

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460863

研究課題名(和文)ヒ素中毒の機序についての分子生化学的研究

研究課題名(英文)Molecular biochemical studies on the mechanisms of arsenite-induced intoxication

研究代表者

上村 公一 (Uemura, koichi)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：30244586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒ素は毒物であるが、急性前骨髄性白血病の治療に用いられる。重大な副作用として心臓毒性がある。ヒ素の心臓毒性の機構を明らかにするため、マウス心房細胞由来のHL-1細胞に対する亜ヒ酸(ATO)毒性を検討した。亜ヒ酸1-10 μM 、24時間曝露の条件で細胞死、Parkinの作用、ubiquitin-proteasome系、autophagy-lysosome系の関与を調べた。結果、HL-1細胞のATOによる細胞傷害時にParkinが活性化され、ubiquitin-proteasome系を活性化することがミトコンドリア品質管理、細胞の恒常性維持、細胞保護的に作用していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Although arsenic is poison, it is used for a treatment of acute promyelocytic leukemia with a secondary effect of cardiac toxicity, e.g. fatal arrhythmia. To elucidate the mechanisms of arsenic on heart we studied the toxicity of arsenic trioxide on mice atrial muscle-derived HL-1 cells. We applied 1-10 μM ATO for 24h and studied the characterization of cell death, the effects of ubiquitin ligase Parkin, the change of ubiquitin-proteasome system and autophagy-lysosome system. The result is that ATO activate Parkin and ubiquitin-proteasome system in cardiac HL-1 cells, and, induces quality control of mitochondria and maintenance of cell homeostasis, thereby, cell protection.

研究分野：法医学

キーワード：ユビキチン-プロテアソーム系 ヒ素 心筋 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

薬物中毒死は外因死（自殺、他殺、不慮の事故、など）であり、「異状死」に該当する。法医実務では、薬物中毒が疑われる異状死体は警察の担当者による検視・見分後、多くの場合、法医解剖が実施され、血液、尿中の薬物定性・定量分析の後、死因の確定が行われる。従来から薬物中毒の研究は法医学、薬理学、救急医学、内科学の領域で行われてきた。中毒物質には、神経毒、血液毒、等に分類されるように、標的臓器が異なる。これは、それぞれの組織・細胞種による毒物への感受性に違いがあることに起因する。また、中毒物質は多数存在しているため、それぞれについての中毒作用の詳細を検討することは中毒の全体像を理解する上で必須である。しかし、中毒の機構についての詳細な生化学・分子生物学的な研究はあまり進んでいない。覚せい剤、一酸化炭素、抗精神病薬中毒等、法医実務上よく見られる薬物についても、その中毒作用の詳細は十分に解明されていない。

本研究ではヒ素の毒性の機構について研究する。ヒ素化合物のうち、亜ヒ酸 (As_2O_3) は無味無臭で、かつ、強い毒性のため、昔から西洋では毒殺の手段としてしばしば用いられてきた。我が国においては、ヒ素中毒死の数は比較的少ない。しかし、1998年の和歌山ヒ素カレー事件のように他殺の手段として用いられたこともある。これまでの研究から、ヒ素は体内に吸収されると、チオール (-SH) 基と反応し、蛋白質を変性させ、毒性を示すとされている。しかし、ヒ素の毒性に活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) が関与していることも報告されている (Platanias, *J Biol Chem.* 284; 18583-18587, 2009)。急性毒性としては、消化器症状、神経症状、循環器症状などがある。慢性中毒では皮膚症状が見られる。一方、近年、ヒ素は急性前骨髄性白血病の治療薬と用いられている (Shen Z-X, et al, *Blood* 89; 3354-3360, 1997)。また、固形腫瘍に対する抗癌剤としても注目されている (Wang W, et al, *Pancreas* 38; e114-e123, 2009)。臨床医学において、亜ヒ酸の副作用として、心臓毒性が問題であり、その解決が待たれる。

2. 研究の目的

法医実務上、中毒物質として重要なヒ素を取り上げ、ヒ素の細胞への直接的な中毒作用の機構の解明を目的とする。具体的には、生化学・分子生物学的手法を用いて、細胞死関連蛋白質やそのシグナル経路を明らかにし、特にヒ素の毒性に係わるとされている活性酸素や標的蛋白質の特定をめざす。その結果、ヒ素中毒の治療・予防法の確立に寄与することを目的とする。また、近年、ヒ素化合物は

