

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2007～2008
課題番号：19590611
研究課題名（和文）ヒ素の転写因子調節作用に着目した免疫細胞特異的作用メカニズムと免疫毒性の解明
研究課題名（英文）Studies on the effect of arsenic on the transcription factors in immune cells

研究代表者
野原 恵子 (NOHARA KEIKO)
独立行政法人国立環境研究所・環境健康研究領域・室長
研究者番号：50160271

研究成果の概要：現在、天然の無機ヒ素による地下水汚染が原因の慢性ヒ素中毒が世界各国で問題となっている。ヒ素の慢性曝露は皮膚や肝臓などで発癌作用を示すが、免疫細胞では反対に、ヒ素が細胞増殖抑制作用を示すことが報告されている。本研究では、ヒ素が免疫細胞特異的に、細胞周期進行に関与する転写因子 E2F の標的遺伝子群の発現を抑制し、それによって細胞増殖を抑制することを明らかにした。さらにその原因として、ヒ素が E2F の機能を調節するポケットプロテインの中の P130 分子を安定化し、E2F 標的遺伝子群のプロモーター領域で P130 を含む転写抑制複合体の形成を促進するというヒ素によるユニークな転写抑制のメカニズムを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：無機ヒ素、免疫細胞、転写因子、E2F、ポケットプロテイン、p130

1. 研究開始当初の背景

天然の無機ヒ素による地下水汚染が原因の慢性ヒ素中毒が、インドやバングラデッシュをはじめとする世界各国で問題となっている。またヒ素化合物は鉱業の副産物や除草剤、防腐剤などとしてこれまでに環境中に大量に放出されており、近年では半導体産業においてガリウムヒ素などがさかんに使用され、ヒ素による環境汚染の生体影響が懸念さ

れる。

無機ヒ素の慢性曝露は、皮膚や肝臓、肺などで発癌作用を示すことが知られている。反対に免疫細胞においては、無機ヒ素はアポトーシスや細胞周期抑制を誘導して増殖抑制作用を示すことが報告され、急性白血病の治療薬としても用いられている。またその構成細胞の 90%以上が T リンパ球である代表的な免疫臓器である胸腺では、ヒ素曝露によって胸腺委縮がおこることが報告されている。

しかしヒ素による胸腺萎縮の分子メカニズムや免疫細胞に特異的な作用メカニズムは明らかにされていない。

2. 研究の目的

環境化学物質である無機ヒ素の免疫系への作用メカニズムを探るため、転写因子への作用に着目して無機ヒ素の免疫細胞特異的な作用メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)マウスへの無機ヒ素（亜ヒ酸）投与

6週令の C57BL/6 マウス（オス）に亜ヒ酸ナトリウム(10 mg/kg)を腹腔内投与した。

(2)網羅的遺伝子発現解析

対照群または亜ヒ酸投与 24 時間後のマウス胸腺から Isogen を用いて RNA 調製を行い、Affymetrix 社のプロトコールに従って GeneChip を用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。対照群または亜ヒ酸投与群それぞれ 3 匹のマウスの胸腺をまとめて 1 サンプルとした。独立に 2 回実験を行い、対照群と比較して暴露群で 2 回とも 2 倍以上または 1/2 以下に発現が変化した遺伝子を抽出した。

(3)mRNA 発現量の測定

組織または細胞から RNeasy Mini kit (Qiagen)を用いて RNA 調製を行い、電気泳動によって品質の確認を行った後、RT-PCR またはリアルタイム PCR によって mRNA 量を測定した。

(4)ポケットプロテインのたんぱく量の測定

A20 細胞から全細胞画分、細胞質画分、核画分のたんぱく質を調製し、Western blotting 法によって pRB、p107、p130 の存在量を検討した。

(5)免疫沈降法と Chromatin immunoprecipitation (ChIP)アッセイ

E2F 標的遺伝子のプロモーター領域への E2F たんぱくの結合については ChIP アッセイで、また E2F4/p130/HDAC 転写抑制複合体の形成については免疫沈降実験で検討した。

4. 研究成果

(1)無機ヒ素による細胞周期関連 E2F 標的遺伝子群の発現抑制

マウスにヒ素を投与すると、胸腺萎縮がおこることが報告されている。そこでヒ素によ

る胸腺での遺伝子発現変化を手がかりとして、ヒ素の免疫細胞への影響のメカニズムを検討した。

マウスにヒ素（亜ヒ酸ナトリウム 10 mg/kg)を投与し、1、3、7 日後に胸腺重量の変化を観察した結果、投与 3 日後で重量は対照群の約 70%となった。7 日目では重量は対象群の約 80%と回復傾向をみせた。

ヒ素投与 1 日（24 時間）後に胸腺について網羅的遺伝子発現解析を行った結果、ヒ素投与したマウスの胸腺では、細胞周期進行に関与する *Ccnb2*、*Ccne2* 等の遺伝子群の顕著な発現抑制が観察された。最近の研究では、他の細胞種でヒ素が転写因子 Nrf2 を活性化することが報告されているが、ヒ素投与したマウスの胸腺では Nrf2 の標的遺伝子である *Homx1* 等の発現変動は検出されなかった。

胸腺、脾臓、肝臓、腎臓、肺等の各種臓器における *Ccnb2* および *Ccne2* の mRNA の発現量をリアルタイム PCR で測定したところ、両遺伝子の発現は対照群のマウスの胸腺で特に高く、ついで脾臓で高く、両臓器での発現がヒ素曝露で大きく抑制されることが明らかとなった(図 1)。

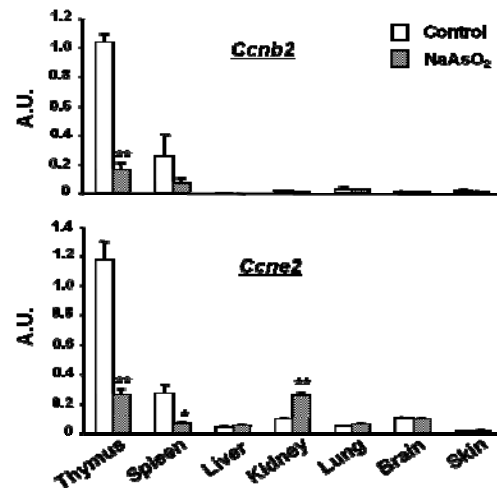


図 1. *Ccnb2*, *Ccne2* 遺伝子発現量の臓器特異性

ヒ素曝露によって発現低下を受けた *Ccnb2*、*Ccne2* 等の細胞周期関連遺伝子群が転写因子 E2F ファミリーの標的遺伝子であることから、E2F ファミリー遺伝子の発現量についても検討した結果、やはり胸腺で特に高く、ついで脾臓で高いことが明らかとなった。また転写促進性の E2F である E2F1 の発現量のヒ素曝露による抑制も検出された(図 2)。

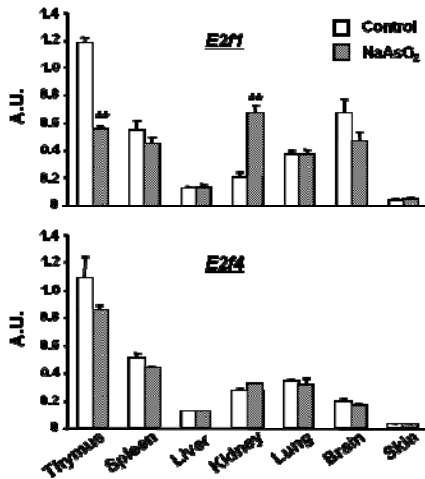


図 2. E2f 遺伝子発現の臓器特異性

さらに胸腺細胞の細胞周期測定の結果、細胞周期が抑制されていることも確認された。

以上の結果は、ヒ素がリンパ球特異的に E2F ファミリーの機能を変化させ、細胞周期進行に関与する遺伝子群の発現低下を介して細胞周期を抑制し、細胞増殖を阻害することを示唆した。

(2) 無機ヒ素によるポケットプロテイン p130 の安定化を介した E2F 標的遺伝子の発現抑制

E2F タンパクの作用はポケットプロテインによって制御されることが知られている。そこで次に、ヒ素のポケットプロテインへの作用について検討した。

リンパ球細胞株 A20 細胞をヒ素 (亜ヒ酸) 存在下培養すると、胸腺で見られたのと同様の細胞周期進行に関与する E2F 標的遺伝子群の転写抑制が観察された。また実際に細胞周期の抑制や細胞増殖の抑制が観察されたことから、以降のメカニズム研究はこの細胞を用いて行った。

