

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：36102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651056

研究課題名（和文） ヒ素毒性の新しいメディエーターとしての S100A8/A9

研究課題名（英文） S100A8/A9 as a new mediator of arsenic toxicity

研究代表者

姫野誠一郎 (HIMENO SEIICHIRO)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：20181117

研究成果の概要（和文）：

S100A8/A9 タンパク質は炎症やがん免疫に関与するタンパク質である。本研究により、環境汚染物質であるヒ素が様々な細胞で S100A9 の発現を上昇させること、S100A9 の発現誘導には転写因子 Nrf2 が関与することを明らかにした。また、バングラデシュのヒ素汚染地域の住民の血清中に高い濃度の S100A8/A9 を検出し、S100A8/A9 がヒ素毒性の発現において重要な役割を果たしている可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：

S100A8/A9 proteins are known to be involved in inflammation and cancer immunity. We showed that exposure to arsenic induces expression of S100A9 in various types of cells and that transcription factor Nrf2 is involved in enhanced transcription of S100A9 gene. We also detected high concentrations of S100A8/A9 among the residents living in arsenic-endemic areas in Bangladesh, suggesting an important role of S100A8/A9 in arsenic intoxication.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2012年度	1,400,000	420,000	1,820,000
	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：複合新領域

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：ヒ素、毒性、免疫、S100A8、S100A9

## 1. 研究開始当初の背景

現在、アジア全域で地下水のヒ素汚染によるヒ素中毒が大きな問題となっている。一方で、ヒ素製剤は、急性前骨髄球性白血病の治療薬としても脚光を浴びているが、当然その副作用が問題となっている。ヒ素中毒による症状として、皮膚の黒色化や潰瘍形成、肝臓、心臓などの内臓障害、動脈硬化などの血管障害、神経障害、喘息、糖尿病、呼吸障害、皮膚癌、肺癌、膀胱癌など、非常に多くの臓器における多彩な症状が報告されている。ヒ素

による様々な健康障害の根本に活性酸素ストレスや SH 基の修飾反応が関与していることが報告されているが、ヒ素中毒によってなぜこのような多彩な症状が起こるのかは、酸化ストレスのみでは説明できない。

本申請者は、これまで亜ヒ酸が免疫応答に及ぼす影響を検討する過程で、肥満細胞モデルとして用いられるラット RBL-2H3 細胞を亜ヒ酸に 4 週間曝露した後、microarray によって遺伝子発現の変化を調べたところ、最も発現上昇率が高かった遺伝子として、S100A9 を見いだした。さらに、Real time

RT-PCR により S100A9 の mRNA レベルを計測したところ、図 1 のように、2 週間をピークに 20 倍以上上昇すること、S100A9 と 2 量体を形成する S100A8 も同様に発現上昇することを見いだした。S100A8 と S100A9 はヘテロダイマーを形成し、calprotectin とも呼ばれる分泌性の Ca 結合性タンパク質で、多くの炎症反応や臓器障害作用に関与する。S100A8/A9 は、現在最も注目されている炎症メディエーターの一つで、活性酸素の産生増強因子、RAGE や TLR4 のリガンドとしての性質を持ち、自己免疫疾患、動脈硬化や炎症性の癌など多様な炎症反応に関与している。しかし、これまでヒ素による S100A8/A9 の誘導を調べた研究はない。

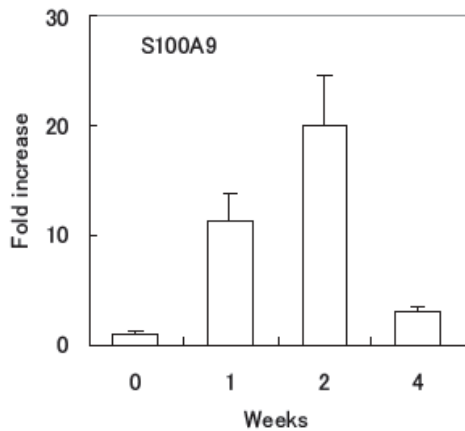


図 1 RBL-2H3 細胞を亜ヒ酸に曝露した際の S100A9 の発現誘導(J. Toxicol. Sci. Shimizu Y. et al., 2011)

