

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460862

研究課題名(和文) オミクスの手法を統合したトキシコオミクスによる薬毒物中毒の分子機構解析

研究課題名(英文) Molecular analysis of drug intoxication by use of integrated toxicomics

研究代表者

秋 利彦 (Aki, Toshihiko)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：60304474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：薬毒物による細胞・臓器障害の分子機構を解明する事は、法医実務にも資する重要な課題である。この課題にトランスクリプトミクス(DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現の解析)、プロテオミクス(質量分析計を用いた蛋白質の解析)およびメタボロミクス(代謝産物の解析)の手法を適宜利用する事で、エタノール・覚醒剤・覚醒剤原料・リポ多糖などの薬毒物の毒性機構の新知見を得た。覚醒剤原料による神経細胞死にはコレステロール動態の異常が、リポ多糖投与による敗血症モデルでは障害ミトコンドリアの細胞外放出という事象が観察される事を見出した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate molecular mechanism of drug toxicity, integrated omics analysis has been performed. Proteomics, transcriptomics, and metabolomics analyzes were used to evaluated the cytotoxicity of ethanol, methamphetamine, and LPS on neuronal, cardiac, and lung cells. Using DNA microarray-based transcriptome analysis, we found that norephedrine induced neuronal cell death through disrupting cholesterol homeostasis. This observation was confirmed by GC-MS-based analysis of cholesterol contents in the cells. In addition, we found that LPS induced extrusion of mitochondria from hepatocytes without loss of plasma membrane integrity. This observation was found by use of MALDI-TOF-MS-based proteomics analysis. Collectively, integrated omics analysis has been proved as efficient and useful method to evaluate the cytotoxicity of drugs.

研究分野：法医学、生化学

キーワード：プロテオミクス トランスクリプトミクス 薬毒物 細胞死

1. 研究開始当初の背景

薬毒物による異状死は法医学的にも問題となる事が多く、それらの毒性機序を明らかにする事は鑑定の精密化のためにも重要である。近年、遺伝子・蛋白質・代謝物などを網羅的に解析するいわゆるオミクス解析が普及し始めている。この手法を薬毒物による細胞・臓器障害機序の解明に応用する事で、いままで明らかでなかった毒性機構を発見出来る可能性がある。

2. 研究の目的

薬毒物の細胞・臓器毒性の機序の解明を目指して、蛋白質・遺伝子発現・代謝産物の網羅的解析手法であるプロテオミクス・トランスクリプトミクス・メタボロミクスの有用性を検討した。

3. 研究の方法

神経・心筋・肺などの臓器由来の細胞にエタノール・覚醒剤・覚醒剤原料・ヒ素・パラコート・リポポリサッカライドなどの毒物を投与し、発現変動遺伝子・変動蛋白質・代謝産物の増加などをそれぞれ MALDI-TOF-MS・DNA マイクロアレイ・GC/LC-MS を用いて解析する事で検討し、それらの結果から分子毒性機序を推定した。

4. 研究成果

敗血症のモデルとして確立しているリポポリサッカライド曝露の肝細胞において、障害されたミトコンドリアを除去するためにオートファジーが起きている事、更に、障害ミトコンドリアはオートファジーにより細胞内で処理されるのみならず細胞外へ放出されている事を見出した。意外な事にこの細胞外放出機構はオートファジー遺伝子依存的であり、細胞内タンパク質分解機構と考えられて来たオートファジーが細胞外分泌経路にも関与している事がわかった。また、肝臓特異的ミトコンドリア蛋白質であるカルバモイルリン酸シンターゼ 1 (CPS1) を検出する事で、血清中の肝ミトコンドリアを検出する事が可能である事も判明し、敗血症時の肝障害マーカーとして期待される。これらは敗血症モデル肝細胞のプロテオミクス解析から CPS1 の減少を見出した事が手掛かりに発見され、オミクス解析の有用性の証明ともなった。また、覚醒剤原料による神経細胞死の DNA マイクロアレイ解析から、コレステロール合成経路が亢進している事が判明し、更にコレステロールの GC-MS 解析から細胞内に異常蓄積している事を見出した。以上を合わせて、薬毒物による細胞死・臓器障害機構の解析にオミクス解析が極めて有用であると結論された。

