

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24年 5月 31日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510071

研究課題名（和文） 近年の皮膚癌増加に対する化学物質と紫外線の複合影響の寄与—ヒストン修飾の観点から

研究課題名（英文） Effect of combined exposures to multiple chemicals and ultraviolet rays on recent increase of skin cancer -from a view point of histone modifications

研究代表者

伊吹 裕子（IBUKI YUKO）

静岡県立大学・環境科学研究所・准教授

研究者番号：30236781

研究成果の概要（和文）：

ヒストン修飾変化はクロマチン構造を変化させ、遺伝子制御、発がんに関連しているとされている。本研究では、タバコ副流煙、ホルムアルデヒドをはじめとする環境化学物質がヒストンのリン酸化・アセチル化状態をダイナミックに変化させること、そのパターンは化学物質の種類に応じて異なることを明らかにした。また、それらヒストン修飾は前がん遺伝子の制御に関連していた。ヒストン修飾変化時点での紫外線の曝露は細胞生存率を顕著に低下させたことから、DNA 損傷修復を混乱させている可能性が考えられ、これらは化学物質と紫外線の複合曝露の皮膚がん増加への寄与を示唆していた。

研究成果の概要（英文）：

Histone proteins have become a focus of research in many fields because their modifications have an important role in gene expression and cancer. In this study, we examined the influence of several chemicals on histone modifications. Side-stream smoke, formaldehyde, etc. changed the modifications of some histones (phosphorylation of histone H3 (S10), acetylation of histone H3 (K9, K14) and phosphorylation of histone H2AX (S139)). Phosphorylation of histone H3 (S10) related with induction of proto-oncogenes, *c-fos* and *c-jun*. In the conditions of remarkable histone modifications, UVB-induced cell death was enhanced. These results suggested that histone modifications by several chemicals might change the sensitivity to DNA damaging agents, indicating the contribution of histone modifications to increase of skin cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：環境毒性学

科研費の分科・細目：放射線・化学物質影響科学

キーワード：ヒストン、リン酸化、アセチル化、複合影響、エピジェネティクス、紫外線、DNA 損傷

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。我々は、皮膚がんの増加の一原因に、紫外線と環境化学物質との複合作用が関連していると考えている。皮膚がん要因の一つは、紫外線により生成するピリミジンダイマーを始めとする DNA 損傷であるが、これまでに我々は、DNA をとりまく環境、エピジェネティックな変化であるヒストン修飾が DNA 損傷の修復能を変化させることを見出した。例えば、ヒストン高アセチル化状態においては、ヌクレオチド除去修復が抑制され、紫外線照射後の細胞の致死性が上昇するとともに、細胞の変異率も上昇することを明らかにしている。つまり、ヒストン修飾の変化が紫外線の傷害とその修復能を変化させている可能性がある。一方で、我々は、様々な環境化学物質によりヒストン修飾が変化することも明らかにしてきた。ヒトは環境化学物質と紫外線に複合的に曝されているが、その影響を考える上において、エピジェネティックな変化と DNA 損傷修復変化の関連性についてはこれまで考慮されていない。

2. 研究の目的

本研究では、環境化学物質によるヒストン修飾変化、並びにヒストン修飾が起こった際の紫外線による DNA 損傷生成・修復の変化を明らかにすることで、化学物質と紫外線の複合作用の皮膚がん発症への寄与を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

化学物質として、タバコ副流煙、ホルムアルデヒド、ベンゾピレン、ニトロソアミン、金属ナノ粒子 (二酸化チタン、銀)、エストラジオール (E2) を作用させ、また、物理的因子として、長波長紫外線 (UVA) を照射し、その後のヒストン修飾変化を検討した。タバコ副流煙については、タバコ 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トラップし、100%副流煙サンプルとした。

ヒト肺上皮細胞である A549、ヒト皮膚角化細胞である HaCaT 細胞に上述の化学物質等を作用させ、時間依存的な各種ヒストン修飾をウエスタンブロット法、免疫染色法により検討した。ヒストンの修飾抗体は H2AX (S139) リン酸化、H3 (S10) リン酸化、H3 (global) アセチル化、H3 (K9) アセチル化、H3 (K14) アセチル化、H3 (S10, K14) アセチルリン酸化抗体を使用した。

細胞生存率はトリパンブルー染色法により定量した。

ヒストン修飾に伴う前がん遺伝子発現制御はヒストン修飾部位に対するクロマチン免疫沈降法 (ChIP) 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変化

