

## アポトーシスに関する研究 (6)

### 活性酸素によるマウスのリンパ球アポトーシスに及ぼすビタミン B6

#### の影響

Study on Apoptosis (6)

Effect of vitamin B6 on active oxygen – induced apoptosis in lymphocyte.

道家晶子

Shoko DOKE

Abstract

The mechanism of active oxygen induced - apoptosis in lymphocyte by vitamin B6 as compared with those by vitamin C was studied. The protective effect of vitamin B6 was dependent on concentration and occurred only in the millimolar concentration range. In contrast, vitamin C did not show the dependent on concentration. Oxidative stress activates apoptosis and antioxidants protect against apoptosis in vitro. These results suggest that vitamin B6 may have an important role in the induction of oxygen-induced apoptosis.

Keywords : apoptosis lymphocyte vitamin B6

はじめに

ビタミン B6 (B6) は、約 100 種類の酵素の補酵素として働く水溶性ビタミンのひとつである。特にアミノ酸代謝に関与するため、その必要量は蛋白質の摂取量の増加に依存して高くなる。経口摂取で肺がんのリスクを減少させる有効性や、疫学調査により血中ピリドキシン濃度の高い男性喫煙者は、肺がんリスクが低いと示されている。また、免疫機能維持に重要な核酸合成に関わるため免疫応答に影響を与え、欠乏すると免疫低下やアレルギーを招くと考えられている。<sup>1)</sup>

B6 の活性型であるピリドキサルリン酸は、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、がん細胞やがん患者の血清では、B6 濃度が減少していること、マウスの実験で B6 による顕著ながん細胞の増殖抑制効果が観察されたこと、リンパ球の幼若化反応が高濃度の B6 を含む飼料を投与したマウスで高くなっていて、高濃度の B6 を投与してがん細胞の増殖を抑制させる研究がおこなわれている。<sup>2)</sup>

生体において、不要なリンパ球にアポトーシスを誘導することが、正常な免疫系の維持に必須である。リンパ球のアポトーシスには、抗原受容体を介するアポトーシスが重要とされ、抗原受容体蛋白質を産生できない細胞はアポトーシスを起こすと考えられている。B リンパ球のアポトーシスには B 細胞の抗原受容体の発現が必須であるといわれている。<sup>3)</sup>

これまでの食品とアポトーシスの研究で、食品中の抗酸化成

分がエトポシドなどの抗がん剤によってダメージを受けたマウス脾臓リンパ球に起こるアポトーシスの誘導を抑制する傾向が認められ、この作用に含まれる活性酸素によるラジカル反応に対するラジカル捕捉作用によるものと推察された。<sup>4)</sup>

そこで、本報では抗酸化作用をもつビタミン B6 に着目し、代表的な水溶性抗酸化ビタミンである C と比較しながら活性酸素によりダメージを受けた正常なマウスリンパ球のアポトーシス抑制作用について検討した。また、栄養状態の違いがアポトーシスにおける反応に及ぼす影響を調べるため、B6 を含まない飼料を与えたマウスを用いて、同様に B6 および C の添加効果や濃度依存性について実験した。

方法

Balb/c メスのマウス生後 4 週令 (中部科学資材 (株) から購入) を用いて、ビタミン B6 濃度の異なる 2 種類の飼料を 4 週間与えた後、脾臓からリンパ球を調製して実験に供した。2 種類の飼料は、AIN-76 にのっとり表 1 に示したようにビタミン B6 を含んだ完全食のコントロール群と、ビタミン B6 が不足したビタミン B6 欠乏群の 2 種類を調整した。

## アポトーシスに関する研究(6)

表1 飼料の成分組成

成分名	コントロール群 (%)	ビタミンB6欠乏群 (%)
カゼイン	20	20
DL メチオニン	0.3	0.3
コリン	0.2	0.2
セルロース	2.0	2.0
大豆油	5.0	5.0
ミネラル混合	3.5	3.5
スクロース	68.0	68.0
ビタミン混合 (-B6)	1.0	1.0
ピリドキシン塩酸 塩 0.7mg%	1.0	-
4-デオキシピリド キシリン塩酸塩	-	1.0

7週令マウス脾臓からリンパ球を調製後、RPMI 1640 培地 (Wako) にて  $2 \times 10^6$  個になるよう  $\text{CO}_2$  インキュベーター (IWAKI) にて培養した。次いで、0、0.5、1.0mMに濃度調製したビタミンB6およびビタミンCを加え、続いて0.1mM過酸化水素溶液を添加して24時間後の細胞死を位相差顕微鏡 (OLYMPUS) にて形態観察およびトリパンブルー細胞分染法で死細胞数をカウントし、乳酸脱水素酵素活性法で細胞死から遊離されるLDH値を測定し、キット (US Biological 社) を用いたカスパーゼ3の測定を行い、アポトーシスの誘導阻害を判定した。

Bリンパ球抗原受容体のシグナルの測定はTSUBATA教授、ADACHI助教授の研究グループの方法で測定した。<sup>5)</sup>

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ラジカル消去活性測定は、200  $\mu\text{M}$  DPPH エタノール溶液に7種類の抗酸化物質を含む試料溶液を加え、517nmの吸光度から消去活性を計算した。

抗酸化物質には、抗酸化力が高いといわれているラジカット (三菱ウエルファーマ)、リゴ酸、フラボン、カテキン、トコフェロール、ピリドキシン塩酸塩およびアスコルビン酸の各試薬を0.1mg%溶液に調製後、実験に供した。(試薬はすべてWako)

## 結果

ビタミンB6を含んだ完全食であるコントロール群と、B6を含まない欠乏食群で飼育した4週間後のマウス脾臓細胞のリンパ球について調べた結果を表1に示した。B6欠乏群のマウスの方が体重が小さいため、各3匹の脾臓あたりの総リンパ球数を平均した数値である。コントロール群に比べ、B6欠乏群では、

総リンパ球数は明らかに減少していた。また、anti IgM で刺激した時に誘導された死細胞数をトリパンブルー分染後にカウントしたところ、B6欠乏群で明らかに数値は高く、アポトーシスは促進されていた。また、アポトーシスによらない死細胞数もかなり多かった。表2に結果を示した。

表2 2種類のリンパ球の状態

マウス飼料	完全食 (コントロール群)	ビタミンB6 欠乏群
リンパ球数	$4.5 \times 10^7$ /spleen	$1.5 \times 10^7$ /spleen
Anti-IgMで 誘導された 死細胞数 (%)	$70 \pm 5$	$84 \pm 3$

次いで、同細胞中から調製した試料のLDH活性を調べた。コントロール群およびB6欠乏群の細胞に、予め夫々B6およびCを添加しておいたシャーレに活性酸素の過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) を加えた後のシャーレ中LDHを測定したところ、図1に示したようにB6欠乏群でコントロール群の約2倍高かった。これは、表2に示した結果と同じ傾向にあった。対照にはB6やCを加えていないシャーレを用いた。さらに、 $\text{H}_2\text{O}_2$ を添加前にCとB6を含むシャーレ中LDH値の結果は、アポトーシスの抑制が認められ、特にコントロール群では、C次いでB6の順に作用が強かったが、B6欠乏群では、B6の方がCより効果が大きく逆の結果となった。抑制率もコントロール群に比べ、B6欠乏群で効果が大きかった。

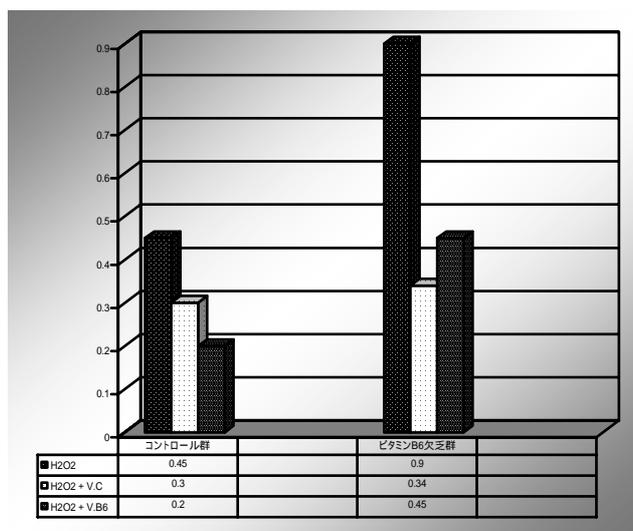


図1 コントロール群およびビタミンB6欠乏群におけるLDH値の変化

## アポトーシスに関する研究(6)

次いで、LDH 値とビタミンによるアポトーシス抑制に濃度依存性があるかどうか調べるため、0.5mM、1.0mM 濃度のビタミン B および C 溶液を調製して図 1 と同様に実験した。コントロール群、B6 欠乏群に夫々、濃度の異なる B6 または C を加えた。

