

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02828

研究課題名(和文) 近年の皮膚がん増加における化学物質・紫外線複合曝露の寄与

研究課題名(英文) Contribution of combined exposure to chemicals and ultraviolet rays in recent increase of skin cancer

研究代表者

伊吹 裕子 (Ibuki, Yuko)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：30236781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、化学物質によるヒストン修飾変化と、紫外線によるDNA損傷生成・修復との関わりを細胞レベルで明らかにし、それを実験動物で実証することにより、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している。多環芳香族炭化水素の酸化体、たばこ副流煙、酸化亜鉛や酸化銅などの金属ナノ粒子により、ヒストンのアセチル化状態が変化した。その状態で紫外線を照射すると、紫外線により生成するDNA損傷の修復が遅延した。また、化学物質を皮膚に塗布後紫外線を照射したマウスにおいても同様の結果が確認された。以上の結果より、一部の化学物質と紫外線の複合曝露は、皮膚がんを増加させる一要因となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, the effect of exposure to chemicals on formation and repair of ultraviolet ray (UV)-induced DNA damage was examined in vitro and in vivo. In cultured human cells, cigarette sidestream smoke condensate (CSS), oxidant forms of polycyclic aromatic hydrocarbons, metal nanoparticles, etc. disrupted histone modifications, especially histone acetylation. In the condition of the disrupted histone modifications, the sensitivity to UV was increased. UV-induced DNA damage, pyrimidine dimers, were similarly formed, whereas the repair was delayed. Hairless mouse skin treated with CSS was exposed to UVB. The immunohistochemical staining of cyclobutane pyrimidine dimers revealed that their repair was delayed by the CSS treatment. These results suggested that combined exposure to some chemicals and UV may be a factor in increasing skin cancer.

研究分野：毒性学

キーワード：化学物質 ヒストン 紫外線 複合曝露 NER DNA損傷 DNA修復 たばこ

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。日本においても、基底細胞がん、有棘細胞がんの増加が報告されている。これら皮膚がんの増加は、寿命の延長や、近年のライフスタイルの変化、ならびに、オゾン層破壊による有害紫外線量の増加が寄与すると考えられるが、我々は、その原因の一つに環境化学物質による生体への影響とそれに基づく紫外線応答の変化が関与していると考えている。

ヒトは、化学物質と紫外線に同時曝露される。紫外線皮膚発がんの主な要因は、紫外線により生成するピリミジンダイマーをはじめとする DNA 損傷であるが、我々は、これまでの研究により、幾つかの環境化学物質やホルモンが、ピリミジンダイマーの修復を遅延することを明らかにしている。また、化学物質によるピリミジンダイマーの修復抑制機構について、我々は DNA が巻きついている主要蛋白質であるヒストンに注目している。ヒストンはアセチル化やメチル化など様々な化学修飾を受け、それが DNA との相互作用を変えるため、クロマチン構造を弛緩または凝集させる。クロマチンの構造変化は特定の遺伝子群の誘導もしくは抑制を引き起こすだけでなく、損傷修復因子の集積効率などを変化させ、DNA 損傷修復速度を制御すると考えられる。化学物質曝露は多様なヒストン修飾をもたらすと考えられているが、その研究はまだ少なく、化学物質曝露後の DNA 損傷修復との関連性についてはほとんど検討されていない。

2. 研究の目的

上記の背景を基に、本研究では、化学物質によるヒストン修飾変化と、紫外線による DNA 損傷生成・修復との関わりを細胞レベルで明らかにし、それを実験動物で実証することにより、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化学物質によるヒストン修飾パターンの検討

