

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：83901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18902

研究課題名（和文）リチウムの新規毒性を標的とした健康リスク評価

研究課題名（英文）Risk assessment of the Lithium toxicity

研究代表者

近藤 梨沙（井田梨沙）（Kondo-Ida, Lisa）

愛知県がんセンター（研究所）・分子腫瘍学分野・リサーチレジデント

研究者番号：00809436

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：SDGs（持続可能な開発）に掲げられた「安全な飲用水の供給と維持」を達成するため、少しずつ衛生環境が整備されてきたが、いまだに世界で約6億人が安全な飲み水を入手できない環境にある。河川や湖などから直接汲んだ未処理水の中に含まれる有害物質の除去は喫緊の課題であり、煮沸浄化が困難な汚染元素の特定が必要となる。

本研究では、アフガニスタンの首都カブールの飲用井戸水227検体中の元素濃度をICP-MSにより測定し、リチウムが高濃度含有されていることを示した。また、培養細胞を用いたin vitro解析により、リチウムが発癌毒性を有する可能性について検証し、関連するシグナル伝達経路を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発展途上国の飲用水汚染により多様な健康被害が発生している。本研究は、飲用水の元素汚染の現状を把握し、発癌毒性を有する元素の特定を目的としており、独自の元素分析により、飲用水中に高濃度のリチウムが含有されていることを明らかにした。リチウムは日本でも双極性障害の治療に用いられることから、毒性リスクの検証および治療方法の探索は重要な課題である。

研究成果の概要（英文）：Water scarcity and water-borne diseases are serious problems in developing countries. In these countries, despite the health risks associated with consuming unsanitary water, improving the quality of drinking water remains challenging. Our fieldwork study in Afghanistan showed that the level of lithium in well water is higher than other countries. We thus investigated the health risk of lithium. We found that lithium promoted anchorage-independent growth of human immortalized epithelial cells, while did not effect on carcinoma cell. We further detected that lithium treatment upregulate the phosphorylation of c-SRC and MEK/ERK but not AKT. Our results suggested that lithium might be a potential oncogenic risk through promoting transformation of non-tumorigenic cells with preferential activation of the c-SRC/MEK/ERK pathway.

研究分野：分子腫瘍学、環境学

キーワード：リチウム 発癌

1. 研究開始当初の背景

開発途上国における安全な飲用水の確保は、SDGs (持続可能な開発目標) のひとつに取り上げられる非常に重要な問題である。世界で約 6 億 6300 万人が基本的な飲み水の入手ができない状況にあり、そのうち河川や湖などから汲んだ未処理水を飲んでいる人口は 1 億 5000 万人にのぼる。

アフガニстанは世界最貧国のひとつである。浄水施設や水道施設の整備が進んでいないことから、不衛生な水をやむを得ず摂取することとなり、下痢症を原因とした脱水症状により死亡は、乳幼児だけでも年間約 1 万人にのぼると報告されている(UNICEF 2017 年)。これまでの研究から、アフガニстанの飲用井戸水が複合的に元素汚染されていることが確認されており (Kato et al. 2016)、汚染元素の特定は喫緊の課題のひとつであった。

2. 研究の目的

元素による水質汚染は、主に①工業など人間の活動由来、②鉱床などの自然由来のものが考えられる。アフガニстанでは、多くの鉱床が存在している中で、伝統的にカレーズを利用して地下用水を生活用水としてきており、自然由来の元素が高濃度に含まれていると考えられている。元素は、加熱処理による浄化が困難であるため、個々の元素に最適な浄化技術が必要となることから、高濃度に含まれる元素を特定すること、および各元素について人体への毒性を評価することが求められる。これまでに、バリウムや鉄、マンガン、ホウ素などの暴露による健康被害が明らかとなっており、今後さらなる有害元素の特定をおこなうことで、汚染状況の全体像の理解を進め、浄化方法の開発につなげることで水質改善を目指したい。近年、アフガニстанでは大規模なリチウムの鉱床が見出されており、飲用水へのリチウム含有も十分に想定されることから、本研究ではリチウムの含有量の評価後にその毒性の検証に取り組むこととした。

3. 研究の方法

(1) アフガニстан飲用井戸水の元素汚染について現状把握

首都カブールにて採取した飲用井戸水 227 検体について、質量分析装置 ICP-MS により元素濃度を測定。リチウムが高濃度に含まれていることを明らかにした。既報の他地域と比較した。

