

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25340052

研究課題名(和文)ヒ素誘導性皮膚癌発症メカニズムの解析と予知・予防法開発に向けた基礎研究

研究課題名(英文) Basic researches for analysis of mechanism and development of prediction and prevention on arsenic-mediated skin cancer

研究代表者

矢嶋 伊知朗 (Yajima, Ichiro)

名古屋大学・医学系研究科・講師

研究者番号：80469022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：全世界で2億人以上の人々がヒ素汚染された井戸水を飲用水として利用し、多くの人が皮膚癌や神経疾患を含む慢性ヒ素中毒を発症し、極めて重大な問題となっている。それにも関わらず、中毒の効果的な予知・予防、診断・治療法は全く確立しておらず、早急の確立が求められている。研究代表者らは Bangladesh のヒ素汚染地域におけるフィールドワーク及び研究室における実験研究により、胎盤増殖因子(Placenta Growth Factor, PIGF)が Bangladesh 在住のヒ素汚染水飲水者の尿で有意に上昇し、且つヒ素誘導性発癌に直接関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Since two hundred millions people are using arsenic-polluted well water for drinking, a large number of people develop arsenic poisoning including skin cancer and neural diseases. Although it is a vitally important problem in the world, there is no effective method for prediction, prevention, diagnosis and therapy. Our fieldwork analysis on arsenic-polluted area in Bangladesh and experimental analysis in our laboratory found that the amount of Placental Growth Factor (PIGF) protein was increased in urine of people who are drinking arsenic-polluted well water and also elucidated the mechanism of arsenic-mediated skin cancer development via PIGF.

研究分野：毒性学

キーワード：ヒ素 重金属 発癌 皮膚癌

1. 研究開始当初の背景

東アジアを中心に、管井戸と呼ばれる飲用井戸水の多くがヒ素を含む重金属で高濃度に汚染されており、世界で2億人以上の人々が飲用水として利用することでヒ素による長期暴露のリスクに晒されている。バングラデシュでは、2千500万人もの人々が慢性ヒ素中毒を発症していることが報告されている。慢性ヒ素中毒では皮膚癌や肺癌、肝障害や末梢神経障害など、人々の生命を脅かすレベルの病気が発症する。井戸水汚染による慢性ヒ素中毒は症状が重篤であり、世界的規模の問題でもあることから、研究代表者らを含め多くの研究者が慢性ヒ素中毒に関する研究を数多く行ってきた。にもかかわらず、予防や治療に効果的な発見はほとんど無く、予知・予防法や治療法に結びつく成果が待たれている

2. 研究の目的

研究代表者らは胎盤増殖因子(Placenta Growth Factor, PIGF)のヒ素誘導性発癌への関連性に着目した。本研究では、フィールドワークにより、バングラデシュ在住のヒ素汚染水飲水者の尿における PIGF タンパク質量とヒ素濃度の関連性や、ヒト培養細胞実験において、PIGF がヒ素誘導性発癌に直接関与している可能性について解析した。PIGF による慢性ヒ素中毒発症に関する疫学研究及びそのメカニズムを解明すると共に、PIGF を用いた慢性ヒ素中毒の予知・予防・診断への有用性を証明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)ヒト尿における PIGF タンパク質量とヒ素濃度の測定：バングラデシュ在住のヒ素汚染地域及び非汚染地域住人の尿中 PIGF 濃度及びヒ素濃度を定量した。PIGF は ELISA 法を用いて定量し、ヒ素濃度は ICP-MS を用いて定量した。ICP-MS による測定の前処理として、硝酸及び過酸化水素による灰化処理を実施し、フィルトレーション後に測定を行った。

(2)実験マウスへのヒ素飲水曝露による PIGF 発現量の変化に関する解析：これまでに実験動物を用いたヒ素飲水投与実験が数多く行われてきたが、その多くは実際の井戸水に含まれるヒ素濃度よりもはるかに高い濃度(10~1000倍)で研究が行われている。しかし、ヒトで実際に起きている現象を再現するためには、実際にヒトが飲水しているヒ素濃度に近い低濃度で飲水投与実験を行うことが不可欠である。本研究では、ヒ素汚染地域でヒトが実際に飲水するレベルのヒ素濃度での飲水投与実験を行い、ヒ素を飲水した場合にどのような組織、臓器、で PIGF 発現の変化が引き起こされるのかを明らかにするために、ヒ素飲水投与マウスの様々な臓器、組織における PIGF 量を定量した。マウスの各臓器を摘出、解剖後、PBS による洗浄を行った。

