

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 7 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510084

研究課題名(和文) 化学物質と紫外線の複合作用と近年の皮膚がん増加との関連性 ヒストン修飾の観点から

研究課題名(英文) Relationship between coexposure to chemicals and UV, and recent increase of skin cancer - from a view point of histone modifications

研究代表者

伊吹 裕子 (Ibuki, Yuko)

静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授

研究者番号：30236781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：各種化学物質を培養細胞に作用すると、ヒストンのアセチル化、リン酸化状態がダイナミックに変化すること、そのパターンは化学物質の種類に応じて異なることを明らかにした。中でも17- β -Estradiol (E2)は、ヒストンH3の高アセチル化、一時的なリン酸化を誘導した。また、ヒストン修飾が変化している状態では、紫外線感受性が高くなること、その原因として、紫外線誘導DNA損傷であるCPDの修復が遅延することが考えられた。E2以外にもヒストンのアセチル化を誘導する化学物質が存在することから、それら化学物質と紫外線の複合曝露時のDNA損傷修復と発がんへの寄与の検証の必要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Histone modifications like acetylation and phosphorylation were detected after exposure to several chemicals. The pattern was different according to classes of chemicals. 17- β -Estradiol (E2) induced remarkable acetylation of histone H3 (K9, K14 and global) and phosphorylation of histone H3 (S10). In the condition of the disruption of histone modifications, the sensitivity to ultraviolet (UV) increased. UVB-induced cell death was enhanced in E2-treated cells. This might be due to delay of DNA damage repair: the formation of cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) did not change, whereas the repair of CPD was delayed in E2-treated cells. Furthermore, we could find some chemicals to induce similar histone acetylation and phosphorylation. These results suggested that the disruption of histone modifications by the chemicals might suppress the repair of DNA damage, indicating the contribution to cancer initiation and promotion in the case of coexposure to UV.

研究分野：環境毒性学

キーワード：ヒストン 紫外線 アセチル化 DNA損傷 修復 クロマチン 複合曝露

1. 研究開始当初の背景

世界保健機構 (WHO) の報告によれば、近年の皮膚がん (悪性黒色腫) の罹患率は 1980 年代に比べ、2~3 倍に増加している。我々は、皮膚がんの増加の一原因に、紫外線と環境化学物質との複合作用が関連していると考えている。これまでに、種々の環境化学物質が DNA そのものだけでなく、DNA をとりまく環境を変化させること、すなわちエピジェネティックな変化であるヒストン修飾を引き起こすことを明らかにした。皮膚がん要因の一つは、紫外線により生成するピリミジンダイマーを始めとする DNA 損傷であるが、ヒストン修飾の変化はクロマチン構造を変化させ、それら DNA 損傷の修復効率に影響する可能性がある。また、クロマチン構造の変化は、細胞増殖、細胞死等に関わる遺伝子の発現制御を攪乱し、変異細胞の生存を促す等、発がんに関与する可能性がある。しかしながら、ヒストン修飾の変化とクロマチン構造、それによる DNA 損傷の修復変化については、ほとんど検討がなされていない。

2. 研究の目的

本研究では、環境化学物質によるヒストン修飾変化が、紫外線による DNA 損傷修復にどのように影響するのかを明らかにし、近年の皮膚がん増加の原因解明に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 化学物質の選定: 化学物質としては、実環境中で発がん物質と認定されているタバコ副流煙中に含まれるホルムアルデヒド、4-(N-nitrosomethylamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)、ヒト女性ホルモンである 17- β -エストラジオール (E2) また、DNA 損傷化学物質として過酸化水素 (H₂O₂) 等を選択した。

(2) 細胞培養: ヒト肺基底上皮腺がん細胞 A549、ヒト乳腺がん細胞 MCF-7 (JCR より購入)、ヒト角化細胞 HaCaT (Norbert Fusening 博士 (German Cancer Research Center, Germany) より譲与) を使用した。10% FBS 含有 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) で培養し、80% コンフルエント時に 0.5% FBS 含有 DMEM に培地交換し、24 時間培養した後、実験に使用した。これは、FBS の濃度を下げることで血清飢餓状態にさせ、細胞分裂に伴って誘導されるヒストンの化学修飾を抑えコントロールのバックグラウンドを低くするためである。

(3) ヒストン修飾の検出法: ヒストン修飾の検出は、western blot 法により行った。細胞に化学物質を作用した後、セルスクレーパーを用いて回収した。MS バッファー (210 mM Mannitol, 70 mM Sucrose, 5 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA (pH 7.5)) を用いて、核画

分を抽出した。タンパク定量は Bio-Rad DC protein assay kit を用いて行った。0.1~1 μ g 程度のサンプルを 15% ポリアクリルアミドゲルで分離した。PVDF 膜 (Millipore) に蛋白質を転写し、1% スキムミルクで 1 時間ブロッキングをした後、一次抗体を作用した (1:1000)。二次抗体 Horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-rabbit IgG を作用後 (1:1000)、目的タンパク質のバンドを、化学発光検出キット ECL plus (Thermo) を用いて検出した。本研究で使用したヒストン修飾一次抗体は、H2AX (S139) リン酸化、H3 (S10) リン酸化、H3 (global) アセチル化、H3 (K9) アセチル化、H3 (K14) アセチル化、H3 (S10, K14) アセチルリン酸化抗体である。

(4) 紫外線照射: UV 照射前、培地を PBS (+) に交換した。UVB 312 nm (HP-30LM, ATTO Co., Ltd. Japan) を照射し、照射後は 0.5% FBS 含有 DMEM (E2 の実験では phenol red free DMEM 培地) に変え、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ の条件下で一定時間培養した。下記、フィルターを用いた局所照射法では、UVC 254 nm (ATTO Co., Ltd.) を照射した。

(5) 生存率の測定: trypan blue にて染色後、細胞生存数を顕微鏡下でカウントした。

(6) 紫外線誘導 DNA 損傷の測定: cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) 量を ELISA 法、免疫染色法、フィルターを用いた局所照射フォーカスカウント法により求めた。

局所照射法では、まず始めに micro cover glass 上に培養した細胞上にポリカーボネートフィルター (Isopore Membrane Filters, Millipore Co.) をかぶせ、UVC を照射することで局所的に損傷を生成し、免疫染色後、フォーカス残存数の数値化を試みた。

(7) 損傷修復に伴う DNA 二本鎖切断 (DSBs) の検出: DSBs の検出は、バイアス正弦電場ゲル電気泳動法 (BSFGE)、ならびにヒストン H2AX のリン酸化 (γ -H2AX) の検出により行った。

BSFGE は、細胞を低融点アガロースに包埋し、ゲルスタックごと proteinase K と RNase で処理後、アガロースゲルにロードし、泳動装置 (GENOFIELD, ATTO Co.) で 1920 分バイアス正弦電場ゲル電気泳動した。

γ -H2AX は、免疫染色法、western blot 法により検出した。

4. 研究成果

(1) 化学物質によるヒストン修飾変化

各化学物質を作用後、様々なヒストン修飾パターンが示された。例えば、H₂O₂ は DNA 損傷を示す H2AX のリン酸化は誘導するがそれ以外のヒストン修飾を誘導しなかった (データ示さず)。NNK は強いヒストン H3 (S10) リン

酸化、H3(K9, 14, global)アセチル化、 γ -H2AXを示した(データ示さず)。化学物質の系統ごとにヒストン修飾を系統化するにはまだ検討化学物質が少ないが、化学物質により特徴的な修飾パターンを示すことが明らかになったので、以後も修飾パターンの解析を継続していく予定である。

ここでは、E2作用後のヒストン修飾変化を掲載する(図1)。一時的なヒストンH3(S10)リン酸化、顕著なH3(K9, 14, global)アセチル化が認められた。

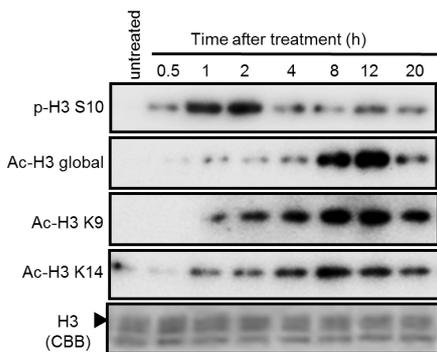


図1 17- β -エストラジオール作用後のヒストン修飾変化

以後、E2作用と紫外線誘導DNA損傷生成修復に関するデータを、成果の代表例として示していく。

(2) E2作用後の紫外線感受性変化

E2作用後、顕著なヒストンアセチル化が認められた時間帯にUVBを照射し、24時間後の生存率を測定した(図2)。E2作用により、紫外線による細胞死が亢進した。

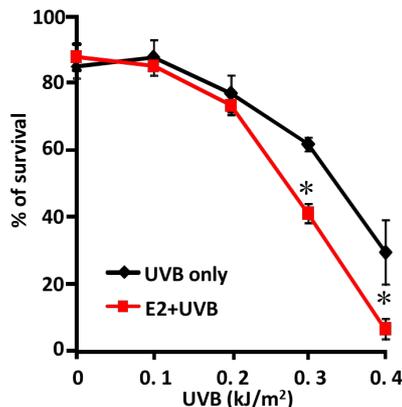


図2 17- β -エストラジオール作用後の紫外線感受性の上昇

(3) E2作用後のCPD生成率変化

紫外線照射による細胞死の主要原因は、紫外線照射により生成するDNA損傷である。紫外線照射により生成するDNA損傷には、CPDと6-4光産物があるが、本研究では、CPDに焦点をあて検討を行った。まず始めに、紫外線照射直後のCPD生成率を、E2作用の有無につ

いて比較検討した。紫外線照射は、ヒストンアセチル化が顕著に起こっていた時間帯に行った。その結果、E2作用の有無にかかわらず、CPDの生成量に変化は認められなかった(図3A)。また、生成量が同じことは、免疫染色法においても確認された(図3B)。

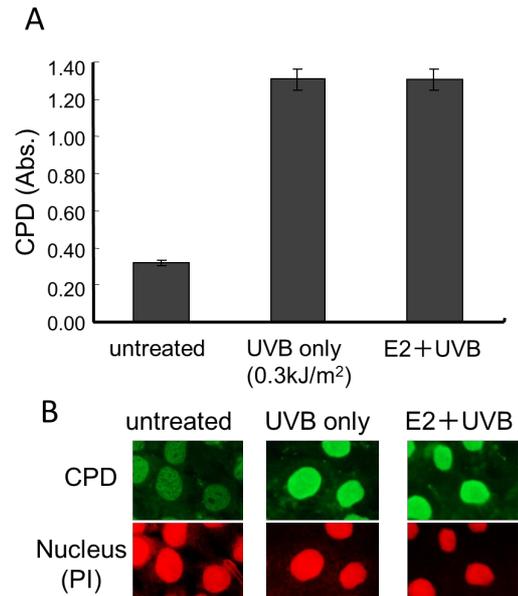


図3 E2作用後の紫外線暴露によるCPDの生成量変化
A: ELISAによる定量
B: 免疫染色による検出

(4) E2作用後のCPD修復率変化

CPDは6-4光産物に比べ、修復速度が遅く、6-4光産物が生成後、約4時間以内で修復さ

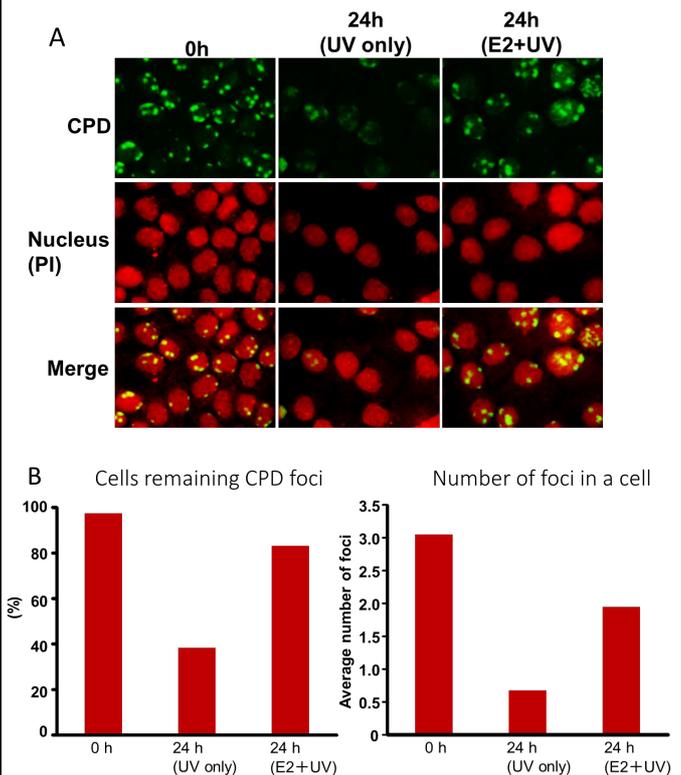


図4 E2作用後の紫外線局所照射によるCPDフォーカスの生成と修復
A: 局所照射法による免疫染色像
B: CPDフォーカスの生成修復率

れるのに対して、24 時間においても 50% 程度の修復率であることが報告されている。

E2 作用、紫外線照射後の CPD の修復率を、フィルターを用いた局所照射法で検討した。図 3B に示すような核全体を染める免疫染色法では、修復が定量不可能であったため、局所照射法を採用した。図 4 に結果を示す。照射直後に示された緑のフォーカスは、UVC が照射された部分を示す。CPD を有する細胞の数、ならびに一細胞あたりのフォーカスの数を、照射後直後の数を 100% として表した。E2 作用しない場合は、照射後 24 時間後には 40% 以下に CPD フォーカス数は減少したが、E2 を作用することにより、CPD の修復は有意に抑えられた。

さらに、E2 による CPD 修復の抑制を確認するために、CPD が修復される際に生成する DSBs を測定した。BSFGE 法により、DSBs を直接測定した結果、E2 作用により明らかな DSBs の生成抑制が認められた (図 5)。また、データは示さないが、 γ -H2AX の誘導も抑制された。

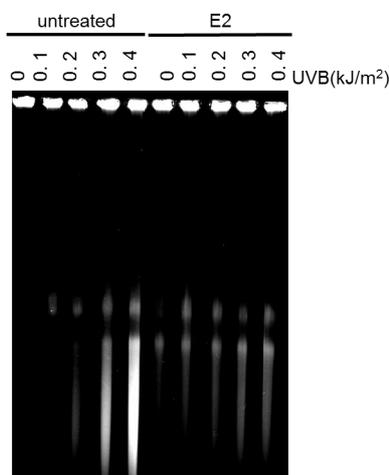


図5 E2作用の有無による紫外線照射後のDSBs生成の違い

(5) まとめ

各種化学物質を培養細胞に作用すると、ヒストンのリン酸化、アセチル化状態がダイナミックに変化すること、そのパターンは化学物質の種類に応じて異なることを明らかにした。中でも E2 は、ヒストンの高アセチル化、一時的なリン酸化を誘導した。また、ヒストンがアセチル化している状態では、紫外線感受性が亢進すること、その原因として、紫外線誘導 DNA 損傷である CPD の修復が遅延することが考えられた。今回は E2 についてデータを示したが、E2 以外にもヒストンのアセチル化を誘導する化学物質、例えば NNK など存在することが明らかになっていることから、それら化学物質と紫外線の複合曝露時の DNA 損傷修復と発がんへの寄与の検証の必要性が示唆された。また、今回は具体的なデータを示していないが、組織免疫染色や組織からのヒストン抽出により、ヒストン修飾

変化が検討できることが示された。今後、*in vitro*, *in vivo* 両方において化学物質と紫外線の複合曝露影響を評価していくことが望まれる。

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 18 件)

1. Y. Ibuki, Histone modifications induced by chemicals and photogenotoxicity. *Genes and Environment* 36, 111-117(2014). (査読有)
DOI: 10.3123/jemsg.2014.008
2. Yoshida and Y. Ibuki, Formaldehyde-induced histone H3 phosphorylation via JNK and the expression of proto-oncogenes. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 770, 9-18 (2014). (査読有)
DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2014.09.003X
3. Zhao, T. Toyooka, Y. Ibuki, Silver ions enhance UVB-induced phosphorylation of histone H2AX. *Environ Mol Mutagen.* 55: 556-565 (2014). (査読有)
DOI: 10.1002/em.21875
4. T. Kubota, T. Toyooka, X. Zhao, Y. Ibuki, Phosphorylation of Histone H2AX Generated by Linear Alkylbenzene Sulfonates and its Suppression by UVB Exposure. *Photochem Photobiol.* 90: 845-852 (2014). (査読有)
DOI: 10.1111/php.12268
5. Y. Ibuki, T. Toyooka, X. Zhao, I. Yoshida. Cigarette sidestream smoke induces histone H3 phosphorylation via JNK and PI3K/Akt pathways, leading to the expression of proto-oncogenes. *Carcinogenesis* 35(6):1228-37 (2014). (査読有)
DOI: 10.1093/carcin/bgt492
6. X. Zhao, T. Toyooka, Y. Ibuki, Synergistic bactericidal effect by combined exposure to Ag nanoparticles and UVA. *Sci Total Environ.* 458-460:54-62 (2013). (査読有)
DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.03.098
7. T. Kubota, T. Toyooka, Y. Ibuki, Nonylphenol polyethoxylates degraded by three different wavelengths of UV and their genotoxic change--detected by generation of γ -H2AX. *Photochem*

