

筑波大学審査学位論文（博士）

論文題目：無機ヒ素曝露によるリンパ球の G0/G1 期停止とセネッセンスの機序

生命環境科学研究科 持続環境学専攻

岡村 和幸

<論文要約>

今日我々を取り巻く環境には様々な形でヒ素が存在し、特に無機ヒ素を含む地下水を飲料水とする地域において、慢性ヒ素中毒が広がっている。慢性ヒ素中毒による症状としては、皮膚の角化症や肺がん、肝臓がん、糖尿病などと共に免疫抑制が報告されているが、それらの分子機序については十分に明らかにされていない。

当研究室では、無機ヒ素による免疫抑制の機序について、リンパ球の増殖抑制に着目して研究を行っている。当研究室のこれまでの研究において、無機ヒ素である亜ヒ酸ナトリウムを、C57BL/6 マウスに投与またはマウス B リンパ腫細胞株 A20 細胞に 24 時間曝露すると、リンパ球において、細胞周期を制御する転写因子 E2F に依存した G0/G1 期停止による細胞増殖抑制がおこることを報告している。その際、E2F 依存的な G0/G1 期の進行を抑制する Rb ファミリータンパク質である p130 が、mRNA の発現増加を介さずに増加することを明らかにした。そこで本研究では、A20 細胞において無機ヒ素曝露による p130 増加の機序の検討を行った。さらに長期無機ヒ素曝露においてもリンパ球増殖への影響を検討した。

p130 増加の機序として、リン酸化・ユビキチン化を介したプロテアソーム分解の経路に着目した。無機ヒ素曝露によって増加した p130 は、MG-132 でプロテアソーム分解のみを阻害した場合と比較して、リン酸化およびユビキチン化が低下していることが認められた。このことから、無機ヒ素曝露による p130 の増加は、リン酸化阻害によるプロテアソーム分解の抑制により引き起こされることが考えられた。次に、p130 のリン酸化を制御する cdk4 と複合体を形成し、cdk4 の活性を阻害するサイクリン依存性キナーゼインヒビター (CDKI) に着目した。その結果、CDKI の 1 つである p16 タンパク質が無機ヒ素曝露により増加することが明らかになった。さらに、無機ヒ素曝露により増加した p16 は低リン酸化体であり、この低リン酸化体の p16 が cdk4 と複合体をつくることが明らかになった。p16 を siRNA でノックダウンすると p130 のタンパク質量が減少したことから、p16 は p130 量を調節する上流の因子であることを確認した。以上のことから、無機ヒ素は低リン酸化体の p16 を増加させ、低リン酸化体の p16 が cdk4 と複合体を形成することによって、p130 のリン酸化を阻害し、その結果プロテアソーム分解が抑制されることによって p130 が蓄積し、蓄積した p130 が G0/G1 期停止をおこすという、無機ヒ素による細胞増殖抑制の新規機序を見出した。

次に、A20 細胞に対する最大 14 日間の長期無機ヒ素曝露の影響を 24 時間曝露の場合と比較・検討した。その結果、長期無機ヒ素曝露をした細胞では、p130 がより顕著に増加し、G0/G1 期停止が亢進することが明らかとなった。さらに、長期無機ヒ素曝露し

た細胞では、培地から無機ヒ素を除いた際に細胞増殖の回復が遅れ、細胞の巨大化や扁平化といった形態学的な変化をおこすことが明らかとなった。これらの特徴は不可逆的な細胞増殖抑制であるセネッセンスと一致しており、セネッセンスのマーカである SA- β gal 活性も検出された。このことから長期無機ヒ素曝露によって、リンパ球でセネッセンスがおこることが新たに明らかになった。セネッセンスは DNA 損傷の蓄積により誘導されることが報告されていたため、DNA 損傷修復経路の遺伝子発現を検討したところ、DNA 損傷を誘導する *Aid*、*Apobec1* の発現量が顕著に増加し、DNA 損傷を修復する多くの遺伝子の発現が減少することが明らかとなった。これらの結果から、長期無機ヒ素曝露はリンパ球において DNA 損傷を蓄積し、セネッセンスを誘導する可能性が示された。

以上の結果より、本研究では短期および長期の無機ヒ素曝露によるリンパ球の細胞増殖抑制の新規機序を明らかにした。