

日化協LRI研究報告会
2020年8月21日(金)



慢性ヒ素中毒の発症機構と 生体応答に関する研究

徳島文理大学薬学部
角 大悟

本日の内容

1. 世界におけるヒ素汚染

2. ヒ素化合物の蓄積に関する検討

2-1: 亜ヒ酸の入り口の同定

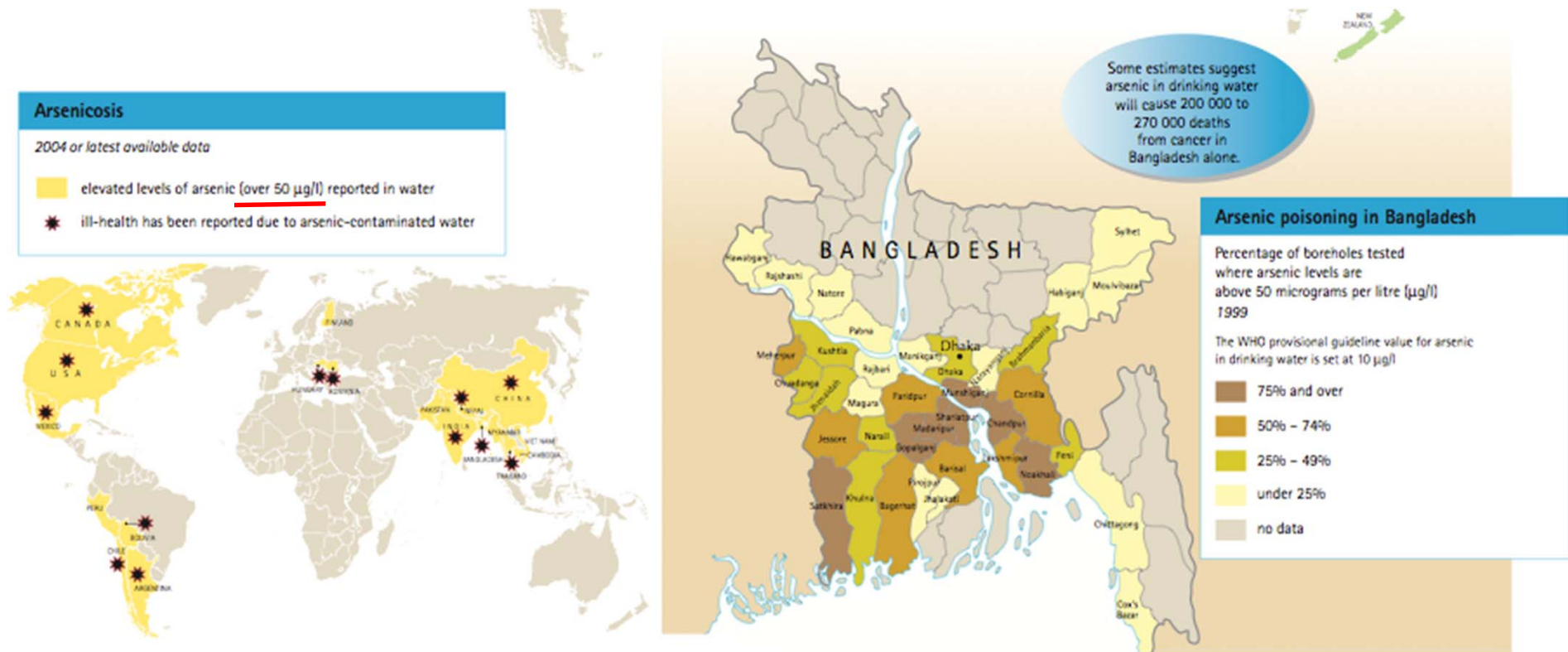
2-2: 転写因子Nrf2活性化による亜ヒ酸毒性の軽減

3. ヒ素化合物の解毒・代謝酵素に関する検討

3-1: ヒ素メチル基転移酵素 (AS3MT) mRNAのスプライシング

3-2: 過酸化水素によるAS3MT mRNAのスプライシング誘発

世界におけるヒ素汚染



WHO暫定ガイドライン: 10 µg/L

慢性ヒ素中毒: 肝、皮膚、肺、腎臓および膀胱における癌、循環器疾患、血管内皮障害等

WHO資料(arsenic map)

烏脚病 = 重度の慢性ヒ素中毒症状

1920年代ごろから、台湾の南西海岸で、深さ100－280メートルの井戸水を飲んでいた住民の間に、末梢血管の障害によって四肢に壊疽が生じ、指の先から黒くなっていく「烏脚病」が多発。



世界におけるヒ素汚染

Soil and Sediments

5 mg/kg (1-40 mg/kg)

鉱山, 製錬工場の廃棄物
(5-3000 mg/kg)

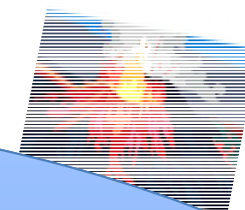
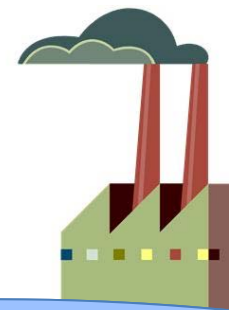


Air

ヒ素を高濃度含有した石炭を
使用する火力発電所
砒鉄鉱石から製錬
> 1000 ng/m³



郊外: 0.02-4 ng/m³
都市部: 3-200 ng/m³



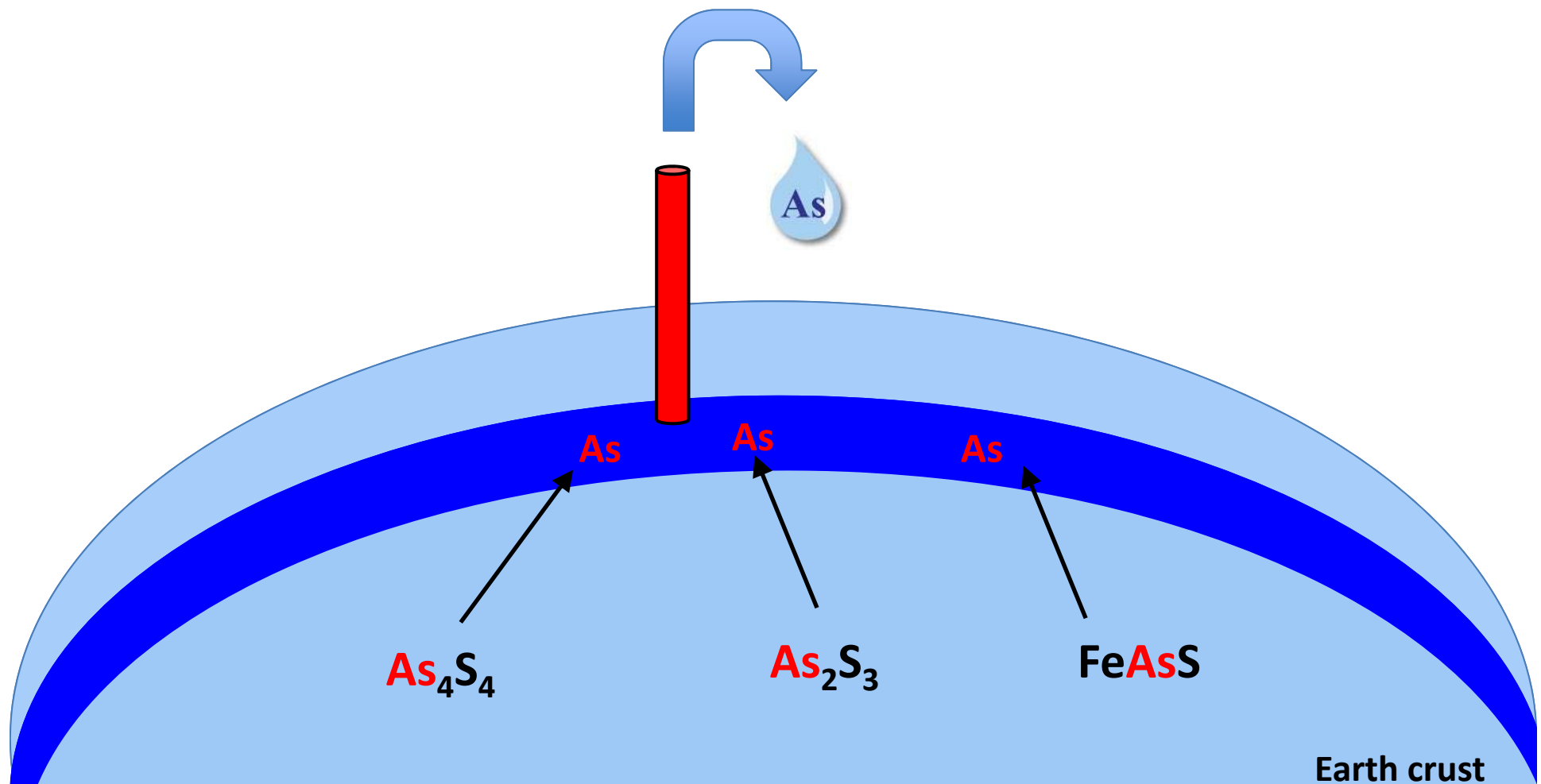
火山活動



Earth crust

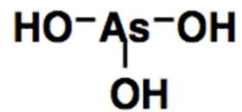
井戸水のヒ素汚染

Water (Deep well water)

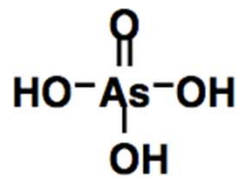


環境中に存在するヒ素化合物の化学形態

無機ヒ素

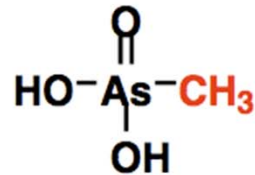


亜ヒ酸

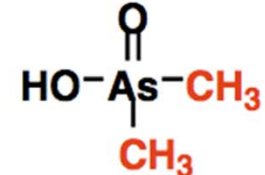


ヒ酸

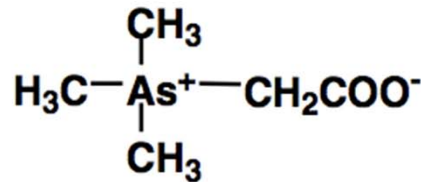
有機ヒ素



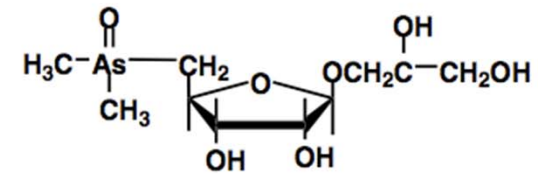
メチルアルソン酸



ジメチルアルシン酸



アルセノベタイン



アルセノシュガー

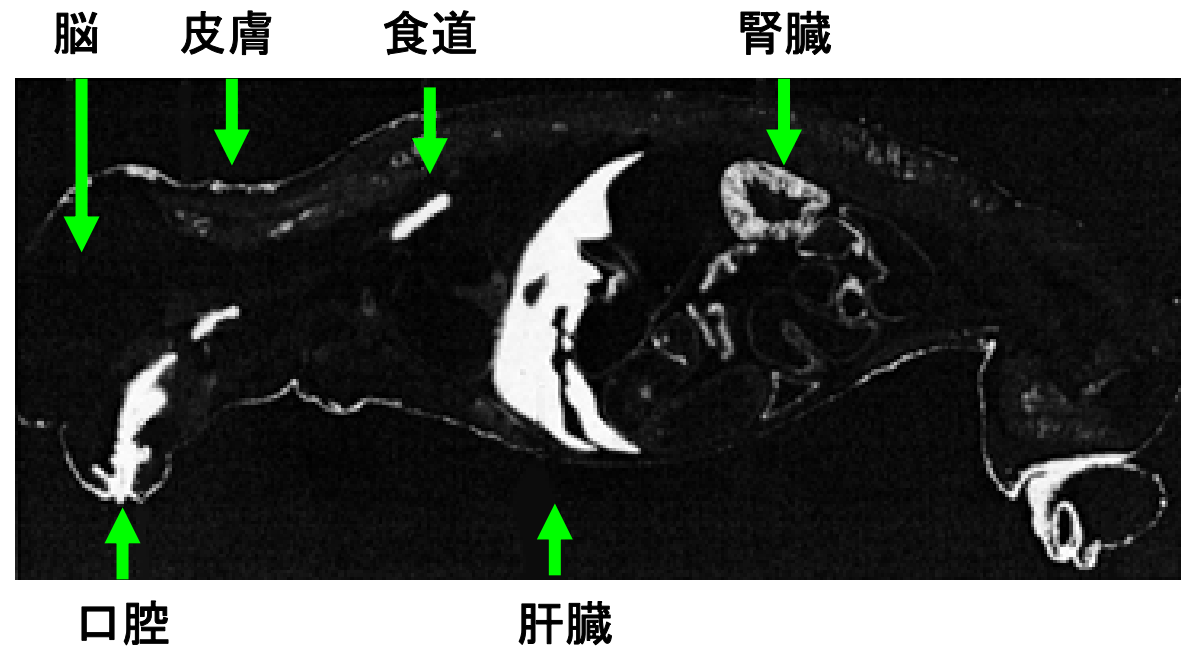
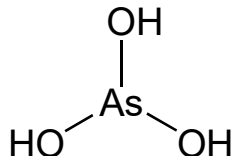
本日の内容

1. 世界におけるヒ素汚染
2. ヒ素化合物の蓄積に関する検討
 - 2-1: 亜ヒ酸の入り口の同定
 - 2-2: 転写因子Nrf2活性化による亜ヒ酸毒性の軽減
3. ヒ素化合物の解毒・代謝酵素に関する検討
 - 3-1: ヒ素メチル基転移酵素 (AS3MT) mRNAのスプライシング
 - 3-2: 過酸化水素によるAS3MT mRNAのスプライシング誘発

ヒ素化合物の蓄積に関する検討

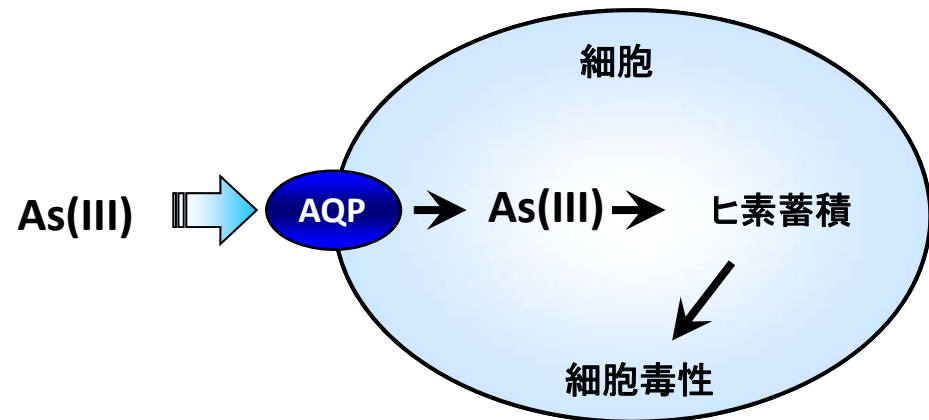
脂溶性の薬毒物ほど細胞内に入りやすいのに、
水溶性の高い亜ヒ酸はどうして、健康に影響を与えるのか？

