

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26740025

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュを用いたアクリルアミドの毒性における小胞体ストレス応答の研究

研究課題名(英文) Study on ER stress response involved in toxicity of acrylamide by using zebrafish

研究代表者

蔣池 勇太 (Komoike, Yuta)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：70386556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、身近な有害化学物質であるアクリルアミドの毒性、特に神経毒性の発現機序の解明を目的に本研究を行った。まず、ヒト神経芽腫細胞をアクリルアミドに曝露すると、活性酸素種(ROS)が蓄積し、そのROSにより、数々の神経変性疾患への関与が知られている小胞体ストレス応答が起こり、アポトーシスを含む細胞死が誘導されることを明らかにした。続いて、ゼブラフィッシュ幼生をアクリルアミドに曝露すると、脳で小胞体ストレス応答依存的アポトーシス因子を発現する細胞が出現すること、アポトーシス細胞死が起こり、脳の構造が劇的に崩壊することを明らかにした。以上の研究成果は原著論文1報と4度の国内学会にて発表した。

研究成果の概要(英文)：Acrylamide has recently been recognized as an immediate hazardous chemical worldwide. In this study, this applicant focused on the toxicity of acrylamide, especially on the mechanisms underlying expression of acrylamide-induced neurotoxicity. The applicant revealed that exposure of human neuroblastoma cells to acrylamide increases accumulation of reactive oxygen species (ROS) and these ROS evoke endoplasmic reticulum (ER) stress response followed by cell death including apoptosis. The applicant also showed that exposure of zebrafish larvae to acrylamide induces expression of the gene encoding ER stress response-dependent proapoptotic factor in the brain, apoptotic death of the brain cells, and dramatic disruption of the brain structure. These findings were reported in an original article and domestic conferences four times.

研究分野：環境毒性学

キーワード：ゼブラフィッシュ 環境毒性学 小胞体ストレス応答 アクリルアミド

## 1. 研究開始当初の背景

環境中に放出される有害化学物質による健康影響が、国際的な環境意識の高まりと共に広く認知されるようになり、有害化学物質が人体や生物に与える影響の評価法および生命科学的手法による対処法が重要視されるようになった。申請者の所属する東京女子医科大学医学部衛生学公衆衛生学(一)講座では、環境毒性学の立場から、さまざまな有害化学物質が生体に与える影響と、その毒性発現機序の解明を目指している。これらのうち、申請者は特に「小胞体ストレス応答」に注目し、ゼブラフィッシュを用いた小胞体ストレス応答解析モデルの構築とその環境毒性学への展開を目的とした研究を、平成 23 年度より、科学研究費助成金 若手研究(B)による助成を受け開始した。小胞体は、小胞体ストレス応答と呼ばれる一連の生体反応により、環境ストレスを感知し対処するための装置としても機能すると考えられているが、環境毒性学の立場から小胞体および小胞体ストレス応答に着目した研究は、平成 23 年の先行研究開始当初には極めて少なかった(いまだに少ない)。また、僅かながら報告されていた研究のほとんどは培養細胞を用いたものであり、モデル動物を用いた個体レベルでの小胞体ストレス応答に関する環境毒性学的研究は、本研究の開始当初においても、申請者らによる上述の先行研究の成果である、トリブチルスズの毒性に小胞体ストレス応答が関与することを明らかにした報告(Komoiike and Matsuoka, 2013)のみであった。このような状況に鑑み、申請者は、環境毒性学の立場から、ゼブラフィッシュをモデル動物として用いる小胞体ストレス応答の研究を継続し、さらに深化させることが重要であると考えた。そこで、申請者は本課題において、有害化学物質として「アクリルアミド」に注目し、研究を進めることにした。アクリルアミドモノマー(以下アクリルアミド)は、さまざまな製品の原料や土壌改良剤などとして広く用いられている一方、神経毒性、肝毒性、変異原性が古くから知られている。本国においては「毒物及び劇物取締法」上の劇物に指定されているほか、国際的にも多くの国で使用に関する法規、勧告などによる制限が行われている。アクリルアミドへの曝露が環境的、産業的に起こりうることは一部では知られていたが、イモ類などの炭水化物を多く含む食材を高温で調理することによりアクリルアミドが生成される、という驚くべき報告を契機に、「日常生活の中でも曝露される身近な有害化学物質」として啓蒙され、一般に認知され始めるようになっていた。しかし、アクリルアミドの毒性発現機序については、その化学的性質に基づいた推定や現象論的記述はなされていたものの、分子細胞生物学的な詳細については明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

申請者の研究の目的は、ゼブラフィッシュをモデル動物として用いて、環境毒性学の立場から、アクリルアミドの毒性発現機序における個体レベルでの小胞体ストレス応答の役割を明らかにすることであり、3 年間の本研究の期間内には、特に以下の 3 つの項目について明らかにすることを目的とした。

- (1) ゼブラフィッシュ個体でアクリルアミド曝露により小胞体ストレス応答が惹起されるか?:ゼブラフィッシュ個体において、小胞体ストレス応答の PERK-EIF2A 経路、IRE1-XBP1 経路、ATF6 経路のそれぞれが、アクリルアミド曝露により活性化されるか、その活性化に器官特異性があるかを明らかにする。この際に曝露条件(開始時期、継続時間、濃度)の検討を行い、至適条件を決定する。また、小胞体ストレス応答のアウトプットとして、小胞体シャペロンおよびアポトーシス誘導因子の発現亢進がみられるかを明らかにする。
- (2) ゼブラフィッシュ個体でアクリルアミド曝露によりどのような異常が生じるか?:上記の至適曝露条件下において、ゼブラフィッシュ個体に生じる異常を、形態、器官、細胞の各レベルで、特に、(1)で小胞体ストレス応答が検出された器官に注目して明らかにする。
- (3) アクリルアミドの毒性発現機序における小胞体ストレス応答の役割はなにか?:小胞体ストレス応答において、アウトプットとなる遺伝子の発現を制御する働きを担っている ATF4 および XBP1 の役割について遺伝学的手法を用いて解析する。形態、器官、細胞の各レベルでそれらの役割を検討し、アクリルアミドの毒性発現機序における小胞体ストレス応答の役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

前述のように、本研究では、アクリルアミドの毒性発現機序における小胞体ストレス応答の役割を、ゼブラフィッシュを用いて解明するという目的で、特に 3 つの項目に集中して解析を進めた。各項目における研究の方法は以下のように計画した。まず、「ゼブラフィッシュ個体でアクリルアミド曝露により小胞体ストレス応答が惹起されるか?」については、アクリルアミド曝露による小胞体ストレス応答の各経路の活性化、小胞体シャペロンおよびアポトーシス誘導因子の発現を、免疫染色法により解析することとした。次に「ゼブラフィッシュ個体でアクリルアミド曝露によりどのような異常が生じるか?」については、アクリルアミド曝露により生じる異常を、形態観察および切片標本に対する各種染色を用いて、形態、器官、細胞の各レベルで解析することとした。最後に「アクリルアミド曝露によりどのような異常が生じるか?」については、アクリルアミド曝露により生じる異常を、形態観察および切片標本に対する各種染色を用いて、形態、器官、細胞の各レベルで解析することとした。最後に「アクリルアミド曝露によりどのような異常が生じるか?」については、アクリルアミド曝露により生じる異常を、形態観察および切片標本に対する各種染色を用いて、形態、器官、細胞の各レベルで解析することとした。

ルアミドの毒性発現機序における小胞体ストレス応答の役割はなにか?」については、ATF4 および XBP1 のノックアウトゼブラフィッシュを作成し、アクリルアミド曝露により生じる異常が、野生型と比較して軽減あるいは亢進するかを、形態、器官、細胞の各レベルで解析することとした。また、これらの研究を効率的に進めるために、培養細胞と生化学的手法を用いた予備的実験を先行させて行うこととした。

#### 4. 研究成果

本研究を効率的に進めるために、まず培養細胞を用いて、アクリルアミドの曝露により小胞体ストレス応答が惹起されるかについて検証するための予備的実験を実施した。アクリルアミドの毒性としては、神経毒性が最もよく知られていることから、ヒト神経芽腫細胞株 SH-SY5Y 細胞を用いた。この予備的実験に、当初の予想を大きく上回る進展が見られたため、十分な成果を得るまで発展的に継続した。アクリルアミドに SH-SY5Y 細胞を曝露すると、活性酸素種 (ROS) の蓄積が亢進し、その ROS により小胞体ストレス応答経路のうち PARK-eIF2 経路が活性化された。一方、IRE1-XBP1 経路の活性化は見られなかった。また、PARK-eIF2 経路の下流因子である小胞体ストレス応答依存的アポトーシス因子 CHOP の著しい発現亢進が観察されたが、細胞保護的に働く小胞体シャペロンの発現亢進は検出されなかった。さらに、ROS の蓄積とそれに続く小胞体ストレス応答を介して、アポトーシスを含む細胞死が誘導されることが明らかになった。

次に、ゼブラフィッシュ幼生を用いた解析を行った。まず、生存限界に近い濃度と継続時間の条件下でアクリルアミドに曝露したゼブラフィッシュ幼生でのアポトーシスを観察したところ、嗅神経、脳などの神経系の器官に顕著で、それらの他には鰓や鰭などの限られた、毒物特異性が低いとされる器官のみでしかアポトーシス細胞は観察されなかった。このことと、上記の SH-SY5Y 細胞を用いた実験の結果を勘案し、ゼブラフィッシュにおいてもアクリルアミドの神経毒性に注目することとした。また、当初の計画に含まれていた PARK-eIF2 経路以外の小胞体ストレス応答経路、および小胞体シャペロンに関する解析は除外することとした。脳の基本的構造が完成している受精後 6 日目のゼブラフィッシュ幼生をアクリルアミドに曝露し、中枢神経系組織の染色、アポトーシス細胞の検出、PARK-eIF2 経路下流で働く小胞体ストレス依存的アポトーシス因子 chop の発現解析を行った。その結果、アクリルアミド曝露により、ゼブラフィッシュ幼生の脳において chop を発現する細胞が出現すること、アポトーシス細胞死が起こり、脳の構造が劇的に崩壊することが明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

- (1) 化学物質の毒性発現機構 最近のシグナル伝達研究からー 松岡雅人、蔭池 勇太、藤木恒太、宮山貴光 産業医学ジャーナル (査読無) 40, 61-65, 2017
- (2) ゼブラフィッシュモデルの環境毒性学研究における有用性 蔭池 勇太、松岡雅人 日本衛生学雑誌 (査読有) 71, 227-235, 2016. DOI: 10.1265/jjh.71.227
- (3) Endoplasmic reticulum stress-mediated neuronal apoptosis by acrylamide exposure. KOMOIKE, Y., MATSUOKA, M. Toxicol. Appl. Pharmacol. (査読有) 310, 68-77, 2016. DOI: 10.1016/j.taap.2016.09.005
- (4) DNA damage response in proliferating Müller glia in the mammalian retina. NOMURA-KOMOIKE, K., SAITOH, F., KOMOIKE, Y., FUJIEDA, H. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. (査読有) 57, 1169-1182, 2016. DOI: 10.1167/iovs.15-18101
- (5) Single nucleotide variations in CLCN6 identified in patients with benign partial epilepsies in infancy and/or febrile seizures. YAMAMOTO, T., SHIMOJIMA, K., SANGU, N., KOMOIKE, Y., ISHII, A., ABE, S., YAMASHITA, S., IMAI, K., KUBOTA, T., FUKASAWA, T., OKANISHI, T., ENOKI, H., TANABE, T., SAITO, A., FURUKAWA, T., SHIMIZU, T., MILLIGAN, C.J., PETROU, S., HERON, S.E., DIBBENS, L.M., HIROSE, S., OKUMURA, A. PLoS One (査読有) 10, e0118946, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0118946.
- (6) Experimental evidence shows salubrinal, an eIF2 dephosphorylation inhibitor, reduces xenotoxicant-induced cellular damage. MATSUOKA, M., KOMOIKE, Y. Int. J. Mol. Sci. (査読有) 16, 16275-16287, 2015. DOI: 10.3390/ijms160716275

[学会発表](計 10 件)

- (1) アクリルアミドの神経毒性に関する解析: 小胞体ストレス応答の関与 蔭池 勇太、松岡雅人 平成 29 年 3 月 28 日 第 87 回日本衛生学会学術総会 シーガイアコンベンションセンター (宮崎県宮崎市)
- (2) Cell cycle reentry and DNA damage response of Müller glia after retinal injury. KOMOIKE, K., SAITOH, F., KOMOIKE Y., FUJIEDA H. 平成 28 年 9 月 26 日 22nd Biennial Meeting of the International Society for Eye Research 京王プラザホテル (東京都新宿区)

