

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860487

研究課題名(和文)薬毒物による細胞内空胞化を介した細胞毒性機序の研究

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism of cytotoxicity with cytoplasmic vacuolation by drugs

研究代表者

船越 丈司 (FUNAKOSHI, TAKESHI)

東京医科歯科大学・医歯(薬)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)：以前の研究で塩基性薬物ノルエフェドリンは、ヒトSH-SY5Y細胞に暴露することで顕著な空胞化と細胞毒性を引き起こすことを明らかにしている。本研究では、細胞内空胞化を伴う細胞毒性機構についてより詳細な検討を行った。薬物暴露後の遺伝子発現変動を解析したところ、コレステロール合成に関する分子群の発現の増加が確認された。またSREBP2の活性化が誘導されており、結果細胞内にコレステロールの蓄積が認められた。誘導される細胞死は、ネクロトーシスおよびSREBP2の阻害剤で細胞死は顕著に抑えられた。以上の結果から塩基性薬物による細胞死は過剰なコレステロール蓄積によって引き起こされることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have shown previously that norephedrine (Nor), a basic drug, induces cell toxicity that are associated with massive cytoplasmic vacuolation in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. To reveal the molecular mechanism underlying cytotoxicity with vacuolation by basic drugs, we examined alteration of gene expression profile during Nor exposure in the cells. DNA microarray and realtime PCR analysis revealed that the genes for cholesterol biosynthesis were increased after exposure to Nor. Concomitant with the observation, the master transcriptional regulator of cholesterol homeostasis, SREBP-2, was activated by Nor. In addition, we found that the cell death by Nor could be suppressed by Nec-1s, an inhibitor of necroptosis. Furthermore, abrogation of SREBP-2 activation by inhibitor botulin efficiently reduced the cell death by Nor. Taken together, our results indicate that the excessive accumulation of cholesterol should underlie the neuronal cell death by basic drug exposure.

研究分野：医歯薬学

キーワード：塩基性薬物 コレステロール ネクロトーシス 細胞内空胞化

## 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。そのためこれら中毒における作用機序の詳細を明らかにすることが、法医実務上非常に重要となる。特に植物アルカロイド(あるいはそれを基に合成された薬物)を主とした塩基性薬物は一般に向精神薬、風邪薬などで使用される他、覚せい剤、麻薬としても使用されるものも存在するため、これら薬物の毒性機序を明らかにすることが中毒における治療法を確立するためにも求められている。

以前から薬物中毒による細胞毒性には、アポトーシスやネクローシスといった細胞死シグナルの関与が主として報告されているが、その一方で塩基性薬物中毒においては、細胞毒性を示す際に細胞内に顕著な空胞を形成することが報告されている(Goldman et al. Bioanalysis, 2009; Henics et al. Biology of the cell, 1999)。しかしながら、その詳細な空胞形成機序、および毒性への関与は明らかとなっていない。

申請者の以前の研究から、過去長年にわたって一般市販薬の鼻炎薬、風邪薬等に使用されており、また多量に摂取した場合に覚せい剤メタンフェタミン類似の作用を有することから、近年「麻薬及び向精神薬取締法」の対象となり、現在では脱法ドラッグの主成分としても使用されている塩基性薬物ノルエフェドリンを神経細胞に暴露することで、顕著な細胞内空胞化と細胞毒性を示すこと、またノルエフェドリンによって形成される空胞が肥大化したリソソームであることを明らかにした。さらに暴露初期の段階では細胞保護機構であるオートファジーが同時に誘導されていることを明らかにしている

(Funakoshi et al. Brain Research, 2013)。さらに、ノルエフェドリンによって誘導されるオートファジーは暴露後期になると空胞化を伴ったリソソーム機能低下により阻害され、以上の結果から細胞障害に結びつく可能性が示唆されている。しかしながら、リソソーム空胞化機序と詳細な細胞毒性機序の詳細は未だ明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、法医実務上取り扱われる薬毒物の中でも一般に使用されていることから、その毒性の検討が特に重要と考えられる塩基性薬物において散見される細胞内空胞化に着目し、これら薬物によって誘導される細胞内空胞化が、従来の細胞死経路であるアポト

シスやネクローシスと異なる新たな細胞毒性経路であると考えられるため、その細胞内空胞化の詳細な誘導機序および毒性発現機序を明らかにすることを目的としている。またその作用機序をもとに、薬毒物中毒の治療・予防法、および法医実務における新規薬物鑑定法を確立することを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) 電子顕微鏡による細胞内空胞化の観察

薬物投与後の細胞を Epon 樹脂により包埋、ウルトラミクロトームによる超薄切を行い、染色後、透過型電子顕微鏡(Hitachi H-7100)を用いて細胞内の観察を行った。

### (2) 薬物暴露後の細胞内遺伝子発現パターンの解析

薬物暴露後の遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより解析し、細胞内シグナルに関与する新規分子を検索した。

薬物処理後、および未処理の細胞を準備し、それぞれの細胞から mRNA を抽出する。各 mRNA はサーマルサイクラーにより逆転写反応にかけ、それぞれ別の蛍光標識をされた cDNA を作成する。作成した cDNA は DNA アレイチップ上でハイブリダイゼーションさせた後、蛍光をスキャナーで取り込んで、薬物処理による各遺伝子の発現パターンの変化を検討する。発現の増減が認められた分子に対し、リアルタイム PCR マシンで mRNA の増減を定量化を行い、薬物暴露後に変動のある遺伝子の網羅的な検索を行った。

### (3) ウェスタンブロッティング法によるシグナル伝達物質の活性化の検討

薬物暴露後の細胞を回収し、SDS sample buffer で溶解後、カスパーゼ関連分子である caspase3、ネクローシス関連分子である RIP3、コレステロール生合成系マスター分子である SREBP-2 に対する抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

また RIP3 に対しては、SDS-PAGE gel に Phos-tag (Wako) を加えたものを使用し、リン酸化による活性化を検討した。

### (4) 細胞内コレステロールの変動の解析

細胞内コレステロール量の変化を検討する為に GC-MS (Agilent 6890GC/5973MS) を用いて薬剤刺激後の細胞内コレステロールの定量を行った。

また、細胞内コレステロール局在の変化を検討するために、コレステロール蛍光染色剤で

ある Filipin を細胞に加え、共焦点蛍光顕微鏡下で刺激・無刺激の細胞の観察を行った。さらに、細胞外から取り込まれるコレステロール量を検討する為に、蛍光標識した LDL (Cayman Chemical LDL uptake Cell-Based Assay Kit) を細胞培地中に加え、刺激後の取込を蛍光顕微鏡下で観察を行った。

(5)ネルロトシス阻害剤および RNAi 法を用いたネクロトシス関連分子ノックダウンによる細胞毒性への影響の検討

ネクロトシス関連分子である RIP1、MLKL それぞれに対する阻害剤である Nec-1s、Necrosulfonamide を細胞培地中に添加し、薬物刺激後の細胞生存率を CCK8 アッセイ (同仁化学 Cell Counting Kit-8)、ATP アッセイ (Promega Cell-Titer Glo) により行った。  
また、RIP1 に対する siRNA をトランスフェクションした細胞を用いて、薬物暴露後の細胞生存率を PI 染色法により検討した。

(6)SREBP-2 阻害剤および SREBP-2 ドミナントネガティブ過剰発現細胞による細胞毒性への影響の検討

コレステロール生合成系マスター分子である SREBP-2 に対する阻害剤 Betulin を細胞培地に添加し、薬物暴露後の細胞形態変化を顕微鏡で、細胞生存率を CCK8 アッセイにより行った。  
また SREBP-2 ドミナントネガティブを恒常的に発現する細胞を作成し、薬物投与後の細胞生存率への影響を CCK8 アッセイ、ATP アッセイにより検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1)塩基性薬物投与によるリソソーム空胞形成

リソソーム膜局在タンパク質である LAMP1 に蛍光タンパク質 GFP を結合した LAMP1-GFP を発現した細胞に塩基性薬物であるノルエフェドリンを暴露したところ、LAMP1 に縁取りされた空胞の形成が確認された (図 1A)。またノルエフェドリン暴露後の細胞を電子顕微鏡で観察したところ、細胞質に顕著な空胞形成が観察され、塩基性薬物暴露によりリソソームの肥大化した空胞が形成されることが確認された (図 1B)。

