

## 学位論文の内容の要旨

論文提出者氏名	船越 泉
論文審査担当者	主査 清水 重臣 副査 中田 隆夫、安原 真人
論文題目	Distinct effects of methamphetamine on autophagy - lysosome and ubiquitin - proteasome systems in HL-1 cultured mouse atrial cardiomyocytes
<p style="text-align: center;">(論文内容の要旨)</p> <p>&lt;要旨&gt;</p> <p>メタンフェタミン(MAP)は覚醒剤として乱用されており、神経系をはじめ、循環器系への影響も広く知られている。動物実験では、MAP 投与の心筋において筋原線維変性や細胞内空胞・顆粒形成が報告されている。今回は、マウス心筋細胞由来の培養細胞である HL-1 細胞を使用し、MAP の心筋毒性の分子メカニズムについて検討した。MAP 曝露細胞の濃度・時間依存的変化を顕微鏡下で形態学的に観察し、また蛋白質や遺伝子発現を調べることでそのメカニズムを検討した。MAP 暴露による心筋障害はリソソームの空胞化、オートファジーの遂行不全とそれに伴う顆粒形成、ミオシン重鎖タンパク質のユビキチン・プロテアソームによる分解と遺伝子発現量の低下、などによると推察された。</p> <p>&lt;緒言&gt;</p> <p>メタンフェタミン(MAP)は世界中で覚醒剤として乱用されており、我が国でもその乱用は深刻な問題である。神経系をはじめ、循環器系への影響も広く知られている。MAP は末梢神経からのカテコラミン放出を促進し、心筋毒性のメディエーターと考えられるが、直接的な心筋障害も知られている。動物実験では、ラットに急性 MAP 投与した研究で、筋原線維変性や肥大、萎縮、細胞内空胞・顆粒形成が報告されている。本研究は、マウス心筋由来の細胞を用いて MAP 刺激を行い、心筋細胞の形態観察及び、細胞内蛋白変動などを用いて心筋毒性について検討したものである。</p> <p>&lt;方法&gt;</p> <p>マウスの心房心筋由来の培養細胞である HL-1 細胞を用いた。HL-1 細胞は培養細胞であるが、拍動する特性を持つ。HL-1 細胞に 0-1mM のメタンフェタミン(MAP)を暴露し、0-48 時間後の形態的变化を観察した。空胞形成が認められたため、各種オルガネラマーカールを用いて蛍光顕微鏡で観察した。MAP1mM 刺激 0 - 48 時間までタイムコースを作成し、回収したサンプルからウエスタン解析(WB)を行い、オートファジーの指標である LC3、p62 および筋原線維蛋白質や抗酸化酵素についての評価を行った。0-1mM まで濃度を振った MAP 暴露 48 時間のサンプルにおいて、電気泳動および CBB 染色で、250kDa 付近に変動するバンドを認め、同部分を切り出し MALDI/TOF/MS 解析を行ったところ、ミオシン重鎖 (MHC) であった。MHC については、リアルタイム PCR で発現量の経時変動の評価をおこない、MHC のユビキチンリガーゼである MURF1、Atrogin</p>	

についても発現量の評価をおこなった。

#### <結果>

0~1mM まで濃度を振ったメタンフェタミン(MAP)を細胞に暴露し、48 時間後の形態を観察したところ、1mM 曝露 48 時間の細胞では細胞内に明らかな顆粒形成を認めた。次に MAP 濃度を 1 mM に固定し、48 時間まで経時的に観察した。MAP 曝露群では 3 時間経過から細胞内に空胞が観察され、12 時間までは徐々に大きくなり、24 時間の時点では小顆粒を形成した。

次に、この空胞の由来を確認するため、オートファゴソームのマーカーである LC-3-GFP を導入した HL-1 細胞に MAP1mM 曝露を行い、形態観察した。24 時間以降の顆粒は LC-3 陽性であるが、空胞とは一致しなかった。ER マーカーである Hsp47-GFP、lysosome マーカー LAMP1-GFP を導入した HL-1 細胞に MAP1mM 曝露を行い、空胞との一致の有無を確認したところ、空胞は LAMP1 と一致し、リソソーム由来と判明した。次に、リソソームの空胞化と機能の関係を調べるために、リソソーム由来のプロテアーゼであるカテプシン L を検討したところ、3 時間から成熟カテプシン L は減少し始め、48 時間までにもとのレベルまで回復した。空胞化とも一致し、リソソームの空胞化に伴うリソソーム機能障害が示唆された。

