

原 著

ショウジョウバエ中枢神経由来のクローン細胞に対する
カテコールアミンの非伝達物質様作用の検討

張 天祥

日本医科大学薬理学教室

Examination of non-transmitter effects of catecholamines on clonal cells derived from drosophila CNS

Tianxiang Zhang

Department of Pharmacology, Nippon Medical School

Abstract

The effects of catecholamines (CAs) other than their transmitter action were investigated using clonal neuronal cells, ML-DmBG 2-c2, derived from *Drosophila* in the larval central nervous system(CNS). All catecholamines tested, adrenaline(AD), dopamine(DA) noradrenaline(NA) and isoproterenol (ISO), prevented any increase in the number of cells during 2-to 7-day culture. α - , β -adrenergic and dopaminergic antagonists did not block the effects of CAs on the number of cells. Adrenochrome, a product of the oxidative degradation of AD, also prevented any increase in the number of cells, as AD did. The effect of AD was partially blocked by an antioxidant, dithiothreitol (DTT) These results suggest that the inhibition of the increase in cell numbers by CA might be mediated by CAs themselves and/or oxidative products in the CA metabolic process. It is concluded that CAs inhibit cell proliferation but do not induce cell death in the *Drosophila* clonal cells.(J Nippon Med Sch 1999 ; 66 : 113 118)

Key words : catecholamines, cell proliferation, oxidative product, clonal neuronal cells

緒 論

Catecholamines (以下 CA と略す) は , 古典的な神経伝達物質としての生理的役割は確立している . 一方 , CA には本来の伝達物質としての作用以外に中枢神経系 (CNS) の発生 , 分化の過程において分化誘導などの作用も近年 , 見い出されている^{1,2} . したがって , CA の非伝達物質様作用を明らかにすることは中枢神経系の発生 , 分化の機構および中枢神経系の機能の解明に重要である . しかしながら , 哺乳類中枢神経系は , 多数の異種神経細胞とグリアから構成されているため , 細胞レベルで CA の作用を評価することが極めて困難である . この問題を解決する一つのアプローチは均一

な細胞系を用いることである . 当薬理学教室ではショウジョウバエ幼虫の中枢神経系から細胞株を樹立し³ , モデル神経細胞として研究に用いている . これらの株細胞は CA を産生していない⁴ . さらに , ショウジョウバエにおいては CA の受容体はほとんど知られておらず , 唯一 dopamine に対する D 1-like 受容体の存在が知られている⁵ . したがって , これらのクローン細胞は dopamine を初めとする CA の非伝達物質様作用をスクリーニングすることに適していると考えられる . 本研究においては , クローン細胞株のうち ML-DmBG 2 c2 を用いて CA の伝達物質以外の作用を見出すことを目的に行った . 本実験の結果 , CA がクローン細胞の増殖を抑制することが見い出され , この CA の効果発現に関与する機構について検討した .

研究材料および方法

(1) 細胞株の培養と処理

ショウジョウバエ幼虫の中樞神経系から樹立されたうちの一つの ML-DmBG 2 c2 細胞株³を用いた。培養条件は以下の通りである。

BG 2 c2 細胞を LM 3 (BF) medium の中に 10% 非働化 fetal bovine serum (FBS, 三菱化学), 10 μ g/ml insulin (Colab), また, 抗生物質 (50 U/ml penicillin (Meiji), 0.1 mg/ml streptomycin (Meiji)) を加えて培養した³。細胞の培養は 24 穴あるいは 35 mm の plate dish に 7.5×10^4 または 5×10^5 cells/ml の密度でまいた。細胞を 5% CO₂, 95% 空気, 25 °C の条件で培養して, 2 日後に各薬剤を添加した。

