

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 5 月 30 日現在

機関番号：23803
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010 年～2012 年
 課題番号：22710065
 研究課題名（和文）重金属による紫外線発がんの増強－ヒストン修飾から解く DNA 損傷生成・修復率の変化
 研究課題名（英文）Augmentation of UV-induced carcinogenesis by heavy metals-relationships with histone modification and repair of DNA damage
 研究代表者
 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

研究成果の概要（和文）：

本研究では、近年の皮膚癌罹患率上昇の原因を、紫外線と環境化学物質（特に重金属）の複合作用に着目し究明した。本研究の遂行により、重金属自身（金属ナノ粒子を含む）の遺伝毒性を明らかにした。さらに、ある種の重金属と紫外線が複合作用することで、紫外線誘導 DNA 損傷の生成が増加すること及び、DNA 損傷の修復が阻害されることを明らかにした。これらの知見は、重金属と紫外線が複合作用することで、遺伝毒性が増強されることを示しており、当該作用が皮膚癌罹患率上昇の一原因となっていることを示唆するものであった。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we investigated the relationship between increased incidence of skin cancer in recent years and coexposure to environmental chemicals (especially heavy metals) plus ultraviolet rays. We showed that several kinds of heavy metals induced DNA damage. In addition of that, the amount of DNA damage generated by UV irradiation was significantly enhanced in the presence of a certain heavy metal, and the repair kinetics of that damage was also attenuated. These results indicated augmented genotoxicity by coexposure to heavy metals and UV. Here we suggested that the coexposure would be one of the causes of recent increased prevalence rate of skin cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：放射線・環境物質影響科学

キーワード：DNA 損傷、紫外線、重金属、皮膚癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、皮膚がんの増加が多数報告されている。WHO の報告によれば、世界で年間、約 13 万人がメラノーマ (致死率の高い最も危険な皮膚がんの一つ) を発症するという。非メラノーマの発症も含めると、その数は年間 300 万人に達し、約 7 万人がこれら皮膚がんが原因で死亡している。メラノーマの罹患率はノルウェーやスウェーデンなどの北欧において過去 45 年で 3 倍、米国において 30 年で 2 倍の上昇が報告されている。加えて、皮膚がん罹患率が低いとされる日本を含むアジア諸国においても、基底細胞がん、有棘細胞がん等の増加が報告されており、それは特にアジア途上国において顕著である。このような事態を受け、WHO は皮膚がんの原因となる過剰な紫外線曝露を避けるよう呼びかけている (<http://www.who.int/uv/en/>)。

(2) 一方、最近になって紫外線発がんが重金属の存在下で増強されるという報告がある。例えば、疫学研究によると、地下水のヒ素濃度が高い地域においては、紫外線があたる皮膚におけるがん発症率が他地域に比べて有為に高く (Rossman et al. 2004)、また、動物実験においてはヒ素、ニッケル、クロミウムが紫外線発がんを促進することが報告されている (Burns et al. 2004, Uddin et al. 2008)。これらの報告は重金属汚染が重大な問題となっているアジア途上国において、皮膚がん罹患率が上昇していることとリンクする。また、先進国においても最近、種々の金属ナノ粒子が産業に大量使用されたことより、同様に紫外線との複合影響が懸念される。このようなことより、皮膚がん罹患率上昇の一原因として、環境中の重金属と紫外線の複合的曝露を考慮し、その詳細を検討することが重要であると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 紫外線発がんの主要因は、紫外線により生成するシクロブタンピリミジンダイマーを始めとする DNA 損傷であり、この DNA 損傷がどの程度生成されるか (生成率)、そして修復されるか (修復率) が細胞の変異、または発がんのポイントとなる。これまでに申請者は、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 損傷修復能力を抑制することを見いだしている。加えて、数種の重金属がアセチル化、リン酸化等のヒストン修飾を誘導することを明らかにしている。重金属作用によりヒストン修飾が変化した場合に紫外線が照射されれば、DNA 損傷生成率、及びその修復率が変化し、変異の上昇、発がんに結びつく可能性がある。

(2) 本研究では、重金属自身の遺伝毒性を明らかにした上で、重金属が紫外線による DNA

損傷の生成、及びその修復を変化させるの可否かをヒストン修飾変化の観点より検討、皮膚がん罹患率上昇の原因の一端を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、まず、重金属 (重金属イオン、粒子) 自身によって誘導される DNA 損傷をヒストン H2AX のリン酸化を指標に検討した。また、ヒストン修飾変化 (ヒストン H3、H4 のアセチル化、リン酸化) を、各種修飾部位特異的抗体を用い測定し、紫外線との複合作用を検討すべき重金属を見極めた。なお、対象とした金属は土壤汚染対策法施行規則に規定される第二種特定有害物質に該当する重金属、カドミウム (CdCl_2)、クロミウム (K_2CrO_4)、セレンウム (SeCl_2)、鉛 (PbCl_2) 等に加えて、銅 (CuCl_2)、ニッケル (NiCl_2)、コバルト (CoCl_2)、亜鉛 (ZnCl_2) 等に加えて、日常生活で我々が接触する機会の高い金属として二酸化チタン (TiO_2)、酸化亜鉛 (ZnO)、銀 (Ag) 等も検討対象とした (各種金属ナノ粒子含む)。加えて、金属ナノ粒子を用いた検討においては細胞内への粒子取込み量をフローサイトメーターを用いて解析した。

(2) 先の検討で選定された重金属と紫外線を複合作用し、紫外線照射後の DNA 損傷 (CPD, 6-4 光産物) 生成率・修復率の変化を測定、ヒストン修飾変化が DNA 修復率等に与える影響に着いて考察した。

4. 研究成果

(1) 金属又は金属ナノ粒子による遺伝毒性についての検討。

① 種々の金属種によるヒストン H2AX のリン酸化誘導

被検対象金属全てにおいて、ヒストン H2AX のリン酸化が誘導されることが明らかとなった。特に銅、亜鉛、銀、カドミウムで強い誘導が確認された。さらに、興味深いことに、金属粒子として金属を作用した方が、金属イオンとして作用するより顕著なリン酸化ヒストン H2AX が誘導されることが判明した。これは細胞内に取り込まれた粒子から持続的に金属イオンが放出され、細胞内での金属イオン濃度が劇的に高まった結果であると考えられた。

金属ナノ粒子は細胞内で活性酸素種を生成するという報告が多数なされており、この活性酸素種は DNA を含む生体内分子を傷害することが知られている。ヒストン H2AX のリン酸化誘導と活性酸素種生成量の関係を検討した結果、ヒストン H2AX のリン酸化を強く誘導した金属粒子では、細胞内活性酸素種量も高いことが明らかとなった。前の結果と併せると、金属粒子は、細胞内で金属イオンを持続的に放出、細胞内活性酸素種量の増加、

ヒストン H2AX をリン酸化したものと考えられた。

一方で、必ずしも金属粒子の細胞内取込み量と活性酸素種生成量は一致するものではなかった。例えば、酸化亜鉛や酸化銅のナノ粒子は、二酸化チタンナノ粒子よりも、細胞内取込み量が少ないにも関わらず細胞内活性酸素種量を顕著に増加させた (図 1)。これらのことより、粒子表面からどの程度金属イオンが放出されるかが、細胞内活性酸素種量の増加に密接に関連しており、ひいてはその金属粒子による DNA 損傷生成に大きく寄与するものであると考えられた。

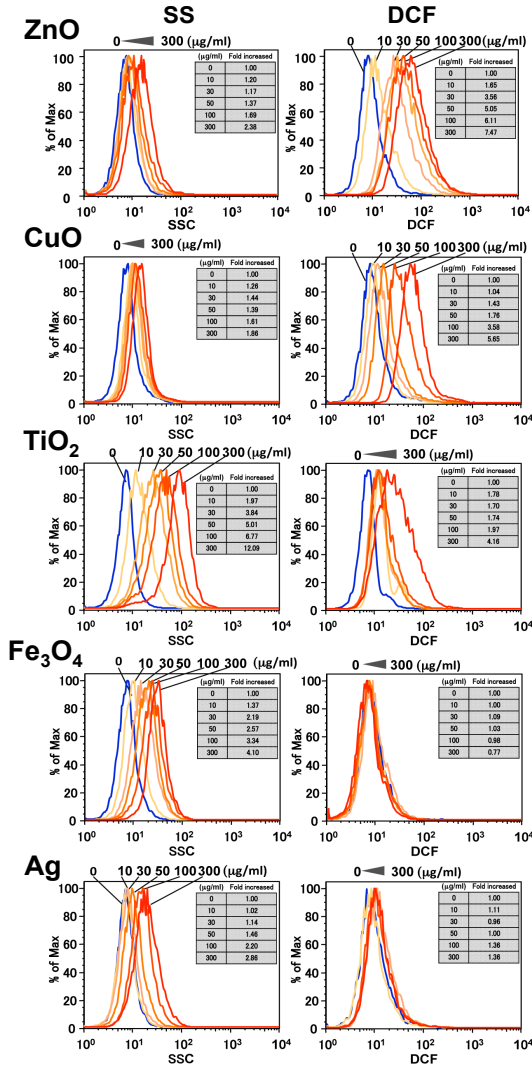


図 1 各種金属粒子の細胞内取込み量と細胞内活性酸素種量の定量

② 二酸化チタン粒子によるリン酸化ヒストン H2AX の誘導

二酸化チタン粒子は化粧品、塗料、コーティング剤等に広く使用されており、我々が日常的に接する機会が高い金属粒子の一つであるため、二酸化チタン粒子の遺伝毒性を詳細に検討する必要があると考えた。マイクロサイズとナノサイズの二酸化チタン粒子で

は、ナノサイズの二酸化チタン粒子の方が細胞内に取り込まれやすく、顕著なリン酸化ヒストン H2AX の誘導が確認された (酸化銅や酸化亜鉛と比べると弱い) (図 2)。

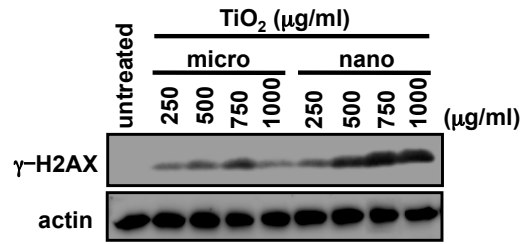


図 2 二酸化チタン粒子によって誘導されるヒストン H2AX のリン酸化

一方で、前述した通り、二酸化チタンナノ粒子は細胞内に取り込まれやすいにも関わらず、活性酸素種生成量は少なく、実際に抗酸化剤 N-acetylcystein 存在下においても、リン酸化誘導が阻害されることはなかった。二酸化チタン粒子がどのような機構で H2AX をリン酸化したかについては現在も検討中である。

(2) 金属又は金属ナノ粒子が誘導するヒストン修飾変化の検討

各種金属又は金属粒子を作用した後、ヒストン H3 及び H4 のアセチル化及びリン酸化について検討した。H3Ser10 のリン酸化においては検討した金属全てについて誘導が確認された。中でも、ある特定の数種類の金属においては非常に強い H3Ser10 のリン酸化に加え、H3 に global なアセチル化を誘導することが明らかとなった (未発表データを含むので詳しくは言及せず)。これらの結果は、金属を作用させるとヒストンの修飾が起こり、クロマチンの高次構造が変化していることが示唆された。

紫外線誘導 DNA 損傷 (CPD, 6-4 PP) はヌクレオチド除去修復 (NER) によって修復されるが、この DNA 損傷修復を行う際に、修復を効率的に行うために、損傷部位に存在するヒストンタンパク質をアセチル化し、クロマチン構造を弛緩、修復因子をリクルートしやすくしていることが最近の研究により明らかになってきている。我々は、金属作用によるヒストン修飾変化とそれに伴うクロマチン構造変化が、NER に必要なヒストン修飾を攪乱し、正常な NER が行われなくなる可能性があるのではないかと考えた。

(3) 金属と紫外線の複合作用による遺伝毒性の増強

前述の検討でヒストン修飾変化を顕著に誘導することが明らかとなった金属類と紫外線 (UVB) の複合作用の影響を検討した。ある金属種 X (未発表のため具体名示さず) と紫外線の複合作用は、それぞれの単独作用に比

して、非常に強いヒストン H2AX のリン酸化が確認された。なお、このヒストン H2AX のリン酸化は紫外線誘導 DNA 損傷 (CPD, 6, 4PP) が細胞内でプロセッシングされ、DNA 二本鎖切断が生じた結果である。複合作用によってヒストン H2AX のリン酸化が亢進された理由として (i) 金属作用により CPD, 6-4PP の修復が阻害された (ii) 金属存在下では最初の紫外線誘導 DNA 損傷が過剰に生成したということが考えられた。実際に紫外線誘導 DNA 損傷 (CPD, 6-4PP) を ELISA 法で測定したところ、予想通り金属 X の存在下で DNA 損傷の修復速度が低下していることが明らかとなった。この原因は前述した通り、金属作用によるヒストン修飾変化の攪乱が関与していると推察された。

また、驚いたことに、金属 X の存在下では紫外線照射によって生成される CPD 及び 6-4PP 自体の量が顕著に増加していた。これら DNA 損傷は DNA が UVB のエネルギーを吸収することにより、特にチミン塩基が励起され生成されるが、金属 X が存在することによって、CPD 及び 6-4PP が生成されるエネルギー準位が下がったためであると推察された。なお、金属 X が DNA と結合しているであろうことは ICP-AES を用いて明らかにしている。

以上、本研究の遂行により、金属はそれ自体でも遺伝毒性を有するが、紫外線と複合作用することで、DNA 損傷生成・修復に影響を与え、細胞の変異及び発がんの亢進の原因となる可能性があることが明らかとなった。一方、ヒストン修飾変化の攪乱と DNA 損傷修復の関係は未だ不明な点が多く、今後も継続的な研究が必要とされる。

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 7 件)

- ① Toyooka T, Kubota T, Ibuki Y. UVB irradiation changes genotoxic potential of nonylphenolpolyethoxylates-remarkable generation of γ -H2AX with degradation of chemical structure. *Mutagenesis*. 2013, 28, 7-14. doi: 10.1093/mutage/ges043. (査読有)
- ② Ibuki Y, Toyooka T. Nanoparticle uptake measured by flow cytometry. *Methods Mol. Biol.* 2012, 926, 157-66. doi: 10.1007/978-1-62703-002-1_11. (査読有)
- ③ Toyooka T, Shinmen T, Aarts JM, Ibuki Y. Dual effects of N-acetyl-L-cysteine dependent on NQO1 activity: suppressive or promotive of 9,10-phenanthrenequinone-induced toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2012, 264,

404-12. doi: 10.1016/j.taap.2012.08.017. (査読有)

- ④ Toduka Y, Toyooka T, Ibuki Y. Flow cytometric evaluation of nanoparticles using side-scattered light and reactive oxygen species-mediated fluorescence-correlation with genotoxicity. *Environ. Sci. Technol.* 2012, 46, 7629-36. doi: 10.1021/es300433x. (査読有)
- ⑤ Toyooka T, Amano T, Ibuki Y. Titanium dioxide particles phosphorylate histone H2AX independent of ROS production. *Mutat. Res.* 2012, 742, 84-91. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.12.015. (査読有)
- ⑥ Toyooka T, Kubota T, Ibuki Y. Nonylphenol polyethoxylates induce phosphorylation of histone H2AX. *Mutat. Res.* 2012, 741, 57-64. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.10.006. (査読有)
- ⑦ Toyooka T, Ishihama M, Ibuki Y. Phosphorylation of histone H2AX is a powerful tool for detecting chemical photogenotoxicity. *J. Invest. Dermatol.* 2011, 131, 1313-21. doi: 10.1038/jid.2011.28. (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

- ① 豊岡達士、伊吹裕子：ヒストン H2AX のリン酸化を指標とした化学物質の遺伝毒性検出：第 4 1 回日本環境変異原学会（静岡）2012 年 11 月
- ② 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 4 0 回日本環境変異原学会（東京）2011 年 11 月
- ③ 戸塚洋輔、豊岡達士、伊吹裕子：ナノ粒子取り込み量と細胞内活性酸素種量の二要素同時解析によるナノ毒性評価法の構築。第 4 0 回日本環境変異原学会（東京）2011 年 11 月
- ④ 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によるリン酸化ヒストン H2AX の誘導。第 3 8 回日本トキシコロジー学会学術年会（横浜）2011 年 7 月
- ⑤ 趙曉旭、豊岡達士、伊吹裕子：銀ナノ粒子と紫外線 UVA の組み合わせによる高い殺菌効果とそれに伴うヒトへの毒性。第 2 4 回変異機構研究会（愛知）2011 年 6 月
- ⑥ 戸塚洋輔、豊岡達士、小池学、伊吹裕子。p21-GFP 蛍光を指標とした Flow cytometer によるナノ粒子毒性評価系の構築。第 2 4 回変異機構研究会（愛知）2011 年 6 月
- ⑦ 豊岡達士、伊吹裕子：銀ナノ粒子は 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 3 9 回

- 日本環境変異原学会（筑波）2010年11月
⑧ 戸塚洋輔、豊岡達士、小池学、伊吹裕子：
p21-GFP を指標とした Flow cytometer に
よる新規ナノ粒子評価法の開発。第39
回 日本環境変異原学会（筑波）2010年
11月

〔その他〕

<http://photobio.u-shizuoka-ken.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 連携研究者

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