## 2. 研究の目的

本研究は、ヒ素の示す多様な症状のメディエーターの一つとして S100A8/A9 が重要な役割を果たしている可能性を追究するため、下記のことを明らかにする。

1. ヒ素化合物による S100A8/A9 誘導機構を明らかにする。
2. ヒ素化合物による様々な健康障害における S100A8/A9 の関与を明らかにする。
3. 血液中 S100A8/A9 レベルの簡便かつ鋭敏な測定系を立ち上げ、ヒ素汚染地域住民における実際の S100A8/A9 レベルを測定し、健康障害との関連を検討する。

## 3. 研究の方法

ヒ素による S100A8/A9 の誘導効率は、細胞、組織によって異なることが予測される。そこで、可能な限り多種類の細胞株におけるヒ素曝露時の S100A8/A9 誘導率を比較検討する。

すでにヒ素による S100A8/A9 の誘導が起

こることを確認しているラット肥満細胞 RBL-2H3、ヒト皮膚由来細胞 HaCaT 細胞を用い、S100A8 あるいは S100A9 のプロモーター領域とルシフェラーゼを結合したレポータープラスミドを導入することで、転写活性化能を測定する。プロモーター領域について様々な deletion mutant を作製することで、ヒ素に応答する領域を絞り込み、関与する転写因子を推測する。

多くの人体試料について、S100A8/A9 の分泌量を western blot によって測定するのは困難なので、より簡便で高感度な測定を行うため ELISA 法を確立する。また、血液のみならず、尿中の微量の S100A8/A9 濃度も測定できるか検討する。

バングラデシュのヒ素汚染地域住民からの血液、尿試料を研究協力者の Hossain 博士（バングラデシュ、ラジャヒ大学生化学部准教授）から入手し、測定する。その際、S100A8/A9 濃度のみならず、毛髪中、爪中ヒ素濃度、及び、様々な臓器障害に関する臨床生化学的指標についても測定する。これらと血液中 S100A8/A9 濃度との相関を検討する。

## 4. 研究成果

- (1) 亜ヒ酸による S100A9 の誘導機構の検討  
すでに亜ヒ酸がマスト細胞である RBL-2H3 細胞で S100A9 の誘導を起こすことを見出している。そこで、ヒ素の標的となる

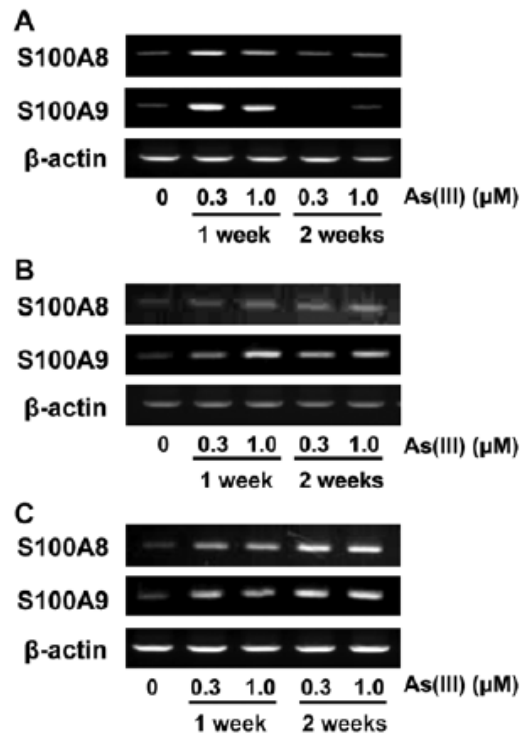


図 2 亜ヒ酸曝露による S100A8/A9 の誘導  
A: HaCaT B: UROtsa C: U937

細胞においても、同様の現象が起こるかどうかが検討したところ、皮膚由来の HaCaT 細胞、膀胱上皮由来の UROtsa 細胞においても亜ヒ酸によって S100A9 が誘導された (図 2)。特に、HaCaT 細胞では、0.3  $\mu\text{M}$  の亜ヒ酸を添加して 1 週間という短い時間で S100A8/A9 のいずれの mRNA レベルも顕著に上昇した。

さらに HaCaT 細胞に亜ヒ酸 1  $\mu\text{M}$  を添加してから 1, 3, 5, 7 日目に細胞を回収し、S100A8 と S100A9 の mRNA レベル、および、タンパクレベルを半定量的 RT-PCR、および、Western blot 法により確認した。その結果、亜ヒ酸を添加して 3 日後には mRNA、タンパク質レベルのいずれも上昇することが明らかになった (図 3)。

そこで、亜ヒ酸による S100A8/A9 の発現誘導機構の検討には、HaCaT 細胞を用いることとした。

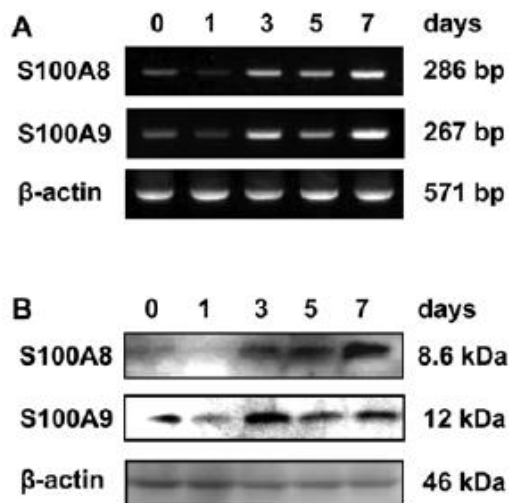


図 3 亜ヒ酸添加後の S100A8/A9 の mRNA、タンパク質レベルの変動

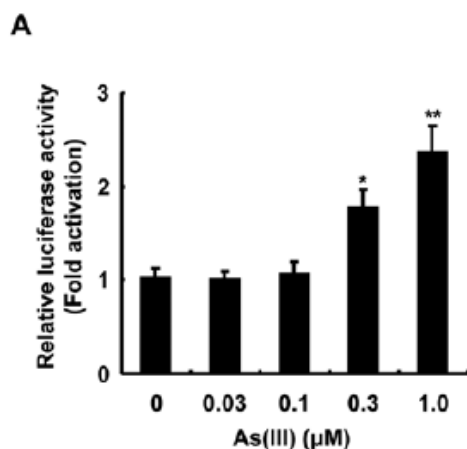


図 4 亜ヒ酸添加による S100A9 レポーター遺伝子の活性化

S100A9 の promoter(-1000/+429)領域にルシフェラーゼ cDNA を連結したレポーター cDNA を作成し、HaCaT 細胞に導入した。この細胞を亜ヒ酸に曝露すると、確かに S100A9 の転写が活性化されたことから、亜ヒ酸による S100A9 の誘導は転写レベルで起こっていることを確認した (図 4)。

さらに、S100A9 の promoter 領域に Nrf2 の結合領域 (antioxidant response element/ARE) が 2 ヶ所存在することを見出したので、deletion mutant を作成してどちらの element が関与しているか検討したところ、ARE2 がヒ素による転写活性化に関与している可能性を見出した。

## (2) S100A9 の測定方法の樹立

ヒトサンプルを用いて S100A9 のレベルを測定するため、S100A9 の ELISA システムを構築した。大腸菌の高発現系を用いて human recombinant S100A9 を作成した。本タンパク質を抗原として抗体を作成し、ELISA 法を構築することに成功した。この ELISA を用いて、バングラデシュのヒ素汚染地域から入手したヒトのサンプルを測定する予定であったが、同じ時期に、人の S100A8、S100A9 のそれぞれに対する ELISA キットが販売されたため、実際の測定はこれら市販のキットを用いて行うこととした。

## (3) バングラデシュヒ素汚染地域住民の血清中 S100A8/A9 濃度の測定

バングラデシュの研究協力者である Hossain 教授から供与されたヒ素汚染地域住民の血清、および、尿サンプルを用いた。血清については、市販の ELISA キットを用いて、S100A8/A9 のレベルを測定した。尿サンプルについては、(2)で確立した ELISA 法で測定したが、ほとんど尿中には S100A8/A9 が排出されていなかった。そこで、血清について測定した結果、S100A8、および、S100A9 のいずれについても、既報の正常値に比べて、ヒ素汚染地域では極めて高いレベルであることがわかった。また、S100A8 と S100A9 の測定値の間には非常に高い相関が認められたことから、ヒ素によって両者が共通の機構によって誘導されているものと予測された。

そこで、ヒ素曝露の指標として、毛髪中ヒ素濃度、あるいは、爪中ヒ素濃度を用い、血清中 S100A8、S100A9 との相関を調べたが、あまり高い相関は得られなかった。その理由として、今回使用した人体試料にヒ素汚染を受けていない対照群が含まれていなかったため、すべてのヒ素曝露群において S100A8/A9 の値が著しく上昇していたことが影響している可能性がある。

いずれにしても、本研究により、ヒ素が細胞レベルで S100A8/A9 を誘導すること、ヒト血

清サンプルにおいても、ヒ素汚染地域ではS100A8/A9レベルが極めて高いことが明らかにされた。今後、ヒ素汚染地域から血清サンプルをさらに多く採取し、S100A8/A9と他の炎症のバイオマーカーとの比較などを行う価値があると考えられる。萌芽研究として、今後の研究の展開につながる成果が得られた。

#### 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5件)

- ① Karim, M. R., Rahman, M., Islam, K., Mamun, A. A., Hossain, H., Hossain, E., Aziz, A., Yeasmin, F., Agarwal, S., Saud, Z. A., Nikkon, F., Hossain, M., Mandal, A., Jenkins, R. O., Haris, P. I., Miyataka, H., Himeno, S., and Hossain, K. Increases in oxidized low density lipoprotein and other inflammatory and adhesion molecules with a concomitant decrease in high density lipoprotein in the individuals exposed to arsenic in Bangladesh. *Toxicol. Sci.*, 査読有、(in press) 2013.
- ② Sumi, D., Shimizu Y., Himeno S. Involvement of Nrf2 activation in the upregulation of S100A9 by exposure to inorganic arsenite. *Int. J. Mol. Med.* 査読有、31(1)、2013、259-264  
[DOI:10.3892/ijmm.2012.1185]
- ③ Hossain E, Islam K, Yeasmin F, Karim MR, Rahman M, Agarwal S, Hossain S, Aziz A, Al Mamun A, Sheikh A, Haque A, Hossain MT, Hossain M, Haris PI, Ikemura N, Inoue K, Miyataka H, Himeno S. Hossain K. (2012) Elevated levels of plasma Big endothelin-1 and its relation to hypertension and skin lesions in individuals exposed to arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 査読有、259(2), 187-194.  
[doi.org/10.1016/j.taap.2011.12.023]
- ④ Islam, K., Haque, A., Karim, M. R., Fajol, A., Hossain, E., Salam, K. A., Ali, N., Saud, Z. A., Rahman, M., Rahman, M., Sultana, P., Hossain, M., Akhand, A.A., Mandal, A., Miyataka, H., Himeno, S., Hossain, K. (2011) Dose-response relationship between arsenic exposure and the serum enzymes for liver function tests in the individuals exposed to arsenic: a cross sectional study in Bangladesh. *Environ. Health* 査読有、10(1), 64, 1-11.  
[doi:10.1186/1476-069X-10-64]
- ⑤ Shimizu, Y., Fujishiro, H., Matsumoto, K., Sumi, D., Satoh, M., Himeno, S. (2011) Chronic exposure to arsenite induces S100A8

and S100A9 expression in rat RBL-2H3 mast cells. *J. Toxicol. Sci.* 査読有、36(1), 135-139.  
[doi.org/10.2131/jts.36.135]

[学会発表] (計2件)

- ① ○姫野誠一郎、清水由里、角 大悟、亜ヒ酸がマスト細胞の応答性と遺伝子発現に及ぼす影響. 第18回ヒ素シンポジウム. 2012年11月24日~25日. 宮崎.
- ② ○池村憲明、井上 潔、宮高透喜、姫野誠一郎. バングラデシュ ヒ素汚染地域住民の毛髪、爪、尿、および飲用水のヒ素濃度の分析. 第22回日本微量元素学会. 2011年7月、京都.

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

姫野 誠一郎 (HIMENO SEIICHIRO)  
徳島文理大学・薬学部・教授  
研究者番号：20181117

##### (2) 研究協力者

角 大悟 (SUMI DAIGO)  
徳島文理大学・薬学部・准教授

清水由里 (SHIMIZU YURI)  
徳島文理大学・薬学部・大学院生

Khaled Hossain  
バングラデシュ国立ラッシュヤイ大学・生化学分子生物学科・教授