

# 細胞死とポリアミン

(課題番号：06807173)

平成7年度科学研究費補助金 (一般研究C 萌芽) 研究成果報告



平成8年3月

研究代表者 白幡 晶  
(城西大学薬学部・講師)

細胞死とポリアミン

(06807173)

平成 7 年度 科学研究費補助金 (一般研究 C, 萌芽) 研究成果報告

平成 8 年 3 月

研究代表者 白幡 晶

(城西大学薬学部講師)

はしがき

スベルミジンおよびスベルミンに代表されるポリアミンは、その生合成律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素の活性が増殖刺激に対して早い時期に上昇することや核酸と強く相互作用することなどから、細胞内における遺伝子発現過程に重要な働きをするものと古くから考えられている。実際、生合成阻害剤や生合成酵素の欠損株を用いた研究によって、ポリアミンの枯渇は増殖の停止や分化の停止や促進をもたらすことが明らかになっている。しかし、陰性電荷をもつ成分とポリアミンとの非特異的相互作用のために、その特異的な作用点を見いだすことは困難であり、細胞内におけるポリアミン作用の実体は不明である。

我々は、ラット肝臓がん由来するHTC細胞を比較的長期間ポリアミン欠乏状態にすると、細胞が培地に添加したスベルミジンあるいはアナログを細胞内に過剰に蓄積して縮小し、アポトーシスと思われる細胞死に至ることを観察した。本研究は、従来増殖因子としてとらえられているポリアミンが、細胞死のシグナルとして機能する可能性を、種々のスベルミジンアナログおよび最近われわれが見いだした細胞死が観察される培養実験系を用いて探ることを目的とし、①スベルミジンアナログを用いて細胞死を起こす構造特異性を系統的に調べることでその作用点を特定し、アナログによる細胞死のメカニズムを明らかにすること、②ポリアミン欠乏細胞におけるスベルミジンによる細胞死の生化学的、解剖学的性質を明らかにすること、③ポリアミン欠乏細胞が投与したスベルミジンを蓄積するメカニズムを明らかにすること、④広範な細胞系でポリアミン蓄積の効果を調べる上で有用となる試薬の開発を試みたものである。

なお、本論文末尾には、上記に関連した既報論文を加えた。

## 研究組織

研究代表者：白幡 晶（城西大・薬・講師）

## 研究経費

平成 6 年度	1,400 千円
平成 7 年度	400 千円

## 研究発表

### (1) 学会誌等

Y. He, T. Suzuki, K. Kashiwagi, K. Kusama-Eguchi, A. Shirahata and K. Igarashi, "Correlation between the inhibition of cell growth by bis(ethyl) polyamine analogues and the decrease in the function of mitochondria". Eur. J. Biochem. 221, 391-398 (1994).

A. Shirahata, H. Hosoda, N. Takahashi, T. Beppu, M. Niitsu, and K. Samejima, "Enzymatic aminopropylation of certain secondary amines". Biol. Pharm. Bull. (Tokyo), 18, 355-359 (1995).

T. Beppu, A. Shirahata, N. Takahashi, H. Hosoda, and K. Samejima, "Specific depletion of spermidine and spermine in HTC cells treated with inhibitors of aminopropyltransferases". J. Biochem. (Tokyo) 117, 339-345 (1995).

Y. He, T. Shimogori, K. Kashiwagi, A. Shirahata, K. Igarashi,  
"Inhibition of cell growth by combination of  $\alpha$ -difluoromethylornithine  
and an inhibitor of spermine synthase". J. Biochem. (Tokyo) 117, 824-829  
(1995).

Kazuei Igarashi, Kunihiko Koga, Young He, Tomomi Shimogori, Hisao  
Ekimoto, Keiko Kashiwagi and Akira Shirahata.

"Inhibition of the growth of various human and mouse tumor cells by  
1,15-bis(ethylamino)-4,8,12-triazapentadecane."  
Cancer Res., 55, 2615-2619 (1995).

T. Beppu, A. Shirahata, K. Samejima, "Determination of covalently  
bound hypusine and deoxyhypusine to protein using submilligram of  
protein samples by HPLC". Biol. Pharm. Bull., 19,1-5 (1996).

(2)口頭発表

シンポジウム

学会発表

深沢孝史, 白幡 晶, 鮫島啓二郎: スペルミジンの毒性と細胞死, 日本薬学会第  
114 年会, 1994.3.29-31 (東京)

五十嵐一衛, 古賀邦彦, 何 勇, 下郡智美, 浴本久雄, 柏木敬子, 白幡 晶: BE  
3333 (1,15-ビスエチルアミノ-4,8,12-トリアザペンタデカン) の抗がん効果, 第  
11 回日本ポリアミン研究会, 1995.1.24-25 (浜松)

別府隆信, 白幡 晶, 鮫島啓二郎: 微量生体試料からのハイプシンおよびデオキ  
シハイプシンの分析, 第11 回日本ポリアミン研究会, 1995.1.24-25 (浜松)

小沢知博，白幡 晶，鮫島啓二郎：ポリアミンを細胞内に導入するプロドラッグとしてのジアセチル誘導體，日本薬学会第 115 年会，1995.3.29-31（仙台）

縣 宗彦，白幡 晶，深沢孝史，鮫島啓二郎：ポリアミン欠乏 HTC 細胞におけるスベルミジン過剰蓄積のメカニズムについて，日本薬学会第 115 年会，1995.3.29-31（仙台）

小沢知博，白幡 晶，和田牧子，柴田聡子，鮫島啓二郎：ポリアミン酸化酵素の基質特異性とポリアミン結合部位，第12 回日本ポリアミン研究会，1996.1.24-25（宇都宮）

縣 宗彦，白幡 晶，深沢孝史，小林美保子，鮫島啓二郎：ポリアミン欠乏 HTC 細胞におけるスベルミジン過剰蓄積のメカニズム，第12 回日本ポリアミン研究会，1996.1.24-25（宇都宮）

## 研究成果

細胞内ポリアミン合成をオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) 阻害剤により阻害すると、プトレシンおよびスペルミジン量は著しく低下し、一般に細胞の増殖は停止する。そこにスペルミジンを投与すると、細胞は速やかにスペルミジンを取り込み、再び増殖を開始する。したがって、スペルミジンと同様に細胞内に取り込まれるアナログ体を投与すれば、その化合物が増殖におけるスペルミジンの役割をどの程度果たせるかによって、細胞はスペルミジン投与の場合とは増殖速度を変えるはずである。これまで当研究室では、ラット肝臓癌由来HTC細胞に対する種々のスペルミジンアナログ体の増殖補助能をスペルミジンと比較することで、スペルミジンに特異的な作用を見いだすことを試みてきた。Fig.1には、当研究室で行った実験結果を模式的に示す。ODC 阻害剤である 1-aminooxy-3-aminopropane (AOAP) を HTC 細胞に投与して、細胞内プトレシンおよびスペルミジン量を低下し細胞増殖を停止させた。そこに、スペルミジンを投与すると、増殖が少し遅れて回復したのち長期的に維持されるのに対して、スペルミジンのアナログ体 (Fig.2) を投与すると、増殖は速やかに回復するが数日でまた停止するという現象を観察した。すなわち、増殖補助において多くのアナログ体がスペルミジンと違う点は、速やかな増殖の回復と4日目以降の増殖の停止であった。これらのことは、スペルミジンの特異的な作用として、長期的に増殖補助することばかりでなく一時的な増殖回復の遅れを生じることも重要であることを示唆している。

本研究では、まず、このスペルミジン投与による一時的な増殖回復の遅れが生理機能に関わるものかどうか明らかにすることを目的として、この遅れがどのようなものに影響されるのかを調べることから着手した。

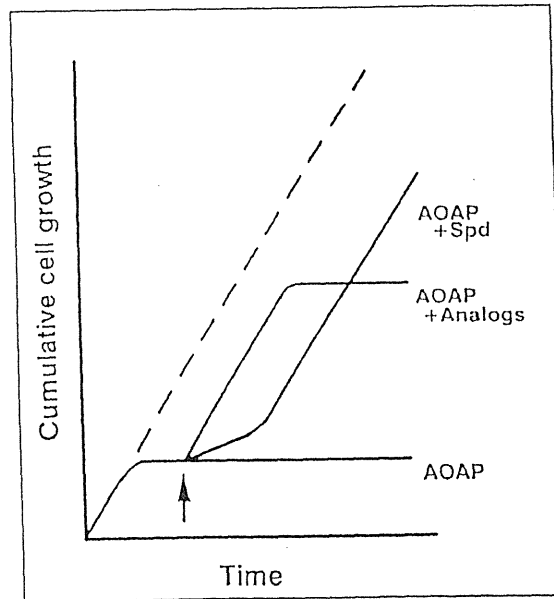


Fig. 1 ポリアミン欠乏 HTC 細胞におけるスペルミジンおよびアナログ体の増殖補助効果についての模式図

対数増殖期の細胞を50 $\mu$ M AOAP存在下2日間培養し、ポリアミン欠乏状態にしたところに、AOAPおよび10 $\mu$ M Spdあるいはアナログ体を含む培地に移し（矢印）培養した時の増殖曲；

### Spermidine Analogs

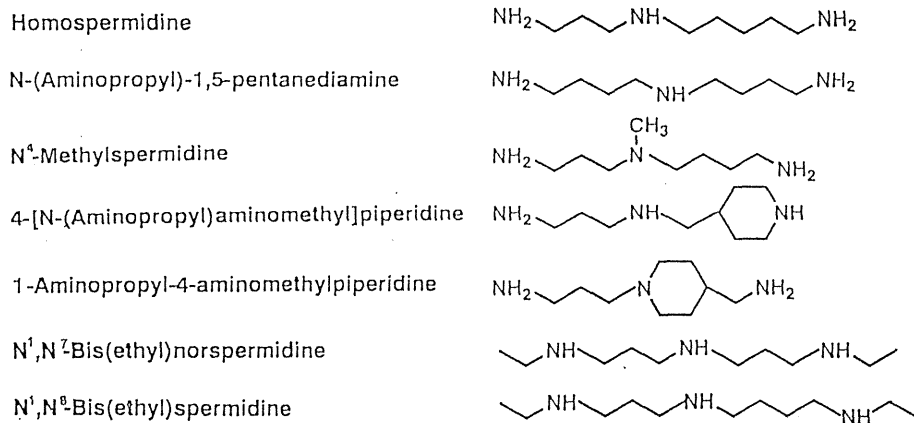


Fig. 2 ポリアミン欠乏 HTC 細胞に対して短期的に増殖の回復作用を示したスペルミジンアナログの構造



## 1 細胞死を起こすスペルミジンアナログの構造特異性

### 1-1 スペルミジン投与による一時的な増殖回復の遅れと AOAP 処理日数の関係

正常に増殖している細胞を  $10\mu\text{M}$  のスペルミジンを含む培地に移しても増殖の停止は起こらないことから、この現象は AOAP による処理に起因するものであることが推察された。そこでまず、AOAP で細胞を処理する日数の影響を調べた。 $50\mu\text{M}$  濃度の AOAP で 2, 3 あるいは 4 日間処理した細胞を集めたのち、 $10\mu\text{M}$  濃度のスペルミジンおよび  $50\mu\text{M}$  AOAP を含む培地で 2 日間培養し、増殖曲線を作成した。その結果、Fig.3 に示すように AOAP 処理日数が増加するごとに一時的な増殖の回復の遅れが大きくなり、4 日目では細胞数の減少が観察された。

Table 1 には、スペルミジン投与後1日目のポリアミン量を示した。スペルミジン投与前の細胞ではいずれもプトレシンおよびスペルミジンが検出されずスペルミンがコントロール細胞の約50%検出されるのに対して（未発表）、スペルミジン投与後1日目の細胞において AOAP 2 日処理と 3 日処理では、コントロール細胞の 2.5 倍、4 日処理ではコントロール細胞の 3.6 倍量のスペルミジンの蓄積が認められた。その際、光学顕微鏡的には細胞数の減少が大きい場合、多くの細胞が縮小し、死細胞が増加していた。(Fig.4)

これらのことから、AOAP 処理日数延長により、スペルミジン投与による一時的な増殖の回復の遅れの程度が大きく、またそのとき取り込まれるスペルミジン量も多いこと、さらに回復の遅れは細胞死にいたる前段階であることが示唆された。

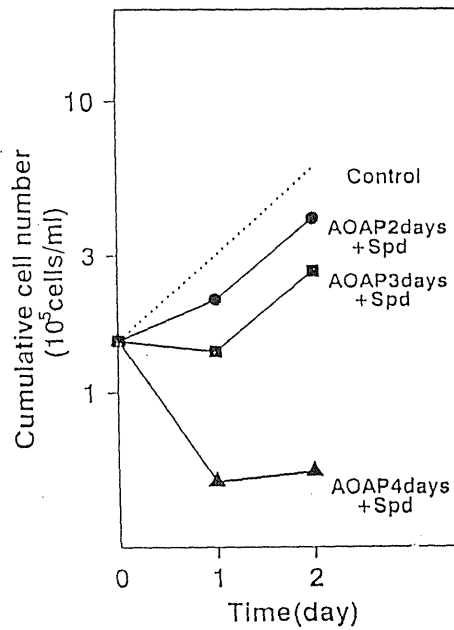


Fig. 3 スペルミジン投与による HTC 細胞の増殖阻害に対する AOAP 処理日数の影響

対数増殖期の細胞を50 $\mu$ M AOAP存在下2.0 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/mlで前培養を開始し、2日(●)、3日(■)あるいは4日目(▲)に集め、10 $\mu$ Mスペルミジンと50 $\mu$ M AOAPを含む培地に1-2 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/mlとなる様に移し培養を続けた。前培養では2日毎に培地を交換した。

Table 1 前培養における AOAP 処理日数の、スペルミジン投与後のポリアミン量への影響

Treatment	nmol/10 <sup>6</sup> cells		
	Put	Spd	Spm
Control	0.46	3.94	4.00
AOAP 2days+Spd	0.36	8.79	3.01
AOAP 3days+Spd	0.38	9.70	3.20
AOAP 4days+Spd	0.77	17.64	3.34

