

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：15201

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19854

研究課題名(和文)腸内環境も勘案したミクロシスチン低濃度曝露による慢性中毒発症機構と緩和法の検証

研究課題名(英文) Mechanism of chronic poisoning by exposure to low concentrations of microcystin and verification of mitigation methods in consideration of the intestinal environment

研究代表者

清水 英寿 (SHIMIZU, Hidehisa)

島根大学・学術研究院農生命科学系・准教授

研究者番号：10547532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、食のグローバル化に伴い、発展途上国だけでなく先進国においても、飲料水や淡水魚介類を介してアオコ由来毒素ミクロシスチンを摂取してしまう可能性が指摘されている。そこで本研究では、低濃度ミクロシスチンによる慢性的な曝露が臓器機能に与える影響について検証を行った。結果として、ミクロシスチンの低濃度曝露により、肝臓や大腸において機能障害の誘発が認められた。また、培養肝細胞および培養腸管細胞を用いた解析から、従来とは異なる作用経路の存在が示唆された。今後は、本研究成果を基盤に、さらなる作用機構の解明に加え、慢性ミクロシスチン中毒を対象としたバイオマーカーの探索などへと発展させていければと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食のグローバル化に伴い、今後、発展途上国と同様に我が国においても、飲食を介して低濃度のミクロシスチンに慢性的に曝露される可能性は否定できない。よって、本研究成果は、新規作用メカニズムの解明といった学術的な発展だけでなく、バイオマーカーの探索や緩和法の検証など、慢性ミクロシスチン中毒への対処方法の作成に向けた基盤となり得る。世界的な問題となりつつある「水質低下」に伴った「食の安全性」の問題に焦点を当てた本研究成果は、我が国のみならず、発展途上国に対する国際貢献にも繋がると期待できる。

研究成果の概要(英文)：In recent years, with the globalization of food, the possibility of ingestion of microcystin, a toxin derived from blue-green algae, through drinking water and freshwater seafood has been pointed out not only in developing countries but also in developed countries. In the present study, we examined the effects of chronic exposure to low concentrations of microcystin on organ function. The results showed that exposure to low concentrations of microcystin induced functional disorders in the liver and colon. Analysis using cultured hepatocytes and intestinal epithelial cells suggested the existence of unconventional pathways of microcystin action. Based on the results of present study, we expect to further elucidate the mechanism of action and search for biomarkers for chronic microcystin poisoning in the future.

研究分野：健康科学

キーワード：腸線維化 ABCトランスポーター SLCトランスポーター Probenecid Rifampicin

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、世界各地の閉鎖系水域において、富栄養化による藍藻類の異常増殖が観察されており、それに伴い様々な湖沼において、マイクロシスチンの濃度上昇が報告されている。特に最近では、浄水機能が整備されていない発展途上国だけでなく、先進国であるアメリカのエリー湖由来の水道水にマイクロシスチンが混入し、周辺住民の多くがマイクロシスチン中毒を患った事は、大きな衝撃として報道された。加えて、淡水魚介類の養殖場においてもマイクロシスチンの濃度上昇が確認されており、そこで養殖された魚介類、例えば、アジア圏や欧米諸国で食されているティラピアに、マイクロシスチンが蓄積されている事も明らかとなっている。養殖されたティラピアは安価で美味しい白身魚として知られており、我が国にも輸入されている。よって、飲料水からだけでなく、体内にマイクロシスチンが蓄積された淡水魚介類を食す事で、マイクロシスチンを人体に取り込む可能性が指摘されている。我が国の食料自給率低下に伴い、多くの農水産物が現在、様々な国から輸入されている。このため、「食の安全性」が近年、非常にクローズアップされている。しかし、どのような分子の混入が「食の安全性」を脅かし、また、その分子がどのようなメカニズムで中毒症状を引き起こすのか、未解明な部分もあるのが現状である。本研究では、「食の安全性」の視点から、「マイクロシスチン」と呼ばれる藍藻類（藍色細菌）由来毒素による慢性中毒に着目した。