サルに亜ヒ酸を投与

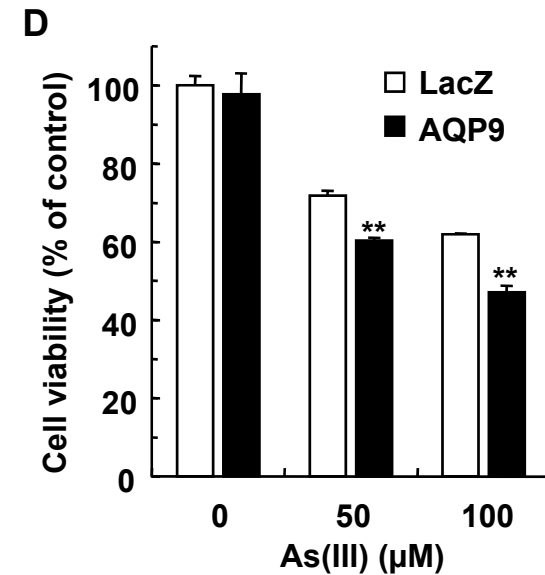
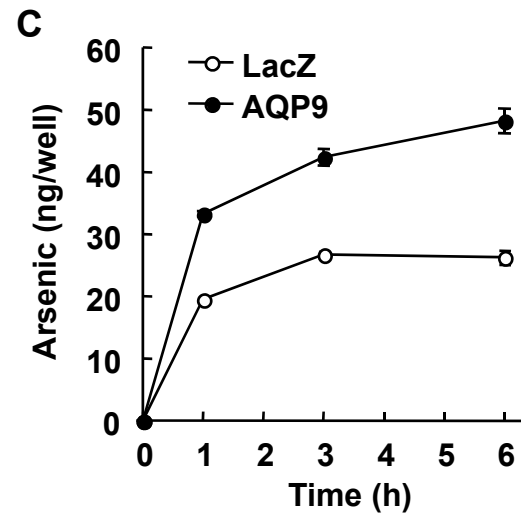
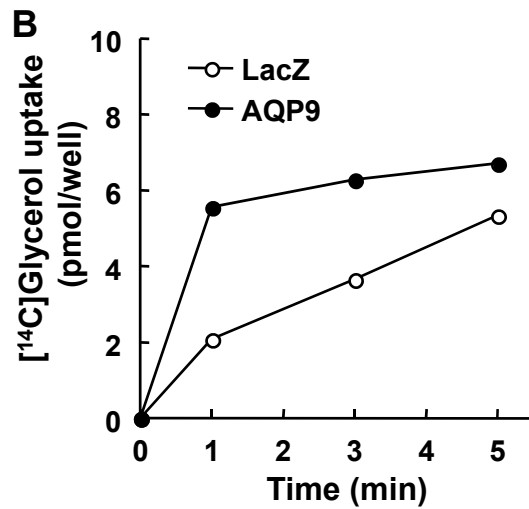
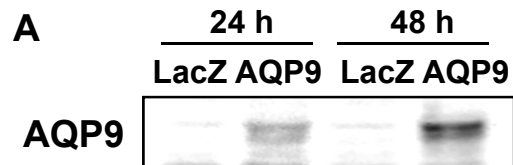


ヒ素化合物の蓄積に関する検討

- アクアポリンは、Peter Agre (2003年、ノーベル化学賞)らによって同定された水チャネル
- ホ乳類においてAQPには13種の分子種が報告されている
- AQPのなかでもグリセロールのような小分子を通過させる分子種をアクアグリセロポリンと称し、AQP3, 7, 9, 10がこれに属する
- 酵母を用いた系でFps1p (AQPのホモログ) が亜ヒ酸の取り込みに関与していることが報告された

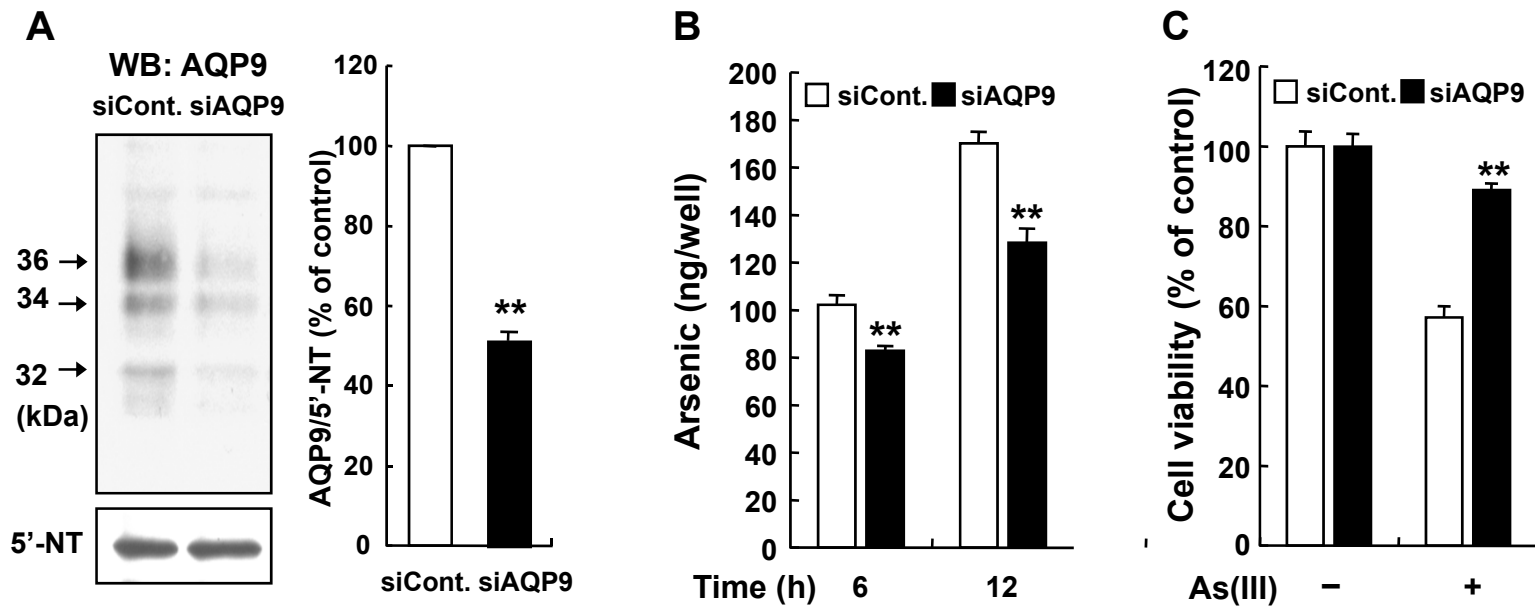


亜ヒ酸の入りの同定



** $p < 0.01$ vs. control

亜ヒ酸の入りの同定

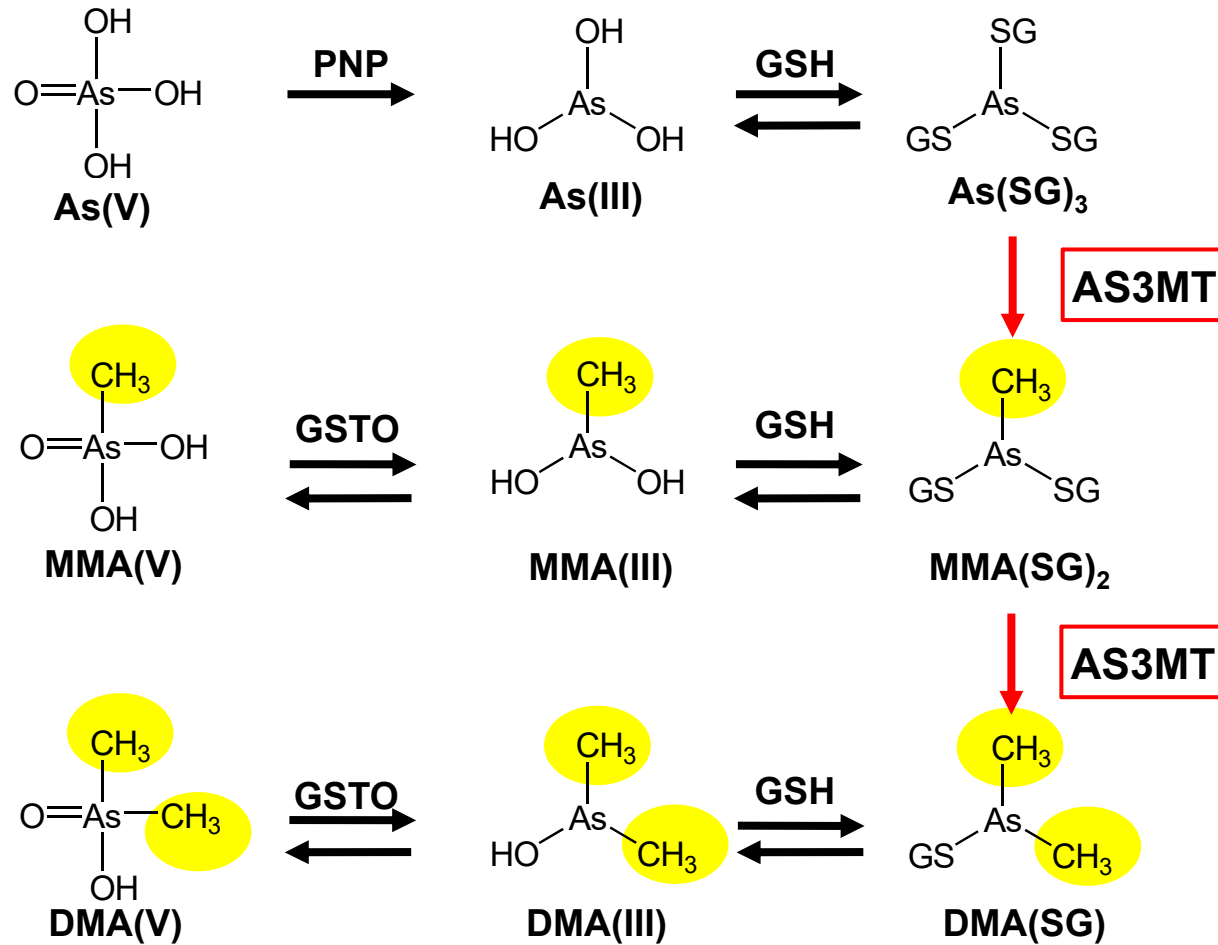


** $p < 0.01$ vs. control

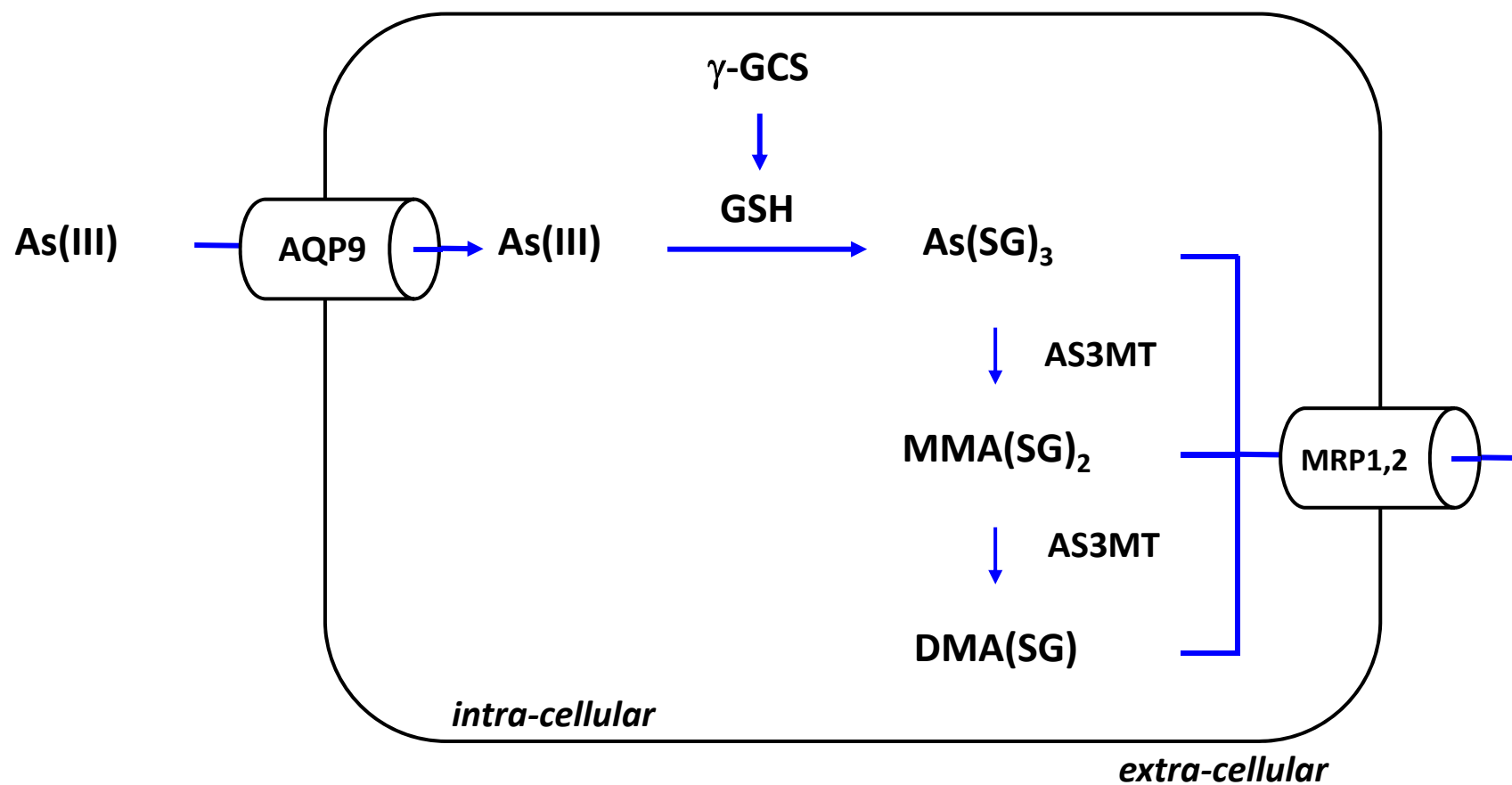
本日の内容

1. 世界におけるヒ素汚染
2. ヒ素化合物の蓄積に関する検討
 - 2-1: 亜ヒ酸の入り口の同定
 - 2-2: 転写因子Nrf2活性化による亜ヒ酸毒性の軽減
3. ヒ素化合物の解毒・代謝酵素に関する検討
 - 3-1: ヒ素メチル基転移酵素 (AS3MT) mRNAのスプライシング
 - 3-2: 過酸化水素によるAS3MT mRNAのスプライシング誘発

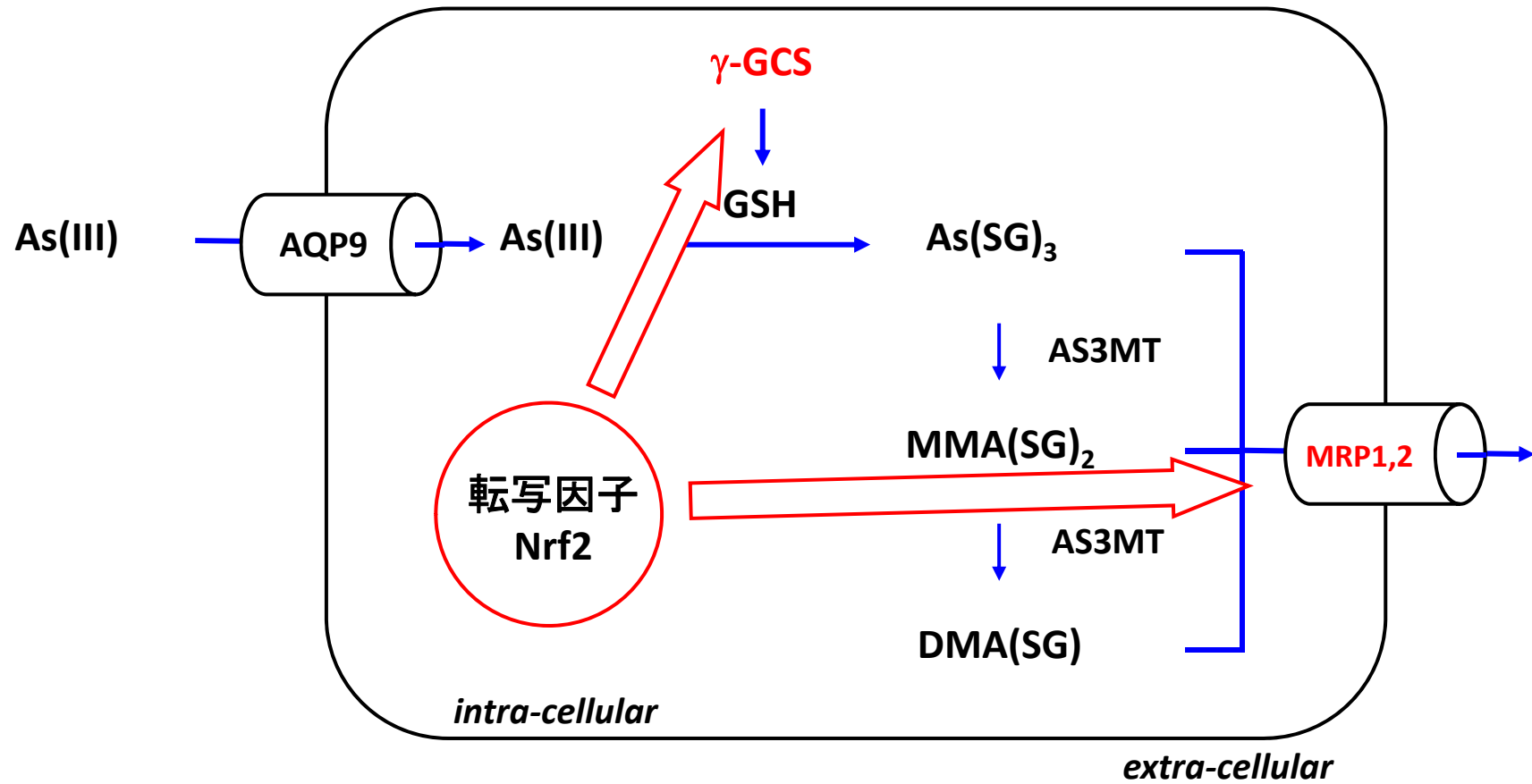
無機ヒ素化合物の代謝様式



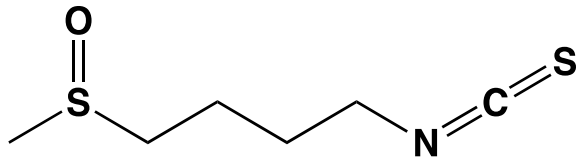
転写因子Nrf2活性化による亜ヒ酸毒性の軽減



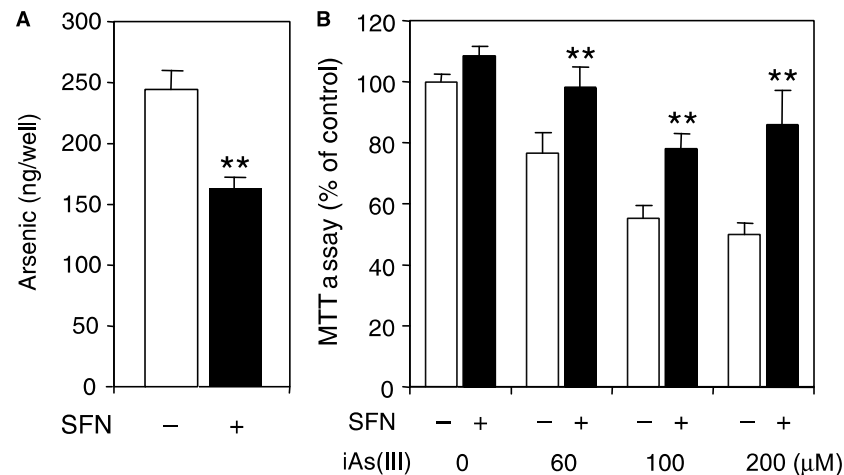
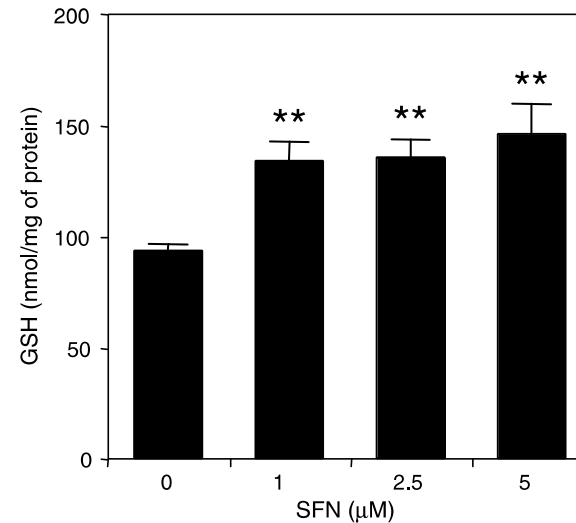
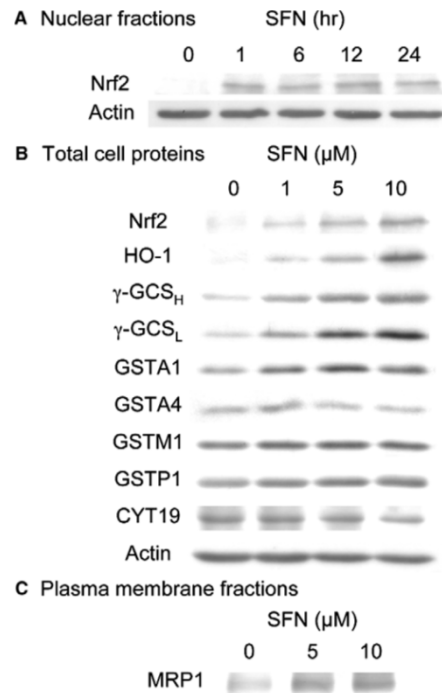
転写因子Nrf2活性化による亜ヒ酸毒性の軽減



転写因子Nrf2活性化による亜ヒ酸毒性の軽減



スルフォラファン(ブロッコリースプラウト)

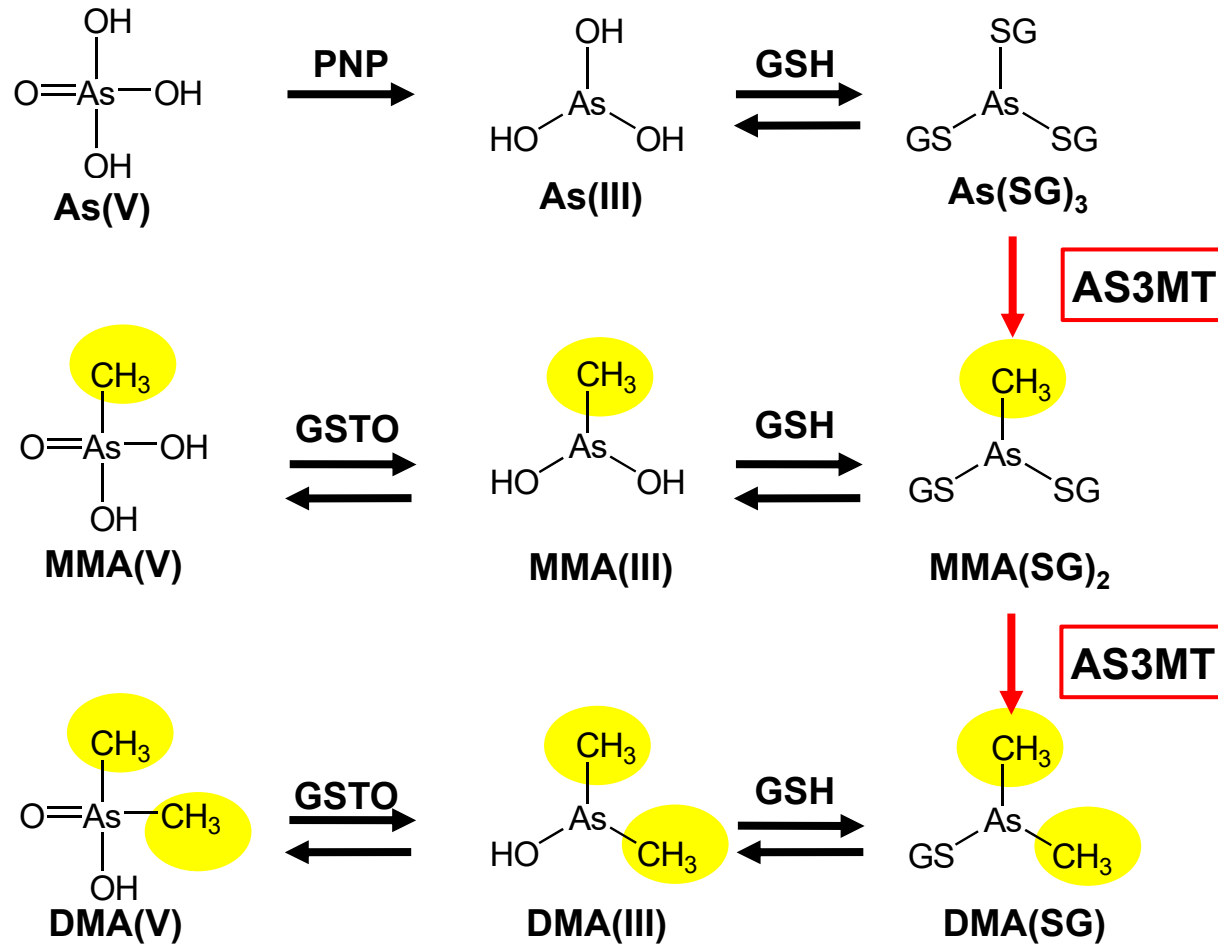


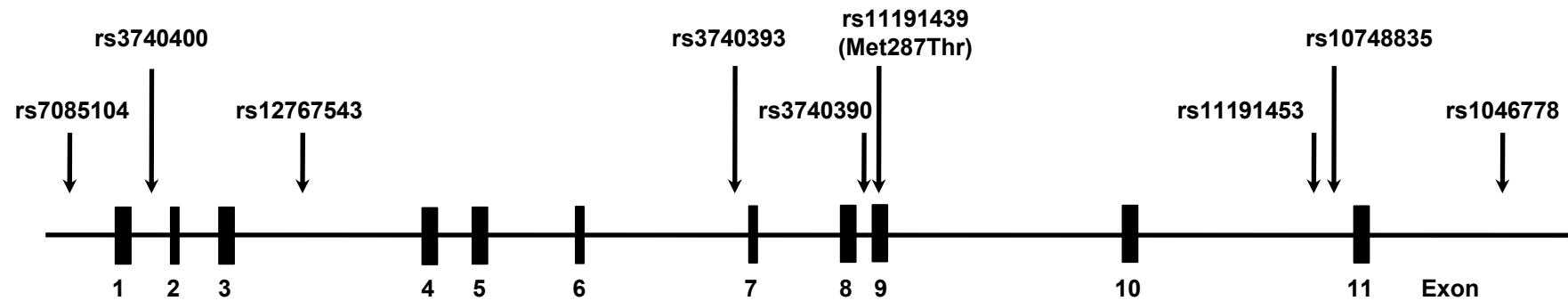
Shinkai Y, Sumi D et al. (2006) FEBS letters.

