

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2008 ～ 2011
 課題番号：20406003
 研究課題名（和文） ヒ素による癌原因遺伝子産物の三次元構造の修飾を介した発癌機構の解明と予防法の開発
 研究課題名（英文） Analysis of arsenic-mediated carcinogenesis and development of a preventive therapy targeting modulation for three-dimensional structure of oncogene products.
 研究代表者
 加藤 昌志 (MASASHI KATO)
 名古屋大学・医学系研究科・教授
 研究者番号：10281073

研究成果の概要（和文）：

飲用井戸水に含まれるヒ素が、慢性ヒ素中毒患者からの発癌を誘発していることが報告されている。ゆえに、ヒ素汚染井戸水を特定することは重要である。さらに、ヒ素誘発癌の機構を解明することは、新しい予防療法を開発するために重要である。本研究では、アジア地域の大学との国際共同研究により、ヒ素を含めた種々の元素の濃度を調べた。さらに、ヒ素がシステインを標的に作用し、癌遺伝子産物の三次元構造修飾を介した活性化より、発癌を誘発する可能性を示した。本機構に基づいて、システインを標的としたヒ素誘発癌の予防療法を提案した。

研究成果の概要（英文）：

It has been reported that arsenic in well drinking water causes various cancers in patients with arsenicosis. Therefore, identification of arsenic-polluted well water is important. Moreover, clarification of mechanisms for arsenic-mediated cancer is also important to develop novel preventive therapies for arsenic-mediated cancers. In this study, we performed international collaboration with several universities in Asian countries and investigated levels of various elements including arsenic. We further showed that arsenic might promote carcinogenesis through cysteine-mediated modulation for three-dimensional structure of oncogene products. Based on the results, we proposed a cysteine-targeted preventive therapy for arsenic-mediated cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
総計	10,200,000	3,060,000	13,260,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：放射線・化学物質影響科学

キーワード：ヒ素、発癌、癌遺伝子産物、システイン

1. 研究開始当初の背景

【ヒ素汚染の現状】

国連大学等より、バングラデシュ、中国の内モンゴル地方等において、井戸水における

飲用水ヒ素汚染による慢性ヒ素中毒の患者数が数千万人に達すると報告されている。これは、世界中のHIVウイルス感染者数をこえるとも言われている。さらに、慢性ヒ素中毒患

者からの癌患者の増加は、本国際環境問題をより複雑かつ深刻にしている。一方、現在でもヒ素誘発癌の予知・予防に有効な検査・治療法はほとんどない。ヒ素を含む飲用井戸水の浄化（環境整備）技術を開発するとともに、ヒ素誘発癌の分子機構を解明し、新しい予防療法を開発することが急務である。

【癌遺伝子産物と癌・黒皮症】

従来までに、受容体型チロシンキナーゼをコードするc-RET、RET-MEN2A、Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) 等の癌原遺伝子および癌遺伝子産物の活性化は直接的に発癌に結びつくと考えられている (Kato M, et al. *Oncogene* 17:1885, 1998; Li Y, et al. *Biomarkers* 12:256, 2007)。研究代表者らは、これらの受容体に対するリガンドだけでなく突然変異や紫外線が、癌原遺伝子産物（チロシンキナーゼ）の二量体形成（三次元構造修飾）を促進し、キナーゼ活性を上昇させ、発癌 (Kato M, et al. *Mol Biol Cell* 11:93, 2000; Kato M, et al. *Cancer Res* 62:2414, 2002) する可能性を示してきた。一方、研究代表者らは、活性型RET癌遺伝子の導入により、マウスに皮膚黒色症が誘導される事を報告している (Kato M, et al. *J Invest Dermatol* 126:2457, 2006)。これは、RETキナーゼの恒常的活性が皮膚黒色症に関与している可能性を示している。

2. 研究の目的

【有害元素汚染飲用井戸水の探索】

アジア地域には上水道の設備が無いために、井戸水を飲用水として使用せざるを得ない地域が多くある。本研究では、アジア各地において、井戸水の環境モニタリングを施行し、ヒ素およびヒ素以外の有害元素の汚染のレベルから健康への安全性を評価する。