B6 添加の場合、コントロール群においても B6 欠乏群においても 0.5mM より 1.0mM の方が LDH 値は低く抑制されていた。一方、C 添加の場合、LDH 値は低下したが、0.5mM ~ 1.0mM では濃度依存性は見られなかった。

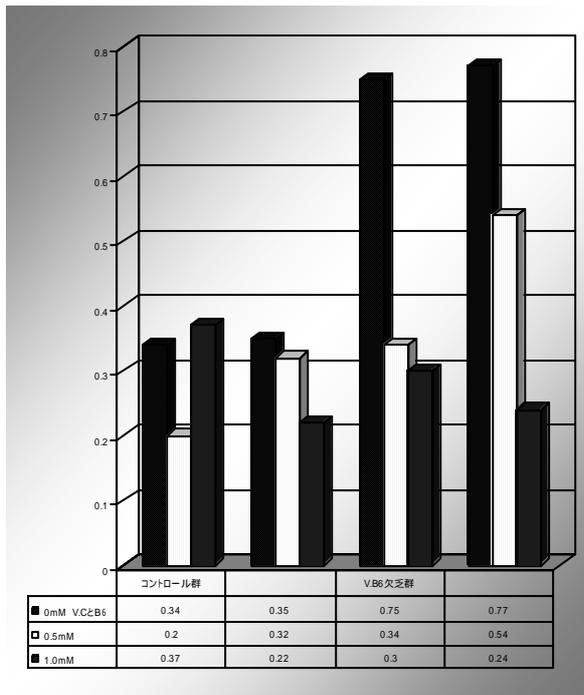


図2 ビタミン B6 および C の濃度依存性とカスパーゼ 3 活性の関係

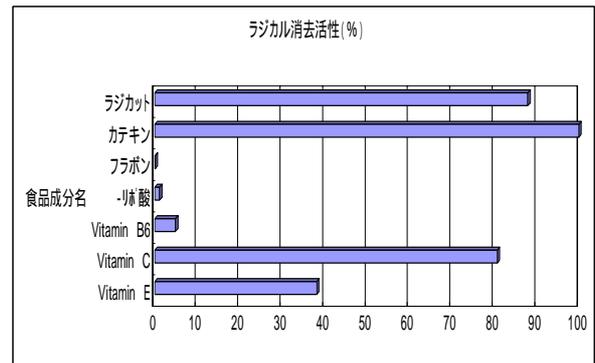
同一の実験条件下でカスパーゼ 3 活性を測定したところ、図 2 のようになった。カスパーゼ 3 活性においても LDH 値と同様な傾向が見られた。コントロール群に比べ、B6 欠乏群で B6 の濃度依存的にアポトーシスを抑制する傾向にあった。

次いで、B リンパ球抗原受容体レセプターのシグナルを測定するため、電気泳動後にウエスタンブロッティングをおこなった。結果は、コントロール群、B6 欠乏群でいずれも 4 つの濃いバンドをはじめ多くのバンドを検出したが、特に両群で顕著な差異は認められなかった。(結果は示していない。)

ビタミン B6 および C を含む 7 種類の抗酸化物質すなわち、ポリフェノール類のカテキン、フラボノイドの仲間のフラボン、ビタミン様作用物質の  $\alpha$ -リポ酸、脂溶性ビタミンの E について DPPH ラジカル消去活性を測定した結果を図 3 に示した。ラジカルスカベンジャ ーとして治療にも用いられるラジカットの値を基準にすると、最も活性が高かったのはカテキンであった。

図3 ビタミンと抗酸化力の関係

## 7種類の抗酸化活性の比較



## 考察

マウスの脾臓リンパ球を用いて、活性酸素で引き起こされるアポトーシスにビタミン B6 が及ぼす影響をビタミン C の結果と比較して検討した。コントロール群とビタミン B6 欠乏群でのトリパンブルー細胞染色法による死細胞数の結果からビタミン B6 欠乏食群のマウスはリンパ球数が少なく、アポトーシスが誘導されやすいことがわかった。ビタミン B6 欠乏の栄養状態下では蛋白質の代謝不全がおり、マウスの体重増加も少なく免疫力も低下する。しかし、B リンパ球受容体 (BCR) シグナルアッセイの結果からビタミン B6 欠乏による BCR シグナルに顕著な違いはなかった。死細胞は増えているがアポトーシス以外のオートファジーやネクローシスによるものも含まれているかも知れない。本実験では抗原受容体架橋により、いろいろな基質のチロシンリン酸化が誘導されるが、シグナルの全体的な強さと経時的変化に差異がなく B 細胞と T 細胞を分離して検討する必要がある。

