

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890195

研究課題名(和文) ポリアミン及び代謝物を用いた臓器損傷マーカーの開発

研究課題名(英文) Development of the novel biomarker for tissue damage using polyamines and their metabolites

研究代表者

植村 武史 (Uemura, Takeshi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50401005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ポリアミン及びその代謝物を用いて、外表から分からない臓器損傷を、簡便で迅速な方法で診断するための新規試験法の開発である。本研究の結果、飲酒によりスベルミンオキシダーゼ(SMO)が転写レベルで誘導され、ポリアミン代謝によりアクロレインを生成し細胞毒性を示す事が示唆された。SMO及びポリアミン、アクロレイン量を測定することにより、エタノール摂取及びそれに伴う肝臓組織の損傷を検出することが出来る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The objective of this research is to develop a novel test for the identification of the cause of death in legal autopsy cases. We found that alcohol consumption induced spermine oxidase (SMO) at the transcriptional level in the liver and generated acrolein by polyamine metabolism to exert cytotoxicity. Our results indicate that polyamines and acrolein levels in liver tissues can be used as a novel biomarker for tissue damage caused by alcohol consumption.

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：法医学

キーワード：ポリアミン アクロレイン 肝臓 アルコール アセトアルデヒド スベルミン酸化酵素

## 1. 研究開始当初の背景

現在、我が国では年間約 100 万人が死亡し、そのうち約 17 万人が変死として扱われている。変死のうち、検死、検案によって事件性が疑われる、又は死因不明のものについて司法解剖が行われ、詳細な死因究明が行われる。しかしながら、司法解剖が行われるのは 10% 程度であり、死因不詳として処理される案件も多い。死因の究明は、事件解決や遺族のためのみに留まらず、将来の犯罪、事件の予防においても重要な意味をもつ。したがって、死因診断の精度を向上させることが重要である。京都府立医科大学では、例年約 120 例の司法解剖が行われ、そのうち、肝臓の損傷が見られる例が約 30 件と多い。しかしながら、肝臓の損傷は外見や CT 所見では判別が困難である。従って、血液や組織検体を用いた組織損傷試験法は、死因解明の精度向上に有益であると考えられる。

ポリアミンは、広く生体内に存在する生理活性アミンであり、細胞増殖や細胞の機能に必須の因子である。生体内には、主にプトレスシン、スペルミジン、スペルミンの 3 種が見いだされ、2 価以上のカチオンとしてはマグネシウムに次いで多量に存在している。生体内では主に核酸に結合して存在し、蛋白質合成の促進に強く関与している。また、イオンチャネルの活性調節や細胞内蛋白質輸送など、その作用は多岐にわたる。ポリアミンは細胞の機能に必須である一方、多すぎるポリアミンは細胞毒性を示す。そのため、細胞内ポリアミン濃度は、生合成、分解、輸送により厳密に調節されている。細胞内ポリアミン量は、組織や細胞により異なり、癌細胞や消化管上皮細胞などの増殖が速く蛋白質合成が盛んな細胞では、ポリアミンの生合成及び取り込み活性が上昇しており、細胞内ポリアミン量が増加している。一方、細胞増殖の活性が低い組織ではその量は少ない。また、組織ポリアミン量は、その組織によって加齢

による影響を受ける。肝臓や筋肉では加齢に伴って組織中ポリアミン量は減少する。一方、脳などでは、加齢によるポリアミン量の変化は見られない。ポリアミンの生合成は、オルニチンよりオルニチン脱炭酸酵素の働きによりプトレスシンが生成し、次いでスペルミジン、スペルミンが合成される。分解及び排出では、ポリアミンアセチル化酵素 SAT によりアセチル化され、分解及び排出される。ポリアミンのアセチル化はポリアミンの毒性低減において重要である。正常な細胞では、ポリアミンの分解、排出時にアセチル化が起こるため、ポリアミン代謝に伴う活性酸素及び毒性物質の発生が細胞の処理容量を超えることはなく、細胞障害を防ぐことが出来る。しかし、虚血性疾患などにより細胞が破壊されると、ポリアミンがアセチル化されない状態で細胞外へ放出される。ポリアミン、特にスペルミンは、血液中に存在するアミノオキシダーゼにより酸化され、*N,N*-Bis-(3-propionaldehyde)-1,4-diaminobutane を生成する。この物質は不安定であり、非酵素的に分解してアクロレイン ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CHO}$ ) を生成する。アクロレインは反応性が高く、蛋白質中のリジン、システイン等のアミノ酸残基と反応して蛋白質結合型アクロレインを生じる。アクロレインは、蛋白質装飾の他、膜障害など様々な細胞毒性を示すことが知られている。これまでに、腎障害及び脳梗塞の患者では、血中の蛋白質結合型アクロレインが上昇していることが報告されている。

以上のことから、組織内ポリアミン、アクロレイン及びアクロレイン結合型蛋白質は、組織損傷のマーカーとして用いることが出来ると考えられる。本研究は、組織損傷時におけるポリアミン及びアクロレインの量的変化及び生細胞への影響を明らかにし、死因診断の精度向上のための新たな検査手法を開発することを目的とする。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ポリアミン及びその代謝物を用いて、外表から分からない臓器損傷を、簡便で迅速な方法で診断するための新規試験法の開発である。まず培養細胞系を用いて細胞外ポリアミン及びアクロレインに対する細胞の反応を解析する。ポリアミン、アクロレイン修飾蛋白質の量的、局在的变化を明らかにする。さらに、アクロレインの細胞内ターゲット蛋白質を同定し、細胞内アクロレインマーカーとして活用する。得られた知見を司法解剖検体に応用し、肝臓を例として用いて組織損傷との関連を明らかにし、組織損傷の新規試験法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

