

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20360235

研究課題名(和文) トキシコゲノミクスのアプローチによる重金属-農薬複合毒性解析
 研究課題名(英文) Analysis of mixture toxicity for dual combinations of heavy metals and herbicides using toxicogenomic approach

研究代表者

岡部 聡 (OKABE SATOSHI)

北海道大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：10253816

研究成果の概要(和文)：

本研究では、ヒト DNA マイクロアレイを用いて、代表的な汚染物質である重金属、農薬の混合暴露下におけるヒト由来細胞(HepG2)の遺伝子発現解析を行い、重金属、農薬それぞれの暴露で得られた遺伝子発現パターンと比較し複合毒性作用(相乗、拮抗、もしくは新たな毒性の出現)の解明および有用な毒性マーカー遺伝子の選定を行った。さらに、遺伝子発現解析により選定された遺伝子マーカーを用いて、より詳細な遺伝子発現解析(定量的RT-PCR)を実施し、各重金属-農薬の組合せにおいて、遺伝子発現レベルで作用濃度閾値を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The single chemical cytotoxicity showed that heavy metals and silver nanoparticles had high toxicity, respectively, but herbicides had relatively low toxicity. In contrast, the dual combinations cytotoxicity showed that the combination of silver nanoparticles and heavy metals tended to be much more toxic than silver nanoparticles or heavy metals alone, excluding the combination of silver nanoparticles and chromium (AgNPs-Cr). However, the toxicity of the combination of herbicides and heavy metals was similar to that of herbicides exposure alone. From cytotoxicity results, 5 μ M of silver nanoparticles, 2.6 μ M of cadmium, 7 μ M of arsenic and 1.1 μ M of chromium were used for the DNA microarray analyses to further elucidate the mechanisms of mixture toxicity. The treatments with AgNPs-Cd (70% cytoviability), AgNPs-As (100% cytoviability) and AgNPs-Cr (140% cytoviability) altered the expression levels of 107 genes, 500 genes and 196 genes, respectively. There was a significant difference between 2 combinations (AgNPs-Cr and AgNPs-Cd) and silver nanoparticles alone on DNA replication genes such as MCM2, MCM5, MCM6, and GINS2 that are important for DNA replication fork. Furthermore, FABP1 gene was down regulated 41-fold by AgNPs-As combination. FABPs play an important role in the transport of lipids to specific compartments in the cell. In conclusion, toxicogenomic approach could elucidate synergistic toxicity by AgNPs and heavy metals, which clearly demonstrate the possible use of DNA microarray analysis for evaluation of mixture toxicity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：水環境工学

科研費の分科・細目：土木環境システム

キーワード：複合毒性評価、DNA マイクロアレイ、重金属、農薬、HepG2 細胞

1. 研究開始当初の背景

現在、既に2,600万種の化学物質がケミカルアブストラクトサービスのデータベースに登録され、そのうち数十万種の化学物質が日常的に使用されている。これら膨大な数の多種多様な化学物質は、製造、使用、廃棄の過程において、我々の生活環境中へ放出され蓄積していると考えられる。しかし、従来行われている器機分析法で同定・定量可能な化学物質は約10%程度とされ、また毒性機序が十分に明らかとなっていない物質のリスク評価は不可能である。このような背景から、ある特定の生物活性を利用し、環境中に存在する化学物質の毒性を評価するバイオアッセイ法が試みられている。その代表的なものとして、Ames 試験 (変異原性) や酵母Two Hybrid 法 (内分泌攪乱作用) などがある。しかし、実際の水環境汚染は低濃度かつ複数の化学物質による複合汚染であり、複数の化学物質の複合作用 (相加、相乗、又は拮抗作用) についてはほとんど知見がない。さらに、水環境基準値や農薬の残留基準値も、個々の化学物質や農薬が単独で存在する場合を想定して求められた基準値であり、複合汚染を考慮したものではない。これまでの複合汚染の評価に用いられた毒性指標は生物個体を用いた致死作用のみであり、詳細な複合汚染 (たとえば毒性の質 (機序) および強度の変化) を正確に評価することはできない。このような理由から、単一の毒性作用を検出することに特化した従来の単指標型バイオアッセイでは、実際の複合汚染の毒性および健康リスクを総合的に予測、評価することが困難である。