(2) 培養細胞株を用いて、細胞の機能に対するリチウムの影響を評価

(a) 細胞増殖活性への影響を評価

非腫瘍形成性上皮細胞株 (BEAS-2B 細胞株/HaCaT 細胞株) および腫瘍形成性上皮細胞株 (A549 細胞株/HSC-5 細胞株) を用いて、段階的濃度にてリチウムを処理し、細胞生存率を経時的に測定した。

(b) 細胞の足場非依存的増殖能への影響を評価

メチルセルロース含有培地を用いて細胞を培養し、1,000 μM 以下のリチウムを添加。2 週間後に直径 50 μm 以上のコロニーを計測し、リチウムによる足場非依存増殖能への影響を評価した。

(c) リチウム誘導性足場依存的増殖能促進に関連する細胞内機構の解明

メチルセルロース含有培地にて培養した細胞を回収し、ウェスタンブロット法により生存・増殖シグナルの活性化状態を評価した。

(d) リチウム誘導性足場依存的増殖能促進に対する既存の阻害剤の効果検証

リチウムによる活性上昇がみとめられた SRC および ERK の活性阻害剤をリチウムとともに添加し、メチルセルロース培地におけるコロニー形成への影響を評価した。

4. 研究成果

(1) アフガニスタン飲用井戸水の元素汚染について現状把握

全 227 検体を用いてリチウムの含有量を分析した結果、アフガニスタンでは、既報の都市と比較して最大値で 2.6 から 260 倍、平均値で 20 倍以上のリチウムが含有されていることが明らかとなった（表 1）。高濃度のリチウム含有が、飲用井戸水の摂取による健康被害にどのように関与しているかを明らかにするため、ヒト培養細胞株を用いて以降の実験をおこなった。

	Lithium conc. ($\mu\text{g/L}$)	Lithium conc. mean ($\mu\text{g/L}$)	References
Afghanistan (n = 227)	2.8-3371.1 In well drinking water	233.0	This study
Austria (n = 6460)	3.3-1300 In drinking water	11.3	(Kapusta et al., 2011)
Aomori (n = 40)	0.0-12.9 In tap water	-	(Sugawara et al., 2013)
Denmark (n = 151)	0.6-30.7 In tap water	11.6	(Knudsen et al., 2017)
East of England (n = 47)	1.0-21.0 In tap water	-	(Kabacs et al., 2011)
Greece (n = 149)	0.1-121.0 In drinking water	11.1	(Giotakos et al., 2013)
Oita (n = 18)	0.7-59 In tap water	-	(Ohgami et al., 2009)
Texas (n = 3132)	2.8-219.0 In well drinking water	-	(Blüml et al., 2013)

表 1. これまでに報告された飲用水中のリチウム含有量

(2) 培養細胞株を用いて、細胞の機能に対するリチウムの影響を評価

(a) 細胞増殖活性への影響を評価

がん細胞の特徴である異常増殖能の獲得へのリチウムの関与を調べる目的で、非腫瘍形成性の細胞と腫瘍形成性の細胞を用いて、リチウム添加時の細胞増殖能を測定した。10,000 ~ 50,000 μM の高濃度添加時にはいずれの細胞においても細胞の生存・増殖を抑制しており、強い細胞毒性を示すと考えられた。1,000 μM 以下の濃度については、未処理細胞との差が認められず、濃度依存的な抑制効果は示さなかった。HaCaT 細胞株、HSC-5 細胞株でも同様の結果を得た。

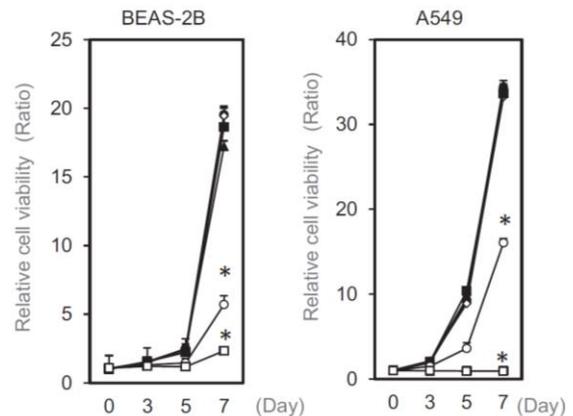


図 1. リチウム添加による細胞生存率へ影響

(b) 細胞の足場非依存的増殖能への影響を評価

細胞生存率への影響がみとめられなかった低濃度（1000 μM 以下）のリチウム添加による足場非依存的増殖能への影響を検討した。足場非依存的増殖は、がん細胞の重要な特性のひとつであり、細胞外基質に接着することなく生存・増殖が可能になり、浸潤・転移能や血管新生誘導能等も亢進されると考えられている。

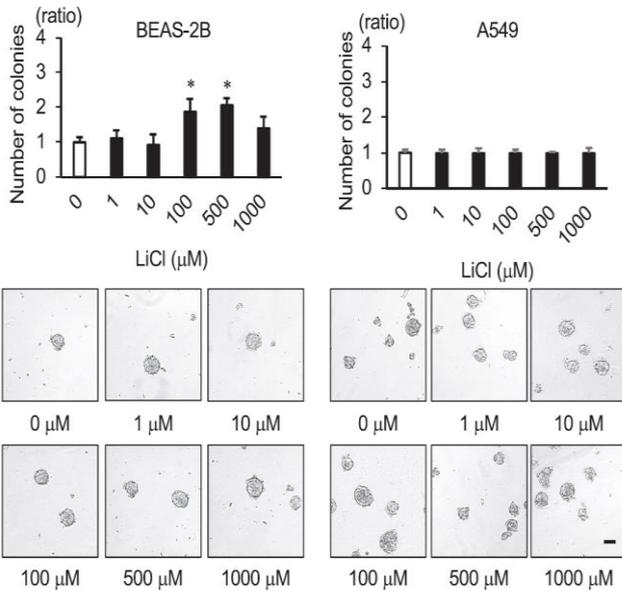


図 2. リチウム添加による足場非依存的増殖能

図 2 に示すように、非腫瘍形成性の BEAS-2B 細胞株において、リチウム添加による足場非依存的増殖能の促進がみとめられた一方で、腫瘍形成性 A549 細胞株では、リチウムによる増殖促進効果は示されなかった。HaCaT 細胞株および HSC-5 細胞株においても同様の結果が得られた。

(c) リチウム誘導性足場依存的増殖能促進に関連する細胞内機構の解明

足場非依存的増殖能の促進が誘導されている細胞内の機序を明らかにするため、生存・増殖に関

連する分子の活性化状態を評価した。HaCaT 細胞株では 100 μM 以上のリチウム添加により c-SRC のリン酸化上昇、500 μM リチウムにより MEK/ERK のリン酸化上昇がそれぞれみとめられた。一方で AKT のリン酸化には影響がみられなかった。また、HSC-5 細胞株においては、いずれの分子のリン酸化もリチウム添加の影響を受けなかった (図 3)。

(d) リチウム誘導性足場依存的増殖能促進に対する既存の阻害剤の効果検証

リチウムによる足場非依存的増殖能の促進 c-SRC および MEK/ERK シグナル経路を介している可能性が示唆されたことから、SRC 阻害剤 PP2 および MEK/ERK 阻害剤 PD98059 を用いたレスキュー実験を検討した。リチウム処理下で上昇した SRC のリン酸化が、PP2 共添加により抑制された条件では、リチウムによる足場非依存的コロニー形成も抑えられていることを明らかにした (図 4)。PD98059 処理においても、同様の結果が得られた。

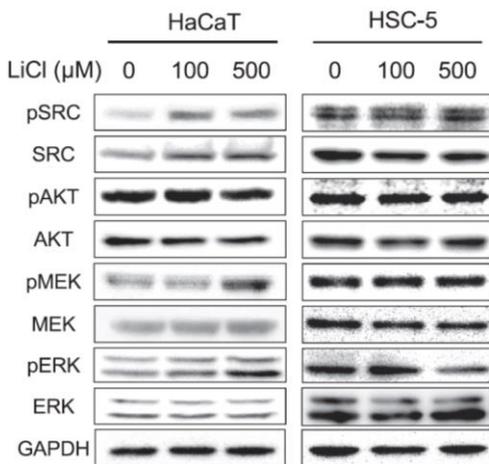


図 3.細胞内シグナル伝達分子への影響

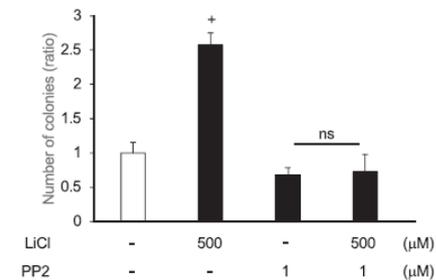
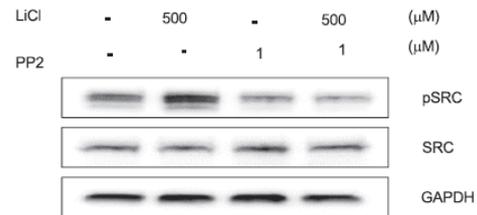


