

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09154

研究課題名(和文)ピレスロイド系農薬は本当に安全か？インスリン抵抗性誘導の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Augmentation in insulin resistance by pyrethroid pesticide invalidating the claim of its safety

研究代表者

崔 正国 (Cui, Zheng-Guo)

富山大学・学術研究部医学系・助教

研究者番号：90572115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、型ピレスロイド系農薬であるフェンバレレートががん細胞の糖代謝とストレスの応答能力に及ぼす影響について解析した。ヒト肝がん由来細胞株であるHepG2細胞をフェンバレレートにより48時間前処理するとワールブルク効果に類した現象が認められた。グルコースの取り込みが顕著に増加され、ATPと乳酸の産生が有意に増強し、酸素の消費が減少した。メトホルミンによるHepG2細胞の細胞死はフェンバレレートの前処理により抑制された。また、PI3K-AKTおよびAMPKシグナル伝達経路の活性化がその分子メカニズムの一部を担うことが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ピレスロイド系農薬は家庭用あるいは果実や野菜の農業生産用に広く利用される殺虫剤である。実験動物等において神経系や生殖ホルモン系統への悪影響が報告されているが、糖代謝に及ぼす影響については不明な点が多い。本研究は、フェンバレレートの曝露ががん細胞の糖代謝に影響を及ぼすことによりワールブルク効果に類した現象を引き起こし、抗がん剤における細胞死の抵抗性を誘発することを見出し、さらにその分子メカニズムの一部を解明した。それは、ピレスロイド系農薬を使用する農業従事者の健康を守るために重要な情報を提供することと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Fenvalerate (Fen) is a synthetic pyrethroid insecticide and a known environmental endocrine disruptor. Previous studies reported that pyrethroid exposure could increase the risk of diabetes. On the other hand, Fen is able to decrease mouse serum glucose, the complicate mechanism is largely unknown. Here we found that Fen promoted ATP generation, lactate production, and glucose uptake, which were similar to the Warburg effect. Moreover, Fen enhanced insulin receptor sensitivity and endocytosis by PI3K-AKT pathway. Fen sustained the Warburg effect dependent on the generation of reactive oxygen species. Potent antioxidants N-acetyl Cysteine and ascorbic acid inhibited the Warburg effect induced by Fen. Finally, chronic Fen exposure fortified HepG2 cells against metformin-induced cell death. In conclusion, Fen enabled hepatoma cells to adapt for their ambient environment.

研究分野：公衆衛生学

キーワード：フェンバレレート がん 糖代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ピレスロイド系農薬は家庭用あるいは果実や野菜の農業生産用に広く利用される殺虫剤である。ピレスロイド系農薬は天然除虫菊有効成分(ピレトリン)類の型とそのシアノ基修飾類の型がある。型に比べて型はより強い殺虫力と残効性を示すため農業生産者は型を良く使用する傾向にある。哺乳類・鳥類の受容体に対する作用は弱く、比較的安全性の高い殺虫剤として認識されていたが、実験動物等において神経系や生殖ホルモン系統への悪影響が報告されている。また、ピレスロイド系農薬は農産物の収穫前日までの使用が認められており、長期間の摂取は微量でもヒトへの生理学的・衛生的問題が懸念されている。

癌細胞は、主に嫌氣的解糖系に依存してエネルギーを産生し、増殖する。酸素を利用するミトコンドリア内電子伝達系やクエン酸回路に比較して解糖系はエネルギー産生効率が非常に低い。そこで、増殖が盛んな癌細胞ではグルコースの取り込みと解糖系の活性化が非常に重要である。環境汚染物質は体内の活性酸素増加や脂肪組織の炎症などに関与し、糖代謝のバランスに影響することが報告されている。

ピレスロイド系農薬による糖代謝異常に関する報告は非常に少ない。最近、ピレスロイド系農薬を生産する労働者に糖代謝異常が有意に増えるという疫学的研究が散見されているがその詳細は不明である(1)。特に、がん細胞の代謝、増殖、ストレス感受性などに及ぼすピレスロイド系農薬の影響についてはまだ報告がない。

