

一酸化窒素(NO)による胃粘膜上皮細胞障害に対する *Crassostera gigas extract* (JCOE)の保護作用と細胞内グルタチオンの役割

増井康治, 吉川敏一, 内藤裕二, 朴義男
藤井貴章, 吉田憲正, 近藤元治
京都府立医大第一内科

慢性活動性炎症を伴う消化管粘膜の免疫組織学的検討により、浸潤した好中球やマクロファージに、誘導型 NO 合成酵素の mRNA や蛋白の発現が明らかとなっている。in vitro でも細菌抽出物やある種の蛋白によりマクロファージからの NO 産生が誘導されることが報告されているが、NO による粘膜障害の機序は不明な点が多い。われわれは既に基礎実験において、JCOE (*Crassostera gigas extract*) が活性酸素であるスーパーオキシド、ヒドロキシルラジカルを消去する作用があること¹⁾、抗酸化物質として様々な酸化ストレスに対し細胞保護作用を有することが知られている細胞内グルタチオン濃度を増加させることにより、活性酸素種による細胞障害を抑制すること²⁾について検討し報告している。そこで今回の研究においてはラット胃粘膜培養細胞を用い、NO による胃粘膜細胞障害性につき検討するとともに、NO 惹起性の細胞障害におよぼす細胞内グルタチオンの影響、さらに NO による胃粘膜の障害に対する JCOE の保護作用についても検討を加えた。

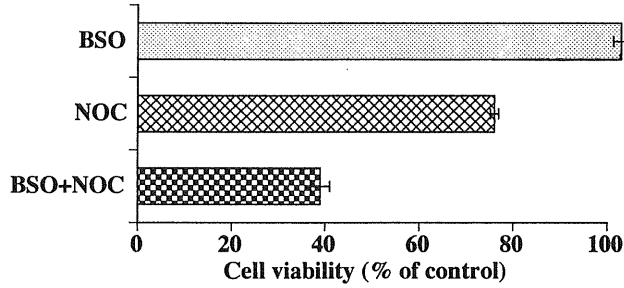
実験方法

胃粘膜上皮細胞としてラット胃粘膜上皮細胞株 RGM-1 細胞 (RCB0876, 理研細胞銀行) を用い、DMEM/F12 混合培地 (20% 牛胎児血清添加) で培養した。細胞を48時間培養後、各種濃度の JCOE を添加した培養液でさらに24時間培養、confluent の状態でハンクス液に置換後、NO ドナーを加えてその細胞障害性を検討した。NO ドナーとして NOC-5, NOC-7, NOC-12 (DOJINDO Co.) を使用した。細胞障害性については、MTT 変法 (WST-1 法, DOJINDO Co.)、細胞生存率はトリパンブルー色素排除試験により評価した。細胞内グルタチオン (GSH) の役割を評価するためにグルタチオン合成の律速酵素である γ -glutamylcysteine synthetase の阻害剤である buthionine sulfoximine (BSO, 100 μ M, 24時間前処置) を用いて検討した。細胞内グルタチオン濃度はグルタチオンリダクターゼ, DTNB 溶液を用いて酵素的リサイクリング法により測定した。

結 果

(1) NO ドナー (NOC5, 7, 12) は RGM-1 細胞に対し、濃度および時間依存性に細胞死を惹起した。

Untreated



JCOE treated

-2hrs exposure-

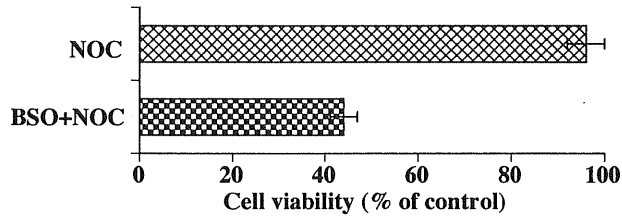


図1 NO ドナー惹起性の細胞障害におよぼす JCOE の効果 (NOC-5 mM に 2 時間暴露)