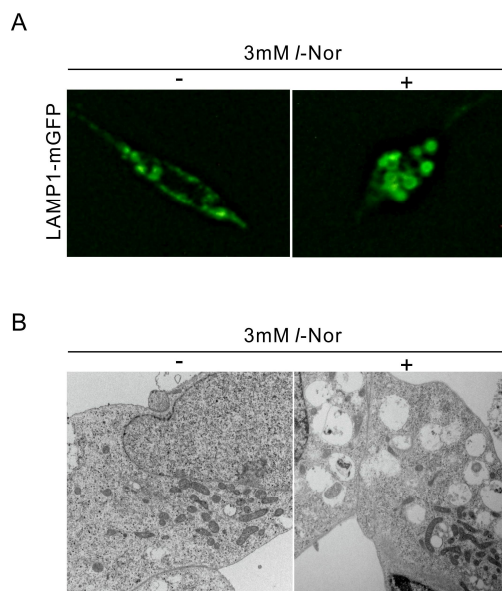
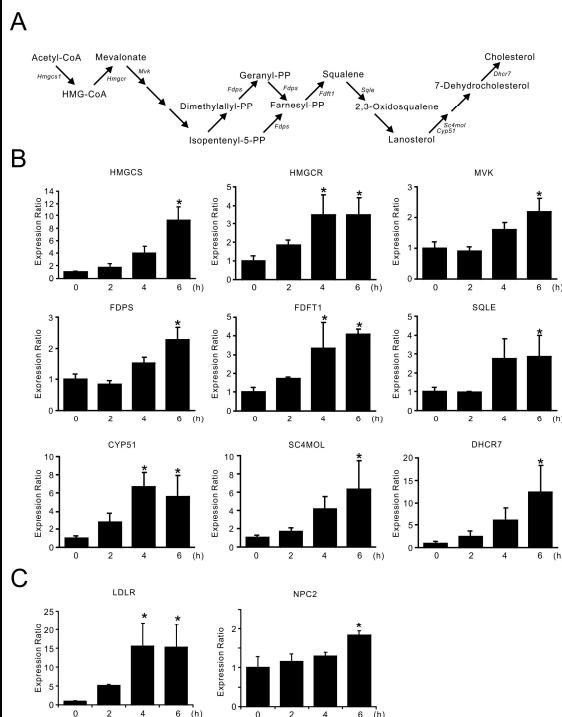


図 1、ノルエフェドリンによる空胞形成

##### (2)塩基性薬物暴露後の遺伝子発現変動の解析

DNA マイクロアレイにより、ノルエフェドリン暴露後の遺伝子発現変動を検討したところ、コレステロールに生合成・取込・輸送に関与する遺伝子群の発現が増加する傾向がみられた。そこでリアルタイム PCR によりこれら遺伝子群 (図 2A) の発現上昇を確認したところ、コレステロール生合成に係わる主要な 9 つの分子 (図 2B) およびコレステロール取込に係わる LDL-R、輸送に係わる NPC1 の発現の薬物暴露後時間依存的上昇が確認され



た (図 2C)。図 2、コレステロール生合成・取込・輸送関連遺伝子の発現増加

SREBP-2はコレステロール合成に係わる分子の転写を制御する分子であり、SREBP-2はプロテアーゼにより切断された後、核に移行し対象の遺伝子の発現を誘導することが知られている。そこでSREBP-2の活性化をウェスタンブロット、および免疫染色によって検討を行った。

ウェスタンブロットでは、薬物暴露後4時間をピークに切断されたバンドの増加がみられ(図3A,B)免疫染色から核への移行が観察され、塩基性薬物暴露後SREBP-2の活性化、コレステロール合成系の活性化が誘導されていることが明らかとなった。

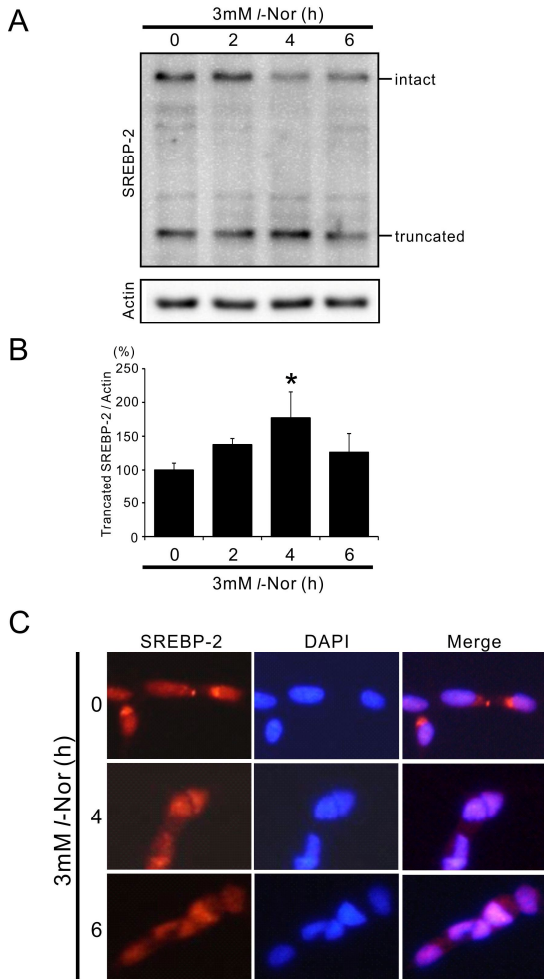


図3、SREBP-2活性化の検討

### (3)薬物暴露後の細胞内コレステロールの変化の検討

ここまでの結果から、塩基性薬物暴露後の細胞では細胞内コレステロールに変化が見られることが示唆されたため、次に細胞内コレステロール量の定量、LDLコレステロールの取込、細胞内コレステロール局在の変化を検討した。

GC-MSによる定量から薬物暴露後時間依存的に細胞内コレステロールの増加がみられ(図4A)細胞外コレステロールの取込の増加も観察された(図4B)。

さらに、細胞内コレステロールをFilipinによって蛍光染色したところ、薬物未処理の細胞ではコレステロールの大半が細胞膜に局在しているのに対し、薬物処理後の細胞では、細胞内に顆粒状にコレステロールが蓄積しているのが観察された。(図4C)またこれら顆粒の一部はリソソームと局在が一致していた。

これらの結果から、塩基性薬物暴露後、細胞内コレステロールの上昇と蓄積が誘導されていることが明らかとなった。

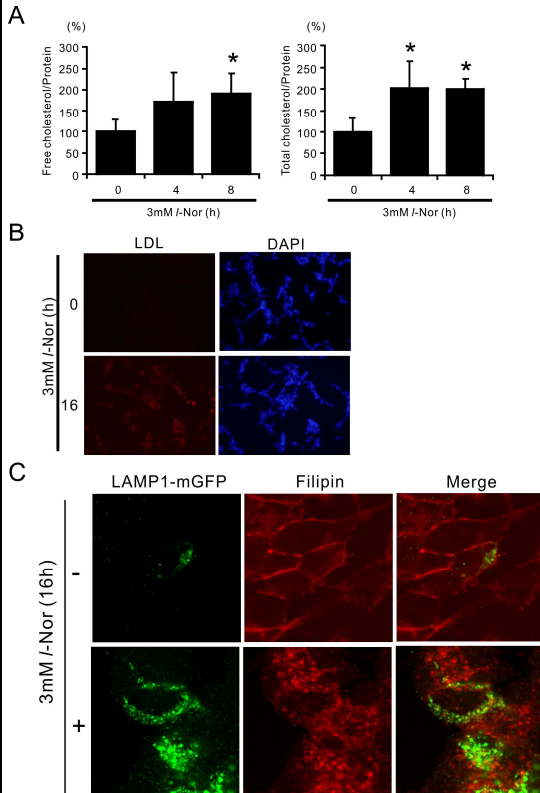


図4、細胞内コレステロールの増加・蓄積

### (4)塩基性薬物による細胞毒性機序の検討

薬物処理群においてアポトーシスが誘導されているかを検討したところ、アポトーシス実行分子であるcaspase3の活性化は見られなかった(図5A)。

近年、酸化コレステロールによりプログラムされたネクローシス様細胞死であるネクロトーシスが誘導されることが報告されている。

そこでネクロトーシスの実行分子であるRIP3の活性化をPhos-tagを用いたウェスタンブロットにより検討したところ、暴露48時間後に顕著なRIP3の活性化であるリン酸化RIP3のバンドの亢進が観察された(図5B,C)。

そこで、RIP3と同様にネクロトーシス実行分子であるRIP1の阻害剤の添加およびsiRNAによりRIP1をノックダウンした細胞において生存率への影響を検討した。薬物暴露細胞ではNec-1sの添加およびRIP1ノックダウンいずれにおいても、顕著に細胞毒性が抑制さ



れた (図 6A-C)。また同様にもう一つのネク  
ロトシス実行分子である MLKL の阻害剤  
添加においても、阻害剤の濃度依存的に細胞

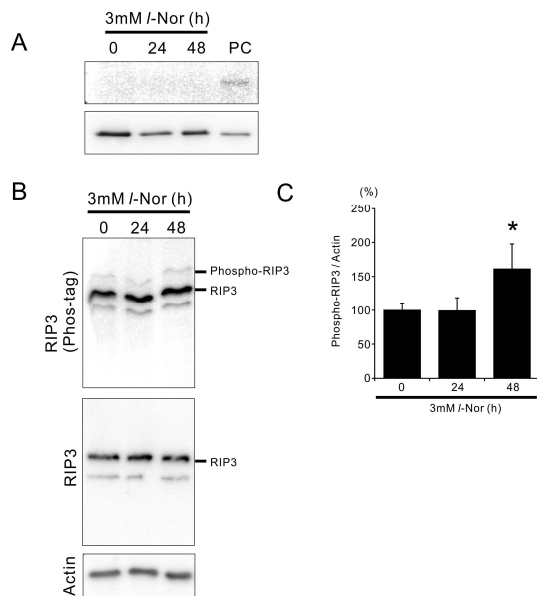


図 5、アポトーシスおよびネクロトシスの  
検討

毒性が抑制され (図 6D) 以上の結果から塩  
基性薬物暴露による細胞死はアポトーシス  
ではなくネクロトシスを誘導することが  
示唆された。

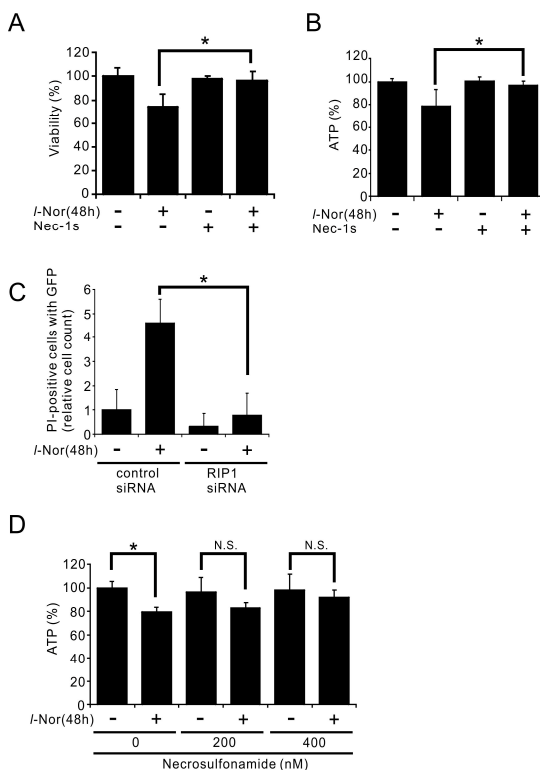


図 6、ネクロトシス誘導の検討

### (5) コレステロール過剰蓄積の細胞毒性に対 する影響の検討

ここまでの結果から、塩基性薬物暴露により、  
細胞内コレステロールの過剰蓄積が起こり、

またネクロトシスが誘導されることが示  
唆されたが、最後にコレステロールと細胞毒  
性の関与について検討を行った。

コレステロール生合成系マスター因子であ  
る SREBP-2 の阻害剤 Betulin を培地に添加し  
たところ、細胞内空胞化が抑制され (図 7A)  
また細胞生存率の回復が観察された (図 7B)  
さらに、SREBP-2 の不活性型を恒常的に発現  
する細胞において薬物を暴露したところ、野  
生株の細胞 (SH-SY5Y) に対して、不活性型  
を発現した細胞 (SREBP2DN) では、CCK-8 ア  
ッセイ (図 7C) において ATP アッセイ (図  
7D) においても顕著に細胞毒性が抑制された。

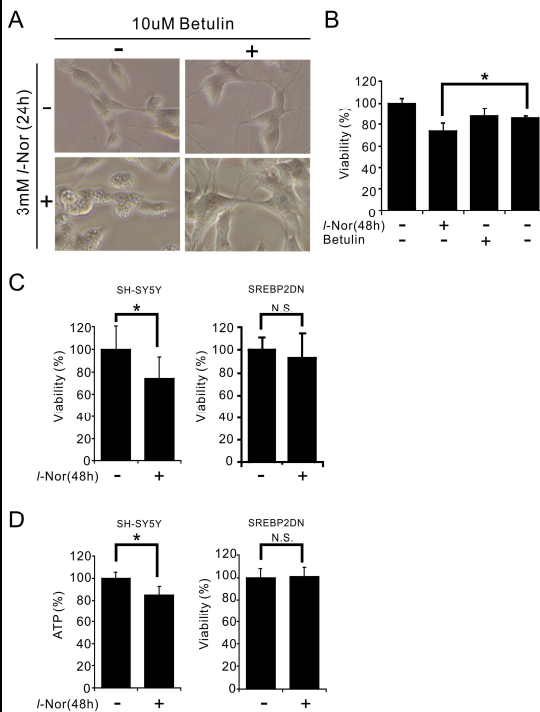


図 7、SREBP-2 抑制による細胞死への影響の  
検討

以上の結果から、塩基性薬物暴露によりコレ  
ステロールの生合成系、取込系の亢進がこ  
り、細胞内にコレステロールの異常蓄積が起  
