

フェネチルアミン誘導体の毒性機序 に関する研究

森 川 嘉 文

2019 年

目次

序論	1 頁
第 1 章 シブトラミンによる ROS 及び RNS の産生変動を介した血管内皮細胞 アポトーシスの誘導	7 頁
第 1 節 緒言	
第 2 節 実験材料及び実験方法	
第 3 節 結果	
第 4 節 考察	
第 2 章 シブトラミンによる活性酸素の産生亢進を介した血管平滑筋細胞の アポトーシス及び細胞収縮の誘導	36 頁
第 1 節 緒言	
第 2 節 実験材料及び実験方法	
第 3 節 結果	
第 4 節 考察	
第 3 章 ピロリジノフェノン誘導体によるヒト血管内皮細胞毒性の構造活性 相関解析	54 頁
第 1 節 緒言	
第 2 節 実験材料及び実験方法	
第 3 節 結果	
第 4 節 考察	
第 4 章 抗酸化能の変動を介した α -pyrrolidinononanophenone による神経細胞 アポトーシスの誘導	68 頁
第 1 節 緒言	
第 2 節 実験材料及び実験方法	
第 3 節 結果	
第 4 節 考察	
総括	91 頁
謝辞	96 頁
参考文献	97 頁
略語表	120 頁
論文目録	124 頁

序論

薬物乱用は我が国における最も深刻な社会問題の 1 つであり、その乱用者数は依然として多い (Fig. 1)。乱用される薬物としては、覚醒剤や大麻、麻薬の 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) やコカインといった規制薬物だけでなく、向精神薬や風邪薬、鎮痛薬等の入手可能な処方箋医薬品まで多種多様であるが、その中でも、覚醒剤メタンフェタミンに代表されるフェネチルアミン誘導体は戦後一貫して乱用薬物の大きな割合を占めている。

フェネチルアミンは内在性芳香族アミンの一種であり、その誘導体も同様に真菌類や植物、動物の体内で産生される。代表的なフェネチルアミン誘導体としてモノアミン系神経伝達物質 (ドパミン、ノルアドレナリン、アドレナリン) や芳香族アミノ酸 (フェニルアラニン、チロシン) 等が知られている¹⁻³⁾。また、多くの誘導体が有機化学的に合成され、それらは多様な薬理活性を示すことが報告されている⁴⁾。それ故、フェネチルアミン誘導体は抗うつ薬や気管支拡張薬、覚醒剤、幻覚剤等、様々な目的で用いられており (Fig. 2)、それらの薬理作用機

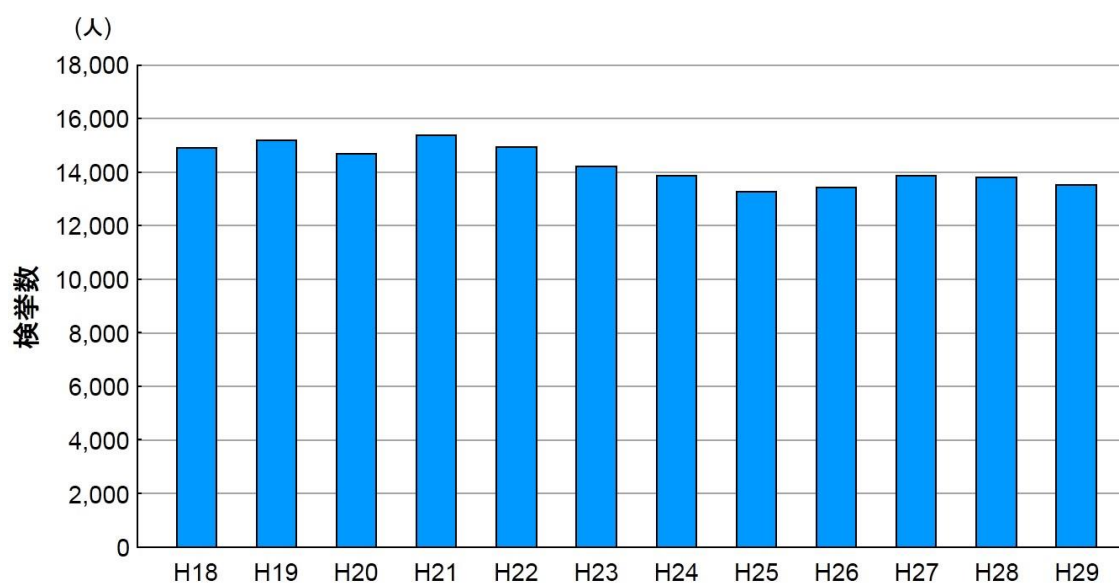


Fig. 1. 日本の全薬物事犯検挙人員の推移 (平成 18 年～平成 29 年)

「警察庁、厚生労働省、海上保安庁 (厚生労働省集計) 調べ」を基に作成

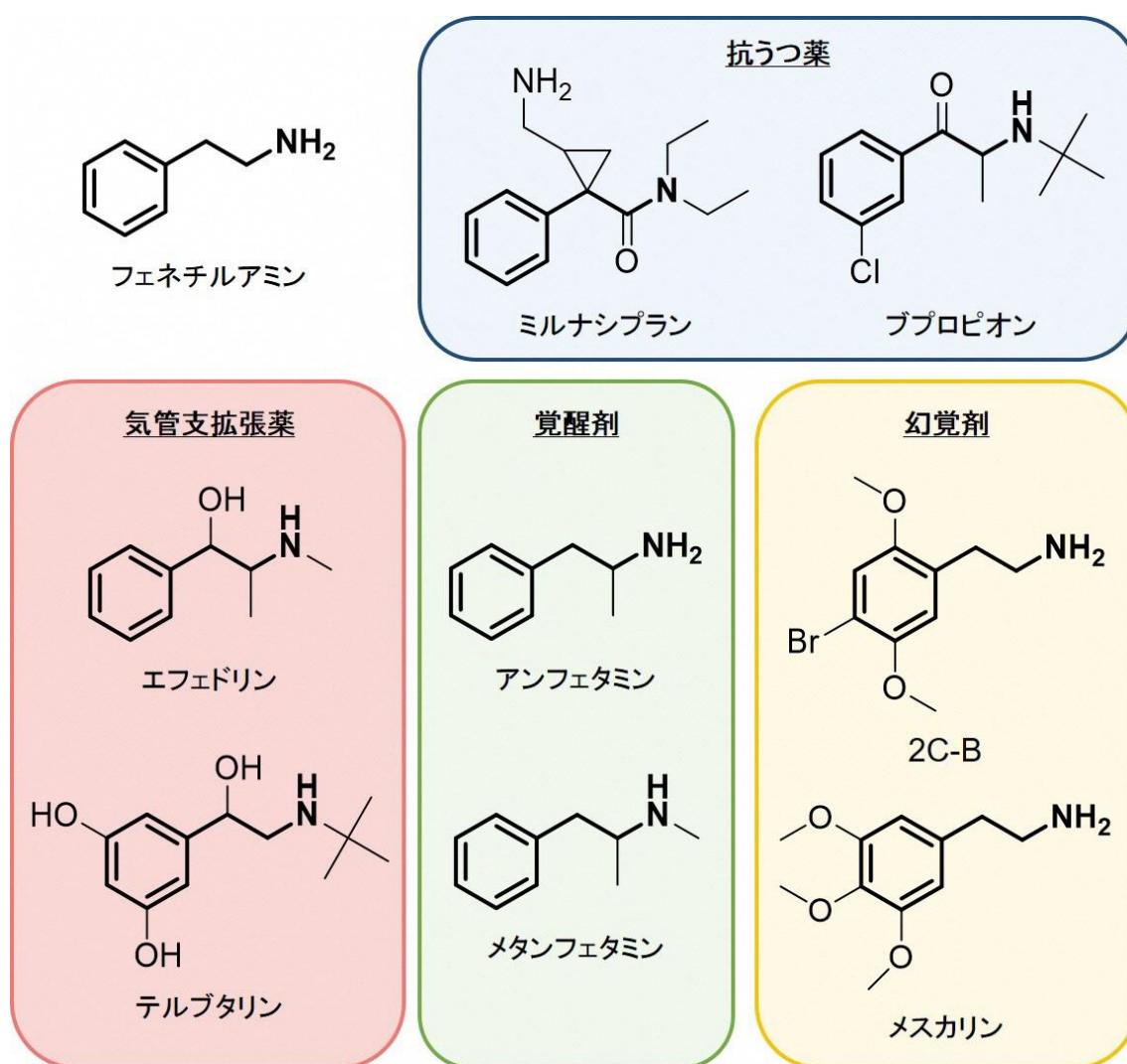


Fig. 2. フェネチルアミン誘導体の構造及び用途

序は主にモノアミン神経伝達物質の調節であると考えられている⁵⁾。実際に、フェネチルアミン誘導体は、その構造類似性により神経終末からの神経伝達物質(ドパミン、ノルアドレナリン、セロトニン)の放出促進や再取り込み阻害、モノアミン酸化酵素阻害作用を有する場合が多い⁵⁻⁷⁾。加えて、化学構造が単純であり置換基による修飾が比較的容易であることから、新規精神賦活物質の親化化合物として対象になることが多く、今後も新規フェネチルアミン誘導体の密造・乱用が予想される。最近では、覚醒剤の類似化合物かつフェネチルアミン誘導体である合成カチノンが、インターネット等を介して密造・販売され世界

的にも大きな問題となっている⁸⁾。一方、フェネチルアミン誘導体は食欲抑制作用を示すものも多数存在することから、今までに痩身薬として様々な誘導体が合成されている (Fig. 3)。実際に、それらは多くの国々で承認を受け流通・販売されたものの、その多くが有害な副作用の発生により承認取消等を受け市場から撤退している⁹⁾。しかしながら、未だにシブトラミンを始めとしてそれら未承認痩身薬は個人輸入できる状態にあることに加え、その含有を標榜していない所謂「痩せ薬」や「ダイエットサプリメント」から検出される事案が多数報告されていることから¹⁰⁻¹²⁾、それらの不適切及び偶発的な使用すなわち乱用による健康被害等の有害事象や薬物事犯の発生が懸念されている。

シブトラミンは、元来セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬として開発されたフェネチルアミン誘導体の一種である。同化合物は、治験の段階で抗うつ薬としての有用性は見出されず、代わりに強力な食欲抑制・体重減少作用が認められたため、欧米各国で抗肥満薬として承認され広く処方された¹³⁾。また、シブトラミンの機序研究の結果、その主要な薬理作用は、エネルギー消

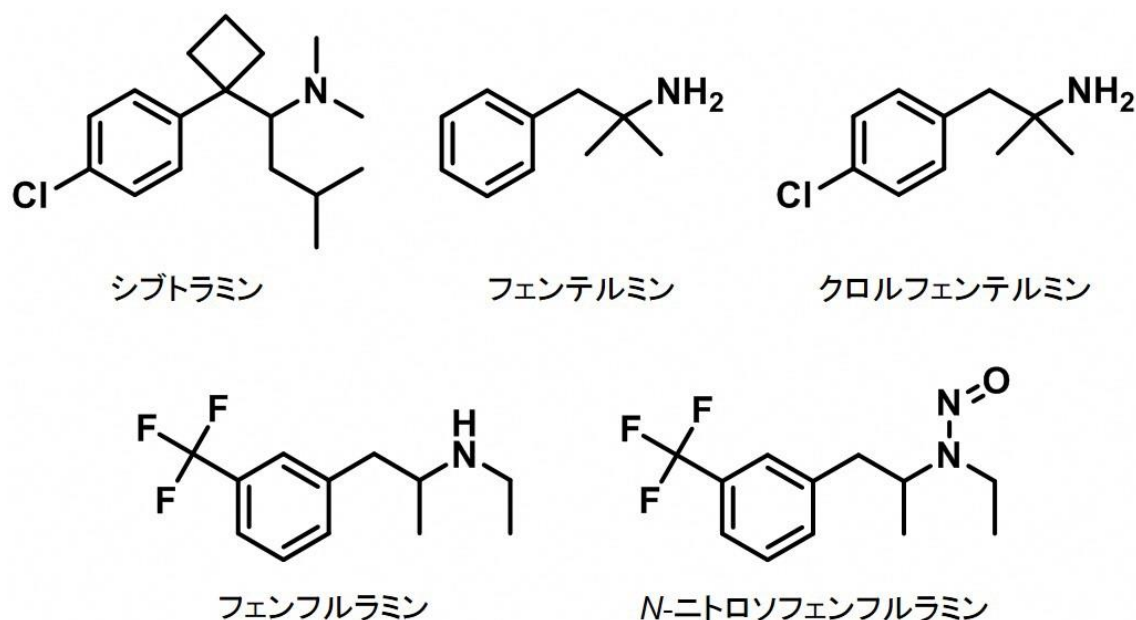


Fig. 3. 痩身薬 (フェネチルアミン誘導体) の構造

費の亢進と満腹感の獲得及びそれに伴う食事摂取量の抑制であることが示された¹⁴⁻¹⁶⁾。しかしながら、市販後に心血管系に対する有害事象（高血圧、頻脈、不整脈等）が多数報告されたため、心血管疾患の罹患歴のある患者を対象とした5年間の臨床試験（Sibutramine Cardiovascular and Diabetes Outcome Study, SCOUT）試験が実施された¹⁷⁾。その結果、シブトラミンは非致死性の心筋梗塞や脳卒中を著明に増加させることが示唆されたことから、現在、欧米ではシブトラミンの製造・販売が中止されている。また、シブトラミンの長期使用は、頭痛や便秘、眩暈等の副作用を高頻度で誘発するだけでなく、高血圧の罹患率や死亡率と正の相関を示すことも報告されている¹⁸⁾。一方で、肥満患者の多いブラジル等の国では未だに薬物療法に用いられており^{19,20)}、リスクとベネフィットのバランスの捉え方が各国によって異なるのが現状である。また前述の通り、シブトラミンは未だにインターネット等を介して流通しており、それらの中には承認時に定められていた最大服用量を大幅に超えるものも存在することから²¹⁾、シブトラミンの継続的かつ過剰な摂取による高血圧等の循環器疾患の誘発が懸念される。しかしながら、それらのシブトラミンによって惹起される循環器障害の発症機序及び心血管系に対する影響の詳細については不明な点が多い。

カチノンは、カート (*Catha edulis*) の葉から発見された生理活性を有するフェネチルアミン誘導体である。その精神賦活性からカートは東アフリカやアラビア半島北東部で伝統的に用いられており、生葉を咀嚼することでカチノンが抽出され、その中枢神経刺激作用による高揚感や多幸福感が得られる²²⁾。薬理作用機序としては、構造が類似している覚醒剤アンフェタミンと同様にモノアミン神経伝達物質の再取り込み阻害及びモノアミン酸化酵素阻害作用が知られている²³⁻²⁵⁾。しかし、カチノンは β 位にカルボニル基を有するため、アンフェタミンと比較して疎水性及び血液脳関門 (blood-brain barrier, BBB) の透過性が低いと考えられている²⁶⁾。加えて、カルボニル基の還元によるカチンへの代謝も比

較的速やかに行われることから、カチノンの精神作用はアンフェタミンよりも弱いとされている²⁷⁻³⁰⁾。そのため、カチノンは覚醒剤の代用となることは少ないと考えられていたが、2000年頃からカチノンと比較して強力な精神作用を示し法規制の対象とならない合成カチノンが注目を集め始め、覚醒剤の代替品及びレクリエーションドラッグとして世界中で流行した²²⁾。合成カチノンとは Fig. 4 に示すように、主に直鎖炭化水素鎖の伸長やベンゼン環の修飾、アミノ基のアルキル化（アルキル化アミンへの置換）が施されたカチノンを指し、国連によれば、毎年新たに合成される新規合成カチノンは推定で 200 種類以上に達すると報告されている³¹⁾。その中でも特に、 α -pyrrolidinovalerophenone (α -PVP) 及び 3,4-methylenedioxypropylvalerophenone (MDPV) に代表されるピロリジノフェノン誘導体 (pyrrolidinophenones, PPs) は最も流行した合成カチノンの一種であり、アミノ基がピロリジノ基に置換されているため疎水性が上昇し、高い臓器移行性を獲得している³²⁾。基本的に、その他の修飾によっても脂溶性が増加することから、合成カチノンの多くはカチノンと比して精神作用及び有害な副作用を強く

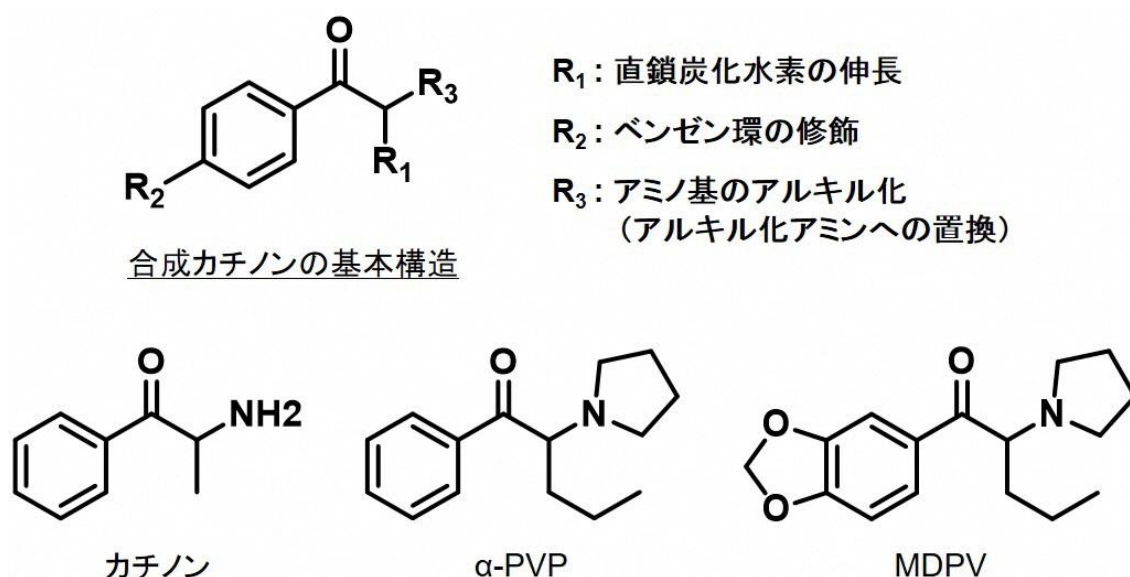


Fig. 4. 合成カチノンの基本構造及び代表的な合成カチノンの構造

発現すると考えられている^{8,33)}。合成カチノンによる副作用としては、幻覚や扇動、うつ病、パラノイア等の精神性の有害作用だけでなく、嘔吐や頻脈、高血圧、横紋筋融解症等の体性の有害作用も多数報告されているが^{34,35)}、それら副作用の発症機序の詳細については未だ解明されていない。合成カチノンの薬理作用機序は基本的にカチノンと同様であるが、置換基の違いによって主に作用するモノアミン神経伝達物質の種類が異なるため、精神作用についても置換体毎に異なるとされている^{22,36)}。しかしながら、合成カチノンの毒性に対する置換基修飾による影響についてはほとんど報告されていない。

そこで本研究では、乱用が問題とされる上記フェネチルアミン誘導体の毒性機序及び副作用発症機序の解明を目的として、第 1 章では、シブトラミンが血管系に対して有害な副作用を誘発することに着目し、ヒト血管内皮細胞に対する細胞傷害作用を調査した。また、その毒性機序に対して活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) や活性窒素種 (reactive nitrogen species, RNS) が関与する可否かを検討した。第 2 章では、高血圧等の循環器疾患への関与が知られるヒト血管平滑筋細胞への影響を調べることを目的に、シブトラミンによる血管平滑筋細胞毒性及び細胞収縮活性を評価した。第 3 章では、PPs の細胞毒性を 10 種の細胞種を用いて検討し、その中で感受性の高かった細胞種における PPs の細胞毒性と置換基の構造活性相関解析を行った。第 4 章では、 α -PVP の直鎖炭化水素鎖が更に伸長した最新 PPs である α -pyrrolidinononanophenone (α -PNP) の神経細胞毒性機序を解明すべく、抗酸化能や異物代謝能 (プロテアソーム及びオートファジー機構) に着目して種々検討を行った。

第1章 シブトラミンによる ROS 及び RNS の産生変動を介した血管内皮細胞アポトーシスの誘導

第1節 緒言

序論でも述べた通り、シブトラミンは、抗肥満薬として処方されていたセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害剤であり、その薬理作用はエネルギー消費の亢進及び満腹感の増加、そしてそれに伴う食事摂取量の減少である^{15,16)}。また、シブトラミンは消化管で吸収された後、肝臓にて薬理活性代謝物である *N*-デスメチルシブトラミン及び *N*-ジデスメチルシブトラミン (Fig. 5) に代謝される。さらに、それらは水酸化や抱合体化を受け不活性代謝物へと変換された後、主に尿中へ排泄される³⁷⁻⁴⁰⁾。一方、シブトラミンの継続的な摂取は、高頻度で有害な副作用 (頭痛、便秘、眩暈等) を誘発することが知られており、近年、それら副作用の中でも高血圧が多大な注目を集めている。その理由として、心血管疾患を持つ患者を対象にした 5 年間の追跡調査によって、シブトラミンは非致死性の心筋梗塞や脳卒中リスクを有意に増加させることが示唆されたからである^{17,41)}。加えて、長期臨床試験の結果、シブトラミンの使用は、高血圧の罹患率と正の相関を示すことも最近報告されている¹⁸⁾。その高血圧発症機序としては、シブトラミンがセロトニンと比較してノルアドレナリンの再取り込み

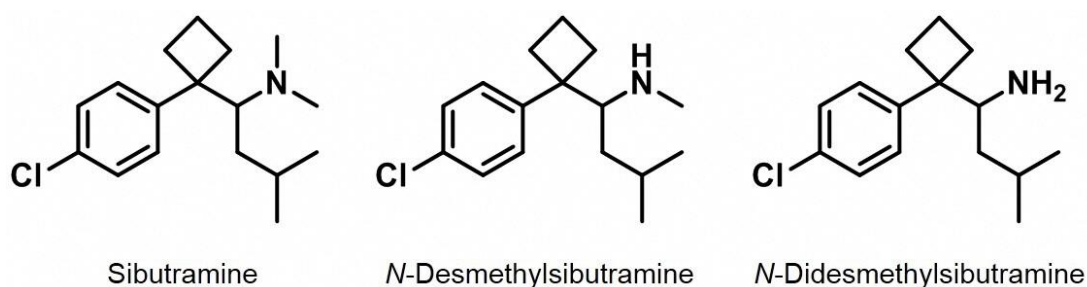


Fig. 5. Structure of sibutramine and its *N*-desmethyl metabolites.

をより強力に阻害することに伴うノルアドレナリンの蓄積が主な要因であると考えられている^{37,42)}。また、血圧の制御に関連する交感神経非依存性経路としては、一酸化窒素 (nitric oxide, NO) や ROS、プロスタサイクリン、エンドセリン等のいくつかの液性因子が知られている^{43,44)}。しかしながら、これら液性因子の分泌を介して血管緊張の制御において中心的な役割を担う血管内皮細胞の生存率や機能に及ぼすシブトラミンの効果については未だ明らかにされていない。

そこで本章では、シブトラミン処理によってヒト血管内皮 (human aortic endothelial, HAE) 細胞のアポトーシスが惹起されるか否かを調査した。また、ROS 及び RNS の産生に着目してシブトラミンによるアポトーシス誘導機序の詳細について探索した。さらに、シブトラミンの代謝と細胞毒性の関連性を解明するために、血管内皮細胞のシブトラミン代謝能と代謝物による細胞毒性を検討した。

第2節 実験材料及び実験方法

1. 実験材料

本実験に使用したシブトラミンは Alexis Biochemicals 社 (San Diego, CA, USA)、*N*-デスメチルシブトラミン及び *N*-ジデスメチルシブトラミンは Tronto Research Chemicals 社 (Toronto, Canada) より購入した。また、毒性比較に用いたフェンテルミンは東京化成工業 (Tokyo, Japan)、フェンフルラミンは Sigma-Aldrich 社 (St. Louis, MO, USA)、*N*-ニトロソフェンフルラミンは和光純薬工業 (Tokyo, Japan) のものを用いた。実験に使用した HAE 細胞は Clonetics 社 (Walkersville, MD, USA)、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞、ヒト胎児腎由来 HEK293 細胞、ヒト肝由来 Chang Liver 細胞、ヒト急性リンパ芽球性白血病 Molt4 細胞は American Type Culture Collection 社 (Manassas, VA, USA)、ヒト神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞は RIKEN Cell Bank 社 (Tsukuba, Japan) より購入した。HAE 細胞の培地として用いた Endothelial Cell Basal Medium-2 (EBM-2) キットは PromoCell 社 (Heidelberg, Germany) より購入した。HepG2 細胞、HEK293 細胞、Molt4 細胞の培地として用いた Dulbecco's-modified Eagle's minimum essential medium (DMEM)、SK-N-SH 細胞に使用した minimum essential medium (MEM) α は和光純薬工業から購入した。また、penicillin-G potassium は Meiji Seika ファルマ (Tokyo, Japan)、streptomycin sulfate はナカライテスク (Kyoto, Japan)、熱非働化ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) は HyClone 社 (Logan, UT, USA) のものを使用した。コラーゲンコートに用いた Cellmatrix Type I-P は新田ゼラチン (Osaka, Japan) より購入した。毒性試験に用いた 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium sodium salt (WST-1) は和光純薬工業、*N*-acetyl-L-cysteine (NAC)、Z-Leu-Leu-Leu-CHO (MG132)、diethylenetriamine NONOate (DETA)、Carboxy-PTIO は Sigma-Aldrich 社より購入した。RNA の抽出に用いた TRIzol 試薬はコスモ・バイオ (Tokyo, Japan)、ReverTra Ace

qPCR RT Master Mix kit は東洋紡 (Osaka, Japan)、ウエスタンブロット解析に用いた ECL enhanced chemiluminescence detection kit は GE ヘルスケア社 (Buckinghamshire, UK)、bicinchoninic acid protein assay kit は Pierce 社 (Rockford, IL, USA)、タンパク質分子量マーカーはナカライテスク、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜は Millipore 社 (Billerica, MA, USA) のものを用いた。また、一次抗体として β -actin は Cell Signaling Technology 社 (Beverly, MA, USA)、Bax 及び CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP) は Santa Cruz Biotechnology 社 (Santa Cruz, CA, USA)、Bcl-2 は BD Biosciences 社 (San Jose, CA, USA)、endothelial NO synthase (eNOS)、pS1177 eNOS、pT495 eNOS 及び inducible NOS (iNOS) は Transduction Laboratories 社 (Lexington, KY, USA) のものを使用した。Polymerase chain reaction (PCR) に用いた SYBR Green II 試薬と Taq DNA ポリメラーゼはタカラバイオ (Shiga, Japan)、100 bp DNA ladder marker はカーク (Aichi, Japan) のものを使用した。電気泳動用アガロースゲルはナカライテスクより購入した。細胞の回収及び洗浄には日水製薬 (Tokyo, Japan) の Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) を用いた。活性測定用の基質として使用した *N*-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylcoumarin (AMC) 及び *N*-succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC は Sigma-Aldrich 社より購入した。蛍光プローブ 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) は Molecular Probes 社 (Eugene, OR, USA)、diaminofluorescein-2 diacetate (DAF2-DA) は第一化学薬品 (Tokyo, Japan)、5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) は Invitrogen 社 (Carlsbad, CA, USA) より購入した。TUNEL 染色に用いた ApoAlert DNA fragmentation assay kit は Clontech 社 (Mountain, CA, USA) から購入した。Cytochrome P450 (CYP) 3A4 のノックダウンに用いた duplex small-interfering RNA (siRNA) は Sigma-Aldrich 社、Opti-MEM 及び Lipofectamine 2000 はそれぞれ GIBCO Laboratories 社 (Grand Island, NY, USA) 及び Life Technologies 社 (Carlsbad,

CA, USA) のものを使用した。CYP3A4 阻害剤として使用したケトコナゾール (ketoconazole, KTZ) は Sigma-Aldrich 社、ドセタキセル (docetaxel, DTX) は東京化成工業、ベラパミル (verapamil, VPM) は和光純薬工業より購入した。その他は和光純薬工業及び Sigma-Aldrich 社の特級試薬を用いた。水は全て精製水を使用した。

2. 細胞培養

2-1. 細胞培養

HepG2 細胞、HEK293 細胞及び Molt4 細胞は 37°C、5% CO₂ 条件下の炭酸ガスインキュベーター内で培養し、2 日毎に培地を交換して 4~6 日毎に継代維持した。増殖培地として 10% FBS、100 unit (U)/mL penicillin-G potassium 及び 100 µg/mL streptomycin sulfate を含む DMEM (pH 7.4) を用いた。接着細胞の剥離には 0.25% トリプシン及び 0.02% ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt (EDTA) を含む DPBS (pH 7.4) を用いた。HAE 細胞及び SK-N-SH 細胞の剥離には 0.05% トリプシン及び 0.02% EDTA を含む DPBS (pH 7.4) を用い、トリプシン処理を停止するために同量の培地を添加した。なお、HAE 細胞や SK-N-SH 細胞は Type-I コラーゲンコートディッシュに播種して継代維持した。また、HAE 細胞の実験前には血管内皮細胞特有の敷石状の形態を顕微鏡下で確認し、8 継代目まで実験に使用した。

2-2. 発現抑制細胞の調製

HepG2 細胞における CYP3A4 の発現抑制細胞は、50%コンフルエントに達した細胞に対して siRNA を Lipofectamine 2000 を用いて導入し、48 時間培養することによって樹立した。対照細胞は scramble siRNA を同様に細胞内に導入することによって調製した。対象遺伝子の発現抑制は後述の Real-time PCR 法により確認した。

3. 細胞生存率の測定⁴⁵⁾

増殖培地に懸濁した細胞を 96 ウェルマルチプレート中に 2×10^4 cells/200 μ L ずつ播種し、CO₂ インキュベーター内で培養した。80%コンフルエントに達した後、培地を抗生物質と低血清 (HAE 細胞では 0.5% FBS 含有) のみを含む処理培地に交換して 2 時間培養後、培地中に試料を添加してさらに 24 時間培養した。なお、対照群として培地のみ (blank) と dimethylsulfoxide (DMSO) を添加した細胞 (100% control) を調製した。次に、5 mM WST-1 及び 0.2 mM 1-methyl-5-methylphenazinium methylsulfate を含む 20 mM HEPES-NaOH (pH 7.4) 溶液を添加して 37°C、3 時間培養した後、マイクロプレートリーダー Model 680 (Bio-Rad Laboratories 社, Hercules, CA, USA) を用いて測定波長 415 nm 及び対照波長 655 nm の吸光度を測定した。細胞生存率 (%) は以下の式により算出した。

$$\text{細胞生存率 (\%)} = (S - A) / (B - A) \times 100$$

S : 試料及び細胞を添加したウェルの吸光度

A : 培地のみを添加したウェルの吸光度 (blank)

B : DMSO のみを添加したウェルの吸光度 (100% control)

4. DNA の断片化及びミトコンドリア膜電位の測定

DNA の断片化の検出では、細胞をトリプシン処理にて剥離し、回収した細胞を DPBS で洗浄した。70% エタノールに再懸濁し、-30°C、24 時間固定処理した後、ApoAlert DNA fragmentation kit を用いて TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) 染色を行った。ミトコンドリア膜電位の測定においては、細胞をトリプシン処理にて剥離し、回収した細胞を DPBS で洗浄した。2 μ M の終濃度の JC-1 を添加して 37°C、30 分間インキュベートした。その後、4% paraformaldehyde を含む DPBS で 30 分間固定処理した。染色及び固定した細胞を DPBS で 2 回洗浄した後、TUNEL または JC-1 陽性細胞を検出

するために FACSVerse フローサイトメーター (BD Biosciences 社) に供した。

5. ウェスタンブロット解析

5-1. 試料の調製

細胞を DPBS で 3 回洗浄後、セルスクレイパーを用いて細胞を剥離した。回収した細胞を 0.1% Triton X-100 を含む DPBS 中に懸濁して、氷冷下において細胞懸濁液を超音波処理 (250 W、60 秒間 × 3 回) を行い、30 分間冷却した。冷却後、細胞破碎液を遠心分離 (12,000 × g、15 分間) し、その上清を採取して細胞抽出液とした。

5-2. ウェスタンブロット解析

Laemmli の方法⁴⁶⁾に従い、ポリアクリルアミドゲルを用いた sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) により細胞抽出液を分離した後、PVDF 膜に転写した。0.1% ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) 及び 5% skim milk を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) /0.15 M NaCl (TBS) 中でインキュベートした後、膜を 1 µg/mL の一次抗体及び二次抗体を含む 0.05% Tween 20 含有 TBS (TBST) と順次反応させた。抗体反応性タンパク質は ECL enhanced chemiluminescence detection kit を用いた化学発光法にて検出した。

5-3. ドットブロット解析

ニトロチロシン含有タンパク質はサンプルテック社製 Dot blotter を用いたドットブロット法にて検出した。「5-1. 試料の調製」で調製した試料 100 µg を PVDF 膜に固定して 0.5% BSA を含む TBS 中でブロッキング処理した後、膜を 1 µg/mL ウサギ抗ニトロチロシンポリクローナル抗体 (ICN Biomedical 社, Cleveland, OH, USA) 及び二次抗体を含む TBST と順次反応させた。抗体反応性タンパク質は

ECL enhanced chemiluminescence detection kit を用いた化学発光法にて検出した。

6. Reverse transcriptase (RT)-PCR 解析⁴⁷⁾

6-1. トータル RNA の抽出

トータル RNA は TRIzol 試薬を用いて単離した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix kit を用いて、37°C、1 時間インキュベートすることにより、トータル RNA から一本鎖 cDNA を調製した。

6-2. 半定量 PCR

小胞体ストレス関連因子やプロテアソームサブユニットの発現量は半定量 PCR 法にて測定した。「6-1. トータル RNA の抽出」で調製した cDNA を鋳型とし、Taq DNA ポリメラーゼと特異的プライマー (Table 1) を用いて DNA Engine Dyad Cycler (Bio-Rad Laboratories 社) にて PCR を行った。増幅した PCR 産物を 1% アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、UV 照射下にて検出した。内標準物質として、特異的プライマー (東洋紡) を用いてヒト β -actin の cDNA を増幅した。

6-3. 定量的 Real-time PCR

各種細胞における CYP2B6 及び CYP3A4 の発現は Real-time PCR 法にて測定した。「6-1. トータル RNA の抽出」で調製した cDNA を鋳型とし、SYBR Green II 試薬と特異的プライマー (Table 1) を用いて Thermal cycler Dice Real Time PCR System (タカラバイオ) にて PCR を行った。各々の PCR 産物の threshold cycle (Ct) 値は、上記の装置のソフトウェアを用いて算出した。ヒト β -actin の特異的プライマー (東洋紡) を用いて同様に Ct 値を算出し、その値を内標準値とした。

Table 1. Primer sequences, conditions and product sizes for PCR analysis.

Genes	Forward primer	Annealing Temperature (°C)	PCR product (bp)
	Reverse primer		
β -Actin	5'-CCACGAAACTACCTTCAAC-3'	52	160
	5'-GATCTTCATTGTGCTGGG-3'		
HSP70	5'-AGGTGCAGGTGAGCTACAAGG-3'	60	145
	5'-GGTCAGCACCATGGACGAG-3'		
CHOP	5'-CAGATGAAAATGGGGGTACCT-3'	60	86
	5'-AGAAGCAGGGTCAAGAGTGGT-3'		
PA28 α	5'-CTCGGATTGAGGATGGTAAC-3'	60	185
	5'-CACCAGCTGCCGATAATCAC-3'		
PA28 β	5'-ACTCCCTCAATGTGGCTGAC-3'	60	162
	5'-GCAGGGACAGGACTTTCTCA-3'		
CYP2B6	5'-TTCAGGAGGAGGCTCAGTGT-3'	63	172
	5'-CCAAAGACGATGGATCAGAT-3'		
CYP3A4	5'-AAGTCGCCTCGAAGATACACA-3'	58	174
	5'-AAGGAGAGAACTGCTCGTG-3'		
beta5	5'-TGGCTCGGCAATGTCGAATC-3'	60	131
	5'-ACAGATCATGGTGCCCAT-3'		
beta5i	5'-GAACACTTATGCCTACGGGGTC-3'	60	173
	5'-TTTCTACTTTCACCCAACCATC-3'		

7. 細胞内 ROS 及び NO 量の測定

細胞内 ROS 及び NO 量はそれぞれ DCFH-DA 及び DAF2-DA を用いて検出した⁴⁸⁾。ROS 量の測定においては、細胞をトリプシン処理にて剥離後、回収した細胞を DPBS で洗浄し、20 μ M の終濃度の DCFH-DA を添加して 37°C、20 分間インキュベートした。4% paraformaldehyde を含む DPBS で 30 分間固定処理し、DPBS で 2 回洗浄した後、FACSVerse フローサイトメーター (BD Biosciences 社) にて DCF 陽性細胞を検出した。また、細胞内の NO 量を測定するために、細胞を DPBS で洗浄後、20 μ M の終濃度の DAF2-DA を添加して 37°C、20 分間インキュベートした。4% paraformaldehyde を含む DPBS で 3 時間固定処理し、キー

エンス (Osaka, Japan) 製オールインワン蛍光顕微鏡 (励起波長 495 nm、測定波長 515 nm) 下において DAF2 陽性細胞を検出した。また、細胞中の NO 量は細胞抽出液のタンパク質量あたりの DAF2 由来の蛍光強度として算出した。

8. 酵素活性の測定

8-1. カスパーゼ 3 活性測定⁴⁸⁾

細胞を DPBS で 3 回洗浄後、セルスクレイパーを用いて細胞を剥離した。回収した細胞を 5 mM 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio] propanesulfonic acid (CHAPS) 及び 5 mM dithiothreitol (DTT) を含む 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.4) 緩衝液に再懸濁し、26 ゲージの針を 30 回通すことにより細胞膜を破壊した。細胞破碎液を遠心分離 (12,000 × g、15 分間) し、その上清を採取して測定用試料とした。試料と等量の 0.2% CHAPS、10 mM DTT、4 mM EDTA を含む 40 mM HEPES-NaOH (pH 7.4) 緩衝液を混合し、カスパーゼ 3 の基質として 20 μM の終濃度の *N*-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-AMC を添加して 37°C、3 時間インキュベートした。遊離した AMC に由来する蛍光強度 (励起波長 380 nm, 測定波長 460 nm) を高感度マルチプレートリーダー (Promega 社, Fitchburg, WI, USA) にて測定した。

8-2. プロテアソーム活性測定

26S プロテアソーム活性はキモトリプシン様活性を指標として既報の方法⁴⁹⁾に従って行った。細胞を DPBS で 3 回洗浄後、セルスクレイパーを用いて剥離した。回収した細胞を 2 mM DTT、5 mM MgCl₂、2 mM ATP 及び 250 mM sucrose を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) 緩衝液中に懸濁し、26 ゲージ針に 30 回通すことにより細胞膜を破碎した。細胞破碎液を遠心分離 (12,000 × g、15 分間) し、その上清を採取して測定用試料とした。試料に 50 μM の終濃度の *N*-succinyl-

Leu-Leu-Val-Tyr-AMC を添加して 37°C、30 分間インキュベートし、遊離した AMC 由来の蛍光強度 (励起波長 380 nm, 測定波長 460 nm) を測定することにより 26S プロテアソーム活性を算出した。

9. 液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS/MS)

シブトラミン代謝物は LC/MS/MS 法にて同定した。検出器として LXQ ion trap mass spectrometer (Thermo Fisher SCIENTIFIC 社, Waltham, MA, USA) を装着した Prominence HPLC system (島津製作所, Kyoto, Japan) を用いた。なお、カラムには Hypersil GOLD™ C₁₈ column (Thermo Fisher SCIENTIFIC 社 ; 50 mm × 2.1 mm、5 μm particle size) を使用し、移動相には溶媒 A (10 mM 酢酸アンモニウム水溶液) と溶媒 B (メタノール) を用いた。シブトラミン代謝物を溶出するためのグラジエント勾配は以下のように設定した。流速 0.3 mL/min の条件下において試料を注入後、A : B (90 : 10) の割合で 2 分間溶出し、21 分間で A : B (6 : 94) まで溶媒 B の割合を直線的に増加させた後、同割合 (A : B = 6 : 94) でさらに 3 分間溶出した。プリカーサーイオンは、それぞれシブトラミン (m/z 280)、*N*-デスメチルシブトラミン (m/z 266)、*N*-ジデスメチルシブトラミン (m/z 252) とした。

10. タンパク質の定量

タンパク質濃度は、Bicinchoninic acid protein assay kit を用いた方法 (測定波長 570 nm)⁵⁰⁾ 及び Bradford の方法 (測定波長 595 nm)⁵¹⁾ を用いて分光光学的に測定した。検量線作成用の標準液には BSA を用いた。

11. 統計解析

各値は、特記したものを除いて、3 回以上の独立した実験の結果の平均値 ± SD で示した。各群間の統計的有意差は、Fisher's test と Student's *t*-test により評価し

た。なお、 $p < 0.05$ である場合に統計学的に有意であると判断した。

第3節 結果

1. シブトラミン処理による血管内皮細胞アポトーシスの誘導

HAE 細胞を 20 μM シブトラミンにて 0、6、12、24 及び 48 時間処理したところ、生存率は 12 時間後から減少し始め、48 時間後においては 21%にまで減少した (Fig. 6A)。また、各種濃度において 48 時間後に測定した結果、シブトラミンは 10 μM 以上の濃度において HAE 細胞の生存率を低下させることが示された (Fig. 6B)。一方、他の痩身薬 (フェンフルラミン、*N*-ニトロソフェンフルラミン、フェンテルミン) での処理は、20 μM の濃度においても HAE 細胞の生存率にほとんど影響を及ぼさなかった。シブトラミン処理の 50%致死濃度 (50% lethal concentration, LC_{50}) を調べたところ、HepG2 及び HEK293 細胞ではそれぞれ 26.7 μM 及び 12.4 μM と高値であったのに対し、HAE、SK-N-SH 及び Molt4 細胞ではそれぞれ 8.4 μM 、7.8 μM 及び 5.8 μM と低値であった。また、シブトラミン処理した HAE 細胞においてアポトーシスシグナリングの下流エフェクターであるカスパーゼ 3 の活性化 (Fig. 6C) 及びアポトーシス細胞を示す TUNEL 陽性細胞の割合の増加 (Fig. 6D) が確認されたことから、シブトラミンは血管内皮細胞に対してアポトーシスを惹起することが示された。

2. シブトラミン毒性における酸化ストレス及び小胞体ストレスの関与

今までに、Matsunaga ら⁵²⁾ はディーゼル排気ガス中に含まれる主要キノン 9,10-phenanthrenquinone (PQ) の処理が細胞内 ROS 量を増加させ、小胞体ストレスやミトコンドリア機能障害、カスパーゼ 3 依存性アポトーシス経路を活性化することを報告した。また、シブトラミンは濃度依存的に HAE 細胞内のカスパーゼ 3 を活性化させた (Fig. 6C) ことから、ROS の産生が血管内皮細胞のシブトラミン誘導アポトーシスに関与することが推察された。この仮説を検討するた

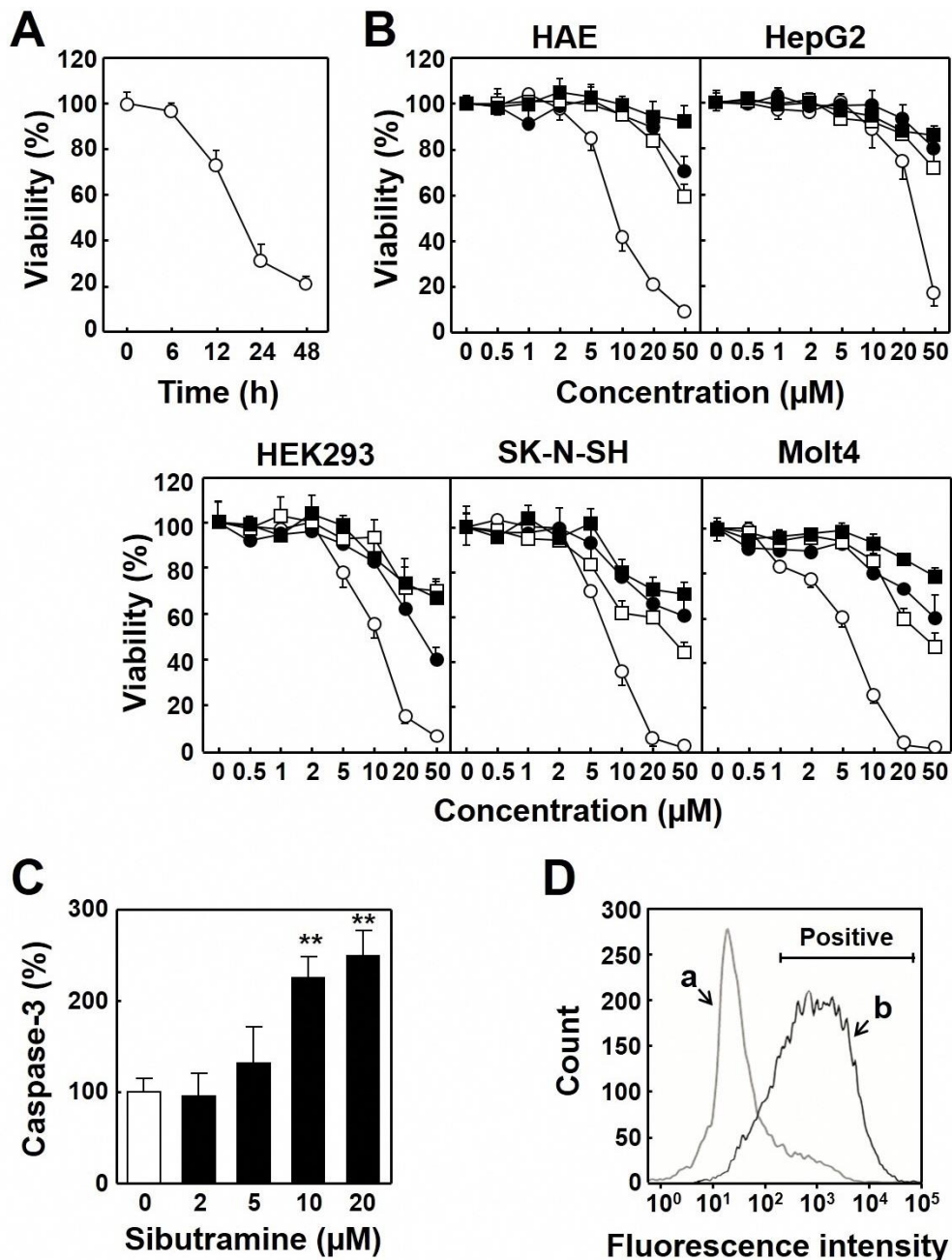


Fig. 6. Apoptosis induction in endothelial cells by sibutramine treatment.

(A) Time-course of HAE cell damage by sibutramine. The cells were treated for 0, 6, 12, 24 and 48 h with 20 μM sibutramine. (B) Concentration-response effects of sibutramine and other anorexants on cell viability. HAE, HepG2, HEK293, SK-N-SH and Molt4 cells were treated for 48 h with the indicated concentrations of sibutramine (\circ), fenfluramine (\bullet), *N*-nitrosfenfluramine (\square) or phentermine (\blacksquare). The viability is expressed as a percentage to that in the control cells treated with the vehicle alone (0 μM). (C) Activation of caspase-3. HAE cells were treated for 48 h with 0, 2, 5, 10 or 20 μM sibutramine. The caspase-3 activity is expressed as a percentage to that of the control cells (0 μM). The values of the cell viability and caspase-3 activity are expressed as the means \pm SD from three independent experiments. (D) Flow-cytometric analysis of TUNEL-stained cells. HAE cells were treated for 48 h with 0 (a) or 20 μM sibutramine (b), stained by the TUNEL method, and then applied to the flow-cytometric analysis. The analytic data are representative patterns from three independent experiments. **Significant difference from the cells treated with vehicle alone, $p < 0.01$.

め、シブトラミンの HAE 細胞毒性に対する抗酸化剤 NAC の効果を検討した。その結果、NAC による前処理は、シブトラミン誘発血管内皮細胞毒性に対して完全ではないものの有意な保護作用を示した (Fig. 7A)。また、過酸化水素 (H_2O_2) 検出用蛍光プローブ DCFH-DA を用いてフローサイトメトリー分析を行ったところ、対照細胞と比較して 20 μM シブトラミンにて 24 時間処理した細胞では DCF 陽性細胞の割合が増加した ($11.2 \pm 4.3\%$ vs $48.3 \pm 6.1\%$) (Fig. 7B)。これらの結果から、ROS 産生の亢進がシブトラミンによって誘導される血管内皮細胞アポトーシスに対して一部関与すると示唆された。

酸化ストレスによる細胞アポトーシスの一序としてミトコンドリア膜機能の低下が知られる⁵³⁾。そこで、ミトコンドリア膜機能タンパク質の発現量を調べるためにウェスタンブロット解析を行った結果、シブトラミンの 24 時間処理は抗アポトーシスタンパク質 Bcl-2 発現量の濃度依存的な減少とミトコンドリア膜の不安定化に関与するアポトーシス促進タンパク質 Bax 発現量の顕著な増加を誘起した (Fig. 7C)。そこで、シブトラミンによる ROS の産生亢進がミトコンドリア膜機能障害を誘起するか否かを調べるため、ミトコンドリア膜機能の低下に対応して赤色 (凝集体) から緑色 (単量体) に蛍光がシフトするシアニン蛍光色素 JC-1⁵⁴⁾ を用いて膜機能の変動をフローサイトメトリー分析にて調査した。その結果、シブトラミンの 24 時間処理は高い緑色蛍光強度を示す HAE 細胞数を顕著に増加させ、その増加は 2 mM NAC による前処理によって抑制された (Fig. 7D)。また、抗酸化剤による前処理は、シブトラミン処理による HAE 細胞のアポトーシス細胞死を著明に減少させた (Fig. 7E)。これらのことから、シブトラミンによる血管内皮細胞アポトーシスの誘導は、ROS の産生亢進及びそれに伴うミトコンドリア膜機能障害によって媒介されることが示唆された。

次に、小胞体ストレス関連因子 (分子シャペロン及びプロアポトーシスタンパク質 CHOP)⁵⁵⁾ の発現量を測定することにより、シブトラミンに起因するアポト

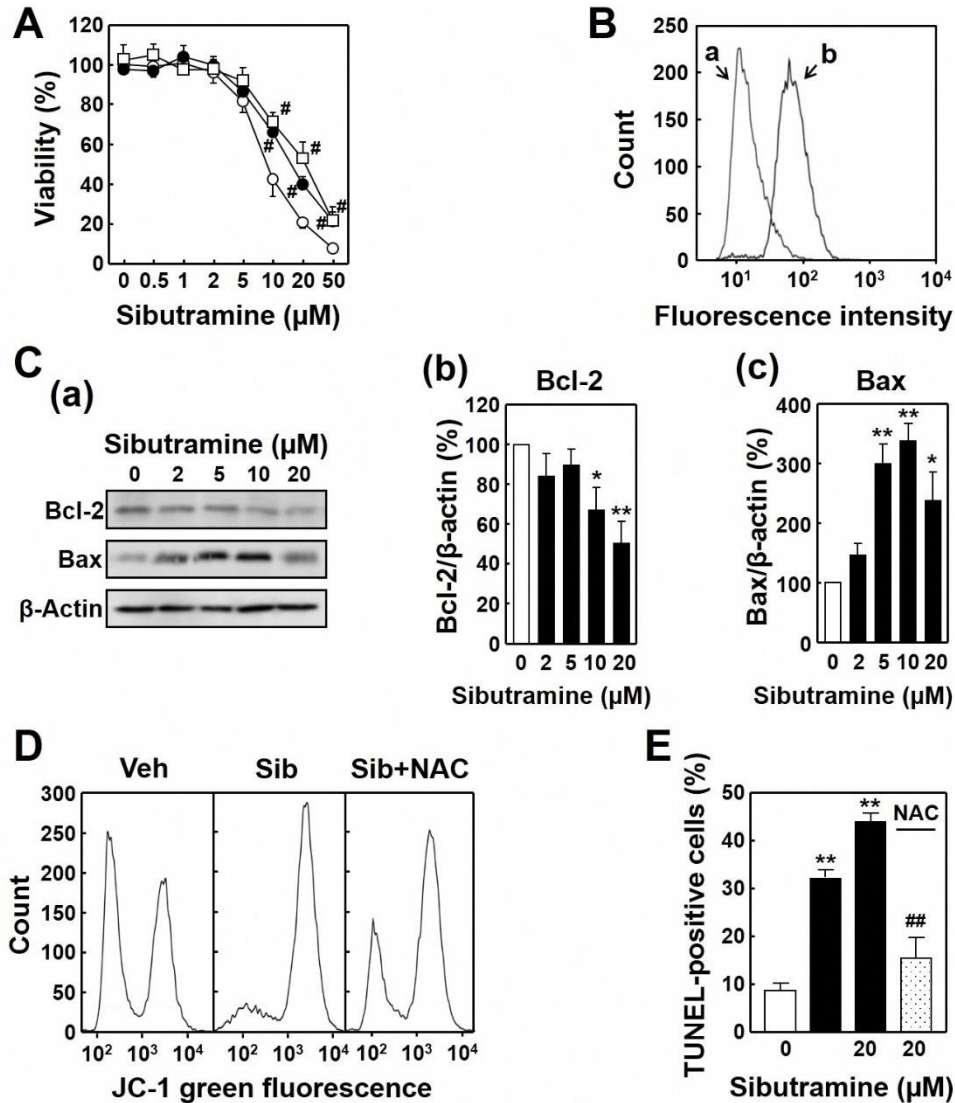


Fig. 7. Sibutramine elicits HAE cell apoptosis in a manner dependent on oxidative stress induction and dysfunction of mitochondrial membrane.

(A) Effect of antioxidant NAC on sibutramine toxicity. The cells were pretreated for 2 h with 0 (○), 0.5 (●) or 2 mM NAC (□), and then treated for 48 h with the indicated concentrations of sibutramine. The viability in the treated cells is normalized to that in the control cells (0 μM sibutramine) and expressed as the means ± SD from three independent experiments. (B) DCFH oxidation. The cells were treated for 24 h with 0 (a) or 20 μM sibutramine (b), and then subjected to flow-cytometric analysis to determine DCFH oxidation by hydrogen peroxide. (C) Change in amounts of Bcl-2 and Bax. The cells were treated for 24 h with 0, 2, 5, 10 or 20 μM sibutramine and their extracts (40 μg) were analyzed by Western blotting. (a) Representative blotting result. The band densities of Bcl-2 (b) and Bax (c) were normalized to that of β-actin, and are expressed as the means ± SD from three independent experiments. (D) Mitochondrial membrane potential. The cells were treated for 24 h with 0 (Veh) or 20 μM sibutramine (Sib). In the NAC group (Sib+NAC), the cells were pretreated for 2 h with 2 mM NAC prior to the treatment with 20 μM sibutramine. The treated cells were stained with JC-1 and then applied to the flow-cytometric analysis for monitoring the number of the cells with JC-1-derived green fluorescence. The results of these flow-cytometric analyses are representative patterns from three independent experiments. (E) Effect of oxidative stress on sibutramine-induced apoptosis. The cells were treated as described in (D) and then subjected to the flow-cytometric analysis. The number of the TUNEL-positive cells is expressed as percentages to total cells in the bar graphs. Data are expressed as the means ± SD from four independent experiments. Significant difference from the cells treated with the vehicle alone (0 μM), * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. Significant difference from the cells treated with 20 μM sibutramine, # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$.

ーシス機序への小胞体ストレスの関与を検討した。始めに、半定量 RT-PCR 法にてそれらの転写レベルを確認したところ、HAE 細胞の heat shock protein (HSP) 70 の mRNA 発現量は、シブトラミン低濃度 (2 及び 5 μM) 処理によって増加したものの、高濃度 20 μM 処理によっては著明に減少した (Fig. 8A)。対照的に、CHOP mRNA 発現量は、高濃度 (10 及び 20 μM) 処理で顕著に上昇し、同様の傾向がタンパク質レベルにおいても確認された (Fig. 8B)。

プロテアソームは、酸化ストレスや小胞体ストレスによって生成される酸化修飾タンパク質や変性タンパク質等の不要なタンパク質を分解するプロテアーゼ複合体である⁵⁶⁾。それ故、このタンパク質分解機構は、上記ストレスに対する細胞の防御機構において中心的な役割を果たすと考えられている。そこで、HAE 細胞の抽出液を用いて 26S プロテアソームのキモトリプシン様活性を測定した結果、本活性はシブトラミンの 24 時間処理により顕著に減弱し、その減弱

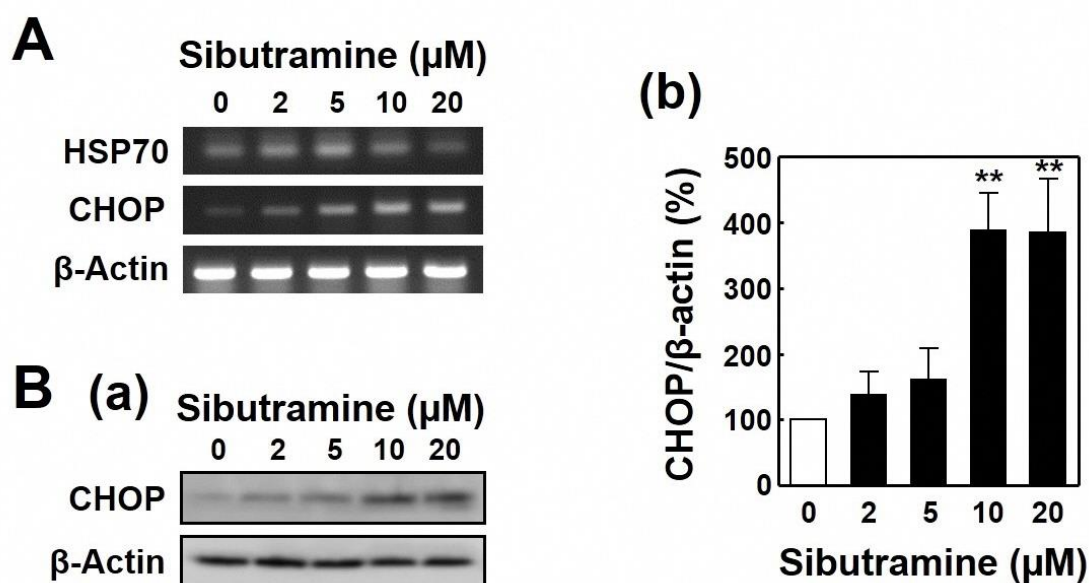


Fig. 8. Elicitation of ER stress in HAE cells by sibutramine treatment.

(A) Alteration in expression of mRNAs for ER stress-related factors. The cells were treated for 24 h with 0, 2, 5, 10 or 20 μM sibutramine and the expression levels of mRNAs for HSP70 and CHOP were assessed by semiquantitative RT-PCR analysis. (B) Change in expression of CHOP. The cells were treated as described in (A), and their extracts (40 μg) were analyzed by Western blotting. (a) Representative blotting result. The band density (b) of CHOP was normalized to that of β -actin. The PCR and Western blot data are representative patterns and the expression level is expressed as the means \pm SD from four independent experiments. **Significant difference from the cells treated with the vehicle alone (0 μM), $p < 0.01$.

は NAC の前処理によって有意に回復した (Fig. 9A)。また、シブトラミンはキモトリプシン様活性を示す触媒サブユニット beta5 及びその誘導型 beta5i の発現量を減少させたのに対し、プロテアソーム活性化因子 P28 α 及び P28 β に対しては影響を及ぼさなかった (Fig. 9B)。さらに、プロテアソーム阻害剤 MG132 の前処理によってシブトラミンの血管内皮細胞毒性は有意に増強された (Fig. 9C)。これらの結果から、ROS の産生亢進によるプロテアソーム機能障害もシブトラミンによる血管内皮細胞アポトーシスの誘導の一序であることが示唆された。

3. シブトラミン処理による NO 産生量の減少

蛍光顕微鏡下にて NO 量の変動を調べたところ、シブトラミンは HAE 細胞の NO 量を時間及び濃度依存的に減少させた (Figs. 10A 及び B)。また、HAE 細胞のシブトラミンに対する感受性は、NO ドナーである DETA の前処理によって有意に低下し、NO ラジカルスカベンジャーである Carboxy-PTIO によって増大した (Fig. 10C)。さらに、シブトラミン処理によって惹起される HAE 細胞内 NO 量の減少は、NAC の前処理によって有意に抑制された (Fig. 10B) ことから、血管内皮細胞における NO の枯渇は ROS の産生に起因し、シブトラミンによるアポトーシス誘発機序に関与すると考えられた。細胞中で生成した NO は、ROS の一種であるスーパーオキシドアニオンと反応しパーオキシナイトライト (ONOO \cdot^-) を生成し、ONOO \cdot^- はシステイン残基のチオール基を酸化するだけでなく、チロシン残基の芳香環をニトロ化することによりニトロチロシンを生成することが報告されている⁵⁷⁾。そこで、ニトロチロシン抗体を用いてドットブロット解析を行ったところ、20 μ M シブトラミン処理は、対照細胞と比較して HAE 細胞内のニトロチロシン結合タンパク質量を 1.8 倍にまで増加させた (Fig. 10D)。

血管内皮細胞において、NO は eNOS 及び iNOS によって L-アルギニンから生

成する⁵⁸⁾。そこで、シブトラミンで 24 時間処理した HAE 細胞抽出液のウェスタンブロット解析を行ったところ、濃度依存的に eNOS 発現量が減少した一方、シブトラミン処理の有無に拘らず iNOS の分子量付近にはバンドが認められなかった (Figs. 11A 及び B)。eNOS 活性は複数の残基におけるリン酸化の有無によって制御されており、特に 1177 番目のセリンのリン酸化は eNOS の NO 産生

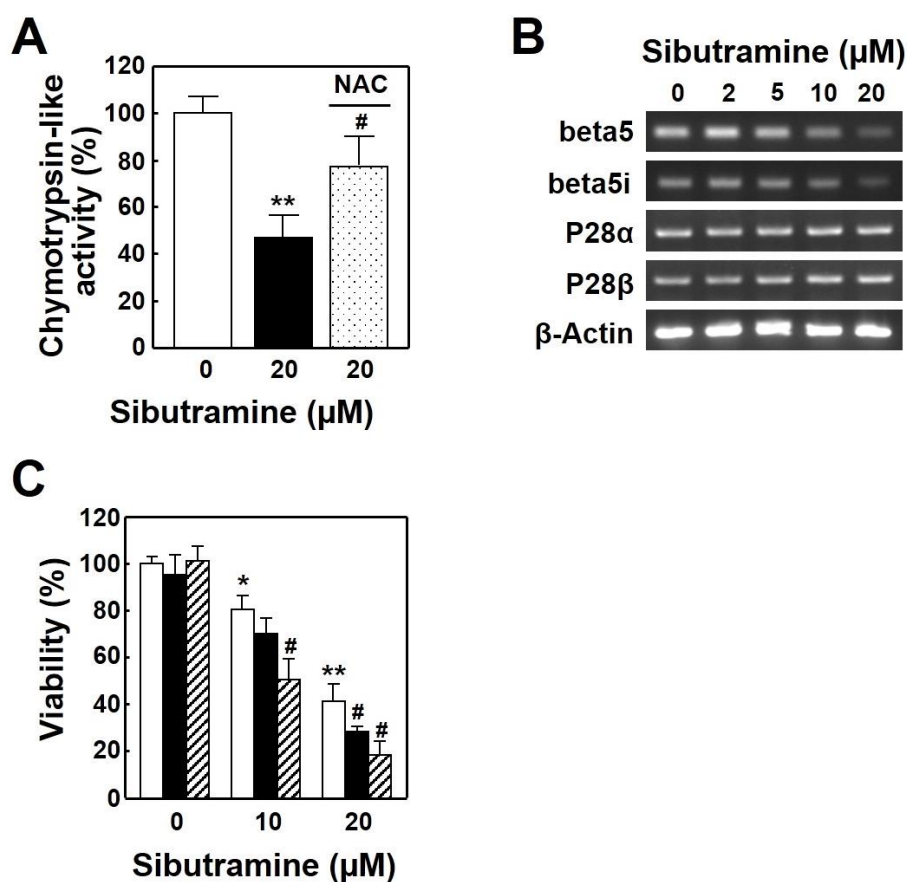


Fig. 9. Contribution of 26S proteasome to apoptotic mechanism caused by sibutramine.

(A) Decrease in chymotrypsin-like proteolytic activity of 26S proteasome by sibutramine treatment. HAE cells were pretreated for 2 h without or with 2 mM NAC, and then treated for 48 h with 20 μM sibutramine. The activity in the cell extract (100 μg) was measured, normalized to that of the control cells (0 μM), and expressed as the means ± SD from three independent experiments. (B) Expression levels of proteasome activators and subunits. The expression levels of two proteasome activators (P28α and P28β) and subunits [beta5 and its inducible type (beta5i)] were assessed by RT-PCR. The data are representative patterns from three independent experiments. (C) Effect of a proteasome inhibitor MG132 on the viability loss by sibutramine treatment. The cells were pretreated for 2 h with 0 (open bar), 0.1 (filled bar) or 0.2 μM MG132 (slashed bar) prior to the 48-h treatment with the indicated concentrations of sibutramine. The viability value is expressed as the means ± SD from four independent experiments. Significant difference from the cells treated with vehicle alone (0 μM), * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. #Significant difference from the cells treated with 20 μM sibutramine, $p < 0.05$.

を亢進し、495 番目のスレオニンのリン酸化は活性を低下させることが知られている⁵⁹⁾。従って、シブトラミン処理によってそれら 2 残基のリン酸化型 (pS1177

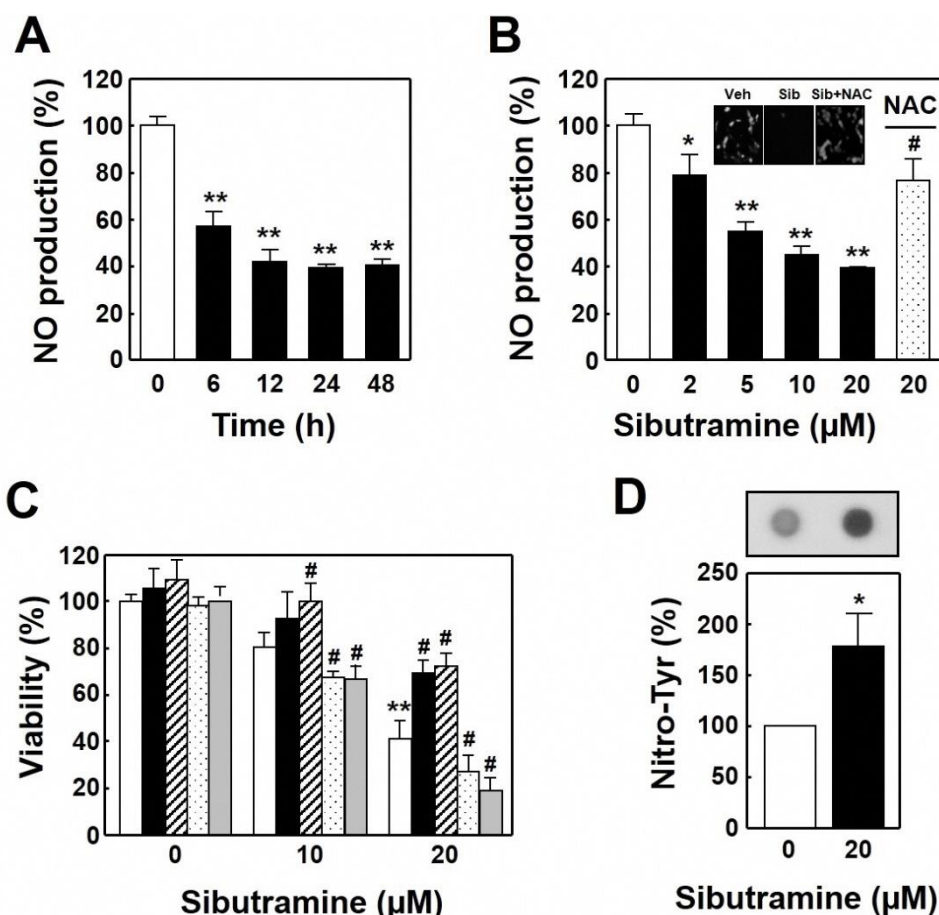


Fig. 10. Lowering of NO production in HAE cells by sibutramine treatment.

(A) Time-course of reduction in NO production. The cells were treated with 20 μM sibutramine for 0, 6, 12, 24 or 48 h, and intracellular NO was stained with DAF2-DA. (B) Concentration-response effect of sibutramine on NO production. The cells were pretreated for 2 h without or with 2 mM NAC, and then treated for 24 h with 0, 2, 5, 10, or 20 μM sibutramine. (Insets) Representative photographs of the fluorescent cells treated for 24 h with vehicle (Veh), 20 μM sibutramine (Sib), or 20 μM sibutramine posterior to 2-h pretreatment with 2 mM NAC (Sib+NAC). The intensity of DAF2-derived fluorescence (*i.e.*, NO amount) is normalized to that in the control cells (open bar) and expressed as the means ± SD from three independent experiments. (C) Effect of NO on sibutramine sensitivity. The cells were pretreated for 2 h without (open bar) or with 20 μM DETA (filled bar), 100 μM DETA (slashed bar), 5 μM Carboxy-PTIO (dotted bar) or 20 μM Carboxy-PTIO (gray bar), and then treated for 48-h with 10 or 20 μM sibutramine. The viability is normalized to that in the cells treated with the vehicle (open bar at 0 μM) and expressed as the means ± SD from four independent experiments. (D) Nitrotyrosine-bound proteins in sibutramine-treated cells. The cells were treated for 24 h with 0 or 20 μM sibutramine and the cell extracts (100 μg) were analysed by dot blotting using the antibody against nitrotyrosine (upper panel). The dot density is expressed as a percentage to that in the untreated cells (0 μM) in the bar graph. The blot is representative patterns and the nitrotyrosine level is expressed as the means ± SD from three independent experiments. Significant difference from the cells treated with vehicle alone (0 μM), * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. #Significant difference from the sibutramine-treated cells, $p < 0.05$.

及び pT495) の発現量が変動するか否かを調べた結果、活性型 eNOS pS1177 発現量は濃度依存的に減少し、不活性型 eNOS pT495 発現量は対照的に増加した (Figs. 11C 及び D)。これらのことから、細胞内 NO 量の減少は eNOS 発現量の減少だけでなく、1177 番目のセリンの脱リン酸化及び 495 番目のスレオニンのリン酸化による eNOS 活性の低下にも起因すると示唆された。

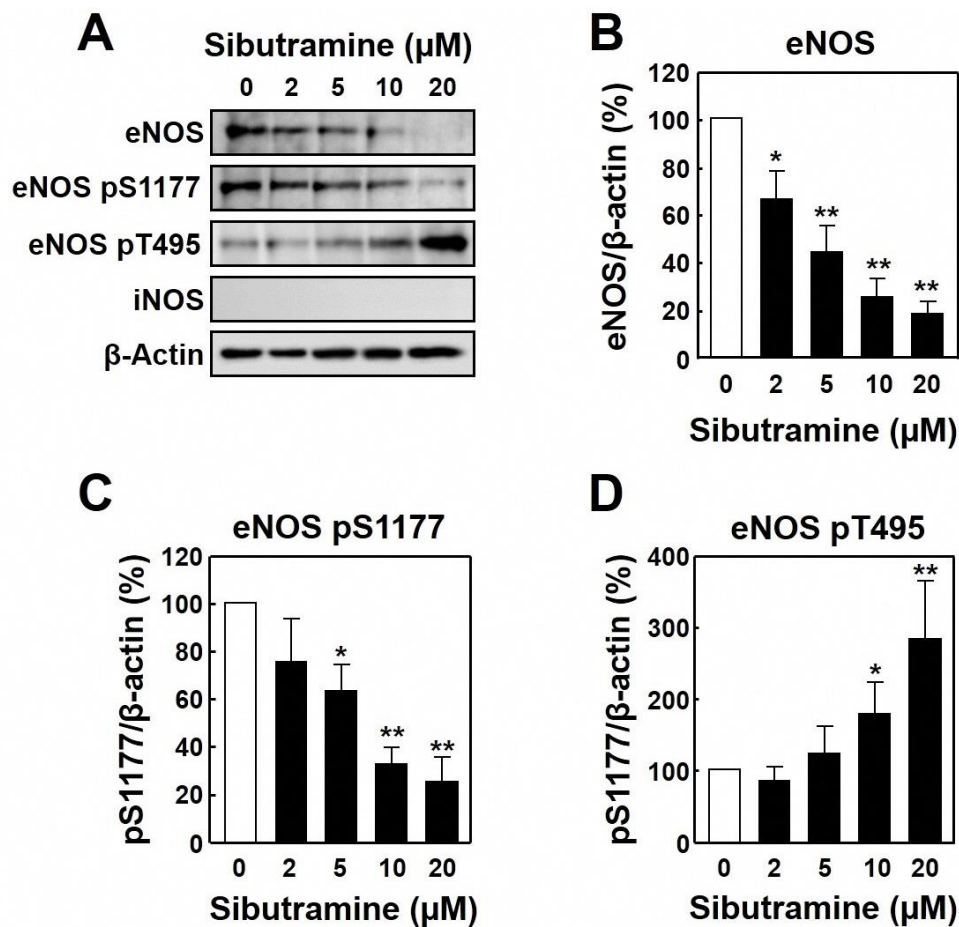


Fig. 11. Down-regulation and inactivation of eNOS by sibutramine treatment.

