

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09162

研究課題名(和文) 妊娠期化学物質曝露仔動物に対するエピジェネティックな肝発がん誘発機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the epigenetic mechanism of carcinogenesis in pups exposed to chemicals during pregnancy

研究代表者

鰐淵 英機 (Wanibuchi, Hideki)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：90220970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠期における子の発達環境が成人後の疾患リスクに影響を与えるという概念(DOHaD説)が生活習慣病領域において報告され、近年発がんにおいても提唱されている。動物実験においても、無機および有機ヒ素を妊娠期の母マウスに曝露させられた仔マウスにおいて、発がんリスクが増加することが報告されている。今回、有機ヒ素化合物DMAは胎盤を介して発がん標的臓器に存在し、その経胎盤曝露による発がんには、ヒストン修飾異常のようなエピジェネティックな発がん機序が関与することを明らかにした。また、妊娠期に生じた影響が成熟後にも存在することが明らかとなり、発がんリスク評価の指標として利用できる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠期における子の発達環境が成人後の疾患リスクに影響を与えるという概念であるDOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) 説が注目されており、これまでに発達期の低栄養環境による生活習慣病等のリスクを増加させることが報告されている。近年、がんにおいても妊娠期における環境が、将来の発がんリスクに影響を与えることが報告されており、発がんリスクを減少させるため発がん機序の解明が望まれる。我々の研究により明らかとなった有機ヒ素化合物DMAの経胎盤曝露によって生じたエピジェネティック異常が、妊娠期曝露による発がんの機序解明に寄与すると期待される。

研究成果の概要(英文)：The concept of developmental origins of health and disease” (DOHaD) has been proposed to link lifestyle-related diseases with the environmental conditions of the early life including the fetal period. Carcinogenic risk though gestational exposure is becoming an important theme for environmental carcinogenesis. Recently, we reported that gestational (transplacental) exposure to organic arsenical dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung and liver carcinogenesis in mice. In the present study, we demonstrated that transplacental exposure to DMA enhanced lung carcinogenesis via histone modification in mice. This finding indicated that the epigenetic alterations induced by arsenicals during the fetal period attribute to the increased risk of cancers in offspring and might serve as useful markers for risk assessment.

研究分野：実験病理学

キーワード：ヒ素 DMA 経胎盤ばく露 経世代影響 発がん エピジェネティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

妊娠期や乳幼児期にあたる発達期の環境が、成人後の疾患リスクに影響を与えるという概念である DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) 説が注目されており、これまでに、発達期の低栄養環境による発育遅延および心疾患・糖尿病をはじめとする生活習慣病等のリスクを増加させることが報告されている。さらに近年 DOHaD 説が発がんにおいても提唱され (Walker, C.L. and Ho, Nature reviews. Cancer. 2012)、発がんにおける Hot topic となっている。

疫学的に無機ヒ素がヒトの各種臓器に対して発がん性を有することが報告されているが、実験動物モデルを用いた発がん性評価系では無機ヒ素投与による発がん性の報告はこれまでなかった。しかし、アメリカの Waalkes らのグループによって、C3H マウスの妊娠第 8 日から第 18 日の 10 日間のみ 85 ppm の無機ヒ素を含む水を摂取させると、生まれた雄性仔において、74 週齢時に対照群と比較して肝臓腫瘍の発症率が増加したことが報告された (Waalkes, M. et al. Carcinogenesis, 2004)。さらに Nohara らは妊娠中の母親 (F0) への無機ヒ素を摂取し生まれた雄性仔 (F1) を父親とする孫世代 (F2) の雄性マウスにおいて、中年期以降に対照群と比べて肝臓がんを高率に発症するという結果が報告されており (Nohara, K. et al., Journal of applied toxicology, 2016)、妊娠期ヒ素曝露誘発肝臓がんメカニズムの解明が待たれる。

また、申請者らの研究で無機ヒ素の生体内代謝物質の一つである有機ヒ素化合物ジメチルアルシン酸 (DMA) を同様に妊娠期曝露させ、生まれた雄性仔について 84 週齢時に肝臓腫瘍 (肝細胞腺腫および肝細胞癌) および肺腫瘍 (肺腺腫および肺腺癌) の有意な増加を認めることが明らかとなっている。無機および有機のいずれのヒ素においても妊娠期曝露によって、雄性仔マウスの肝臓がんが誘発されていることから、ヒ素の妊娠期曝露において、無機および有機ヒ素に共通する発がんメカニズムの存在が示唆されている。そこで本研究では、DMA の妊娠期曝露による発がんメカニズムについて検討を行った。

2. 研究の目的

本研究は、妊娠期ヒ素曝露により成長後に発症する雄仔肝臓がんの機構を明らかにするため、

- (1) 妊娠期ヒ素曝露した新生児におけるヒ素の形態別定量的解析を行うことで、母動物に投与したヒ素が妊娠期を介して発がん標的臓器に蓄積するか、またどのようなヒ素化合物として存在するか検証する。
- (2) 胎仔あるいは新生仔組織において、ヒ素の蓄積が明らかとなった臓器におけるエピジェネティック関連因子 (DNA メチル化あるいはヒストン修飾異常) を検討し、発がん過程における Key molecule を同定する。

以上 2 点を目的として、研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 動物並びに飼育条件

交配を実施した CD1 マウスは日本クレア株式会社から雌雄をそれぞれ入手し、1 週間の検疫・馴化飼育の後、8 週齢時に試験に供した。なお、本研究に関連する動物実験の実施については大阪市立大学動物実験施設による審査・承認のもと行った。また実験動物の取り扱いについては、大阪市立大学動物実験管理規定および社団法人日本実験動物学会の動物取り扱い規約に準拠して行った。

(2) マウスの経胎盤曝露による仔マウスの作製

8 週齢に達した動物に交配を実施し、妊娠した母動物に対して妊娠第 8 日から第 18 日まで、DMA を 0、200 ppm の用量で飲水投与し、出生が確認された雄性新生仔マウスおよび 6 週齢まで飼育した仔マウス (6 週齢マウス) より肝臓および肺を採取し、ホルマリン固定および凍結保存を行い以降の試験に供した。

(3) DMA 経胎盤曝露肝臓における発がん機序の解析

新生仔マウス肝臓内ヒ素の測定

雄性新生仔マウス肝臓組織内のヒ素を、LC-ICP-MS で化学形態別に濃度測定した。サンプル調整法について以下に記す。キレート剤 (EDTA・2Na) およびジエチルジチオカルバミン酸ジエチルアンモニウムを含む酢酸緩衝液 300 μ l にマウス組織を添加後、ピーズ破砕し上清を回収した。得られた上清に四塩化炭素 400 μ l を加えヒ素化合物を分離精製した。得られた溶液を LC-ICP-MS でヒ素化学形態別に測定した。

新生仔マウスにおける網羅的遺伝子発現解析およびパスウェイ解析

新生仔マウス肝臓凍結組織より total RNA を抽出し、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。また得られた結果について、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) Software によるパスウェイ解析を行った。

(4) DMA 妊娠期曝露肺における発がん機序の解析

新生仔マウス肺組織内ヒ素の測定

雄性新生仔マウス肺組織内のヒ素を、LC-ICP-MS で化学形態別に濃度測定した。サンプル調整法については 3-1 と同様の方法で行った。

Ki-67 免疫組織化学染色（免疫染色）による細胞増殖能の検討

ホルマリン固定した新生仔および 6 週齢マウスより得られた肺組織から標本を作成し、Ki-67 抗体による免疫組織化学染色を実施した。肺胞上皮の Ki-67 核陽性率を測定し、細胞増殖能を検討した。

ヒストン H3K9me3 および H3K27me3 の核タンパク発現量解析

新生仔マウス肺組織より抽出した核タンパクを用いて、ヒストン H3K9 のトリメチル化 (H3K9me3) および K27 のトリメチル化 (H3K27me3) について Western blot 法で半定量的に評価を行った。なお、内在性コントロールとしてヒストン H3 を用いた。

新生仔マウスにおける網羅的遺伝子発現解析およびパスウェイ解析

新生仔マウス肺凍結組織より total RNA を抽出し、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。また得られた結果について、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) Software によるパスウェイ解析を行った。

quantitative RT-PCR (qPCR) 解析

mRNA 発現量について TaqMan 定量的 PCR で解析を行った。また、定量的評価のために内在性コントロールとして 18S を指標とし、得られた遺伝子発現量を Western blot 法にて評価した。

新生仔マウスにおけるヒストン H3K9me3 の ChIP-seq の実施

新生仔マウス肺組織より genomic DNA (gDNA) を抽出し、ヒストン H3K9me3 を標的とした ChIP-seq 解析について次世代シーケンサーを用いて行った。得られた結果は Integrative Genomics Viewer (IGV) を用いて標的領域のアノテーションを実施した。