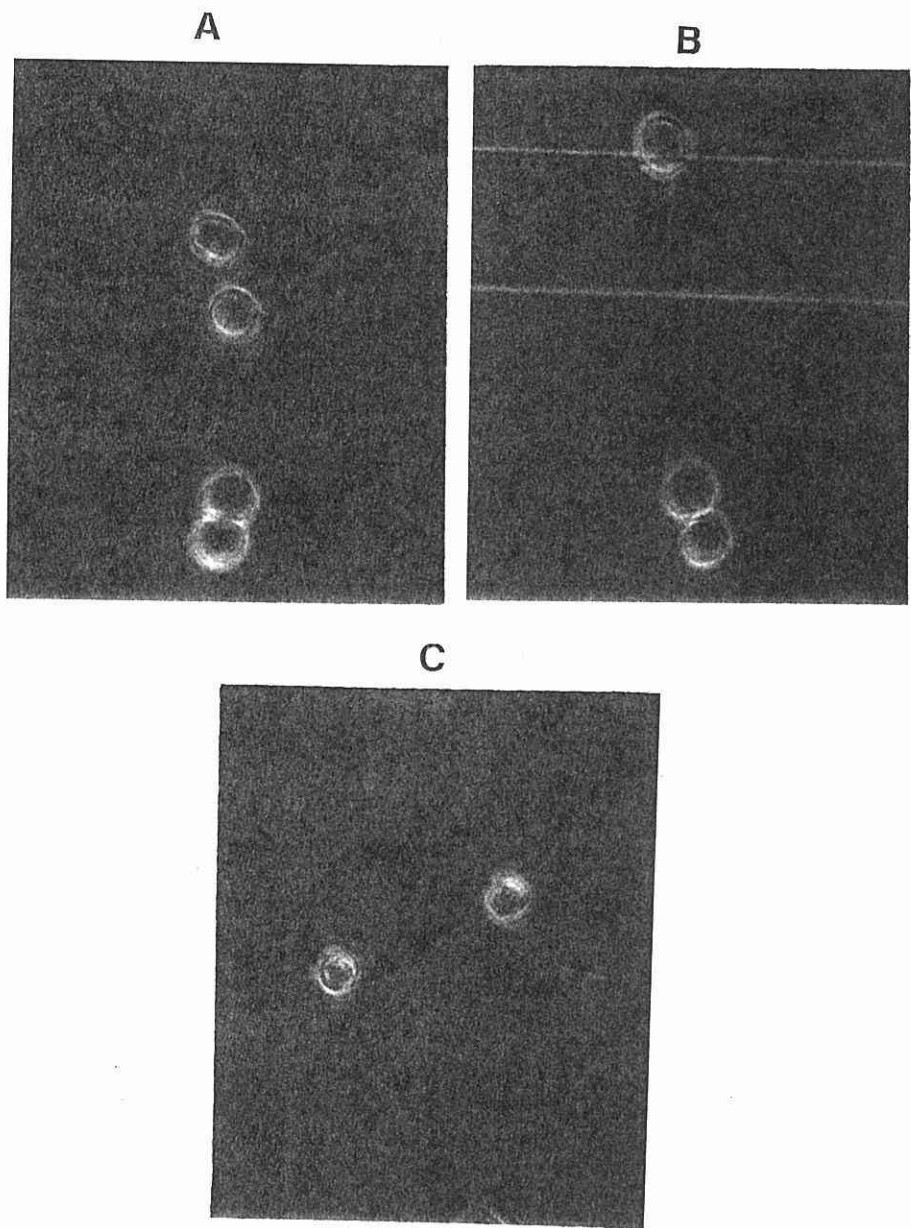


Fig. 4 HTC 細胞の光学顕微鏡による写真

## 1-2 細胞内スベルミジン量と細胞数との関係

スベルミジン投与による細胞数の減少が細胞内に過剰に蓄積したスベルミジン量に関係しているものと思われる。このことを確かめるために、スベルミジン投与量あるいはスベルミジン含有培地で培養する時間を変化させることにより検討した。細胞内に蓄積するスベルミジン量を調節するために、投与するスベルミジン量として  $0.1\mu\text{M}$  から  $10\mu\text{M}$  までの 5 点を取り、ポリアミン欠乏細胞に投与し 2 日間培養した。その結果、Fig. 5 に示すように、 $0.1\mu\text{M}$  投与では細胞増殖の回復が見られなかった。 $0.3\mu\text{M}$  および  $1\mu\text{M}$  ではコントロール細胞の増殖には至らないがゆっくりとした増殖が見られた。 $3\mu\text{M}$  で、細胞数の減少が観察され、 $10\mu\text{M}$  ではさらに大きな細胞数の減少を観察した。スベルミジン投与後 1 日目のポリアミン量を調べると (Table 2),  $0.1$  および  $0.3\mu\text{M}$  では、スベルミジンは検出限界以下だった。また  $1\mu\text{M}$  では  $10^6\text{cell}$  あたり  $2.1\text{nmol}$ ,  $3\mu\text{M}$  では  $12.2\text{nmol}$ ,  $10\mu\text{M}$  では  $22.3\text{nmol}$  蓄積していた。しかし、プトレシンおよびスベルミンは、コントロール細胞より少なかった。このことから、細胞内にスベルミジンが過剰蓄積したときに細胞数の減少が起こることが示唆された。

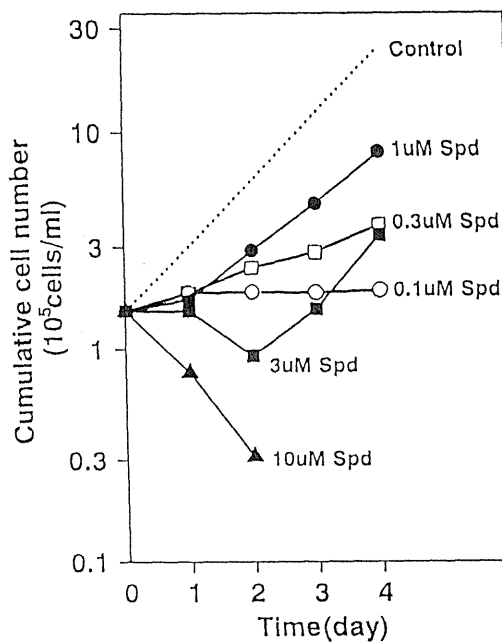


Fig. 5 スペルミジン投与濃度の、ポリアミン欠乏細胞の増殖への影響

対数増殖期の細胞を50 $\mu$ M AOAPを含む培地で4日間培養後、0.1 $\mu$ M (○), 0.3 $\mu$ M (□), 1 $\mu$ M (●), 3 $\mu$ M (■), あるいは10 $\mu$ M (▲) スペルミジンと50 $\mu$ M AOAPを含む培地でさらに4日間培養した。2日毎に行った培地交換に際しては、細胞濃度を1-2 $\times 10^5$  cells/mlとして培養を続けたが、細胞数は積算濃度として表示した。

Table 2 種々の濃度のスペルミジンをポリアミン欠乏細胞に投与したときのポリアミン量

Treatment	nmol/10 <sup>6</sup> cells		
	Put	Spd	Spm
Control	0.46	3.94	4.00
AOAP	<0.10	<0.10	1.90
AOAP+Spd (0.1 $\mu$ M)	<0.10	<0.10	2.03
AOAP+Spd (0.3 $\mu$ M)	<0.10	<0.10	2.62
AOAP+Spd (1 $\mu$ M)	<0.10	2.10	3.59
AOAP+Spd (3 $\mu$ M)	0.78	12.20	2.64
AOAP+Spd (10 $\mu$ M)	0.37	22.29	2.54

### 1-3 プトレシンおよびスペルミン投与との比較

細胞数の減少に関して、スペルミジン以外のポリアミンについても同様の傾向が見られるかどうかを確かめるために、AOAPで4日間処理した細胞に対するプトレシンおよびスペルミン投与の影響を調べた。その結果、Fig.6に示すように、プトレシン投与では細胞数の減少が見られないのに対し、スペルミンではスペルミジンと同程度の細胞数の減少を示した。このときのポリアミン量を調べると、Fig.7に示すように、プトレシン投与の場合は投与してから1時間で通常の約20倍量のプトレシンを取り込んだ後、スペルミジンおよびスペルミン量が上昇した。一方、スペルミン投与の場合は、スペルミジン投与の場合に蓄積するスペルミジン量と同程度のスペルミン量を蓄積しながらスペルミジン量が上昇した。これらの結果から、プトレシンそのものは細胞死を起こす作用が小さいこと、またスペルミンにもスペルミジンと同様に細胞死を引き起こす作用のあることが確かめられた。しかし、スペルミン投与の場合、スペルミンそのものに細胞死を起こす作用があるのか、またはスペルミン投与後変換されたスペルミジンの作用によるのかについての結論は得られなかった。

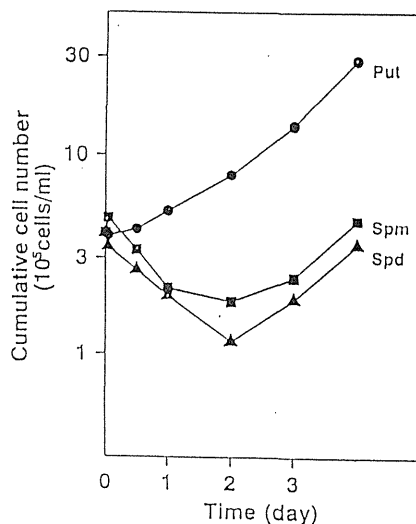


Fig. 6 プトレシンおよびスペルミンの、ポリアミン欠乏細胞の増殖への影響

対数増殖期の細胞を50 $\mu$ M AOAPを含む培地で4日間培養後、10 $\mu$ M プトレシン (●)、スペルミジン (▲)、あるいはスペルミン (■)とAOAPを含む培地で4日間培養した。2日毎に行った培地交換の際には細胞濃度を1-4 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/mlとして培養を続けたが、細胞数は積算濃度として表示した。

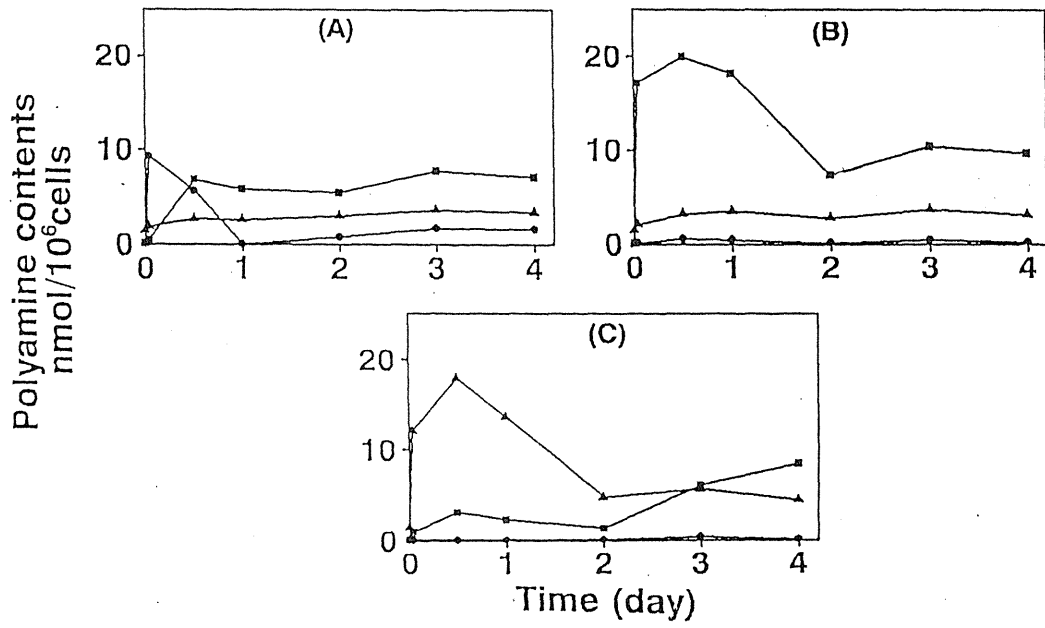


Fig. 7 ポリアミン欠乏細胞にプトレシンおよびスペルミンを投与したときの細胞内ポリアミン量

Fig. 6 においてプトレシン(A), スペルミジン(B), あるいはスペルミン(C)を投与したときの細胞内ポリアミン量の変化を示した.  
 プトレシン (●), スペルミジン (■), スペルミン (▲).

#### 1-4 スペルミジンアナログ体投与との比較

観察された細胞死について、スペルミジンの構造特異性があるかを調べた。スペルミジンのアナログ体は、Fig.8 に示す化合物を 10 $\mu$ M 濃度で用いた。その結果、Fig.9 に示すようにホモスペルミジン、N<sup>1</sup>-メチルスペルミジンはスペルミジンと同様の細胞数の減少を示したのに対し、N-(アミノプロピル)-1,5-ペンタジアミン、N<sup>4</sup>-メチルスペルミジン、N<sup>8</sup>-メチルスペルミジン、1-(3-アミノプロピル)-4-アミノメチルピペリジンでは細胞数の減少を示さず、アナログ体のグループ分けができることが示唆された。Fig.10 に示すように、スペルミジンおよびアナログ体を投与してからのポリアミンおよびアナログ体量を調べると、いずれも急激に取り込まれた後、減少しある一定値を維持するような推移を示した。特にスペルミジンとN-メチル置換体の蓄積量はスペルミジンの蓄積量と近似していた。また、N<sup>1</sup>-メチルスペルミジンおよびN<sup>8</sup>-メチルスペルミジンでは、それぞれプトレシンおよびメチルプトレシンとHPLC上保持時間の同じ成分が検出され、これらがポリアミンの逆経路により分解されたことが示唆された。一方、もっとも急激な細胞数の減少を示したホモスペルミジン投与では、投与後12時間でスペルミジンの蓄積量の3倍量が蓄積していた。また、細胞数の減少を起こさないN-(アミノプロピル)-1,5-ペンタジアミン、1-(3-アミノプロピル)-4-アミノメチルピペリジンでは、蓄積量は他のアナログ体に比べて少なかった。

これらの結果を総合すると、蓄積する量が多いアナログ体は細胞数の減少が大きくなる傾向にあり、またN-メチル置換体のように蓄積量にほとんど差が見られない場合も細胞数の減少の程度に差が生じることから、蓄積量ばかりでなくその化学構造も細胞死にいたる上では重要であることがわかった。また、細胞数の減少を引き起こす共通構造としては、N<sup>1</sup>-メチルスペルミジン、ホモスペルミジンのようにトリアミン分子のプトレシン構造の窒素原子に置換基がない場合にスペルミジンと同様の細胞数の減少が起こり、置換基がある場合に細胞数の減少が起こりにくくなることがわかった。



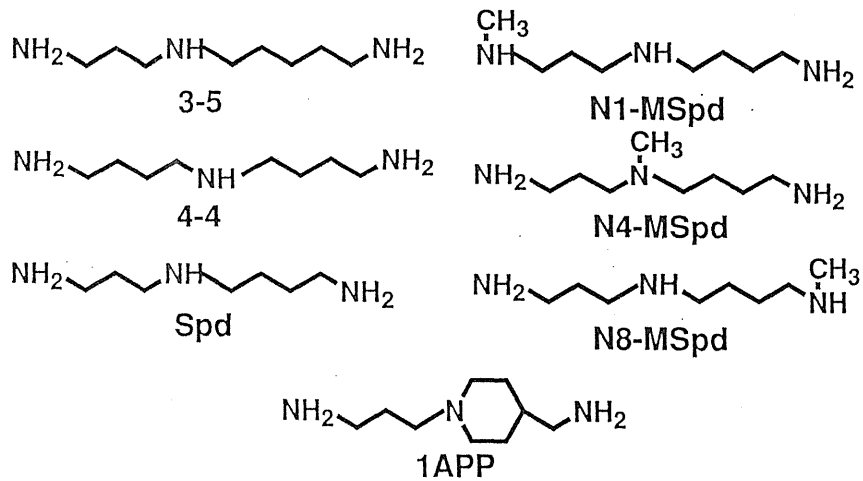


Fig. 8 本研究で用いたスperlミジンアナログの構造

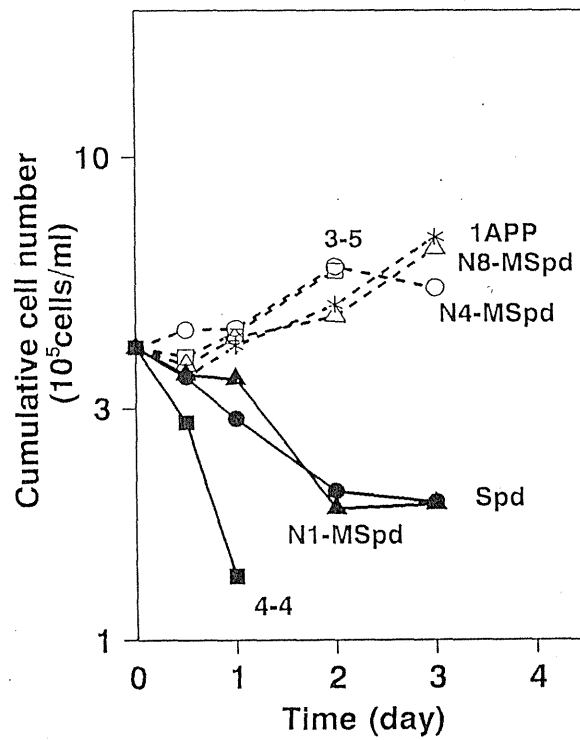


Fig. 9 ポリアミン欠乏細胞におけるスperlミジンアナログの増殖への効果

対数増殖期の細胞を50 $\mu$ M AOAPを含む培地で4日間培養後、10 $\mu$ Mアナログ体  
 あるいは10 $\mu$ Mスperlミジンと50 $\mu$ M AOAPを含む培地で4日間培養した。  
 2日毎に行った培地交換の際には、細胞濃度を1-4 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/mlとして  
 培養を続けたが細胞数は積算濃度とした。  
 N<sup>1</sup>-メチルスperlミジン (▲), N<sup>4</sup>-メチルスperlミジン (○),  
 N<sup>8</sup>-メチルスperlミジン (△),  
 1-(3-アミノプロピル)-4-アミノメチルピペリジン (\*),  
 N-(3-アミノプロピル)カダベリン (□), ホモスperlミジン (■),  
 スperlミジン (●).

