

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03375

研究課題名(和文)トキシコリポミクス的手法を用いた重金属の組織特異的毒性発現機構の解析

研究課題名(英文)Analysis on molecular mechanisms for tissue-specific toxicity of heavy metals

研究代表者

原 俊太郎 (Hara, Shuntaro)

昭和大学・薬学部・教授

研究者番号：50222229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：未だ不明な点が多い重金属の組織・細胞特異的毒性発現機構を明らかにするために、化学物質曝露時に生体や細胞でみられる脂質プロファイルの変化を網羅的に解析するトキシコリポミクス的手法をさらに展開するとともに、重金属曝露により産生が惹起される過酸化脂質の生成・除去や生理活性脂質の産生に関わる脂質代謝酵素の遺伝子欠損マウスやノックダウン細胞を用いた解析を進めた。その結果、重金属による毒性発現に、毒性発現部位における長鎖アシルCoA合成酵素ACSL4およびカルシウム非依存性ホスホリパーゼA2gammaの発現、ならびにこれらの酵素により制御される過酸化脂質の生成が深く関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メチル水銀やカドミウムといった重金属を過剰に摂取すると、脳や腎臓といった特異的な組織に障害をもたらされるが、その組織特異的な毒性発現機構についてはほとんどわかっていない。この機構がわかれば、毒性をいかに軽減するか、解毒するかにつながることも期待される。本研究では、組織における脂質組成や脂質代謝酵素発現に関する解析を通じて、毒性が発現する組織での過酸化脂質の生成が重金属毒性に深く関与することを明らかにすることができた。

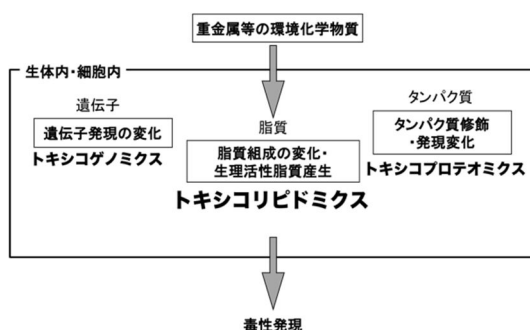
研究成果の概要(英文)：In order to reveal molecular mechanisms for tissue-specific toxicity of heavy metals, we performed toxicolipidomics, in which we comprehensively investigated chemicals-induced alterations in lipid profiles, and investigated the effects of gene knockout or knockdown of lipid metabolizing enzymes, which are involved in generation or elimination of lipid peroxides and/or production of bioactive lipids, on heavy metals-induced tissue-specific toxicity. As the results, we found that expressions of long-chain acyl-CoA synthetase ACSL4 and calcium-independent phospholipase A2 gamma and the generation of lipid peroxides controlled by these enzymes in target tissues might be critical for tissue-specific toxicity of heavy metals.

研究分野：環境毒性学、脂質生化学、衛生薬学

キーワード：脂質代謝 過酸化脂質 毒性発現 重金属 生理活性脂質

1. 研究開始当初の背景

体内に取り込まれた重金属は、標的組織に運ばれ、酸化ストレスを誘導したり炎症反応を惹起したりすることにより毒性を発現する。重金属の毒性の多くは組織特異的であるが、必ずしも重金属が高蓄積した組織が標的となるとは限らず、重金属の組織特異的毒性発現機構については未だ不明な点が多い。一方、研究代表者はこれまでに、重金属をはじめとする化学物質の生体における標的として脂質分子に注目し、化学物質を曝露した際に変化する脂質組成・生理活性脂質産生といった脂質プロファイルを網羅的に解析するトキシコリポドミクスを進めてきた^{1,2)}。その結果、化学物質曝露により生じる膜脂質の過酸化やプロスタグランジン (PG) 類などの生理活性脂質の産生には、毒性と関連し組織特異性がみられることが明らかとなってきた。特に研究代表者らは、最近になり、メチル水銀の標的となるマウス小脳では、標的とならない大脳に比べて、過酸化を受けやすいアラキドン酸やドコサヘキサエン酸といった不飽和脂肪酸を含むグリセロリン脂質が非常に豊富に存在すること、さらに、マウスにメチル水銀を投与すると、小脳におけるこれら不飽和脂肪酸を含むリン脂質の多くが減少する一方で、大脳のリン脂質の多くは逆に増加傾向を示すことを見出した。以前より、メチル水銀の毒性には、脂質過酸化物を生じる酸化ストレスの誘導が関わることが報告されており、研究代表者らも、ラット小脳顆粒細胞をメチル水銀に曝したときに生じる細胞死が、抗酸化剤の前処理で抑えられることを明らかにしている³⁾が、このトキシコリポドミクスの結果は、メチル水銀の小脳特異的な毒性発現に、小脳の脂質組成 (膜脂質が過酸化反応を受けやすいか否か) が強く関連している可能性を示しており、メチル水銀のみならず、多くの重金属の組織・細胞特異的毒性発現にも、各々の組織・細胞における脂質組成や脂質代謝が密接に関与している可能性を示唆している。



2. 研究の目的

本研究では、これまで研究代表者が進めてきたトキシコリポドミクスの手法をさらに展開するとともに、脂質代謝酵素のうち、重金属曝露により産生が惹起される過酸化脂質の生成・除去に関わる、カルシウム非依存性ホスホリパーゼ A₂ (iPLA₂) や長鎖アシル CoA 合成酵素 4 (ACSL4) といった脂質代謝酵素、生理活性脂質の産生に関わる各種 PG 最終合成酵素の遺伝子欠損 (KO) マウスやノックダウン (KD) 細胞を用いた解析を行うことにより、重金属の組織特異的毒性発現機構を明らかにすることを目的とする。本研究では、重金属の組織特異的毒性発現機構の解析につながると考えられる組織特異的毒性を示す化学物質の毒性についても、検討を行った。

3. 研究の方法

- (1) リポドミクス：マウスの各組織、細胞から脂質画分を抽出し、QTRAP5500 および 6500 (Sciex 社) の LC/MS を用い、MRM (multiple reaction monitoring) により、リン脂質の脂肪酸組成、アシル CoA 含有量、生理活性脂質の産生量、リン脂質過酸化物 (PE-00H、PE-0H、TLCL-00H 等) 量を測定した。
- (2) メチル水銀による神経毒性の誘導：メチル水銀をマウスに 10 mg/kg/日、7 日間連続経口投与し、投与開始後 8 日目に後肢交叉を観察し、さらに脳組織を摘出しリポドミクスに用いた。
- (3) パラコートによる肺毒性の誘導：パラコートをマウスに 25 mg/kg 腹腔投与し、投与 3 日後に肺組織を摘出し、組織化学的解析、リポドミクス、遺伝子発現解析に用いた。
- (4) シクロホスファミドによる膀胱炎の誘導：シクロホスファミドをマウスに 150 mg/kg 腹腔投与し、投与 4 時間後に膀胱組織を摘出し、各種解析に用いた。
- (5) アセトアミノフェンによる肝毒性の誘導：アセトアミノフェンをマウスに 200 mg/kg 腹腔投与し、投与 3 時間後に肝臓組織を摘出し、各種解析に用いた。
- (6) 組換え ACSL6 タンパク質の調製と活性測定：バキュロウイルス発現系⁴⁾により、His-tag を付加した組換えヒト ACSL6V1 および V2 タンパク質を発現させ、コバルトアフィニティカラムクロマトグラフィーを用い、部分精製した。この部分精製品を基質となる各種脂肪酸とインキュベートし、得られるアシル CoA 量を LC/MS により測定した。

