

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：15201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12352

研究課題名(和文) ミクロシスチンによる新規臓器機能障害メカニズムの解明 胆汁酸代謝に焦点を当てて

研究課題名(英文) Novel mechanism analysis of microcystin on organ dysfunction-focusing on bile acid metabolism-

研究代表者

清水 英寿 (Shimizu, Hidehisa)

島根大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：10547532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：湖沼の富栄養化によって発生するアオコは、ミクロシスチンと呼ばれる毒素を産生する。本研究では、培養肝細胞のHepG2細胞で、Microcystin-LR (MC-LR) の処理濃度の違いによるAMPKの活性化の有無で、細胞死に対して異なる作用が存在する事が示された。また、培養腸管細胞のCaco-2細胞では、p38とJNKの活性化を介した細胞増殖や、原がん遺伝子の発現誘導が観察された。ラットを用いた解析では、ミクロシスチン投与による影響は、摂食量、体重、各種臓器重量(肝臓・腎臓・脂肪)で見られなかった。今後、各種臓器の遺伝子発現量、血中パラメーター、肝脂質、胆汁酸、腸内細菌叢の解析なども行っていく。

研究成果の概要(英文)：Eutrophication of lake and reservoir accelerates development of Microcystis which produces a toxin, called microcystin. The present study shows that in a cultured hepatocyte cell line, HepG2 cells, AMPK was time- and dose-dependently activated by microcystin-LR (MC-LR) stimulation. When AMPK was not activated in MC-LR-treated HepG2 cells, cell death was induced. However, when MC-LR activated AMPK, cell death was inhibited. In a cultured intestinal cell line, Caco-2 cells, MC-LR led to cell proliferation through p38 and JNK activation although ERK activation was not participate. Furthermore, the expression levels of oncogene was upregulated in MC-LR-treated Caco-2 cells. In rat analysis, food intake, body weight, and weight of liver, kidney, and adipose tissue were not difference between control and MC-LR-administrated rats. We will continue to check for serum parameter (ALT/AST, TG, and TC etc), liver TG and TC, and gut microbiota, etc.

研究分野：病態生理学・分子栄養学

キーワード：ミクロシスチン 藍藻類由来毒素 アオコ 健康リスク評価 消化管 飲料水 淡水魚介類 湖沼

## 1. 研究開始当初の背景

昨今、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、ミクロシスチンの濃度上昇が報告されている。特に最近、アメリカのエリー湖由来の水道水にミクロシスチンが混入し、周辺住民の多くがミ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。加えて近年、発展途上国における淡水魚介類の養殖場においても、ミ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、台湾、中国、タイ等では既に重要なタンパク源として食されているティラピアに、ミ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いる事から、将来、我が国に輸入される可能性もある。よって、飲料水からだけでなく、体内にミクロシスチンが蓄積された魚介類を食す事で、ミクロシスチンを人体に取り込む事があり得ると指摘されている。

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。そのため、「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。そこで本申請では、「食の安全性」の視点からの報告が非常に少ない「ミクロシスチン」と呼ばれる藍藻類(藍色細菌)由来毒素に着目している。

## 2. 研究の目的

これまでにミクロシスチンは、肝機能障害や大腸ガンの進展に關与しているとの報告があるが、作用メカニズムの詳細は不明な点が多岐に多い。また、これまで多くのグループから報告されている濃度は、非常に高濃度である。そこで本研究では、ミクロシスチンの低濃度慢性暴露を念頭に置き、培養肝細胞や培養腸管細胞、そしてラット個体を用いて、報告されている濃度よりも遥かに低い濃度でのミクロシスチン-LR の効果とその作用メカニズムについて解析を行う事を目的とした。

## 3. 研究の方法

### < 肝細胞における解析 >

ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞を用いた。HepG2 細胞を播種後、24 時間スタベーションを行った後、ミクロシスチン-LR で細胞を刺激した。ミクロシスチン-LR が細胞に与える影響として、生存率を指標とした。また、ウェスタンブロット法を用いて、細胞の生死に關わる細胞内分子のリン酸化の変化について検証を行った。

### < 腸管細胞における解析 >

ヒト腸管由来細胞株 Caco-2 細胞を用いた。Caco-2 細胞を播種後、24 時間スタベーションを行った後、ミクロシスチン-LR で細胞を刺激した。ミクロシスチン-LR が細胞に与える影響として、細胞増殖を調べた。また、細胞増殖に大きく關与する Mitogen-activated protein kinase (MAPK) ファミリーの Extracellular signal-regulated kinase (ERK)、p38、c-jun N-terminal kinase (JNK) の活性化について、それぞれウェスタンブロット法にて調べた。さらに、原がん遺伝子の発現量も同様の方法を用いて測定する事で、ミクロシスチン-LR による細胞増殖の亢進への關与についても検証を行った。

### < ラットを用いた解析 >

AIN93G を基本食として、ラットにミクロシスチン-LR 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、肝臓、腎臓、副睾丸脂肪を採取するのと合わせ、各種臓器重量を測った。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、腎皮質、腸管粘膜の一部を液体窒素で直ちに凍結させ、保存した。盲腸内容物に關しては、有機酸分析および腸内細菌叢の測定のため、必要量を確保した後、それぞれ液体窒素で凍結させ、保存した。

