

## 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 静岡県立大学食品栄養科学部環境生命科学科 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。これまでに、中・短期動物発がん実験系において、各組織でヒストン H2AX のリン酸化（ $\gamma$ -H2AX）の検出が可能であることが示されている。これを発がんリスク評価系としてさらに推し進めるために、本年度は、 $\gamma$ -H2AX 検出における偽陽性検出の可能性を評価した。ヒト培養細胞を、界面活性剤処理、pH 変化、熱処理など、様々な条件で培養した。その結果、 $\gamma$ -H2AX は、DNA 損傷を誘導しない特定の界面活性剤で顕著に誘導されること、pH を酸性に傾けると誘導されることが判明した。また、細胞がアポトーシスを誘導した際も顕著なリン酸化が認められた。 $\gamma$ -H2AX は、高感度な DNA 損傷マーカーとして、化学物質による DNA 損傷性評価に使用されるが、これら DNA 損傷以外のいくつかの要因においても誘導されることも認識して  $\gamma$ -H2AX の誘導を評価する必要があることが示された。

### A. 研究目的

本研究事業の中心課題である中・短期動物発がん実験系において、化学物質を作用した動物の各組織でヒストン H2AX のリン酸化（ $\gamma$ -H2AX）の検出が可能であることが示されている。 $\gamma$ -H2AX は高感度な DNA 損傷マーカーであることは *in vitro* の実験で証明されているが、*in vivo* において  $\gamma$ -H2AX の検出を発がんリスクマーカーとして推し進めるためには、本来の化学物質による DNA 損傷を原因とする  $\gamma$ -H2AX の誘導と、偽陽性を含めたそれ以外の原因による誘導を区別して評価できるようにする必要がある。本年度は、DNA 損傷を原因としない  $\gamma$ -H2AX の誘導、並びに偽陽性検出の可能性について検討し、 $\gamma$ -H2AX の発がんリスクマーカーとしての評価とその注意事項について明らかにすることを目的とする。

### B. 研究方法

ヒト培養細胞株（A549 肺上皮細胞）に界面活性剤作用、熱ショック処理、pH 変化などを行い、一定時間で培養した後、Western blotting 及び免疫染色法により、 $\gamma$ -H2AX 誘導変化を解析した。

Western blotting: 細胞を回収後、ヒストンを抽出、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-HRP (Jackson Immuno Research Lab., USA) を反応後、ECL+ (Thermo Fisher Scientific, MA, 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、各種化学物質等を作用した。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。

### C. 研究結果

過剰量の化学物質や熱など作用後、アポトーシスが誘導されると、顕著な  $\gamma$ -H2AX の誘導が認められた。免疫染色では、アポトーシスに移行すると考えられる細胞は、DNA 損傷に基づくリン酸化パターンとは明らかな違いを示した (Fig. 1)。

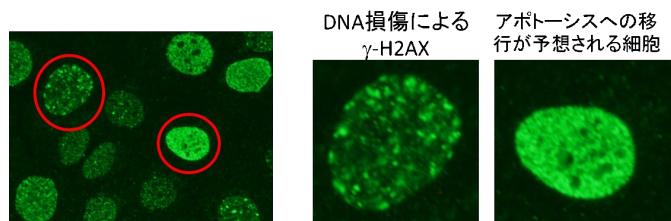


Fig. 1 アポトーシスによる $\gamma$ -H2AXの誘導

DNA 損傷能を有しないとされる化学物質作用においても  $\gamma$ -H2AX の誘導が確認された。特に、界面活性剤によるリン酸化は顕著であった。Fig.2 に各種界面活性剤による  $\gamma$ -H2AX の誘導を示す。Tween 20, Triton X, NP-40 いずれの界面活性剤においても、顕著な  $\gamma$ -H2AX の誘導が認められた。一方、同じ界面活性剤である SDS では、同様の  $\gamma$ -H2AX の誘導は認められなかった。

