

研究区分	教員特別研究推進 地域振興
------	---------------

研究テーマ	化学物質のオートファジー活性への影響と肝毒性発現との関連性に関する研究				
研究組織	代 表 者	所属・職名	薬学部・助教	氏名	保坂 卓臣
	研究分担者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	吉成 浩一
		所属・職名	薬学部・講師	氏名	志津 怜太
		所属・職名		氏名	
	発 表 者	所属・職名	薬学部・助教	氏名	保坂 卓臣

講演題目
化学物質によるオートファジー阻害と反復投与毒性試験における毒性所見の発現との関連性
研究の目的、成果及び今後の展望
オートファジーとは、隔離膜によって細胞質成分や細胞小器官を包み込んだ後、リソソームと融合することでそれらを加水分解する細胞内分解システムである。近年、オートファジーは、肝臓において飢餓応答、恒常性維持、腫瘍抑制などの重要な役割を担うことが明らかとなった。肝特異的オートファジー欠損動物は、肝がん、非アルコール性脂肪性肝疾患、肝肥大などを発症することが報告されていることから、オートファジーを阻害する化学物質は肝がんや肝脂肪化、肝細胞肥大などを引き起こす可能性が考えられる。しかし、化学物質がオートファジーを阻害するか否かについて大規模な調査は行われておらず、化学物質によるオートファジー阻害と肝がんや肝脂肪化、肝細胞肥大などの発現との関連性は明らかではない。もし、関連性が認められた場合、オートファジー阻害を新たな肝毒性発現機序として提唱できると考え、本研究ではこの関連性の解明を目的とした。 被験物質にはラット 2 年間反復投与毒性試験結果を入手可能な農薬 222 種を用いた。オートファジーの進行に伴って分解され、オートファジーマーカーとして用いられている LC3 タンパク質を、HiBiT タグ融合タンパク質として発現するプラスミドをマウス肝細胞株 AML12 に導入し、被験物質を 100 μM で 24 時間処置した。100 μM 処置で細胞毒性を示した物質は、30 μM 又は 10 μM で処置した。細胞溶解液中の HiBiT タグ融合 LC3 による発光を定量し、被験物質処置群のオートファジー活性を溶媒対照群に対する相対値で示した(オートファジーが阻害されると相対値は上昇する)。オートファジー阻害の陽性対照物質として用いた Bafilomycin A1 による上昇分を 100%とした時、10%以上の上昇を示した物質をオートファジー阻害活性ありと判定した。オートファジー阻害と非遺伝毒性肝がん、肝脂肪化/空胞化、又はびまん性肝細胞肥大の発現との関連性を Fisher の正確確率検定により解析した。また、各所見の陽性及び陰性農薬のオートファジー阻害活性を Wilcoxon の順位和検定で比較した。 雌雄いずれかで非遺伝毒性肝がん、肝脂肪化/空胞化、及びびまん性肝細胞肥大を起こした農薬各 34、47、及び 37 種のうち 8 種 (24%)、20 種 (43%)、及び 16 種 (43%) がオートファジー阻害活性を示した。雌雄ともに非遺伝毒性肝がん、肝脂肪化/空胞化、及びびまん性肝細胞肥大を起こさなかった農薬各 188、175、及び 185 種のうち 59 種 (31%)、47 種 (27%) 及び 51 種 (28%) がオートファジー阻害活性を示した。Fisher の正確確率検定の結果、非遺伝毒性肝がんとオートファジー阻害との間に有意な関連は認められなかった一方、肝脂肪化/空胞化又はびまん性肝細胞肥大とオートファジー阻害との間に有意な関連が認められた ($p < 0.05$)。また、Wilcoxon の順位和検定の結果、肝脂肪化/空胞化に関してのみ有意差が認められ、オートファジー阻害活性は肝脂肪化/空胞化陽性農薬の方が陰性農薬よりも有意に強かった ($p < 0.05$)。以上より、オートファジーを阻害する化学物質は肝脂肪化/空胞化やびまん性肝細胞肥大を引き起こしやすいことが示された。これはオートファジー阻害が化学物質による肝毒性の新たな発現機序となりうることを示唆するものである。