Polyamine contents  
nmol/10<sup>6</sup> cells

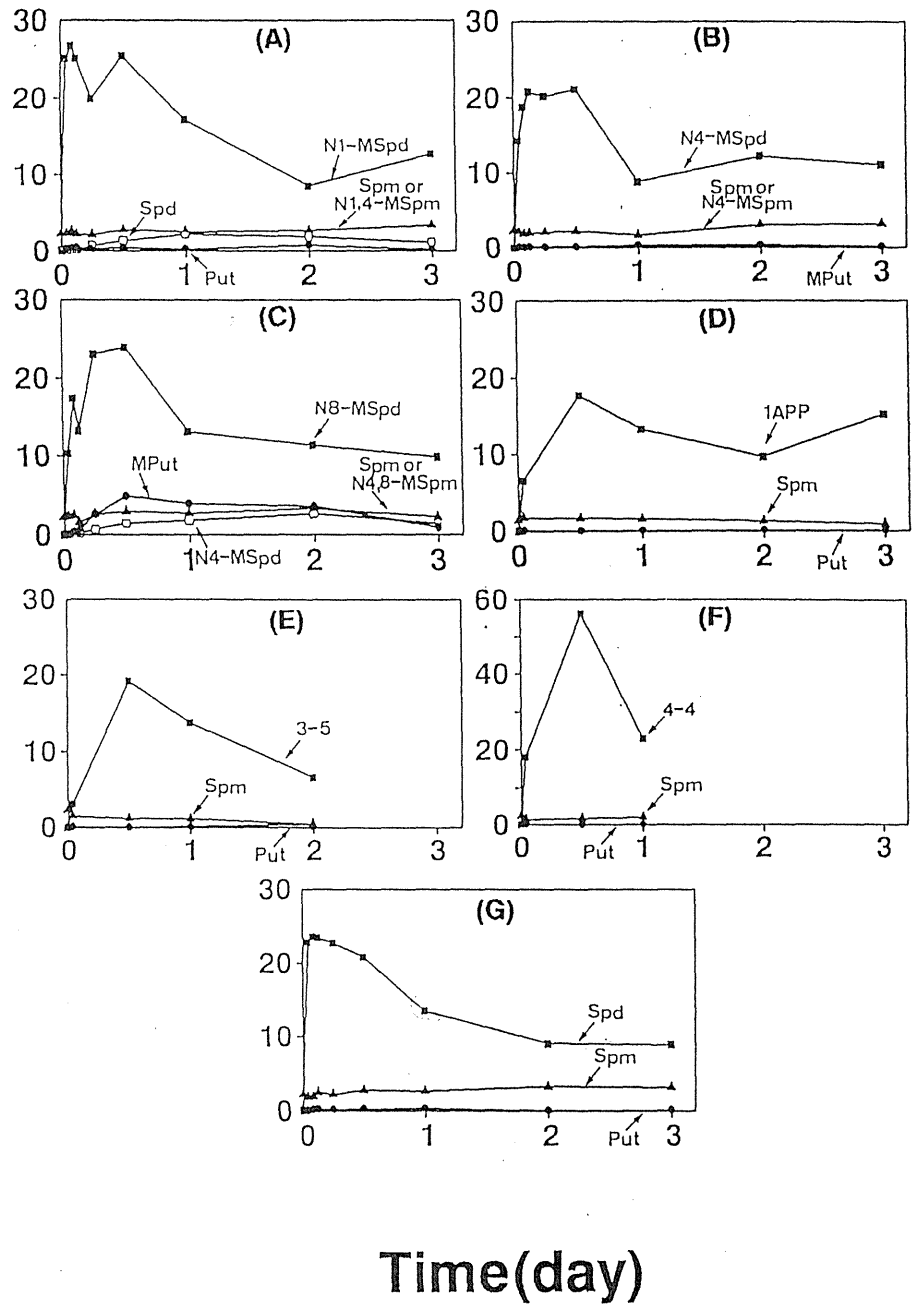


Fig. 10 ポリアミン欠乏細胞にスペルミジンアナログを投与したときの細胞内ポリアミン量およびアナログ体量

Fig. 9 においてN<sup>1</sup>-メチルスペルミジン(A), N<sup>4</sup>-メチルスペルミジン(B), N<sup>8</sup>-メチルスペルミジン(C), 1-(3-アミノプロピル)-4-アミノメチルピペリジン(D), N-(3-アミノプロピル)カダベリン(E), ホモスペルミジン(F), あるいはスペルミジン(G)を投与した場合のポリアミン量を示した。

## 1-5 血清中のアミン酸化酵素の影響

これまでに、スペルミジン投与による一時的な増殖回復の遅れが、AOAP処理日数の延長により大きくなり、ついには細胞死が観察されること、また、細胞内にスペルミジンを多量に蓄積するほど細胞数の減少の度合いが大きくなることを明らかにした。次に、このスペルミジン過剰蓄積の際起こる細胞死が、蓄積したスペルミジンの直接作用によるものか、スペルミジンが代謝される結果による二次的な作用なのかどうかを明らかにすることを試みた。

ポリアミンは、血清中のアミン酸化酵素によりアクロレインを生じ細胞毒性を示すことが知られている。本研究ではその反応を防ぐ目的でアミン酸化酵素阻害剤であるアミノグアニジン培地中に添加したが、スペルミジン投与によるこの細胞死が微量に生成するスペルミジンの分解物に起因する可能性は否定できない。そこで、まずアミン酸化酵素の活性が比較的高い新生仔牛血清から活性がほとんどないとされる馬血清にかえた場合やアミン酸化酵素の阻害剤であるアミノグアニジンの濃度を変えた場合にどのような影響がでるか調べた。その結果、血清の種類やアミノグアニジン濃度を変えてもスペルミジンの蓄積と細胞数の減少は同様に観察された。

## 1-6 スペルミジンおよびN<sup>4</sup>-メチルスペルミジンの代謝変化

細胞内においてスペルミジンの代謝物が細胞死を引き起こすことも考えられる。そこで、細胞内に取り込まれたスペルミジンあるいはそのアナログ体である N<sup>4</sup>-メチルスペルミジンがどれくらいの割合で代謝されるのかを放射標識体を用いて調べた。その結果、Table 3 および 4 に示すようにスペルミジンおよび N<sup>4</sup>-メチルスペルミジンいずれの場合も、逆経路におけるポリアミン酸化酵素によって生成するジアミンの分画およびアミノプロピル化されて生成するテトラミンの分画に放射活性の移行が検出されたのみで、クロマトグラム上放射活性のピークは他の分画には検出されなかった。したがって、この細胞死はスペルミジンが代謝された結果起こることを完全には否定できないものの、蓄積したスペルミジンの直接作用の結果起こるものであろうと思われた。

Table 3 HTC 細胞に取り込まれた <sup>3</sup>H-スペルミジンの代謝

対数増殖期の細胞を 50 $\mu$ M AOAPを含む培地で4日間培養後、10 $\mu$ M <sup>3</sup>H-スペルミジンおよび50 $\mu$ M AOAPを含む培地に移し、1時間、6時間、12時間あるいは24時間後に細胞を集め、実験の部に示すような方法で分析した。数値は細胞内に取り込まれた放射能に対するプトレシン分画(Put)、スペルミジン分画(Spd)、スペルミン分画(Spm)に回収された放射能およびいずれの分画にも回収されなかった放射能(unknown)の割合をそれぞれ示した。

Treatment	Put	Count(%)			
		Spd	Spm	unknown	
AOAP 4days +Spd	1hr	0.2	97.7	1.7	0.4
	6hr	0.7	92.2	4.7	2.4
	12hr	0.7	90.6	6.0	2.7
	24hr	1.3	85.7	9.5	3.5

Table 4 HTC 細胞に取り込まれた  $^{14}\text{C}$ -メチルスベルミジンの代謝

対数増殖期の細胞を  $50\mu\text{M}$  AOAPを含む培地で4日間培養後、 $10\mu\text{M}$   $^{14}\text{C}$ -メチルスベルミジンおよび  $50\mu\text{M}$  AOAPを含む培地に移し、1時間、6時間、12時間あるいは24時間後に細胞を集め、実験の部に示すような方法で分析した。数値は細胞内に取り込まれた放射能に対するN-メチルプトレシン分画(MPut), N<sup>4</sup>-メチルスベルミジン分画(N4-MSpd), N<sup>4</sup>-メチルスベルミン分画(N4-MSpm)に回収された放射能およびいずれの分画にも回収されなかった放射能(unknown)の割合をそれぞれ示した。

Treatment		Count(%)			
		MPut	N4-MSpd	N4-MSpm	unknown
AOAP4days +N4-Spd	1hr	0.1	97.7	1.7	0.5
	6hr	0.4	96.6	1.8	1.2
	12hr	0.8	95.6	2.9	0.7
	24hr	1.2	88.1	10.0	0.7

### 3 スペルミジンの過剰蓄積による細胞死の形態的および生化学的特徴

#### 3-1 形態的特徴

本研究で調べてきたスペルミジン過剰蓄積による細胞死は、光学顕微鏡で観察したところ細胞容積の縮小を特徴としていた。したがって、ネクローシス（壊死）とは異なるアポトーシスの可能性を疑った。両者の特徴はそれぞれ、ネクローシスが、ミトコンドリアなどに機能障害を起こした結果、浸透圧調節ができなくなり細胞溶解を起こす細胞死であるのに対し、アポトーシスは、細胞表面の平滑化、細胞容積の縮小およびDNAの凝縮に引き続く細胞の断片化によって特徴づけられている。そこで、スペルミジン過剰蓄積による細胞死が形態的にはどのようなものであるのか、顕微鏡を用いて調べた。

AOAP 4 日間処理の細胞にスペルミジンまたは  $N^4$ -メチルスペルミジンを投与してから 1 日目のものを試料とした。固定化した細胞をトルイジンブルー染色した後光学顕微鏡で観察すると、Fig.11 に示すように、スペルミジン投与の細胞では、コントロール細胞および AOAP 処理の細胞に比べて、観察される細胞像が小さく、核が強く染色されているものが非常に多かった。 $N^4$ -メチルスペルミジン投与群では、スペルミジン投与群で観察される細胞と同様に小さく核が強く染色された細胞が、少数ではあるが観察された。

これらの細胞を電子顕微鏡で観察すると、Fig.12 に示すように、コントロール細胞と AOAP 処理した細胞では、細胞内に空胞が若干増えているもののほとんど形態的变化はなかった。これに対して、スペルミジン投与群ではコントロール群に比べて細胞容積の縮小、膜表面の平滑化、核の凝縮と染色性の変化を観察した。さらに、ミトコンドリアは膨張しており傷害を受けていることが示唆された。また、 $N^4$ -メチルスペルミジン投与群の中で細胞容積が縮小しているものでは、スペルミジン投与群と同様な形態的变化を受けていることが観察された。

これらの特徴からミトコンドリアに傷害があるもののスペルミジン過剰蓄積による細胞死が、形態的にはアポトーシス様の細胞死であることがわかった。また、 $N^4$ -メチルスペルミジンもその頻度は低いがスペルミジンと同様に細胞に傷害を与えることが分かった。

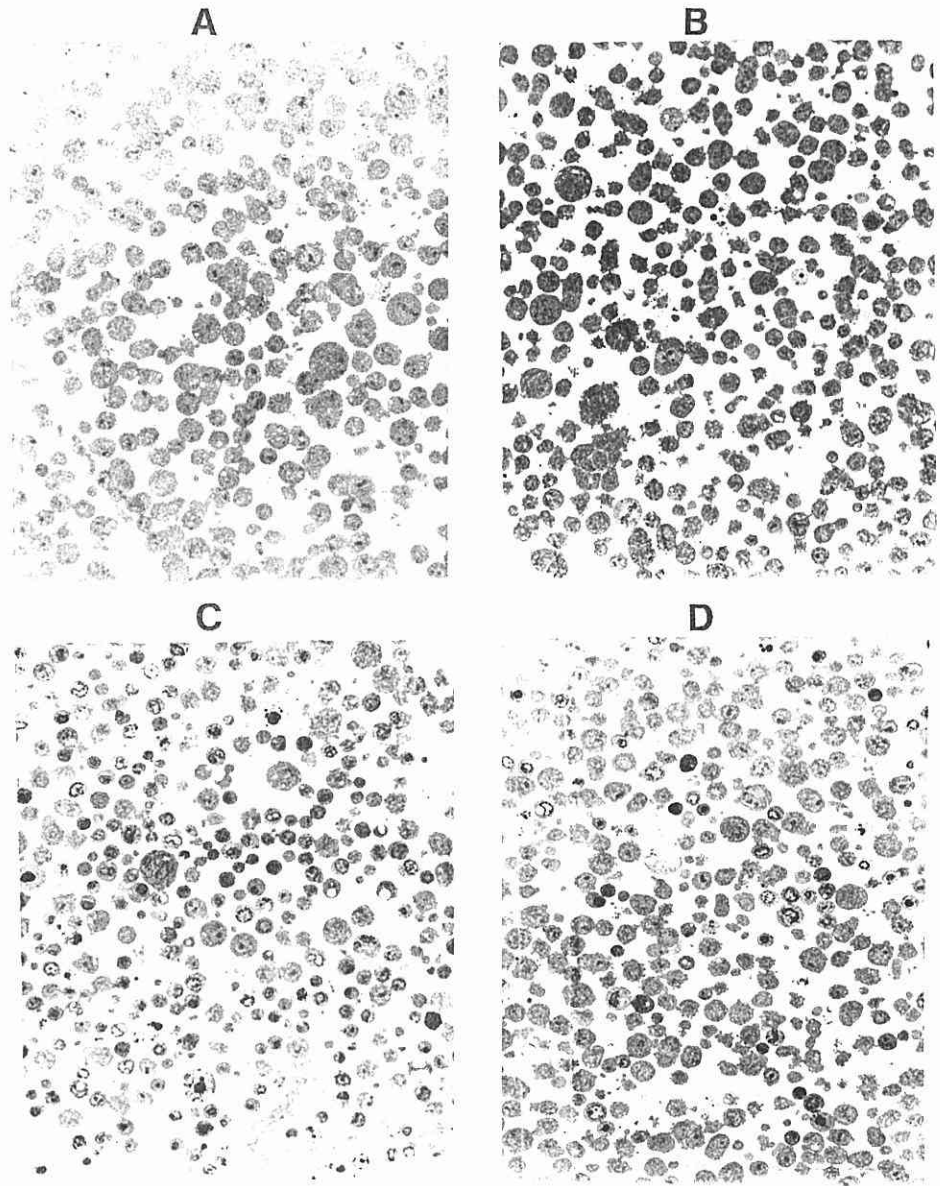


Fig. 11 ロレイジンブルーで染色した HTC 細胞

A:コントロール細胞, B:AOPで5日間処理した細胞  
C:AOPで4日間処理後, スペルミジンを投与してから1日目の細胞  
D:AOPで4日間処理後, N<sup>+</sup>-メチルスペルミジンを投与してから1日目の細胞  
倍率 : X110

