

「第19回日本臨床環境医学会学術集会シンポジウム」 (臨床環境19: 66~71, 2010)

無機ヒ素の胎児期曝露による ジェネティック/エピジェネティック変化

野原 恵子

国立環境研究所環境健康研究領域分子細胞毒性研究室

Maternal exposure to inorganic arsenic and genetic/epigenetic changes

Keiko Nohara

Environmental Health Sciences Division, National Institute for Environmental Sciences

要約

ヒ素化合物は古くから現在まで、農業や工業・医薬に利用されているが、一方で発癌をはじめとするさまざまな健康被害をもたらしている。無機ヒ素の作用機序として、各種シグナル伝達系や、また NF- κ B、Nrf2、E2F などの転写因子の活性変化を介して、遺伝子発現の変化を誘導することが明らかとなっている。一方近年、無機ヒ素がグローバルな DNA メチル化変化や遺伝子領域特異的な DNA メチル化変化を中心としたエピジェネティックな変化を誘導し、遺伝子発現変化をおこすことが報告されている。特に胎児期曝露の影響機序として、エピジェネティクスが重要な役割を果たすことが示唆されている。無機ヒ素によるエピジェネティック変化誘導の機序に関してはさらなる研究が必要であるが、従来のシグナル伝達系や転写因子への影響に、「エピジェネティックな作用」を考え合わせることによって、無機ヒ素の作用機序の研究は新たな展開を迎えようとしている。

《キーワード》無機ヒ素、エピジェネティクス、転写因子、胎児期曝露

Abstract

Inorganic arsenic, a carcinogen, is currently the source of one of the most serious concerns among environmental health issues. Arsenic is known to induce transcriptional changes by affecting various signal transduction pathways and transcription factors, including NF- κ B, Nrf2, and E2F. Additionally, recent studies have illuminated the importance of “epigenetics” as another mechanism to regulate transcription. Arsenic has been reported to induce epigenetic changes, such as global DNA methylation changes and gene-specific DNA methylation changes. Particularly, epigenetic changes are suggested to be deeply involved in the effects of maternal exposure to arsenic. Further studies

別刷請求宛先：野原恵子

〒305-8506 つくば市小野川16-2 国立環境研究所環境健康研究領域

Reprint Requests to Keiko Nohara, Environmental Health Sciences Division, National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506, Japan

from the integrated view of signal transduction pathways, transcription factors, as well as “epigenetics”, will greatly advance our understanding of the mechanism of arsenic toxicity.

《Key words》 inorganic arsenic, epigenetics, transcription factor, maternal exposure

I. 無機ヒ素の生体影響・健康被害^{1,2)}

ヒ素化合物は古くからその生物毒性を利用して各種農薬や木材防腐剤などの原料として多用され、現在では液晶基板ガラスの製造における清澄剤や半導体合成の原料として使用されている。また、解毒剤や抗炎症剤として製剤に配合され使用された歴史があり、現在でも三酸化二ヒ素が急性骨髄性白血病の治療薬として使われている。

環境中のヒ素汚染としては、自然起源の他、過去に使われたヒ素化合物系農薬や防腐剤等を起源とするもの、火力発電、金属精錬などの人為起源のものなどがある。

近年、地質由来の無機ヒ素が混入した井戸水の利用による慢性無機ヒ素中毒が、インド、バングラデッシュ、中国などのアジア諸国や中南米をはじめとした世界各国で発生し、患者数は数千万人にのぼるともいわれ、深刻な環境問題となっている。主な症状は色素沈着・脱失と角化症で、また皮膚癌をはじめとする癌の発症が認められている。近年の疫学研究では2型糖尿病との関連も報告されている。

また職業曝露や動物実験からは、皮膚症状や発癌のほか、無機ヒ素による免疫抑制や神経系、循環器系の障害などが報告されている。

II. 無機ヒ素の転写因子を介した作用

無機ヒ素の作用機序の一つに、活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) を生成し、その結果各種シグナル伝達系や転写因子を活性化または抑制するという経路が明らかにされている³⁾。酸化ストレス防御機構に重要な役割を果たす転写因子 Nrf2の活性化や、分化・増殖・アポトーシスなど広範な反応に関連する転写因子 AP-1の活性化、NF- κ Bの活性抑制が、無機ヒ素によるROS産生によって誘導される³⁾。その結果、遺伝子発現が変化し、毒性が発現すると考えられる。

