

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 4 月 20 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590736

研究課題名（和文） 亜ヒ酸製剤投与患者におけるヒ素感受性に関与する遺伝子の解明

研究課題名（英文） Study on gene related to arsenic susceptibility in patient treated with arsenic trioxide

研究代表者

藤原 純子（FUJIHARA JUNKO）

島根大学・医学部・助教

研究者番号：20346381

研究成果の概要（和文）：亜ヒ酸投与された成人および小児 acute promyelocytic leukemia 患者における尿中ヒ素化合物と 8-OHdG 分析を行った。成人ではメチルヒ素化合物の MMA と DMA は投与期間中増加傾向で、無機ヒ素（As^V と As^{III}）は、低濃度で一定の値を示した。8-OHdG 濃度はヒ素化合物の総和、MMA および DMA 濃度との間に有意な正の相関関係が認められた。小児患者では尿中 As^{III} の割合は 5-47% と成人例に比較して高く、8-OHdG 濃度と尿中 DMA 濃度に正の相関関係が認められた。

研究成果の概要（英文）：The concentrations of arsenic compounds (dimethylarsinic acid (DMA), monomethylarsonic acid (MMA), As (V), and As (III)) and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in the urine of an acute promyelocytic leukemia (APL) patient during Arsenic trioxide treatment were determined. In adult patient, the methylated arsenic (DMA and MMA) concentrations were increased during the consolidation therapy. Significant positive correlations were observed between concentrations of 8-OHdG and DMA, between concentrations of 8-OHdG and MMA, and between concentrations of 8-OHdG and the sum of arsenic compounds. In pediatric patient, the levels of arsenic compounds and urinary arsenic level and % of MMA and DMA were lower than those of adult patient and significant positive correlations were observed between concentrations of 8-OHdG and DMA.

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	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：亜ヒ酸・遺伝的多型・感受性

1. 研究開始当初の背景

亜ヒ酸（三酸化ヒ素：ATO）は難治性・抵抗性急性前骨髄球性白血病（APL）の治療に用いられている。一方で、治療域

濃度の ATO 投与過程で、患者の突然死例が報告されるなど、ヒ素に対する感受性には個人差が存在し、ヒ素代謝に関する酵素の遺伝的多型を考慮に入れた上で

投与を行う必要があると考えられる。

2. 研究の目的

本申請課題では、①ATO を投与された APL 患者におけるヒ素代謝を評価し、②ヒ素代謝に関与する多種の遺伝子群 (AS3MT、GSTO など) の遺伝的多型部位の探索を行い、ATO 投与による毒性影響評価を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

①島根大学血液内科、同小児科の協力を得て亜ヒ酸製剤を投与された APL 患者の血液および尿を採取し HPLC-ICP-MS、を用いてヒ素化合物の分析の定性・定量を行い、ヒ素の体内動態を解明する。

②ヒ素代謝の個人差に関与する酵素として還元に関わる glutathione *S*-transferase (GST)ファミリーと、メチル化に関与する As (+3 oxidation state) methyltransferase (AS3MT)および DNA 修復酵素について多型解析を行う。

4. 研究成果

(1) 成人 APL 患者における検討

ヒ素化合物の組成割合は、投与期間を通じて平均で dimethylarsinic acid (DMA) (約 45%), As (III) (約 30%), monomethylarsonic acid (MMA) (約 20%), As (V) (約 5%) であった。メチルヒ素化合物の MMA と DMA は投与期間中増加傾向にあった。一方、無機ヒ素 (As^V と As^{III}) は、投与期間中、低濃度で一定の値を示し、これはヒ素のメチル化に関与する酵素の活性化によるのではないかと考えられた。8-OHdG は活性酸素種による DNA ダメージにより生じる。8-OHdG 濃度は 7-58.5 ng/mg creatinine の範囲を示し、投与期間中増加傾向を示した。8-OHdG 濃度はヒ素化合物の総和、MMA および DMA 濃度との間にいずれも有意な正の相関関係が認められた。海産物などの食品には、MMA や DMA が含まれるが、ヒトの尿サンプルにおいてこれら由来の MMA、DMA も検出される可能性が考えられる。ヒ素化合物濃度と 8-OHdG 濃度を総合的に判断することが、食事経路の摂取とヒ素中毒とを区別する一助になることが、本研究の結果から示唆された。

