

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成23年6月17日現在

機関番号：82101
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23790680
研究課題名（和文） ヒト肝癌細胞株におけるヒ素のエピジェネティクス作用を介した発癌メカニズムの解析
研究課題名（英文） Studies on the epigenetic mechanism of arsenic carcinogenesis on human liver cancer cell line
研究代表者 鈴木 武博（SUZUKI TAKEHIRO） 独立行政法人国立環境研究所・環境健康研究センター・主任研究員 研究者番号：60425494

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒト尿路上皮細胞において、癌抑制遺伝子 *p16^{INK4a}* のエピジェネティックな発現制御に着目して、ヒ素による発癌メカニズムを検討した。その結果、ヒ素曝露により、*p16^{INK4a}* の発現低下、*p16^{INK4a}* プロモーター領域の H3K27 トリメチル化レベルの増加、さらに H3K27 トリメチル化酵素 *EZH2* の発現増加が観測された。したがって、ヒト尿路上皮細胞では、ヒ素による抑制型ヒストン修飾の誘導を介した *p16^{INK4a}* の発現減少が、ヒ素による発癌に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the mechanism involved in arsenic-induced carcinogenesis focusing on epigenetic regulations of the tumor suppressor gene *p16^{INK4a}* in human urothelial cell lines. The results showed that arsenic exposure induced a significant decrease in expression of *p16^{INK4a}* associated with an increase in the level of trimethylated histone H3 lysine 27 (H3K27), a transcription-suppressive histone modification, in the promoter region. The results also showed that arsenic exposure induced a significant increase in expression of H3K27 histone methyltransferase *EZH2*. These results suggested that the decreased expression of *p16^{INK4a}* through histone modification is associated with arsenic-induced carcinogenesis in human urothelial cell lines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2012年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：ヒ素、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

東南アジアをはじめ世界各国で、地質由来の無機ヒ素が井戸水に混入し、それを飲み水としている住民に大きな健康被害を与えている。無機ヒ素による深刻な健康影響として

は発癌があり、無機ヒ素が混入した水の長期摂取により、皮膚、肺、膀胱、肝臓癌などが発症することが疫学研究により報告されている。

近年の研究から、発癌とエピジェネティッ

ク作用は深く関与していることが明らかになっている。癌で観測されるエピジェネティックな変化は、5メチルシトシン (5meC) の全体量が減少していることに代表されるグローバルなDNA低メチル化と、癌遺伝子あるいは癌抑制遺伝子プロモーター領域のDNAメチル化変化及びヒストン修飾変化である。INK4b-ARF-INK4a locus は、二大癌抑制経路であるRbおよびp53経路を正に制御している領域であり、 $p16^{INK4a}$ 、 $p14^{ARF}$ (マウスでは $p19^{Arf}$)、 $p15^{INK4b}$ という3種類の癌抑制遺伝子をコードする。これらの遺伝子は、様々な癌においてエピジェネティック作用による不活化が報告されており、発癌研究において極めて重要な領域であると考えられる。ヒ素による発癌にもエピジェネティック作用が関連するという報告があるが、エピジェネティック作用が発癌の原因か結果かなど、詳細なメカニズムは十分には明らかになっていない。

そのような状況の中、我々は、50 ppmの亜ヒ酸ナトリウム (NaAsO_2) を、C57 マウス雌雄に6ヶ月間飲水投与し、癌ができていない肝臓と肺で、 $p16^{INK4a}$ 、 $p19^{Arf}$ 、 $p15^{INK4b}$ の発現を調べたところ、オスの肝臓のみで、 $p16^{INK4a}$ の発現が有意に低下することを見出した。このとき、 $p16^{INK4a}$ プロモーター領域では、DNAメチル化の変化は見られず、抑制型ヒストン修飾 H3K9 ジメチル化のレベルが有意に増加していることを明らかにした。これらの結果から、ヒ素は直接エピジェネティック作用を変化させる作用をもち、その結果 $p16^{INK4a}$ の発現を減少させ、その現象が、ヒ素による癌発症のメカニズムの1つにつながる可能性があると考えられた。エピジェネティック作用を変化させる要因の詳細なメカニズムの検討が必要であると考えられたが、マウスにおける長期ヒ素曝露の実験系は、サンプル調製に6ヶ月もかかるという難点がある。そこで、ヒ素曝露により $p16^{INK4a}$ の発現が減少することが報告されており、比較的短期間かつ簡便に影響を検出できる肝臓由来の細胞株を用い、ヒ素によるINK4b-ARF-INK4a locus の遺伝子発現調節メカニズムを、エピジェネティック作用に着目して検討することを着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト肝臓癌細胞株 HepG2 を用いて、ヒ素によるINK4b-ARF-INK4a locus の癌抑制遺伝子の発現変化とその発現調節メカニズムの検討、及びグローバルなDNAメチル化変化の絶対量測定から、ヒ素による癌発症に関与するターゲットを同定し、ヒ素による発癌に関するメカニズムを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、まず、ヒト肝臓癌細胞株 HepG2 を亜ヒ酸ナトリウム (以後、ヒ素と略記する) で曝露し、INK4b-ARF-INK4a locus から転写される、3つの癌抑制遺伝子 ($p16^{INK4a}$ 、 $p15^{INK4b}$ 、 $p14^{ARF}$) の発現がどのように変化するかを real time PCR で調べた。発現減少が見られた遺伝子について、エピジェネティック作用に着目し、バイサルファイトシークエンシングによりプロモーター領域のDNAメチル化変化、及びクロマチン免疫沈降法によりヒストン修飾変化を検討した。さらに、その変化を誘導する因子 (DNAメチル化酵素、ヒストン修飾酵素、noncoding RNA、CTCF など) についても検討をおこなった。

グローバルなDNAメチル化変化 (5meCの量) を、我々が開発したLC/MSを用いた精密測定方法により測定した。また、レトロトランスポゾンLINE1のORF1とORF2の発現変化からもグローバルなDNAメチル化変化を検討した。

4. 研究成果

当初、ヒ素曝露により $p16^{INK4a}$ の発現が減少することが報告されていたヒト肝臓癌細胞株 HepG2 を用いる予定であったが、報告の再現性が得られなかったため、実験計画に合致する他の細胞株の探索および曝露条件の検討から開始することになった。

論文検索などにより、数種類の細胞株において、ヒ素曝露により $p16^{INK4a}$ の発現が減少するかどうかを検討した結果、ヒトの正常尿路上皮細胞株 SV-HUC-1 をヒ素で曝露すると $p16^{INK4a}$ の発現がコントロールと比較して有意に減少することが確認できた (図1)。INK4b-ARF-INK4a locus の他の2つの遺伝子である $p14^{ARF}$ および $p15^{INK4b}$ の発現もコントロールと比較してヒ素曝露により有意に減少することが明らかになったが、まず、動物実験による知見がある $p16^{INK4a}$ について遺伝子発現調節メカニズムを詳細に検討することにした。

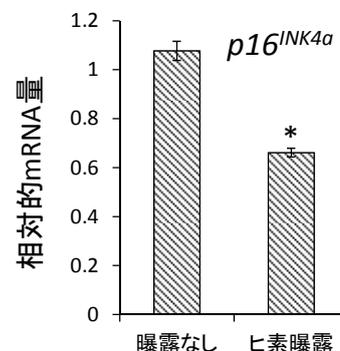


図1. ヒ素による $p16^{INK4a}$ 遺伝子の発現変化 (CPBでノルマライズ)

$p16^{INK4a}$ は細胞周期の G1 期から S 期への移行に関わる pRB-E2F 複合体の制御に重要な役割を果たしている。そこで、フローサイトメーターでヒ素曝露後の細胞周期を検討した。その結果、 $p16^{INK4a}$ の発現減少に対応して、S 期の割合がヒ素で増加していることが明らかになった (表 1)。

表 1. ヒ素による細胞周期の変化 (%)

	G0/G1	S	G2/M
曝露なし	48	28	22
ヒ素曝露	44	35	20

$p16^{INK4a}$ 遺伝子は、DNA メチル化により遺伝子発現が抑制されることが知られているため、バイサルファイトシークエンシングにより、 $p16^{INK4a}$ プロモーター領域の DNA メチル化状態を調べた。その結果、ヒ素曝露でもほぼ完全に非メチル化状態であり、DNA メチル化状態には変化がないことがわかった (図 2)。

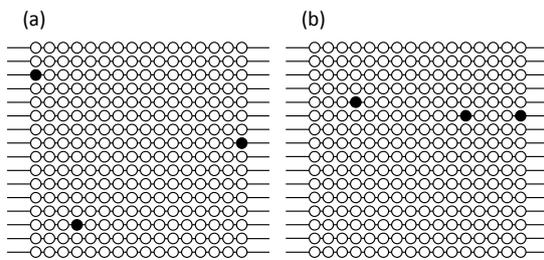


図 2. $p16^{INK4a}$ プロモーター領域の DNA メチル化状態。(a) 曝露なし、(b) ヒ素曝露

次に、 $p16^{INK4a}$ プロモーター領域のヒストン修飾変化についてクロマチン免疫沈降法により検討した。その結果、転写活性型ヒストン修飾であるアセチル化ヒストン H3 のレベルはヒ素曝露で減少した。また、抑制型ヒストン修飾は、ヒ素曝露のマウス肝臓で大きく増加していた H3K9 ジメチル化よりも、H3K27 トリメチル化のレベルの増加の方が顕著であった。ヒ素により影響を受けるヒストン修飾は、ヒトとマウスの種差や、臓器により特異性があることが示唆された。また、H3K27 トリメチル化酵素である *EZH2* の遺伝子発現が、ヒ素曝露により有意に増加することが明らかになった。

一方、INK4b-ARF-INK4a locus の 3 つの癌抑制遺伝子は、ポリコームである BMI1 により同時に制御される、また、 $p16^{INK4a}$ の発現調節にはクロマチンインスレーターである CTCF が関与する、さらに、non-coding RNA である ANRIL がヒストンメチル化酵素であるポリコーム群を $p16^{INK4a}$ や $p15^{INK4b}$ のプロモーター領域にリクルートする、ということが報

告されている。SV-HUC-1 細胞株において、ヒ素による $p16^{INK4a}$ 遺伝子の発現減少にこれらの因子が関与するかどうか調べるために、クロマチン免疫沈降法および real time PCR をおこなった。 $p16^{INK4a}$ プロモーター領域及びクロマチン境界領域への BMI1 と CTCF のリクルートは、ヒ素曝露により変化しなかった。一方、ANRIL の遺伝子発現はヒ素曝露で減少していた。したがって、SV-HUC-1 細胞においては、これらの因子は $p16^{INK4a}$ 遺伝子の発現減少への関与は低いことが明らかになった。

以上の結果から、 $p16^{INK4a}$ プロモーター領域に実際に *EZH2* がリクルートされているか否かは今後更なる検討が必要であるが、SV-HUC-1 細胞におけるヒ素による $p16^{INK4a}$ 遺伝子の発現減少には、DNA メチル化ではなく、ヒストン修飾の関与が大きいことが明らかになった。また、ヒ素はヒストン修飾酵素に影響を及ぼす可能性が示唆された。

グローバルな低メチル化は、癌における代表的なエピジェネティック変化の一つである。我々は、一般的に入手可能な材料から安定同位体標識化合物 (サロゲート) を合成し、そのサロゲートを用いて LC/MS による 5meC の精密測定の手法を開発し、マウス肝臓において精度高く 5meC 量が測定可能なことを確認している (Nohara et al., 2011)。ヒ素曝露した SV-HUC-1 細胞においても、この手法によりグローバルな 5meC 量の精密測定をおこなった。しかしながら、安定したデータを得ることができなかった。DNA にメチル基を導入する酵素の一つである DNMT1 が結合するゲノム領域が、細胞周期により異なることが報告されている (Hervouet et al., 2012)。したがって、本手法を細胞株に使用する場合は細胞周期を正確に同期させることが必要であることが考えられた。

レトロトランスポゾン LINE1 の 2 種類のオープンリーディングフレーム (*ORF1* と *ORF2*) の遺伝子発現はプロモーター領域の DNA メチル化により調節されている。つまり、プロモーター領域が低メチル化状態であると、遺伝子発現が活性化する遺伝子である。LINE1 は全ゲノムの約 17% を占めるため、*ORF1* 及び *ORF2* プロモーター領域のメチル化レベルはゲノム全体のメチル化レベルの指標となると考えられている。そこで、ヒ素曝露した SV-HUC-1 細胞において、*ORF1* 及び *ORF2* の遺伝子発現を real time PCR で測定した。その結果、ヒ素曝露により *ORF1* は増加傾向にあり、*ORF2* は有意に増加していることが明らかになった。今後、バイサルファイトシークエンシングなどで *ORF1* 及び *ORF2* プロモーター領域の DNA メチル化を詳細に検討する必要があるが、ヒ素曝露した SV-HUC-1 細胞は、癌の代表的な DNA メチル化変化であるグローバ

ルな低メチル化状態になっている可能性が示唆された。

以上の結果から、ヒト尿路上皮細胞では、ヒ素によるエピジェネティック作用、特にH3K27トリメチル化の変化を介した*p16^{INK4a}*の発現減少が、ヒ素による発癌に関与している可能性が示唆された。

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3件)

(1) Suzuki T. and Nohara K., Long-term arsenic exposure induces histone H3 Lys9 dimethylation without altering DNA methylation in the promoter region of p16INK4a and down-regulates its expression in the liver of mice. J. Appl. Toxicol. (in press) DOI: 10.1002/jat.2765, 査読有

(2) Nohara K., Tateishi Y., Suzuki T., Okamura K., Murai H., Takumi S., Maekawa F., Nishimura N., Ito T., Late-onset increases in oxidative stress and other tumorigenic activities and tumors with a Ha-ras mutation in the liver of adult male C3H mice gestationally exposed to arsenic. Toxicol Sci. 2012, 129(2), 293-304. DOI: 10.1093/toxsci/kfs203, 査読有

(3) Maekawa F, Shimba S, Takumi S, Sano T, Suzuki T., Bao J, Ohwada M, Ehara T, Ogawa Y, Nohara K., Diurnal expression of Dnmt3b mRNA in mouse liver is regulated by feeding and hepatic clockwork. Epigenetics. 2012, 7(9), 1046-56. 査読有

URL:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22847467>

[学会発表] (計8件)

(1) 野原恵子, 鈴木武博, 岡村和幸, 内匠正太, 無機ヒ素による発がんへの変異とエピ変異の関与, 環境エピゲノミクス研究会第7回定例会, 2012年05月12日, 東京

(2) 鈴木武博, 山下聡, 内匠正太, 立石幸代, 佐野友春, 牛島俊和, 野原恵子, ヒ素によるマウス肝癌の網羅的DNAメチル化解析による領域特異的メチル化変化とFosb発現増加の検出, 第6回日本エピジェネティクス研究会年会, 2012年05月14日~2012年05月15日, 東京

(3) 野原恵子, 鈴木武博, 岡村和幸, 内匠正太, 前川文彦, 小堀真珠子, 胎児期ヒ素曝露によるC3Hマウス雄肝臓での脂質代謝変化とHa-ras変異をもった腫瘍の増加, 第1回日

本DOHaD研究会年会, 2012年08月04日, 東京

(4) 内匠正太, 青木康展, 佐野友春, 鈴木武博, 能美健彦, 野原恵子, gpt deltaマウスを用いた無機ヒ素によるin vivo突然変異解析, 日本環境変異原学会第41回大会, 2012年11月30日~2012年12月01日, 静岡

(5) 鈴木武博, 野原恵子, ヒ素によるFosb発現増加に関与するエピジェネティック修飾の検討, 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月11日~2012年12月14日, 福岡

(6) 野原恵子, 岡村和幸, 鈴木武博, 村井景, 新城恵子, 近藤 豊, C3Hマウスへの胎児期無機ヒ素曝露によるF1およびF2世代でのHa-ras変異をもった腫瘍の増加, 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月11日~2012年12月14日, 福岡

(7) 鈴木武博, 野原恵子, Fosb遺伝子発現調節における遺伝子領域内部DNAメチル化の関与の検討, 第83回日本衛生学会学術総会, 2013年03月25日~2013年03月26日, 金沢

(8) 野原恵子, 鈴木武博, 岡村和幸, 内匠正太, 無機ヒ素の胎児期曝露による後発的発癌増加の機序, 第83回日本衛生学会学術総会, 2013年03月25日~2013年03月26日, 金沢

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 武博 (SUZUKI TAKEHIRO)

独立行政法人国立環境研究所・

環境健康研究センター・主任研究員

研究者番号: 60425494

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし