

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19670

研究課題名(和文)化学物質による細胞死と分子制御型ネクローシス

研究課題名(英文)Cell death by chemicals and possible involvement of regulated necrosis

研究代表者

秋 利彦(Aki, Toshihiko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：60304474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：化学物質による細胞死におけるアポトーシス以外の細胞死として、近年注目を浴びている分子制御型ネクローシスの関与を、様々な化学物質を用いて検討した。工業に汎用されるブタノールによる心筋由来細胞株の細胞死は、ブタノールの曝露濃度と曝露時間が大きくなるにつれてアポトーシスから炎症促進性のパイロトーシスと呼ばれるネクローシスに変化することを示した。これは、炎症応答を含まない「キレイな」細胞死であるアポトーシスから、ブタノールの濃度が高くなると、炎症応答を惹起して周辺組織にも影響を与える「ネクローシス」へと細胞死の型が変化し、ブタノールの毒性が増す要因の一つである事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学物質による人体への悪影響は工業化された現代社会の大きな問題である。細胞死は毒性の究極の形態であり、アポトーシスが細胞死の形態として広く知られておりその作用機序の研究も進んでいる。しかしながらもう一つの細胞死の形態であるネクローシスの作用機序の解析はアポトーシスと比べ大きく遅れている。化学物質による毒性の一例としてブタノールによる心筋細胞死を調べることで、濃度依存的な毒性の上昇の背後にアポトーシスからネクローシスへの細胞死モードの変化があることを突き止めた。ネクローシスはアポトーシスより重度の障害をもたらす細胞死であり、毒性の重度化の背景にある機構の一端を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：To evaluate possible involvement of regulated form of necrosis in chemical-induced cell death, we examined effects of various chemicals on a panel of cells such as cardiomyocytes, macrophages, and hepatoma cells. We found that 1-butanol, which is frequently used for industrial purposes, induces apoptosis when used around at 100 mM whilst induces necrosis such as pyroptosis when used at concentrations higher than 150 mM. Since apoptosis are not associated with immune responses whilst necrosis is associated with immune reactions, this concentration-dependent switching from apoptosis to necrosis should be involved in the worsening of butanol cytotoxicity.

研究分野：法医学

キーワード：ネクローシス 化学物質 パイロトーシス アポトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬物・毒物などの化学物質による細胞死はアポトーシスとネクローシスに大別される。アポトーシスはその分子機序の研究の歴史が長く、かなりの部分が解明されていると言える。一方でネクローシスは、アポトーシス以外の細胞死として分類されることが多く、経路は存在しないとも考えられていた。近年、形態的にネクローシスに分類されるが、アポトーシスにおけるカパーゼ経路のような、明確な遂行機構を持つネクローシスが多数見出された。最初に見つかったネクローシス(necroptosis)に加え、フェロトーシス(ferroptosis)・メソーシス(methuosis)、パイロトーシス(pyroptosis)などが続々と報告され、化学物質による細胞死経路についても、これらの経路の関与を調べることで定説を見直す必要に迫られている。また、細胞死の様式を理解する事は、組織変性・臓器障害ひいては個体の死を理解する上で重要である。細胞死には様々な形態があるにもかかわらず、主にアポトーシスとオートファジー様細胞死についての解析・報告が主流であり、近年急速に進歩を遂げている分子制御型ネクローシスの化学物質による細胞死への関与を検討した研究例は極めて少ない。また、重要な事実として、これら分子制御型ネクローシスは皆、低分子化合物により引き起こされる新たな形式の細胞死として発見され、当初は試験管内でのみ起こすことができる特殊な細胞死と考えられたが、後に虚血などの病態にも関与している事が明らかになっていることが挙げられる。即ち、試験管内で起こる細胞死は生体内でも起こり得ると言える。従って、様々な化学物質による細胞毒性におけるこれらの細胞死の関与を調べることは、生体に対する毒性機序研究に新側面をもたらすことも期待された。

2. 研究の目的

本研究計画では各種薬物・毒物を用いて

化学物質による細胞死における分子制御型ネクローシスの関与の検討

新規分子制御型ネクローシス経路の検索

を行い、新規毒性機序の発見を目指した。特に の、アポトーシスと従来言われていた化学物質による細胞死に分子制御型ネクローシスが関与していることはないのか？を主に検証することを目的とした。具体的には、既にアポトーシスと知られている実験系、即ちブタノールによる心筋細胞死、アセトアミノフェンによる肝細胞死、ヒ素による神経細胞死、硫化水素による肺上皮細胞死などにパイロトーシス、ネクローシス、フェロトーシス、メソーシスなどが関与している可能性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

細胞材料として H9c2 ラット心筋由来細胞、A549 ヒト肺胞上皮由来細胞、Neuro2A ヒト神経芽細胞、Huh7 ヒト肝がん由来細胞などを用いた。H9c2 にはブタノールを 100、150、200mM の終濃度で 1-6 時間添加し、A549 細胞には緩徐型硫化水素発生剤である GYY4137 もしくは瞬時放出型硫化水素発生剤である硫化水素ナトリウムを 1-6mM で数時間または数日間、Huh7 細胞にはアセトアミノフェンもしくは三酸化二ヒ素を数 mM で数日間、Neuro2A 細胞には三酸化二ヒ素を数十～数百マイクロ M にて数時間暴露した。細胞障害を MTT 法、細胞死を LDH 放出により評価した。細胞死の様式がアポトーシスであるかネクローシスであるか、またネクローシスであった場合はパイロトーシス、ネクローシス、フェロトーシス、メソーシスのいずれであるのか、な

どはそれぞれのマーカータンパク質・マーカー遺伝子の状態で評価した。具体的には、アポトーシスの評価にはカスパーゼ3、パイロトーシスの評価にはガスダーミンDとガスダーミンEの切断活性化を、ネクロトーシスの評価にはRIP1/3のリン酸化による活性化をウエスタンブロットで、フェロトーシスの評価に過酸化脂質の除去酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼ4とグルタチオンの前駆体であるシステインを細胞内へ運び込むトランスポーターであるSLC7A11の発現をリアルタイムPCRで、で評価した。さらにこれらの細胞死の阻害剤の効果も検討した。具体的にはネクロトーシスの阻害剤であるnec-1s、フェロトーシスの阻害剤であるfer-1およびビタミンDとデフェロキサミンなどの効果も検討した。

4. 研究成果

工業に汎用されるブタノールによる心筋由来細胞株H9c2の細胞死は、ブタノールの曝露濃度と曝露時間が大きくなるにつれてアポトーシスから炎症促進性のパイロトーシスと呼ばれるネクロトーシスに変化することを示した。これは、炎症応答を含まない「キレイな」細胞死であるアポトーシスから、ブタノールの濃度が高くなると、炎症応答を惹起して周辺組織にも影響を与える「ネクロトーシス」へと細胞死の型が変化し、ブタノールの毒性が増す要因の一つである事が示唆された。GYY4137により長期間一定レベルの硫化水素に暴露した場合、A549細胞はアポトーシスを起こすことがわかった。注目すべきことに、この際にアポトーシスに至らなかった細胞は上皮間葉転換を起こしており、これによってアポトーシス抵抗性を獲得していることが想像された。また、三酸化二ヒ素をNuro2A神経芽細胞に暴露した場合も、濃度依存的なアポトーシスからパイロトーシスへの変換が起きており、この変換はある程度不変的な現象であると想像された。以上から、研究計画当初の予想通り、化学物質による細胞死は従来言われていたように単純なものではなく、アポトーシス以外の細胞死実行様式が起こり得るものであり、それが起こるか否かは濃度や曝露時間に依存することが想像された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Funakoshi T, Furukawa M, Aki T, Uemura K	4. 巻 75
2. 論文標題 Repeated exposure of cocaine alters mitochondrial dynamics in mouse neuroblastoma Neuro2a	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurotoxicology	6. 最初と最後の頁 70-77
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuro.2019.09.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Unuma K, Aki T, Yoshikawa A, Uemura K	4. 巻 32(4)
2. 論文標題 Increased circulating Prx4 in sepsis model rats involves secretion from hepatocytes and is mitigated by GYY4137	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Toxicologic Pathology	6. 最初と最後の頁 305-310
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1293/tox.2019-0030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Murata Tatsuhiko, Noritake Kanako, Aki Toshihiko, Uemura Koichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Possible roles of AMPK and macropinocytosis in the defense responses against 9-THC toxicity on HL-1 cardiomyocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicology Reports	6. 最初と最後の頁 980 ~ 987
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.toxrep.2021.04.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Noritake Kanako, Aki Toshihiko, Isa Shintaro, Uemura Koichi	4. 巻 6
2. 論文標題 Pyroptotic cell death by exposure to 1-butanol in H9c2 cardiomyoblastoma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e05503 ~ e05503
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2020.e05503	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Wen Shuheng, Aki Toshihiko, Unuma Kana, Uemura Koichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Chemically Induced Models of Parkinson's Disease: History and Perspectives for the Involvement of Ferroptosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 581191 ~ 581191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2020.581191	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 則竹香菜子, 秋利彦, 上村公一
2. 発表標題 エタノール以外のアルコールによる細胞毒性研究
3. 学会等名 2019年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会、札幌
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 船越丈司、古川真子、秋利彦、上村公一
2. 発表標題 コカイン長期曝露による神経細胞ミトコンドリアダイナミクスへの影響
3. 学会等名 第42 回日本分子生物学会年会、福岡
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naho Hirayama, Toshihiko Aki, Koichi Uemura
2. 発表標題 Paraquat-induced cell death pathway, mitochondrial stress and autophagy in human neuronal cell line SH-SY5Y.
3. 学会等名 IALM (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Rina Kaseda, Toshihiko Aki, Koichi Uemura
2. 発表標題 SH-SY5Y human neuroblastoma cell death by methamphetamine involves downregulation of cell cycle regulators.
3. 学会等名 IALM (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関