活性酸素を添加した時のビタミン B6 のアポトーシス抑制率は、ビタミン C より抗酸化力が小さい B6 添加群で効果が大きく B6 欠乏群の細胞に特異的な結果と考えられた。濃度依存性を調べた LDH の実験からも、活性酸素添加後の LDH 値は B6 で濃度依存性が認められた。ビタミン C では、1.0mM 濃度レベルでは、逆に酸化抑制が小さくなり低濃度レベルで効果が大きく適量が存在することが推測された。

カスパーゼ3放出の吸光度結果からビタミンB6欠乏群ではコントロール群に比べビタミンB6やCによる回復も大きいことがわかった。栄養状態が不良でも適切に栄養補給すればアポトーシスの誘導は正しく行われ、活性酸素の害から細胞を守る働きをしていることを示しているといえよう。健康の回復や維持増進に栄養の大切さを改めて痛感する。

コントロール群とB6欠乏群における反応の違いは、Bリンパ球受容体のシグナルが関係しているのではないかと推察したが、いずれもシグナルは確かに見られるもののB6特異的な変化まで検出することができなかった。より微量に含まれるT細胞受容体のシグナルも関与しているかもしれない。今回は、脾臓細胞を使用したため、T細胞受容体シグナルの検出まで至らなかった。B6欠乏による胸腺萎縮は明白なので、Tリンパ球における変化の方が大きいことが推察され、今後の課題にしたい。

ラジカルと反応し、ラジカルを消す働きをもつラジカルスカベンジャーのラジカットを基準に比較したところ、カテキンが最も強く、次いでビタミンC、ビタミンEの順となり、フラボン、-リポ酸と共にビタミンB6は抗酸化力はあるもののラジカルスカベンジャーとしての働きは弱いことがわかった。今回の実験では、カテキンよりもビタミン類の方が活性酸素で誘導されたリンパ球のアポトーシス抑制が大きかったため、抗酸化力の強さと必ずしも関連していない。活性酸素に代表されるラジカルは、さまざまながんや生活習慣病を引き起こす根源と考えられる。ビタミンを多く含む食品の摂取や抗酸化物質の積極的活用は、予防医学的に重要と考える。しかし、ヒトの骨髄性白血病細胞HL60の増殖抑制に及ぼす8種類のフラボノイド化合物の影響を調べた実験からは、抗酸化活性の高いポリフェノール類よりは、むしろ特定の位置に水酸基を有するフラボン化合物の方が有効なことで、明確な構造相関性が存在することを報告している。<sup>6)</sup>抗酸化力の強弱だけでは説明ができないことを示唆しているといえよう。

#### 要約

活性酸素によりダメージを受けたリンパ球にビタミンB6がアポトーシス誘導の抑制作用を示すかどうかマウスの脾臓を用いて実験した。トリパンブルー染色法による死細胞数、LDH値、カスパーゼ3活性から細胞死の判定を検討したところ、B6には、活性酸素により誘導されたアポトーシスを抑制する作用があり0.5mM~1.0mMで濃度依存的に効果が認められた。B6欠乏状態では、リンパ球の脆弱化が認められ、アポトーシスを起こす細胞数も多かった。しかし、B6欠乏群にB6添加後の結果からB6によるアポトーシス抑制の回復効果は同じ水溶性ビタミンのCよりもさらに大きいことがわかった。これらの差異は、Bリンパ球受容体から発生するシグナルが関与するのではないかと予想したが、明らかな差異は認められず、抗酸化力の強さと

も相関しなかった。がんをはじめさまざまな生活習慣病を防ぐには、ビタミン不足のない栄養状態を確保しておくことが最も大事であるが、欠乏状態下でも適切にビタミンを補充すれば十分に効果があることを確認した。

#### 参考文献

- 1) 健康食品の安全性・有効性情報 独立行政法人健康栄養研究所 2005
- 2) 岡達三 トピックス ビタミン 73巻2号 1999
- 3) 鏑田武志 リンパ球選択とアポトーシス 実験医学 22巻 11号 2004
- 4) 道家晶子 食品とアポトーシス 岐阜市立女子短期大学研究紀要 第54輯
- 5) Hokazono, Y., et al ; J. Immuno. 1835-1843 2003
- 6) Takahashi, T., et al ; Biosci. Biotechnol. Biochem., 62, 2199-2204 1998

(提出期日 平成17年11月28日)