

論 文 要 旨

Effect of myeloperoxidase inhibition on gene expression profiles in HL-60 cells exposed to 1, 2, 4,-benzenetriol

ベンゼントリオール暴露 HL-60 細胞における
遺伝子プロファイルへのミエロペルオキシダーゼ阻害の影響

宮 原 恵 弥 子

【序論および目的】

ベンゼンは石油化学産業の現場で広く用いられており、ガソリンの排気やタバコの煙などにも存在する。ベンゼンはヒトにおいて急性骨髄性白血病を引き起こすことが知られているが、その機序は未だ不明である。我々はベンゼン代謝物の一つである 1, 2, 4-benzenetriol (BT) がヒト骨髄由来細胞株 (HL-60) において過酸化水素 (H_2O_2) などの活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の産生を誘導し、その H_2O_2 が骨髄系細胞特異的に発現している myeloperoxidase (MPO) の働きにより、強力な ROS である次亜塩素酸 (HOCl) に代謝され、DNA 損傷の一つであるハロゲン化 DNA を生じる事を報告した。MPO が骨髄細胞におけるベンゼン毒性において重要な役割を果たしているという見地から、ベンゼンの骨髄毒性と MPO の関係をさらに明らかにするため HL-60 細胞にベンゼン代謝物の中で最も酸素と強く反応し DNA に酸化的損傷を引き起こす BT を曝露し MPO 阻害下、非阻害下における遺伝子の発現変動及びアポトーシスの誘導を解析した。

【材料および方法】

MPO に特異的な阻害剤である 4-aminobenzoic acid hydrazine (ABAH) を処理、非処理の HL-60 細胞に 50 μ M の BT を曝露し 1 時間、4 時間後の遺伝子発現を SurePrint G3 Human Gene Expression Microarray 8 \times 60K v2 チップを用いたマイクロアレイ法で網羅的に解析した。その結果を基に解析ソフト Database for annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) を使い、Gene Ontology (GO) 及び KEGG Pathway 解析を行った。統計学的解析は Fisher's exact test により $p < 0.05$ を有意とみなした。さらにマイクロアレイの結果を検証するために KEGG pathway 解析で最も発現上昇が見られた上位 20 遺伝子の発現を Real time PCR で確認した。

HL-60細胞のMPOを ABAHあるいはsiRNAで阻害後、BTに8 時間曝露し、アポトーシスの誘導をAnnexin V及びpropidium iodideの二重染色によりフローサイトメトリーで測定した。MPOを発現していないヒトリンパ球細胞株 (U937) においても同様にアポトーシスの誘導を評価した。統計

学的解析はnon-parametric Wilcoxon testを行い $p < 0.05$ を有意とみなした。

【結 果】

50,599 遺伝子の発現変動データを基に解析を行った。BT 曝露 1 時間で 1214、4 時間曝露では 1213 遺伝子もの発現変動が確認された（1 時間及び 4 時間後の発現促進遺伝子数はそれぞれ 751、817、また発現抑制遺伝子数はそれぞれ 463、396、 $|Z\text{-score}| > 2.0$ ）。GO 及び KEGG Pathway 解析の結果、アポトーシス、抗アポトーシス、細胞増殖、炎症、細胞周期関連遺伝子の発現が BT 曝露により有意に上昇していた。しかし、MPO を阻害しただけで、これら遺伝子の発現増多は劇的に抑制された。

MPO を阻害した HL-60 細胞、MPO 未発現の U937 細胞において、BT 曝露によるアポトーシスの有意な誘導は起こらなかった。

【結論及び考察】

骨髄細胞に対するベンゼン毒性において MPO の役割を明らかにするために HL-60 細胞の遺伝子発現特性の解析を行った。これまで BT 以外のベンゼン代謝物曝露においてアポトーシス、細胞増殖、細胞死関連遺伝子の発現が変動したという報告はあったが（Sarma et al., Environ Toxicol Pharmacol., 2011）、BT 曝露ではさらに抗アポトーシス、炎症、細胞周期関連遺伝子の発現も有意に上昇していた。

BT は ROS を産生し（Kawanishi et al., Cancer Res., 1989）、ROS は MAPK シグナル経路を活性化（Gupta et al., Carcinogenesis, 1999）。MAPK シグナル経路が活性化するとアポトーシスが誘導されるが、KEGG pathway 解析の結果 *JUN*、*FOS*、*VEGF*、*MMPs* そして *IL-8* など、MAPK 経路下流の遺伝子発現が有意に上昇していた。

一方、KEGG pathway 解析の結果、*NF- κ B* や *cIAPs* の発現上昇がみられた。*NF- κ B* の活性化により細胞が抗アポトーシスへと誘導されると DNA に生じたハロゲン化損傷が残り発がんへ向かう確率が高くなることが予測される。近年、*NF- κ B* シグナル経路の活性化が白血病誘発と関連があるとの報告もある（Nakagawa et al., Blood, 2011）。BT を曝露することで HL-60 細胞の遺伝子発現はアポトーシス、抗アポトーシスの両方向へ変動する事が明らかになった。

また ROS による DNA 損傷は *p53* シグナル経路を活性化しアポトーシスを誘導することが知られているが、解析の結果 *p53* の下流にある細胞周期関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子に有意な発現上昇がみられた。実験に用いた HL-60 細胞は *p53* を発現していないが我々は *p53* 下流の遺伝子の発現上昇を確認した。これは細胞内に *p53* シグナル経路類似の働きをする他の経路がある可能性を示唆している。

MPO を阻害した HL-60 細胞あるいは MPO を発現していない U937 細胞において、BT 曝露によるアポトーシスの有意な誘導が起こらなかったことから、BT 曝露によるアポトーシスの誘導には H_2O_2 - MPO - HOCl システムの関与が強く示唆された。

MPO を阻害しただけで、HL-60 の遺伝子発現パターンは劇的に変わりアポトーシスの誘導もほとんどみられなくなった。以上のことから MPO はベンゼン発がんにおいて重要な分子であり、化学発がんのリスク評価や予防における生物学的な分子マーカーとして使用できる可能性が示唆された。

