

論 文 要 旨

Involvement of reactive oxygen species in Microcystin-LR induced cytogenotoxicity

Microcystin-LR による細胞遺伝毒性誘発における
活性酸素の関与

農 清清

【序論および目的】

マイクロシスチン-LR (MCLR) はアオコが産生する環境毒素である。MCLR はプロテインホスファターゼ (PP) 1 および PP2A を特異的に阻害し、急性の肝不全を誘発する。また慢性的な曝露により肝がんを誘発する発がんプロモーターと考えられている。MCLR は PP の阻害だけでなく、酸化ストレスを介し、細胞毒性を誘発すると報告されているが、酸化ストレスの誘発機構は明らかになっていない。ヒト肝がん細胞株 HepG2 はヒト肝臓と類似する代謝系を有し、活性酸素産生系の酵素 cytochrome P 450 や消去系の酵素等を発現するため、HepG2 を使うことにより、ヒト肝における MCLR の影響を予測することができる。本研究では、ヒト肝類似の代謝を有する HepG2 細胞を用い、MCLR が HepG2 細胞にどのような影響を及ぼすか、その影響は酸化ストレスと関連があるかを詳細に解析し、なぜ酸化ストレスが誘発されるかも検討した。

【材料および方法】

ヒト肝がん細胞、HepG2 は実験処理を行う培養器具に入れ、CO₂ インキュベーターで 24 時間培養した。その後、MCLR と活性酸素スカベンジャーである catalase、superoxide dismutase (SOD)、deferoxamine を添加し、一定時間培養後、細胞毒性を MTT アッセイ並びに LDH release assay で測定した。細胞周期はフローサイトメーターで解析し、同時にアポトーシスも解析した。DNA 損傷は、コメットアッセイで DNA 鎖切断を計測し、酸化的 DNA 損傷は抗 8-hydroxydeoxyguanosine (8OHdG) 抗体を用い、免疫学的に評価した。細胞膜の脂質過酸化物は、蛍光プローブ diphenyl-1-pyrenylphosphine (DPPP) を用いて測定した。細胞内活性酸素量は蛍光プローブ 2-[6-(4'-hydroxy)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acid (HPF) を用いて測定した。Cytochrome P 450 の isoforms である CYP1A1、1A2、2E1 の mRNA 発現量は、real-time PCR で解析した。CYP2E1 を抑制する目的で、chlormethiazole (CMZ) と diallyl sulphide (DAS) を用いた。

【結果】

MCLR は濃度依存的、時間依存的に細胞毒性を誘発した。MCLR は G0/G1 期で cell cycle arrest を起こすと同時に、アポトーシスも誘発した。高濃度 MCLR は DNA 鎖切断を誘発した。抗 8OHdG 抗体を用いた免疫染色では、8OHdG 産生量が MCLR 濃度に依存して増加した。MCLR は細胞膜脂質過酸化も増加させた。また、活性酸素スカベンジャーは、MCLR により誘発される DNA 鎖切断、8OHdG、脂質過酸化並びに LDH release を抑制した。MTT アッセイを用いて解析した MCLR の細胞毒性は、活性酸素スカベンジャーにより部分的に抑制された。活性酸素スカベンジャーは MCLR により誘発される cell cycle arrest を抑制しなかったが、アポトーシスは抑制した。MCLR は細胞内の活性酸素産生量を増加させた。MCLR は CYP1A1 の mRNA 発現量には影響を与えなかったが、CYP2E1 の mRNA 発現量は増加させた。CYP2E1 阻害剤である CMZ と DAS は、MCLR により誘発される細胞内活性酸素の増加並びに LDH release を抑制した。