臨床医学において、急性前骨髄性白血病の治療薬として用いられ、固形腫瘍の抗癌剤としても注目されており、本研究においてヒ素の細胞への作用機序の詳細が解明されることより、より副作用の少ない抗癌剤の開発にも資するものである。ATOの心毒性にはミトコンドリア障害が重要と考えられており、障害ミトコンドリアの除去によりミトコンドリア品質管理に寄与する E3 ユビキチンリガーゼである Parkin との関係に興味をもたれるが、心臓においてはほとんど検討されていない。よって本研究では、マウス心房細胞由来 HL-1 細胞を用い、ATO 誘導性心筋障害(細胞死)に対する Parkin およびユビキチンプロテアソーム系の役割を検討した。

3. 研究の方法

(1) 材料

<試薬>

As_2O_3 (Arsenic trioxide)

<細胞培養>

マウス成体心房由来の HL-1 cell. 3 cm dish に培養。

(2) As_2O_3 の曝露方法

As_2O_3 は、固体で、比較的水に溶けやすい。Stock 溶液 (1M) を作成した後、希釈して培地中に投与する。

As_2O_3 1 μM ~10 μM の濃度範囲で投与

(3) 形態変化の観察

細胞に経時的に形態的な変化を位相差顕微鏡で観察し、確実に細胞死が起こっている濃度と時間を確定する。細胞死の客観的な評価法として、MTT assay を用いる。蛍光顕微鏡 (BZ-8100、キーエンス) を用いて、蛍光色素 propidium iodide と Hoechst33342 の二重染色により、necrosis、apoptosis が区別される。

(4) アポトーシス関連蛋白質の変化の検討
細胞内の細胞死シグナル伝達経路を検討するため、生化学的測定法として、western blotting 法を用いて、細胞死に関与する蛋白質を確定する。例えば、cleaved caspase-3

(apoptosis 共通経路)、 α -fodrin (necrosis) 抗体、p62 (autophagy) の発現を観察する。さらに、apoptosis では、mitochondria からの cytochrome c の漏出および caspase-9

(mitochondria 経路)、caspase-8 (death receptor を介する外因性経路)、詳細な apoptosis 経路を確定する。

(5) ミトコンドリア膜電位の変化の観察

3 cm dish に培養した細胞に JC-1 10 μM を加え、10 分間静置した。その後 PBS で wash し、ATO を曝露させた。曝露直後から蛍光顕微鏡を用

いてミトコンドリア膜電位の変化を観察した。

(6) ミトコンドリア分画の採取

回収した細胞を26 Gの注射針で20回出し入れし、14,000 × g 15分間遠心し、上清を細胞質分画とした。沈殿を緩衝液に懸濁し、10秒3回の超音波処理後、14,000 × g 15分間遠心し、上清をミトコンドリア分画とした。

(7) オートファジーに関する実験

HL-1にLipofectamine 2000を用いて、MT-mAG1 (MBL), MT-mKO1 (MBL), LMP2-GFP, GFP-LC3をtransfectし、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(8) Proteasome 活性の測定

chymotrypsin-like activityを測定した。Proteasome-Glo Chymotrypsin-Like Cell-Based Assay kit (Promega)を用い、microplate readerによる560nmの吸光度を測定した。

(9) ラットを用いた動物実験を行った。ラットに5mg/kg B.W. i.p.のATOを投与し、6h、48h後に臓器を回収し、ヒ素の標的であるPML蛋白質の動態について、western blottingで解析した。

4. 研究成果

(1) ATO曝露によるHL-1細胞への影響

ATO 1~10μM曝露により、ミトコンドリア膜電位感受性のJC-1を用いて測定したところ、ATOは濃度依存的にミトコンドリア膜電位を低下させた(図1-A)。Hochst33342とPIの蛍光観察により、ATOは濃度依存的にアポトーシスを生起した。各凝縮があり、PI陰性細胞をアポトーシスとした(図1-B)。

