

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10682

研究課題名(和文)メタボローム解析による薬毒物毒性機序の解析法と新規毒性マーカー探索法の構築

研究課題名(英文)Construction of a method for analyzing the toxic mechanism and new toxic markers by metabolome analysis

研究代表者

船越 丈司 (Funakoshi, Takeshi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：40444715

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)：数多ある薬物の中でも、その詳細な作用機序が明らかになっているものは多くはない。また近年は、危険ドラッグ成分などのような、毒性およびその機序が不明な薬物による事例も増加しており、法医学的にもこれら薬毒物の毒性を迅速に評価し、毒性機序を明らかにする手法の開発が急務である。本研究では、ワイドターゲットメタボロミクスとノンターゲットメタボロミクスの手法を用いることで薬毒物による細胞毒性の解析を行うことを目的としており、薬毒物として腎近位尿細管細胞における、抗てんかん薬カルバマゼピンとオクスカルバゼピンと生薬に含まれる植物アルカロイドであるアリストロキア酸をモデルとして細胞毒性機序の解明を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬物毒性モデルとして使用したNRK52E細胞においては、抗てんかん薬オクスカルバゼピン曝露により腎近位尿細管細胞はPIK1活性化阻害による異常紡錘体の形成・G2/M期細胞周期停止が誘導され、結果Mitotic catastropheによるアポトーシス誘導、細胞毒性が惹起されることが明らかになった。またメタボローム解析から脂質生合成・代謝経路の変動が確認されたことから、近位尿細管細胞におけるMitotic catastrophe、細胞毒性にこれら脂質代謝経路の関与が示唆され、今後より詳細なメタボローム解析により、さらなる細胞毒性マーカー代謝物の検討を進めていきたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：Death from poisoning caused by various drugs such as drugs and antipsychotics is treated as abnormal death, and the cause of death has been determined legally, but the detailed mechanism of action has been clarified among many drugs. There aren't many things. In recent years, cases of drugs with unknown toxicity and mechanism, such as synthetic cannabinoids have been increasing, and the toxicity of these drug poisons is rapidly evaluated and the mechanism of toxicity is clarified from a forensic perspective. There is an urgent need to develop a method to do this.

The purpose of this study is to analyze cell toxicity caused by drug toxins by using wide-target metabolomics and non-target metabolomics methods. We elucidated the mechanism of cytotoxicity using the antiepileptic drugs carbamazepine and oxcarbazepine and aristolochic acid, which is a plant alkaloid contained, as a model.

研究分野：中毒学

キーワード：メタボローム解析

1. 研究開始当初の背景

麻薬、抗精神薬など種々の薬物による中毒死は異状死として扱われ、法医学的に死因の確定を行っているが、数多ある薬物の中でも、その詳細な作用機序が明らかになっているものは多くはない。また近年は、危険ドラッグ成分などのような、毒性およびその機序が不明な薬物による事例も増加しており、法医学的にもこれら薬毒物の毒性を迅速に評価し、毒性機序を明らかにする手法の開発が急務である。

従来、薬毒物による毒性機序を解明するためには遺伝子・タンパク質レベルでの変化を検討し、毒性評価は動物実験や過去の薬物事例における結果の集積によって行われている。しかし、これらの方法には膨大な時間と労力が必要であり、結果ごく一部の薬毒物の検討に限定されているのが現状である。またこれまで、薬毒物による毒性機序の多くはカスパーゼの活性化を介したアポトーシスによる細胞死であると考えられていたが、申請者の以前の研究から、覚せい剤類似物質であり、危険ドラッグ含有成分でもあるノルエフェドリンによる神経細胞死は、アポトーシスを誘導しておらず、一方でリソソームの肥大化を由来とする過剰な細胞内空胞化を引き起こし (Funakoshi T et al Brain Res 2013)、さらにコレステロール生合成経路を亢進することで、細胞内コレステロールの増加を誘導した。最終的にはコレステロールの蓄積が引き金となり、プログラムされたネクローシスであるネクロトーシスを誘導していることを明らかにしている (Funakoshi T et al. J Biol Chem 2016)。またアラキドン酸カスケードなどによる脂質代謝経路が、従来考えられていた細胞膜構成脂質を生成するだけでなく、生成された脂質代謝物がメディエーターとなって、細胞の恒常性維持、細胞保護および細胞毒性経路に密接に関与していることが近年明らかとなっている。これらの結果からも、細胞死の検討においてカスパーゼの活性化を検討するだけでは不十分であり、コレステロールなどの生体内代謝物の動態を精査することが薬毒物の毒性機序の探索において極めて重要であると考えられる。

