターである EDTA を加えるとホモシステインと銅によるアポトーシスが抑制され、生細胞数が約 60%まで回復した (図 6)。これらの結果は、PL がホモシステインと銅で処理した

NM-1 細胞において銅のキレーターとして機能している可能性を示唆している。

次に、細胞内の酸化ストレスのマーカーとして TBARS 濃度を測定した。ホモシステインと銅で処理すると、細胞内の TBARS 濃度は約 3 nmol/ml に増大した。PL を 200 μ M 加えるとコントロールの約 44%まで低下し、500 μ M 加えると約 25%まで有意に低下した (図 9)。

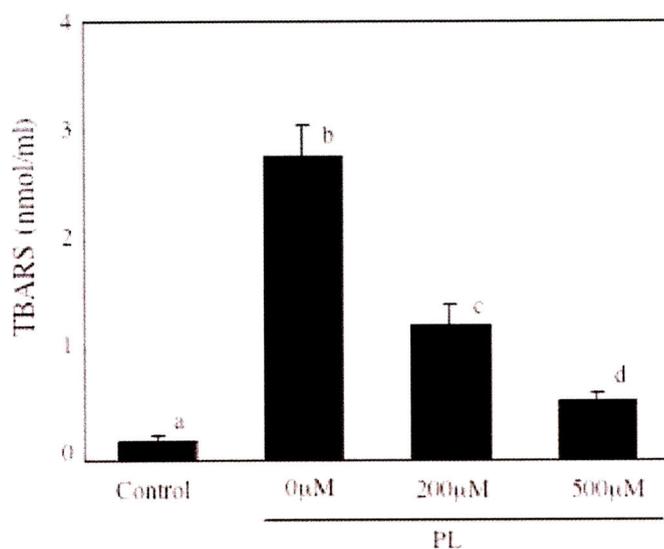


図 9 細胞内脂質過酸化物 (TBARS) 濃度

PL (200 μ M または 500 μ M) の存在、非存在下で 250 μ M のホモシステインと 2 μ M の銅で 24 時間インキュベートした後、細胞を超音波破碎して細胞内の TBARS 濃度を測定した。異なる文字間で統計的に有意差あり ($p < 0.01$)。

4. 考察

本研究では、ホモシステインと銅により誘導される NM-1 細胞の細胞死に及ぼすビタミン B₆ の効果を検討した。ホモシステインおよび銅を単独で NM-1 細胞を培養している培地に加えても生細胞数は変化しなかったが、ホモシステイン 250 μ M 存在下では銅の濃度依存的に生細胞数が減少した。今回観察された生細胞数の減少は、DNA ラダーおよび TUNEL 陽性細胞が観察されたことと、カスパーゼ阻害剤である Z-VAD-fmk によって阻害されなかったことからカスパーゼ経路を介さないアポトーシスにより引き起こされたことが示唆された。その他のアポトーシスに伴う現象として、ミトコンドリア膜電位の消失が観察されたが、シトクローム *c* の放出は認められなかった。ホモシステインと銅による生細胞数の減少は細胞外過酸化水素消去剤であるカタラーゼの添加によりほぼ完全に阻害されたことから、銅がホモシステインの酸化を促進し、発生した過酸化水素が細胞死を引き起こしたと考えられる。事実、細胞外の過酸化水素と細胞内の ROS レベルはホモシステインと銅により増大していた。今回の結果と一致して、銅またはその他の遷移金属がホモシステインの酸化を促進し、過酸化水素を発生するとの報告がある [Nakano et al., 2004; Coyle et al., 2006]。また Coyle らはブタの血管内皮細胞を用いて、過酸化水素がスーパーオキシドの増大を通して細胞障害を引き起こすことを報告した [Coyle et al., 2006]。今回、スーパーオキシドの濃度を測定しなかったが、ホモシステインと銅を加えると細胞外過酸化水素濃度が増大したことから、おそらく速やかに高濃度のスーパーオキシドが発生したことが推測される。このことは細胞内脂質過酸化物濃度の増大が観察されたことから示唆される。

ビタミン B₆ はホモシステインと銅による細胞外過酸化水素濃度の増大を抑制し、その効果は PL>PN>PM であり、ビタミン B₆ のホモシステインと銅による

細胞障害性の改善とも一致した (PL>PN>PM)。Kachur らは銅が触媒するチオール (ジチオスレイトール ; DTT) の酸化によるヒドロキシルラジカルの発生メカニズムを報告している [Kachur et al., 1997]。その報告によると、まず銅と DTT の複合体が形成され、フリーの DTT の酸化が起こる。次に、フリーの DTT が完全に酸化されると、スーパーオキシドと過酸化水素が産生され、続いて銅による過酸化水素の還元が起こり、最も反応性の高いヒドロキシルラジカルが発生する。ホモシステインなどのチオール基をもつ物質の酸化にも同様の機序で銅が働いていると考えられる。本実験で、PL はホモシステインと銅が誘導する NM-1 細胞の細胞死を有意に抑制した。Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) は鉄のキレーターとして鉄の過剰状態時に臨床的に用いられている薬剤であるが、PIH は *in vitro* で銅をキレートし、フリーラジカルの生成を阻害したとの報告がある [Hermes-Lima et al., 2001]。また、ホモシステインと銅とともに銅のキレーターである EDTA を加えたところ、NM-1 細胞の生細胞数は約 60 %まで回復した。以上の結果を考え併せると、PL が銅をキレートし、ホモシステインの酸化を抑制したと考えられる。しかしながら、PL 自体の抗酸化機能以外に、PL を補酵素とする抗酸化酵素や PL 代謝物がホモシステインと銅による細胞死の抑制に関わっている可能性は十分に考えられ、今後 PL のさらなる機能解明を期待したい。