各種ヒト培養細胞に化学物質を作用後、ヒストン修飾の変化を、ウエスタンブロット法、免疫染色法により解析した。ヒト肺基底上皮腺癌細胞 A549 およびヒト乳癌細胞 MCF-7 は Japanese Collection of Research Bioresources (Japan) から購入した。ヒト皮膚角化細胞 HaCaT は Dr. N Fusening (German Cancer Research Center, Germany) より譲渡された。化学物質は、たばこ副流煙 (CSS)、飽和・不飽和アルデヒド類、金属ナノ粒子類、多環芳香族炭化水素類とした。CSS は、たばこ 5 本分の燃焼煙を 100ml の細胞培養用培地 (DMEM) にバブリングにてトッラップし、100%サンプルとした。

各化学物質を作用した後、一定時間ごとに細胞を回収し、1 mL MS Buffer (5 mM Tris-HCl (pH7.5)、1 mM EDTA (pH7.5)、210 mM mannitol、70 mM sucrose、1% protease inhibitor) を加え、ホモジナイズ、遠心分離し、核画分を回収した。Western Blotting 用 Lysis Buffer (50 mM Tris (pH8.0)、5 mM EDTA、150 mM NaCl、0.5% nonidet P-40) に懸濁し、1 分間で超音波処理し、蛋白質定量後、SDS-PAGE、各種ヒストン修飾抗体によるウエスタンブロットングを行った。

②ヒストン修飾と紫外線 DNA 損傷生成、修復率変化との関連性の解析

①で明らかになった代表的なヒストン修飾パターンを引き起こす化学物質を選択し、培養細胞に作用後、紫外線を照射し、ピリミジンダイマー (cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs)、6-4 photoproducts (6-4PPs)) の生成、修復率を測定した。ピリミジンダイマーの定量は、ELISA、ドットブロット法、フィルターを介した紫外線部分照射後の免疫染色法により行った。また、DNA 損傷マーカーであるヒストン H2AX のリン酸化 (γ -H2AX) の誘導を解析した。

DNA 損傷部位への修復分子の集積は、3 μ m の穴を有するフィルター (Millipore) を通して紫外線 UVC (254 nm, アトー) を照射し、形成されるピリミジンダイマーへの TFIIH の集積を免疫蛍光染色法によりフォーカスとして検出し、計測した。

③ マウス皮膚組織における、化学物質、紫外線曝露後の DNA 損傷修復変化の検証

②において明らかな DNA 損傷修復遅延を誘導した CSS を用いて、マウス皮膚に塗布後、紫外線を照射し、生成した CPDs の修復を組織免疫染色法により検討した。

