

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580304

研究課題名(和文)水産廃棄物残渣等を用いた藍藻毒マイクロシスチン中毒の化学予防

研究課題名(英文)Chemoprevention of microcystin poisoning using fisheries waste

研究代表者

小松 正治 (Komatsu, Masaharu)

鹿児島大学・水産学部・准教授

研究者番号：30325815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：アオコ由来の肝臓毒マイクロシスチンLRの細胞毒性を抑制し得る化合物を探索し、肝がんや肝機能不全の化学予防または対処法の確立のための礎とすることを目指した。様々な生物資源由来の抽出物や単離化合物を用いてスクリーニングした結果、アメリカオオアカイカの廃棄残渣の皮から単離精製したセラミド誘導体のセラミドアミノエチルホスホン酸がマイクロシスチンLRの細胞毒性を抑制し得ることが明らかになった。さらに柑橘類由来のフラボノイドであるナリンジンにも同様の効果があることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The chemical compounds were screened capable of suppressing the cytotoxicity of liver-selective toxin microcystin-LR derived from blue-green algae. This screening was aimed to be the foundation for the establishment of chemical prevention or remedy of liver cancer and liver dysfunction. Ceramide aminoethylphosphonate isolate from skin of the Jumbo flying squid waste potently attenuated the cytotoxicity of microcystin-LR. Furthermore, naringin which is a kind of flavonoid isolated from citrus was also attenuated the cytotoxicity.

研究分野：水圏生命科学

キーワード：マイクロシスチン セラミド誘導体 アメリカオオアカイカ ナリンジン フラボノイド アノイキス抵抗性

1. 研究開始当初の背景

国内・国外の研究動向及び位置づけ：

アオコを形成する藍藻類（主に *Microcystis* 属）が産生する最も代表的で強力な毒物としてマイクロシスチン LR (MC-LR) が知られている。MC-LR は比較的極性が高く (logPow が -2.9) 分子量 995 の環状ペプチド構造をとる化合物であり、単純拡散では細胞膜を通過しない。MC-LR の主な毒性は、セリン/スレオニン型タンパク質脱リン酸化酵素 PP1 および PP2A を特異的かつ不可逆的に阻害することを介してヒトを含めた動物に急性の肝機能不全を誘発することである。腹腔投与でその LD₅₀ (半数致死量) 値はマウスの体重 1kg あたり 32.5~100 μ g であり、シアン化カリウムの 20 倍以上の強い毒性をもつ。また慢性的な低濃度曝露により肝臓がんを誘発する発がんプロモーター (国際がん研究機関が定めた IARC グループ 2B) としても機能する。しかし、これまでその肝臓選択的な毒性発現機構には不明な点が多かったが、報告者らは、平成 17~19 年度の科学研究費補助金若手研究 (B) においてヒト肝細胞の類洞膜上に特異的に発現している OATP1B1 及び OATP1B3 が、MCLR の肝細胞への選択的な取り込みおよび肝細胞選択的な毒性発現に重要な機能を果たすことを明らかにした (Komatsu et al., *Toxicological Sciences*, 97, 407-416, 2007)。また、これらの知見は報告者らのグループ、ドイツ (Fischer et al., *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203, 257-263, 2005)、並びにアメリカのグループ (Monks et al., *Molecular Cancer Therapeutics*, 6, 587-598, 2007) がそれぞれ独立に発見した。

これまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯とその発展：

富栄養化しやすい湖沼水を水源とする浄水施設をもつ地域において、藍藻類の大発生であるアオコの除去は「安全な水」の供給のための重要課題である。1996 年にブラジルにおいて MC-LR が混入した透析液により 50 名の腎臓透析患者が犠牲になった中毒事故 (Jochimsen et al., *The New England Journal of Medicine*, 338, 873-878, 1998) のように、諸外国においてアオコが産生する有毒化合物により「水の安全」が脅かされている。我が国においては中毒の報告例はないが、主に水温の高い夏場において、日本各地の淡水池等でアオコが発生している。2003 年の新聞報道では死因との因果関係は不明とされているものの、国内の病院において、ブラジルの中毒事故と同様に腎臓透析患者が急性肝機能不全で亡くなっており、事故調査の結果、透析液から MC-LR が検出されている。また、MC-LR が生物濃縮した貝類を摂取することを介して起こるヒトの健康被害も危惧されている。