5. 小括

本研究では、ウシの大動脈血管内皮細胞である NM-1 細胞に及ぼすホモシステインと銅の効果を検討し、それにより誘導される細胞死の経路を検討した。さらにホモシステインと銅により誘導される細胞死に及ぼす直接的なビタミン B₆ の効果を検討した。その結果、ホモシステイン添加のみでは NM-1 細胞に障

害が引き起こされないこと、ホモシステインの毒性は銅添加容量依存的であることが明らかとなった。ホモシステインと銅は NM-1 細胞にカスパーゼを介さない経路でアポトーシスを起こすことが示唆された。また、PL はホモシステインと銅によるアポトーシスを抑制した。この作用は PL の抗酸化能を介していることが示唆された。

第4章 総合考察

アテローム性動脈硬化症の危険因子としてホモシステインが注目されている。これまではホモシステイン誘発アテローム性動脈硬化症には血中ホモシステイン濃度が関与していると考えられていた。しかしながら本研究において血中ホモシステイン濃度だけではなく、ホモシステインによる血中過酸化レベルの亢進がアテローム性動脈硬化症への進行と深く関連する事が、ビタミン B₆ 欠乏食を投与したラットを用いた実験から明らかになった。このことは血中ホモシステイン濃度上昇時に抗酸化作用が効果的であることを示唆している。Mahfouz & Kummerow は高ホモシステイン血症を示すラットにビタミン C を多く含む食事を与えると、血中の酸化ストレスの指標が有意に低下し、LDL の酸化を抑制する可能性を報告している [Mahfouz & Kummerow, 2004]。既に述べたように、植物においてはビタミン B₆ の抗酸化活性の重要性が指摘されている [Chen & Xiong, 2005]。ホモシステイン投与ラットに限られた結果であるが、代表的な抗酸化物質であるビタミン C や E が添加されているにもかかわらずビタミン B₆ が欠乏するだけで血清中脂質過酸化物質濃度が有意に増大した結果は興味深く、ビタミン B₆ の抗酸化作用の重要性が現れているのかもしれない。ホモシステインから酸化ストレスが生じて血管内皮細胞障害を引き起こし、アテローム性動脈硬化症にまで至る経路に関するいくつかの論文が報告されている。ホモシステインの自己酸化によって生じた過酸化水素は血管内皮細胞を障害する [Sainani GS & Sainani R, 2002]。過酸化水素自体は不対電子を持たず、比較的不活性であるが過酸化水素から容易にスーパーオキシドや反応性の高いヒドロキシルラジカルなどの ROS が産生される。スーパーオキシドは LDL 酸化を促進するとともに細胞膜を通過し細胞内の脂質過酸化を引き起こす

[Graham, 1998]。また、内皮細胞由来の NO を不活性化し内皮機能を低下させる [Lang et al., 2000]。さらに、血小板の凝集 [Signorello et al., 2002] や、接着分子の発現を増大させ単球の接着を亢進させる [Postea et al., 2006]。培養細胞を用いた検討では高濃度のホモシステインに曝露すると IL-8 と MCP-1 の発現が増大する [Poddar et al., 2001]。このように、様々な因子の複合的な作用によって動脈硬化症の発症につながる。

本研究第2章においてホモシステインによる酸化ストレスが引き金となり、アテローム性動脈硬化症の発症に至り、ビタミン B₆ が抗酸化作用を示している可能性が示された。動物を用いた検討では、酸化ストレスは様々な細胞に作用しており、血管内皮細胞への直接的な影響は考察できない。そこで、培養細胞を用いて、ホモシステインが血管内皮細胞へどのような影響を及ぼすのか検討した。ホモシステイン単独投与では細胞毒性が認められなかったが、銅を添加することで細胞毒性が認められるようになった。ホモシステインと銅を培地に加えると細胞外の過酸化水素濃度が増大したが、これは Starkebaum & Harlan が報告した銅とホモシステインがともに存在するとさらにその作用は大きくなる結果と一致する [Starkebaum & Harlan, 1986]。この現象は二価の銅イオンが細胞外のホモシステインを酸化し、ジスルフィド結合を形成する過程で過酸化水素を生じるためであると考えられる。動物実験でホモシステイン単独投与においても効果があったのは血中に存在する銅イオンが作用していると推測される。実際、培養細胞で効果の認められる銅イオン濃度 (0.5 $\mu\text{mol/l}$) 以上が血中でも存在する (18~36 $\mu\text{mol/l}$)。ホモシステインと銅から生じる過酸化水素による細胞障害以外にも、ホモシステインと銅の複合体が細胞を障害するとの報告もある [Apostolova et al., 2003]。Austin らはヒトの巨核細胞である DAMI 細胞を用いてホモシステインと銅がともに存在すると、細胞内の過