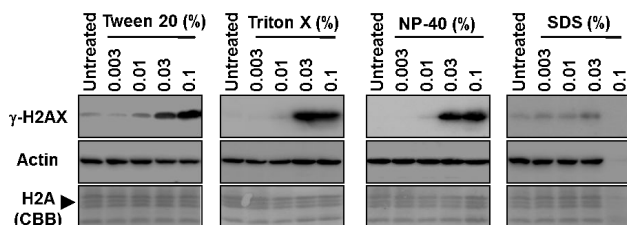


Fig. 2 各種界面活性剤による $\gamma$ -H2AXの誘導

また、 $\gamma$ -H2AXの誘導は、低pH処理においても誘導された。pHを4-5に調整すると、顕著な $\gamma$ -H2AXが認められたが、pHを高くした場合は誘導はわずかしか認められなかった (Fig. 3)

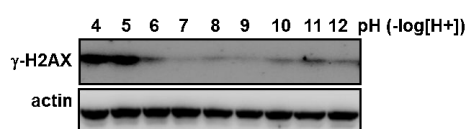


Fig. 3 pH変化による $\gamma$ -H2AXの誘導

## D. 考察

$\gamma$ -H2AXの組織免疫染色の際、アポトーシスによるリン酸化と、DNA損傷やその他要因によるリン酸化を区別する必要があると考えられた。今回示した培養細胞の免疫染色のように、ヒストン染色パターンで区別ができるか否か、検討する必要がある。

また、DNA損傷能を有さないと報告されている化学物質においても顕著な $\gamma$ -H2AXが認められる場合があることが示された。界面活性剤は、遺伝毒性や発がんの報告は少なく、各種産業などで使用されている。Tween 20、Triton X、NP-40において、濃度依存的に $\gamma$ -H2AXが誘導されたのにもかかわらず、同じ界面活性剤であるSDSにおいて誘導されなかった理由については不明であるが、誘導メカニズムの解明においてヒントを与えるものとなると考えている。pHの変化による $\gamma$ -H2AX誘導についても同様に、その誘導メカニズムは不明である。

## E. 結論

組織免疫染色におけるポジティブな $\gamma$ -H2AXのデータは、DNA損傷能を有する化学物質による作用以外に、幾つかの要因による誘導の可能性がある。組織免疫染色の際、それらを加味して、慎重に評価されるべきと考えられた。界面活性剤やpH変化により $\gamma$ -H2AXが誘導された機構については不明であり、今後解析していく予定である。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- I. Yoshida and Y. Ibuki. Formaldehyde-induced histone H3 phosphorylation via JNK and the expression of proto-oncogenes. *Mutat. Res.-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 770, 9-18 (2014).
- T. Kubota, T. Toyooka, X. Zhao, Y. Ibuki. Phosphorylation of Histone H2AX Generated by Linear Alkylbenzene Sulfonates and its Suppression by UVB Exposure. *Photochem. Photobiol.* 90, 845-852 (2014).
- Y. Ibuki, T. Toyooka, X. Zhao, I. Yoshida. Cigarette sidestream smoke induces histone H3 phosphorylation via JNK and PI3K/Akt pathways, leading to the expression of proto-oncogenes. *Carcinogenesis* 35(6), 1228-1237 (2014).

### 2. 学会発表

- 伊吹裕子, 豊岡達士: 環境化学物質の光分解と遺伝毒性変化: リン酸化ヒストンH2AXを指標とした解析. 日本薬学会第134回年会(熊本) 2014年3月
- Y. Ibuki, T. Toyooka, G. Yang, M. Matsushita: 17- $\beta$ -estradiol-induced hyperacetylation of histone H3 and change of sensitivity to UVB. The 11th Japan-China International Symposium on Health Sciences (Shizuoka) Nov. 2014.
- 楊光, 吉田唯真, 伊吹裕子: ホルムアルデヒド暴露による紫外線感受性の上昇とDNA損傷修復の遅延. 第27回変異原機構研究会(愛知) 2014年6月.
- 伊吹裕子, Vivienne Reeve: 長波長紫外線UVA1によるヒストン修飾変化 第36回日本光医学・光生物学会(大阪) 2014年7月.
- 趙曉旭, 伊吹裕子: フローサイトメーターの側方散乱光とhistone H3リン酸化を指標とした銀ナノ粒子の生体影響評価手法の開発. 第43回日本環境変異原学会(東京) 2014年12月.
- 楊光, 伊吹裕子: ホルムアルデヒド暴露による紫外線感受性の上昇とDNA損傷修復の遅延. 第43回日本環境変異原学会(東京) 2014年12月.

## 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