本日の内容

1. 世界におけるヒ素汚染
2. ヒ素化合物の蓄積に関する検討
 - 2-1: 亜ヒ酸の入り口の同定
 - 2-2: 転写因子Nrf2活性化による亜ヒ酸毒性の軽減
3. ヒ素化合物の解毒・代謝酵素に関する検討
 - 3-1: ヒ素メチル基転移酵素 (AS3MT) mRNAのスプライシング
 - 3-2: 過酸化水素によるAS3MT mRNAのスプライシング誘発

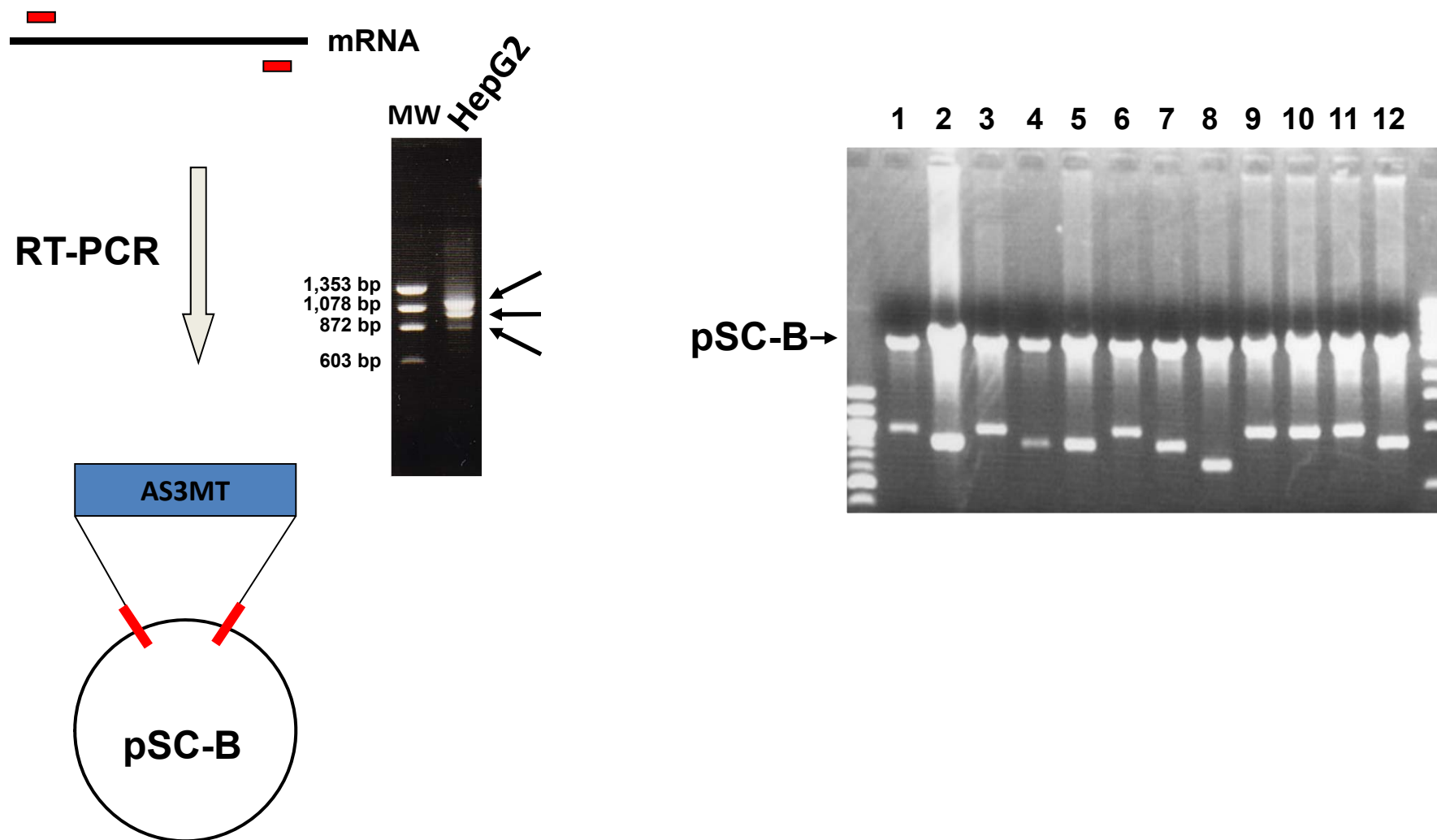
無機ヒ素化合物の代謝様式



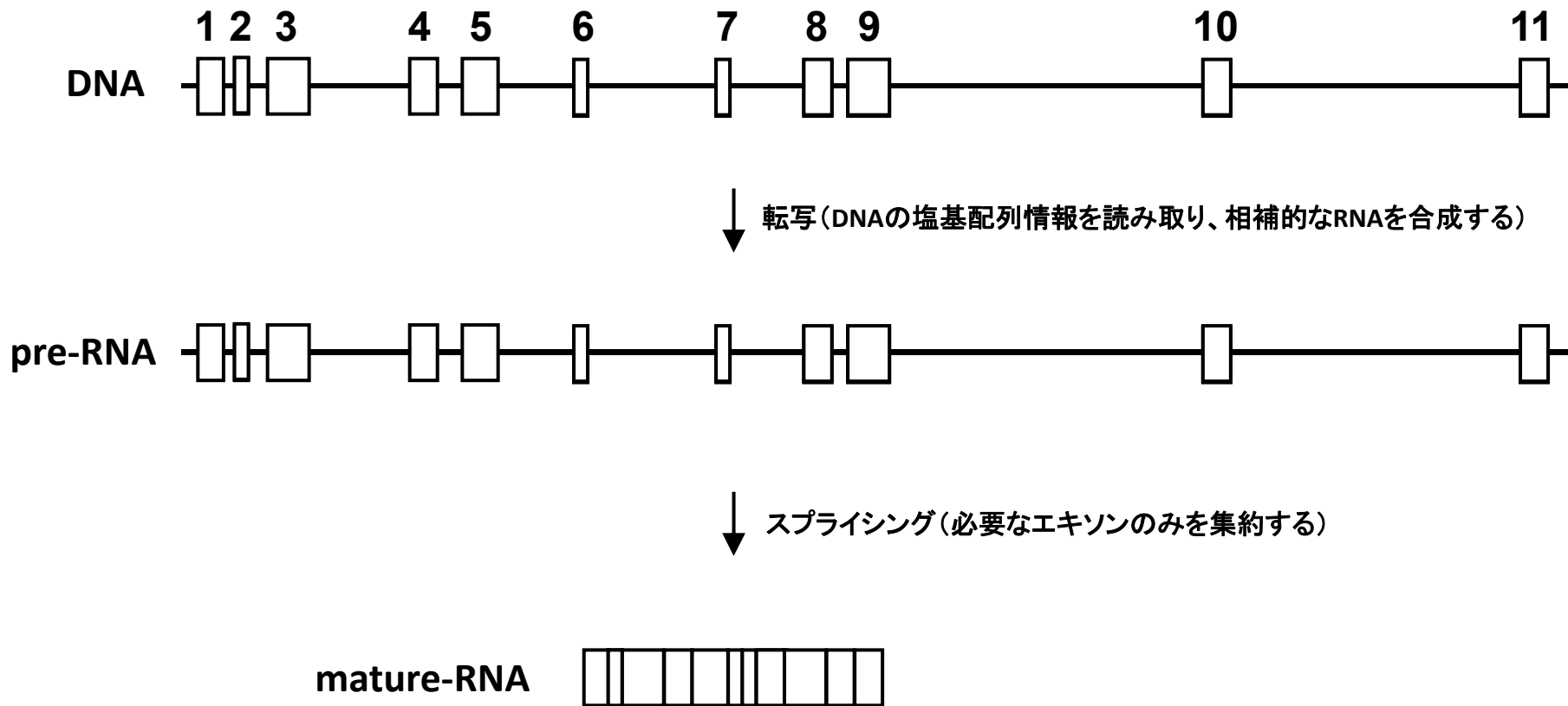


rs number	intronic or exonic	Study area	Association	References
rs7085104	intronic	San Antonio de los Cobres, Tolar Grande, Olacapato, Salar de Pocitos (Argentine)	%iAs!, %MMA!, %DMA"	Engstrom et al. (2011)
rs3740400	intronic	San Antonio de los Cobres, Tolar Grande, Olacapato, Salar de Pocitos (Argentine)	%iAs!, %MMA!, %DMA" As3MT expression	Engstrom et al. (2011)
		Matlab (Bangladesh)	%MMA!	Engstrom et al. (2011)
rs12767543	intronic	Yaqui Valley of Sonora (Mexico)	DMA(V)/MMA(V)"	Meza et al. (2005)
		Yaqui Valley of Sonora (Mexico)	DMA(V)/MMA(V)"	Meza et al. (2005)
rs3740393	intronic	San Antonio de los Cobres (Argentine)	%MMA!, %DMA"	Schlawicke Engstrom et al. (2007)
		Hoa Hau, Liem Thuan in Ha Nam Province (Vietnam)	DMA/MMA !	Agusa et al. (2009)
		San Antonio de los Cobres, Tolar Grande, Olacapato, Salar de Pocitos (Argentine)	%iAs!, %MMA!, %DMA"	Engstrom et al. (2011)
		Matlab (Bangladesh)	%iAs!, %DMA"	Engstrom et al. (2011)
		San Antonio de los Cobres (Argentine)	%MMA!, %DMA"	Schlawicke Engstrom et al. (2007)
rs3740390	intronic	San Antonio de los Cobres, Tolar Grande, Olacapato, Salar de Pocitos (Argentine)	%iAs!, %MMA!, %DMA"	Engstrom et al. (2011)
		Matlab (Bangladesh)	%iAs!, %DMA"	Engstrom et al. (2011)
		San Antonio de los Cobres (Argentine)	%MMA!, %DMA"	Schlawicke Engstrom et al. (2007)
rs11191439	exonic (Met287Thr)	Central Europe (Hungary, Romania, and Slovakia (ASHRAM study))	%MMA", %DMA!	Lindberg et al. (2007)
		Chuquicamata (Chile)	%MMA"	Hernandez et al. (2008a, 2008b)
		Hoa Hau, Liem Thuan in Ha Nam Province (Vietnam)	MMA/As"	Agusa et al. (2009)
		Torreón, Coahuila (Mexico)	DNA damage "	Sampayo-Reyes et al. (2010)
		Matlab (Bangladesh)	%iAs!, %DMA"	Engstrom et al. (2011)
rs11191453	intronic	Yaqui Valley of Sonora (Mexico)	DMA(V)/MMA(V)" As(III)/MMA(V)"	Meza et al. (2005)
		Hoa Hau, Liem Thuan in Ha Nam Province (Vietnam)	DMA/MMA!	Agusa et al. (2009)
		San Antonio de los Cobres, Tolar Grande, Olacapato, Salar de Pocitos (Argentine)	%iAs!, %MMA!, %DMA"	Engstrom et al. (2011)
		Matlab (Bangladesh)	%iAs!, %DMA"	Engstrom et al. (2011)
rs10748835	intronic	San Antonio de los Cobres (Argentine)	%MMA!, %DMA"	Schlawicke Engstrom et al. (2007)
		San Antonio de los Cobres, Tolar Grande, Olacapato, Salar de Pocitos (Argentine)	%iAs!, %MMA!, %DMA"	Engstrom et al. (2011)
		Matlab (Bangladesh)	%MMA!	Engstrom et al. (2011)
rs1046778	intronic	San Antonio de los Cobres, Tolar Grande, Olacapato, Salar de Pocitos (Argentine)	%iAs!, %MMA!, %DMA" As3MT expression	Engstrom et al. (2011)
		Matlab (Bangladesh)	%MMA!	Engstrom et al. (2011)

AS3MTの選択的スプライシングの検出

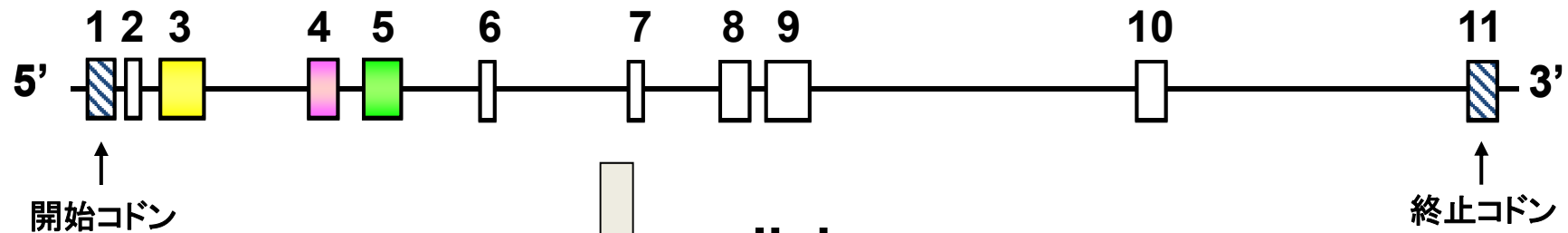


mRNAスプライシングとは？



AS3MTの選択的スプライシングの解析

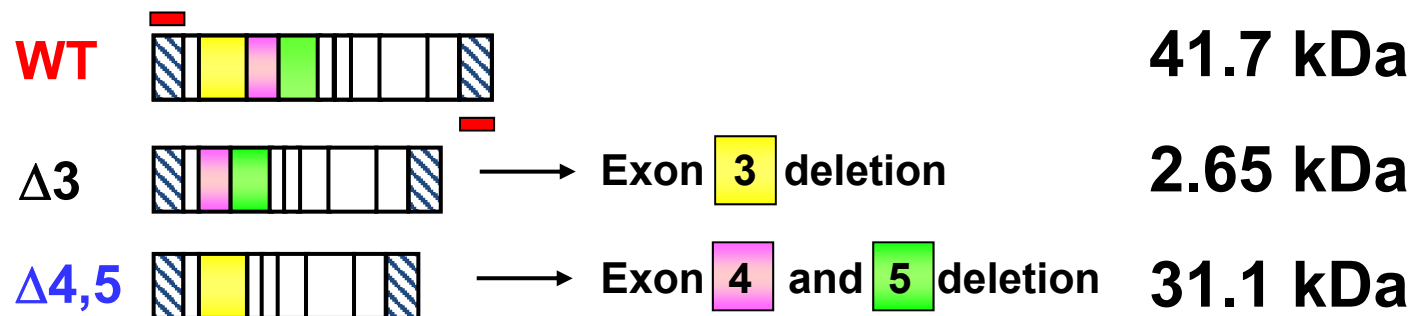
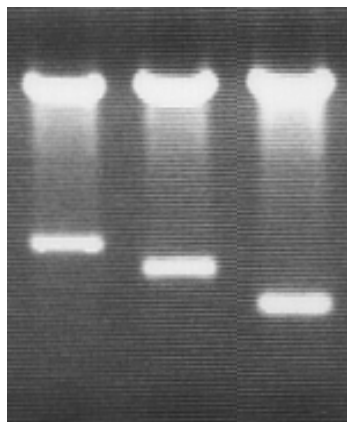
Human AS3MT genome DNA



splicing

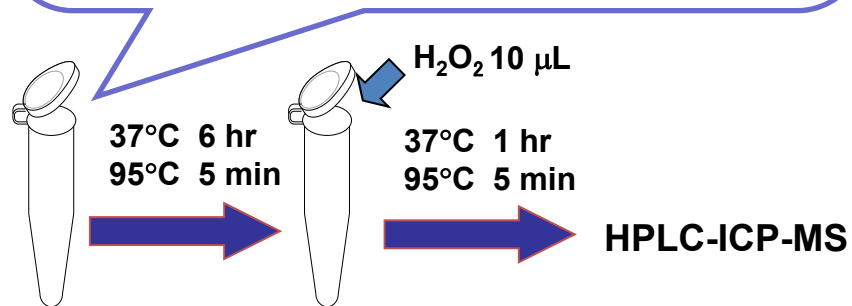
mature mRNA

WT $\Delta 3$ $\Delta 4,5$



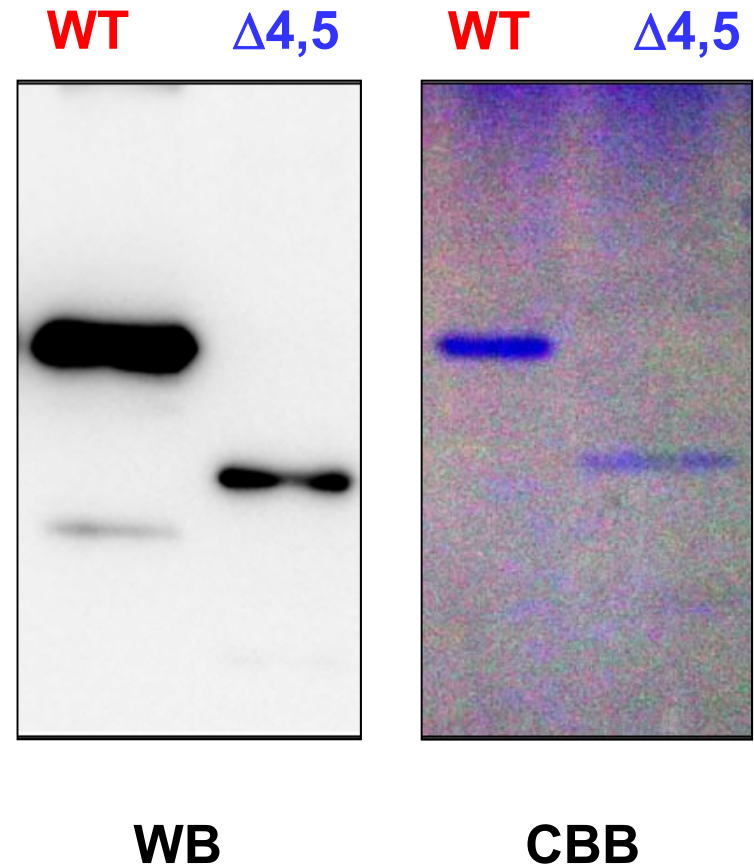
AS3MT活性測定方法

AS3MT (WT or $\Delta 4,5$)	30 μ G
SAM(メチル基供与体)	1 μ M
GSH(還元)	7 μ M
As (III)	10 μ M