【ヒ素誘発癌の新機構解析と予防療法開発】

現在までに、ヒ素が蛋白質レベルで作用することを示した報告は限られている。本研究では、「ヒ素によるシステインを標的とした癌原遺伝子および癌遺伝子の二量形成を介した活性化による発癌機構」の解明を進める。さらに、本機構に基づいて、ヒ素誘発癌に対する新しい予防療法を提案する。

3. 研究の方法

【飲用井戸水の解析】

アジア諸国（バングラデシュ・マレーシア・ベトナム等）において、現地の大学と国際共同研究を推進し、飲用井戸水を採取した。井

戸水は、誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）を用いて、ヒ素、マンガン、鉄、バリウム等の元素を分析した。

【癌原遺伝子および癌遺伝子産物に対するヒ素の標的システインの解析】

c-RET癌原遺伝子およびRET-MEN2A癌遺伝子産物を対象として、還元状態および非還元状態にてウエスタンブロットを施行し、ヒ素がRET蛋白質の二量体形成量に及ぼす影響を調べる。さらに、ヒ素の標的となると推測されるアミノ酸を置換したc-RET癌原遺伝子およびRET-MEN2A癌遺伝子産物を用いて、ヒ素の標的となるアミノ酸を特定する。

4. 研究成果

【有害元素汚染飲用井戸水の探索】

- 1) バングラデシュにおいて、WHOの基準の50倍を超える高濃度のヒ素に汚染されている井戸水もあった。ヒ素は、MMP活性の賦活を介して発癌を誘発している可能性がある (Kato M et al. *J Toxicol Environ Health A*, 2008)。
- 2) バングラデシュのヒ素汚染井戸水は、高濃度の鉄を含んでいた。
- 3) マレーシアおよびベトナムの井戸水において、高濃度のマンガンが検出された (Kato M et al. *Toxicol Environ Chem*, 2010)。マンガンの神経毒性をはじめとする健康被害は、従来より注目されるようになっており、今後井戸水からのマンガン浄化も重要課題になる可能性が大きい。
- 4) ヒ素汚染井戸水は、非汚染井戸水に比較してバリウム濃度が高い傾向を示した。本研究において、WHOの健康ガイドライン値以下の濃度のバリウムが、試験管レベルで、非腫瘍形成性細胞の悪性転化を促進した (Tang ND et al. *PLoS ONE*, 2011)。今後、井戸水からのバリウムに関する健康ガイドライン値を再検討する必要があると考えられる。

【癌遺伝子産物に対するヒ素の標的システインの解析】

図1に示すように、10^{-1,000}μMのヒ素は、濃度依存的にc-RET遺伝子産物の二量体形成を促進するとともにキナーゼ活性を促進した。さらに、非還元状態でのウエスタンブロットにより検出されたヒ素の二量体形成促進作用は、還元状態でウエスタンブロットにより消出した。これは、ヒ素によるc-RET遺伝子産物の二量体形成は、ジスルフィド結合によるものである可能性が高いことを示している。

さらに、ヒ素はRET-MEN2A癌遺伝子産物に対してもc-RET癌原遺伝子と同様に、RET-MEN2A

癌遺伝子産物の二量体形成を促進するとともにキナーゼ活性を促進した。ヒ素は、遺伝的変異により既にc-RET分子の3-10倍程度活性が促進されているRET-MEN2A分子の活性をさらに3-10倍程度亢進させた(スーパー活性化)。このように、ヒ素は、癌遺伝子産物だけでなく癌遺伝子産物の活性をさらに亢進させることにより、発癌に関与している可能性を示した。