- (3) ヒト神経芽細胞株とゼブラフィッシュを用いたアクリルアミドの神経毒性に関する解析 **蔣池 勇太**、松岡雅人 平成 28 年 5 月 13 日 第 86 回日本衛生学会学術総会 旭川市民文化会館 (北海道旭川市)
- (4) Single nucleotide variation in CLCN6 identified in patients with benign partial epilepsies in infancy and/or febrile seizures. YAMAMOTO, T., SHIMOJIMA, K., **KOMOIKE, Y.**, ISHII, A., ABE, S., YAMASHITA, S., IMAI, K., KUBOTA, T., FUKASAWA, T., OKANISHI, T., ENOKI, H., TANABE, T., SAITO, A., FURUKAWA, T., SHIMIZU, T., MILLIGAN, C.J., PETROU, S., HERON, S.E., DIBBENS, L.M., HIROSE, S., OKUMURA, A. 平成 28 年 4 月 3 日 The 13th International Congress of Human Genetics 京都国際会議場 (京都府京都市)
- (5) 網膜の変性による Müller グリアの細胞周期進入と DNA 損傷応答 **蔣池 勇太**、齋藤文典、**蔣池 勇太**、藤枝弘樹 平成 27 年 8 月 19 日 第 19 回 視覚科学フォーラム ホテル福島グリーンパレス (福島県福島市)
- (6) 女子中高生の医療系理系進路選択を支援する取り組み「未来の医療を支えるのはあなた II」における ICT の活用 岡田みどり、中村裕子、佐藤梓、岡谷理恵子、酒向加菜子、福井由理子、浦瀬香子、木下順二、松本みどり、山口俊夫、辻野賢治、八木淳二、加藤秀人、松岡雅人、**蔣池 勇太**、高桑雄一、越野一朗、柴田亮行、加藤陽一郎 平成 27 年 3 月 26 日 日本薬学会第 135 年会 神戸サンボホール (兵庫県神戸市)
- (7) アクリルアミドの神経細胞毒性における小胞体ストレス応答の関与 **蔣池 勇太**、松岡雅人 平成 27 年 3 月 27 日 第 85 回日本衛生学会学術総会 和歌山県民文化会館 (和歌山県和歌山市)
- (8) Tributyltin induces endoplasmic reticulum stress in experimental model teleost, zebrafish. **KOMOIKE, Y.** 平成 26 年 10 月 18 日 BIT's 3rd annual world congress of ocean/aquaculture and fisheries-2014 大連 (中国)
- (9) メチマゾールの催奇性のゼブラフィッシュを用いた検討 **蔣池 勇太** 平成 26 年 7 月 27 日 第 54 回日本先天異常学会学術集会 麻布大学 (神奈川県相模原市)
- (10) アクリルアミドの神経毒性における小胞体ストレス応答の関与 **蔣池 勇太**、松岡雅人 平成 26 年 5 月 26 日 第 84 回日本衛生学会学術総会 岡山コンベンションセンター (岡山県岡山市)

〔その他〕

講演

- (1) 衛生学～生をまもる科学～ **蔣池 勇太**  
平成 26 年 9 月 12 日 スーパーサイエンス  
ハイスクール 東海大学付属高輪台高校

(東京都港区)

ホームページ

- (1) 衛生学公衆衛生学(一)大学ホームページ  
<http://www.twmu.ac.jp/univ/medical/subject/detail.php?id=01011>
- (2) 衛生学公衆衛生学(一)教室ホームページ  
<http://www.twmu.ac.jp/Basic/hygiene1/index.html>
- (3) 業績データベース  
<http://gyoseki.twmu.ac.jp/twmhp/KgApp?kyoinId=ymdigbgggk>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

蔣池 勇太 (KOMOIKE, Yuta)  
東京女子医科大学・医学部・講師  
研究者番号：70386556

(2) 研究協力者

松村 賢一 (MATSUMURA, Kenichi)  
東京女子医科大学・医学部・実験補助員