

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11654

研究課題名(和文) 不飽和カルボニル化合物による細胞傷害と病態発症におけるプロテインキナーゼCの役割

研究課題名(英文) The role of PKC for unsaturated carbonyl compounds-induced cell injury and disease onset

研究代表者

東 恒仁 (HIGASHI, Tsunehito)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：90453018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：人の生活環境には様々な化学物質が存在し、人の健康に影響を与えている。不飽和カルボニル化合物は、主に有機化合物の燃焼によって発生する化学物質であり、強い毒性を持つことが知られているが、その毒性メカニズムは分かっていなかった。本研究では、不飽和カルボニル化合物が、細胞内の特定のシグナル伝達経路を活性化することで細胞死を引き起こしていることを明らかにした。更に、アミノ酸であるシステインやシステインの誘導体が、不飽和カルボニル化合物と直接反応してその細胞毒性を抑制することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不飽和カルボニル化合物は、有機化合物の燃焼によって発生する毒性化合物であり、生体内で細胞死を引き起こすと考えられている。不飽和カルボニル化合物に暴露されやすい肺や心血管系の細胞死は、それぞれ慢性閉塞性肺疾患や動脈硬化症といった疾患の発症・進展の原因となると考えられる。本研究の成果は、環境中の化学物質に起因するこれらの疾患の発症の予防や進展の抑制方法の開発につながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Various chemical compounds exist in human environment, and affect human health. Unsaturated carbonyl compounds are generally generated by combustion of organic chemicals. Although unsaturated carbonyl compounds are highly toxic, the molecular mechanism for their cytotoxicity has been unclear. I have reported that the unsaturated carbonyl compounds induce cell death by activation of specific signaling pathway in cells. I also have revealed that cysteine and several cysteine derivatives directly react with unsaturated carbonyl compounds and detoxify them.

研究分野：化学物質の毒性学

キーワード：不飽和カルボニル化合物 細胞死 プロテインキナーゼC

1. 研究開始当初の背景

(1) 不飽和カルボニル化合物

不飽和カルボニル化合物は、分子内に二重結合を持つカルボニル化合物(アルデヒド・ケトン)であり、高い化学反応性と細胞毒性を持つことが知られている。代表的な不飽和カルボニル化合物としては、アクロレイン(acrolein, ACR)やメチルビニルケトン(methyl vinyl ketone, MVK)が挙げられる。ACRは、タバコの主流煙や草木を燃やした際に発生する煙、加熱された食用油、自動車の排気ガスなどに含まれる。一方、MVKはタバコの主流煙に含まれるほか、プラスチックの重合剤やステロイドの合成材料として工業的に幅広く使われている。このように、不飽和カルボニル化合物は、環境中に広く存在するため、ヒトが容易に暴露されうる化学物質であると言える。生体内において不飽和カルボニル化合物の影響を受けやすいのは、直接暴露されると考えられる気管と肺、そして肺でのガス交換によって暴露されうる血管構成細胞や血液細胞である。肺胞細胞や血管内皮細胞の傷害は、それぞれ慢性閉塞性肺疾患や動脈硬化症の引き金となることが報告されていることから、不飽和カルボニル化合物による細胞傷害の分子メカニズムを明らかにすることで、これら呼吸器系および心血管系疾患の発症機構の解明、ならびに予防・治療方法の開発につながるものと期待される。

不飽和カルボニル化合物は、分子内に二重結合を持つため、通常のカルボニル化合物に比べて化学反応性に富む。生体内においては、特にタンパク質やペプチドのシステイン・リジン・ヒスチジン残基に、また核酸のグアニン残基に対してそれぞれ求電子付加反応して化学修飾(カルボニル化)することが報告されている。しかしながら、どのような生体分子が不飽和カルボニル化合物の標的となり細胞傷害を引き起こしているのか、これまで全く分かっていなかった。

(2) プロテインキナーゼC(PKC)

