

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、動物発がん実験系において、評価指標候補の一つとして研究されているヒストン H2AX(Ser139)のリン酸化 (γ -H2AX)を中心に、発がん物質である 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)の代謝とヒストン修飾との関係を検討した。NNK を作用一定時間後、明らかな γ -H2AX の誘導が認められた。また、CYP2A13 過剰発現細胞に NNK を作用した場合、過剰発現細胞では、野生型の細胞に比べて高レベルな γ -H2AX の誘導が長時間持続したことから、 γ -H2AX の誘導は NNK の付加体形成による DNA 損傷を反映したものであると考えられた。電気泳動法などの従来法では NNK 作用による DNA 損傷を検出できなかったことより、 γ -H2AX は、化学物質の代謝によるイニシエーション活性を検出できる有用な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。

本年度は、動物発がん実験系において、評価指標候補の一つとして研究されているヒストン H2AX(Ser139)のリン酸化 (γ -H2AX)を中心に、タバコ煙中等に含まれる発がん物質である 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)の代謝と γ -H2AX との関係を検討し、 γ -H2AX が *in vitro* において化学物質の代謝を反映した評価系となる可能性について明らかにすることを目的とした。

また、*in vivo* と *in vitro* 評価の差異を確認するため、動物組織からヒストンを抽出し、ヒストン修飾の変化を検証する方法を構築するための予備的検討を行った。

B . 研究方法

1) γ -H2AX の解析

ヒト培養細胞株 (A549 肺上皮細胞) に NNK を作用後、Western blotting 及び免疫染色法により、一定時間後の γ -H2AX 誘導変化を解析した。

Western blotting: 60mm ディッシュに細胞を播種し、培養後、NNK を一定時間作用した。ヒストンを抽出後、12.5% ゲルで SDS-PAGE を行い、PVDF 膜に転写した。1% skim milk/T-PBS 溶液で 1/2800 希釈した一次抗体 Rabbit anti-phospho-histone H2AX (Ser139) IgG antibody (Merck Millipore. Co., USA)、二次抗体 Rabbit anti-IgG-HPR (Jackson Immuno Research Lab., USA) を反応後、ECL+ (GE Healthcare Ltd, USA)を用いて検出した。

免疫染色法: 35mm ガラス底ディッシュに細胞を播種し、培養後、NNK を一定時間作用した。6%ホルマリンで固定、2% Triton X-100 で透過処理した後、一次抗体 Mouse anti-phospho-histone H2AX (Ser139) IgG, (Millipore. Co., USA)、二次抗体 FITC conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Lab. Inc., USA) をいずれも 1/200 希釈して使用した。蛍光顕微鏡 (IX70, Olympus Co., Japan)、Axio vision Ver.2.05 (Carl Zeiss Co. Ltd., Germany) で撮影を行った。画像解析には Image J 1.46 (Broken Symmetry Software, USA) を使用した。

2) バイアス正弦電場ゲル電気泳動法

35 mm ディッシュに A549 細胞を播種し培養後、NNK を一定時間作用した。過酸化水素は 10 mM で 2時間作用した。細胞を 1%低融点アガロースで固めて、stacking gel を作成し、Protenase K で処理した。Agarose gel の well に stacking gel を入れて、泳動装置 (GENOFIELD, ATTO Co., Ltd. Japan) にセットし 30

mV、198 mA、AC 周波数を 0.001 ~ 0.005 Hz の条件下で約 32 時間電気泳動した。泳動終了後、Ethidium bromide で染色し、トランスイルミネーター (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) で検出した。

3) 生存率評価

NNK の毒性評価として、作用後 24 時間において、1%トリパンブルー染色法による生存率の測定を行った。

4) CYP2A13 過剰発現細胞の作製

γ -H2AX 誘導と NNK 代謝活性化の関連性については、NNK 代謝酵素である CYP2A13 を過剰発現した A549 細胞を構築し、上記 1) - 3) と同様に検討を行った。導入したプラスミドの構成を下に示す。また、CYP2A13 cDNA を切り取ったプラスミドを同時に導入した細胞 (空ベクター細胞) を構築した。

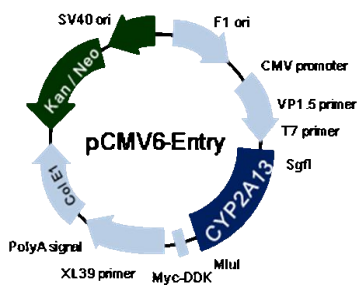


図1 CYP2A13 プラスミド DNA

5) 動物組織からのヒストンの抽出とヒストン修飾の予備的検討

ラット肝臓 50 mg をホモジナイズ後、塩酸/アセトン法によりヒストンを抽出し、1) と同様に Western blotting に供した。

C. 研究結果

1) NNK 作用後の γ -H2AX 誘導変化

NNK 作用後 24 時間までの γ -H2AX の誘導を Western blotting により検討した (図2)。NNK 作用 2 ~ 8 時間後に時間依存的な γ -H2AX 誘導が認められた。また、その誘導は作用濃度依存的であった。

同様に、免疫染色法を用いて、 γ -H2AX 誘導を確認した。核内全体に γ -H2AX フォーカスが認められ、特に作用後 4 ~ 8 時間後に蛍光の強いものが認められた (図3)。また、濃度依存的な γ -H2AX についても検討を行った。100 ~ 300 μ M の濃度において γ -H2AX フォーカスの蛍光強度の強い細胞が認められた (データ示さず)。