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)

(雑誌論文)(計 10 件)

1. 則竹香菜子、秋利彦、上村公一 (2015) アルコールによる心筋障害とオートファジーの役割 月刊「細胞」47, 41-44 査読なし
2. Kanako Noritake, Toshihiko Aki, Takeshi Funakoshi, Kana Unuma, and Koichi Uemura (2015) Direct exposure to ethanol disrupts junctional cell-cell contact and hippo-YAP signaling in HL-1 murine atrial cardiomyocytes. *PLOS ONE*, 10, e0136952 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0136952.
3. Kana Unuma, Toshihiko Aki, Takeshi Funakoshi, Kyoko Hashimoto, and Koichi Uemura (2015) Extrusion of mitochondria from lipopolysaccharide-stimulated cells: Involvement of autophagy. *Autophagy*, 11, 1520-1536 査読有 doi: 10.1080/15548627.2015.1063765.
4. Toshihiko Aki, Takeshi Funakoshi, and Koichi Uemura (2015) Regulated necrosis and its implications in toxicology (Review). *Toxicology*, 333, 118-126 査読有 doi: 10.1016/j.tox.2015.04.003.
5. Atsushi Yamada, Toshihiko Aki, Kana Unuma, Takeshi Funakoshi, Koichi Uemura (2015) Paraquat induces epithelial-mesenchymal transition-like cellular response resulting in fibrogenesis and the prevention of apoptosis in human pulmonary epithelial cells. *PLOS ONE*, 10, e0120192 査読有 doi: 10.1293/tox.2014-0004.
6. Sayuri Okawa, Kana Unuma, Atsushi Yamada, Toshihiko Aki, and Koichi Uemura (2015) Lipopolysaccharide induces expression of collagen VI in the

- rat lung. *J. Toxicologic Pathology*, 28, 37-41 査読有 doi: 10.1293/tox.2014-0053.
7. Mayumi Watanabe, Takeshi Funakoshi, Kana Unuma, Toshihiko Aki, and Koichi Uemura (2014) Activation of the ubiquitin-proteasome system against arsenic trioxide cardiotoxicity involves ubiquitin ligase Parkin for mitochondrial homeostasis. *Toxicology*, 322, 43-50 査読有 doi: 10.1016/j.tox.2014.04.008.
 8. Kyoko Uchida, Kana Unuma, Takeshi Funakoshi, Toshihiko Aki, and Koichi Uemura (2014) Activation of master autophagy regulator TFEB during systemic LPS administration in cornea. *J. Toxicologic Pathology*, 27, 153-158 査読有 doi: 10.1293/tox.2014-0004.
 9. Izumi Funakoshi-Hirose, Toshihiko Aki, Takeshi Funakoshi, Kana Unuma, Kanako Noritake, and Koichi Uemura (2013) Distinct effects of methamphetamine on autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome systems in HL-1 cultured mouse atrial cardiomyocytes. *Toxicology*, 312, 74-82 査読有 doi: 10.1016/j.tox.2013.07.016.
 10. Toshihiko Aki, Takeshi Funakoshi, Kana Unuma, and Koichi Uemura (2013) Impairment of autophagy: from hereditary disorder to drug intoxication (Review). *Toxicology*, 311, 205-215 査読有 doi: 10.1016/j.tox.2013.07.001.