化学物質並びに UVA 照射後のヒストンリン酸化、アセチル化パターンは、それぞれの誘導因子で異なっていた。タバコ副流煙作用後のヒストン修飾パターンを図 1 に示す。作用後、顕著なヒストン H3 (S10, S28) のリン酸化が示された。

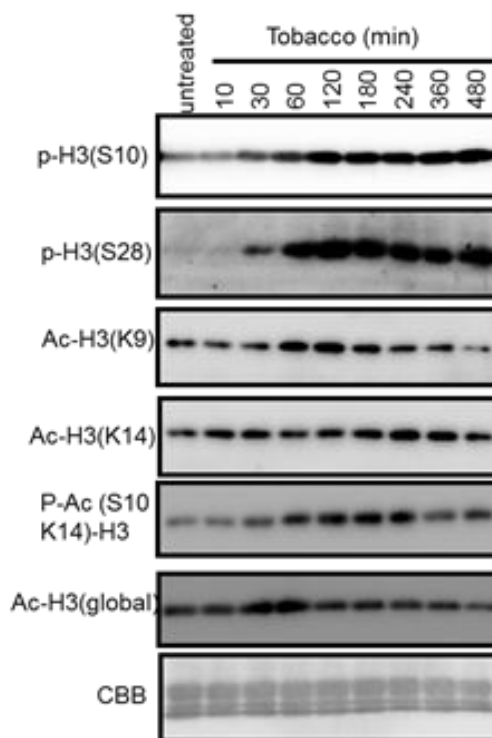


図1 タバコ副流煙作用後のヒストン修飾変化

一方、ホルムアルデヒド作用後にはヒストン H3 (S10) のリン酸化は同様に誘導されたが、その誘導は一時的であり、タバコ副流煙作用程継続しなかった (図 2)。ヒストンアセチル化は、タバコ副流煙ではほとんど変化が認められなかったが、ホルムアルデヒド作用では一時的 (~6 時間) アセチル化が低下し、その後回復するパターンを示した。また、データは示さないが、UVA 照射後では、二相性のヒストン H3 リン酸化 (S10, S28)、時間依存的なヒストン H3 アセチル化の増加が示された。E2 においては時間依存的なリン酸化 (S10, S28)、アセチル化 (global, K9, K14) の増加が認められた。

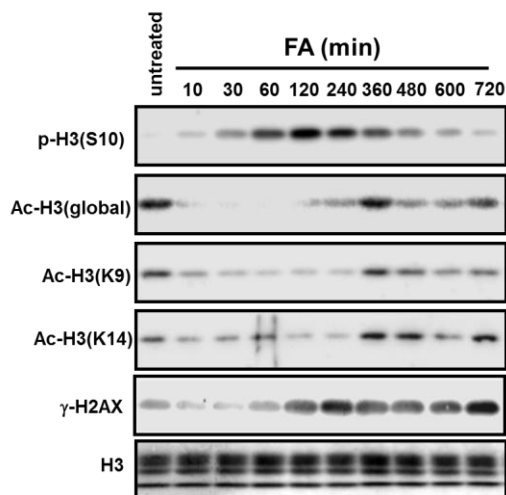


図2 ホルムアルデヒド作用後のヒストン修飾変化

DNA 損傷マーカーであるヒストン H2AX (S139) リン酸化はベンゾピレン以外の化学物質の作用により、時間依存的に増加した (ホルムアルデヒドの例: 図2)。この H2AX のリン酸化は、それぞれの化学物質により DNA 損傷が生成し、それが起因となって DNA 複製、修復時に誘導されたものと考えられた。

(2) ヒストン修飾変化の免疫染色

(1) で示したヒストン修飾の細胞内局在を検討した。すべてを示すことはできないので、ここでは、代表例として、タバコ副流煙作用後のヒストン H2AX 並びに H3 リン酸化修飾に対する染色パターンを示す (図3)。タバコ副流煙作用により、明らかな H3(S10) のリン酸化並びに H2AX(S139) リン酸化が認められた。しかしながら、その2つの染色をマージさせても重ならないことから、H3(S10) のリン酸化が DNA 損傷とは異なった部位で誘導されていることが判明した。

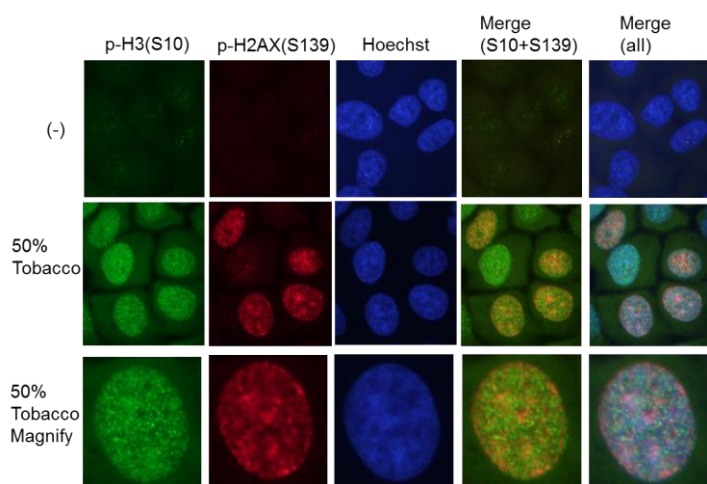


図3 タバコ副流煙作用後のヒストン修飾変化—細胞内局在

(3) ヒストン修飾変化時の UVB 照射による生存率変化

環境化学物質によるヒストン修飾変化が起こった際の紫外線による DNA 損傷生成・修復の変化を明らかにするために、タバコ副流煙作用後並びにホルムアルデヒド作用後に短波長紫外線 (UVB) を照射し、24 時間後の生存率を測定した (図4)。化学物質処理は UVB に対する感受性を顕著に亢進させた。

(1)、(2) で示されたヒストン修飾変化が、UVB による DNA 損傷誘導、修復を混乱させている可能性があると考え、現在、DNA 損傷量 (ピリミジンダイマー) を ELISA 法により定量中である。

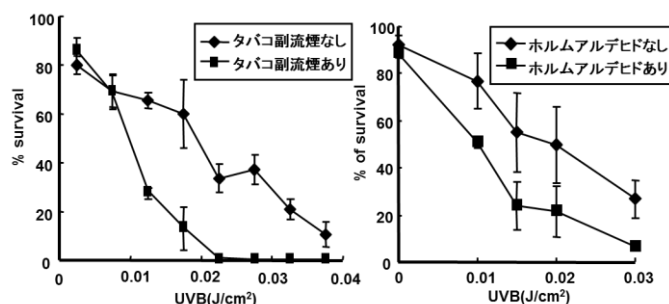


図4 ヒストン修飾変化時の紫外線照射による生存率変化

(4) ヒストン H3(S10) のリン酸化部位における前がん遺伝子の発現制御

顕著な変化が認められたヒストン H3(S10) のリン酸化は、前がん遺伝子の発現制御に関わっていることが報告されている。そこで、ChIP 法を用いて *c-fos*、*c-jun* プロモーター領域における H3(S10) のリン酸化を検討した。ホルムアルデヒド作用ではヒストン H3 リン酸化部位において、明らかに *c-fos*、*c-jun* 遺伝子プロモーター部位が多いことが明らかになった (図5)。タバコ副流煙作用後の H3(S10) のリン酸化部位においても同様の結果が得られた。

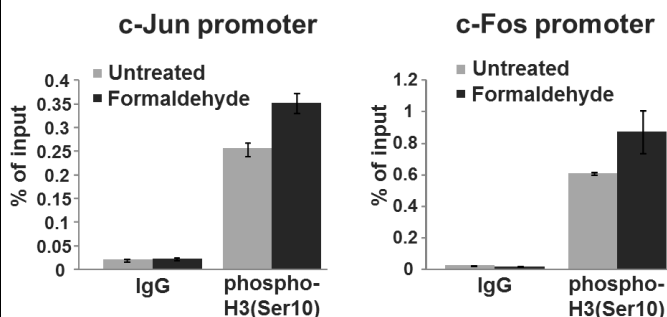


図5 ヒストンH3(Ser10)リン酸化と前がん遺伝子発現制御

(5) まとめ

本研究により、タバコ副流煙、ホルムアルデヒドをはじめとする化学物質はヒストンのリン酸化・アセチル化状態をダイナミックに変化させること、そのパターンは化学物質の種類に応じて異なることが明らかになった。ヒストン H3 (S10) のリン酸化については、時間的変化はあるものの、多くの化学物質で誘導され、また、前がん遺伝子の発現を制御していることが明らかとなった。ヒストン H3 のアセチル化は、長波長紫外線照射や E2 作用により顕著であった(データ示さず)。ヒストンのアセチル化はクロマチン構造を弛緩させることが報告されていることから、ヒストン修飾が起因となり遺伝子発現制御に関与していることが考えられた。

顕著なヒストン修飾が認められた時間に短波長紫外線 (UVB) を照射したところ、明らかな生存率の低下が認められたことから、ヒストン修飾変化が、UVB による DNA 損傷誘導、修復を混乱させている可能性が考えられ、これらは複合曝露の皮膚がん増加への寄与を示唆していた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

1. T. Toyooka, T. Amano, Y. Ibuki; Titanium dioxide particles phosphorylate histone H2AX independent of ROS production. *Mutat Res.* 742(1-2):84-91 (2012). DOI: [10.1016/j.mrgentox.2011.12.015](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.12.015) (査読有)
2. T. Toyooka, T. Kubota, Y. Ibuki; Nonylphenol polyethoxylates induce phosphorylation of histone H2AX. *Mutat Res.* 741(1-2):57-64 (2012). DOI: [10.1016/j.mrgentox.2011.10.006](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.10.006) (査読有)
3. T. Toyooka, M. Ishihama, Y. Ibuki; Phosphorylation of histone H2AX is a powerful tool for detecting chemical photogenotoxicity. *J Invest Dermatol.* 131(6):1313-21 (2011). DOI: [10.1038/jid.2011.28](https://doi.org/10.1038/jid.2011.28) (査読有)
4. G. Ohnuki, T. Toyooka, Y. Ibuki; UVB

in solar-simulated light causes formation of BaP-photoproducts capable of generating phosphorylated histone H2AX. *Mutat. Res.* 702, 70-7 (2010). DOI: [10.1016/j.mrgentox.2010.07.001](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.07.001) (査読有)

5. T. Toyooka and Y. Ibuki; Cigarette sidestream smoke induces phosphorylated histone H2AX. *Mutat. Res.* 676, 34-40 (2009). DOI: [10.1016/j.mrgentox.2009.03.002](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.03.002) (査読有)

[学会発表] (計 27 件)

1. 伊吹裕子: ヒストン修飾を指標とした環境化学物質と光の複合影響に関する研究. 第 40 回日本環境変異原学会 (東京) pp. 66, 2011 年 11 月 21 日.
2. 吉田唯真, 豊岡達士, 伊吹裕子: ホルムアルデヒドによるヒストン修飾変化. 第 40 回日本環境変異原学会 (東京) pp. 144, 2011 年 11 月 21 日.
3. 豊岡達士, 久保田徹, 伊吹裕子: ノニルフェノールポリエトキシレートはヒストン H2AX のリン酸化を誘導する. 第 40 回日本環境変異原学会 (東京) pp. 142, 2011 年 11 月 21 日.
4. 伊吹裕子, 豊岡達士: ヒストン H2AX のリン酸化を指標とした光毒性検出法. 第 38 回トキシコロジー学術大会(横浜) pp 207, 2011 年 7 月 13 日.
5. 豊岡達士, 久保田徹, 伊吹裕子: ノニルフェノールポリエトキシレート及びその光分解物はヒストン H2AX のリン酸化を誘導する. 第 38 回トキシコロジー学術大会 (横浜) pp 125, 2011 年 7 月 11 日.
6. 豊岡達士, 伊吹裕子: 銀ナノ粒子は DNA-topoisomerase II 複合体を形成しヒストン H2AX のリン酸化を誘導する. 第 39 回日本環境変異原学会 (茨城) 講演要旨集 pp 134, 2010 年 11 月 16 日.
7. Yuko Ibuki: Histone modifications by environmental factors - crucial signals for DNA repair -. The 26th annual meeting of KSOT/KEMS (Korea) Abstract pp 41-53, 2010 年 11 月 15 日.
8. 伊吹裕子: ヒストン修飾による DNA 損傷修復の変化. 第 56 回日本環境変異原学会 MMS 研究会講演要旨集 pp 1-5, 2010 年 6 月 25 日.

9. Tatsushi Toyooka, Yuko Ibuki: Silver nanoparticles induce phosphorylation of histone H2AX by inhibition of topoisomerase II. 第82回日本生化学会(神戸)講演要旨集 pp 403, 2009年10月22日.
10. 伊吹裕子: 環境ストレスと Epigenetics —ヒストンアセチル化と発癌の関連性について考える. 第1回環境エピゲノミクス研究会(静岡) 2009年5月15日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊吹 裕子 (IBUKI YUKO)
静岡県立大学・環境科学研究所・准教授
研究者番号: 30236781

(2) 研究分担者

豊岡 達士 (TOYOOKA TATSUSHI)
静岡県立大学・環境科学研究所・助教
研究者番号: 40423842