

## 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31日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790597

研究課題名（和文） アルコール濫用による小胞体ストレス応答破綻の分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanism of ER stress response by alcohol abuse.

研究代表者

西谷 陽子 (NISHITANI YOKO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：3035997

研究成果の概要（和文）：

アルコールの濫用が小胞体ストレス応答について、特に細胞内への脂質の蓄積に着目して脂質の蓄積と代謝に関わるクレアチンの障害を明らかに小胞体ストレス応答の変化を検討する。2010～2011年度に異動に伴い新しく整備した、CO<sub>2</sub>インキュベーターや動物固定器などの初代培養肝細胞を実施するのに必要なものの調整を実施した。また、新しい設備のもとでラット初代培養肝細胞培養を実施し、培養条件の再検討を実施した。複数の濃度の血清培地を用いて培地の分析を行い、良好な実験条件の検討を行った。0～10%培地で0～100mMのエタノールを24時間負荷し、細胞の状態をチェックした。培養細胞からは培地を-80度で保存し、さらに細胞の細胞質画分を分画し保存した。肝臓で生成されエネルギーに関連するクレアチンがアルコールにより受ける影響について培地を検討したところ、アルコール負荷によりクレアチンが非酵素的に転換されたクレアチニンの濃度はアルコール負荷で低下することを見出した。肝臓におけるクレアチン産生の機序は脂質代謝とも大きく関わっていることが知られている。脂質の蓄積による小胞体ストレス応答の変化に肝細胞におけるクレアチン産生障害が関わっているかもしれない。

研究成果の概要（英文）：

To clarify the molecular mechanism of endoplasmic reticulum (ER) stress response by alcohol abuse, I focused on the lipid accumulation and lipid metabolism, both observed nearby ER. Creatine is one of factors concerning lipid metabolism. I had to establish new lab system for primary rat hepatocyte culture, because of moving on new institutes. I checked the condition of culture in the new system. I performed primary rat hepatocyte culture and loaded 0-100 mM ethanol in the culture medium with 0-10% serum for 24 hours. I found that ethanol suppressed serum concentration of creatinine, which converted from creatine and increased depending on the concentration of serum in the culture medium. Creatine is synthesized in the liver and creatine plays important role in lipid metabolism. Alcohol may suppress creatine synthesis in the liver leading disturbance of ER stress response and alcoholic liver disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：法医学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：アルコール、小胞体ストレス、臓器障害

### 1. 研究開始当初の背景

アルコール等の濫用薬物による臓器障害は法医実務でしばしば認められる。生体は外部の刺激に対し生体防御反応によって恒常性を保つが、この恒常性が崩れると臓器障害を引き起こす。

私たちは、過去にアルコール等の濫用薬物がどのように恒常性の均衡を崩壊させるのかを明らかにするために、初めに細胞死に関係するプロテインキナーゼである JNK に着目し、急性アルコール負荷が及ぼす影響についてラット灌流肝とラット初代培養肝細胞を用いて検討を行った。その結果、アルコールにより活性化した Akt が JNK の足場タンパクである JIP1 を介して JNK の活性を制御している可能性を示し、また、アルコール刺激や浸透圧ストレスであるマンニトール刺激で小胞体シャペロン蛋白 GRP78 の mRNA 発現量の低下を認め、急性アルコールで小胞体ストレス応答に変化が起きることを示した (Nishitani and Matusmoto, 2006)。

小胞体は真核細胞内で最も大きな膜小器官で、分泌あるいは膜タンパク質、脂肪酸やリン脂質の生合成が行われる一方で、細胞内のカルシウムの主たる貯蔵部位としてカルシウム恒常性において重要な役割を果たす。また、外部からの刺激に対しタンパクのフォールディングに関係する GRP78 を初めとした小胞体シャペロン蛋白の生成など、細胞内の恒常性を保つための小胞体ストレス応答が起こることが知られている。

近年、メタボリックシンドロームによる脂肪肝など細胞への脂質の蓄積が注目される。そこで次に、脂肪肝に対するアルコールの影響を明らかにするため、不飽和脂肪酸を用いてラット初代培養肝細胞内に脂肪滴を生じ疑似脂肪肝を作成すると、同じように GRP78 mRNA 発現の低下を認めた。肝臓において、脂質代謝はミトコンドリアを中心とした  $\beta$  酸化と小胞体・ミクロソームを中心とした  $\omega$  酸化を中心に行われる。 $\beta$  酸化に関連する酵素の mRNA 発現量は、不飽和脂肪酸で顕著な変化は認められないが、 $\omega$  酸化に関連する CYP4 系の酵素は不飽和脂肪酸で mRNA 発現が変化し、さらにアルコールと脂肪酸を同時に負荷する発現が上昇した。アルコールは、細胞質を主体とするアルコール脱水素酵素と小胞体・ミクロソームに局在する CYP2E1 が主に代謝することが知られている。アルコールで小胞体ストレス応答が乱れ、脂肪酸負荷や細胞内の脂質の蓄積でさらに破綻する

可能性を示す。そこに、クレアチンなどのエネルギー代謝に関わる因子が関わっている可能性がある。

小胞体ストレス応答シグナルは、細胞内の様々な小器官にも影響を及ぼすことが知られている。小胞体ストレス応答は細胞内のレドックス変化を引き起こし、核における転写制御やアポトーシスの誘導が起こる。また、小胞体とミトコンドリアをつなぐタンパクもいくつか同定されており、小胞体とミトコンドリアの接触がミトコンドリアにおけるカルシウムの流入など、これら2つの細胞内小器官の関係の変化が細胞死に影響を及ぼすと考えられる。さらに、ゴルジ体は小胞体から小胞輸送でタンパクなどが輸送されるが、その輸送に関わる積み荷受容体は、小胞体ストレス応答シグナルで制御されている。これらミトコンドリアやゴルジ体などの細胞内小器官は、細胞内の脂質の蓄積で小胞体とのネットワークに障害がおこる可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

この研究の目的は、アルコールの濫用が小胞体ストレス応答を破綻させ、細胞内の小器官に障害を及ぼす可能性を明らかにすることであり、特に細胞内への脂質の蓄積に着目して、脂肪肝など細胞内に脂肪が蓄積とアルコールの濫用が、小胞体などの細胞内小器官の局在変化にどのように影響するかを明らかにするため脂質の蓄積と代謝に関わるクレアチンの障害を明らかに小胞体ストレス応答の変化を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 肝細胞培養

既報 (Seglen, 1975; Matsumoto, 2002) に従ってラット初代肝細胞培養を行う。札幌医科大学動物実験倫理指針に従って、Wistar 系雄ラット (8週齢、体重 250 ~ 300 g) の肝臓から、肝灌流システムを用いてコラゲナーゼ灌流を行い、肝細胞を分離精製し、10% 血清含有の William's E 培地にて培養をおこなった。4時間経過後に、0, 1, 10%の血清含有の William's E 培地を負荷し、20時間経過後に以下の実験に使用した。

## (2) 実験群の作成

最終濃度 0 ~ 100 mMのエタノールを培地に負荷し、24時間経過後に細胞を採取した。また、エネルギー代謝を詳細に解明するために、培地中の血清濃度を 0, 1, 10% にし検討をおこなった。適宜トリパンブルー染色で死細胞の有無を検討した。負荷終了後に培地は分注し-80℃で保存を行った。細胞から細胞質画分を分画し-80℃で保存を行った。

## (3) 培地中の電解質の解析

細胞の状態を確認するために、培地中の電解質（ナトリウム、カリウム、クロライド）のを簡易電解質検査（Arkray）を用いて検討した。

## (4) 培地中のクレアチニン濃度測定

クレアチンは非酵素的にクレアチニンに転換されるが、培地中のクレアチニン濃度をクレアチニンアッセイキット（Cayman chemical company）および簡易クレアチニン検査（Arkray）を用いて検討した。

## (5) データ解析

データは一元配置分散分析（ANOVA）を実施後、ボンフェローニ補正 *t* 検定を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 環境整備について

平成22年度は、平成21年に異動があったため新しく環境を整える必要があり、ラットからの初代肝細胞培養を実施するための環境整備に時間を費やした。本研究費を用いて、CO<sub>2</sub>インキュベーター（アステック・SCA-165DS）や細胞を観察するための倒立顕微鏡、ラット灌流肝を実施するための小動物実験専用固定器や、コラゲナーゼや培地などの初代培養肝細胞を実施するのに必要なものの整備を実施した。また、新しい設備のもとでラット初代培養肝細胞培養を実施し、培養条件の再検討を実施した。培地中に複数の濃度の血清培地を用いて培地の分析を行い、良好な実験条件の検討を行った。0 ~ 100 mMのエタノールを24時間負荷し、トリパンブルー染色で細胞の生存状態をチェックしたところ、0, 1, 10%血清含有培地のいずれにおいても、明らかな死細胞の増加は認めなかった。また、培地中の電解質は、1%血清含有培地で、エタノール各濃度（0 ~ 100 mM）で明らかな変動は認めず、アルコールによる細胞死やアルコール代謝物など

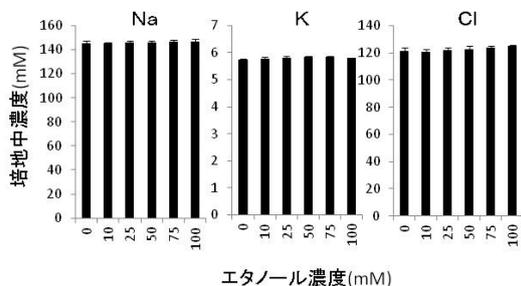


図1. 培地中の電解質濃度.

による電解質変動は認められないことを確認した（図1）。

## (2) 培地中のクレアチニン濃度について

クレアチンは筋肉や脳でのエネルギー代謝に関連する。クレアチンの産生は腎臓および肝臓から2ステップで産生される。腎臓でアルギニンおよびグリシンから酵素 AGAT を介して guanidinoacetate acid (GAA) が産生され、肝臓にて酵素 GAMT を介して GAA からクレアチンが産生される。クレアチンは非酵素的にクレアチニンへと転換される。クレアチン濃度を類推するために、より一般的に検査を実施しやすい培地中のクレアチニン濃度について検討を行った。アルコールにより受ける影響について培地を 1%血清含有培地で 0 ~ 100 mMエタノールを24時間負荷して検討したところ、100 mMの高濃度では培地中のクレアチニン濃度が減少する傾向を認めた（図2）。

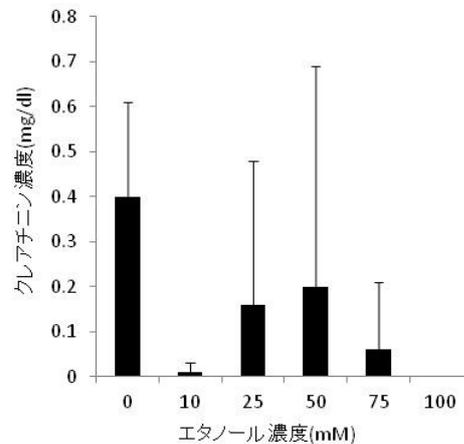


図2. 培地中のクレアチニン濃度(1%血清含有培地).

しかしながら、クレアチニン濃度は全体に検出限界下限近くであり値の誤差が多かった。肝臓では、通常、アルギニンおよびグリシンから GAA を産生する AGAT は含まれておらず、これらの培地中のクレアチニンは、血清に含まれる GAA をもとに産生されたと仮説し、培地に含有する血清を 0, 1%, 10% として、それぞれアルコールの影響を検討した（図3）。

培地に含まれるクレアチニン濃度は血清濃度に依存して増加しており、血清に含まれる GAA を材料として産生されたと考えられる。肝細胞への負荷を行っていない培地（0, 1, 10%血清含有）は、いずれもクレアチニンは検出されておらず、24時間の肝細胞への負荷で肝細胞により作成されたと考えられた。最終濃度 100 mMのエタノールを負荷したところ、負荷をしない場合に比べ優位に培地中のクレアチニン濃度が減少した。クレアチニンの標準液にエタノールを負荷しただけの溶液ではエタノールによるクレアチ

ニン濃度の低下は起こっておらず、アルコールが検出方法へ及ぼす影響はないと考えられる。0%、1%血清含有培地ではエタノール負荷群はいずれも検出限界以下であったが、10%血清含有培地ではエタノール負荷群においてもクレアチニンが検出されており、エタノールは部分的に抑制している可能性が高い。今後、クレアチニンに転換される前のクレアチンおよびGAMT酵素の動態を詳しく検討する予定である。

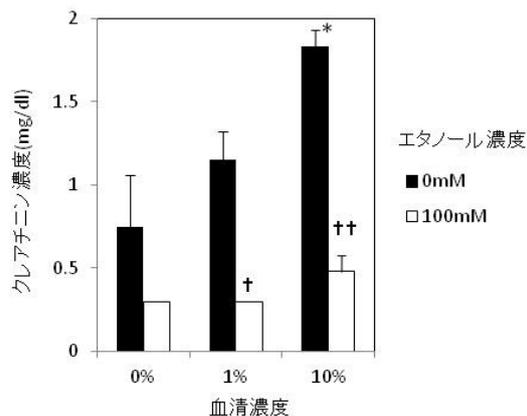


図3. 培地中のクレアチニン濃度. \* $p < 0.05$ ; compared among the serum concentration (0 mM Ethanol). † $p < 0.05$ , †† $p < 0.01$ ; compared between ethanol concentration at each serum concentration.

#### (3) 得られた成果の位置づけ

クレアチンは約半分は食事より摂取され、残り半分は体内で産生される。肝臓におけるクレアチン産生の機序は脂質代謝とも大きく関わっていることが知られている。クレアチンを食事で摂取することで高脂肪食を摂取したラットの脂肪肝が軽減したという報告がある一方で (Deminice et al., 2011)、アルコール症の人の脳のクレアチンは正常者に比べ少ないという報告もあり (Lee et al., 2007)、エタノールによるクレアチン産生障害がアルコール肝障害における脂質の蓄積異常に関与している可能性がある。肝細胞における脂質の蓄積は小胞体ストレス応答の変化を引き起こす可能性があることから、アルコールによるクレアチン産生障害に小胞体ストレス反応は関わっているかもしれない。

#### (4) 今後の展望について

初期の細胞培養立ち上げに時間を要し、細かな小胞体ストレス応答の検討にはいたっておらず、今後、アルコール濫用による小胞体ストレス破綻の分子機構を検討するために、エネルギー代謝に関与するクレアチンに着目し、まずその非酵素的に転換されるクレアチニンを検討した。今後、クレアチンおよびその産生酵素について検討するとともに、ホ

モシスチンをはじめとする脂質代謝に関連する因子を明らかにする。また、細胞内の小器官とクレアチニン産生および脂質代謝の関係についても検討を行う。また、脂肪酸を負荷し脂質が蓄積された場合に、クレアチン産生がどのように変化するかを検討し、アルコールによる肝臓における脂質代謝異常を解明したい。

#### 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 米満孝聖, 笹尾亜子, 西谷陽子. 抗精神病薬服用者急死の現状と薬物の検出状況—熊本大学の法医解剖事例からの検討—, 平成23年度アルコール・薬物依存関連学会合, 2011. 10. 14, (愛知県名古屋市)
- ② 米満孝聖, 笹尾亜子, 西谷陽子. 交通事故死者におけるアルコール・薬物の検出状況. 平成22年度アルコール・薬物依存関連学会合, 2010. 10. 7, (福岡県北九州市)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

西谷 陽子 (NISHITANI YOKO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号: 30359997