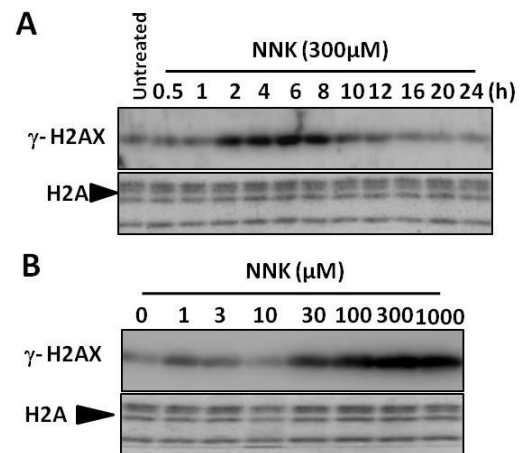


図2 NNK 作用後の γ -H2AX 誘導パターン

A: NNK 作用後の時間依存的 H2AX リン酸化
B: NNK 作用後の濃度依存的 H2AX リン酸化

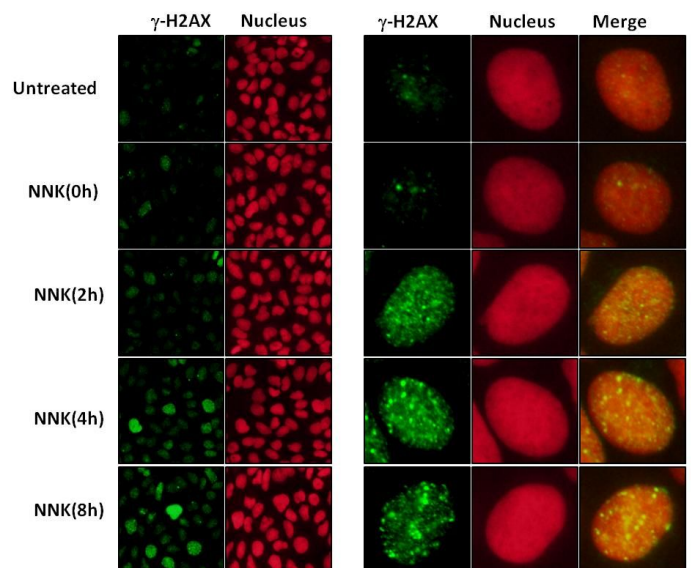


図3 NNK (300 μ M) 作用後の γ -H2AX 誘導パターン

2) NNK 作用後の DNA 損傷並びに細胞毒性の検討

γ -H2AX は、DNA 二本鎖切断(DSBs)の生成を起因として誘導される。また、DSBs 以外の DNA 損傷、例えば、DNA クロスリンクやアダクトが生成した際、複製フォークの崩壊や損傷修復過程で DSBs が生成することが知られ、その際 H2AX がリン酸化されると考えられている。NNK は代謝後、DNA アダクトを形成することが報告されている。そこで、バイアス正弦電場ゲル電気泳動法を用いて、DNA 損傷形成の有無を解析した(図4)。その結果、ポジティブコントロールである H₂O₂ (10 mM) では、顕著な DSBs が認められたが、NNK 作用後はいずれの時間においても DSBs は確認できなかった。

また、NNK 作用後の生存率の変化をトリパンブルーアッセイにより検討した。その結果、NNK 1000 μ M を作用しても、24 時間時点で生存率の変化は認められなかった(データ示さず)。



図4 NNK 作用後の DSBs の誘導

バイアス正弦電場ゲル電気泳動法を用いて、DSBs 形成の有無を解析した。ポジティブコントロールとして H₂O₂ を 2 時間作用させた。

3) 代謝酵素過剰発現細胞における NNK 作用後の γ -H2AX 誘導

NNK の主要な代謝酵素として CYP2A6、2A13 が知られているが、肺組織においては CYP2A13 が CYP2A6 よりも優先的に発現し NNK の代謝を行っている。過去の論文では、A549 細胞に CYP2A13 を導入後に NNK の代謝および DNA 付加体が増加することが示されている。そこで、CYP2A13 プラスミド DNA を A549 細

胞に導入し、CYP2A13 過剰発現 A549 細胞を樹立し NNK 代謝活性化と γ -H2AX の誘導の関連を検討した。

今回構築した空ベクター導入細胞および CYP2A13 過剰細胞の CYP2A13 の発現量を Western blotting を用いて確認した(図5)。野生型と空ベクター導入細胞は発現量が同程度であり、CYP2A13 過剰 A549 細胞においてはこれら細胞よりも顕著な発現を認めた。つまり、安定的に CYP2A13 を発現する細胞株が得られた。

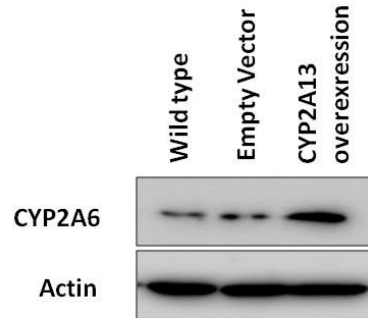


図5 プラスミド DNA 導入細胞における CYP2A13 の発現量解析

野生型の A549 細胞と、本実験で構築した空ベクター導入細胞および CYP2A13 過剰発現細胞における CYP2A13 の発現量。

はじめに、NNK 作用 24 時間後の細胞生存率を検討した。空ベクター導入細胞は野生型の細胞と同様、いずれの濃度においても細胞死は認められなかった。一方、CYP2A13 過剰発現細胞は 100 ~ 1000 μ M において野生型、空ベクター導入細胞よりも若干であるが細胞死が多く認められた(データ示さず)。

空ベクター導入細胞、CYP2A13 過剰発現細胞において、NNK 作用 24 時間後までの γ -H2AX を Western blotting(図6)によって検討した。その結果、両細胞とも NNK 作用後に時間依存的な誘導が認められた。空ベクター導入細胞は、図2の野生型の細胞と同様 20 ~ 24 時間後には γ -H2AX の誘導は消失していたが、CYP2A13 過剰発現細胞においては 20 ~ 24 時間後にも持続した。

免疫染色法においても空ベクターの細胞に比べて CYP2A13 過剰発現細胞では 24 時間後にも誘導が認められ、また γ -H2AX 特有のフォーカスとともに、pan-nuclear な γ -H2AX が確認された(図7)。各細胞の γ -H2AX の蛍光値を解析し、その値をプロットしたものを図8に示す。ウィルコクソンの順位和検定法を用いて、空ベクター導入細胞、CYP2A13 過剰発現細胞一つ一つの蛍光値を比較したところ、NNK 作用 8、24 時間後において有意な差が認められた。

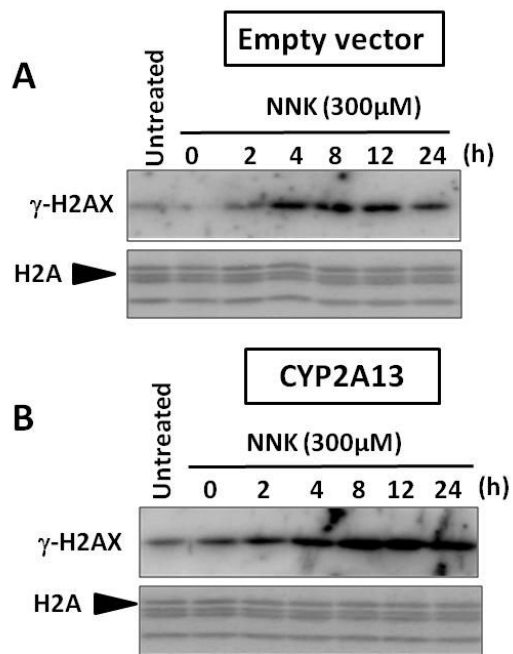


図6 CYP2A13 過剰発現細胞における NNK 作用後の 継続的γ-H2AX の誘導

NNK を所定の時間作用後、H2AX リン酸化の継続的変化を Western blotting により検出した。

A: 空ベクター導入細胞

B: CYP2A13 過剰発現細胞

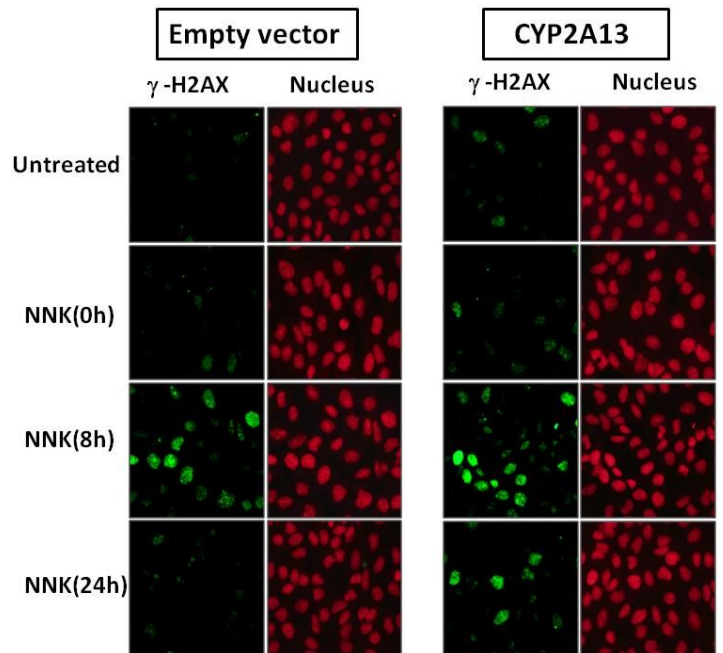


図7 CYP2A13 過剰発現細胞における NNK 作用後の 継続的γ-H2AX の誘導パターン

左: 空ベクター導入細胞

右: CYP2A13 過剰発現細胞

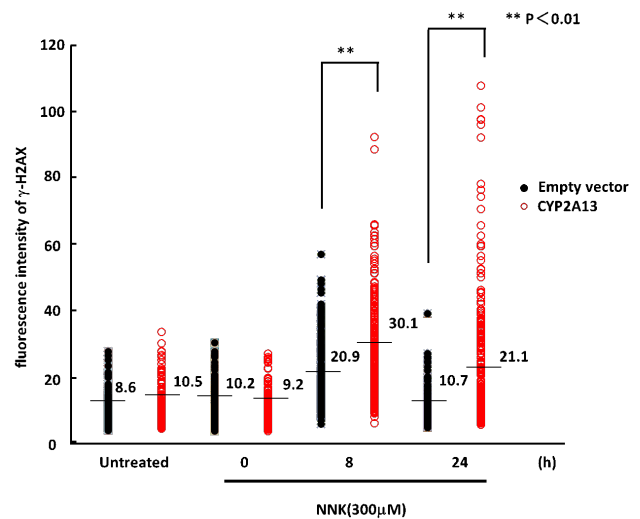


図8 CYP2A13 過剰発現による NNK 作用後の γ-H2AX の誘導比較

空ベクター導入細胞、CYP2A13 過剰発現細胞一つ一つの蛍光値をプロットした。ウィルコソンの順位和検定法を用いて、比較を行った。

4) 代謝酵素過剰発現細胞における NNK 作用後の DNA 損傷変化

CYP2A13 過剰発現細胞では、空ベクター導入細胞と比べて γ -H2AX の誘導が定量的に多く、そして 20~24 時間後も認められた。そこでバイアス正弦電場ゲル電気泳動法を用いて DSBs を検討した (図 9)。図 4 において、野生型の細胞では NNK を作用後、DSBs を検出することができないことが示された。空ベクターの細胞も野生型と同様であったが、CYP2A13 過剰発現細胞においては NNK 作用後 2~24 時間において DSBs が検出された。

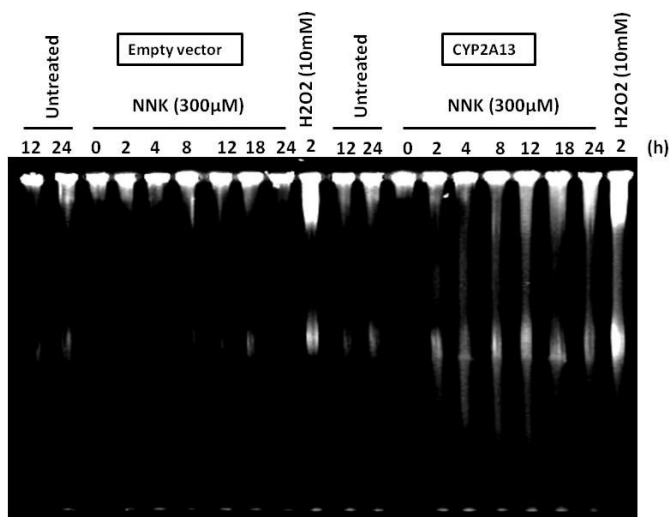


図 9 NNK 作用後の DSBs の誘導

空ベクター導入細胞、CYP2A13 過剰発現細胞に、NNK を所定の時間作用後 DSBs の生成量を BSFGE により検出した。ポジティブコントロールとして H_2O_2 を 2 時間作用させた。

