

放射光マイクロビームを用いた微量元素による活性酸素発生と炎症 発生機構との相関解析

Study about the mechanisms of action between in production of ROS(reactive oxygen species) by trace elements and inflammation processes using SR(Synchrotron Radiation) micro beam

国村 伸祐 , 白川 太郎 , 中島 加珠子 , 坪内 美樹 , 程 雷

Shinsuke Kunimura , Taro Shirakawa , Kazuko Nakashima , Mina Tsubouchi , Lei Cheng

京都大学大学院医学研究科社会健康医学系専攻健康要因学講座健康増進行動学分野

Department of Health Promotion and Human Behavior, Kyoto University School of Public Health,

刺激を加えると、好中球内で Fenton 反応が起こる。この反応は遷移金属の存在下で起こる。好中球様に分化させた細胞内での Fenton 反応と鉄との関連を確認するために、SPring-8 の BL37XU を使って、蛍光法による XAFS(X-ray Absorption Fine Structure)分析により、刺激前後の細胞内の鉄の価電子状態を分析した。刺激前後とも鉄は 3 価のものが多く、鉄の価電子状態はほとんど変化しなかった。Fenton 反応が起こったとしても、鉄の価電子状態はほとんど変化しない可能性ががある事がわかった。

The Fenton reaction is caused in stimulated neutrophils. Transition metal relate to the Fenton reaction. We have investigated the iron oxidation state in human neutrophil-like cells, dimethylsulfoxide-differentiated HL60(DMSO-HL60) and stimulated DMSO-HL60 to confirm the Fenton reaction visibly. We have analyzed XAFS(X-ray Absorption Fine Structure) in fluorescence mode for the determination of the iron oxidation states in samples at beam-line 37XU at SPring-8. We have got the results that Fe^{3+} were major oxidation state in both samples. It is possible that the iron oxidation state hardly change by the Fenton reaction.

背景と研究目的

好中球は、刺激を受けると、活性酸素種を産生する。主な活性酸素種として、スーパーオキシド(O_2^-)、過酸化水素(H_2O_2)、ヒドロキシラジカル($\text{OH}\cdot$)がある。特に、 $\text{OH}\cdot$ は、反応性に非常に富んでおり、生体内のたんぱく質、脂質、DNA などを損傷させる。 $\text{OH}\cdot$ は、Fenton 反応により生成される。この反応

は、遷移金属と H_2O_2 との酸化還元反応である。よって、細胞内で Fenton 反応が起こると、細胞内に存在する遷移金属の価電子状態が変化する可能性がある。この価電子状態の変化を分析する事が出来れば、Fenton 反応を目に見える形で確認する事が出来る。しかし、細胞内に存在する遷移金属は微量であるため、検出する事が困難であった。よって、Fenton

反応を目に見える形で確認するのは非常に困難であった。SPring-8 の放射光は高輝度光であり、非常に強力な強度を有する X 線を試料に照射する事が出来るので、検出感度が極めて高い。熱損傷が少ないために、非破壊的に分析を行う事が出来る。これらの事から、SPring-8 の放射光を用いた実験は、細胞内の微量な遷移金属の価電子状態を分析するために最も良い方法であると考えた。本研究の目的は、刺激前後での好中球内の遷移金属の価電子状態の変化を分析する事により、Fenton 反応を目に見える形で確認する事である。今回は、鉄に注目して、刺激前後での好中球内の鉄の価電子状態に変化が起こるかどうかを確認する事にした。近年多くの疾病が活性酸素による、と考えられている。特に、 $\text{OH}\cdot$ が原因と考えられている疾病は多い。マイクロビームを用いて、細胞内での Fenton 反応と遷移金属との関連が分析出来れば、 $\text{OH}\cdot$ 由来の疾病の原因を明らかに出来、創薬分野への応用も考えられる。以上の事から、ナノテクノロジー分野における研究として、非常に重要であると考えられる。

実験

本研究は、BL37XU の X 線分光顕微鏡を用いて行った。実験で用いたビームの大きさは、縦 $5\mu\text{m}$ 、横 $4\mu\text{m}$ であった。培養細胞である HL60 細胞を、DMSO(Dimethyl sulfoxide)で好中球様に分化させた細胞(DMSO-HL60)と、これに発がん物質の一種である PMA(Phorbol myristate acetate)による刺激を加えて、活性酸素を発生させた細胞の 2 種類を試料とした。各試料ともエタノール固定をした。まず、蛍光 X 線分析によるマッピングにより、試料の

