

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590629

研究課題名（和文） 薬毒物による細胞死のマーカータンパク質のプロテオミクスによる検索

研究課題名（英文） Proteomic screening of possible marker proteins for drug-induced cellular injuries

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・講師

研究者番号：60304474

研究成果の概要（和文）：ヒト神経芽腫由来細胞における覚せい剤メタンフェタミンの細胞障害機構、ラット心筋由来細胞におけるコカインによる障害機構、細胞内毒素(LPS)による敗血症モデル実験などにおいて、それぞれ細胞外成分のマクロピノサイトーシスによる流入、ミオシンの発現上昇、ミトコンドリアタンパク質の細胞内含量の顕著な低下と細胞外への能動的な放出、などをプロテオミクスにより発見した。これは障害を受けたミトコンドリアのオートファジーによる除去を反映していることがわかり、プロテオミクスの有用性を実証することができた。

研究成果の概要（英文）：Using human neuroblastoma cells, rat cardiomyocyte-derived cells, and rat liver as well as heart, molecular mechanisms of cytotoxicity of several toxicants including methamphetamine, cocaine, and LPS were examined. Major-responsible proteins were determined by the method of proteomics. Involvement of macropinocytosis, myosin gene expression, and active extrusion of mitochondrial proteins were suggested during methamphetamine, cocaine, and LPS exposure, respectively. These results have proved usefulness of the method of proteomics in the field of forensic toxicology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：法医学

1. 研究開始当初の背景

覚せい剤・アルコール等の薬毒物の乱用は法医学的にも、これら薬物による不審死が今迄以上に実務上の問題となって行くことが予想される。近年DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現変動の網羅的解析が一般化しつつあり、様々な刺激に対して応答する新たな遺伝子群が同定されている。しかし遺伝子発

現の変動は一般的に数十分から数時間のオーダーで起こることが多く、覚せい剤やアルコールによる迅速な細胞変性を解析するには適していない。タンパク質レベルでの変動を分析して細胞変性・細胞死を誘導する分子群を同定するためには、タンパク質を直接解析するプロテオミクスの手法を用いることが必須である。

2. 研究の目的

プロテオミクスの手法を用いた覚せい剤・アルコール等の薬物による細胞死誘導機構の解析を行う。

3. 研究の方法

ヒト神経芽腫由来細胞、ラット心・肝などを用い、覚せい剤・アルコール・コカイン・硫化水素・ヒ素・細胞内毒素などの法医実務においても重要な薬毒物について、その細胞障害機構を解明するために、電気泳動において著名な変動を認めるタンパク質を質量分析計を用いて同定した。更に同定されたタンパク質の発現ベクターなどを用いて、細胞障害への関与を詳細に検討した。

4. 研究成果

ヒト神経芽腫由来細胞に覚せい剤メタンフェタミンを暴露したところ、分子量約 65kDa のタンパク質の顕著な増加を認めた。質量分析計により解析したところ細胞外の培地の血清成分であるアルブミンの流入であることがわかった。このことから、覚せい剤暴露により細胞外液の取り込み経路の一つであるマクロピノサイトーシスが異常に亢進していることが判明した。更に、塩基性薬物である覚せい剤がリソソームに蓄積することでリソソームの機能障害が起こり、それに伴うオートファジーの不全など様々な障害が引き起こされることを明らかにした。コカインをラット心筋由来細胞に暴露したところ分子量約 230kDa のタンパク質の顕著な誘導を認めた。これはミオシン重鎖の一つ Myosin-9 であることが判明し、心不全時のミオシン重鎖の発現誘導と類似の現象と考えられた。また、細胞内毒素 (LPS) による敗血症モデル実験において、ミトコンドリア局在タンパク質 CPS-1 の顕著な低下をプロテオミクスにより発見した。これは障害を受けたミトコンドリアのオートファジーによる除去を反映していることがわかった。以上のいずれの実験においても、全タンパク質を電気泳動することで薬毒物刺激により顕著な発現変動を示すタンパク質が認めることが出来、そのタンパク質を質量分析計により同定することで障害機構を解明することが出来、プロテオミクスの有用性を実証することができた。

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 12 件)

1. Hideyuki Maeda, Hisashi Nagai, Genzou

Takemura, Masaaki Komatsu, Sayoko

Ogura, Kaori Shintani-Ishida, Toshihiko

Aki, Mikiyasu Shirai, Ichiro Kuwahira,

Ken-ichi Yoshida (2013)

Intermittent-hypoxia induced autophagy

attenuates contractile dysfunction and

myocardial injury in rat heart. *Biochimica*

et Biophysica Acta, 査読有、1832,

1159-1166 doi:

10.1016/j.bbadis.2013.02.014.

2. Marie Bessho, Toshihiko Aki, Takeshi

Funakoshi, Kana Unuma, Kanako Noritake,

Chizuru Kato, and Koichi Uemura (2013)

Rho-kinase inhibitor Y-27632 attenuates

arsenic trioxide toxicity on H9c2

cardiomyoblastoma cells. *Cardiovasc.*

Toxicol. 査読有、印刷中

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2353>

2581

3. Kana Unuma, Toshihiko Aki, Seiji

Matsuda, Takeshi Funakoshi, Ken-ichi

Yoshida, Koichi Uemura (2013) Cobalt

protoporphyrin accelerates TFEB

activation and lysosome reformation during

LPS-induced septic insults in rat heart.

PLOS ONE 査読有、8, e59526 doi:

10.1371/journal.pone.0056526.

4. Takeshi Funakoshi, Toshihiko Aki, Kana

Unuma, Koichi Uemura (2013) Lysosome

vacuolation disrupts the completion of

autophagy during norephedrine exposure in

SH-SY5Y human neuroblastoma cells.

Brain Res. 査読有、1490, 9-22 doi:

10.1016/j.brainres.2012.10.056.

5. Kana Unuma, Toshihiko Aki, Seiji

Matsuda, Takeshi Funakoshi, Ken-ichi

Yoshida, Koichi Uemura (2013)

Elimination and active extrusion of liver

- mitochondrial proteins during LPS administration in rat. *Hepatology Res.* 査読有、43, 526-534 doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.01084.x.
6. Kana Unuma, Toshihiko Aki, Seiji Matsuda, Takeshi Funakoshi, Ken-ichi Yoshida, Koichi Uemura (2013) Inducer of heme oxygenase-1 cobalt protoporphyrin accelerates autophagy and suppresses oxidative damages during LPS treatment in rat liver. *Hepatology Res.* 査読有、43, 91-96 doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.01049.x.
 7. Akina Nara, Toshihiko Aki, Takeshi Funakoshi, Kana Unuma, Koichi Uemura (2012) Hyperstimulation of macropinocytosis leads to lysosomal dysfunction and cell death during exposure to methamphetamine in differentiated SH-SY5Y cells. *Brain Res.* 査読有、1466, 1-14 doi: 10.1016/j.brainres.2012.05.017.
 8. Kanako Noritake, Toshihiko Aki, Takeshi Funakoshi, Kana Unuma, Akina Nara, Chizuru Kato, and Koichi Uemura (2012) Critical roles of Rho-associated kinase in membrane blebbing and mitochondrial apoptosis caused by 1-butanol. *Toxicol. in Vitro* 査読有、26, 849-855 doi: 10.1016/j.tiv.2012.04.027.
 9. Toshihiko Aki, Akina Nara, and Koichi Uemura (2012) Cytoplasmic vacuolization during exposure to drugs and other substances (Review). *Cell Biol. and Toxicol.* 査読有、28, 125-131 doi: 10.1007/s10565-012-9212-3.
 10. Takeshi Funakoshi, Toshihiko Aki, Haruka Nakayama, Yumi Watanuki, Satoko Imori, and Koichi Uemura (2011) Reactive oxygen species-independent rapid initiation of mitochondrial apoptotic pathway by chelerythrine. *Toxicol. in Vitro* 査読有、25, 1581-1587 doi: 10.1016/j.tiv.2011.05.028.
 11. Akina Nara, Toshihiko Aki, Takeshi Funakoshi, Koichi Uemura (2010) Methamphetamine induces macropinocytosis in differentiated SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain Res.* 査読有、1352, 1-10 doi: 10.1016/j.brainres.2010.07.043.
 12. Toshihiko Aki, Akina Nara, Takeshi Funakoshi, Koichi Uemura (2010) Bifurcate effects of glucose on caspase-independent cell death during hypoxia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有、396, 614-618 doi: 10.1016/j.bbrc.2010.04.122.
- [学会発表] (計 14 件)
1. 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による神経細胞毒性機序の検討、第94回日本法医学会、2010年6月、東京
 2. 白鳥典、船越丈司、鶴沼香奈、秋利彦、上村公一、硫化水素による心筋障害の検討、第79回日本法医学会学術関東地方集会、2010年10月、東京
 3. 船越丈司、内田恭子、奈良明奈、白鳥典、則竹香菜子、鶴沼香奈、秋利彦、上村公一、Neurotoxic effects of norephedrine in SH-SY5Y human

- neuroblastoma cells. 第33回日本分子生物学会、2010年12月、神戸
4. 秋利彦、奈良明奈、船越丈司、上村公一、低酸素による細胞死に対するグルコースの効果は、濃度により抑制的から促進的に変動する、第83回日本生化学会大会 2010年12月、神戸
 5. 秋利彦、船越丈司、鶴沼香奈、上村公一、ヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y における虚血再灌流時のチロシン水酸化酵素の発現誘導、第95回日本法医学会、2011年6月、福島
 6. 則竹香菜子、秋利彦、加藤千鶴、白鳥典、上村公一、Involvement of Rho-associated kinase in the cytotoxicity of 1-butanol、第95回日本法医学会、2011年6月、福島
 7. 奈良明奈、秋利彦、船越丈司、鶴沼香奈、上村公一、Methamphetamine-caused cytotoxic effects involves macropinocytosis in differentiated SH-SY5Y cells、第95回日本法医学会、2011年6月、福島
 8. Akina Nara, Toshihiko Aki, Takeshi Funakoshi, Kana Unuma and Koichi Uemura, Signaling pathway of macropinocytosis by methamphetamine in human neuroblastoma cells, 6th International Symposium Advances in Legal Medicine, 2011年9月、ドイツ
 9. 綿貫裕美、秋利彦、則竹香菜子、船越丈司、上村公一、筋芽細胞におけるコカインの細胞毒性、第80回日本法医学会 学術関東地方集会、2011年10月、宇都

宮

10. 内田恭子、鶴沼香奈、船越丈司、秋利彦、上村公一、敗血症モデル動物の前房水、硝子体、水晶体における構成タンパク質の変動の検討、第96回日本法医学会、
2012年6月、浜松
11. 別所麻里江、則竹香菜子、藤井祐介、秋利彦、上村公一、亜ヒ酸によるRhoキナーゼ依存的なアポトーシスの誘導、
第81回日本法医学会学術関東地方集
会、2012年10月20日、高崎
12. 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による神経細胞毒性機序の検討、第35回日本分子生物学会、2012年12月11日、福岡
13. 船越泉、鶴沼香奈、則竹香菜子、秋利彦、上村公一、マウス心房由来心筋細胞HL-1におけるメタンフェタミンの毒性、第85回日本生化学会、2012年12月16日、福岡
14. 藤井祐介、船越丈司、秋利彦、上村公一、ラット肺上皮由来L2細胞における硫化水素の毒性の検討、第85回日本生化学会、2012年12月16日、福岡

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋 利彦 (Toshihiko Aki)
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

(2) 研究分担者

上村公一 (Koichi Uemura)
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

(3) 連携研究者

船越丈司 (Takeshi Funakoshi)
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