

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：35302

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24389

研究課題名(和文) 化学物質により誘発される脂肪変性の毒性パスウェイ解析

研究課題名(英文) Toxicity pathway analysis of fatty degeneration of liver induced by chemicals

研究代表者

齋藤 文代 (Saito, Fumiyo)

岡山理科大学・獣医学部・准教授

研究者番号：80800672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では肝脂肪変性の細胞内イベントを遺伝子発現から組織変化までを統合的に解析した。四塩化炭素(CCl<sub>4</sub>)とエチオニン(ET)をラットに最大28日間投与した結果、肝白色化やALP、 $\gamma$ -GT、T-BilおよびTBAの有意な増加は共通だったものの、AST、ALT、LDHの有意な増加はCCl<sub>4</sub>のみ、T-Colの減少はETのみだった。遺伝子発現解析では、UPS系及びERストレス関連の低下はET群で有意で、酸化リン酸化の異常はCCl<sub>4</sub>群で有意だった。脂肪酸の酸化や輸送異常は共通性が高かったことから、イニシエーション反応には差があるものの、脂肪蓄積の細胞イベントには共通性が高いことが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、毒性症状としては同じ脂肪変性を示す化合物であっても、その分子メカニズムや肝臓に与える毒性影響には時間的なものを含めてそこに至るまでの細胞内イベントが異なることが分かった。しかし、その結果として脂肪変性が生じると、その表現型に關与する遺伝子群には共通性が高かったことから、毒性としては“収束”していくことが分かった。本研究成果は毒性症状の段階的な進行に關して分子レベルでのメカニズムを考察できる非常に有用なもので、複雑な毒性症状を理解し、より早期の検出法開発への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed intracellular events of hepatic fatty degeneration in an integrated manner from gene expression to tissue changes. After up to 28 days of administration of carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) and ethionine (ET) to rats, liver whitening and significant increases in ALP,  $\gamma$ -GT, T-Bil and TBA were common to both substances. However, the significant increase in AST, ALT, and LDH was only in the CCl<sub>4</sub> group, and the decrease in T-Col was only in the ET group. In gene expression analysis, UPS and ER stress-related reductions were significant in the ET group, and abnormal oxidative phosphorylation was significant in the CCl<sub>4</sub> group.

Since  $\beta$ -oxidation and transport abnormalities of fatty acids were highly common to both substances, it was found that although there are differences in initiation reactions, there is high commonality in cellular events of fat accumulation.

研究分野：毒性学

キーワード：肝毒性 脂肪変性 オミクス解析 毒性パスウェイ AOP

## 1. 研究開始当初の背景

化学物質の毒性評価は、化学物質の安全利用のために必要不可欠である。従来は、実験動物の病理組織学的検査などで有害性評価を行ってきたが、データの評価・解釈は毒性学者の経験に拠る面が大きく、不確実性を伴うという課題を抱えてきた。化学物質暴露により最も影響を受けるのは肝臓である。例えば、代表的な肝毒性物質の四塩化炭素は生体内でラジカルを発生させ、脂肪変性を生じる。脂肪変性は肝炎を経て肝硬変や肝がんに至る可能性が高い重要な毒性症状の一つであるが、そこに至るまでのメカニズムは不明である。四塩化炭素を含め多くの化学物質の毒性は、「入口」と「出口」の知見は多く蓄積されているものの、その間のメカニズムはブラックボックスのままである。このように、シーケンシャルな毒性メカニズムの解明は毒性学上の推進すべき重要課題の一つである。総合的な毒性メカニズムの理解には、従来法の毒性学的知見とオミクスなどの分子レベルのデータを関連付けた総合的な毒性パスウェイ解析が必要である。OECD（経済協力開発機構）は、有害事象発現（Adverse Outcome Pathway: AOP）の概念に基づいた化学物質管理を提唱している。OECD は試験に用いる毒性指標の意義を AOP により明確にすることを求めており、世界的にもシーケンシャルな毒性メカニズムの解明がますます重要になってきている。

「なぜ化学物質暴露により、その遺伝子が変動したのか」、「その下流でどのような細胞イベントが生じた結果、毒性が現れたのか」、これらの学術的「問い」を研究課題の核心に据え、これまで知見が乏しかった化学物質投与による生体内でのタンパク質の機能的変化や細胞内局在の変化を捉えることが重要だと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、肝脂肪変性の細胞内イベントにかかわるタンパク質の機能的変化や細胞内局在を調べ、遺伝子、タンパク質、細胞、組織の各階層のデータを統合的に解析し、シーケンシャルな毒性メカニズムを解明することである。

