ミニ特集 環境発がんと衛生～ヒ素研究の視点から～

無機ヒ素によるマウス肝がん増加に関連したエピジェネティック変化と DNA メチル化マーカーの探索

鈴木 武博, 野原 恵子

国立研究開発法人国立環境研究所環境健康研究センター

Exploration of Epigenetic Changes and DNA Methylation Markers Associated with Liver Tumors Induced by Inorganic Arsenite Exposure in Mice

Takehiro SUZUKI and Keiko NOHARA

Center for Environmental Health Sciences, National Institute for Environmental Studies

Abstract Naturally occurring inorganic arsenic is known to increase the risk of cancers of the skin and several other organs, including the urinary bladder, lung, and liver. Epidemiological studies have also indicated that gestational arsenic exposure is associated with increased incidences of cancers in several organs, including the bladder and liver, in adulthood. Previous studies have shown that epigenetic changes are involved in arsenic-induced carcinogenesis. Among epigenetic changes, DNA methylation changes that are specific to arsenic-induced tumors would be useful for distinguishing such tumors from tumors induced by other factors and for clarifying arsenic carcinogenesis. It has been reported that gestational arsenic exposure of C3H mice, whose males tend to spontaneously develop liver tumors, increases the incidence of tumors in the male offspring. Using the same experimental protocol, we found a number of regions where the DNA methylation status was altered in the liver tumors compared with the normal liver tissues by the methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP)-CpG island microarray method. Among such regions, we demonstrated using real-time methylation-specific PCR and bisulfite sequencing that a gene body region of the oncogene *Fosb* underwent alteration in DNA methylation following gestational arsenic exposure. We also showed that the *Fosb* expression level significantly increased following gestational arsenic exposure. These findings suggest that the DNA methylation status of the *Fosb* region is implicated in tumor augmentation and can also be utilized for characterizing tumors induced by gestational arsenic exposure.

Key words: arsenic (ヒ素), maternal exposure (妊娠期曝露), cancer (がん), liver (肝臓),
DNA methylation (DNA メチル化), histone modification (ヒストン修飾)

はじめに

ヒ素およびヒ素化合物は国際がん研究機関がグループ
1 (人に対して発がん性のある物質) に分類する発がん

物質である。世界保健機関 (WHO) は、環境基準として飲料水中のヒ素濃度は 10 ppb 以下であることを推奨しているが、1 億人をこえる人々が環境基準をこえる濃度のヒ素を含む飲料水を飲んでいるという試算もある (1)。特に、中国、インド、バングラデシュをはじめとした東南アジアでは、天然由来の無機ヒ素の摂取による慢性中毒が発生し、大きな環境問題となっている。無機ヒ素の連続的な摂取による主な症状は皮膚疾患で、後発的には各種臓器における発がんを増加させることが疫学研究によって明らかにされている (2)。さらに、胎児期から小児期にヒ素を摂取すると、成人後に各種臓器にお

受付 2015 年 1 月 29 日, 受理 2015 年 2 月 4 日
Reprint requests to: Takehiro SUZUKI
Center for Environmental Health Sciences, National Institute for
Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506,
Japan
TEL & FAX: +81(29)850-2237
E-mail: suzuki.takehiro@nies.go.jp

ける発がんを増加させることも疫学研究により明らかとなっている (3)。しかしながら、ヒ素は変異原性が低いと報告されているため、その発がん誘導メカニズムについては不明な部分が多い。近年、ヒ素による発がんにはエピジェネティックなメカニズムの関与が示唆されている。本稿では、エピジェネティクスとは何かを簡単に述べ、筆者らがやっているエピジェネティックな実験的手法、および、ヒ素による発がんに関わるエピジェネティック作用の実験的研究の結果について紹介したい。

エピジェネティックなメカニズム

「エピジェネティクス」とは、DNA の塩基配列の変化をとまわずに、染色体における変化によって生じる、安定的に受け継がれる表現型と定義されており、多くの環境因子の影響を受けやすいことが報告されている。「エピジェネティック」とは、エピジェネティクスという現象が関与する、という意味の形容詞である。したがって、エピジェネティックなメカニズムとは、エピジェネティクスを制御する分子機構であり、主にヒストン修飾 (アセチル化、脱アセチル化、複雑なメチル化) と DNA メチル化を指すことが多い。