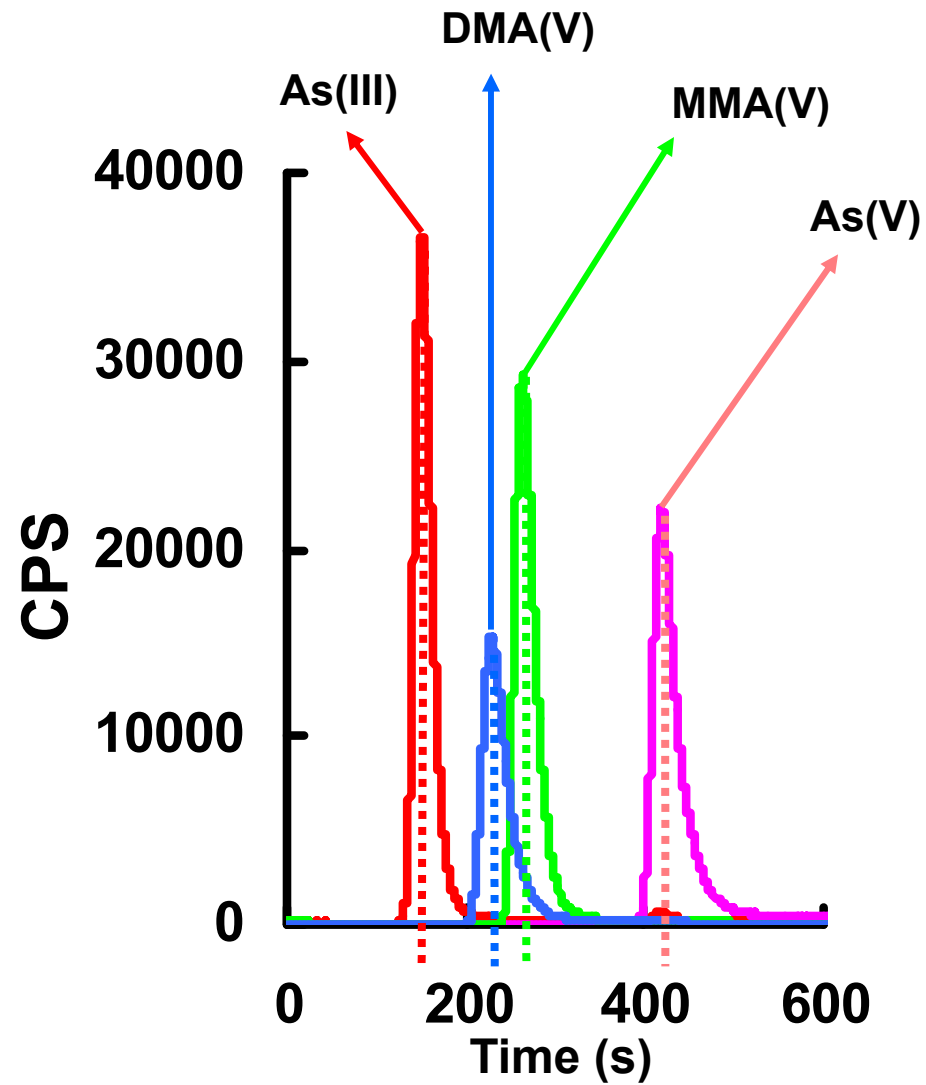


カラム: CAPCELL PAC C18 MGII (2.0 mmid \times 150 mm)
ライン: PEEKチューブ1/16インチ \times 0.13 mm
移動相: 5 mMテトラブチルアンモニウムヒドロキシド
3 mMマロン酸
4%メタノール

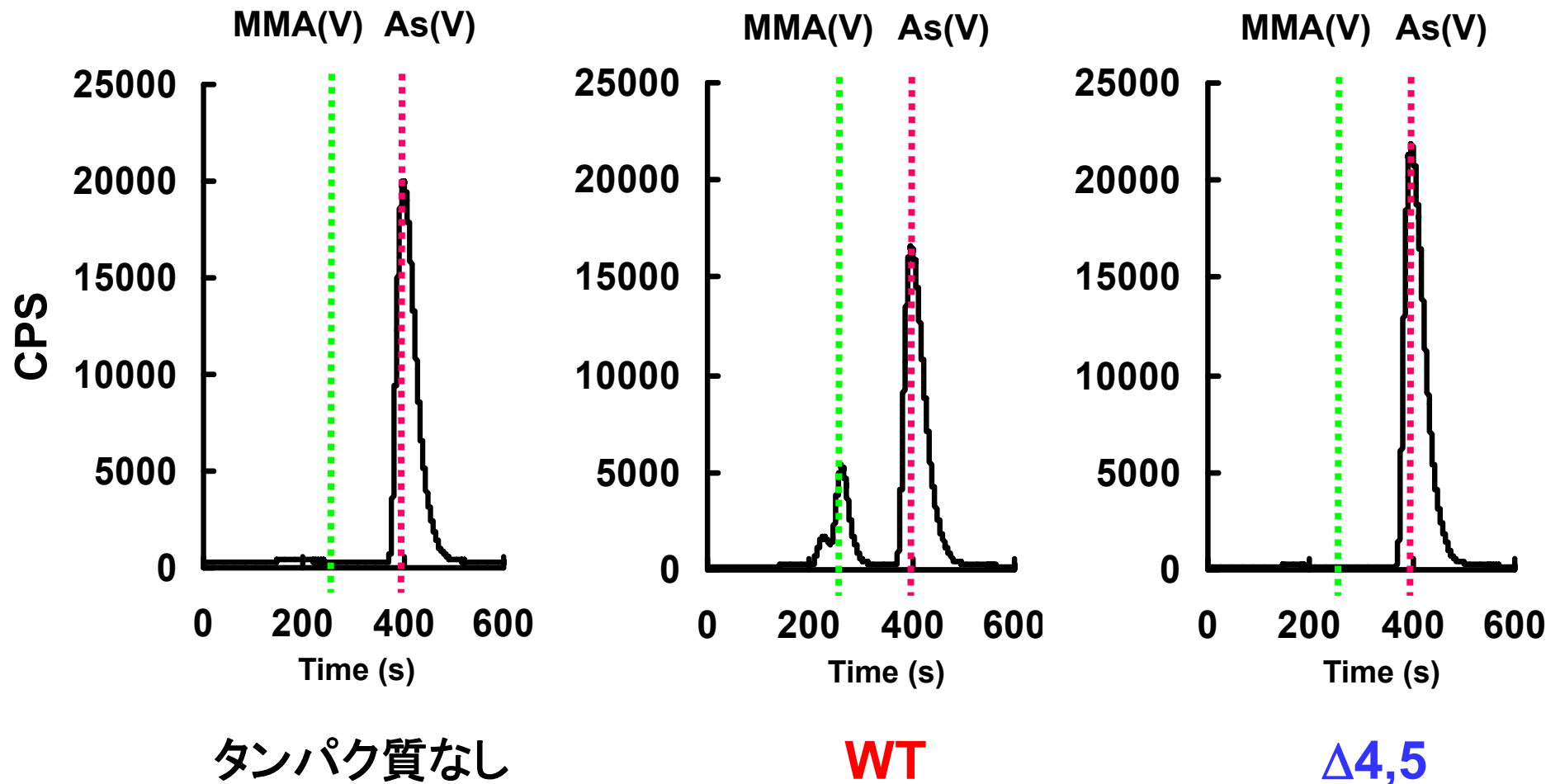
流速: 200 μ L/min
測定時間: 13 min (ICP-MS: 10 min)
オープン温度: 37°C
オートサンプラー: 4°C
注入量: 5 μ L



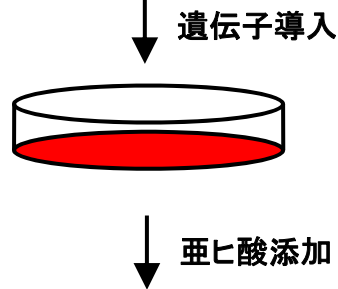
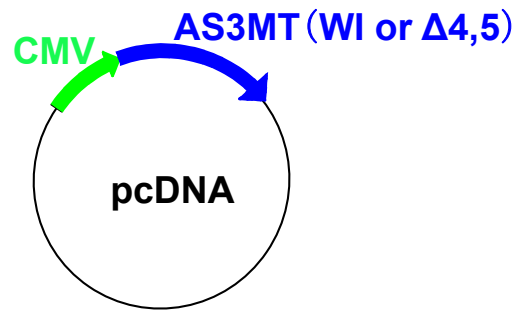
HPLC-ICP-MSによるヒ素化合物の形態分析



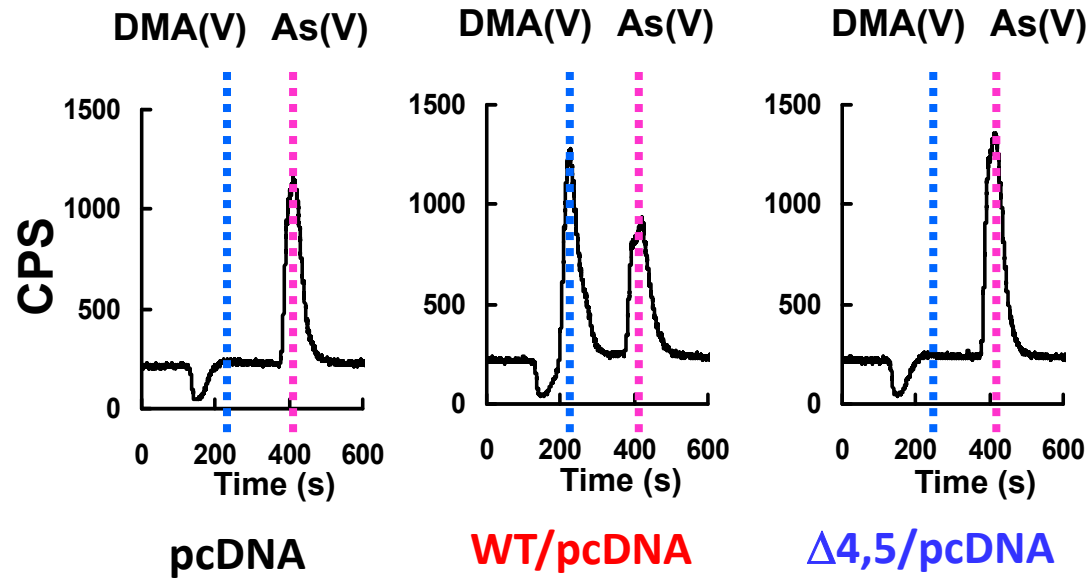
スプライスフォームはAS3MT活性が欠損している



スプライスフォームはAS3MT活性が欠損している



HPLC-ICP-MS



ヒトAS3MTのアミノ酸配列

MAALRDAEIQKDVQTYYGQVLKRSADLQTNGCVTTARPVPKH
IREALQNVHEEVALR**YYGCGLVIPEHLENCWILDLGSGSGRD**
CYVLSQLVGEKGHVTGIDMTKGQVEVAEKYLDYHMEKYGFQA
SNVTFIHGYIEKLG EAGIKNESHDIVVSNCVINLVPDKQQVL
QEAYRVLKHGGELYFSDVYTSLELPEEIRTHKVLWGECLGGA
LYWKELAVLAQKIGFCPPRLVTANLITIQNKELERVIGDCRF
VSATFRLFKHSGTKGPTKRCQVIYNGGITGHEKELMFDANFTF
KEGEIVEVDEETAAILKNSRFAQDFLIRPIGEKLP TSGGCSA
LELKDIITDPFKLA EESDSMKSRCVPDAAGGCCGTTKSC

ヒトA3MTのアミノ酸配列

SAMとの結合

MAALRDAEIQKDVQTYYGQVLKRSADLQTN~~GC~~VTTARPVPKH
IREALQNVHEEVALRYYGCGLVPEHLENCWILDLGSGSGRD
CYVLSQLVGEKGHVTGIDMTKGQVEVAEKYLDYHMEKYGFQA
SNVTFIHGYIEKLGEAGIKNESHDIVVSNCVINLVDPDKQQVL
QEAYRVLKHGGELYFSDVYTSLELPEEIRTHKVLWGECLGGA
LYWKELAVLAQKIGFCPPRLVTANLITIQNKELERVIGDCRF
VSATFRLFKHSGTKGPTKRCQVIYNGGITGHEKELMFDANFTF
KEGEIVEVDEETAAILKNSRFAQDFLIRPIGEKLP TSGGC SA
LELKDIITDPFKLAEESDSMKSRCVPDAAGGCCGTTKSC