Photobiol. 89(2):461-7 (2013). (査読有)

DOI: 10.1111/php.12002

8. T. Toyooka, T. Kubota, Y. Ibuki. UVB irradiation changes genotoxic potential of nonylphenolpolyethoxylates-remarkable generation of γ -H2AX with degradation of chemical structure. *Mutagenesis* 28(1):7-14 (2013). (査読有)
DOI: 10.1093/mutage/ges043

[学会発表](計 37件)

1. 楊光, 伊吹裕子: ホルムアルデヒド暴露による紫外線感受性の上昇とDNA損傷修復の遅延. 第43回日本環境変異原学会(東京) 2014年12月.
2. 伊吹裕子, Vivienne Reeve: 長波長紫外線 UVA1 によるヒストン修飾変化. 第36回日本光医学・光生物学会(大阪) 2014年7月.
3. 楊光, 吉田唯真, 伊吹裕子: ホルムアルデヒド暴露による紫外線感受性の上昇とDNA損傷修復の遅延. 第27回変異原機構研究会(愛知) p8, 2014年6月21-22日.
4. 伊吹裕子, 豊岡達士: 環境化学物質の光分解と遺伝毒性変化: リン酸化ヒストン H2AX を指標とした解析. 日本薬学会第134回年会 2014年3月.
5. Y. Ibuki, T. Toyooka, G. Yang, M. Matsushita: 17 β -estradiol-induced hyperacetylation of histone H3 and change of sensitivity to UVB. The 6th Asia & Oceania Conference on Photobiology (Sydney). pp. 73, Nov. 2013.
6. 伊吹裕子: 化学物質によるヒストン修飾変化と光遺伝毒性. 第42回日本環境変異原学会(岡山)pp.69, 2013年11月.
7. 四方真理子, 豊岡達士, 伊吹裕子: NNKによるヒストン修飾変化とCYP2A13による代謝活性化との関連性. 第42回日本環境変異原学会(岡山) pp.116, 2013年11月.
8. 四方真理子, 豊岡達士, 伊吹裕子: NNKによるヒストン修飾変化とCYP2A6/2A13による代謝活性化との関連性. 第40回日本毒性学会学術年会(幕張) pp.71, Suppl.298, 2013年6月.
9. 伊吹裕子: 環境因子によるヒストン修飾変化 - 化学物質、食品成分等の複合曝露とその影響評価への応用. 環境科学学会 2013年会(静岡) pp.199, 2013年9月.
10. 伊吹裕子, 豊岡達士, 松下実理: 17 β -Estradiol によるヒストンアセチル化とDNA損傷修復応答変化. 第35回日本光医学・光生物学会(浜松) pp41, 2013年7月.
11. 四方真理子, 豊岡達士, 伊吹裕子: NNKによるヒストン修飾変化とCYP2A6/2A13による代謝活性化との関連性. 第26回変異原機構研究会(愛知) pp.18, 2013年6月.
12. 松下実理, 豊岡達士, 伊吹裕子: 17 β -estradiol によるヒストンアセチル化と紫外線感受性変化. 第41回日本環境変異原学会(静岡) pp.113, 2012年11月.
13. 吉田唯真, 豊岡達士, 伊吹裕子: , -不飽和アルデヒドによるヒストン修飾変化. 第41回日本環境変異原学会(静岡) pp.119, 2012年11月.
14. 伊吹裕子, 四方真理子, 吉田唯真, 豊岡達士, 若林敬二: 化学物質によるヒストン修飾変化とそれを指標とした毒性評価系の構築. 第27回 発癌病理研究会(修善寺) pp.31, 2012年8月.
15. I. Yoshida, T. Toyooka, Y. Ibuki: Formaldehyde-induced histone modifications and expression of proto-oncogenes. The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology (Sendai) pp.232, Jul. 2012.
16. 伊吹裕子, 豊岡達士: たばこ副流煙によるヒストン修飾変化. 第39回日本毒性学会学術年会(仙台) pp.232, 2012年7月.
17. 吉田唯真, 豊岡達士, 伊吹裕子: ホルムアルデヒドによるヒストン修飾変化とがん原遺伝子発現制御. 第39回日本毒性学会学術年会(仙台) pp.232, 2012年7月.

[その他]

ホームページ:

<http://sweb.u-shizuoka-ken.ac.jp/~photo/bio/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊吹 裕子 (IBUKI YUKO)

静岡県立大学・食品栄養科学部・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