## 4. 研究成果

### < 培養肝細胞での解析結果 >

ミクロシスチン-LR を 72 時間、培養肝細胞に処理したところ、報告されているような濃度よりも遥かに低い濃度であっても、ある一定濃度までは、細胞死が濃度依存的に引き起こされた。しかし、ある一定濃度以上になると逆に、濃度依存的に生存率が回復した。この濃度も、報告されている濃度よりも遥かに低い濃度であった。そこで、細胞死の回復を導いた濃度を用いて、AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性化について確認したところ、時間依存的に AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性化が観察された。また、その活性化は持続的であり、少なくとも刺激 48 時間後まで活性化されていた。さらに、AMPK の活性化は濃度依存的でもあり、その活性化レベルの上昇は、生存率の回復とも關連していた。そこで、AMPK 阻害剤を用いて、ミクロシスチン-LR による生存率について検証を行ったところ、AMPK 阻害剤によって、ある濃度で観察されたミクロシスチン-LR による生存率の回復は抑制された。よって、ミクロシスチン-LR は、ある一定の濃度異常になると、AMPK の活性化を介して細胞死の誘導を抑制している事が明らかとなった。

以上から、培養肝細胞に対してミクロシス

チン-LR は、濃度の違いによって、細胞に与える影響とその作用メカニズムとが異なる事が確認された。現在、ミクロシスチン-LR による AMPK の活性化を介して、培養肝細胞でオートファジーが引き起こされているのではないかと考え、引き続き解析を行っているところである。

#### < 培養腸管細胞での解析結果 >

ミクロシスチン-LR を 72 時間、報告されているような濃度よりも遥かに低い濃度で培養腸管細胞に処理したところ、濃度依存的に細胞増殖が観察された。次に、細胞増殖への関与が報告されている MAPK ファミリーの ERK、p38、JNK の活性化について調べたところ、全ての MAPK が活性化されていた。そこで、各種 MAPK の阻害剤を用いてミクロシスチン-LR 依存的な細胞増殖に関与する MAPK について確かめたところ、p38 と JNK が関わっていた。したがって、たとえ報告されている濃度よりも遥かに低い濃度であっても、ミクロシスチン-LR は p38 と JNK の活性化を介して細胞増殖を導く事が明らかとなった。

また本研究では、他の報告で使用されている濃度よりも遥かに低く、かつ我が国で規定されている上限の水道水含有濃度で腸管細胞にミクロシスチン-LR 処理を行った。その結果、原がん遺伝子の時間依存的な発現上昇が確認された。さらに、このミクロシスチン-LR による原がん遺伝子の発現上昇は、濃度依存性も有していた。血漿・血清の主成分の 1 つである Lysophosphatidic acid (LPA) や二次胆汁酸の 1 つである Deoxycholic acid (DCA) は、ミクロシスチン-LR 依存的に発現上昇される原がん遺伝子を活性化する事が知られているため、ミクロシスチン-LR による細胞増殖の促進は、この原がん遺伝子の発現増加を介した活性化が関与している可能性が高い。

以上から、他の報告よりも遥かに低い濃度のミクロシスチン-LR 処理によっても、p38 と JNK の活性化を介して、大腸がんの進行に寄与する事が示唆された。さらに、ミクロシスチン-LR 単独の直接的な作用だけでなく、LPA や DCA と協調的に働き、原がん遺伝子の発現増加と活性化を亢進させる事により、大腸がんの進行促進に関わる可能性が明らかとなった。また、この原がん遺伝子は、DCA による活性化を介して、腸透過性の上昇を導く事から、ミクロシスチン-LR は、腸透過性の亢進にも関与している可能性が示された。

#### < ラットでの解析結果 >

ミクロシスチン-LR を 7 週間投与したラットの摂食量と体重は、コントロール群と比較して変化はなかった。また、肝臓、腎臓、副腎丸脂肪の各種臓器重量についても、コントロール群とミクロシスチン-LR 投与群の間に違いは観察されなかった。現在、胆汁酸代謝

や血中及び各種臓器のパラメーターだけでなく、腸内細菌叢、遺伝子の発現変化を含めた各種臓器に対してミクロシスチン-LR が与えている影響について解析を進めているところである。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

河原秀明, 蔵田航一, 清水英寿. 大腸がん細胞増殖に対するミクロシスチン-LR の作用経路の同定. 日本農芸化学会中四国支部第 47 回講演会(例会). 2017 年 1 月 28 日. 於, 島根大学(松江市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
清水 英寿 (SHIMIZU HIDEHISA)  
島根大学・生物資源科学部・准教授  
研究者番号: 10547532

(2) 研究分担者  
清水 和哉 (SHIMIZU KAZUYA)  
筑波大学・生命環境系・准教授  
研究者番号: 10581613

岡野 邦宏 (OKANO KUNIHIRO)  
秋田県立大学・生物資源科学部・助教  
研究者番号：30455927

(3)連携研究者

杉浦 則夫 (SUGIURA NORIO)  
筑波大学・生命環境系・名誉教授  
研究者番号：10302374

宮崎 均 (MIYAZAKI HITOSHI)  
筑波大学・生命環境系・教授  
研究者番号：40183636

石塚 敏 (ISHIZUKA SATOSHI)  
北海道大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号：00271627

吹谷 智 (FUKITANI SATORU)  
北海道大学・大学院農学研究院・講師  
研究者番号：10370157

(4)研究協力者

なし