HAE cells were treated for 24 h with the indicated concentrations of sibutramine, and the cell extracts (40 μg) were applied to Western blotting for detection of eNOS, its phosphorylated forms (pS1177 and pT495) and iNOS. (A) Representative blotting pattern. The band densities of eNOS (B), eNOS pS1177 (C) and eNOS pT495 (D) were normalized to that of β-actin. The blots are representative patterns and the expression levels are expressed as the means ± SD from three independent experiments. Significant difference from the cells treated with vehicle alone (0 μM), * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

4. シブトラミン代謝能と感受性の関連性

シブトラミンは肝臓にて *N*-デスメチルシブトラミン及び *N*-ジデスメチルシブトラミンに代謝されることから、HAE 及び HepG2 細胞に対するシブトラミンとその代謝物の細胞毒性を比較した。その結果、HAE 細胞における *N*-デスメチル代謝物の毒性はシブトラミンと比較して有意に低かったのに対し、HepG2 細胞においては、代謝物とシブトラミンの間で毒性の差は認められなかった (Fig. 12)。また、上記 2 種類の細胞においてシブトラミンが *N*-デスメチル代謝物に代謝される割合を調べたところ、HepG2 細胞は HAE 細胞と比較してはるかに代謝速度が速かったのに対し、HAE 細胞を 10 μ M シブトラミンで 24 時間処理した際の *N*-デスメチルシブトラミン及び *N*-ジデスメチルシブトラミン生成量は、それぞれ約 3% 及び 1% 未満であった (Fig. 13A)。さらに、HepG2 における代謝物生成を経時的に観察したところ、シブトラミンは *N*-デスメチルシブトラミンへと速やかに変換され、それは更なる代謝を受け *N*-ジデスメチルシブトラミンに変換された (Fig. 13B)。

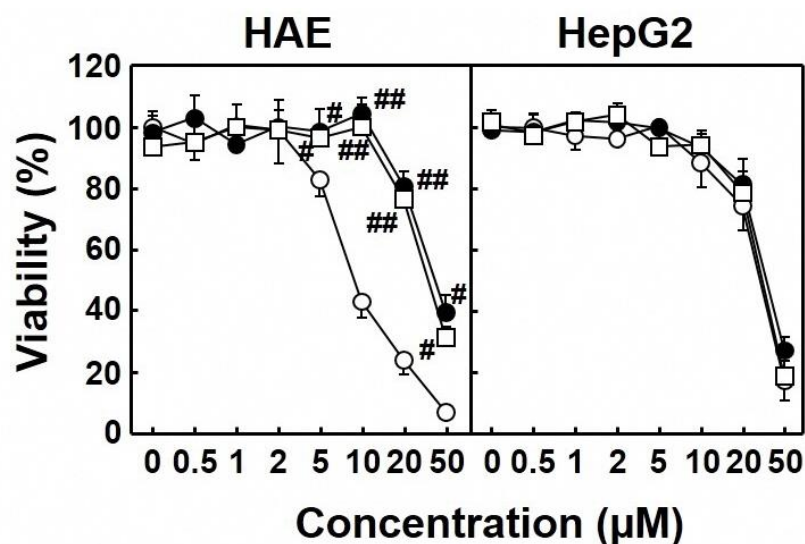


Fig. 12. Sensitivity of HAE and HepG2 cells to sibutramine and its metabolites.

The cells were treated for 48 h with the indicated concentrations of sibutramine (○), *N*-desmethylsibutramine (●) or *N*-didesmethylsibutramine (□). The viability is normalized to that in the untreated cells (0 μ M) and expressed as the means \pm SD from three independent experiments. Significant difference from the sibutramine-treated cells, # p < 0.05 and ## p < 0.01.

過去の文献によれば、シブトラミン代謝に関わる主要酵素として2種類のCYPアイソフォーム (2B6 及び 3A4) が報告されている^{15,40,60,61)}。定量的 RT-PCR 法を行った結果、CYP2B6 及び CYP3A4 発現量は HAE、HEK293 及び SK-N-SH 細胞と比較して HepG2 及び Chang Liver 細胞で高く (Fig. 14A)、前者3種の細胞では実際に *N*-デスメチル代謝物の生成量が少なかった (Fig. 14B)。したがって、これらの細胞ではシブトラミン代謝能と感受性の間に負の相関があることが示

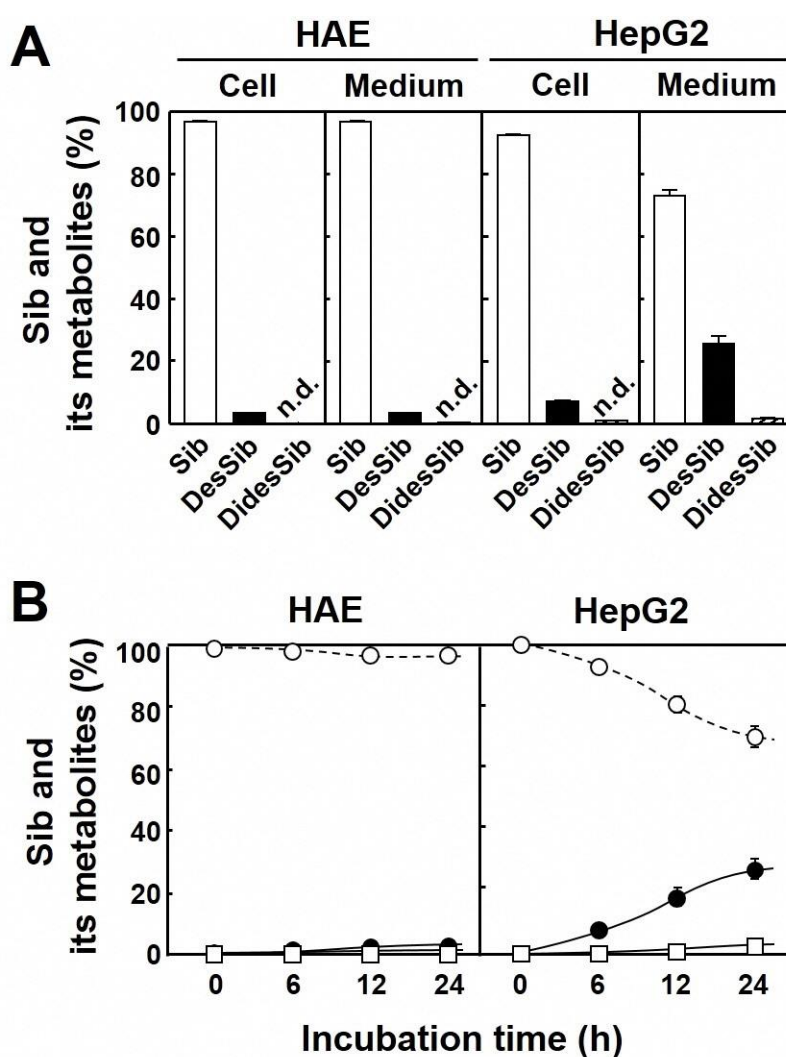


Fig. 13. Metabolism of sibutramine in HAE and HepG2 cells.

(A) Intracellular and extracellular levels of sibutramine (Sib), *N*-desmethylsibutramine (DesSib) and *N*-didesmethylsibutramine (DidesSib) in the cells and medium after the cells were treated for 24 h with 10 μ M Sib. (B) Time-course of Sib metabolism. The cells were treated for 0, 6, 12 or 24 h with 10 μ M Sib, and Sib and its metabolites in the culture medium were analyzed. The amounts of Sib (\circ), DesSib (\bullet) and DidesSib (\square) are expressed as percentages to the sum of their amounts from three independent experiments. n.d., not detected.

された。興味深いことに、CYP3A4 阻害剤である KTZ の前処理は 2 種の肝細胞においてシブトラミン代謝物の生成を顕著に阻害し (Fig. 14B)、siRNA の導入による CYP3A4 発現抑制は不完全であった (HepG2 及び Chang Liver 細胞においてそれぞれ 72% 及び 81% の発現抑制) ものの、シブトラミンの代謝が顕著に減弱した (Fig. 14C)。さらに、生存率に影響を及ぼさない濃度での KTZ 及び他の 2 種類の CYP3A4 阻害剤 (VPM 及び DTX)^{62,63)} の前処理はシブトラミン感受性を有意に増加させ (Fig. 14D)、それと同様の変化が CYP3A4 発現抑制 HepG2 細胞においても認められた (Fig. 14E)。以上のことから、CYP3A4 によるシブトラミン代謝能が低い血管内皮細胞等の細胞は、シブトラミン代謝能が高い肝細胞等と比較して高いシブトラミン感受性を示すことが示唆された。

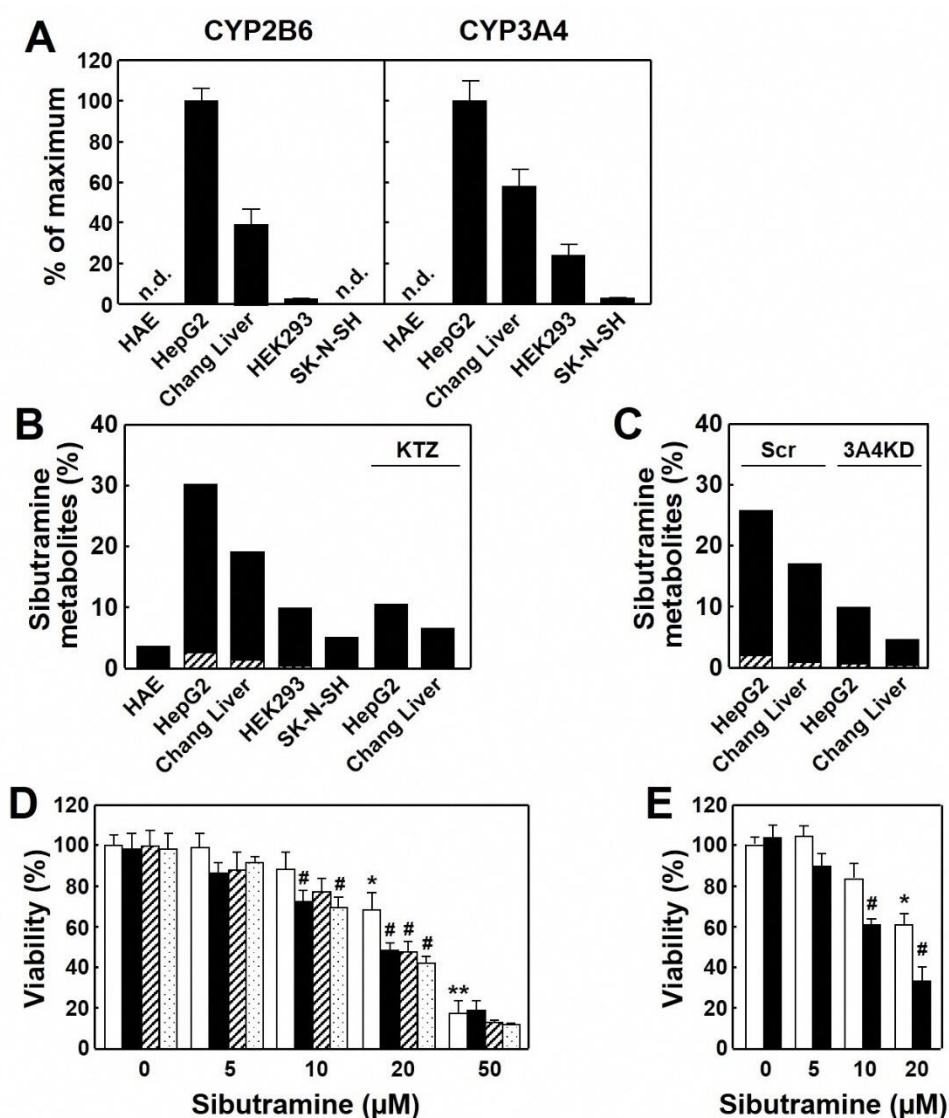


Fig. 14. Contribution of CYP3A4 to sibutramine metabolism.

(A) Real-time RT-PCR analyses of expression of mRNAs for CYP2B6 and CYP3A4 in HAE, HepG2, Chang Liver, HEK293 and SK-N-SH cells. The analytic data are expressed as the means \pm SD from four independent experiments. (B) Effect of KTZ on sibutramine metabolism. The cells were incubated for 24 h with 10 μ M sibutramine, and the culture medium was collected to determine extracellular levels of sibutramine, *N*-desmethyisibutramine and *N*-didesmethyisibutramine by the LC/MS/MS analysis as described in Fig. 13. HepG2 and Chang Liver cells were also pretreated for 2 h with 5 μ M KTZ, prior to the 24-h treatment with sibutramine. (C) Effect of CYP3A4 knockdown on sibutramine metabolism. The levels of sibutramine metabolites (*N*-desmethyisibutramine and *N*-didesmethyisibutramine) in HepG2 and Chang Liver cells transfected with siRNA targeted to CYP3A4 (3A4KD) and its scramble siRNA (Scr) were analyzed by the LC/MS/MS analysis as described in (B). The amounts of *N*-desmethyisibutramine (filled bar) and *N*-didesmethyisibutramine (slashed bar) are expressed as percentages to the sum of the three compounds from three independent experiments. (D) Effect of CYP3A4 inhibitors on sibutramine sensitivity of HepG2 cells. The cells were pretreated for 2 h with 0 (open bar), 5 μ M KTZ (filled bar), 5 μ M VPM (slashed bar) or 10 nM DTX (dotted bar), and then treated for 48 h with 0, 5, 10, 20 or 50 μ M sibutramine. (E) Effect of CYP3A4 knockdown on the sibutramine sensitivity. The siRNA-treated HepG2 cells (filled bar) and the control cells (open bar) prepared above were treated for 48 h with 0, 5, 10, or 20 μ M sibutramine. The viability is normalized to that in the control cells treated with the vehicle alone (0 μ M) expressed as the means \pm SD from four independent experiments. Significant difference from the cells treated with vehicle alone (0 μ M), * p < 0.05 and ** p < 0.01. #Significant difference from the sibutramine-treated cells, p < 0.05. n.d., not detected.

第4節 考察

本章では、シブトラミンが血管内皮細胞のアポトーシスを誘導することを初めて見出し、*N*-デスメチル代謝物ではなく主にシブトラミンが細胞毒性を示すことを明らかにした。シブトラミンで HAE 細胞を 48 時間処理した際の LC_{50} 値は $8.4 \mu M$ であったが、 $1 \mu M$ の濃度のシブトラミンによる長時間 (96 時間) 曝露は血管内皮細胞の生存率を有意に減少させた ($83.3 \pm 3.9\%$) (成績未掲載)。シブトラミンの血中濃度についてはいくつかの報告があるが、Abolfathi らは、被験者に 15 mg のシブトラミンを単回投与した場合、空腹状態の被験者と比較して食事の摂取により薬物濃度時間曲線下面積及び最高血中濃度 (maximum drug concentration, C_{max}) が約 3~5 倍に増加し、最高血中濃度到達時間が 2 時間から 4 時間に延長されることを報告した³⁸⁾。また彼らは同時に、食事の摂取はシブトラミンの半減期を延長し、 C_{max} は 25 nM 以上に達することも示した。さらに、摂食状態におけるシブトラミンの半減期の延長は、食事の摂取が腸壁や肝臓に多く発現している CYP3A4 によるシブトラミン代謝の阻害に起因すると予測されている^{64,65)}。これらの知見から、食事の摂取を伴う継続かつ過剰量のシブトラミンの服用は血中濃度の上昇とそれに伴う血管内皮細胞の機能障害及びアポトーシスを誘導することが推察された。加えて、SK-N-SH 及び Molt4 細胞は、HAE 細胞と同様にシブトラミンに対して高い感受性を示したことから、シブトラミンは神経及び血管細胞機能障害を惹起することが示唆された。

本研究では、シブトラミンによるアポトーシス誘導機序に酸化ストレスの誘発が関与することを見出した。また、ROS 産生の主たる原因を同定することは出来なかったものの、Fig. 7B で認められた ROS の産生亢進は主に抗酸化作用の減弱によるものと予想された。この予想を裏付けるものとして、HAE 細胞のシブトラミン処理に起因する細胞質局在性抗酸化酵素である Cu/Zn-スーパーオキ

シドジスムターゼ (superoxide dismutase, SOD) (成績未掲載) 及び Bcl-2 (Fig. 7C) の発現量の減少が挙げられる。これら抗酸化酵素や抗アポトーシス因子の発現量低下は、PQ のレドックスサイクルを介して多量の ROS が産生された際の T リンパ球においても確認されている⁶⁶⁾。それ故、シブトラミン処理による細胞質での ROS の蓄積が血管内皮細胞アポトーシスの誘導の引き金になると予測された。また、Bcl-2/Bax の割合が減少してミトコンドリア膜機能が低下すると、プロカスパーゼ 9 や apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1) とともにアポトソームを形成するミトコンドリア関連タンパク質 cytochrome c (Cyt-c) がミトコンドリアから漏出することから⁶⁷⁾、ミトコンドリア膜機能低下による Cyt-c の細胞質への漏出とカスパーゼ 9 及びカスパーゼ 3 の順次活性化もシブトラミンによるアポトーシス誘導の一序であると推察された。

NO は可溶性グアニル酸シクラーゼの活性化を介して血管平滑筋細胞の収縮を抑制し、血圧を降下させる強力な血管弛緩因子である⁶⁸⁾。そのため、前述のノルアドレナリン濃度の上昇だけでなく、血管内皮細胞の NO 産生量低下もまたシブトラミンの副作用である高血圧の主発症機序であると考えられた。本研究において、ニトロチロシン (Fig. 10D) 及び NOS (Figs. 11A~D) のイムノブロット解析の結果から、シブトラミンによる NO 枯渇は、eNOS の発現量及び活性低下と ONOO \cdot の生成による NO 消費量の増加に起因すると推察された。eNOS 活性化部位 Ser1177 のリン酸化及び eNOS の活性化による NO の放出促進は、タンパク質キナーゼ (protein kinase, PK) A、PKB/Akt、PKC、AMP 活性化キナーゼ等の様々なキナーゼにより制御される⁶⁹⁻⁷¹⁾。また、PKC 及び Ca²⁺/カルモジュリン依存性キナーゼは、eNOS の 495 番目のスレオニン残基をリン酸化することが知られている^{71,72)}。さらに、血管内皮に由来する血管収縮ペプチドであるエンドセリンは、PKC を介した eNOS の不活性化及び発現抑制により NO 産生を抑制する⁷³⁾。それ故、シブトラミン処理を行った HAE 細胞での eNOS 発現量及び

機能を制御する主因子を解明すべく更なる検討が必要である。先行研究において、NO が PKA 及び PKC 依存性シグナリング経路の活性化及びイムノプロテアソームサブユニット (beta1i、beta2i、beta5i) の発現量増加を介してプロテアソームの機能を亢進することが報告されている⁴⁹⁾。また、本研究では、シブトラミンが HAE 細胞のプロテアソーム活性 (Fig. 9A) 及びイムノプロテアソームサブユニット発現量 (Fig. 9B) を低下させることに加え、プロテアソーム機能不全がシブトラミン感受性を上昇させること (Fig. 9C) を見出した。これらの成果より、シブトラミン処理による NO 枯渇はプロテアソームの構成的なサブユニット及びその誘導型の発現抑制を介してプロテアソーム機能を低減させ、その結果、酸化ストレス及び小胞体ストレスによって生成した異常タンパク質の蓄積が細胞傷害を誘起すると推察された。

シブトラミンの主代謝物 (*N*-デスメチルシブトラミン及び *N*-ジデスメチルシブトラミン) は強力な薬理作用 (食欲低下等) を有しているため、シブトラミンによる体重減少作用の中心的な役割を果たすと考えられている⁷⁴⁾。しかし、薬理作用とは逆にそれら代謝物の HAE 細胞に対する細胞毒性はシブトラミンと比較して低かった (Fig. 12)。また、HAE 細胞と比較して CYP3A4 を高発現している HepG2 細胞ではシブトラミンに対する感受性が低く (Figs. 12 及び 14A)、その低感性は CYP3A4 阻害剤の前処理 (Fig. 14D) や発現抑制 (Fig. 14E) によって減弱した。これらの結果から、シブトラミンによる血管内皮細胞傷害等の有害作用のリスクは、CYP3A4 発現量と負の相関があると推察された。この推察は神経 SK-N-SH 細胞がシブトラミンに対して高い感受性を示すこと (Fig. 6B) 及びほとんどシブトラミン代謝能を有していないこと (Fig. 14B) に裏付けられており、前述の頭痛や眩暈等の脳神経関連疾患が副作用として報告されていることとも一致する。シブトラミン代謝に関与する 2 種類の CYP (CYP2B6 と CYP3A4) は多くの遺伝子多型が存在しており、その多型により薬物動態及び力学的な特

徴が変化すると考えられている⁷⁵⁻⁷⁷⁾。それ故、シブトラミンによって惹起される症状や副作用の個人差は、細胞や臓器中の代謝酵素の発現量や遺伝的な多型に依存することが示唆された。

第2章 シブトラミンによる活性酸素の産生亢進を介した血管平滑筋細胞のアポトーシス及び細胞収縮の誘導

第1節 緒言

経口食欲抑制剤シブトラミンは、アンフェタミンに構造が類似した (Fig. 15) セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害剤である^{16,42,78)}。また、序論でも述べた通り、満腹感及びエネルギー消費の亢進を介して食事量を減少させることから、多くの国で経口抗肥満薬として承認され処方された^{79,80)}。しかしながら、高血圧や心筋梗塞等の循環器障害が高頻度で発生したため、現在、シブトラミンは市場から撤退している⁸¹⁾。また、SCOUT試験を行ったJamesらは、シブトラミンの副作用の中でも高血圧が最も懸念すべき副作用のひとつであると提言している^{17,41)}。しかしながら、多くの国で抗肥満薬として使用することが禁止されているにも拘らず、インターネット上で販売されている所謂「痩せ薬」や「ダイエットサプリメント」からシブトラミンが検出される事案が未だに多数発生している。従って、本化合物の乱用及び偶発的な使用による健康被害の発生が懸念されている。前章でも述べた通り、シブトラミンはセロトニンと比べノルアドレナリンの再取り込みを強力に阻害するため、ノルアドレナリンの

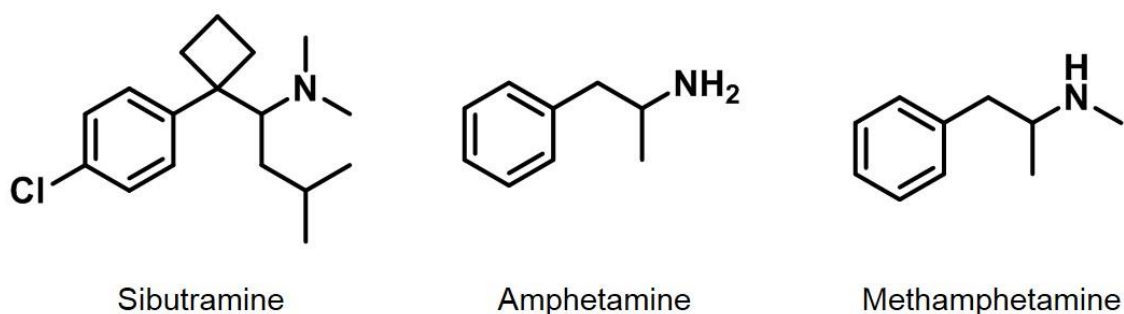


Fig. 15. Structure of sibutramine and psychostimulants.

蓄積が高血圧の発症機序として推察されている^{37,42)}。また、交感神経副腎反応に加えて、様々な液性因子 (ROS、NO、プロスタサイクリン、トロンボキサン A₂ 及びエンドセリン等) が血圧の制御に関与すると考えられている⁸²⁻⁸⁴⁾。しかしながら、液性因子の放出を介して血管緊張の制御に関与する血管細胞の生存率及び機能に対して、シブトラミンが影響を及ぼすか否かについては未だに不明な点が多い。前章では、シブトラミンが ROS の産生亢進や NO の枯渇を介して HAE 細胞のアポトーシスを惹起することを見出した⁸⁵⁾。

そこで本章では、高血圧発症機序に対する血管平滑筋細胞の関与を解明すべく、シブトラミンがヒト大動脈平滑筋 (human aortic smooth muscle, HASM) 細胞の生存率及び形態に対して影響するか否かを調べた。また、ROS や NO の産生に着目し、HASM 細胞に対するシブトラミンの毒性及び収縮作用機序への関与を明示すべく種々検討を行った。

第2節 実験材料及び実験方法

1. 実験材料

本実験に使用した HASM 細胞及びその培地として用いた HuMedia-SG キットはクラボウ (Osaka, Japan) より購入した。毒性試験に用いた 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) は Cayman Chemicals 社 (Ann Arbor, MI, USA) のものを使用した。カスパーゼ 9 活性測定用の基質として使用した *N*-acetyl-Leu-Glu-His-Asp-AMC は Sigma-Aldrich 社より購入した。ウェスタンブロット解析に用いた一次抗体は Cu/Zn-SOD 及び total myosin light chain (t-MLC) は Cell Signaling Technology 社、phosphorylated-MLC (p-MLC) は Thermo Fisher SCIENTIFIC 社、Mn-SOD は Sigma-Aldrich 社より購入した。コラーゲンゲル収縮アッセイに用いた Cellmatrix Type I-P は新田ゼラチンから購入した。蛍光プローブ 1-[6-amino-2-(5-carboxy-2-oxazolyl)-5-benzofuranyloxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy) ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, pentapotassium salt (Fura-2) は同仁化学研究所 (Kumamoto, Japan) より購入した。PQ はナカライテスクのものを用了。4-hydroxy-2-nonenal (HNE) は Esterbauer らの方法⁸⁶⁾により合成した。その他は全て第1章の第2節で使用したのと同じものを用了。

2. 細胞培養

細胞培養は第1章の第2節に記載した方法に従った。

HASM 細胞は 37°C、5% CO₂ 条件下の炭酸ガスインキュベーター内で培養し、2 日毎に培地を交換して 4~6 日毎に継代維持した。なお、増殖培地として HuMedia-SB2 を用い、Type-I コラーゲンコートディッシュに播種して継代維持した。

3. 細胞生存率の測定

細胞生存率の測定は第 1 章の第 2 節に記載した方法に従った。

4. DNA の断片化及びミトコンドリア膜電位の測定

DNA の断片化及びミトコンドリア膜電位の測定は第 1 章の第 2 節に記載した方法に従った。

5. ウェスタンブロット解析

5-1. 試料の調製

試料の調製は第 1 章の第 2 節に記載した方法に従った。

5-2. ウェスタンブロット解析

ウェスタンブロット解析は第 1 章の第 2 節に記載した方法に従った。

6. RT-PCR 解析

6-1. トータル RNA の抽出

トータル RNA の抽出は第 1 章の第 2 節に記載した方法に従った。

6-2. 定量的 Real-time PCR

各種細胞における CYP2B6 及び CYP3A4 の発現は第 1 章の第 2 節に記載した方法に従った。

7. 細胞内 ROS 量の測定

細胞内 ROS 量の測定は第 1 章の第 2 節に記載した方法に従った。

8. カスパーゼ 3 及びカスパーゼ 9 活性の測定

カスパーゼ 3 活性の測定は第 1 章の第 2 節に記載した方法に従った。

カスパーゼ 9 活性はカスパーゼ 3 と同様の方法にて測定し、基質として *N*-acetyl Leu-Glu-His-Asp-AMC を使用した。

9. コラーゲンゲル収縮アッセイ

HASM 細胞の収縮はコラーゲンゲルを用いて既報の方法⁸⁷⁾に従って測定した。 2×10^6 cells/mL の濃度で HASM 細胞を懸濁した細胞懸濁液とコラーゲン溶液 [2.2 mg/mL Cellmatrix Type I-P、PBS を含む 13 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)] を 1 : 4 の割合で混合し、12 ウェルマルチプレートに播種した。CO₂ インキュベーター内で 30 分間静置後、ゲル化したコラーゲンゲルの上から増殖培地を添加した。24 時間毎に培地を交換して 2 日間培養した後、白チップにてゲルを剥離し、処理培地中で一定時間処理した。コラーゲンゲルを WSE-5200 Printgraph 2M (ATTO, Tokyo, Japan) によって撮影し、そのコラーゲンゲルの面積を測定することによって HASM 細胞の収縮率を算出した。

10. 細胞内 Ca²⁺濃度の測定

細胞内 Ca²⁺濃度は Ca²⁺感受性蛍光プローブ Fura-2 を用いて蛍光光学的に検出した。増殖培地に懸濁した細胞を 4×10^5 cells/200 μ L となるように 96 ウェルマルチプレートに播種して一晩培養した。培地を 115 mM NaCl、5.4 mM KCl、0.8 mM MgCl₂、1.8 mM CaCl₂、13.8 mM glucose 及び 5 μ M Fura-2 を含む 20 mM HEPES (pH 7.4) に置換した後、37°C、45 分間インキュベートした。細胞を DPBS で 2 回洗浄後、蛍光強度 (励起波長 340 nm/380 nm、蛍光波長 510 nm) を測定することによって細胞内 Ca²⁺濃度の変動を評価した。

11. LC/MS/MS 分析によるシブトラミン代謝物の測定

シブトラミン代謝物の測定は第 1 章の第 2 節に記載した方法に従った。

12. タンパク質の定量

タンパク質の定量は第 1 章の第 2 節に記載した方法に従った。

13. 統計解析

統計解析は第 1 章の第 2 節に記載した方法に従った。

第3節 結果

1. シブトラミン処理による血管平滑筋細胞アポトーシスの誘導

HASM 細胞を 20 μM シブトラミンにて 0、6、12、24 及び 48 時間処理した結果、細胞生存率は 6 時間後から減少し始め、48 時間後においては 12%にまで減少した (Fig. 16A)。また、多様な濃度において 48 時間処理したところ、10 μM 以上のシブトラミン濃度において細胞毒性が認められ、その LC_{50} 値は 14.2 μM であった (Fig. 16B)。さらに、シブトラミン処理によってアポトーシス細胞死を示すカスパーゼ 3 の活性化 (Fig. 16C) 及び DNA 断片化が観察された (Fig. 16D)。これらのことから、シブトラミン処理は血管平滑筋細胞に対してアポトーシスを誘導するこ

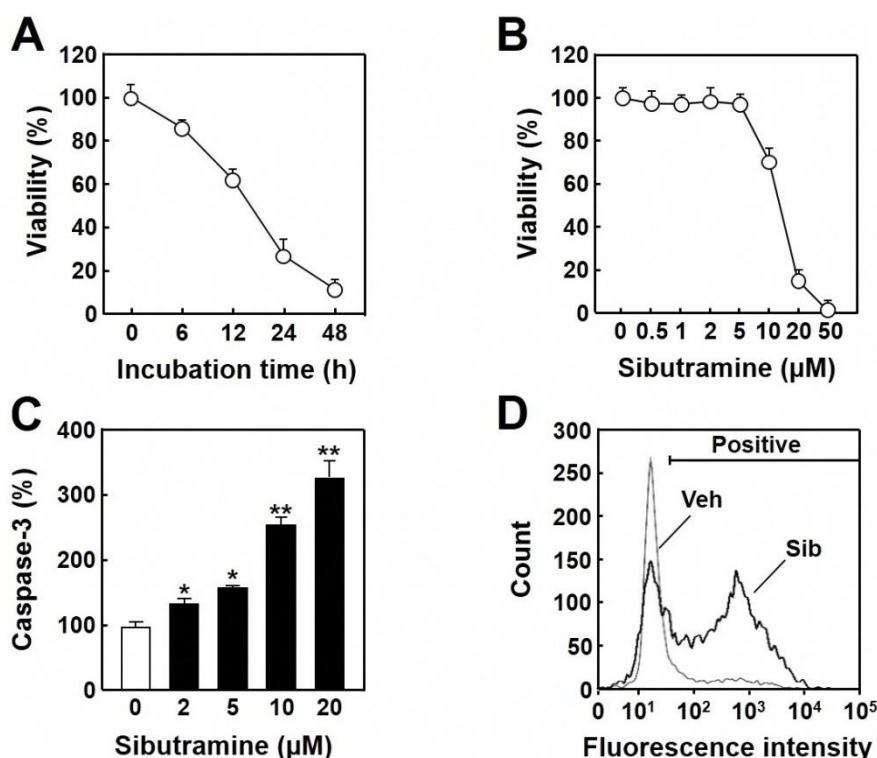


Fig. 16. Apoptosis induction in HASM cells by sibutramine treatment.

(A) Time-course of the cell damage by 20 μM sibutramine. **(B)** Dose-response effects of sibutramine on cell viability. The cells were treated for 48 h with the indicated concentrations of sibutramine. The viability value is expressed as a percentage to that in the control cells (0 μM). **(C)** Activation of caspase-3. The cells were treated for 48 h with 0, 2, 5, 10 or 20 μM sibutramine. The caspase-3 activity is expressed as a percentage to that of the control cells. Significant difference from the control cells, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. **(D)** Flow-cytometric analysis of TUNEL-stained cells. The cells were treated for 48 h with 20 μM sibutramine (Sib) or the vehicle (Veh), stained by the TUNEL method, and then applied to the flow-cytometric analysis. The TUNEL-positive cells are indicated as “Positive”.

