

令和元年6月4日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09202

研究課題名(和文) ターゲットメタボローム法を用いた網羅的薬物毒性機序の解析と新規毒性評価法の研究

研究課題名(英文) Analysis of drug toxicity mechanism and toxicity evaluation method using targeted metabolome method

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：40444715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではターゲットメタボロミクス的手法を用いて、薬物によって変動するシグナル経路を特定し、さらにそれら薬物によって変動する代謝物の増減から薬物間の毒性を比較できる新規毒性評価法の確立を目的とした。

覚せい剤原料ノルエフェドリンで刺激した神経細胞のメタボローム解析では、糖代謝、アミノ酸代謝、脂質代謝に関わる代謝物の優位な変動が観察され、過去の研究において明らかにされている脂質代謝異常、活性酸素の発生と一致する結果が得られた。構造類似薬物間の比較では、構造類似物においても代謝変動の違いを明らかにすることができ、メタボローム解析法が薬毒物による毒性機序の検討において非常に有用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬毒物による毒性機序の解明と毒性評価は法医学実務上重要であるが、数多存在する薬毒物の内その毒性機序の詳細が明らかな物は少なく、危険ドラッグなど毒性が不明な薬物も多く存在するため、薬物の毒性および機序をより簡便に検討する手法の確立が求められている。本研究で行ったターゲットメタボロミクス手法は、従来の方法に比べより簡便かつ短期間で薬物毒性および機序を検討することが可能となることから、今後法医学実務においても非常に有用となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we use the latest targeted metabolomics method to identify drug-dependent signal pathways, and quantify the increase or decrease of metabolites that fluctuate with these drugs, and compare the toxicity between drugs. Finally, we aimed to establish a new toxicity evaluation method for drugs that are unknown toxicity.

From metabolome analysis, in neurons exposed to norephedrine which is stimulant drug, significant changes in metabolites related to energy metabolism, amino acid metabolism and lipid metabolism were observed. These results are consistent with lipid metabolism abnormalities, generation of reactive oxygen species and decrease in ATP, which have been clarified in past studied. Therefore, it is suggested that the metabolome analysis method constructed in this study is very useful in examining the toxic mechanism due to the toxic substance.

研究分野：細胞中毒学

キーワード：メタボローム解析 細胞毒性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 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。また近年は、危険ドラッグ成分などのような毒性機序も細胞毒性も不明な薬物による事例も増加しており、法医学的にもこれら薬毒物の毒性を迅速に評価し、毒性機序を明らかにする手法の開発が急務である。

従来からの薬毒物による毒性機序を解明するためには遺伝子・タンパク質レベルでの変化を検討し、毒性評価は動物実験や過去の薬物事例における結果の集積によって行われている。しかし、これらの方法には莫大な時間と労力が必要であり、結果ごく一部の薬毒物の検討に限定されているのが現状である。また従来、薬毒物による毒性機序の多くはカスパーゼの活性化を介したアポトーシスによる細胞死であると考えられていたが、以前の研究から、覚せい剤類似物質であり、カチノン・フェネチルアミン系薬物であるノルエフェドリンによる神経細胞死は、アポトーシスを誘導しておらず、その一方でリソソームの肥大化を由来とする過剰な細胞内空胞化(Funakoshi et al Brain Research 2013)を引き起こし、さらにコレステロール代謝経路が亢進し、細胞内に顆粒状のコレステロールの蓄積が認められた。最終的にはコレステロールの蓄積が引き金となって、プログラムされたネクローシスであるネクロトーシスを誘導していることが示唆されている。この結果から、細胞死の検討においてカスパーゼの活性化を検討するだけでは不十分であり、コレステロールなどの生体内代謝物の動態を検討することが薬毒物の毒性機序の探索において極めて重要であると考えられる。

近年、生体分子の変動を網羅的に探索し、包括的に生命現象を解析するオミックス解析が生理・病理機構の解析法として着目されている。特にメタボロミクスは生体内に存在する多様な代謝産物を網羅的に解析する手法で、近年では血液中より特定の疾病のマーカー物質を探索する、あるいは一個体から細胞までの生体の状態を把握する為の強力な手法として用いられその有用性が着目されている手法である。メタボロミクスにはターゲットメタボロミクスとノンターゲットメタボロミクスの2種のアプローチが存在する。ターゲットメタボロミクスでは対象となる代謝産物を絞り込むことで高い定性・定量が可能だが、解析対象を限定する必要がある。一方ノンターゲットメタボロミクスでは対象代謝物を絞り込まず全代謝物を検出する手法であり、新規代謝物の検出が可能となるが、ターゲットメタボロミクスに比べ検出感度や定量性に劣る問題がある。近年の分析機器の発展により、高感度・高速分析が進みターゲット分析でありながら数百の代謝物を一斉分析することで網羅的な分析が可能となった。その為、ノンターゲット分析に対し劣っていた多くの代謝物の定性が可能となり、且つ高い定量性と高感度な解析を行うことが出来るようになった。以上の背景から本研究においてターゲットメタボロミクス法により、培養細胞における薬毒物処理後の代謝物の変動を解析し、毒性機序となるシグナル経路の探索を行い、また代謝物の変動値より薬物間の毒性評価を行うことで、従来では困難であった毒性不明の新規薬物においてもその毒性が評価できる手法を確立できるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

薬毒物による毒性機序の解明と毒性評価は法医実務上重要であるが、数多存在する薬毒物の内その毒性機序の詳細が明らかなものは少なく、また近年では危険ドラッグ成分など未だその毒性が不明な薬物も多く存在する。そのため薬毒物の毒性および機序をより簡便にかつ各薬物間での差を比較する手法の確立は法医学上急務となっている。

そこで本研究では最新のターゲットメタボロミクスの手法を用いて、薬毒物によって変動するシグナル経路を特定、さらにそれら薬毒物によって変動する代謝物の増減を数値化し毒性を評価することで、薬物間の毒性を比較し、最終的には毒性未知の薬物による細胞毒性の法医鑑定に有用な新規毒性評価法の確立を目的とする。

### 3. 研究の方法

各種薬毒物を投与した培養細胞より代謝物を抽出し、ターゲットメタボロミクス解析を行うことで、毒性機序の探索、毒性評価を行う。また薬物毒性において有用な代謝物を探索することで、ターゲットメタボロミクス解析の対象成分の拡充を計り、最終的には毒性および機序の不明な薬毒物における新規毒性機序の探索および毒性評価法の確立を試みた。

#### (1) ターゲットメタボロミクス用メソッドの作成

メタボローム解析には、分析装置として液体クロマトグラフ質量分析器、およびガスクロマトグラフ質量分析器(島津制作所製 LCMS-8040、GCMS-TQ8030)を用いて行った。各代謝物解析メソッドとして一般的な解糖系、アミノ酸、ホルモン、脂質メディエーターに加えコレステロール・ステロイド生合成系、脂肪酸類、および細胞毒性と密接に関与する活性酸素種由来の過酸化脂質を解析するメソッドの作成を試みた。解析メソッドは全て MRM (Multiple Reaction Monitoring) 法による測定法を使用しており、これにより従来の質量分析器では困難であったバックグラウンドノイズの低減を行うことで、特定イオンを効率良くかつ高感度で定性・定量することが可能である。各代謝産物の標準品は 10ppm に調整して質量分析器に注入し、まずプリカーサーイオンの確認、プリカーサーイオンから産生する定性用確認イオンの検出設定を

行った。次に測定時に使用する逆相 C18 カラムを液体クロマトグラフに装着した状態で再度標準品を注入し、各代謝物の保持時間（リテンションタイム）を測定、さらに産生するプロダクトイオン（MS/MS）を測定しデータベースへの登録を行い、これらデータにより代謝物の MRM メソッドを作成する。さらにこれら各代謝物の MRM メソッドを一つの解析メソッドに合わせ、一測定で約 200 成分の代謝物を測定するターゲットメタボロミクス解析メソッドを最終的に構築した。

## (2) 培養細胞におけるターゲットメタボロミクス解析

作成したメソッドを用いて培養細胞におけるメタボロミクス解析を行った。培養細胞は薬毒物の影響を強く受けると想定される神経系として神経芽細胞腫由来細胞 SH-SY5Y 細胞にレチノイン酸を添加し培養することで神経細胞様に分化させて使用した (Fig.1)。投与薬物は覚せい剤（メタンフェタミン）、覚せい剤類似物（ノルエフェドリン）、抗精神薬（ハロペリドール）等各種薬剤で行い、適宜対象薬物を増やし各薬物間の代謝変動の比較を行った。各薬物それぞれ 1 $\mu$ M ~ 1mM、1h ~ 24h で濃度・曝露時間を数点サンプリングして細胞回収を行い (Fig.1) 回収した細胞に内部標準試薬を添加したメタノールを加え超音波破碎することで疎水性代謝物を抽出、さらに純水を加え溶解することで親水性代謝物を抽出し、ターゲットメタボロミクス用サンプルとした (Fig.1)。サンプルは LC-MS/MS および GC-MS/MS にかけて作成したターゲットメタボロミクスメソッドにより測定を行い (Fig.1) 得られたデータを多変量解析にかけて (Fig.1) 各薬物投与群の特徴的な代謝変動を検討、さらにパスウェイ解析により毒性機序経路の解析を行った (Fig.1 ~ )。

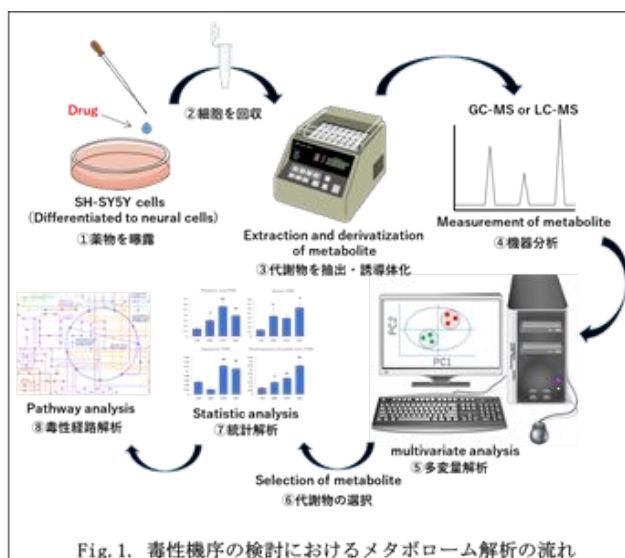


Fig.1. 毒性機序の検討におけるメタボローム解析の流れ

## 4. 研究成果

### (1) 覚せい剤原料ノルエフェドリンによる神経細胞代謝変動の多変量解析

SH-SY5Y 細胞に覚せい剤原料ノルエフェドリンを 0, 1, 3mM で刺激し 24 時間後代謝物を抽出、ターゲットメタボローム解析により約 200 種の代謝物の変動を測定し、ケモメトリクスソフトウェア Pirouette (infometrix 社) により多変量解析を行った (Fig.2)。群情報としてクラス変数を用いた PLS-DA 解析 (Fig.2A)、薬物濃度を目的変数として用いた PLS 解析 (Fig.2B) いずれにおいても、0, 1, 3mM 群それぞれを明確に分けることが出来たことから、薬物濃度によって代謝物の変動パターンが異なることが明らかとなった。

そのため、各多変量解析結果 (PLS-DA, PLS, PCA) における代謝物の Loading Score をもとに、各群において特徴的な変動代謝物をピックアップし、多重比較検定により各代謝物変動を検討した (Table.1)。

各多変量解析結果より重複を除く 60 代謝物に対してそれぞれ多重比較検定 (Dunnett 検定) を行った結果、34 種の代謝物において各群に優位な差が確認され、コントロールに比べ増加 (上矢印) もしくは減少 (下矢印) している代謝物を選択することができた。

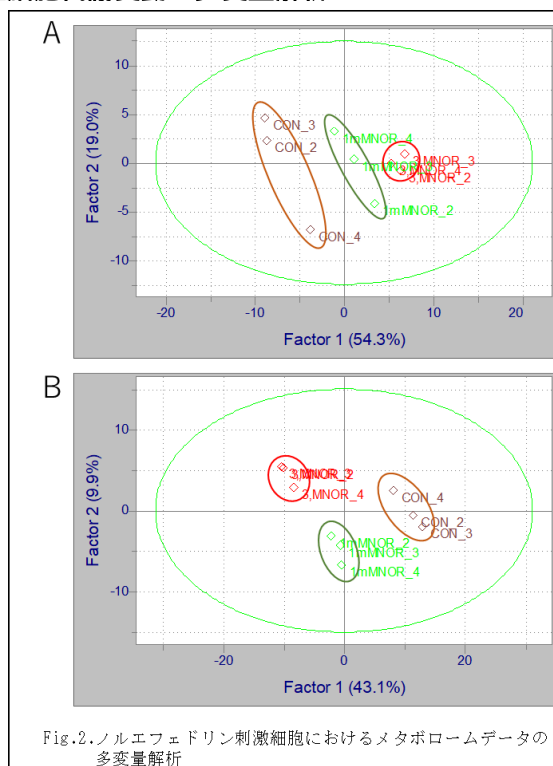


Fig.2. ノルエフェドリン刺激細胞におけるメタボロームデータの多変量解析

多変量解析、多重比較検定によって変動の見られた代謝物には、糖代謝、アミノ酸代謝、脂質代謝に関与する代謝物が多く含まれる印象であったが、現状では実際にどの代謝経路に属するものが多いか主観による判断を避けるため、優位な変動代謝物のパスウェイ解析を試みた。

Table.1 多変量解析結果および多重比較検定結果

	PCA	PLS	PLS-DA	1mM	3mM
Lactic acid	○	○	-	-	-
Alanine	○	○	-	↑↑	-
3-Hydroxyisobutyric acid	○	○	○	-	-
Octanoic acid	○	○	-	-	-
Leucine	○	○	-	↑↑	-
Phosphoric acid	○	○	-	↑↑	-
Nicotinic acid	○	○	○	-	-
Proline	○	○	-	↑	-
Succinic acid	○	○	-	-	-
Glycine	○	○	○	-	↑↑
Serine	○	○	-	↑↑	-
Threonine	○	○	-	↑↑	-
Isobutyrylglycine	○	○	-	-	-
Mesaconic acid	○	○	-	-	-
3-Methylglutaric acid	○	○	-	-	-
3-Aminopropanoic acid	○	○	-	-	-
3-Aminoisobutyric acid	○	○	-	-	-
Adipic acid	○	○	-	↑↑	-
3-Aminoglutaric acid	○	○	○	-	↑↑
Aspartic acid	○	○	○	-	↑↑
4-Hydroxyproline	○	○	-	↑↑	-
5-Oxoproline	○	○	○	-	↑↑
4-Aminobutyric acid	○	○	○	↓↓	↓↓
Creatinine	○	○	-	↑↑	-
3-Hydroxyglutaric acid	○	○	○	-	-
3-Phenyllactic acid	○	○	-	-	-
Ornithine	○	○	-	↑	-
Phenylalanine	○	○	-	↑↑	-
Lauric acid	○	○	-	-	-

	PCA	PLS	PLS-DA	1mM	3mM
Dihydroxyacetone phosphate	○	○	-	-	↑↑
Glycerol 3-phosphate	○	○	-	-	↑↑
Hypoxanthine	○	○	-	-	↑↑
Myristic acid	○	○	○	-	-
Hippuric acid	○	○	○	↑	↑↑
Tagatose	○	○	-	-	↓↓
Allose	○	○	-	-	-
Mannose	○	○	-	-	-
4-Hydroxyphenyllactic acid	○	○	○	-	↑↑
Galactose	○	○	-	-	-
Glucose	○	○	-	-	-
Allose	○	○	-	-	-
Mannose	○	○	-	-	-
1-Hexadecanol	○	○	-	-	-
Xanthine	○	○	○	-	↑↑
Palmitic acid	○	○	-	-	-
Octopamine	○	○	-	↓	-
Dodecanedioic acid	○	○	-	-	-
Inositol	○	○	-	-	↑
Margaric acid	○	○	-	-	-
Kynurenine	○	○	-	-	↑
Oleic acid	○	○	-	-	↑
2,3-Bisphosphoglyceric acid	○	○	○	↑	↑↑
Elaidic acid	○	○	-	-	↑
Stearic acid	○	○	-	-	↑↑
Tryptophan	○	○	○	↑	↑↑
Monostearin	○	○	-	-	↑↑
Guanosine	○	○	-	-	↑↑

(2) パスウェイ解析による細胞毒性機序の解明

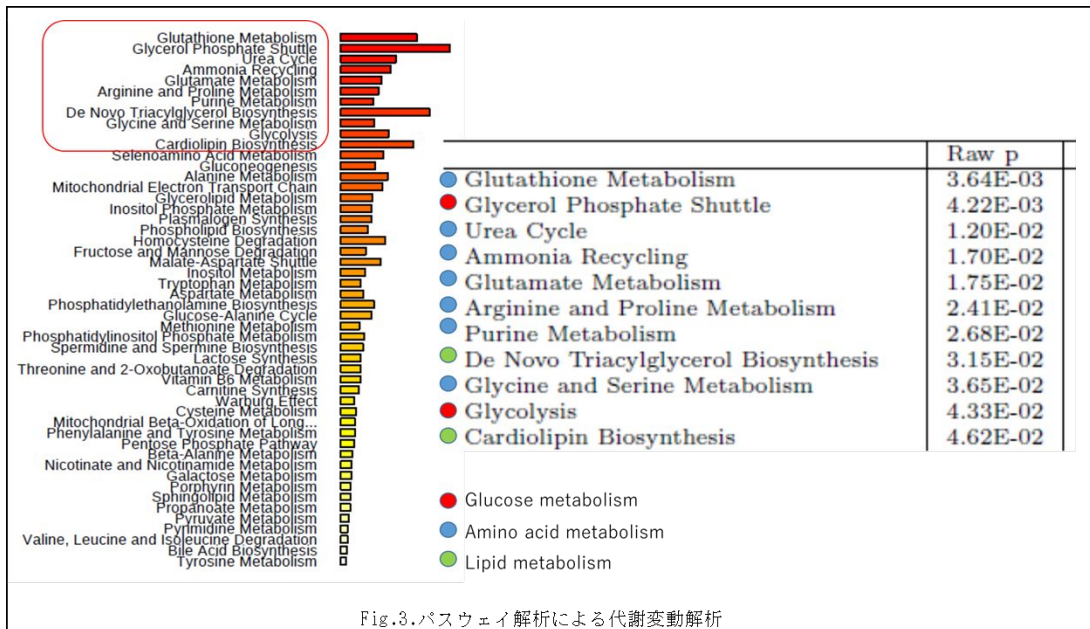


Fig.3.パスウェイ解析による代謝変動解析

パスウェイ解析には Web 上のプログラムである Metaboanalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>) を使用した。

Metaboanalyst はカナダの研究グループにより運営されている Web プログラムで、メタボロームデータの解析に特化したパスウェイ解析を行うことが可能となっている。多変量解析、多重比較検定により優位な変動が見られた代謝物を本プログラムにより解析したところ、解糖系などの糖代謝、グルタチオン代謝系などのアミノ酸代謝経路、およびトリアシルグリセロールの生合成系などの脂質代謝経路に相当するパスウェイに変動代謝物がより強く関与することが明らかとなった (Fig.3)。実際多重比較検定の結果では、エネルギー代謝系である TCA サイクルの内、クエン酸、イソクエン酸、ケトグルタル酸、フマル酸のノルエフェドリン刺激に依存した増加が見られ、特にクエン酸の増加は TCA サイクルを抑制することが知られていることから細胞のエネルギーである ATP 産生が抑制している可能性が考えられる。脂質代謝に関しては、ジヒドロキシアセトンリン酸やグリセロール 3 リン酸の増加が見られ、これらはトリアシルグリセロールやカルジオリピン合成に関わる代謝物であり、膜脂質などの脂質代謝系へのノルエフェドリンの影響が示唆された。またアミノ酸代謝においては、グリシンやグルタミン酸の増加が誘導されており、これらはグルタミルシステインを介してグルタチオン合成に関わるアミノ酸であることからグルタチオンの生合成へのノルエフェドリンの関与が考えられた。グルタチオンは活性酸素発生時における抗酸化作用に働く分子であり、活性酸素の発生によりグルタチオン生成が誘導されている可能性も考えられる。以前の研究からノルエ

フェドリン刺激により、神経細胞においてATPの減少が起こること、コレステロールなどの脂質合成系に異常をきたすこと、空胞化形成により生体膜形成に変化が起きていること、活性酸素が発生することが明らかとなっているが( Funakoshi et al Brain Research 2013、Funakoshi et al JBC 2016 ) これらの結果はその内容と一致しており、本研究で構築したメタボローム解析法が薬毒物による毒性機序を検討する上で、非常に有用であることが示唆された。

また興味深いことに、覚せい剤原料であるノルエフェドリンとその構造類似体である覚せい剤メタンフェタミンを比較検討したところ、多変量解析で無刺激群、ノルエフェドリン刺激群、メタンフェタミン刺激群で明確な分類を行え、またノルエフェドリンとメタンフェタミンで誘導される代謝変動には明確な差が認められた。このことから作用が類似しかつ構造類似物においても代謝物変動の違いを検出でき、危険ドラッグ成分である合成カンナビノイドのような作用類似かつ構造類似物においてもそのわずかな差を代謝変動により検討し、その毒性を代謝変動の差から推測出来る可能性が示唆された。

以上の結果から、薬毒物による毒性機序の解明において、本研究で構築したターゲットメタボロームの手法は非常に有用であり、今後危険ドラッグ成分などのような構造類似かつ毒性未知の薬物による細胞毒性機序の解明に役立つと考えられる。今後は細胞毒性にとどまらず、一個体における組織、血液、尿などのメタボローム解析の系を構築しより詳細な毒性機序研究法の確立が求められる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Takeshi Funakoshi, Toshihiko Aki, Masateru Tajiri, Kana Unuma, Koichi Uemura, Necroptosis-like Neuronal Cell Death Caused by Cellular Cholesterol Accumulation., J. Biol. Chem., 査読有り, 291(41), 2016, 25050-25065  
DOI: 10.1074/jbc.M116.727404

〔学会発表〕(計 5 件)

古川 真子, 秋 利彦, 船越 丈司, 鶴沼 香奈, 平山 菜穂, 渡邊 嶺, 上村 公一, 神経細胞におけるコカイン長期曝露の影響について、第 87 回日本法医学会学術関東地方集会、2018 年

高橋 蓮穂, 秋 利彦, 船越 丈司, 鶴沼 香奈, 則竹 香菜子, 永井 みどり, 佐野 智美, 上村 公一, クロルプロマジン曝露におけるラットグリア細胞由来 C6 細胞の細胞死について、第 87 回日本法医学会学術関東地方集会、2018 年

船越丈司, 秋利彦, 鶴沼香奈, 則竹香菜子, 上村公一、覚せい剤原料ノルエフェドリン曝露による神経細胞内コレステロール異常蓄積とネクロトーシス誘導の解析、第 101 次日本法医学会全国集会、2017 年

佐野智美、船越丈司、則竹香菜子、上村公一、メタボローム解析を用いた薬物毒性評価法の構築、第 86 回日本法医学会学術関東地方集会、2017 年

船越丈司, 秋利彦, 鶴沼香奈, 則竹香菜子, 上村公一、ノルエフェドリンによる神経細胞内コレステロール蓄積とネクロトーシス誘導の解析、ConBio2017、2017 年

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.tmd.ac.jp/med/legm/houi\\_top.html](http://www.tmd.ac.jp/med/legm/houi_top.html)

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：上村 公一

ローマ字氏名：(UEMURA, koichi)

所属研究機関名：東京医科歯科大学

部局名：大学院医歯学総合研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：30244586

研究分担者氏名：秋 利彦

ローマ字氏名：(AKI, toshihiko)

所属研究機関名：東京医科歯科大学

部局名：大学院医歯学総合研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁): 60304474

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。