上述したように、無機ヒ素は発癌性をもつとともに、血液細胞の癌に対しては抗癌作用を示し、細胞の種類によってその作用が大きく異なっている。著者らは、無機ヒ素の免疫毒性作用をトキシコゲノミクスを利用して検討した結果、無機ヒ素が免疫細胞において細胞周期を調節する転写因子である E2F ファミリーに影響を与え、細胞増殖を抑制することを明らかにした^{4,5)}。すなわち、C57BL/6マウスに胸腺萎縮を誘導する用量の無機ヒ素 (亜ヒ酸ナトリウム) を投与し、24時間後の胸腺での遺伝子発現変化をマイクロアレイ (Affymetrix GeneChip) で解析した。その結果、E2F1をはじめとする E2F ファミリーによって転写制御を受け、細胞周期進行に関連する遺伝子群の発現が、無機ヒ素曝露で低下していることがみつけた (図1)。これらの細胞周期関連遺伝子群の発現低下は、免疫臓器である胸腺や脾臓で観察され、肝臓、腎臓、肺等の臓器では観察されなかった。さらに無機ヒ素による免疫細胞への作用メカニズムを明らかにするために、免疫系細胞株での検討を行った。Bリンパ球細胞株 A20細胞を亜ヒ酸ナトリウム存在下24時間培養すると、胸腺への無機ヒ素曝露でみられたのと同様に細胞周期関連遺伝子群の発現低下が観察され、同時に細胞増殖が抑制された。細胞周期の検討では無機ヒ素曝露によって G1期および G2/M 期にある細胞の割合がヒ素無添加の細胞に比べて増加することが示され、アポトーシスの増加は検出されなかった。また無機ヒ素曝露した細胞では、発現低下した遺伝子の E2F 結合領域において、細胞周期進行に参与する E2F1の結合低下と細胞周期抑制に参与する E2F4の結合上昇が観察された。以上の結果から、無機ヒ素が E2F ファミリータンパクを介して細胞周期進行を抑制することによって細胞増殖を抑制するという新たな作用経路が明らかとなった⁵⁾。

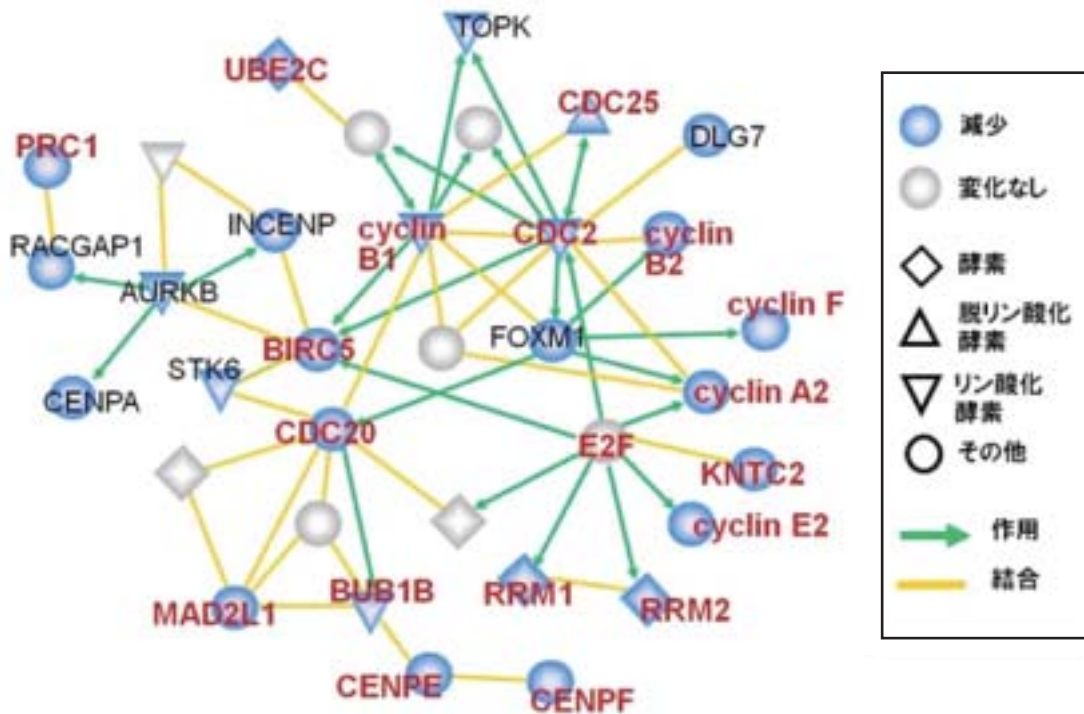


図1 無機ヒ素曝露によってマウス胸腺で発現が低下した遺伝子群ネットワーク (文献5より転載)。

赤字は細胞周期に関連する遺伝子⁴⁾。

Ⅲ. 無機ヒ素のエピジェネティクスを介した作用

上述の転写因子の作用はDNAの塩基配列に依存しており、転写因子による遺伝子発現制御は従来の遺伝学(ジェネティクス)が発展した分子遺伝学の考え方に基づいている。これに対して、近年、塩基配列に依存しない遺伝子機能の調節機構である「エピジェネティクス」の重要性が注目されている。エピ(epi-)は「外」や「追加」といった意味を持つ接頭語である。具体的には、遺伝子発現の調節が、主としてDNAのCpGという塩基配列のシトシン5位へのメチル化修飾(5メチルシトシン修飾)や、DNAが巻きついているヒストンタンパク中の特定のリジン残基へのメチル化、アセチル化修飾などの、いわゆるエピジェネティック修飾によって行われるという仕組みである(図2)。

グローバルなDNAの低メチル化、すなわち全体的な5メチルシトシン量の減少はゲノムを不安定化し、癌などの疾患につながると考えられている^{6,7)}。また、遺伝子のプロモーター領域の高メチル化は遺伝子発現を抑制する^{6,7)}。各種ヒストン修飾はそれぞれ遺伝子発現を促進または抑制することが明らかにされている。

無機ヒ素は生体内でメチル化されるが、その際にDNAメチル化におけるメチル基供与体でもあるS-adenosylmethionine (SAM)がメチル基を供与する。このことから、無機ヒ素によるSAMの消費がグローバルなDNAメチル化低下につながるという仮説が提案されている⁸⁾。このDNAの低メチル化が癌につながる可能性が考えられる。そこで著者らはこの仮説を検証するために、5-methyldeoxycytidine (5medC)の安定同位体標識化合物を合成し、DNA中のdeoxycytidine

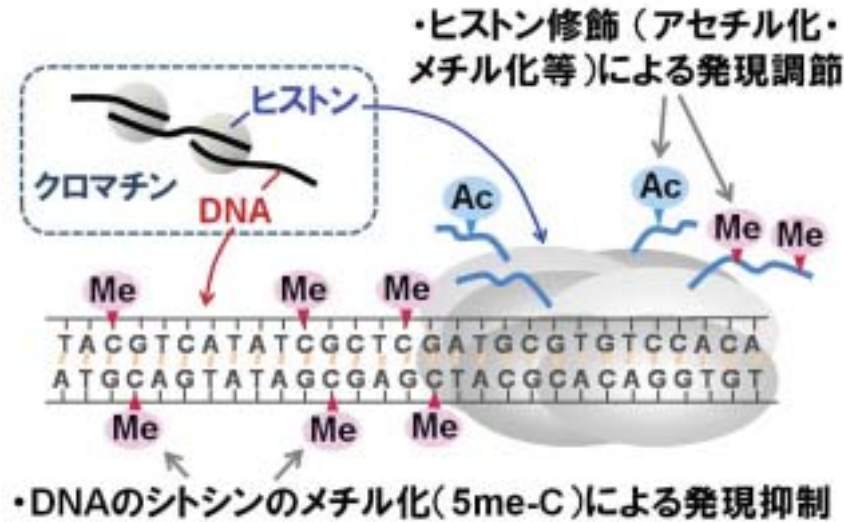


図2 エピジェネティクスによる遺伝子発現の調節機序。

(dC) と5meC の比を LC/ESI-MS によって精密測定する方法を確立した。この方法を用いて、SAM の合成に使われるメチオニン、葉酸、コリンを除いたメチル欠乏食、またはメチル欠乏食＋無機ヒ素を長期投与した C57BL/6マウスの肝臓について、ゲノム DNA メチル化レベルと SAM 量の測定を行った⁹⁾。その結果、DNA メチル化レベルと SAM 量の変動は相関せず、上記の仮説は必ずしも成り立たないことから、未解明の機序があることが明らかとなった。さらに、メチル欠乏食や無機ヒ素による DNA メチル化レベルや SAM 量の変動には顕著な性差があることが明らかとなった。無機ヒ素による癌の発症率に性差があるという報告があり¹⁰⁾、無機ヒ素の DNA メチル化への影響における性差と関連する可能性も考えられた。無機ヒ素によるグローバルな DNA メチル化変化や、また遺伝子領域特異的なエピジェネティック修飾に関しては、包括的な解析や機序の研究が今後必要である。

なお、II. で無機ヒ素が E2F ファミリータンパクの機能に影響を及ぼすことを述べたが、E2F とエピジェネティック関連酵素の相互作用も報告されており^{11,12)}、無機ヒ素の転写因子への作用がエピジェネティック修飾につながる可能性も今後の検討課題である。

IV. 化学物質の発達期曝露影響

1. DOHaD 仮説とエピジェネティクス

近年、ヨーロッパの疫学研究を中心に、胎生期から乳幼児期の栄養環境が、後年、成人期や老年期の生活習慣病発症リスクに影響を及ぼすという DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) 仮説が注目されている¹³⁾。発生・発達段階は感受性や可塑性が高いことが知られているが、この時期に何らかの要因によって決定された遺伝子機能の変化の保持にはエピジェネティクスが重要な役割をもつと考えられており¹⁴⁾、DOHaD との関連にも関心が高まっている。発達期は化学物質に対する感受性も高く、化学物質の発達期曝露の影響発現にエピジェネティクスの関与が考えられている。

2. 無機ヒ素胎児期曝露による後発影響

C3H マウスは雄で肝癌を発症するなど、自然発癌がみられる系統である。Waalkes らは、C3H マウスの妊娠 8 日から 18 日の間のみ無機ヒ素を含む水を飲ませると、生まれた雄の仔が 1 年 5 カ月令を過ぎたころから肝癌を高率に発症することを報告した¹⁵⁾。さらに胎児期ヒ素曝露を受けて肝癌を発症した雄の肝臓の正常部分で、細胞増殖に関与するエストロゲン受容体 α (ER α) mRNA の増加と、ER α 遺伝子プロモーター領域

A. 肝臓ゲノムDNA全シトシン中の5メチルシトシン含量(%)

	メチル補充食群	メチル欠乏食群	メチル欠乏食 +ヒ素群
オス	5.26 ± 0.13 (100)	5.07 ± 0.16 (96.4)	5.01 ± 0.23 (95.2)
メス	4.89 ± 0.09 (100)	4.91 ± 0.13 (100.4)	5.20 ± 0.10 ^{a*} (106.3)

B. 肝臓のSAM含量

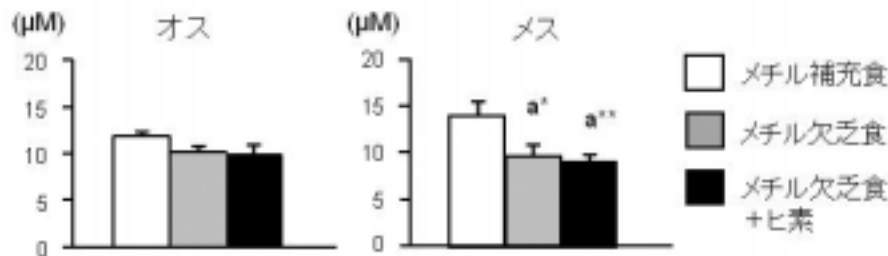


図3 メチル欠乏食またはメチル欠乏食+無機ヒ素のグローバルDNAメチル化(A)および肝臓SAM量(B)への影響。

C57BL/6マウスに合成メチル補充食、メチル欠乏食、またはメチル欠乏食+50ppm無機ヒ素を含む水を5カ月間投与し、肝臓について検討した。(A)カッコ内の数字は、メチル補充食群を100とした時の比率。(B)SAM量は20%肝臓ホモジネート上清中の濃度で示した。a,メチル補充食群に対して有意差あり(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

のDNAメチル化低下が観察されている。これらの結果は、胎児期ヒ素曝露がいずれかの時期にER α プロモーター領域のDNAメチル化を低下させ、その結果ER α を高発現させ、それが癌の高発現につながった可能性を示唆する重要な報告である。

そこで著者らは、胎児期ヒ素曝露とDNAメチル化変化というエピジェネティックな変化との因果関係を明らかにするために、Waalkesら¹⁵⁾と同じ実験系で研究を開始した。その結果著者らの実験でも、無機ヒ素投与群において肝腫瘍・肝癌の増加が観察された。しかし、ER α の発現増加とプロモーター領域のDNAメチル化低下は観察されず、ER α 関連の変化は癌の増加に必須ではな