A20 細胞をヒ素存在下培養し、ポケットプロテインの pRB, p107, p130 の存在量を検討した。その結果、ヒ素によって核の p130 の量が大きく増加することが明らかとなった。p130 mRNA 量は変化しないことから、p130 の増加はタンパクレベルで起こることが示された。

p130 はリン酸化につづいてユビキチン化を受け、プロテアソームで分解される。プロテアソーム阻害剤 MG-132 を用いた実験によって、対照群の細胞では p130 がプロテアソーム分解を受けているのに対して、ヒ素存在下ではプロテアソーム分解が低いことが示唆された。すなわち、ヒ素存在下では p130

が低リン酸化・低ユビキチン化状態にあり、その分解が低下していることが示唆された。

また ChIP アッセイ(図 3)および免疫沈降実験によって、ヒ素曝露によって E2F 標的遺伝子のプロモーター領域での E2F4/p130/HDAC 転写抑制複合体の結合が増加していることが明らかとなった。

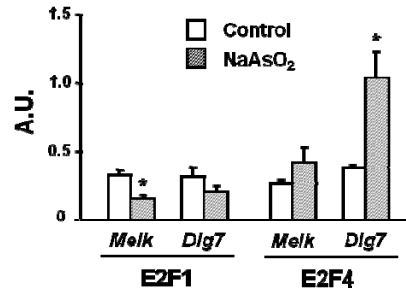


図 3. ヒ素による E2F たんぱくの標的遺伝子プロモーター領域への結合量の変化

以上の結果から、無機ヒ素が免疫細胞において p130 を安定化し、細胞周期進行に関与する E2F 標的遺伝子のプロモーター領域で E2F4/p130/HDAC 転写抑制複合体の形成を促進し、それによって細胞周期関連遺伝子の発現を抑制して細胞増殖を抑制する、というヒ素のユニークな作用メカニズムが示された。

今後、このようなメカニズムを介したヒ素の免疫系への影響の検討が必要と考えられる。

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 1 件)

① Nohara, K., Ao, K., Miyamoto, Y., Suzuki, T., Imaizumi, S., Tateishi, Y., Omura, S., Tohyama, C. and Kobayashi, T. Arsenite-induced thymus atrophy is mediated by cell cycle arrest :A characteristic down-regulation of E2F-related genes revealed by a microarray approach. Toxicol. Sci. 101, 226-238, 2008, 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

① 野原恵子、ヒ素の毒性のゲノミクス・エピゲノミクス、日本衛生学会学術総会、2009.03

② Nohara, K. The E2F family is a sensitive

target of arsenite in the thymus: A characteristic down-regulation of E2F-related genes revealed by immunotoxicogenomics. Society of Toxicology: 2009 annual meeting, 2009.03

- ③ Kerkvliet, N., Nohara, K.
Transcriptional changes in immunotoxicology: Transcription factors, signal transduction, and epigenetics. Society of Toxicology: 2009 annual meeting, 2009.03
- ④ 鈴木武博、村井景、西村典子、小林弥生、野原恵子、無機ヒ素によるp16INK4α発現調節へのエピジェネテクス作用の関与、第8回分子予防環境医学研究会、2008.12
- ⑤ 鈴木武博、村井景、松本みちよ、立石幸代、西村典子、小林弥生、野原恵子、ヒ素の癌抑制遺伝子の発現調節への影響、第8回分子予防環境医学研究会、2008.12
- ⑥ 野原恵子、環境化学物質のイムノトキシコゲノミクス、第15回日本免疫毒性学会学術大会、2008.09

6. 研究組織

(1)研究代表者

野原 恵子 (NOHARA KEIKO)
独立行政法人国立環境研究所・環境健康研究領域・室長
研究者番号：50160271

(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

鈴木武博
独立行政法人国立環境研究所・研究員
粟生佳奈
独立行政法人国立環境研究所・アシスタントフェロー
村井景
独立行政法人国立環境研究所・アシスタントスタッフ
三木大介
筑波大学大学院環境科学研究科・大学院生
大井航
筑波大学大学院環境科学研究科・大学院