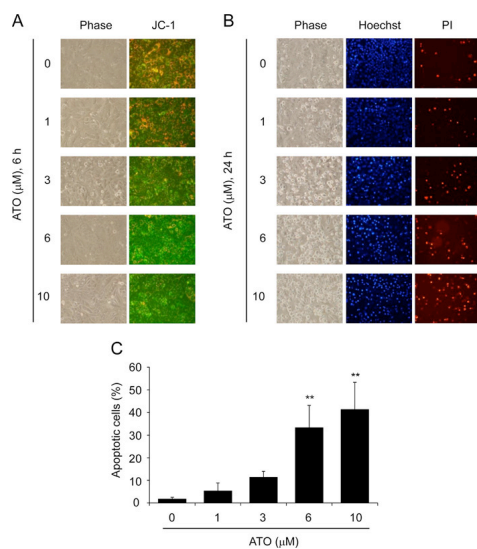


図1.ミトコンドリア膜電位の低下とアポトーシス

(2) 内因性アポトーシス経路の活性化

ATO 1~10μM曝露し、24時間後に細胞を回収した。western blottingにより、アポトーシス関連タンパク質であるcleaved caspase-9、cleaved caspase-3を測定した。ともに、濃度依存的に活性化を認めた。

(3) Parkinの細胞質からミトコンドリアへの移動

Parkinは傷害されたミトコンドリアから放出されるE3 ubiquitin ligaseである。

mCherry-Parkin and MT-mAG1 (mitochondrial marker)を用い、ATO曝露(0~6μM)により、Parkinが細胞質からミトコンドリアにtranslocationする(図2-A)。

ミトコンドリア、細胞質分画し、western blottingにより、Parkinの細胞質からミトコンドリア分画への移動を確認した(図2-B)。

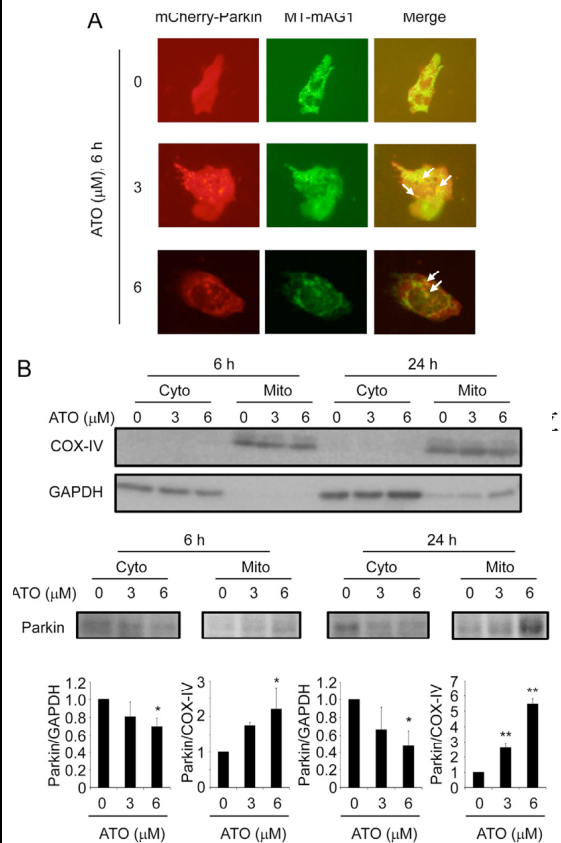


図2.Parkinのミトコンドリアへの転位

(4) VDAC1 のユビキチン化

ATO 24 時間暴露後に Parkin の基質である VDAC1 のユビキチン化を認めた。また、10 μ M ATO 24 時間 ATO 暴露後、VDAC1 抗体による免疫沈降後、汎ユビキチン抗体で western blotting したところ、ユビキチン化された VDAC1 のバンドが見出された (Fig.3-A)。一方、VDAC2 は、ATO によるユビキチン化は認められなかった (Fig.3-B)。

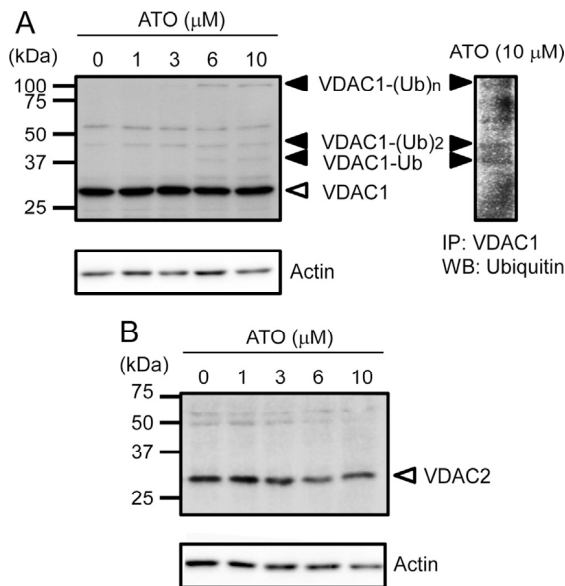


図3.Parkinの基質のVDAC1のユビキチン化

(5) オートファジーの関与の有無

オートファジー関連蛋白の western blotting により、オートファジーマーカー LC-3 に変動はなく、6 μ M, 10 μ M の ATO では、オートファジーの基質 p62 の増加が認められた。LC-3 の蛍光観察により、autophagosome は認められなかった。

