

平成30年6月25日現在

機関番号：82101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21611

研究課題名(和文)胎児期ヒ素曝露により多世代にわたり増加する肝腫瘍への細胞老化の関与

研究課題名(英文)The involvement of cellular senescence in hepatic tumors that increase through multiple generations by gestational arsenite exposure

研究代表者

岡村 和幸 (Okamura, Kazuyuki)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・研究員

研究者番号：50736064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：天然由来の環境化学物質である無機ヒ素は慢性ヒ素中毒により肝臓がんを引き起こすことが報告されている。我々はこれまでにC3Hマウスを用いた動物実験によって、妊娠期に無機ヒ素曝露を行うことで生まれてきた仔、孫世代の雄に後発的に肝腫瘍が増加することを見出したが、その機序は未解明である。本研究では、機序として細胞老化に着目し、ヒ素曝露によるF1の肝腫瘍増加には活性酸素除去酵素の遺伝子発現減少による酸化ストレスの増加、F2ではTgf-経路の活性化を介した細胞老化の増加が後発的な肝腫瘍増加に関与する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Arsenite exposure has been known to induce liver cancer. Our previous study revealed that gestational arsenite exposure induced hepatic tumor increase in C3H F1 and F2 male mice, however, the mechanisms remain unknown. In this study, our data suggested that the gestational arsenite exposure-induced cellular senescence in F1 and F2 hepatic tumors via reduction of antioxidative enzymes and activation of Tgf- pathway, respectively, are involved in hepatic tumor increase.

研究分野：環境毒性学

キーワード：ヒ素 多世代影響 細胞老化 酸化ストレス Tgf- 妊娠曝露

1. 研究開始当初の背景

天然由来の環境化学物質である無機ヒ素は、慢性ヒ素中毒によって肝がんを引き起こすことが知られている (Hughes et al., 2011)。当研究室におけるこれまでの動物実験において、C3H マウスの妊娠期 8-18 日目 (gestational day 8-18 (GD8-18)) に亜ヒ酸ナトリウム 85 ppm を含む水を自由飲水させることで、仔 (F1)、孫 (F2) 世代の雄において後発的に肝腫瘍が増加することが明らかになった。しかしなぜ妊娠期ヒ素曝露によって、F1、F2 世代で肝腫瘍が増加するか、その機序は不明であった。

一方で、肝腫瘍形成の機序として細胞老化の関与が報告されていた。細胞の老化は不可逆的な細胞増殖の停止で定義され (Sikora et al., 2011)、体細胞は細胞分裂の度に染色体末端の繰り返し配列であるテロメアが短縮し、分裂を繰り返すことで一定以上短くなると分裂が停止する。これを細胞の複製老化と呼ぶ。また細胞は酸化ストレスや DNA 損傷、Tgf- β 経路の活性化を受けることで、複製老化がおこるよりも早い段階で細胞老化 (早期細胞老化) がおこることが報告されている (Kuilman et al., 2010)。ヒ素は酸化ストレスや DNA 損傷を誘導することが報告されていることから (Hughes et al., 2011)、早期細胞老化を誘導する可能性が考えられる。

老化した細胞は、自身の増殖が停止することから、これまでがん抑制の役割が報告されてきた (Hanahan and Weinberg, 2000)。しかしながら近年、細胞老化は老化した細胞が産生する SASP (senescence-associated secretory phenotype) と呼ばれる炎症性サイトカインなどの刺激によって、周囲の細胞の増殖を促進し、臓器レベルでがんを誘導することが報告された (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007)。さらにヒ素曝露によりがんを発症する臓器 (Hughes et al., 2011) と、細胞老化が蓄積する臓器 (Muñoz-Espín and Serrano, 2014) を比較すると、肝臓を含め共通する臓器が多いことからヒ素曝露による発がんは細胞老化が関与することが考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、妊娠期ヒ素曝露による肝腫瘍形成促進作用が疑われる細胞老化に着目し、特に以下の4点を明らかにすることを目指した。

(1) 妊娠期ヒ素曝露により F1、F2 の肝腫瘍組織において細胞老化および SASP 因子が増加しているか。

(2) ヒ素曝露による肝腫瘍における細胞老化の増加機序は何か。特にテロメア長、酸化ストレス、DNA 損傷修復経路、Tgf- β 経路に着

目した。

(3) 肝臓を構成する細胞のうち、どの細胞に細胞老化がおこるか。

(4) (2) で検討した細胞老化を誘導する因子を胎児期から経時的に観察することで、どの因子がいつから変化するか、F1 と F2 に差異が認められるか。

3. 研究の方法

2. で述べた目的に対応した研究の方法を下記に記載した。

(1) 対照群およびヒ素曝露群の C3HF1、F2 マウス雄約 80 週齢の肝臓から RNA を抽出し、cDNA 合成 (逆転写) 後、細胞老化マーカー *p16*、*p21*、*p15* の遺伝子発現量を Real-time PCR 法を用いて測定した。内在性コントロールとして 18S リボソーム RNA を使用した。測定は対照群・ヒ素曝露群それぞれの正常肝組織 (N)、腫瘍をもった個体肝臓の非腫瘍組織 (TN)、腫瘍組織 (TT) 計 6 群に対して行った。多群間比較のための統計処理として Tukey-Kramer 法を用いた。また F1、F2 腫瘍部において SASP 因子として *Gro- α* 、*Mmp14* の遺伝子発現量を測定した。2 群間の比較には t 検定を行った。

(2) (1) で得た対照群、ヒ素曝露群の腫瘍組織の cDNA を用いて、酸化ストレス除去酵素 *Sod1*、*Sod2*、*Cat*、DNA 損傷修復経路 *Ape1*、Tgf- β 経路 *Tgf- β 1*、 *β 2*、 *β R1*、 *β R2* の遺伝子発現量を測定した。また、テロメア長の測定は Cawthon, 2002 や O'Callaghan and Fenech, 2011 を参照に行った。具体的には C3H F1、F2 マウス雄約 80 週齢の肝臓から gDNA を抽出し、5 ng/ μ l に希釈後、Qubit を用いて濃度測定を行い、その後 gDNA 20 ng を使用し Real-time PCR 法を用いて測定を行った。*36b4* を標準化のための単一遺伝子として用いた。2 群間の比較には t 検定を用いた。

(3) 対照群およびヒ素曝露群の C3H F2 マウス雄約 80 週齢の肝臓から凍結切片およびパラフィン包埋切片を作製し、p15 の免疫染色を行った。また、連続切片もしくはミラー切片を用いて細胞増殖マーカー Ki-67、細胞膜マーカー pan-Cadherin、肝星細胞マーカー Desmin の免疫染色を行った。核は DAPI を用いて染色した。

(4) C3HF1、F2 マウス雄 GD18 (雌雄は Sry 遺伝子の PCR を行うことによって判別)、F1 雄 23-25 週齢、F2 雄 11-13 週齢における活性酸素除去酵素、Tgf- β 経路の遺伝子発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) 妊娠期ヒ素曝露による F1、F2 肝腫瘍組織における細胞老化マーカーの遺伝子発現増加

まず初めに妊娠期ヒ素曝露によって後発的に増加する肝腫瘍において細胞老化が増加しているかを検討するために、F1 の約 80 週齢において細胞老化マーカー *p16*、*p21*、*p15* の遺伝子発現量を測定した。その結果、検出した全ての細胞老化マーカーの遺伝子発現量が腫瘍組織 (TT) において正常組織 (N)、非腫瘍組織 (TN) と比較して増加しており、特に *p21* と *p16* は対照群の腫瘍組織と比較してヒ素曝露群の腫瘍組織において有意に発現が増加していた。

次に F2 の約 80 週齢において同様の測定を行った。その結果、F1 と同様に全ての細胞老化マーカーの遺伝子発現量が腫瘍組織 (TT) において増加していた。しかし対照群とヒ素曝露群の腫瘍組織で *p21*、*p16* の発現量に差は認められなかった。一方で、*p15* の遺伝子発現量が対照群の腫瘍組織と比較してヒ素曝露群の腫瘍組織で有意に増加していた。

以上の結果から、妊娠期ヒ素曝露によって F1 では *p21*、*p16* 増加、F2 では *p15* 増加を介した細胞老化の誘導が腫瘍部において増加している可能性が考えられた。

SASP 因子の遺伝子発現変化の測定

次に腫瘍部における SASP 因子の遺伝子発現量を測定した。その結果、特に F2 の腫瘍組織において対照群と比較してヒ素曝露群で *Gro-α* および *Mmp14* の遺伝子発現量が有意に増加することが明らかになった。

(2) 細胞老化誘導因子の検討

酸化ストレスの関与

妊娠期ヒ素曝露によって F1、F2 の腫瘍部で増加する細胞老化の誘導因子の検討を行った。これまでに酸化ストレスによって細胞老化が誘導されることが報告されているため (Kuilman et al., 2010)、酸化ストレスの関与を検討した。腫瘍組織における対照群とヒ素曝露群の比較を行ったところ、F1 では活性酸素除去酵素である *Sod1*、*Sod2*、*Cat* の有意な遺伝子発現の減少が観察された。一方で、F2 肝腫瘍組織において対照群とヒ素曝露群を比較しても両群に有意な差は認められなかった。

Tgf-β 経路の関与

次に、酸化ストレスの他に Tgf-β も細胞老化を誘導することが報告されているため、

Tgf-β 経路の遺伝子発現量を測定した。その結果、F1 ではヒ素曝露群のうちいくつかのサンプルで *Tgf-β1*、*β2* の高い発現を示したが、測定したサンプル全体で比較すると *Tgf-βR1* 以外有意な差は認められなかった。一方、F2 では *Tgf-β1*、*βR1*、*βR2* の遺伝子発現量がヒ素曝露群で有意に増加していた。

テロメア長の関与

次にテロメア長の変化の測定を行ったが、F1、F2 共にテロメア長は対照群とヒ素曝露群を比較して有意な差は認められなかった。

DNA 損傷修復経路の関与

DNA 損傷修復経路として *Apel* の遺伝子発現変化を検討したが、対照群とヒ素曝露群を比較して差は認められなかった。

以上の結果から、妊娠期ヒ素曝露によって F1 では活性酸素除去酵素の発現低下を介した酸化ストレスの増加による *p16*、*p21* の増加、F2 では F1 と異なり Tgf-β 経路の活性化による *p15* の増加が細胞老化を増加させ、腫瘍形成を促進する可能性が考えられた。

(3) 肝腫瘍組織における細胞老化マーカーの局在の検討

次に F1、F2 で増加する細胞老化マーカーが肝臓を構成する細胞のどこに局在するかを明らかにするため、肝腫瘍の組織切片を用いた免疫染色を行った。検討の結果、*p15* が F2 の腫瘍部において細胞膜もしくは肝星細胞に発現している可能性が高まった。

また、連続切片を用いて細胞増殖マーカーの Ki-67 の局在を検討したところ、*p15* が高発現している部分の周辺で Ki-67 陽性細胞が見られる箇所が見つかった。

さらに *p15* が細胞膜、肝星細胞どちらに局在しているかを明らかにするために連続切片やミラー切片を用いて、*p15* と肝星細胞マーカー *Desmin* または細胞膜マーカー *pan-Cadherin* の免疫染色を行った。しかし、明確に *p15* の局在を明らかにすることは出来なかった。

(4) 細胞老化を誘導する因子の経時的な遺伝子発現変化の測定

F1 の GD18、23-25 週齢の正常肝組織において、活性酸素除去酵素の遺伝子発現量を測定した。その結果、F1 の GD18 において *Sod1*、*Sod2* の遺伝子発現量がヒ素曝露群で対照群と比較して有意に減少していた。しかし、その変化は 23-25 週齢では観察されなかった。

F1 の GD18 における *Sod1*、*Sod2* の発現低下は後発的な肝腫瘍形成の促進に関わる可能性が考えられるが、生後継続して維持されるものではないことが明らかになった。

一方、妊娠期ヒ素曝露を行った F2 の約 80 週齢肝腫瘍組織における Tgf-β 経路の活性化に関しても、GD18 および 11-13 週齢における正常肝組織の遺伝子発現量を測定し、経時変化を観察した。その結果、対照群とヒ素曝露群の間で顕著な遺伝子発現変化は観察されなかった。このことから妊娠期のヒ素曝露による F2 肝腫瘍組織における Tgf-β 経路の活性化は腫瘍特異的な作用であり、何らかの因子がその経路を後発的に活性化させることが示唆された。

なお、今回の検討により活性酸素除去酵素の遺伝子発現量は GD18 より生後の方が高く、逆に Tgf-β 経路の遺伝子発現量は GD18 の時に高いことが明らかになった。

(5) まとめ

本研究の結果、妊娠期の無機ヒ素曝露によって F1、F2 で増加する肝腫瘍において細胞老化が誘導される可能性が示唆された。また、その誘導経路は F1 が活性酸素除去酵素の低下に伴う酸化ストレスの増加、F2 が Tgf-β 経路の活性化であることが示唆された。F1 と F2 で経路が異なるのは妊娠期のヒ素曝露時、F1 は胎児での全身曝露、F2 は F1 胎児中の始原生殖細胞の曝露で曝露経路が異なることによる違いであることが考えられる。F1 における活性酸素除去酵素の遺伝子発現低下は GD18 の段階で認められたが、23-25 週齢になると対照群と比較して差が見られなくなることから、胎児期でおこった遺伝子発現変化が成長後も継続するわけではないことが明らかになった。F1、F2 における後発的な肝腫瘍形成の引き金になる変化はがん幹細胞のような 1 細胞レベルでおきている可能性があり、今後は肝臓全体の解析のみならず、1 細胞ごとの解析等、より詳細な解析が必要であると考えられる。

<引用文献>

- ① Hughes et al., Arsenic Exposure and Toxicology: A Historical Perspective., *Toxicol Sci.* 2011;123:305-32.
- ② Sikora et al., Impact of cellular senescence signature on ageing research., *Ageing Res Rev.* 2011;10:146-52.
- ③ Kuilman et al., The essence of senescence., *Genes Dev.* 2010;24:2463-79.
- ④ Hanahan and Weinberg, The hallmarks of cancer., *Cell.* 2000;100:57-70.
- ⑤ Campisi and d'Adda di Fagagna, Cellular senescence: when bad things happen to good cells., *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:729-40.

⑥ Muñoz-Espín and Serrano, Cellular senescence: from physiology to pathology., *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15:482-96.

⑦ Cawthon, Telomere measurement by quantitative PCR., *Nucleic Acids Res.* 2002;30:e47.

⑧ O'Callaghan and Fenech, A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length., *Biol Proced Online.* 2011;13:3.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

(1) 岡村和幸, 野原恵子, 細胞老化に着目した妊娠期ヒ素曝露による孫世代肝腫瘍増加機序の解明、第 36 回 生体と金属・化学物質に関する研究会、2017 年

(2) 岡村和幸, 鈴木武博, 野原恵子, 妊娠期ヒ素曝露により孫世代で増加する肝腫瘍への細胞老化の関与とその誘導因子、第 87 回日本衛生学会学術総会、2017 年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 和幸 (Okamura, Kazuyuki)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・研究員

研究者番号：50736064

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

野原 恵子 (Nohara, Keiko)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・フェロー

研究者番号：50160271

鈴木 武博 (Suzuki, Takehiro)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・主任研究員

研究者番号：60425494