

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590860

研究課題名(和文) 飲酒の肝臓内タンパク酵素に及ぼす影響と小胞体ストレス応答機構

研究課題名(英文) Effects of ethanol on hepatic proteins.

研究代表者

西谷 陽子(Nishitani, Yoko)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：30359997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アルコール等の濫用薬物による臓器障害メカニズムを明らかにするため、特に小胞体ストレスとの関連のある脂質代謝に関係の深いクレアチンに着目して、アルコールによる合成障害について検討を行った。エタノールで培地中のクレアチニン濃度が減少したが、クレアチン自体の濃度変化は確認できなかった。エタノールを負荷すると、脂質の酸化で発生するケトン体の一つであるアセトン濃度が培地内で減少しており、エタノール負荷が脂質代謝を抑制している可能性が示された。クレアチン産生を制御するタンパク群の一つでありNAD依存性脱アセチル化を行う長寿遺伝子の一つのSIRT1はエタノール濃度やアセトン濃度に変化は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanism of alcohol induced organ injury, we focused on the creatine production in hepatocytes. Creatine is produced in hepatocytes and related with energy metabolism. Ethanol reduced the creatinine, which is created from creatine, in the medium of primary rat hepatocyte culture, and 4-MP, an alcohol dehydrogenase inhibitor, recover the reduction. Ethanol also reduced acetone, one of the ketone body produced during the fatty acid oxidation. SIRT1 is related to NAD dependent deacetylation of the protein that related creatine production. However, there was no effect of SIRT1 activator on the ethanol metabolism or acetone concentration. Ethanol and its metabolism may affect the lipid oxidation and creatine production, even though it is necessary to study more details.

研究分野：法医学

キーワード：法医学 アルコール医学 肝臓

1. 研究開始当初の背景

アルコール等の濫用薬物による臓器障害は法医学実務でしばしば認められる。生体は外部の刺激に対し生体防御反応によって恒常性を保つが、この恒常性が崩れると臓器障害を引き起こす。

私たちは、過去にアルコール等の濫用薬物がどのように恒常性の均衡を崩壊させるのかを明らかにするために、初めに細胞死に関係するプロテインキナーゼである JNK に着目し、急性アルコール負荷が及ぼす影響についてラット灌流肝とラット初代培養肝細胞を用いて検討を行った。その結果、アルコールにより活性化した Akt が JNK の足場タンパクである JIP1 を介して JNK の活性を制御している可能性を示し、急性アルコールで小胞体ストレス応答に変化が起きることを示した(Nishitani and Matsumoto, 2006)。

小胞体は真核細胞内で最も大きな膜小器官で、脂肪酸やリン脂質の生合成が行われる一方で、分泌あるいは膜タンパク質の生合成、細胞内のカルシウムの主たる貯蔵部位としてカルシウム恒常性において重要な役割を果たす。また、外部からの刺激に対しタンパクのフォールディングに関係する GRP78 を初めとした小胞体シャペロン蛋白の生成など、細胞内の恒常性を保つための小胞体ストレス応答が起こることが知られている。

アルコール性肝障害にはエネルギー代謝が関わっているといわれている。腎臓でアルギニンおよびグリシンから酵素 AGAT を介して guanidinoacetate acid (GAA) が産生され、肝臓にて酵素 GAMT を介して GAA からクレアチンが産生される。クレアチンは非酵素的にクレアチニンへと転換される。クレアチンは脳や筋肉などでのエネルギー代謝に関わる。最近の研究では慢性エタノール摂取モデルでクレアチン産生が減少するという報告されている (Kusum et al., 2013)。私は過去に初代培養肝細胞において、クレアチンが非酵素的に転換されたクレアチニンが培地に含まれる濃度は、エタノール負荷によって減少することを示した。また、それは培地に添加された血清量が多いほうが培地中のクレアチニン濃度が高いことが示され、エタノール負荷においてクレアチン産生機構の障害が起こっている可能性が示された。また、クレアチン産生に関わる GAMT の制御に補酵素 NAD 依存性の脱アセチル化酵素である SIRT1 が関わっているが、補酵素 NAD はエタノール代謝とも深く関わっており、エタノール代謝に伴い SIRT1 が影響を及ぼしクレアチン産生を解して脂質代謝に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

