

令和元年9月3日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09201

研究課題名(和文)ヒ素による細胞死とオートファジー、プロテアソーム系の関与について

研究課題名(英文)Cell death induced by arsenite in relation to autophagy and proteasome system

研究代表者

上村 公一 (UEMURA, Koichi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30244586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒ素の臓器障害作用の機構の解明を研究目的とし、培養細胞、ラットへのヒ素投与により、細胞死関連蛋白質やそのシグナル経路を明らかにしたい。結果、ATO投与48時間のラットの脳にDNA損傷が起こされ、チェックポイントとしてATR-Chk経路が働いていた。脳組織ではATOが起こすDNA損傷に対してATR-Chk経路だけでなく、PMLも変動していた。アポトーシスが見られず、DNA損傷が修復されたからと考えた。一方、SH-SY5Y細胞ではChk1のリン酸化を認めたがアポトーシスを防げなかったと考えた。ATO投与後、比較的早期にラット脳組織に達し、DNA損傷を起こし、PML変動も起こることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中毒物質として重要なヒ素を取り上げ、ヒ素の各臓器に対する障害作用の機構の解明を目的とする。ヒ素は急性前骨髄性白血病の治療薬として用いられ、ヒ素の細胞への作用機序の詳細の解明によって、副作用の少ない抗癌剤の開発にも資する。ラット脳組織ではヒ素が起こすDNA損傷に対してATR-Chk経路だけでなく、PMLも変動し、細胞死を抑制していた。一方、神経系培養細胞ではChk1のリン酸化を認めたが、細胞死をを防げなかった。ヒ素の作用機序の一部が解明された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify arsenic trioxide (ATO) induced organ damage by the administration of ATO to rat or cultured cells, in relation to cell death related proteins or death signal pathway. We clarified DNA damage occurred in the brain where ATO was administered after 48hrs and DNA damage checkpoint AR-Chk pathway was activated with PML (promyelocytic leukemia protein) upregulation. This is because DNA damage was restored and apoptosis did not occur, while in the cultured SH-SY5Y cells, apoptosis was not preventable in spite of phosphorylation of Chk1. After the ATO administration to rat, DNA damage occurred relatively in the early stage with the PML upregulation.

研究分野：法医学

キーワード：ヒ素 脳 PML ATR-Chk経路

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬物中毒死は代表的な外因死であるが、外表を観察するのみの検案では死因は究明できない。そのため、法医解剖が実施され、血液、尿、臓器中の薬物定性・定量分析の後、死因の確定が行われる。従来から薬物中毒の研究は法医学、薬理学、救急医学、内科学の領域で行われてきたが、中毒の機構についての詳細な生化学・分子生物学的研究は、膨大な数の中毒物質があることと研究者が少ないことから、あまり進んでいない。中毒物質は神経毒、血液毒、等に分類されるように標的臓器が異なる。それぞれの組織・細胞種による毒物への感受性に違いがあることに起因する。中毒物質は多数存在し、それぞれについての中毒作用の詳細を検討することは中毒の全体像を理解する上で重要である。近年、細胞毒性の指標となる細胞死についての生化学的な研究が進歩している (necrosis, apoptosis, autophagy)。

ヒ素化合物の亜ヒ酸 (As_2O_3) は無味無臭、かつ、強毒性のため、昔から西洋で毒殺の手段としてしばしば用いられてきた。我が国ではヒ素中毒死の数は比較的少ない。しかし、1998年の和歌山ヒ素カレー事件のように他殺の手段として用いられたこともある。過去の研究から、ヒ素は体内に吸収されるとチオール (-SH) 基と反応し、蛋白質を変性させ、毒性を示すとされている。また、ヒ素毒性に活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) が関与していることも報告されている。急性毒性としては、消化器症状、神経症状、循環器症状などがあり、慢性中毒では皮膚症状が見られる。一方、ヒ素は急性前骨髄性白血病の治療薬に用いられている (Shen Z-X, et al, Blood 89; 3354-3360, 1997)。その作用機序はヒ素が異常タンパク質の PML (promyelocytic leukemia protein)-RAR α (retinoic acid receptor- α) や PML を分解し、血球系の異常な増殖シグナルを止めることである (Santos, et al., J Exp Med 210; 2793-2802, 2013)。また、ヒ素は血球系だけでなく、固形腫瘍に対する抗癌剤としても注目されている (Wang W, et al, Pancreas 38; e114-e123, 2009)。