(2) 小児 APL 患者における検討

寛解導入療法期間中血清中総ヒ素濃度は 0.002-0.156 $\mu\text{g/g}$ と極めて低く、血清中のいずれのヒ素化合物も今回の測定方法では検出されなかった。一方尿中総ヒ素濃度は 18-2120 ng/mg creatinine であり、投与尿中 As^{III} : 67-675 ;

arsenate (As^V) : 34-642 ; MMA : 89-233 ; DMA : 193-565 (ng/mg creatinine) の範囲で検出された。尿中 DMA の割合が最も高く、23-69% であった。また尿中 As^{III} の割合は 5-47% と成人例に比較して高かった。

尿中 8-OHdG 濃度は 0.8-34 ng/mg creatinine の範囲を示し、尿中 DMA 濃度と正の相関関係が認められた。血清 8-OHdG 濃度は、2.2-5.8 ng/mg と低値であり、投与期間中ほぼ一定の値を示した。ATO を投与された小児患者の尿および血清において 8-OHdG と各ヒ素化合物濃度との関係を調べたのは、本研究が初めてである。小児患者では、 As^{III} の割合が高く、成人に比較してヒ素の多代謝能が低い可能性が示唆された。

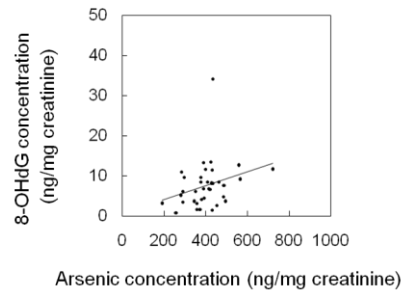


図 1. 小児患者における尿中 DMA 濃度と 8-OH d G 濃度の関係

(3) DNA 修復酵素における遺伝子多型

ヒ素に曝露されたベトナム人における尿中 8-OHdG 濃度と DNA 修復酵素である *hOGG1* (human oxoguanine glycosylase1) Ser326Cys 遺伝子多型と *AP(1)* Asp148Glu 遺伝子多型の関連について調査を行ったところ、*hOGG1* Ser326Cys 多型について Cys/Cys では Ser/Cys および Ser/Ser に比べ有意に高く、*AP(1)* Asp148Glu について Asp/Glu は Asp/Asp に比べ有意に高く、これらの変異を有する人では酸化ストレスを強く受けやすいことが示唆された。

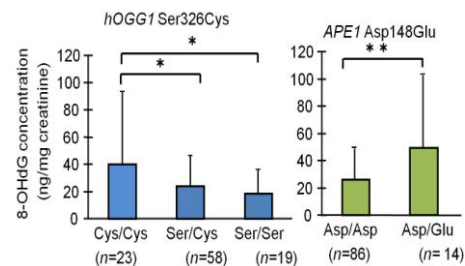


図 2. 尿中 8-OHdG と DNA 修復酵素における多型の関係

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 13 件)

- ① Fujihara J., Hasegawa M., Kanai R., Agusa T., Iwata H., Tanabe S., Yasuda T., Yamaguchi S., Takeshita H. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine and arsenic compounds in urine and serum of a 4-year-old child suffering from acute promyelocytic leukemia during treatment with arsenic trioxide. *Forensic Toxicol*, 査読有 2011; 29: 65-68.
DOI : 10.1007/s11419-010-0104-z
- ② Fujihara J., Yasuda T., Kato H, Yuasa I, Panduro A, Kunito T, Takeshita H. Genetic variants associated with arsenic metabolism within human arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase show wide variation across multiple populations. *Arch Toxicol*. 査読有 2011; 85:119-125.
DOI : 10.1007/s00204-010-0568-y
- ③ Fujihara J., Ueki M, Yasuda T, Iida R, Soejima M, Koda Y, Kimura-Kataoka K, Kato H, Panduro A, Tongu M, Takeshita H. Functional and genetic survey of all known the SNPs within human deoxyribonuclease I gene in wide-ranging ethnic groups. *DNA and Cell Biol*. 査読有 2011;30:205-217.
DOI : 10.1089/dna.2010.1120.
- ④ Fujihara J., Tabuchi M, Yasuda T, Fujita Y, Takeshita H. Rapid measurement of deoxyribonuclease I activity with the use of microchip electrophoresis based on DNA degradation. *Anal Biochem*. 査読有 2011 ; 413:78-79.
DOI : org/10.1016/j.ab.2011.02.011,
- ⑤ Fujihara J., Soejima M, Yasuda T, Koda Y, Agusa T, Kunito T, Tongu M, Yamada T, Takeshita H. Global analysis of genetic variation in human arsenic (+ 3 oxidation state) methyltransferase (AS3MT). *Toxicol Appl Pharmacol*. 査読有 2010; 243:292-299.
DOI : org/10.1016/j.taap.2009.11.020
- ⑥ Fujihara J., Yasuda T, Iida R, Kimura-Kataoka K, Soejima M, Koda Y, Kato H, Panduro A, Yuasa I, Takeshita H. Global analysis of single nucleotide polymorphisms in the exons of human deoxyribonuclease I-likel and 2 genes. *Electrophoresis*. 査読有 2010 ;31:3552-3557.
DOI: 10.1002/elps.201000319
- ⑦ Fujihara J., Fujii Y, Agusa T, Kunito T, Yasuda T, Moritani T, Takeshita H. Ethnic differences in five intronic

polymorphisms associated with arsenic metabolism within human arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase (AS3MT) gene. *Toxicol Appl Pharmacol* 査読有 2009; 234: 41-46.

DOI:org/10.1016/j.taap.2008.09.026,

- ⑧ Fujihara J., Agusa T, Tanaka J, Fujii Y, Moritani T, Hasegawa M, Iwata H, Tanabe S, Takeshita H. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) as a possible marker of arsenic poisoning: a clinical case study on the relationship between concentrations of 8-OHdG and each arsenic compound in urine of an acute promyelocytic leukemia patient being treated with arsenic trioxide. *Forensic Toxicol* 査読有 2009; 27; 41-44.

DOI: 10.1007/s11419-008-0062-x

- ⑨ Fujihara J., Yuasa I, Muro T, Iida R, Tsubota E, Nakamura H, Imamura S, Yasuda T, Takeshita H. Allele frequencies and haplotypes for 28 Y-STRs in Ovambo population. *Legal Med* 査読有 2009; 11, :205-208

DOI:org/10.1016/j.legalmed.2009.03.009

- ⑩ Fujihara J., Yasuda T, Iida R, Takatsuka H, Fujii Y, Takeshita H. Cytochrome P450 1A1, glutathione S-transferases M1 and T1 polymorphisms in Ovambos and Mongolians. *Legal Med* 査読有 2009; 11, S408-S410.

DOI:.org/10.1016/j.legalmed.2009.01.073,

- ⑪ Fujihara J., Agusa T, Yasuda T, Soejima M, Kato H, Panduro A, Koda Y, Kimura K, Takeshita H. Ethnic variation in genotype frequencies of δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD). *Toxicol. Lett.* 査読有 2009; 191, 236-239.

DOI:.org/10.1016/j.toxlet.2009.09.005

- ⑫ Fujihara J., Tsubota E, Iida R, Takeshita H. Allele frequencies and haplotypes for five Y-STRs (DYS441, DYS442, DYS443, DYS444, and DYS445) in Ovambo and Turks populations using mutiplex PCR system. *Forensic Sci Int. Genetics*. 査読有 2009; 3, 268-269.

DOI: org/10.1016/j.fsigen.2009.03.001,

〔学会発表〕 (計 10 件)

1. 藤原純子, 竹下治男, 安田年博, 加藤秀章, 神田芳郎, 副島美貴子: ヒ素代謝に関与する AS3MT 遺伝子多型の民族差異. 第 95 次日本法医学会総会, 2011 年 6 月 16 日, コラッセふくしま (福島).

2. 藤原純子, 竹下治男, 安田年博, 加藤秀章, 神田芳郎, 副島美貴子: Delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) G177C (Asn59Lys) 多型の頻度分布における民族差異. 第95次日本法医学会総会. 2011年6月16日, コラッセふくしま (福島)
3. 湯浅勲, 遠藤実, 入澤淑人, 針原伸二, 西向弘明, 松末綾, 藤原純子, 竹下治男, 梅津和夫: 補体 I i n n s h i のイントロン7にみられるSTRについて (3) 東アジアにおける分布. 第95次日本法医学会総会, 2011年6月16日, コラッセ福島 (福島).
4. 藤原純子, 長谷川正紀, 岩田久人, 田辺信介, 竹下治男, ヒ素に曝露したベトナム人におけるDNA repair gene SNPが酸化ストレス感受性の差異に与える影響, 日本法中毒学会第30年会, 2011年6月10日, 長崎大学 (長崎).
5. 藤原純子, 藤田恭久, 竹下治男, 法医学的個人識別を応用したしじみ等食品技術開発. 起源分析技術研究懇談会第4回講演会, 2010年11月30日, タワーホール船堀 (東京).
6. 藤原純子, 木村かおり, 竹下治男, 中島たみ子, 小湊慶彦, 湯浅勲, 飯田礼子, 植木美鈴, 安田年博. Deoxyribonuclease II (DNase II) 遺伝子に座位する非同義置換型SNPには不活性な酵素を産生する minor allele が分布する. 日本DNA多型学会第19回学術集会, 2010年11月18~19日三島市民文化会館 (静岡).
7. 藤原純子, 竹下治男, 安田年博, 植木美鈴, 飯田礼子, 中島たみ子, 小湊慶彦. 動物種特異的臓器分布から明らかにされたDNase I の分子進化. 日本DNA多型学会第19回学術集会, 2010年11月18日, 久留米.
8. 藤原純子, 阿草哲郎, 金井理恵, 長谷川正紀, 山口清次, 竹下治男: 亜ヒ酸製剤を投与された急性前骨髄球性白血病 (APL) 患者の血清および尿中ヒ素化合物濃度と尿中8-OHdG分析日本法中毒学会第29年会, 2010年7月23日, 日本医科大学 (東京).
9. 藤原純子, 木村かおり, 竹下治男, 安田年博, 飯田礼子, 小湊慶彦, 佐野利恵, 中島たみ子: 哺乳類DNase IにおけるN-グリコシド型糖鎖解析. 第94次日本法医学会総会, 2010年6月25日, タワーホール船堀 (東京).
10. 藤原純子, 竹下治男, 藤田恭久: 酸化亜鉛ナノ粒子によるエチジウムブロマイド発光強度上昇の検討. ナノ学会第8回大会, 2010年6月14日, 岡崎コンファレンスセンター (岡崎).

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
藤原 純子 (FUJIHARA JUNKO)
島根大学・医学部・助教
研究者番号: 20346381
- (2) 研究分担者
竹下 治男 (TAKESHITA HARUO)
島根大学・医学部・教授
研究者番号: 90292599
- (3) 連携研究者
()
研究者番号