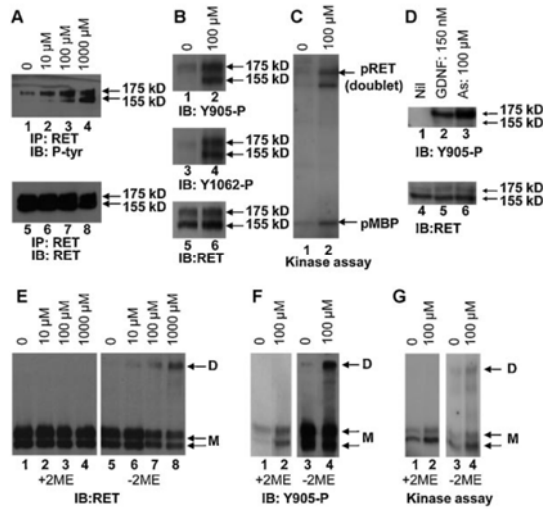


図1: ヒ素のc-RET癌遺伝子産物に対する作用 (Kato M et al. J Cell Biochem, 2010 Fig. 2より抜粋)

次に、ヒ素の作用点を調べた。図2に示すように、ヒ素は、細胞外領域の欠損したRET-PTC1の活性を亢進させた。これは、ヒ素が、少なくともRET癌遺伝子産物の細胞内領域に作用することを示している。さらに、RET-PTC1分子の376シスチンをアラニンに置換することにより、ヒ素によるRET-PTC1分子活性化作用は、消失した。

以上の結果は、ヒ素がRET蛋白質の細胞内領域にある特定シスチン (RET-PTC1分子の場合はシスチン376) に作用し、二量体形成を促進し、RETキナーゼの活性化を促進することを示している。

一方、ヒ素により誘発されるc-RET 癌遺伝子産物およびRET-MEN2A癌遺伝子産物の活性化は、L-シスチン投与により、かなり減弱させることができた (図3)。

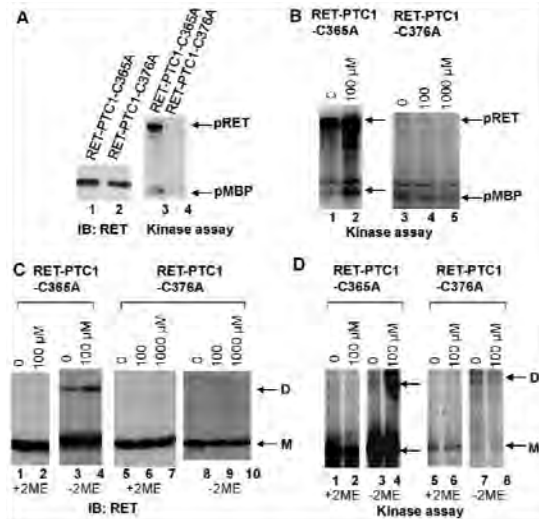


図2: ヒ素のRET-PTC1癌遺伝子産物に対する作用 (Kato M et al. J Cell Biochem, 2010 Fig. 4より抜粋)

以上の成果は、ヒ素のシスチンを介した二量体形成の促進により誘発される癌遺伝子および癌遺伝子の活性化は、L-シスチンにより抑制できる可能性を示している。既に、紫外線発癌には、L-シスチンが抑制的に作用する可能性が動物レベルで報告されている。

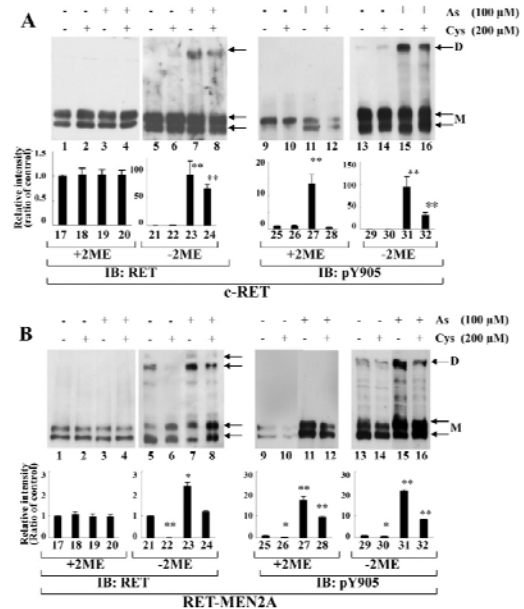


図3: ヒ素により誘発されるRETキナーゼ活性化作用はL-シスチンにより減弱する (Kato M et al. Toxcol In Vitro, 2011 Fig.2より抜粋)

【考察】

本研究では、海外フィールドワークをアジア各国で展開し、井戸水の有害重金属汚染を調べた。

現在までのほとんどの報告は、遺伝子に対する作用に着目し、ヒ素の発癌作用を検討したものである。本研究では、ヒ素によるシステインを標的とした癌遺伝子産物の三次元構造修飾を介した発癌誘導機構を世界で初めて提案した。本研究では、さらに、ヒ素が作用するシステインを特定した。また、L-システインの投与により、ヒ素発癌毒性を軽減できる可能性を試験管レベルで示し、ヒ素誘発癌に対する新しい予防療法の開発に道を開いた。L-システインは、日本では処方箋無しに薬店で購入できるほど安全性が高い薬物であるので、今後、開発途上国における癌多発地帯での応用が期待される。

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 51 件)

01. Kumasaka YM, Yamanoshita O, Shimizu S, Ohnuma S, Furuta A, Yajima I, Nizam S, Khalequzzaman M, Shekhar UH, Nakajima T, Kato M. Enhanced carcinogenicity by coexposure to arsenic and iron and a novel remediation system for the elements in well drinking water. Arch Toxicol, 87:439-447, 2013. 査読有

02. Ohgami N, Hori S, Ohgami K, Tamura H, Tsuzuki T, Ohnuma S, Kato M. Exposure to low-dose barium by drinking water causes hearing loss in mice. Neurotoxicol, 33(5):1276-83, 2012. 査読有

03. Yajima I, Uemura N, Nizam S, Khalequzzaman M, Thng ND, Kumasaka YM, Akhand AA, Shekhar HU, Nakajima T, Kato M. Barium inhibits arsenic-mediated apoptotic cell death in human squamous cell carcinoma cells. Arch Toxicol 86(6):961-73, 2012. 査読有

04. Thang ND, Yajima I, Kumasaka MY, Ohnuma S, Yanagishita T, Hayashi R, Shekhar HU, Watanabe D, Kato M. Barium promotes anchorage-independent growth and invasion of human HaCaT keratinocytes via activation of c-SRC kinase. PLoS ONE, 6(10):e25636, 2011. 査読有

05. Taguchi N, Uemura N, Goto Y, Sakura M, Hara K, Niwa M, Iida M, Yanagishita T, Watanabe D, Kato M. Antioxidative effects of cherry leaves extract on tert-butyl hydroperoxide-mediated cytotoxicity through regulation of thioredoxin-2 protein expression level. J Toxicol Environ Health A 74(18):1240-7, 2011. 査読有

06. Kato M, Kumasaka MY, Takeda K, Hossain K, Iida M, Yajima I, Goto Y, Ohgami N. L-cysteine as a regulator for arsenic-mediated cancer-promoting and anti-cancer effects. Toxicol In Vitro, 25:623-629, 2011. 査読有

07. Kato M, Ohnuma S, Kato Y, Thang D. Nguyen, Yajima I, Hoque Z. Mohammad, Shekhar U. Hossain. Toxic Elements in Well Water from Malaysia. Toxicol Environ Chem 92(9):1609-12, 2010. 査読有

08. Kato M, Takeda K, Hossain K, Thang D. Nguyen, Kaneko Y, Kumasaka M, Yamanoshita O, Uemura N, Takahashi M, Ohgami N, Kawamoto Y. A redox-linked novel pathway for arsenic-mediated RET tyrosine kinase activation. J Cell Biochem 110:399-407, 2010. 査読有

09. Hossain K, Kawamoto Y, Hamada M, Akhand A, Yanagishita T, Hoque Md. A, Tsuboi H, Kato M, Nakashima I: 1,4-butanediyl-bismethanethiosulfonate (BMTS) induces reactive oxygen species-mediated apoptotic signals independent of stress-activated MAPK cascade in Jurkat cells. J Cell Biochem 108(5):1059-65, 2009. 査読有

10. Kato M, Hossain K, Iida M, Sato H, Uemura N, Goto Y: Arsenic enhances matrix metalloproteinase-14 expression in fibroblasts. J Toxicol Environ Health A, 71(16), 1053-5, 2008. 査読有

[学会発表] (計 40 件)

1. 発表者：矢嶋伊知朗、熊坂真由子、**Saika Nizam**、**Md. Khalequzzaman**、**Hossain U. Shekhar**、大沼章子、古田昭男、那須民江、**加藤昌志**

学会名：第 12 回分子予防環境医学研究会
発表年月日：2013 年 2 月 1～2 日
場所：つくばサイエンスインフォメーション
センター、筑波
発表様式：口頭発表
演題名：飲用井戸水の重金属複合汚染による
発癌リスクに関する解析

2.
発表者：小島美千代・椛島由佳・青山富彦・
林留美子・皆川洋子・大沼章子・加藤昌志
学会名：第 82 回日本衛生学会学術総会
発表年月日：2012 年 3 月 24～26 日
場所：京都府（京都大学吉田キャンパス）
発表様式：一般演題
演題名：愛知県とバングラデシュ・ジェソール
地区住民の尿中ヒ素化学形態に関する比較
研究

3.
発表者：山ノ下理・大神信孝・大沼章子・
林留美子・加藤昌志
学会名：第 80 回日本衛生学会学術総会
発表年月日：2010 年 5 月 9～11 日
場所：宮城県（仙台国際センター）
発表様式：一般演題
演題名：重金属吸着剤におけるヒ素除去
能力の検討

4.
発表者：堀創二郎・大神信孝・大沼章子・
加藤昌志
学会名：第 80 回日本衛生学会学術総会
発表年月日：2010 年 5 月 9～11 日
場所：宮城県（仙台国際センター）
発表様式：一般演題
演題名：飲水投与した塩化バリウムが生
体内の必須元素レベルに与える影響

5.
発表者：山ノ下理・上村規行・加藤昌志
発表年月日：2009 年 3 月 29～4 月 1 日
場所：東京都（北里大学）
発表様式：一般演題
演題名：ヒ素によるガン化とその除去に
関する解析

〔図書〕（計 1 件）

01. 加藤昌志・高橋雅英：モデル動物利用マ
ニュアルシリーズ 疾患モデルの作製と利用
（分担執筆：第 I 部疾患モデルの作成と利用、
第 2 章多臓器発がんモデル、第 7 節 Ret）、株
式会社 エル・アイ・シー、2012

〔産業財産権〕

○出願状況（計 12 件）
名称：発癌毒性の評価方法及び発癌予防・治
療剤
発明者：加藤昌志
権利者：中部大学
種類：特許
番号：特願 2009-241197
出願年月日：2009 年 10 月 20 日
国内外の別：国内

○取得状況（計 4 件）
名称：白髪発症モデル動物、白髪発症モデル
動物の樹立方法、白髪発症モデル動物の継代
方法、白髪発症の研究方法、白髪発症制御手
段のスクリーニング方法、白髪発症制御用組
成物
発明者：加藤昌志
権利者：中部大学
種類：特許
番号：11/988,203
取得年月日：2011 年 09 月 1 日
国内外の別：国外（アメリカ合衆国）

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/1814/1815/kankyouroudouiseigaku.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
加藤昌志 (KATO MASASHI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10281073

(2) 研究分担者
大神 信孝 (OHGAMI NOBUTAKA)
中部大学・生命健康科学部・講師
研究者番号：80424919 (H19-H20)
川本 善之 (KAWAMOTO YOSHIYUKI)
中部大学・生命健康科学部・准教授
研究者番号：10410664 (H19-H22)
山ノ下 理 (YAMANOSHITA OSAMU)
中部大学・生命健康科学部・講師
研究者番号：50424924
後藤 友二 (GOTO YUJI)
中部大学・生命健康科学部・助手
研究者番号：70362522
伊田 みちる (YAMANOSHITA OSAMU)
中部大学・生命健康科学研究所・助教
研究者番号：80393148 (H19-H20)

(3) 連携研究者 無