

ヒ素代謝物がコレステロール輸送経路へ及ぼす影響

内匠正太

国立大学法人 鹿児島大学水産学部 食品生命科学分野

連絡先住所：〒890-0056 鹿児島市下荒田 4-50-20

TEL: 099-286-4201

要旨：ヒ素は環境中に様々な形態で存在し、日常的に曝される可能性のある物質である。本研究では、無機ヒ素化合物である亜ヒ酸 (NaAsO_2) 及び水産物などにも多く含まれ、ヒ素の代謝過程で生ずる有機ヒ素化合物ジメチルアルシン酸 (DMAV) がコレステロール輸送経路へ及ぼす影響について検討を行った。実験には、コレステロール代謝の主要な臓器である肝臓由来のヒト肝がん由来細胞株 HepG2 を用いた。細胞毒性試験の結果、 IC_{50} は亜ヒ酸で $59.8 \mu\text{M}$ であり、DMAV で $1050.8 \mu\text{M}$ であった。また、遺伝子発現解析の結果、コレステロール輸送タンパク質である ABC トランスポーター A1 (*ABCA1*) の遺伝子発現は、亜ヒ酸では、低毒性濃度（生存率が 80% 以上）においても有意な発現抑制が認められた。一方、DMAV では、低毒性濃度において *ABCA1* の有意な発現抑制は認められなかった。また、タンパク質レベルでも同様の傾向が認められた。更に、*ABCA1* と共働して細胞からのコレステロールの引き抜きを担うアポリポプロテイン A-I (ApoA1) の有意な遺伝子発現抑制が認められなかったことから、亜ヒ酸に比べ DMAV によるコレステロール輸送経路への影響は少ないことが示唆された。

1. 緒言

ヒ素は、環境中に広く存在する元素で、無機ヒ素及び有機ヒ素化合物の形で存在する。日本では、飲料水による摂取よりも米や水産物などの食品からの摂取が主となる。我々日本人は、食品に含まれる多様なヒ素化合物を摂取しているが、生体内に吸収されたヒ素化合物はそれぞれ生体内で代謝を受け、ほとんどが有機ヒ素化合物に変換され体外へ排出される。特に、ヒ素化合物が多く含まれる米や水産物を好む日本人の総ヒ素摂取量は、約 $170 \mu\text{g}/\text{日}$ と推計されており、食品からの総ヒ素摂取量の多くは、魚貝類や海藻に由来すると考えられている。また、水産物にも多く含まれるアルセノシユガー及び脂溶性有機ヒ素化合物であるアルセノリピッドは、ヒトの体内でジメチルアルシン酸 (DMAV) に代謝されることが報告されており¹⁾、水産物を好む日本人の尿中のヒ素を形態別に分析した結果、尿中に含まれるヒ素の約 3 割は、DMAV であることが報告されている²⁾。しかし、ヒ素の代謝物である DMAV が、ヒトの健康に及ぼす影響については、発がん性や遺伝毒性、細胞毒性などを中心に行われているが、その他の健康影響については、未だ不明な点が多いのが現状である。

ヒ素によるヒトへの健康影響としては、東南アジアなどの土壌由来の無機ヒ素に汚染された地下水を生活用水として用いる地域において、肺がんや皮膚がんなどが報告されていることから、無機ヒ素の発がん性については認められている。更に、これらのヒ素汚染の深刻な地域を中心に行った疫学研究から、近年、慢性的なヒ素曝露によってアテローム性動脈硬化症などの心疾患や高血圧症の発症リスクが増大することが示されており、その一因として動脈硬化症のリスク要因の一つである血中高密度リポタンパク質 (HDL) いわゆる善玉コレステロールの低下が挙げられている。実際にバングラデシュなどのヒ素汚染が深刻な地域では、血中 HDL の低下が近年報告されている⁴⁾。

HDL は肝臓の ABC トランスポーター A1 (ABCA1) を介して主に産生され、肝臓特異的 ABCA1 欠損マウスでは血中 HDL が 80% 低下することが報告されている³⁾。HDL はコレステロールの分解能を持たない末梢細胞表面からの余剰コレステロールの引き抜きと、コレステロールの胆汁酸への転換排出の場である肝臓への輸送を促進する役割を担っている。血中 HDL の低下は、末梢細胞でのコレステロールの蓄積を引き起こし、血管壁におけるマクロファージの泡沫化を介して動脈硬化の引き金となることが知られている。これまでの我々の研究においても、無機ヒ素である亜ヒ酸 (NaAsO_2) をヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞に曝露することにより、ABCA1 の発現が抑制されるとともに、細胞内コレステロールの蓄積が誘発されることが明らかとなっており、亜ヒ酸が、ABCA1 の発現抑制を介して HDL 産生の低下を引き起こしている可能性が示唆されている。