そこで本研究では、これら従来のバイオアッセイの欠点を補完する手法としてDNAマイクロアレイを用いる。DNAマイクロアレイは、数千から数万の遺伝子発現を同時に検出できるため、ある生物学的状態 (毒性物質によるストレス等) における細胞の応答を網羅的に評価できる。従って、DNAマイクロアレイでは理論上、単一の実験系で全ての毒性作用が検出可能である。このように、DNAマイクロアレイを用いた多指標型バイオアッセイを開発できれば、多様な化学物質個々の毒性、およびそれらが混在する場合の毒性 (複合毒性) も総合的に評価することが可能である。

申請者らはこれまでに、DNAマイクロアレイを用いた新規バイオアッセイ手法開発のため

の基礎的研究として、ヒト由来細胞を用いた単一化学物質の毒性評価を主に重金属を対象として実施してきた。まず、高濃度短時間暴露による毒性として3つのモデル毒性作用:酸化ストレス (代表的化学物質としてDMNQ)、タンパク質変性作用 (フェノール)、DNA障害性 (ニトロソアミン) を選択し、各物質暴露下における遺伝子発現変動を解析した。

2. 研究の目的

そこで本研究では、ヒト DNA マイクロアレイを用いて、代表的な汚染物質である重金属、農薬の混合暴露下におけるヒト由来細胞 (HepG2) の遺伝子発現解析を行い、重金属、農薬それぞれの暴露で得られた遺伝子発現パターンと比較し複合毒性作用 (相乗、拮抗、もしくは新たな毒性の出現) の解明および有用な毒性マーカー遺伝子の選定を行う。さらに、遺伝子発現解析により選定された遺伝子マーカーを用いて、より詳細な遺伝子発現解析 (定量的 RT-PCR) を実施し、各重金属—農薬の組合せにおいて、遺伝子発現レベルで作用濃度閾値を明らかにする。

3. 研究の方法

細胞培養

本研究では、ヒト肝癌由来細胞株 (HepG2) を使用した。HepG2 は phase I 酵素と phase II 酵素の活性を維持しており、薬物代謝の機能を有する。また、この細胞は様々な変異原性物質に対して DNA 損傷の指標 (小核形成や姉妹染色分体交換) を示すことから、毒性学的研究において広く使用されている。細胞は理研バイオリソースセンターセルバンク (茨城) より提供を受けた。細胞培養はイーグル MEM 培地 (日水製薬株式会社、東京) に 10% ウシ胎児血清、1% 非必須アミノ酸 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を添加した培地を用いて、CO₂ 5%、37°C 条件下で行った。60mm ディッシュで細胞密度が 70% に達した時点で、以下の 2 つの暴露系で 48 時間暴露を行った。(1) 1 つの化学物質による単一暴露系: 酸化ヒ素 As 0-20 μM、塩化カドミウム Cd 0-10 μM、二クロム酸カリウム Cr 0-3 μM、銀ナノ AgNPs 0-30 μM、グリホサート Gly 及びモリネート Mol 0-100 μM。(2) 2 つの化学物質を組み合わせた複合暴露系: 表 1 に示した組み合わせモデル。本研究で使用した化学物質は和光純

薬工業（大阪）、シグマアルドリッチジャパン（東京）から購入した。

複合暴露モデル

2つの化学物質を組み合わせた複合暴露モデルを単一暴露のニュートラルレッドアッセイの結果に基づいて作成した（表1）。高毒性化学物質と低毒性化学物質に関して、(1) 高毒性と高毒性、(2) 高毒性と低毒性、(3) 低毒性と低毒性、のように組み合わせた暴露系について細胞毒性の評価を行った。