酸化水素濃度だけではなくホモシステイン濃度も増大することを示し、ホモシステインと銅によってミトコンドリア RNA が減少すること、細胞の電子顕微鏡像においてミトコンドリアが明瞭なクリステをもたずに膨大化していることを示した。さらに、培地に過酸化水素のみを加えても効果がなく、ホモシステインと過酸化水素が同時に存在することでミトコンドリアの機能、形態的に顕著な変化をもたらすことを報告した [Austin et al., 1998]。これらの報告から、ホモシステイン、銅および過酸化水素が複雑に関連して細胞障害を引き起こしていることが示唆される。しかしながら、NM-1 細胞を用いた本実験においてはカタラーゼ添加によってホモシステインと銅による細胞毒性がほぼキャンセルされる事から、本実験系における細胞毒性は過酸化水素の生成に起因していると推測される。

ホモシステインと銅により誘導される NM-1 細胞の細胞死において DNA ラダーが認められるが、カスパーゼ阻害剤によって細胞死が抑制されないことからカスパーゼ経路を介さないアポトーシスであることが示唆された。また、その他の現象としてミトコンドリアの膜電位の消失が観察されたが、シトクローム c の放出は観察されなかった。Lemarie らは、ヒトの肝癌細胞である Hep3B 細胞においてカドミウムがカスパーゼ非依存的アポトーシスを引き起こすことを報告した。その際、細胞内の ROS 濃度の増大と、ミトコンドリアの膜電位の消失が認められている。さらに、カドミウムとのインキュベートにより、ミトコンドリアに存在する endonuclease G (EndoG) と apoptosis-inducing factor (AIF) の核内への移行が観察された [Lemarie et al., 2004]。カスパーゼによるアポトーシスでは caspase activated nuclease によって DNA 断片化が起こるが [Yan et al., 2006]、カスパーゼを介さない経路における DNA の断片化には EndoG が関わる事が報告されている [Bahi et al., 2006]。また、虚

血／再灌流障害は心筋梗塞や冠動脈バイパス手術時に見られる心筋細胞の細胞死であるが、ROSが大きく関与している [Becker L.B., 2003]。また、Kimらは、虚血／再灌流障害を起こしたモデルラットの心筋においてカスパーゼ非依存的アポトーシスが起きていることを示し、さらにシトクローム *c* の放出が観察されなかったことと、AIF の細胞質あるいは核への移行が観察されたことを報告している [Kim et al., 2003]。さらに、過酸化水素により細胞内のカルシウムイオン濃度が増大し、ミトコンドリアからの AIF 放出を誘導したとの報告もある [Braun et al., 2002]。これらの結果から、ホモシステインと銅によって過酸化水素、ROS ならびにカルシウムイオン濃度が増大し、ミトコンドリアの膜電位の消失に続いて AIF や EndoG の放出が起きている可能性が考えられる。AIF は Poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) の下流に位置し、カスパーゼ阻害剤では阻害されず PARP-1 阻害剤によって阻害される。PARP-1 は過酸化水素や NMDA によって活性化される。さらに ROS の作用でミトコンドリア膜電位が消失し、AIF がミトコンドリアから核内へ移行し、核の濃縮や、アネキシン陽性および細胞死を引き起こす。EndoG は AIF と協力して DNA の断片化などにはたらく [Hong et al., 2004] (図 1)。最近、アポトーシスの分類を電子顕微鏡を用いた形態的な変化から定義する論文が Bredesen らによって報告された [Bredesen et al., 2006] (図 2)。それによると、形態的な特徴は 6 種類に分けられる。(1) デスレセプター、DNA ダメージあるいはウイルス感染が引き金となって起こる典型的なアポトーシスの形態でありクロマチンの凝集、核の断片化およびアポトーシス小体が観察される。また、カスパーゼ経路を介するため、カスパーゼ阻害剤により阻害される。(2) アミノ酸の枯渇や小胞体におけるタンパク質のミスフォールディングによるタンパク質の凝集が過剰に起こった場合、オートファージ的な細胞死が起こる。このとき、形態的には

自己貪食液胞が観察される。(3) 栄養毒性が引き金となり小胞体とミトコンドリアの膨潤が観察される。メディエーターとして ERK2 と NUR77 がはたらいており、パラプトーシスと呼ばれる。(4) 線虫で報告されたカルシウム介在性の細胞死で、細胞内のカルシウム濃度が上昇することで起こる。細胞膜がねじれ状になっている像が観察され、カルパインとカテプシンがメディエーターとして関与している。(5) DNA ダメージ、グルタミン酸あるいは一酸化窒素などが引き金となり、PARP の活性化に続いて AIF のミトコンドリアからの放出が起こる AIF/PARP 依存性経路。中程度のクロマチンの凝集が観察され、PARP 阻害剤によって阻害される。(6) 虚血や興奮毒性が引き金となり JNK を介して起こる経路。細胞の膨潤が観察され、JNK 阻害剤によって阻害される。本研究においては、ホモシステインと銅によるアポトーシス誘導経路の詳細な検討を行っていないが、AIF/PARP を介する経路であることが推測される。細胞の電子顕微鏡像の撮影も含めて、今後の検討課題である。