2. 研究の目的

細胞死に necrosis, apoptosis の区別がある。一方、autophagy はこれまで細胞死のひとつの類型と考えられてきたが、最近、傷害された細胞内小器官を除去することにより細胞保護的に働いていることが明らかになってきた。本研究では、ヒ素中毒作用の標的臓器と考えられる心臓、肝臓、脳について研究をすすめる。当教室ではラット心房心筋由来の HL-1 細胞、ラット心筋由来の H9c2 細胞、ヒト肝癌由来の HepG2 細胞、ヒト神経芽細胞腫由来の SH-SY5Y 細胞を常時培養している。これら培養細胞にヒ素化合物である三酸化二ヒ素 (亜ヒ酸: As_2O_3) を暴露し、細胞死の種類を確認し、さらに、autophagy の関与について、生化学的解析を行う。薬毒物による細胞傷害と autophagy の関係は現在、まだまだ研究途上である。また、培養細胞実験の結果をもとに、ラットへの亜ヒ酸投与実験を行い、組織学的検討を加える。当分野の飼育室で亜ヒ酸投与 2 日目までの急性実験を実施する。心臓、肺、肝臓、脳の各臓器について、生化学的解析、免疫組織化学的解析を行う。これまでの当分野の研究成果では、心筋由来の培養細胞への亜ヒ酸暴露では proteasome の機能不全による ubiquitin-proteasome 系 (UPS) の障害が細胞傷害に関与していることが明らかとなっている。さらに、肝臓、肺、脳についても同様に、亜ヒ酸による proteasome の機能不全や autophagy の障害があるのではないかと考えている。また、ラットへの亜ヒ酸投与の予備実験では、脳の western blotting で PML (promyelocytic leukemia protein) が減少 (分解) していることを確認している。PML は多くの isoform があり、どの isoform が関与しているかについても検討する。

3. 研究の方法

実験モデルとしてラットを用いた。ラットでは亜ヒ酸の薬理作用の target である PML (promyelocytic leukemia protein) の分解について、ヒ素の毒性に関与しているかという観点から検討した。ヒ素を腹腔内投与し、心臓、肺、肝臓、脳について、PML の変動と DNA の損傷について検討した。さらに、その結果を確認するため、培養細胞を用いて詳細に検討した。

(1) 材料

< 試薬 >

As_2O_3 (Arsenic trioxide) は固体で、比較的水に溶けやすい。Stock 溶液 (1M) を作成した。

< ラット >

動物実験は東京医科歯科大学動物実験センターの運営指針に従い、動物実験の実施許可を得て実施した。

ATO (5mg/kg) を 6 週齢 Wistar 系雄性ラットに腹腔内投与し、6 時間後及び 48 時間後に心臓、肺、

肝臓、脳(大脳半球)を採取した。ウェスタンブロット法(WB)により蛋白質動態を、8-OHdG 染色及び TUNEL 法により DNA 損傷とアポトーシスの有無について評価した。さらに、DNA 損傷チェックポイント蛋白の変動についても検討した。

< 細胞培養 >

Stock 溶液(1M)を希釈して培地中に投与する。神経系由来の SH-SY5Y 細胞に 1、3、10 μ M の ATO を 24 時間暴露し、in vivo 同様に PML、DNA 損傷マーカーについて、WB 法により蛋白質動態を評価した。

< 使用抗体 >

anti-PML antibody(Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, TX, USA),
anti-ATR, p-ATR (Ser428-phosphorylated), p-ATM (Ser1981-phosphorylated), p-Chk1 (Ser345-phosphorylated), p-Chk2 (Thr68-phosphorylated), p-H2AX (Ser139-phosphorylated), and cleaved caspase-3 antibodies Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA).
anti-actin Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
anti-8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) antibodies JaiCA (Shizuoka, Japan), respectively.

(2) Western blotting

定法通り、組織および細胞の lysates は電気泳動し、PVDF membranes (Millipore)に転写、一次抗体と反応させ、horseradish peroxidase 二次抗体と反応後、ECL 発光試薬でバンドを発光させて定量した。

(3) DNAダメージ

パラフィン包埋切片について、anti-8-OHdG antibody、overnight at 4 $^{\circ}$ C で反応させ、Histofine Simple Stain MAX PO kit (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan) 、DAB発色させた。

(4) TUNEL 染色

Apoptosis in situ detection kit (Wako, Osaka, Japan) を使用した。

4. 研究成果

(1)ラットに ATO (5mg/kg)を腹腔内投与し、6時間、48時間後に心、肺、肝、大脳を採取した。WB にて、PML の変動を測定した。その結果、心、肺、肝に変動なく、48時間の脳では PML の 150kDa 以上の isoform で変動を認めた。

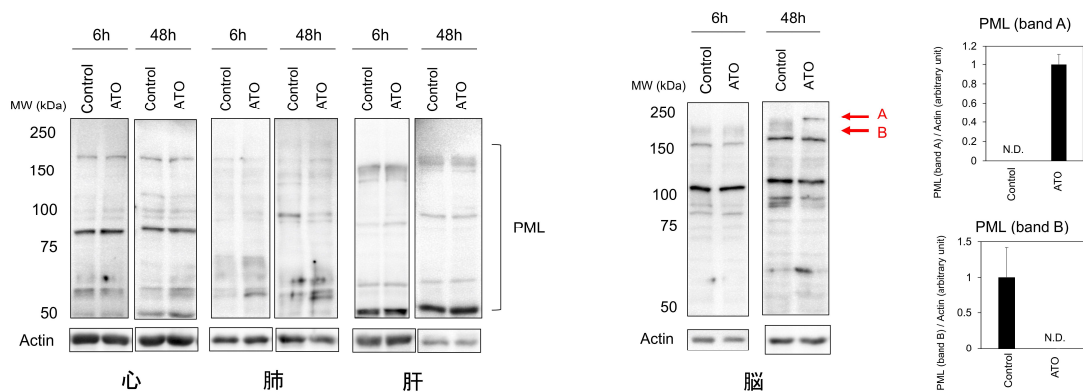


図 1A ラットの心、肺、肝では PML に有意な変動はなかった。

図 1B 48時間の脳では PML の 150kDa 以上の isoform (A、B の矢印)の変動を認めた

(2)ラットに ATO (5mg/kg)を腹腔内投与により、ラット脳について、ATR,DNA 損傷チェックポイント蛋白 Chk1 のリン酸化を認めた。ATR-Chk1 経路を活性化が確認された。また、48時間後に神経細胞核に 8OH-dG 染色陽性が認められ、DNA 損傷が示唆された。

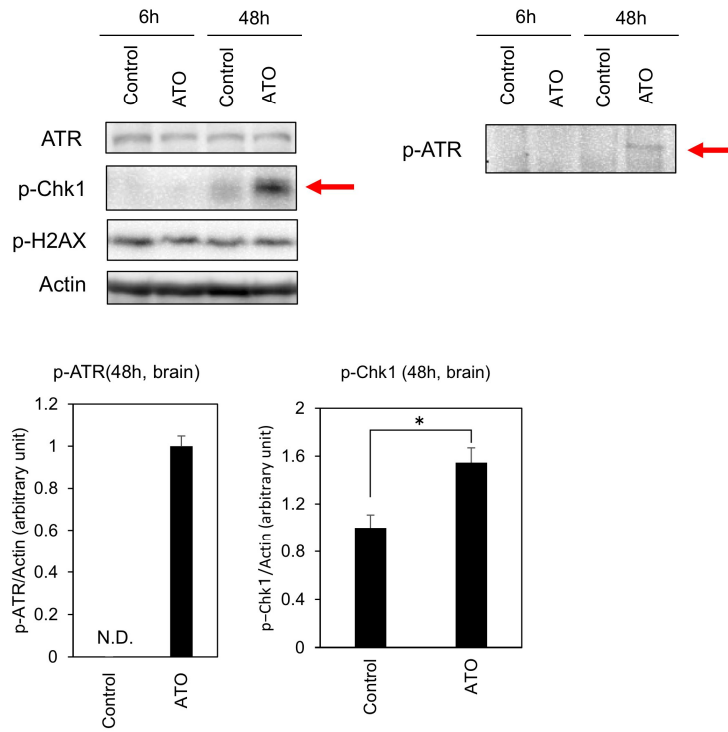


図 2A ATO はラット脳組織において、DNA 損傷を惹起し、ATR-Chk1 経路を活性化した

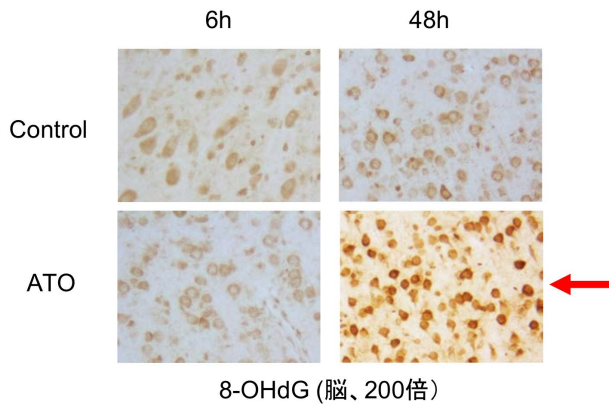


図 2B 48 時間後に神経細胞核に 8OH-dG 染色陽性が認められ、DNA 損傷が示された

(3)ラットに ATO (5mg/kg)を腹腔内投与 48 時間後、cleaved caspase 3 活性の上昇、TUNEL 染色は陰性であり、細胞死のアポトーシスは確認できなかった。

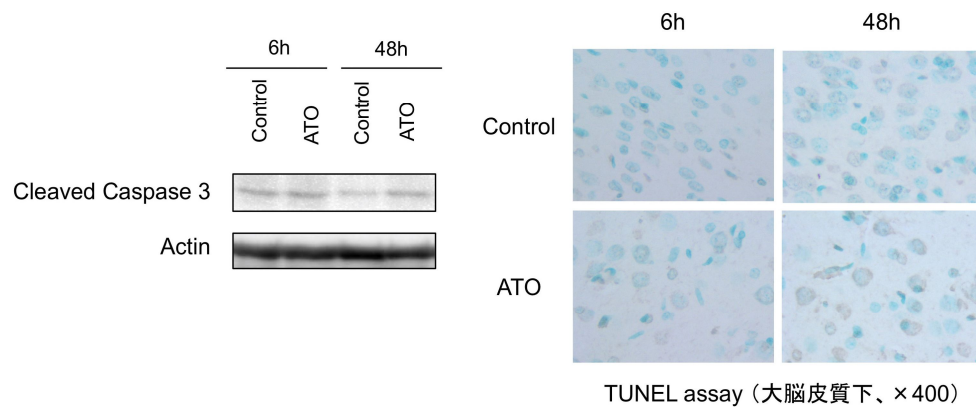


図 3 48 時間後に TUNEL 染色ではアポトーシスは確認できなかった。

(4)神経系由来の SH-SY5Y 細胞に 1、3、10 μ M の ATO を 24 時間暴露した。24 時間後では 3 μ M

を最高に Chk1 のリン酸化と濃度依存的に cleaved caspase 3 の増加を認め、細胞死を確認した。

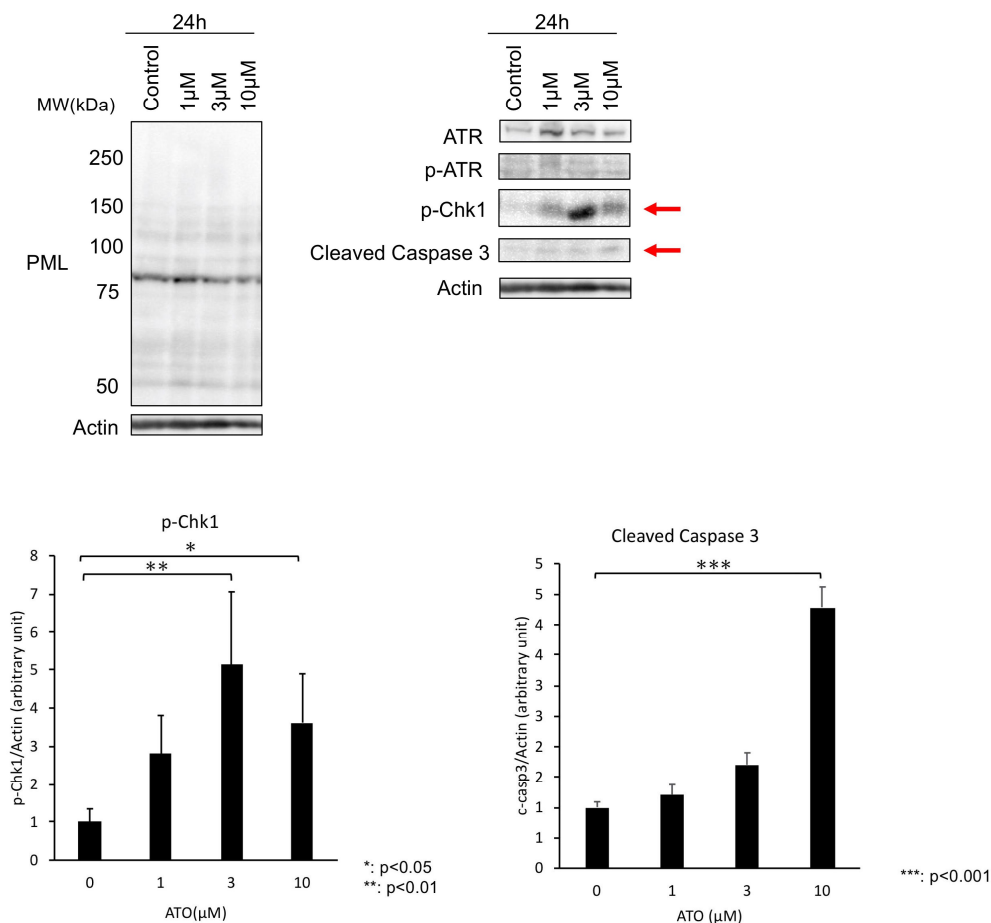


図 4 SH-SY5Y 細胞では、24 時間後では 3 μM を最高に Chk1 のリン酸化と濃度依存的に cleaved caspase 3 の増加を認めた

<まとめ>

ヒ素が細胞に暴露された時、細胞死を防ぐため、autophagy、ubiquitin-proteasome 系 (UPS) が作動し、細胞保護的に働いていると考えられる。しかし、ヒ素の毒性の方がより強いと、最終的に細胞死に至る。ATO 投与 48 時間のラットの脳に DNA 損傷が起こされ、そのチェックポイントとして ATR-Chk1 経路が働いていると考えられた。脳組織では ATO が起こす DNA 損傷に対して ATR-Chk 経路だけでなく、PML も変動していた。アポトーシスが見られないことは DNA 損傷が修復されたからと考える。SH-SY5Y 細胞では、Chk1 のリン酸化を認めるが、ATO によるアポトーシスを防げなかったと考えた。ATO 投与後、比較的早期にラット脳組織に達し、DNA 損傷を起こし、また、PML 変動も起こることが示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Ryo Watanabe, Kana Unuma, Kanako Noritake, Takeshi Funakoshi, Toshihiko Aki, Koichi Uemura. Ataxia telangiectasia and rad3 related (ATR)-promyelocytic leukemia protein (PML) pathway of the DNA damage response in the brain of rats administered arsenic trioxide. J. Toxicologic Pathology. 査読有、2017; 30: 333-337. DOI: 10.1293/tox.2017-0020;

[学会発表] (計 2 件)

ラット脳組織における三酸化二ヒ素の PML 及び DNA 損傷チェックポイント機構への影響.

渡邊 嶺, 鷗沼 香奈, 秋 利彦, 上村 公一.

日本生化学会第 91 回大会 2018 年 9 月 24-26 日、京都.

三酸化二ヒ素の中樞神経系における PML 及び DNA 損傷チェックポイント機構への影響.

渡邊 嶺, 鷗沼 香奈, 秋 利彦, 上村 公一.

第 85 回日本法医学会学術関東地方集会、2016 年 10 月 29 日、横須賀

[その他]

ホームページ等

http://www.tmd.ac.jp/med/legm/houi_kenkyuu.html

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 秋 利彦

ローマ字氏名: (AKI, Toshihiko)

所属研究機関名: 東京医科歯科大学

部局名: 大学院医歯学総合研究科

職名: 准教授

研究者番号: 60304474

研究分担者氏名: 船越 丈司

ローマ字氏名: (FUNAKOSH, Takeshi)

所属研究機関名: 東京医科歯科大学

部局名: 大学院医歯学総合研究科

職名: 助教

研究者番号: 40444715

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 渡邊 嶺

ローマ字氏名: (WATANABE, Ryo)