5) 動物組織を使ったヒストン修飾評価のための予備的検討

ラット肝臓からヒストンを抽出し、ヒストン修飾が検出できることを確認した (データ示さず)。本検討により、*in vivo* から抽出したヒストンでも同様に、その修飾を検討することができることが明らかになった。*in vitro* によるスクリーニング法が *in vivo* での変化に対応するかどうかを検討する基礎的方法となると考えられる。

D. 考察

NNK はたばこ煙等に含まれるニトロソアミンであり、発がん物質として知られている。NNK の発がん性は、NNK が CYP 酵素により代謝を受け、それにより DNA 損傷が誘導されることが原因であるとされている。代謝は、化学物質の DNA 損傷性において重要なファクターであるが、化学物質による代謝と γ -H2AX の誘導についての検討はこれまでなされていない。そこで、本研究では、NNK とその代謝による γ -H2AX の誘導について検討を行った。

はじめに、NNK が γ -H2AX を誘導することが示された。NNK は直接 DSBs を誘導しないが、複製や DNA 損傷修復過程において間接的に DSBs が誘導され、 γ -H2AX が誘導されたものと考えられた。一方、バイアス正弦電場ゲル電気泳動法では DSBs を検出することができなかった。これまでに γ -H2AX を指標とすることにより、様々な環境中の化学物質の遺伝毒性を従来の方法 (細胞生存率測定法、DNA 電気泳動法) よりも 100~1000 倍高感度に検出することができることを我々は報告している。本実験でも γ -H2AX を用いることで、細胞生存率、DNA 電気泳動法よりも NNK の DNA 損傷能を高感度に検出することができたと考えられ、 γ -H2AX による指標が NNK をはじめとする DNA 付加体誘導物質の発がんイニシエーション作用を評価する上で有用な手法であると考えられた。

NNK 作用後の γ -H2AX 誘導が、NNK の代謝によるものであることは、CYP2A13 過剰発現細胞を使用した検討により確認された。まず、野生株では確認できなかったバイアス正弦電場ゲル電気泳動法による DSBs が、CYP2A13 過剰発現により確認できるようになり、CYP2A13 過剰発現細胞における NNK 代謝による DNA 損傷性の亢進が確認された。さらに、 γ -H2AX は、長時間、強く発現したことから、NNK の代謝による DNA 損傷を反映していることが示された。つまり、 γ -H2AX を指標にすれば、高感度にかつ代謝物の DNA 損傷性も評価ができることが示され、 γ -H2AX が *in vitro* における発がんイニシエータースクリーニング系においても、かつ *in vivo* の発がんマーカーとしても有用であると予想された。

E. 結論

本研究班において、動物発がん実験系の評価指標候補の一つとして研究されている γ -H2AX は、*in vitro* スクリーニングにおいても、化学物質の代謝並びに付加体形成を反映し、DNA 損傷を評価できる系であることが確認された。また、電気泳動法などの従来法では感度が悪く *in vitro* では DNA 損傷性を検出できない化学物質であっても、 γ -H2AX を指標にすることにより、高感度に化学物質の代謝によるイニシエーション活性を検出できる可能性が示された。

F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記入

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) T. Toyooka, T. Kubota, Y. Ibuki. UVB irradiation changes genotoxic potential of nonylphenolpolyethoxylates--remarkable generation of γ -H2AX with degradation of chemical structure. *Mutagenesis* 28(1):7-14 (2013).
- 2) T. Kubota, T. Toyooka, Y. Ibuki. Nonylphenol polyethoxylates degraded by three different wavelengths of UV and their genotoxic change--detected by generation of γ -H2AX.

(Proceedings)

- 3) T. Toyooka and Y. Ibuki: Phosphorylation of histone H2AX is a useful marker for detecting chemical phototoxicity. *Photomedicine and Photobiology* 35, 15-16 (2013)
- 4) Y. Ibuki, T. Toyooka and M. Matsushita : 17- β -estradiol-mediated hyperacetylation of histone H3 and change of repair ability of DNA damage. *Photomedicine and Photobiology* 35, 21-22 (2013)

2. 学会発表

- 1) 四方真理子、豊岡達士、伊吹裕子 : NNK によるヒストン修飾変化と CYP2A6/2A13 による代謝活性化との関連性 第 40 回日本毒性学会学術年会プログラム pS299 (2013).
- 2) 伊吹裕子、豊岡達士、松下実理 : 17- β -estradiol によるヒストンアセチル化と DNA 損傷修復応答変化 第 35 回日本光医学・光生物学会プログラム p41 (2013).
- 3) 伊吹裕子 : 環境因子によるヒストン修飾変化 化学物質、食品成分等の複合暴露とその影響評価への応用 環境科学会 2013 年会プログラム 講演要旨集 p199 (2013).
- 4) 伊吹裕子 : 化学物質によるヒストン修飾変化と光遺伝毒性 第 42 回日本環境変異原学会プログラム p69 (2013).
- 5) 四方真理子、豊岡達士、伊吹裕子 : NNK によるヒストン修飾変化と CYP2A6/2A13 による代謝活性化との関連性 第 42 回日本環境変異原学会プログラム p116 (2013).
- 6) Y. Ibuki, T. Toyooka, G. Yang and M. Matsushita: 17 β -estradiol-induced hyperacetylation of histone H3 and change of sensitivity to UVB The 6th Asia & Oceania Conference on Photobiology program p73 (2013).

H. 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