アルコール性肝障害にはエネルギー代謝が関わっているといわれている。脂質代謝とクレアチン肝細胞でエタノール代謝阻害下

において急性エタノール負荷がクレアチン産生にどのような影響を及ぼすかを検討した。また、小胞体ストレスに影響を及ぼす細胞内の脂質の蓄積との関係について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 肝細胞培養

既報 (Seglen, 1975; Matsumoto, 2002) に従ってラット初代肝細胞培養を行う。熊本大学動物実験倫理指針に従って、Wistar 系雄ラット (8 週齢、体重 250 ~ 300 g) の肝臓から、肝灌流システムを用いてコラゲナーゼ灌流を行い、肝細胞を分離精製し、10% 血清含有の William's E 培地にて培養をおこなった。4 時間経過後に培地を交換し、20 時間経過後に以下の実験に使用した。

(2) 実験群の作成

最終濃度 50 mM または 100 mM のエタノールを培地に負荷し、24 時間経過後に細胞を採取した。また、エタノール代謝を詳細に解明するために、アルコール脱水素酵素 (ADH) 阻害剤である 4-メチルピラゾール (4-MP, 1 mM) およびアルデヒド脱水素酵素 (ALDH) であるシアナマイド (0.5 mM) を負荷した。さらに、SIRT1 の影響を見るために、SIRT1 活性化剤であるレスベラトロール (40 μ M) を培地中に負荷した。脂肪肝モデルを作成するため不飽和脂肪酸 (リノレン酸 0.3 mM) を負荷した。適宜トリパンブルー染色で死細胞の有無を検討した。負荷終了後に培地は分注し -80 で保存を行った。細胞から細胞質画分を分画し、あるいは mRNA を採取し -80 で保存を行った。

(3) 培地中のクレアチニン濃度測定

クレアチンは非酵素的にクレアチニンに転換されるが、培地中のクレアチニン濃度を簡易クレアチニン検査 (Arkray) を用いて検討した。

(4) 培地中のクレアチン濃度測定

培地中のクレアチン濃度について BioAssay System EnzyChromTM Creatine Assay Kit (ECRT-100) で測定を実施した。

(5) 培地中のエタノール濃度およびアセトン濃度測定

培地に含まれているエタノール濃度およびアセトン濃度は気化平衡ガスクロマトグラフィー法で検出した。

(6) データ解析

データは一元配置分散分析 (ANOVA) を実施後、ボンフェローニ補正 *t* 検定を行った。

4. 研究成果

(1) エタノール代謝阻害下での培地中クレアチニン濃度

エタノール負荷では対照群に比べて明らかに培地中のクレアチニン濃度は減少した。エタノール代謝により受ける影響について、ADH 阻害薬である 4-MP を負荷するとエタノール負荷でもクレアチニン減少は認めなかった。一方で ALDH 阻害薬である cyanamide を負荷するとエタノール負荷によるクレアチニン減少が見られた(図 1)

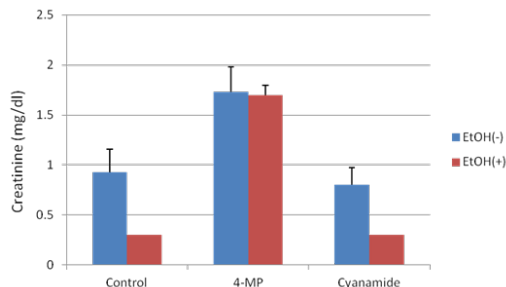


図 1. エタノール代謝阻害によるクレアチニン濃度変化。

(2) 培地中のクレアチン濃度

培地内のクレアチン濃度を測定したところ、群間に有意な差は認めなかった(図 2)

