

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24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790594

研究課題名（和文） ノルエフェドリンによる細胞毒性機序の解明

研究課題名（英文） Analysis of cellular toxicity by treatment with norephedrine.

研究代表者

船越 文司（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

研究成果の概要（和文）：エフェドリン類は、漢方薬である「麻黄」に含まれる成分であり、長年にわたって血管収縮剤として一般市販薬あるいは脱法ドラッグの成分として使用されてきた。本研究では、ヒト SH-SY5Y 細胞を神経細胞様に分化し、ノルエフェドリンを暴露することで神経細胞に対する毒性を検討した。その結果、ノルエフェドリンを暴露させると細胞内の空胞形成、顕著な細胞死が誘導され、ノルエフェドリンによる細胞死はオートファジーを誘導する一方でリソソームに障害を起こし、オートファジーの完結を阻害することで細胞毒性をしめすことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Norephedrine was widely used as over-the-counter cough and cold medicine and law-evading drug. In this study, we considered effects of norephedrine induced neuronal cell injury. Norephedrine induced vacuolation rapidly and cell viability was reduced. Norephedrine induced autophagy and then cell death with both lysosomal dysfunction and disruption of autophagic flux.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2300000	690000	2990000
2011年度	900000	270000	1170000
年度			
年度			
年度			
総計	3200000	960000	4160000

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：ノルエフェドリン・オートファジー・覚せい剤原料

1. 研究開始当初の背景

（1）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。また近年は検挙数の増加から第三次覚醒剤乱用期にあたり、従来の成人層による使用から、若年層がファッション感覚で麻薬・覚醒剤を使用する傾向にあり、社会問題となっている。

そのため、これら薬物の乱用を防止するために、その毒性・危険性に対する社会的認知度を上げる必要があるが、その詳細な毒性機序は未だ明らかとなっておらず、有効な治療法も確立できてはいない。

(2) エフェドリン類は、漢方薬である「麻黄」に含まれる成分であり、長年にわたって血管収縮剤として一般市販薬の鼻炎薬、風邪薬等に使用されてきた。しかしながら、エフェドリン類服用患者において、脳出血 (Haller et al, N Engl J Med, 2000)、心筋障害 (Theoharides et al, J Clin Psychopharmacol, 1997)、肝機能障害 (Nadir et al, Am J Gastroenterol, 1996)、精神障害 (Maglione et al, Am J Psychiatry, 2005) など多くの副作用に関する症例報告があり、近年では劇薬指定され、また医薬品中の含有量によっては「麻薬及び向精神薬取締法」の対象となっている。

そのため近年では、OTC 薬品としての使用は減少しているが、漢方薬、ダイエット薬などでは依然としてエフェドリン類は使用されており、さらに覚醒剤であるメタンフェタミン類似の作用を有することから、現在も脱法ドラッグの主成分として使用され続けている。また他の中毒薬物と同様に、エフェドリンの過剰摂取による自殺症例も報告されており (Backer et al, J Forensic Sciences, 1997)、脱法ドラッグなどによって引き起こされるエフェドリン中毒は、非常に致死的であると考えられる。

(3) エフェドリン類による心筋障害に関しては、動物実験において心筋細胞にアポトーシスを引き起こすことが報告されているが (Nyska et al, Toxicological Sciences, 2005)、in vitro での培養細胞系による詳細な検討は行われておらず、現在もエフェドリンによって誘導される細胞死シグナル伝達経路の詳細は明らかとなっていない。また、精神障害に関する研究は心筋障害以上にあまり進んでおらず、動物実験における行動観察から中枢神経系に対する強い毒性を示すことが報告されているが (William et al, J Pharmacology and Experimental therapeutics, 1986)、神経細胞に対する細胞毒性の詳細な作用機序も未だ明らかとなっていない。

しかしながら、近年、エフェドリン類と分子構造および生理作用も類似している覚醒剤メタンフェタミンが、ラット脳にアポトーシスを引き起こすことが報告されており (Tokunaga et al, J Medical Investigation, 2008)、エフェドリン類によって引き起こされる精神障害も、神経細胞死を誘導するためではないかと考えられる。

(4) 申請者の以前の研究より、ノルエフェドリンは培養神経細胞において顕著な細胞死を引き起こすことが確認されており、刺激初期の段階において細胞内に空胞様の構造が観察され、アポトーシスやネクローシスとは異なる形態変化を示すことを明らかにした。この形態変化は、近年アポトーシス・ネクローシスとは異なる第三の細胞死経路として注目されている“オートファジー”に特徴的にみられる現象であり、事実ノルエフェドリン刺激細胞において、オートファジーのマーカータンパク質 LC3-II の発現が顕著に増加することも明らかにしている。

2. 研究の目的

(1) エフェドリン類に関しては、培養神経細胞を用いた in vitro 系における細胞毒性は報告されておらず、本研究で検討を行う作用機序の詳細は未だ明らかとなっていない。本研究は、法医実務上取り扱われる薬物中毒の中でも、比較的容易に入手が可能であることから問題となっている脱法ドラッグの主成分ノルエフェドリンに着目し、その細胞毒性の作用機序を明らかにすることを目的としている。

(2) エフェドリン類は医薬品中の含有量によって、麻薬及び向精神薬取締法の対象となっており、近年市販の風邪薬の成分として利用されることはなくなってきたが、その一方でダイエット薬、脱法ドラッグの成分として未だに利用され続けている。

そのため、神経細胞におけるエフェドリン類の作用機序の詳細を明らかにすることにより、これら薬品の中毒患者の治療において、画期的な治療法を確立することが期待される。

また、治療法だけにとどまらず、法医学上における死因鑑定においては、通常脱法ドラッグ摂取後数日で尿中から薬物を検出できなくなるが、脳や心臓などの臓器において特徴的な細胞形態を観察することで、薬物使用の痕跡を検出するといった、新規の病理組織鑑定を確立することに貢献することを目的としている。

3. 研究の方法

ノルエフェドリンによって誘導される細胞毒性について検討するために、個体および個体に比べより単純化された実験系である培養細胞系を用いて、薬品暴露後の各細胞における変化について検証を行った。

タンパク質レベルでのシグナル分子の発現変化を検討は western blotting 法により行い、オートファジー関連分子を含む、発現変化が観察された分子に関しては、遺伝子のクロー

ニングを行い、培養細胞に発現させることで、細胞レベルで毒性シグナル経路を明らかにした。

(1) ノルエフェドリン刺激後の細胞生存率の測定

ヒト神経芽細胞腫由来の培養細胞 SH-SY5Y はレチノイン酸を培地中に添加することで、神経突起を伸ばし、神経細胞様の形態となることが知られている。

そこで、SH-SY5Y にレチノイン酸により神経細胞へと誘導をかけたものに、0~5 mM の濃度範囲でエフェドリン類を培地に加え、その後時間経過ごとに、ミトコンドリア機能を測定する MTT assay、および細胞生存率の指標となる ATP の測定を行い、濃度および暴露時間ごとの細胞の生存率の変化を検討した。

(2) ウェスタンブロッティング法によるシグナル伝達物質活性化の検討

アポトーシス、ネクロシス、オートファジーなどの細胞死経路では、それぞれ特異的なシグナル分子の活性化が起こり、それらは western blotting により確認することが可能である。

そこで、ノルエフェドリン暴露後の細胞を回収し、SDS sample buffer で溶解後、LC-3 等オートファジー関連分子やリソソーム酵素、他のシグナル分子に対する抗体を用いてウェスタンブロッティングを行いノルエフェドリン処理による神経細胞死のシグナル伝達経路を検討した。

(3) 蛍光タンパク質融合分子を用いた、細胞内分子挙動の検討

ノルエフェドリン刺激後の細胞内分子の挙動をより詳細に検討するために、蛍光タンパク質を融合した各分子 (LC3、LAMP 1 等) を SH-SY5Y にトランスフェクションし、ノルエフェドリン刺激後の細胞内局在の変化を蛍光顕微鏡により検討した。

(4) 電子顕微鏡によるノルエフェドリン刺激後の細胞形態変化の解析

通常の顕微鏡下では細胞内オルガネラの詳細な形態変化を観察することは困難であった。

そこで電子顕微鏡により細胞内の形態、特に細胞内オルガネラの形態変化を中心に、ノルエフェドリン暴露後の細胞形態の変化をより詳細な観察を行った。

(5) 各種阻害剤を用いた、細胞毒性経路の検討

ノルエフェドリン刺激により誘導される細胞毒性経路をより詳細に検討するために、オートファジー阻害剤である wortmannin、リソ

ソーム阻害剤である Bafilomycin A1 を前投与した細胞において、ノルエフェドリン刺激後の細胞形態の変化、細胞生存率の評価を行った。

4. 研究成果

(1) ノルエフェドリンを暴露させると、顕著な細胞死が誘導 (図 1)、細胞内に多数の空胞の形成 (図 2)、オートファジーマーカーである LC3-II の顕著な増加がみられた (図 3)。

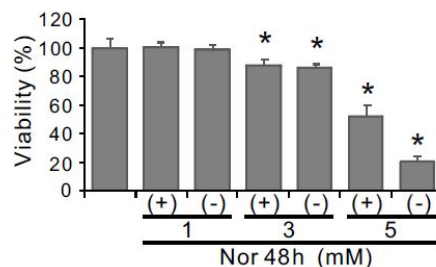


図1 ノルエフェドリン刺激後の細胞生存率の検討



図2 ノルエフェドリン刺激後の細胞内空胞形成

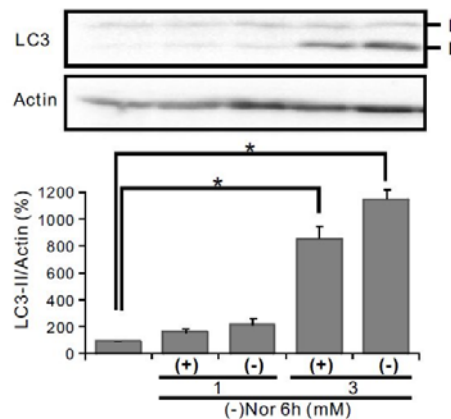
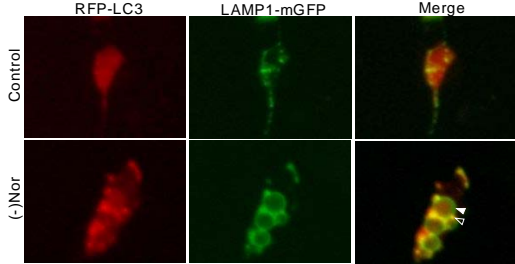


図3 LC3 活性化の検討

(2) リソゾームマーカー蛋白質である LAMP1 およびオートファジーマーカー蛋白質である LC3 を発現した細胞にノルエフェドリンを投与すると、LAMP1、LC3 は形成される空胞に局在していることが観察されたことから (図 4)、形成される空胞がリソゾーム由来であり、またオートファジーを誘導していることが示唆された。

図4 LC3、LAMP1の細胞内局在の変化



(3) 電子顕微鏡による観察を行ったところ、オートリソソームと思われる消化物を内封する空胞と、内容物の無い空胞が散見された(図5)。また酸性オルガネラを検出する acridine orange 染色を行ったところ、形成された小さな空胞の大半が酸性であったが、巨大化した空胞は酸性を呈しておらず、またリソソーム内蛋白質分解酵素である Cathepsin L の活性が顕著に低下していることが明らかとなった。

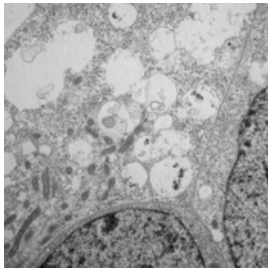


図5 透過電子顕微鏡による空胞の観察



図6 アクリジノレンジによる酸性オルガネラの観察

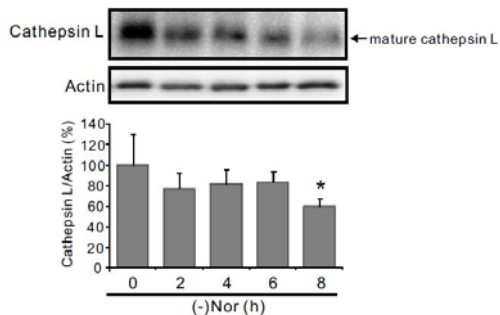


図7 カテプシンL活性の検討

(4) そこでノルエフェドリン処理による細

胞毒性とオートファジーの関与をより詳細に検討するため、オートファゴソーム形成の阻害剤である wortmannine とリソソーム阻害剤である Bafilomycin A1 を処理した細胞にノルエフェドリンを処理すると、wortmannine を前処理した細胞ではノルエフェドリン単独処理に比べ、細胞死がより早く誘導され(図8)、一方で Bafilomycin 前処理を行った細胞では空胞の形成および細胞毒性が抑制されることが明らかとなった(図9)。

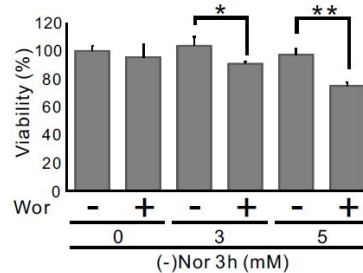


図8 wortmannine 前処理による細胞生存率の変化

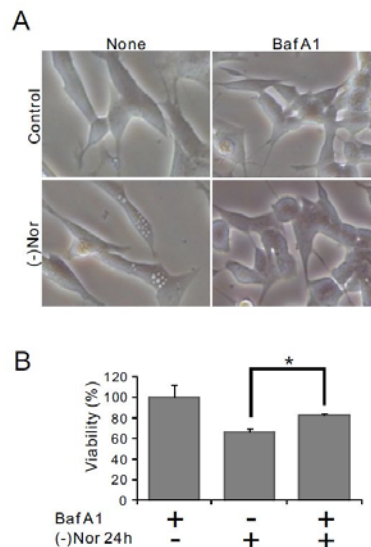


図9 BafilomycinA1 前処理による細胞生存率の変化

これらの結果からノルエフェドリンは顕著な細胞死を誘導することが明らかとなった。ノルエフェドリンによる細胞死は初期の段階ではオートファジーを誘導し細胞を保護し、一方で後期の段階ではリソソームに障害を起こし、オートファジーの完結を阻害し細胞毒性をしめすことも明らかとなった。さらにノルエフェドリンの空胞形成には、塩基性薬物にみられるリソソーム指向性が関与していることも阻害剤による検討から示唆された。

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)

[学会発表] (計2件)

- ① 船越丈司、内田恭子、奈良明奈、中山春香、白鳥典、秋利彦、上村公一
覚醒剤原料ノルエフェドリンによる神経細胞毒性の検討、第94次日本法医学会学術全国集会、2010年6月、船堀
- ② 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
ノルエフェドリンによる神経細胞毒性の検討、BMB2010、2010年12月、神戸

[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：40444715