

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2007～2008

課題番号：19510071

研究課題名（和文） 環境汚染と紫外線の複合影響が近年の皮膚発癌増加に及ぼす影響
ヒストン修飾との関連性研究課題名（英文） Multiple effects of environmental pollutants and ultraviolet light
on the recent increase of skin cancer -relationship with histone modification

研究代表者

伊吹 裕子 (IBUKI YUKO)

静岡県立大学・環境科学研究所・准教授

研究者番号：30236781

研究成果の概要：

環境汚染物質と太陽光（紫外線）の複合作用後の皮膚培養細胞中のヒストン修飾変化について検討した。その結果、環境汚染物質への光照射により、光酸化物質が産生し、それがヒストン H2AX およびヒストン H3 のリン酸化を引き起こすことを明らかにした。また、光酸化物質がアポトーシスを阻害し細胞をがん化させることを示した。ヒストン H3 のリン酸化は発がんに関与していることが報告されていることから、本成果は環境汚染物質への太陽光照射が、ヒストンの修飾変化をもたらす発がん性物質を生成しうることを示唆したものである。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：光環境学

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：ヒストン、リン酸化、複合影響、ヒストン H2X、ヒストン H3、エピジェネティクス、光、紫外線

1. 研究開始当初の背景

近年、皮膚がんの増加が多数報告されている。WHO(World Health Organization)によれば、世界で年間 132000 人が悪性黒色腫を発症し、66000 人が皮膚がんではなくなっている。悪性黒色腫はノルウェーやスウェーデンなどの北欧において過去 45 年で 3 倍、米国において 30 年で 2 倍の上昇が報告されている。これら皮膚がんの増加は、寿命の延長や、近年のライフスタイルの変化ならびに、オゾン

層破壊による有害紫外線量の増加の寄与するところが大きいと考えられている。一方、これら皮膚がんの増加は、先進国、都市部で多く見られるという報告がある。ライフスタイルの変化が原因と考えれば、先進国、都市部で多く見られるのはもっともであるが、我々は、その原因の一つには環境汚染が関与していると考えている。特に、環境汚染物質と太陽光の複合作用は、皮膚細胞の遺伝子損傷などを引き起こす、つまり発がん要因であ

るということが、ここ数年我々が見出した知見により明らかになっている。

エピジェネティック変化、中でも核内クロマチンの構造変化は特定の遺伝子群の誘導もしくは抑制を引き起こし、細胞の増殖、分化、死に関わっていることが最近になって明らかになりその研究は世界的に加速している。その代表的なものにヒストン修飾があり、中でも遺伝子の転写、発現に関係しているヒストンアセチル化が最もよく研究されている。また、ヒストンのアセチル化はヒストンのリン酸化と相互に作用していることも報告されている。環境化学物質によるヒストン修飾の変化についてはこれまで報告は少ない。

2. 研究の目的

本研究では、環境汚染物質と太陽光（紫外線）の複合作用による発がん誘導の可能性の有無を、培養皮膚細胞を用いてヒストン修飾という観点から検討した。

環境汚染物質と太陽光の複合作用は大きく2種に分けられる。一つは太陽光により酸化分解された化学物質の作用、もう一つは、両者が同時に又はそれぞれ作用した場合の作用である。我々は、両方に視点を置いて研究を進めているが、本報告書では紙面の都合上、前者の光分解物の影響に焦点を絞って報告する。特に今回は代表的な発がん物質である benzo[a]pyrene (BaP) の光酸化物とそれによるヒストン修飾、および発がんへの関与について報告する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

CHO-K1, A549細胞は理研細胞バンクより購入した。10%FBSを含むF12およびDMEM培地で培養し、対数増殖期の細胞を実験に使用した。また、NIH3T3細胞は10%CSを含むDMEM培地で培養した。

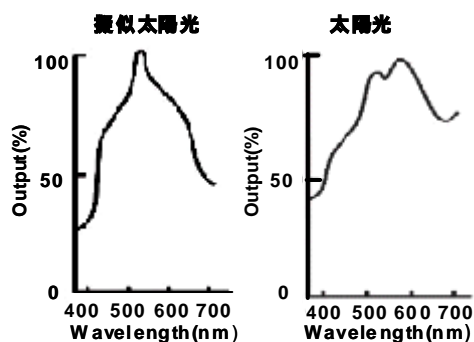


図1 擬似太陽光の波長スペクトル

(2) 光照射 BaP の調製

BaP に擬似太陽光を照射した。使用した擬似太陽光スペクトルを図1に示す。アセトンとメタノール混合溶液(8:3)に溶解した BaP を石英管に入れ、25 において擬似太陽光照射後、エバポレートし、最終濃度 13.2mM になるように DMSO に溶解、一定濃度に希釈後各細胞に作用させた。以後、擬似太陽光照射した BaP を LBaP (light-irradiated BaP) と記述する。

(3) ヒストン H2AX のリン酸化の検出

ヒストン H2AX のリン酸化は免疫染色法およびウエスタンブローディング法により行った。検出一次抗体には、anti-phospho-histone H2AX (ser139) (Upstate)を使用した。

(4) ヒストン H3 のリン酸化の検出

ヒストン H3 のリン酸化はウエスタンブローディング法により行った。検出一次抗体には、anti-phospho-histone H3 (ser10) (Upstate)を使用した。

(5) LBaP によるアポトーシスの阻害および細胞のがん化

血清除去および付着除去によりアポトーシスを誘導した NIH3T3 細胞に LBaP を 2 時間作用させ、洗浄後 24 時間の生存率を測定した。生存率は、fluoresceine diacetate の代謝を指標にフローサイトメーターにて測定した。また、LBaP 作用させ生存した NIH3T3 細胞を軟寒天培地中に撒き、足場非依存的増殖を測定した。

4. 研究成果

(1) LBaP によるヒストン H2AX のリン酸化

ヒストン H2AX のリン酸化は DNA 二本鎖切断 (DSBs) に伴い誘導されることが知られている。また、DNA アダクトが存在する場合にも、DNA の複製過程に生成することが報告されている。48 時間擬似太陽光照射した LBaP (~200 μ M) 作用後のヒストン H2AX のリン酸化の免疫染色像を図2に示す。LBaP 作用により、細胞核内にヒストン H2AX のリン酸化フォーカスが認められた。フォーカスが認められる細胞をヒストン H2AX リン酸化ポジティブ細胞としてカウントすると、図2下のグラフに示すように、非常に短時間に、濃度依存的にリン酸化されることが明らかになった。さらにウエスタンブローディングにおいても同様の結果が得られた(データ示さず)。

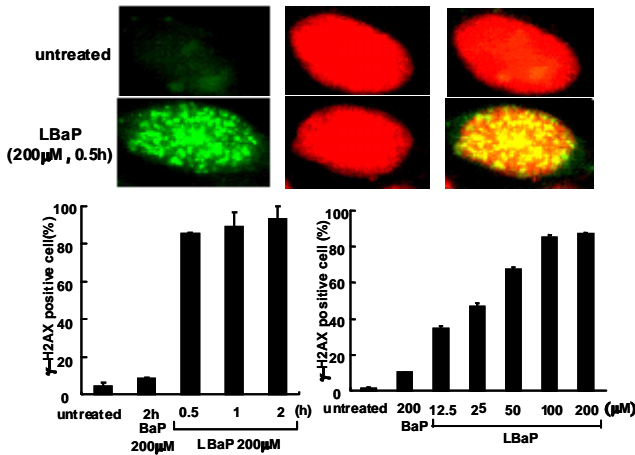


図2 LBaPによるヒストンH2AXのリン酸化

LBaP 作用により DSBs が急速に生成することが示され、LBaP が直接的に DSBs を誘導することが予想された。

また、この H2AX リン酸化は、LBaP からの活性酸素種の産生が原因であった。図 3 に示すように、抗酸化剤である N-acetylcysteine (NAC) により、H2AX のリン酸化は有意に抑制された。よって、LBaP からの活性酸素種の生成が DSBs を引き起こしたと考えられた。しかしながら、NAC 作用時に H2AX のリン酸化が完全にはなくなっていないことから、一部は LBaP が DNA にアダクトし、複製の際生成する DSBs である可能性が考えられた。DSBs は遺伝子の不安定性を起し、発がんに関連する DNA 損傷である。BaP では、ヒストン H2AX の誘導は認められなかったことから、BaP は光照射を受け、最も重篤な DNA 損傷を誘発する化学物質に変化していることが明らかになり、化学物質への光照射を考慮する重要性が示された。

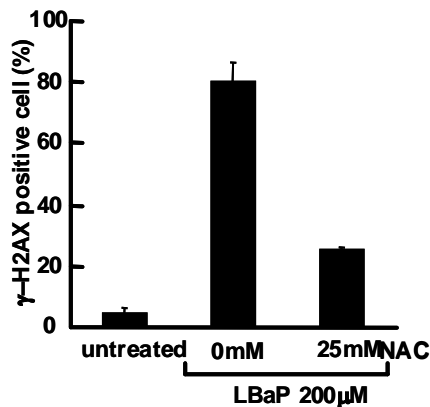


図3 H2AXリン酸化における活性酸素種の関与

(2) LBaP によるヒストン H3 のリン酸化

ヒストン H3(ser10)のリン酸化はプロモーション活性を担う proto-oncogene である *c-fos* や *c-jun* の誘導に関連している。48 時間擬似太陽光照射した LBaP (200 μM) 作用によるヒストン H3 のリン酸化を検討した (図 4)。LBaP 作用後、1.5~2 時間においてヒストン H3 のリン酸化が誘導された。また、このリン酸化は、LBaP 濃度依存的に上昇した (データ示さず)。前述したヒストン H2AX のリン酸化は LBaP からの活性酸素種の生成に起因していたが、ヒストン H3 のリン酸化については活性酸素種の産生が起因ではないことが、NAC を作用させてもその誘導に変化を与えないことから示された (データ示さず)。

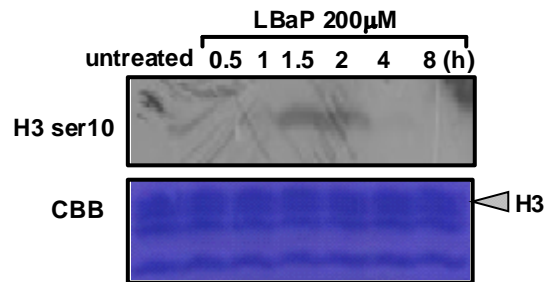


図4 LBaP作用後のヒストンH3(Ser10)のリン酸化

一方、mitogen-activated protein kinases (MAPK) の阻害剤である、U0126 (ERK 阻害剤)、SB203580 (p38 阻害剤) を作用させたところ、U0126 により明らかな誘導の阻害が認められたことから、LBaP によるヒストン H3 リン酸化は MAPK、なかでも ERK 経路を経て誘導されることが示唆された (図 5)。

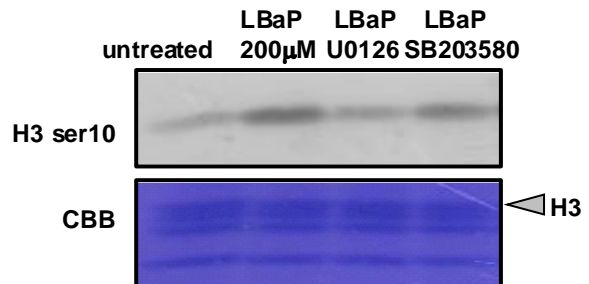


図5 MAPKを介したLBaPによるヒストンH3(Ser10)のリン酸化

ヒストン H3(ser10)のリン酸化は、ヒストン H3(Lys9)、ヒストン H3(Lys14)のアセチル化と相互に作用していることが報告されているので、現在、ヒストン H3(ser10)のリン酸化に伴うアセチル化についても検討中である。

(3) LBaPによるアポトーシス阻害とがん化

LBaP が DSBs を誘導すること、細胞増殖、がん化に関連する遺伝子の発現に与えているヒストン H3(ser10)をリン酸化することを明らかにし、照射された BaP の発がんへの関与が推察された。そこで、LBaP が本当に発がん性を有しているのかを検討した。その結果、ヒストン修飾変化との相関は明らかではないが、LBaP がアポトーシス誘導を阻害し、細胞をがん化させることを見出した。

図6に示すように、LBaPは血清除去、附着除去によるアポトーシスを濃度依存的に阻害した。

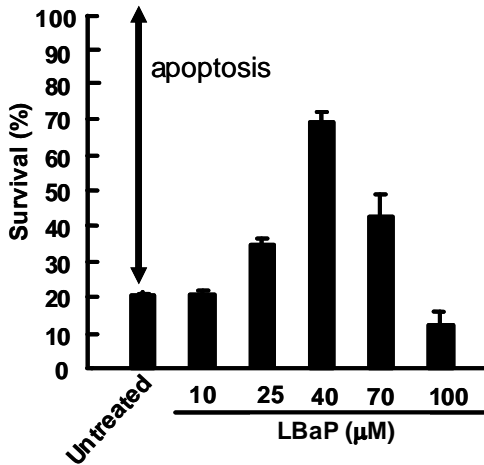


図6 LBaPによるアポトーシスの阻害

アポトーシスは変異した細胞を除去するための重要な機構である。抗アポトーシス分子である Bcl-2 の高発現等によるアポトーシスの阻害は、発がんにつながるものが数多く報告されている。LBaP 作用によりアポトーシスを逃れた細胞と正常の NIH3T3 細胞を軟寒天培地中に撒いたところ、アポトーシスを逃れた細胞において高いコロニー形成率が認められた(図7)。この結果は、LBaP によるアポトーシスの阻害が、正常の細胞を足場非依存的な増殖を起こすことができる細胞(がん化した細胞)に変異させる可能性を示唆していた。

さらにデータは示さないが、低血清培地中での増殖率の亢進が認められ、ヌードマウスへの移植実験においても高い腫瘍形成能を

示したことから、LBaP 作用により細胞ががん化することが確認された。前述したように LBaP は DNA 損傷を誘導するので、アポトーシス阻害効果は DNA 損傷を有した細胞を生存させることになり、細胞ががん化し易くなると考えられた。

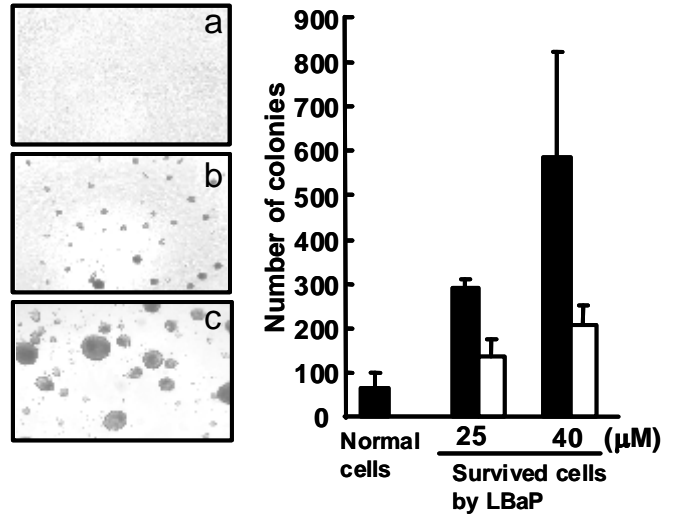


図7 LBaP作用により生存した細胞の足場非依存的増殖

a: 通常のNIH3T3細胞
b: 25μM LBaPによりアポトーシスを逃れた細胞
c: 40μM LBaPによりアポトーシスを逃れた細胞

(4) まとめ

これまで、BaP 等の多環芳香族炭化水素は代表的な発がん性物質とされ、その発がんメカニズムは代謝体による DNA 付加体形成と考えられてきた。本研究結果は、太陽光は BaP を修飾、酸化することにより、より高い毒性、発がん性を有する化合物に変化させること、ヒストンの修飾変化、アポトーシスの阻害など、DNA 付加体形成とは別のがん化を亢進する機構があることを示した。

(5) その他の研究成果

本報告書では、BaP の光照射物である LBaP の発がん性やヒストン修飾変化について検討した結果を記載した。本研究では、BaP 以外にも幾つかの環境汚染物質を使用して、太陽光照射によるヒストン修飾変化を検討した。幾つかの化学物質が光を照射することにより、前述したヒストン H2AX や H3 のリン酸化を誘導する化学物質に変化していることが明らかになった。また、今回は示すことができなかったが、光と化学物質を同時に作用させた場合にも同様のヒストン修飾変化が認

められた。

以上本研究において、光の存在下、環境汚染物質は酸化分解され DSBs のような重篤な DNA 損傷を誘導しうる化学物質に変化する場合があることを明らかにした。また、発がんに関連しているヒストンの修飾を誘導することを明らかにした。今後、様々な化学物質の複合作用や、様々なヒストン修飾変化を検証し、光と汚染物質の複合作用と発がんの関連を明らかにするとともに、光および汚染物質作用後 in vivo におけるヒストン修飾変化を検討予定である。

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 6件)

(1) T. Toyooka, and Y. Ibuki: Histone deacetylase inhibitor sodium butyrate enhances the cell killing effect of psoralen plus UVA by attenuating nucleotide excision repair. *Cancer Res.* 69, 3492-3500 (2009). 査読有

(2) M. Ishihama, T. Toyooka, Y. Ibuki: Generation of phosphorylated histone H2AX by benzene metabolites. *Toxicol. In Vitro*, 22, 1861-1868 (2008). 査読有

(3) Y. Ibuki, Y. Tani, T. Toyooka, UVB-Exposed Chlorinated Bisphenol A Generates Phosphorylated Histone H2AX in Human Skin Cells. *Chem. Res. Toxicol.* 21(9):1770-1776 (2008). 査読有

(4) T. Toyooka, G. Ohnuki and Y. Ibuki, Solar-simulated light-exposed benzo[a]pyrene induces phosphorylation of histone H2AX. *Mutat. Res.* 650(2):132-139 (2008). 査読有

(5) Y. Mutou, Y. Ibuki, Y. Terao, S. Kojima, R. Goto. Induction of apoptosis by UV-irradiated chlorinated bisphenol A in Jurkat cells. *Toxicol. In Vitro* 22(4):864-872 (2008). 査読有

(6) Y. Ibuki, M. Akaike, T. Toyooka and R. Goto, Akt-mediated intracellular oxidation after UVB irradiation suppresses apoptotic cell death induced by cell detachment and serum starvation. *Photochem. Photobiol.* 84(1):154-61 (2008). 査読有

[学会発表](計 9件)

(1) 豊岡達士、伊吹裕子: Histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate enhances the cell-killing effect of PUVA by attenuating nucleotide excision repair.

第 10 回静岡ライフサイエンスシンポジウム記念大会(静岡) 2009年3月.

(2) Shinmen T, Toyooka T, Ibuki Y: UVA irradiation enhances phosphorylation of histone H2AX induced by 9,10-phenanthrenequinone. 第 37 回日本環境変異原学会(沖縄), 2008年12月.

(3) Ibuki Y, Tani Y, Toyooka T: UVB-exposed chlorinated bisphenol A generates phosphorylated histone H2AX in human skin cells. 第 37 回日本環境変異原学会(沖縄), 2008年12月.

(4) Toyooka T, Ohnuki G, Ibuki Y: Solar-simulated light-exposed benzo[a]pyrene induces phosphorylation of histone H2AX 11th Asian Conference on Environmental Mutagens (Fukuoka), 2007年, 11月

(5) 豊岡達士、伊吹裕子: 化学物質の光毒性検出におけるリン酸化ヒストン H2AX の有用性 第 29 回日本光医学・光生物学会(富山), 2007年7月

(6) 寺西麻衣、豊岡達士、伊吹裕子: 光修飾を受けた多環芳香族炭化水素によるアポトーシスの阻害と発がんの関連性 第 29 回日本光医学・光生物学会(富山), 2007年7月

(7) 大貫剛、豊岡達士、伊吹裕子: 疑似太陽光照射した Benzo[a]pyrene の光照射産物によるヒストン H2AX のリン酸の誘導 変異機構研究会・第 20 回夏の学校(愛知), 2007年7月

(8) 寺西麻衣、豊岡達士、伊吹裕子: 多環芳香族炭化水素の光反応中間体によるアポトーシスの阻害と発がんの関連性 第 34 回日本トキシコロジー学会(東京), 2007年6月

(9) 大貫剛、豊岡達士、伊吹裕子: Benzo[a]pyrene の光反応中間体による DNA 二本鎖切断およびヒストン H2AX のリン酸化の誘発 第 34 回日本トキシコロジー学会(東京), 2007年6月

[産業財産権]

出願状況(計 1件)

豊岡達士、伊吹裕子：ヒストン高アセチル化
状態における光増感処理による腫瘍殺傷方
法．特願 2008-307283

6．研究組織

(1)研究代表者

伊吹 裕子 (IBUKI YUKO)
静岡県立大学・環境科学研究所・准教授
研究者番号：30236781

(2)研究分担者

豊岡 達士 (TOYOOKA TATSUSHI)
静岡県立大学・環境科学研究所・助教
研究者番号：40423842

大浦 健 (OOURA TAKESHI)
静岡県立大学・環境科学研究所・助教
研究者番号：60315851