

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（ γ -H2AX）の検出が可能であることが示されている。ヒストン修飾変化を発がんリスク評価系としてさらに推し進めるために、昨年度の検討において偽陽性検出の可能性が示唆された、DNA 損傷を誘導しない界面活性剤による γ -H2AX 誘導メカニズムについて検討した。また、複数のヒストン修飾を指標とした *in vitro* 評価系構築の可能性を探るために、既に γ -H2AX の組織免疫化学的解析が行われている各種化学物質を投与したラット組織（肝臓、肺）からヒストンを抽出し、 γ -H2AX ならびにヒストンアセチル化を解析した。

ヒト培養細胞における界面活性剤（LAS）処理による γ -H2AX の出現は、 $ZnCl_2$ や EGTA により阻害された。 $ZnCl_2$ や EGTA は、deoxyribonuclease I（DNase I）の阻害剤であり、界面活性剤作用後、DNase I が細胞質から細胞核へ移行し、DNA を切断することが確認された。この γ -H2AX の出現機構は、これまでに報告されてきた化学物質自身による DNA 損傷を起因とせず、細胞内 DNase I による DNA の切断という新しいものであることが示された。よって γ -H2AX 検出の際は、DNA 損傷に基づかない陽性反応に注意する必要がある。

ラット組織のヒストン解析では、肝臓において γ -H2A の上昇、幾つかの化学物質によるヒストンアセチル化の上昇が認められたが、化学物質の肝発がん性との相関は不明であった。また、肺ではそれらヒストン修飾の上昇は認められないことから、肝臓における化学物質の代謝などが関連していると考えられるが、これについては継続検討が必要である。

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（ γ -H2AX）の検出が可能であることが示されている。 γ -H2AX が高感度な 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 γ -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 γ -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。 γ -H2AX は DNA 損傷に対する細胞応答であるため、DNA 損傷を起因としない偽陽性検出の可能性がある。本年度は、昨年度の検討において偽陽性検出の可能性が示唆された DNA 損傷を誘導しない界面活性剤による γ -H2AX 誘導メカニズムについて検討し、 γ -H2AX の偽陽性出現の一機構について明らかにすることを目的とした。また、既に γ -H2AX の組織免疫化学的解析が行われている各種化学物質を投与したラット組織（肝臓、肺）からヒストンを抽出し、 γ -H2AX とヒストンアセチル化を解析し、 γ -H2AX の確認と同時に解析可能な他のヒストン修飾について模索した。

B．研究方法

B-1. 界面活性剤による γ -H2AX 誘導機構の検討

ヒト培養細胞株（A549 肺上皮細胞）に界面活性剤（linear alkylbenzene sulfonates (LAS))作用を行い、一定時間で培養した後、Western blotting 及び免疫蛍光染色法により、 γ -H2AX、deoxyribonuclease I（DNase I）、actin 変化を解析した。細胞分画は、Sucrose による高張液処理と遠心により行った。

Western blotting：細胞を回収後、ヒストン（核画分）を抽出、15% ゲルで SDS-PAGE を行い、PVDF 膜に転写した。一次抗体は、Rabbit anti-phospho-histone H2AX (Ser139) IgG (Merck Millipore Co.)、Rabbit anti-DNase I polyclonal IgG (Thermo Scientific)、Rabbit anti-actin polyclonal IgG (SantaCruz Biotech.)を用いた。二次抗体を反応後、ECL+ (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)を用いて検出した。

免疫蛍光染色法：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。一次抗体に Mouse anti-phospho-histone H2AX (Ser139) IgG, (Merck Millipore Co.)、Rabbit anti-DNase I polyclonal IgG を使用した。アクチン

は、Anti-stain TM555 fluoresceine phalloidin (Cytoskelton Inc.)で染色し、蛍光顕微鏡 (IX70, Olympus Co., Japan)で撮影を行った。

B-2. 化学物質投与ラット組織におけるヒストン修飾の解析法

同班の小川博士、豊田博士より、2-acetylaminofluorene(2-AAF), p-cresidine, dimethylarsenic acid(DMA), glycidol, N-nitrosodiethylamine(DEN), acrylamide(AA)を4週間投与したF344ラットから採取した肝臓、肺を譲り受けた。各組織 50-80mg からヒストンを抽出し、Western blottingにより解析を行った。検出バンドの解析にはImage J 1.46 (Broken Symmetry Software, USA)を使用した。使用したヒストンアセチル化検出抗体は以下のとおりである。

- Rabbit anti-acetyl-histone H3 (global) IgG
- Rabbit anti-acetyl-histone H3 (lys9) IgG
- Rabbit anti-acetyl-histone H3 (Lys14) IgG (いずれもMerck Millipore Co.)

