

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460831

研究課題名(和文)ヒ素による後発的発癌増加に関するFosファミリー遺伝子発現調節メカニズムの解析

研究課題名(英文)Studies on the regulation of Fos family gene expression involved in late-onset increases of tumor induced by arsenic

研究代表者

鈴木 武博 (Suzuki, Takehiro)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境健康研究センター・主任研究員

研究者番号：60425494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒ素によるエピジェネティクス作用に着目したFosb遺伝子発現調節メカニズムを検討した。その結果、マウス肝癌細胞株においては、ヒ素によりFosbの発現が増加しFosb転写開始点近傍のDNAメチル化が減少した。さらに、DNAメチル化阻害剤による処理、及び3種類のDnmtsをそれぞれsiRNAでノックダウンすると、DNAメチル化阻害剤とDnmt3bノックダウンにおいてのみ、Fosb同領域のDNAメチル化が減少しFosb遺伝子発現が増加した。したがって、マウス肝癌細胞株では、Dnmt3bによるFosb転写開始点近傍のDNAメチル化がFosb発現調節に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the mechanisms of Fosb gene expression focused on epigenetic regulation by arsenic in mouse hepatoma Hepa1c1c7 cells. Upon exposure of Hepa1c1c7 cells to 0.5 μ M As₂O₃, the expression of Fosb was greatly increased after 2 days. The bisulfite sequencing revealed that DNA methylation level decreased in the DNA regions around transcription start sites (TSS) of Fosb gene by arsenic. We also found a decrease of DNA methylation level in the same DNA region and an increase of Fosb gene expression by DNA methyltransferase inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine and siDnmt3b in Hepa1c1c7 cells. These results suggested that the DNA methylation change in the DNA regions around TSS of Fosb gene by Dnmt3b is involved in its expression regulation by arsenic in Hepa1c1c7 cells.

研究分野：社会医学・衛生学

キーワード：ヒ素 エピジェネティクス Fosb

1. 研究開始当初の背景

有害物質に脆弱と考えられる胎児期や乳幼児期における環境化学物質曝露は、様々な後発的影響を誘導することが懸念されている。この後発的影響の分子メカニズムは主にエピジェネティクスによると考えられている。in vivo や in vitro における研究から、環境中の化学物質などが、エピジェネティクス作用を介して遺伝子発現に変化をもたらし、生体に影響を及ぼす可能性が徐々に報告されている。

無機ヒ素は、中国、インド、バングラデシュやアルゼンチンなどの世界各国で、地質から井戸水等への混入を介して深刻な健康被害をもたらす、大きな環境問題となっている。無機ヒ素の長期飲水摂取により皮膚、膀胱、肺、肝臓などに癌が発症するため、無機ヒ素は発癌物質としても知られている。さらに近年の疫学調査では、胎児期や乳幼児期の無機ヒ素曝露によって成人後に膀胱、肺、肝臓などの癌が増加するという報告がされている。したがって、無機ヒ素による発癌にもエピジェネティクス作用の関与が示唆されている。

無機ヒ素による動物実験発癌モデルとして、成長後に雄が肝臓に腫瘍を高率に自然発症する系統である C3H マウスを用いた系が報告された。これは、妊娠中のみ無機ヒ素を飲水投与した C3H マウスの母親から生まれた雄の子が 74 週令 (1 年 5 カ月) まで成長すると、対照群と比較して肝臓腫瘍を高率に発症するというものである。申請者らは、この系の追試をおこない、実際に無機ヒ素曝露群の母親から産まれた 74 週令の雄の子で肝臓腫瘍が増加することを確認し、無機ヒ素曝露群の腫瘍では癌遺伝子 Fos ファミリーに属する *Fosb* 遺伝子の発現が、対照群の肝臓腫瘍と比較しヒ素曝露群の肝臓腫瘍で大きく増加することを明らかにしている。しかしながら、無機ヒ素曝露群の腫瘍における *Fosb* 遺伝子発現調節メカニズムは不明であった。

胎児期無機ヒ素曝露の動物実験系はサンプル収集まで約 1 年半という多大な時間を費やすことになるため、短期間かつ簡便に影響を検出できる肝臓由来の細胞株を用い、無機ヒ素によるエピジェネティクス作用を介した *Fosb* 遺伝子の発現調節メカニズムを検討することを着想するに至った。

予備的検討により、マウス肝臓癌細胞株 Hepal1c1c7 において、無機ヒ素曝露により *Fosb* 遺伝子の発現が増加することを明らかにしている。したがって、この細胞株は、申請者らの結果をよく再現し、無機ヒ素による肝臓癌に関与するエピジェネティクス作用のメカニズムを総合的に議論するために、今回の研究計画に非常によく合致した細胞株であることが考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、申請者らが動物実験で得た結果を再現し、かつメカニズム研究が容易なマウス肝臓癌細胞株 Hepal1c1c7 を用い、無機ヒ素によるエピジェネティクス作用に着目した *Fosb* 遺伝子発現調節メカニズムを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

Hepal1c1c7 を As_2O_3 (以下ヒ素) で経時的に曝露後、回収した細胞から RNA 及びゲノム DNA を抽出し、リアルタイム PCR で *Fosb* の発現を調べた。ゲノム DNA をバイサルファイト処理し、バイサルファイトシークエンスにより、*Fosb* 転写開始点を含む領域及び遺伝子領域内部の CpG island の DNA メチル化状態を調べた (図 1)。同様の実験を、DNA メチル化阻害剤 5-aza-dC 及び siDnmts 処理によってもおこなった。また、クロマチン免疫沈降法により *Fosb* 転写開始点付近のヒストン修飾を調べた。

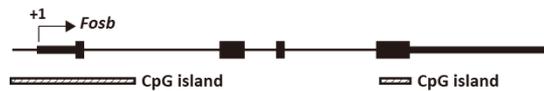


図 1. マウス *Fosb* の遺伝子領域模式図

4. 研究成果

0.5 μM のヒ素に Hepal1c1c7 を 48 時間曝露すると、*Fosb* 遺伝子の発現が大きく増加することが明らかになった (図 2)。この曝露条件を以下の実験で使用した。

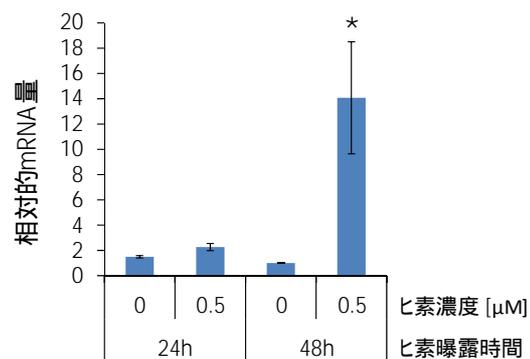


図 2. ヒ素による *Fosb* 遺伝子の発現変化

次に、ヒ素に Hepal1c1c7 を曝露したときに、上記 2 か所の CpG island の DNA メチル化状態が変化するかどうか調べるために、まず、ヒ素を曝露しない状態で、Hepal1c1c7 のゲノム DNA を用いてバイサルファイトシークエンシングをおこなった結果、転写開始点を含む CpG island では *Fosb* 転写開始点よりも下流 200 bp ~ 700 bp の領域がメチル化

されていることが明らかになった。一方、遺伝子領域内部の CpG island は、ほぼ完全にメチル化されていることが明らかになった。

次に、ヒ素に曝露した Hepal1c7 のゲノム DNA を用いてバイサルファイトシーケンスをおこなった。その結果、*Fosb* 転写開始点よりも下流 200 bp ~ 700 bp の領域の DNA メチル化が減少することがわかった。遺伝子領域内部の DNA メチル化はヒ素曝露でも変化せずほぼ完全にメチル化されていた。転写開始点付近の CpG island の DNA 高メチル化はその遺伝子発現を抑制し、低メチル化は遺伝子発現を活性化することが知られている。したがって、ヒ素曝露で *Fosb* 遺伝子の発現が増加していることから、ヒ素による *Fosb* 転写開始点よりも下流 200 bp ~ 700 bp の領域の DNA メチル化が *Fosb* 遺伝子発現に關与している可能性が考えられた。