そこで本研究では、我々日本人も米や水産物などの食品から日常的に曝される危険性が高い有機ヒ素化合物である DMAV が、動脈硬化症のリスクを高める要因となり得るか否か、コレステロール輸送経路へ影響を及ぼすことが報告されている亜ヒ酸と比較することにより検討を行った。DMAV などの有機ヒ素化合物がヒトのコレステロール輸送経路に及ぼす影響を評価することは、食品の安全性や有用性を評価する上でも極めて重要な課題であると考えられる。

2. 実験方法

2.1 細胞培養

ヒト肝がん由来株化培養細胞 HepG2 は、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Wako) に 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco)、100 U/mL Penicillin (Wako)、及び 100 µg/mL Streptomycin (Wako) を添加し、37°C 飽和湿潤、及び 5% CO₂ の条件下で継代培養し、各試験に供した。

2.2 細胞毒性試験

HepG2 細胞 (5×10^3 cells/well) を 96 穴プレートに播種し、CO₂ インキュベーターで 24 時間 DMEM-10%FCS を用いて培養後、各濃度の亜ヒ酸 (NaAsO₂) 及び DMAV を曝露し、さらに 3 日間培養した。3 日間培養後に 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide (MTT) を添加し、3 時間インキュベーション後、細胞内脱水素酵素活性により生成したホルマザン量を相対比較し、細胞の生存率を指標に細胞毒性を評価した。

2.3 リアルタイム RT-PCR

HepG2 細胞 (1.0×10^5 cells/ml) を 12 穴プレートに 1 ml 播種し、CO₂ インキュベーターで 24 時間 DMEM-10%FCS を用いて培養後、各濃度の亜ヒ酸及び DMAV を添加し、3 日間曝露した。曝露後、細胞を Sepasol-RNA I Super G (ナカライテスク) で回収し、total RNA を抽出した。抽出した RNA から ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用い cDNA を調製した。調製した cDNA を用い、StepOne™ リアルタイム PCR (Applied Biosystem) により ABCA1 及びコレステロール輸送を担う高密度リポタンパク質 (HDL) の構成タンパク質であるアポリポプロテイン A-I (*ApoA1*) の遺伝子発現解析を行った。内部標準遺伝子には、GAPDH を用いた。

2.4 ABCA1 のタンパク質発現解析

HepG2 細胞 (1.0×10^5 cells/ml) を 5 ml 播種し、24 時間、37°C でインキュベート後、各濃度の亜ヒ酸及び DMAV を曝露した。3 日間インキュベート後、細胞を回収し細胞ライセートを RIPA バッファーで調製し、ABCA1 抗体を用いたウエスタンブロット法によりタンパク質の発現解析を行った。内部標準には、Na⁺/K⁺-ATPase を用いた。

3. 結果および考察

MTT assay を用いた細胞毒性試験の結果、HepG2 細胞において亜ヒ酸は、DMAV に比べ高い毒性を示した。IC₅₀ は、亜ヒ酸の 59.8 µM と DMAV の 1050.8 µM であった

(Fig. 1)。三価の無機ヒ素化合物である亜ヒ酸の毒性は、五価の有機ヒ素化合物である DMAV に比べ高いことが報告されていることから、今回行った細胞毒性試験の結果は、これまでの報告と一致する結果であった。DMAV の細胞内への取り込み量が亜ヒ酸

に比べ少ないことが報告されており、細胞への取り込み量の違いが感受性の違いの原因の一つと考えられた⁵⁾。

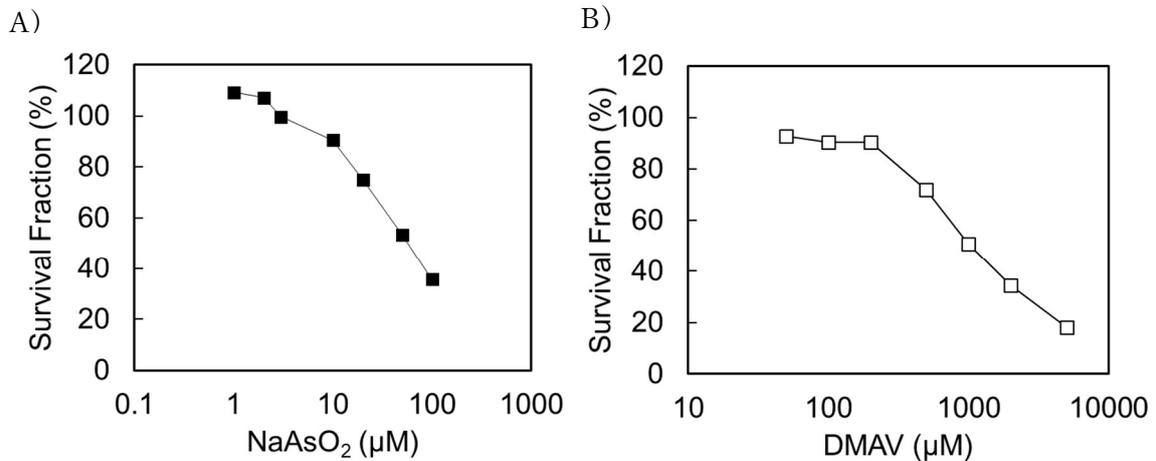


Fig.1. Cytotoxicity of NaAsO₂ and DMAV

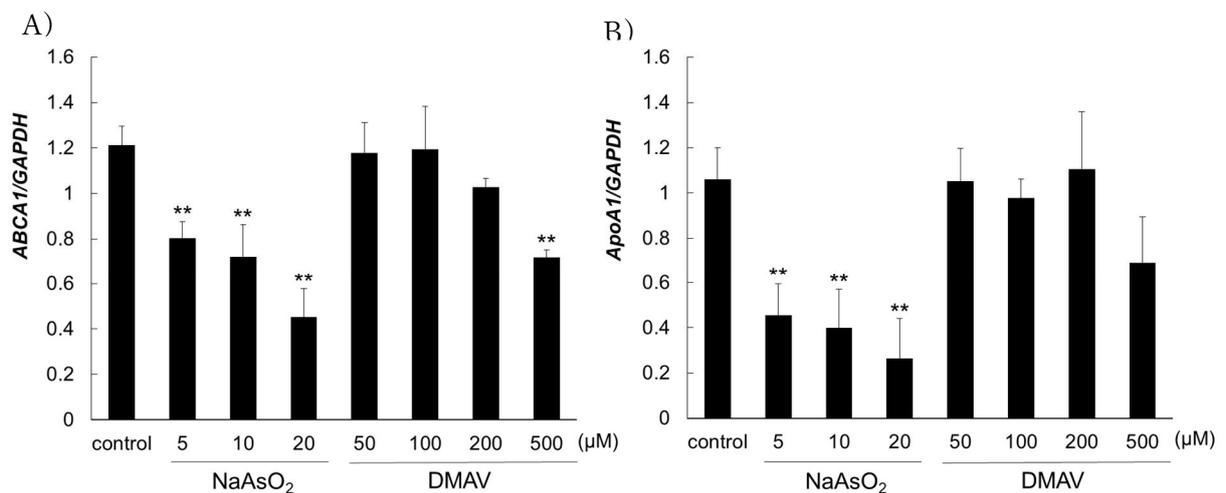


Fig.2. Expression of mRNA of *ABCA1* and *ApoA1*

次に、細胞毒性試験の結果、生存率 70%以上を示した曝露濃度において、コレステロール輸送タンパク質 ABCA1 及び ABCA1 と共働して細胞内のコレステロールの引き抜きを行うアポリポタンパク質 A1 (ApoA1) の遺伝子発現解析を行った。その結果、*ABCA1* の遺伝子発現は、亜ヒ酸では、生存率が 80%以上である低毒性濃度 (5, 10 μM) においても有意な発現抑制が認められた (Fig. 2A)。一方、DMAV では、低毒性濃度 (50, 100, 200 μM) において有意な発現抑制は認められず、500 μM で有意な発現抑制が認められた (Fig. 2B)。また、*ApoA1* に関しては、亜ヒ酸の低毒性濃度 (5, 10 μM) において有意な発現抑制が認められたが、DMAV の低毒性濃度 (50, 100, 200 μM) では有意な発現抑制は認められなかった。

更に、タンパク質レベルでの発現解析を行うためにウエスタンブロット法により、ABCA1 の発現解析を行った結果、遺伝子発現と相関が見られ、DMAV に比べ亜ヒ酸により強い発現抑制が認められた (Fig. 3)。

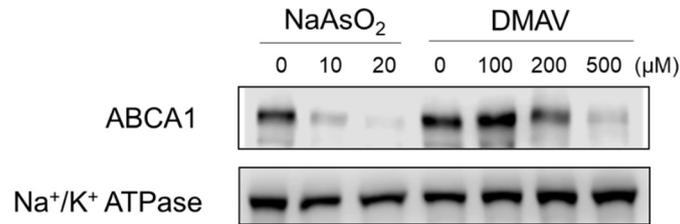


Fig.3. Expression of protein of ABCA1 and Na⁺/K⁺-ATPase

本研究の結果から、亜ヒ酸に比べ DMAV では、*ABCA1* 及び *ApoA1* の遺伝子発現の阻害作用が少ないことが明らかとなった。これは、細胞内へのヒ素化合物の取り込み量の違いだけでなく、取り込み後の生体分子との反応性の違いが影響した可能性が考えられた。三価のヒ素化合物である亜ヒ酸は、タンパク質または、酵素の活性部位に存在するシステイン残基のチオール基と結合することで、機能阻害を引き起こすことが報告されている⁶⁾。一方、五価の有機ヒ素化合物である DMAV は、システイン残基との親和性が弱いとされており、この性質の違いが *ABCA1* 及び *ApoA1* の遺伝子発現に影響している可能性が考えられるが、*ABCA1* 及び *ApoA1* の転写制御を担う核内受容体 LXR などの転写制御因子とヒ素の親和性については、今後さらに検討が必要である。

4. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を頂いたサンケイ科学振興財団に厚く感謝申し上げます。

5. 引用文献

- 1) R. Raml, G. Raber, A. Rumpler, T. Bauernhofer, W. Goessler, K. A. Francesconi. Individual variability in the human metabolism of an arsenic-containing carbohydrate, 2',3'-dihydroxypropyl 5-deoxy-5-dimethylarsinoyl-beta-D-ribose, a naturally occurring arsenical in seafood. *Chem Res Toxicol.* 2009 Sep;22(9):1534-1540.
- 2) A. Hata, Y. Endo, Y. Nakajima, M. Ikebe, M. Ogawa, N. Fujitani, G. Endo. HPLC-ICP-MS speciation analysis of arsenic in urine of Japanese subjects without occupational exposure. *J Occup Health.* 2007 May;49(3):217-223.
- 3) J.M. Timmins, J. Lee, E. Boudyguina, K.D. Kluckman, L.R. Brunham, A. Mulya, A.K. Gebre, J.M. Coutinho, P.L. Colvin, T.L. Smith, M.R. Hayden, N. Maeda, J.S. Parks.

Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *J Clin Invest.* 2005 May;115(5):1333-1342.

4) M.R. Karim, M. Rahman, K. Islam, A.A. Mamun, S. Hossain, E. Hossain, A. Aziz, F. Yeasmin, S. Agarwal, M.I. Hossain, Z.A. Saud, F. Nikkon, M. Hossain, A. Mandal, R.O. Jenkins, P.I. Haris, H. Miyataka, S. Himeno, K. Hossain. Increases in oxidized low-density lipoprotein and other inflammatory and adhesion molecules with a concomitant decrease in high-density lipoprotein in the individuals exposed to arsenic in Bangladesh. *Toxicol Sci.* 2013 Sep;135(1):17-25.

5) E. Dopp, L. M. Hartmann, U. von Recklinghausen, A. M. Florea, S. Rabieh, U. Zimmermann, B. Shokouhi, S. Yadav, A. V. Hirner, A. W. Rettenmeier. Forced Uptake of Trivalent and Pentavalent Methylated and Inorganic Arsenic and Its Cyto-/genotoxicity in Fibroblasts and Hepatoma Cells. *Toxicological Sciences*, Volume 87, Issue 1, September 2005, Pages 46–56,

6) K.T. Kitchin, K. Wallace. Arsenite binding to synthetic peptides based on the Zn finger region and the estrogen binding region of the human estrogen receptor-alpha. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005 Aug 1;206(1):66-72.

Effect of DMAV on cholesterol transport

Shota Takumi

Division of Food and Chemical Biology, Faculty of Fisheries, Kagoshima University
4-50-20 Shimoarata Kagoshima 890-0056, Japan

Arsenic is present in the environment in various forms. The primary intake of arsenic is from drinking water and food which contains inorganic and organic arsenic compounds. We have previously analyzed the effects of inorganic arsenic (NaAsO_2) on cholesterol metabolism, focusing on ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1), a cholesterol transport protein, and reported that inorganic arsenic exposure suppresses the expression of ABCA1, and increase the accumulation of intracellular cholesterol. However, the effect of organic arsenic compounds on cholesterol transport has not been clear.

Therefore, we compared the effect of inorganic arsenic with dimethyl arsenic acid (DMAV) on the cholesterol transport mechanism. DMAV is produced during the metabolism of arsenosugars and arsenolipids, organic arsenic compounds that are also abundant in marine products, and detected in Japanese urine. HepG2, a human hepatocarcinoma cell line derived from the human liver, a major organ of lipid metabolism, was used for the experiments.

As a result of a cytotoxicity assay, the IC_{50} was 59.8 μM for arsenite and 1050.8 μM for DMAV. The gene expression analysis showed that the gene expression of *ABCA1* was significantly repressed in inorganic arsenic even at low toxicity concentrations (>80% cell survival), but not in DMAV at low toxicity concentrations. The same tendency was observed at the protein expression level, indicating that DMAV was less effective than inorganic arsenic in suppressing the expression of ABCA1 and ApoA1, which are the major components of cholesterol efflux from cells.