### 2. 研究の目的

マイクロシスチン研究におけるこれまでの健康評価は、急性中毒を想定した高濃度のマイクロシスチン曝露に対する解析が主であり、低濃度曝露による慢性中毒に焦点を当てた報告は稀である。そこで本研究では、低濃度曝露による肝臓や大腸に対する影響を解析する事を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ラットを用いた解析

AIN93G を基本食として、ラットにマイクロシスチンを 7 週間投与し、摂食量と体重の変化について測定を行った。また飼育後、解剖を行い、腹部大動脈血と門脈血を採血した後、肝臓、腎臓、副睾丸脂肪を採取するのと同様に、各種臓器重量を計測した。その後、肝臓脂質や各種臓器の遺伝子発現解析のために、肝臓、腎臓の皮質、大腸粘膜の一部を液体窒素で直ちに凍結させ、保存した。腹部大動脈血の血漿と肝臓からコレステロールとトリアシルグリセロールをそれぞれ測定した。肝臓および大腸で発現している mRNA レベルに関しては、それぞれの組織から RNA 抽出を行い、それを逆転写した後、real-time PCR 法で mRNA レベルを測定した。内部標準として、36B4 を使用した。糞中胆汁酸は、ケージ交換した 24 時間後に採取し、そこから胆汁酸を抽出した後、UPLC/ESI-MS を用いて測定を行なった。

#### (2) 腸管細胞における解析-1

ヒト培養腸管細胞株 Caco-2 細胞を播種後、28 日間培養し、腸管上皮様に分化誘導させた細胞を用いて解析を行なった。Caco-2 細胞を分化誘導後、24 時間スタベーションを行った後、マイクロシスチンで細胞を刺激した。Organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1、1B3、2B1、1A2 阻害剤である Rifampicin を用いた際、また、ATP Binding Cassette (ABC) および Solute carrier (SLC) transporter の阻害剤である Probenecid を用いた際は、それぞれ 24 時間スタベーションを行った後、30 分間前処理を行い、その後マイクロシスチンで細胞を刺激した。c-Jun N-terminal kinase (JNK) の活性化は、細胞からタンパク質を抽出した後、JNK のリン酸化抗体を用いてウェスタンブロット法により解析を行なった。内部標準として、 $\beta$ -actin を用いた。MCP-1 の mRNA レベルは、細胞から RNA 抽出を行い、それを逆転写した後、real-time PCR 法にて測定を行なった。内部標準として、36B4 を使用した。

#### (3) 腸管細胞における解析-2

ヒト培養腸管細胞株 Caco-2 細胞を播種後、24 時間スタベーションを行なった後、マイクロシスチンで細胞を刺激した。48 時間ごとに培地を入れ替えるのと同様に同様の刺激を行い、8 日間培養させた後、細胞を回収した。回収した細胞から RNA 抽出を行い、それを逆転写した後、real-time PCR 法にて細胞内シグナル伝達分子および転写因子の作用経路に関わる分子の mRNA レベルの測定を行なった。内部標準として、36B4 を使用した。

#### (4) 肝細胞における解析

ヒト肝臓由来細胞株 HepG2 を播種後、24 時間スタベーションを行った後、マイクロシスチンで細胞を刺激した。Protein kinase A (PKA) の阻害剤である H89、5'Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) の阻害剤である Compound C、Extracellular signal-regulated kinase

(ERK)経路阻害剤である U0126 を用いた際は、24 時間スタベーションを行った後、それぞれの阻害剤を 30 分間前処理後、ミクロシスチンで細胞を刺激した。細胞からタンパク質を抽出した後、ERK、AMPK、Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1 (ULK 1)、PKA の活性化は、それぞれに対するリン酸化抗体を用いて、また Sirtuin 1 (Sirt1) のタンパク量については、Sirt1 に対する抗体を用いて解析を行なった。内部標準として、 $\beta$ -actin を用いた。