ホモシステインによって生じる細胞毒性を含めた動脈硬化の促進に酸化ストレスが深く関わっていることが本研究によって明らかになった。ビタミン B₆ はホモシステインにより生じる酸化ストレスを軽減する性質を有することが、*in vivo* と *in vitro* の実験から認められた。ビタミン B₆ は水溶性ビタミンであり安全に摂取でき、さらに抗酸化活性を有することを考えると、アテローム性動脈硬化症についてはその他の酸化ストレスが原因となる疾病の予防への応用が期待される。

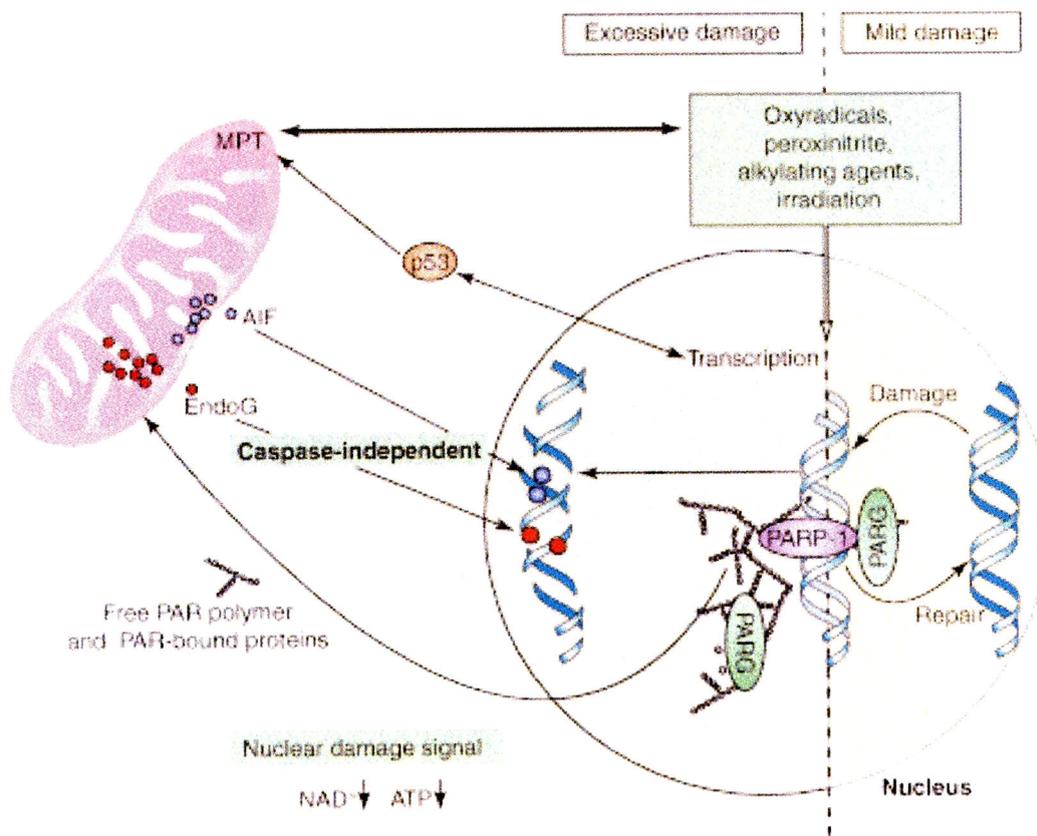
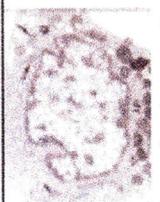
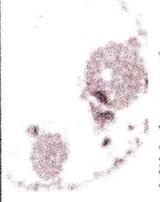


図1 PARP-1 を介するカスパーゼ非依存的アポトーシス経路 (Hong et al., 2004 より引用)

DNA へのマイルドなダメージがあると DNA 修復機構がはたらくが、DNA への重大なダメージによって PARP-1 の活性化が起こり、細胞死へ導かれる。ROS やその他の DNA 障害因子はミトコンドリアの膜透過性を増大させ、ミトコンドリアから AIF の放出を引き起こす。EndoG が PARP-1 を介する細胞死においてどのように移行するか明らかでないが、EndoG と AIF が協力してカスパーゼ非依存的アポトーシスに参与している可能性がある。

Table 1 | Characteristics of dying cells

Characteristics	Established forms of cell death Apoptosis	Autophagic	Atypical forms of cell death Paraptosis	Calcium-mediated	AIF/PARP-dependent	Oncosis
Morphology	 Chromatin condensation, nuclear fragmentation, apoptotic bodies	 Autophagic vacuoles	 ER swelling, mitochondrial swelling	 Membrane whorls	 Mild chromatin condensation	 Cellular swelling
Triggers	Include death receptors, trophic-factor withdrawal, DNA damage, viral infections	Serum, amino-acid starvation, protein aggregates	Trophotoxicity	Calcium entry, <i>C. elegans</i> deg mutants	DNA damage, glutamate, nitric oxide	Ischaemia, excitotoxicity
Mediators	Caspases, BH1-3, BH3 proteins	JNK1? MKK7? ATG orthologues	ERK2, NUR77	Calpains, cathepsins	PARP, AIF	JNK
Inhibitors	Caspase inhibitors, BH1-4 proteins	JNK inhibitors?	U0126 (MEK), DN NUR77	Calreliculin, Some calpain inhibitors?	PARP inhibitors	JNK inhibitors
Examples	Type I PCD, nuclear PCD	Type II PCD	Type III PCD, cytoplasmic PCD	<i>C. elegans</i> deg mutants	Some excitotoxic PCD	Ischaemic PCD

