

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（-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、これまでに偽陽性検出の可能性が示唆されている化学物質による -H2AX 誘導について明らかにすることが必要である。そこで DNA 損傷を誘導しない界面活性剤による -H2AX 誘導機構について昨年度に引き続き検討を行った。その結果、界面活性剤による -H2AX 誘導は、細胞骨格アクチンからの deoxyribonuclease I (DNase I) の遊離、核移行による DNA 切断に起因することが確認された。また、DNase I の核内移行を視覚化することができた。さらに、界面活性剤だけでなく、熱ストレスも同様に DNase I の遊離、核移行による -H2AX を誘導する可能性が示された。また、昨年度に引き続き、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 -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）からヒストンを抽出し、-H2AX ならびにヒストン H3 アセチル化を解析した。一部の化学物質で -H2AX、ヒストン H3 アセチル化の変化が認められたが、化学物質の肝発がん性や傷害性との相関は不明であった。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（-H2AX）の検出が可能であることが示されている。-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 -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 -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。-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、これまで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ならびに熱ストレスによる -H2AX 誘導機構について検討し、-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 -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）からヒストンを抽出し、-H2AX とヒストン H3 アセチル化を解析し、-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の模索を継続検討した。

B. 研究方法

B-1. 界面活性剤 NPEO による -H2AX 誘導機構の検討
ヒト培養細胞株（MCF7 ヒト乳がん細胞）に界面活

性剤 (nonylphenol polyethoxylate (NPEO)) 作用を行い、一定時間で培養した後、Western blotting および免疫蛍光染色法により、-H2AX、deoxyribonuclease I (DNase I)、actin 変化を解析した。

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.) 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 (Cytoskeleton 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

同班の鈴木博士より、methyl nitrosourea (MNU), 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB), dimethyl nitrosoamine (DMN), dimethyl hydrazine (DMH) を 4 週間投与した F344 ラットから採取した肝

臓を譲り受けた。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 NPEO による γ -H2AX 誘導機構

昨年度までに、陰イオン界面活性剤 (linear alkylbenzene sulfonates : LAS) 作用により、濃度依存的に γ -H2AX が誘導されることを明らかにし、その機構について検討してきた。本年度は、非イオン界面活性剤である NPEO による γ -H2AX の誘導とその機構について解析した。NPEO により γ -H2AX が誘導され、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 UVB や H_2O_2

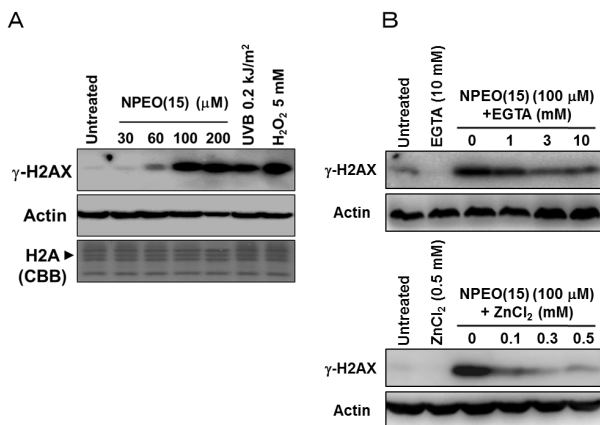


図1 NPEO作用後の γ -H2AXの誘導

A: NPEO(15)作用後の γ -H2AXの誘導

B: EGTA, $ZnCl_2$ による γ -H2AXの誘導の阻害

による γ -H2AX は $ZnCl_2$ や EGTA では抑制されなかった。 $ZnCl_2$ や EGTA は、DNase I の阻害剤であることが知られている。そこで、DNase I の挙動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、NPEO 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)。同時に、細胞骨格を構成し、DNase I と共存しているアクチンの崩壊が観察された。

また、熱ストレス作用後の γ -H2AX 誘導機構についても検討を行った。データは示さないが、界面活性剤作用による DNase I 遊離と同様のメカニズムで、熱ストレス作用後の γ -H2AX が誘導されることが明らかになりつつある。

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からヒストンを抽出し、Western blotting により、 γ -H2AX、ヒストン H3 アセチル化 (global, K9, K14) の解析を行

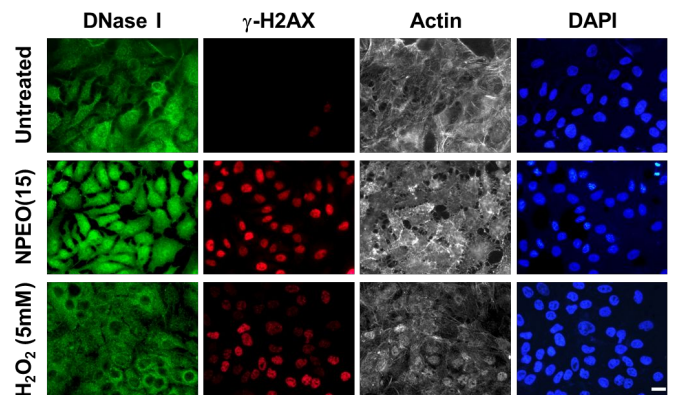


図2 NPEO作用後のDNase Iの核移行

った。

一部の化学物質で γ -H2A が上昇する傾向が認められたが有意ではなかった。DMN, DMH 投与により、ヒストン H3 アセチル化の変化が認められたが、化学物質の肝発がん性や傷害性との相関は不明であった。この変化の意義についてはさらなる検討が必要である。

D. 考察

D-1. 界面活性剤 NPEO や熱ストレスによる γ -H2AX 誘導機構と DNA 損傷性

昨年度示した LAS と同様に NPEO 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、界面活性剤は、その種類には依存せず、DNase I の遊離が γ -H2AX 誘導を引き起こすことが示された。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 損傷に基づくとされてきたが、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。同じように、DNA 損傷性を有していない熱ストレスも同様の機構で γ -H2AX 誘導を引き起こすことも予備的データではあるが示唆され、新しい DNA 損傷機構が明らかになりつつある。

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、化学物質投与後にヒストン H3 アセチル化変化が観察された。特に、肝発がん物質である DMN 作用後の高アセチル化は興味深い。その理由づけにまでは至らなかった。さらに、 γ -H2AX が誘導されると考えた化学物質において、それが検出できないなど、不明な点が多く残されている。今回のヒストン抽出方法では、肝臓の採取部分を限定していないため、クリアなデータが得られなかったのではと考えられる。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と、採取部位を制限することが必要と考えられた。

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、昨年度明らかにした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が検出される系の存在を確定することができた。本結果は、-H2AX検出において、そのメカニズムを考慮の上で *in vivo*, *in vitro* の両検討を行う必要があることを示唆している。

*in vivo*の組織解析では、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。

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] X. Zhao, F. Takabayashi, Y. Ibuki. Coexposure to silver nanoparticles and ultraviolet A synergistically enhances the phosphorylation of histone H2AX. J. Photochem. Photobiol. B 162, 213-222 (2016).
- [2] 伊吹裕子 化学物質によるヒストン修飾と遺伝毒性 Bio Clinica 31(5) 93-96 (2016).

2. 学会発表

- [1] 楊光, 伊吹裕子: たばこ副流煙によるヌクレオチド除去修復の遅延. 日本光医学光生物学会 第38回年会(京都) 2016年7月.
- [2] 楊光, 伊吹裕子: タバコ副流煙によるヌクレオチド除去修復の遅延とカルボニル類の関与. 第29回変異原機構研究会(愛知) 2016年9月.
- [3] 趙曉旭, 伊吹裕子: 各種金属ナノ粒子によるヒストン修飾変化とその誘導メカニズムの検討. 第45回日本環境変異原学会(つくば) 2016年11月.
- [4] 楊光, 伊吹裕子: 飽和/不飽和アルデヒド類によるヌクレオチド除去修復の阻害. 第45回日本環境変異原学会(つくば) 2016年11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