図 4.SRC 阻害剤によるレスキュー効果

以上の結果から、リチウムが SRC および MEK/ERK という代表的な生存・増殖シグナル経路を介して非腫瘍細胞の足場非依存的増殖機能を亢進させる可能性を有することが明らかになった。

本研究では、飲用井戸水による健康被害が発生しているアフガニスタンより試料を採取し、ICP-MS による網羅的な元素分析を実施できたことに大きな意義を見出している。大規模なリチ

ウム鉱床の存在から予想されたように、高濃度のリチウムが飲用水中に含有していることが本研究のデータにより裏付けられた。リチウムの毒性については、これまで明らかになっていなかったが、非腫瘍性の細胞株を用いた足場非依存的増殖能への影響に着目したことにより、発癌誘導性を有する可能性が示唆される結果を得た。さらには、関連するシグナル経路の一端を同定し、阻害剤によるレスキュー効果をも確認できた。今後、開発途上国の飲用水中リチウムの浄化方法の開発が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Khaledian B, Taguchi A, Shin-Ya K, Kondo-Ida L, Kagaya N, Suzuki M, Kajino T, Yamaguchi T, Shimada Y.	4. 巻 112(3)
2. 論文標題 Inhibition of heat shock protein 90 destabilizes receptor tyrosine kinase ROR1 in lung adenocarcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1225-1234
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14786	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 Makoto Sudo, Kazunori Hashimoto, Masafumi Yoshinaga, Mohammad Daud Azimi, Said Hafizullah Fayaz, Nobuyuki Hamajima, Lisa Kondo-Ida, Kiyoshi Yanagisawa, Masashi Kato	4. 巻 744
2. 論文標題 Lithium promotes malignant transformation of nontumorigenic cells in vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science of the Total Environment	6. 最初と最後の頁 140830-140830
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scitotenv.2020.140830	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 Kato M, Ohgami N, Ohnuma S, Hashimoto K, Tazaki A, Xu H, Kondo-Ida L, Yuan T, Tsuchiyama T, He T, Kurniasari F, Gu Y, Chen W, Deng Y, Komuro K, Tong K, Yajima I.	4. 巻 25(1)
2. 論文標題 Multidisciplinary approach to assess the toxicities of arsenic and barium in drinking water.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental Health and Preventive Medicine	6. 最初と最後の頁 16-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12199-020-00855-8.	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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Lisa I. Kondo, Kiyoshi Yanagisawa
2. 発表標題 Proteomic identification of potential biomarkers of malignant pleural mesothelioma
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mari Inuma, Lisa I. Kondo, Kiyoshi Yanagisawa
2. 発表標題 Exploration of novel molecular function of SMAD4 in colorectal cancer
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akihide Nishimae, Lisa I. Kondo, Kiyoshi Yanagisawa
2. 発表標題 Exploration of functional significance of TTF-1 in drug resistance in lung adenocarcinoma
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuya Ogimoto, Lisa I. Kondo, Kiyoshi Yanagisawa
2. 発表標題 Functional analyses of IKAROS isoform 6 (IK6) generating knockout cells of B-cell acute lymphoblastic leukemia
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mari Inuma, Lisa Kondo-Ida, Kiyoshi Yanagisawa
2. 発表標題 Exploration of novel molecular function of SMAD4 in colorectal cancer
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術学会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuya Ogimoto, Lisa Kondo-Ida, Kiyoshi Yanagisawa
2. 発表標題 Functional analyses of IK6 generating knockout cells of B-cell acute lymphoblastic leukemia
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荻本祐也、近藤梨沙、柳澤 聖
2. 発表標題 ヒトB細胞急性リンパ芽球性白血病細胞株におけるIkarosアイソフォーム6 (IK6) のノックアウトモデルによるIK6の役割の解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
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
---------------------------	-----------------------	----

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