

1. 研究課題名：ヒト細胞の分裂寿命に対する酸素ストレスの影響

2. 研究機関名：科学技術振興事業団 長崎研究室

1) 長崎大学薬学部保健衛生薬学講座 放射線生命科学教室

2) (e-mail ; f1246@cc.nagasaki-u.ac.jp)

3. 研究者：中山 由紀子 1)、2)

4. 研究協力者：児玉靖司 1)、2)、鈴木啓司 1)、横山兼久 2)、渡邊正己 1)、2)

5. 研究期間

6. 要約

酸素ストレスがヒト細胞の分裂寿命に与える影響を調べるために、ヒト胎児細胞 HE23、HE31、HE40 を 7 日間を一継代として 2 種類の低酸素条件(0.5%O₂、2%O₂)と、コントロールとして 20%O₂ の条件を用いて継代培養したところ、2%O₂ 条件下の細胞では全ての細胞を通じて分裂寿命が最も長く、酸素ストレスの減少による分裂寿命の延長効果が見られた。また、0.5%酸素下では細胞の増殖に必要なエネルギー不足によると思われる形態の変化が確認され、細胞の増殖にとっては酸素不足であると思われた。また、細胞寿命とテロメアの短縮率に相関が見られた。

7. 研究目的

テロメアは、真核生物の DNA 末端を構成する反復配列であり、分裂回数とともに短縮することが知られている。これまでに、高酸素圧下での細胞分裂寿命の低下と一回の分裂あたりのテロメア短縮速度の増加(1,2)や、抗酸化物質存在下におけるヒト細胞の分裂寿命の増加、老化表現形の抑制(3)などの報告があり、酸素の細胞分裂寿命に与える毒性が示されてきた。そこで本研究では逆に酸素ストレスを低下させることによって、細胞の分裂寿命やテロメアの短縮率に及ぼす影響について調べることを目的として行った。

8. 材料と方法

細胞と細胞培養

本研究では 7-8 週齢のヒト胎児(HE)細胞を用いた。細胞は、10%牛胎児血清 (FBS:fetal bovine serum,TRACE 社)を含む Eagle's MEM 培養液 (日水製薬)で、37 °C の CO₂ インキュベーター (20%O₂、2%O₂ ; TABAI ESPEC、0.5%O₂ ; IKEMOTO RIKI KOGYO)中で継代培養した。

培養フラスコ (BECTON DICKINSON)は 75cm²(T-75)を用い、1 × 10⁶個細胞を植え込み、培養液を 30ml ずつ加え、7 日間を一継代として培養し、3 継代毎に DNA を抽出した。老化期の判別には senescence-associated-β-galactosidase 活性の検出を用いた。

テロメア長の測定

用いた細胞の DNA を抽出(*lysis buffer* ; 10mM Tris-HCl,400mM NaCl, 2mM Na₂EDTA pH 8.2)し、制限酵素に HinfI, RsaI (NEW ENGLAND BioLabs Inc.)を用いて 5 μg の DNA を消化、精製後、TE buffer に溶解し、0.7%アガロースゲルで電気泳動し、変性 (0.25M HCl)、中和 (1.5M NaCl/0.5M NaOH)後、ニトロセルロースフィルター

(Amersham)にアルカリトランスファーし、プローブとして(TTAGGG)₄ 配列を用いてハイブリダイゼーションし 2×SSC,0.1%SDS 洗浄液で洗浄後、メンブレンを X 線フィルムに感光させた。

9. 結果

ヒト胎児細胞 HE23、HE31、HE40 は酸素分圧 0.5%O₂/5%CO₂/94.5%N₂(以下 0.5%O₂)、2%O₂/5%CO₂/93%N₂(以下 2%O₂)、20%O₂/5%CO₂/75%N₂(以下 20%O₂)条件下で、7 日間を一継代として培養した。その結果、HE23 では 2%酸素が 20%酸素と同様の増殖率を示し、総集団倍加数 81 で分裂を停止した。0.5%酸素下では総集団倍加数 49 で分裂を停止し、20%酸素下よりも分裂寿命は 32%低かった。HE31 では 2%酸素と 0.5%酸素が 20%酸素下よりも高い増殖率を示し、総集団倍加数 52 で分裂を停止し、20%酸素下では総集団倍加数 26 で分裂を停止した。HE40 においては 2%酸素が 20%酸素と同様の増殖率を示し、総集団倍加数 66 で分裂を停止し、0.5%酸素下では総集団倍加数 49 で分裂を停止し、20%酸素下よりも分裂寿命は 22%低かった(図 1)。

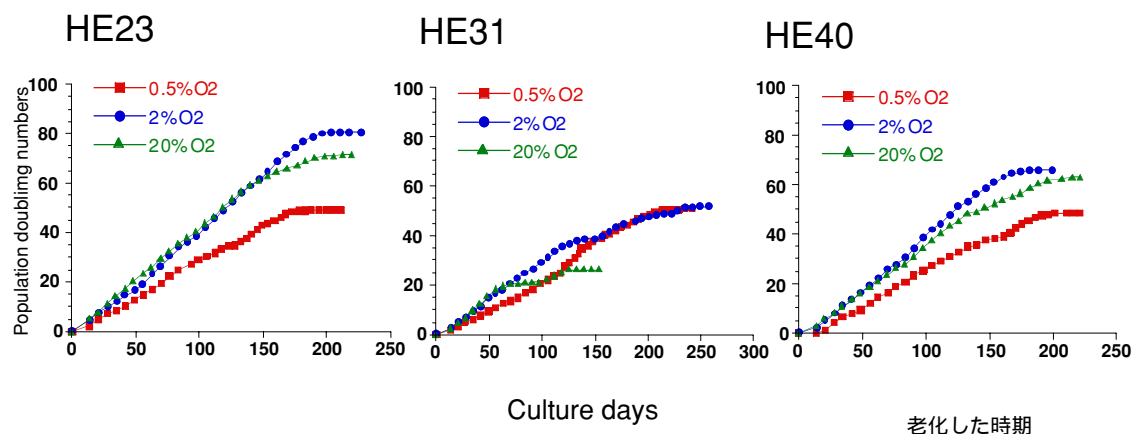


図 1 HE23、HE31、HE40 細胞の各酸素条件下における総集団倍化数

0.5%酸素下では他の条件と異なり細胞がコンフルエントになるとそのままの状態を保つことができず、死んでしまうことが分かった(図 2)。

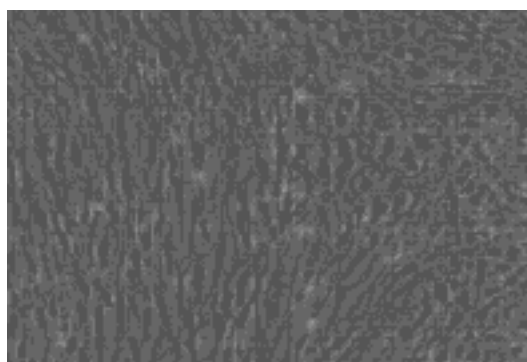


図 2 0.5%酸素下コンフルエント直後の細胞形態

そのため 7 日の継代期間で分裂寿命がのびなかったのは植え継いだ細胞のなかに死んだ細胞が存在したことによるためではないかと考え、細胞をコンフルエントになった直後に植え継ぐ方法で、継代期間を 3 日にして同じ細胞を培養し、7 日継代の結果と比較した。しかし、継代期間の違いによらず分裂寿命は 2%酸素下よりも 20-40%低かった(図 3)。

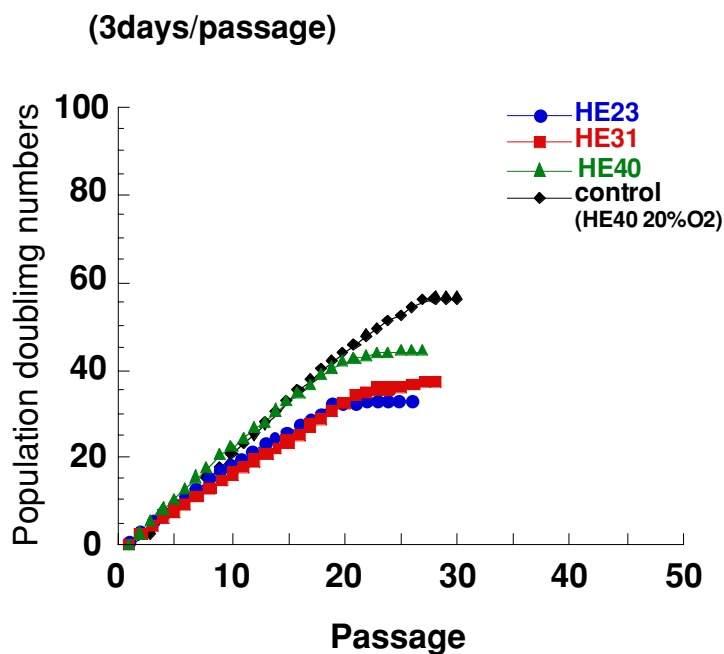


図 3 0.5%酸素下で 3 日毎に培養した細胞の総集団倍加数

HE31、HE40 細胞は 3 継代毎に DNA を抽出し、サザンハイブリダイゼーション法を用いて TRF(Terminal Restriction Fragment)長を算出した。

いずれの細胞においても、培養初期の TRF 長は 10~12kbp で、分裂を重ねる毎に 4~5kbp にまで短縮した(図 4)。

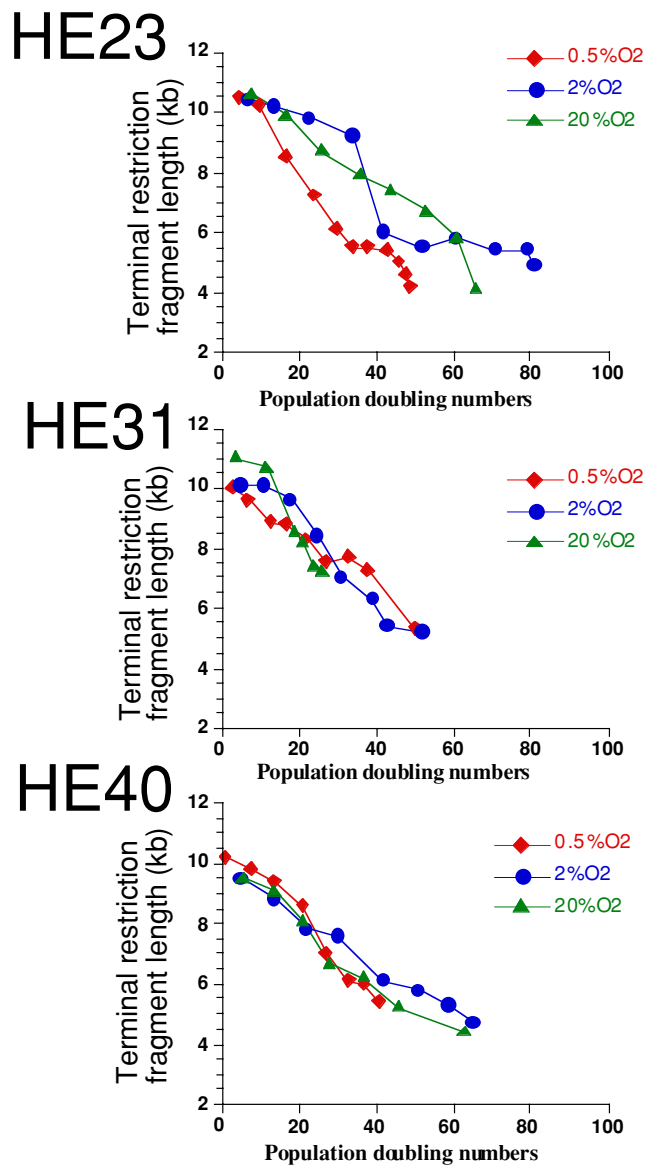


図 4 HE23,HE31,HE40 細胞を各酸素分圧条件
で培養したときのテロメアサイズ の変化

同様に 0.5%酸素下で 3 日毎に培養した細胞のテロメアの長さについて示した(図 5)。

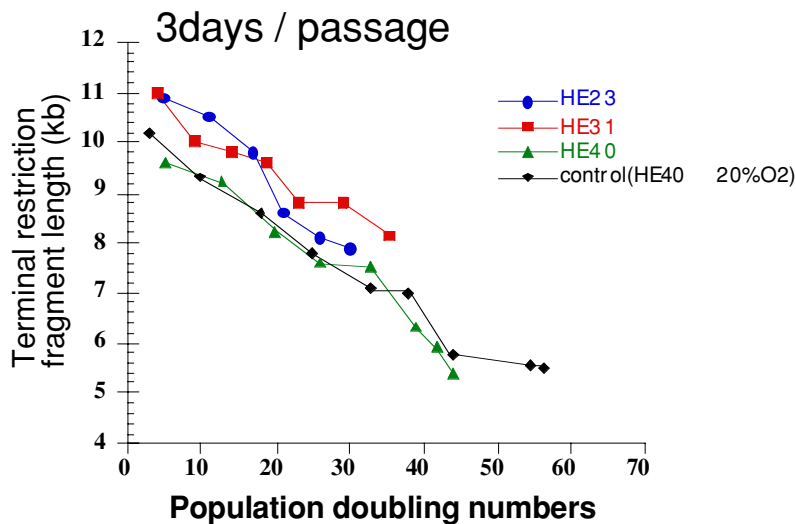


図5 HE23,HE31,HE40 細胞を 0.5%酸素分圧条件下で 3 日毎に培養したときのテロメアサイズ の変化

短縮のパターンは 7 日毎に培養したものと同じだったが、HE23 と HE31 においては 8kb くらいで分裂を停止した。

短縮率は HE23、HE31、HE40 共に約 100~200bp/PDN であった(表 1)。2%酸素下において短縮率が低い値を示した。HE23 においては 2%酸素下で培養した細胞の分裂寿命が最も伸びており、このとき 2%酸素下におけるテロメア短縮率は用いた酸素条件のなかで一番小さい。HE31 で早期に分裂を停止した 20%酸素下の細胞では短縮率が 173bp/PDN と示された細胞の短縮率のなかで最も高い値を示しており、寿命と相関している可能性が示唆される。HE40 においても最も短い分裂寿命を示した 0.5%酸素下では短縮率が 2%酸素下、20%酸素下よりも 40bp/PDN 大きくなっていった。Fig.4 より 20%酸素下で培養した HE31 を除く全ての細胞においてもテロメアは 4-5 kb に達したところで分裂を停止しており、短縮率と寿命との相関が示唆された。

	0.5%O ₂	2%O ₂	20%O ₂
HE23	143 (91)	74	103
HE31	124 (76)	104	173
HE40	120 (105)	80	89 (84)

表 1 異なる酸素条件下で 7 日毎に培養した細胞におけるテロメア短縮率(bp/PDN) 括弧内は 3 日毎の短縮率

10. 考察

今回用いた酸素条件下では、2%酸素下において酸化ストレスの減少による細胞寿命の延長効果が確認され、また 0.5%酸素下においては細胞増殖には不利であることが 3 日毎と 7 日毎の結果より明らかになった(図 1,2,3)。0.5%酸素下では細胞の増殖のためのエネルギーが不十分であったと思われる。テロメアは用いた細胞全てにおいて初め 10-12kb で分裂を繰り返して 4-5kb になったところで停止していた(図 4)。この結果は Zhi Yang ら(4)による報告とも一致する。写真は示していないが、3 日毎、7 日毎に培養した HE31 においては、0.5%酸素下、2%酸素下においては培養期を通じて 10kb 以上の長いテロメアが存在していた。これは HE31 においてのみ確認される現象であった。この結果は先の Zhi Yang らの報告とも一致した。これは HE31 の個体的な特徴であると考えられる。0.5%酸素下ではテロメアの短縮率も他と比較して大きく、寿命延長がみられた 2%酸素下の細胞においてはテロメアの短縮率は小さかった(表 1)。このことはテロメア短縮率と細胞寿命における相関を示唆するものである。HE31 の 20%酸素下で培養した細胞はテロメア短縮率が大きいため細胞寿命が短かったと考えられる。0.5%酸素下で 7 日毎に培養した細胞のテロメア短縮率と、3 日毎に培養した細胞のテロメア短縮率を比較すると、3 日毎に培養したもののほうが 10-40%低かった。また 3 日毎に培養した方では HE23 と HE31 においてテロメアが 8kb くらいで分裂を停止していた(図 5)。培養期間を短くすることでテロメア短縮率が低下したことやテロメアが長いままで分裂を停止する細胞があったことは興味深い事実であるが、それが培養の日数の違いを反映した結果であるのかどうかは今後明かにされるべき課題である。テロメアの短縮と酸化ストレスの相関については、明確な結果を得られなかったが、すくなくとも酸素ストレスの減少と細胞寿命の延長は直接関係ないことが明らかになった。

11. 今後の展開

今後は、細胞内で酸化ストレスが減少しているのかについて DCFH-DA 試験で調べる。また、アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩存在下での酸化ストレス抑制効果と同じ酸素条件を用いて調べる。また FISH 法を用いたテロメアの解析を行う。

12. 参考文献

1. Thomas von zglinicki et al. *Exp.Cell Res.* 220,186-193, 1995
2. Qin Chen et al. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 92,4337-4341,1995
3. Qin Chen et al. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 91,4130-4134,1994
4. Zhi Yang et.al.*J.Radiat. Res.* 39,35-51,1998

13. 研究業績

- 13-1. 原著論文：なし
- 13-2. 総説など：なし
- 13-3. 国際学会発表：なし
- 13-4. 国内学会発表

1. 中山由紀子、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己:低酸素ストレスの細胞分裂寿命に与える影響、第 36 回放射線影響懇話会、平成 11 年 8 月 7 日、福岡.
2. 中山由紀子、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：ヒト細胞の分裂寿命に対する酸素分圧の影響、第 42 回日本放射線影響学会、平成 11 年 9 月 1-3 日、広島.

13-5. 新聞など:なし

13-6. 特許申請：なし

14.

- (1) The effect of oxygen stress on replicative lifespan of human cells.
- (2) Laboratory of Cell and Stress Biology, Japan Science and Technology Corporation(JST), Laboratory of Radiation and Life Science, Nagasaki University School of Pharmaceutical Sciences.
- (3) Yukiko Nakayama
- (4) Seiji Kodama, Keiji Suzuki, Kanehisa Yokoyama and Masami Watanabe
- (5)
- (6) Abstract:

To know the effect of oxygen stress on replicative lifespan of human cells, we sequentially subcultured three normal human embryo cell strains, i.e., HE23, HE31 and HE40, every 7 days under two different conditions of the reduced oxygen tension, 0.5% and 2%, and used 20% condition as a control. We investigated replicative ability and telomere shortening associated with increasing population doubling numbers (PDN) in three HE cell strains from the beginning of the culture to over 150 days. Growth analysis revealed that the growth rate under 0.5% oxygen tension was diminished compared with those under 2% and 20% oxygen conditions in all HE cell strains and that the growth rate under 2% oxygen condition was similar to that of control until 60 days of the culture followed by becoming slightly higher over 60 days. The results suggest that the low oxygen tension as 0.5% is disadvantageous for cell proliferation and the 2% oxygen tension is advantageous for cell proliferation. Telomere analysis revealed that rates of telomere shortening in all HE cell strains fell into the range from 100 to 200 bp per cell division. But under 0.5% oxygen tension the rates of telomere shortening was large and the replicative life span was short, on the other hand, under 2% oxygen tension the rates of telomere shortening was short and the replicative life span was long. Telomere analysis revealed that telomeres were shortened to 4-5 kb then cells ceased proliferating, indicating that the life span of cells and the rates of telomere shortening related each other.