#### 4. 研究成果

##### (1) ラットを用いた解析

ラットにミクロシスチン含有水を 7 週間自由飲水させたところ、コントロール群と比較してミクロシスチン摂取群で、肝機能の指標である Aspartate aminotransferase (AST) は減少傾向、Alanine aminotransferase (ALT) は優位に減少していた。一方、ミクロシスチン群で、肝臓中の総コレステロール量は有意に増加していた。肝臓と血漿のトリアシルグリセロール値、血漿のコレステロール値に関しては、両群の間で有意な差は認められなかった。肝臓での遺伝子発現に関しては、炎症性サイトカインの一種である Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ )、ケモカインの一種である MCP-1 の発現量がコントロール群と比較して、それぞれ減少傾向にあった。線維化関連遺伝子である Type I Collagen (COL1A1)、Fibronectin、 $\alpha$ -Smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) の発現量についても調べたところ、両群の間でいずれの遺伝子の発現量にも変化は生じていなかった。大腸については、TNF $\alpha$  および Interleukin-6 (IL-6) の発現量に有意な変化はなかった。しかし、単球・マクロファージを誘導・浸潤させる MCP-1 の発現量は増加していた。このため、マクロファージのマーカー遺伝子の 1 つである F4/80 の発現量を調べたところ、その発現量は MCP-1 の発現量と正の相関関係にあった。つまり、MCP-1 の発現上昇に依存して、単球・マクロファージが大腸に誘導・浸潤されている事が示唆された。よって、この時点では、炎症は惹起されていない事が示唆されたものの、ミクロシスチンの摂取期間の延長に伴い炎症が誘発される可能性が示された。続いて、腸線維化についても着目した。マーカー遺伝子である COL1A1、Fibronectin、 $\alpha$ -SMA の発現増加がミクロシスチン摂取ラットで観察された。これらの結果から、ミクロシスチンは炎症反応非依存的に腸線維化を導く事が明らかとなった。

胆汁酸代謝について着目したところ、糞中胆汁酸種およびその濃度についてコントロール群とミクロシスチン摂取群の間で大きな違いはなかった。しかし、糞中総胆汁酸中のデオキシコール酸比と上述のミクロシスチン摂取群における各種腸線維化マーカー遺伝子の発現量に関して、正の相関関係が認められた。よって、ミクロシスチンにより胆汁酸の一種であるデオキシコール酸の感受性が上昇したと考えられる。

以上から、低濃度ミクロシスチンによる慢性曝露は、肝臓および大腸の機能に影響を及ぼす事が確かめられた。大腸における MCP-1 の発現増加メカニズムの解析結果は以下に記載するが、肝臓でのコレステロール蓄積および腸線維化誘導メカニズムの解明は今後の課題である。

##### (2) Caco-2 細胞を用いた解析-1

腸管上皮様に分化誘導させた Caco-2 細胞に対しミクロシスチン刺激を行ったところ、c-Jun N-terminal kinase (JNK) の活性化を介して MCP-1 の発現量が増加する事が明らかとなった。また、Probenecid を前処理した後ミクロシスチン刺激を行ったところ、JNK の活性化と MCP-1 の発現増加は共に抑制された。一方、Rifampicin を前処理した後、ミクロシスチン刺激を行ったところ、ミクロシスチンにより上昇した JNK の活性化と MCP-1 の発現増加に変化はなかった。したがって、ミクロシスチンは、従来報告されている OATP1B1 と OATP1B3 ではなく、ABC または SLC トランスポーターを介して大腸上皮細胞内に取り込まれ、JNK/MCP-1 経路を活性化させる事が示唆された。