表1. 単一暴露の細胞毒性試験の結果に基づいて作成した複合暴露モデル

化学物質	HepG2への毒性	HepG2への毒性
As-Cd	高い	高い
As-Cr	高い	高い
Cd-Cr	高い	高い
AgNPs-As	高い	高い
AgNPs-Cd	高い	高い
AgNPs-Cr	高い	高い
AgNPs-Gly	高い	低い
As-Gly	高い	低い
Cd-Gly	高い	低い
Cr-Gly	高い	低い
Gly-Mol	低い	低い

細胞毒性試験

化学物質の毒性を早期検出するために有効な指標となる暴露初期の生物反応を検討するため、暴露時間を6時間及び48時間とした。また、複合暴露系の暴露濃度は明確な細胞毒性を発現しない最大濃度（ニュートラルレッドアッセイにおいて細胞生存率100%となる濃度）を採用した。ニュートラルレッドアッセイは生細胞の定量法として広く使用される手法である。暴露終了後、ニュートラルレッドを添加した培地で細胞培養を行う。続いて、生細胞のリソソームに取り込まれた色素を溶出させ、比色分析を行う。本手法では一般的に、96ウェルプレートを用いてマイクロプレートリーダーにより吸光度の自動計測を行う。

DNA マイクロアレイ試験

表2に示した化学物質で暴露を行った後、RNeasy Mini Kit（Qiagen, Hilden, Germany）を用いてtotal RNAの抽出を行った。続いて、

Affymetrix社（Santa Clara, CA）の技術マニュアルに記載されたプロトコールに従い、DNAマイクロアレイ試験を行った。以下にその詳細を記す。

まず、One-Cycle cDNA Synthesis kit（Affymetrix, Santa Clara, CA）を用いて、total RNAからcDNAを合成した。次に、IVT Labeling kit（Affymetrix, Santa Clara, CA）を用いて、cDNAを鋳型にin vitro転写を行いcRNAの合成とそのビオチン標識を行った。続いて、Tris acetate (pH8.1) 40 mM、酢酸カリウム 100 mM、酢酸マグネシウム 30 mMの存在下で、94℃で35分間加熱し、標識cRNAの断片化を行った。Hybridization Control Kit（Affymetrix）を用いて、8793ヒト遺伝子断片を搭載したHuman Genome Focus array（Affymetrix, Santa Clara, CA）と断片化cRNAを45℃で16時間ハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーション後、Fluidics Station 450（Affymetrix, Santa Clara, CA）を使用して、マイクロアレイの洗浄及び染色を行い、最後に、共焦点レーザー方式 Genechip Scanner（Affymetrix, Santa Clara, CA）により、スキャンして遺伝子発現データを得た。

表2. DNA マイクロアレイ試験で対象とした化学物質とその暴露濃度

化学物質	暴露濃度 (μM)
AgNPs	5 μM
As	7 μM
Cd	2.6 μM
Cr	1.1 μM
AgNPs-As	5 μM - 7 μM
AgNPs-Cd	5 μM - 2.6 μM
AgNPs-Cr	5 μM - 1.1 μM

DNA マイクロアレイデータ解析

Gene Chip Operating Software (GCOS) に“CEL file”として保存されている21サンプル（7 treatments, n=3）の遺伝子発現のデータをAvadis Prophetic Ver. 4.2（Strand Life Science, Redwood City, CA）に移動させ、MAS5アルゴリズムを用いて蛍光強度の標準化を行った。MAS5により判定される“Absolute Call”が、3つの全ての試料において“Present”である遺伝子のみを以降の解析に用いた。有意に発現変動している遺伝子を識別するために、各々の遺伝子について対照群と暴露群についてt検定を行った。これらの解析結果にお

いて、p 値が 0.05 未満であり、対照群に対し蛍光強度の変化が 2 倍以上である遺伝子を有意に発現変動した遺伝子と定義した。解析により得られた遺伝子について、ウェブ上の遺伝子アノテーションプログラム FatiGO+ (<http://fatigo.bioinfo.cipf.es>) を使用して、Gene Ontology (GO) に基づいた遺伝子の機能分類を行った。

4. 研究成果

細胞毒性試験

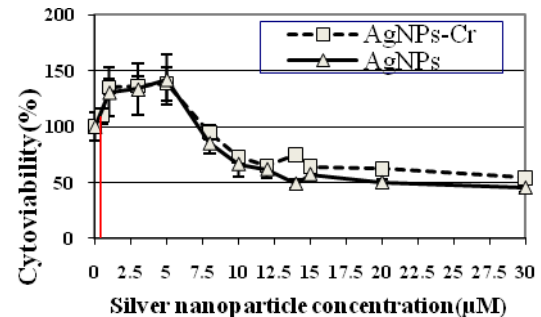
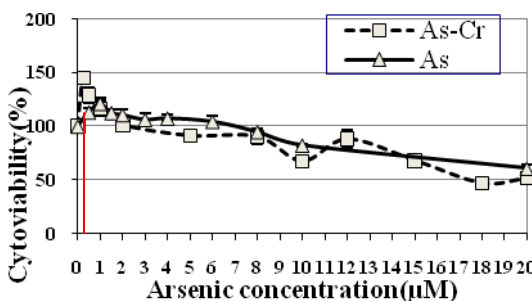
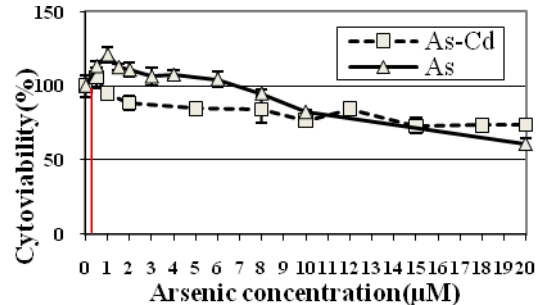
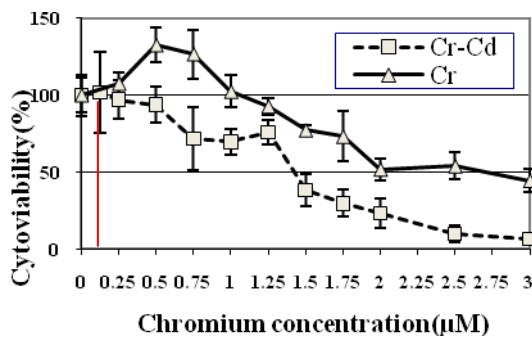
単一暴露系では、ヒ素、カドミウム、クロミウムの重金属、銀ナノが μM 単位の低濃度で HepG2 に対して高い毒性を示した。対照的に、グリホサートとモリネートでは 100 mM という高濃度でも HepG2 に対して明らかな毒性が確認できなかった。これらの試験結果より、複合暴露系の暴露濃度を決定した (As 7 μM 、Cd 2.6 μM 、Cr 1.1 μM 、AgNPs 0-30 μM 、グリホサート 10 μM または 0-100 μM 、モリネート 0-100 μM)。

複合暴露系では、高毒性物質と高毒性物質の組み合わせで結果に大きな変化が見られた (図 1)。一方で、高毒性物質と低毒性物質、低毒性物質と低毒性物質の組み合わせの結

果は、それぞれの単一暴露系の結果と類似したものであった。複合暴露系は化学物質の単一暴露において細胞生存率が 100% となる濃度に基づいて作成した (ヒ素 7 μM 、カドミウム 2.6 μM 、クロミウム 1.1 μM)。複合暴露系では、重金属と重金属 (As-Cr を除く)、銀ナノと重金属 (AgNPs-Cr を除く) の組み合わせが銀ナノ及び重金属の単体よりも高い毒性を示した。

また、細胞毒性試験においてより強い毒性作用が見られた、AgNPs-As、AgNPs-Cd、AgNPs-Cr の三つの組み合わせについて DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行う複合暴露モデルとして選択した。DNA マイクロアレイ試験には銀ナノ 5 μM に対してヒ素 7 μM 、カドミウム 2.6 μM 、クロミウム 1.1 μM をそれぞれ混合した試料を用いた。