(2) 使用する薬剤と処理

実験に使用した薬剤 (すべて SIGMA 社製) は次の通りである。α-adrenoceptor 作動薬: adrenaline (AD), noradrenaline (NA), β-adrenoceptor 作動薬: isoproterenol (ISO), β-adrenoceptor 作動薬: dobutamine, β₂-adrenoceptor 作動薬: procaterol, α-adrenoceptor 拮抗薬: phenylephrine, α-adrenoceptor 拮抗薬: phentolamine, β-adrenoceptor 拮抗薬: propranolol, dopamine 受容体作動薬: dopamine (DA), dopamine 受容体拮抗薬: haloperidol である。また, adrenaline 代謝過程の酸化産物である adrenochrome (Adc) と抗酸化物質 dithiothreitol (DTT) も用いた。これらの中で haloperidol は DMSO で溶解し, 他の薬物は滅菌蒸留水で溶解し, いずれも 0.22 μ m のフィルターで濾過後培養細胞に適用した。用いた薬物の濃度は Zilkha-Falb ら⁶ の実験を参考にし, 各 CA 作動薬は 10 μ M ~ 1 mM の濃度で細胞に添加した。用いた拮抗薬の濃度は, 0.3 μ M から 10 μ M とした。また, Simantov ら⁷ の実験を参考にして 100 μ M から 1 mM の濃度の DTT を培養細胞に添加し, 遮光下に約 30 分前処理後, CA 作動薬を培養細胞に加えた。

(3) 各薬剤の評価法

各薬剤を加えた日を 0 日として培養 2, 4, 7 日目に細胞を回収し, Cell Counter を使って, 細胞数を数えた。各薬物の作用を検討する実験は 3 well ずつ行い, 3 つの well の平均値を 1 回の測定値とした。細胞数の変化は, 各 2, 4, 7 日目の測定値を 0 日の細胞数に対する割合 (%) で表した。データは 3~4 回の実験から得られた測定値の平均値 \pm SD で表した。統計処理は片側 t-test によって, 有意の差を検討した。p < 0.05 を有意と判定した。

結 果

1. CA の培養細胞への影響

CA の BG 2 c2 細胞への影響を検討するために 10 μ M から 1 mM を適用して形態と細胞数の経時変化を観察した。Fig. 1 は AD (B), NA (C), DA (D) 300 μ M 添加後 4 日目の細胞の写真例を示しているが, CA 添加群は無処置群 (A) に比べ細胞数が少なかった。経時的に細胞を調べてみると, Fig. 2 に示すように CA 無添加群は 2, 4, 7 日目に平均 302%, 507%, 907% に細胞数が増加するのに対し, 各 CA 添加により細胞数の増加は抑えられ, CA 適用後 2 日目から対応する日の無処置群に対し有意差があった。各 CA の細胞数増加抑制作用は用いた 10 μ M から 1 mM の範囲内で濃度依存的であった (データは示していない)。培養 7 日目で比較して見ると細胞数増加率は無処置群平均 907% であったのに対し, AD 300 μ M 添加群は 212%, NA 300 μ M 添加群は 128%, DA 300 μ M 添加群は 162%, ISO 300 μ M 添加群は 155% であった。これら CA 添加群の 7 日目の細胞数は統計的には実験開始日の細胞数との間に有意の差はなかった (Fig. 2)。CA による細胞数の増加抑制は 4 日目ですでに明らかであることから (Fig. 2), 以下の実験においては 4 日間の培養で CA 300 μ M を適用して細胞数増加抑制の機構を調べた。

2. CA 受容体関与の検討

(1) α-adrenoceptor 作動薬 phenylephrine により細胞数増加抑制は起こらなかった (データは示していない)。また, α-adrenoceptor 拮抗薬 phentolamine で AD による細胞数増加抑制効果は阻害されなかった (Fig. 4)。前述のように ISO には細胞数増加抑制効果が認められたことより, AD による細胞数増加抑制に β-adrenoceptor の関与が考えられる。そこで β-adrenoceptor の関与を検討するためにサブタイプである各 β₁, β₂-adrenoceptor の作動薬 dobutamine, procaterol を用い細胞数増加に対する効果を検討した。その結果, dobutamine で CA と同様に細胞数増加停止現象が見られた。しかし, procaterol では細胞数増加抑制作用は見られなかった (Fig. 3)。β-adrenoceptor 拮抗薬 propranolol を 0.3 ~ 10 μ M の濃度で 30 分前処置しても AD 300 μ M による細胞数増加抑制効果は阻止されなかった (Fig. 4)。