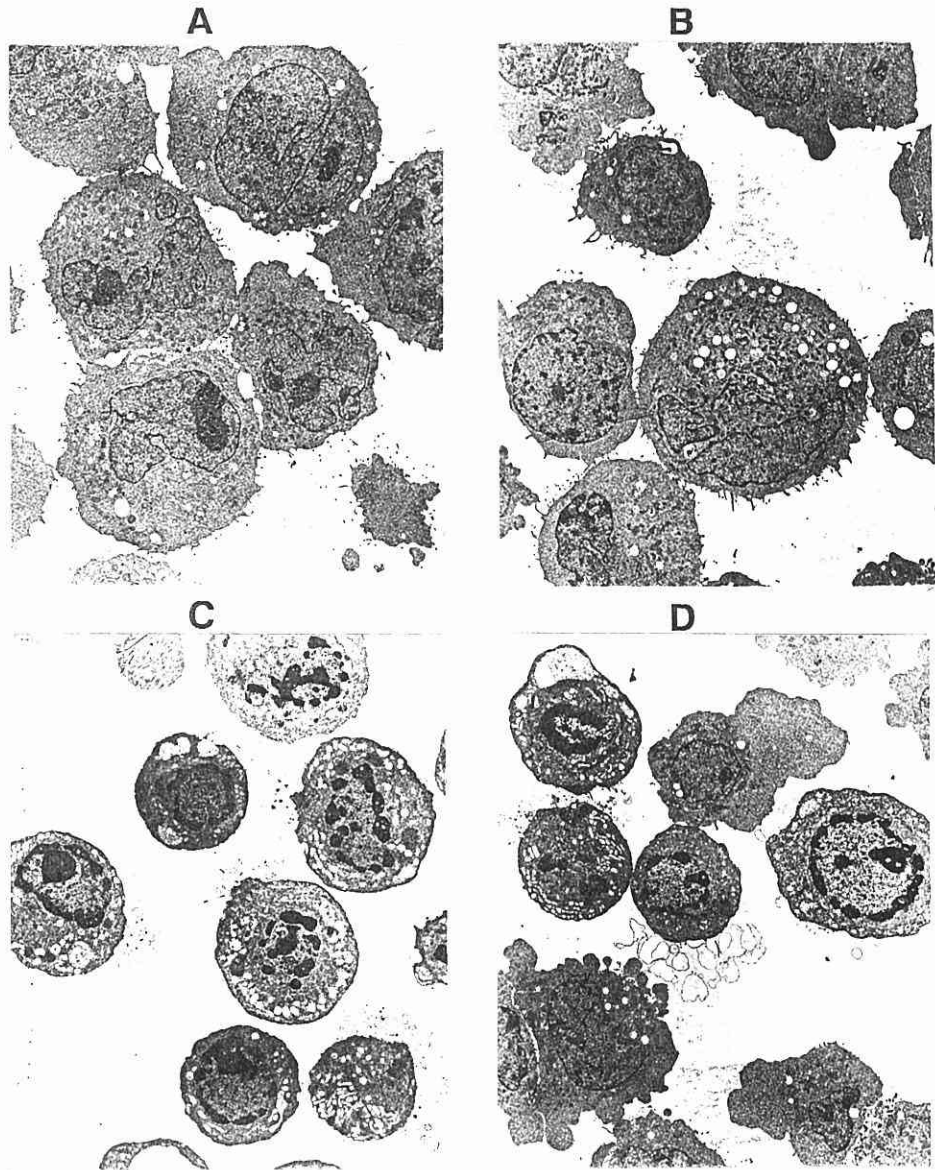


Fig. 12 HTC 細胞の電子顕微鏡写真

A: コントロール細胞, B: AOAPで5日間処理した細胞  
 C: AOAPで4日間処理後, スペルミジンを投与してから1日目の細胞  
 D: AOAPで4日間処理後, N<sup>1</sup>-メチルスペルミジンを投与してから1日目の細胞  
 倍率: X3,000



### 3-2 生化学的特徴

前章で述べたようにスペルミジン過剰蓄積による細胞死は、形態的にはアポトーシスに類似する細胞死であることが明らかになった。アポトーシスでは形態的な変化ばかりでなく、エンドヌクレアーゼの活性化により起こるDNAの断片化も重要な生化学的特徴になっている。また、アポトーシスでは多くの場合、遺伝子発現を伴うので新たな蛋白合成を必要とすることが多い。一方、ポリアミンは一般に蛋白合成系を活性化するが高濃度で強く阻害することが知られている。そこで、今回観察された細胞死がどのような生化学的変化を伴うのか、DNAの断片化について調べた。

アポトーシスに見られるDNAの断片化ではヌクレオソーム単位にDNAが不完全に切断されるため、細胞から抽出したDNAをアガロースゲル電気泳動で分析すると、1つのヌクレオソームに対応するDNA鎖長ずつ分子量のずれた多くの断片が梯子状にラダーバンドとして検出される。そこで、スペルミジン投与群およびN<sup>4</sup>-メチルスペルミジン投与群についてDNAを抽出しアガロースゲルを用いて分析した。その結果、Fig. 13に示すように、コントロール群に弱いながらもラダーバンドが検出されたのに対して、AOAP処理群、スペルミジン投与群、およびN<sup>4</sup>-メチルスペルミジン投与群では、明瞭なラダーバンドは検出されなかった。このことから、スペルミジン過剰蓄積による細胞死にはDNAの断片化が起こらず、ポリアミン量の低下およびスペルミジンの蓄積でDNAの断片化がむしろ抑制されることが示唆された。

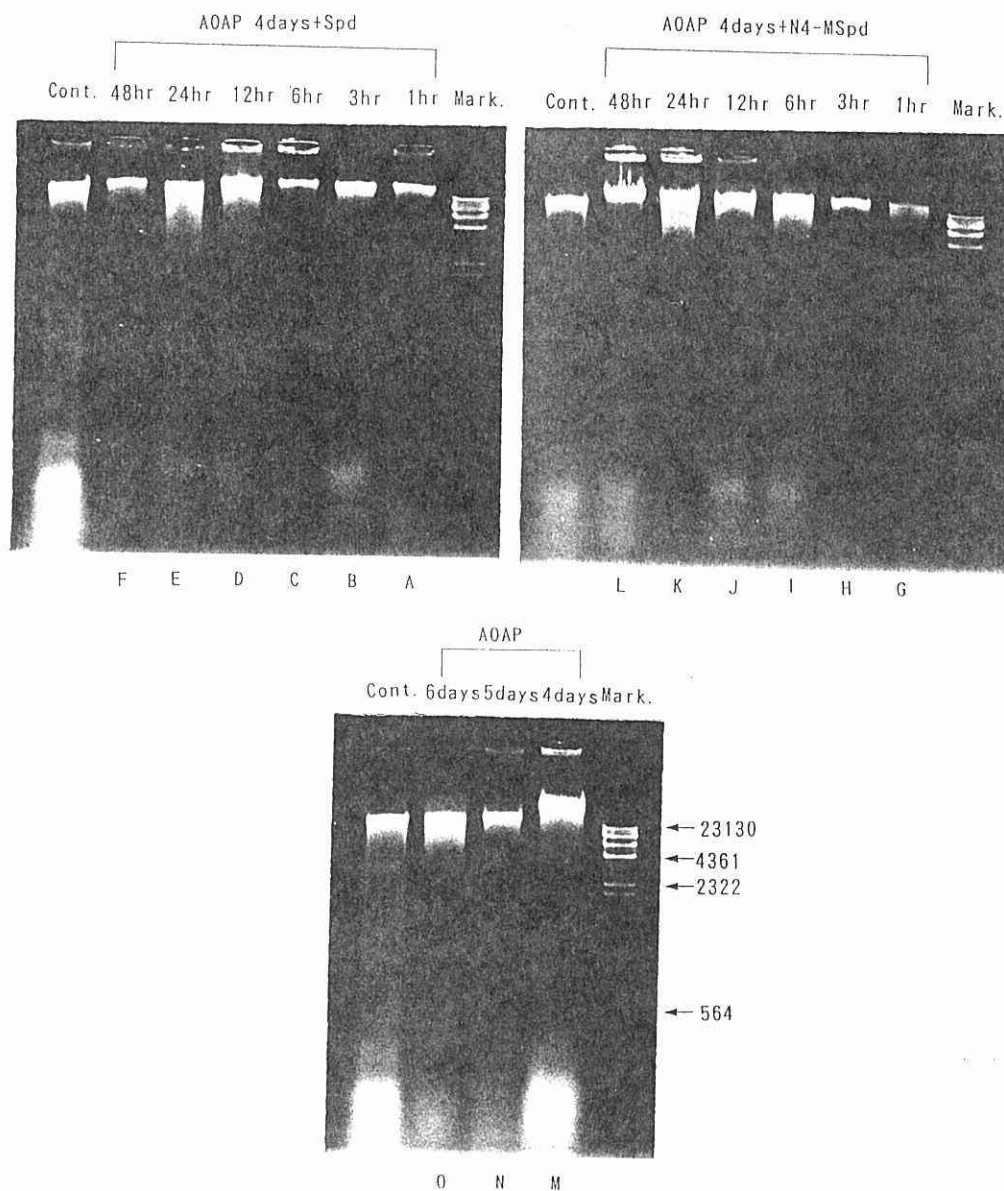


Fig. 13 HTC 細胞から抽出した DNA のアガロース電気泳動

A-E: 50 $\mu$ M AOAPを含む培地で4日間培養後, 50 $\mu$ M AOAPおよび10 $\mu$ M スペルミジンを含む培地で1-48時間培養した細胞  
 G-L: 50 $\mu$ M AOAPを含む培地で4日間培養後, 50 $\mu$ M AOAPおよび10 $\mu$ M N<sup>4</sup>-メチルスペルミジンを含む培地で1-48時間培養した細胞  
 M-O: 50 $\mu$ M AOAPを含む培地で4-6日間培養した細胞  
 Cont.: コントロール細胞, Mark. 分子重量マーカー

#### 4 スペルミジン過剰蓄積のメカニズム

スペルミジン過剰蓄積に関わる因子として、AOAP 処理によるポリアミン量の低下に基づくスペルミジン取り込み速度の増大、スペルミジン代謝の律速酵素である SSAT の活性低下などが考えられる。そこで、この節では、スペルミジン取り込み系、ポリアミン代謝系の AOAP の処理日数による変化を調べた。

##### 4-1 スペルミジン取り込み活性への影響

スペルミジンの取り込み活性の測定は、<sup>3</sup>H-標識スペルミジンを含む培地で細胞をインキュベーションして、細胞内に取り込まれる放射能を測定することで調べることができる。Fig.14 に AOAP 処理日数によるスペルミジン取り込み活性の変化を示した。AOAP 存在下、細胞を 2 日間培養すると、取り込み活性はコントロール細胞の約 4 倍に上昇した。しかし、培養日数を 4 日、6 日としてもスペルミジンの取り込み活性は、若干の増加は認められたものの著しい活性の変化は見られなかった。したがって、ポリアミン量が低下したために誘導された取り込み活性の違いによっては、AOAP 2 日処理と 4 日、6 日処理におけるスペルミジンの蓄積量の差は説明できなかった。

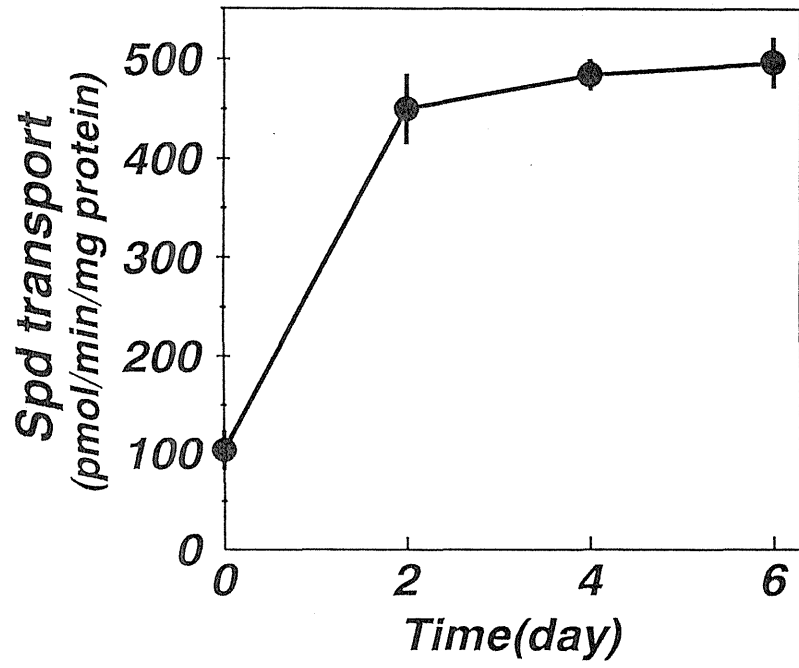


Fig. 14 AOP 処理によるスベルミジン取り込み活性の誘導

#### 4-2 生合成代謝酵素活性への影響

スベルミジンの蓄積が細胞内のスベルミジン代謝活性の低下に基づくかどうかを知るために、ポリアミン代謝の律速酵素である SSAT の活性を測定した。SSAT は、ポリアミンの一級アミノ基をアセチル化して逆経路や細胞外に送り出す手助けをしており、刺激に対して変動の激しい誘導酵素であることが知られている。SSAT 活性は、2 日処理で対照の 50% にまで低下したが、それ以降は、大きな変化は認められず、2 日処理と 4 日処理以降のスベルミジンの蓄積の差を SSAT 活性によっては説明することは出来なかった。

一方、細胞内 ODC 活性は投与された AOAP によって阻害されているものと思われるが、ポリアミン欠乏状態によって、誘導酵素である ODC が誘導され、ポリアミンの生合成が活発になったためにスベルミジンが蓄積した可能性も否定できない。そこで、ODC の活性を測定した。その結果、ODC 活性は AOAP 2 日処理で一度上昇した後、4 日、6 日処理では順次低下した (Fig.15)。このことから、生合成系は、スベルミジンの蓄積には直接は関係していないことが明らかになった。

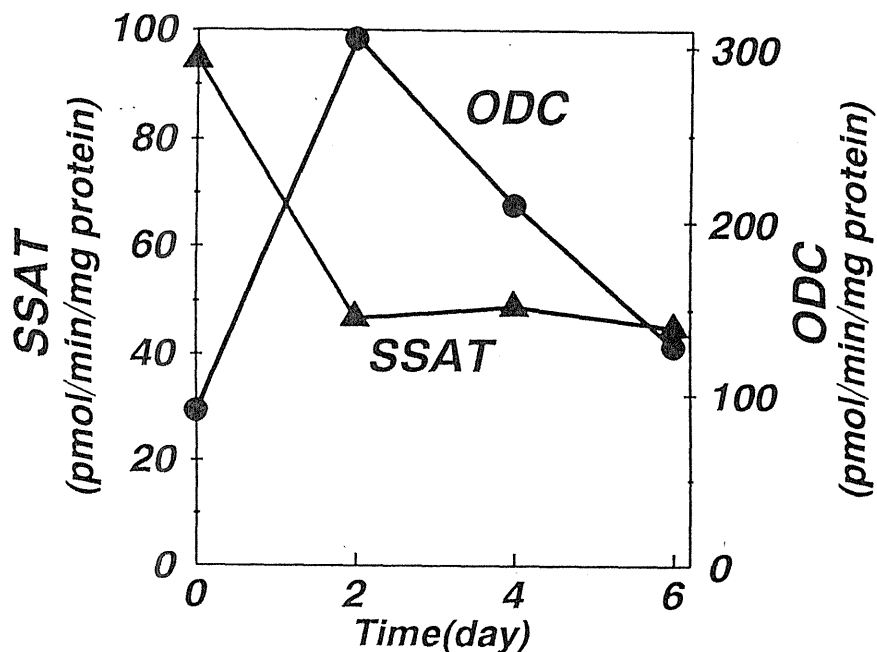


Fig. 15 AOAP 処理の SSAT 活性および ODC 活性への影響

#### 4-3 スペルミジン投与によるスペルミジン取り込み活性の抑制

ポリアミン取り込み系および SSAT 活性は、細胞内ポリアミン濃度の上昇によってそれぞれ速やかに抑制あるいは誘導されることが知られている。そこで、この節では、スペルミジン投与後スペルミジン取り込み系および SSAT 活性がどのように変化するかを調べた。

AOAP 処理の細胞にスペルミジンを投与して 1 時間、2 時間、3 時間、24 時間後の細胞について、スペルミジンの取り込み活性を調べた。その結果 Fig.16 に示すように、スペルミジンの取り込み活性はいずれの場合も速やかに抑制された。しかし、AOAP 2 日処理の細胞では、誘導された取り込み活性が、スペルミジンの投与後 1 時間で投与前の約 20% に抑制されたのに対して、AOAP 処理 4 日及び 6 日の細胞では約 60% までの抑制にとどまった。また、AOAP 6 日処理の細胞についてはスペルミジン投与後 24 時間たっても僅かではあるがスペルミジンの取り込み活性が検出された。このことから、AOAP の長期投与によってスペルミジンによる取り込み活性の抑制がかかり難くなっていることが明らかになった。

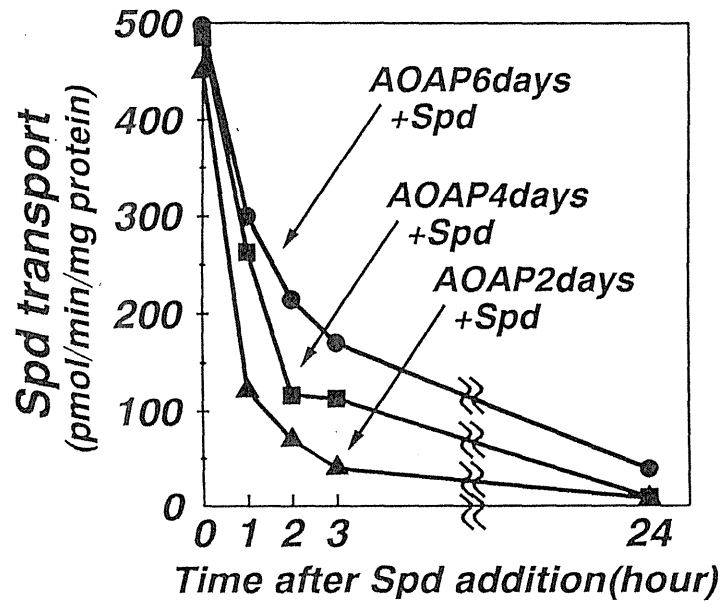


Fig. 16 AOAP 処理細胞におけるスペルミジン取り込み活性のスペルミジン投与による抑制

#### 4-4 スペルミジン投与による SSAT 活性の誘導

スペルミジンを投与して 4 時間後の細胞について SSAT 活性を調べた。SSAT 活性の誘導は、AOAP 処理日数が長いほど大きく、蓄積したスペルミジン量に応じて、誘導される活性も大きくなった (Fig.17)。このことは、スペルミジン投与 24 時間後のプロレシン量は AOAP 6 日処理の細胞で最も多かった (未発表) こととも矛盾しなかった。したがって、SSAT がスペルミジンの蓄積に直接は関与していないことが示唆された。

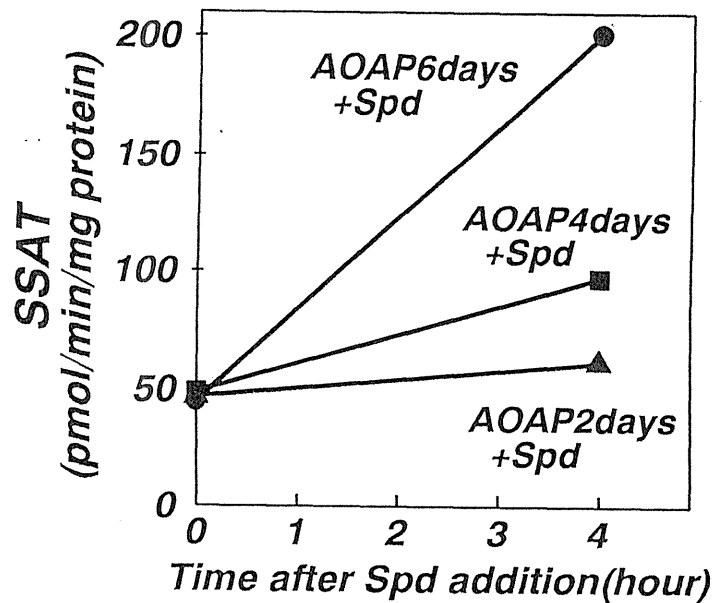


Fig. 17 AOAP 処理細胞における SSAT 活性のスペルミジン投与による誘導



#### 4-5 AOAP 処理日数の違いによる蛋白合成速度の変化

ポリアミン取り込み系の抑制には新たな蛋白合成の関与がすでに Mitchell らにより示唆されている。そこで、 $^{35}\text{S}$ -メチオニンのトリクロロ酢酸沈殿画分への取り込み量によって、細胞内蛋白合成速度を調べた。その結果、AOAP 処理によって蛋白合成は、細胞増殖が停止する 3 日を過ぎても低下し続け、4 日および 6 日処理ではそれぞれ対照の約 20%、まで低下することがわかった。また、低下した蛋白合成活性は、AOAP の処理日数に関係なくスペルミジンの投与後 24 時間までは回復しないこともわかった (Fig.11)。

このことから、AOAP の長期的な処理によって蛋白合成活性が低下するために、スペルミジン取り込み抑制に関わるタンパク質の新たな合成が起こりにくいことが示唆された。

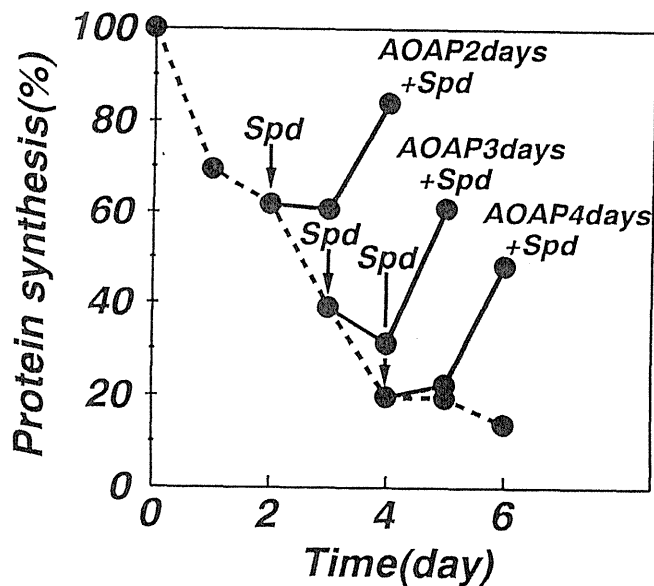


Fig. 18 AOAP 処理およびスペルミジン投与によるたん白合成能の変化

#### 4-5 蛋白合成阻害剤の影響

スペルミジンの蓄積が AOAP 処理による蛋白合成能の低下によって起こるのなら、蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシミドの細胞への投与で同じような現象が起こるはずである。そこでシクロヘキシミドの投与により、スペルミジン投与後のポリアミン欠乏細胞 (AOAP 4 日処理) の細胞数及びポリアミン量がどのようになるのか調べた。その結果、シクロヘキシミド存在下スペルミジンを投与すると、細胞数の減少はさらに著しく (Fig.12)、またその際、24時間後のスペルミジン量は、シクロヘキシミドを投与しない場合の2倍以上であった (Table.1)。

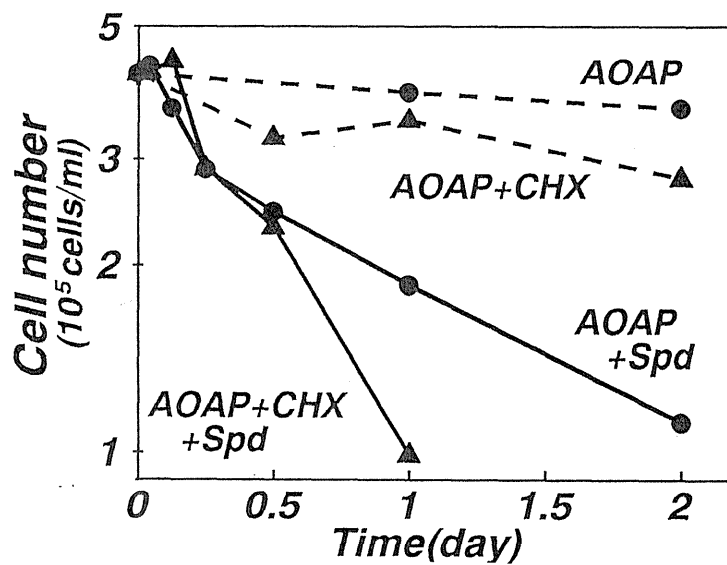


Fig. 19 AOAP 処理およびスペルミジン投与細胞の増殖へのシクロヘキシミドの影響

Table 5 シクロヘキシミドおよびスペルミジンを投与したAOAP 処理細胞のポリ  
アミン量

<i>Treat</i>	<i>Time after Spd addition (hr)</i>	<i>nmol/10<sup>6</sup> cells</i>		
		<i>Put</i>	<i>Spd</i>	<i>Spm</i>
<i>CHX (-)</i>	0	<0.10	<0.10	1.73
	1	<0.10	16.54	2.19
	24	0.39	15.09	3.57
-----				
<i>CHX (+)</i>	0	<0.10	<0.10	1.73
	1	<0.10	17.69	2.09
	24	0.54	38.82	5.01

## 5 ポリアミン導入試薬の開発

本研究は、ポリアミンの過剰蓄積の影響を調べるための導入試薬の開発をめざして、ポリアミンのジアセチル体を候補化合物として選び、ジアセチル体が細胞内に取り込まれた後、ポリアミン酸化酵素によってモノアセチルポリアミンを経由してポリアミンにまで変換されるかどうかを、試験管および培養細胞レベルで調べることを目的とした。

### 5-1 ポリアミンアナログの合成

ポリアミンの導入試薬の持つべき性質として、1)血清アミン酸化酵素に対して安定であること、2)細胞内にポリアミンと同様に取り込まれること、3)細胞内に取り込まれたのち速やかにポリアミンを生成すること、などがあげられる。血清アミン酸化酵素は、牛などの反すう動物の血清中に多く存在する酵素で、スペルミジン、スペルミンに対して反応性が高いが、アルキルモノアミンも基質にする。すでに基質特異性に関する報告があり、1級アミノ基を持つアミンに対して働くことが明らかになっている。したがって、培地中で安定なためには1級アミノ基を持たない構造が望ましいのではないかと考えた。次に、ポリアミンは選択的なATP依存性の取り込み系によって細胞に取り込まれることが知られており、実体は不明であるが、その取り込み系は主に電荷を認識した比較的ゆるい基質特異性を持つことが明らかになっている。したがって、この取り込み系を利用する導入試薬の候補化合物としてはポリアミンおよびその前駆体のプトレシンと同じように、2、3あるいは4個の電荷を持つ誘導体が望ましいのではないかと考えた。

先にも述べたように、細胞内ポリアミンはSSATによりアセチル化された後、効率よくPAOにより脱アセタミドプロピル化される。このPAOは、本来の基質であるモノアセチルポリアミンばかりでなく、ジアセチルスペルミンも基質にし、プトレシンにまで変換することが知られている。PAOの基質特異性については詳細な報告はないが、アセタミドプロピル基のかわりに、ベンジル誘導体からベンズアルデヒドを脱離することも知られており、基質認識が曖昧であることが示唆される。そこでこのことに着目し、長鎖のジアセチルポリアミンがPAOの基質に

なり，モノアセチル体を経由して対応するポリアミンに変換されるのではないかと考えた．これらのことから，導入試薬の候補化合物として，ジアセチルポリアミンを選び合成を行った．

当研究室では，これまでに多くのポリアミン類似体を合成してきた．当初，すでに合成済みのテトラアミン，ペンタアミン，ヘキサアミンを利用し，無水酢酸によりアセチル化したのち，イオン交換カラムにより分離精製することでジアセチルポリアミンを調製することを計画し検討を行った．しかし，モノアセチル体との完全な分離が困難であること，グラムスケールの合成にカラム操作は無理であること，等の理由によりイオン交換カラムクロマトグラフィーを必要としない合成法を検討した．

すでに当研究室で確立したポリアミン合成法を応用し，Fig.20-23 に示すように行った．すなわち，テトラアミンのジアセチル体の合成 (Fig.20) では，まず，N,N'-ジベンジルジアミノアルカンにフタルイミドアルキルブロミドを KF-Celite 存在下反応させたのち，フタルイミドを除去し，2級アミノ基をベンジル基で保護したテトラアミンを合成した．つぎに両端の1級アミノ基をピリジン中無水酢酸と反応させてアセチル化し，ベンジル基を接触還元で除去して目的物をジベンジル体から高収率で得ることができた．

ペンタアミンのジアセチル体の合成 (Fig.21) も，N,N',N''-トリベンジルアザジアミノアルカンに，テトラアミンのジアセチル体の場合と同様にして，アミノアルキル基を導入後アセチル化し，ベンジル保護基を除去することで比較的収率よく目的物を得ることができた．なお，N,N',N''-トリベンジルアザジアミノアルカンについては，まず，ポリアミン合成法における中間体を得る方法で合成したが，大量調製のため，入手可能なアザジアミノアルカンから合成する経路を新たに確立して用いた (Fig.22)．

ヘキサアミンのジアセチル体の合成 (Fig.23) は，まずテトラアミンのアセチル体の合成中間体として得たジベンジルトetraアミンの両端アミノ基をベンズアルデヒドおよび水素化ホウ素ナトリウムによりベンジル化して N,N',N'',N'''-テトラベンジルアザジアミノアルカンを合成した．次にそれにアミノアルキル基を導入しアセチル化したのち，ベンジル基を除去して行い合成することができた．

