

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009 ～ 2012

課題番号：21310022

研究課題名（和文）カタラーゼ遺伝子変異マウスの初代培養肝細胞を用いた環境化学物質評価法の開発

研究課題名（英文）Risk assessment of environmental oxidative chemicals using catalase mutant primary cultured hepatocytes

研究代表者

汪 達紘 (WANG DA-HONG)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90294404

研究成果の概要（和文）：ヒドロキノン (hydroquinone)、ローソン (lawsone) 等日常生活によく使われる化学物質を初代培養肝細胞に曝露し、高濃度になるにつれて、カタラーゼ遺伝子正常 (Cs<sup>a</sup>) 及び変異 (Cs<sup>a</sup>) とともに肝細胞生存率が有意に低くなる傾向がみられた。各曝露濃度においては、カタラーゼ活性の低いマウス (Cs<sup>b</sup>) の肝細胞の生存率がカタラーゼ活性正常のマウス (Cs<sup>a</sup>) に比し著しく低下した。特に美白クリームの主成分であるヒドロキノンの添加により、肝細胞のアポトーシス（細胞死）がみられ、酸化ストレス関連薬物代謝酵素CYP 2E1のmRNA及び蛋白質とともに発現が増加したことが分かった。

研究成果の概要（英文）： We exposed mouse primary hepatocytes to chemicals that are commonly used in our daily lives like hydroquinone, lawsone. We found that exposure the cells to these chemicals decreased cellular viability in both catalase mutant mice (Cs<sup>b</sup>) and the wild-type mice (Cs<sup>a</sup>) dose-dependently, in particular, the survival of hepatocytes was lower in Cs<sup>b</sup> when compared to that of Cs<sup>a</sup>. We also observed that exposure the cells to hydroquinone, a main component of skin-lightening cream, enhanced the cellular expression of cytochrome P450 2E1 mRNA and protein dose-dependently as well as induced apoptosis of the cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2012年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	10,700,000	3,210,000	13,910,000

研究分野：環境保健・予防医学

科研費の分科・細目：環境学・環境影響評価・環境政策

キーワード：初代培養肝細胞、カタラーゼ、過酸化水素、ヒドロキノン、アポトーシス、ローソン、レスベラトロール

### 1. 研究開始当初の背景

私たちを取り巻く環境中には2000万種以上の化学物質があり、これら物質の有害性評価には、生体に及ぼす影響を感度よく検知するシステムの開発が必要不可欠である。環境化学物質の有害性の系統的評価には、実験動物を用いた実験が必要とされるが、その一方で、動物実験に要する高コストや長期に亘る実験期間、並びに動物愛護運動の拡大などの問題がある。そこで、コスト、時間及び実験動物数などの軽減のために、動物実験に先立って行う、簡便且つ迅速な細胞レベルでの評価法の確立が望まれている。

### 2. 研究の目的

我々はカタラーゼ遺伝子変異マウスの初代培養肝細胞を用い、環境化学物質の単独及び複合曝露により細胞内の遺伝子及びたんぱく質の発現にどんな変化が起こるか、正常細胞との違いはあるか等について調べる。

### 3. 研究の方法

(1)カタラーゼ遺伝子正常(Cs<sup>a</sup>)及び変異マウス(Cs<sup>b</sup>)をそれぞれペントバルビタール(腹腔内投与)で麻酔し、コラゲナーゼ還流法により肝実質細胞を分離し、得られた細胞を無血清培地で培養した。

(2)過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、ヒドロキノン(hydroquinone)、ローソン(lawsone)等日常生活によく使われる化学物質を細胞に曝露し、曝露により惹起される、カタラーゼ遺伝子正常及び異常肝細胞の生存率の差異から、毒性発現が酸化ストレスによるか否かを評価した。細胞毒性評価キットWST-8(同仁化学社)を用いて細胞内脱水素酵素活性をマイクロプレートリーダー(450nm)にて測定した。

(3)細胞内の還元型グルタチオン(以下GSH)、酸化型グルタチオン(以下GSSG)をDTNB(5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid))

による酵素サイクリング法を利用し、マイクロプレートリーダー(412nm)にて測定し、GSH及びGSSGの濃度(μM/10<sup>6</sup> cells)を算出した。

(4)肝細胞アポトーシスを核染色試薬Hoechst 33342(Dojindo)にて検出した。

(5)RT-PCRによるCYP2E1 mRNA発現を評価した。肝細胞におけるCYP2E1 mRNAの発現量はβ-actinの発現量で補正した。

(6)Western blottingによるCYP2E1蛋白発現を評価した。蛋白質の定量値はβ-actinの定量値で補正した。

(7)有害物質曝露後のタンパク質の変動をプロテオーム解析で評価した。

### 4. 研究成果

(1)H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、hydroquinone、lawsoneにより、カタラーゼ遺伝子正常(Cs<sup>a</sup>)及び変異マウス(Cs<sup>b</sup>)とともに、高濃度になるにつれて、肝細胞生存率が有意に低くなる傾向がみられた。また、各曝露濃度においては、Cs<sup>a</sup>はCs<sup>b</sup>に比べて高値を示し、カタラーゼ活性の低いCs<sup>b</sup>肝細胞の生存率が著しく低下した。

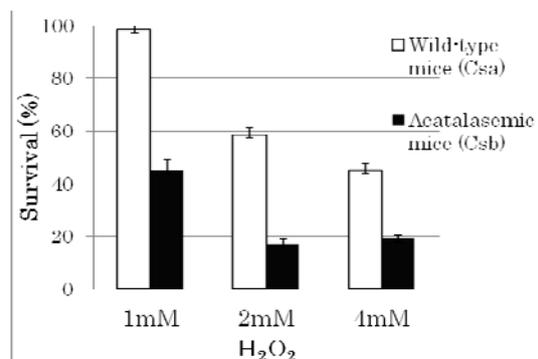


図1. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によるマウス初代培養肝細胞への影響。P<sub>1</sub><0.001: マウス群間比較、P<sub>2</sub><0.001: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>曝露濃度間の比較(by 2-way ANOVA).

(2) 美白クリームの主成分である hydroquinone の添加により、Cs<sup>a</sup> 及び Cs<sup>b</sup> 共に、高濃度になるにつれて、細胞カタラーゼ活性の減少傾向がみられ、Cs<sup>b</sup> の肝細胞カタラーゼ活性は、Cs<sup>a</sup> のそれに比し有意に低値を示した。Hydroquinone 単独曝露する場合、Cs<sup>b</sup> の細胞生存率は Cs<sup>a</sup> のそれより著明に低下したが、1 mM 及び 10mM の濃度の resveratrol を加えることにより、Cs<sup>a</sup> と Cs<sup>b</sup> 間の細胞生存率の差異が小さくなり、hydroquinone の曝露により引き起こされた細胞障害が、resveratrol の添加によって抑制された。特に、Cs<sup>a</sup> と Cs<sup>b</sup> と共に、5mM、10mM の resveratrol の添加は顕著な抑制効果が現われ、それぞれ 60%(Cs<sup>a</sup>)、30%(Cs<sup>b</sup>) 以下となっていた生存率が、5mM resveratrol の添加により 80%、100%に回復され、10mM resveratrol の添加により 100%以上になった。

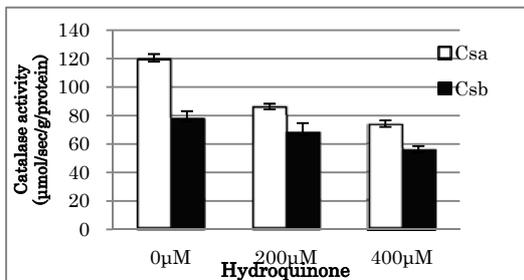


図 2-1. マウス初代培養肝細胞におけるカタラーゼ活性 (Student's *t*-test, \*\* $p < 0.01$ )

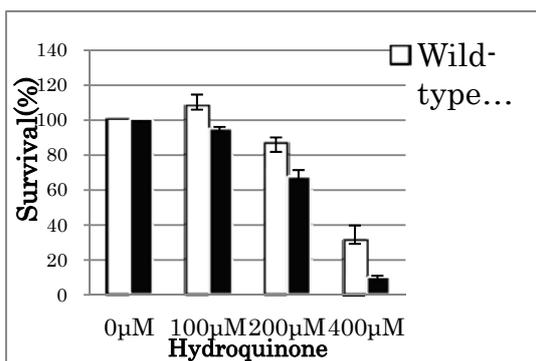


図 2-2. Hydroquinone 添加後のマウス初代培養肝細胞への生存率の影響。P<sub>1</sub> < 0.001: マウス群間比較 P<sub>2</sub> < 0.001: Hydroquinone 曝露濃度別比較 (by 2-way ANOVA)。

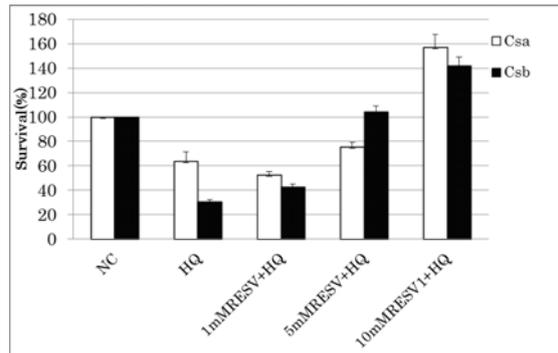


図 2-3. Resveratrol 曝露による HQ (400 µM) 細胞毒性に対する抑制効果 (P<sub>1</sub> < 0.001: マウス群間比較、P<sub>2</sub> < 0.001: RESV 濃度間の比較 (by 2-way ANOVA)。NC: Negative Control、HQ: Hydroquinone、RESV: resveratrol)。

(3) 図 3 に示すように 200 µM HQ 添加群の GSH:GSSG の比率は、有意な差異が認められなかった。

また、400 µM HQ 添加群の GSH:GSSG の比率は、対照群より約 30% 有意に減少した。

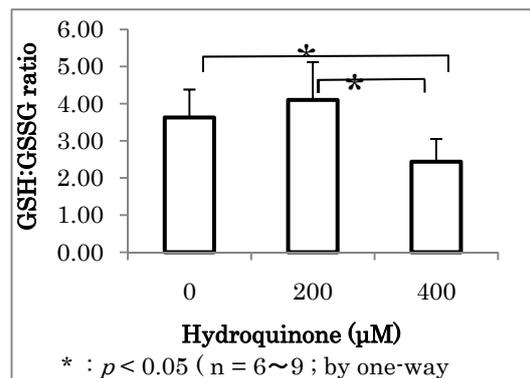


図 3. Hydroquinone 曝露後の GSH:GSSG 比率

(4) 蛍光色素 Hoechst 33342 を用いて hydroquinone の曝露で両種マウスの肝細胞アポトーシスを検出した (図 4)。特に 400 µM hydroquinone の曝露によるクロマチン凝集の割合が両種マウスの肝細胞とも高く、細胞核の断片化が顕著であった。ただし、両種マウスの肝細胞の間では有意な差異が見られなかった。