その後、4%PFA(パラホルムアルデヒド)/PBS 溶液による固定を 4°C、16時間行なった。その後パラフィン包埋を作成、組織切片を作成し、抗 PIGF 抗体を用いた組織免疫染色を行ない、PIGF 発現領域を特定した。その後 WINDROOF を用いて発現量(発色量)を定量し、ヒ素曝露マウスと非曝露マウス間の発現量の差を計測した。

(3)培養細胞を用いたヒ素曝露による PIGF 発現誘導解析：ヒ素による PIGF 発現誘導を *in vitro* にて解析するため、ヒト正常皮膚角化細胞株(HaCaT)を用いた発現解析を実施した。ヒ素への HaCaT 細胞株曝露は、0、1、10 µM 濃度で実施した。PIGF mRNA、細胞内 PIGF タンパク質、分泌された PIGF タンパク質それぞれを定量した。mRNA については cDNA 合成後、Realtime PCR 法によって定量し、細胞内 PIGF タンパク質量はウェスタンブロット法によって定量した。分泌された PIGF タンパク質は、培養液を用いた ELISA 法により定量を行った。

(4)培養細胞を用いたヒ素誘導性コロニー形成活性(発癌活性)解析：ヒ素による皮膚癌誘導を *in vitro* にて解析するため、ヒト正常皮膚角化細胞株(HaCaT)を用いたコロニー形成アッセイを実施した。非接着性 24-well 培養プレートに HaCaT 細胞を播種し、細胞へのヒ素曝露後直径 50µm 以上のコロニー数を計測し、比較検討を行なった。

(5)発癌関連シグナル伝達経路の解析：PIGF がレセプターである VEGFR1 又は VEGFR2 に結合後、どのような細胞内シグナル分子を活性化しているかを明らかにするため、様々な癌関連シグナル分子の活性化をウェスタンブロット法にて解析した。VEGFR1、VEGFR2、MEK、ERK、PI3K、AKT、FAK の活性化(リン酸化)レベルを測定した。

(6)siRNA ノックダウン法を用いたヒ素誘導性皮膚癌発症における PIGF 機能解析：PIGF の機能阻害を行うため、PIGF に対する siRNA をデザインし、HaCaT 細胞へトランスフェクションを行った。siRNA はコントロール用 siRNA 以外に、PIGF 特異的 siRNA を2種類用意した。siRNA による特異的 PIGF 発現低下をウェスタンブロット法にて確認後、PIGF ノックダウン HaCaT 細胞をヒ素に曝露し、コロニー形成活性を測定した。また、発癌関連分子シグナル経路である MEK/ERK や PI3K/AKT シグナルの活性化、PIGF のレセプターである VEGFR1 の活性化等をウェスタンブロット法にて解析した。

4. 研究成果

(1)ヒトにおけるヒ素曝露と PIGF 発現の関連性：バングラデシュ在住のヒ素汚染地域及び非汚染地域住人の尿中 PIGF 濃度及びヒ素濃

度を定量した結果、ヒ素汚染地域住人の尿では、非汚染地域住人の尿と比較してヒ素濃度が有意に高いだけでなく、PIGF タンパク質濃度も有意に上昇していることが明らかとなった。この結果は、ヒ素曝露と PIGF 発現に関連性があることを示していると共に、PIGF 量を尿サンプルにおいて測定可能であることを示している。

(2)実験マウスにおけるヒ素曝露による PIGF 発現変化：2 ヶ月間のヒ素飲水曝露の結果、マウス皮膚上皮組織において PIGF タンパク質発現が強く誘導されていることが組織免疫染色によって明らかとなった。この結果は、ヒトの疫学データと合わせてヒ素飲水曝露が皮膚における PIGF 発現誘導を活性化していることを示している。

(3)培養細胞におけるヒ素誘導性 PIGF 発現：ヒト正常角化細胞株(HaCaT)のヒ素への曝露は、PIGF mRNA、PIGF タンパク質の発現及び分泌を強く活性化した。また、その発現量はヒト皮膚扁平上皮癌細胞株(A431)が発現するレベルと同等にまで上昇していた。ヒ素曝露後3時間で発現量のピークを迎え、その後徐々に減少するが、曝露前のレベルまでは減少せず、一定の高発現レベルを維持していたことから、ヒ素曝露による PIGF 発現は一過性のものでなく、持続的に発現誘導されることを示している。これらの結果は、ヒト皮膚角化細胞ではヒ素が直接作用し PIGF 発現を活性化していることを示唆している。

(4)ヒ素誘導性発癌における PIGF の関連性：HaCaT のヒ素への曝露はコロニー形成活性(発癌活性)を有意に上昇させる。我々はこの発癌活性における PIGF の機能的な関与を明らかにするため、siRNA 導入による PIGF ノックダウンを行なった。その結果、PIGF ノックダウン HaCaT 細胞ではヒ素曝露によるコロニー形成が強く抑制され、ヒ素誘導性皮膚癌発症に PIGF が機能的に関与している可能性が示された。

(5)PIGF を介したヒ素誘導性皮膚癌発症に関与する細胞内シグナル経路：ヒ素曝露によって発現誘導された PIGF が、発癌にどのように関与しているかを明らかにするため、皮膚癌発症に関連するシグナル伝達経路である MEK/ERK 経路及び PI3K/AKT/FAK 経路の活性化レベルを解析した。HaCaT 細胞においてヒ素曝露はレセプターである VEGFR1 を活性化した後、MEK/ERK 経路を活性化し、PI3K/AKT/FAK 経路は活性化しないことが明らかとなった。また、PIGF にはもう一つ VEGFR2 レセプターが存在するが、角化細胞ではほとんど発現していないことが明らかとなった。この結果は、皮膚における発癌では、PIGF/VEGFR1 シグナルが主な経路であることを示している。また、siRNA による PIGF ノックダウン HaCaT 細胞で

はヒ素曝露によって MEK/ERK 経路が活性化しなかったことから、ヒ素曝露による PIGF 発現活性化は VEGFR1/MEK/ERK シグナル経路を介して発癌を誘導していることが示された。

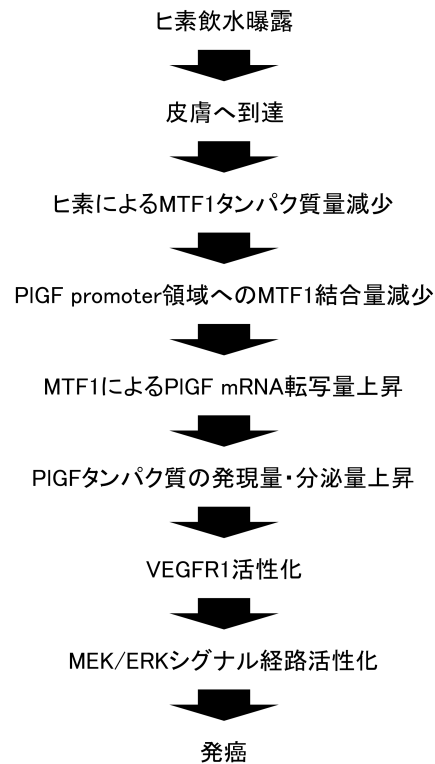


図1:PIGFを介したヒ素誘導性皮膚癌発症メカニズム

(6)ヒ素曝露による MTF1 タンパク質の分解作用：今回の研究により、ヒ素曝露による皮膚癌発症は、PIGF 発現上昇と、その後続く発癌関連シグナル伝達経路の活性化によって誘発されることが明らかとなったが、ヒ素による PIGF 発現活性化機構が未だ不明のままである。これまでの研究から、PIGF 遺伝子座の 5' プロモーター領域には転写因子の1つである MTF1 が結合し、PIGF mRNA の転写を制御していることが明らかとなっている。本研究において、HaCaT 細胞のヒ素曝露後の MTF1 タンパク質量を測定した結果、そのタンパク質量は減少しており、プロテアソーム依存的な分解作用を受けていることが明らかとなった。また、ヒ素曝露時の MTF1 タンパク質の PIGF 遺伝子座プロモーター領域への結合量を ChIP アッセイ法により測定したところ、ヒ素曝露によって MTF1 タンパク質の PIGF プロモーター領域への結合量は有意に減少していることが明らかとなった。さらには、HaCaT 細胞において siRNA トランスフェクションによる MTF1 発現抑制を実施した結果、PIGF mRNA が強力に発現上昇していることも明らかとなった。これらの結果は、通常 MTF1 タンパク質は PIGF プロモーター領域に結合することでその発現量を抑制しているが、ヒ素曝露は MTF1 タンパク質をプロテアソーム依存的に分解することで、結果として PIGF 発現量を上昇させていることが明らかとな

った。

(7)今回の研究成果はこれまでほとんど明らかとなっていなかった、ヒ素による皮膚癌発症のメカニズム、特に PIGF がヒ素によって発現誘導され、VEGFR1/MEK/ERK シグナル経路を介して発癌を誘導していることが明らかとなった。本研究ではヒトの尿においてヒ素濃度と PIGF 濃度が有意に関連性があることを明らかにしており、尿を用いた PIGF 及びヒ素濃度の測定によって発癌リスクを予知できる可能性を示している。また、PIGF が機能的にヒ素誘導性皮膚癌発症に強く関連していることから、PIGF を標的とした新たな治療薬・予防薬の開発にも将来的には寄与するものと考えられる。

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 15 件)

Yajima, I., Kumasaka, M. Y., Ohnuma, S., Ohgami, N., Naito, H., Shekhar, H. U., Omata, Y. and Kato, M. (2015). "Arsenite-Mediated Promotion of Anchorage-Independent Growth of HaCaT Cells through Placental Growth Factor." *J Invest Dermatol* 135(4): 1147-1156. 査読有り.