そこで有毒藍藻類由来の化合物中毒に対

する対処法を確立する必要がある、有毒藍藻類がもつ毒性についての知識を得るための詳細な毒性学的実験研究が急務である。水道法において MC-LR は要検討項目に分類されており、その毒性に関する研究を奨励し、知見の集積の必要性ならびに検出法の確立の必要性が謳われている。報告者は平成 21 年度~23 年度の科学研究費補助金基盤研究 (C) において、MC-LR が有する細胞毒性および細胞増殖の対極的な生命現象が同時に活性化し、それらのバランスの強弱の差により細胞の運命が決定することを明らかにし、その分子機序の中心に癌抑制遺伝子産物 p53 が位置することをはじめ、詳細な細胞内シグナリングを解明した (Takumi et al., *Environmental Health Perspectives*, 118, 1292-1298, 2010)。

2. 研究の目的

報告者らは、MC-LR の毒性発現、並びに解毒機構を解析する独自のツールとして有用な HEK293-OATP1B3 および MDCK-OATP1B3 細胞を有している。これらの培養細胞、並びに実験動物 (ゼブラフィッシュ) を利用して MC-LR の解毒機構が解明され、MC-LR 中毒に対する化学予防、並びに化学療法の礎を築くための研究基盤が確立できると考える。本研究で得られる成果を基に、近い将来に水道法の改正等により MC-LR が要検討項目から少なくとも水質管理目標設定項目に引き上げられることが望まれ、結果的に我が国の健康水準がより上昇することが期待される。延いては諸外国で発生している MC-LR 中毒、並びに疫学的因果関係が不明の肝臓がんの発生予防や対症療法の確立に貢献し、水産化学領域における「食と健康」・「水と健康」研究を通じて世界中の人類の公衆衛生の向上に寄与できると考える。

3. 研究の方法

本研究計画では MC-LR の細胞内解毒代謝機構の分子機序の解明への着手に加え、MC-LR の細胞毒性を抑制し得るアメリカオオアカイカ由来のセラミド誘導体セラミドアミノエチルホスホン酸 (CAEP) 等の水産物廃棄残渣をはじめとした食品成分・天然化合物の機能解析を実施する。また、OATP1B3 の発現は正常組織では肝細胞に限局されるが、乳がんなどのある種の腫瘍細胞にも発現が確認されている。従って MCLR を抗がん剤として使用するための基礎研究がスタートしている (Monks et al., *Molecular Cancer Therapeutics*, 6, 587-598, 2007) が、がんの約半数の種類が p53 の機能を失っていることが知られていることから、本研究が、将来的に MC-LR を使用する抗がん剤開発に繋がるための判断材料になることも期待される。そしてモデル生物であるマウスおよびゼブラフィッシュを用いて CAEP 等の化合物が有す MC-LR の毒性抑制効果に関する *in vivo* の評

価を試みる。本研究では MCLR の解毒機構の解明ならびに毒性抑制化合物の探索・機能解析を目的に、以下の検討項目を設定し、報告者が独自に有している特殊な培養細胞から動物実験へと展開し、評価した。

第 相の薬毒物代謝酵素カルボキシルエステラーゼ 2 の MC-LR 代謝への関与。

第 相の薬毒物代謝系細胞外排出ポンプ ABC2 の MCLR-GSH 抱合体の細胞外排出への関与。

水産物廃棄残渣中の成分、水圏天然化合物、ならびにその他の化合物から MCLR の毒性を抑制するものの探索・機能解析を試みた。

で得られた成分・化合物の機能性の動物実験による検証。

また、実験の過程で MC-LR の新機能が発見されたので、詳細な解析を加えた。

4. 研究成果

上述の および に関しては、理想的な展開ができなかったものの、 および については、順調に展開し、研究成果が得られたので、以下に研究成果を示す。

アメリカオオアカイカ皮由来の CAEP は、保存安定性が悪く、機能性の低下が比較的早いことが判明したが、HEK293-OATP1B3 細胞を用いた解析において、O-P-C 構造をもつ CAEP は MC-LR の細胞毒性を有意に抑制した。この毒性抑制活性は、対照として用いた O-P-O 構造をもつスフィンゴミエリン (SM) の約 2 倍であり、また、リン酸基をもたないセレプロシド (CMS) には活性は検出されなかった (図 1)。この結果から、MC-LR の細胞毒性の抑制効果には化合物の構造活性相関が示唆された (Komatsu et al., Fisheries Science, 79, 313-320, 2013)。

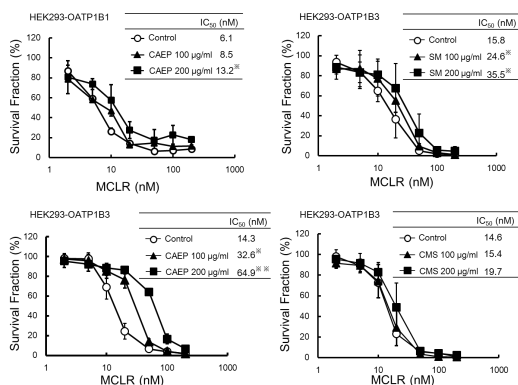


図 1. CAEP による MC-LR 毒性の抑制

実験動物のラットにおいて MC-LR の細胞毒性を減弱することが報告されている柑橘類フラボノイドであるナリンジンについて、ヒトの肝細胞に対して MC-LR の細胞毒性抑制能を発揮する可能性について検討した結果、OATP1B1 または OATP1B3 を強制発現させた培養細胞において、ナリンジンは OATP1B1 または OATP1B3 を介した MC-LR の細胞内取り込みを阻害し、MC-LR による PP 活性阻害を抑制し、

リン酸化タンパク質の細胞内蓄積を低下させた。これらの分子機序を介してナリンジンは MC-LR の細胞毒性を減弱することが明らかになった (Takumi et al., Environmental Toxicology and Pharmacology, 39, 974-981, 2015)。

また、本研究において、MC-LR の新規な機能性としてアノキス抵抗性の誘導能を見出し、その分子機序を部分的に明らかにした。解析の結果、MC-LR 曝露により足場からはがれ浮遊した細胞がアノキス抵抗性を示し、さらに、MC-LR 耐性を獲得することが明らかになった。この細胞を HEK293-OATP1B3-FL 細胞と命名した。HEK293-OATP1B3-FL 細胞は細胞接着分子である E カドヘリンの発現が低下していることが判明した。一方、MC-LR 曝露に耐えて接着し続けた細胞を HEK293-OATP1B3-AD 細胞と命名した。HEK293-OATP1B3-AD 細胞もシスプラチン LR 耐性を獲得して、細胞骨格タンパク質の発現が上昇していた。さらに E カドヘリンの発現が上昇し、E カドヘリンの発現を負に制御する転写調節因子 ZEB-1 の発現が低下していた (Takano et al., Toxicology, 326, 53-61, 2014)。

さらに、MC-LR およびオカダ酸ならびにカリクリン A は、セリン/スレオニンホスファターゼ PP1 および PP2A を特異的に阻害することにより細胞毒性を発揮する。肝臓毒である MC-LR とは異なり、オカダ酸およびカリクリン A の毒性には臓器特異性が存在しないと従来は考えられていたが、本研究により、オカダ酸についても肝臓に対して比較的高い選択毒性を有することが示唆された。また、オカダ酸の肝細胞への選択的取り込み機構に関するより詳細な解析を試みた。実験の結果、肝細胞に特異的に発現し、MC-LR の肝毒性発現の責任分子である OATP1B3 の輸送基質として知られるプロムスルファレイン、タウロコール酸、およびデヒドロエピアンドロステロン硫酸塩、ならびに OATP1B3 を介した MC-LR の細胞毒性の抑制化合物であるセラミドアミノエチルホスホン酸などの各種化合物により、HEK293-OATP1B3 細胞に対するオカダ酸の細胞毒性が抑制された。さらに、肝機能改善に有効とされる生薬ウコンと複合曝露により MC-LR およびオカダ酸の細胞毒性が共に減弱した。また、HEK293-OATP1B3 細胞へのマイクロシスチン LR の取り込みは、オカダ酸との複合曝露により顕著に競合阻害的に抑制された。以上の結果から、オカダ酸は MC-LR と同様の OATP1B3 を介する共通機序により細胞内へ取り込まれ、細胞毒性を発現し、原因不明の肝疾患や肝がんの発症に関わっている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Ikeda, A., Ichino, H., Kiguchiya, S., Chigwechokha, P., Komatsu, M., Shiozaki, K., Evaluation and identification of potent angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide derived from dwarf gulper shark (*Centrophorus atromarginatus*).
J. Food Process Pres. 39, 107-115, 2015

Shota Takumi, Satoshi Ikema, Tamami Hanyu, Yusuke Shima, Takashi Kurimoto, Kazuhiro Shiozaki, Yasumasa Sugiyama, Ho-Dong Park, Seiichi Ando, Tatsuhiko Furukawa, and Masaharu Komatsu
Naringin attenuates the cytotoxicity of hepatotoxin microcystin-LR by the curious mechanisms to OATP1B1- and OATP1B3-expressing cells.
Environmental Toxicology and Pharmacology, 39, 974-981, 2015.

Hiroyuki Takano, Shota Takumi, Satoshi Ikema, Nozomi Mizoue, Yuki Hotta, Kazuhiro Shiozaki, Yasumasa Sugiyama, Tatsuhiko Furukawa, and Masaharu Komatsu
Microcystin-LR Induces Anoikis Resistance to the Hepatocyte Uptake Transporter OATP1B3-expressing Cell Lines,
Toxicology, 326, 53-61, 2014.

Chigwechokha, P., Komatsu, M., Itakura, T., Shiozaki, K.
Nile Tilapia Neu3 sialidases: molecular cloning, functional characterization and expression in *Oreochromis niloticus*. Gene, 552, 155-164, 2014.

Liqiang Xie, Tamami Hanyu, Noriko Futatsugi, Masaharu Komatsu, Alan D. Steinman, Ho-Dong Park
Inhibitory effect of naringin on microcystin-LR uptake in the freshwater snail *Sinotaia histrica*.
Environmental Toxicology and Pharmacology, 38, 430-437, 2014

Shiozaki, K., Ryuzono, S., Matushita, N., Ikeda, A., Takeshita, K., Chigwechokha, P., Komatsu, M., Miyagi, T.
Molecular cloning and biochemical characterization of medaka (*Oryzias latipes*) lysosomal neu4 sialidase.
J. Fish Physiol Biochem.40, 1461-1472, 2014

Masaharu Komatsu, Naoki Ichiyama, Takashi Kurimoto, Shota Takumi, Kazuhiro Shiozaki, Yasumasa Sugiyama, Tatsuhiko Furukawa, Seiichi Ando, Saki Itonori, and

Hiroaki Saito
Ceramide Aminoethylphosphonate from Jumbo flying squid *Dosidicus gigas* attenuates the toxicity of cyanotoxin microcystin-LR.
Fisheries Science, 79, 313-320, 2013.

Kazuhiro Shiozaki, Kazuki Takeshtia, Mako Ikeda, Asami Ikeda, Yusuke Harasaki, Masaharu Komatsu, Shoji Yamada, Kazunori Yamaguchi and Taeko Miyagi.
Molecular cloning and biochemical characterization of two novel Neu3 sialidases, neu3a and neu3b, from medaka (*Oryzias latipes*)
Biochimie, 95, 280-289, 2013.

Yang Li, Wei Hongyi, Masaharu Komatsu, Kenichi Ishibashi, Tatsuo Ito, Takeshi Yoshikawa, and Hiroto Maeda
Isolation and characterization of bacterial isolates algicidal against a harmful bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*.
Biocontrol Science, 17, 107-114, 2012.

[学会発表](計14件)
Chigwechokha, P., Itakura T., Komatsu, M., Shiozaki, K.
Molecular cloning and characterization of gaglioside specific sialidase in tilapia.
平成26年度日本水産学会秋季大会 2014年9月21日 九州大学(福岡県福岡市)

池間 智・橋本海理・堀田夕貴・杉山靖正・塩崎一弘・内匠正太・小松正治
生薬ウコンによるマイクロシスチン LR およびオカダ酸の毒性抑制
平成26年度日本水産学会秋季大会 2014年9月20日 九州大学(福岡県福岡市)

舟橋亜希・小松正治・吉園優希・居川康博・林 征一・板倉隆夫・上西由翁
培養細胞を用いたウナギ GFP の機能解析
平成26年度日本水産学会秋季大会 2014年9月20日 九州大学(福岡県福岡市)

原崎裕介、池田麻美、龍園せな、吉川みのり、大石一樹、小松正治、塩崎一弘
筋分化におけるメダカシアリダーゼ Neu3b の機能解析
平成26年度日本水産学会秋季大会 2014年9月20日 九州大学(福岡県福岡市)

龍園せな、池田麻美、原崎裕介、大石一樹、小松正治、宮城妙子、塩崎一弘
ニホンメダカ *Oryzias latipes* のシアリダーゼ研究におけるモデル動物としての有用性
第33回 日本糖質学会 2014年8月11日 名古屋大学(愛知県名古屋市)

小松正治、栗本隆史、防田真哉、池間 智、市山直樹、杉山靖正、安藤清一、糸乗 前、斎藤洋昭
マイクロシスチン LR およびオカダ酸の毒性発現の共通機序
第4回 リン化合物討論会・第31回 C-P化合物研究会 2013年12月14日 滋賀大学(滋賀県大津市)

高野博之、溝上 望、内匠正太、杉山靖正、古川龍彦、小松正治
マイクロシスチン LR によるアノキス抵抗性の誘導
第4回 リン化合物討論会・第31回 C-P化合物研究会 2013年12月14日 滋賀大学(滋賀県大津市)

防田真哉、栗本隆史、杉山靖正、内匠正太、古川龍彦、小松正治
ヒト肝細胞トランスポーターOATP1B3 を介したオカダ酸の毒性発現機構
第15回 マリンバイオテクノロジー学会 2013年6月1日 沖縄県市町村自治会館(沖縄県那覇市)

居川康博、青木俊二、杉山靖正、内匠正太、古川龍彦、小松正治
マイクロシスチン LR の毒性抑制能を有す生薬成分の探索
第15回 マリンバイオテクノロジー学会 2013年6月1日 沖縄県市町村自治会館(沖縄県那覇市)

高野博之、内匠正太、塩崎一弘、杉山靖正、古川龍彦、小松正治
発がんプロモーターであるマイクロシスチン LR はアノキス抵抗性を誘導する
第35回 日本分子生物学会 2012年12月13日 マリンメッセ福岡(福岡県福岡市)

堂免康人、森山 史、高野博之、直江昌宏、塩崎一弘、山田章二、杉山靖正、林 征一、小松正治
魚類血清を用いた代替細胞培養法の検討
平成24年度 日本水産学会秋季大会 2012年9月16日 水産大学校(山口県下関市)

前川継徳、池田麻美、安部洋平、加治屋夏希、小松正治、山田章二、塩崎一弘
サメ筋肉に由来する健康機能性ペプチドの探索
平成24年度 日本水産学会秋季大会 2012年9月16日 水産大学校(山口県下関市)

竹下一輝、池田麻美、原崎裕介、松下直人、小松正治、山田章二、宮城妙子、塩崎一弘
メダカシアリダ ゼ Neu3a、Neu3b の神経細胞分化に与える影響
平成24年度 日本水産学会秋季大会 2012年9月15日 水産大学校(山口県下関市)

南謙太郎、山本雅達、小松正治、池田龍二、新里能成、田畑祥、秋山伸一、古川龍彦
DEC2 による gemcitabine 耐性膵癌細胞の耐性抑制
第16回(平成24年度)日本がん分子標的治療学会学術集会 2012年6月28日 西日本総合展示場 AIM3F(福岡県北九州市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://marinechemicalbiology.jimdo.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小松正治(Masaharu Komatsu)
鹿児島大学・水産学部・准教授
研究者番号: 30325815