2. 研究の目的

本研究では、ピレスロイド系農薬の曝露が誘発する糖代謝の異常及びがん細胞のストレス応答に及ぼす影響について調べる。具体的には、ピレスロイド系農薬の使用量の4分の1を占めるフェンバレレート(型)を用いて、インスリンシグナル伝達系とがん細胞死感受性の変化を解析し、その分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1. 細胞培養と処理

ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 細胞は、理化学研究所バイオリソース研究センター細胞材料開発室より供与されたものを用いた。10% fetal calf serum(FCS, Wako 社製) Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, Wako 社製)により培養した。フェンバレレートはSigma-Aldrich Corp., MO, USA から購入した。細胞に最終濃度が1-10 μ Mになるようにフェンバレレートを添加し、一定期間の培養後各指標を検討した。

2. 細胞毒性試験

細胞毒性試験はCell Counting Kit-8 (CCK-8) (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)を用いて、同社のプロトコールに従って行った。細胞を96 well-plate(Becton, Dickinson 社製)に播種し、薬剤処理24時間後波長450 nm (Filter Max F5, Molecular Devices, San Jose, CA, USA)で吸光度を計測した。

3. グルコース取り込みとアデノシン三リン酸の量

細胞のグルコース取り込みとアデノシン三リン酸(ATP)の量はそれぞれGlucose (G0) assay kit (Sigma-Aldrich Corp., MO, USA)とATP assay kit (Toyo Ink Inc., Tokyo, Japan)を用いて解析を行った。

4. 乳酸生成と酸素消費量の評価

細胞の乳酸生成と酸素消費量の解析には、それぞれglycolysis assay kit and an extracellular oxygen consumption assay kit (Abcam, Cambridge, MA, USA)とextracellular oxygen consumption assay kit (Abcam, Cambridge, MA, USA)を用いた。

5. ミトコンドリア膜電位の低下と細胞内活性酸素の生成

ミトコンドリア膜電位の低下と細胞内活性酸素の生成はTetramethylrhodamine, Methyl Ester, Perchlorate (TMRM)、dihydroethidium (DHE)、2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)を用いて、細胞を37 15分間染色し、フローサイトメトリー法により計測した。

6. タンパク質の発現変化

インスリンシグナル伝達系に関連するタンパク質の発現変化は、ウェスタンブロット法により検討した。インスリン受容体 (IR β)とリン酸化 IR- β (p-IR β)の一次抗体はSanta Cruz Biotechnology, Inc. CA, USA から購入し、その他の抗体はCell Signaling Technology, Inc. Beverly, MA, USA から購入した。

7. 統計学的処理

得られた実験値はOne-wayあるいはtwo-way ANOVAとDunnnett's testにより統計学的処理を行い、p<0.05を有意差とした。

4. 研究成果

1. グルコースの取り込み、ATP 及び乳酸産生の促進

解糖系に偏ったエネルギー代謝はがん細胞の特徴の一つであり、解糖系の活性化はがん細胞の生存に極めて重要である。HepG2 細胞を 1-20 μ M のフェンバレレートにより処理し 24 時間培養して細胞生存率を測定した結果、20 μ M で 20%の生存率の抑制が認められた。次に、フェンバレレートの曝露によるがん細胞の糖代謝変化を詳しく解析するため、HepG2 細胞を 1-10 μ M のフェンバレレートにより処理し、細胞の ATP、乳酸の生成、グルコースの取り込みと酸素の消費量を測定した。その結果、フェンバレレートは細胞のグルコース取り込みと ATP の産生を顕著に増加させた。一方、酸素の消費量は減少し、乳酸の生成量は増加した。以上の結果により、フェンバレレートの処理が HepG2 細胞の解糖系を促進することが示唆された。