【結論及び考察】

環境中に存在する肝臓毒である MCLR は、ヒト肝がん細胞株の HepG2 の活性酸素産生量を増加させ、DNA 鎖切断、酸化的 DNA 損傷並びに脂質過酸化を誘発した。活性酸素スカベンジャーは MCLR により誘発される DNA 損傷、脂質過酸化並びに細胞毒性を有意に抑制した。これらの結果から、MCLR の細胞遺伝毒性は酸化ストレスと密接に関連することが明らかになった。また MCLR は CYP2E1 の mRNA 発現量を増加させ、CYP2E1 阻害剤は MCLR により誘発される活性酸素産生並びに細胞毒性を抑制したため、MCLR は CYP2E1 の誘導を介して酸化ストレスを誘発することが示唆された。本研究で、MCLR がヒト肝がん細胞株に酸化ストレスを誘発し酸化損傷を誘発することを明確に示すことができ、さらに MCLR による酸化ストレス誘発機構を提示することができた。今後、MCLR による CYP2E1 の誘導機構の解明、MCLR の肝毒性発現における酸化ストレスとタンパク質のリン酸化の perturbation の関係を明らかにすることが必要と考える。

(Free Radical Research 印刷中)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 25 号		学位申請者	農 清清
審査委員	主査	嶽崎 俊郎	学位	博士 (医学)
	副査	秋葉 澄伯	副査	秋山 伸一
	副査	坪内 博仁	副査	丸山 征郎
<p>Involvement of reactive oxygen species in Microcystin-LR-induced cytogenotoxicity (Microcystin-LR による細胞遺伝毒性誘発における活性酸素の関与)</p> <p>Microcystin-LR (MCLR) はアオコが産生する環境毒素で、肝発がん物質と考えられている。MCLR は酸化ストレスを介し、細胞毒性を誘発すると報告されているが、酸化ストレスの誘発機構は明らかになっていない。ヒト肝がん細胞株 HepG2 はヒト肝細胞と類似した代謝系を有し、活性酸素産生系の cytochrome P450 や消去系の酵素等を発現する。MCLR は肝毒性を有するため、肝臓と類似する代謝系を有する細胞を使うことにより、肝における MCLR の影響を推測することができる。</p> <p>本研究では、HepG2 細胞を用い、MCLR が HepG2 細胞にどのような影響を及ぼすか、その影響は酸化ストレスと関連があるかを詳細に解析し、なぜ酸化ストレスが誘発されるかも検討した。学位申請者らは、MTT アッセイ並びに LDH release assay を用いて細胞毒性を測定した。細胞周期はフローサイトメーターで解析し、同時にアポトーシスも解析した。DNA 損傷は、コメットアッセイで DNA 鎖切断を計測し、酸化的 DNA 損傷は抗 8-hydroxydeoxyguanosine (8OHdG) 抗体を用い、免疫組織学的に評価した。細胞膜の脂質過酸化物は、蛍光プローブ diphenyl-1-pyrenylphosphine (DPPP) を用いて測定した。細胞内活性酸素量は、蛍光プローブ 2-[6-(4'-hydroxy) phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl] benzoic acid (HPF) を用いて検出した。Real-time PCR により cytochrome P450 分子種の mRNA 発現を測定した。</p> <p>本研究で以下の点が明らかになった。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. MCLR は活性酸素の産生を増加させ、酸化的 DNA 損傷並びに脂質過酸化を誘発した。 2. 活性酸素スカベンジャーは MCLR により誘発される DNA 損傷、脂質過酸化並びに細胞毒性を有意に抑制したため、活性酸素の関与が考えられた。 3. MCLR は CYP2E1 の mRNA 発現を増加させた。CYP2E1 阻害剤は、MCLR により誘発される細胞内活性酸素の増加並びに LDH の遊離を抑制したため、CYP2E1 の関与が示唆された。 4. MCLR は細胞周期を停止させた。これは活性酸素スカベンジャーで抑制されなかった。細胞周期の停止は活性酸素ではなくリン酸化の変化で発生すると推測された。 <p>本研究で、MCLR がヒト肝がん細胞株に酸化ストレスを誘発し酸化損傷を誘発することを明確に示すことができ、さらに MCLR による酸化ストレス誘発機構を提示することができた。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。</p>				

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 25 号		学位申請者	農 清清	
審査委員	主査	嶽崎 俊郎		学位	博士 (医学)
	副査	秋葉 澄伯		副査	秋山 伸一
	副査	坪内 博仁		副査	丸山 征郎
<p>主査および副査の5名は、平成19年12月5日、学位申請者 農 清清 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) 実験で用いた MCLR 濃度は環境中の濃度と比べてどうか? 正常肝細胞に近い Chang liver cell で検討したらどうか?</p> <p>(回答) HepG2 細胞毒性を誘発するため、環境中の濃度と比べて高い濃度を用いた。Chang liver cell は MCLR に対する感受性が不明である。</p> <p>質問2) MCLR の細胞からの排出機構は? HepG2 と正常肝細胞とで、MCLR の排出機構は異なるか?</p> <p>(回答) MCLR は肝細胞でグルタチオンやシステインと結合して排出される。HepG2 はヒト肝臓と類似する代謝系を有するため、HepG2 と正常肝細胞とで、MCLR の排出機構は類似であると考えられる。</p> <p>質問3) MCLR による細胞障害は apoptosis か necrosis か? DNA ladder や caspase 3 の活性はどうか?</p> <p>(回答) MCLR による細胞障害は apoptosis か necrosis かを Annexin V-FITC 染色で詳細に検討することが必要と考える。文献では DNA ladder が見られたが、caspase 3 の活性が減ったと報告されている。</p> <p>質問4) CYP2E1 の発現が上昇することにより、なぜ細胞毒性が誘発されるか?</p> <p>(回答) CYP2E1 は酵素反応を介してあるいは NADPH oxidase 様活性を介し、活性酸素を産生すると報告されている。MCLR は活性酸素産生を高めて、活性酸素を介して細胞障害を引き起こすと考える。</p> <p>質問5) なぜ MCLR は他の臓器のがんではなく、肝がんを誘発するか?</p> <p>(回答) 肝細胞特異性は肝細胞に発現している有機アニオン類取り込みタンパク質 (OATP) が関与する。環境中に存在する MCLR の濃度では肝細胞にしか取り込まれないため、肝がんを発生すると考えられる。</p> <p>質問6) MCLR は細胞内で CYP 等で代謝されるか?</p> <p>(回答) 不明である。</p> <p>質問7) 中国の広西地域では肝がんが多いというが、HBV の感染はどうか? 肝発がんにおいて、HBV と MCLR の相互作用はあるか?</p> <p>(回答) 中国の広西地域では肝がんが多発するが、HBV の感染が関わりと報告されている。しかし、肝発がんの動物実験では、HBV と MCLR の相互作用は認められなかったと報告されている。</p> <p>質問8) DNA に double strand breaks (dsb) が誘発されれば、細胞周期の停止が引き起こされる。活性酸素で dsb が誘発されるのであれば、活性酸素スカベンジャーで細胞周期停止が抑制されると思うが、なぜ抑制されないか?</p> <p>(回答) Comet assay で検出された DNA strand breaks は主に軽度の損傷であることから、細胞周期停止は DNA strand breaks 以外の経路で誘発すると考えられる。</p> <p>質問9) Radiation による apoptosis では Bax や Bcl-2 が誘導されるが、MCLR ではどうか?</p> <p>(回答) MCLR による apoptosis では Bax が誘導されたが、Bcl-2 の誘導は認められないと報告されている。</p> <p>質問10) 細胞周期への影響を検討する場合、MCLR 添加時期を変えて検討すると良いと思うが、検討したか?</p> <p>(回答) 検討していない。</p>					

最終試験の結果の要旨

質問 1 1) MCLR は肝毒性を有するが、他の臓器や細胞にも毒性を有するか？なぜ肝に強い毒性を有するか？

(回答) MCLR は肝毒性を有するが、腎臓や腸の細胞などにも毒性を有する。MCLR の肝毒性には OATP を介した選択的肝細胞内取り込みが関与すると考える。

質問 1 2) HepG2 はどのような機構で MCLR を取り込むか？

(回答) HepG2 は pinocytosis で MCLR を取り込むという報告があるが、詳細は不明である。

質問 1 3) HPF 実験で、MCLR が増加させた活性酸素はわずかであると思われるが、増加した活性酸素のレベルで MCLR の毒性が説明できるか？

(回答) HPF のバックグラウンド蛍光がどのくらいか不明なため、MCLR がどのくらい活性酸素を増加させたかは不明である。活性酸素スカベンジャーが障害を抑制したため、MCLR が増加させた活性酸素を介して細胞障害を引き起こされたと考える。

質問 1 4) CYP2E1 の実験では 2 種類の阻害剤を使っているが、それぞれの特異性はどうか？

(回答) CYP2E1 阻害剤である Chlormethiazole は mRNA および蛋白質レベルで CYP2E1 を特異的阻害するという報告がある。Diallyl sulphide は CYP2E1 を阻害するとともに、CYP3A1 あるいは CYP3A2 の阻害を示唆する報告がある。

質問 1 5) 動物実験で、MCLR は肝障害を誘発するか？慢性毒性実験での肝組織はどのようになっているか？

(回答) MCLR は肝障害を誘発する。慢性毒性実験で、肝臓小葉中心性リンパ球、マクロファージ、好中球浸潤、繊維化、アポトーシス、脂肪変性が見られたと報告されている。

質問 1 6) 日本でも飲料水に MCLR が混入する可能性はあるか？

(回答) 日本でも飲料水に MCLR が混入する可能性はある。

質問 1 7) 初代肝細胞に毒性を誘発する MCLR の濃度はどのくらいか？

(回答) 初代肝細胞では 1 μ M で毒性を誘発したと報告されている。

質問 1 8) MCLR は HepG2 に時間依存的障害を誘発したが、細胞は経時的に形態学的にどのように変化したか？

(回答) MCLR 処理すると、経時的に細胞数が減った。一部の細胞は丸くなり、ディッシュから剥がれた。

質問 1 9) CYP2E1 の発現が誘導されたが、MCLR 添加後何時間で検討したか？

(回答) 4 時間で検討した。

質問 2 0) 酸化ストレスの評価に DPPP や HPF を用いているが、これらは酸化ストレスの信頼できる評価プローブか？

(回答) Major journal で認められた方法であり、酸化ストレスを検出・評価できる方法である。

質問 2 1) Cytogenotoxicity という用語を用いているが、なぜこの用語を用いたか？

(回答) MCLR が細胞障害と DNA 損傷を誘発したため、Cytotoxicity と genotoxicity をあわせて表現した。

質問 2 2) 肝がん予防を目指すとするれば、今回の実験結果のどのような点が肝がん予防に応用できるか？

(回答) 今回実験は急性毒性実験であり、肝がんの発症においては、MCLR の低濃度長期間暴露によって起こることが推測される。直接的には関連が薄いかもしれないが、酸化ストレスを制御することで、予防に繋がる可能性はある。しかし、まず飲料水から MCLR を除去、アオコの発生抑制を検討すべきである。

質問 2 3) 飲料水から MCLR を除去する方法は？

(回答) 活性炭濾過・オゾン処理・紫外線照射処理などにより飲料水から MCLR を除去できる。

質問 2 4) 活性酸素スカベンジャーが MCLR の毒性抑制に有効であったが、ビタミン類やカテキン類にも効果があるか？

(回答) 動物実験で、ビタミン E やビタミン C やカテキン類にも効果があると報告されている。

質問 2 5) MCLR は DNA 付加体を形成するか？

(回答) 報告がない。

質問 2 6) MCLR は藻類が放出する exotoxin か？Toll-like receptor のリガンドになるか？

(回答) MCLR は藻類が放出する exotoxin である。Toll-like receptor のリガンドになりうるかについては報告がない。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。