4. 研究成果

(1) 神経毒性を示すメチル水銀に関する解析

メチル水銀投与後のマウス脳におけるトキシコリポドミクスをさらに展開し、リン脂質過酸化物として、ホスファチジルコリン (PC) のヒドロペルオキシド体 (PC-00H) に加え、ホスファチジエタノールアミン (PE) のヒドロペルオキシド体 (PE-00H) やヒドロキシ体 (PE-0H) が、

大脳および小脳で増加することを見出した。しかし、iPLA₂ の KO マウスにおいても、この増加は野生型マウスと同様であった。

また、不飽和脂肪酸含有膜リン脂質の維持に関わる ACSL4 および、炎症刺激に伴う PGE₂ 産生を担う mPGES-1 の遺伝子欠損がメチル水銀の神経毒性に及ぼす影響についても検討した。ACSL4 欠損はメチル水銀投与による後肢交叉を軽減する傾向を示したが、mPGES-1 欠損はメチル水銀の神経毒性発現に影響を及ぼさなかった。

(2)腎毒性を示すシスプラチン(白金を含む)・カドミウムに関する解析

ヒト膀胱癌由来 EJ 細胞を用いた解析

シスプラチンの抗がん作用の標的となる膀胱癌由来 EJ 細胞の iPLA₂ を KD すると、対照細胞ではみられないミトコンドリア膜電位の低下及びミトコンドリアにおける過酸化脂質産生の増加が観察された。また、iPLA₂ の KD 細胞では、シスプラチン処理により、カルジオリピンの 1 つ、テトラリノレオイルカルジオリピンの過酸化物(TLCL-00H)の生成が増加することも明らかとなった。

ヒト腎近位尿細管由来 HK2 細胞を用いた解析

HK2 細胞において、ACSL4 を KD すると、ドコサヘキサエン酸やアラキドン酸等の高度不飽和脂肪酸含有リン脂質が減少した。しかし、カドミウム、シスプラチン(白金を含む)、亜ヒ酸処理により HK2 細胞の活性酸素産生は上昇したが、これらの重金属に対する感受性に変化はみられなかった。また、プログラム細胞死の各種阻害剤で前処理したところ、カドミウムによる細胞死はいずれの阻害剤の影響もみられなかったが、亜ヒ酸による細胞死は、アポトーシスやフェロトーシスの阻害剤により一部抑えられた。一方、iPLA₂ の KD は本細胞の生存率を著しく低下させることもわかった。

(3)組織特異的毒性を示す化学物質に関する解析：重金属における解析の前に、肺毒性、膀胱毒性、肝毒性を示す化学物質としてよく知られているパラコート、シクロホスファミド、アセトアミノフェンについてトキシコリドミクスを進めた。

パラコートによる肺毒性に関する解析

野生型マウスにパラコートを 25 mg/kg 腹腔投与すると、投与 1 週間後には約 80% のマウスが死に至るが、ACSL4 欠損はこの死亡を有意に抑制した。投与 3 日後で比較すると、ACSL4 欠損マウスでは、野生型マウスでみられる IL-1 や IL-6 といった炎症性サイトカイン、CXCL1 や CXCL2 といったケモカインの発現誘導、肺組織への好中球の浸潤、肺の線維化が抑えられていた。ACSL4 欠損マウスの肺では高度不飽和脂肪酸含有リン脂質が減少しており、パラコートの毒性発現には膜リン脂質の過酸化が大きく寄与すると考えられた。

シクロホスファミドによる膀胱毒性に関する解析

シクロホスファミドによる出血性膀胱炎は、プロスタサイクリン(PGI₂)合成酵素(PGIS)欠損や PGI₂ 受容体遮断薬の前投与により抑制されることがわかった。一方、mPGES-1 欠損はシクロホスファミドによる膀胱炎の発症・進展に影響を及ぼさなかった。PGIS の欠損は膀胱組織における血管透過性亢進ならびに好中球の浸潤を抑制することで、出血性膀胱炎を抑えることも明らかになった。さらに、PGIS の欠損は膀胱炎に伴う侵害受容応答も抑制することがわかった。

アセトアミノフェンによる肝毒性に関する解析

アセトアミノフェン投与により肝臓ではアラキドン酸等の n-6 系高度不飽和脂肪酸の酸化が亢進するが、この際引き起こされる肝障害は、ACSL4 欠損やフェロトーシスの阻害剤フェロスタチン-1 の前投与により有意に抑制された。

(4)精巣や脳に特異的に発現する長鎖アシル CoA 合成酵素 ACSL6 の基質特異性の解析

精巣や脳において高発現し、各組織におけるリン脂質組成の制御を介し、組織特異的毒性発現に関与すると予想される ACSL6 の基質特異性について解析した。その結果、ACSL6 分子種のうち、ACSL6v1 がリノレン酸を良い基質にするのに対し、精巣や脳に高発現する ACSL6v2 はドコサヘキサエン酸を良い基質とすることが見出された。

<引用文献>

- 1) Sasaki Y *et al.*: Microsomal prostaglandin E synthase-1 is involved in multiple steps of colon carcinogenesis. *Oncogene*, 31, 2943-2952 (2012).
- 2) Sasaki Y *et al.*: Genetic-deletion of cyclooxygenase-2 downstream prostacyclin synthase suppresses inflammatory reactions but facilitates carcinogenesis, unlike deletion of microsomal prostaglandin E synthase-1. *Sci. Rep.*, 5, 17376 (2015).
- 3) Sakaue M *et al.*: Involvement of independent mechanism upon poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activation in methylmercury cytotoxicity in rat cerebellar granule cell culture. *J. Neurosci Res.*, 86, 3427-3434 (2008).
- 4) Shimbara-Matsubayashi S *et al.*: Analysis on the substrate specificity of recombinant human acyl-CoA synthetase ACSL4 variants. *Biol. Pharm. Bull.*, 42, 850-855 (2019).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kuwata, H., Tomitsuka, Y., Yoda, E., Hara, S.	4. 巻 42
2. 論文標題 Role of ACSL4 in the chemical-induced cell death in human proximal tubule epithelial HK-2 cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience Reports	6. 最初と最後の頁 BSR20212433
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BSR20212433	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 Kurotaki, A., Kuwata, H., Hara, S.	4. 巻 44
2. 論文標題 Substrate specificity of human long-chain acyl-CoA synthetase ACSL6 variants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1571-1575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b21-00551	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 Ochiai, T., Sasaki, Y., Yokoyama, C., Kuwata, H., Hara, S.	4. 巻 35
2. 論文標題 Absence of prostacyclin greatly relieves cyclophosphamide induced cystitis and bladder pain in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e21952
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202101025R	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 富塚祐希、桑田浩、原俊太郎	4. 巻 81
2. 論文標題 新たな細胞死フェロトーシスの制御因子としての長鎖アシルCoA合成酵素4 (ACSL4)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 昭和学会雑誌	6. 最初と最後の頁 380-386
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Sasaki, Y., Kuwata, H., Aida, E., Ochiai, T., Kamei, D., Nakatani, Y., Hara, S.	4. 巻 41
2. 論文標題 Gene deletion of microsomal prostaglandin E synthase-1 suppresses chemically induced skin carcinogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1307-1314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.14888	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 Kuwata, H., Hara, S.	4. 巻 144
2. 論文標題 Role of acyl-CoA synthetase ACSL4 in arachidonic acid metabolism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Prostaglandins & Other Lipid Mediators	6. 最初と最後の頁 106363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.prostaglandins.2019.106363	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 Kuwata, H., Nakatani, E., Shimbara-Matsubayashi, S., Ishikawa, F., Shibanuma, M., Sasaki, Y., Yoda, E., Nakatani, Y., Hara, S.	4. 巻 1864
2. 論文標題 Long-chain acyl-CoA synthetase 4 participates in the formation of highly unsaturated fatty acid-containing phospholipids in murine macrophages	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids	6. 最初と最後の頁 1606-1618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2019.07.013	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 Yamada, N., Karasawa, T., Kimura, H., Watanabe, S., Komata, T., Komata, R., Sampilvanjil, A., Ito, J., Nakagawa, K., Kuwata, H., Hara, S., Mizuta, K., Sakuma, Y., Sata, N., Takahashi, M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Ferroptosis driven by radical oxidation of n-6 polyunsaturated fatty acids mediates acetaminophen-induced acute liver failure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-020-2334-2	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 -