2. PI3K-AKT 経路の活性化

次は、グルコース代謝に及ぼすフェンバレレートの影響の分子メカニズムを解明するために、ウエスタンブロットによりインスリンシグナル伝達経路の変化を調べた。HepG2 細胞をフェンバレレートにより 24 時間前処理した後、100nM のインスリンを用いて 10 分間刺激した。その結果、IR β と AKT のリン酸化が、用量依存的に顕著に増加した。AMP 活性化プロテインキナーゼのリン酸化も、用量依存的に増強された。これらの結果により、フェンバレレートは PI3K-AKT 経路を介してグルコースの代謝を促進することが示唆された。

3. 活性酸素生成の増加

活性酸素は生体内の様々な生理病理的なシグナル伝達系に關与する。ピレスロイド系農薬が活性酸素を誘導することが報告されており、フェンバレレートによる活性酸素の生成とミトコンドリアの機能変化を検討した。その結果、フェンバレレートの前処理は HepG2 細胞の活性酸素の生成とミトコンドリアの膜電位が低下した細胞の割合を増加させた。また、抗酸化剤 N-acetylcysteine、アスコルビン酸との併用処理によって、フェンバレレートによるグルコースの取り込み、ATP の生成、乳酸産生の増強効果が抑制された。活性酸素の生成がワールブルグ効果の誘導と持続に關与することが報告されており、フェンバレレートが産生する活性酸素がワールブルグ効果を誘発する可能性が示唆された。

4. メトホルミン誘発細胞死に対する抵抗性

メトホルミンは、糖尿病患者の肝細胞癌のリスクを低下させる。また優れた抗がん剤としてもその研究が注目されている。フェンバレレートが誘発するがん細胞の糖代謝異常ががん治療成績に及ぼす影響を調べるため、フェンバレレートの前処理後メトホルミンにより細胞死を誘導した。その結果、1 μ M のフェンバレレートにより、メトホルミンが誘発する細胞死は有意に抑制された。

解糖系では 2 分子の ATP しか産生されない。36 分子の ATP が産生されるミトコンドリアの電子伝達系に比べて効率は低い、ATP の合成速度は解糖系の方が 100 倍ほど速い。また、グルコース 6-リン酸やフルクトース 6-リン酸は解糖系の中間代謝産物として産生され、急速に増殖するがん細胞に核酸やアミノ酸、脂肪酸などのバイオマスの合成に寄与する。フェンバレレートはがん細胞内でグルコースの提供量、ATP の産生を上げ、解糖系を促進し、抗がん剤に対するがん細胞死に抵抗性をもたらす可能性が示唆された。今後担がん小動物モデルを用いてその詳細をさらに詳しく検討する予定である。これらの知見はピレスロイド系農薬使用者の健康を守るために重要な情報を提供することと考えられる。

参考文献

1. Wang N, Huang M, Guo X, Lin P. Urinary Metabolites of Organophosphate and Pyrethroid Pesticides and Neurobehavioral Effects in Chinese Children. *Environ Sci Technol*. 2016;50(17):9627-9635. doi:10.1021/acs.est.6b01219

