

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：47704

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860445

研究課題名(和文)ヒ素によるコレステロール代謝異常誘発メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of the effect of arsenic on the cholesterol metabolism

研究代表者

内匠 正太(Takumi, Shota)

鹿児島女子短期大学・その他部局等・准教授

研究者番号：80570770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、ヒ素曝露による循環器疾患の発症リスクが増大することが報告されている。そこで本研究では、循環器疾患のリスク要因の一つである血中高密度リポタンパク質(HDL)の低下に着目した。HDLは肝臓のATP-binding cassette transporter-A1 (ABCA1)を介して主に産生されることから、肝臓由来の培養細胞を用いヒ素がABCA1の発現に及ぼす影響について解析を行った。その結果、ヒ素により、ABCA1の有意な発現抑制が認められたと同時に、細胞内コレステロールの蓄積が認められた。このことから、ヒ素曝露によるABCA1の発現抑制がコレステロール代謝の異常に關与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recent epidemiological studies suggest that arsenic exposure involved in atherosclerosis. In this study, we focused on the effect of arsenic on the cholesterol metabolism by using Hepa1c1c7 and HepG2 cells. The gene expression and Western Blot analysis showed that arsenic suppress the expression of ATP-binding cassette transporter-A1 (ABCA1) which involved in HDL biogenesis. Furthermore, arsenic induced the accumulation of cellular cholesterol. These results suggest that arsenic disrupt the cholesterol efflux through the inhibition of the expression of ABCA1.

研究分野：衛生学

キーワード：ヒ素 ABCA1 コレステロール

1. 研究開始当初の背景

無機ヒ素(ヒ素)は、バングラデシュ、台湾やインドなど東南アジアをはじめ世界各国で、地質から井戸水への混入を介して住民に深刻な健康被害をもたらし、大きな環境汚染問題となっている。近年の疫学研究から慢性的なヒ素曝露によってアテローム性動脈硬化症などの心疾患や高血圧症の発症リスクが増大することが示されているがその分子機序については未だ不明な点が多い。

動脈硬化症のリスク要因の一つには血中高密度リポタンパク質(HDL)の低下が挙げられ、近年バングラデシュのヒ素汚染地域における血中HDLの低下が報告されている(Karim et al., Toxicol. Sci., 2013)。HDLは肝臓のATP-binding cassette transporter-A1(ABCA1)を介して主に産生され、肝臓特異的ABCA1欠損マウスでは血中HDLが80%低下することが報告されている(Timmins et al., J. Clin. Invest., 2005)。HDLはコレステロールの分解能を持たない末梢細胞表面からの余剰コレステロールの引き抜きと、コレステロールの胆汁酸への転換排出の場である肝臓への輸送を促進する役割を担っている。血中HDLの低下は、末梢細胞でのコレステロールの蓄積を引き起こし、血管壁におけるマクロファージの泡沫化を介して動脈硬化の引き金となることが知られているが、ヒ素がHDL産生の責任分子であるABCA1の発現に及ぼす影響については未だ十分に理解されていない。

2. 研究の目的

本研究ではコレステロール代謝の主要な臓器である肝臓に着目し、ヒ素曝露によるコレステロール代謝異常のメカニズムを明らかにすることを目的とする。具体的には、動脈硬化症の危険因子の一つであるHDLの低下にヒ素がどの様に関与しているか、HDL産生の責任分子であるATP-binding cassette transporter-A1(ABCA1)の発現への影響を中心に解析を行った。

3. 研究の方法

本研究では、HDL産生の主要な臓器である肝臓に着目したことから、マウス肝がん由来細胞株であるHepa1c1c7細胞及びヒト肝がん由来細胞株であるHepG2細胞を用いて、以下のような手法を用いて研究を行った。

(1) MTT assay

Hepa1c1c7またはHepG2細胞をプレートに播種し、24時間培養した後、ヒ素を曝露した。3日間インキュベートした後、3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)

-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide(MTT)を添加し、3時間インキュベーション後、細胞内脱水素酵素活性により生成したホルマザン量を相対比較し、細胞の生存率を指標にヒ素に対する感受性を評価した。

(2) リアルタイム RT-PCR

ヒ素曝露した細胞からセパゾールを用いてtotal RNAを抽出し、抽出したRNAからReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO)を用いcDNAを調製した。調製したcDNAを用い、StepOne™リアルタイムPCRシステムにより各遺伝子の発現を解析した。内部標準遺伝子には、CPBを用いた。

(3) 細胞内コレステロールの蛍光観察

細胞を一晩培養後、ヒ素及びコレステロールの輸送阻害剤であるU-18666A(1.25 μM)を添加し、3日間培養した細胞に、Cell-Based Assay Fixative Solutionを添加し、固定した後、Wash Bufferで洗浄後、Filipin solutionを添加し、暗所で60分静置した。Wash Bufferで洗浄後、蛍光顕微鏡で観察を行った。

(4) 細胞内コレステロール値の定量

細胞を一晩培養後、ヒ素及び亜鉛を添加し、3日間培養した細胞を氷冷PBSで洗浄後、hexane:isopropanol(3:2)を1ml添加し、1時間攪拌抽出した溶液を遠心エバポレーターを用い乾固した。乾固したサンプル中のコレステロール値を、LabAssay Cholesterol kit(Wako)により測定した。また、コレステロール抽出後のplateに0.2N NaOHを1.4ml添加し、37℃、3時間インキュベーション後、Bradford法によりタンパク質定量を行い、cholesterol(mg/mg protein)を算出した。

4. 研究成果

(1) ヒ素がABCA1の発現に及ぼす影響

本研究では、HDL産生の主要な臓器である肝臓に着目し、マウス肝がん由来細胞であるHepa1c1c7細胞及びヒト肝がん由来細胞であるHepG2細胞を対象とした解析を行った。まず、ヒ素への感受性を評価するために、MTT assayを各細胞に対して行った。その結果、ヒ素に対する感受性が細胞により大きく異なり、Hepa1c1c7細胞の方がHepG2細胞より高い感受性を示すことが明らかとなった(図1)。

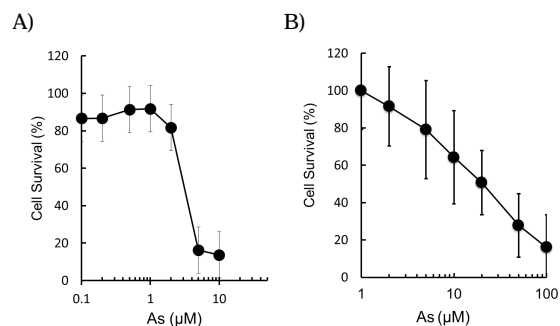


図1 Hepa1c1c7細胞(A)及びHepG2細胞(B)のヒ素(As)に対する感受性

この感受性の違いは、HepG2細胞が

Hepa1c1c7 細胞に比べ、ヒ素の解毒又は排泄経路の活性が高いことが原因と推測されるが、具体的にどのようなメカニズムによりヒ素に対して耐性を示しているのかについては、本研究では解析対象としていないが、ヒ素の解毒機構を知る上で、興味深い結果であり、今後更なる解析が必要と考えられた。

次に、ヒ素曝露が Hepa1c1c7 細胞の Abca1 のタンパク質発現に及ぼす影響を解析した。その結果、ヒ素濃度依存的な発現抑制が認められた。一方、LXR の合成リガンドである T0901317 では、Abca1 の顕著な発現増加が認められた (図 2)。

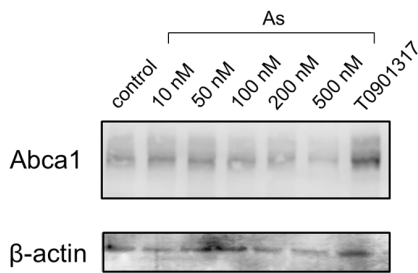


図 2 ヒ素(As)曝露による Abca1 タンパク質発現量の変化

更に、ヒ素曝露による Abca1 の発現抑制が認められたことから、細胞内コレステロールの蛍光観察を行った。その結果、対照群に比べ、ヒ素曝露群ではコレステロールの蓄積が認められた (図 3)。細胞内コレステロールの輸送阻害剤である U-18666A は、ポジティブコントロールとして用いた。

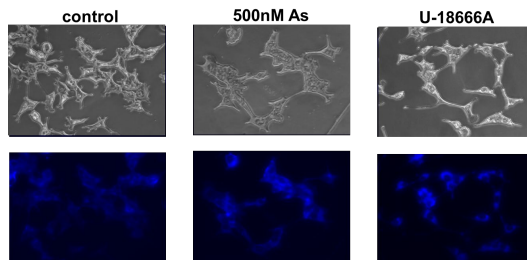


図 3 ヒ素曝露による細胞内コレステロールの蓄積 (下段)