次に、オートファジーとリソソームの状態を確認するため、濃度依存的に 0~1mM48 時間曝露のサンプルを電気泳動し、LC-3 の活性化を確認したところ、1mM48 時間曝露では顕著に LC3-II が増加しており、オートファジーの活性化を示唆する結果であったが、分解されるはずの p62 も増加していた。このことからオートファジーの後半過程であるリソソームによるタンパク分解が阻害されているものと考えられた。リソソームマーカーである LAMP1 も増加しており、リソソームの増加が示唆された。

濃度を 1 mM に固定し、0~48 時間 の経時的变化を確認したところ、LC3-II、p62 のいずれも経時的に増加し、LAMP1 は 3~12 時間では減少し 48 時間では原状に復帰しているように思われた。これらは先程の成熟カテプシン L の動態とも一致していると考えられた。これらの結果から MAP 曝露の間にオートファジーは活性化されるのではなく阻害されているものと考えられた。

細胞内に蓄積されたオートファゴソームと p62/Nrf2/HO-1 と抗酸化経路の関連を調べるため、MAP 刺激 48 時間の細胞を LC3、p62、ユビキチン抗体で免疫染色し、顆粒への局在を確認したところ、LC3 と p62、ユビキチンの局在が一致した。p62/Nrf2/HO-1 経路の活性化を確認するため、GFP-Nrf2 導入した細胞に MAP 刺激を行ったところ、Nrf2 の核移行を認め、活性化されているものと考えられた。また、HO-1 の経時的变化を調べたところ、3 時間から 24 時間まで増加が認められた。抗酸化蛋白である HO-1 の発現増加による抗アポトーシス作用を確認するためにカスパーゼ 3 の評価を行ったところ、HO-1 阻害薬である SnPP 添加群では MAP 刺激時にアポトーシスが誘導されていた。

次に、0~1mM まで MAP 曝露し、48 時間経過した細胞のサンプルを用いて CBB 染色を行った所、約 250kDa の位置のバンドが薄くなっているのが観察された。このバンドを同定するために MALDI/TOF/MS 解析をしたところ、 $\alpha$  ミオシン重鎖 ( $\alpha$  MHC) であることが判明した。ウェスタンブロットでも MHC の減少を確認したが、この MHC の減少は同じフェネチルアミンのノルエフェドリンでは認められなかった。

MHC に対するユビキチンリガーゼである MURF1 と Atrogin の発現変動を調べたところ、どちら

も有意な発現上昇がみられ、ミオシン重鎖のユビキチン・プロテアソームシステムによる分解も起きていると推察された。また MHC  $\alpha$ 、 $\beta$  の遺伝子発現の経時変化を調べたところ、どちらも経時的に発現が低下していた。

最後に、MAP 暴露時にユビキチンプロテアソームシステムによる MHC 分解が起きているのか確認するために免疫沈降を行った。プロテアソーム阻害剤である MG132 処理した細胞ではユビキチン化されたミオシン重鎖は検出されなかったが、MAP 曝露+MG132 添加ではユビキチン化されたミオシン重鎖が観察された。

#### <考察>

細胞質内の空胞は ER やエンドソームやリソソームなどを起源とする。神経系の細胞にメタンフェタミン (MAP) 暴露をおこなった先行研究で細胞質内の空胞形成が報告されている。MAP 中毒者や MAP 投与動物モデルの心筋でも空胞が報告されているが、その起源は解明されていない。今回、本研究において心筋細胞内の空胞はリソソームマーカーである LAMP1 と一致しており、リソソーム由来と判明した。

過剰なユビキチン化蛋白は不溶性集合体を形成しプロテアソームでは分解されない。これらのユビキチン化集合体はオートファジーによって分解される。MAP 暴露時に細胞内顆粒が LC3, p62 陽性であり、p62 分解ができなくなっていることから、オートファジーがリソソームによるタンパク分解の途中のステップで障害されていると推測される。MAP 暴露時にリソソームの主要なタンパク分解酵素であるカテプシン L を成熟体に変化させる過程が徐々に障害されているというデータから、これらが裏付けられる。また、p62 はオートファジーにおける基質だけでなく、Nrf2 転写因子の活性化の役割も担っている。核内に移行した Nrf2 は HO-1 を含む抗酸化酵素を誘導する。本実験においても Nrf2/HO-1 経路が誘導されていたのは、オートファジー障害に対して細胞保護的な作用を果たしているものと考えられる。

また、本研究で確認された MAP 暴露による心筋細胞でのミオシン重鎖 (MHC) の発現低下及び MHC のユビキチン化は初めての報告である。MAP 暴露時には MHC は E3 リガーゼによりユビキチン化され、プロテアソームで分解されることを示唆し、これらは骨格筋や心筋の委縮時に起きる現象である。結果として、MAP 投与された動物モデルや MAP 中毒者の心筋において心筋細胞の配列の乱れなどがみられるが、それにも関与していると推察される。今回は HL-1 細胞において、 $\alpha$ -および  $\beta$ -MHC の mRNA の減少がみられた。MHC の半減期は長く、ラットでは通常数日と考えられている。プロテアソームを通じた MHC 減少に続き、MHC の発現低下により、心筋内では長期に MHC 低下が起こると考えられる。

我々の研究によって、MAP 投与の動物実験や MAP 中毒者の剖検時の心臓に認められる心筋変性の分子学的な機構を下記の様に推測出来た。MAP 暴露による心筋障害及び障害応答は①リソソームの空胞化②オートファジーの遂行不全とそれに伴う顆粒形成③ミオシン重鎖タンパク質のユビキチン・プロテアソームによる分解と遺伝子発現量の低下、などによると推察された。

# 論文審査の要旨および担当者

報告番号	甲第 4897 号	船越 泉
論文審査担当者	主査 清水 重臣 副査 安原 真人、中田 隆夫	
(論文審査の要旨)		
<b>1. 論文内容</b>		
本論文は、覚醒剤であるメタンフェタミンの心毒性に、リソソームやオートファジーの機能不全、ならびにミオシン重鎖タンパク質のユビキチン・プロテアソーム系による分解が関与している可能性を示した論文である。		
<b>2. 論文審査</b>		
<u>1) 研究目的の先駆性・独創性</u>		
メタンフェタミンによる死因の一つとして心毒性があることは良く知られているが、その分子機構は余り解明されていない。本研究は、心毒性の原因として、リソソームやオートファジーの機能不全、ならびにミオシン重鎖タンパク質のユビキチン・プロテアソーム系による分解が関与している可能性を発見したもので、高く評価できる。		
<u>2) 社会的意義</u>		
本研究で申請者が発見した主な結果は以下の通りである。		
1. 心房心筋由来細胞であるHL-1細胞にメタンフェタミンを投与すると、リソソームの空胞化、リソソーム機能の低下、オートファジーの機能不全が生じること。		
2. また、ミオシン重鎖タンパク質がユビキチン・プロテアソーム系によって分解され、タンパク質発現量が低下すること。		
細胞レベルで同定したこれらの変化は、ヒト臨床における心筋変化の一部を説明するものであり、心毒性の発症機序の一端を明らかにしたものとして、有用な研究成果である。		
<u>3) 研究方法・倫理観</u>		
本研究は、十分な法医学、細胞生物学の知識のもとに遂行されており、申請者の研究方法に対する知識と技術力が極めて高いことが窺われる。		
<u>4) 考察・今後の発展性</u>		
申請者は、本研究結果を受けて、以下のように考察している。即ち、今回見出された知見はあくまで細胞レベルのもので、ヒトに摂取された場合には副次的な現象も同時に起こることが予想される。しかしながら、ミオシン重鎖タンパク質の減少などは、ヒト臨床例でも見られて		

おり、少なくとも心毒性の一端は解明されたものと考えている。この考察は、得られた結果を鑑みて妥当なものである。今後、生体レベルでの心毒性機構解析が望まれる。

### **3. 審査結果**

以上を踏まえ、本論文は博士（医学）の学位を申請するのに十分な価値があるものと認められた。