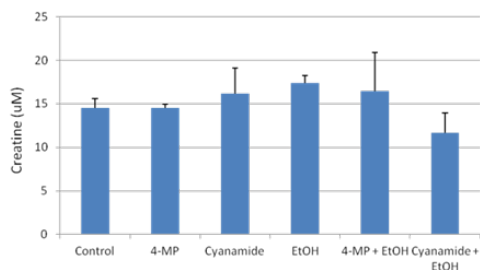


図 2. クレアチン濃度

(3) 培地中に含まれるエタノール濃度およびアセトン濃度

エタノール濃度は 4-MP 負荷で高値を示した(data not shown)。エタノール負荷によって、ケトン体のひとつであるアセトン濃度は減少した。4-MP を負荷するとエタノールによる減少は見られずエタノール代謝が脂質代謝に影響している可能性が示された(図 3)。SIRT1 活性に関わるレスベラトロールはエタノール濃度およびアセトン濃度に明らかな変化は認めなかった。

リノレン酸負荷時では 4-MP による培地中のエタノール濃度変化は有意な差は認めない。また、エタノール負荷ではリノレン酸非負荷時と同じくエタノール負荷ではアセトンは減少する一方で、4-MP 負荷でその減少は認められなくなった。(data not shown)

(4)まとめ

エタノール代謝に関わるアルコール脱水素酵素 (ADH) も SIRT1 と同様に補酵素 NAD を必要とするが、SIRT1 阻害で培地中のエタ

培地中アセトン濃度(24時間負荷)

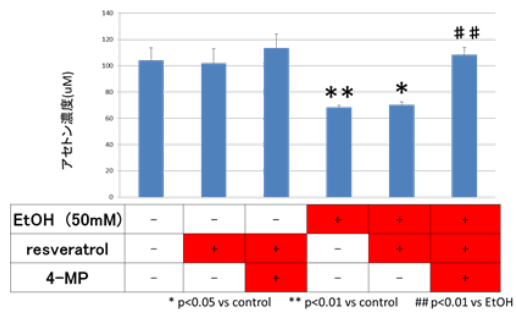


図 3 . 培地中のアセトン濃度。

ノール濃度が上昇する傾向を認めたが有意差は認めなかった。また、エタノールを負荷すると、脂質の酸化で発生するケトン体の一つであるアセトン濃度が培地内で減少しており、エタノール負荷が脂質代謝を抑制している可能性が示された。細胞内に蓄積される脂質は小胞体の近傍に位置することが多く、細胞内の脂質の蓄積は小胞体ストレス応答を引き起こす可能性があり、クレアチン産生に関わるタンパクの発現程度や小胞体ストレス応答の程度検討する必要がある。

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 4 件)

西谷陽子 死体検案の実際と現状 天草医学会雑誌 26: 1-4, 2012 (査読無)

Sasao A, Suwa Y, Aso T, Kohmatsu H, Ohtsu Y, Mishima S, Yonemitsu K, Morioka H, Nishitani Y. Single-chain variable fragment technology in forensic toxicological analysis: production of an antibody to fluvoxamine. Forensic Toxicology 31: 62-66, 2013 (査読有)

Ohtsu Y, Sasao A, Yonemitsu K, Nishitani Y. Postmortem serum tenascin-C (TN-C) concentrations in forensic autopsy cases: A pilot study. Legal Medicine 15: 61-65, 2013 (査読有)

西谷陽子 飲酒の人体への影響と交通事故 IATSS Review, vol 40, 2015, in press (査読無)

[学会発表] (計 15 件)

西谷陽子, 笹尾亜子, 三島聡子, 米満孝聖. 肝細胞のクレアチニン産生にエタノールが及ぼす影響. 平成 24 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会 2012 年 09 月 07 日 ~ 2012 年 09 月 09 日 札幌

Yonemitsu K, Sasao A, Ohtsu Y, Mishima S, Nishitani Y. Detection of alcohol and drugs

in forensic autopsy cases from traffic accidents in Kumamoto, Japan. The 50th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT2012) 2012年06月03日~2012年06月08日 浜松

Sasao A, Suwa Y, Ohtsu Y, Mishitani S, Yonemitsu K, Morita H, Nishitani Y. Application of recombinant antibody engineering to drug screening. Report 1: preparation of anti-fluvoxamine single chain variable fragment (scFv) antibody. The 50th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT2012) 2012年06月03日~2012年06月08日 浜松

米満孝聖、笹尾亜子、大津由紀、三島聡子、西谷陽子. 抗精神病薬服用者の肺動脈塞栓症による急死事例. 第96次日本法医学会学術全国集会. 2012年06月07日~2012年06月09日 浜松

笹尾亜子、諏訪喜昭、大津由紀、三島聡子、米満孝聖、森岡弘志、西谷陽子. 抗うつ薬フルボキサミンに知アする一本鎖抗体の調整. 第96次日本法医学会学術全国集会. 2012年06月07日~2012年06月09日 浜松

米満孝聖、笹尾亜子、大津由紀、三島聡子、西谷陽子. ブタンガス吸引中の急死事例における体内ブタン濃度測定とその代謝物の検出. 第97次日本法医学会学術全国集会. 2013年6月26日~28日 札幌

増田将人、米満孝聖、大津由紀、笹尾亜子、三島聡子、西谷陽子. Histological age determination of pulmonary thrombi in autopsy of patients with mental disorder. 第97次日本法医学会学術全国集会. 2013年6月26日~28日 札幌

笹尾亜子、米満孝聖、三島聡子、西谷陽子. 最近経験したブタンガス吸引中急死の3事例. 平成25年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会. 2013年10月03日~05日 岡山市

西谷陽子、笹尾亜子、大津由紀、三島聡子、米満孝聖. 冠動脈起始異常を認めた2事例. 第63回日本法医学会学術九州地方集会. 2013年10月18日~19日 福岡市

米満孝聖、笹尾亜子、大津由紀、三島聡子、西谷陽子. 処方向精神薬の一斉分析法の検討. 第63回日本法医学会学術九州地方集会. 2013年10月18日~19日 福岡市

Yonemitsu K, Ohtsu Y, Sasao A, Mishima S, Nishitani Y. Simultaneous Extraction of 50 Psycho-active Drugs for LC-MS/MS Analysis - Is QuEChERS method better than Extrelut® Method? -. 9th International Symposium on Advances in Legal Medicine (ISALM). 2014年06月16日~20日 福岡市

Sasao A, Takaki M, Hee-Jin J, Ohtsu Y, Mishima S, Yonemitsu K, Morioka H, Ueda H, Nishitani Y. Application of antibody engineering to drug screening: Preparation of the anti-fluvoxamine Quenchbody, a novel fluorescent biosensor. 9th International Symposium on Advances in Legal Medicine (ISALM). 2014年06月16日~20日 福岡市

西谷陽子、三島聡子、笹尾亜子、米満孝聖. クレアチニン産生におけるエタノール代謝の役割. 平成26年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会. 日本アルコール・薬物医学会雑誌. 2014年10月2日~4日 横浜市

米満孝聖、三島聡子、大津由紀、笹尾亜子、西谷陽子. 危険ドラッグ使用者急死の1事例. 第64回日本法医学会学術九州地方集会. 2014年10月10日~11日 鹿児島市

三島聡子、大津由紀、笹尾亜子、米満孝聖、西谷陽子. 浅瀬で溺死したと推定された1例. 第64回日本法医学会学術九州地方集会. 2014年10月10日~11日 鹿児島市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西谷 陽子 (NISHITANI YOKO)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号: 30359997

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし