

研究論文紹介

制がん剤で誘導される HL-60 細胞のアポトーシスにおけるセラミドの増加とカタラーゼによる阻害の ESI-MS/MS による測定

奈良女子大学食物¹、兵庫教育大学生活健康系²山田 靖子¹、梶原 一美¹、矢埜 みどり²、岸田 恵津²、増澤 康男²、小城 勝相¹

Vitamin (Japan), 76 (1), 1-2(2002)

Increase of Ceramides and Its Inhibition by Catalase during Chemically Induced Apoptosis of HL-60 Cells Determined by Electrospray Ionization Tandem Mass SpectrometryYasuko YAMADA¹, Kazumi KAJIWARA¹, Midori YANO², Etsu KISHIDA², Yasuo MASUZAWA², and Shosuke KOJO¹
[Biochim. Biophys. Acta, 1532, 115-120 (2001)]¹Department of Food Science and Nutrition, Nara Women's University, ²Department of Life and Health Sciences, Hyogo University of Teacher Education

バイオフィクターとして、スフィンゴ脂質が注目されている。中でもセラミドが、アポトーシスのシグナル伝達において重要な役割を果たすという多くの論文がある。従来セラミドは酵素法によって定量されてきたが、最近その方法に疑問が提出されている。そこで我々は、HL-60 細胞のアポトーシスにおけるセラミド量の変化を、ESI-MS/MS (Finnigan MAT TSQ 7000) を用いて測定した。マススペクトルを使う場合でも MS/MS でないと特異性が低いといわれている。今回の実験では、非天然型の C17:0 を用いることにより、回収率も初めて考慮した。

HL-60 細胞にアクチノマイシン D (AcD) 10 μ g/ml を作らせると、図1に示すように、最も含量が高いセラミドである C16:0 が4時間後有意に増加した。他のセラミド類 (C24:1, C26:1) も4時間後に有意に増加した。C18:0, C22:1 は6時間後に有意に増加した。

AcD はこの10 μ g/ml の濃度条件では6時間後に80%のアポトーシスを引き起こし、1.5時間後にミトコンドリアから細胞質へのシトクロームcの移動が起こること、4時間後に Caspase-3 の活性化が有意に起こることが

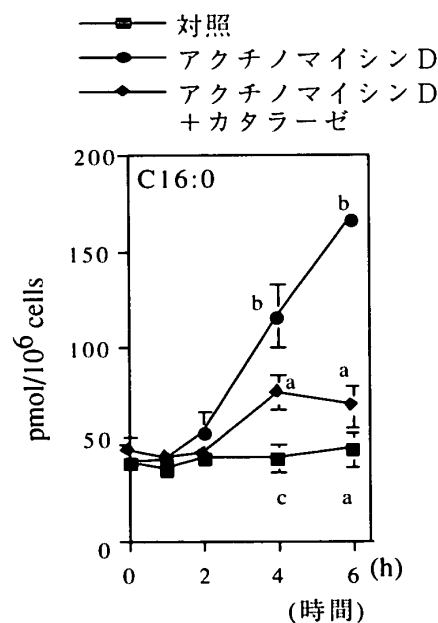


図1. アクチノマイシン D 添加後の HL-60 細胞における C16:0 セラミドの変化とカタラーゼの効果
それぞれの点は平均値 \pm SD. 図の中で異なる添字間には統計的に有意差があることを示す [ANOVA Bonferroni/Dunn Procedure ($p < 0.05$)] .

我々の研究で判明している¹⁾ので, セラミドの増加はアポトーシスのプロセスにおいてシトクローム c の細胞質への移動より下流であることがわかった。

さらに, AcD によるアポトーシスはカタラーゼで阻害されることから, H_2O_2 が重要な役割を果たすことがわかっている²⁾。本実験でも図1に示すように, カタラーゼによってアポトーシスを阻害するとC16:0セラミドの増加も有意に阻害され, 他のセラミド類の増加も有意に抑制された。この結果は, セラミドの増加は H_2O_2 の発生より下流であることを示している。カタラーゼはシトクローム c の漏出も Caspase-3 の活性化も阻害すること¹⁾を合わせると, セラミドの増加は H_2O_2 の発生, シトクローム c 漏出の下流に位置すると共に, Caspase-3 の活性化と同時期に起こることがわかる。

セラミドの増加によって, アポトーシスを引き起こすとされる Daunorubicin (Dau) についても同様の実験を行った。Dau も HL-60 細胞に6時間で75%のアポトーシスを起こす濃度条件(5 μ M)で実験を行った。Dau も AcD 同様, 1.5 時間でシトクローム c の漏出を起こし, 4時間後にCaspase-3の活性化を引き起こす¹⁾。しかも,

AcD と同様カタラーゼがこれらのプロセスもアポトーシスも阻害することがわかっている¹⁾²⁾。Dau も, 4時間後に C16:0, C24:1, C18:0, C22:1, C26:1 セラミドを増加させた。しかもこれらの増加は, カタラーゼによって有意に阻害された。これらの結果より, Dau におけるセラミドの増加も AcD と同様の場所に位置することが判明した。

以上より, HL-60 細胞におけるAcD や Dau によるアポトーシスにおいて, セラミドの増加は H_2O_2 の発生やシトクローム c の細胞質への移動の下流に位置し, Caspase-3 の活性化とほぼ同時期であることが判明した。

文 献

- 1) Kajiwar K, Ikeda K, Tokumaru S, Kojo S (2001) Involvement of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in the activation of caspase-3 in chemically induced apoptosis of HL-60 cells. *Mol Cell Life Sci* **58**, 485-491
- 2) Ikeda K, Kajiwar K, Tanabe E, Tokumaru S, Kishida E, Masuzawa Y, Kojo S (1999) Involvement of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in chemically induced apoptosis of HL-60 cells. *Biochem Pharmacol* **57**, 1361-1365