(6) ユビキチン化蛋白増加と proteasome 活性増加

anti-pan-ubiquitin (pan-Ub) を用いて、western blotting を行ったところ、pan-Ub が認められた (Fig.4-A)。次に、K48-linked protein ubiquitination は proteasomal による分解、K63-linked protein ubiquitination は lysosomal による分解と考えられている。anti-K48 linkage-specific polyubiquitin (K48), anti-K63 linkage-specific polyubiquitin (K63) 抗体を用いて、western blotting により、ユビキチン化蛋白を測定した。K48、K63 抗体のいずれも増

加が認められた (Fig.4-B)。proteasome 活性を測定したところ、3~10 μ M ATO 暴露により、仮性の増加が認められた (Fig.4-C)。

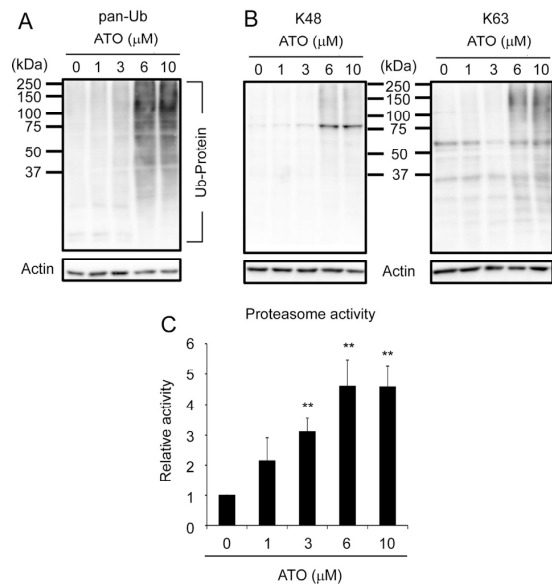


図4.蛋白のユビキチン化

(7) ユビキチン-プロテアソーム系が細胞の恒常性に関与

LMP2-GFP (proteasomal marker)、MT-mKO1 (mitochondrial marker) を用いて、蛍光観察を行ったところ、proteasome subunit protein LMP2 がミトコンドリアに translocates した (Fig.5-A)。proteasome inhibitor の bortezomib 投与により、アポトーシスが増加した (Fig.5-B)。

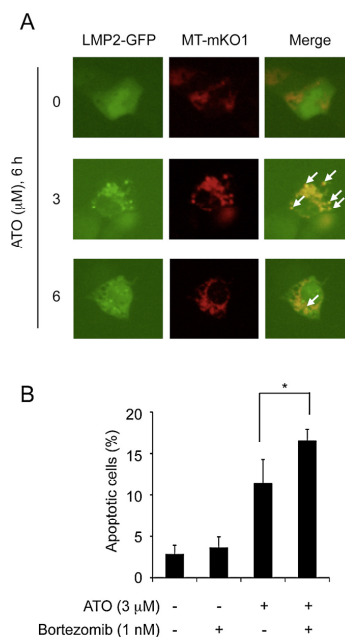


図5. ubiquitin-proteasome 系の細胞の恒常性への関与 proteasome 阻害剤でアポトーシスが増加。

(8) 動物実験

Wistar rat 7W 雄 (BW 200-300g) に ATO、5mg/kg B.W. i.p. 投与。各群 5 匹以上。6h と 48h 後に屠殺し、心臓、肺、肝臓、大脳を回収した。定法により、ホモジナイズ、蛋白定量し、蛋白濃度を調整した。ヒ素の標的である PML 蛋白質の動態について、western blotting で調べた (Fig.6)。その結果、心臓での変動はなく、大脳でのみ PML タンパクの変動 (増加と減少) を認めた (Fig.6)。