とが示唆された。

前章では、シブトラミンが ROS の産生亢進及びミトコンドリア機能障害を介して HAE 細胞のアポトーシスを惹起することを示した (Fig. 7)。そこで始めに、ROS の産生亢進がシブトラミン誘導血管平滑筋細胞アポトーシスに關与するかどうかを調べたところ、NAC の前処理はシブトラミンによる細胞毒性を有意に減弱させた (Fig. 17A)。また、DCFH-DA を用いて細胞中の H_2O_2 量を測定したところ、シブトラミン処理によって DCF 陽性細胞の割合が約 2 倍に増加した (Fig. 17B) ことから、ROS の産生亢進は HASM 細胞のシブトラミン誘導アポトーシスの一序であることが示唆された。さらに、ウエスタンブロット解析の結果、シブトラミンにより HASM 細胞中の Bax 発現量の上昇及び Bcl-2 発現量の減少が認められ、Bax/Bcl-2 の割合は濃度依存的に増加した (Fig. 17C)。Bax/Bcl-2 の割合の増加は、ミトコンドリア膜を不安定化させることが知られているため^{88,89)}、JC-1 を用いたフローサイトメトリーにてミトコンドリア膜機能を評価した (Fig. 17D)。その結果、シブトラミン処理した HASM 細胞ではミトコンドリア膜機能の低下を示す緑色蛍光強度が上昇し、その上昇は 2 mM NAC による 2 時間前処理によって抑制された。加えて、シブトラミン処理した HASM 細胞における 2 種類のカスパーゼの活性化及び TUNEL 陽性細胞の割合の増加は抗酸化剤の前処理によって有意に減弱した (Figs. 17E 及び F)。これらのことから、シブトラミンによる血管平滑筋細胞アポトーシス誘導には、血管内皮細胞と同様、ROS の産生亢進及びそれに伴うミトコンドリア機能障害が重要な役割を果たすことが示唆された。

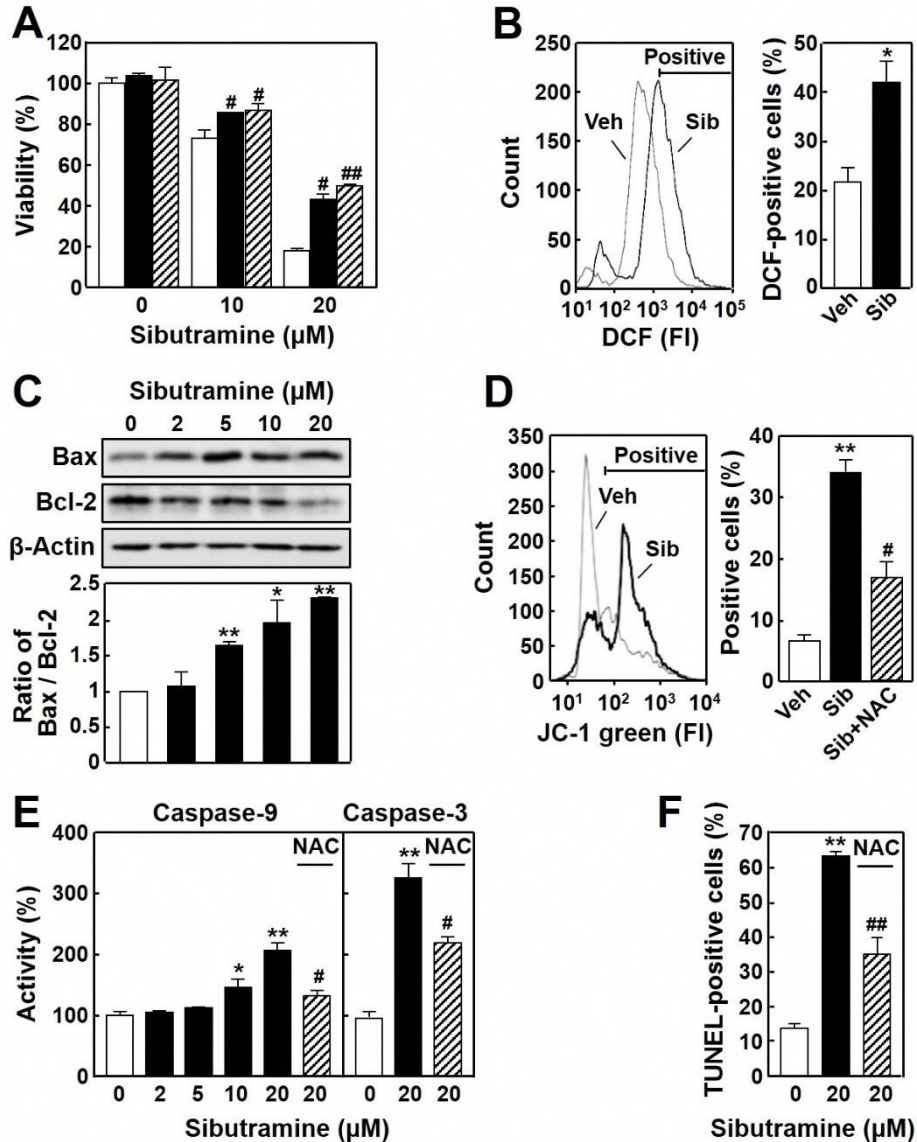


Fig. 17. Activation of ROS-dependent apoptotic mechanism by sibutramine treatment.

(A) Effect of antioxidant NAC on sibutramine toxicity. HASM cells were pretreated for 2 h with 0 (open bar), 0.5 (filled bar) or 2 mM NAC (slashed bar), and then treated for 48 h with 0, 10 or 20 μM of sibutramine. The viability value is expressed as a percentage to that in the vehicle-treated control cells (0 μM). (B) DCFH oxidation. The cells were treated for 24 h with 20 μM sibutramine (Sib) or the vehicle (Veh), and then subjected to flow-cytometric analysis to determine DCFH oxidation by H_2O_2 . The DCF-positive cells are expressed as percentages of total cells in the bar graph. (C) Alteration in amounts of Bax and Bcl-2. The cells were treated 24 h with the indicated concentrations of sibutramine. The amounts of Bax and Bcl-2 in the cell extracts (40 μg) were analyzed by Western blotting and the band densities were normalized to those of β -actin. (D) Mitochondrial membrane potential. The cells were pretreated for 2 h without or with 2 mM NAC, and then treated for 48 h with 20 μM sibutramine. The treated cells were stained with JC-1 and then applied to the flow-cytometric analysis to monitor the JC-1-derived green fluorescence. The positive cell is expressed as a percentage of total cells in the bar graph. (E) Activation of caspases. The cells were treated for 48 h with 0, 2, 5, 10 or 20 μM sibutramine. In the group shown with NAC, 2 mM NAC was pretreated for 2 h prior to the sibutramine treatment. The activities of caspase-9 and caspase-3 in the cell extracts are expressed as percentages to those of the control cells. (F) DNA fragmentation. The cells were pretreated for 2 h without or with 2 mM NAC, and then treated for 48 h with 0 or 20 μM sibutramine. The TUNEL-positive cell is expressed as a percentage of total cells in the bar graph. Significant difference from the control cells, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$). Significant difference from the cells treated without NAC pretreatment, # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$.

2. シブトラミン処理による血管平滑筋細胞収縮の誘導

シブトラミン処理が血管平滑筋細胞を収縮させるか否か調べるため、コラーゲンゲル収縮アッセイを行った (Fig. 18A)。その結果、HASM 細胞を包含したコラーゲンゲルは 20 μ M シブトラミン処理によって有意に収縮し、24 時間後におけるゲル面積は、処理直後の面積と比較して約 60%まで縮小した。血管平滑筋細胞の収縮及び弛緩は主に MLC のリン酸化の有無によって決定され、そ

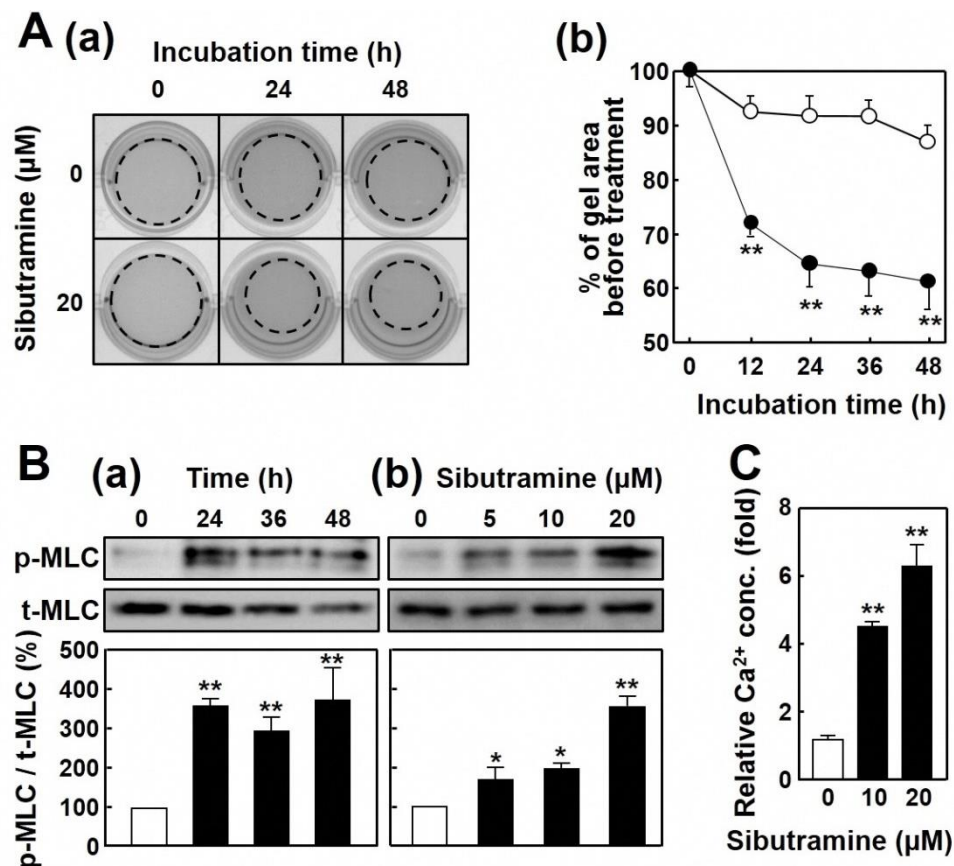


Fig. 18. Facilitation of smooth muscle cell contraction by sibutramine.

(A) Evaluation of HASM cell contraction. (a) Representative photographs of HASM cell-embedded collagen gels. The cells were suspended in DPBS containing type-I collagen, seeded into a 12-well plate, and cultured for 48 h in a CO_2 incubator to promote the gelation. The collagen gels were detached from the wells, and then the cells were treated with 0 (\circ) or 20 μ M sibutramine (\bullet). (b) Quantification of collagen gel contraction. Outer perimeter of the gel was indicated as dotted circle and the gel area calculated is expressed as a percentage to that before treatment shown as 0 h. (B) MLC phosphorylation. The cells were treated for 0, 24, 36 or 48 h with 20 μ M sibutramine in (a), and for 24 h with 0, 5, 10 or 20 μ M of sibutramine in (b). The cell extracts (40 μ g) were analyzed by Western blotting using their specific antibodies of p-MLC and t-MLC. The p-MLC/t-MLC ratio is expressed as a percentage to that in the control cells. (C) Intracellular Ca^{2+} concentration. The cells were treated for 24 h with 0, 10 or 20 μ M sibutramine. The Ca^{2+} concentration is expressed as a fold increase to that in the control cells. Significant difference from the control cells, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

れはMLCのリン酸化酵素及びMLC脱リン酸化酵素によって制御される⁹⁰⁻⁹²⁾。実際に、収縮誘導物質による刺激は血管平滑筋細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇とそれに伴う MLC キナーゼの活性化、 Ca^{2+} /カルモジュリン複合体の形成を誘起し、最終的に MLC のリン酸化を引き起こす^{90,93)}。そこで、リン酸化 MLC のウェスタンブロット解析を行ったところ、シブトラミンの 24 時間処理は濃度依存的に MLC のリン酸化を誘導した (Fig. 18B)。加えて、 Ca^{2+} 検出試薬 Fura-2 を用いて細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定したところ、HASM 細胞内の Ca^{2+} 濃度はシブトラミン処理によって有意に上昇した (Fig. 18C) ことから、シブトラミンによる平滑筋細胞収縮は Ca^{2+} /カルモジュリン依存的であると推察された。

近年、ROS と Ca^{2+} シグナリングの間に複雑な相互関係が存在することを示唆する報告が増えていることから⁹⁴⁾、シブトラミンに起因する ROS の産生亢進によって、血管平滑筋細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することが推測された。この仮定を検討すべく、HASM 細胞のシブトラミン処理による Ca^{2+} 濃度の上昇に対して NAC が影響を及ぼすか否かを調査した (Fig. 19)。その結果、NAC の前処理は

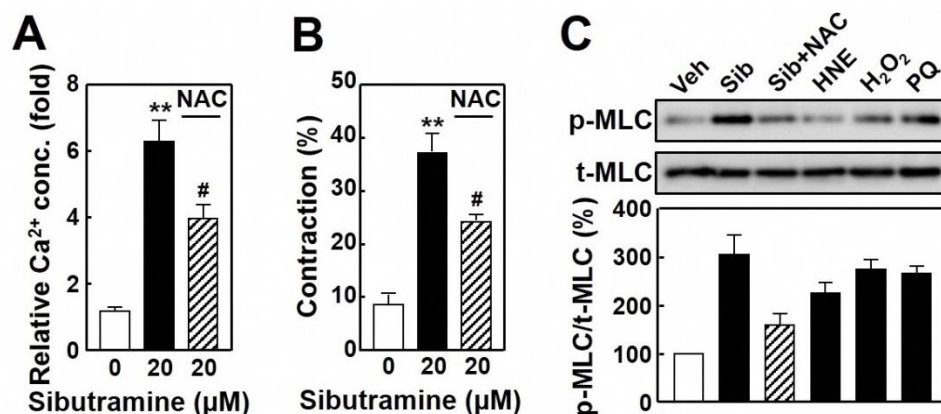


Fig. 19. Contribution of ROS to smooth muscle cell contraction elicited by sibutramine.

(A) Effect of NAC on increase in Ca^{2+} entry by sibutramine. The cells were pretreated for 2 h without or with 2 mM NAC (slashed bar), and then treated for 24 h with 0 or 20 μM sibutramine. (B) Effect of NAC on cell contraction. The cells were treated as described in A. The contraction was measured in collagen gel-based contraction assay and is expressed as a percentage to that of the vehicle-treated control cells (shown as 0 μM). (C) Effect of oxidative stress on MLC phosphorylation. The cells were treated for 24 h with 20 μM sibutramine (Sib), 40 μM HNE, 200 μM H_2O_2 or 2 μM PQ. In the NAC group (Sib+NAC), the cells were pretreated for 2 h with 2 mM NAC prior to the sibutramine treatment. The p-MLC/t-MLC ratio is expressed as a percentage to that in the control cells (Veh). Significant difference from the control cells, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. Significant difference from the cells treated with 0 mM NAC, # $p < 0.05$.

Ca²⁺濃度の上昇を有意に抑制した (Fig. 19A)。また、NAC はシブトラミン誘導血管平滑筋細胞収縮だけでなく、MLC のリン酸化も抑制した (Figs. 19B 及び C)。一方、シブトラミンと同様に、H₂O₂、PQ (レドックスサイクル介在性 ROS 産生化合物) 及び HNE (ω -6 系脂肪酸由来反応性アルデヒド) 処理によって MLC のリン酸化は促進された (Fig. 19C) ことから、血管平滑筋細胞内 Ca²⁺濃度の上昇はシブトラミンによる ROS の産生亢進及びその結果生じる HNE によって惹起されることが推察された。

血管内皮細胞は NO 産生を介して血管平滑筋細胞の緊張状態を制御する。前章では、シブトラミンが血管内皮細胞の NO 合成酵素の発現抑制及び不活性化を介して細胞内 NO を減少させることを示した。そこで、HASM 細胞のシブトラミン誘導アポトーシス及び細胞収縮に及ぼす NO の効果を調べた結果、シブトラミン感受性は DETA の前処理によって有意に低減し、Carboxy-PTIO によって増強された (Fig. 20A)。また、DETA はシブトラミンによる細胞収縮及び MLC のリン酸化を顕著に抑制した (Figs. 20B 及び C)。さらに、DETA によるシブトラミン細胞毒性に対する保護作用は可溶性グアニル酸シクラーゼ阻害剤 ODQ の前処理によって顕著に減弱されたこと (Fig. 20A) から、NO による血管平滑筋細胞の収縮作用は ONOO[•] 生成等を介する経路ではなく、グアニル酸シクラーゼの活性化と cyclic guanosine monophosphate (cGMP) 生成を介する経路に起因するものと推測された。これらのことから、血管平滑筋細胞の ROS 産生の亢進だけでなく、血管内皮細胞からの NO 放出量の減少もまたシブトラミンによる平滑筋細胞収縮の亢進に関与することが示唆された。

3. 細胞毒性及び収縮に対するシブトラミン代謝物の影響

上述のように、シブトラミンは CYP3A4 及び CYP2B6 によって薬理活性代謝物 *N*-デスメチルシブトラミン及び *N*-ジデスメチルシブトラミンへと代謝される

ことが知られることから^{38,40,42,95)}、HASM 細胞の生存率及び収縮に対するそれら代謝物の影響を検討した (Fig. 21)。その結果、シブトラミンと比較して *N*-デスメチル代謝物の HASM 細胞毒性は低く、コラーゲンゲル面積の減少幅は有意に小さかったことから、*N*-デスメチル化はシブトラミンによる細胞毒性及び収縮

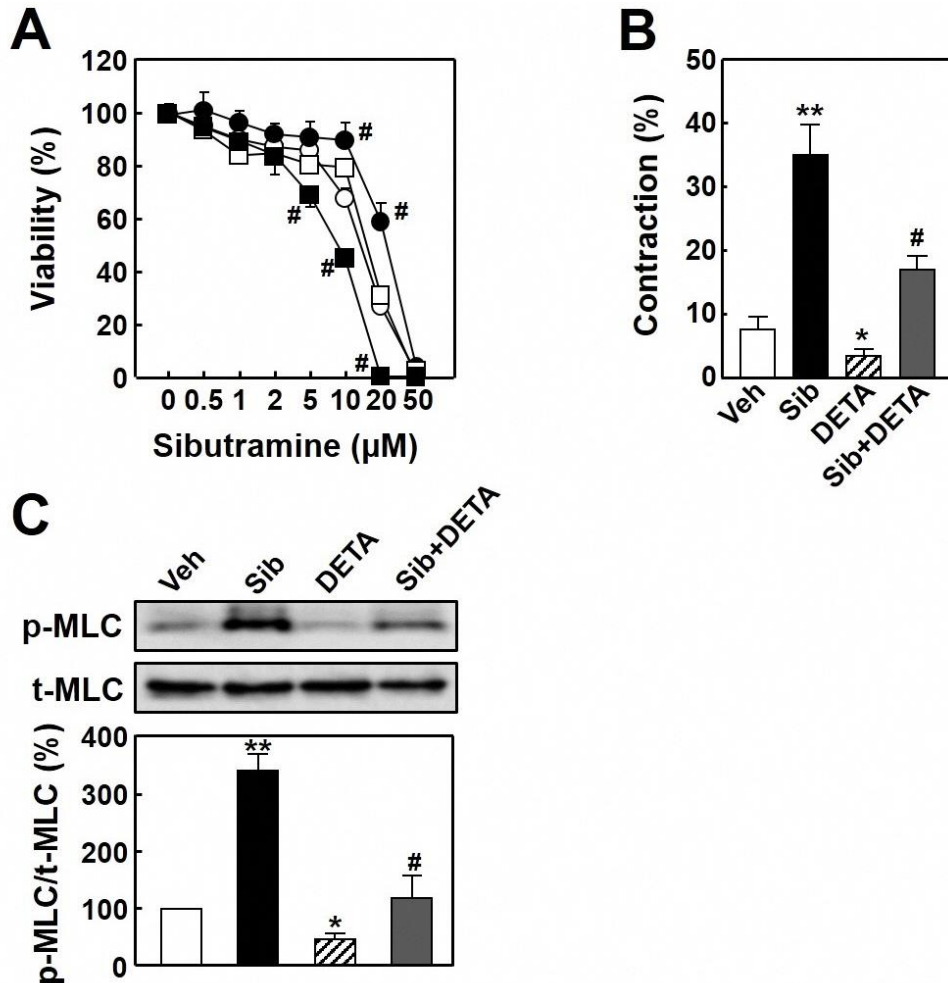


Fig. 20. Effect of NO on damage and contraction of HASM cells elicited by sibutramine treatment.

(A) Effect on sibutramine sensitivity. The cells were pretreated for 2 h without (○) or with 20 μM DETA (●), 20 μM DETA plus 10 μM ODQ (□) and 50 μM carboxy-PTIO (■), and then treated for 48 h with the indicated concentrations of sibutramine. The viability value is expressed as a percentage to that in the vehicle-treated control cells (0 μM). (B) Effect on contraction. The cells were pretreated for 2 h without or with 20 μM DETA, and then treated for 24 h with 20 μM sibutramine (Sib). The contraction is expressed as a percentage to that of the vehicle-treated control cells (Veh). (C) Effect on MLC phosphorylation. The cells were treated as described in B. The p-MLC/t-MLC ratio is expressed as a percentage to that in the control cells (Veh). Significant difference from the control cells, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. Significant difference from the cells treated with the same concentrations of sibutramine alone, # $p < 0.05$.

活性を減弱させることが示された。次に、HASM 細胞の CYP3A4 及び CYP2B6 の mRNA 発現量を Real-time PCR 法にて測定したところ、HepG2 細胞における上記 2 種類の CYP は高い転写レベルにあることが確認できたのに対し、HASM 細胞では検出限界以下であった (成績未掲載)。実際に、シブトラミンで HASM 細胞を 24 時間処理した後の *N*-デスメチル代謝物量を LC/MS/MS 分析にて調べたところ、HASM 細胞の *N*-デスメチル代謝物生成量は HepG2 細胞と比較して少なかった (Fig. 21C)。これらの成果より、シブトラミンによる強力な血管平滑筋細胞傷害及び収縮作用は、低シブトラミン代謝能に伴う細胞内における強毒性シブトラミンの長時間貯留に起因すると考えられた。

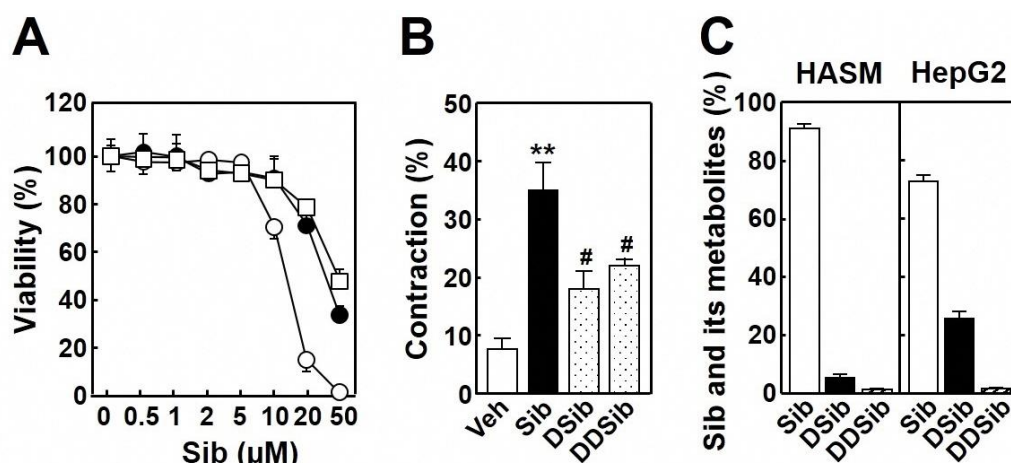


Fig. 21. Cytotoxic and contraction effects of sibutramine metabolites.

(A) Sensitivity of HASM cells to sibutramine (Sib), *N*-desmethylsibutramine (DSib) and *N*-didesmethylsibutramine (DDSib). The cells were treated for 48 h with the indicated concentrations of Sib (○), DSib (●) or DDSib (□). The viability value is expressed as a percentage to that in the vehicle-treated control cells (0 μM). (B) HASM cell contraction by Sib metabolites. The cells were treated for 24 h with 20 μM Sib, DSib or DDSib. The contraction is expressed as a percentage to that of the vehicle-treated control cells (Veh). (C) Detection of Sib metabolites. HASM cells were treated for 24 h with 10 μM Sib. Sib and the two metabolites in the medium were measured by LC/MS/MS analysis. The values in HepG2 cells are taken from our previous results (Morikawa et al., 2017). **Significant difference from the control cells, $p < 0.01$. #Significant difference from the cells treated with Sib, $p < 0.05$.

第4節 考察

本章において、シブトラミン処理は管平滑筋細胞のアポトーシスを誘導することを見出した。HASM 細胞の LC_{50} 値は、HepG2 細胞 ($26.7 \mu M$) と比較して低値を示し ($14.2 \mu M$)、HAE 細胞 ($8.4 \mu M$) 及び T リンパ球 Molt4 細胞 ($5.8 \mu M$)⁸⁵⁾ と同程度の値であったことから、血管細胞はシブトラミンに対して高い感受性を示すことが示唆された。いくつかの未認可痩身薬の検査結果では、シブトラミンが高い濃度 ($25 \sim 78 \text{ mg}$) で含有されている錠剤やカプセルが見つかっており^{21,96,97)}、この濃度は Food and Drug Administration が定めた 1 日当たりの最大服用量 15 mg を大幅に超えている。また、それらの製造者が作成した説明書によれば、最大効果を得るために 1 日に 2、3 錠の服用を推奨している。さらに、シブトラミン乱用者の血清中シブトラミン濃度は約 $0.4 \mu M$ であったこと⁹⁸⁾、並びに食事の摂取はシブトラミンの C_{max} を約 3~5 倍上昇させて半減期を延長させることが報告されている³⁸⁾。本研究において HASM 細胞におけるカスパーゼ 3 の有意な活性化が $2 \mu M$ 以上の濃度で認められたこと (Fig. 16C) を考慮すると、高用量のシブトラミンの継続的な摂取は、血管平滑筋細胞を傷害し、高血圧等の深刻な循環器障害へと繋がることが示唆された。Fig. 17 の結果から、シブトラミン処理による HASM 細胞のアポトーシス誘導はミトコンドリア機能障害やカスパーゼ活性化等の ROS 依存性シグナリング経路に依存すると考えられた。その HASM 細胞のシブトラミン誘導アポトーシス機序は、前述の血管内皮 HAE 細胞の場合とほとんど一致するが、HAE 細胞のシブトラミン感受性は HASM 細胞と比較して若干高かった。この差異は内皮細胞と比べ平滑筋細胞の ROS 産生能が低く、HNE 解毒活性が高いことに起因している可能性がある^{99,100)}。シブトラミンによる ROS 産生機序については未だに不明であるが、ミトコンドリア機能障害は ROS の産生亢進の主要な原因であると予測された。その理由として、

シブトラミン処理を行った HASM 細胞では、ミトコンドリアを ROS から保護することで知られるミトコンドリア局在抗酸化酵素 Mn-SOD^{101,102)} の発現量が増加し、その一方で細胞質の Cu/Zn-SOD には影響を及ぼさなかったことが挙げられる (成績未掲載)。

血管平滑筋細胞の緊張状態は血管収縮因子と血管弛緩因子のバランスによって制御されている¹⁰³⁾。また、高血圧の多くは血管平滑筋細胞の異常な収縮に起因すること¹⁰⁴⁾、並びに肺高血圧患者から採取した肺動脈平滑筋細胞は非高血圧被験者のものと比較してコラーゲン収縮アッセイにおいて高い細胞収縮活性を示すことが報告されている¹⁰⁵⁾。本研究では、コラーゲンゲル収縮アッセイにおいてシブトラミン処理が HASM 細胞の収縮を誘起することを初めて見出した (Fig. 18A)。また、抗酸化剤を用いた検討により、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇とそれに伴う MLC のリン酸化を介したシブトラミン誘発血管平滑筋細胞収縮に酸化ストレスの誘導が関与することも推測された (Figs. 19A～C)。このことはシブトラミン処理が若年ラットの精管における Ca^{2+} 依存的な収縮に影響し、細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させたことにも部分的に一致する¹⁰⁶⁾。実際に、ROS と平滑筋収縮の関連性については報告がいくつか存在する。例えば、高血圧モデルラットの動脈における収縮反応が H_2O_2 によって誘導されること¹⁰⁷⁾、ROS 産生は Rho/Rho キナーゼ II 経路を介して胃の平滑筋収縮を増強すること¹⁰⁸⁾、並びに高脂肪食を与えたラットにおいて、ROS の過剰産生は AT_1 依存経路を介してアンジオテンシン II による血管平滑筋収縮を強めること¹⁰⁹⁾ 等が報告されている。興味深いことに、HASM 細胞における MLC のリン酸化は H_2O_2 及び ROS 産生物質 PQ と同様に反応性アルデヒド HNE 処理によっても促進されたこと (Fig. 19C) から、HNE のタンパク質への結合もまた血管平滑筋収縮に関与することが推察された。MLC のリン酸化と HNE に関する報告は知る限りないため、現在、HNE 修飾の対象となる細胞内タンパク質を同定すべく研究を進行させている。

血管内皮細胞から放出された NO は血管拡張を誘起するために血管平滑筋細胞に速やかに移行する。前章の研究において、シブトラミン処理が HAE 細胞内の NO を枯渇させることを見出したため、シブトラミン誘導血管平滑筋細胞収縮には ROS 産生だけでなく、血管内皮細胞からの NO 産生の減少も関与すると推測した。この推測は以下の 2 つの先行研究によっても支持される。(1) NO が S-ニトロシル化を介して Ca^{2+} とカルモジュリンの相互作用を触媒するカルモジュリン依存性 PK II α 及び Ca^{2+} チャンネルを阻害すること¹¹⁰⁾、並びに (2) NO を含む血管拡張因子が MLC のリン酸化における Ca^{2+} 感受性を cGMP 依存的に低下させること¹¹¹⁾ である。NO/cGMP 経路はリン酸化 MLC の脱リン酸化を促進する MLC 脱リン酸化酵素を活性化し、血管平滑筋を弛緩する¹¹²⁾。また、シブトラミン血管平滑筋細胞毒性に対する NO ドナー DETA による保護作用は、グアニル酸シクラーゼ阻害剤 ODQ の添加によってほぼ完全に抑制されたこと (Fig. 20A) から、NO によるシブトラミン誘導血管平滑筋細胞毒性及び細胞収縮の減弱は、細胞内タンパク質のニトロシル化というよりはむしろグアニル酸シクラーゼの活性化による GTP から cGMP への変換に起因するものと考えられた。これらのことから、シブトラミン処理により惹起される過剰な ROS 産生や NO 枯渇は、 Ca^{2+} 濃度の上昇及び MLC のリン酸化を介して血管平滑筋収縮を亢進し、その結果、高血圧を引き起こすと推察された。

シブトラミンは脱メチル化によって N-デスメチルシブトラミン及び N-ジデスメチルシブトラミンへと代謝され^{38,40,42,95)}、それらはシブトラミンと比べより強力なモノアミン再取り込み阻害剤として作用する^{42,113)}。また、シブトラミンや N-デスメチルシブトラミンではなく、N-ジデスメチルシブトラミンによって痩せ型及び肥満型マウスの脂肪細胞におけるグリセロール産生が亢進するとの報告もある¹¹⁴⁾。それらの知見とは対照的に、本研究では、N-デスメチル代謝物がシブトラミンと比較して HASM 細胞に対する毒性及び収縮作用が弱いことを示

した (Figs. 21A 及び B)。前章において、代謝物の細胞毒性が低いことは HAE 細胞においても同様に確認されているため、シブトラミンによるこれら 2 種類の血管細胞に対する作用は、前述の ROS の産生亢進及び NO の枯渇によって説明することができるかもしれない。血管細胞では CYP3A4 及び CYP2B6 の発現量が大変少ないため、血管細胞のシブトラミン代謝能は低く (Fig. 21C)、それ故、細胞内シブトラミン濃度が高い状態で維持されると考えられた。血管細胞の代謝酵素の発現量及びシブトラミンに対する感受性は、高血圧症の発症を含む副作用の発現リスクに関係している可能性がある。このことから、*N*-デスメチル代謝物はシブトラミンよりも高いモノアミン阻害活性を有し、高血圧発症リスクの低い痩身薬となり得るかもしれない。最近の研究において、いくつかの新規シブトラミン誘導体がサプリメントに混在していることが示された^{115,116}。薬理作用や安全性の観点から、それら誘導体による高血圧等の循環器疾患の発症及び増悪機序を解明するため構造毒性相関の更なる研究が必要である。

第3章 ピロリジノフェノン誘導体によるヒト血管内皮細胞毒性の構造活性相関解析

第1節 緒言

カチノン (β -ケト-アンフェタミン) は、カートの葉に含まれる精神賦活性のフェネチルアミン系アルカロイドである²⁶⁾。その構造類似性からカチノンの薬理作用は覚醒剤アンフェタミンに非常に類似しており、脳内のモノアミントランスポーターに対して強力に結合することによってモノアミン神経伝達物質 (ドパミン、ノルアドレナリン、セロトニン) の再取り込みを阻害する^{26,117-119)}。また、カチノンはモノアミン系神経伝達物質の分解に関与するモノアミン酸化酵素の強力な阻害剤としても作用する²⁴⁾。また、序論でも述べたように、 β -ケト基を有することから、カチノンはアンフェタミンと比較して疎水性が低く、BBBの透過性も低いと考えられている²⁶⁾。しかしながら、最近流行の合成カチノンの多くはアルキル鎖の伸長やハロゲン付加等の構造修飾により高い疎水性を有し、それら合成カチノンの乱用による脳神経及び血管系における重篤な副作用の発生が懸念されている^{26,27)}。Kelly の報告¹¹⁷⁾によれば、合成カチノンは化学的に *N*-アルキル化カチノンと PPs に分類することができ、*N*-アルキル化カチノンにはアミノ基の側鎖アルキル鎖の短いものも含まれ、メチル基やエチル基で置換されたものはメトカチノン及びエトカチノンと呼ばれる。また、PPs はアミノ基がピロリジニル基で置換されたカチノン誘導体であり、原型として α -pyrrolidinopropiophenone (α -PPP) (Fig. 22) が知られている。さらに、最近では、芳香環の4位をメチル基、メトキシ基及びフルオロ基もしくは3,4位をメチレンジオキシ基にて修飾した PPs が違法な市場やインターネットを介して密造・

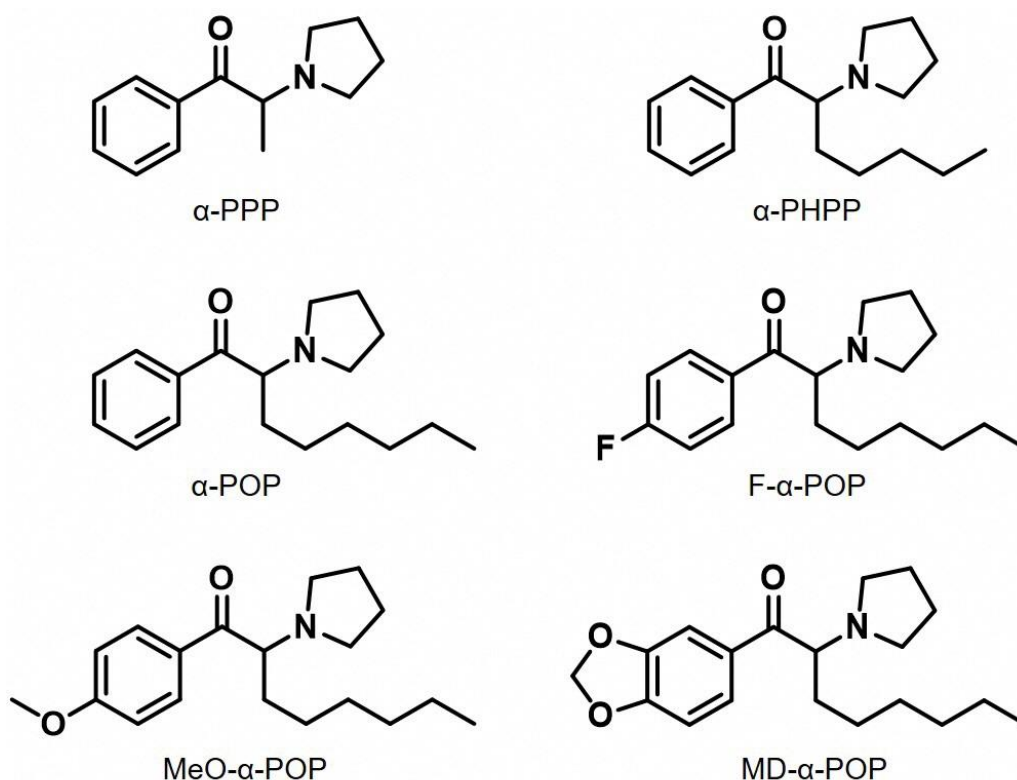


Fig. 22. Structure of α -PPP, α -PHPP, α -POP and its derivatives.