近年、生体分子の変動を網羅的に探索し、包括的に生命現象を解析するオミクス解析が生理・病理機構の解析法として着目されている。特にメタボロミクスは生体内の代謝産物を網羅的に解析する手法で、近年では一個体から細胞までの生体の状態を把握する為の強力な手法として用いられ、その有用性が着目されている手法である。メタボロミクスにはターゲットメタボロミクスとノンターゲットメタボロミクスの2種のアプローチが存在する。ターゲットメタボロミクスでは対象となる代謝産物を絞り込むことで高い定性・定量が可能だが、解析対象を限定する必要がある。一方ノンターゲットメタボロミクスでは対象代謝物を絞り込まず全代謝物を検出する手法であり、新規代謝物の検出が可能となるが、ターゲットメタボロミクスに比べ検出感度や定量性に劣る問題がある。これまでの研究では、近年の分析機器の発展により、高感度・高速分析が進みターゲット分析でありながら数百の代謝物を一斉分析することで網羅的な分析が可能となったワイドターゲット分析により各種薬毒物により惹起される細胞毒性機序の解明を行い、代謝産物の変動と薬物毒性を評価してきたが、一方で毒性機序のより詳細な解明において、毒性誘導時など特殊な状況で産生される代謝物であるエピメタボライトの検出を明らかにする必要があり、そのためにノンターゲットメタボロミクスの手法が必要であると考えた。その為、本研究ではワイドターゲット分析とノンターゲット分析を組み合わせた新たな薬物毒性機序に特化したメタボローム解析を構築することを検討した。

2. 研究の目的

薬毒物による毒性機序の解明と毒性評価は法医実務上重要であるが、数多存在する薬毒物の内その毒性機序の詳細が明らかかなものは少なく、また近年では危険ドラッグ成分など未だその毒性が不明な薬物も多く存在する。そのため薬毒物の毒性および機序をより簡便にかつ各薬物間での差を比較する手法の確立は法医学上急務となっている。

そこで本研究では最新のターゲットメタボロミクスの手法を用いて、薬毒物によって変動するシグナル経路を特定、さらにそれら薬毒物によって変動する代謝物の増減を数値化し毒性を評価することで、薬物間の毒性を比較し、最終的には毒性未知の薬物による細胞毒性の法医鑑定に有用な新規毒性評価法の確立を目的とする。

本研究では、薬毒物障害モデルとして、抗てんかん薬カルバマゼピンとその類縁体であるオクスカルバゼピンの腎近位尿細管細胞への毒性の解明を中心に解析を行った。

3. 研究の方法

ラット腎近位尿細管細胞 NRK-52E に 0, 12.5, 25, 50, 100 μM の OXC を 24 時間曝露した後、細胞の形態観察や生存率の解析を行い、さらに、ノンターゲットメタボローム解析、ワイドターゲットメタボローム解析を行った。さらに細胞障害機構の解析として、フローサイトメーターを用いた細胞周期の解析および DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析及びリアルタイム PCR 解析に加え、ウェスタンブロッティングにて、細胞周期変動や細胞死誘導に関連するタンパク質の変動を解析により、毒性機序の探索を試みた。

4. 研究成果

(1) カルバマゼピンおよびオクスカルバゼピンによる腎近位尿管への毒性の検討

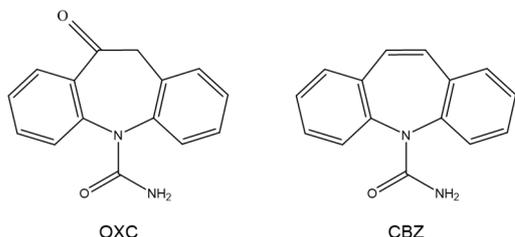


図1 カルバマゼピンおよびオクスカルバゼピンの構造式

オクスカルバゼピン (OXC) は、部分てんかんの第一選択薬であるカルバマゼピン (CBZ) をケトアナログ化した第二世代抗てんかん薬である (図1)。

まず、OXC 曝露により誘導される細胞死について検討するため、CCK-8 を用いて細胞生存率を測定した (図2)。0~100 μM の OXC を 24 時間曝露後に細胞生存率を測定した結果、12.5 μM 以上の濃度で顕著な生存率の減少が見られた (図2A, C)。細胞死の種類を特定するため、代表的なプログラム細胞死であるアポトーシスの実行分子 Caspase3 の活性化をウェスタンブロットングで解析した。OXC 曝露群で cleaved-Caspase3 のバンドがより強く検出され (図2D) Caspase3 の活性化が見られた。そこで、フローサイトメーターによるアポトーシスの解析を行ったところ、50 μM の OXC 曝露細胞においては、約 35% の細胞においてアポトーシスを引き起こしていることが明らかとなった。

また OXC と CBZ 曝露細胞の形態変化について比較したところ、OXC 曝露細胞では、アポトーシスで死滅した細胞の他に、細胞の肥大化がみられたが、これは CBZ 曝露細胞では観察されず、OXC に特徴的な細胞変化であることが推測された (図2A-B)。

(2) カルバマゼピン・オクスカルバゼピン曝露細胞におけるメタボローム解析

NRK-52E 細胞においてオクスカルバゼピンは、アポトーシスを誘導し顕著な細胞毒性を示すことが示されたことから、次にノンターゲットメタボローム解析・ターゲットメタボローム解析を行うことで、代謝変動の解析を行った。

代謝物ピークデータを主成分分析にかけたところ、CBZ、OXC いずれにおいても 25、50 μM で明確に分別することができたことから、これら薬物の曝露により明確な代謝物変動が認められることが示唆された。

また変動優位な代謝物 (表1) をピックアップしパスウェイ解析を行った。パスウェイ解析には Web 上のプログラムである Metaboanalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>) を使用した。Metaboanalyst はカナダの研究グループにより運営されている Web プログラムで、メタボロームデータの解析に特化したパスウェイ解析を行うことが可能となっている。

優位な変動が見られた代謝物を本プログラムにより解析したところ、Fatty Acid Biosynthesis、Steroid Biosynthesis、Glycerolipid Metabolism などの脂質生合成に関わる代謝パスウェイに影響があることが明らかとなった (図4)。

以上の結果は、単にこれら抗てんかん薬により脂質代謝変動を引き起こす可能性が示されただけでなく、神経細胞における覚せい剤原料による細胞毒性を検討した以前の研究においても、コレステロールなどの脂質合成が亢進することで細胞毒性が誘導される事例もあることから (Funakoshi T et al. J Biol Chem 2016)、細胞毒性における脂質生合成・代謝経路の変動は、細胞死・細胞毒性経路の指標となる可能性が示唆された。

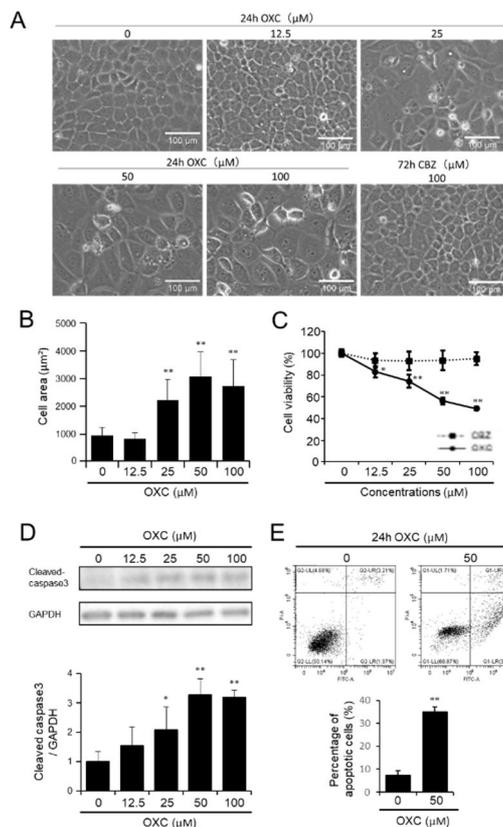


図2 カルバマゼピンおよびオクスカルバゼピンの腎近位尿管細胞への毒性の検討

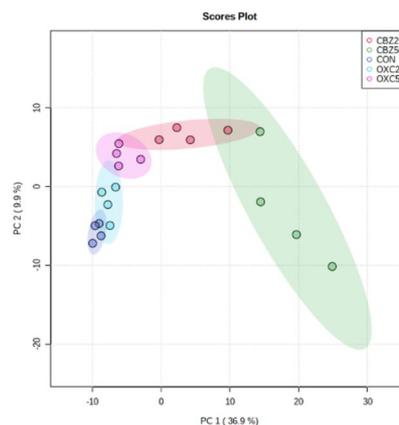


図3 ノンターゲットメタボローム解析データの主成分分析

表1 ノンターゲットメタボローム解析データの統計解析

Metabolite	ANOVA p-value
Cholesterol	6.47E-08
7-benzoylneobavaisoflavone	1.13E-07
Docosanoic acid butyl ester	1.07E-05
Maltose	5.83E-05
Heptacosane	0.002187258
Tetracosane	0.003316541
Stearic acid	0.01648781
Oleic acid	0.01925552
Docosane	0.02587535
Heptadecanoic acid	0.02745402
Nonadecane	0.02910341
Pentadecanoic acid	0.03373642
Palmitic acid	0.03419131
N-acetylmethionine	0.03430666
HEPTADECANE	0.03563046
Nonadecane	0.03708315
Myristic acid	0.03942295
Heptadecane	0.04385303

Metabolite Sets Enrichment Overview

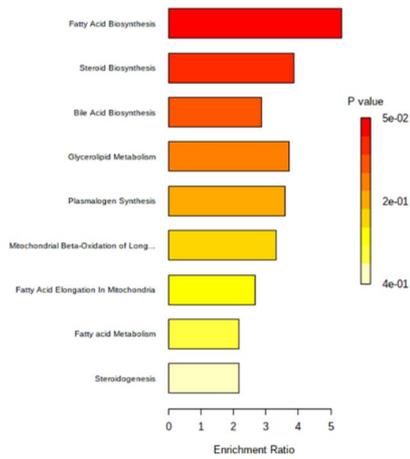


図4 代謝物パスウェイ解析による細胞毒性機序の解明

(3)オクスカルバゼピンによる G2/M 期細胞周期停止と単極紡錘体形成

図1 A-B で示した細胞肥大は、Mitotic catastrophe に特徴的な細胞形態変化であったため、OXC 暴露細胞の細胞周期と細胞分裂期の形態をより詳細に検討した(図5)。

フローサイトメーターによる OXC 暴露細胞の細胞周期解析の結果、OXC の濃度依存的に G2/M 期細胞周期の細胞が増加しており(図5A) tubulin 染色による細胞周期解析では、単極紡錘体が多く観察された。

以上の結果から、OXC 曝露細胞では、G2/M 期細胞周期停止が誘導されていることが示唆された。

そこでこの単極紡錘体の形成が、紡錘体複製異常によるものか、もしくは紡錘体の分極に異常をきたしたためかを検討するために、共焦点顕微鏡による紡錘体の詳細な観察と、紡錘体の分極にはたらく PLK1 の活性化を検討した(図6)。

共焦点顕微鏡による紡錘体の画像解析から、OXC によって誘導される単極紡錘体は2つの紡錘体が近接して局在していることが明らかとなった。また紡錘体の移動・分極を行う PLK1 の活性化を Western Blotting で検討した結果、時間依存的に PLK1 の活性化が阻害されていることが明らかとなった。

以上の結果から、オクスカルバゼピン曝露により腎近位尿細管細胞は PLK1 活性化阻害による異常紡錘体の形成・G2/M 期細胞周期停止が誘導され、結果 Mitotic catastrophe によるアポトーシス誘導、細胞毒性が惹起されることが明らかになった。

またメタボローム解析から脂質合成・代謝経路の変動が確認されたことから、近位尿細管細胞における Mitotic catastrophe、細胞毒性にこれら脂質代謝経路の関与も示唆され、今後より詳細なメタボローム解析により、さらなる細胞毒性マーカー代謝物の検討を進めていきたいと考えている。