プロテインキナーゼC(PKC)は、西塚らによって発見されたセリン/スレオニンキナーゼであり、10種類のアイソフォームが存在することが知られている。PKCは、細胞増殖や細胞分化、細胞死など、様々な細胞プロセスの制御に関係する多機能なキナーゼである。研究代表者の研究により、PKC阻害薬が不飽和カルボニル化合物を高濃度を含むタバコ煙ガス相抽出物によって誘導される細胞死を抑制できることが判明していた(Mai and Higashi et al., 2012)。したがって、不飽和カルボニル化合物がPKCを介した細胞死を誘導する可能性が高いことが示唆されていた。

2. 研究の目的

研究代表者は、ACRやMVKなどの不飽和カルボニル化合物の生体毒性の分子メカニズムを明らかにすることを目的として研究を進めている。不飽和カルボニル化合物に暴露された細胞において、もっとも顕著に観察される表現型は、細胞死である。そこで、本研究計画では、不飽和カルボニル化合物によって誘導される細胞死のメカニズムの解明を目標とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ラットC6グリオーマ細胞、HEK293T細胞、ラット大動脈平滑筋A7r5細胞、ヒト臍帯動脈内皮EA.hy926細胞は、10%ウシ胎児血清を添加したダルベッコ変法イーグル培地を用い、37℃、5%炭酸ガス条件下で培養を行った。

(2) 哺乳類培養細胞におけるタンパク質発現

哺乳類培養細胞においてタンパク質を発現するにあたっては、当該タンパク質の遺伝子をマルチクローニングサイトに挿入したレトロウイルスベクターをHEK293T細胞に導入し、レトロウイルスを作製した。培養上清からレトロウイルスを回収し、用いる細胞に感染させた後、抗生物質による遺伝子導入細胞の選抜を実施した。

(3) タバコ煙ガス相抽出物の作製方法

紙巻きたばこ「ハイライト」(JT)の主流煙をガラスファイバー製のフィルターに通じることでタール相を除去した。残ったガス相を25mlのリン酸緩衝バッファー中でバブリングすることでガス相に含まれる水溶性成分を抽出した。この抽出液をタバコ煙ガス相抽出物として用いた。

(4) MTS還元活性測定による細胞の生存率の評価

細胞を96wellプレートに 1.0×10^4 cells/100 μ l/wellの濃度で播種して16時間培養した。タバコ煙ガス相抽出物・ACR・MVKを添加して4時間インキュベートした後、MTS基質(Promega)を加えて更に1-4時間インキュベートし、490nmの吸光度を測定した。未処理の細胞から得られた吸光度を100%として細胞の生存率を評価した。

(5) カルボニル化タンパク質の検出

タバコ煙ガス相抽出物やACRで処理した細胞をNP-40 bufferで溶解し、タンパク質を定量した。細胞溶解液に、アルデヒドと特異的に反応する試薬Aldehyde Reactive Probe(Dojindo)を加えて37℃で1時間反応させた。反応液から目的タンパク質を免疫沈降法で精製した。得られたサンプルをSDS-PAGEで分離し、メンブレンに転写した後、HRP標識ストレプトアビジンで

検出することで目的タンパク質のカルボニル化を検出した。

4. 研究成果

(1) 血管構成細胞の不飽和カルボニル化合物感受性に関する検討

不飽和カルボニル化合物が、心血管系にどのような影響を与えるかを調べるため、まず血管を構成する細胞の不飽和カルボニル化合物感受性について検討した。ラット大動脈平滑筋 A7r5 細胞およびヒト臍帯静脈内皮 EA.hy926 細胞に対して不飽和カルボニル化合物 (ACR・MVK) を負荷し、細胞の生存率を評価したところ、いずれの化合物を用いた場合でも、血管内皮細胞は耐性を示したのに対して血管平滑筋細胞は高い感受性を示した (図 1)。以上の結果から、心血管系において不飽和カルボニル化合物による影響を受けやすいのは、血管平滑筋細胞である可能性が示唆された。血管平滑筋細胞の細胞死 (アポトーシス) は、動脈硬化部位のプラークの脆弱性を強めるという研究成果が報告されていることから (Clarke et al., 2006)、不飽和カルボニル化合物による血管平滑筋細胞の細胞死誘導が動脈硬化症の進展に寄与している可能性は十分に考えられるものである。

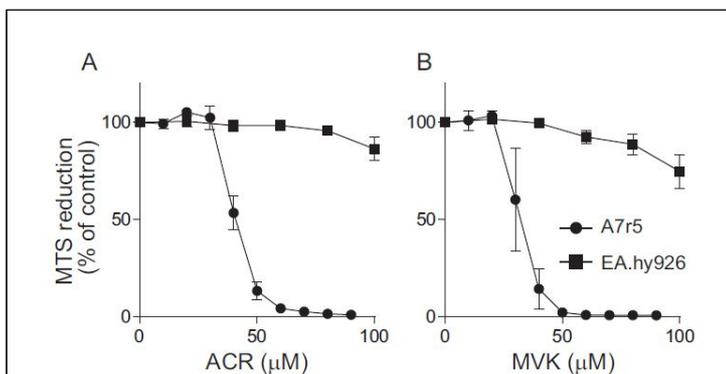


図 1 血管構成細胞の不飽和カルボニル化合物感受性の検討。血管平滑筋由来細胞 (A7r5) および血管内皮由来細胞 (EA.hy926) に対して ACR (A) と MVK (B) を負荷し、細胞の生存率を評価した。JBB 126: 680-684 (2018) より改変して掲載。

(2) 不飽和カルボニル化合物による血管平滑筋細胞の細胞死メカニズム

研究代表者は、過去に ACR や MVK を高濃度を含むタバコ煙ガス相抽出物が PKC 依存的に細胞死を誘導することを見出ししていたことから (Mai and Higashi et al., 2012; Higashi et al., 2014) ACR や MVK による細胞死の PKC 依存性について検討した。まず、血管平滑筋細胞を ACR や MVK で処理したところ、細胞内 PKC のキナーゼ活性が上昇することが分かった。このことは、ACR や MVK が、何らかのメカニズムで PKC を活性化して細胞死を誘導している可能性を示唆する。そこで PKC 阻害薬 (bisindolylmaleimide I, BIS I) であらかじめ処理した細胞に対して ACR・MVK を負荷したところ、細胞死が有意に抑制された (図 2)。したがって、ACR・MVK による細胞死誘導にも PKC が何らかの役割を果たしていることが強く示唆された。A7r5 細胞では、少なくとも PKC α ・ δ ・ ϵ ・ ι の 4 種類のアイソフォームの発現が確認されたことから、蛍光顕微鏡法でこれらのアイソフォームの局在を調べたところ、ACR・MVK 処理によって PKC α および PKC δ が細胞膜に移行するという結果が得られた (図 3)。PKC の細胞膜移行は、一般に PKC 活性化の指標とされていることから、ACR・MVK は、血管平滑筋細胞内で少なくとも一部の PKC アイソフォームの活性化に関与していることが示唆された。なお、ラット C6 グリオーマ細胞においても、同様に ACR・MVK 処理によって一部の PKC アイソフォームの細胞膜移行が観察されたことや PKC 阻害薬によって ACR・MVK による細胞死が抑制されたことから、ACR・MVK による PKC 活性化と PKC を介した細胞死誘導は、特定の細胞種特異的な現象ではないことが示唆された。

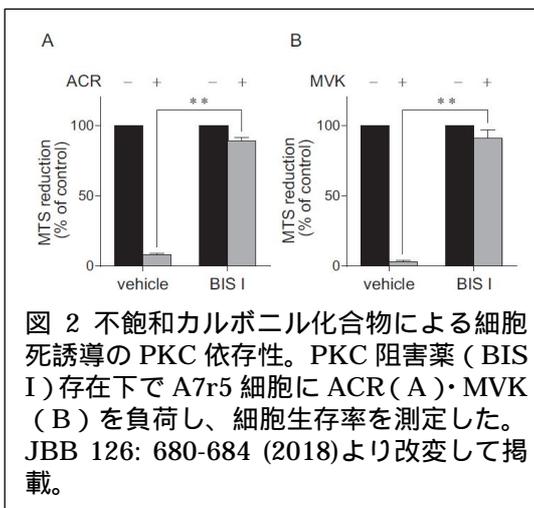


図 2 不飽和カルボニル化合物による細胞死誘導の PKC 依存性。PKC 阻害薬 (BIS I) 存在下で A7r5 細胞に ACR (A)・MVK (B) を負荷し、細胞生存率を測定した。JBB 126: 680-684 (2018) より改変して掲載。

(3) 抗酸化物質による不飽和カルボニル化合物の無毒化メカニズム

不飽和カルボニル化合物が、心血管系、特に血管平滑筋細胞に強く作用し、細胞死を誘導することが判明した。血管構成細胞の細胞死は、動脈硬化症をはじめとする心血管系の疾患の原因となることが知られていることから、不飽和カルボニル化合物の無毒化方法の開発は疾病の予防や進展抑制につながることを期待される。そこで、不飽和カルボニル化合物の効果的な無毒化方法とそのメカニズムについて検討した。不飽和カルボニル化合物は、その α 位の炭素原子が電子豊富な他の原子に対して求電子付加反応することで生体分子に影響を及ぼし、細胞死を誘導すると考えられる。そこで、求核性の高い分子を用いることで不飽和カルボニル化合物をスカベン

ジできるのではないかと考えた。不對電子対をもつ幾つかの化合物を検討したところ、システインやグルタチオン・N-アセチルシステインなどのシステイン誘導体が、ACR・MVK による細胞死を効果的に抑制できることが判明した。

次に、システインやシステイン誘導体による不飽和カルボニル化合物の毒性抑制のメカニズムについて検討した。システイン誘導体が、実際に ACR・MVK と直接反応しているのかを調べるため、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) ならびに質量分析を用いた解析を行った。システイン誘導体と不飽和カルボニル化合物を試験管内で等モル量混合してインキュベートした後、反応物を HPLC にて分析した。その結果、システイン誘導体・不飽和カルボニル化合物とは保持時間が全く異なるピークが観察されたことから、不飽和カルボニル化合物とシステイン誘導体との直接反応の可能性が示唆された。そこで、不飽和カルボニル化合物を高濃度を含むタバコ煙ガス相とグルタチオンを混合してインキュベートした後に精密質量分析で解析したところ、グルタチオンが ACR および MVK とそれぞれ直接反応して生

じる化合物と分子量が等しいピークが観察された。更に、培養上清にシステインやシステイン誘導体をあらかじめ添加することで、細胞内タンパク質のカルボニル化修飾を効果的に抑制できることが判明した (図 4)。生体アミノ酸ではなく、トランスポーターを介して細胞内には取り込まれないと考えられる D-システインについても、L-システインと同様の細胞死やタンパク質のカルボニル化の抑制効果が観察された。以上の結果から、システインやシステイン誘導体は細胞外で不飽和カルボニル化合物のスキャベンジャーとして働き、その細胞毒性を抑制しているものと考えられる。

PKC は、複数のシグナル伝達経路に関係するキナーゼであり、様々な生理的機能を有すると考えられていることから、その機能の全貌の解明が待たれている。本研究の成果は、PKC を介した細胞死の新たな経路の存在を示唆するものであり、基礎科学的には新たな細胞死誘導経路の特定につながるものと期待される。また、不飽和カルボニル化合物による細胞死の効果的な抑制方法とそのメカニズムの解明に成功したことにより、環境中に含まれる毒性化合物である不飽和カルボニル化合物暴露によって引き起こされる可能性がある疾病、すなわち動脈硬化症や満船閉塞性肺疾患の予防法の開発にもつながるものとも考えられる。このように、本研究は基礎科学的側面のみならず、医学的な観点からも今後の進展が期待されるものと考えている。

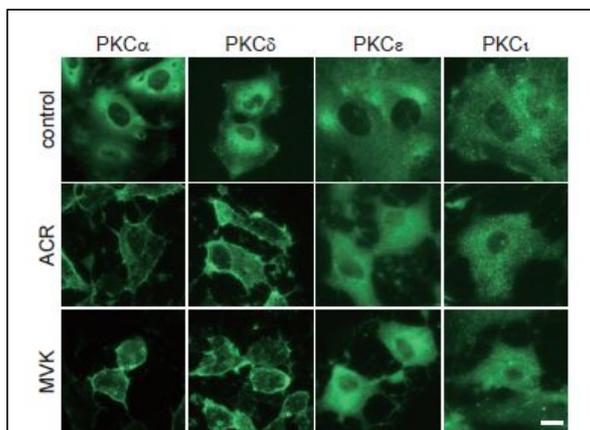


図 3 不飽和カルボニル化合物による PKC の局在変化。GFP を付加した PKC を発現する A7r5 細胞に不飽和カルボニル化合物を負荷し、PKC の局在変化を調べた。JBB 126: 680-684 (2018)より改変して掲載。

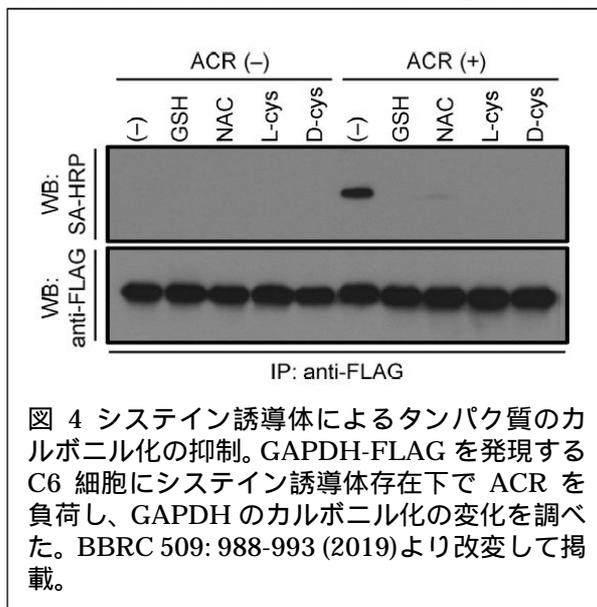


図 4 システイン誘導体によるタンパク質のカルボニル化の抑制。GAPDH-FLAG を発現する C6 細胞にシステイン誘導体存在下で ACR を負荷し、GAPDH のカルボニル化の変化を調べた。BBRC 509: 988-993 (2019)より改変して掲載。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tomaru Utano, Ito Tomoki, Ohmura Yu, Higashikawa Kei, Miyajima Syota, Tomatsu Ruka, Higashi Tsunehito, Ishizu Akihiro, Kuge Yuji, Yoshioka Mitsuhiro, Kasahara Masanori	4. 巻 191
2. 論文標題 Decreased Proteasomal Function Induces Neuronal Loss and Memory Impairment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 144 ~ 156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2020.10.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sampilvanjil A, Karasawa T, Yamada N, Komada T, Higashi T, Baatarjav C, Watanabe W, Kamata R, Ohno N, Takahashi M	4. 巻 318
2. 論文標題 Cigarette smoke extract induces ferroptosis in vascular smooth muscle cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Physiol Heart Circ Physiol	6. 最初と最後の頁 H508-H518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpheart.00559.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mazaki Y, Takada S, Nio-Kobayashi J, Maekawa S, Higashi T, Onodera Y, Sabe H	4. 巻 513
2. 論文標題 Mitofusin 2 is involved in chemotaxis of neutrophil-like differentiated HL-60 cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 708-713
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.04.037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Myobatake Y, Kamisuki S, Tsukuda S, Higashi T, Chinen T, Takemoto K, Hachisuka M, Suzuki Y, Takei M, Tsurukawa Y, Maekawa H, Takeuchi T, Matsunaga TM, Sahara H, Usui T, Matsunaga S, Sugawara F	4. 巻 27
2. 論文標題 Pyrenosine A induces monopolar spindle formation and suppresses proliferation of cancer cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorg Med Chem	6. 最初と最後の頁 115149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2019.115149	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mai Y, Ujiie H, Higashi T, Yamagami J, Iwata H, Shimizu H	4. 巻 180
2. 論文標題 Autoantibodies undetectable by chemiluminescent enzyme immunoassay require extended antigen-antibody reaction time for detection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Br J Dermatol	6. 最初と最後の頁 215-216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjd.17121	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Higashi T, Elmeligy E, Mai Y, Noya Y, Terada K, Mazaki Y, Kuge Y, Miwa S	4. 巻 509
2. 論文標題 Glutathione and cysteines suppress cytotoxicity of gas phase of cigarette smoke by direct reacting with unsaturated carbonyl compounds in the gas phase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 988-993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.01.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Mazaki Y, Higashi T, Horinouchi T, Miwa S	4. 巻 511
2. 論文標題 Annexin A2 is involved in activation of extracellular signal-regulated kinase upon endothelin-1 stimulation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 69-72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.02.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mazaki Yuichi, Higashi Tsunehito, Onodera Yasuhito, Nam Jin Min, Hashimoto Ari, Hashimoto Shigeru, Horinouchi Takahiro, Miwa Soichi	4. 巻 593
2. 論文標題 Endothelin type B receptor interacts with the 78 kD a glucose regulated protein	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 644-651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13347	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Higashi Tsunehito, Mai Yosuke, Mazaki Yuichi	4. 巻 126
2. 論文標題 Protein kinase C-dependent cell damage by unsaturated carbonyl compounds in vascular cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 527 ~ 532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2018.04.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 東恒仁、真崎雄一
2. 発表標題 不飽和カルボニル化合物による細胞死に關与するPKCアイソフォームの同定
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tsunehito Higashi, Yuichi Mazaki
2. 発表標題 Protein kinase C β is involved in unsaturated carbonyl compounds-induced cell death in macrophages
3. 学会等名 JAACT2020 Fuchu (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東恒仁、真崎雄一
2. 発表標題 タバコ煙タール相による細胞死誘導メカニズム
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東恒仁、Enas Elmeligy、眞井洋輔、野矢洋一、真崎雄一、久下裕司、三輪聡一
2. 発表標題 システイン誘導体による煙中の不飽和カルボニル化合物の解毒メカニズムの解明
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東恒仁、Enas Elmeligy、眞井洋輔、野矢洋一、久下裕司、真崎雄一、三輪聡一
2. 発表標題 抗酸化物質によるタバコ煙ガス相の分子メカニズムの解明
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東恒仁、眞井洋輔、真崎雄一
2. 発表標題 不飽和カルボニル化合物が血管構成細胞に及ぼす影響の解明
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 東恒仁、眞井洋輔、真崎雄一
2. 発表標題 不飽和カルボニル化合物はプロテインキナーゼC依存的に心血管系細胞の細胞死を誘導する
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsunehito Higashi, Yosuke Mai, Yuichi Mazaki
2. 発表標題 Molecular mechanism for unsaturated carbonyl compounds-induced vascular cell death
3. 学会等名 ASCB/EMBO 2018 Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学大学院医学研究院・薬理学分野・細胞薬理学教室
http://plaza.umin.ac.jp/cellular_pharm/?p=12

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------