本研究室では既往の研究において、細胞毒性試験の結果に基づいて DNA マイクロアレイ試験に用いる暴露濃度を選択してきた。しかし、本研究ではグリホサートの暴露による細胞生存率の変化が見られなかったことから、DNA マイクロアレイ試験に用いるグリホサートの暴露濃度は 10 mM に決定した。



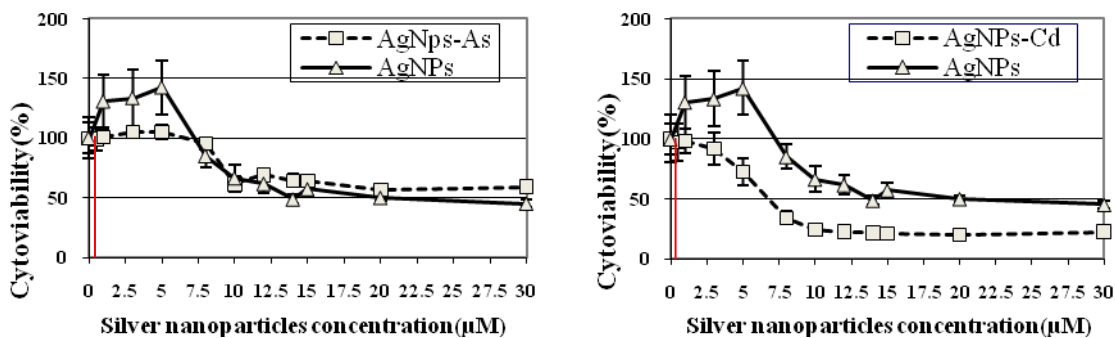


図 1. 複合暴露系における細胞生存率

DNA マイクロアレイデータ解析

単一暴露系

グリホサートの暴露により有意に発現変動した遺伝子は 22 遺伝子であった (上昇変動: 10、抑制変動: 12)。変動遺伝子の 1 つには、*NT5E* があった。*NT5E* は中性 pH 域で、5'-プリンモノヌクレオチドが AMP の基質になりやすいヌクレオチドに変換される反応を触媒する。

70kD の同一のサブユニットの二量体により構成されるこの酵素は、グリコシル・ホスファチジル・イノシトール鎖により細胞膜の外側に結合する。また、この酵素はリンパ球分化の指標として用いられている。*NT5* の欠乏はさまざまな免疫不全症 (SCID, X 染色体免疫欠損生涯など) の結果として起こる。他の形態の 5'-ヌクレオチダーゼは細胞質やリソソーム内に存在し、*NT5E* とは区別される。

複合毒性により発現変動した遺伝子

AgNPs-As (細胞生存率 105%)、AgNPs-Cd (細胞生存率 70%)、AgNPs-Cr (細胞生存率 140%) 暴露により有意に発現変動した遺伝子はそれぞれ 500 遺伝子 (上昇変動: 222、抑制変動: 278)、107 遺伝子 (上昇変動: 45、抑制変動: 62)、196 遺伝子 (上昇変動: 105、抑制変動: 91) であった。3 つのモデルの変動遺伝子の重複を図 3 に示した。複合暴露系では、AgNPs-As (As: 209 > AgNPs: 26)、AgNPs-Cd (Cd: 29 > AgNPs: 5)、AgNPs-Cr (Cr: 49 > AgNPs: 7) のように重金属の方が銀ナノよりも重複する遺伝子が多かった。以上の結果より、銀ナノと重金属の複合暴露系では、銀ナノの毒性が重金属の毒性により支配されていることが示唆された。

