

ヒストン修飾を指標とした *in vitro* 発がんリスク評価系の開発

研究分担者 伊吹裕子 静岡県立大学環境科学研究所 准教授

研究要旨

本研究ではヒストンの化学修飾に焦点をあてた新規 *in vitro* 評価系を開発することを目的とし、最終的に本研究事業の中心課題である中・短期動物発がん実験系との対比検討を行うことにより、その有用性を確認することを目標としている。化学物質によるヒストン修飾変化の基礎データを蓄積し、評価に使用するヒストン修飾パターンを決定するために、本年度は、昨年度の予備的検討において評価項目候補となった、ヒストン H2AX(Ser139)、H3(Ser 10)リン酸化を中心に、タバコ副流煙、ホルムアルデヒド作用後の修飾変化と発がんへの関与について検討した。その結果、H2AX リン酸化により DNA 損傷を検出しながら、H3 リン酸化により proto-oncogene の発現制御を捉えることが可能であり、本評価系は、化学物質のイニシエーション活性と、プロモーション活性を同時に検出できる系であることが示された。

A. 研究目的

近年、多岐にわたる化学物質が開発されているが、その使用は幾つかの毒性試験により規制されている。発がん性予測の第一スクリーニング法として、Ames 試験、小核試験等の遺伝毒性試験は有用であるが、それらの遺伝毒性試験では陰性でも発がん性を示す化学物質の存在が報告される等、最終的には動物における長期の発がん試験が必要とされる。動物愛護の観点から、その代替法の開発が望まれており、新しい観点からの新規 *in vivo*, *in vitro* 評価法の構築が期待されている。

本研究では新しい *in vitro* 評価系を開発することを目的とし、構築した手法について、本研究事業での中心課題である中・短期動物実験系の結果と対比させながらその実用性の可能性について検証を行う。評価法としては、化学物質作用後のヒストンの修飾変化に焦点をあてる。これまでの遺伝毒性評価では不可能であった DNA 変異に基づかない毒性や、その誘導機構の予測について検討する。

B. 研究方法

ヒト培養細胞株 (A549 肺上皮細胞) に化学物質を作用させ、その後、時間依存的なヒストン修飾変化を western blotting により検出した。ヒストン修飾としては、DNA 損傷マーカーであるヒストン H2AX(Ser139)リン酸化、細胞増殖マーカーであるヒストン H3(Ser10, Ser28)リン酸化、H3 アセチル化 (global, Lys9, Lys14) を対象とした。化学物質としては、タバコ副流煙、その中に含まれるホルムアルデヒドを対象とした。タバコ副流煙は 5 本のタバコの燃焼煙を 100ml の培地 (DMEM) にトラップした。ホルムアルデヒドは、発がん性物質であるが、変異原性試験で判定が難しいとされ、ヒストンに対して高い反応性を有することが知られている。

ヒストン修飾に伴う前がん遺伝子 (*c-fos*, *c-jun*) 発現制御はヒストン修飾部位に対するクロマチン免疫沈降

法 (ChIP) により検討した。

また、印刷工場における胆管がん誘発の原因物質と考えられている 1,2-ジクロロプロパンのヒストン修飾変化についても、ヒト正常肝細胞 WRL-68 並びに、ヒト肝ガン由来細胞株 HepG2 に作用させ、同様に検討した。

C. 研究結果

1) タバコ副流煙、ホルムアルデヒド作用後のヒストン修飾パターン変化

タバコ副流煙、ホルムアルデヒド作用後のヒストン修飾変化について検討した (図 1, 2)。

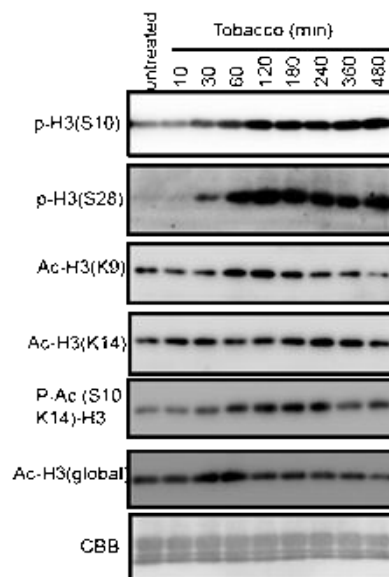


図 1 タバコ副流煙作用後のヒストン修飾パターン

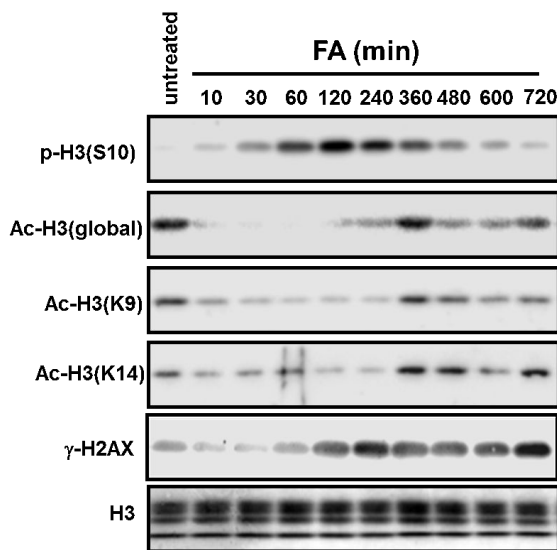


図2 ホルムアルデヒド (1mM) 作用後のヒストン修飾パターン

ヒストン H3 リン酸化、アセチル化パターンは、それぞれの誘導因子で異なっていた。タバコ副流煙作用後のヒストン修飾パターンを図1に示す。作用後、顕著なヒストン H3(Ser10, Ser28)のリン酸化が示された。一方、ホルムアルデヒド作用後にはヒストン H3(Ser10)リン酸化は同様に誘導されたが、その誘導は2時間をピークに一時的であり、タバコ作用程継続しなかった(図2:昨年度報告書で示したが、対比のために掲載)。ヒストンアセチル化は、タバコ副流煙ではほとんど変化が認められなかったが、ホルムアルデヒド作用では一時的に(~6時間)アセチル化が低下し、その後回復するパターンを示した。

ヒストン H2AX(Ser139)リン酸化は両作用により、時間依存的に増加した(図2)。タバコ副流煙による H2AX(Ser139)リン酸化については既に報告している(Mutat. Res. 676, 34-40 (2009))。この H2AX のリン酸化は、それぞれの化学物質により DNA 損傷が生成し、それが起因となって DNA 複製、修復時に誘導されたものと考えられた。

2) 1,2-ジクロロプロパン作用後のヒストン修飾変化

1,2-ジクロロプロパンのヒストン修飾変化について、ヒト正常肝細胞 WRL-68 並びに、ヒト肝ガン由来細胞株 HepG2 に作用させ検討した。短期間曝露(~24時間)では、上述したタバコ副流煙やホルムアルデヒドのような顕著なヒストン修飾変化は認められなかった(データ示さず)。

3) ヒストン H3 リン酸化機構の解析

ホルムアルデヒド作用後のヒストン H3 (Ser10)リン酸化メカニズムについて検討した。ヒストン H3 リン酸化並びに H2AX リン酸化を二重免疫染色したところ、DNA 損傷の誘導を示す H2AX のリン酸化と H3 のリン

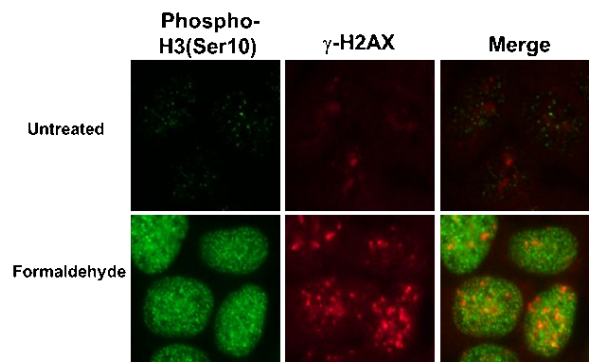


図3 ホルムアルデヒド作用後のヒストン H3 リン酸化と H2AX リン酸化の局在
左(緑): H3 リン酸化、中央(赤): H2AX リン酸化、右: マージ

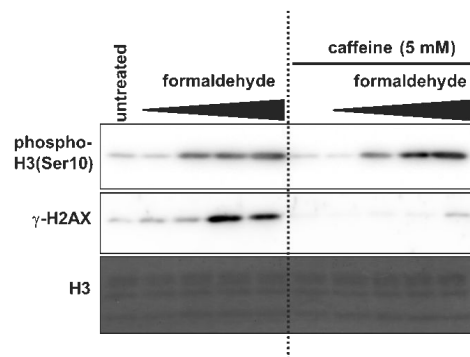


図4 ヒストン H3 リン酸化と DNA 損傷応答

ATM 阻害剤 caffeine を作用後、ホルムアルデヒド (~3mM) 加え、2時間培養後細胞を回収した。

酸化は、細胞内局在が異なっていた(図3: H3 リン酸化部位は H2AX リン酸化を示すフォーカスと一致していない)。

また、DNA 損傷に基づき活性化される ATM 阻害剤により H2AX のリン酸化は抑制されるが、H3 のリン酸化は抑制されなかったことから、H3 のリン酸化は DNA 損傷に依存せず、それとは異なる経路によることが示された。

一方、ヒストン H3 のリン酸化は MAPK カスケードに依存することが報告されているので、MAPK の阻害剤を使用して、ホルムアルデヒド作用後のヒストン H3 リン酸化を検討した(図5)。

ホルムアルデヒドによるヒストンリン酸化は MAPK カスケードの JNK 経路阻害剤で阻害される(図5A)ことから、JNK 経路を介していることが示唆された。また、JNK の siRNA を用いた検討においてもそれが確認された(図5B)。

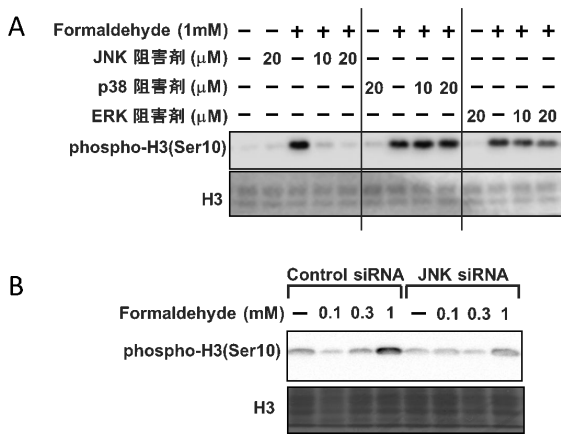


図5 MAPK 経路によるヒストン H3 (Ser10)リン酸化
 A. MAPK 阻害剤各種を作用後、ホルムアルデヒド (1mM) 加え、2 時間培養後細胞を回収した。
 B. JNK を siRNA により knock-down し、ホルムアルデヒド (~1mM) 加え、2 時間培養後細胞を回収した。

4) ヒストン H3 (Ser10)リン酸化によるがん遺伝子発現制御の検討

ヒストン修飾に伴う前がん遺伝子(*c-fos*, *c-jun*) 発現制御はヒストン H3(Ser10)リン酸化部位に対するクロマチン免疫沈降法(ChIP)により検討した。各遺伝子の転写開始点を基準として-1000~3000bp 地点のプライ

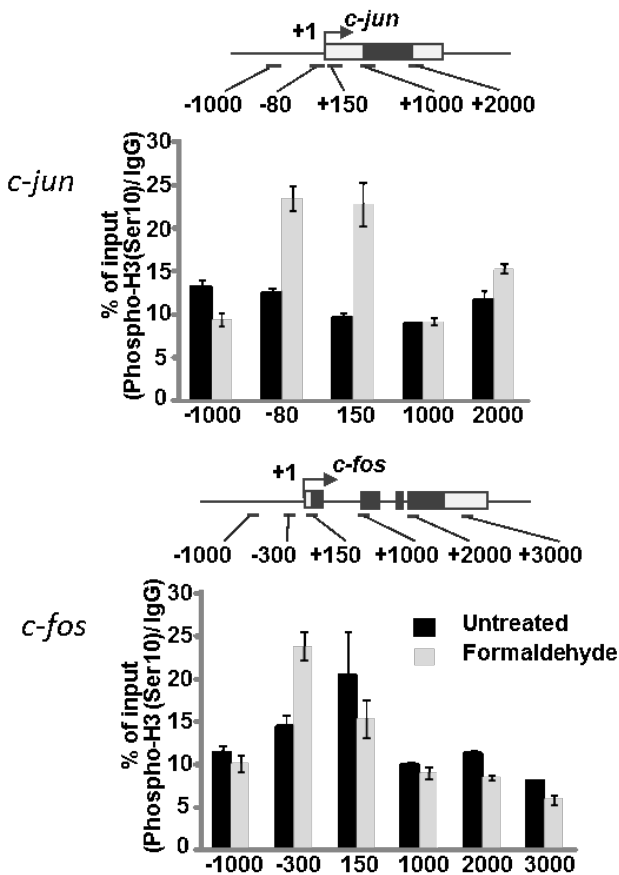


図6 *c-fos*, *c-jun* 遺伝子領域におけるヒストン H3 (Ser10)リン酸化

マーを使用して検討した(図6)。その結果、*proto-oncogene*である *c-fos*, *c-jun* プロモーター領域で H3 (Ser10)のリン酸化は上昇していることから、このヒストン修飾が発がんプロモーションに繋がることが示唆された。

D. 考察

本研究により、タバコ副流煙、ホルムアルデヒドはヒストンのリン酸化・アセチル化状態変化をダイナミックに変化させること、そのパターンは化学物質の種類に応じて異なることが明らかになった。ヒストン H3(Ser10)のリン酸化については、時間的変化はあるものの、両作用で誘導され、また、*proto-oncogene* の発現を制御していることが明らかとなったことから、H3(Ser10)のリン酸化を検出すれば、従来の *in vitro* 遺伝毒性試験では捉えることが出来ない発がんプロモーション作用を捉えることができると考えられた。DNA 損傷生成を反映する H2AX(Ser139)リン酸化と同時に測定することにより、イニシエーション、プロモーション両者を同時に解析することが可能な評価方法であることが示唆された(図7)。

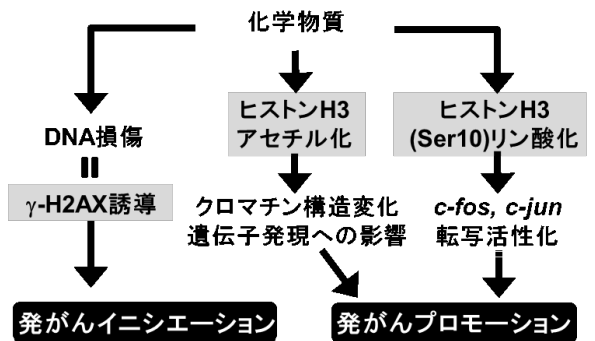


図7 ヒストン修飾を指標とした発がんイニシエーション、プロモーション同時評価

ホルムアルデヒドのアセチル化の変動については、アルデヒドとリジン残基の反応によるアセチル化の妨害がはじめのアセチル化の低下を反映していたと考えられる。今回は、高濃度・短期曝露の変化を検討したが、今後、低濃度・長期曝露の変化を検討したいと考える。

1,2-ジクロロプロパンの短期曝露によるヒストン修飾変化については変化が認められなかったが、発がん性を示すためには代謝が必要と考えられるので、長期曝露検討の必要性があると思われる。

化学物質によるヒストン修飾変化に関する研究については、未だ基礎実験段階であり、さらに多くの化学物質について検証する必要がある。今回は、タバコ副流煙とホルムアルデヒドを選択したが、明らかに変異によって、H2AXのリン酸化とH3のヒストン修飾を評価することにより、別経路で誘導されるイニシエーション、プロモーション過程をそれぞれ評価できると考えられる。

E . 結論

ヒストン H2AX(Ser139)リン酸化により DNA 損傷を検出しながら、H3(Ser10)リン酸化により前がん遺伝子の発現制御を捉えることが可能であることが明らかになり、in vitro 新規発がんリスク評価指標候補としてさらに多種の化学物質について検証していくこととした。

F . 研究発表

1 . 論文発表

- 1) Toyooka T, Kubota T, Ibuki Y: Nonylphenol polyethoxylates induce phosphorylation of histone H2AX. *Mutat. Res.* 741, 57-64 (2012)
- 2) Toyooka T, Amano T, Ibuki Y: Titanium dioxide particles phosphorylate histone H2AX independent of ROS production. *Mutat. Res.* 742, 84-91 (2012)
- 3) Toduka Y, Toyooka T, Ibuki Y: Flow cytometric evaluation of nanoparticles using side-scattered light and ROS-mediated fluorescence -correlation with genotoxicity. *Environ. Sci. Technol.* 46,7629-7636 (2012)
- 4) Toyooka T, Shinmen T, Arts J.M., 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.* 264, 404-412 (2012)
- 5) Ibuki Y, Toyooka T: Nanoparticle uptake measured by flow cytometry. *Methods Mol. Biol.* 46, 7629-7636 (2012)
- 6) Toyooka T, Kubota T, Ibuki Y. UVB irradiation changes genotoxic potential of nonylphenolpolyethoxylates-- remarkable generation of -H2AX with degradation of chemical structure. *Mutagenesis.* 28(1):7-14 (2013).

2 . 学会発表

- 1) 吉田唯真, 豊岡達士、伊吹裕子: ホルムアルデヒドによるヒストン修飾変化と前がん遺伝子発現制御. 環境エピゲノム研究会第7回定例会(東京) pp.2, 2012年5月.
- 2) 吉田唯真, 豊岡達士、伊吹裕子: ホルムアルデヒドによる発がんヒストン修飾変化の関連性について. 第25回変異機構研究会(愛知) pp.8, 2012年6月
- 3) 吉田唯真, 豊岡達士、伊吹裕子: ホルムアルデヒドによるヒストン修飾変化とがん原遺伝子発現制御. 第39回日本毒性学会学術年会(仙台) pp.232, 2012年7月
- 4) Ikuma Yoshida, Tatsushi Toyooka, Yuko Ibuki: Formaldehyde-induced histone modifications and expression of proto-oncogenes. The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology (Sendai) pp.232, Jul. 2012.
- 5) 伊吹裕子, 豊岡達士: たばこ副流煙によるヒスト

ン修飾変化. 第39回日本毒性学会学術年会(仙台) pp.232, 2012年7月

- 6) 伊吹裕子, 四方真理子, 吉田唯真, 豊岡達士, 若林敬二: 化学物質によるヒストン修飾変化とそれを指標とした毒性評価系の構築. 第27回発癌病理研究会(修善寺) pp.31, 2012年8月
- 7) 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41回日本環境変異原学会(静岡) pp.156, 2012年11月
- 8) 四方真理子, 豊岡達士, 伊吹裕子: タバコ煙中発がん性物質 NNK によるヒストン修飾変化と発がんプロモーション活性. 第41回日本環境変異原学会(静岡) pp.91, 2012年11月
- 9) 吉田唯真, 豊岡達士, 伊吹裕子: , -不飽和アルデヒドによるヒストン修飾変化. 第41回日本環境変異原学会(静岡) pp.119, 2012年11月
- 10) 松下実理, 豊岡達士, 伊吹裕子: 17- -estradiol によるヒストンアセチル化と紫外線感受性変化. 第41回日本環境変異原学会(静岡) pp.113, 2012年11月
- 11) 趙曉旭, 豊岡達士, 伊吹裕子: 銀は紫外線誘導ヒストン H2AX のリン酸化を増強する. 第41回日本環境変異原学会(静岡) pp.110, 2012年11月
- 12) 久保田徹, 豊岡達士, 伊吹裕子: 非イオン界面活性剤の紫外線分解とその遺伝毒性変化. 第41回日本環境変異原学会(静岡) pp.98, 2012年11月

G . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1 . 特許取得

なし

2 . 実用新案登録

なし

3 . その他

なし