以上、合成したジアセチルポリアミンの m. p. および略号をまとめて Table 6 に示す。

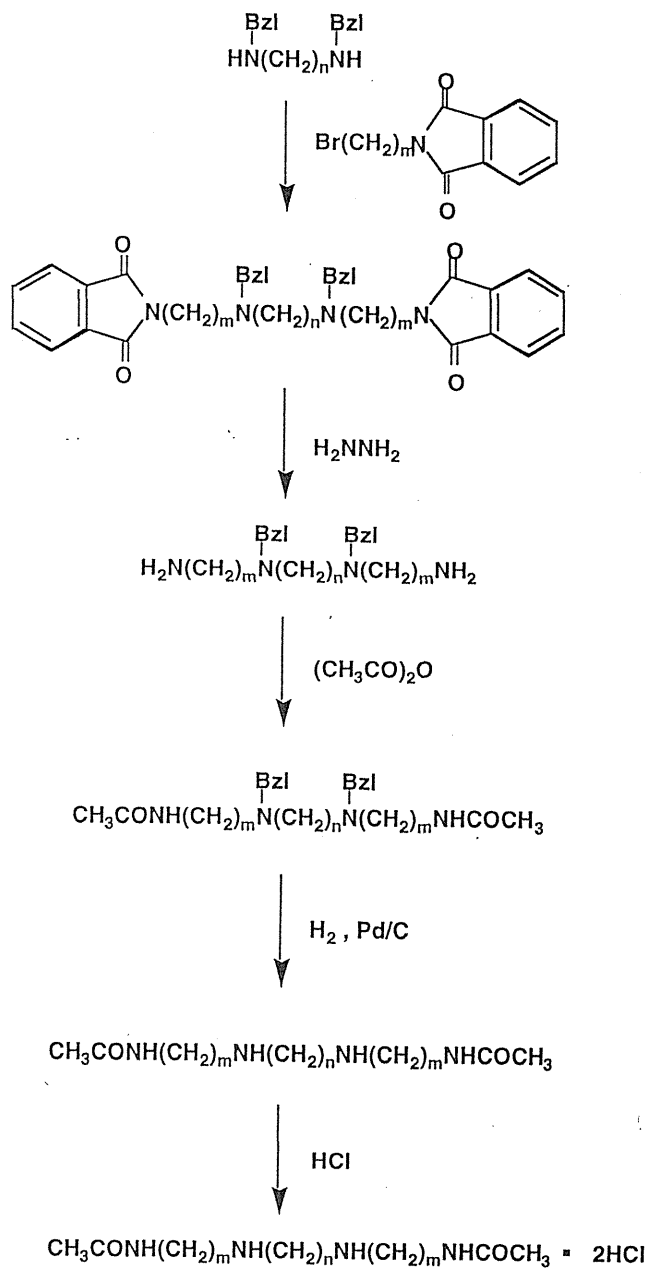


Fig. 20 ジアセチルテトラアミンの合成

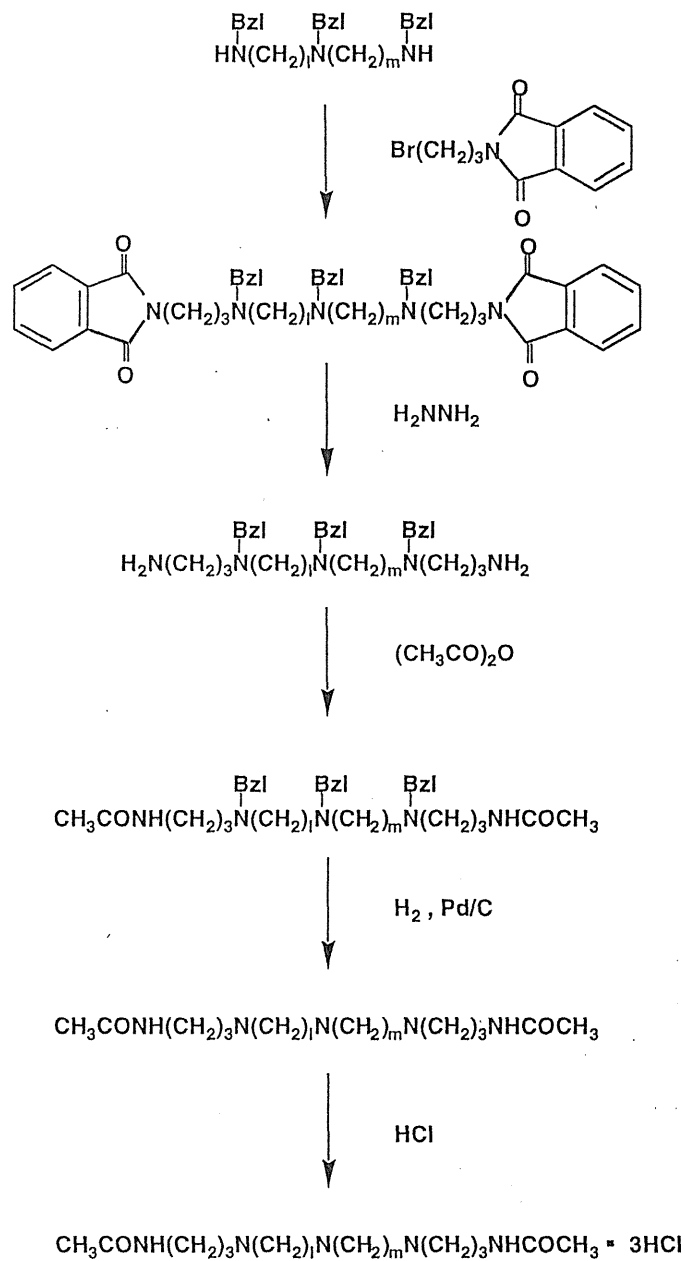


Fig. 21 ジアセチルペンタアミンの合成

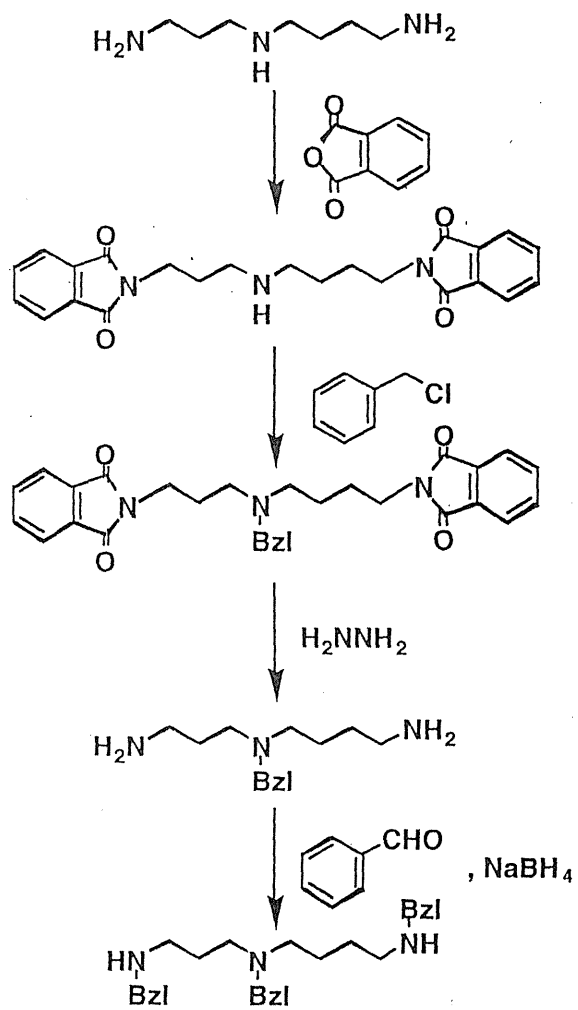


Fig. 22 トリベンジルスperlミジンの合成



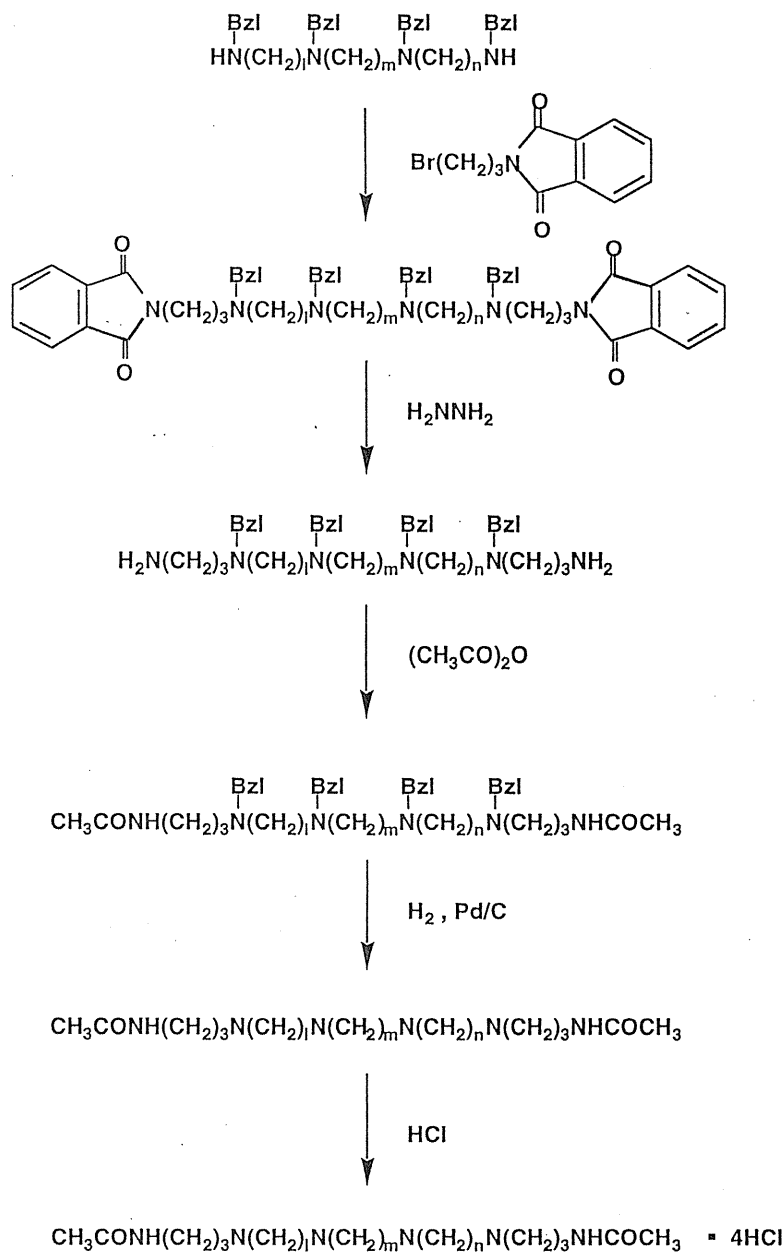


Fig. 23 ジアセチルヘキサアミンの合成

Table 6 本研究で合成したジアセチルポリアミン

compound	structure	m.p.
DA 333	$\text{CH}_3\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3 \cdot 2\text{HCl}$	227-229
DA 343	$\text{CH}_3\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3 \cdot 2\text{HCl}$	233-236(dec.)
DA 444	$\text{CH}_3\text{CONH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3 \cdot 2\text{HCl}$	238-242(dec.)
DA 3333	$\text{CH}_3\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3 \cdot 3\text{HCl}$	247-249(dec.)
DA 3343	$\text{CH}_3\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3 \cdot 3\text{HCl}$	251-258(dec.)
DA 3443	$\text{CH}_3\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3 \cdot 3\text{HCl}$	261-262(dec.)
DA 33333	$\text{CH}_3\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3 \cdot 4\text{HCl}$	274-277(dec.)
DA 33433	$\text{CH}_3\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3 \cdot 4\text{HCl}$	>290
DA 34443	$\text{CH}_3\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3 \cdot 4\text{HCl}$	260-270(dec.)

## 5-2 ジアセチルポリアミンのポリアミン酸化酵素に対する基質性と培地中における安定性

調製したジアセチルポリアミン (Table 6) が、ポリアミン酸化酵素の基質になりポリアミンを生成するかどうか、また、血清アミン酸化酵素を含む血清含有培地中で安定であるかどうかを確かめるため、ラット肝臓の部分精製 PAO に対する基質性および仔牛血清を含む培地中での安定性を試験管内で検討した。

部分精製酵素とジアセチルポリアミンとの反応性の検討は、Seiler らの活性測定法の条件を用いて行った。すなわち、アミン酸化酵素とジアミン酸化酵素阻害剤存在下、0.56 mM のジアセチルポリアミンから生成するモノアセチル体およびポリアミンを 1 級アミノ基を検出するオルトフタルアルデヒド-蛍光検出 HPLC により追跡した。まず、ジアセチルテトラアミンについて調べると、DA333 および DA343 からモノアセチルノルスベルミジン (Ac33) およびモノアセチルスベルミジン (Ac34) がそれぞれ検出され、少量のジアミンにまで代謝されたが、DA444 はほとんど基質にならないことがわかった (Fig. 24)。このことから、脱離するアセタミドプロピル基がアセタミドブチル基に変わると基質性が低下し、ポリアミンの導入試薬としては両端にアセタミドプロピル基を持つ誘導体が望ましいことが推察された。

ジアセチルテトラアミンの結果から、両側にアセタミドプロピル基を持つ DA3333, DA3343, DA3443 の基質性の違いをつぎに調べた (Fig. 25)。DA3333 および DA3343 は、一度脱アセタミドプロピル化された後、速やかにもう一度脱アセタミドプロピル化され、ノルスベルミジン (33) およびスベルミジン (34) を生成することがわかった。大過剰のジアセチル体存在下、極めて効率よくモノアセチル体の代謝物 (すなわち 33 および 34) が検出されることから、テトラアミンのモノアセチル体の酵素に対する  $K_m$  値はジアセチルペンタアミンの  $K_m$  値に比べて非常に小さいことが示唆された。一方、DA3443 では、モノアセチル体に代謝された後もう一度代謝されたホモスベルミジン (44) が検出されなかったことから、アセタミドプロピル基の脱離され易さは、電荷を有する窒素原子間の距離にも関係することが示唆された。また、テトラアミンに比べてペンタアミンの方がポリアミンにまで代謝され易かった。

テトラアミンよりもペンタアミンの方がポリアミンを効率よく生成することから、ヘキサアミンではどうかと考え、そのジアセチル体であるDA33333, DA33433, DA34443 の基質性をつぎに調べた (Fig.26). いずれのジアセチルヘキサアミンからも生成物が検出されたが、予想されるモノアセチル体のほかにモノアセチルテトラアミンと思われるものおよびその代謝物であるトリアミンも検出された。このことから、アルキル基の切断反応の特異性はそれほど高くないことが示唆された。

血清含有培地における安定性を調べることを目的として、アミン酸化酵素を比較的多く含む仔牛血清を含有した培地中に 10 $\mu$ M 濃度のスベルミジンあるいは DA3333 および DA3343 を投与した際、37 $^{\circ}$ Cにおける濃度変化を HPLC により調べた。その結果 Fig.27 に示すように、スベルミジンが 1 時間でほぼ 100% 分解されたのに対し、DA3333は、12 時間、24 時間後でそれぞれ残存率 78%, 75%で、DA3343は、12 時間、24 時間後でそれぞれ残存率 65%, 59%とスベルミジンに比べて明らかに安定であることがわかった。