4. 研究成果

①化学物質によるヒストン修飾パターンの検討

ヒト培養細胞に各種化学物質を作用させると、各化学物質に対応した異なったヒストン修飾パターンが得られた。特に、多環芳香

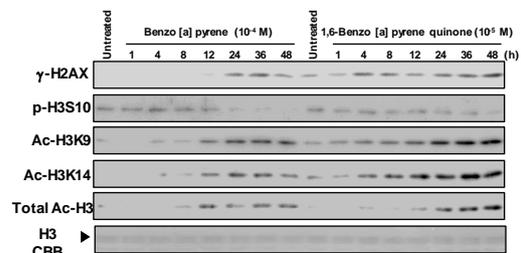


図 1 Benzo[a]pyrene とその酸化体によるヒストン修飾の時間変化

BaP (10^{-4} M)、BaP-1,6-quinone (10^{-5} M) を A549 細胞に作用し、48 時間までのヒストン修飾変化を検討した。

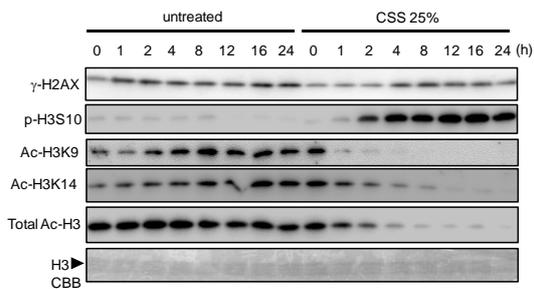


図2 たばこ副流煙(CSS)によるヒストン修飾の時間変化

CSSを25%濃度でHaCaT細胞に作用させ、48時間までのヒストン修飾変化を検討した。

族化合物の酸化体、金属ナノ粒子などにより、ヒストンアセチル化が誘導された。多環芳香族化合物である benzo[*a*]pyrene, その酸化体である 1,6-benzo[*a*]pyrene quinone を作用させた後のヒストン修飾パターンを図1に示す。benzo[*a*]pyrene に比べ酸化体は顕著なアセチル化を示した。金属ナノ粒子では、酸化亜鉛や酸化銅においてアセチル化が認められたが、酸化鉄や酸化チタンなどでは変化が認められなかった。逆に、CSS や不飽和アルデヒド類では、ヒストンアセチル化は低下した(図2)。

②ヒストン修飾と紫外線 DNA 損傷生成、修復率変化との関連性の解析

ヒストンが修飾変化した時間に紫外線を照射し、その後のピリミジンダイマーの生成、修復率を測定した。benzo[*a*]pyrene の酸化体、CSS など、ヒストンアセチル化または脱アセチル化させた化学物質では、紫外線曝露後の γ -H2AX の誘導が亢進または低下し、複合曝露により DNA 損傷修復に影響があることが示された(データ示さず)。そこで、最も顕著な変化を示した CSS について、ピリミジンダイマーの生成、修復率を測定した。CSS 作用後、UVB を照射、0~2 時間での 6-4PPs 量を測定した。ドットプロット法、ELISA を用いた検

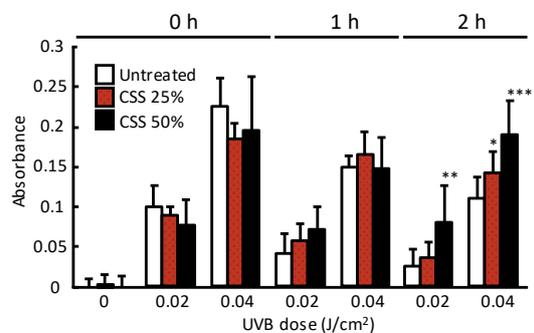


図3 たばこ副流煙(CSS)と紫外線曝露後の6-4PPsの生成、修復

CSSを25, 50%濃度でHaCaT細胞に作用させ、UVB (0.02, 0.04 J/cm²)を照射、0-2時間培養後の6-4PPs量をELISAで測定した。

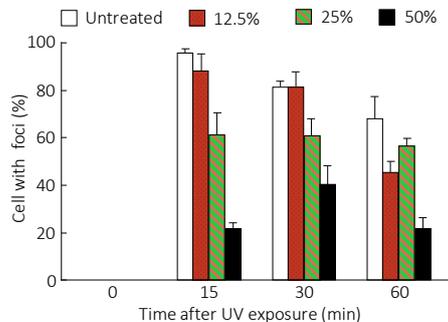
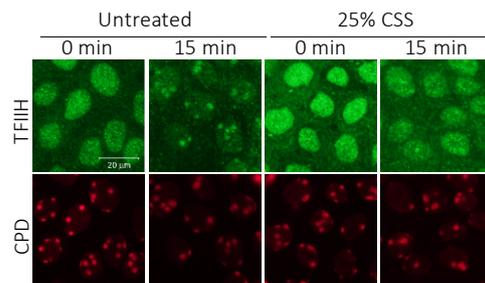


図4 たばこ副流煙(CSS)によるDNA損傷部位への修復分子の集積阻害

CSSを作用した細胞にフィルターを介して紫外線を部分照射し、生成したCPDs部位へのTFIIFの集積を免疫蛍光染色法により検討した。

討によれば、UVB照射により生成した6-4PPsは、CSSの有無にかかわらず同量であった。CSSがない場合は、6-4PPsは、2時間までに時間依存的に修復されたが、CSS作用した場合には、その修復が有意に抑制された。ELISAによる結果を図3に示す。

