

平成22年 4月28日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790143
 研究課題名 (和文) アクロレイン及びその産生酵素測定による脳梗塞診断マーカーの開発研究
 研究課題名 (英文) Developmental research for measurement of acrolein and polyamine oxidase as markers for diagnosis of brain infarction
 研究代表者
 富取 秀行 (TOMITORI HIDEYUKI)
 千葉科学大学・薬学部・講師
 研究者番号：30337381

研究成果の概要 (和文)：ポリアミンは細胞増殖促進作用を持つ因子であるが、酸化分解されると毒性の強いアクロレインを産生する。血中アクロレイン量及びポリアミン酸化酵素活性の測定法及びアクロレインの毒性作用機構について検討を行い、以下に述べる新知見を得た。

研究成果の概要 (英文)：Polyamines play important roles in cell proliferation and differentiation. However, acrolein that is highly toxic compound is produced by polyamine oxidation. In this study, new methods for measuring acrolein and polyamine oxidases, and molecular mechanism of acrolein toxicity on cell growth have been studied. New findings in this study have been described below.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：生理活性物質、脳・神経、バイオマーカー、臨床化学、薬物治療・トキシコロジー

1. 研究開始当初の背景

脳梗塞・脳出血に代表される脳血管障害は悪性新生物、心疾患に次ぐ死亡率第3位の病因である。その患者数は日本全国で136万5000人(厚生労働省「平成18年患者調査の概要」より)、またWHO発表の統計によると、全世界人口のおよそ4600万人が脳血管障害に罹患していると記されている。脳梗塞は極めて予後の悪い疾病であり、梗塞巣の

規模・場所によっては意識障害・昏睡・四肢の麻痺・失語症等、その後の社会生活に支障を来すケースが少なくない。

現在、脳梗塞の診断にはCT (computed tomography) もしくはMRI (magnetic resonance imaging) での画像診断が一般的に行われており、機器性能や診断技術の向上によりその精度・感度はここ数年で著しく向上している。しかし、CT もしくはMRI での画像診断には

適用できない患者やコストパフォーマンス等の問題があることから、簡便に、精度良く、低コストで脳梗塞を診断できる手段が必要である。

申請者らのグループは、アクロレインが過酸化水素よりも強力な毒性物質であること、この毒性がポリアミノキナーゼ(SMOおよびAcPAO)の阻害剤で解除されることを証明した。また、脳梗塞患者のSMO, AcPAO活性及びアクロレイン量を測定し、梗塞巣の大きさと重症度との相関性を見出した。さらに脳梗塞発症後CTにより梗塞巣が認められるより早く、血中AcPAOが速やかに上昇することを明らかにした。これらの成果を基に、SMO, AcPAOおよびアクロレイン量を指標とした脳血管障害の診断法に関する特許を出願した。さらに、健常者群よりSMO, AcPAO又はアクロレイン値の高い被験者を選別し、MRIによる確定診断により感度82%の確率で無症候性脳梗塞を発見することに成功した。さらに炎症性マーカーであるインターロイキン6およびC反応性蛋白質を組合せて測定することで、感度を90%に上昇させることができた。

2. 研究の目的

tPA (tissue plasminogen activator) は脳梗塞の初期治療に有効であり、発症後3時間以内の適用が可能である。従って、脳梗塞を迅速に診断できる生化学マーカーは、発症及び治療後の病状経過を知る上で非常に役立つと考えられる。そこで、発症後速やかに上昇する血中AcPAOを迅速に測定する方法の確立を目指す。また、現在は酵素活性及びアクロレイン含有量を測定するために被験者の血液を用いているが、より非侵襲的な検査法が望ましい。そこで本研究では、以下の点について重点的に研究を遂行する。

(1) 尿中に含まれるアクロレイン付加化合物を同定し、それに対する抗体を作製及びELISAキットの開発を行う。またAcPAO活性測定法の短時間高感度化をはかり、臨床の現場で正確かつ迅速に測定できる方法を開発する。

(2) ポリアミンの酸化分解により産生するアクロレインは、過酸化水素より数十倍強い細胞毒性を持つにもかかわらず、その細胞毒性作用機序に関しては不明な点が多い。本研究ではアクロレイン耐性細胞の樹立とその生化学的性質の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 生体内に多く存在し、アクロレインと反応しやすく、かつ尿中に排泄されうる化合物を試験管内でアクロレインと反応させる。アクロレインはアミノ基やチオール基と良好に反応することが明らかとなっていること

から、ポリアミン(プトレスシン、スペルミジン、スペルミン)、還元型グルタチオン、システイン等をアクロレインと反応させた後、HPLCで分離・検出を試み、主要な付加化合物をNMR (nuclear magnetic resonance)、MS (mass spectrometry)等で同定する。AcPAOの現行の測定法は、37℃で24~48時間反応させ、基質の分解産物であるスペルミジンをHPLC (high performance liquid chromatography)で定量する方法をとっている。短時間に高感度で測定できる方法に改良するための検討を試みる。

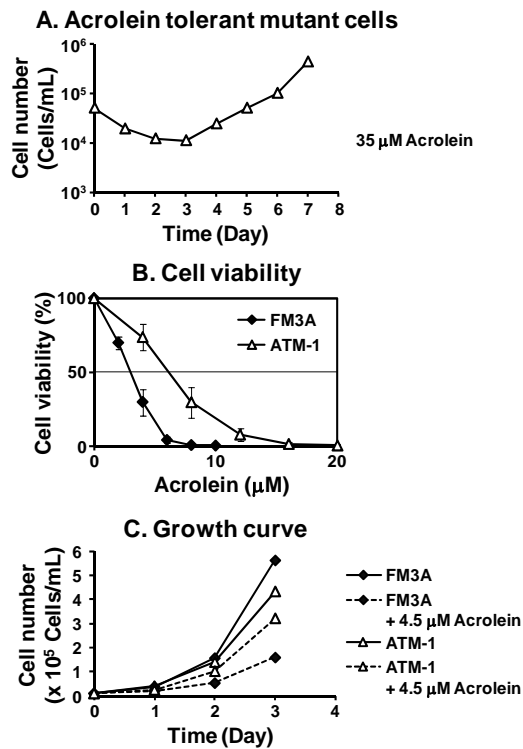
(2) 変異導入剤で変異を入れたFM3A細胞を高濃度のアクロレイン添加培地で数ヶ月間継代培養する。アクロレインの細胞毒性に耐性を獲得した細胞の細胞内グルタチオン量、ポリアミン量、及びこれらの化合物の生合成・分解に関与する酵素の活性・発現量について解析を行った。

4. 研究成果

(1) アクロレインは生体内でcarboxyethylmercapturic acid (CEMA)と3-hydroxypropylmercapturic acid (HPMA)という2種のメルカプツール酸に代謝され、尿中に排泄される。これら2種のメルカプツール酸に対する抗体の作製を試みた。HPMAもしくはCEMAを、キャリア蛋白質であるKLH, BSAまたはウサギ血清アルブミン(RSA)に結合し、ウサギに免疫した。追加免疫は2週に一度行い、また追加免疫の1週間後に採血を行い、抗体価を確認した。その結果、HPMA-キャリア蛋白質に対する抗体は追加免疫を行う度に増加が見られた。これらの抗体を含む抗血清を用いて、ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)の構築を試みた。しかし、キャリア蛋白質に結合したHPMAを認識する抗体は得られたものの、フリーのHPMAを認識しなかった。現在、フリーのHPMAを認識するようにシステムを構築中である。

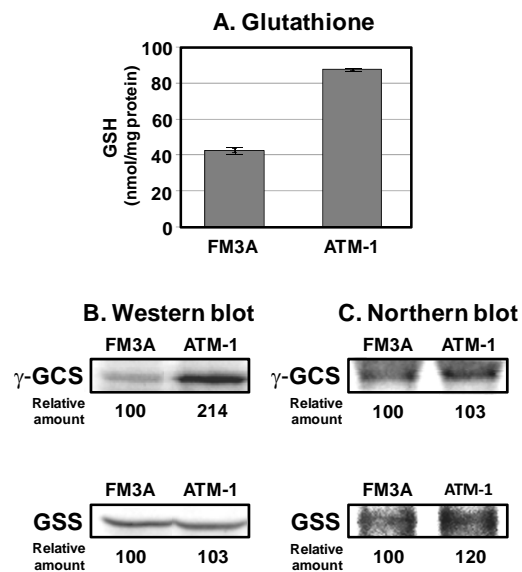
2. アクロレインは過酸化水素に比べ、極めて細胞毒性が強い化合物である。しかし、その毒性作用機構は不明な点が多いため、分子レベルで毒性作用機構の解明を試みた。マウス乳がん細胞FM3Aに変異を導入し、アクロレイン添加培地で数ヶ月培養することで、アクロレイン耐性細胞ATM-1を樹立した(図1)。ATM-1はFM3Aに比べ、細胞内のグルタチオン(GSH)含量及びGSH合成の律速酵素であるγ-グルタミルシステインシナーゼ(γ-GCS)の発現量を2倍にすることで、アクロレイン耐性を獲得したことを明らかにした(図2)。またγ-GCSのmRNA及びゲノム配列を確認したところ、FM3Aのγ-GCS遺伝子が元々ヘテロで存在していることが明らかとなり、ATM-1はその復帰変異であるこ

(図 1)



とを示した。また細胞内のポリアミン含量を測定したところ、ATM-1ではFM3Aに比べ、スペルミジンが減少し、スペルミンが増加していた。ポリアミンの分解によりアクロレインが産生されることから、ポリアミン代謝酵素であるSMO、AcPAO及びSSATの活性を測定したが、変化は見られなかった。一方、ポリアミン合成酵素であるオルニチン脱炭酸酵素(ODC)及びS-アデノシルメチオン脱炭酸酵素(SAMDC)の活性を測定したところ、ATM-1ではODC活性が60%に低下していることが見出された。ATM-1ではグルタチオン合成がFM3Aの2倍に上昇していること、またグルタチオン合成にはシステインの供給源としてS-アデノシルメチオンが必要であること、そしてS-アデノシルメチオンはポリアミン生合成にも必要であることから、ATM-1ではグルタチオン合成にS-アデノシルメチオンが優先的に使用され、その結果、ポリアミン合成が低下し、低下したポリアミン量を補うためスペルミンが増加した、と推測される。

(図 2)



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 5 件)

- (1) Yoshida, M., Higashi, K., Jin, L., Machi, Y., Suzuki, T., Masuda, A., Dohmae, N., Suganami, A., Tamura, Y., Nishimura, K., Toida, T., Tomitori, H., Kashiwagi, K. and Igarashi, K. Identification of acrolein-conjugated protein in plasma of patients with brain infarction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2010) **391**, 1234-1239
- (2) Terui, Y., Higashi, K., Tabei, Y., Tomitori, H., Yamamoto, K., Ishihama, A., Igarashi, K. and Kashiwagi, K. Enhancement of the synthesis of RpoE and StpA by polyamines at the level of translation in *Escherichia coli* under heat shock conditions. *J. Bacteriol.* (2009) **191**, 5348-5357
- (3) Yoshida, M., Tomitori, H., Machi, Y., Katagiri, D., Ueda, S., Horiguchi, K., Kobayashi, E., Saeki, N., Nishimura, K., Ishii, I., Kashiwagi, K. and Igarashi, K. Acrolein, IL-6 and CRP as markers of silent brain infarction. *Atherosclerosis* (2009) **203**, 557-562
- (4) Yoshida, M., Tomitori, H., Machi, Y., Hagihara, M., Higashi, K., Goda, H., Ohya, T., Niitsu, M., Kashiwagi, K. and Igarashi, K. Acrolein toxicity: Comparison with reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2009) **378**, 313-318
- (5) Han, X., Tomitori, H., Mizuno, S., Higashi,

K., Füll, C., Fukiwake, T., Terui, Y., Leewanich, P., Nishimura, K., Toida, T., Williams, K., Kashiwagi, K. and Igarashi, K. Binding of spermine and ifenprodil to a purified, soluble regulatory domain of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Neurochem.* (2008) **107**, 1566-1577

[学会発表] (計9件)

- (1) 荒野直紀、アダマンタンダイマーの合成と細胞増殖への影響、日本薬学会 第130年会、2010年3月29日、岡山コンベンションセンター、岡山
- (2) 秋山真律子、ポリアミンにより合成促進される ribosome modulation factor の大腸菌生存率維持に果たす役割、日本薬学会 第130年会、2010年3月28日、岡山コンベンションセンター、岡山
- (3) 中村瑞穂、アクロレイン耐性細胞の樹立とそのアクロレイン毒性除去機構 第82回日本生化学会大会、2009年10月23日、神戸ポートアイランド、兵庫
- (4) 富取秀行、ポリアミン酸化により産生されるアクロレインの毒性：活性酸素種との比較 第82回日本生化学会大会、2009年10月23日、神戸ポートアイランド、兵庫
- (5) 富取秀行、 Isolation and characterization of an acrolein tolerant mutant of FM3A cells. 2009 GORDON RESEARCH CONFERENCE ON POLYAMINES, 2009年6月24日、Waterville Valley, New Hampshire, USA
- (6) Kashiwagi, K., Terui, Y., Higashi, K., Okudaira, H., Ochiai, E., Tomitori, H., Nishimura, K., Yamamoto, K., Ishihama, A., Igarashi, K. Polyamine effect on protein synthesis and its mechanism. Gordon Research Conference on Polyamines, 2009年6月22日、Waterville Valley, NH, USA
- (7) 韓 霞、スペルミン及びイフェンプロジルのNMDA受容体調節領域への結合能. 日本薬学会第129年会、2009年3月26日、国立京都国際会館
- (8) 富取秀行、アクロレイン耐性細胞の樹立とその性質の検討、日本ポリアミン研究会 第23回研究発表会、2009年1月23日、藍野大学、大阪
- (9) 富取秀行、PREDICTION OF SILENT BRAIN INFARCTION BY ACROLEIN, POLYAMINE OXIDASE, IL-6 AND CRP Polyamines: Forty years of Mammalian Ornithine Decarboxylase 2008年6月28日、Kuopio, Finland

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富取 秀行 (TOMITORI HIDEYUKI)

千葉科学大学・薬学部・講師

研究者番号：30337381