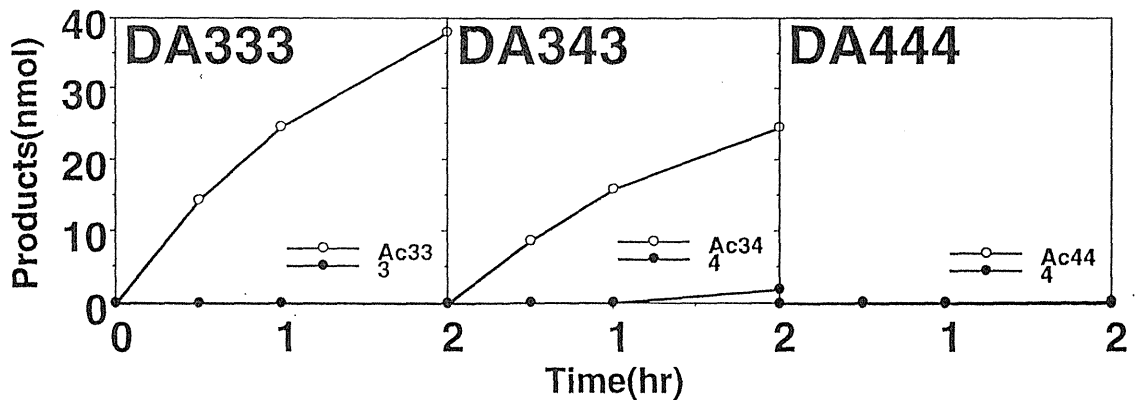


Fig. 24 部分精製したポリアミン酸化酵素によるジアセチルヘキサミンからのジアミンの生成

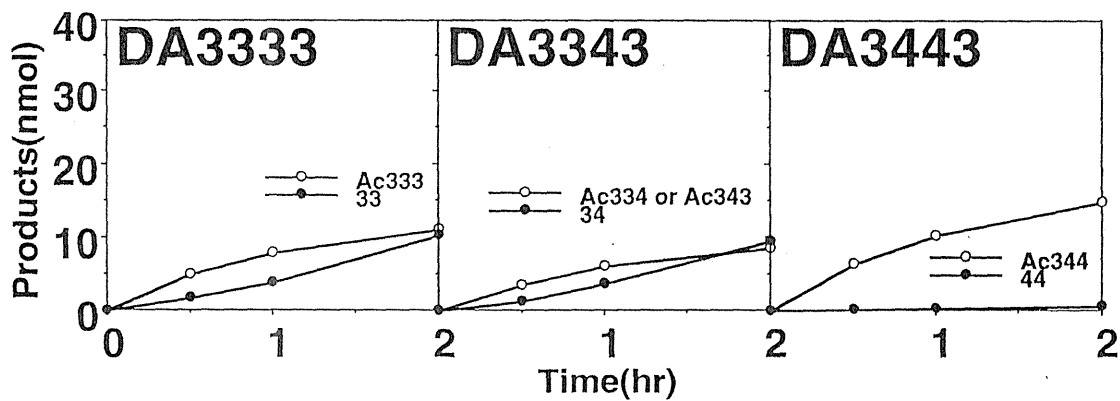


Fig. 25 部分精製したポリアミン酸化酵素によるジアセチルペンタアミンからのトリアミンの生成

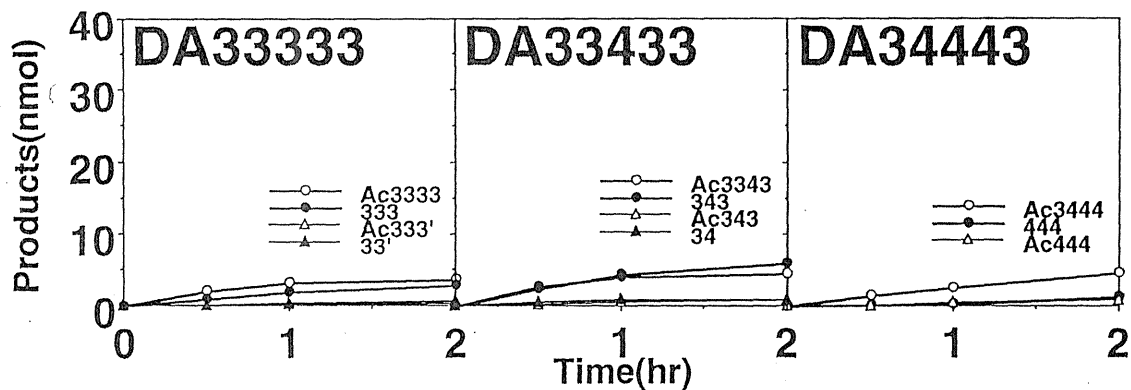


Fig. 26 部分精製したポリアミン酸化酵素によるジアセチルヘキサアミンからのテトラアミンの生成

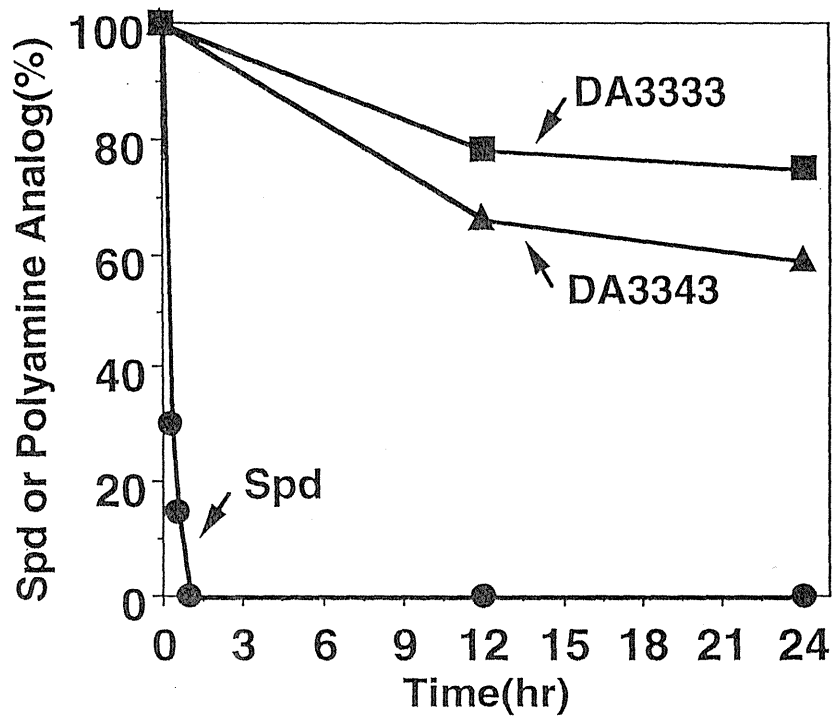


Fig. 27 10% 仔牛血清を含む培地中における、スペルミジン、BE3333 および BE3343 の安定性

### 5-3 培養細胞内におけるジアセチルポリアミンからポリアミンへの変換

先の結果から、DA3333 はノルスベルミジン(33), DA3343 はスペルミジンの導入試薬として有用である可能性が高いと考え、DA3333 と DA3343 について、細胞内に取り込まれたのち対応するポリアミンを生成するかどうかを、ポリアミン欠乏状態にしたラット肝がん由来 HTC 細胞を用いて調べた。

HTC 細胞は古くからポリアミン研究に用いられてきた細胞系であり、当研究室においても種々のポリアミンアナログの増殖への効果を調べる研究に用いてきた。ODC 生合成阻害剤である1-アミノオキシ-3-アミノプロパン(AOAP)で HTC 細胞を処理すると、細胞内スペルミジン量の減少にともない増殖が停止し、スペルミジンの投与で再び増殖を回復することができる。その際、スペルミジンやスペルミンなどのポリアミンの代わりにアナログ体を投与すると一時的な増殖の回復ののち増殖は停止し、生理的ポリアミン以外の投与によっては完全な増殖の回復は起こらないことを見い出してきた。したがって、ポリアミン欠乏 HTC 細胞の増殖の回復を観察することにより、細胞内でスペルミジンの生成を予測できると考えた。

また、ポリアミン取り込み系は細胞内ポリアミン量の低下によりその活性が誘導される。したがって、AOAP で細胞を処理することにより細胞内プトレシンおよびスペルミンが枯渇する結果、取り込み系が活性化されてジアセチルポリアミンが取り込まれ易くなることも期待できた。

50  $\mu$ M AOAP を48時間前に投与してポリアミン欠乏状態にした細胞に、10  $\mu$ M あるいは 100  $\mu$ M の DA3333, あるいは 10  $\mu$ M DA3343 を投与したときの増殖への影響を調べた。その際、AOAP 投与後 48時間ではほぼ HTC 細胞の増殖は停止した。そこに、ジアセチルポリアミンを投与すると DA3333 投与では、いずれの場合も一時的な増殖の回復が認められたが 72時間以降増殖速度は著しく低下した(Fig.28 and 29)。一方、DA3343 の投与では、増殖は速やかに回復し、無処理細胞と同様に増殖し続け (Fig.29)、細胞内にスペルミジンが生成していることが示唆された。

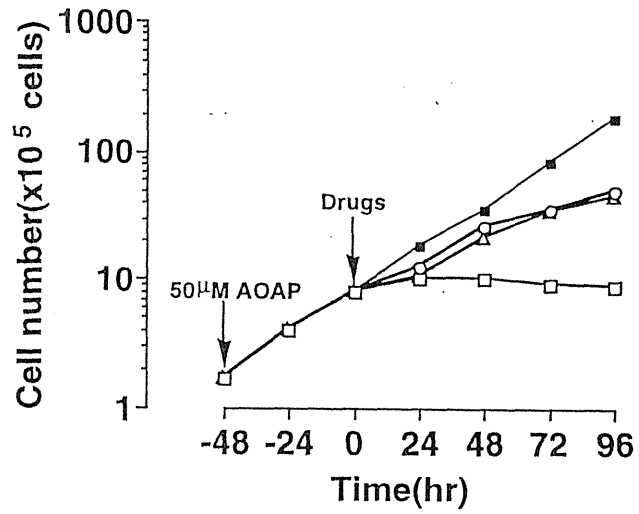


Fig. 28 AOAP 存在下ポリアミンおよび BE3333 を投与した細胞の増殖

■—■ Control , ○—○ 100µM DA3333 + 50µM AOAP ,  
 △—△ 10µM DA3333 + 50µM AOAP , □—□ 50µM AOAP .

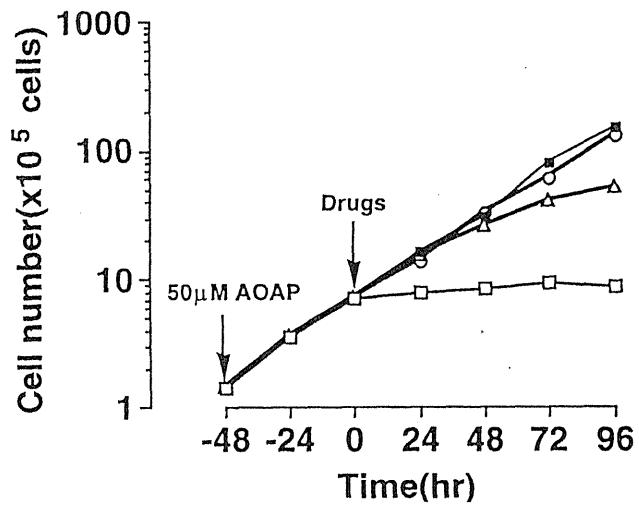


Fig. 29 AOAP 存在下ポリアミン, BE3333 および BE3343 を投与した細胞の増殖

■—■ Control , ○—○ 10µM DA3343 + 50µM AOAP ,  
 △—△ 10µM DA3333 + 50µM AOAP , □—□ 50µM AOAP .



細胞増殖の回復から、ジアセチル体が細胞内に取り込まれて対応するポリアミンを生成している可能性が示唆されたので、細胞内ポリアミン量を HPLC により測定した。Fig. 30 に DA3333 を投与したときのクロマトグラムを一例としてを示す。薬物無処理の細胞では、プトレシン、スペルミジン、スペルミンが明瞭なピークとして検出されるのに対して、AOAP 48時間処理の細胞ではプトレシンとスペルミジンが検出されず、スペルミン量の減少が観察された。DA3333 の投与により、ノルスペルミジン(33, 図中 NSpd)の明瞭なピークの出現とスペルミン量の減少が観察された。その際、生成が予想されるモノアセチル体は検出されなかった。なお、このクロマトグラムは1級アミノ基を検出する HPLC により得たものであるもので、投与したジアセチル体はクロマトグラム上に検出されない。

Fig. 28 および 29 における細胞内ポリアミンおよびアセチル体量を Table 7 および Table 8 に示す。Table 8 に示すように、 $10\mu\text{M}$  DA3333 の投与ではノルスペルミジン(表中 NSpd)が蓄積し、スペルミン量が低下したのに対して、 $10\mu\text{M}$  DA3343 の投与ではスペルミジンおよびスペルミン量が回復した。その際、いずれの場合にもモノアセチル体は検出されなかった。さらに、同一試料について、ジアセチル体も検出可能なダンシル化法 HPLC により分析を試みたが、モノアセチル体、ジアセチル体はいずれも検出されなかった。Table 7 に示すように、DA3333 の投与濃度によってはノルスペルミジンの蓄積量はほとんど影響を受けなかった。また、投与後1時間後においてもすでにノルスペルミジンが検出され細胞内における DA3333 の代謝が非常に速いことが示唆された。

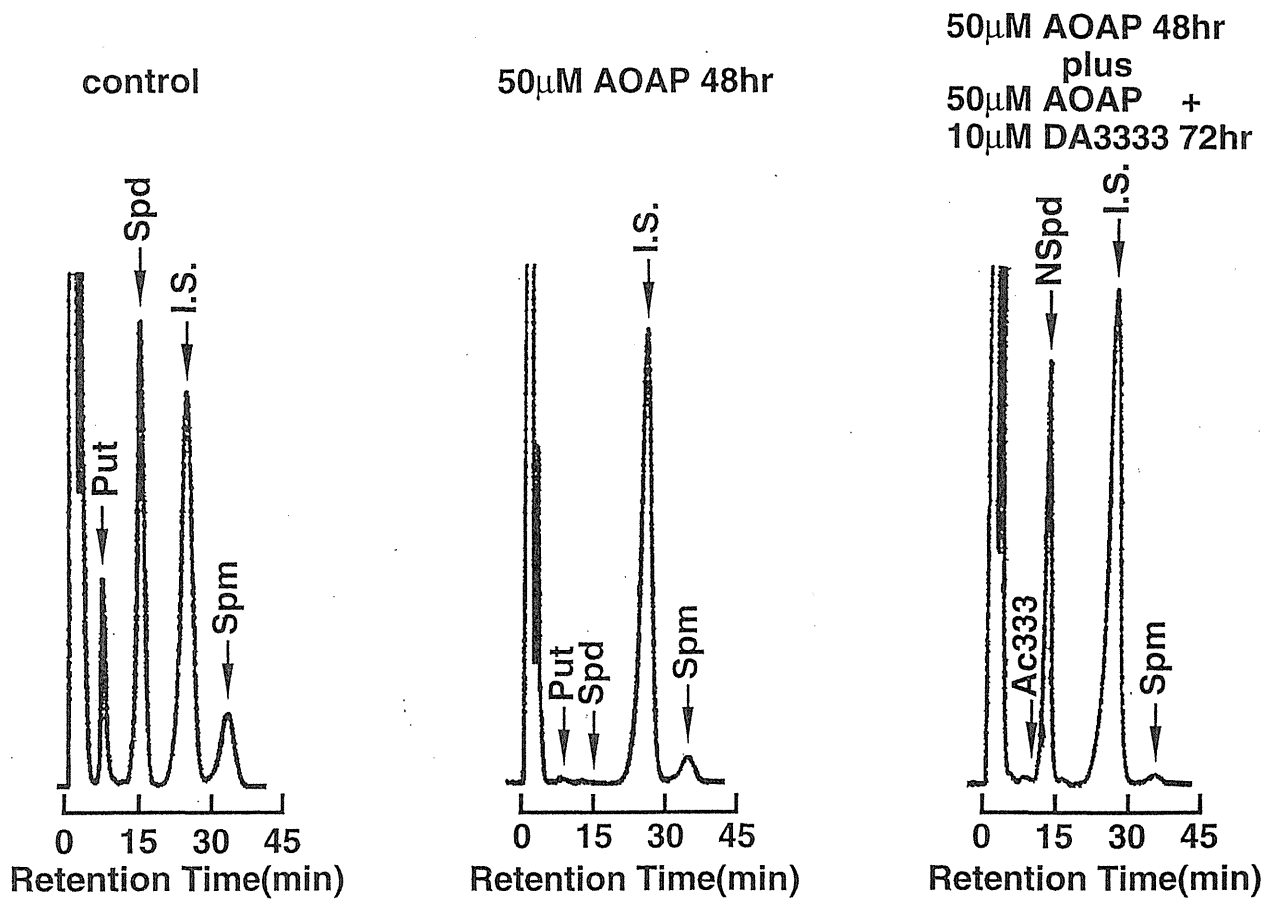


Fig. 30 薬物処理した HTC 細胞におけるポリアミンのクロマトグラム

Table 7 ポリアミン欠乏 HTC 細胞に DA3333 を投与したときの HTC 細胞  
におけるポリアミンおよびアナログ体量

treatment	hr	polyamine (nmol/10 <sup>6</sup> cells)				analog (nmol/10 <sup>6</sup> cells)	
		Put	Spd	Spm	NSpd	monoacetyl polyamine	
50μM AOAP	0	0.12	N.D.	1.83	—	—	
	24	N.D.	N.D.	1.68	—	—	
50μM AOAP+ 10μM DA3333	0	N.D.	N.D.	1.83	N.D.	N.D.	
	1	N.D.	N.D.	1.83	0.23	N.D.	
	2	N.D.	N.D.	1.83	0.40	N.D.	
	24	N.D.	N.D.	1.05	5.09	N.D.	
	48	N.D.	N.D.	0.71	3.18	N.D.	
	72	N.D.	N.D.	0.35	4.2	N.D.	
50μM AOAP+ 100μM DA3333	0	N.D.	N.D.	1.83	N.D.	N.D.	
	1	N.D.	N.D.	1.83	0.44	N.D.	
	2	N.D.	N.D.	1.83	0.78	N.D.	
	24	N.D.	N.D.	1.12	3.29	N.D.	
	48	N.D.	N.D.	0.56	4.51	N.D.	
	72	N.D.	N.D.	0.32	4.86	N.D.	
(Control)		1.34	4.35	2.92	—	—	

N.D. : < 0.1 nmol/10<sup>6</sup> cells

Table 8 ポリアミン欠乏 HTC 細胞に DA 3333 および DA 3343 を投与したとき  
の HTC 細胞におけるポリアミンおよびアナログ体量

treatment	hr	polyamine (nmol/10 <sup>6</sup> cells)				analog (nmol/10 <sup>6</sup> cells)		
		put	spd	spm	Nspd	monoacetyl polyamine	diacetyl polyamine	
50μM AOAP	0	N.D.	N.D.	1.62	—	—	—	
	24	N.D.	N.D.	1.60	—	—	—	
50μM AOAP+ 10μM DA3333	0	N.D.	N.D.	1.62	N.D.	N.D.	N.D.	
	24	N.D.	N.D.	0.76	1.97	N.D.	N.D.	
	48	N.D.	N.D.	0.53	3.45	N.D.	N.D.	
	72	N.D.	N.D.	0.34	4.02	N.D.	N.D.	
	96	N.D.	N.D.	0.25	5.35	N.D.	N.D.	
50μM AOAP+ 10μM DA3343	0	N.D.	N.D.	1.62	—	N.D.	N.D.	
	24	N.D.	1.14	2.51	—	N.D.	N.D.	
	48	N.D.	0.88	2.47	—	N.D.	N.D.	
	72	N.D.	1.78	1.67	—	N.D.	N.D.	
	96	N.D.	1.46	1.95	—	N.D.	N.D.	
(control)		1.61	4.35	3.10	—	—	—	

N.D. : < 0.1 nmol/10<sup>6</sup> cells

## 本研究の意義と今後の課題

### ①細胞死を起こすスペルミジンアナログの構造特異性に関連して

培養細胞に対するポリアミン投与の効果調べる場合には、アミン酸化酵素阻害剤を培地に添加するか、あるいはその酵素活性が低いとされる馬血清や無血清培地を用いることが通例になっていることでもわかるように、ポリアミンによる細胞の損傷は、ポリアミン由来の代謝物に起因すると考えられてきた。しかし、最近、このような考えに矛盾する結果が相次いで報告されている。

Brunton 等は、ハムスター由来の BHK 細胞を比較的高濃度の 1mM のスペルミンおよび馬血清を含む培地で培養したときに見られる増殖抑制が、カタラーゼ、グルタチオンレダクターゼの阻害剤でそれぞれ影響を受けないこと、また、アミノグアニジンでも増殖は一部しか回復せず、ポリアミン酸化酵素の阻害剤では増殖抑制が増強されることを報告し、スペルミンそのものに増殖抑制作用があるものと推察した。また、Igarashi 等もマウス FM3A 細胞を 10mM のスペルミジンあるいは 2mM のスペルミンを含む培地で培養すると、強い増殖抑制が起り、それは低マグネシウム含有培地によりさらに増強されることを報告した。これらの報告は、培地に投与したスペルミン濃度が比較的高いために細胞膜への直接作用の可能性も否定できないが、細胞内濃度が上昇すると、ポリアミンが増殖補助因子としてではなく毒性物質として作用することを示唆している。

一方、Mitchell 等は ODC 過剰産生株を本研究で用いたと同じ HTC 細胞で分離した際、細胞が低濃度ポリアミンの投与で容易に死ぬことに注目し、細胞内ポリアミン量を調べ、これらの細胞が大過剰のポリアミンを蓄積して死ぬことを報告した。また、Poulin 等はマウス白血病由来の L1210 細胞の ODC 過剰産生株に、低濃度のスペルミジン存在下浸透圧ショックを加えると、細胞が急激にスペルミジンを取り込み細胞死に至ることを報告した。両グループの結果ともスペルミジンの蓄積量と細胞数の減少には相関があることを示しており、ODC 過剰産生株に特有なポリアミンの過剰蓄積が細胞死の原因であると結論している。

本研究で観察された細胞死も、スペルミジンから生ずる微量の毒性物質に起因

する可能性を完全には否定できない。しかし、培地に加えるアミノグアニジン濃度や馬血清の影響を調べた結果は、この細胞死が血清中のアミン酸化酵素によって起きたものでないことを示している。また、細胞内に取り込まれた  $^3\text{H}$ -スペルミジンの変化を追跡したとき、細胞死が明瞭に観察される投与後 24 時間においても放射能の 97% がプトレシン、スペルミジンおよびスペルミン分画に回収されることは、 $^3\text{H}$ -スペルミジンに由来する  $^3\text{H}$ -プトレシンの放射比活性が半分になることも考慮すれば、スペルミジンが過剰に蓄積した状況下でも通常の代謝経路以外の変化を受けないことを示している。この他、アナログ体の中でもメチルプトレシンへの代謝を受け易い  $\text{N}^8$ -メチルスペルミジンに強い毒性が見られないことは、ポリアミン合成の逆経路における代謝過程には、有毒な代謝中間体がほとんど生成しないことを示唆している。さらに、カルボニル試薬としての強い反応性を持つ AOAP の処理濃度によっても、スペルミジンの毒性が影響を受けなかったことは、アルデヒドあるいはケトン基をもつ化合物がこの毒性に関わらないことを強く示唆している。したがって、これらの結果から、スペルミジンの直接作用により細胞死が起こるものと結論した。

本研究は、基本的には低濃度のスペルミジン投与による過剰蓄積を示した Mitchell 等および Poulin 等の報告と同様の細胞死を観察したものであるが、細胞系として変異誘発剤により分離した ODC 過剰産生株を用いていない点、細胞死がスペルミジンの化学構造に特異的に起こることを示している点で、この細胞死がスペルミジンの生理作用に関わるものであることをより強く示唆しているといえよう。

ポリアミン合成に関わる酵素類の生合成が種々の増殖因子、ホルモンあるいはポリアミン自身によって巧妙かつ複雑に調節されていることは、ポリアミンの重要性を示すものと考えられてきた。しかし、ポリアミン合成の阻害によってポリアミンを枯渇させたほとんどの場合、細胞は可逆的に増殖を停止するが、特殊な分化過程を除き、細胞機能に重大な傷害を与えることは観察されない。スペルミジン蓄積による細胞死が、もし、プログラム細胞死などの生理的な細胞機能の調節に関わるならば、これまでポリアミンの有効利用あるいはプトレシンの供給が

主目的であると考えられてきたポリアミン合成逆経路の律速酵素である SAT の存在が、過剰なポリアミンの蓄積を回避する新しい意義を持つことになる。本研究結果はポリアミン機能研究ばかりでなく代謝調節の観点からも新しい視点を提供している。

## ②スペルミジンによる細胞死の生化学的、形態的特徴

アポトーシスは、形態的な特徴とDNAの断片化によって定義される細胞死の一形態であるが、プログラム細胞死の過程で観察されることが多いため、生理的な細胞死の一指標と考えられている。特に免疫細胞で観察されるアポトーシスに関して多くの研究がなされており、癌遺伝子の発現とも密接に関わることが明らかになっている。

これまでに報告されているポリアミンとアポトーシスとの関係を調べた研究から、胸腺細胞に種々の刺激を加えたときに観察されるDNAの断片化がスペルミンの投与により抑制されること、DNAの断片化に関わると思われる  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$  依存性エンドヌクレアーゼの活性をスペルミンが効率よく阻害することなどが明らかになっており、ポリアミンがアポトーシスに対して抑制的に働くことを示唆している。しかし一方で、腫瘍壊死因子によって誘導されるアポトーシスと思われる細胞死がポリアミン合成阻害剤によって抑制されることも報告されており、ポリアミンがこの細胞死の過程に複雑に関わる可能性は高い。今回得られた結果は、形態的な変化とDNAの断片化の抑制が同時に起こるという従来アポトーシスでは報告のない結果になった。ポリアミンの蓄積がDNAの断片化を抑制する結果は他の研究者の報告と一致すること、形態的变化もきわめて明瞭に観察されること、また、アポトーシスの定義そのものが曖昧で形態的变化とDNAの断片化との因果関係が不明であること、などを考慮すると結果のそのものに矛盾はないように思われる。HTC細胞で観察されたこの細胞死は、生理的な細胞死の一形態と見るよりも、アポトーシスで起こる形態的变化のプロセスに異常に蓄積したポリアミンが働いた結果起こったものと考えるのが妥当だろう。しかし、このスペルミジンの作用は構造特異的であり、何らかの高分子の関与が示唆される。樹立細胞系では異常な状況で観察される現象であっても、免疫細胞の分化や発生の過程での細胞死のプロ

セスにスベルミジンが生理的に関与するかどうかは今後の興味ある課題である。

### ③ポリアミン欠乏細胞が投与したスベルミジンを蓄積するメカニズム

細胞内ポリアミン量は、その生合成、代謝および取り込み速度が変化することで、巧妙に調節されている。この調節は、増殖刺激に対してばかりでなく、細胞内ポリアミン量に対しても敏感に反応し、ポリアミン合成の律速酵素である ODC、代謝の律速酵素である SSAT および取り込み系において最も顕著であることが明らかになっている。細胞内ポリアミンレベルの上昇は、通常、SSAT 活性を誘導し、ODC 活性および取り込み系を抑制する。したがって、培養細胞を単にポリアミンを含む培地で培養するだけでは、細胞内ポリアミン濃度が至適であるかぎり、細胞内にポリアミンを過剰に蓄積させることは困難となる。本研究で扱った HTC 細胞におけるスベルミジンの過剰蓄積は、ODC 阻害剤の長期投与によって、このような調節になんらかの障害が起きたことを意味しており、その障害を追跡することは、未だに実体が明らかになっていないポリアミンの取り込み系に関する情報を得ることになるであろう。

ポリアミンの過剰蓄積が種々の細胞系で報告されることはまれであるが、先にも述べたように、最近、2つのグループから本研究と類似の研究結果が報告されている。すなわち、Mitchell らは、本研究で用いたのと同じ HTC 細胞で ODC 過剰産生株を分離した際、細胞が低濃度のポリアミン投与で容易に死ぬことを見だし、これらの細胞が通常の数倍量のポリアミンを取り込むことを報告した<sup>7)</sup>。また、Poulin らは、マウス白血病由来の L1210 細胞の ODC 過剰産生株に、低濃度のスベルミジン存在下浸透圧ショックを加えると、細胞が急激にスベルミジンを取り込み、細胞死に至ることを報告した。Mitchell らはさらに、過剰蓄積のメカニズムを検討し、ポリアミン取り込み活性を抑制する因子が、ODC 過剰産生株において有効に機能しなくなったことが蓄積の理由であると推察している。本研究におけるスベルミジンの過剰蓄積も、基本的には同一の抑制蛋白が関与するものと思われる。

本研究結果から明かなように、AOAP 投与期間の延長はポリアミンによる取り込み系の抑制を起し難くする。その理由は明確ではないが、投与期間の延長が蛋白合成を低下させることが、取り込み系の抑制に関わる新たな蛋白の合成を起し難くしているものと思われる。実際、蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシミドの投与は、著しいスペルミジンの蓄積と細胞死をもたらすことが本実験系においても確認された。

スペルミジンの蓄積によってなぜ細胞死が起きるのかについては不明である。この細胞死では、細胞容積が縮小し、ミトコンドリアの傷害による通常の壊死とはその形態が明らかに異なっている。一方、核の凝縮は観察されるが、DNA の断片化が観察されず、蛋白合成を阻害するとさらに細胞死が著しくなることから、この細胞死が遺伝子の直接関与するアポトーシスであるとは考え難い。細胞容積の縮小は、明らかに細胞内の水分の漏出を伴っており、イオンチャネルに何らかの変化が起きているのかもしれない。最近、膜電位を維持するために働くカリウムイオンチャネルの調節にポリアミンが関わるということが明らかになっており、細胞容積の調節に関わる種々のイオンチャネルが高濃度のポリアミンにより影響を受ける可能性もあるだろう。当教室で行われた予備的な実験では、膜中の蛋白の架橋を形成させる酵素であるトランスグルタミナーゼの阻害剤の投与で、スペルミジンによる細胞死が抑制されることも示されており、この細胞死のメカニズムを明らかにすることは、ポリアミンの新たな生理作用を見いだすことにつながるかもしれない。



#### ④ポリアミン導入試薬の開発

本研究では、まずジアセチルポリアミンを系統的に合成し、ラット肝臓から部分精製した PAO に対するそれらの基質性を調べて、効率よく基質となるジアセチルペンタアミンを導入試薬の候補として選択した。その際得られた結果から、PAO によって脱離する基はアセタミドプロピル基がよいこと、電荷を持つ窒素原子間の距離が重要であること、ジアセチルペンタアミンに比べてモノアセチルテトラアミンの酵素に対する  $K_m$  値が低いこと、アルキル基の切断反応自体の特異性はそれほど高くないことなどが推察された。ラットの PAO に対するポリアミンアナログの基質性をこのように系統的に調べた例はこれまでになく、PAO のポリアミン結合部位を推察する上からも本研究結果は興味深い。今後、これらのアセチルポリアミンを用いて反応速度論的に解析をすすめることで、PAO の活性部位構造の推定が可能になるであろう。

DA3333 および DA3343 はそれぞれノルスペルミジンおよびスペルミジンの補給を目的とした導入試薬として有望である。ポリアミン濃度が低下した HTC 細胞に速やかに取り込まれ、投与後 1 時間で対応するポリアミンの生成が確認できた。今後取り込み活性を調べる必要があるが、取り込まれたジアセチル体がすぐにポリアミンに変換されたと考えると、同条件におけるスペルミジンの約 20分の1の速さで取り込まれることになる。また、細胞内にはジアセチル体、モノアセチル体ともに検出されず、取り込まれたジアセチル体はすぐに代謝されるものと思われる。ラット肝臓からの部分精製 PAO を用いた実験結果は、モノアセチルテトラアミンがジアセチルペンタアミンよりも小さい  $K_m$  値をもつことを示唆しており、取り込まれたジアセチル体は細胞内ですぐにトリアミンにまで変換されると考えられる。

ジアセチルペンタアミンはポリアミン欠乏細胞には効率よく取り込まれて対応するポリアミンを生成するが、薬物無処理の細胞に投与するとその取り込み量は著しく低下する(未発表)。ポリアミン欠乏細胞にジアセチル体を投与しても取り込み量は一定になり、過剰な取り込みが起こらないことから示されるように、ジアセチル体の取り込み量は、細胞内ポリアミンレベルの上昇に反応したポリア

ミン取り込み系の抑制によって、制限されるのだろう。この機構によって、細胞内ポリアミン量が十分量存在する無処理細胞では、ジアセチル体の取り込みが起り難くなる。したがって、細胞内へのポリアミンの過剰導入の効果を調べるためには、今回調べたジアセチル体は不適當であり、アセチル基の代わりに大きな疎水性基を導入したアシルポリアミンなど、ポリアミン取り込み系を利用しない導入試薬のデザインも今後は必要と思われる。

本研究は培養実験で使用できる導入試薬の開発を当面の目標としているが、ジアセチル体を直接動物に投与した際に安定に血流中に存在するかどうかは興味深い。動物へのポリアミンの直接投与は、急性の腎障害が起こるため困難であるとされている。その原因は必ずしも血清アミン酸化酵素が関与するものではないかも知れないが、アセチルポリアミンが排泄型の代謝物であることを考えれば、ジアセチル化がポリアミンの毒性の改善に役立つ可能性は高いものと思われる。血清中でも安定なジアセチル体がこれまでに実現できなかった組織へのポリアミン供給を可能にするかも知れない。