また、細胞内コレステロール値の定量を行った結果、ヒ素濃度依存的な細胞内コレステロール値の増加が認められた (図 4)。

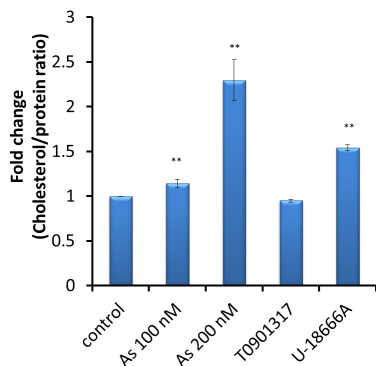


図 4 ヒ素(As)曝露による細胞内コレステロール値の変化

このことから、ヒ素曝露による細胞内コレステロールの蓄積に Abca1 の発現抑制が関与していることが示唆された。これまでに、マクロファージ等の末梢細胞を用いた研究では、ヒ素曝露による Abca1 の発現抑制が報告されていたが、今回の結果から HDL 産生の主要な臓器である肝臓においても、ヒ素曝露による Abca1 の発現抑制が起きている可能性が示唆された。我々の先行研究では、実際にヒ素曝露を行った *gpt delta* マウスの肝臓で Abca1 の遺伝子発現の抑制が認められており、ヒ素曝露による肝臓の Abca1 の発現抑制が動脈硬化症のリスク要因の一つである HDL 産生の低下を引き起こす可能性が示唆された。

一方、胆汁酸及びヒ素の排泄に關与する Mrp2 は、ヒ素濃度依存的な発現誘導が遺伝子レベルで認められた。また、Abca1 の発現制御を担う LXR の遺伝子発現を解析した結果、ヒ素曝露により抑制傾向にあったが、有意差はなくタンパク質レベルでの解析で差は認められなかった。ヒ素曝露による Abca1 の発現抑制機構については、今後も更に詳細な解析を行う予定である。

(2) 亜鉛の影響

次に、本研究では、ABCA1 をはじめとしたコレステロール代謝関連遺伝子の発現を制御する核内受容体 LXR 内に存在する Zn フィンガードメインに着目した。これまでに、LXR と類似の Zn フィンガードメイン構造を持つ DNA 修復酵素 PARP1 の Zn フィンガードメインにヒ素が結合し、DNA 修復活性を阻害することが報告されている (Zhou et al., J. Biol. Chem., 2011)。このことから、ヒ素による LXR の転写活性化阻害の可能性を検討する目的で、ヒ素による遺伝子発現抑制が認められた遺伝子の発現が、亜鉛添加により回復するかどうか HepG2 細胞を用い検討を行った。

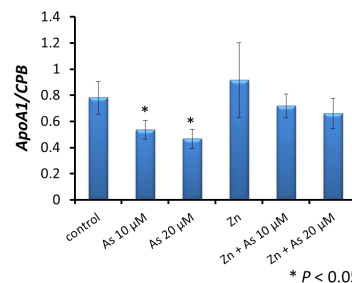
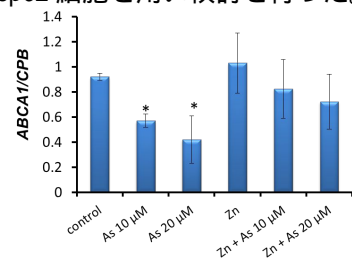


図 5 ヒ素 (As) と亜鉛 (Zn) の共曝露による遺伝子発現への影響

その結果、ヒ素による有意な遺伝子発現抑制が認められた ABCA1 及び ApoA1 の遺伝子発

現、亜鉛を添加することで回復傾向にあり、対照群及び亜鉛単独曝露群に比べてヒ素、亜鉛共曝露群で有意差は認められなかった(図5)。一方、タンパク質レベルの解析では、亜鉛添加による効果は認められなかった(図6)。

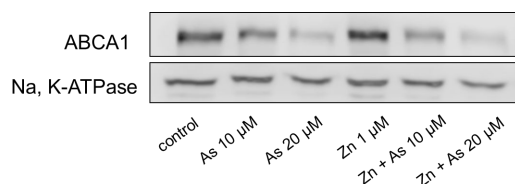


図6 ヒ素 (As) と亜鉛 (Zn) の共曝露によるタンパク質発現への影響

以上の結果から、亜鉛添加により、遺伝子レベルでの発現抑制は抑えられる可能性が示されたが、タンパク質レベルでの発現抑制には、ヒ素によるタンパク質分解経路の活性化や miRNA 等の影響が関与することが推測された。

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10件)

Nohara K, Suzuki T, Okamura K, Matsushita J, Takumi S. Tumor-augmenting effects of gestational arsenic exposure on F1 and F2 in mice. *Genes Environ.* 査読有. 39:2017. doi: 10.1186/s41021-016-0069-1.

Suzuki T, Takumi S, Okamura K, Nohara K. Biological effects of arsenic and diseases: The mechanisms involved in arsenic-induced carcinogenesis. *Nihon Rinsho.* 査読無. 2016. 74:1207-1213.

Funahashi A, Komatsu M, Furukawa T, Yoshizono Y, Yoshizono H, Orikawa Y, Takumi S, Shiozaki K, Hayashi S, Kaminishi Y, Itakura T. Eel green fluorescent protein is associated with resistance to oxidative stress. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 査読有. 2016. 181-182:35-39. doi: 10.1016/j.cbpc.2015.12.009.

Ikema S, Takumi S, Maeda Y, Kurimoto T, Bohda S, Chigwechokha PK, Sugiyama Y, Shiozaki K, Furukawa T, Komatsu M. Okadaic acid is taken-up into the cells mediated by human hepatocytes transporter OATP1B3. *Food Chem Toxicol.* 査読有. 2015. 83:229-236.

doi: 10.1016/j.fct.2015.06.006.

Nohara K, Okamura K, Suzuki T, Murai H, Ito T, Shinjo K, Takumi S, Michikawa T, Kondo Y, Hata K. Augmenting effects of gestational arsenite exposure of C3H mice on the hepatic tumors of the F₂ male offspring via the F₁ male offspring. *J Appl Toxicol.* 査読有. 2016. 36:105-112. doi: 10.1002/jat.3149.

Takumi S, Ikema S, Hanyu T, Shima Y, Kurimoto T, Shiozaki K, Sugiyama Y, Park HD, Ando S, Furukawa T, Komatsu M. Naringin attenuates the cytotoxicity of hepatotoxin microcystin-LR by the curious mechanisms to OATP1B1- and OATP1B3-expressing cells. *Environ Toxicol Pharmacol.* 査読有. 2015. 39:974-981. doi: 10.1016/j.etap.2015.02.021.

Takumi S, Okamura K, Yanagisawa H, Sano T, Kobayashi Y, Nohara K. The effect of a methyl-deficient diet on the global DNA methylation and the DNA methylation regulatory pathways. *J Appl Toxicol.* 査読有. 2015. 35:1550-1556. doi: 10.1002/jat.3117.

Inokuchi A, Yamamoto R, Morita F, Takumi S, Matsusaki H, Ishibashi H, Tominaga N, Arizono K. Effects of lithium on growth, maturation, reproduction and gene expression in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Appl Toxicol.* 査読有. 2015. 35:999-1006. doi: 10.1002/jat.3058.

Takano H, Takumi S, Ikema S, Mizoue N, Hotta Y, Shiozaki K, Sugiyama Y, Furukawa T, Komatsu M. Microcystin-LR induces anoikis resistance to the hepatocyte uptake transporter OATP1B3-expressing cell lines. *Toxicology.* 査読有. 2014. 326:53-61. doi: 10.1016/j.tox.2014.10.003.

Nohara K, Suzuki T, Takumi S, Okamura K. Increase in incidence of hepatic tumors caused by oncogenic somatic mutation in mice maternally exposed to inorganic arsenic and the multigenerational and transgenerational effects of inorganic arsenic. *Nihon Eiseigaku Zasshi.* 査読無. 2014. 69:92-36.

〔学会発表〕(計4件)

内匠正太、山下優香、小松正治、柳澤裕之・ヒ素曝露による細胞内コレステロールの蓄積・第87回日本衛生学会学術総会、2017年3月27日、フェニックス・シーガイア・リゾート(宮崎)

内匠正太、小松正治、柳澤裕之・ヒ素がコレステロール代謝に及ぼす影響・第86回日本衛生学会学術総会、2016年5月11~13日、旭川市民文化会館(旭川)

S. Takumi, K. Okamura, T. Suzuki, H. Hano, K. Nohara and H. Yanagisawa. Gestational arsenic exposure affects gene expression in the kidney and lung in the F1 and F2 mice. Society of Toxicology, 2015年3月25日、San Diego Convention Center, 米国

内匠正太、岡村和幸、鈴木武博、羽野寛、野原恵子、柳澤裕之・C3Hマウス胎児期ヒ素曝露が次世代に及ぼす影響・第25回日本微量元素学会学術集会、2014年7月3日、岡山大学創立五十周年記念館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内匠 正太 (TAKUMI, Shota)

鹿児島女子短期大学・生活科学科・准教

授

研究者番号：80570770

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし