

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10061

研究課題名(和文) 上皮間葉転換に着目した妊娠期ヒ素曝露による後発的肝腫瘍増加メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms of late-onset increase in hepatic tumor by gestational exposure to arsenic focusing on epithelial mesenchymal transition

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・環境リスク・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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、妊娠期ヒ素曝露した母親から産まれた子世代(F1)と孫世代(F2)のオスで後発的に肝腫瘍発症率が増加することを明らかにしている。本研究では、そのメカニズムについて肝臓を構成する細胞ごとに解析するために、肝臓から肝実質細胞と肝星細胞を単離する条件を確立し、それぞれの細胞で遺伝子発現変化を網羅的に解析した。その結果、ヒ素曝露されたF2の肝実質細胞において、対照群と比較して、脂肪蓄積、糖新生経路の異常、酸化ストレスの増加に関与する遺伝子の発現変化が観測された。したがって、これらの遺伝子発現変化がF2の後発的な肝腫瘍発症率の増加に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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が、次世代やさらにそれ以降の世代にまで健康に悪影響を及ぼす可能性が指摘されている。無機ヒ素についても、疫学研究や動物実験により、F1やF2での肝腫瘍発症率の増加が報告されているが、詳細は明らかになっていない。本研究では、F2の肝実質細胞において、脂肪蓄積や糖新生に関与する遺伝子の発現が変化することを明らかにでき、ヒ素による世代を超えた後発影響についてどの細胞がどのような影響を受けるかの実態の理解及びそれに基づく予測・予防に資する基礎的データを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Exposure to environmental chemicals during fetal development can increase the risk of various late-onset adverse effects. We have previously showed that gestational arsenic exposure of C3H mice induces increased hepatic tumor incidence in the F1 and F2 male offspring. In this study, to examine the mechanisms of increased hepatic tumor increase in the F2 male mice gestationally exposed to arsenic, we isolated hepatocytes and hepatic stellate cells from liver tissue of mice and analyzed the gene expression changes in hepatocytes and hepatic stellate cells of F2 males by RNA-sequencing (RNA-Seq) and real-time RT-PCR. The current study suggests that changes in gene expression associated with lipid accumulation, gluconeogenesis suppression, and/or increased oxidative stress in hepatocytes are involved in increased hepatic tumor incidence in the F2 generation.

研究分野：衛生学

キーワード：ヒ素 妊娠期曝露 後発影響 肝実質細胞 RNA-Seq

## 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、すぐには顕在化しない様々な後発的影響を誘導することが懸念されている。さらに、化学物質曝露が次世代やさらにそれ以降の世代にまで健康に悪影響を及ぼす可能性が指摘されているが (Perera & Herbstman. *Rep Toxicol*. 2011)、その詳細はほとんど明らかになっていない。

無機ヒ素 (ヒ素) 汚染は、中国、インド、バングラデシュなどの世界各国で、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し、大きな環境問題となっている。ヒ素の長期摂取により慢性炎症をはじめ、最悪の場合発がんにいたることが疫学研究により報告されている (Yoshida et al. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2004)。さらに近年の疫学調査では、妊娠期や乳幼児期のヒ素曝露によって成人後に膀胱、肺、肝臓などのがん発症が増加することが報告されている (Smith et al. *Environ Health Perspect*. 2012、Smith et al. *J Natl Cancer Inst*. 2018)。このような後発影響の実態を理解し、予測・予防を可能とするためには、動物実験によるメカニズム研究が不可欠である。

ヒ素による後発影響の動物実験モデルとして、C3H マウス母親 (F0) の妊娠中にヒ素を飲水投与すると生まれた雄の子 (F1) が、74 週齢で対照群と比較して肝腫瘍を高率に発症することが報告された (Waalkes et al. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003)。我々は、この系を用いて、母親 (F0) の妊娠中ヒ素曝露により子世代 (F1) の雄で肝腫瘍発症率が増加することを確認した (Nohara et al. *Toxicol Sci* 2012)。さらに解析をすすめ、孫世代 (F2) においても雄で肝腫瘍発症率が増加することを明らかにした (Nohara et al. *J Appl Toxicol* 2016)。