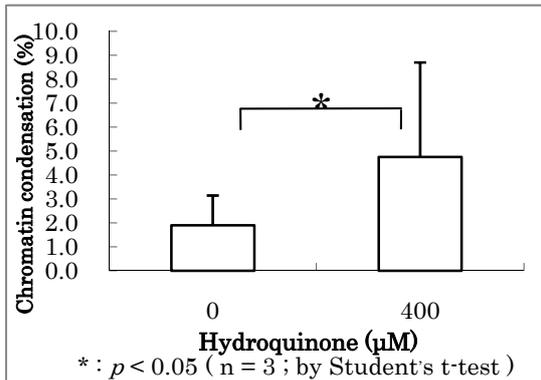


図4. Hydroquinone 曝露による肝細胞のクロマチン凝集の割合。

(5) 図5-1 に示すように、200 μM HQ および 400 μM HQ に曝露された肝細胞では、薬物代謝酵素 CYP2E1 mRNA の発現量は、対照群に比較し顕著な変化がみられなく、3つの群の間には有意な差異が認められなかった。

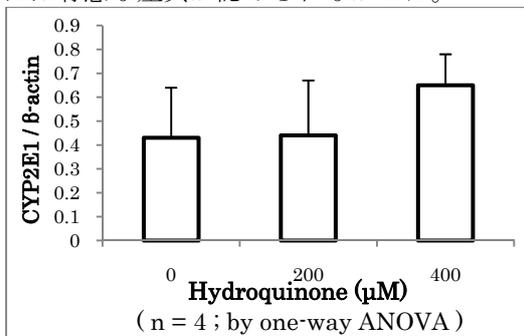


図5-1. Hydroquinone 曝露による肝細胞 CYP2E1 mRNA の発現

図5-2 に示すように、肝細胞に Resveratrol を加えることにより、hydroquinone の曝露により増加された CYP2E1 mRNA 発現量が少なくなった。

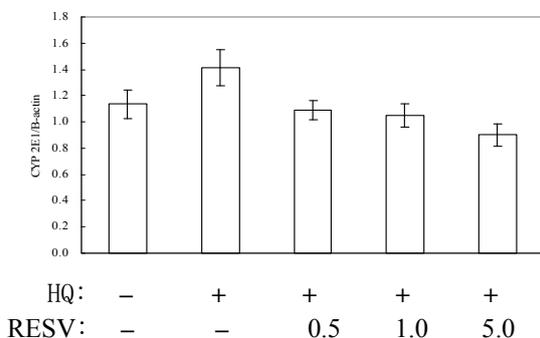


図5-2. Resveratrol (RESV, mM) 添加の有無による Hydroquinone (HQ: 400 μM) 曝露後の肝細胞 CYP2E1 mRNA 発現の変化

(6) HQ 曝露後の CYP2E1 蛋白質の発現量を図6に示した。200 μM および 400 μM hydroquinone 曝露群の CYP2E1 発現量は、対照群より有意に高くなった。

また、200 μM hydroquinone 曝露群の CYP2E1 発現量は 400 μM hydroquinone 曝露群の CYP2E1 発現量に対して有意な差異が認めなかった。

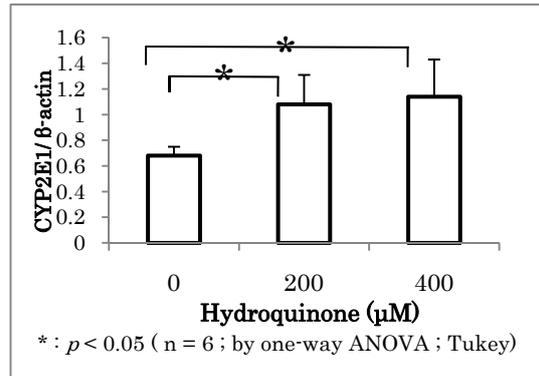


図6. Western blotting による Hydroquinone 曝露後 CYP2E1 蛋白質の発現

(7) プロテオーム解析結果: Hydroquinone を 48時間曝露後では、たんぱく質 Major urinary protein 1、ATP synthase subunit delta、および Translocon-associated protein subunit delta が同定され、特に Translocon-associated protein subunit delta の発現が Cs<sup>b</sup> の初代培養肝細胞に上昇したことが分かった。

本研究で用いる hydroquinone の曝露濃度は、5% Hydroquinone 含有美白クリーム の 1/1000 の濃度であり、長期の hydroquinone 含有化粧品等の使用は、酸化ストレスに曝されやすい環境となり、生体に何らかの悪影響を及ぼすのではないかと考えられる。

(8) Cumene hydroperoxide (CH) の細胞毒性及び抗酸化物質 Trolox の抑制効果: Cs<sup>a</sup> 及び Cs<sup>b</sup> の肝細胞に様々な濃度の CH を曝露させ、CH による細胞毒性が濃度依存的事であることが分かった。その結果を、これまでに得られているカタラーゼ変異遺伝子導入大腸菌を用いた曝露結果と照らし合せ、両者の一致性も明らかとなった。また、細胞毒性は Trolox の前処理によって著しく低減され、Trolox は CH の細胞毒性の予防に有効であることを示した。

今後は、Hydroquinone 曝露後において Cs<sup>b</sup> の

初代培養肝細胞に上昇された蛋白質についてさらに検討する必要がある。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計8件)

- ① Kamimura W, Doi W, Takemoto K, Ishihara K, Wang DH, Sugiyama H, Oda SI, Masuoka N: Effect of vitamin E on alloxan-induced mouse diabetes. *Clinical Biochemistry* 査読有 2013 (in press).
- ② Wang DH, Ootsuki Y, Fujita H, Miyazaki M, Yie Q, Tsutsui K, Sano K, Masuoka N, Ogino K: Resveratrol Inhibited Hydroquinone-induced Cytotoxicity in Mouse Primary Hepatocytes. *Int. J. Environ Res & Public Health* 査読有 2012; 9:3354-3364.
- ③ Takiue K, Sugiyama H, Inoue T, Morinaga H, Kikumoto Y, Kitagawa M, Kitamura S, Maeshima Y, Wang DH, Masuoka N, Ogino K, Makino H. Acatlasemic mice are mildly susceptible to adriamycin nephropathy and exhibit increased albuminuria and glomerulosclerosis. *BMC Nephrol.* 査読有 2012;13:14.
- ④ Wang DH, Ishikawa Y, Miyazaki M, Fujita H, Tsutsui K, Sano K, Masuoka N, Ogino K: A new risk assessment method for evaluation of oxidative chemicals using catalase mutant mouse primary hepatocytes. *Health* 査読有 2011; 3: 288-291.
- ⑤ Odajima N, Betsuyaku T, Nagai K, Moriyama C, Wang DH, Takigawa T, Ogino K, Nishimura M. The Role of Catalase in Pulmonary Fibrosis. *Respiratory Res.* 査読有 2010; 11:183.
- ⑥ Kikumoto Y, Sugiyama H, Inoue T, Morinaga H, Takiue K, Kitagawa M, Fukuoka N, Saeki M, Maeshima Y, Wang DH, Ogino K, Masuoka N, Makino H. *Biochim. Biophys. Acta.* 査読有 2010;1802:240-246.
- ⑦ Takemura Y, Wang DH, Sauriasari R, Horita M, Tsutsui K, Sano K, Masuoka N, Takigawa T, Takaki J, Ogino K: Evaluation of Pyrogallol-induced Cytotoxicity in Catalase-mutant Escherichia coli and Mutagenicity in Salmonella typhimurium. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 査読有 2010; 84:347-350.
- ⑧ Takemoto K, Tanaka M, Iwata H, Nishihara R, Ishihara K, Wang DH, Ogino K, Taniuchi K, Masuoka N: Low catalase activity in blood is associated with the diabetes caused by alloxan. *Clin. Chim. Acta.* 査読有 2009; 407:43-46.

〔学会発表〕 (計8件)

- ① Wang DH, Miyazaki M, Fujita H, Tsutsui K, Sano K, Masuoka N, Ogino K: Risk assessment of environmental oxidative chemicals using catalase mutant primary cultured hepatocytes. The American Public Health Association's 140th Annual Meeting and Exposition, The Moscone Convention Center West, San Francisco, CA, USA, 2012年10月29日.
- ② 叶欽霞、汪達紘、大月芳恵、石川靖夫、藤田洋史、宮崎正博、筒井研、佐野訓明、益岡典芳、荻野景規。初代培養肝細胞におけるヒドロキノンの影響とレスベラトロールの抑制効果。第82回日本衛生学会学術総会、京都大学吉田キャンパス、2012年3月25日
- ③ 張燃、村上育郎、高橋秀和、汪達紘。ダニ蛋白誘発喘息におけるL-アルギニンの効果。第82回日本衛生学会学術総会、京都大学吉田キャンパス、2012年3月25日。
- ④ 張燃、村上育郎、高橋秀和、汪達紘、荻野景規。新しい喘息予防法に関する研究。第9回日本予防医学会学術総会、首都大学東京 荒川キャンパス、2011年11月20日
- ⑤ 大月芳恵、汪達紘、石川靖夫、藤田洋史、宮崎正博、筒井研、佐野訓明、瀧川智子、荻野景規。低カタラーゼ活性マウスの初代培養肝細胞を用いた環境化学物質評価法の開発 (第2報)。第81回日本衛生学会学術総会、昭和大学旗の台キャンパス、2011年3月26日
- ⑥ 大月芳恵、汪達紘、石川靖夫、藤田洋史、宮崎正博、筒井研、佐野訓明、瀧川智子、荻野景規。カタラーゼ活性の異なるマウスの初代培養肝細胞に及ぼすヒドロキノンの影響。第8回日本予防医学会学術総会、石川県立音楽堂 交流ホール、2010年12月12日
- ⑦ Kazunori Takemoto, Tanaka M, Iwata H, Nishihara R, Ishihara K, Wang DH, Ogino K, Taniuchi K, Masuoka N: Low catalase activity is higher incidence of diabetes. International Conference on Biologically Active Substances. 岡山県立大学 (総社)、2010年8月11日
- ⑧ 汪達紘、石川靖夫、宮崎正博、藤田洋史、筒井研、佐野訓明、益岡典芳、瀧川智子、高木二郎、荻野景規: 低カタラーゼ活性マウスの初代培養肝細胞を用いた環境化学物質評価法の開発 (第1報)。第80回日本衛生学会学術総会、仙台市国際センター、2010年5月10-11日

〔図書〕 (計1件)

- ① Wang DH, Tsutsui K, Sano K, Masuoka N,

Sugiyama H, Miyazaki M, Fujita H, Ogino K: Catalase gene mutant mice — acatalasemic and hypocatalasemic mice. In 『Catalases: Evolutionary Significance, Molecular Mechanisms and Antioxidant Benefits』, Nova Science Publishers, Inc., NY, USA (in press) .

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

汪 達紘 (WANG DA-HONG)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：90294404

### (2) 研究分担者

藤田 洋史 (FUJITA HIROFUMI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：20423288

荻野 景規 (OGINO KEIKI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：70204104

筒井 研 (Tsutsui KEN)  
岡山大学・自然生命科学研究支援センター・教授  
研究者番号：70108158  
(H24:連携研究者)

佐野 訓明 (Sano Kuniaki)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：00294405  
(H24:連携研究者)

中村 和行 (NAKAMURA KAZUYUKI)  
山口大学医学(系)研究科・教授  
研究者番号：90107748  
(H24:連携研究者)

宮崎 正博 (Miyazaki Masahiro)  
岡山学院大学・人間生活学部・教授  
研究者番号：90116509  
(H22→H24:連携研究者)

### (3) 連携研究者

益岡典芳 (Masuoka Noriyoshi)  
岡山理科大学・理学部・教授  
研究者番号：20116502