Note the difference in morphology present in each form, as well as the differences in biochemical mediators, inducers, and inhibitors. At present, only apoptosis and autophagic PCD are generally accepted as being legitimate forms of PCD; however, ongoing research should reveal which of the additional candidates represent novel pathways of PCD. DN, dominant-negative; DEG, degeneration; U0126, a mitogen-activated protein kinase inhibitor. (Images reproduced, with permission, from refs.58-62.)

図2 形態的特徴による細胞死の分類 (Bredesen et al., 2006より引用)

引用文献

Adachi H, Hirai Y, Fujiura Y, Matsuoka H, Satoh A and Imaizumi, T. Plasma homocysteine levels and atherosclerosis in Japan: epidemiological study by use of carotid ultrasonography. *Stroke*, 33, 2177-2181, 2002.

Apostolova MD, Bontchev PR, Ivanova BB, Russell WR, Mehandjiev DR, Beattie JH and Nachev CK. Copper-homocysteine complexes and potential physiological actions. *J. Inorg. Biochem.*, 95, 321-333, 2003.

Austin RC, Sood SK, Dorward AM, Singh G, Shaughnessy SG, Pamidi S, Outinen PA and Weitz JI. Homocysteine-dependent alterations in mitochondrial gene expression, function and structure. Homocysteine and H₂O₂ act synergistically to enhance mitochondrial damage. *J. Biol. Chem.*, 273, 30808-30817, 1998.

Bahi N, Zhang J, Llovera M, Ballester M, Comella JX and Sanchis D. Switch from caspase-dependent to caspase-independent death during heart development: essential role of endonuclease G in ischemia-induced DNA processing of differentiated cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.*, 281, 22943-22952, 2006.

Barua RS, Ambrose JA, Srivastava S, DeVoe MC and Eales-Reynolds LJ.

Reactive oxygen species are involved in smoking-induced dysfunction of nitric oxide biosynthesis and upregulation of endothelial nitric oxide synthase: an in vitro demonstration in human coronary artery endothelial cells. *Circulation*, 107, 2342-2347, 2003.

Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc. Res.*, 61, 461-470, 2004.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA and Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1620-1624, 1990.

Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS and Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA*, 274, 1049-1057, 1995.

Braun JS, Sublett JE, Freyer D, Mitchell TJ, Cleveland JL, Tuomanen EI and Weber JR. Pneumococcal pneumolysin and H₂O₂ mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J. Clin. Invest.*, 109, 19-27, 2002.

Bredesen DE, Rao RV and Mehlen P. Cell death in the nervous system.

Nature, 443, 796-802, 2006.

Burns KE, Xiang Y, Kinsland CL, McLafferty FW and Begley TP. Reconstitution and biochemical characterization of a new pyridoxal-5'-phosphate biosynthetic pathway. *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 3682-3683, 2005.

Chen H and Xiong L. Pyridoxine is required for post-embryonic root development and tolerance to osmotic and oxidative stresses. *Plant J.*, 44, 396-408, 2005.

Chumnantana R, Yokochi N and Yagi T. Vitamin B6 compounds prevent the death of yeast cells due to menadione, a reactive oxygen generator. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1722, 84-91, 2005.

Coburn SP, Mahuren JD, Schaltenbrand WE, Wostmann BS and Madsen D. Effects of vitamin B-6 deficiency and 4'-deoxypyridoxine on pyridoxal phosphate concentrations, pyridoxine kinase and other aspects of metabolism in the rat. *J. Nutr.*, 111, 391-398, 1981.

Coyle CH, Martinez LJ, Coleman MC, Spitz DR, Weintraub NL and Kader KN. Mechanisms of H₂O₂-induced oxidative stress in endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 40, 2206-2013, 2006.

Dayal S, Brown KL, Weydert CJ, Oberley LW, Arning E, Bottiglieri T, Faraci FM and Lentz SR. Deficiency of glutathione peroxidase-1 sensitizes hyperhomocysteinemic mice to endothelial dysfunction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 22, 1996-2002, 2002.

De Lau LML, Koudstaal PJ, Witteman JCM, Hofman A and Breteler MMB. Diet folate, vitamin B12, and vitamin B6 and the risk of Parkinson disease. *Neurol.*, 67, 315-318, 2006.

Denisova MI and Rabotnikov IuM. On the anti-inflammatory effect of pyridoxine. *Farmakol. Toksikol.*, 32, 306-308, 1969.

Doke S, Inagaki N, Hayakawa T and Tsuge H. Effects of vitamin B6 deficiency on cytokine levels and lymphocytes in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 1008-1010, 1998.

Drewke C, Klein M, Clade D, Arenz A, Muller R and Leistner E. 4-O-phosphoryl-L-threonine, a substrate of the pdxC (serC) gene product involved in vitamin B6 biosynthesis. *FEBS Lett.*, 390, 179-182, 1996.

Drewke C, Notheis C, Hansen U, Leistner E, Hemscheidt T, Hill RE and Spenser ID. Growth response to 4-hydroxy-L-threonine of *Escherichia coli* mutants blocked in vitamin B6 biosynthesis. *FEBS Lett.*, 318,

125-128, 1993.

Dudman NPB and Wilcken DEL. Increased plasma copper in patients with homocystinuria due to cystathionine β -synthase deficiency. *Clinica. Chimica. Acta.*, 127, 105-113, 1983.

Ehrenshaft M, Bilski P, Li MY, Chignell CF and Daub ME. A highly conserved sequence is a novel gene involved in *de novo* vitamin B6 biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 9374-9378, 1999.

Graham A. Cellular thiol production and oxidation of low-density lipoprotein. *Free Radic. Res.*, 28, 611-621, 1998.

Griffiths HR, Aldred S, Dale C, Nakano E, Kitas GD, Grant MG, Nugent D, Taiwo FA, Li L and Powers HJ. Homocysteine from endothelial cells promotes LDL nitration and scavenger receptor uptake. *Free Radic. Biol. Med.*, 40, 488-500, 2006.

Hankey GJ and Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet*, 354, 407-413, 1999.

Hermes-Lima M, Goncalves MS and Andrade RG Jr. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) prevents copper-mediated *in vitro* free radical formation. *Mol. Cell. Biochem.*, 228, 73-82, 2001.

Hofmann MA, Lalla E, Lu Y, Gleason MR, Wolf BM, Tanji N, Ferran LJ Jr., Kohl B, Rao V, Kisiel W, Stern DM and Schmidt AM. Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. *J. Clin. Invest.*, 107, 675-683, 2001.

Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke. *JAMA*, 288, 2015-2022, 2002.

Hong SJ, Dawson TM and Dawson VL. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends. Pharmacol. Sci.*, 25, 259-264, 2004.

Hultberg B, Andersson A and Isaksson A. Metabolism of homocysteine, its relation to the other cellular thiols and its mechanism of cell damage in a cell culture line (human histiocytic cell line U-937). *Biochim. Biophys. Acta.*, 1269, 6-12, 1995.

Hultberg B, Andersson A and Isaksson A. The cell-damaging effects of low amounts of homocysteine and copper ions in human cell line cultures are caused by oxidative stress. *Toxicology*, 123, 33-40, 1997.

Kachur AV, Held KD, Koch CJ and Biaglow JE. Mechanism of

production of hydroxyl radicals in the copper-catalyzed oxidation of dithiothreitol. *Radiat. Res.*, 147, 409-415, 1997.

Kim GT, Chun YS, Park JW and Kim MS. Role of apoptosis-inducing factor in myocardial cell death by ischemia-reperfusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 309, 619-624, 2003.

Kita T, Nagano Y, Masayuki Y, Ishii K, Kume N, Ooshima A, Yoshida H and Kawai C. Probucol prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit, an animal model for familial hypercholesterolemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 5928-5931, 1987.

Komatsu S, Watanabe H, Oka T, Tsuge H, Nii H and Kato N. Vitamin B-6-supplemented diets compared with a low vitamin B-6 diet suppress azoxymethane-induced colon tumorigenesis in mice by reducing cell proliferation. *J. Nutr.*, 131, 2204-2207, 2001.

Kühn H, Heydeck D, Hugou I and Gniwotta C. *In vivo* action of 15-lipoxygenase in early stages of human atherogenesis. *J. Clin. Invest.*, 99, 888-893, 1997.

Laber B, Maurer W, Scharf S, Stepusin K and Schmidt FS. Vitamin B6 biosynthesis: formation of pyridoxine 5'-phosphate from 4-(phosphohydroxy)-L-threonine and 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate

by PdxA and PdxJ protein. *FEBS Lett.*, 449, 45-48, 1999.

Lang D, Kredan MB, Moat SJ, Hussain SA, Powell CA, Bellamy MF, Powers HJ and Lewis MJ. Homocysteine-induced inhibition of endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta: role for superoxide anions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 20, 422-427, 2000.

Lemarie A, Lagadic-Gossmann D, Morzadec C, Allain N, Fardel O and Vernhet L. Cadmium induces caspase-independent apoptosis in liver Hep3B cells: role for calcium in signaling oxidative stress-related impairment of mitochondria and relocation of endonuclease G and apoptosis-inducing factor. *Free Radic. Biol. Med.*, 36, 1517-1531, 2004.

Li M, Chen J, Li YS, Feng YB, Gu X and Shi CZ. Folic acid reduces adhesion molecules VCAM-1 expression in aortic of rats with hyperhomocysteinemia. *Int. J. Cardiol.*, 106, 285-288, 2006.

Mahfouz MM and Kummerow FA. Vitamin C or Vitamin B6 supplementation prevent the oxidative stress and decrease of prostacyclin generation in homocysteinemic rats. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 36, 1919-1932, 2004.