〔学会発表〕 計24件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 佐々木由香、遠藤勇気、鈴木康友、近藤幸尋、横山知永子、原俊太郎
2. 発表標題 プロスタサイクリン合成酵素の欠損が化学物質による膀胱がんを促進するメカニズムの解明
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富塚祐希、桑田浩、原俊太郎
2. 発表標題 パラコートの肺毒性発現における長鎖アシルCoA合成酵素（ACSL）4の役割の解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富塚祐希、桑田浩、原俊太郎
2. 発表標題 パラコート誘発性肺障害における長鎖アシルCoA合成酵素4の役割の解析
3. 学会等名 フォーラム2021: 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 落合翔、佐々木由香、横山知永子、原俊太郎
2. 発表標題 出血性膀胱炎におけるプロスタサイクリンの機能解析
3. 学会等名 第63回日本脂質生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桑田浩、原俊太郎
2. 発表標題 高度不飽和脂肪酸の活性化の阻害が炎症応答に及ぼす影響
3. 学会等名 第21回Pharmaco-Hematologyシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 依田恵美子、原俊太郎
2. 発表標題 メチル水銀による中枢神経毒性における脂質代謝機構の解明
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 落合翔、佐々木由香、横山知永子、原俊太郎
2. 発表標題 出血性膀胱炎におけるプロスタグランジン最終合成酵素の機能解析
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桑田浩、原俊太郎
2. 発表標題 高度不飽和脂肪酸選択的アシルCoA合成酵素、ASCL4の生体内機能の解析
3. 学会等名 フォーラム2020: 衛生薬学・環境トキシコロジー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 落合翔、吉田七虹、前田芽依、佐々木由香、横山知永子、原俊太郎
2. 発表標題 シクロホスファミド誘導出血性膀胱炎におけるプロスタサイクリン合成酵素の機能解析
3. 学会等名 フォーラム2020: 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 落合翔、佐々木由香、横山知永子、原俊太郎
2. 発表標題 出血性膀胱炎におけるプロスタグランジン最終合成酵素の機能解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoda, E., Hara, S.
2. 発表標題 Effect of methylmercury on membrane phospholipid metabolism
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (ICBL2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kuwata, H., Hara, S.
2. 発表標題 The in vivo roles of long-chain acyl-coenzyme A synthetase 4 in phospholipid remodeling
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (ICBL2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 依田恵美子、向田汐里、原俊太郎
2. 発表標題 メチル水銀による脂質代謝機構への影響
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 落合翔、吉田七虹、前田芽依、佐々木由香、横山知永子、原俊太郎
2. 発表標題 化学物質による炎症へのプロスタグランジン合成酵素の機能解析
3. 学会等名 フォーラム2019: 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桑田浩、落合翔、原俊太郎
2. 発表標題 生体内における長鎖アシルCoA合成酵素4の役割
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hara, S., Kuwata, H.
2. 発表標題 Regulation of inflammatory reactions by acyl-CoA synthetase ACSL4
3. 学会等名 EMBO Workshop on Lipid Function in Health and Disease (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hara, S., Kuwata, H.
2. 発表標題 Participation of long-chain acyl-CoA synthetase ACSL4 in inflammatory reactions
3. 学会等名 16th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 依田恵美子、中山聡子、鈴木康友、近藤幸尋、原俊太郎
2. 発表標題 膀胱癌細胞に対するシスプラチンの抗腫瘍効果増強因子の探索
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------