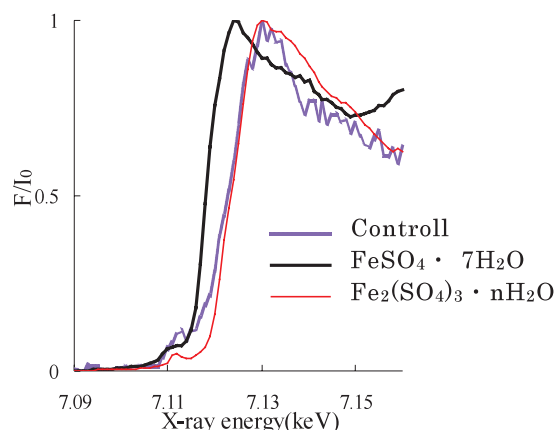


Fig.1.Fe K-edge XANES spectra of DMSO-HL60 (Control)

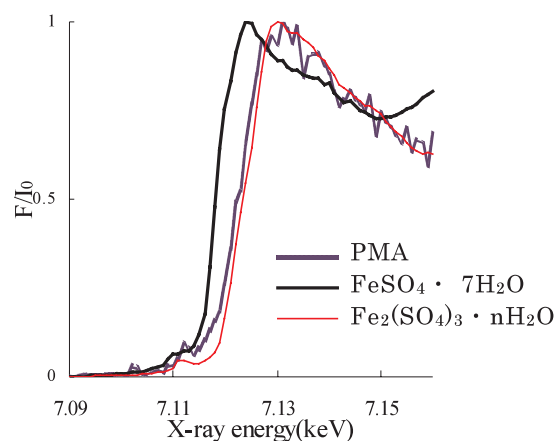


Fig.2.Fe K-edge XANES spectra of stimulated DMSO-HL60 (PMA)

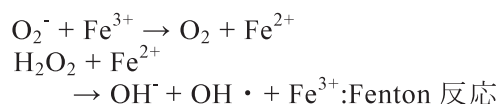
I_0 :The strength of incidence X-ray

F:The strength of the iron X-ray fluorescence

元素分布を分析した。その結果、細胞部位であると考えられる部分の鉄の価電子状態を、蛍光法を用いた、鉄の K 吸収端 XAFS スペクトルの XANES(X-ray absorption near edge structure)領域から、分析した。入射 X 線エネルギーは 7.09keV から 7.16keV の範囲で変化させた。鉄の 2 価、3 価を表す標準試料として、硫酸鉄七水和物($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、三硫酸二鉄 n 水和物($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$)を用いた。蛍光 X 線分析、XAFS 法による分析とも真空中で行った。

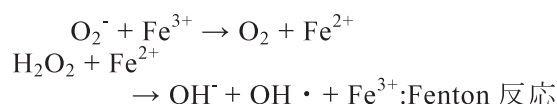
結果と考察

図 1 に DMSO-HL60 の鉄の K 吸収端 XAFS スペクトルの結果を、図 2 に PMA による刺激を加えた DMSO-HL60 の鉄の K 吸収端 XAFS スペクトルの結果を示す。今回の結果から、両試料中の鉄の K 吸収端 XAFS スペクトルの XANES 領域とも、 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ の K 吸収端 XAFS スペクトルの XANES 領域とほぼ重なっていたので、両試料中の鉄は 3 価のものがほとんどであると考えた。このことから、今回用いた培養細胞内では、Fenton 反応によって、鉄の価電子状態はほとんど変化しない可能性がある事がわかった。これは、以下の 2 つの反応が繰り返し起こっているためと考えられる。



今後の課題

今回の XAFS 分析から、刺激前後で、細胞内の鉄の価電子状態はほとんど変化しない事がわかった。これは、以下の 2 つの反応が繰り返し起こっているからと考えられる。



今後は、カタラーゼ等の過酸化水素不均化酵素を加えた後、刺激を加えて活性酸素を発生させた細胞内の鉄の価電子状態も分析したい。この試料は発生する過酸化水素を不均化しているので、上の反応の Fenton 反応の部分がほぼ起こらなくなると考えられる事から、今回分析した 2 つの試料よりも 2 価の鉄の割合が多くなる、と考えられる。また、この分析をする事により、細胞内での Fenton 反応と鉄との関連を明らかに出来ると確信する。

参考文献

- 1) T.Takeuchi et al(1996)
Carcinogenesis vol.17 pp.1543-1548
- 2) 飯田厚夫(2003)
Biomed Res Trace Elements 14(3):188-195

論文発表状況・特許状況

現在のところなし。

キーワード

● XANES

エネルギーを変化させながら、吸収を測定していくと、あるエネルギーで急激に吸収が立ち上がる部分が存在する(吸収端)。吸収端の現れるエネルギーの値は、元素固有である。この吸収端の近傍約 50eV にわたる領域を XANES(X-ray absorption near edge structure)と呼ぶ。この領域から、注目元素の価電子状態を分析する事が出来る。

● Fenton 反応

過酸化水素と Fe^{2+} 、 Cu^+ などの遷移金属との反応で、ヒドロキシラジカル($\text{OH} \cdot$)を生成する反応。