Mansoor MA, Bergmark C, Haswell SJ, Savage IF, Evans PH, Berge RK, Svardsdal AM and Kristensen O. Correlation between plasma total

homocysteine and copper in patients with peripheral vascular disease. *Clin. Chem.*, 46, 385-391, 2000.

McCaddon A, Davies G, Hudson P, Tandy S and Cattell H. Total serum homocysteine in senile dementia of Alzheimer type. *Int. J. Geriatr. Psych.*, 13, 235-239, 1998.

McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am. J. Pathol.*, 56, 111-128, 1969.

Mittenhuber G. Phylogenetic analyses and comparative genomics of vitamin B6 (pyridoxine) and pyridoxal phosphate biosynthesis pathways. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 3, 1-20, 2001.

Modak MJ. Observation of the pyridoxal 5'-phosphate inhibition of DNA polymerase. *Biochemistry*, 15, 3620-3626, 1975.

Molina A, Oka T, Munoz SM, Chikamori-Aoyama M, Kuwahata M and Natori Y. Vitamin B6 suppresses growth and expression of albumin gene in human hepatoma cell line HepG2. *Nutr. Cancer.*, 28, 206-211, 1997.

Mutus B, Rabini RA, Staffolani R, Ricciotti R, Fumelli P, Moretti N, Martarelli D and Mazzanti L. Homocysteine-induced inhibition of nitric

oxide production in platelets: a study on healthy and diabetic subjects. *Diabetologia*, 44, 979-982, 2001.

Nakano E, Williamson MP, Williams NH and Powers HJ. Copper-mediated LDL oxidation by homocysteine and related compounds depends largely on copper ligation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1688, 33-42, 2004.

Oka T, Komori N, Kuwahata M and Natori Y. Vitamin B6 modulates expression of albumin gene by inactivating tissue-specific DNA-binding protein in rat liver, *Biochem. J.*, 309, 243-248, 1995.

Oka T, Komori N, Kuwahata M, Sassa T, Suzuki I, Okada M and Natori Y. Vitamin B6 deficiency causes activation of RNA polymerase and general enhancement of gene expression in rat liver. *FEBS Lett.*, 331, 162-164, 1993.

Oka T, Komori N, Kuwahata M, Suzuki I, Okada M and Natori Y. Effect of vitamin B6 deficiency on the expression of glycogen phosphorylase mRNA in rat liver and skeletal muscle. *Experientia*, 50, 127-129, 1994.

Oka T, Sugitatsu H, Nordin H, Thakur MK, Aoyama M, Sasagawa T, Suzuki I and Tsuji H. Pyridoxal 5'-phosphate inhibits DNA binding of HNF1. *Biochim. Biophys. Acta*, 1568, 189-196, 2001.

Okada M and Ochi A. The effect of dietary protein level on transaminase activities and fat deposition in vitamin B6-depleted rat liver. *J. Biochem.*, 70, 581-585, 1971.

Poddar R, Sivasubramanian N, DiBello PM, Robinson K and Jacobsen DW. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. *Circulation*, 103, 2717-2723, 2001.

Postea O, Krotz F, Henger A, Keller C and Weiss N. Stereospecific and redox-sensitive increase in monocyte adhesion to endothelial cells by homocysteine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 26, 508-513, 2005.

Rimm EB, Willett WC, Hu FB, Sampson L, Colditz GA, Manson JE, Hennekens C and Stampfer MJ. Folate and vitamin B6 from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. *JAMA*, 279, 359-364, 1998.

Robinson K, Mayer EL, Miller DP, Green R, van Lente F, Gupta A, Kottke-Marchant K, Savon SR, Selhub J, Nissen SE, et al. Hyperhomocysteinemia and low pyridoxal phosphate. Common and independent reversible risk factors for coronary artery disease.

Circulation, 92, 2825-2830, 1995.

Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *New Eng. J. Med.*, 340, 115-126, 1999.

Sainani GS and Sainani R. Homocysteine and its role in the pathogenesis of atherosclerotic vascular disease. *J. Assoc. Physicians. India.*, 50, 16-23, 2002.

Sawle P, Foresti R, Green CJ and Motterlini R. Homocysteine attenuates endothelial haem oxygenase-1 induction by nitric oxide (NO) and hypoxia. *FEBS lett.*, 508, 403-406, 2001.

Schnyder G, Roffi M, Flammer Y, Pin R and Hess OM. Effect of homocysteine-lowering therapy with folic acid, vitamin B12, and vitamin B6 on clinical outcome after percutaneous coronary intervention: the Swiss Heart study: a randomized controlled trial. *JAMA*, 288, 973-979, 2002.

Schwammenthal Y and Tanne D. Homocysteine, B-vitamin supplementation, and stroke prevention: from observational to interventional trials. *Lancet Neurol.*, 3, 493-495, 2004.

Shimada D, Fukuda A, Kanouchi H, Matsumoto M and Oka T. Vitamin

B6 suppresses growth of the feline mammary tumor cell line FRM. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 1038-1040, 2006.

Shimada D, Fukuda A, Kawaguchi H, Kato N, Yoshida H, Kanouchi H and Oka T. Effect of high dose of pyridoxine on mammary tumorigenesis. *Nutr. Cancer.*, 53, 202-207, 2005.

Signorello MG, Pascale R and Leoncini G. Effect of homocysteine on arachidonic acid release in human platelets. *Eur. J. Clin. Invest.*, 32, 279-284, 2002.

Signorello MG, Pascale R and Leoncini G. Reactive oxygen species accumulation induced by homocysteine in human platelets. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 973, 546-549, 2002.

Siri PW, Verhoef P and Kok FJ. Vitamins B6, B12, and folate: association with plasma total homocysteine and risk of coronary atherosclerosis. *J. Am. Col. Nutr.*, 17, 435-441, 1998.

Stamler J, Wentworth D and Neaton JD. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the multiple risk factor intervention trial (MRFIT). *JAMA*, 256, 2823-2828, 1986.

Starkebaum G and Harlan JM, Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *J. Clin. Invest.*, 77, 1370-1376, 1986.

Steinberg D. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation*, 95, 1062-1071, 1997.

Tambasco-Studart M, Titiz O, Raschle T, Forster G, Amrhein N and Fitzpatrick TB. Vitamin B6 biosynthesis in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 13687-13692, 2005.

Ullegaddi R, Powers HJ and Gariballa SE. B-group vitamin supplementation mitigates oxidative damage after acute ischaemic stroke. *Clin. Sci.*, 107, 477-484, 2004.

van Aken BE, Jansen J, van Deventer SJ and Reitsma PH. Elevated levels of homocysteine increase IL-6 production in monocytic Mono Mac 6 cells. *Blood. Coagul. Fibrinolysis.*, 11, 159-164, 2000.

Verhoef P, Kok FJ, Kruyssen DA, Schouten EG, Witteman JC, Grobbee DE, Ueland PM and Refsum H. Plasma total homocysteine, B vitamins, and risk of coronary atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 17, 989-995, 1997.

Verhoef P, Stampfer MJ, Buring JE, Gaziano JM, Allen RH, Stabler SP, Reynolds RD, Kok FJ, Hennekens CH and Willett WC. Homocysteine metabolism and risk of myocardial infarction: relation with vitamins B6, B12, and folate. *Am. J. Epidemiol.*, 143, 845-859, 1996.

Vollset SE, Refsum H, Tverdal A, Nygard O, Nordrehaug JE, Tell GS and Ueland PM. Plasma total homocysteine and cardiovascular and noncardiovascular mortality: the Hordaland Homocysteine Study. *Am. J. Clin. Nutr.*, 74, 130-136, 2001.

Wagner S, Bernhardt A, Leuendorf JE, Drewke C, Lytovchenko A, Mujahed N, Gurgui C, Frommer WB, Leistner E, Fernie AR and Hellmann H. Analysis of the Arabidopsis *rsr4-1/pdx1-3* mutant reveals the critical function of the PDX1 protein family in metabolism, development, and vitamin B6 biosynthesis. *Plant Cell.*, 18, 1722-1735, 2006.

Wang G, Siow YL and O K. Homocysteine induces monocyte chemoattractant protein-1 expression by activating NF- κ B in THP-1 macrophages. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 280, H2840-H2847, 2001.

Witztum JL and Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Invest.*, 88, 1785-1792, 1991.

Yan B, Wang H, Peng Y, Hu Y, Wang H, Zhang X, Chen Q, Bedford JS, Dewhirst MW and Li CY. A unique role of the DNA fragmentation factor in maintaining genomic stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 1504-1509, 2006.

Yang Y, Zhao G and Winkler ME. Identification of the pdxK gene that encodes pyridoxine (vitamin B6) kinase in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol. Lett.*, 141, 89-95, 1996.

Zhou J, Moller J, Ritskes-Hoitinga M, Larsen ML, Austin RC and Falk E. Effects of vitamin supplementation and hyperhomocysteinemia on atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis*, 168, 255-262, 2003.

Zhou J, Werstuck GH, Lhoták S, de Koning ABL, Sood SK, Hossain GS, Møller J, Ritskes-Hoitinga M, Falk E, Dayal S, Lentz SR and Austin RC. Association of multiple cellular stress pathways with accelerated atherosclerosis in hyperhomocysteinemic apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 110, 207-213, 2004.

小崎丈太郎, 小山千穂. 特集 高脂血症治療の曲がり角. *Nikkei Medical*, 1997年6月号, 60-69.

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、本研究を通じて終始ご懇篤なご指導とご助言を賜りました、鹿児島大学農学部獣医学科基礎獣医学講座生理学分野、岡達三教授、鹿児島大学農学部獣医学科基礎獣医学講座生理学分野、川崎安亮助教授、鹿児島大学農学部獣医学科先端獣医科学講座分子病態学分野、叶内宏明助教授、宮崎大学農学部応用生物科学科食品機能化学講座、西山和夫助教授、鹿児島大学農学部獣医学科基礎獣医学講座解剖学分野、松元光春助教授ならびに鹿児島大学農学部生物資源化学科食品機能化学講座、大塚彰助教授に深く感謝の意を捧げます。また、実験にご協力いただきました鹿児島大学フロンティアサイエンス研究推進センタープロジェクト研究員、岡部正明氏始め鹿児島大学農学部獣医学科基礎獣医学講座生理学分野、学生の諸氏に謝意を表します。