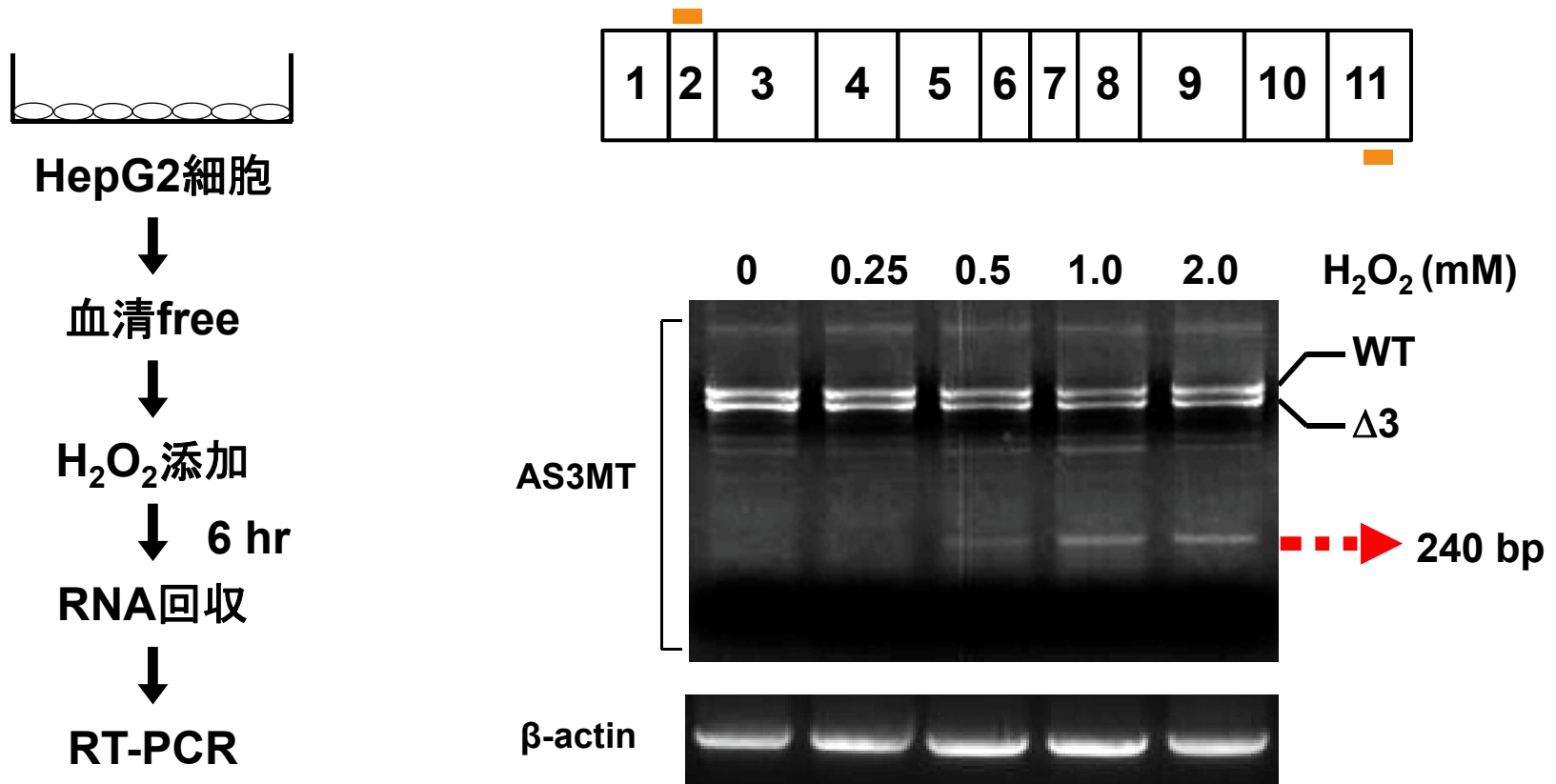
活性中心

酵素の安定性

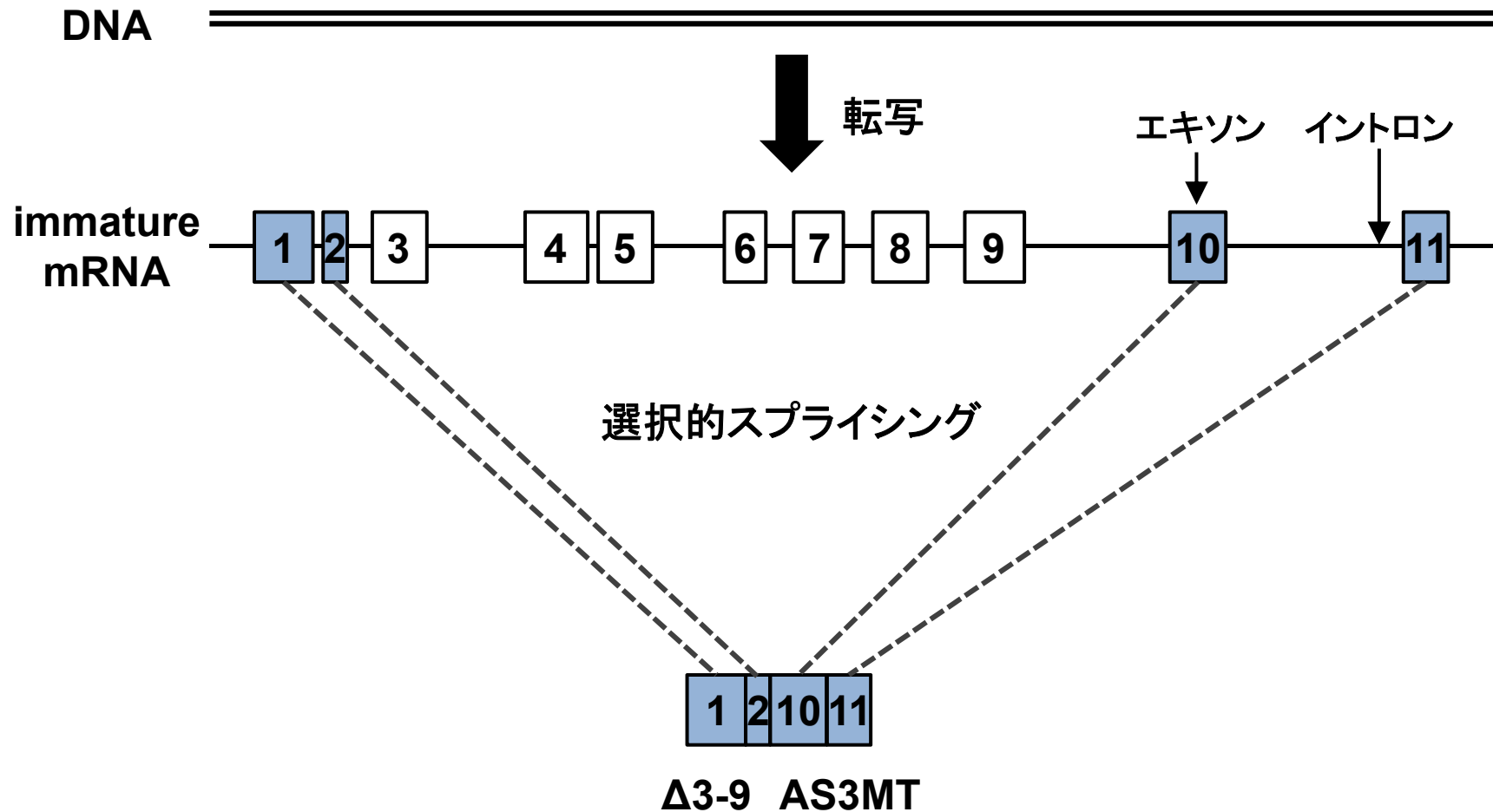
本日の内容

1. 世界におけるヒ素汚染
2. ヒ素化合物の蓄積に関する検討
 - 2-1: 亜ヒ酸の入り口の同定
 - 2-2: 転写因子Nrf2活性化による亜ヒ酸毒性の軽減
3. ヒ素化合物の解毒・代謝酵素に関する検討
 - 3-1: ヒ素メチル基転移酵素 (AS3MT) mRNAのスプライシング
 - 3-2: 過酸化水素によるAS3MT mRNAのスプライシング誘発

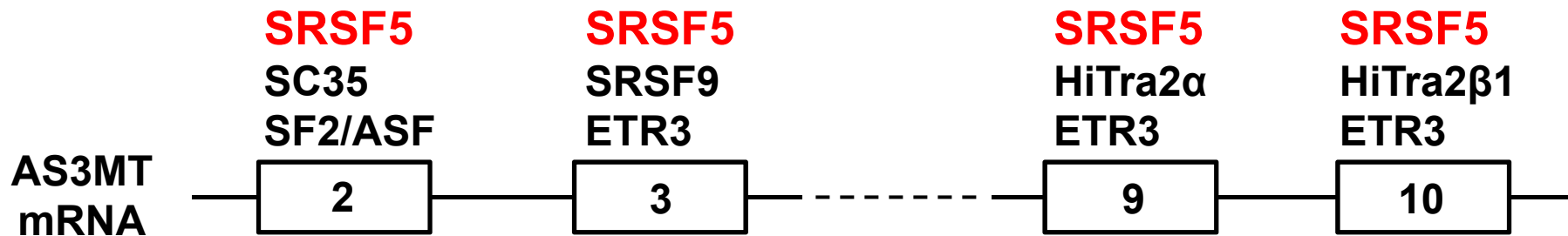
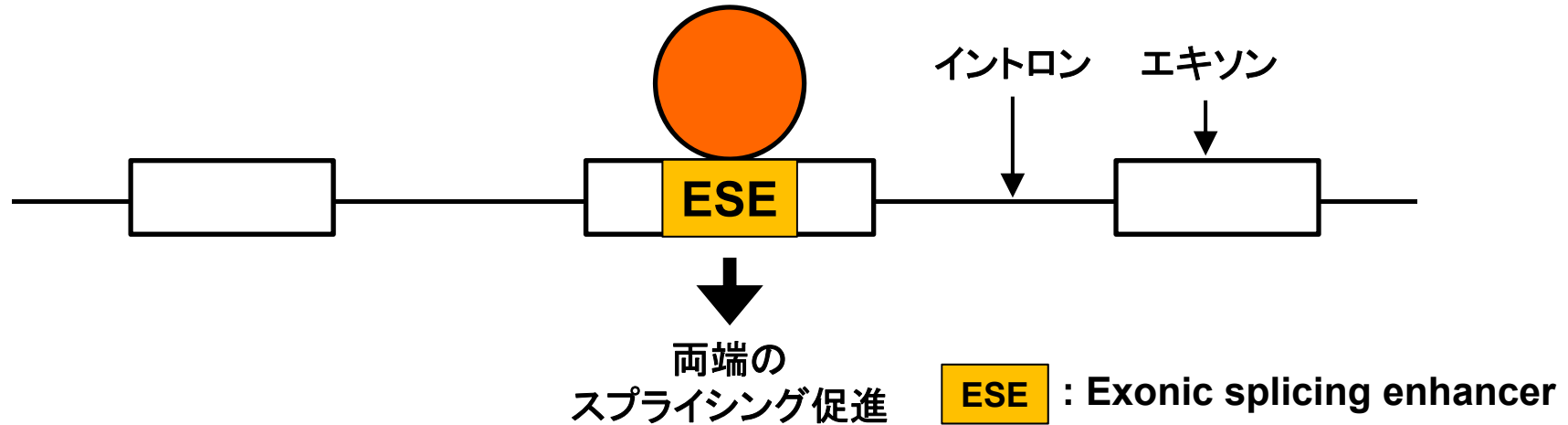
過酸化水素曝露による新規AS3MT mRNAの選択的スプライシング



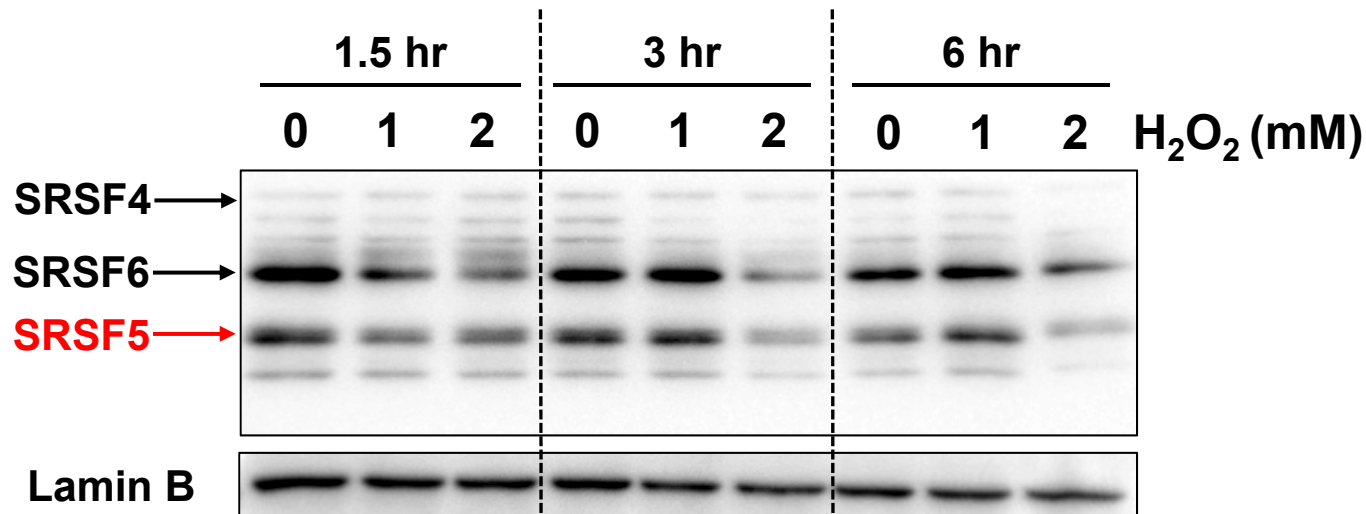
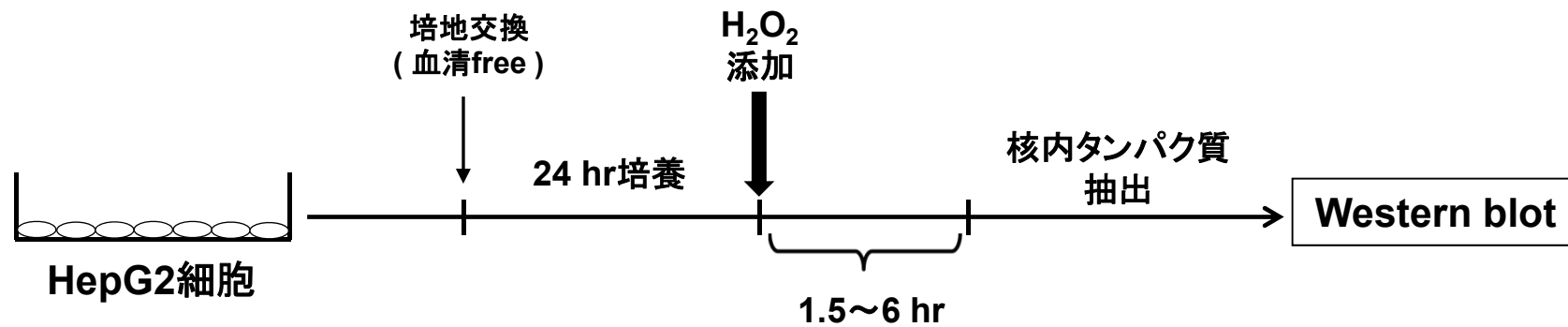
過酸化水素曝露による新規AS3MT mRNAの選択的スプライシング