こることが明らかとなった。

またその後誘導される細胞死はアポト  
シスではなく、プログラムされた細胞死であ  
るネクロトシスであることが示唆された。  
さらにコレステロールの蓄積を抑制するこ  
とで、細胞内空胞形成および細胞死が抑制さ  
れることから、塩基性薬物暴露後のコレステ  
ロールの過剰蓄積が空胞形成とネクロト  
シスの誘導に関与している可能性が示唆さ  
れた。

本研究は塩基性薬物による空胞形成と脂質  
代謝経路および毒性の関連について報告し  
た初の研究であり、今後これら薬物の中毒患  
者の治療法を確立することだけでなく、法  
医学上の新規薬物毒性マーカーとなること  
が期待される。

しかしながら、コレステロールの蓄積がネク  
ロトシス実行分子である RIP1、RIP3、MLKL

の活性化をどのようなシグナルを介して誘導しているかは未だ不明であり、今後の研究で明らかにすべき課題である。

また本研究期間では、SH-SY5Y 細胞を用いた神経細胞をモデルにした in vitro の実験系での検討だったため、今後マウス一頭体における in vivo の実験系において検討することがもう一つの課題である。

#### 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)

[学会発表](計 2件)

相原瑤、船越丈司、加藤千鶴、秋利彦、上村公一

向精神病薬ハロペリドールによるコレステロール代謝変化

第 83 回日本法医学会学術関東地方集会

2014 年 11 月 8 日

東京女子医科大学(東京都)

船越丈司、秋利彦、鶴沼香奈、上村公一  
覚せい剤原料ノルエフェドリン暴露による細胞内コレステロール変動の解析

第 36 回日本分子生物学会年会

2013 年 12 月 5 日

神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/med/legm/legm-J.html>

#### 6. 研究組織

(1)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：4 0 4 4 4 7 1 5