##### (3) Caco-2 細胞を用いた解析-2

培養腸管細胞に対して 8 日間、WHO の規定内の濃度でミクロシスチンを処理したところ、腸の恒常性維持や分化誘導に関わる細胞内シグナル伝達分子および転写因子の作用経路に破綻が生じていた。よって、たとえ WHO の規定内の濃度であっても、慢性的に腸がミクロシスチンに曝露される事で、腸管機能異常を介した健康障害を引き起こす可能性が示唆された。

##### (4) HepG2 細胞を用いた解析

培養肝癌細胞である HepG2 細胞に対してミクロシスチンは、ERK の活性化および AMPK を介した ULK 1 の活性化と Sirt1 の発現上昇を導いた。またミクロシスチンは、PKA の活性化を促し、その阻害剤である H89 の前処理により AMPK の活性化は亢進され、逆に ERK の活性化は一部抑制された。さらに、細胞増殖に関しては、ERK 経路の阻害剤である U126 によりミクロシスチンによる細胞増殖が抑制された。よって、ミクロシスチン依存的な細胞増殖には ERK の活性化が寄与している事が確かめられた。一方、AMPK の阻害剤である Compound C はミクロシスチンによる細胞増殖に影響を与えなかったため、AMPK の関与は確認できなかった。以上から、ミクロシスチンによる培養肝癌細胞の増殖に PKA-ERK 経路が関わっている事が明らかとなった。加えて、肝癌における AMPK の活性化を介したオートファジーの誘導や Sirt1 の発現上昇は、肝癌に対する分子標的薬の 1 つであるソラフェニブへの抵抗性を付与するとの報告がある

ため、ミクロシスチンによりソラフェニブ抵抗性が導かれる可能性も示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡辺優太, 岡野邦宏, 杉浦則夫, 清水和哉, 清水英寿.
2. 発表標題 アオコ由来毒素マイクロシチンの発癌プロモーターとしての作用メカニズムの解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（ワークショップ：「毒生物が産生する『トキシン』の織りなす多元的世界」）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺優太, 河原秀明, 蔵田航一, 湯浅佳奈, 西村浩二, 地阪光生, 横田一成, 杉浦則夫, 清水和哉, 清水英寿
2. 発表標題 肝細胞の生死に対するマイクロシチン-LR作用メカニズムの差異に関する解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水英寿, 河原秀明, 蔵田航一, 湯浅佳奈, 渡辺優太, 堀 将太, 石塚 敏, 岡野邦宏, 吉清恵介, 山本達之, 西村浩二, 地阪光生, 横田一成, 杉浦則夫, 清水和哉
2. 発表標題 アオコ由来毒素マイクロシチン-LRの低濃度投与はラット肝臓コレステロール値を上昇させる
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古東義仁, 堀 将太, 石塚 敏, 杉浦則夫, 清水和哉, 清水英寿
2. 発表標題 アオコ由来毒素マイクロシチン-LRはラットにおいて腸線維化を誘導する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古東義仁, 河原秀明, 蔵田航一, 吉清恵介, 杉浦則夫, 清水和哉, 清水英寿
2. 発表標題 ラットに対するマイクロシスチンの低濃度曝露は結腸においてMCP-1の発現増加を導く
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第58回講演会(例会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古東義仁, 河原秀明, 蔵田航一, 吉清恵介, 杉浦則夫, 清水和哉, 清水英寿
2. 発表標題 アオコ由来毒素マイクロシスチン-LRの慢性的な低濃度曝露は大腸においてJNKの活性化を介してMCP-1の発現増加を導く
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021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	石塚 敏  (ISHIZUKA Satoshi)  (00271627)	北海道大学・農学研究院・教授   (10101)	
研究分担者	清水 和哉  (SHIMIZU Kazuya)  (10581613)	筑波大学・生命環境系・准教授   (12102)	
研究分担者	岡野 邦宏  (OKANO Kunihiro)  (30455927)	秋田県立大学・生物資源科学部・准教授   (21401)	

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------