マイクロアレイおよび ChIP-seq データの比較統合解析

マイクロアレイおよび ChIP-seq で得られたデータを用いて、共通して発現変動がみられた遺伝子の検索を行った。

Keratin 8 の免疫染色

ホルマリン固定した新生仔、6 週齢仔および 84 週齢仔マウス肺組織より標本を作製後、抗 keratin 8/18 (Krt8/18) 抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、肺組織内における keratin 8 (Krt8) の発現を検討した。

(5) 統計学的解析

すべての数値は平均 ± 標準偏差 (Mean ± SD) で表記した。遺伝子発現量について、F 検定による等分散検定を行った。等分散の場合は student t test による両側検定を行い、不等分散の場合は welch t test 法による両側検定を行った。

4. 研究成果

(1) DMA 妊娠期曝露肝臓における発がん機序の解析

新生仔マウス肝組織内ヒ素の測定

対照群と比較して肝組織内に存在する DMA の有意な増加が DMA 経胎盤曝露群で確認され、母動物の摂取した DMA が胎盤を介して仔マウス肝臓へ蓄積されていることが確認できた。

新生仔マウスにおける網羅的遺伝子発現解析およびパスウェイ解析

DMA 経胎盤曝露新生仔マウス肝臓における網羅的遺伝子発現解析の結果、無機ヒ素を経胎盤曝露した肝臓において高発現が報告されている p16^{INK4a}、Rassf1a および Ha-ras については対照群と比較して有意な発現変動はみられなかった。得られた網羅的遺伝子発現解析データを用いた IPA software による upstream regulator 解析の結果、TP53 および c-myc などのがん関連遺伝子の活性化が予測された。

(2) DMA 妊娠期曝露肺における発がん機序の解析

新生仔マウス肺組織内ヒ素の測定

雄性新生仔マウス肺組織内のヒ素を LC-ICP-MS で化学形態別に濃度測定した結果、DMA 経胎盤曝露新生仔マウス肺において、母動物由来の DMA の蓄積が確認された。また代謝物として、ジメチルモノチオアルシン酸 (DMMTA) やトリメチルアルシンオキシド (TMAO) を認めた (Table. 1)。

Table 1. 新生仔マウス肺におけるヒ素形態別解析

Treatment	No. of mice	DMA (ppb)	DMMTA (ppb)	TMAO (ppb)
Control	5	N.D.	N.D.	N.D.
DMA	5	15.1 ± 4.7	1.2 ± 2.3	3.2 ± 0.6

N.D. 検出限界以下

Ki-67 免疫染色による細胞増殖能の検討

対照群と比較して DMA 経胎盤曝露群において、新生仔・6 週齢いずれにおいても肺胞上皮の Ki-67 核陽性率の上昇が存在し、細胞増殖能の増加がみられた (Fig.1)

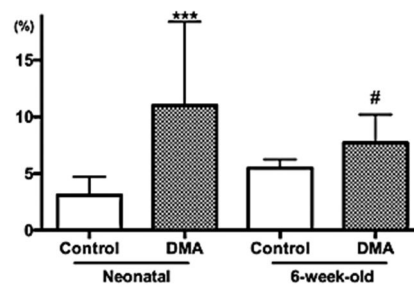


Fig. 1. 新生仔および6週齢マウス肺胞上皮におけるKi67陽性率, *** P < 0.001; # P = 0.064.

新生仔マウス肺における網羅的遺伝子発現解析およびパスウェイ解析

マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析の結果、対照群と比較して2倍以上の発現変動がみられた遺伝子として、22 遺伝子が発現増加を、62 遺伝子が発現低下を示した。さらに IPA Software によるパスウェイ解析の結果、keratin のような細胞骨格成分をコードする Glucocorticoid 受容体シグナルが Top score network として予測された。

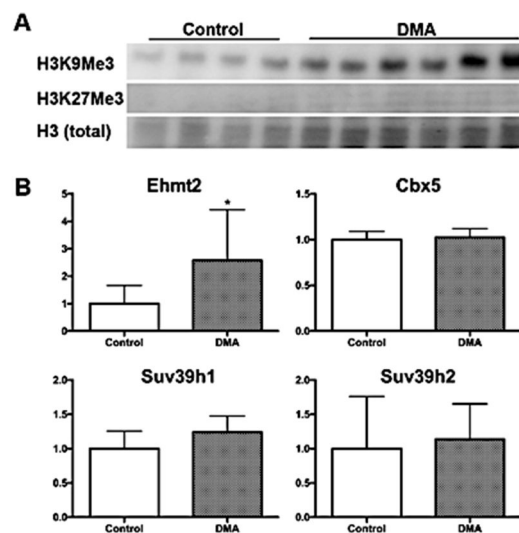


Fig. 2. A: 新生仔マウス肺におけるヒストンH3のwestern blot解析; B: qPCRによるEhmt2, Cbx5, Suv39h1およびSuv39h2遺伝子発現解析 (*P < 0.05)

ヒストン H3K9me3 および H3K27me3 の核タンパク発現量解析

対照群と比較して、DMA 経胎盤曝露群の肺組織において、ヒストン H3K9me3 の増加が確認された。一方、ヒストン H3K27me3 の有意な差はみられなかった (Fig.2A)。

新生仔マウスにおけるヒストン H3K9me3 の ChIP-seq の実施

新生仔マウス肺組織より gDNA を抽出し、ヒストン H3K9me3 を標的とした ChIP-seq 解析を実施した結果、対照群と比較して DMA 経胎盤曝露群においてヒストン H3K9me3 と結合する 231 の遺伝子が減少を、948 の遺伝子が増加を示した。IPA による解析の結果、histone H3 や H4 に関連する遺伝子の変動が Top scored pathway network として示された。

qPCR 解析

ヒストン修飾関連遺伝子である Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2 (Ehmt2)、Chromobox protein homolog 5 (Cbx5)、suppressor of variegation 3-9 homolog 1 (Suv39h1) および suppressor of variegation 3-9 homolog 2 (Suv39h2) の発現量について検討した結果、ヒストンメチル基転移酵素である Ehmt2 の有意な発現増加が DMA 経胎盤曝露群でみられた。そのほかの遺伝子については有意な発現変動はみられなかった (Fig. 2B)。

マイクロアレイおよび ChIP-seq データの比較統合解析

マイクロアレイおよびヒストン H3K9me3 の ChIP-seq データを比較した結果、共通して発現変動を示した遺伝子として、ATPase, H⁺ transporting, lysosomal V0 subunit A4 (Atp6v0a4) および Krt8 が選出され、DMA 経胎盤曝露群にて増加していることが予測された (Fig. 3A)。qPCR 法にて発現を検証した結果、対照群と比較して DMA 経胎盤曝露群で Atp6v0a4 および Krt8 いずれも有意な発現増加が確認された。興味深いことに、両遺伝子の発現増加は新生仔期だけではなく、成熟期 (6 週齢) においても発現増加が有意に維持されていた (Fig. 3B)。

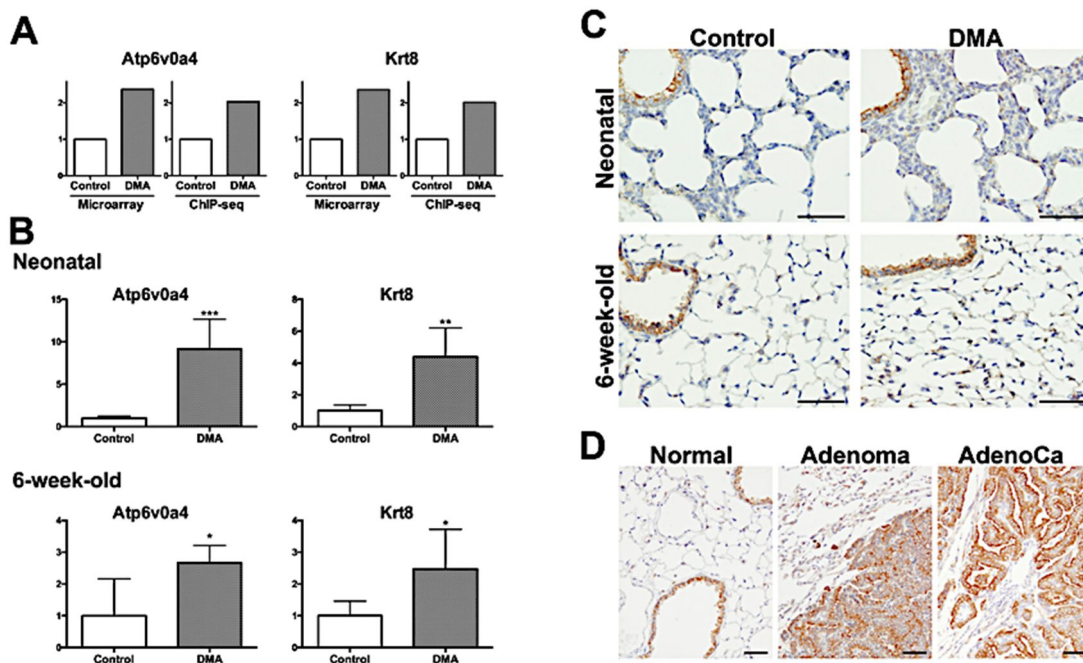


Fig. 3. A: マイクロアレイおよびChIP-seqにおけるAtp6v0a4およびKrt8の発現量; B: 新生仔および6週齢マウス肺におけるAtp6v0a4およびKrt8の遺伝子発現量 (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001); C: 新生仔および6週齢マウス肺におけるKrt8/18免疫染色; D: DMA経胎盤曝露した84週齢雄性マウス肺および発生した腫瘍病変におけるKrt8/18免疫染色

免疫染色

抗 Krt8/18 による免疫染色の結果、対照群と比較して肺胞上皮は弱い発現を示したが、気管支管は新生仔マウスと 6 週齢マウスの両方の肺で Krt8/18 の強発現を示した。加えて DMA 経胎盤曝露群肺胞上皮でやや強い染色性を示した (Fig. 3C)。さらに DMA 経胎盤曝露した 84 週齢マウス肺に存在した腺腫および肺腺癌では、Krt8/18 の強発現を示した (Fig. 3D)。

(3) まとめ

DMA を経胎盤曝露された雄性マウスにおいて、その成熟後に肝臓がんおよび肺臓がんが生じること報告されている。本研究の結果、肺臓がんにおけるその発がん機序として新生仔期におけるヒストン修飾異常の関与が明らかとなった。また、その影響が生後 6 週間後においても維持されていることが明らかとなり、肺臓がんへの寄与が示唆された。従って、肝臓がん機序についても同様にエピジェネティックな影響の関与が示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Fujioka Masaki, Suzuki Shugo, Gi Min, Kakehashi Anna, Oishi Yuji, Okuno Takahiro, Yukimatsu Nao, Wanibuchi Hideki	4. 巻 94
2. 論文標題 Dimethylarsinic acid (DMA) enhanced lung carcinogenesis via histone H3K9 modification in a transplacental mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arch Toxicol	6. 最初と最後の頁 927 ~ 937
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00204-020-02665-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤岡正喜、魏民、奥野高裕、行松直、梯アンナ、大石裕司、鰐淵英機
2. 発表標題 有機ヒ素化合物Dimethylarsinic acidの経胎盤ばく露によるマウス肺発がん過程におけるヒストン修飾異常
3. 学会等名 第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鰐淵英機、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、奥野高裕
2. 発表標題 環境化学物質による発がん細胞傷害・修復の破綻
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤岡正喜、魏民、梯アンナ、鰐淵英機
2. 発表標題 マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物Dimethylarsinic acidの肺発がん機序の検討
3. 学会等名 平成30年度文部科学省新学術領域研究学術研究支援基盤形成【先端モデル動物支援プラットフォーム】若手支援技術講習会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤岡正喜、魏民、奥野高裕、行松直、大石裕司、梯アンナ、鰐淵英機
2. 発表標題 有機ヒ素化合物Dimethylarsinic acidの Maus 経胎盤ばく露による発がん機序の検討
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤岡正喜、魏民、奥野高裕、熊田賢次、梯アンナ、大石裕司、鰐淵英機
2. 発表標題 Maus 経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物Dimethylarsinic acidの発がん性およびその機序
3. 学会等名 第34回日本毒性病理学会総会及び学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鰐淵英機
2. 発表標題 実験的アプローチを用いたヒ素発がん性の証明とその機序の解明
3. 学会等名 第106回日本病理学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鰐淵英機、魏民、藤岡正喜、梯アンナ
2. 発表標題 ヒ素の発がんリスク評価
3. 学会等名 第44回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤岡正喜、魏 民、奥野高裕、梯アンナ、鰐淵英機
2. 発表標題 マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物DMAの発がん性
3. 学会等名 文部科学省新学術領域研究 学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム若手支援技術講習会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤岡正喜、魏 民、奥野高裕、熊田賢次、梯アンナ、大石裕司、鰐淵英機
2. 発表標題 マウス経胎盤ばく露による有機ヒ素化合物Dimethylarsinic acidの発がん性およびその機序
3. 学会等名 第23回ヒ素シンポジウム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考