販売されている。なお、最も広く乱用されたカチノン誘導体のひとつに 4-メチルメトカチノン (メフェドロン) があり、その高用量投与は中毒死の誘発に関与すると推測されている³¹⁾。詳細な機序については未だ不明な点が多いものの、メフェドロン中毒は急性毒性として循環器系疾患 (頻脈や高血圧等) 及び中枢神経系疾患 (発作や扇動、幻覚等) を引き起こす可能性が高いと考えられている²⁷⁾。それ以外の合成カチノンの副作用に関する事例報告として、メフェドロン乱用者における胸痛、心筋浮腫、肺気腫等が知られる¹²⁰⁻¹²²⁾。このように、合成カチノンの乱用は重篤な健康被害を誘起し、死亡リスクを著明に増加させることが予測されるが、新規合成カチノンの一種である α -pyrrolidinoctanophenone (α -POP)、 α -pyrrolidinoheptanophenone (α -PHPP) やそれらの誘導体の生物学的作用及び安全性に関しての知見はほとんど報告されていない。

そこで本章では、 α -POP 及び α -PHPP の副作用発現部位を明示するために、そ

れら合成カチノンに対する感受性を 10 種のヒト細胞種において測定・比較した。また、感受性の高い細胞種における PPs の細胞毒性と置換基の構造活性相関を調査した。さらに、 α -POP 及びその誘導体による細胞傷害機序に対する ROS の産生、カスパーゼ 3 の活性化及びアポトーシス誘導の関与を検討した。

第2節 実験材料及び実験方法

1. 実験材料

本実験に使用した18種のPPsはCayman Chemicals社より購入した。ヒト胃癌MKN45細胞、ヒト大腸癌DLD1細胞、ヒト肺癌A549細胞、ヒト気道上皮BEAS-2B細胞及びヒト神経膠芽腫A172細胞はAmerican Type Culture Collection社から購入した。その他は全て第1章及び第2章の第2節で使用したのと同じものを用いた。

2. 細胞培養

細胞培養は第1章及び第2章の第2節に記載した方法に従った。

MKN45細胞、DLD1細胞、A549細胞、BEAS-2B細胞及びA172細胞は37°C、5% CO₂条件下の炭酸ガスインキュベーター内で培養し、2日毎に培地を交換して4~6日毎に継代維持した。増殖培地として10% FBS、100 U/mL penicillin-G potassium 及び100 µg/mL streptomycin sulfate を含むDMEM (pH 7.4) を用いた。

3. 細胞生存率の測定

細胞生存率の測定は第1章の第2節に記載した方法に従った。

4. 細胞内ROS量の測定

細胞内ROS量の測定は第1章の第2節に記載した方法に従った。

5. カスパーゼ3の測定

カスパーゼ3活性の測定は第1章の第2節に記載した方法に従った。

6. DNA の断片化の測定

DNA の断片化の測定は第 1 章の第 2 節に記載した方法に従った。

7. タンパク質の定量

タンパク質の定量は第 1 章の第 2 節に記載した方法に従った。

8. 統計解析

統計解析は第 1 章の第 2 節に記載した方法に従った。

第3節 結果

1. PPs に対する各種細胞の感受性の測定

HAE 細胞を 20 μM α -POP にて 0、6、12、24、36 及び 48 時間処理したところ、生存率は 24 時間後から減少し始め、48 時間後においては 40%にまで減少した (Fig. 23A)。また、 α -POP の 48 時間処理によって HAE 細胞の生存率は濃度依存的に減少し、 LC_{50} 値は $15.6 \mu\text{M} \pm 2.3 \mu\text{M}$ であった (Fig. 23B 及び Table 2)。

次に、PPs による細胞傷害作用の臓器特異性を予測・同定するため、10 種のヒト細胞種 (HAE、HASM、SK-N-SH、A172、HepG2、MKN45、DLD1、HEK293、A549 及び BEAS-2B) の α -POP 及び α -PHPP に対する感受性を調べた (Tables 2 及び 3)。その結果、肝臓 HepG2、腎臓 HEK293 及び肺 A549 細胞は全ての PPs 誘導体に対する感受性が大変低かったのに対し、それ以外の細胞は総じて高い感受性を示した。それらの細胞の中でも特に、気道上皮 BEAS-2B、血管内皮 HAE 及び血管平滑筋 HASM 細胞は、神経 SK-N-SH 細胞と並んで α -POP に対する感

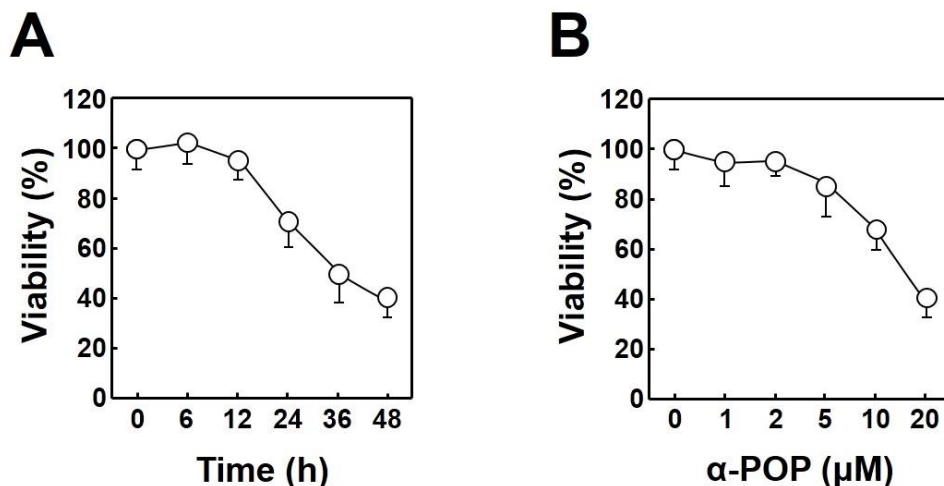


Fig. 23. HAE cell damage by α -POP treatment.

(A) Time-course of HAE cell damage by α -POP. The cells were treated for 0, 6, 12, 24, 36 and 48 h with 20 μM α -POP. The cell viability was estimated by the WST-1 method, and expressed as a percentage to that in the control cells before the treatment (0 h). (B) Dose-response experiment of α -POP. The cells were treated for 48 h with the indicated concentrations of α -POP.

Table 2. LC₅₀ values for toxicity of α -POP derivatives against ten cell lines.

Cell line	LC ₅₀ (μ M)			
	α -POP	F- α -POP	MeO- α -POP	MD- α -POP
BEAS-2B (<i>Lung</i>)	14.9 \pm 1.5	11.8 \pm 0.3 ^a	14.8 \pm 2.2	12.8 \pm 1.2
HAE (<i>Vascular</i>)	15.6 \pm 2.3	10.6 \pm 1.3 ^a	15.2 \pm 1.7	13.1 \pm 1.4
HASM (<i>Vascular</i>)	22.4 \pm 0.8	14.4 \pm 1.5 ^a	21.7 \pm 0.4	16.6 \pm 0.6 ^a
SK-N-SH (<i>Neuron</i>)	22.6 \pm 4.4	11.4 \pm 0.6 ^a	22.0 \pm 2.4	16.0 \pm 1.0 ^a
DLD1 (<i>Colon</i>)	24.3 \pm 3.1	17.3 \pm 1.9 ^a	22.5 \pm 1.6	18.3 \pm 1.6 ^a
A172 (<i>Neuron</i>)	42.9 \pm 6.2	29.8 \pm 5.6 ^a	38.5 \pm 4.7	33.6 \pm 5.6
MKN45 (<i>Stomach</i>)	45.7 \pm 4.9	31.5 \pm 5.2 ^a	44.1 \pm 3.5	37.0 \pm 5.1
HEK293 (<i>Kidney</i>)	89.4 \pm 5.7	56.4 \pm 4.9 ^a	82.1 \pm 7.9	67.5 \pm 4.7 ^a
A549 (<i>Lung</i>)	>100 ^b	93.4 \pm 5.3	>100	>100
HepG2 (<i>Liver</i>)	>100	>100	>100	>100

^a Significant difference from α -POP, $p < 0.05$.

^b No significant cytotoxicity (less than 40%) was observed at 100 μ M.

Table 3. LC₅₀ values for toxicity of α -PHPP derivatives against ten cell lines.

Cell line	LC ₅₀ (μ M)			
	α -PHPP	F- α -PHPP	MeO- α -PHPP	MD- α -PHPP
BEAS-2B (<i>Lung</i>)	42.1 \pm 5.1	28.9 \pm 4.2 ^a	36.9 \pm 4.9	33.2 \pm 5.4
HAE (<i>Vascular</i>)	44.9 \pm 4.8	32.5 \pm 2.5 ^a	38.8 \pm 3.0	34.1 \pm 2.9 ^a
HASM (<i>Vascular</i>)	46.2 \pm 4.1	30.2 \pm 6.9 ^a	40.1 \pm 4.0	33.8 \pm 5.2 ^a
SK-N-SH (<i>Neuron</i>)	57.5 \pm 4.8	35.2 \pm 6.8 ^a	51.8 \pm 6.8	44.9 \pm 6.7
DLD1 (<i>Colon</i>)	57.9 \pm 5.6	43.8 \pm 4.9 ^a	52.9 \pm 6.3	49.7 \pm 5.2
A172 (<i>Neuron</i>)	65.1 \pm 6.3	52.9 \pm 3.5 ^a	63.8 \pm 5.7	55.6 \pm 5.0
MKN45 (<i>Stomach</i>)	82.4 \pm 4.3	45.8 \pm 5.1 ^a	72.6 \pm 7.8	56.8 \pm 6.3 ^a
HEK293 (<i>Kidney</i>)	>100 ^b	83.7 \pm 6.0	>100	92.4 \pm 6.6
A549 (<i>Lung</i>)	>100	>100	>100	>100
HepG2 (<i>Liver</i>)	>100	>100	>100	>100

^a Significant difference from α -PHPP, $p < 0.05$.

^b No significant cytotoxicity (less than 40%) was observed at 100 μ M.

受性が高かった (Table 2)。また、同様の傾向が α -PHPP 処理においても観察された (Table 3) ことから、PPs の過剰摂取は循環器、呼吸器及び脳神経系において重篤な障害を誘発する可能性が示された。HAE 細胞の α -POP 及び α -PHPP に対する感受性は大変高かったこと、並びに血管内皮細胞は全身組織への薬物循環において中心的な役割を果たすことを考慮し、これ以降の実験は HAE 細胞を用いて行った。

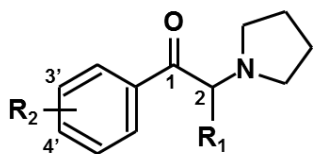
2. PPs による血管内皮細胞毒性の構造活性相関解析

PPs による細胞毒性と置換基の構造活性相関を解明すべく、始めに直鎖炭化水素鎖及び／又は芳香環の置換基が異なる 10 種類の PPs に対する HAE 細胞の感受性を評価した (Table 4)。その結果、 α -PPP (R_1 がメチル基のもの) 及びその誘導体 (芳香環の 4 位にフッ素又はメトキシ基もしくは 3,4 位にメチレンジオキシ基が結合したもの) は、高濃度である 100 μ M 処理を行った場合においても有意な細胞傷害作用を示さなかった。また、 R_1 がエチル基の α -pyrrolidinobutylphenone (α -PBP) も同様に毒性が認められなかったが、その 4'-フルオロ体及び 3',4'-メチレンジオキシ体は若干の細胞毒性を示した。一方、長い直鎖炭化水素鎖を有する α -PVP、pyrrolidinohexanophenone (α -PHP)、 α -PHPP 及び α -POP は血管内皮細胞毒性を示し、それらの毒性は炭化水素鎖の伸長に伴って増加した。 α -POP 及び α -PHPP の誘導体に関しては、4'位のフルオロ化 (F- α -POP 及び F- α -PHPP) または 3',4'位のメチレンジオキシ化 (MD- α -POP 及び MD- α -PHPP) によって細胞毒性が増強され、 α -POP 誘導体の毒性の強さは F- α -POP > MD- α -POP > MeO- α -POP > α -POP の順であった。この傾向は他の 8 種の細胞においても同様に確認されたことから、PPs の血管内皮細胞毒性は直鎖炭化水素鎖の伸長や芳香環の 4-フルオロ化及び 3,4-メチレンジオキシ化により増強することが示された。

Table 4. LC₅₀ values for toxicity of PPs against HAE cells.

PP	Substituent ^a		LC ₅₀ (μM)
	R ₁	R ₂	
α-PPP	CH ₃	H	>100 ^b
F-α-PPP	CH ₃	F	>100
MeO-α-PPP	CH ₃	4'-OCH ₃	>100
MD-α-PPP	CH ₃	3',4'-Methylenedioxy	>100
α-PBP	CH ₂ CH ₃	H	>100
F-α-PBP	CH ₂ CH ₃	4'-F	76.3 ± 6.4
MeO-α-PBP	CH ₂ CH ₃	4'-OCH ₃	>100
MD-α-PBP	CH ₂ CH ₃	3',4'-Methylenedioxy	83.6 ± 5.7
α-PVP	(CH ₂) ₂ CH ₃	H	92.3 ± 6.1
α-PHP	(CH ₂) ₃ CH ₃	H	71.7 ± 5.5

^a



^b No significant cytotoxicity (less than 40%) was observed at 100 μM.

3. α-POP 誘導体誘発アポトーシスにおける酸化ストレスの関与

HAE 細胞を α-POP で処理したところ、カスパーゼ 3 の活性化が認められ、その活性化レベルは α-POP の濃度依存的に上昇した (Fig. 24A)。また、アポトーシスの有無を調べるため TUNEL 染色法にてアポトーシス細胞を検出した結果、α-POP 処理による TUNEL 陽性細胞の割合は DMSO のみで処理した対照細胞に比して顕著に増加した (Fig. 24B)。以上より、α-POP 処理は HAE 細胞のアポトーシスを惹起することが示された。カチノンを含むカートによる処理は、ケラチノサイトや繊維芽細胞の ROS 産生を亢進させることから¹²³⁾、ROS の産生亢進が α-POP 誘導アポトーシス機序に関与していると予測される。そこで、この仮説を検証するために、α-POP の HAE 細胞毒性に対する NAC の影響を調べ

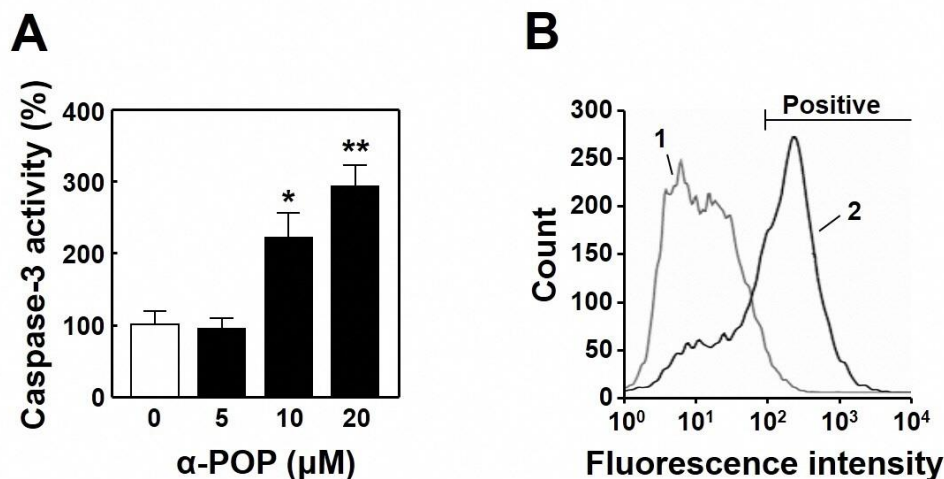


Fig. 24. Apoptotic induction of HAE cells by α -POP treatment.

(A) Activation of caspase-3. The cells were treated for 48 h with 0, 5, 10 or 20 μ M α -POP and activity of caspase-3 in their extract (100 μ g) was measured using the fluorogenic probe. The caspase-3 activity is expressed as a percentage to that of the control cells treated with the vehicle DMSO alone (0 μ M). (B) Detection of apoptotic cells. The cells were treated for 48 h with 0 (1) or 20 μ M α -POP (2). Significant difference from the control cells treated with the vehicle alone (0 μ M), * p < 0.05 and ** p < 0.01.

た (Fig. 25A)。その結果、NAC の前処理は α -POP の細胞傷害作用を有意に減弱させ、その保護作用は 3 種の α -POP 誘導体で処理した細胞においても同様に観察された。また、細胞内 H_2O_2 量を蛍光プローブ DCFH-DA を用いたフローサイトメトリー分析により調べたところ、20 μ M α -POP での 24 時間処理によって DCF 陽性細胞の割合が増加し [59.4 ± 6.3 vs $7.8 \pm 3.7\%$ (対照細胞)]、最も強力な細胞毒性を示した F- α -POP では更に陽性細胞の割合が高かった ($67.3 \pm 7.1\%$) (Fig. 25B)。さらに、 α -POP によるカスパーゼ 3 活性化やアポトーシス誘導は 4'位のフルオロ化によって増強され、その増加は NAC の前処理によってほぼ完全に抑制された (Figs. 25B 及び C)。これらの結果から、 α -POP による血管内皮細胞アポトーシスの誘導に ROS の産生亢進が関与することが示唆された。

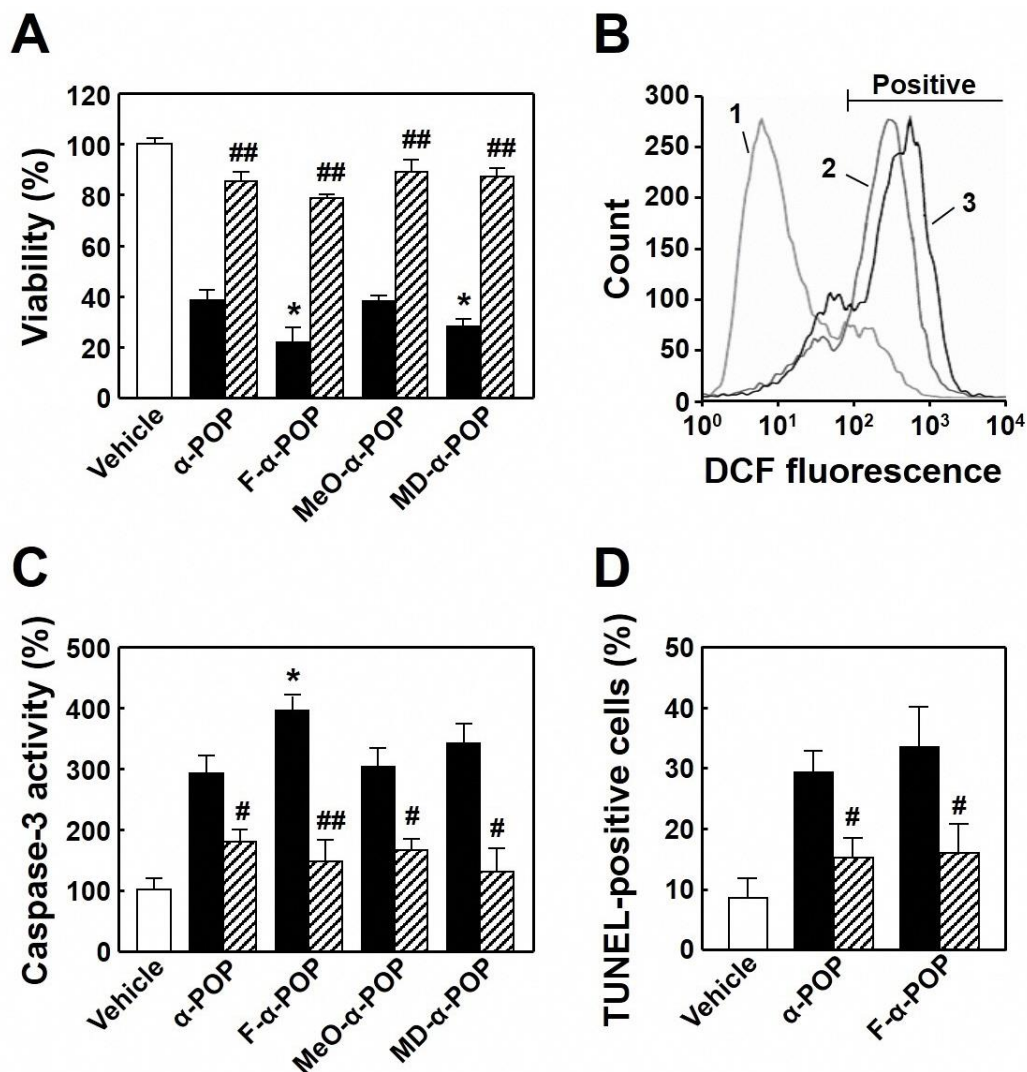


Fig. 25. Activation of reactive oxygen species-dependent apoptotic pathway by HAE cell treatment with α -POP derivatives.

(A) Effect of NAC on toxicity elicited by α -POP derivatives. The cells were pretreated for 2 h with 0 or 2 mM NAC (slashed bar), and then treated for 48 h with 20 μ M α -POP, F- α -POP, MeO- α -POP or MD- α -POP (filled bar). The viability in the treated cells is expressed as a percentage to that in the control cells treated with the vehicle alone (open bar). (B) DCF formation. The cells were treated for 24 h without (1) or with 20 μ M α -POP (2) or F- α -POP (3). (C) Effect of NAC on caspase-3 activation. The cells were treated as described in (A). (D) Effect of NAC on apoptotic induction. The cells were pretreated for 2 h with 0 or 2 mM NAC (slashed bar), and then treated for 48 h with 20 μ M α -POP or F- α -POP. The percentage of the TUNEL-positive cells was indicated in the bar graphs. *Significant difference from the cells treated with 20 μ M α -POP, $p < 0.05$. Significant difference from the cells treated without the antioxidant, # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$.

第4節 考察

本章では、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、気道上皮細胞及び神経細胞が α -POP に対して高い感受性を示すことを見出した。 α -POP で 48 時間処理した際の HAE 細胞の LC_{50} 値は $15.6 \mu M$ であったが、長時間 (96 時間) 処理した場合、 α -POP は $4 \mu M$ 以上の濃度において細胞生存率の有意な減少 ($4 \mu M$ α -POP 処理時に $75.3 \pm 5.7\%$ まで減少) を示した (成績未掲載)。Hasegawa らの報告¹²⁴⁾によれば、死後の大腿静脈中の α -POP 濃度は約 $0.66 \mu M$ であり、他の報告¹²⁵⁾では α -POP 及びその 4'-メトキシ体 (MeO- α -POP) の摂取に起因すると考えられる死亡例において、それらが高濃度 (それぞれ $2.7 \mu M$ 及び $0.86 \mu M$) で検出されている。本研究で用いた α -POP 濃度は上記の事例報告と比較的近い値であることから、合成カチノン摂取による死因の 1 つとして血管内皮細胞傷害の関与が示唆された。一般的に、合成カチノンの摂取経路は経鼻吸入もしくは経口摂取である^{117,126)}。また、合成カチノンの種類によって使用量は異なるものの、典型的な摂取量は $5 \sim 250 mg$ と考えられている。そのため、合成カチノンを服用する際には気道及び消化器系細胞が高濃度の合成カチノンに曝露されることが推測される。加えて、BEAS-2B 細胞は PPs に対して高い感受性を有していることから、合成カチノンの摂取により血管と同様に気道系組織障害も誘発されることが予測された。培養細胞を用いた最近の毒性試験によれば、4-メチルメトカチノンや 3,4-メチレンジオキシメトカチノンは神経細胞毒性¹²⁷⁻¹²⁹⁾、MDPV は肝細胞毒性を惹起することが示唆されている^{130,131)}。加えて、3-フルオロメトカチノン (fluoromethcathinone, FMC) も同様に神経細胞の生存率を減少させることが報告されているものの、それらは数百 $\mu M \sim mM$ オーダーの高濃度処理においてのみ誘導されること¹³²⁾から、数世代前の合成カチノンと比較して α -POP の神経細胞毒性は顕著に上昇していると考えられた。これらのことから、 α -POP の過剰

摂取は循環器、呼吸器及び脳神経系の健康被害発生リスクを増加させることが示唆された。一方で、 α -POP の細胞毒性に関する報告は調べた限り 1 報³²⁾しか存在しないため、中枢神経系の細胞に対する PPs 毒性についての詳細な知見は未だ得られていない。

本研究における構造活性相関解析の結果、PPs 毒性は直鎖炭化水素鎖の伸長や 4'-フルオロ化、3',4'-メチレンジオキシ化等の芳香環の構造修飾によって上昇することが示された (Table 2~4)。細胞膜の透過性は細胞傷害性を決定する最も重要な要因の 1 つであることが知られている。それ故、直鎖炭化水素鎖の伸長による毒性亢進は、伸長に伴う疎水性の上昇とそれに伴う細胞膜の透過性増加に起因すると考えられた。一方、3',4'-メチレンジオキシ体において、疎水性の指標である分配係数 $\log P$ 値が α -POP では 4.13 であったのに対し、MD-POP では 3.91 と小さかったにも拘らず細胞毒性が増大したことから、3',4'-メチレンジオキシ基の修飾による細胞毒性の変動は疎水性以外の要因の関与が示唆された。最近の神経細胞を用いた検討において、MDPV の主代謝物である 3',4'-Catechol-PV (MDPV の脱メチレン体) が MDPV と比較して強力な毒性を有することが示された¹³³⁾。それ故、PPs の 3',4'-メチレンジオキシ化による細胞毒性の増大は、カテコール体等の毒性の強い代謝物の生成によるものと推測された。また、4'-フルオロ体については、疎水性 (F-POP ; $\log P = 4.28$) の上昇に加え、細胞内での代謝経路の違いによる影響が考えられる。つまり、 α -PPP 誘導体のラットを用いた実験では、ピロリジン環の水酸化及びそれに続く脱水素により対応するラクタムが形成される代謝経路が主要な経路とされている^{117,125,134)}。また、ピロリジン環の修飾に加えて、メトキシ基及びメチレンジオキシ基を有する α -PPP 誘導体は、それぞれ O-脱メチル化及び脱メチレン化によってヒドロキシ体及びジヒドロキシ体に代謝されると報告されている¹³⁴⁻¹³⁶⁾。対照的に、4-FMC のようなフルオロカチノン誘導体は、C-F 結合が酵素分解されにくいため代謝物の生成が

抑えられると考えられている^{117,137)}。そのため、4'-フルオロ体が高い代謝安定性を有することも、F-POP が強力な細胞毒性を示すことの一序であると考えられた。

本毒性機序研究の結果、 α -POP による血管内皮細胞アポトーシスの誘導に酸化ストレスが関与することが示された。また、 α -POP と同様にフェネチルアミン誘導体に属する覚醒剤 (アンフェタミン及びメタンフェタミン) は、血管内皮細胞や神経細胞に対して ROS 産生及びカスパーゼ 3 の活性化を誘発することが知られている¹³⁸⁻¹⁴⁰⁾。さらに、先行研究及び第 1 章において、血管内皮細胞へのセラミドやシブトラミン処理は ROS の産生亢進を惹起し、Bcl-2 及び Bcl-X_L に対する Bax の割合の増加を介してミトコンドリア膜機能を低下させること、並びに Cyt-c を細胞質中に漏出させることが報告されている^{48,85,141)}。これらのことから、 α -POP のアポトーシス誘導機序として ROS の蓄積に伴うミトコンドリア機能障害とそれに続くカスパーゼ 3 の活性化も考えられた。なお、フローサイトメトリー分析の結果、抗酸化能が比較的高いとされる HepG2 及び A549 細胞の α -POP 処理は DCF の酸化をほとんど誘起しなかったことから (成績未掲載)、 α -POP 誘導体に対する各細胞種の感受性の違いはその抗酸化能に起因すると推察された。しかしながら、合成カチノンによる ROS の産生部位及び産生機序の詳細については未だに不明であるため、更なる研究が必要である。

第4章 抗酸化能の変動を介した α -pyrrolidinononanophenone による神経細胞アポトーシスの誘導

第1節 緒言

β -ケト-アンフェタミン類似体である合成カチノンは、最も流行したデザイナードラッグの1つで、違法な市場やインターネットを介して世界中で販売されている^{117,126,142)}。その主要な薬理作用機序は、モノアミン系神経伝達物質（ドパミン、ノルアドレナリン、セロトニン）の調節であり、モノアミントランスポーターに対して強力に結合することでそれらの再取り込みを阻害することが知られている^{143,144)}。各種トランスポーターに対する阻害活性は誘導体によって異なり、最も流行した精神賦活性ピロリジノフェノン誘導体である α -PVP 及び MDPV (Fig. 4) は、強力なノルアドレナリン及びドパミン再取り込み阻害剤として作用する^{26,144)}。対照的に、メフェドロンや4-メチルエフェドロンはノルアドレナリンではなくセロトニン及びドパミンの再取り込みを強力に阻害する^{26,144)}。いくつかの事例報告によれば、合成カチノンの経口摂取は多様な臨床的特徴を示す深刻な副作用を引き起こすことが報告されている。例えば、MDPV 及び／又はメフェドロンを摂取した患者では、扇動、精神病、高血圧、不整脈等の神経及び循環器系トキシドロームが認められる^{26,145)}。また、メフェドロンの過剰摂取によって急性心筋浮腫や頭部及び頸部の皮下気腫が副作用として引き起こされたとの報告もある^{121,122)}。さらに、Nagai ら^{146,147)} は α -PVP、MDPV 及びメフェドロンなど多種の合成カチノンの混合物の摂取による死亡例を報告し、合成カチノンの混合による副作用の多様化や複雑化を示した。前章では、血管内皮細胞傷害作用は PPs の直鎖炭化水素鎖の伸長によって増悪し、 α -PVP と比較

して長い直鎖炭化水素鎖を有する α -POP が ROS の産生亢進を介してアポトーシスを惹起することを解明した。従って、高脂溶性合成カチノンの過剰摂取は深刻な副作用を引き起こし、死亡リスクを高めると考えられる^{117,126,142)}。このように、合成カチノンへの関心が高まり乱用による健康被害の発生が懸念されているにも拘らず、 α -POP よりもさらに直鎖炭化水素鎖が長い新規合成カチノンの 1 つである α -PNP (Fig. 26) の生物学的な作用、毒性及びその機序についてはほとんど報告がされていない。

そこで本章では、ヒト神経細胞の生存率に及ぼす α -PNP の効果を検証した。また、ROS 産生及びその結果として生成する酸化物 (脂質及びタンパク質)、並びにそれら酸化物の分解に関与するプロテアソーム及びオートファジー機構に着目し、アポトーシス誘導機序を明示すべく種々検討を行った。

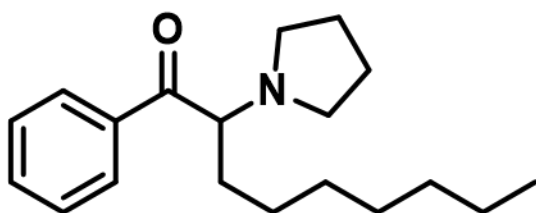


Fig. 26. Structure of α -PNP.

第2節 実験材料及び実験方法

1. 実験材料

本実験に使用した α -PNP は Cayman Chemicals 社より購入した。神経芽細胞腫 TGW 細胞は RIKEN Cell Bank 社、大腸癌 HT29 細胞は American Type Culture Collection 社から購入した。TGW 細胞に使用した Eagle's minimum essential medium (EMEM) は和光純薬工業より購入した。毒性試験に用いた Polyethylene glycol-conjugated catalase (PEG-cat) は筑波大学医学医療系環境生物学的研究室 熊谷嘉人教授より供与された。ウェスタンブロット解析に用いた一次抗体は LC3、p62、phosphorylated-adenosine monophosphate kinase (p-AMPK)、total-AMPK (t-AMPK) 及び Beclin1 は Cell Signaling Technology 社、Cyt-*c* は Sigma-Aldrich 社より購入した。また、HNE 結合タンパク質の検出に用いた一次抗体は Alexis Biochemicals 社のものを使用した。オートファジー阻害剤として用いたクロロキン、プロテアソーム活性測定に用いた *t*-butyloxycarbonyl-Leu-Arg-Arg-AMC、還元型グルタチオン (glutathione, GSH) の枯渇剤として使用した DL-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO) は Sigma-Aldrich 社、*N,N*-dimethylformamide (DMF) 及び diethylmaleate (DEM) はナカライテスクから購入した。その他は全て第1章、第2章及び第3章の第2節で使用したのと同じものを用いた。

2. 細胞培養

細胞培養は第1章、第2章及び第3章の第2節に記載した方法に従った。

TGW 細胞及び HT29 細胞は 37°C、5% CO₂ 条件下の炭酸ガスインキュベーター内で培養し、2 日毎に培地を交換して 4~6 日毎に継代維持した。増殖培地として 10% FBS、100 unit (U)/mL penicillin-G potassium 及び 100 µg/mL streptomycin sulfate を含む EMEM 及び DMEM (pH 7.4) を用いた。

3. 細胞生存率の測定

細胞生存率の測定は第 1 章の第 2 節に記載した方法に従った。

4. DNA の断片化及びミトコンドリア膜電位の測定

DNA の断片化及びミトコンドリア膜電位の測定は第 1 章の第 2 節に記載した方法に従った。

5. 細胞内 ROS 量の測定

細胞内 ROS 量の測定は第 1 章の第 2 節に記載した方法に従った。

6. ウェスタンブロット解析

6-1. 試料の調製

試料の調製は第 1 章の第 2 節に記載した方法に従った。

細胞の細胞質画分は、回収した細胞を 0.14 M KCl を含む Tris-KCl (pH 7.5) 緩衝液に懸濁して 26 ゲージの針を 30 回以上通すことにより細胞膜を破壊した。細胞破碎液を遠心分離 ($105,000 \times g$, 60 分間) し、その上清を採取して細胞質画分とした。

6-2. ウェスタンブロット解析

ウェスタンブロット解析は第 1 章の第 2 節に記載した方法に従った。

6-3. ドットブロット解析

ドットブロット解析は第 1 章の第 2 節に記載した方法に従った。

7. 酵素活性の測定

7-1. カスパーゼ活性の測定

カスパーゼ 3 及びカスパーゼ 9 活性の測定は第 1 章及び第 2 章の第 2 節に記載した方法に従った。

7-2. プロテアソーム活性測定

プロテアソーム活性の測定は第 1 章の第 2 節に記載した方法に従った。

トリプシン様活性はキモトリプシン様活性と同様の方法にて測定し、基質として *t*-butyloxycarbonyl-Leu-Arg-Arg-AMC を使用した。

7-3. HNE 還元酵素及び脱水素酵素活性の測定

細胞を DPBS で 3 回洗浄後、セルスクレイパーを用いて細胞を剥離した。回収した細胞を 5 mM 2-mercaptoethanol 及び 20% グリセロールを含む 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 緩衝液に再懸濁し、26 ゲージの針を 30 回通すことにより細胞膜を破壊した。細胞破碎液を遠心分離 (12,000 × g、15 分間) し、その上清を採取して測定用試料とした。測定用試料中の HNE 還元酵素及び脱水素酵素活性は、以下の反応系における 37°C での NADPH の酸化及び形成速度を分光学的 (340 nm) に測定することにより算出した。反応系は、0.1 M リン酸カリウム (pH 7.4) 緩衝液、基質、補酵素、細胞抽出液を含む全量 2 mL とした。還元酵素活性測定の基質及び補酵素として、それぞれ 10 µM HNE 及び 0.1 mM NADPH を使用した。脱水素酵素活性測定の基質及び補酵素は、それぞれ 50 µM HNE 及び 1 mM NAD⁺ を用いた。

7-4. グルタチオン *S*-転移酵素 (glutathione-*S*-transferase, GST) 活性測定

GST 活性は、Habig らの方法¹⁴⁸⁾に従って測定した。細胞を DPBS で 3 回洗浄

後、セルスクレイパーを用いて細胞を剥離した。回収した細胞を 140 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液中に再懸濁し、26 ゲージの針を 30 回通すことにより細胞膜を破壊した。細胞破碎液を遠心分離 ($12,000 \times g$, 15 分間) し、その上清を採取して測定用試料とした。測定用試料中の GST 活性は、以下の反応系における 37°Cでのグルタチオン-1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) の生成を分光学的 (340 nm) に測定することにより算出した。反応系は、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、基質、細胞抽出液を含む全量 2 mL とした。基質として、5 mM GSH 及び 1 mM CDNB を用いた。