1. ヒストン修飾

ゲノム DNA はヒストンに巻き付いた状態で核内に収納されている (この構造をクロマチンという)。ヒストンの N 末端部分がアセチル化、メチル化、リン酸化やユビキチン化などの修飾を受けると、クロマチン構造が変化し、DNA と転写因子などの核内因子との接近のしやすさが変化し、遺伝子の発現制御が可能となる。アセチル化は遺伝子発現の活性化に関与する。またメチル化については、メチル化を受けるリジンの位置が遺伝子の発現制御に重要であることが明らかになっている。たとえば、ヒストン H3 のアミノ末端から 9 番目のリジンのジメチル化・トリメチル化 (H3K9me2・H3K9me3 のように表記する) や H3K27me3 は遺伝子発現の抑制に関与し、H3K4me3 や H3K36me3 は遺伝子発現の活性化に関与する。ヒストンのアセチル化酵素や脱アセチル化酵素、特定の位置のヒストンメチル化酵素や脱メチル化酵素が同定されている (4)。

2. DNA メチル化

DNA 中のシトシン (C) の次にグアニン (G) が続く CG 配列の C の 5 位がメチル化され、5 メチルシトシンになることを DNA のメチル化という。哺乳類においては、メチル化されたテンプレート DNA 鎖をもとに相補鎖の対応する位置にメチル基を導入する DNMT1、およびメチル化されていない DNA 鎖に新たにメチル基を導入する DNMT3a と DNMT3b という 3 種類の DNA メチル基転移酵素 (DNMT) が存在し、DNA メチル化を担当する。一方、DNA の脱メチル化は、受動的脱メチル

化と、能動的脱メチル化が報告されている。能動的脱メチル化は、Tet というタンパク質が 5 メチルシトシンを 5 ヒドロキシメチルシトシンに変換し、その後連続的な酸化反応により行われることが近年明らかにされた (5, 6)。CG 配列が密に存在する領域を CpG island とよぶが、一般に、遺伝子プロモーター領域の CpG island がメチル化されると、その遺伝子の発現は抑制される。

DNA メチル化マーカー

DNA メチル化は安定した修飾であり、DNA 自体も RNA やタンパク質に比べると非常に安定しているためサンプルとして使用することが容易である。また、DNA メチル化変化は突然変異よりも頻度が高く、誘発要因や組織により特異的で蓄積性があることから、疾患のマーカーとしての応用が期待されている (7)。特にがんの分野においては研究が盛んで、肺がんや胃がんをはじめとして様々ながんに対応する DNA メチル化マーカーが報告されている。DNA がメチル化しているかしていないかだけではなく、DNA メチル化の程度 (DNA メチル化の割合; DNA メチル化率) も重要であることがわかってきている。たとえば、ピロリ菌に感染した胃炎を持ったヒトは胃がんになるリスクが高いことが知られているが、ピロリ菌に感染したヒトの胃では、ピロリ菌に感染していないヒトの胃に比べて多くの領域で DNA メチル化異常が観察されており、胃がんの重症度が高いヒトは、DNA メチル化の割合も高いことが報告されている (8, 9)。さらに、胃がんからのリンパ節転移の有無で DNA メチル化が変化する領域も同定されている (10)。このような、DNA メチル化異常の検出を、がんの診断・治療に応用する試みも行われている (11)。

DNA メチル化解析法

DNA メチル化の解析方法には、ゲノム全体の DNA メチル化を一度に解析する網羅的解析法と、特定領域の DNA メチル化を解析する方法がある。最近のエピジェネティクスに関わる研究では、次世代シーケンサーを用いた網羅的な解析が主流となりつつある (12)。特定領域の DNA メチル化解析にもさまざまな手法があり (13)、データの精度を高めるためにも、網羅的解析と特定領域の解析を組み合わせることが重要である。ここでは、筆者らがメチル化解析に使用している主な実験手法について簡単に紹介する。

1. 網羅的 DNA メチル化解析

筆者らは、Methylated DNA Immunoprecipitation (MeDIP)-Seq 法や、MeDIP-CpG island microarray 法を用いている。MeDIP とは、ゲノム DNA を断片化したのち、抗 5 メチルシトシン抗体で免疫沈降し、メチル化した領域を回収する方法である。その後、次世代シーケンサーによる

マッピング,あるいは,CpG island のプローブのみを搭載したアレイを用いることで,ゲノム中の DNA メチル化を網羅的に解析することができる。たとえば,アジレント・テクノロジーのマウス CpG island マイクロアレイでは,マウスゲノム中の約 16,000 か所の全 CpG island が解析可能である。

2. 特定領域の DNA メチル化解析

特定領域の DNA メチル化解析は,最初のステップとして,バイサルファイト処理が必要である (図 1)。バイサルファイトで DNA を処理すると,シトシンはウラシルに変換されるが,メチル化されたシトシンは変換されない。したがって,バイサルファイト処理したゲノム配列を決定し,もとの配列と比較することで,どのシトシンがメチル化されているかを区別することができる。また,バイサルファイト処理後の DNA をテンプレートとして PCR を行う場合,プライマーの位置やアニーリングの温度条件によっては,メチル化されている配列が増幅されやすい,あるいは,メチル化されていない配列が増幅されやすいといった PCR バイアスがかかる場合がある。この PCR バイアスをできる限り最小にするために,完全メチル化 DNA と完全非メチル化 DNA をバイサルファイト処理したコントロール DNA を用いて,適切な PCR 条件を決定することが重要である (図 1)。

1) メチル化特異的 PCR (Methylation specific PCR, MSP)

バイサルファイト処理した DNA を鋳型にして,完全メチル化 DNA の配列に対応した M プライマーと,完全非メチル化 DNA の配列に対応した U プライマーを用いて PCR を行い,バンドの有無で簡便にメチル化状態を調べることができる手法である。コントロール DNA をスタンダードに用いてリアルタイム PCR を行えば,メ

チル化状態を定量的に評価できる。プライマーの詳細な設計方法は,別の著書を参照されたい (14)。

2) バイサルファイトシーケンス

バイサルファイト処理した標的配列 DNA を組み込んだプラスミドを大腸菌にトランスフォームしてクローニングし,個別の CpG がメチル化シトシンかあるいは非メチル化シトシンかを決定できる手法である。個別 CpG のメチル化状態の定量をするためには,複数のクローンを作成して得られたデータをまとめなければならないため多大な労力が必要となるが,メチル化状態を確実に決定できる手法である。能動的脱メチル化に関与する 5 ヒドロキシメチルシトシン (5hmC) と 5 メチルシトシンは,バイサルファイトシーケンスでは区別できない。5hmC を区別するためには,5hmC をグルコシル化したのち, Tet1 により 5 メチルシトシン (5mC) のみをカルボキシル化する方法 (TAB-Seq) などが使用される (15)。

3) パイロシーケンス

DNA 合成の際に生成する ATP とルシフェリンの反応を利用し, DNA メチル化率を測定する手法である。複数のバイサルファイト反応したサンプル DNA において, 70–300 bp までの標的配列を PCR で増幅し, その配列中に含まれる 30 bp 程度の領域中の複数の CpG メチル化率を簡便に定量することができる。キアゲンのパイロシーケンサーの場合,メチル化率はソフトウェアにより自動的に解析される。しかし,PCR プライマーや PCR のアニーリング温度条件により,PCR バイアスがかかり,実際のメチル化率とは異なる結果が得られる可能性があるため,精度の高い定量が可能な測定条件を確立することが最も重要である。

a) バイサルファイト反応による塩基変換

b) PCR バイアスの例 (模式図)

図 1 バイサルファイト反応による塩基変換と PCR バイアスの例

ヒ素による発がんに関連する実験系と エピジェネティック作用

ヒ素による発がんとはエピジェネティック作用の関連を調べる *in vivo* の実験系として、AJ マウスという肺がんを発症しやすいマウスを用いた実験系が報告されている。この研究では、オスの AJ マウスにヒ素を含む水を 18 か月間自由に摂取させると、対照群と比較して 1 個体あたりの肺の腫瘍数が増加し、腫瘍部においてがん抑制遺伝子である *p16^{ink4a}* と *Rassf1a* のプロモーター領域の DNA メチル化が増加し、それぞれの遺伝子の発現が抑制される (16)。この結果からは、DNA メチル化の変化が腫瘍の原因と考えられるが、腫瘍が生じた結果 DNA メチル化が変化している可能性も考えられるため、DNA メチル化変化が腫瘍の原因か結果かどうかは不明であった。筆者らは、オスの C57BL/6 マウスにヒ素を含む水を 6 か月間自由に摂取させる実験系において、ヒ素により正常な肝臓組織においても *p16^{ink4a}* の発現が減少することを明らかにした。このとき、*p16^{ink4a}* プロモーター領域において、DNA メチル化状態は変化していなかったが、遺伝子発現の抑制に関与するヒストン H3K9 ジメチル化の増加と、ヒストン H3K9 メチル化酵素である G9a のリクルートが増加することを明らかにした (17)。この結果は、ヒ素は正常な肝臓においてもヒストン修飾を変化させることができることを示し、ヒストン修飾変化の結果として、がん抑制遺伝子の働きが抑制されることが腫瘍発症の促進に関与する可能性を示唆している。