いことが示された。一方、1年5カ月令の雄マウス肝臓について遺伝子発現の網羅的解析を行った結果、比較的発現が高く、対照群とヒ素曝露群で有意に発現に差が現れる5遺伝子が検出された。6週令のマウスではこれらの遺伝子の発現に有意な差は見られず、後発的な変化であることが示唆された。このうちの2つは脂質代謝に関係する遺伝子で、さらにそのプロモーター領域にヒストン修飾変化が観察された。これらの遺伝子発現変化と発癌の関連は現在明らかでないが、胎児期の10日間だけのヒ素曝露によって後発的な遺伝子発現変化が検出され、その変化がエピジェネティック修飾によって固定されている可能性が示された点は重要と考えている。さらにこの実験系では、胎

児期にヒ素曝露を受けた仔マウスが成長後に肥満を示すことが観察され、上記の脂質代謝関連遺伝子の発現変化との関連についても検討中である。

これまでの研究で、無機ヒ素の胎児期曝露が後発的な影響を発現することが明らかとなったが、その機序の解明は今後の課題である。無機ヒ素の酸化ストレス誘導を介したシグナル伝達系や転写因子への作用に、これまでミッシングピースであった「エピジェネティックな作用」からの視点を加えることによって、研究は新たな展開を迎えようとしている。

略語リスト

ROS : 活性酸素種、reactive oxygen species
 SAM : S-adenosylmethionine
 5medC : 5-methyldeoxycytidine
 dC : deoxycytidine
 DOHaD: Developmental Origins of Health and Disease

文献

- 1) 山内博: III-7重金属 d.ヒ素 “分子予防環境医学 — 生命科学の予防・環境医学への統合”. 分子予防環境医学研究会編: 本の泉社、2003、pp611-618
- 2) 内閣府食品安全委員会事務局: 平成20年度食品安全確保総合調査「平成20年度食品に含まれるヒ素の食品影響評価に関する調査報告書」
- 3) Kumagai Y, Sumi D: Arsenic: Signal transduction, transcription factor, and biotransformation involved in cellular response and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 243-262, 2007
- 4) Nohara K, Ao K, et al: Arsenite-induced thymus atrophy is mediated by cell cycle arrest: A characteristic downregulation of E2F-related genes revealed by a microarray approach. *Toxicol Sci* 101: 226-238, 2008
- 5) トキシコゲノミクスを利用した環境汚染物質の免疫毒性評価法、NIES トキシコゲノミクスサイト: <http://www.nies.go.jp/health/toxicogm/riyo/nohara-0.html>
- 6) 豊田実、神前正幸、他: 第4章-1. 発がんにおけるエピジェネティック異常の役割. 羊土社、2010、pp131-136
- 7) 牛島俊和、竹島秀幸、他: 第4章-2. エピジェネティック異常の誘発要因と機構. 羊土社、2010、pp137-143
- 8) Reichard JF, Schnekenburger M, et al: Long term low-dose arsenic exposure induces loss of DNA methylation. *Biochem Biophys Res Commun* 352: 188-192, 2007
- 9) Nohara K, Baba T, et al: Global DNA methylation in the mouse liver is affected by methyl deficiency and arsenic in a sex-dependent manner. *Arch Toxicol* (in press)
- 10) Chen CJ, Wang CJ: Ecological correlation between arsenic level in well water and age-adjusted mortality from malignant neoplasms. *Cancer Res* 50: 5470-5474, 1990
- 11) Blais A, Dynlacht BD: E2F-associated chromatin modifiers and cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* 19: 658-662, 2007
- 12) Montoya-Durango DE, Ramos KS: L1 retrotransposon and retinoblastoma: molecular linkages between epigenetics and cancer. *Curr Mol Med* 10: 511-521, 2010
- 13) Godfrey KM, Gluckman PD, et al: Developmental origins of metabolic disease: life course and intergenerational perspectives. *Trends Endocrinol Metab* 21: 199-205, 2010
- 14) Bird A: Perceptions of epigenetics. *Nature* 447: 396-398, 2007
- 15) Waalkes MP, Liu J, et al: Estrogen signaling in livers of male mice with hepatocellular carcinoma induced by exposure to arsenic *In Utero*. *J Natl Cancer Inst* 96: 466-474, 2004