[学会発表](計 19 件)

1. 則竹香菜子、秋利彦、上村公一、HL-1心筋細胞においてエタノールは細胞間接着・細胞骨格を破綻し、Hippo経路の機

能を障害する、第88回日本生化学会、2015年12月

2. 木村(小島)遥、鷗沼香奈、秋利彦、上村公一、平滑筋細胞へのコカイン曝露によるMFG-E8の増加とその病態生理学的意義、第88回日本生化学会、2015年12月
3. 山田真嗣、秋利彦、上村公一、パラコートによる呼吸器上皮細胞の上皮間葉転換誘導後の線維化とその細胞保護的役割の検討、第88回日本生化学会、2015年12月
4. 船越丈司、秋利彦、田尻正輝、鷗沼 香奈、上村公一、覚せい剤原料ノルエフェドリン曝露による細胞内コレステロール蓄積とネクロトーシスの解析、第38回日本分子生物学会、2015年12月
5. 山田真嗣、秋利彦、加藤 千鶴、上村公一。パラコート肺における上皮間葉転換とその細胞保護的役割の検討。第83回日本法医学会学術関東地方集会、2015年10月
6. 則竹香菜子、秋利彦、上村公一。アルコールの毒性と心筋細胞障害。平成 27 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会、2015年10月
7. 船越(廣瀬)泉、秋利彦、鷗沼香奈、船越丈司、則竹香菜子、上村公一。HL-1心筋細胞におけるオートファジー・リソソームおよびユビキチン・プロテアソームシステムへのメタンフェタミンの影響。第99次日本法医学術全国集会、2015年6月
8. 大川紗由里、鷗沼香奈、秋利彦、山田真嗣、上村公一。敗血症性肺障害モデルにおけるコラーゲン分子の変動。第99次日本法医学術全国集会、2015年6月
9. Atsushi Yamada, Toshihiko Aki, and Koichi Uemura. Epithelial-mesenchymal transition and fibrosis during paraquat

- poisoning in human alveolar cells.第99次日本法医学術全国集会、2015年6月
10. 相原瑤、船越丈司、加藤千鶴、秋利彦、上村公一 抗精神病薬ハロペリドールによるコレステロール代謝変化 第83回日本法医学会学術関東地方集会 2014年11月
 11. 則竹香菜子、秋利彦、上村公一、アルコールによる心筋細胞への影響、第49回日本アルコール・薬物医学会 2014年10月
 12. Kanako Noritake, Toshihiko Aki, and Koichi Uemura, Ethanol induces apoptosis with alterations of Cx43 expression and distribution in HL-1 cells. 9th International Symposium Advances in Legal Medicine, 2014年6月
 13. Atsushi Yamada, Toshihiko Aki, and Koichi Uemura, Differential induction of epithelial-mesenchymal transition and cell death during paraquat poisoning in human alveolar cell line, A549, 9th International Symposium Advances in Legal Medicine, 2014年6月
 14. Mayumi Watanabe, Takeshi Funakoshi, Kana Unuma, Toshihiko Aki, and Koichi Uemura, Activation of ubiquitin-proteasome system plays a protective role in arsenic trioxide-induced cardiotoxicity, 9th International Symposium Advances in Legal Medicine, 2014年6月
 15. 船越 丈司, 秋利彦, 鵜沼 香奈, 上村公二, 覚せい剤原料ノルエフェドリン暴露による細胞内コレステロール変動の解析、第36回日本分子生物学会、2013年12月
 16. 小島遥、則竹香菜子、藤井祐介、船越丈司、秋利彦、上村公一、コカインによるアポトーシス誘導におけるオートファジー・リソソームの関与、第82回日本法医学会学術関東地方集会、2013年10月
 17. 内田恭子、鵜沼香奈、船越丈司、秋利彦、上村公一、敗血症モデルラットの角膜におけるオートファジー誘導性転写因子TFEBの活性化、第82回日本法医学会学術関東地方集会、2013年10月
 18. 則竹香菜子、秋利彦、上村公一、心筋ギャップ結合制御機構に及ぼすエタノールの影響、平成 25年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会 2013年10月
 19. 則竹香菜子、秋利彦、上村公一、エタノールが心筋ギャップ結合に及ぼす影響、第86回日本生化学会大会、2013年9月

〔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