

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 8日現在

機関番号：32525

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790169

研究課題名（和文） アクロレインの細胞毒性機構に基づいた新規脳機能改善薬の探索

研究課題名（英文） Research of cerebral insufficiency improver based on the mechanism of acrolein toxicity on cell growth

研究代表者

富取 秀行 (TOMITORI HIDEYUKI)

千葉科学大学・薬学部・准教授

研究者番号：30337381

研究成果の概要（和文）：ポリアミンは細胞増殖促進作用を持つ因子であるが、酸化分解されると毒性の強いアクロレインを産生する。本研究では、アクロレインの細胞毒性機構の分子レベルでの解明、及びその機構に基づいた脳機能改善薬の探索を試み、以下の新知見を得た。

研究成果の概要（英文）：Polyamines play important roles in cell proliferation and differentiation. However, acrolein that is highly toxic compound is produced by polyamine oxidation. In this study, we studied on the molecular mechanism of acrolein toxicity on cell growth, and researched candidates for cerebral insufficiency improver based on the mechanism of acrolein toxicity on cell growth. New findings in this study have been described below.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：生理活性物質、脳・神経、バイオマーカー、臨床化学、細胞毒性、脳梗塞、ポリアミン、アクロレイン

1. 研究開始当初の背景

細胞増殖必須因子であるポリアミン（プトレスシン、スペルミジン、スペルミン）は細胞内に高濃度（mM オーダー）存在し、蛋白質合成を促進することにより細胞増殖を促進する。一方、ポリアミンのうちスペルミンはスペルミンオキシダーゼ（SMO）またはアセチルポリアミンオキシダーゼ（AcPAO）により酸化分解されると、細胞にとって毒性の高いアクロレイン（ $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CHO}$ ）及び過酸化水素（ H_2O_2 ）を産生する。

申請者らのグループは、アクロレインが過酸化水素よりも強力な毒性物質であることを細胞培養実験により示し【Sharmin, S., Sakata, K., Kashiwagi, K., Ueda, S., Iwasaki, S., Shirahata, A. and Igarashi, K.: Polyamine cytotoxicity in the presence of bovine serum amine oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001, 282, 228-235】、この毒性がSMO及びAcPAOの阻害剤で解除されることを証明した。また、脳梗塞患者の血中ポリアミンオキシダーゼ（SMO, AcPAO）活

性及び血中のアクロレイン抱合蛋白質 (PC-Acro) を測定し、梗塞巣の大きさと重症度との相関性を見出した。さらに脳梗塞発症後 CT により梗塞巣が認められるより早く、血中 AcPAO が速やかに上昇することを明らかにした。これらの成果を基に、SMO, AcPAO 及び PC-Acro 値を指標とした脳血管障害の診断法に関する特許を出願した【特許 1; 特開 2005-304476, PCT/JP2005/006429】。近年行なった小規模臨床試験では、健常者群から SMO, AcPAO 又は PC-Acro 値の高い被験者を選別し、炎症性マーカーであるインターロイキン 6 及び C 反応性蛋白質を組合せて測定することで、感度 90% の確率で無症候性脳梗塞を発見することに成功した。また、その後行なった 1000 人規模の臨床試験も終了し、その有用性が確認された。現在は人間ドックを中心に無症候性脳梗塞のリスク判定事業を開始する段階にきた。

また、脳梗塞モデルマウスを用いた検討では以下のことが明らかとなった。脳梗塞部位ではスペルミン及びスペルミジンの減少に伴い PC-Acro の増加が見られた。PC-Acro は梗塞部位では正常部位の 28 倍も蓄積しており、血漿中では正常マウスに比べ 1.8 倍の上昇が見られた。血漿中の SMO, AcPAO 活性も脳梗塞モデルマウスで有意に上昇していた【Saiki, R., Nishimura, K., Ishii, I., Omura, T., Okuyama, S., Kashiwagi, K., and Igarashi, K.: Intense correlation between brain infarction and protein-conjugated acrolein. *Stroke* (2009) **40**, 3356-3361】。したがって、PC-Acro がポリアミンより産生されていること、そして血漿中の PC-Acro 量及び SMO, AcPAO が脳梗塞のバイオマーカーとなることを動物実験で確認できた。さらに最近、この脳梗塞モデルマウスに、申請者らが開発した NMDA 受容体のチャンネルブロッカーであるトリベンジルスペルミジン (TB34) 及びアクロレイン除去剤である N-ベンジルヒドロキシルアミンを投与したところ、梗塞巣の大きさを 60% 以下に縮小させることに成功した。この場合、梗塞巣における PC-Acro 量は有意に減少した。また、発症 6 時間後にこれらの化合物を投与しても、発症前に投与した場合と同様の効果が得られた。特にトリベンジルスペルミジンは強い効果を示した。これらの実験結果から、脳梗塞の重症度とアクロレイン量は非常に強く相関していること、また脳梗塞を発症した際にアクロレインを除去することで症状が劇的に緩和されることが明らかとなった。