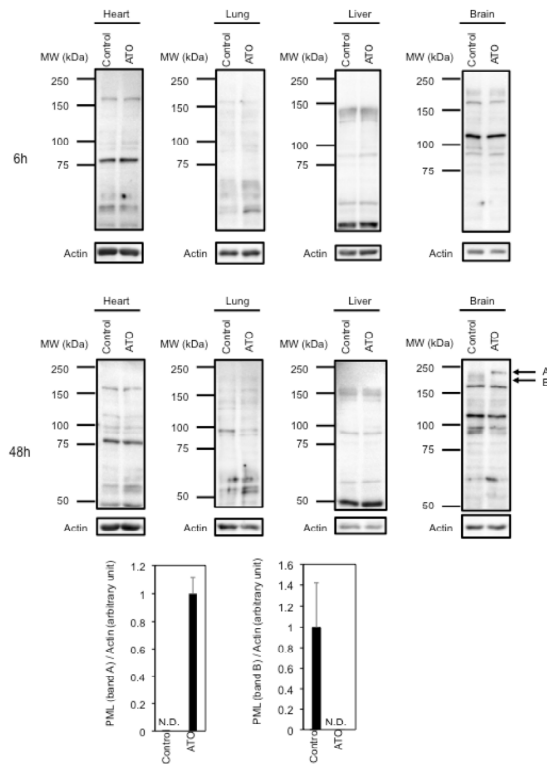


図 6. ラットの諸臓器における PML の変動。
心臓、肺、肝での変動はなく、大脳でのみ PML タンパクの変動 (増加と減少)。

(9) 考察

この研究では、亜ヒ酸は心筋由来の HL-1 細胞にアポトーシス型の細胞死を引き起こした。Parkin の細胞質からミトコンドリアへの translocation が起こり、VDAC1 のユビキチン化を引き起こされた。この時、proteasome 活性が上昇していたが、autophagy-lysosome 系の活性化は認められなかった。また、proteasome 活性を抑制すると、細胞死 (アポトーシス) が増加した。以上のことから、ATO 投与時は、ubiquitin-proteasome 系が活性化し、細胞保護的に作用していることが考えられた。

Proteasome を抑制すると細胞死が増加することは、mitophagy が起こっていることが示唆された。ラットの動物実験は、予備的な実験であるが、ヒ素の標的である PML 蛋白質の動態について、western blotting で調べた。その結果、心臓での変動はなく、大脳でのみ PML タンパクの変動 (増加と減少) を認めた。今後は酸化ストレスと DNA 損傷を中心に研究を進める予定である。

(10) 研究の総括

心筋由来の培養細胞の亜ヒ酸による細胞傷害時に、傷害されたミトコンドリアから放出される E3 ubiquitin ligase である Parkin がミトコンドリアに translocation し、さらに ubiquitin-proteasome 系を活性化することが、ミトコンドリア品質管理、細胞の恒常性維持につながり、結果として、細胞保護的に作用している。今後は、動物での検証が待たれる。

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)

[論文発表] (計 1 件)

① Watanabe M, Funakoshi T, Unuma K, Aki T, Uemura K.

Activation of the ubiquitin-proteasome system against arsenic trioxide cardiotoxicity involves ubiquitin ligase Parkin for mitochondrial homeostasis.

Toxicology. 査読有、2014; 322(1), 43-50.
doi: 10.1016/j.tox.2014.04.008

[学会発表] (計 2 件)

① Activation of ubiquitin-proteasome system plays a protective role in arsenic trioxide-induced cardiotoxicity.

Mayumi Watanabe, Takeshi Funakoshi, Kana Unuma, Toshihiko Aki, Koichi Uemura. 9th International Symposium Advances in Legal Medicine (ISALM) Fukuoka. Program and abstracts of the 9th International Symposium Advances in Legal Medicine (ISALM), P.154,

2014.6.16-20 Fukuoka

②渡邊 まゆ美、船越 丈司、鶴沼 香奈、
秋 利彦、上村 公一
マウス心房細胞由来 HL-1 細胞の亜硫酸誘
導性アポトーシスにおけるユビキチン-
プロテアソーム系の抑制作用. 第 87 回
日本生化学会大会、2014 年 10 月 16 日
(2P-292)、京都

[その他]

ホームページ等

[http://www.tmd.ac.jp/med/legm/houi_kenkyuu.ht
ml](http://www.tmd.ac.jp/med/legm/houi_kenkyuu.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

上村 公一 (UEMURA KOICHI)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・教授
研究者番号：30244586

(2)研究分担者

秋 利彦 (AKI TOSHIHIKO)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・講師
研究者番号：60304474

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