DA による細胞数増加抑制に dopamine 受容体が関与するかどうかを調べるため dopamine 拮抗薬である

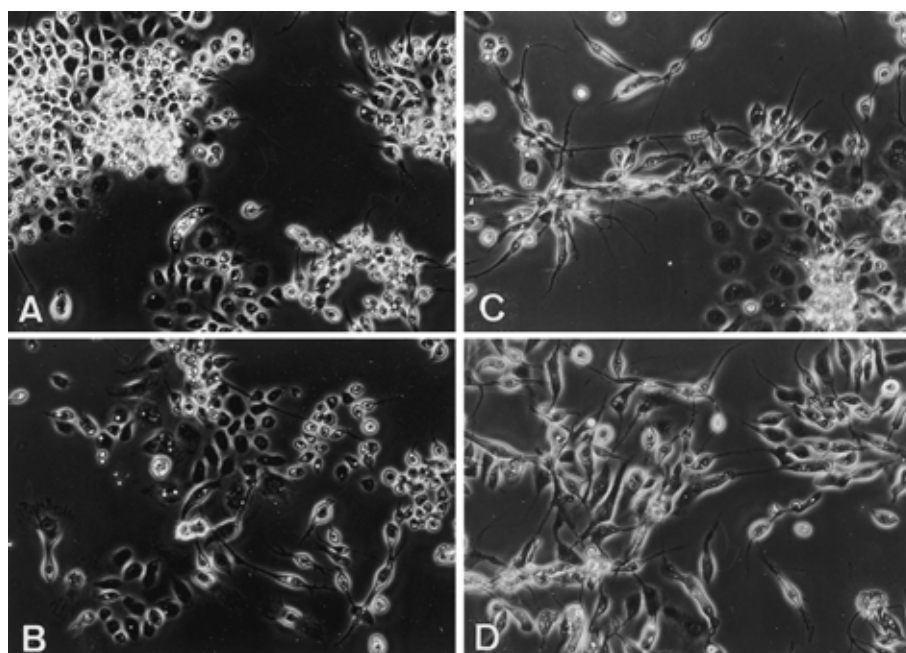


Fig. 1 Effects of CA on ML-DmBG 2-c 2 cells
A : control cells without CA. B, C and D : cells exposed to 300 μ M AD, NA and DA, respectively. Cells were cultured for 4 days.

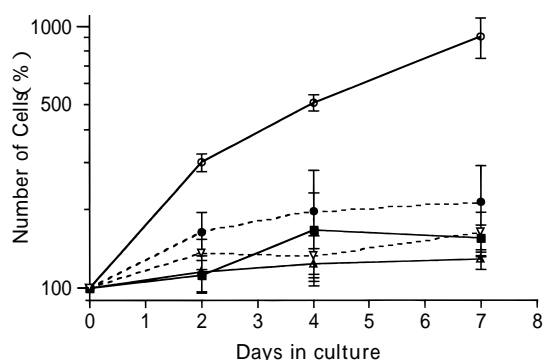


Fig. 2 Time course of change in cell number after exposure to CA

: Control, : 300 μ M of adrenaline, : 300 μ M of noradrenaline, : 300 μ M of isoproterenol, : 300 μ M of dopamine. The cells at each day were expressed as percent of the number of cells on the initial day (0 day). Number of cells treated with each CA were not significantly different from those initial of the cells on the day, though they were significantly less than those of the control cells without CA at the corresponding day ($p < 0.01 \sim 0.001$). Symbols of significant difference were omitted for complexity. Each symbol and bar represent mean \pm SD ($n = 3 \sim 4$).

haloperidol 0.3 ~ 10 μ M で 30 分前処置した後に DA を加えたが, DA 単独投与群との間に有意の差は見られなかった (Fig. 4).