Hepal1c7 における *Fosb* 遺伝子発現調節に DNA メチル化が關与しているかをより詳細に調べるために、DNA メチル化阻害剤 5-アザ-2'-デオキシシチジン (5-aza-dC) を用いて検討した。Hepal1c7 を 5-aza-dC で処理すると、5-aza-dC の濃度依存的に *Fosb* 遺伝子発現が増加することがわかった。このとき、*Fosb* 転写開始点よりも下流 200 bp ~ 700 bp の領域の DNA メチル化は減少したが、遺伝子領域内部はほぼ完全にメチル化されたままだった。したがって、Hepal1c7 において、*Fosb* 遺伝子は DNA メチル化により発現が調節されている可能性が示唆された。

哺乳類では DNA をメチル化する酵素として、3 種類のメチル基転移酵素 (Dnmt) が知られている。DNA メチル化の維持に關与するのが Dnmt1 で、新規に DNA をメチル化する酵素が Dnmt3a および Dnmt3b である。Hepal1c7 における *Fosb* 遺伝子の発現調節にどの Dnmt が關与しているのかを調べるために、siRNA による各 Dnmt のノックダウンをおこなった。siRNA により、それぞれの Dnmt の発現が有意に抑制されていることを確認後、それぞれの siRNA 処理による *Fosb* 遺伝子の発現量と、siRNA 処理した Hepal1c7 のゲノム DNA を用いてバイサルファイトシーケンスにより DNA メチル化状態を調べた。その結果、Dnmt3b をノックダウンしたときのみ、*Fosb* 遺伝子の発現が増加することが明らかになった。そのとき、*Fosb* 転写開始点よりも下流 200 bp ~ 700 bp の領域の DNA メチル化は減少したが、遺伝子領域内部はほぼ完全にメチル化されたままだった。したがって、Hepal1c7 における *Fosb* 遺伝子発現調節には、Dnmt3b が關与している可能性が考えられた。

以上の結果から、Hepal1c7 においては、ヒ素曝露による *Fosb* 遺伝子発現には、

Dnmt3b による転写開始点よりも下流 200 bp ~ 700 bp の領域の DNA メチル化が深く關与する可能性が示唆された。

DNA メチル化に加えて、ヒストン修飾もエピジェネティック作用として重要である。Hepal1c7 におけるヒ素曝露による *Fosb* 遺伝子発現調節にヒストン修飾が關与しているかどうかをクロマチン免疫沈降法により調べた。その結果、*Fosb* 転写開始点近傍において、遺伝子発現の活性化に關与するアセチル化ヒストン H3 のレベルがヒ素曝露で増加することがわかった。転写活性化と遺伝子領域内部の H3K36me3 レベルが対応することが報告されているため、遺伝子領域内部における H3K36me3 レベルも検討したところ、H3K36me3 レベルはヒ素曝露で増加することがわかった。この条件においてはグローバルな H3K36me3 レベルがヒ素で増加していた。以上の結果から、Hepal1c7 においては、ヒ素による *Fosb* 遺伝子の発現増加には、DNA メチル化変化に加えて、転写開始点上流のアセチル化ヒストン H3 レベルの増加、および遺伝子領域内部の H3K36me3 レベルの増加が關与している可能性が示唆された。

マウス以外の細胞におけるヒ素曝露による *Fosb* 遺伝子発現調節メカニズムを検討するために、ヒト肝癌細胞株 HepG2 を用いて、*Fosb* 遺伝子領域の 2ヶ所の CpG island (転写開始点付近と遺伝子領域内部) の DNA メチル化解析をおこない、*Fosb* 遺伝子の発現と比較検討した。ヒトの *Fosb* 遺伝子領域は、染色体番号が異なるもののマウスの *Fosb* 遺伝子領域とほぼ同じ構造である。その結果、ヒ素曝露した HepG2 では、*Fosb* 遺伝子の発現が大きく増加することを確認した。ヒ素曝露していない HepG2 のゲノムを用いてバイサルファイトシーケンスをおこなった結果、*Fosb* 転写開始点近傍の CpG island はほぼ完全に非メチル化状態だったが、遺伝子領域内部は 20%程度メチル化されていることがわかった。HepG2 をヒ素で曝露すると、*Fosb* 遺伝子領域内部の CpG island の DNA メチル化が増加した。遺伝子領域内部の DNA メチル化は、遺伝子発現の増加と対応することが報告されているため、HepG2 においても *Fosb* 遺伝子の発現調節には DNA メチル化変化が關与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