一方、アクロレインの反応性に関して、申請者らはこれまでに 1) アクロレインが蛋白質のシステイン及びリジン残基に親和性が高いこと、2) 活性酸素種 (H₂O₂、 \cdot OH、 \cdot O₂⁻) は DNA 合成及び RNA 合成を阻害するのに対し、

アクロレインは蛋白質合成を阻害することで強力な細胞増殖阻害作用を示すことを明らかにした。また、アクロレイン及び活性酸素の毒性を除去する物質も明らかにした。すなわち、アクロレインは SH 基を含む N-アセチルシステイン等により無毒化され、活性酸素は CO 基を含むピルビン酸等により強く、ポリフェノールにより弱く無毒化された。しかし、アクロレインは不安定で反応性が高く、毒性が非常に高いため、その挙動を解析するのが非常に難しい。ゆえにアクロレインの細胞毒性機序は未だ不明な点が多く、標的となる因子さえ明らかとなっていない。

2. 研究の目的

以上の背景及び研究成果を踏まえ、本研究では以下の 2 点について重点的に研究を遂行する。

(1) 脳梗塞発症時にポリアミンより産生されるアクロレインの細胞障害機構を解明する。特に、細胞障害が起こる際のアクロレイン標的蛋白質の同定を中心に行う。また、標的蛋白質の機能を回復する分子標的物質を探索する。

(2) アクロレイン産生を阻害する、もしくは産生したアクロレインを速やかに除去する化合物を探索し、新たな脳機能改善薬のリード化合物とする。

3. 研究の方法

(1.) アクロレイン標的蛋白質の同定及び標的蛋白質の機能を回復する分子標的物質の探索

① 抗アクロレイン抗体によるアクロレイン標的蛋白質の検出及び同定と分子標的物質の探索

アクロレインに一定時間暴露したマウス神経芽細胞腫 Neuro2A を回収し、SDS 電気泳動及び抗アクロレイン抗体を用いた Western blot 解析により、アクロレインの濃度依存的に強く検出される蛋白質を選別する。これらの蛋白質及びアクロレインにより修飾されるアミノ酸残基を LC-MS/MS 及びエドマン分解により同定する。また脳梗塞時の虚血モデルとして、マルチガスインキュベーター (申請設備品) を使用し、Neuro2A を低酸素・低グルコース状態で培養した細胞を調製・回収する。回収した細胞は上記と同様、抗アクロレイン抗体で検出される蛋白質を選別し、同定する。同定されたアクロレイン標的蛋白質の機能を明らかにし、この蛋白質の機能を回復させる分子標的物質を探索する。分子標的物質が得られたら、その物質が脳機能改善薬として作用するかどうか検討する。

(2) アクロレイン量の減少を指標とする化合物の探索

① アクロレイン産生阻害作用を示す化合物

の探索

AcPAO もしくは SMO に基質及び候補化合物を添加し、アクロレイン産生量を HPLC で測定することで、候補化合物のアクロレイン産生阻害作用を評価する。アクロレイン産生阻害作用の高い候補化合物が得られたら、脳梗塞モデルマウスに投与し、梗塞巣の大きさ及び PC-Acro 値を測定する。

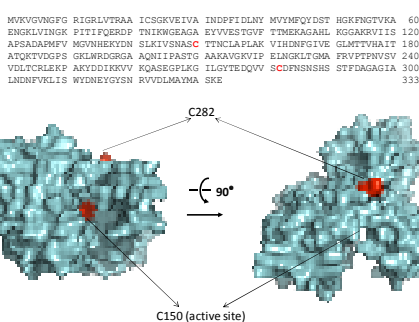
②アクロレイン除去作用を示す化合物の探索

培地中にアクロレイン及び候補化合物を添加し、Neuro2A の生存率を測定することで候補化合物のアクロレイン除去作用を評価する。アクロレイン除去作用の高い候補化合物が得られたら、脳梗塞モデルマウスに投与し、①と同様の検討を行う。