一方、アメリカの Waalkes らグループは、オスが肝臓腫瘍を発症しやすい系統である C3H マウスを用いた実験系で、ヒ素による発がんメカニズムの検討を行った。この研究においては、C3H マウスの妊娠 8 日から 18 日の 10 日間のみ 85 ppm の亜ヒ酸ナトリウム (NaAsO_2) を含む水を自由に摂取させると、生まれたオスの仔が 74 週令において、対照群と比較して肝臓腫瘍の発症率が増加することを報告している (18)。この肝臓腫瘍の発症率が増加する現象のメカニズムとしては、妊娠期ヒ素曝露によって仔の肝臓でエストロゲンレセプター α (*ERa*) 遺伝子のプロモーター領域の DNA 低メチル化と

ERa の発現増加が起こり、その結果、エストロゲンシグナル伝達系が亢進しがんが促進される、というエピジェネティック作用の関与を報告している (19)。

筆者らは、上記の Waalkes らの実験系において、妊娠中の C3H マウスへのヒ素の投与がどのようなメカニズムで成長後に腫瘍を増加させるのかについて研究を行っている。筆者らの研究では、妊娠期ヒ素曝露群において成長後に肝臓腫瘍が増加することは確認できたが、*ERa* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化変化は観測されなかった (20)。したがって、妊娠中のヒ素投与により仔の肝臓腫瘍が増加するメカニズムとしては、*ERa* のプロモーター領域 DNA 低メチル化以外の他の要因が関与することが考えられた。筆者らは現在までに、がん遺伝子 *Ha-ras* の変異が関与する可能性を示している (20)。さらに興味深いことに、筆者らは、妊娠中の C3H マウスへのヒ素の投与が孫の世代まで成長後に肝臓腫瘍を増加させることを見出した (野原他, フォーラム 2014 衛生薬学・環境トキシコロジー要旨集 p31, 2014)。この現象についてもメカニズム解明のため、遺伝子発現変化や突然変異などに着目し、次世代シーケンサーなどを用いた網羅的な解析を開始している。

DNA メチル化解析については、ヒ素による肝臓腫瘍に特異的な DNA メチル化マーカーを探索する目的で、妊娠中にヒ素投与した C3H マウスの仔の成長後に増加した肝臓腫瘍において、腫瘍で DNA メチル化が大きく変化するといわれている CpG island に特化した microarray を用いた網羅的な解析を行った。これまでに、MeDIP-CpG island microarray, リアルタイム MSP, 及びバイサルファイトシーケンセスにより、がん遺伝子として知られている *Fosb* 遺伝子の遺伝子領域内部の DNA メチル化が、対照群の肝臓腫瘍と比較して、ヒ素曝露群の肝臓腫瘍で、有意に高いことを明らかにした (図 2)。これらの結果から、*Fosb* の DNA メチル化は、ヒ素が原因で発症した腫瘍とその他の要因で発症した腫瘍を区別できる DNA メチル化マーカーになる可能性が示唆された (21)。また、遺伝子発現解析の結果、ヒ素曝露群の肝臓腫瘍における *Fosb* 遺伝子の発現が、対照群とヒ素曝露群の他の組織 (正常肝臓、腫瘍がある肝臓の非腫瘍部) よりも約 10 倍高いことが明らかになり (図 2), *Fosb* の

a) *Fosb* 領域の DNA メチル化変化

b) *Fosb* の遺伝子発現変化

図 2 妊娠期ヒ素曝露により発症した腫瘍における DNA メチル化変化と遺伝子発現変化 (文献 21 より改変)

発現増加は、妊娠期ヒ素曝露で肝臓腫瘍が増加するメカニズムに関与する可能性が考えられた (21)。

おわりに

エピジェネティック作用の重要な特徴の一つに、化学物質の曝露や生活環境など、環境要因の変化が反映されやすいことが挙げられる。DNA メチル化変化は、すでに疾患のマーカーとして診断や治療への応用が開始されているが、環境要因変化のマーカーとしての応用可能性も期待されている。現在、筆者らは、バングラデシュの研究者との共同研究において、ヒ素曝露の DNA メチル化マーカーを探索する目的で、ヒ素汚染地域と非汚染地域の住民の血液ゲノム DNA の特定領域のメチル化変化と、飲水中のヒ素濃度、生体中のヒ素濃度、その他の因子とに関連があるかどうかの検討を開始している。予備的な検討においては、血液ゲノムの特定領域の DNA メチル化と、飲水中や生体中のヒ素濃度に有意な関連があることを明らかにしているが、さらに検体数を増やし、疾患との関連も含めて詳細な解析を行う予定である。今後、環境要因の変化が誘導した疾患の治療や予防につながるような新たな DNA メチル化変化領域を探索し、DNA メチル化変化に着目した疾患メカニズムの解明に貢献していきたいと考えている。

謝 辞

本研究の一部は、科学研究費補助金 (233390166, 24790600, 23790680, 25460831) の助成を得て行われた。

利益相反なし

文 献

- (1) World Health Organization. United Nations Synthesis Report on Arsenic in Drinking Water, Geneva, 2001.
- (2) Hughes MF, Beck BD, Chen Y, Lewis AS, Thomas DJ. Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. *Toxicol Sci* 2011;123:305–332.
- (3) Smith AH, Marshall G, Liaw J, Yuan Y, Ferreccio C, Steinmaus C. Mortality in young adults following in utero and childhood exposure to arsenic in drinking water. *Environ Health Perspect* 2012;120:1527–1531.
- (4) Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 2011;21:381–395.
- (5) Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 2009;324:930–935.
- (6) Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, et al. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 2011;333:1300–1303.
- (7) Ushijima T, Asada K. Aberrant DNA methylation in contrast with mutations. *Cancer Sci* 2010;101:300–305.
- (8) Maekita T, Nakazawa K, Mihara M, Nakajima T, Yanaoka K, Iguchi M, et al. High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clin Cancer Res* 2006;12:989–995.
- (9) Nakajima T, Maekita T, Oda I, Gotoda T, Yamamoto S, Umemura S, et al. Higher methylation levels in gastric mucosae significantly correlate with higher risk of gastric cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:2317–2321.
- (10) Shigematsu Y, Niwa T, Yamashita S, Taniguchi H, Kushima R, Katai H, et al. Identification of a DNA methylation marker that detects the presence of lymph node metastases of gastric cancers. *Oncol Lett* 2012;4:268–274.
- (11) Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer* 2003;3:253–266.
- (12) Michels KB, Binder AM, Dedeurwaerder S, Epstein CB, Greally JM, Gut I, et al. Recommendations for the design and analysis of epigenome-wide association studies. *Nat Methods* 2013;10:949–955.
- (13) Laird PW. Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis. *Nat Rev Genet* 2010;11:191–203.
- (14) 牛島俊和, 眞貝洋一 (編) エピジェネティクス実験プロトコール. DNA メチル化とヒストン修飾を網羅的・領域特異的, 定量的に解析する実験手法のすべて. 2008, 48–61.
- (15) Yu M, Hon GC, Szulwach KE, Song CX, Zhang L, Kim A, et al. Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian genome. *Cell* 2012;149:1368–1380.
- (16) Cui X, Wakai T, Shirai Y, Hatakeyama K, Hirano S. Chronic oral exposure to inorganic arsenate interferes with methylation status of p16INK4a and RASSF1A and induces lung cancer in A/J mice. *Toxicol Sci* 2006;91:372–381.
- (17) Suzuki T, Nohara K. Long-term arsenic exposure induces histone H3 Lys9 dimethylation without altering DNA methylation in the promoter region of p16(INK4a) and down-regulates its expression in the liver of mice. *J Appl Toxicol* 2013;33:951–958.
- (18) Waalkes MP, Ward JM, Liu J, Diwan BA. Transplacental carcinogenicity of inorganic arsenic in the drinking water: induction of hepatic, ovarian, pulmonary, and adrenal tumors in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003;186:7–17.
- (19) Waalkes MP, Liu J, Chen H, Xie Y, Achanzar WE, Zhou YS, et al. Estrogen signaling in livers of male mice with hepatocellular carcinoma induced by exposure to arsenic in utero. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:466–474.
- (20) Nohara K, Tateishi Y, Suzuki T, Okamura K, Murai H, Takumi S, et al. Late-onset increases in oxidative stress and other tumorigenic activities and tumors with a Ha-ras mutation in the liver of adult male C3H mice gestationally exposed to arsenic. *Toxicol Sci* 2012;129:293–304.
- (21) Suzuki T, Yamashita S, Ushijima T, Takumi S, Sano T, Michikawa T, et al. Genome-wide analysis of DNA methylation changes induced by gestational arsenic exposure in liver tumors. *Cancer Sci* 2013;104:1575–1585.