妊娠期におけるヒ素曝露により子世代さらには孫世代まで肝腫瘍の発症率が増加するメカニズムの解明に向け、我々は、標的臓器である肝臓に着目して検討をすすめている。肝臓から肝実質細胞を単離し、ヒ素によりどのような影響を受けるのかフェノタイプを検討したところ、妊娠期ヒ素曝露された 74 週齢の雄マウスの肝臓から単離した肝細胞は、F1 と F2 とともに対照群と比較してコラーゲンコート dish への接着能が減少する、という現象を見出した。肝細胞の接着能の低下は、肝腫瘍発症率の増加とよく対応していた。

一方、我々は、これまでの研究より、妊娠期ヒ素曝露した F2 の 74 週齢の肝臓における遺伝子発現マイクロアレイ及びエンリッチメント解析から、対照群の腫瘍がない肝臓に対してヒ素曝露群の肝腫瘍部で発現変動した遺伝子の機能に、多数の代謝に関わる経路が含まれていることを明らかにしている。そこで、細胞接着に加え、代謝関連の経路にも着目し、これらのメカニズムを詳細に解析することで、妊娠期ヒ素曝露による後発的な肝腫瘍発症率の増加に関するメカニズムが検討可能であることが考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、妊娠期ヒ素曝露した、特に F2 マウスにおいて、後発的な肝腫瘍発症率増加メカニズム解明に向け、肝臓から肝実質細胞と肝星細胞を単離し、RNA-Seq による遺伝子発現の網羅的解析を行った。上皮間葉転換をはじめ、細胞接着に関する経路や代謝に関する経路を中心に解析し、それらがどのように妊娠期ヒ素曝露による後発的な肝腫瘍発症率増加メカニズムに関与するのかを検討した。

## 3. 研究の方法

### 3 - 1) 肝実質細胞と肝星細胞の単離

C3H マウス (クレア) F0 の妊娠 8 ~ 18 日に、ヒ素を含まない水、及び、85 ppm の NaAsO<sub>2</sub> を含む水を自由飲水させ、産まれた F1 をさらに交配し、F2 (対照群、ヒ素曝露群) を得た。76 ~ 77 週齢で解剖し、腫瘍がない肝臓からコラーゲンゼラチン灌流法を用いて肝実質細胞を調製した。肝星細胞は、肝細胞を単離したあと、OptiPrep を使用した密度勾配遠心法により単離した (Graham. *ScientificWorldJournal*. 2002、Mederacke et al. *Nat Protoc*. 2015)。

### 3 - 2 ) RNA-Seq 解析

3 - 1 )で単離した F2 の肝実質細胞と肝星細胞( 対照群とヒ素曝露群 )から RNA を抽出し、TruSeq stranded mRNA LT Sample Prep Kit でライブラリーを調製後、Transcriptome Sequencing を行った。得られたシークエンスデータを Hisat2 で mm10 にマッピングし、StringTie で発現量を算出した。TPM 値で Student's t-test を行い、対照群に対してヒ素曝露群で有意(  $p < 0.05$  )に発現変化した遺伝子を抽出し、それらの抽出した遺伝子を使用し Metascape ( <https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1> )でエンリッチメント解析を行った。

### 3 - 3 ) リアルタイム RT-PCR

肝実質細胞と肝星細胞の RNA から cDNA を調製し、LightCycler 480 ( Roche )あるいは、StepOnePlus™ ( Thermo Fisher Scientific )を用いて、各種遺伝子の発現量を検出した。

## 4 . 研究成果

### 4 - 1 ) 肝実質細胞と肝星細胞の単離

3 - 1 )の条件で単離した肝実質細胞と肝星細胞から、RNA を抽出し、cDNA を調製した。その cDNA を用いて、肝星細胞に特異的に発現していることが報告されている Desmin、Acta2、Col1a2 遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR で測定した。その結果、肝星細胞におけるそれぞれの遺伝子の発現が、肝実質細胞と比較して、10 ~ 30 倍高いことを確認した。また、それぞれの細胞の顕微鏡観察より細胞形状が異なることを確認した。したがって、3 - 1 )の条件により、肝実質細胞と肝星細胞が単離できていることが示された。