4. 研究成果

(1) 細胞を 400 μ M のアクロレインに 1 時間曝露し、その細胞抽出液を SDS 電気泳動及び解析した。その結果、2 種類の蛋白質が顕著に消失することを見出した。これらの蛋白質をゲルから抽出し、LC-MS/MS により解析した結果、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 及びビメンチンであることを同定した。GAPDH について詳細に解析を行い、GAPDH の活性中心であるシステインにアクロレインが付加することで、GAPDH の活性を低下させていることを見出した【下図】。また、アクロレイン化した GAPDH は核へ移行し、転写因子として働くこと、このシグナルが細胞増殖を抑制する一因であることが示唆された。

Acrolein adduct sites on mouse GAPDH



(2) アクロレインはチオールやアミンと良好に反応する性質があることから、食品中に含まれる化合物のうち、チオールやアミンを含む化合物や、抗酸化作用があると言われている化合物を選別し、アクロレインと共に培養細胞の培地中に添加し、アクロレインの細胞毒性を除去する作用があるかどうか検討した。その結果、ニンニクの成分

であるアリイン【上記化合物】にアクロレインの細胞毒性を除去する作用が見出された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Tomitori, H., Nakamura, M., Sakamoto, A., Terui, Y., Yoshida, M., Igarashi, K., Kashiwagi, K.: Augmented glutathione synthesis decreases acrolein toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2012) **418**, 110-115
2. Terui, Y., Akiyama, M., Sakamoto, A., Tomitori, H., Yamamoto, K., Ishihama, A., Igarashi, K., Kashiwagi, K.: Increase in cell viability by polyamines through stimulation of the synthesis of ppGpp regulatory protein and ω protein of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (2012) **44**, 412-422
3. Tomitori, H., Kashiwagi, K., and Igarashi, K.: Structure and function of polyamine-amino acid antiporters CadB and PotE in *Escherichia coli*. *Amino Acids* (2012) **42**, 733-740
4. Yamamichi, S., Jinno, Y., Haraya, N., Oyoshi, T., Tomitori, H., Kashiwagi, K., Yamanaka, M.: Separation of proteins using supramolecular gel electrophoresis. *Chem. Commun. (Camb)*. (2011) **47**, 10344-10346
5. Hamdan, F.F., Gauthier, J., Araki, Y., Lin, D.T., Yoshizawa, Y., Higashi, K., Park, A.R., Spiegelman, D., Dobrzaniecka, S., Piton, A., Tomitori, H., Daoud, H., Massicotte, C., Henrion, E., Diallo, O.; S2D Group, Shekarabi, M., Marineau, C., Shevell, M., Maranda, B., Mitchell, G., Nadeau, A., D'Anjou, G., Vanasse, M., Srour, M., Lafrenière, R.G., Drapeau, P., Lacaille, J.C., Kim, E., Lee, J.R., Igarashi, K., Hujanir, R.L., Rouleau, G.A., Michaud, J.L.: Excess of de novo deleterious mutations in genes associated with glutamatergic systems in nonsyndromic intellectual disability. *Am. J. Hum. Genet.* (2011) **88**, 306-316
6. Fukushima, T., Takasusuki, T., Tomitori, H., Hori, Y.: Possible involvement of syntaxin 1A downregulation in the late phase of allodynia induced by peripheral nerve injury. *Neuroscience* (2011) **175**, 344-357

7. Yoshida, M., Mizoi, M., Saiki, R., Kobayashi, E., Saeki, N., Wakui, K., Kusaka, T., Takizawa, H., Kashiwado, K., Suzuki, N., Fukuda, K., Nakamura, T., Watanabe, S., Tada, K., Tomitori, H., Kashiwagi, K., Igarashi, K.: Relationship between metabolic disorders and relative risk values of brain infarction estimated by protein-conjugated acrolein, IL-6 and CRP together with age. *Clin. Chim. Acta.* (2011) **30**, 412, 339-342
8. Terui, Y., Tabei, Y., Akiyama, M., Higashi, K., Tomitori, H., Yamamoto, K., Ishihama, A., Igarashi, K., Kashiwagi, K.: Ribosome modulation factor, an important protein for cell viability encoded by the polyamine modulon. *J. Biol. Chem.* (2010) **285**, 28698-28707
9. Yoshida, M., Higashi, K., Kobayashi, E., Saeki, N., Wakui, K., Kusaka, T., Takizawa, H., Kashiwado, K., Suzuki, N., Fukuda, K., Nakamura, T., Watanabe, S., Tada, K., Machi, Y., Mizoi, M., Toida, T., Kanzaki, T., Tomitori, H., Kashiwagi, K., Igarashi, K.: Correlation between images of silent brain infarction, carotid atherosclerosis and white matter hyperintensity, and plasma levels of acrolein, IL-6 and CRP. *Atherosclerosis* (2010) **211**, 475-479

[学会発表] (計 15 件)

1. 富取秀行、大腸菌ポリアミン-アミノ酸アンチポーターCadB及びPotEの構造と機能：日本薬学会第132年会、2012年、札幌
2. 坂本明彦、ポリアミンによる大腸菌二成分制御系UvrY及びCprX合成促進に基づくバイオフィーム形成上昇：日本薬学会第132年会、2012年、札幌
3. 富取秀行、マウス神経芽細胞腫及びマウス乳がん細胞におけるアクロレイン毒性の解毒機構：日本ポリアミン学会第3回年会、2012年、大宮
4. 柏木敬子、脳梗塞患者における尿中アクロレイン-グルタチオン代謝物3-HPMA(3-ヒドロキシプロピルメルカプツール酸)の低下：日本ポリアミン学会第3回年会、2012年、大宮
5. 中村瑞穂、細胞内アクロレイン抱合蛋白質の同定及びアクロレイン抱合の細胞増殖に対する影響：第84回日本生化学会大会、2011年、京都
6. 坂本明彦、ポリアミンによるppGppの合成促進及びRpoZ-ppGpp複合体を介した

RNA合成調節による大腸菌の生存率上昇：第84回日本生化学会大会、2011年、京都

7. 金井健、高度高熱菌及び大腸菌ポリアミン取り込み系PotABCDのポリアミン結合蛋白質PotDの基質認識：日本薬学会第131年会、2011年、静岡
8. 照井祐介、大腸菌の生存率維持に果たすポリアミンの役割：日本薬学会第131年会、2011年、静岡
9. 吉沢佑基、NMDA受容体調節領域NR1RとNR2BRの構造と機能：日本薬学会第131年会、2011年、静岡
10. 秋山真律子、ポリアミンの微生物の生存率に果たす役割：日本ポリアミン学会第2回年会、2011年、宇都宮
11. 柏木敬子、メタボリックシンドロームと血漿蛋白質抱合アクロレイン、IL-6、CRPより求めた脳梗塞リスク値との相関：日本ポリアミン学会第2回年会、2011年、宇都宮
12. 西村和洋、脳梗塞患者の血漿中に見いだされるアクロレイン抱合蛋白質の分析と同定：第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年、神戸
13. 柏木敬子、無症候性脳梗塞、頸部動脈硬化及び大脳白質病変の画像とアクロレイン、IL-6及びCRPの血漿レベルとの相関：第83回日本生化学会大会合同大会、2010年、神戸
14. 坂本明彦、マウス神経芽細胞腫Neuro2aを用いたアクロレイン耐性細胞の樹立と新たな毒性除去機構の解明：第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年、神戸
15. 石川沙枝、大腸菌由来スペルミジンアセチルトランスフェラーゼのX線結晶構造解析と変異体解析：第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010年、神戸

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 1 件)

名称：脳卒中・無症候性脳梗塞のスクリーニングの方法

発明者：五十嵐一衛、上田志朗、佐伯直勝、柏木敬子、富取秀行

権利者：株式会社アミンファーマ研究所、日油株式会社、株式会社フューエンス

種類：特許

番号：第 4426929

取得年月日：2009 年 12 月 18 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富取 秀行 (TOMITORI HIDEYUKI)

千葉科学大学・薬学部・准教授

研究者番号：30337381

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：