ピリミジンダイマーの修復が抑制された理由として、我々は2つの原因を考えている。一つは、DNAが巻き付く主要蛋白質であるヒストンの修飾により、クロマチン構造が変化し、修復率が低下したこと、もう一つは、ピリミジンダイマーを修復するために集積する多種の修復分子が何らかの理由により、損傷部位に集積できなかった可能性である。ヒストンが変化している時間帯に今回は照射していることから、前者は考えられることである。また、後者についても、実際に、フィルターを用いた紫外線の部分照射により、損傷生成部位に修復分子が集積するが、CSS作用により、その集積は有意に抑制された(図4)ことから、損傷部位への集積が抑制された可能性が考えられた。

CSS、アルデヒドによるヒストン修飾変化や紫外線DNA損傷修復阻害は、細胞種によりその効果が異なり(データ示さず)、それは、求電子性であるアルデヒドと反応する細胞内化合物の量の違いに依存することが考えられた。

③マウス皮膚組織における、化学物質、紫外線曝露後のDNA損傷修復変化の検証

CSS作用した場合には、その修復が低下することが *in vitro* で示されたので、同様の

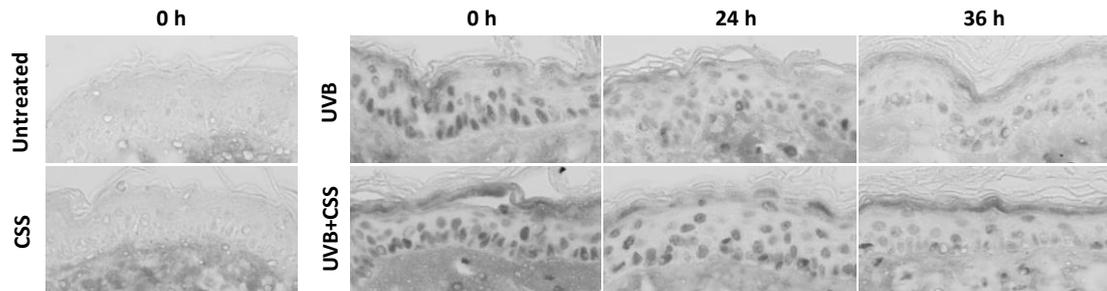


図5 たばこ副流煙 (CSS) と紫外線曝露後のピリミジンダイマーの生成と修復

CSS 作用後、UVB を照射し、0, 24, 36 時間後、マウスの背部皮膚を回収し、CPDs 抗体による組織免疫染色を行った。

損傷修復阻害が *in vivo* においても引き起こされるのかどうか明らかにするために、HR-1 ヘアレスマウス背部皮膚の所定範囲に、CSS サンプルを 12 時間間隔で 6 回塗布した後、UVB を照射した。0, 24, 36 時間後、マウスの背部皮膚を回収し、CPDs 抗体による組織免疫染色法を行った (図 5)。

CPDs の持つ細胞は茶色く染められ、色の濃さは CPDs の量を示している。UVB に曝露されなかった場合、CPDs に染色された細胞は確認できなかった。UVB 照射直後の場合、CSS 塗布の有無にかかわらず、CPDs の染色はほぼ同じであったが、24 時間経過すると、CSS 塗布による CPDs 修復の遅延が認められた。36 時間では、UVB のみの場合に比べ、CSS 塗布されたマウスの皮膚における CPDs の示す色が明らかに濃かった。*in vitro* で認められた化学物質による DNA 損傷修復阻害が *in vivo* でも同様に確認された。

以上の結果より、ヒストン修飾を変化させる化学物質は、ヌクレオチド除去修復速度を遅延させることが明らかとなった。特に、アルデヒドの様な反応性の高い化学物質は、様々な細胞内分子、中でも紫外線 DNA 損傷の修復に必要な分子やクロマチン構造の主要蛋白質であるヒストンとも反応し、その機能に影響することが示された。よって、化学物質と紫外線の複合曝露は、DNA 損傷修復の遅延から、DNA 変異の亢進につながる可能性が考えられた。ヌクレオチド除去修復以外の DNA 損傷修復機構については今回検討していないが、同じように修復が阻害されている可能性が考えられるため、今後検討を行いたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. G. Yang, Y. Ibuki. Cigarette sidestream smoke delays nucleotide excision repair - inhibited accumulation of repair proteins at DNA lesions. *Carcinogenesis*, 39, 56-65 (2018). doi: 10.1093/carcin/bgx109.