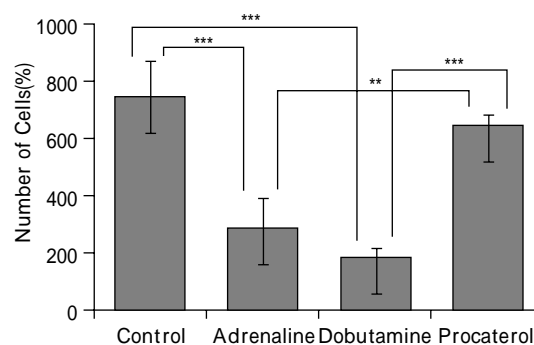


Fig. 3 Effects of β agonists on the cells
Cells were cultured for 4 days with β_1 agonist dobutamine and β_2 agonist procaterol at the concentration of 300 μ M. Each column and bar indicates mean \pm SD. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ ($n = 3 \sim 4$).

3. AD 代謝物質および酸化防止剤による検討

Dobutamine を含めた CA は光や酸素あるいは酵素などによって代謝分解されて酸化代謝産物や活性酸素などを作り出すのに対し, procaterol は別の代謝過程によって代謝分解される^{6, 10}. 本実験で各 CA 拮抗薬が無効 (Fig. 4) であったことから, CA の細胞数の増加を抑える作用は CA それ自身が受容体を介し発揮するものではなく, 別の機構, 例えば CA の酸化物質や活性酸素などが関与している可能性がある. そこで, AD の作用に対する酸化防止剤 dithiothreitol

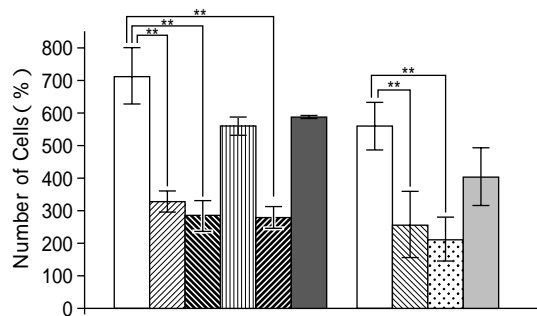


Fig. 4 Effects of CA antagonists on the cells treated with AD or DA

: control, : AD 300 μ M, : AD 300 μ M with phentolamine 10 μ M, : Phentolamine alone 10 μ M, : AD 300 μ M with propranolol 10 μ M, : Propranolol alone 10 μ M, : DA 300 μ M, : DA 300 μ M with haloperidol, : Haloperidol alone 10 μ M. Each symbol and bar represent mean \pm SD (n=3~4) Cells were counted on day 4 in culture. *p<0.05; **p<0.01.

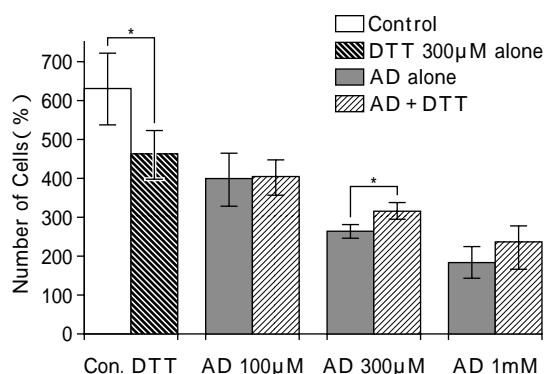


Fig. 5 Effects of DTT on cells exposed to adrenaline. Cells were cultured with 100 μ M, 300 μ M or 1 mM of AD alone or with 300 μ M of DTT for 4 days. Number of cells treated with DTT alone were significantly less than that of non-treated cells (*p<0.05). After pretreatment with DTT, the number of cells exposed to 300 μ M AD with significantly greater than the value of 300 μ M AD alone (*p<0.05, n=3)

(DTT) 300 μ M の効果を検討した . DTT 300 μ M 単独での細胞数 (458.1 \pm 63.9% , 平均値 \pm SD) はコントロール (626.6 \pm 93.1% , 平均値 \pm SD) の平均 73% であった (Fig. 5 , p<0.05 , n=3) . 各 AD 100 μ M , 300 μ M あるいは 1 mM と DTT を同時に作用させた場合 , AD 300 μ M+DTT 群だけ 300 μ M AD 濃度単独群との間に有意の差が見られた . すなわち , DTT 存在下では AD による細胞数増加の抑制が部分的に抑えられた . さらに , AD 代謝産物の一つである adrenochrome の細胞に及ぼす影響を 10 μ M から 1 mM までの濃度の範囲

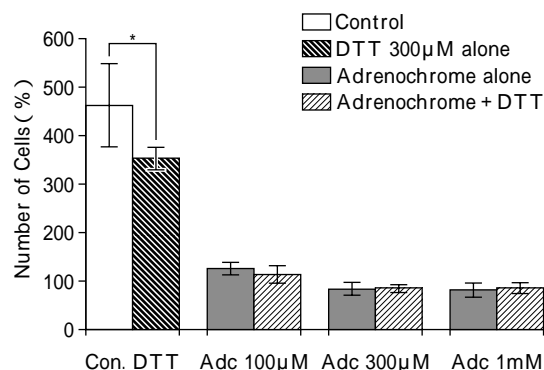


Fig. 6 Effects of DTT on cells exposed to adrenochrome

Cells were cultured with 100 μ M, 300 μ M or 1 mM of adrenochrome alone or with 300 μ M of DTT for 4 days. Number of cells treated with adrenochrome were significantly less than that of control. Number of cells treated with DTT alone were significantly less than that of non-treated cells (*p<0.05, n=3) After pretreatment with DTT, the number of cells exposed to adrenochrome at each concentration was not significantly greater than the value of adrenochrome alone.

で⁷ , 検討した . Adrenochrome は細胞数増加を CA と同様に抑えることが見られた . Fig. 6 に示すように adrenochrome 100 μ M から 1 mM の濃度で無処置群に比べ細胞数は約 1/4 と著しく少なかった (p<0.001 , n=3) . Adrenochrome の細胞数増加抑制作用が adrenochrome 自身がさらに酸化されるために起こることも考えられるので , DTT の作用を検討した . このシリーズの実験では DTT 単独での細胞数 (351.8 \pm 22.3% , 平均値 \pm SD) はコントロール (461.5 \pm 86.7% , 平均値 \pm SD) に対し , 平均 24% 少なかった (Fig. 6 , p<0.05 , n=3) . Adrenochrome 単独群と adrenochrome+DTT 群の間に有意の差は見られなかった (Fig. 6 , 考察参照) . さらに , CA 代謝に伴って発生する H₂O₂^{7,9,10} の作用も検討したところ , adrenochrome と同様に細胞数増加抑制作用が見られた (データーは示していない) .

考 察

本研究結果によって用いた adrenaline , noradrenaline , dopamine , isoproterenol は , ショウジョウバエ幼虫の中枢神経系からクローン化された細胞 ML-DmBG 2 c2 に細胞数増加抑制を引き起こすことが明らかとなった (Fig. 1, 2) . この抑制現象は細胞死によるものであるのか , あるいは細胞増殖抑制のためであるかが問題である . トリパブルーで死細胞を検討し

た結果でも, CA 添加群で死細胞の増加は認められなかった(データは示していない). また, 予備的な検討で apoptosis の一つの特徴である DNA 断片化は見られなかった. したがって, CA によるこの現象は細胞増殖抑制と判断した. CA の伝達物質としての生理的な役割以外に神経細胞の生存維持にも CA が関与することを示唆する報告がある. Rosenberg² は培養ラット大脳皮質細胞に NA 25 μ M を適用したところ培養 72 時間後に 82% の細胞が死んだと報告している. Simantov ら⁷ は CA によって human neuroblastoma NMB 細胞の細胞数増加が抑制されることを報告しており, 形態と DNA 断片化の分析から CA が apoptosis を NMB 細胞に引き起こしたと結論した. さらに, Zilkha-Falb ら⁶ は 10 日目のニワトリ胚の培養交感神経節細胞, また 8 日目の BALB-C マウス小脳顆粒細胞に CA を投与すると培養 10 時間後に細胞はほとんど死んでしまうことを報告している. これらの細胞死は apoptosis の特徴を持ち, 酸化防止剤 DTT によって完全に細胞死は抑制されることから, CA 自体ではなく CA 中間酸化代謝物質が apoptosis を引き起こすと結論した. また, 白木¹¹ は NA によってニワトリ胚培養脊髄神経細胞に死が誘導されること, この死は α_1 -adrenoceptor を介すること, さらに, この細胞死のタイプは apoptosis であると報告した. これらの報告に対し本実験ではショウジョウバエの細胞の CA による細胞数増加抑制は細胞死ではなく細胞増殖停止と結論した. すなわち, CA の新たな作用が見い出されたことになる.

本研究で見られた CA によって誘導される細胞増殖抑制が受容体を介するか否かが問題となるが, 受容体が関与しているとするれば, 本研究で用いた CA から α , β adrenoceptor および DA 受容体の関与が考えられる. Adrenoceptor 作動薬のうち ISO が同様の作用を発現したことは, 少なくとも β -adrenoceptor が関与することが考えられる. そこで, β -adrenoceptor のサブタイプを検討したところ, β_1 -adrenoceptor 作動薬である dobutamine により細胞増殖抑制作用が認められたが, β_2 作動薬である procaterol は無効であった. しかし, α - β -adrenoceptor 拮抗薬および DA 拮抗薬はいずれも AD および DA の細胞増殖抑制作用を阻害しなかった. これら拮抗薬および作動薬の結果を解釈すると, 拮抗薬が無効であったことは, 用いた CA の作用が受容体を介さず別の機構で細胞増殖抑制を起こしていることを示唆している. しかしながら, 最近の分子生物学的手段により受容体の構造解析が進み, α , β , DA 受容体にサブタイプが存在すること, また種により受容体の構造が異なることもある¹² などを考える

と, 本研究で用いた細胞がショウジョウバエ由来であることから, 受容体を特に β_1 様 adrenoceptor を介している可能性を否定することは出来ない. もう一つの可能性として, CA の中間代謝産物あるいは CA 代謝過程に生じる活性酸素が細胞増殖抑制を引き起こすか否かを検討した. そのため CA のうち入手が可能である AD の中間酸化代謝物である adrenochrome および H_2O_2 を用いた. その結果, adrenochrome により CA と同様に細胞増殖抑制作用が観察された (Fig. 6). さらに, 活性酸素を産生する物質である H_2O_2 を適用しても細胞増殖が抑制された. これらのことは, CA 中間酸化代謝物質のうち少なくとも adrenochrome, あるいは CA 代謝過程で生じる活性酸素が細胞増殖抑制を引き起こしていることを示唆している. そこで, CA の酸化を阻止する目的で酸化防止剤 (DTT) を投与した. その結果, 300 μ M AD 群と AD 300 μ M + DTT 群の間には有意の差がであった. つまり, AD により誘導される細胞増殖抑制は部分的ではあるが阻止されたと解釈される. また, 酸化防止剤として ascorbate も用いたが, DTT と同様の結果であった (データは示していない). これらの結果は CA 自体だけではなく中間代謝物質, あるいは活性酸素も細胞増殖抑制作用を發揮していることを考えさせる. しかしながら, DTT は用いた濃度における adrenochrome による細胞増殖抑制は抑えなかった (Fig. 6). この結果から adrenochrome の細胞増殖抑制阻害作用は DTT にはないと考えられる. Adrenochrome は培養中にさらに酸化を受けると考えられるが, DTT の抑制効果がないということは, adrenochrome 以降の酸化代謝物質には細胞増殖抑制作用はないと考えられる. CA 中間代謝物のすべてについて調べたわけではないので, さらに検討が必要であるが, 本研究で見い出された CA の細胞増殖抑制作用は CA 自体, CA の代謝物質およびその過程で産生される活性酸素によって發揮されていることが推測される.

結 論

本研究によって, 用いた全部の CA (adrenaline, noradrenaline, dopamine, isoproterenol) は, ショウジョウバエ幼虫の中枢神経系 (CNS) からクローン化した細胞 (ML-DmBG 2 c2) の細胞増殖を抑制することが見い出された. この細胞増殖抑制作用は, CA 自体, CA の中間酸化代謝産物, CA の中間代謝の過程で生じる活性酸素などによって引き起こされることが考えられた.

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました日本医科大学薬理学教室宮田雄平教授に深甚なる感謝の意を表しますとともに本研究を行うにあたり御指導頂きました永野昌俊助手に深謝いたします。また御助言、御協力頂きました薬理学教室の皆様にも、厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1 . Kwon JH, Eves EM, Farrell S, Segovia J, Tobin AJ, Wainer BH, Downen M : β_2 -adrenergic receptor activation promotes process outgrowth in an embryonic basal forebrain cell line and in primary neurons. *Eur J Neurosci* 1996 ; 8 : 2042 - 2055.
- 2 . Rosenberg PA : Catecholamine toxicity in cortex in dissociated cell culture. *J Neurosci* 1988 ; 8 : 2887 - 2894.
- 3 . Ui K, Nishihara S, Sakuma M, Togashi S, Ueda R, Miyata Y, Miyake T : Newly established cell lines from *Drosophila* larval CNS express neural specific characteristics. *In vitro Cell Dev Biol* 1994 ; 30 A : 209 - 216.
- 4 . Ui-Tei K, Nishihara S, Sakuma M, Matsuda K, Miyake T, Miyata Y : Chemical analysis of neurotransmitter candidates in cell lines from *Drosophila* central nervous system. I. ACh and L-DOPA. *Neurosci Lett* 1994 ; 174 : 85 - 88.
- 5 . Reale V, Hannan F, Hall LM, Evans PD : Agonist-specific coupling of a cloned *Drosophila melanogaster* D1-like dopamine receptor to multiple second messenger pathways by synthetic agonists. *J Neurosci* 1997 ; 17 : 6545 - 6553.
- 6 . Zilkha-Falb R, Ziv I, Nardi N, Ofen D, Melamed E, Barzilai A : Monoamine-induced apoptotic neuronal cell death. *Cell Mol Neurobiol* 1997 ; 17 : 101 - 118.
- 7 . Simantov R, Blinder E, Ratovitski T, Tauber M, Gabbay M, Porat S : Dopamine-induced apoptosis in human neuronal cells : Inhibition by nucleic acids antisense to the dopamine transporter. *Neuroscience* 1996 ; 74 : 39 - 50.
- 8 . Bindoli A, Rigobello MP, Galzigna L : Toxicity of aminochromes. *Toxicol Lett* 1989 ; 48 : 3 - 20.
- 9 . Matthews SB, Henderson AH, Campbel AK : The adrenochrome pathway : The major route for adrenaline catabolism by polymorphonuclear leucocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1985 ; 17 : 339 - 348.
- 10 . Karon BS, Daly TM, Scott MG : Mechanism of dopamine and dobutamine interference in biochemical tests that use peroxide and peroxidase to generate chromophore. *Clin Chem* 1998 ; 44 : 155 - 160.
- 11 . 白木康夫 : ニワトリ胚培養脊髄神経細胞のノルアドレナリンによる細胞死誘導 . *日医大誌* 1998 ; 65 : 34 - 41.
- 12 . Yamazaki Y, Takeda H, Akahane M, Nishizawa O, Ajisawa Y : Species differences in the distribution of beta-adrenoceptor subtypes in blood smooth muscle : *Bri J Pharmacol* 1998 ; 124 : 593 - 599

(受付 : 1998 年 12 月 10 日)

(受理 : 1998 年 12 月 28 日)