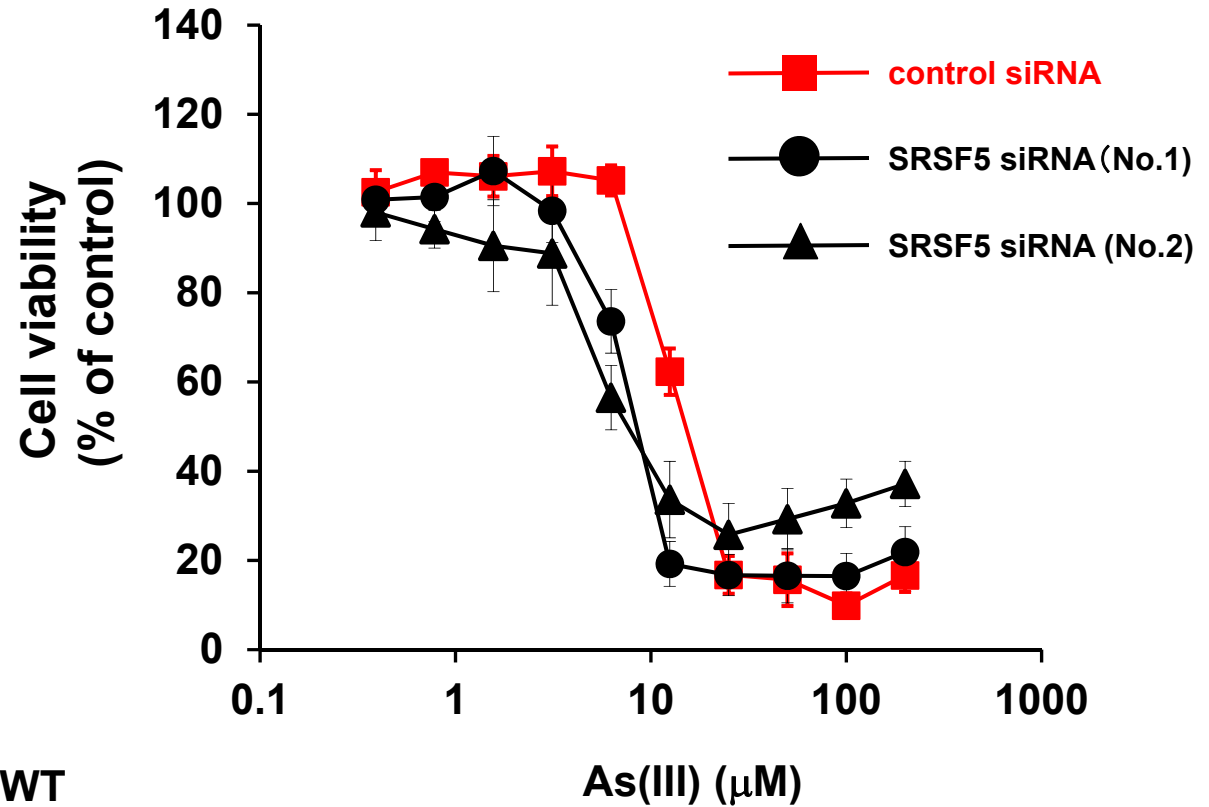
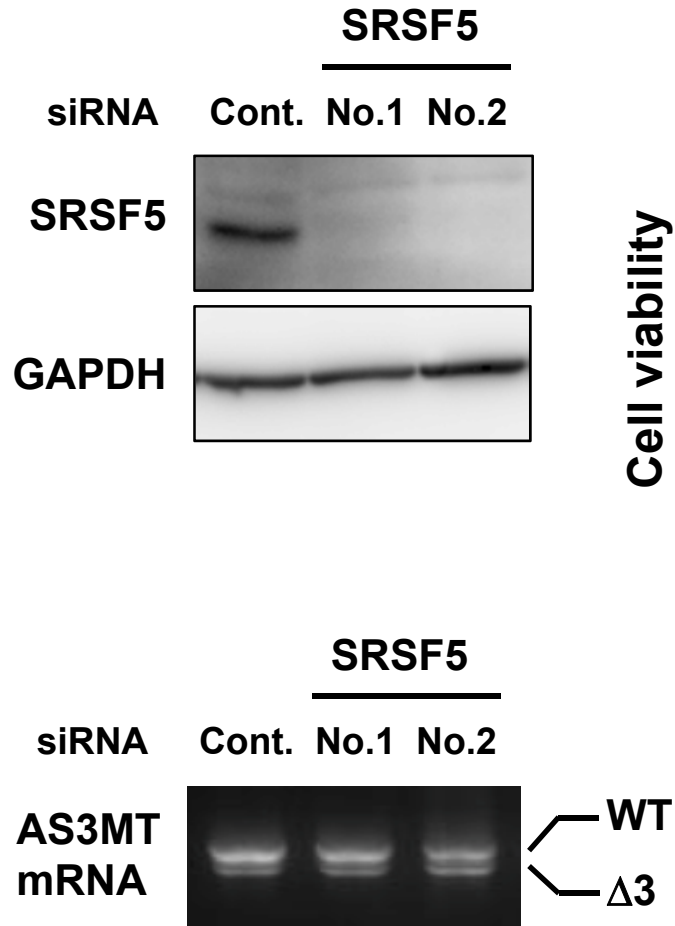
過酸化水素曝露による新規AS3MT mRNAの選択的スプライシング



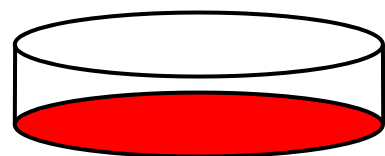
過酸化水素曝露による新規AS3MT mRNAの選択的スプライシング



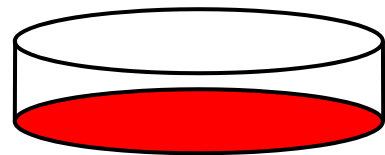
SRSF5 siRNA導入HaCaT細胞における亜ヒ酸感受性の変化



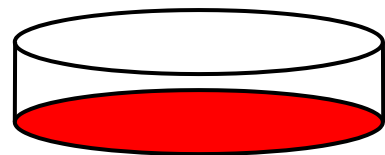
SRSF5 siRNA導入HaCaT細胞の亜ヒ酸感受性の上昇に関する因子



Control siRNA



SRSF5 siRNA (No.1)



SRSF5 siRNA (No.2)

→ 48 hr → 10 μ M As(III)曝露

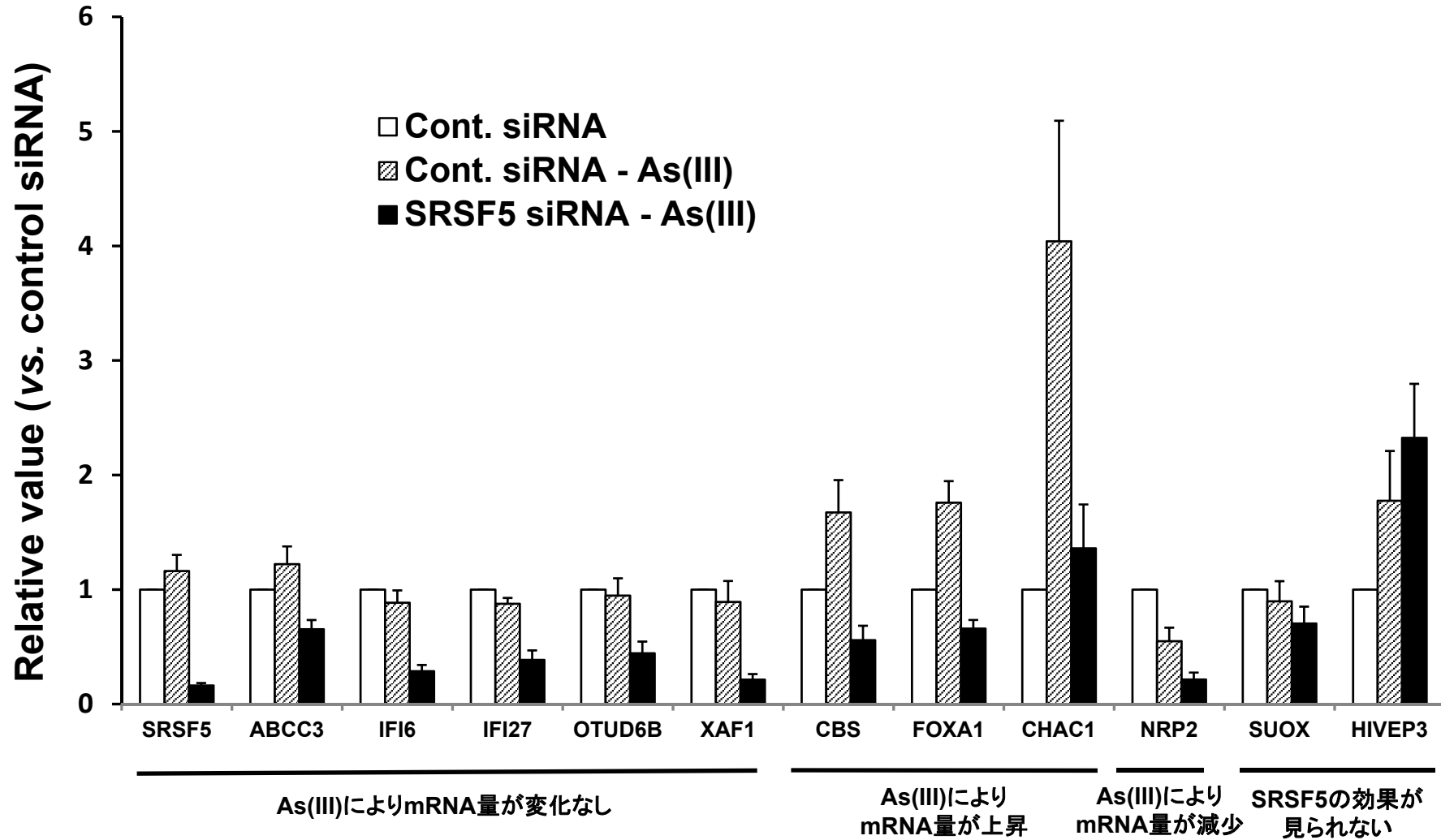
↓ 3 hr

RNA回収

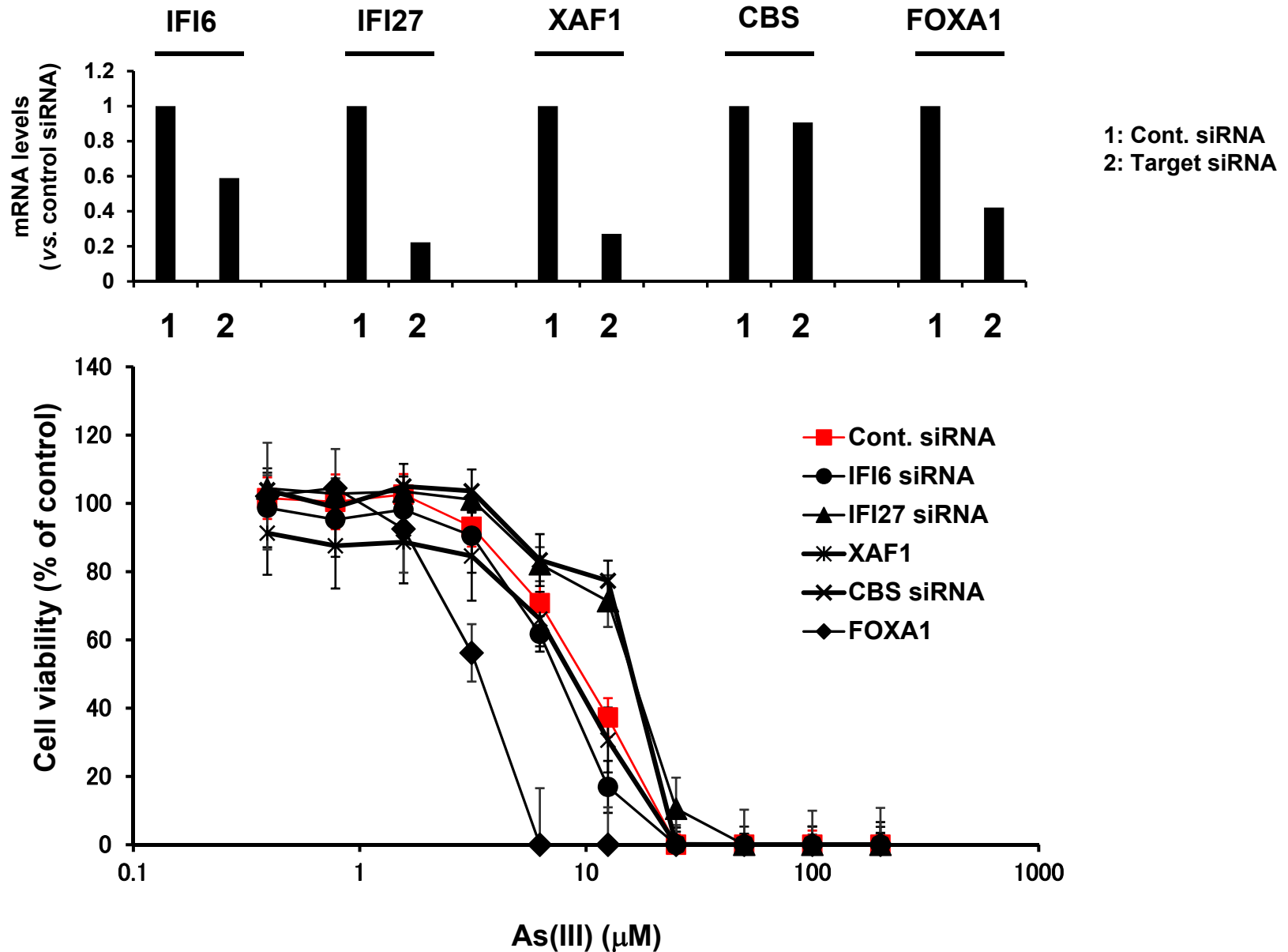
↓
次世代シーケンサーでRNA量の解析

↓
SRSF5 siRNA No.1とNo.2で共通して減少しているmRNA群を抽出

SRSF5 siRNA導入HaCaT細胞の亜ヒ酸感受性の上昇に関与する因子



候補遺伝子のsiRNA導入HaCaT細胞の亜ヒ酸感受性の変化

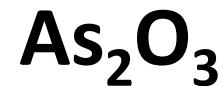


ヒ素化合物の毒性研究から見える展望

- 亜ヒ酸の入り口としてAQP9を同定した。
 - 転写因子Nrf2の活性化により亜ヒ酸毒性が軽減した。
- 慢性ヒ素中毒患者に対するNrf2活性化剤を使用した解毒効果
- AS3MT mRNAのスプライシング異常を検出した。
 - 亜ヒ酸の毒性に関わる因子としてFOXA1を同定した。
- 慢性ヒ素中毒患者におけるAS3MT mRNAのスプライシングは
どうなっているか？
- 慢性ヒ素中毒による中毒症状とFOXA1との関連性

医薬品としてのヒ素化合物

中国で使用されていた「癌霊1号」などの亜ヒ酸を含む薬剤が、急性前骨髄性白血病に有効であるとする報告が中国、アメリカからなされた（1990年代）



※※2007年4月改訂（第4版）

※2005年12月改訂

貯法：室温保存

使用期限：外箱及び

アンプルに表示

毒薬
指定医薬品
処方せん医薬品[※]

再発・難治性
急性前骨髄球性白血病治療剤

トリセノックス[®]注10mg

Trisenox[®] Injection 10mg

<三酸化ヒ素製剤>

日本標準商品分類番号

874291

承認番号 21600AMY00137000

薬価収載 2004年12月

販売開始 2004年12月

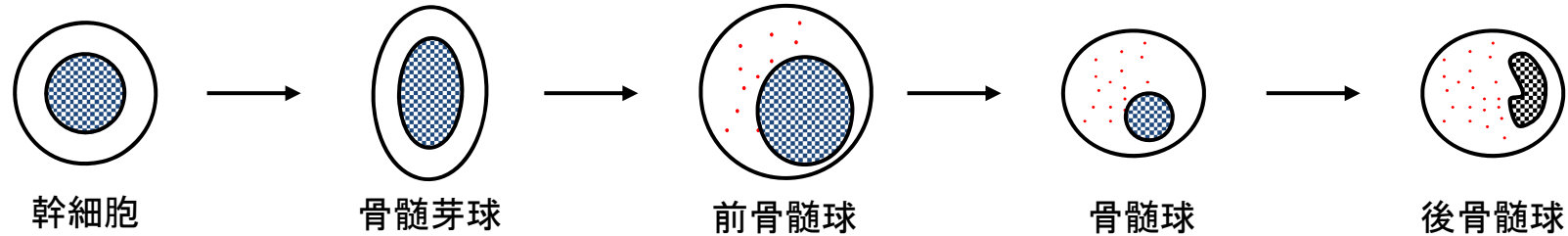
国際誕生 2000年9月

注) 注意-医師等の処方せんにより使用すること

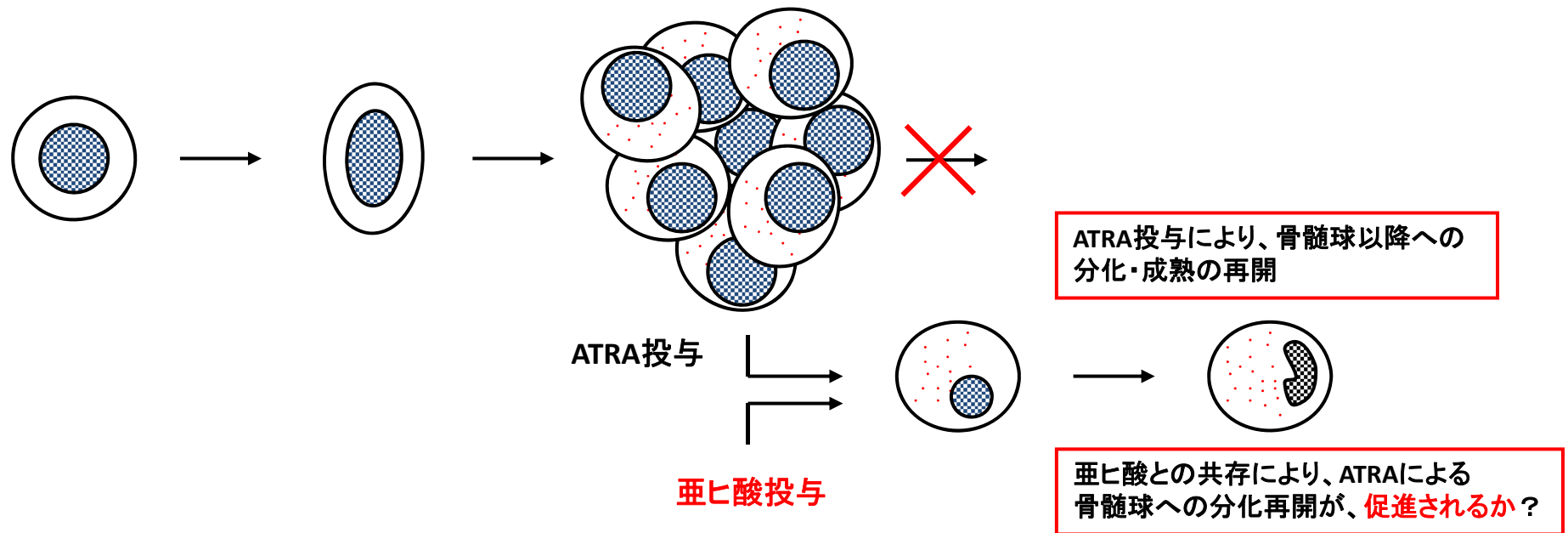


急性前骨髄球性白血病 (APL)

【正常な好中球への分化・成熟】

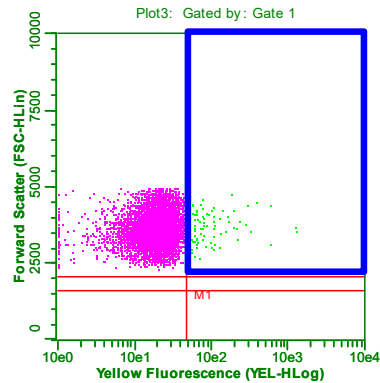


【急性前骨髄性白血病における分化・成熟の障害】

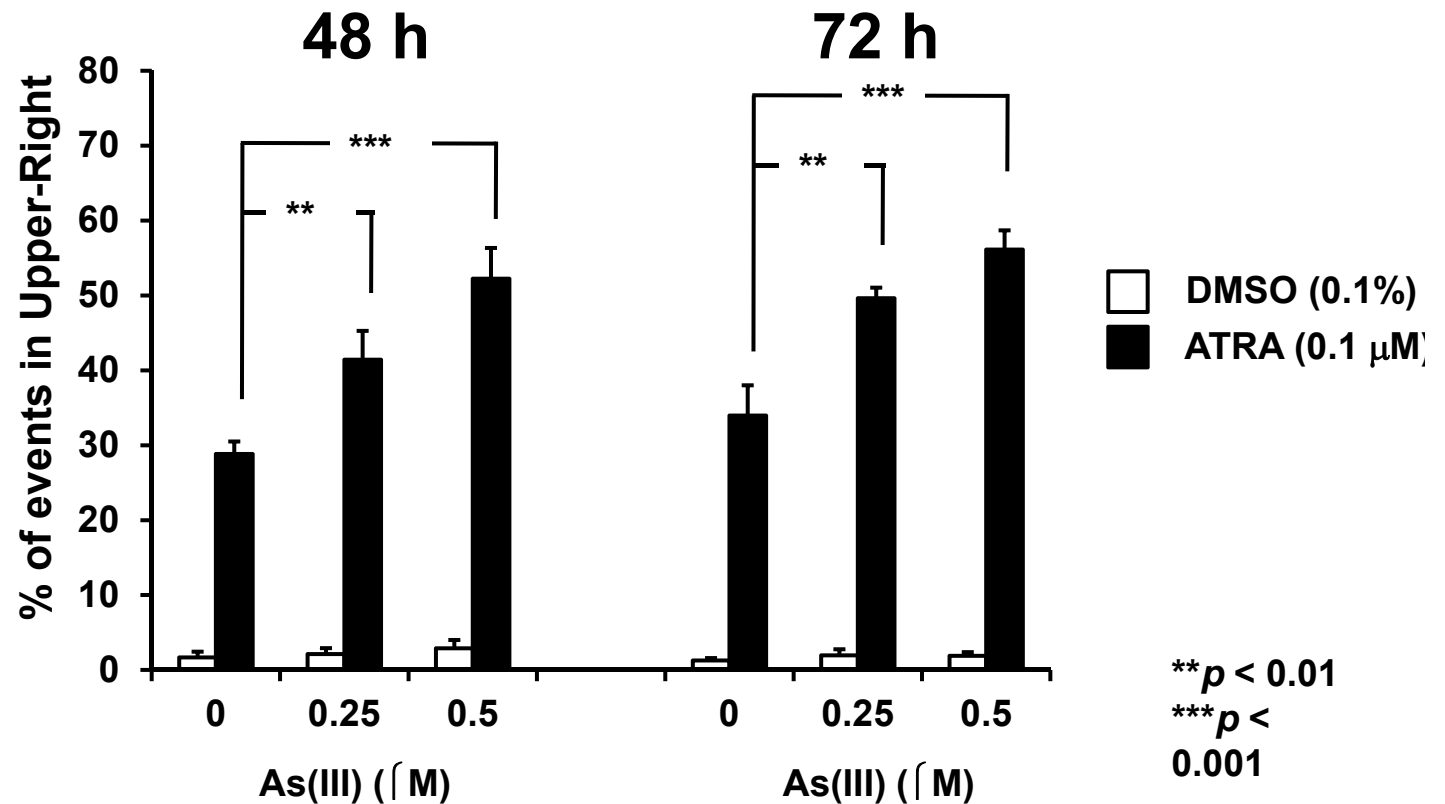
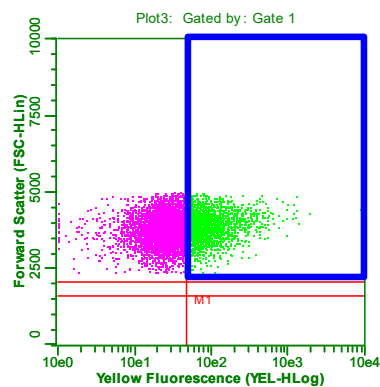


亜ヒ酸はATRAによるHL-60細胞の分化を増強させる

DMSO
(0.1%)

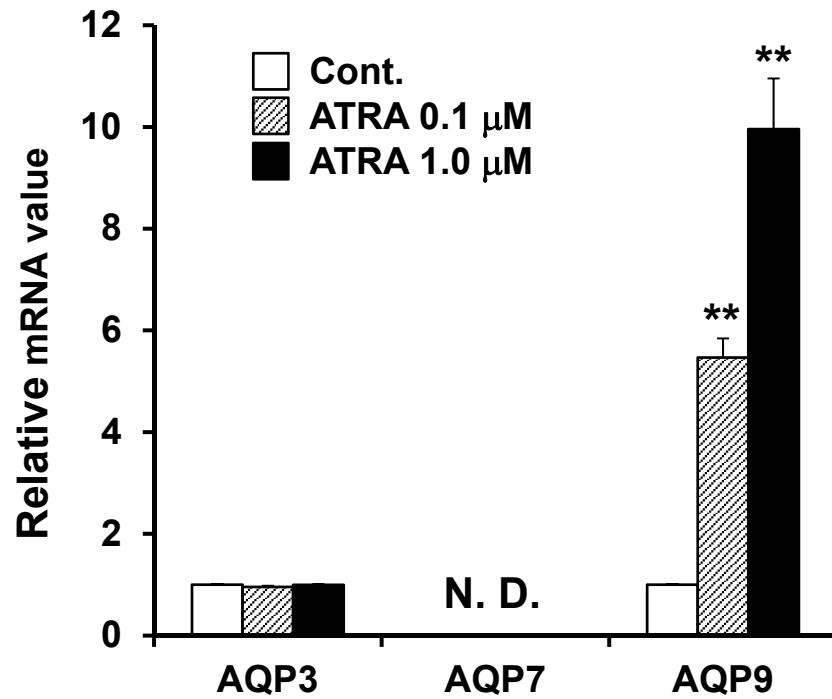


ATRA
(0.1 μM)



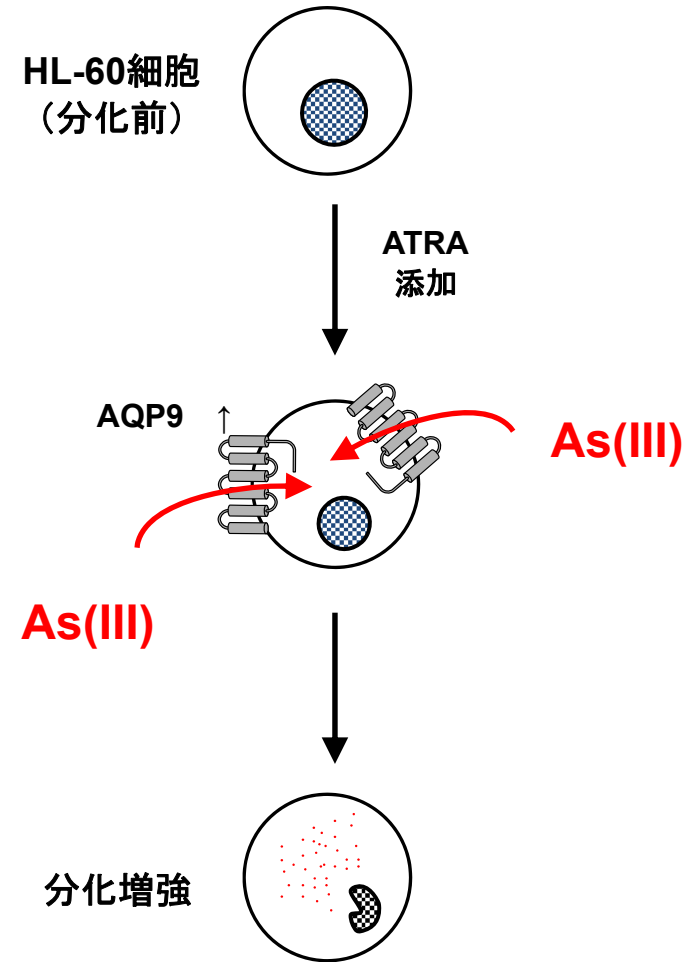
計測した10,000細胞のうち、
青枠に入った細胞数の割合を定量

ATRAはAQP9 mRNAの発現を亢進させる



N. D. = not detected

** $p < 0.01$



謝辞

- 徳島文理大学薬学部 姫野誠一郎教授、スタッフの皆様、学部生
- 筑波大学大学院人間総合科学研究科 熊谷嘉人教授、大学院生



御清聴、ありがとうございました。

アジア地域におけるヒ素汚染