2. G. Yang, Y. Ibuki. α , β -Unsaturated aldehyde-induced delays in nucleotide excision repair and the contribution of reactive oxygen species. *Chem. Res. Toxicol.*, 31, 145-155 (2018). doi: 10.1021/acs.chemrestox.7b00304.
3. X. Zhao, T. Toyooka, Y. Ibuki. Silver nanoparticle-induced phosphorylation of histone H3 at serine 10 is due to dynamic changes in actin filaments and the activation of Aurora kinases. *Toxicol Lett.* 276:39-47 (2017). doi:10.1016/j.toxlet.2017.05.009.
4. X. Zhao, F. Takabayashi, Y. Ibuki. Coexposure to silver nanoparticles and ultraviolet A synergistically enhances the phosphorylation of histone H2AX. *J. Photochem. Photobiol. B* 162, 213-222 (2016).
5. 伊吹裕子 化学物質によるヒストン修飾と遺伝毒性 *Bio Clinica* 31(5) 93-96 (2016).
6. Y. Ibuki, M. Shikata, T. Toyooka. γ -H2AX is a sensitive marker of DNA damage induced by metabolically activated 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Toxicol. in vitro.* 29, 1831-8 (2015).
7. X. Zhao, Y. Ibuki. Evaluating the toxicity of Ag nanoparticles by detecting phosphorylation of histone H3 in combination with flow cytometry side-scattered light. *Environ. Sci. Technol.* 49, 5003-12 (2015).

[学会発表] (計 23 件)

1. 伊吹裕子: 化学物質によるヌクレオチド除去修復の阻害—ヒストン修飾変化と活性酸素種の影響 日本酸化ストレス学会東海支部第 6 回学術集会 (静岡)

2018年2月10日.

2. 楊光, 伊吹裕子: たばこ副流煙によるヌクレオチド除去修復の遅延とそのメカニズム. ConBio2017 (神戸) 2017年12月.
3. 伊吹裕子, 楊光: 飽和/不飽和アルデヒド類によるヌクレオチド除去修復の阻害. 第43回日本毒性学会 (横浜) 2017年7月.
4. 趙曉旭, 伊吹裕子: 各種金属ナノ粒子によるヒストン修飾変化とその誘導メカニズムの検討. 第45回日本環境変異原学会 (つくば) 2016年11月.
5. 趙曉旭, 高林ふみ代, 伊吹裕子: 銀ナノ粒子と紫外線の組み合わせによる酸化型DNA損傷の増加とヒストンH2AXのリン酸化. 第44回日本環境変異原学会 (福岡) 2015年11月.
6. Y. Ibuki: Histone modifications induced by chemicals and change of sensitivity to UV. 15th International Conference of Radiation Research (Kyoto), May 2015.

[図書] (計 2件)

1. Y. Ibuki, Silver and Histone modifications. "Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics" eds. V.R.Preedy, V.B. Patel, Springer International Publishing AG (2017). doi: 10.100/978-3-319-31143-2_74-1
2. 伊吹裕子, 光と生命の事典「太陽紫外線の生体影響」 日本光生物学協会 編集 2016年2月

[その他]

ホームページ

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

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・教授

研究者番号: 30236781

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

平川 和貴 (HIRAKAWA, Kazutaka)

静岡大学・工学研究科

研究者番号: 60324513

(4) 研究協力者

趙曉旭 (ZHAO, Xiaoxu)

楊光 (YANG, Guang)