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Zakki SA, Muhammad JS, Li JL, Feng QW, Li YL, Cui ZG, Inadera H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Melatonin triggers the anticancer potential of phenylarsine oxide via induction of apoptosis through ROS generation and JNK activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Metallomics	6. 最初と最後の頁 396-407
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi:10.1039/c9mt00238c	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kanwal A, Faisal Z, Cui ZG, Zhou D, Khan U, Abdul S, Inadera H.	4. 巻 18
2. 論文標題 Potential proapoptotic phytochemical agents for the treatment and prevention of colorectal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Onocology Letters	6. 最初と最後の頁 487-498
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.3892/ol.2019.10349.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Li ML, Cui ZG, Sun L, Zakki SA, Feng QW, Zhou D, Inadera H.	4. 巻 234
2. 論文標題 Aluminium chloride induces 5-fluorouracil resistance in hepatocellular carcinoma HepG2 cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 20249-20265
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1002/jcp.28625.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Feng QW, Cui ZG, Jin YJ, Sun L, Li ML, Zakki SA, Zhou D, Inadera H.	4. 巻 24
2. 論文標題 Protective effect of dihydromyricetin on hyperthermia-induced apoptosis in human myelomonocytic lymphoma cell.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Apoptosis	6. 最初と最後の頁 290-300
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1007/s10495-019-01518-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Piao JL, Jin YJ, Li ML, Zakki SA, Sun L, Feng QW, Zhou DJ, Kondo T, Cui ZG, Inadera H.	4. 巻 18
2. 論文標題 Excessive Oxidative Stress in the Synergistic Effects of Shikonin on the Hyperthermia-Induced Apoptosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 322-334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.2174/1566524018666181024161704.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Zakki SA, Cui ZG, Sun L, Feng QW, Li ML, Inadera H.	4. 巻 45
2. 論文標題 Baicalin Augments Hyperthermia-Induced Apoptosis in U937 Cells and Modulates the MAPK Pathway via ROS Generation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cellular Physiology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2444 ~ 2460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI:10.1159/000488263	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sun L, Cui ZG, Zakki SA, Feng QW, Li ML, Inadera H.	4. 巻 120
2. 論文標題 Mechanistic study of nonivamide enhancement of hyperthermia-induced apoptosis in U937 cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 147 ~ 159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zhou DJ, Li XY, Li D, Guo ZS, Zhang QL, Bie HY, Cui ZG.	4. 巻 41
2. 論文標題 Synthesis of dehydroindolizidine-type poison-frog alkaloids via Michael-type conjugate addition	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Research	6. 最初と最後の頁 398-402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.3184/174751917X14967701766987	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Cui ZG, Jin YJ, Sun L, Zakki SA, Li ML, Feng QW, Kondo T, Ogawa R, Inadera H.	4. 巻 38
2. 論文標題 Potential hazards of fenvalerate in massive pollution influence the apoptosis sensitivity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Applied Toxicology	6. 最初と最後の頁 240 ~ 247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jat.3517	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zhou DJ, Wang ZH, Zhang YR, Cui ZG.	4. 巻 41
2. 論文標題 Flexible syntheses of 5,8-disubstituted indolizidine poisonous-frog alkaloids via a Michael-type conjugate addition	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Research	6. 最初と最後の頁 98-105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.3184/174751917X14858862342223	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa R, Kagiya G, Watanabe A, Morii A, Cui ZG, Kondo T.	4. 巻 1651
2. 論文標題 A Simple Method for Constructing Artificial Promoters Activated in Response to Ultrasound Stimulation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 187 ~ 203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-7223-4_14	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Cui ZG, Jin YJ, Zakki SA, Sun L, M Li, Feng Q, Inadera H.
2. 発表標題 Shikonin augments hyperthermia-induced apoptosis through enhancement of oxidative stress
3. 学会等名 15th International Congress of Toxicology (ICTXV) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Cui ZG, Jin YJ, Sun L, Zakki SA, Feng Q, Inadera H.
2. 発表標題 Prospective hazards of fevalerate in extensive pollution influences the apoptosis sensitivity
3. 学会等名 EUROTOX 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 崔正国、周徳軍、Li Mengling、Sun Lu、Shahbaz Ahmad Zakki、 稲寺秀邦.
2. 発表標題 温熱誘発アポトーシスにおけるシコニンの増強効果とその分子メカニズム
3. 学会等名 第88回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 崔正国、Shahbaz Ahmad Zakki、Sun Lu、Feng Qianwen、Jin Yujie、 稲寺秀邦.
2. 発表標題 バイカリンによる温熱誘発アポトーシスの増強とその分子メカニズム
3. 学会等名 第87回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 崔正国、Shahbaz Ahmad Zakki、Sun Lu、Feng Qianwen、Jin Yujie、 稲寺秀邦.
2. 発表標題 ノニバミドによる温熱誘発アポトーシスの増強とその分子メカニズム.
3. 学会等名 第16回分子予防環境医学研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	稲寺 秀邦 (Inadera Hidekuni) (10301144)	富山大学・学術研究部医学系・教授 (13201)	
研究 分担者	小川 良平 (Ogawa Ryohei) (60334736)	富山大学・学術研究部医学系・准教授 (13201)	