### 4 - 2 ) RNA-Seq 解析

妊娠期ヒ素曝露した F2 の腫瘍がない肝臓から、3 - 1 )の条件により、肝実質細胞と肝星細胞を単離し、それぞれの細胞から RNA を抽出して、RNA-Seq 解析を行った。肝実質細胞については、対照群に対してヒ素曝露群で増加した遺伝子(  $p < 0.05$  )は 875 個、減少した遺伝子(  $p < 0.05$  )は 306 個だった。また、エンリッチメント解析の結果、それらの発現変動した遺伝子の機能には、脂質代謝など代謝に関わる経路が含まれていた。肝星細胞については、対照群に対してヒ素曝露群で増加した遺伝子(  $p < 0.05$  )は 277 個、減少した遺伝子(  $p < 0.05$  )は 246 個だった。また、エンリッチメント解析の結果、それらの発現変動した遺伝子の機能には、糖代謝に関わる経路が含まれていた。

本研究の当初の目的にしていた、上皮間葉転換をはじめとした細胞接着に関する経路はエンリッチメント解析の上位には入っていなかった。そこで、代謝に関わる経路を中心に、ヒ素曝露群 F2 の肝実質細胞及び肝星細胞において、リアルタイム RT-PCR により遺伝子発現解析を行い、妊娠期ヒ素曝露した F2 における肝腫瘍発症率増加のメカニズムを考察した。

### 4 - 3 ) リアルタイム RT-PCR による代謝関連経路に関する遺伝子の発現量解析

まず、RNA-Seq の結果では、グルコース 6 リン酸( G6P )をグルコースに転換する Glucose-6-Phosphatase ( *G6pc* )の発現がヒ素曝露群の肝実質細胞で大きく発現減少したため、*G6pc* の発現量をリアルタイム RT-PCR で検討した。RNA-Seq の結果に対応して、*G6pc* の発現は肝実質細胞においてヒ素曝露群で有意に減少した。*G6pc* は、肝星細胞においてはほとんど発現がみられなかった。G6P からグリコーゲンを合成する Glycogen Synthase 2 ( *Gys2* )の発現については、ヒ素曝露群の肝実質細胞で有意に増加していることがわかった。これより、ヒ素曝露群 F2 の肝実質細胞では、グリコーゲンの蓄積を促進することにより、グルコース産生を抑制している可能性が示唆された。

次に、エンリッチメント解析の結果から、肝実質細胞における脂質代謝経路に着目した。脂質代謝に深く関与する Peroxisome proliferator-activated receptor ( *Ppara*、*Ppar $\gamma$ 2* )は、ヒ素曝露群の肝実質細胞で有意に増加することが明らかになった。*Ppara* の活性化は肝臓の脂肪蓄積を増加させること、*Ppar $\gamma$ 2* は脂肪組織で発現することが報告されている( Yan et al. PLoS One. 2014、Hernandez-Quiles et al. Front Endocrinol. 2021 )。加えて、肝臓における *Ppar $\gamma$ 2* の発現は脂肪蓄積に関与することが知られている( Lee et al. Liver Res. 2018 )。また、ヒ素曝露と非アルコール性脂肪肝疾患との関連についても報告されている( Frediani et al. Environmental Health. 2018 )。したがって、ヒ素曝露群 F2 の肝実質細胞は、脂肪蓄積が亢進している可能性が示唆された。

酸化ストレスは肝臓の脂肪蓄積や肝臓腫瘍の発症に深く関与する (Wang et al. Oxid Med Cell Longev. 2016, Masarone et al. Oxid Med Cell Longev. 2018)。そこで、ヒ素曝露群 F2 の肝実質細胞において酸化ストレスに関与する遺伝子の発現を検討した。その結果、Superoxide dismutase (*Sod1* 及び *Sod2*) の発現は変化しなかったが、過酸化水素を分解する Catalase (*Cat*) の発現が有意に増加していた。したがって、ヒ素曝露群 F2 の肝実質細胞では酸化ストレスが増加している可能性が示唆された。