C. 研究結果

C-1. 界面活性剤による γ -H2AX 誘導機構

界面活性剤(LAS)作用により、濃度依存的に γ -H2AX が誘導された。この誘導は、 $ZnCl_2$ やEGTAの前作用により阻害された(図1)。一方、一般的なDNA損傷剤である H_2O_2 による γ -H2AX は抑制しなかった。 $ZnCl_2$ やEGTAは、DNase Iの阻害剤であることが知られている。そこで、細胞を核と細胞質に分画してDNase Iの局在を調べたところ、界面活性剤作用後、DNase Iが核分画に検出された。さらに、DNase Iの核移行を免疫蛍光染色法により確認したところ、通常細胞質に存在するDNase Iが、界面活性剤作用と共に核に移行すること、その際、 γ -H2AXが誘導されることが示された(図2)。また、同時に、細胞骨格を構成し、DNase

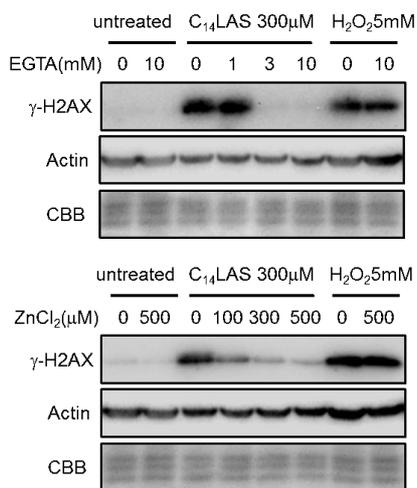


図1 $ZnCl_2$ とEGTAによるLAS誘導 γ -H2AXの抑制
LAS作用後に誘導される γ -H2AXは $ZnCl_2$ とEGTAにより抑制されるが、 H_2O_2 により誘導される γ -H2AXは抑制されない。

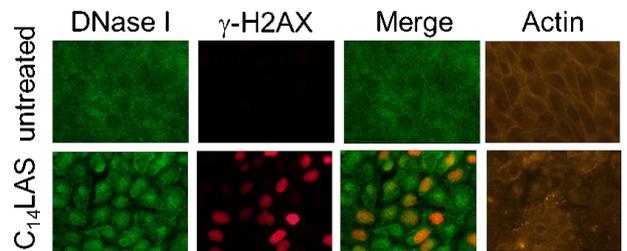


図2 LAS作用後のDNase Iの細胞内局在と γ -H2AX
界面活性剤LAS作用後、細胞質に存在したDNase Iは核に移行し、 γ -H2AXを誘導した。その際、LASによるActinの崩壊が確認された。

Iと共存しているアクチンの崩壊が観察された。

C-2. 化学物質投与ラット組織におけるヒストン修飾

化学物質投与ラットから採取した肝臓、肺からヒストンを抽出し、Western blottingにより、 γ -H2AX、ヒストンアセチル化(global, K9, K14)の解析を行った。

肝臓では、化学物質の種類によらず、H2AXがリン酸化される傾向が認められた。特に、DEN, AAで有意な上昇が認められた。また、ヒストンアセチル化(global)は、2-AAF, glycidol, AA、アセチル化(K9)は、DMA, glycidol, AA、アセチル化(K14)は、DMA, glycidol, DEN, AAで認められた。

一方、肺では、肝臓で検出されたヒストン修飾の変化はほとんど認められなかった。

D. 考察

D-1. 界面活性剤による γ -H2AX 誘導機構とDNA損傷性

界面活性剤により、DNase Iがアクチンから遊離し、核移行することが判明した。細胞核内に入ったDNase Iは、DNAを切断し、 γ -H2AXを誘導すると考えられた。これまで、 γ -H2AX誘導は、放射線や化学物質等により直接誘導されるDNA損傷に基づくと考えられてきたが、本研究で明らかになった γ -H2AX誘導は、化学物質による直接的なDNA損傷を反映していない。細胞骨格の損傷によるDNase I遊離によるDNA損傷、そして γ -H2AX誘導であり、これまで明らかになっていなかった機構である。

D-2. 化学物質投与ラット組織におけるヒストン修飾

肝臓において、 γ -H2AX、ヒストンアセチル化が観察された。しかしながら、 γ -H2AXは化学物質の種類に依存せず、全体的に高く、肝遺伝毒性を反映した結果とはならなかった。また、アセチル化においては、修飾部位により、上昇をさせる化学物質が異なっていたので、今後、さらに化学物質の種類を増やして解析していくことが必要と考えられた。

肺では化学物質投与後のヒストン修飾変化がほとんど認められなかった。ヒストンアセチル化において

は、肝臓における化学物質の代謝などが関係している可能性がある。肺に標的のある化学物質を使用して検討することにより、臓器によるこれら修飾の差異の理由が明らかになる可能性がある。

E . 結論

本研究班では、中・短期動物発がん評価の標的として、-H2AXの可能性を検討している。我々は、*in vitro*の実験において、これまで -H2AX が DNA 損傷を起因としない別の要因により検出される可能性を示唆してきた。本検討により、細胞骨格の崩壊により DNA を切断する酵素が遊離し、DNA 切断が起こり -H2AX が検出される場合があることを示した。本結果は、-H2AX 検出において、偽陽性を検出する可能性を示唆するものであり、それを考慮の上で *in vivo*, *in vitro* の両検討を行う必要がある。

in vivo の組織解析により、化学物質投与後、-H2AX だけでなく、ヒストンアセチル化も引き起こされることが示された。アセチル化は、遺伝子発現制御に重要なヒストン修飾であり、今後、*in vitro* での実験を含め、データを蓄積することにより、発がん評価の標的、または、-H2AX を補う評価対象として検討できる可能性を考えている。しかしながら、本年度の検討では、発がんとの相関が認められるデータは得られていないため、今後の継続検討が必要である。

G . 研究発表

1. 論文発表

- [1] X. Zhao, T. Toyooka, T. Kubota, G. Yang, Y. Ibuki. -H2AX induced by linear alkylbenzene sulfonates is due to deoxyribonuclease-1 translocation to the nucleus via actin disruption. *Mutat Res.* 777, 33-42 (2015).
- [2] Y. Ibuki, M. Shikata, T. Toyooka. -H2AX is a sensitive marker of DNA damage induced by metabolically activated 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butane. *Toxicol. in vitro.* 29, 1831-8 (2015).
- [3] X. Zhao, G. Yang, T. Toyooka, Y. Ibuki. New mechanism of -H2AX generation: Surfactant-induced actin disruption causes deoxyribonuclease I translocation to the

nucleus and forms DNA double-strand breaks. *Mutat Res.* 794, 1-7 (2015).

2. 学会発表

- [1] Yuko Ibuki: Histone modifications induced by chemicals and change of sensitivity to UV. 15th International Conference of Radiation Research (Kyoto), May 2015.
- [2] 豊岡達士, 伊吹裕子, 山口さち子, 王 瑞生: リン酸化ヒストン H2AX を指標とした化学物質遺伝毒性試験法構築に向けた基礎的検討. 第 43 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会 (南知多) 2015 年 10 月
- [3] 楊光, 伊吹裕子: タバコ副流煙暴露による紫外線 DNA 損傷修復の遅延とアルデヒド類の関連性. 第 44 回日本環境変異原学会 (福岡) 2015 年 11 月.
- [4] 荻野真宏, 豊岡達士, 伊吹裕子: 熱ストレスによるヒストン H2AX のリン酸化とその機構. 第 44 回日本環境変異原学会 (福岡) 2015 年 11 月.
- [5] 豊岡達士, 伊吹裕子, 山口さち子, 王 瑞生: リン酸化ヒストン H2AX を指標とした化学物質遺伝毒性評価手法構築に関する基礎的検討. 第 44 回日本環境変異原学会 (福岡) 2015 年 11 月.
- [6] 楊光, 伊吹裕子: タバコ副流煙はヒト皮膚細胞の紫外線感受性を亢進させる. 富士山麓アカデミック&サイエンスフェア (富士) 2015 年 12 月.
- [7] 荻野真宏, 豊岡達士, 伊吹裕子: DNA 損傷能を有さない熱ストレスがなぜ -H2AX を誘導するか? 富士山麓アカデミック&サイエンスフェア (富士), 2015 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

該当なし

2 . 実用新案登録

該当なし

3 . その他

該当なし