また紙面の都合上詳細は記載していないが、生薬に含まれるアリストロキア酸による腎毒性のメタボローム解析も同様に進めており、こちらの研究では、アリストロキア酸を曝露した NRK-52E 細胞では顕著なアポトーシスを伴った細胞死が誘導され、メタボローム解析からアラキドン酸カスケードの誘導からプロスタグランジン E が顕著に産生することを明らかにした。これらの結果からも、同じアポトーシスにより細胞死が誘導される薬物であっても、Mitotic catastrophe が誘導される場合と、炎症応答を誘導する場合には代謝変動が大きく異なっている

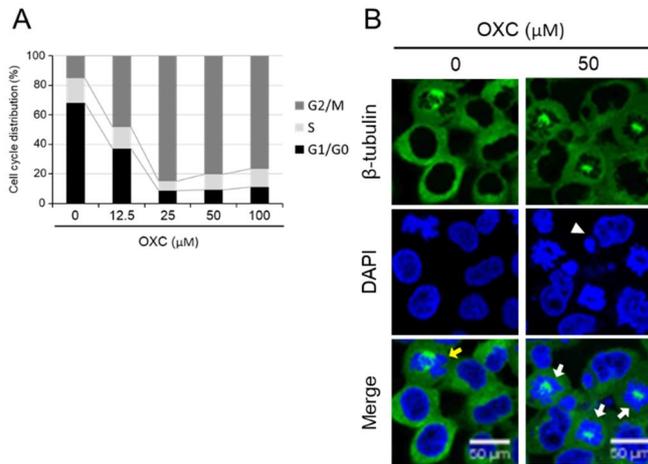


図5 オクスカルバゼピンによるG2/M期細胞周期停止

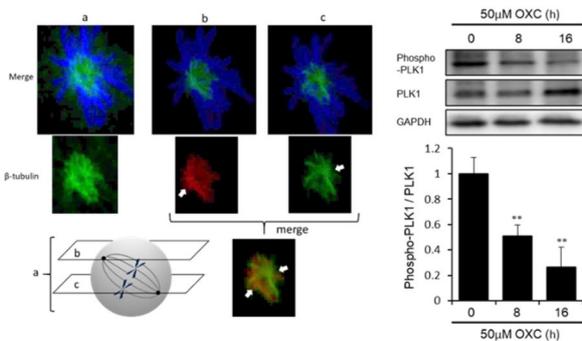


図6 オクスカルバゼピンによる紡錘体形成異常とPLK1活性化の阻害

ことも明らかとなり、今後様々な細胞障害機構特異的な代謝物変動の解析が必要であると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Funakoshi Takeshi, Furukawa Mako, Aki Toshihiko, Uemura Koichi	4. 巻 75
2. 論文標題 Repeated exposure of cocaine alters mitochondrial dynamics in mouse neuroblastoma Neuro2a	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 NeuroToxicology	6. 最初と最後の頁 70～77
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuro.2019.09.001	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 Ota Momoka, Funakoshi Takeshi, Aki Toshihiko, Unuma Kana, Uemura Koichi	4. 巻 350
2. 論文標題 Oxcarbazepine induces mitotic catastrophe and apoptosis in NRK-52E proximal tubular cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicology Letters	6. 最初と最後の頁 240～248
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.toxlet.2021.07.018	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 太田百香、船越丈司、鶴沼香奈、則竹香菜子、佐野智美、村田達彦、上村公一
2. 発表標題 抗てんかん薬オクスカルバゼピンの腎近位尿管への影響
3. 学会等名 第89回日本法医学会学術関東地方集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 溝部万純、秋利彦、船越丈司、平山菜穂、渡邊嶺、永井みどり、野村萌夏、上村公一
2. 発表標題 ヒ素の神経細胞特異的な毒性機序の解明
3. 学会等名 第89回日本法医学会学術関東地方集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 船越丈司、古川真子、秋利彦、上村公一
2. 発表標題 コカイン長期曝露による神経細胞ミトコンドリアダイナミクスへの影響
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小松 美結、船越 丈司、秋 利彦、上村 公一
2. 発表標題 アリストロキア酸による近位尿管細胞への細胞毒性の検討
3. 学会等名 第105次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担者	上村 公一 (Uemura Koichi) (30244586)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	
研究 分担者	秋 利彦 (Aki Toshihiko) (60304474)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授 (12602)	

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
---------	---------