一方、Nrf2 は酸化ストレスなどの発生に伴い、ストレスにตอบสนองして活性化される転写因子である。最近になり、Nrf2 誘導により、肝臓において、*G6pc* の発現抑制と Fibroblast Growth Factor 21 (*Fgf21*) の発現誘導が起こり、グルコース代謝恒常性の維持に重要な役割を果たすことが報告されている (Urano et al. Arch Biochem Biophys. 2015)。ヒ素曝露群 F2 の肝実質細胞において、*Nrf2* と *Fgf21* の発現を検討したところ、*Nrf2* の発現は対象群と比較して変化しなかった。*Fgf21* の発現は対照群と比較して増加傾向ではあるものの有意な変化はみられなかった。したがって、*Nrf2* によるグルコース代謝恒常性の維持機能は、ヒ素曝露群 F2 の肝実質細胞においては大きくは寄与していない可能性が示唆された。

以上の結果から、肝実質細胞における、脂肪蓄積、糖新生経路の異常、酸化ストレスの増加が、妊娠期ヒ素曝露による F2 の後発的な肝腫瘍発症率増加メカニズムに関与する可能性が示唆された。現在のところ、脂肪蓄積、糖新生経路の異常、酸化ストレスの増加のそれぞれがどのように関連しているか不明であるため、今後さらなる検討が必要である。

これまで我々は肝臓組織 (正常肝臓、肝腫瘍がある肝臓の非腫瘍部、肝腫瘍がある肝臓の腫瘍部) を使用した研究により、妊娠期ヒ素曝露した F2 における肝腫瘍発症率増加のメカニズムに *Tgf-β* の経路が関与することを報告している (Okamura et al. Toxicol Appl Pharmacol. 2020)。本研究では、*Tgf-β* は、主に肝星細胞に発現していることを確認した。肝実質細胞と肝星細胞を単離する本研究の遂行により、妊娠期ヒ素曝露による *Tgf-β* 経路に加えて、F2 肝実質細胞自体にも代謝経路の異常などが存在することを明らかにできた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okamura Kazuyuki, Suzuki Takehiro, Nohara Keiko	4. 巻 408
2. 論文標題 Gestational arsenite exposure augments hepatic tumors of C3H mice by promoting senescence in F1 and F2 offspring via different pathways	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxicology and Applied Pharmacology	6. 最初と最後の頁 115259 (1-12)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.taap.2020.115259	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 -

1. 著者名 Nohara Keiko, Suzuki Takehiro, Okamura Kazuyuki	4. 巻 409
2. 論文標題 Gestational arsenic exposure and paternal intergenerational epigenetic inheritance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxicology and Applied Pharmacology	6. 最初と最後の頁 115319 (1-8)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.taap.2020.115319	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鈴木武博, 岡村和幸, 野原恵子
2. 発表標題 妊娠期ヒ素曝露を受けた F1精子由来の F2初期胚における遺伝子発現変化の検討
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takehiro Suzuki, Keiko Nohara
2. 発表標題 Expression changes of cancer-related genes of the hepatocytes in the F1 and F2 generations of C3H mice maternally exposed to arsenite
3. 学会等名 47th Myanmar Health Research Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木武博, 野原恵子
2. 発表標題 妊娠期ヒ素曝露したマウス精巣におけるエピジェネティック及び精子形成に関連する遺伝子発現の変化
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木武博, 岡村和幸, 野原恵子
2. 発表標題 妊娠期ヒ素曝露したマウスにおける孫世代精子DNAの網羅的DNAメチル化解析
3. 学会等名 第91回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Udagawa Osamu, Okamura Kazuyuki, Suzuki Takehiro, Nohara Keiko.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 14
3. 書名 Chapter 3. Arsenic exposure and reproductive toxicity. In: Yamauchi H, Sun G editors. Arsenic contamination in Asia.	

〔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
連携研究者	野原 恵子	国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・フェロー	
	(NOHARA Keiko)		
	(50160271)	(82101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
連携研究者	岡村 和幸  (OKAMURA Kazuyuki)  (50736064)	国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・主任研究員    (82101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関