矢嶋伊知朗, Cunchao ZOU, Xiang LI, 中野千尋, 小又 耐広, 熊坂真由子 (2015) "フィールドワーク研究と実験研究を基にした重金属によって誘発された疾患の機構解明と浄化法の開発" *日本衛生学雑誌* 70, 105-109. 査読有り.

Thang, N. D., Yajima, I., Ohnuma, S., Ohgami, N., Kumasaka, M. Y., Ichihara, G. and Kato, M. (2015). "Enhanced constitutive invasion activity in human nontumorigenic keratinocytes exposed to a low level of barium for a long time." *Environ Toxicol* 30(2): 161-167. 査読有り.

Thang, N. D., Yajima, I., Kumasaka, M. Y., Iida, M., Suzuki, T. and Kato, M. (2015). "Deltex-3-like (DTX3L) stimulates metastasis of melanoma through FAK/PI3K/AKT but not MEK/ERK pathway." *Oncotarget* 6(16): 14290-14299. 査読有り.

Kumasaka, M. Y., Yajima, I., Iida, M., Takahashi, H., Inoue, Y., Fukushima, S., Ihn, H., Takeda, K., Naito, Y., Yoshikawa, T. and Kato, M. (2015). "Correlated expression levels of

endothelin receptor B and Plexin C1 in melanoma." *Am J Cancer Res* 5(3): 1117-1123. 査読有り.

Iida, M., Omata, Y., Nakano, C., Yajima, I., Tsuzuki, T., Ishikawa, K., Hori, M. and Kato, M. (2015). "Decreased expression levels of cell cycle regulators and matrix metalloproteinases in melanoma from RET-transgenic mice by single irradiation of non-equilibrium atmospheric pressure plasmas." *Int J Clin Exp Pathol* 8(8): 9326-9331. 査読有り.

Yanagishita, T., Yajima, I., Kumasaka, M., Kawamoto, Y., Tsuzuki, T., Matsumoto, Y., Watanabe, D. and Kato, M. (2014). "Actin-binding protein, Espin: a novel metastatic regulator for melanoma." *Mol Cancer Res* 12(3): 440-446. 査読有り.

Yajima, I., Iida, M., Kumasaka, M. Y., Omata, Y., Ohgami, N., Chang, J., Ichihara, S., Hori, M. and Kato, M. (2014). "Non-equilibrium atmospheric pressure plasmas modulate cell cycle-related gene expressions in melanocytic tumors of RET-transgenic mice." *Exp Dermatol* 23(6): 424-425. 査読有り.

Thang, N. D., Yajima, I., Kumasaka, M. Y. and Kato, M. (2014). "Bidirectional functions of arsenic as a carcinogen and an anti-cancer agent in human squamous cell carcinoma." *PLoS One* 9(5): e96945. 査読有り.

Kumasaka, M. Y., Yajima, I., Ohgami, N., Naito, H., Omata, Y. and Kato, M. (2014). "Commentary to Krishna et al. (2014): Brain deposition and neurotoxicity of manganese in adult mice exposed via the drinking water." *Arch Toxicol* 88(5): 1185-1186. 査読有り.

Iida, M., Yajima, I., Ohgami, N., Tamura, H., Takeda, K., Ichihara, S., Hori, M. and Kato, M. (2014). "The effects of non-thermal atmospheric pressure plasma irradiation on expression levels of matrix metalloproteinases in benign melanocytic tumors in RET-transgenic mice." *Eur J Dermatol* 24(3): 392-394.

査読有り.

〔学会発表〕(計1件)

矢嶋伊知朗 (2015) 「実験研究を基にした重金属誘導性疾患の機構解明と予防法の開発」 第84回日本衛生学会学術総会 シンポジウム1 平成26年5月26日 岡山コンベンションセンター (岡山県・岡山市)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/hygiene/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

矢嶋 伊知朗 (YAJIMA, Ichiro)
名古屋大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：80469022

(2)研究分担者

武田 湖州恵 (TAKEDA, Kozue)
中部大学・生命健康科学部・准教授
研究者番号：80345884

(3)連携研究者

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