7-5. グルタチオン還元酵素 (glutathione reductase, GR) 活性測定

GR 活性は、Worthington らの方法¹⁴⁹⁾に従って測定した。細胞を DPBS で 3 回洗浄後、セルスクレイパーを用いて細胞を剥離した。回収した細胞を 1 mM EDTA 及び 0.1% Triton X-100 を含む 150 mM HEPES-NaOH (pH 8.0) 緩衝液中に再懸濁して、26 ゲージの針を 30 回通すことにより細胞膜を破壊した。細胞破碎液を遠心分離 ($12,000 \times g$, 15 分間) し、その上清を採取して測定用試料とした。測定用試料中の GR 活性は、以下の反応系における 37°Cでの NADPH の酸化を分光学的 (340 nm) に測定することにより算出した。反応系は、50 mM HEPES-NaOH (pH 8.0)、1 mM EDTA、基質、補酵素、細胞抽出液を含む全量 2 mL とした。基質には 1 mM 酸化型グルタチオン (oxidized glutathione, GSSG)、補酵素には 0.1 mM NADPH を使用した。酵素活性 1 U は 25°Cにおいて 1 分間に 1 μ mol の NADPH を酸化する酵素量として定義した

8. 細胞内グルタチオン量の測定

細胞内の全グルタチオン及び GSH 量の測定は、5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) を用いて既報の方法¹⁵⁰⁾に従って行った。細胞を DPBS で 3 回洗

浄後、セルスクレイパーを用いて細胞を剥離した。回収した細胞を 1 mM EDTA 及び 0.1% Triton X-100 を含む 0.1 M リン酸カリウム (pH 7.4) 緩衝液中に懸濁し、氷冷下において細胞懸濁液を超音波処理 (250 W、60 秒間 × 3 回) を行い、30 分間冷却した。冷却後、細胞破碎液を遠心分離 (12,000 × g、15 分間) し、その上清を採取して測定用試料とした。次に、0.8% sulfosalicylic acid を加えて除タンパク質処理することにより測定用試料を調製した。75 µM DTNB を添加して 37°C、15 分間インキュベートした後、生成した 5-thio-2-nitrobenzoic acid の吸光度 (測定波長 415 nm) をマイクロプレートリーダーにて測定することにより GSH 量を算出した。なお、全グルタチオン量の測定は、DTNB 添加の 30 分前にグルタチオン還元酵素及び NADPH を添加し、GSSG を GSH に変換した後に同様の方法を用いて行った。

9. RT-PCR 解析

9-1. トータル RNA の抽出

トータル RNA の抽出は第 1 章の第 2 節に記載した方法に従った。

9-2. 定量的 Real-time PCR

定量的 Real-time PCR は第 1 章の第 2 節に記載した方法に従った。

γ-glutamylcysteine synthetase (γ-GCS) の発現量は既報の特異的プライマーを用いて測定した¹⁵¹⁾。

10. タンパク質の定量

タンパク質の定量は第 1 章の第 2 節に記載した方法に従った。

11. 統計解析

統計解析は、第 1 章の第 2 節に記載した方法に従った。

第3節 結果

1. α -PNP 処理による神経 SK-N-SH 細胞のアポトーシス誘導

SK-N-SH 細胞を 50 μ M α -PNP にて 0、6、12、24 及び 48 時間処理し、WST-1 を用いて細胞生存率を算出したところ、12 時間以上の処理において生存率の減少が認められ、48 時間後における生存率は 8% にまで減少した (Fig. 27A)。また、 α -PNP による細胞生存率減少の傾向は、WST-1 試験と生細胞数を検出するトリパンプルー色素排除試験法でほとんど違いが認められなかったことから、WST-1 試験の結果はミトコンドリア機能だけでなく細胞生存数においても α -PNP による変動を反映していることが示された。加えて、 α -PNP の 48 時間処理は TUNEL 陽性細胞の数を顕著に増加させた (Fig. 27B) ことから、 α -PNP 処理によって神経細胞アポトーシスが誘導されることが示唆された。次に、各種濃度において SK-N-SH 細胞を 48 時間処理した結果、10 μ M 以上の α -PNP 処理は細胞生存率を顕著に低下させたのに対し、同濃度での直鎖炭化水素が短い α -PVP の処理は生存率にほとんど影響を及ぼさなかった (Fig. 27C)。SK-N-SH 細胞で観察された強力な α -PNP 毒性は、他の神経 TGW 細胞、血管平滑筋 HASM 細胞及び血管内皮 HAE 細胞においても認められ、それぞれの LC_{50} 値は 16.9、13.7 及び 12.6 μ M であり、SK-N-SH 細胞 (11.8 μ M) と同程度であった。一方、大腸 HT29 細胞や肝臓 HepG2 細胞、肺 A549 細胞、腎臓 HEK293 細胞の α -PNP に対する感受性は、神経細胞や血管細胞と比較して低かった (α -PNP に対する LC_{50} 値はそれぞれ > 50、33.1、38.4 及び 35.8 μ M であった)。これらのことから、 α -PNP の過剰な摂取や乱用は中枢神経や血管系に対して深刻な障害を引き起こす可能性が示された。アポトーシス誘導機序を解明すべく、以下の実験では高用量 (20 及び 50 μ M) の α -PNP を使用した。

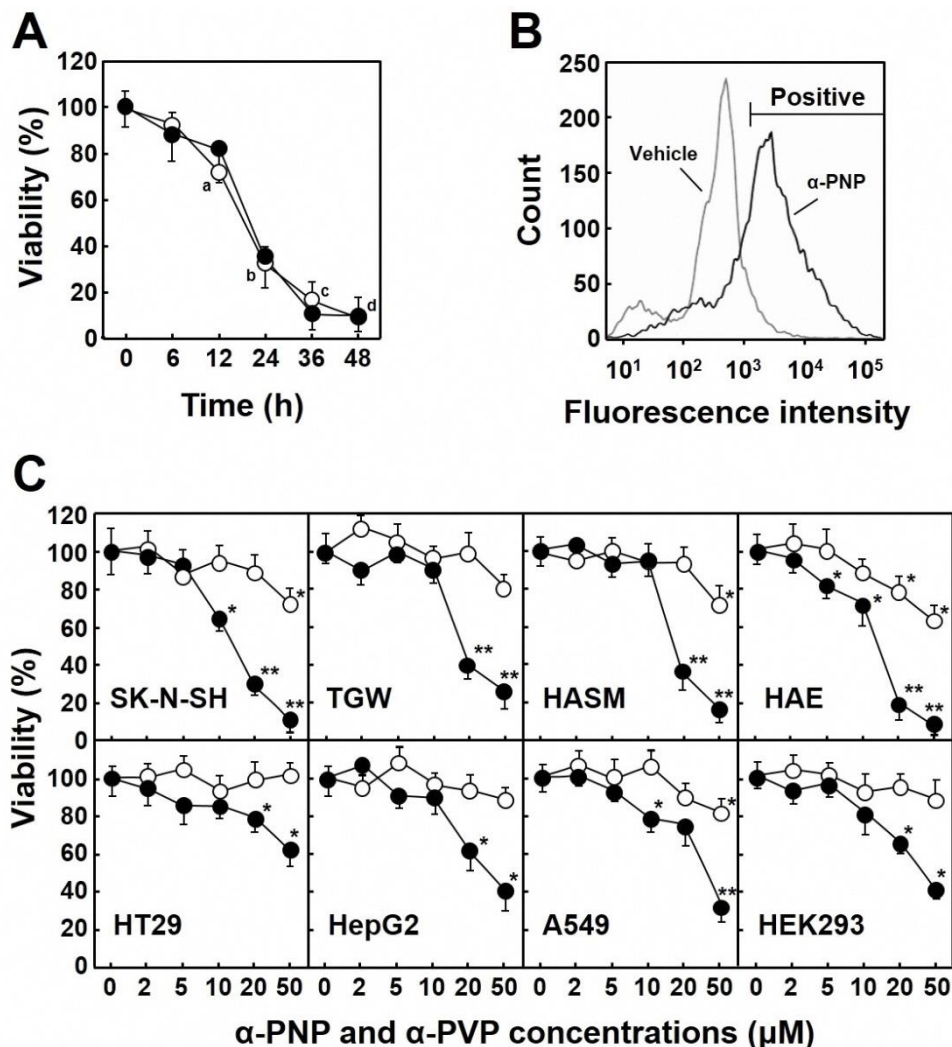


Fig. 27. Induction of neuronal cell apoptosis by α -PNP treatment.

(A) Time-course experiment in SK-N-SH cell damage by α -PNP. The cells were treated for 0, 6, 12, 24, 36 and 48 h with 50 μ M α -PNP, and the viability value was estimated by the WST-1 assay (\circ) and trypan blue dye-exclusion assay (\bullet). ^{a-d}Significant difference from the control cells in the in the time-course WST-1 assay, $p < 0.05$ (B) Flow-cytometric analysis of TUNEL-stained cells. The cells were treated for 48 h with 0 (Vehicle) or 50 μ M α -PNP (α -PNP), stained by the TUNEL method, and then applied to the flow-cytometric analysis. The apoptotic cells were detected as the TUNEL-positive cells. (C) Dose-response effect of α -PNP on cellular viability. SK-N-SH, TGW, HASM, HAE, HT29, HepG2, A549, and HEK293 cells were treated for 48 h with various concentrations of α -PVP (\circ) or α -PNP (\bullet). The viability values in the treated cells are expressed as the percentage of that in the control cells treated with vehicle alone (shown as 0 μ M). Significant difference from the control cells, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

2. α -PNP による ROS 依存性アポトーシス因子の活性化

前章において、 α -POP が酸化ストレスの誘導を介して血管内皮細胞傷害を誘発することを示した (Fig. 25)。また、PPs の細胞傷害作用は直鎖炭化水素鎖の伸長によって増強することから、神経 SK-N-SH 細胞中では α -PVP よりも長い直鎖炭化水素鎖を有する α -PNP によって多量の ROS が産生されることが推測される。

この仮説を検討するために、ROS の産生が α -PNP による神経細胞のアポトーシス機序に関与するか否かを調べたところ、致死濃度 (50 μ M) の α -PNP 処理による SK-N-SH 細胞傷害作用は、抗酸化剤である NAC や PEG-cat による前処理によって濃度依存的に抑制された (Fig. 28A)。また、DCFH-DA を用いたフローサイトメトリーによる検討の結果、 α -PNP の 24 時間処理によって DCF 陽性細胞が有意に増加し (Fig. 28B)、その割合の増加は同濃度の α -POP と比較して大きかった。一方、直鎖炭素水素鎖が短い α -PVP 処理によって ROS がほとんど産生しなかったことから、3 種類の PPs による ROS の産生量とそれらの直鎖炭化水素鎖の長さの間に正の相関が認められた。次に、 α -PNP 誘導アポトーシスへのミトコンドリア機能障害の関与を明らかにするため、ミトコンドリア膜透過性関連因子の変動をウェスタンブロット解析によって検討した (Fig. 28C)。その結果、SK-N-SH 細胞の α -PNP 処理は Bax 発現量の増加と Bcl-2 発現量の減少を誘起し、Bax/Bcl-2 の割合は対照群と比較して有意に高値を示した。また、 α -PNP 処理は細胞質画分における Cyt-c レベルを上昇させ、JC-1 由来の赤色蛍光を減弱させた (Fig. 28D)。さらに、 α -PNP 処理は濃度依存的にカスパーゼ 9 及びカスパーゼ 3 の活性化 (Fig. 28E) と DNA の断片化 (Fig. 28F) を誘導し、それらは NAC の前処理によって有意に抑制された。これらのことから、 α -PNP 誘導神経細胞アポトーシスにおいて ROS の産生亢進が重要な役割を果たすことが明らかとなり、そのアポトーシス機序としてミトコンドリア機能障害とそれに伴うカスパーゼの活性化が考えられた。

3. α -PNP による HNE 産生亢進

ROS の産生は脂質過酸化を惹起し、その結果生じる過酸化脂質分解産物の主要な毒性物質として HNE が挙げられる¹⁵²⁾。そこで、SK-N-SH 細胞中の HNE 付加タンパク質量をドットブロット分析にて調べたところ、50 μ M α -PNP での処理は HNE-タンパク質結合体を顕著に増加させた (Fig. 29A)。HNE の解毒には 3 種

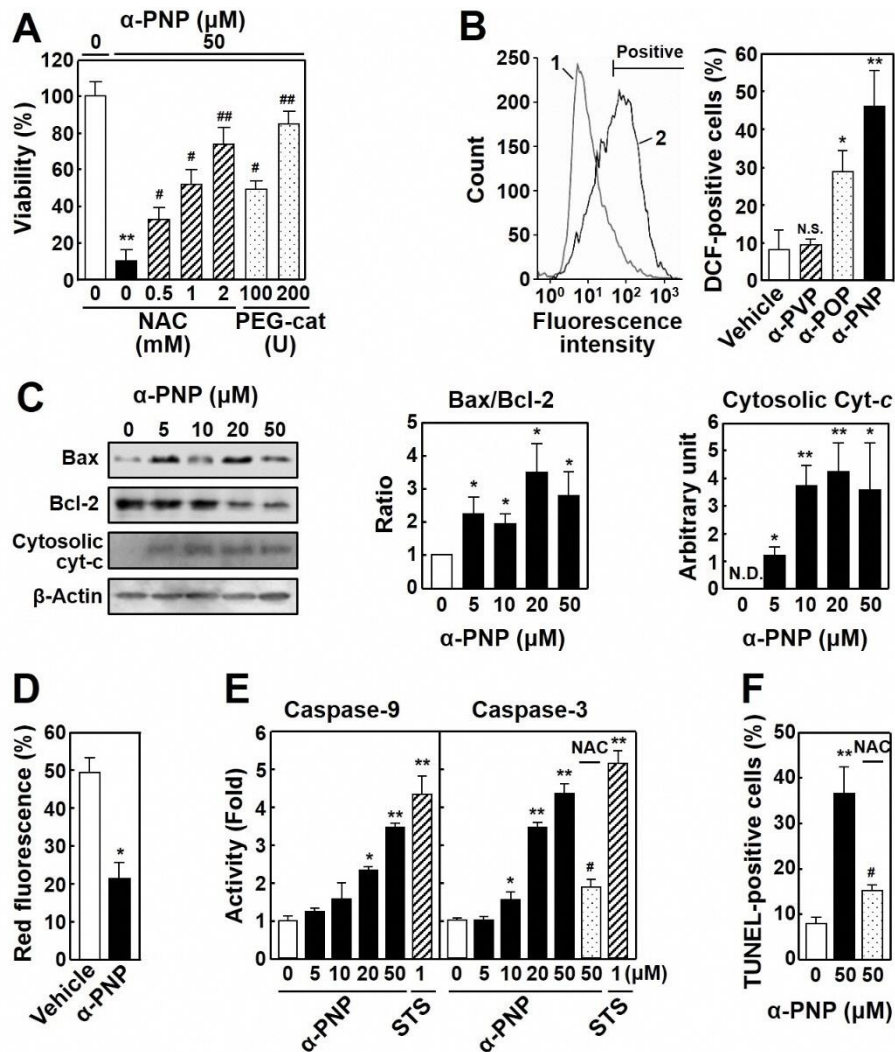


Fig. 28. Activation of ROS-dependent apoptotic mechanism by α-PNP treatment.

(A) Effect of antioxidants on α-PNP toxicity. SK-N-SH cells were pretreated for 2 h with the indicated concentrations of NAC or PEG-cat, and then treated for 48 h with 50 μM α-PNP. The viability values in the treated cells in WST-1 assay are expressed as the percentage of that in the control cells treated with vehicle alone. (B) DCFH oxidation. The cells were treated for 24 h with 50 μM α-PVP, α-POP, α-PNP or the vehicle, and then followed by the flow cytometric analysis to determine DCFH oxidation by ROS. The DCF-positive cells are shown as “Positive” in the representative patterns of the cells treated with vehicle (1) or α-PNP (2), and are expressed as the percentage of total cells in the bar graph. (C) Western blotting of Bax, Bcl-2 and cytosolic cytochrome-c (Cyt-c). The cells were treated for 24 h with 0, 5, 10, 20 or 50 μM α-PNP. The amounts of Bax and Bcl-2 in the cell extracts (40 μg) and Cyt-c in the cytosolic fraction (80 μg) were monitored by Western blot analyses using their specific antibodies and the band densities were normalized to those of β-actin. (D) Mitochondrial membrane potential. The cells were treated for 24 h with vehicle or 50 μM α-PNP, stained with JC-1 and then applied to the flow-cytometric analysis to monitor the JC-1-derived red fluorescence. (E) Activation of caspase-9 and caspase-3. The cells were treated with 0, 5, 10, 20 or 50 μM α-PNP for 48 h and 1 μM staurosporine (STS) for 12 h as the positive control. The enzyme activities in the extracts of the treated cells were measured using their fluorogenic probes. In the group shown with NAC, 2 mM NAC was pretreated for 2 h prior to the 24-h treatment with α-PNP. (F) DNA fragmentation. The cells were pretreated for 2 h without or with 2 mM NAC, and then treated for 48 h with 0 or 50 μM α-PNP, stained by the TUNEL method, and then applied to the flow-cytometric analysis. The TUNEL-positive cells are expressed as the percentage of that in the control cells treated with vehicle alone (0 μM). Significant difference from the control cells, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. Significant difference from the cells treated with α-PNP alone without inhibitor, # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$. N.D.: not detected. N.S.: no significant difference from the control cells, $p > 0.05$.

類の代謝酵素 (GST、NAD⁺依存性脱水素酵素及び NADH 依存性還元酵素) が関与することが知られている¹⁵³⁾。それ故、 α -PNP 処理した SK-N-SH 細胞中のそれら酵素活性の変動を調べた結果、GST 活性に有意な変動は認められず (Fig. 29B)、HNE 脱水素酵素活性は検出限界以下であった (成績未掲載)。それに対し、HNE 還元活性は 50 μ M α -PNP 処理によって有意に減少した (Fig. 29C) ことから、神経細胞中において α -PNP によって生成した HNE は、酸化還元反応による 4-ヒドロキシノネン酸や 1,4-ジヒドロキシノネンへと変換されることよりもむしろ、GST による GSH 付加を介して解毒代謝されることが考えられた。

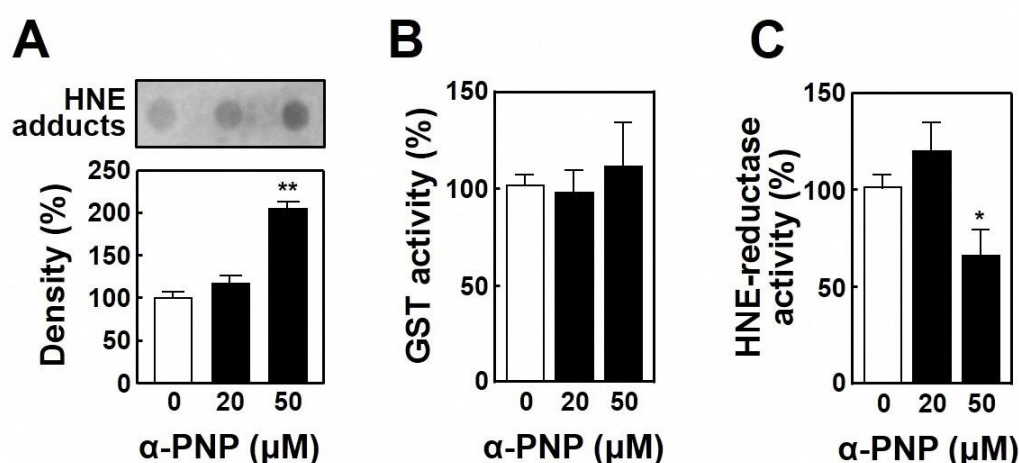


Fig. 29. Increase in HNE-adductive protein by α -PNP treatment.

(A) Dot blotting of HNE adducts. SK-N-SH cells were treated for 48 h with 0, 20 or 50 μ M α -PNP, and the cell extracts (100 μ g) were subjected to the dot blot analysis using the antibody against HNE. (B and C) GST (B) and HNE-reductase activities (C) in the cell extracts prepared in (A). The dot density and activity are expressed as the percentage of the respective values in the vehicle-treated control cells (0 μ M). Significant difference from the control cells, * p < 0.05 and ** p < 0.01.

4. α -PNP による細胞内 GSH レベルの減少

前項の結果から α -PNP に対する防御機構として GST による解毒作用が示唆されたため、SK-N-SH 細胞における α -PNP 誘導アポトーシスに GSH の枯渇が関与するか否かを検討した (Fig. 30A)。その結果、 α -PNP の 24 時間処理により細胞内の GSH 量が有意に減少し、その減少は総グルタチオン量の減少と同程度であったことから、総グルタチオン量の減少は GSH の減少に起因するものと推測された。次に、GSH の減少に関わる因子を解明するために、GSH の合成及び再生に関わる酵素の変化を Real-time PCR 法により調べたところ、GSH の新規合成における律速酵素 γ -GCS の発現量は α -PNP 処理によって有意に減少した (Fig. 30B)。また α -PNP 処理は GSSG の還元により GSH を再生させる NADPH 依存性 GR 活性も有意に低下させた (Fig. 30C)。さらに、3 種の GSH 枯渇剤 (DMF、DEM 及び BSO) 及び膜透過性を改善した GSH アナログである GSH エチルエステルによる前処理は α -PNP による細胞傷害作用をそれぞれ増強及び減弱させた (Fig. 30D)。これらの結果から、 α -PNP 処理により惹起される細胞内 GSH 量の減少は、HNE の解毒による消費や GSH の新規合成及び再生経路の機能障害に起因することが示唆された。

5. α -PNP によるプロテアソーム機能障害とオートファジーの誘導

プロテアソーム及びオートファジー機構が α -PNP による神経細胞傷害に関与するか否かを調べるため、始めに神経細胞毒性に対するタンパク質分解機構阻害剤の影響を検討した (Fig. 31)。その結果、プロテアソーム阻害剤 MG132 やオートファジー阻害剤クロロキンによる前処理は α -PNP 細胞毒性を有意に増強し、その毒性増強作用はそれらの併用によって相加的に増大した。この結果から、プロテアソーム及びオートファジー機構は α -PNP 誘導神経細胞アポトーシスを抑制していることが示唆された。

次にプロテアソーム活性を測定したところ、 α -PNP の高濃度 (20 μ M 及び 50 μ M) 処理はキモトリプシン様及びトリプシン様活性を有意に低減し (Fig. 32A)、そのキモトリプシン様活性の低下はNACによる前処理によりほぼ完全に回復し

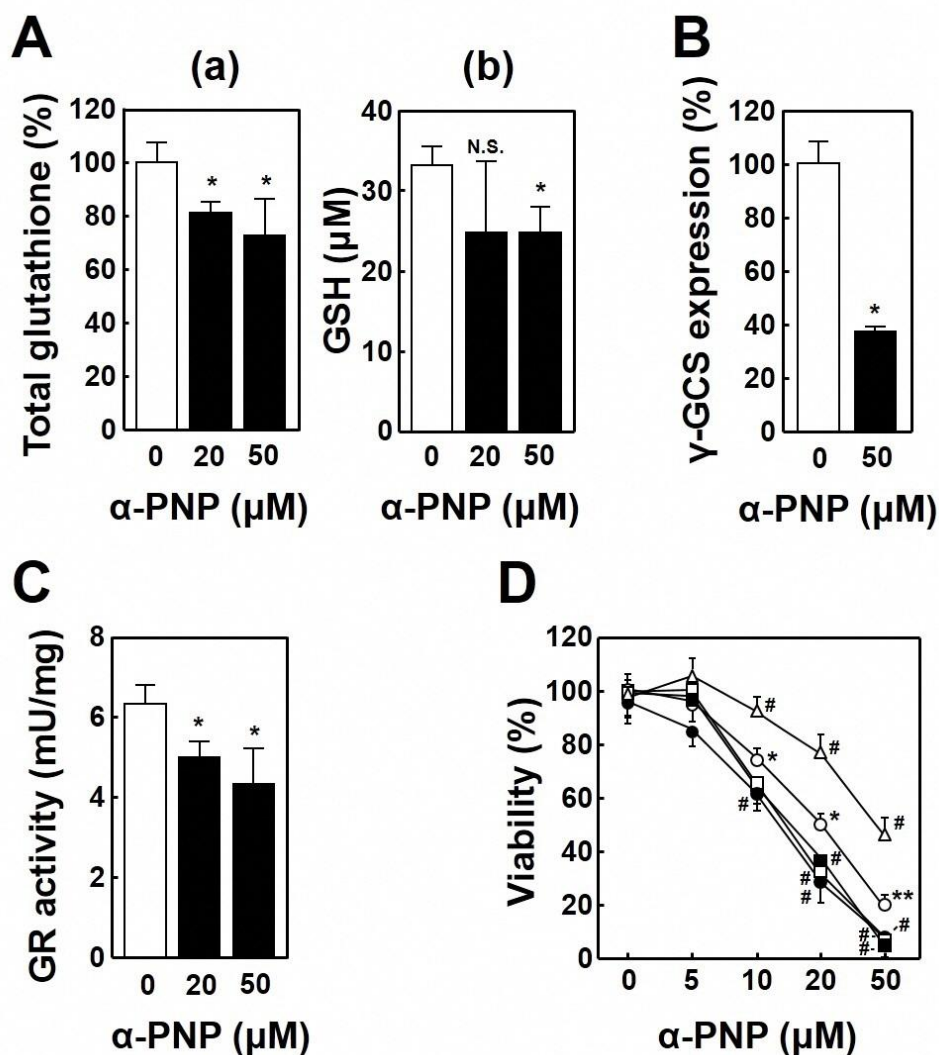


Fig. 30. Lowering of antioxidant properties by α -PNP.

(A) Glutathione levels. SK-N-SH cells were treated for 24 h with 0, 20 or 50 μ M α -PNP, and levels of total glutathione (a) and GSH (b) in the cell extracts (100 μ g) were measured by the DTNB method. (B) Alteration in level of mRNA for γ -GCS. The cells were treated for 24 h with 0 or 50 μ M α -PNP, and the expression level was analyzed by Real-time PCR. The values are expressed as the percentage of that in the vehicle-treated control cells (0 μ M). (C) GR activity. The cell treatment was performed as described in (A) and the activity in the cell extracts (100 μ g) was determined. (D) Effect of glutathione on sensitivity to α -PNP toxicity. SK-N-SH cells were pretreated for 2 h with BSO (10 μ M, ●) DEM (10 μ M, □), DMF (100 μ M, ■) or GSH ethylester (1 mM, Δ) and then treated for 48-h with the indicated concentrations of α -PNP. The viability values in the treated cells are expressed as the percentage of that in the control cells. Significant difference from the control cells, * p < 0.05 and ** p < 0.01. Significant difference from the cells treated with same concentration of α -PNP without inhibitor pretreatment (○), # p < 0.05 and ## p < 0.01. N.S.: no significant difference from the control cells, p > 0.05.

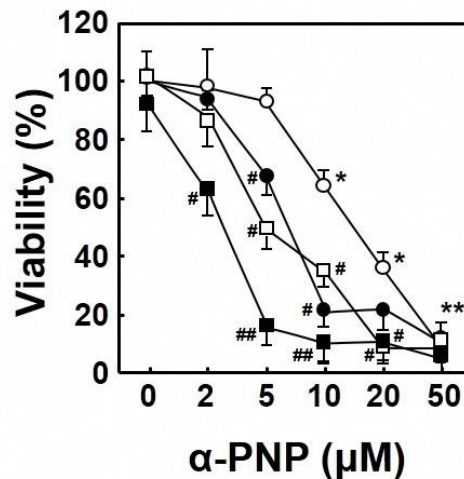


Fig. 31. Effects of proteasome and autophagy inhibitors on α -PNP sensitivity of SK-N-SH cells.

The cells were pretreated for 2 h with MG132 (100 nM, ●), chloroquine (20 μ M, □) or MG132 plus chloroquine (■) prior to the 48-h treatment with indicated concentrations of α -PNP. The viability values are expressed as the percentage of that in the vehicle-treated control cells (0 μ M). Significant difference from the control cells, * p < 0.05 and ** p < 0.01. Significant difference from the cells treated with same concentration of α -PNP without inhibitor pretreatment (○), # p < 0.05 and ## p < 0.01.

た (Fig. 32B)。また、神経細胞において同様のキモトリプシン様活性の減弱がレドックスサイクルを介して ROS を多量に産生する PQ⁶⁶⁾ によっても惹起されたことから、神経細胞の α -PNP 処理によるプロテアソーム活性の減少において ROS が重要な役割を担うと推察された。

オートファジーの誘導時には、LC3 前駆体タンパク質が分解されて LC3-I に変換され、LC3-I にさらにホスファチジルエタノールアミンが結合することにより LC3-II が生成する。そこで、LC3-I 及び LC3-II のウェスタンブロット解析を行った結果、 α -PNP 処理は SK-N-SH 細胞内の両オートファジー関連タンパク質の量を増加させ、オートファジーの基質である p62 の発現量を減少させた (Figs. 33A～C)。また、 α -PNP 処理はオートファジーの重要な調節因子であるだけでなく ROS の下流標的¹⁵⁴⁾ でもある AMPK のリン酸化及び Beclin1 の発現量増加を誘導した (Figs. 33A 及び D)。さらに、それらの変動は神経細胞の PQ 処理によっても同様に観察され、 α -PNP によるオートファジー関連因子の変動は NAC の前処理によって有意に抑制されたことから、 α -PNP によるオートファジー促進

効果は ROS の産生亢進によることが推察された。

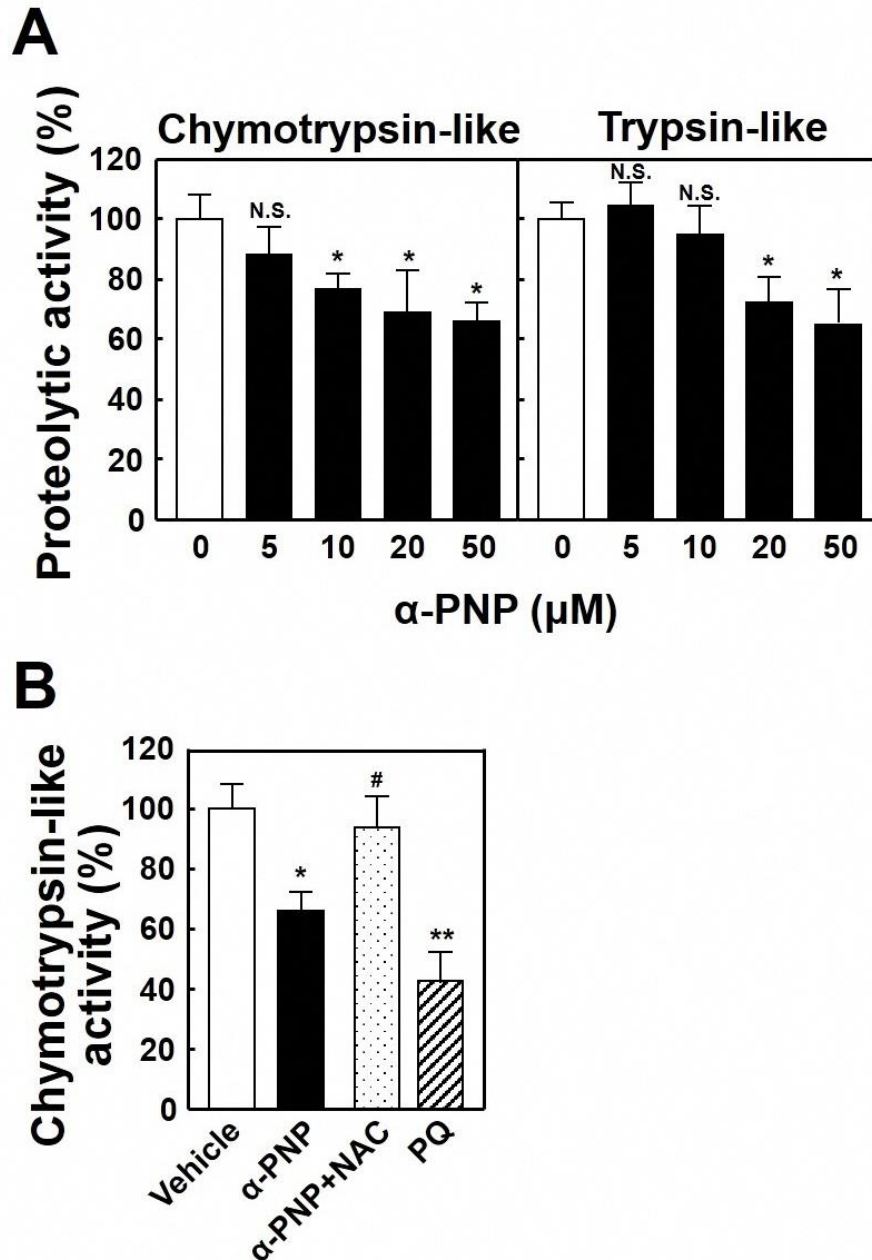


Fig. 32. Reduction of proteasomal activity due to ROS produced by α-PNP.

(A) Dose-dependent experiments of chymotrypsin- and trypsin-like activities. SK-N-SH cells were treated for 48 h with 0, 5, 10, 20 or 50 μM α-PNP and the cell extracts (100 μg) were used for measurement of chymotrypsin-like and trypsin-like activities using their fluorogenic probes. (B) Contribution of ROS to the reduction of proteasomal activity. The cells were treated for 48 h with 50 μM α-PNP or 1 μM PQ and the chymotrypsin-like activity was assayed as described in (A). α-PNP+NAC: the cells were pretreated for 2 h with 2 mM NAC prior to the treatment with 50 μM α-PNP. The values are expressed as the percentage of that in the vehicle-treated cells. Significant difference from the vehicle-treated cells, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. #Significant difference from the cells treated with α-PNP alone, $p < 0.05$. N.S.: no significant difference from the control cells, $p > 0.05$.

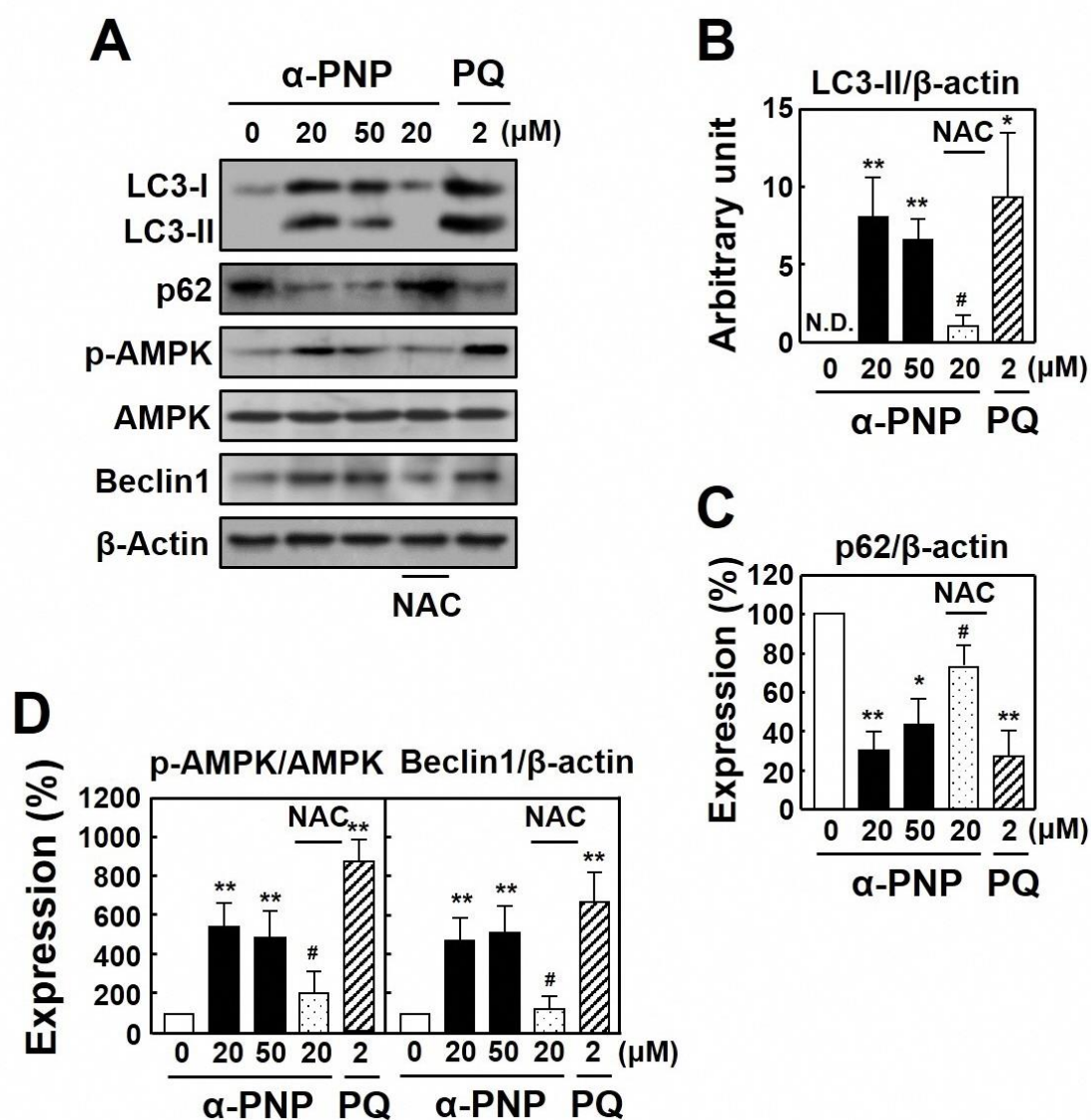


Fig. 33. ROS-dependent autophagic induction by α-PNP treatment.

SK-N-SH cells were pretreated for 2 h without or with 2 mM NAC, and then treated for 48 h with the indicated concentrations of α-PNP or PQ. The cell extracts (40 μg) were subjected to Western blot analyses using the antibodies against LC3, p62, p-AMPK and total AMPK and Beclin1. (A) Representative patterns. (B to D) Alterations in LC3-II (B), p62 (C), AMPK phosphorylation and Beclin1 (D). The densities of the immunoreactive bands were normalized to those of β-actin, and are expressed as the percentage of those in the vehicle-treated control cells (0 μM) in the bar graphs, except that that of LC3-II is shown as arbitrary unit because of its non-detectability (N.D.) in the control cells. Significant difference from the vehicle-treated cells, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. #Significant difference from the cells treated with α-PNP alone, $p < 0.05$.

第4節 考察

本章では、 α -PNP 処理が神経細胞のアポトーシスを惹起することを初めて見出した。また、毒性試験において神経及び血管内皮細胞が α -PNP に対して高い感受性を示したことから、 α -PNP の過剰摂取や乱用は脳神経及び循環器系に対して深刻な障害を誘発すると推察された。このことは合成カチノンの副作用として扇動や精神障害、頻脈、高血圧、発作等の神経及び血管機能障害関連疾患が挙げられるとした先行研究によっても裏付けられる。毒性試験の結果から、神経及び血管内皮細胞はそれぞれ 10 及び 5 μ M 以上の α -PNP による 48 時間処理によって細胞生存率が有意に減少することが示された (Fig. 27C)。成績は示していないが、2 μ M α -PNP への長時間 (96 時間) 曝露により SK-N-SH 及び HAE 細胞の生存率は有意に低減し ($71.3 \pm 3.6\%$ 及び $65.1 \pm 4.3\%$)、この処理濃度は死後の大腿血から検出された α -POP 濃度 (2.7 μ M)¹²⁵⁾ よりも低値であった。加えて、SK-N-SH 細胞の α -PNP に対する LC_{50} は α -POP (22.6 μ M)¹⁵⁵⁾ と比較して低いことを考慮すると、 α -PNP の摂取により神経及び血管細胞が致死濃度の α -PNP に曝され、その結果、 α -POP と同様にアポトーシス経路の活性化を介して細胞傷害を受けると予想された。これらのことから、 α -PNP は合成カチノンの中で最も有害な化合物の 1 つであり、その過剰摂取は神経及び血管系に対して深刻な副作用を惹起するため死亡リスクを上昇させることが示唆された。

本研究において、酸化ストレスの誘導及びミトコンドリア膜機能の低下が、 α -PNP によるアポトーシス誘導機序に関与することを示した。また、SK-N-SH 細胞の α -PNP 処理は ROS の産生亢進を引き起こし、その亢進は肝臓及び神経細胞の MDPV 及びメフェドロン処理や血管内皮細胞の α -POP 処理を行った際にも確認された^{129,131)}。さらに前章において、PPs の直鎖炭化水素鎖長と血管内皮細胞毒性及び ROS の産生量との間に正の相関があることを明らかにしている。こ

これらのことから、PPs の直鎖炭化水素鎖長は ROS の産生における重要な構造上の決定因子であり、その ROS の産生亢進が引き金となって神経細胞アポトーシスを誘導することが推測された。合成カチノンによる ROS の産生機序については未だ不明であるが、カチノンによるモノアミントランスポーターの阻害及びそれに伴うモノアミン神経伝達物質の枯渇が ROS の産生に関与することが推察される。何故なら、げっ歯類を用いた実験においてメタンフェタミンの投与により脳内モノアミンレベルの低下及び酸化マーカーの増加が確認されたこと¹⁵⁶⁾、並びに遺伝的にセロトニン、ドパミン及びノルアドレナリンの小胞トランスポーターを欠損させたマウスでは前帯状及び脳梁膨大後部皮質の表層部において死細胞が増加することが報告されているからである¹⁵⁷⁾。また、この報告によれば、モノアミントランスポーターのノックアウトにより大脳皮質の上粒状層において Bcl-X_L の発現量が減少し、カスパーゼ 3 及びカスパーゼ 9 の活性化が誘起されることも示されている。このノックアウトマウスにおけるアポトーシス関連因子の変動は今回の実験結果と類似していることから、合成カチノンによるモノアミン神経伝達物質の枯渇は神経細胞における ROS の産生亢進及びミトコンドリア機能障害を惹起すると考えられた¹⁵⁸⁾。なお、 α -PNP に起因する ROS の産生亢進機序については、ドパミンの酸化、ミトコンドリア病の誘発、アンフェタミンや MDMA において観察されるフリーラジカル中間体への酵素による代謝の可能性も挙げられる^{159,160)}。そこで現在、ROS 産生の詳細な機序を解明すべく *all-trans* レチノイン酸により分化させた SK-N-SH 細胞及び初代培養神経細胞を用いて、モノアミントランスポーターに対する合成カチノンの結合親和性、合成カチノン処理後における細胞内モノアミン量及びフリーラジカル中間体の生成についての研究を行っている。

ドットプロット解析の結果、 α -PNP 処理は ROS による脂質過酸化に起因する HNE 生成を促進することが示された (Fig. 29A)。HNE の細胞毒性として、神経

細胞内の Ca^{2+} 恒常性の破綻、ミトコンドリア膜機能障害及びカスパーゼの活性化が報告されている^{161,162)}。これらのことから、HNE 産生による上記の反応が α -PNP 誘発性神経細胞アポトーシス機序に関与すると推察された。今回の SK-N-SH 細胞の酵素活性測定において、 α -PNP 処理は GST 活性に影響を及ぼさなかった (Fig. 29B) ものの HNE 還元活性を有意に減少させた (Fig. 29C) ことから、 α -PNP 処理により生成した HNE は HNE 還元酵素による還元よりも GST による GSH-HNE 結合体 (GS-HNE) の形成によって代謝されることが推察された。O'Connor ら¹⁶³⁾によれば、5 種類のアルドケト還元酵素 (AKR) メンバー (AKR1A1、AKR1B1、AKR1C1、AKR1C4 及び AKR7A2) は HNE をアルコール代謝物へと還元する酵素活性を有しており、特に脳に局在する AKR1A1 及び AKR1B1 は他の AKR と比較して高い HNE 還元活性を示すことを報告している。加えて、AKR1B1 は GS-HNE を還元し、HNE 及び GS-HNE に対する K_m 値はそれぞれ 9 及び 34 μM と低いことから、HNE と GS-HNE は AKR1B1 の主要な生体内基質と考えられる¹⁶⁴⁾。これらの知見から、AKR1B1 は神経細胞において HNE を還元する主要な酵素であること、並びに HNE 還元活性の低下には α -PNP による AKR1B1 の発現抑制及び／又は不活性化が関与することが推察された。一方、GST の酵素反応で消費される GSH は α -PNP 処理によって減少した (Fig. 30A)。このような GSH 量の低下は MDPV 処理を行った肝細胞においても同様に観察されており¹³¹⁾、本研究における GSH 関連酵素の Real-time PCR 法及び活性測定の結果から、 γ -GCS の発現抑制 (Fig. 30B)、GR 活性の低下 (Fig. 30C) 及び HNE 等の脂質過酸化アルデヒドの GST による GSH との結合に起因すると示唆された。 γ -GCS 発現抑制の機序の詳細については不明であるが、GR 不活性化の要因として、HNE による NADPH 依存的な GR 阻害が考えられた¹⁶⁵⁾。これらのことから、合成カチノンによる HNE 形成は GSH 等の抗酸化物質の減少の主要な要因と推察された。

GSH に加え、細胞中タンパク質のリシン、ヒスチジン及びシステイン残基は HNE の結合部位であり、HNE によって修飾を受けたタンパク質はユビキチン-プロテアソーム及びオートファジー機構によって分解されることが知られている^{166,167)}。それ故、上記 2 種のタンパク質分解機構は酸化ストレスに対する細胞保護作用において重要な役割を担うと考えられている。本研究の主たる発見の 1 つとして、 α -PNP 処理が ROS の産生亢進を介して神経細胞のプロテアソーム活性を減弱させ、オートファジーを惹起することを見出した。現在まで、上記 2 つの分解機構の変動が ROS によって誘起されることが多くの研究者の報告で提唱されていたにも拘らず^{85,168-170)}、プロテアソーム及びオートファジー機構が合成カチノン誘導神経細胞アポトーシスを抑制することを示した文献は存在していない。以前報告した研究成果から考察すると、 α -PNP 処理によるプロテアソーム機能の低下は、多量の ROS 生成による触媒サブユニット [proteasome subunit molecule beta (PSMB) 1、PSMB2 及び PSMB5] 及びそれらの誘導型サブユニット (それぞれ PSMB9、PSMB10 及び PSMB8) の発現抑制によって説明できるかもしれない^{47,48,170)}。ウエスタンブロット解析の結果 (Fig. 31) から、 α -PNP 処理は AMPK のリン酸化に加え、オートファジーの特徴である LC3-II と Beclin1 の増加及び p62 発現量の減少を惹起することが示された。これらの変動より、以下のオートファジー誘導機序が想定される。(1) α -PNP によって産生した ROS が ATP の枯渇による AMP の生成亢進を介して AMPK を活性化する。(2) その活性化 AMPK によって、mechanistic target of rapamycin (mTOR) の阻害及びそれに続く ULK-1 リン酸化並びに Beclin1-Bcl-2 複合体からの Beclin1 の乖離が誘導されるためオートファジーが惹起される。また、AMPK はエネルギー恒常性を維持するための細胞内代謝における重要な制御因子であるため、ROS による AMPK 活性化はオートファジーの誘導と同様にミトコンドリア新生及び抗酸化関与遺伝子の発現も亢進する¹⁷¹⁾。これらのことから、 α -PNP によるオートファジーの

誘導はアポトーシスによる自己分解というよりはむしろ不要な酸化修飾タンパク質を分解するための細胞保護反応であると推測された。なお、合成カチノン処理による神経細胞のプロテアソーム機能障害及びオートファジーの誘導について、それらの本質的な役割及び詳細な誘発機序を解明するために更なる研究が必要である。

総括

フェネチルアミン誘導体は多様な薬理活性を有していることから、様々な医薬品が開発され治療に用いられてきた。しかしながら、その作用機序（モノアミン神経伝達物質の調節）の性質上、有害な副作用や強力な精神作用を示す化合物も数多く存在することから、有用性の評価が難しく流通後に問題が発生することも少なくない。シブトラミンはその代表例であり、食欲抑制作用（体重減少作用）が痩身薬の中でも強力な抗肥満薬物治療においては有用であるため、心血管系への有害事象の存在を示した市販後調査後も評価が分かれている。また、合成カチノンについては事例報告により数多くの有害な症状が誘発されることが明らかになっているにも拘らず、現在もその強力な精神賦活作用から世界中で乱用されている。このような状況にある要因として、上記フェネチルアミン誘導体の作用及び毒性機序について未だに不明な点が多く、これらに対する危険性を漠然とは認識しているものの、その詳細が判明していないことが個人輸入による使用や娯楽目的の乱用が後を絶たない理由の 1 つであると考えられる。また、副作用発症機序の解明はそれら乱用薬物の中毒症状の診断及び治療において重要な役割を果たすと予測される。そこで本研究では、フェネチルアミン誘導体の毒性機序及び副作用発症機序の解明を目的に、血管細胞及び神経細胞を中心に様々な細胞種を用いて種々検討を行い、以下に示す知見を得た。

第 1 章では、細胞毒性及び細胞内 NO の変動に着目してシブトラミンのヒト血管内皮細胞に対する影響を調べ、以下の知見を得た。また、それらに基づいて予測される経路を Fig. 34 に要約する。

- 1) シブトラミンはカスパーゼ経路の活性化を介して HAE 細胞のアポトーシスを惹起し、その血管内皮細胞毒性は同様にフェネチルアミン骨格を有する他

- の痩身薬と比較して強力であった。
- シブトラミンは HAE 細胞に対して ROS の産生亢進やそれに伴う反応性アルデヒドの産生、ミトコンドリア膜機能障害、プロテアソーム活性の低下を誘発した。
 - シブトラミン誘発血管内皮細胞アポトーシスに対する小胞体ストレスの関与が推察された。
 - シブトラミンは HAE 細胞内の NO 量を減少させ、その減少は eNOS の発現量低下及び不活性化に起因すると示唆された。
 - シブトラミン代謝物の細胞毒性はシブトラミンと比較して低減しており、シブトラミン代謝酵素 (CYP3A4) の発現量と細胞毒性の間に負の相関が認められた。

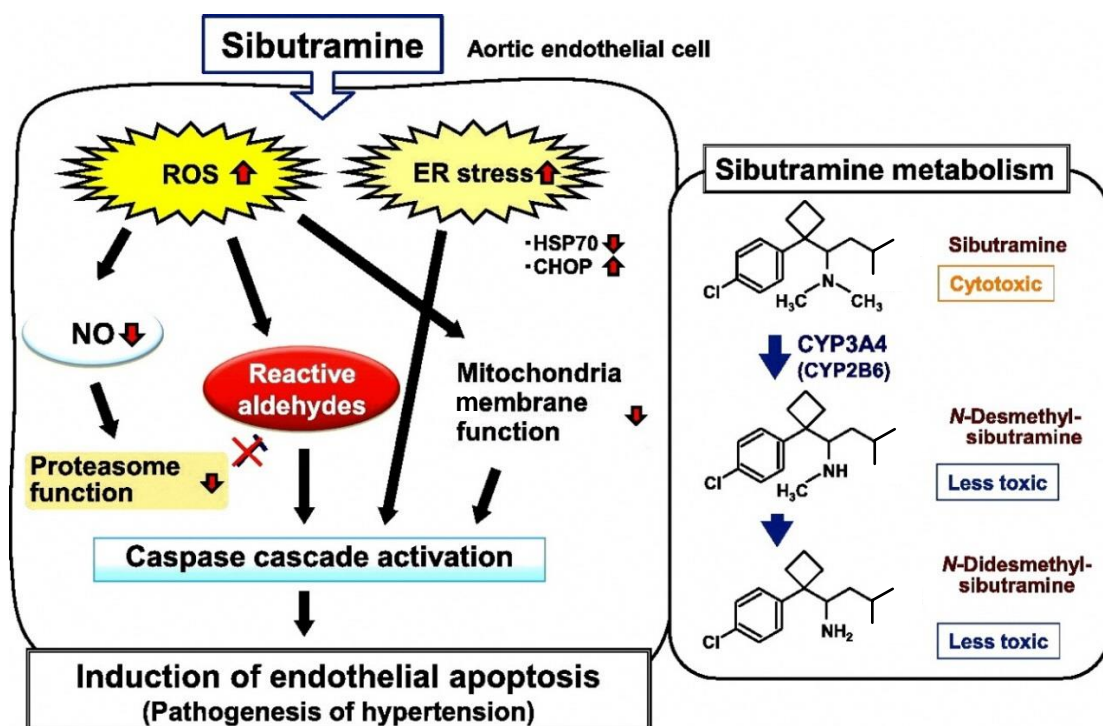


Fig. 34. Mechanism of sibutramine-induced apoptosis and relationship between metabolism and cytotoxic effect of sibutramine in endothelial cells.

第 2 章では、高血圧発症機序の解明を目的として、シブトラミンのヒト血管平滑筋細胞に対する細胞毒性及び細胞収縮作用について種々検討を行い、以下の知見を得た (Fig. 35)。

- 1) シブトラミンは HAE 細胞と同様に HASM 細胞に対してアポトーシスを誘導した。
- 2) シブトラミンは ROS の産生亢進を介して細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇及び MLC のリン酸化を誘起し、血管内皮細胞の収縮を惹起することが示唆された。
- 3) シブトラミン代謝物による細胞毒性及び細胞収縮作用はシブトラミンと比較して低減した。

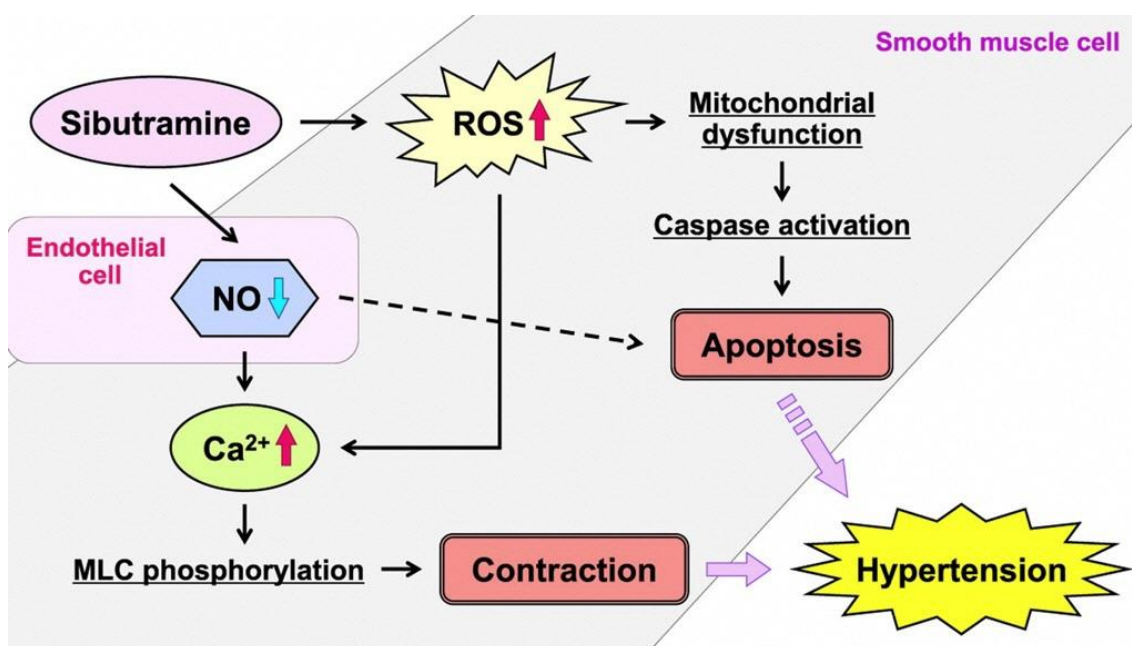


Fig. 35. Mechanism of sibutramine-induced apoptosis and contraction of smooth muscle cell.

第 3 章では、PPs の細胞毒性に対して置換基が及ぼす影響を調べるため、10 種の細胞種を用いて PPs による細胞毒性の構造活性相関解析を行い、以下の知見を得た。

- 1) PPs に対して血管内皮、血管平滑筋、気道上皮及び神経細胞は高い感受性を示した。
- 2) PPs の細胞毒性は直鎖炭化水素鎖の伸長や 4'-フルオロ化、3',4'-メチレンジオキシ化によって増大した。
- 3) α -POP 誘導血管内皮細胞アポトーシスに対して酸化ストレスの誘発が関与することが示唆された。

第 4 章では、細胞の抗酸化機構に着目し、ヒト神経細胞を用いて α -PNP の神経細胞傷害作用及び機序について種々検討を行い、以下の知見を得た (Fig. 36)。

- 1) α -PNP は ROS の産生亢進、ミトコンドリア膜機能障害及びそれに伴うカスパーゼの活性化を介して神経細胞アポトーシスを誘導すると推察された。
- 2) α -PNP は脂質過酸化によって生じる反応性アルデヒド HNE の生成を促進し、その解毒機構として GST による GSH 付加体の形成が示唆された。
- 3) プロテアソーム及びオートファジー機構が α -PNP 誘導神経細胞アポトーシスの抑制に関与すると示唆された。
- 4) α -PNP はプロテアソーム機能障害とオートファジーを誘導した。

以上、シブトラミンは酸化ストレスの誘発による血管細胞傷害作用だけでなく、血管内皮細胞の NO 産生量の低下及びその結果生じる血管平滑筋細胞への NO 供給量の減少を介して、高血圧等の循環器疾患を惹起することが示唆された。また、PPs は置換基修飾によりその細胞毒性が増悪し、その毒性機序として ROS の産生亢進及び抗酸化機構の破綻が示唆された。これら上記フェネチルアミン誘導体毒性機序の一端を解明できたことは、生物学的に新しい知見が得られたことに加え、法科学及び法中毒学的な観点からも有用な情報が得られたと考える。すなわち、乱用薬物の危険性を啓発する上でより具体性を持たせることが

可能となり、特にその評価が一定でない薬物において、それらの安易な使用や乱用の防止に繋がることが期待される。また、PPs の構造活性相関解析の結果は置換基修飾による危険性の増大を示唆しており、今後密造が予想される新規合成カチノンによる健康被害予測系の確立に寄与するものと考えられる。さらに、変死者の死因究明や中毒者の治療において、上記フェネチルアミン誘導体による有害事象推測の一助となり得ると考えられた。

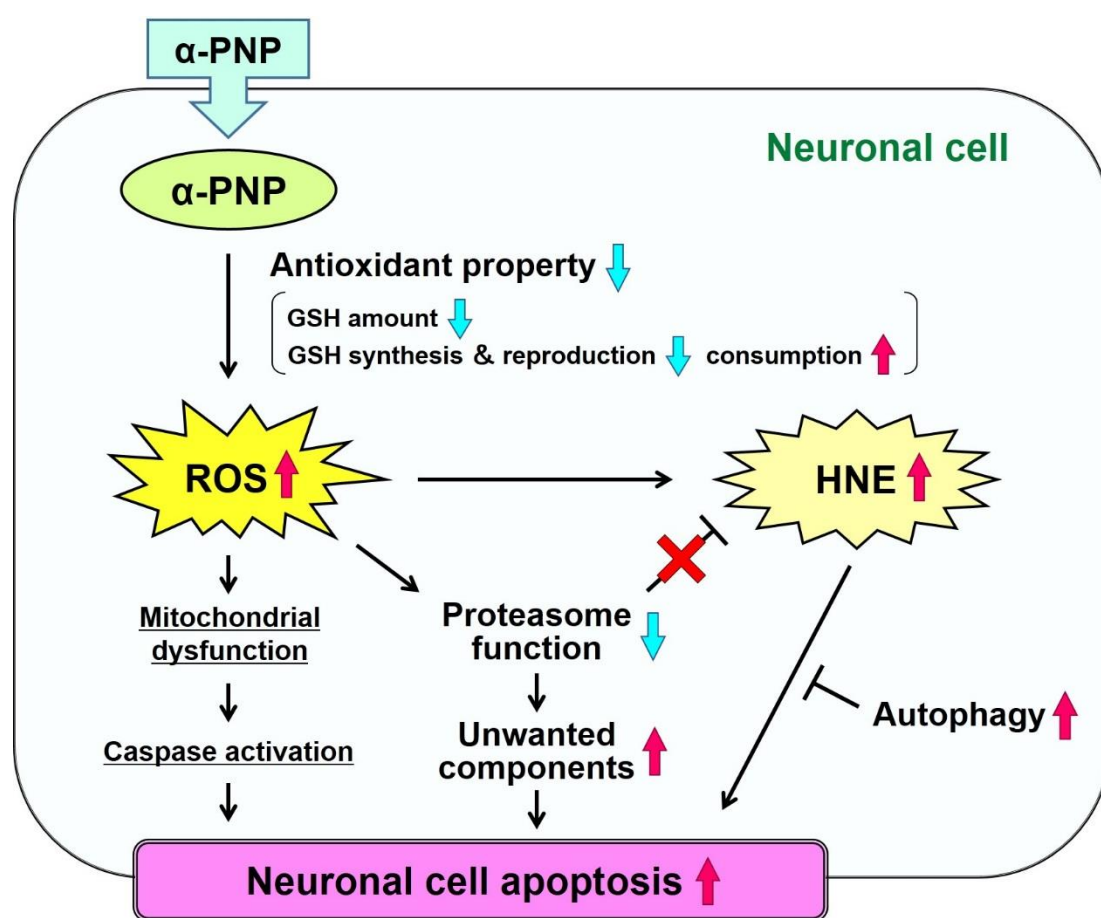


Fig. 36. Mechanism of neuronal cell apoptosis induced by α -PNP.

謝辞

本稿を終わるに臨み、本研究に終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました岐阜薬科大学生命薬学大講座生化学研究室教授 五十里 彰博士、同准教授 松永 俊之博士に深甚なる謝意を表します。

本研究を推進するにあたり、多岐にわたる御助言を賜りました岐阜薬科大学生命薬学大講座生化学研究室講師 遠藤 智史博士に深く感謝致します。

本研究に際して終始御懇切なる御助言を賜りました岐阜県警察本部刑事部科学捜査研究所所長 中澤 俊介氏、同管理監 竹腰 裕二博士、同化学係 佐藤 清人博士、末次 耕一博士、笹島 康秀博士に深謝致します。

本研究に際し、御協力と御助言を頂きました岐阜県警察本部刑事部科学捜査研究所諸氏に厚く御礼申し上げます。

最後に、様々な面で惜しめない御協力を頂きました岐阜薬科大学生化学研究室の諸氏に心より感謝致します。

参考文献

1. Potkin, S.G., Karoum, F., Chuang, L.W., Cannon-Spoor, H.E., Phillips, I., Wyatt, R.J. (1979) Phenylethylamine in paranoid chronic schizophrenia. *Science* **206**, 470-471.
2. Martinez, S.J., Alfano, J.C., Levy, D.H. (1993) The Electronic Spectroscopy of Tyrosine and Phenylalanine Analogs in a Supersonic Jet: Basic Analogs. *J. Mol. Spectrosc.* **158**, 82-92.
3. Kikura-Hanajiri, R., Hayashi, M., Saisho, K., Goda, Y. (2005) Simultaneous determination of nineteen hallucinogenic tryptamines/beta-calbolines and phenethylamines using gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **825**, 29-37.
4. King, L.A. (2014) New phenethylamines in Europe. *Drug Test Anal.* **6**, 808-818.
5. Santillo, M.F. (2014) Inhibition of monoamine oxidase (MAO) by α -ethylphenethylamine and N, α -diethylphenethylamine, two compounds related to dietary supplements. *Food Chem. Toxicol.* **74**, 265-269.
6. Banks, M.L., Worst, T.J., Rusyniak, D.E., Sprague, J.E. (2014) Synthetic cathinones ("bath salts"). *J. Emerg. Med.* **46**, 632-642.
7. Tyrkkö, E., Andersson, M., Kronstrand, R. (2016) The Toxicology of New Psychoactive Substances: Synthetic Cathinones and Phenethylamines. *Ther. Drug Monit.* **38**, 190-216.
8. Capriola, M. (2013) Synthetic cathinone abuse. *Clin. Pharmacol.* **5**, 109-115.
9. Hainer, V., Hainerová, I.A. (2012) Do we need anti-obesity drugs? *Diabetes Metab. Res. Rev.* **S2**, 8-20.

10. Deconinck, E., Cauwenbergh, T., Bothy, J.L., Custers, D., Courselle, P., De Beer, J.O. (2014) Detection of sibutramine in adulterated dietary supplements using attenuated total reflectance-infrared spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **100**, 279-283.
11. da Silva, N.C., Honorato, R.S., Pimentel, M.F., Garrigues, S., Cervera, M.L., de la Guardia, M. (2015) Near Infrared Spectroscopy Detection and Quantification of Herbal Medicines Adulterated with Sibutramine. *J. Forensic Sci.* **60**, 1199-1205.
12. Pamukcu, Gunaydin, G., Dogan, N.O., Levent, S., Kurtoglu, Celik, G. (2015) Herbal weight loss pill overdose: sibutramine hidden in pepper pill. *Case Rep. Emerg. Med.* **2015**, 213874.
13. Heal, D.J., Cheetham, S.C., Prow, M.R., Martin, K.F., Buckett, W.R. (1998) A comparison of the effects on central 5-HT function of sibutramine hydrochloride and other weight-modifying agents. *Br. J. Pharmacol.* **125**, 301-308.
14. Ryan, D.H., Kaiser, P., Bray, G.A. (1995) Sibutramine: a novel new agent for obesity treatment. *Obes. Res.* **S4**, 553S-559S.
15. Luque, C.A., Rey, J.A. (1999) Sibutramine: a serotonin-norepinephrine reuptake-inhibitor for the treatment of obesity. *Ann. Pharmacother.* **33**, 968-978.
16. Arterburn, D.E., Crane, P.K., Veenstra, D.L. (2004) The efficacy and safety of sibutramine for weight loss: a systematic review. *Arch. Intern. Med.* **164**, 994-1003.
17. James, W.P., Caterson, I.D., Coutinho, W., Finer, N., Van Gaal, L.F., Maggioni, A.P., Torp-Pedersen, C., Sharma, A.M., Shepherd, G.M., Rode, R.A., Renz, C.L., SCOUT Investigators (2010) Effect of sibutramine on cardiovascular outcomes in overweight and obese subjects. *N. Engl. J. Med.* **363**, 905-917.

18. Siebenhofer, A., Jeitler, K., Horvath, K., Berghold, A., Posch, N., Meschik, J., Semlitsch, T. (2016) Long-term effects of weight-reducing drugs in people with hypertension. *Cochrane Database Syst. Rev.* **3**, CD007654.
19. Araldi, R.P., Santos, N.P., Mendes, T.B., Carvalho, L.B., Ito, E.T., de-Sá-Júnior, P.L., Souza, E.B. (2015) Can *Spirulina maxima* reduce the mutagenic potential of sibutramine? *Genet. Mol. Res.* **14**, 18452-18464.
20. Ferreira, G.M., Nazar, B.P., da Silva, M.R., Carriello, M.A., Freitas, S., Appolinario, J.C. (2018) Misuse of sibutramine and bulimia nervosa: a dangerous combination. *Rev. Bras. Psiquiatr.* **40**, 343.
21. Khazan, M., Hedayati, M., Kobarfard, F., Askari, S., Azizi, F. (2014) Identification and determination of synthetic pharmaceuticals as adulterants in eight common herbal weight loss supplements. *Iran Red. Crescent. Med. J.* **16**, e15344.
22. Majchrzak, M., Celiński, R., Kuś, P., Kowalska, T., Sajewicz, M. (2018) The newest cathinone derivatives as designer drugs: an analytical and toxicological review. *Forensic Toxicol.* **36**, 33-50.
23. Jones, S., Fileccia, E.L., Murphy, M., Fowler, M.J., King, M.V., Shortall, S.E., Wigmore, P.M., Green, A.R., Fone, K.C., Ebling, F.J. (2014) Cathinone increases body temperature, enhances locomotor activity, and induces striatal c-fos expression in the Siberian hamster. *Neurosci. Lett.* **559**, 34-38.
24. Nencini, P., Amiconi, G., Befani, O., Abdullahi, M.A., Anania, M.C. (1984) Possible involvement of amine oxidase inhibition in the sympathetic activation induced by khat (*Catha edulis*) chewing in humans. *J. Ethnopharmacol.* **11**, 79-86.

25. Ketema T, Yohannes M, Alemayehu E, Ambelu A. (2015) Evaluation of immunomodulatory activities of methanolic extract of khat (*Catha edulis*, Forsk) and cathinone in Swiss albino mice. *BMC Immunol.* **16**, 9.
26. Zawilska, J.B., Wojcieszak, J. (2013) Designer cathinones-an emerging class of novel recreational drugs. *Forensic Sci. Int.* **231**, 42-53.
27. Guantai, A.N., Maitai, C.K. (1983) Metabolism of cathinone to d-norpseudoephedrine in humans. *J. Pharm. Sci.* **72**, 1217-1218.
28. Brenneisen, R., Geisshüsler, S., Schorno, X. (1986) Metabolism of cathinone to (-)-norephedrine and (-)-norpseudoephedrine. *J. Pharm. Pharmacol.* **38**, 298-300.
29. Krikorian, A.D. (1984) Kat and its use: an historical perspective. *J. Ethnopharmacol.* **12**, 115-178.
30. Lemieux, A.M., Li, B., al'Absi, M. (2015) Khat use and appetite: an overview and comparison of amphetamine, khat and cathinone. *J. Ethnopharmacol.* **160**, 78-85.
31. Karch, S.B. (2015) Cathinone neurotoxicity ("The "3Ms"). *Curr. Neuropharmacol.* **13**, 21-25.
32. Wojcieszak, J., Andrzejczak, D., Woldan-Tambor, A., Zawilska, J.B. (2016) Cytotoxic Activity of Pyrovalerone Derivatives, an Emerging Group of Psychostimulant Designer Cathinones. *Neurotox. Res.* **30**, 239-250.
33. Prosser, J.M., Nelson, L.S. (2012) The toxicology of bath salts: a review of synthetic cathinones. *J. Med. Toxicol.* **8**, 33-42.
34. Karila, L., Megarbane, B., Cottencin, O., Lejoyeux, M. (2015) Synthetic cathinones: a new public health problem. *Curr. Neuropharmacol.* **13**, 12-20.
35. Geste, J.R., Pompilus, M., Febo, M., Bruijnzeel, A.W. (2018) Self-administration of the synthetic cathinone MDPV enhances reward function via a nicotinic receptor dependent mechanism. *Neuropharmacology* **137**, 286-296.

36. Simmler, L.D., Rickli, A., Hoener, M.C., Liechti, M.E. (2014) Monoamine transporter and receptor interaction profiles of a new series of designer cathinones. *Neuropharmacology* **79**, 152-160.
37. Stock, M.J. (1997) Sibutramine: a review of the pharmacology of a novel anti-obesity agent. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **21**, S25-S29.
38. Abolfathi, Z., Couture, J., Vallée, .F, LeBel, M., Tanguay, M., Masson, E. (2004) A pilot study to evaluate the pharmacokinetics of sibutramine in healthy subjects under fasting and fed conditions. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **7**, 345-349.
39. Link, M., Hakala, K.S., Wsól, V., Kostianen, R., Ketola, R.A. (2006) Metabolite profile of sibutramine in human urine: a liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric study. *J. Mass Spectrom.* **41**, 1171-1178.
40. Bae, S.K., Cao, S., Seo, K.A., Kim, H., Kim, M.J., Shon, J.H., Liu, K.H., Zhou, H.H., Shin, J.G. (2008) Cytochrome P450 2B6 catalyzes the formation of pharmacologically active sibutramine (N-{1-[1-(4-chlorophenyl)-cyclobutyl]-3-methylbutyl}-N,N-dimethylamine) metabolites in human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* **36**, 1679-1688.
41. Scheen, A.J. (2010) Cardiovascular risk-benefit profile of sibutramine. *Am. J. Cardiovasc. Drugs* **10**, 321-334.
42. Luscombe, G.P., Hopcroft, R.H., Thomas, P.C., Buckett, W.R. (1989) The contribution of metabolites to the rapid and potent down-regulation of rat cortical beta-adrenoceptors by the putative antidepressant sibutramine hydrochloride. *Neuropharmacology* **28**, 129-134.
43. Lai, Y.C., Potoka, K.C., Champion, H.C., Mora, A.L., Gladwin, M.T. (2014) Pulmonary arterial hypertension: the clinical syndrome. *Circ. Res.* **115**, 115-130.

44. Sinha, N., Dabla, P.K. (2015) Oxidative stress and antioxidants in hypertension-a current review. *Curr. Hypertens. Rev.* **11**, 132-142.
45. Matsunaga, T., Usui, S., Kiho, T., Hirano, K. (1999) Activation of macrophages and neutrophils by an endothelium growth suppressing factor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**, 1228-1237.
46. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
47. Matsunaga, T., Hojo, A., Yamane, Y., Endo, S., El-Kabbani, O., Hara, A. (2013) Pathophysiological roles of aldo-keto reductase (AKR1C1 and AKR1C3) in development of cisplatin resistance in human colon cancers. *Chem. Biol. Interact.* **202**, 234-242.
48. Matsunaga, T., Kotamraju, S., Kalivendi, S.V., Dhanasekaran, A., Joseph, J., Kalyanaraman, B. (2004) Ceramide-induced intracellular oxidant formation, iron signaling, and apoptosis in endothelial cells: protective role of endogenous nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **279**, 28614-28624.
49. Kotamraju, S., Matalon, S., Matsunaga, T., Shang, T., Hickman-Davis, J.M., Kalyanaraman, B. (2006) Upregulation of immunoproteasomes by nitric oxide: potential antioxidative mechanism in endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* **40**, 1034-1044.
50. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goek, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.

51. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
52. Matsunaga, T., Shinoda, Y., Inoue, Y., Shimizu, Y., Haga, M., Endo, S., El-kabbani, O., Hara, A. (2011) Aldo-keto reductase 1C15 as a quinone reductase in rat endothelial cell: its involvement in redox cycling of 9,10-phenanthrenequinone. *Free Radic. Res.* **45**, 848-857.
53. Lenaz, G., Bovina, C., Formiggini, G., Parenti, Castelli, G. (1999) Mitochondria, oxidative stress, and antioxidant defences. *Acta. Biochim. Pol.* **46**: 1-21.
54. Perelman, A., Wachtel, C., Cohen, M., Haupt, S., Shapiro, H., Tzur, A. (2012) JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death Dis.* **3**, e430.
55. Sano, R., Reed, J.C. (2013) ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 3460-3470.
56. Adams, J. (2003) The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat Rev.* **29**, 3-9.
57. Ferrer-Sueta, G., Radi, R. (2009) Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem. Biol.* **4**, 161-177.
58. Nathan, C. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051-3064.
59. Lenasi, H., Kohlstedt, K., Fichtlscherer, B., Mülsch, A., Busse, R., Fleming, I. (2003) Amlodipine activates the endothelial nitric oxide synthase by altering phosphorylation on Ser1177 and Thr495. *Cardiovasc. Res.* **59**, 844-853.
60. Hwang, I.C., Park, J.Y., Ahn, H.Y., Kim, K.K., Suh, H.S., Ko, K.D., Kim, K.A. (2014) Effects of CYP3A5, CYP2C19, and CYP2B6 on the clinical efficacy and

adverse outcomes of sibutramine therapy: a crucial role for the CYP2B6*6 allele.

Clin. Chim. Acta **428**, 77-81.

61. Shinde, D.D., Kim, M.J., Jeong, E.S., Kim, Y.W., Lee, J.W., Shin, J.G., Kim, D.H. (2014) Enantioselective N-demethylation and hydroxylation of sibutramine in human liver microsomes and recombinant cytochrome p-450 isoforms. *Toxicol. Environ. Health A* **77**, 1419-1430.
62. Wang, Y.H., Jones, D.R., Hall, S.D. (2005) Differential mechanism-based inhibition of CYP3A4 and CYP3A5 by verapamil. *Drug Metab. Dispos.* **33**, 664-6671.
63. Baumhäkel, M., Kasel, D., Rao-Schymanski, R.A., Böcker, R., Beckurts, K.T., Zaigler, M., Barthold, D., Fuhr, U. (2001) Screening for inhibitory effects of antineoplastic agents on CYP3A4 in human liver microsomes. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **39**, 517-528.
64. Watkins, P.B. (1992) Drug metabolism by cytochromes P450 in the liver and small bowel. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **21**, 511-526.
65. Kolars, J.C., Lown, K.S., Schmiedlin-Ren, P., Ghosh, M., Fang, C., Wrighton, S.A., Merion, R.M., Watkins, P.B. (1994) CYP3A gene expression in human gut epithelium. *Pharmacogenetics* **4**, 247-259.
66. Matsunaga, T., Kamiya, T., Sumi, D., Kumagai, Y., Kalyanaraman, B., Hara, A. (2008) L-Xylulose reductase is involved in 9,10-phenanthrenequinone-induced apoptosis in human T lymphoma cells. *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 1191-1202.
67. Cain, K. (2003) Chemical-induced apoptosis: formation of the Apaf-1 apoptosome. *Drug Metab. Rev.* **35**, 337-363.
68. Zhao, Y., Vanhoutte, P.M., Leung, S.W. (2015) Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J. Pharmacol. Sci.* **129**, 83-94.

69. Chen, Z.P., Mitchelhill, K.I., Michell, B.J., Stapleton, D., Rodriguez-Crespo, I., Witters, L.A., Power, D.A., Ortiz de Montellano, P.R., Kemp, B.E. (1999) AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett.* **443**, 285-289.
70. Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., Zeiher, A.M. (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* **399**, 601-605.
71. Michell, B.J., Chen, Z.P., Tiganis, T., Stapleton, D., Katsis, F., Power, D.A., Sim, A.T., Kemp, B.E. (2001) Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **276**, 17625-17628.
72. Fleming, I., Fisslthaler, B., Dimmeler, S., Kemp, B.E., Busse, R. (2001) Phosphorylation of Thr⁴⁹⁵ regulates Ca²⁺/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ. Res.* **88**, e68-e75.
73. Ramzy, D., Rao, V., Tumiati, L.C., Xu, N., Sheshgiri, R., Miriuka, S., Delgado, D.H., Ross, H.J. (2006) Elevated endothelin-1 levels impair nitric oxide homeostasis through a PKC-dependent pathway. *Circulation* **114**, I319-I326.
74. Glick, S.D., Haskew, R.E., Maisonneuve, I.M., Carlson, J.N., Jerussi, T.P. (2000) Enantioselective behavioral effects of sibutramine metabolites. *Eur. J. Pharmacol.* **397**, 93-102.
75. Ingelman-Sundberg, M., Sim, S.C., Gomez, A., Rodriguez-Antona, C. (2007) Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeigenetic and clinical aspects. *Pharmacol. Ther.* **116**, 496-526.

76. Chung, J.Y., Jang, S.B., Lee, Y.J., Park, M.S., Park, K. (2011) Effect of CYP2B6 genotype on the pharmacokinetics of sibutramine and active metabolites in healthy subjects. *J. Clin. Pharmacol.* **51**, 53-59.
77. Shinde, D.D., Kim, H.S., Choi, J.S., Pan, W., Bae, S.K., Yeo, C.W., Shon, J.H., Kim, D.H., Shin, J.G. (2013) Different effects of clopidogrel and clarithromycin on the enantioselective pharmacokinetics of sibutramine and its active metabolites in healthy subjects. *J. Clin. Pharmacol.* **53**, 550-558.
78. Li, Y.W., Langdon, S., Pieschl, R., Strong, T., Wright, R.N., Rohrbach, K., Lelas, S., Lodge, N.J. (2014) Monoamine reuptake site occupancy of sibutramine: Relationship to antidepressant-like and thermogenic effects in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **737**, 47-56.
79. Luque, C.A., Rey, J.A. (2002) The discovery and status of sibutramine as an anti-obesity drug. *Eur. J. Pharmacol.* **440**, 119-128.
80. Araújo, J.R., Martel, F. (2012) Sibutramine effects on central mechanisms regulating energy homeostasis. *Curr. Neuropharmacol.* **10**, 49-52.
81. Kim, J.W., Kweon, S.J., Park, S.K., Kim, J.Y., Lee, J.H., Han, K.M., Cho, S., Kim, J., Han, S.Y., Kim, H.J., Kim, W.S. (2013) Isolation and identification of a sibutramine analogue adulterated in slimming dietary supplements. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **30**, 1221-1229.
82. Francois, H., Athirakul, K., Mao, L., Rockman, H., Coffman, T.M. (2004) Role for thromboxane receptors in angiotensin-II-induced hypertension. *Hypertension* **43**, 364-369.
83. Yuan, P., Wu, W.H., Gao, L., Zheng, Z.Q., Liu, D., Mei, H.Y., Zhang, Z.L., Jing, Z.C. (2013) Oestradiol ameliorates monocrotaline pulmonary hypertension via NO, prostacyclin and endothelin-1 pathways. *Eur. Respir. J.* **41**, 1116-1125.

84. Tain, Y.L., Huang, L.T. (2014) Restoration of asymmetric dimethylarginine-nitric oxide balance to prevent the development of hypertension. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 11773-11782.
85. Morikawa, Y., Shibata, A., Okumura, N., Ikari, A., Sasajima, Y., Suenami, K., Sato, K., Takekoshi, Y., El-Kabbani, O., Matsunaga, T. (2017) Sibutramine provokes apoptosis of aortic endothelial cells through altered production of reactive oxygen and nitrogen species. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **314**, 1-11.
86. Esterbauer, H., Weger, W. (1967) Über die Wirkungen von aldehyden auf gesunde und maligne zellen. 3. MittSynthese von homologen 4-hydroxy-2-alkenalen. *Monatsh. Chem.* **98**, 1994-2000.
87. Sakota, Y., Ozawa, Y., Yamashita, H., Tanaka, H., Inagaki, N. (2014) Collagen gel contraction assay using human bronchial smooth muscle cells and its application for evaluation of inhibitory effect of formoterol. *Biol. Pharm. Bull.* **37**, 1014-1020.
88. Salakou, S., Kardamakis, D., Tsamandas, A.C., Zolota, V., Apostolakis, E., Tzelepi, V., Papathanasopoulos, P., Bonikos, D.S., Papapetropoulos, T., Petsas, T., Dougenis, D. (2007) Increased Bax/Bcl-2 ratio up-regulates caspase-3 and increases apoptosis in the thymus of patients with myasthenia gravis. *In Vivo.* **21**, 123-132.
89. Kavitha, M., Nataraj, J., Essa, M.M., Memon, M.A., Manivasagam, T. (2013) Mangiferin attenuates MPTP induced dopaminergic neurodegeneration and improves motor impairment, redox balance and Bcl-2/Bax expression in experimental Parkinson's disease mice. *Chem. Biol. Interact.* **206**, 239-247.
90. Horowitz, A., Menice, C.B., Laporte, R., Morgan, K.G. (1996). Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol. Rev.* **76**, 967-1003.

91. Jeon, S.B., Kim, G., Kim, J.I., Seok, Y.M., Kim, S.H., Suk, K., Shin, H.M., Lee, Y.H., Kim, I.K. (2007) Flavone inhibits vascular contraction by decreasing phosphorylation of the myosin phosphatase target subunit. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **34**, 1116-1120.
92. Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., Krizanova, O. (2015) Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox. Biol.* **6**, 260-271.
93. Deng, J.T., Van Lierop, J.E., Sutherland, C., Walsh, M.P. (2001) Ca²⁺-independent smooth muscle contraction. a novel function for integrin-linked kinase. *J. Biol. Chem.* **276**, 16365-16373.
94. Wang, T., Kendig, D.M., Trapanese, D.M., Smolock, E.M., Moreland, R.S. (2012) Phorbol 12,13-dibutyrate-induced, protein kinase C-mediated contraction of rabbit bladder smooth muscle. *Front. Pharmacol.* **2**, 83.
95. Nisoli, E., Carruba, M.O. (2000) An assessment of the safety and efficacy of sibutramine, an anti-obesity drug with a novel mechanism of action. *Obes. Rev.* **1**, 127-139.
96. Mathon, C., Ankli, A., Reich, E., Bieri, S., Christen, P. (2014) Screening and determination of sibutramine in adulterated herbal slimming supplements by HPTLC-UV densitometry. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **31**, 15-20.
97. Yoshida, N., Numano, M., Nagasaka, Y., Ueda, K., Tsuboi, H., Tanimoto, T., Kimura, K. (2015) Study on health hazards through medicines purchased on the Internet: a cross-sectional investigation of the quality of anti-obesity medicines containing crude drugs as active ingredients. *BMC Complement Altern. Med.* **15**, 430.

98. Lam, P.K., Leung, K.S., Wong, T.W., Lee, H.H., Tang, M.H., Mak, T.W., (2012) Serotonin syndrome following overdose of a non-prescription slimming product containing sibutramine: a case report. *Hum. Exp. Toxicol.* **31**, 414-417.
99. Ahmarani, L., Avedanian, L., Al-Khoury, J., Perreault, C., Jacques, D., Bkaily, G. (2013) Whole-cell and nuclear NADPH oxidases levels and distribution in human endocardial endothelial, vascular smooth muscle, and vascular endothelial cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **91**, 71-79.
100. Chapple, S.J., Cheng, X., Mann, G.E. (2013) Effects of 4-hydroxynonenal on vascular endothelial and smooth muscle cell redox signaling and function in health and disease. *Redox Biol.* **23**, 319-331.
101. Ibrahim, W.H., Habib, H.M., Kamal, H., St Clair, D.K., Chow, C.K. (2013) Mitochondrial superoxide mediates labile iron level: evidence from Mn-SOD-transgenic mice and heterozygous knockout mice and isolated rat liver mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* **65**, 143-149.
102. Govatati, S., Malempati, S., Saradamma, B., Divyamaanasa, D., Naidu, B.P., Bramhachari, P.V., Narayana, N., Shivaji, S., Bhanoori, M., Tamanam, R.R., Rao, P.S., Nallanchakravarthula, V. (2016) Manganese-superoxide dismutase (Mn-SOD) overexpression is a common event in colorectal cancers with mitochondrial microsatellite instability. *Tumour. Biol.* **37**, 10357-10364.
103. Li, Q.F., Tang, D.D. (2009) Role of p47 (phox) in regulating Cdc42GAP, vimentin, and contraction in smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **297**, C1424-C1433.
104. Wirth, A., Benyó, Z., Lukasova, M., Leutgeb, B., Wettschureck, N., Gorbey, S., Orsy, P., Horváth, B., Maser-Gluth, C., Greiner, E., Lemmer, B., Schütz, G., Gutkind, J.S., Offermanns, S. (2008) G12-G13-LARG-mediated signaling in

vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nat. Med.* **14**, 64-68.

105. Barnes, E.A., Chen, C.H., Sedan, O., Cornfield, D.N. (2017) Loss of smooth muscle cell hypoxia inducible factor-1 α underlies increased vascular contractility in pulmonary hypertension. *FASEB J.* **31**, 650-662.
106. Jurkiewicz, N.H., da Silva, Júnior, E.D., de Souza, B.P., Ferreira Verde, L., Drawanz Pereira, J., Mendes Sobrinho, C., Soubhi Smaili, S., Caricati-Neto, A., Miranda-Ferreira, R., Jurkiewicz, A. (2012) Changes of cytosolic calcium and contractility of young rat vas deferens by acute treatment with amphetamine, fluoxetine or sibutramine. *Eur. J. Pharmacol.* **691**, 52-60.
107. García-Redondo, A.B., Briones, A.M., Beltrán, A.E., Alonso, M.J., Simonsen, U., Salaices, M. (2009) Hypertension increases contractile responses to hydrogen peroxide in resistance arteries through increased thromboxane A₂, Ca²⁺, and superoxide anion levels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **328**, 19-27.
108. Al-Shboul, O., Mustafa, A. (2015) Effect of oxidative stress on Rho kinase II and smooth muscle contraction in rat stomach. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **93**, 405-411.
109. Zhang, X., Yan, S.M., Zheng, H.L., Hu, D.H., Zhang, Y.T., Guan, Q.H., Ding, Q.L. (2014) A mechanism underlying hypertensive occurrence in the metabolic syndrome: cooperative effect of oxidative stress and calcium accumulation in vascular smooth muscle cells. *Horm. Metab. Res.* **46**, 126-32.
110. Trebak, M., Ginnan, R., Singer, H.A., Jourdain, D. (2010) Interplay between calcium and reactive oxygen/nitrogen species: an essential paradigm for vascular smooth muscle signaling. *Antioxid. Redox Signal* **12**, 657-674.

111. van Riper, D.A., McDaniel, N.L., Rembold, C.M. (1997) Myosin light chain kinase phosphorylation in nitrovasodilator induced swine carotid artery relaxation. *Biochim. Biophys. Acta* **1355**, 323-330.
112. Nakamura, K., Koga, Y., Sakai, H., Homma, K., Ikebe, M. (2007) cGMP-dependent relaxation of smooth muscle is coupled with the change in the phosphorylation of myosin phosphatase. *Circ. Res.* **101**, 712-722.
113. Heal, D.J., Aspley, S., Prow, M.R., Jackson, H.C., Martin, K.F., Cheetham, S.C. (1998) Sibutramine: a novel anti-obesity drug: a review of the pharmacological evidence to differentiate it from d-amphetamine and d-fenfluramine. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **22**, S18-S28.
114. Richardson, D.K., Jones, R.B., Bailey, C.J. (2006) The primary amine metabolite of sibutramine stimulates lipolysis in adipocytes isolated from lean and obese mice and in isolated human adipocytes. *Horm. Metab. Res.* **38**, 727-731.
115. Yun, J., Choi, J., Jo, C.H. and Kwon, K. (2018) Detection of Synthetic Anti-Obesity Drugs, Designer Analogues and Weight- Loss Ingredients as Adulterants in Slimming Foods from 2015 to 2017. *J. Chromatogr. Sep. Tech.* **9**, 1.
116. Yun, J., Shin, K.J., Choi, J., Jo, C.H. (2018) Isolation and structural characterization of a novel sibutramine analogue, chlorosipentramine, in a slimming dietary supplement, by using HPLC-PDA, LC-Q-TOF/MS, FT-IR, and NMR. *Forensic. Sci. Int.* **286**, 199-207.
117. Kelly, J.P. (2011) Cathinone derivatives: a review of their chemistry, pharmacology and toxicology. *Drug Test Anal.* **3**, 439-453.

118. Nagai, F., Nonaka, R., Satoh, H., Kamimura, K. (2007) The effects of non-medically used psychoactive drugs on monoamine neurotransmission in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* **559**, 132-137.
119. Cozzi, N.V., Foley, K.F. (2003) Methcathinone is a substrate for the serotonin uptake transporter. *Pharmacol. Toxicol.* **93**, 219-225.
120. Wood, D.M., Davies, S., Greene, S.L., Button, J., Holt, D.W., Ramsey, J., Dargan, P.I. (2010) Case series of individuals with analytically confirmed acute mephedrone toxicity. *Clin. Toxicol.* **48**, 924-927.
121. Nicholson, P.J., Quinn, M.J., Dodd, J.D. (2010) Headshop heartache: acute mephedrone 'meow' myocarditis. *Heart* **96**, 2051-2052.
122. Maan, Z.N., D'Souza, A.R. (2012) Spontaneous subcutaneous emphysema associated with mephedrone usage. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* **94**, e38-e40.
123. Lukandu, O.M., Costea, D.E., Neppelberg, E., Johannessen, A.C., Vintermyr, O.K. (2008) Khat (*Catha edulis*) induces reactive oxygen species and apoptosis in normal human oral keratinocytes and fibroblasts. *Toxicol. Sci.* **103**, 311-324.
124. Hasegawa, K., Wurita, A., Minakata, K., Gonmori, K., Nozawa, H., Yamagishi, I., Suzuki, O., Watanabe, K. (2014) Identification and quantitation of a new cathinone designer drug PV9 in an “aroma liquid” product, antemortem whole blood and urine specimens, and a postmortem whole blood specimen in a fatal poisoning case. *Forensic. Toxicol.* **32**, 243-250.
125. Kudo, K., Usumoto, Y., Kikura-Hanajiri, R., Sameshima, N., Tsuji, A., Ikeda, N. (2015) A fatal case of poisoning related to new cathinone designer drugs, 4-methoxy PV8, PV9, and 4-methoxy PV9, and a dissociative agent, diphenidine. *Leg. Med.* **17**, 421-426.

126. Paillet-Loilier, M., Cesbron, A., Le Boisselier, R., Bourguine, J., Debruyne, D. (2014) Emerging drugs of abuse: current perspectives on substituted cathinones. *Subst. Abuse Rehabil.* **5**, 37-52.
127. den Hollander, B., Sundström, M., Pelander, A., Ojanperä, I., Mervaala, E., Korpi, E.R., Kankuri, E. (2014) Keto amphetamine toxicity-focus on the redox reactivity of the cathinone designer drug mephedrone. *Toxicol. Sci.* **141**, 120-131.
128. den Hollander, B., Sundström, M., Pelander, A., Siltanen, A., Ojanperä, I., Mervaala, E., Korpi, E.R., Kankuri, E. (2015) Mitochondrial respiratory dysfunction due to the conversion of substituted cathinones to methylbenzamides in SH-SY5Y cells. *Sci. Rep.* **5**, 14924.
129. Valente, M.J., Bastos, M.L., Fernandes, E., Carvalho, F., Guedes, de Pinho, P., Carvalho, M. (2017) Neurotoxicity of β -keto amphetamines: deathly mechanisms elicited by methylenedioxypyrovalerone (MDPV) in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *ACS Chem. Neurosci.* **8**, 850-859.
130. Silva, B., Fernandes, C., Tiritan, M.E., Pinto, M.M.M., Valente, M.J., Carvalho, M., Gusdes, de Pinho, P., Remião, F. (2016) Chiral enantioresolution of cathinone derivatives present in "legal highs", and enantioselectivity evaluation on cytotoxicity of 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV). *Forensic. Toxicol.* **34**, 372-385.
131. Valente, M.J., Araújo, A.M., Silva, R., Bastos, M.L., Carvalho, F., Guedes, de Pinho, P., Carvalho, M. (2016) 3,4-Methylenedioxypyrovalerone (MDPV): in vitro mechanisms of hepatotoxicity under normothermic and hyperthermic conditions. *Arch. Toxicol.* **90**, 1959-1973.

132. Siedlecka-Kroplewska, K., Wrońska, A., Stasiłojć, G., Kmiec, Z. (2018) The Designer Drug 3-Fluoromethcathinone Induces Oxidative Stress and Activates Autophagy in HT22 Neuronal Cells. *Neurotox. Res.* **34**, 388-400.
133. Coccini, T., Vecchio, S., Crevani, M., De Simone, U. (2019) Cytotoxic Effects of 3,4-Catechol-PV (One Major MDPV Metabolite) on Human Dopaminergic SH-SY5Y Cells. *Neurotox. Res.* **35**, 49-62.
134. Springer, D., Fritschi, G., Maurer, H.H. (2003) Metabolism of the new designer drug α -pyrrolidinopropiophenone (PPP) and the toxicological detection of PPP and 4'-methyl- α -pyrrolidinopropiophenone (MPPP) studied in rat urine using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **796**, 253-266.
135. Springer, D., Fritschi, G., Maurer, H.H. (2003) Metabolism and toxicological detection of the new designer drug 4'-methoxy- α -pyrrolidinopropiophenone studied in rat urine using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* **793**, 331-342.
136. Springer, D., Fritschi, G., Maurer, H.H. (2003) Metabolism and toxicological detection of the new designer drug 3',4'-methylenedioxy- α -pyrrolidinopropiophenone studied in urine using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* **793**, 377-388.
137. Westphal, F., Rösner, P., Junge, T. (2010) Differentiation of regioisomeric ring-substituted fluorophenethylamines with product ion spectrometry. *Forensic. Sci. Int.* **194**, 53-59.
138. Chen, P.I., Cao, A., Miyagawa, K., Tojais, N.F., Hennigs, J.K., Li, C.G., Sweeney, N.M., Inglis, A.S., Wang, L., Li, D., Ye, M., Feldman, B.J., Rabinovitch, M. (2017) Amphetamines promote mitochondrial dysfunction and DNA damage in pulmonary hypertension. *JCI Insight* **2**, e90427.

139. Shah, A., Kumar, S., Simon, S.D., Singh, D.P., Kumar, A. (2013) HIV gp120- and methamphetamine-mediated oxidative stress induces astrocyte apoptosis via cytochrome P450 2E1. *Cell Death Dis.* **4**, e850.
140. Chen, L., Huang, E., Wang, H., Qiu, P., Liu, C. (2013) RNA interference targeting α -synuclein attenuates methamphetamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. *Brain Res.* **1521**, 59-67.
141. Dhar-Mascareño, M., Cárcamo, J.M., Golde, D.W. (2005) Hypoxia-reoxygenation-induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells are inhibited by vitamin C. *Free Radic. Biol. Med.* **38**, 1311-1322.
142. German, C.L., Fleckenstein, A.E., Hanson, G.R. (2014) Bath salts and synthetic cathinones: an emerging designer drug phenomenon. *Life Sci.* **97**, 2-8.
143. Hadlock, G.C., Webb, K.M., McFadden, L.M., Chu, P.W., Ellis, J.D., Allen, S.C., Andrenyak, D.M., Vieira-Brock, P.L., German, C.L., Conrad, K.M., Hoonakker, A.J., Gibb, J.W., Wilkins, D.G., Hanson, G.R., Fleckenstein, A.E. (2011) 4-Methylmethcathinone (mephedrone): neuropharmacological effects of a designer stimulant of abuse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **339**, 530-536.
144. Simmler, L.D., Buser, T.A., Donzelli, M., Schramm, Y., Dieu, L.H., Huwyler, J., Chaboz, S., Hoener, M.C., Liechti, M.E. (2013) Pharmacological characterization of designer cathinones in vitro. *Br. J. Pharmacol.* **168**, 458-470.
145. Mas-Morey, P., Visser, M.H., Winkelmolen, L., Touw, D.J. (2013) Clinical toxicology and management of intoxications with synthetic cathinones ("bath salts"). *J. Pharm. Pract.* **26**, 353-357.
146. Nagai, H., Saka, K., Nakajima, M., Maeda, H., Kuroda, R., Igarashi, A., Tsujimura-Ito, T., Nara, A., Komori, M., Yoshida, K. (2014) Sudden death after

- sustained restraint following self-administration of the designer drug α -pyrrolidinovalerophenone. *Int. J. Cardiol.* **172**, 263-265.
147. White, C.M. (2016) Mephedrone and 3,4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV): synthetic cathinones with serious health implications. *J. Clin. Pharmacol.* **56**, 1319-1325.
 148. Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130-7139.
 149. Worthington, D.J., Rosemeyer, M.A. (1976) Glutathione reductase from human erythrocytes. Catalytic properties and aggregation. *Eur. J. Biochem.* **67**, 231-238.
 150. Hazelton, G.A., Lang, C.A. (1980) Glutathione contents of tissues in the aging mouse. *Biochem. J.* **188**, 25-30.
 151. Oguri, T., Fujiwara, Y., Isobe, T., Katoh, O., Watanabe, H., Yamakido, M. (1998) Expression of γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS) and multidrug resistance-associated protein (MRP), but not human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT), genes correlates with exposure of human lung cancers to platinum drugs. *Br. J. Cancer* **77**, 1089-1096.
 152. Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zollner, H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* **11**, 81-128.
 153. Ullrich, O., Grune, T., Henke, W., Esterbauer, H., Siems, W.G. (1994) Identification of metabolic pathways of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by mitochondria isolated from rat kidney cortex. *FEBS Lett.* **352**, 84-86.

154. Poillet-Perez, L., Despouy, G., Delage-Mourroux, R., Boyer-Guittaut, M. (2015) Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy. *Redox Biol.* **4**, 184-192.
155. Matsunaga, T., Y. Morikawa., Tanigawa, M., Kamata, K., Shibata, A., Sasajima, Y., Suenami, K., Sato, K., Takekoshi, Y., Endo, S., El-Kabbani, O., Ikari, A. (2017) Structure-activity relationship for toxicity of α -pyrrolidinophenones in human aortic endothelial cells. *Forensic. Toxicol.* **35**, 309-316.
156. Gluck, M.R., Moy, L.Y., Jayatilleke, E., Hogan, K.A., Manzino, L., Sonsalla, P.K. (2001) Parallel increases in lipid and protein oxidative markers in several mouse brain regions after methamphetamine treatment. *J. Neurochem.* **79**, 152-160.
157. Stankovski, L., Alvarez, C., Ouimet, T., Vitalis, T., El-Hachimi, K.H., Price, D., Deneris, E., Gaspar, P., Cases, O. (2007) Developmental cell death is enhanced in the cerebral cortex of mice lacking the brain vesicular monoamine transporter. *J. Neurosci.* **27**, 1315-1324.
158. Brown, J.M., Yamamoto, B.K. (2003) Effects of amphetamines on mitochondrial function: role of free radicals and oxidative stress. *Pharmacol. Ther.* **99**, 45-53.
159. Miyazaki, I., Asanuma, M. (2008) Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself. *Acta. Med. Okayama* **62**, 141-150.
160. Jeng, W., Wells, P.G. (2010) Reduced 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, Ecstasy)-initiated oxidative DNA damage and neurodegeneration in prostaglandin H synthase-1 knockout mice. *ACS Chem. Neurosci.* **1**, 366-380.
161. Camandola, S., Poli, G., Mattson, M.P. (2000) The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2,3-nonenal increases AP-1-binding activity through caspase activation in neurons. *J. Neurochem.* **74**, 159-168.

162. Mattson, M.P. (2009). Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. *Exp. Gerontol.* **44**, 625-633.
163. O'Connor, T., Ireland, L.S., Harrison, D.J., Hayes, J.D. (1999) Major differences exist in the function and tissue-specific expression of human aflatoxin B1 aldehyde reductase and the principal human aldo-keto reductase AKR1 family members. *Biochem. J.* **343**, 487-504.
164. Srivastava, S., Chandra, A., Bhatnagar, A., Srivastava, S.K., Ansari, N.H. (1995) Lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal and its conjugate with GSH are excellent substrates of bovine lens aldose reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **217**, 741-746.
165. Vander Jagt, D.L., Hunsaker, L.A., Vander Jagt, T.J., Gomez, M.S., Gonzales, D.M., Deck, L.M., Royer, R.E. (1997) Inactivation of glutathione reductase by 4-hydroxynonenal and other endogenous aldehydes. *Biochem. Pharmacol.* **53**, 1133-1140.
166. Grune, T., Davies, K.J. (2003) The proteasomal system and HNE-modified proteins. *Mol. Aspects Med.* **24**, 195-204.
167. Zhang, H., Forman, H.J. (2017) Signaling by 4-hydroxy-2-nonenal: Exposure protocols, target selectivity and degradation. *Arch. Biochem. Biophys.* **617**, 145-154.
168. Ding, Q., Keller, J.N. (2001) Proteasome inhibition in oxidative stress neurotoxicity: implications for heat shock proteins. *J. Neurochem.* **77**, 1010-1017.
169. Zhang, L., Wang, H., Xu, J., Zhu, J., Ding, K. (2014) Inhibition of cathepsin S induces autophagy and apoptosis in human glioblastoma cell lines through

ROS-mediated PI3K/AKT/mTOR/p70S6K and JNK signaling pathways. *Toxicol. Lett.* **228**, 248-259.

170. Matsunaga, T., Arakaki, M., Kamiya, T., Haga, M., Endo, S., El-Kabbani, O., Hara, A. (2010) Nitric oxide mitigates apoptosis in human endothelial cells induced by 9,10-phenanthrenequinone: role of proteasomal function. *Toxicology.* **268**, 191-197.
171. Sid, B., Verrax, J., Calderon, P.B. (2013) Role of AMPK activation in oxidative cell damage: Implications for alcohol-induced liver disease. *Biochem. Pharmacol.* **86**, 200-209.

略語表

AKR	aldo-keto reductase
AMC	7-amido-4-methylcoumarin
AMPK	adenosine monophosphate kinase
Apaf-1	apoptotic protease activating factor 1
BBB	blood-brain barrier
BSA	bovine serum albumin
BSO	DL-buthionine-(<i>S,R</i>)-sulfoximine
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzene
cGMP	cyclic guanosine monophosphate
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio propanesulfonic acid
CHOP	CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein
C _{max}	maximum drug concentration
Ct	threshold cycle
CYP	cytochrome P450
Cyt- <i>c</i>	cytochrome <i>c</i>
DAF2-DA	diaminofluorescein-2 diacetate
DCFH-DA	2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate
DEM	diethylmaleate
DETA	diethylenetriamine NONOate
DMEM	dulbecco's modified eagle's minimum essential medium
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethylsulfoxide
DPBS	dulbecco's phosphate buffered saline

DTNB	5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
DTT	dithiothreitol
DTX	docetaxel
EBM-2	endothelial cell basal medium-2
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt
EMEM	Eagle's minimum essential medium
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
FBS	fetal bovine serum
FMC	fluoromethcathinone
Fura-2	1-[6-Amino-2-(5-carboxy-2-oxazolyl)-5-benzofuranyloxy]-2-(2-amino-5-methylphenoxy)ethane- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid, pentapotassium salt
γ -GCS	γ -glutamylcysteine synthetase
GR	glutathione reductase
GSH	reduced glutathione
GS-HNE	4-hydroxy-2-nonenal glutathione conjugate
GSSG	oxidized glutathione
GST	glutathione <i>S</i> -transferase
HAE	human aortic endothelial
HASM	human aortic smooth muscle
HEPES	<i>N</i> -2-hydroxyethylpiperazine- <i>N</i> -2-ethanesulfonic acid
HNE	4-hydroxy-2-nonenal
HSP	heat shock protein
iNOS	inducible nitric oxide synthase
JC-1	5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide

KTZ	ketoconazole
LC ₅₀	50% lethal concentration
MDMA	3,4-methylenedioxymethamphetamine
MDPV	3,4-methylenedioxypyrovalerone
MEM	minimum essential medium
MG132	carbobenzoxy-Leu-Leu-leucinal
MLC	myosin light chain
mTOR	mechanistic target of rapamycin
NAC	<i>N</i> -acetyl-L-cysteine
NO	nitric oxide
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
ONOO ⁻	peroxynitrite
α-PBP	α-pyrrolidinobutiophenone
PEG-cat	polyethylene glycol-conjugated catalase
α-PHP	α-pyrrolidinohexanophenone
α-PHPP	α-pyrrolidinoheptanophenone
PK	protein kinase
α-PNP	α-pyrrolidinononanophenone
α-POP	α-pyrrolidinooctanophenone
α-PPP	α-pyrrolidinopropiophenone
PPs	pyrrolidinophenone derivatives
PQ	9,10-phenanthrenequinone
PSMB	proteasome subunit molecule beta
PVDF	polyvinylidene difluoride
α-PVP	α-pyrrolidinovalerophenone

RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	small interfering RNA
SOD	superoxide dismutase
TBS	tris-buffered saline
TBST	tris-buffered saline with tween 20
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling
U	unit
VPM	verapamil
WST-1	2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium monosodium salt

論文目録

本学位論文内容は、以下の発表論文を総括したものである。

1. Morikawa, Y., Shibata, A., Okumura, N., Ikari, A., Sasajima, Y., Suenami, K., Sato, K., Takekoshi, Y., El-Kabbani, O., Matsunaga, T. (2017) Sibutramine provokes apoptosis of aortic endothelial cells through altered production of reactive oxygen and nitrogen species. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **314**, 1-11.
2. Matsunaga, T., Morikawa, Y., Tanigawa, M., Kamata, K., Shibata, A., Sasajima, Y., Suenami, K., Sato, K., Takekoshi, Y., Endo, S., El-Kabbani, O., Ikari, A. (2017) Structure-activity relationship for toxicity of α -pyrrolidinophenones in human aortic endothelial cells. *Forensic. Toxicol.* **35**, 309-316.
3. Matsunaga, T., Morikawa, Y., Kamata, K., Shibata, A., Miyazono, H., Sasajima, Y., Suenami, K., Sato, K., Takekoshi, Y., Endo, S., El-Kabbani, O., Ikari, A. (2017) α -Pyrrolidinononanophenone provokes apoptosis of neuronal cells through alterations in antioxidant properties. *Toxicology* **386**, 93-102.
4. Morikawa, Y., Shibata, A., Sasajima, Y., Suenami, K., Sato, K., Takekoshi, Y., Endo, S., Ikari, A., Matsunaga, T. (2018) Sibutramine facilitates apoptosis and contraction of aortic smooth muscle cells through elevating production of reactive oxygen species. *Eur. J. Pharmacol.* **841**, 113-121.