(1) Nohara K, Okamura K, Suzuki T, Murai H, Ito T, Shinjo K, Takumi S, Michikawa T, Kondo Y, Hata K. Augmenting effects of gestational arsenite exposure of C3H mice on the hepatic tumors of the F2 male offspring via the F1

male offspring. J Appl Toxicol. 2016, 36, 105-12. DOI: 10.1002/jat.3149, 査読有

(2) 鈴木武博, 野原恵子. 無機ヒ素によるマウス肝がん増加に関連したエピジェネティック変化と DNA メチル化マーカーの探索. 日本衛生学雑誌. 2015;70(3):181-5. 総説, DOI: 10.1265/jjh.70.181, 査読有

(3) 野原恵子, 鈴木武博, 内匠正太, 岡村和幸. 妊娠期無機ヒ素曝露による子での癌遺伝子体細胞突然変異を介した発癌増加と多世代・継世代影響. 日本衛生学雑誌. 2014; 69(2):92-6.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24858502>, 総説, 査読有

(4) Takumi S, Aoki Y, Sano T, Suzuki T, Nohmi T, Nohara K. In vivo mutagenicity of arsenite in the livers of gpt delta transgenic mice. Mutat Res. 2014, 760, 42-47. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2013.12.001, 査読有

(5) Suzuki T, Yamashita S, Ushijima T, Takumi S, Sano T, Michikawa T, Nohara K. Genome-wide analysis of DNA methylation changes induced by gestational arsenic exposure in liver tumors. Cancer Sci. 2013, 104, 1575-1585. DOI: 10.1111/cas.12298, 査読有

〔学会発表〕(計6件)

(1) 鈴木武博, 岡村和幸, 野原恵子. Fosb 発現と DNA メチル化変化の対応関係を検討する実験系の探索. 日本環境変異原学会第 44 回大会, 2015 年 11 月 28 日, 九州大学 (福岡)

(2) 鈴木武博, 野原恵子, マウス肝臓癌細胞株における無機ヒ素による Fosb の発現と DNA メチル化変化, フォーラム 2014 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2014 年 9 月 20 日, つくば国際会議場 (つくば)

(3) 鈴木武博, 山下聡, 牛島俊和, 内匠正太, 佐野友春, 野原恵子, 胎児期無機ヒ素曝露によるマウス肝腫瘍の DNA メチル化変化, 第 84 回日本衛生学会学術総会, 2014 年 5 月 25 日, 岡山コンベンションセンター (岡山)

(4) Suzuki T, Yamashita S, Ushijima T, Takumi S, Sano T, Nohara K. Identification of DNA methylation changes in the liver tumors induced by gestational arsenic exposure using genome-wide analysis, Society of Toxicology 53rd Annual Meeting, 2014 年 3 月 24 日, フェニックス (アメリカ)

(5) 鈴木武博, 野原恵子, マウス肝臓癌細胞株における Fosb 発現と DNA メチル化の関連.

分子予防環境医学研究会第 13 回大会, 2014 年 1 月 31 日, 和歌山県民文化会館 (和歌山)

(6) 鈴木武博, 山下聡, 牛島俊和, 内匠正太, 佐野友春, 野原恵子, 胎児期ヒ素曝露によるマウス肝腫瘍の領域特異的な DNA メチル化と遺伝子発現変化. 日本 DOHaD 研究会第 2 回学術集会, 2013 年 6 月 7 日, 厚生労働省戸山研究庁舎 (東京)

〔図書〕(計1件)

(1) 鈴木武博, 野原恵子, 環境因子によるエピジェネティック制御, 毒性の科学, 49-52, 東大出版会, 2014 年 2 月 28 日発行, 総ページ数 200

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 武博 (SUZUKI TAKEHIRO)
国立研究開発法人国立環境研究所・
環境健康研究センター・主任研究員
研究者番号: 60425494