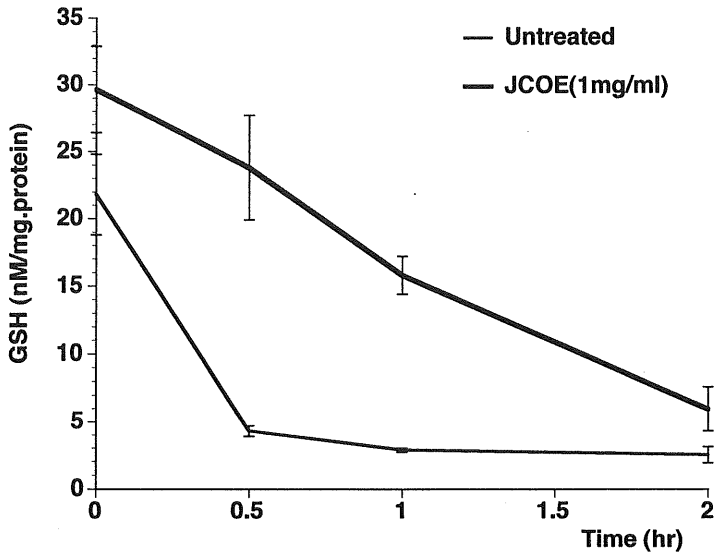


図2 NO ドナーによる細胞内グルタチオン濃度の変化と JCOE の影響

- (2) BSO により GSH を枯渇させた RGM-1 細胞はそれのみでは細胞は障害されなかったが, NO ドナー惹起性の細胞障害は有意に増強した。
- (3) NO ドナーにより RGM-1 細胞内のグルタチオンは濃度および時間依存性に減少した。
- (4) JCOE は NO ドナー惹起性の細胞障害を抑制し, BSO により GSH を枯渇させることによりその障害

抑制作用は阻害された (図1)。

(5) JCOE により細胞内グルタチオン濃度は増加し, NO ドナーによるグルタチオンの消費を抑制した (図2)。

考 察

本実験においては, 最初に NO による細胞障害性についての検討を行った。各種 NO ドナーは, 濃度依存性, 時間依存性に細胞死を誘導した。加えて, 結果には示していないが, 本実験に用いた NO ドナーが培養液中に実際に NO を発生させていることを ESR 法により確認し, また NO 代謝物である NO_2^- , NO_3^- , NOC 不活性型などが RGM-1 細胞に障害性を示さないことも確認している。これらの結果は NO が直接的に RGM-1 細胞に対して細胞死を惹起させていることを示す結果である。細胞死の様式に関しては, DNA 結合性傾向二重染色法 (Hoechst 33342-Propidium iodide 染色) を用いて蛍光顕微鏡によりネクロシスであることを確認している。

細胞死のメカニズムについては, 現在その詳細を検討中であるが, 本実験で示したように細胞内還元型グルタチオン (GSH) の果たす役割は重要であると考えられた。つまり細胞内 GSH 濃度は細胞死の出現に先行し, NO ドナー投与後すみやかに低下した。また, BSO の前処置によって作製した NO-depleted RGM-1 細胞では細胞死誘導が増強された。JCOE の前処置により細胞内 GSH は増加し NO による細胞障害性を軽減させたことも, 本モデルにおける細胞内 GSH の細胞保護作用の重要性を示す結果であると考えられる。今後 NO と GSH の細胞内動態の検討並びに JCOE による GSH 増加作用の検討が必要と考えられた。

結 論

NO は直接胃粘膜細胞に障害をもたらす。この際, 細胞内グルタチオンが細胞保護作用を有し, JCOE は細胞内グルタチオン濃度を増加させることにより NO による胃粘膜の障害に対し保護的に働くことが示唆された。

文 献

- 1) Yosikawa, T., Naito, Y., Masui, Y., Fujii, T., Boku, Y., Nakagawa, S., Yoshida, N. and Kondo, M.: Free radical scavenging activity of *Crassostera gigas* extract (JCOE), *Biomed. Pharmacother.* 51 : 328-332, 1997.
- 2) 吉川敏一, 内藤祐二, 増井康治, 朴 義男, 藤井貴章, 吉田憲正, 近藤元治: *Crassostera gigas* extract (JCOE) による胃粘膜上皮細胞保護作用と細胞内グルタチオンの役割, *微量栄養素研究* 14 : 119-121, 1997.