個別の遺伝子発現量の変化だけでなく、タンパク質の機能的変化を含む細胞内イベントに着目し、その変化を多層的に捉えた毒性学研究は他にない。また、化学物質による脂肪変性について、申請者独自のユビキチン-プロテアソーム系に着目した毒性パスウェイの仮説に基づく研究はない。これら 2 点が本研究の独自性である。期待される成果が得られれば、化学物質による肝脂肪変性の発現メカニズム解明の発端となり、停滞している毒性メカニズム研究に新潮流を生み出す創造性を有する。

## 3. 研究の方法

同一の毒性症状を示すにも関わらず、途中の細胞内イベントにどのような共通性もしくは相違点があるのかを調べるために、肝脂肪変性のモデル化合物として四塩化炭素とエチオニンをラットに投与し、肝臓の遺伝子発現量データを元に詳細な毒性パスウェイの仮説を構築した後、シーケンシャルな毒性メカニズムを解明した。

### 項目① 脂肪変性に関連した標的分子の絞り込み

化学物質暴露後の肝ゲノミクスデータには TGP（トキコゲノミクスプロジェクト）の TG-GATEs を用い、動物実験データは TG-GATEs に加えて HESS（Hazard Evaluation Support System Integrated Platform）を用いた。

### 項目② 細胞内イベントのオミクス解析

四塩化炭素とエチオニンをラットに 1~28 日間反復投与し、経時的に肝臓組織を採取し、標的分子の発現量をマイクロアレイ法にて網羅的に解析した。

### 項目③ 多層的データからの毒性パスウェイ構築

遺伝子発現量データは経時的データも加えて、GSEA（Gene Set Enrichment Analysis）で解析し、AOP 概念に沿ってシーケンシャルな毒性メカニズムを解明した。

## 4. 研究成果

### 4. 1 肝臓への毒性影響および肝脂肪変性の程度は物質によって異なる

四塩化炭素(CCl<sub>4</sub>、40 mg/kg および 200 mg/kg)とエチオニン(ET、50 mg/kg および 250 mg/kg)を Wistar-Han ラットの雄に 7、14 および 28 日間反復投与し、臓器重量の測定、剖検、血液組織学的検査を行い、化学物質投与による毒性影響を調べた。その結果、CCl<sub>4</sub> および ET ともに投与が進むにつれて有意な体重抑制および肝白色化の重篤化がみられたものの、投与 28 日目で肝臓の絶対および相対重量が増加したのは CCl<sub>4</sub> のみであった (図 1)。投与 28 日目の血液生化学的検査では、CCl<sub>4</sub> および ET ともに ALP、 $\gamma$ -GT、T-Bil および TBA の有意な増加がみられたものの、AST、ALT、LDH の有意な増加がみられたのは CCl<sub>4</sub> のみであった。また、血中の総コレステロール(T-Cho)は投与 7~14 日までは CCl<sub>4</sub> および ET ともに有意な減少がみられたものの、投与 28 日目では ET 投与群のみで有意な減少が継続した (表 1)。

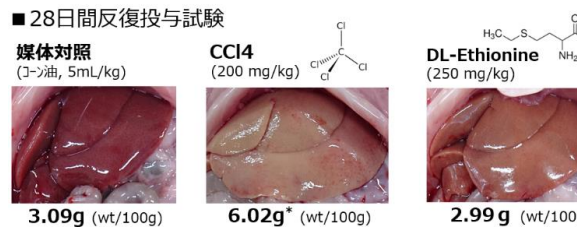


図 1 肝臓写真及び肝相対重量

表 1 血液生化学的検査

	7day			14day			28day		
	媒体対照 (コーン油)	CCl <sub>4</sub> (200 mg/kg)	ET (250 mg/kg)	媒体対照 (コーン油)	CCl <sub>4</sub> (200 mg/kg)	ET (250 mg/kg)	媒体対照 (コーン油)	CCl <sub>4</sub> (200 mg/kg)	ET (250 mg/kg)
AST	81 ± 20	801 ± 332 *	102 ± 27	83 ± 16	1,038 ± 445 *	97 ± 9	60 ± 8	3,513 ± 1,593 *	82 ± 19
ALT	34 ± 2	564 ± 331 *	42 ± 9	29 ± 5	835 ± 378 *	43 ± 4	34 ± 3	1,579 ± 531 *	38 ± 5
LDH	190 ± 71	524 ± 226 *	165 ± 49	142 ± 61	1,461 ± 165 *	171 ± 7	175 ± 58	924 ± 354 *	110 ± 45
ALP	756 ± 194	1,302 ± 129 *	979 ± 332 *	581 ± 88	1,646 ± 361 *	851 ± 27 *	441 ± 101	2,171 ± 473 *	975 ± 214 *
$\gamma$ -GT	0.3 ± 0.5	1.0 ± 0.8	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.5	2.3 ± 1.9	0.7 ± 0.5	0.0 ± 0.0	22.3 ± 9.2 *	1.3 ± 0.4 *
T-Bil	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1 *	0.3 ± 0.0 *	0.1 ± 0.0	0.5 ± 0.1 *	0.3 ± 0.1 *
T-Cho	60 ± 14	39 ± 2 *	23 ± 5 *	57 ± 4	36 ± 7	31 ± 9	46 ± 0.9	45 ± 13	19 ± 5 *
TBA	22 ± 1	74 ± 16 *	200 ± 29 *	20 ± 8	116 ± 33 *	174 ± 33 *	13 ± 2.2	104 ± 15 *	138 ± 45 *

### 4. 2 肝脂肪変性を引き起こすイニシエーションカスケードは化合物間で差がある

投与 28 日目 (高用量) の肝臓の網羅的な遺伝子発現量データについて GSEA 解析を行い、化学物質投与による脂肪肝の誘発メカニズムを解明した。その結果、ユビキチン-プロテアソーム系 (ERAD pathway) 及び ER (小胞体) ストレス関連遺伝子の発現減少は ET 投与群で有意性が高く、ミトコンドリア機能及び酸化リン酸化の異常は CCl<sub>4</sub> 投与群でみられた。しかし、脂肪酸の  $\beta$  酸化や脂質輸送の異常、オートファジーの機能不全は CCl<sub>4</sub> および ET ともに共通性が高かったことから、肝脂肪変性を引き起こす初期の反応は化合物間で差異があるものの、脂肪蓄積に繋がる細胞イベントには共通性が高いことが

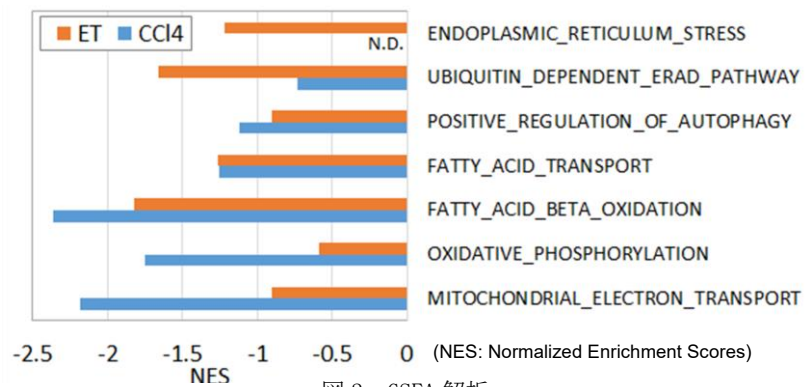


図 2 GSEA 解析

分かった (図 2)。さらに、ET 投与群では、ER 膜上タンパク質に有意な発現低下がみられ、ER 膜の構造異常およびリン脂質の恒常性破綻がリポタンパク質の産生低下を引き起こしている可能性が示唆された。これは、ET 投与群のみで血中の T-Cho 減少が有意な減少が継続したことを支持する。これらの結果から、毒性症状としては同じ脂肪変性を示す化合物であっても、その分子メカニズムや肝臓に与える毒性影響には時間的なものを含めてそこに至るまでの細胞内イベントが異なることが分かった。しかし、その結果として脂肪変性が生じると、その表現型に関与する遺伝子群には共通性が高かったことから、毒性としては“収束”していくことが分かった。本研究結果は毒性症状の段階的な進行に関して分子レベルでのメカニズムを考察できる非常に有用なものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsui Toshikatsu, Miyamoto Norimasa, Saito Fumiyo, Shinozawa Tadahiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Molecular Profiling of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cells and their Application for Drug Safety Study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Pharmaceutical Biotechnology	6. 最初と最後の頁 807 ~ 828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1389201021666200422090952	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 Ito Yuko, Nakajima Kota, Masubuchi Yasunori, Kikuchi Satomi, Okano Hiromu, Saito Fumiyo, Akahori Yumi, Jin Meilan, Yoshida Toshinori, Shibutani Makoto	4. 巻 40
2. 論文標題 Downregulation of low density lipoprotein receptor class A domain containing protein 4 ( Ldlrad4 ) in the liver of rats treated with nongenotoxic hepatocarcinogen to induce transforming growth factor signaling promoting cell proliferation and suppressing apoptosis in early hepatocarcinogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Applied Toxicology	6. 最初と最後の頁 1467 ~ 1479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jat.3998	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------