### 1. ポリアミン、アクロレインの細胞への影響

組織障害により細胞内ポリアミンが放出され、アクロレインが発生すると、周囲の細胞がアクロレインに暴露されて様々な変化を示すと考えられる。この周囲の細胞に対する影響と時間的变化を明らかにすることで、細胞内ポリアミン、アクロレインの状態により組織損傷の程度が推測できると考えられる。そこで、培養細胞系を用いて、細胞外に添加したポリアミン及びアクロレインが細胞に与える影響を検討した。細胞株は、肝臓癌由来 HepG2 細胞株を用いた。ポリアミン及びアクロレインを培地中に添加し、細胞増殖、細胞の形状、ミトコンドリアやゴルジ体などのオルガネラの形状、数、核の状態などを解析した。ポリアミンの定量は HPLC を用いた OPA 法によって行った。また、蛋白質結合型アクロレインの細胞内局在を、免疫化学染色法、免疫蛍光法を用いて検討した。

### 2. ヒト肝臓組織における傷害とポリアミン、アクロレイン及び蛋白質結合型アクロレイン量の関係

検査法開発の目的のため、実際の司法解剖検体を用いて検討を行った。臓器障害の例と

して、肝臓を用いた。司法解剖の検体より採取した血液、肝臓組織を用い、ポリアミン、蛋白質結合型アクロレインの量、局在を測定した。肝臓の有無により分類し、比較検討を行った。同一検体における損傷の見られる部位と見られない部位について同時に解析を行い、比較検討した。組織損傷によりアクロレインが生成する条件では、前駆体であるスペルミンの量が減少し、蛋白質結合型アクロレイン/スペルミン比が上昇していると予想される。この比が損傷の有無により変化するか検討した。

## 4. 研究成果

HepG2 細胞を用いてポリアミン及びアクロレインの影響を検討した結果、アクロレインの毒性はポリアミンに比べて高く、50-300 nM で細胞障害が見られた。その際、ミトコンドリア、ゴルジ体に変形が認められた。一方、ポリアミンによりアクロレインの毒性が低減された。また、アクロレイン添加により細胞内ポリアミンプロファイルが変化し、スペルミジン/スペルミン比が上昇していた。培養細胞および組織切片を用いた解析により、アクロレイン結合蛋白質は肝臓細胞および肝臓組織中に広く存在するが、細胞間の腔や脂肪組織周辺に多く存在することが明らかになった。特にアルコール常飲者ではアクロレイン結合蛋白質を多く認めた。

司法解剖検体中のポリアミン濃度を測定した結果、飲酒者では血中および肝臓組織中のポリアミン濃度が非飲酒者に比べて高かった。肝臓細胞モデルとして HepG2 培養細胞系を用いて検討を行った結果、エタノール代謝物であるアセトアルデヒド(AcH)により細胞増殖が阻害された。AcH 暴露細胞ではスペルミンが減少し、プトレスシン及びスペルミジン量が増加していた。その際、ポリアミンの生合成酵素及びアセチル化酵素は増加していなかった。一方、スペルミンオキシダーゼ(SMO)の活性、mRNA、蛋白質量は AcH に

より増加していた。SMO 活性依存的に毒性物質アクロレインが生成しており、SMO の発現量を減少させた細胞では、AcH の毒性発現が減少した。

本研究の結果、AcH はスペルミンオキシダーゼを転写レベルで誘導し、その結果、スペルミンが酸化されスペルミジン、プトレスシンが増加したと考えられた。また、SMO によりスペルミンが酸化される際、アクロレインが生成し、細胞毒性を示すと考えられた。SMO 及びポリアミン、アクロレイン量を測定することにより、エタノール摂取及びそれに伴う肝臓組織の損傷を検出することが出来る可能性が示唆された。

#### 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 1 件)

Uemura T., Tanaka Y., Higashi K., Miyamori D., Takasaka T., Nagano T., Toida T., Yoshimoto K., Igarashi K., and Ikegaya H.: Acetaldehyde-induced cytotoxicity involves induction of spermine oxidase at the transcriptional level. Toxicology 310C, 1-7 (2013)

[学会発表](計 4 件)

植村武史, 東 恭平, 戸井田敏彦, 五十嵐一衛, 池谷 博

アセトアルデヒドは、スペルミンオキシダーゼを転写レベルで誘導する  
日本ポリアミン学会第4回年会

Uemura T., Tanaka Y, Higashi K, Miyamori D, Takasaka T, Nagano T, Toida T, Yoshimoto K, Igarashi K, and Ikegaya H

Acetaldehyde-induced cytotoxicity involves induction of spermine oxidase at the transcriptional level.

Gordon Research Conference on Polyamines  
2013

Uemura T., Stringer D.E., Blohm-Mangone K., Gerner E.W.

Regulation of cellular polyamine levels by

transport, protein sorting and metabolism.

第86回日本生化学大会

植村武史, 高坂友和, 宮森大輔, 吉本寛司, 池谷 博

アセトアルデヒドの肝細胞毒性には、スペルミンオキシダーゼが関与する

第97次日本法医学会学術全国集会

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/hoi/>

#### 6 . 研究組織

(1)研究代表者

植村 武史 (UEMURA, Takeshi)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号 : 50401005