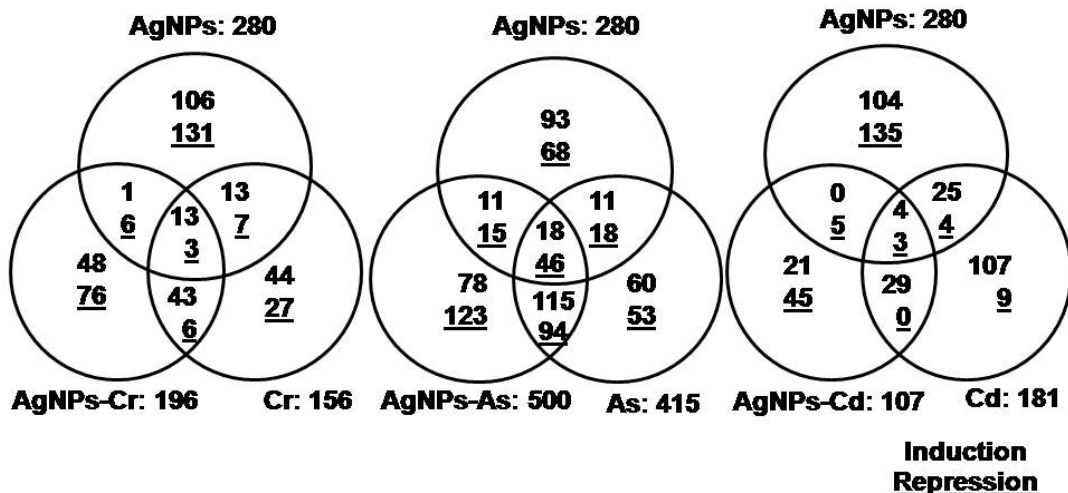


図 2. 複合暴露による HepG2 細胞の発現変動遺伝子の重複を表わしたベン図

メタロチオネインは重金属応答遺伝子である。全ての重金属暴露でメタロチオネインを発現した一方で、銀ナノ暴露ではメタロチオネインを発現しなかった。AgNPs-Cr以外のAgNPs-AsとAgNPs-Cdではメタロチオネインの遺伝子発現が顕著であり、重金属単体の暴露よりも多くの重金属がHepG2内に取り込まれたことが示唆された(表3)。

表3. 単一暴露系及び複合暴露系における重金属応答遺伝子のFold Change値

	MT1H	MT1X	MT2A
AgNPs	-	-	-
As	+3.1	+4.9	+4
Cd	-	+2.1	-
Cr	-	+2.0	-
AgNPs-As	+4.8	+8.1	+5.0
AgNPs-Cd	+2.0	+2.7	+2.1
AgNPs-Cr	-	-2.1	-

(+) = 上昇変動、(-) = 抑制変動

発現変動遺伝子の生物学的機能分類

Gene Ontology (GO) に基づき、変動遺伝子の機能分類を行った。AgNPs-Asでは特に“Lipid biosynthesis”、“Monocarboxylic acid metabolic process”、“Enzyme linked receptor protein signaling pathway”の機能群において、銀ナノ粒子及びヒ素単体に比べ、遺伝子発現が抑制される傾向が見られた。一方、“Cell death”、“Intracellular transport”に分類される抑制変動遺伝子の割合がヒ素単体に比べて低かった。AgNPs-Cdでは、“DNA replication”や“Protein modification process”の機能群において、銀ナノ粒子及びカドミウム単体に比べて遺伝子発現が抑制される傾向が見られた。一方で、“Regulation of nucleic acid metabolic process”、“RNA biosynthetic process”、“Protein modification process”に分類される上昇変動遺伝子の割合がカドミウム単体に比べて低かった。AgNPs-Crでは、“DNA replication”に分類される抑制変動遺伝子の割合が銀ナノ粒子及びクロミウム単体に比べて非常に高かった。

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2件)

1. **Kawata, K., Osawa, M., and Okabe, S.** (2009) *In vitro* toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environmental Science and Technology* Vol. 43(15), Pp. 6046-6051.
2. **Kawata, K., Shimazaki, R., and Okabe, S.** (2009) Comparison of gene expression profiles in HepG2 cells exposed to arsenic, cadmium, nickel and three model carcinogens for investigating the mechanisms of metal carcinogenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 50, Pp. 46-59.

[学会発表] (計1件)

1. 多賀哲平、川田耕司、岡部聡 (2009) ヒトDNAマイクロアレイを用いた濃度依存的ヒ素毒性の評価、第43回日本水環境学会年会、2009年3月16日～19日、山口大学、山口

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡部 聡 (OKABE SATOSHI)
北海道大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：10253816

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし