

ヒ素の毒性のメカニズム

ヒ素の作用機序については、様々な観点から多くの報告がなされている。これまでも IARC、EFSA、ATSDR 等の海外諸機関において検討がなされているものの、その作用機序については明らかにされていない。本項では、小グループの検討における遺伝毒性の見解、IARC (2004、2012)、ATSDR (2007) 等を中心に、ヒ素化合物による発がん作用機序に関する科学的知見を整理した。

(1) DNA 損傷、遺伝子突然変異、染色体異常

小グループの検討において、ヒ素化合物による遺伝毒性について以下のように見解をまとめている。

ヒ素化合物は、ヒト細胞を含めた培養細胞において、DNA 損傷及び染色体異常を引き起こすと考えられる。一般に毒性の強さは、原子価数 3 価の方が 5 価よりも高く、また、原子価数 5 価の場合は有機ヒ素化合物よりも無機ヒ素化合物の方が高いと考えられる。

ヒ素化合物による *in vivo* 試験の報告は少ないが、マウスに As(III) を経口投与、腹腔内投与又は皮下投与することにより染色体異常、小核形成の増加及び DNA 損傷が引き起こされる。DMA(V) 投与では、肺の DNA 損傷や骨髄の染色体異常性の誘発等の報告があるものの、遺伝子突然変異及び小核の誘発は認められていない。

疫学研究では、ヒ素による遺伝子突然変異の有意な頻度上昇を認める報告はない。しかし、対象者間のバラツキが大きかったために統計的に有意とならなかった可能性もあるため、今後の報告を待たねばならない。一方、染色体異常及び姉妹染色分体交換 (SCE) については、一部陰性の報告があるが、飲料水中のヒ素曝露により尿路上皮細胞、口腔粘膜細胞及び末梢血リンパ球細胞において有意に頻度が高くなると報告されている。さらに、ヒトの尿路上皮細胞、口腔粘膜細胞及び末梢血リンパ球細胞において小核形成の頻度に、ヒト末梢血リンパ球において染色体異常及び姉妹染色分体交換に用量反応性がみられている。なお、ヒ素曝露による感受性は、喫煙により修飾されるとする報告もあるが、ないとする報告もある。

これらのヒ素による遺伝毒性の誘導について、IARC (2004) はヒ素曝露によって生じる遺伝子の不安定性に寄与している可能性があるとしている。また、ヒ素のメチル化における中間代謝物である MMA(III) 及び DMA(III) は、*in vitro* で細胞に DNA 損傷を誘導する能力があり、*in vitro* で活性酸素を介した DNA 鎖切断を引き起こす分子種であるとされており、最近の研究から、これら

の代謝物並びに活性酸素がラット膀胱癌の誘発において主要な役割を果たすこと示しているとしている (IARC 2004)。

活性酸素は、ヒ素化合物の曝露により *in vitro*、*in vivo* のいずれにおいても生じる。IARC (2004、2012) は、活性酸素は As(III)、MMA(III) 及び DMA(III) による DNA 損傷や遺伝子発現を変化させるストレス応答に関連している可能性があるとしているとし、以下のように、ヒ素による酸化的 DNA 損傷について言及している。

低濃度の 3 価のヒ素化合物に曝露された細胞は酸化的 DNA 損傷を示す (Wang et al. 2002、IARC 2012)。As(III) 及び MMA(III) はヒト膀胱上皮細胞において酸化的 DNA 損傷の誘導能及び毒性が同等である (IARC 2012)。

例えば、細胞毒性濃度において、As(III) は活性酸素の生成を介してヒト-ハムスターハイブリッド細胞に大きな欠失変異を増加させる (Hei et al. 1998、IARC 2012)。DMA(III) により、フェリチンから鉄が遊離され、この遊離鉄によりフェントン反応やハーバー-ワイス反応を通じて活性酸素が生じる。また、MMA(III) 又は DMA(III) を *in vitro* で添加された Φ X174 DNA において活性酸素の生成を介した DNA 鎖切断が検出されている (IARC 2004)。

低濃度の 3 価のヒ素化合物は、G→T 塩基置換を生じると考えられている 8-OHdG による酸化的 DNA 損傷を誘導するという事実があるにも関わらず、As(III) 及び MMA(III) だけではなく DMA(III) も明らかな点突然変異物質ではないとされている (Klein et al. 2007、IARC 2012)。これは酸化的 DNA 損傷が効率的に修復・除去されることによるものと考えられる (IARC 2012)。

一方、DMA(V) による酸化的 DNA 損傷に関する報告もある。

マウスでは、DMA(V) は、還元的代謝を受けジメチルヒ素過酸化ラジカル ($(\text{CH}_3)_2\text{AsOO}\cdot$) により肺特異的 DNA 損傷を生じ、培養細胞内で DNA 切断や DNA-タンパク質架橋も生じうる (Tezuka et al. 1993、Yamanaka and Okada 1994、IARC 2012)。

DMA(V) を投与されたラットの尿中には DMA(III) が含まれており、その後生じる活性酸素による遺伝子損傷は、ラットでみられるヒ素による膀胱癌にとって重要な役割を演じている可能性がある。例えば、酸化的 DNA 損傷のマーカールとして最も一般的に用いられている 8-OHdG の形成やシクロオキシゲナーゼ (cox) -2 発現は DMA(III) によるラット膀胱癌を増加させると報告されている (IARC 2004)。

(2) DNA修復の変化

ヒ素による変異原性の増強は、核酸除去修復及び塩基除去修復のいずれにも影響することにより生じる可能性があるとされている。IARC (2012) は、ヒト皮膚線維芽細胞における核酸除去修復の阻害は、MMA(III)で最も強く、次いでDMA(III)、As(III)の順であったとしている。

① 無機ヒ素化合物

IARC (2004) で引用されている Hartwig ら (1997) の報告では、As(III)は、2.5 μM で DNA 切断過程を、20 及び 50 μM では DNA 結合過程を阻害することによってヒトの線維芽細胞で紫外線 (UVC) により引き起こされた DNA 損傷の核酸除去修復を阻害するとしている。また、IARC (2012) によると、As(III) は、特定のタンパク質を阻害することに加え、一部の DNA 修復遺伝子の発現を抑制するとしているが、非常に低い濃度では、細胞内抗酸化防御系に付随する DNA 修復の増大作用といった逆の影響を及ぼす可能性があるとしている。

IARC (2004、2012) は、無機ヒ素による DNA 修復の阻害のメカニズムについて以下のようにまとめている。

As(III)は DNA 修復酵素の特異な阻害物質ではなく、むしろ DNA 修復を制御する DNA 損傷シグナル機構に影響を及ぼす。シグナル伝達に参与するポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ (PARP) -1 は、DNA 修復タンパク質である X-ray complementing group 1 gene (XRCC1)、DNA ポリメラーゼ β 及び DNA リガーゼ III に相互作用することで塩基除去修復に関与しているが、このことは As(III)による塩基除去修復過程のうち結合過程を阻害する可能性がある (IARC 2012)。

As(III)は、ジスルフィド共有結合に関連した DNA リガーゼ I 及び II 並びに亜鉛フィンガータンパク質を含む複数の DNA 修復酵素を阻害する。亜鉛フィンガーDNA 修復酵素系の一つである PARP の活性は、5 μM 及び 10 nM といった低濃度の As(III)によって阻害されることが、ヒト T 細胞リンパ腫由来 Molt-3 細胞及び HeLa 細胞で示された。しかしながら、哺乳類の色素性乾皮症 A 群タンパク質や細菌由来のホルムアミド-ピリミジン-DNA グリコシラーゼといった他の亜鉛フィンガーDNA 修復酵素は As(III)によって阻害されない (IARC 2004)。

② 有機ヒ素化合物

IARC (2012) は、MMA(III)及び DMA(III)は、As(III)よりも強力な PARP 阻害物質でありまた、PARP の阻害は亜鉛フィンガードメインにおける亜鉛の置換によって生じるとしている (IARC 2012)。

(3) DNAメチル化の変化

最近、ヒ素化合物が、培養細胞及び生体内でエピジェネティックな影響を及ぼすことを指摘する報告が増えてきている。例えば、ヒ素及びヒ素代謝物の広範な DNA メチル化及び遺伝子特異的な DNA メチル化に対する影響、並びにヒ素化合物曝露によるヒストン修飾、クロマチン構造及びマイクロ RNA に対する影響が報告されている (Rossman and Klein 2011)。

ヒ素による DNA メチル化の変化は、がんの進行に関与している可能性があり、*in vitro* 及び *in vivo* 研究において、ヒ素による発がんが DNA のメチル化状態の変化や過剰なメチル化や低メチル化によっても誘導されていることが示唆されている (IARC 2004)。また、ヒ素化合物による遺伝子増幅や、DNA メチル化の変化による遺伝子発現の変化についての報告がなされている (Klein et al. 2007、IARC 2012)。IARC (2012) で引用されているヒ素化合物による DNA のメチル化に関する報告は、以下のとおりである。

- ・ As(III)及び MMA(III)により、ヒストン修飾を伴う DNA メチル化の変化がみられた (Jensen et al. 2008、Zhou et al. 2008)。
- ・ 低濃度の As(III)曝露により DNA メチル化の変化と染色体異数性が誘発されたチャイニーズハムスター V79-13 細胞では、遺伝的不安定性がより早期に認められた (Sciandrello et al. 2004)。
- ・ As(III)により形質転換された複数の細胞において、特異的な遺伝子の過剰なメチル化とともに、全体的な DNA の低メチル化が認められた (Bendbrahim-Tallaa et al. 2005a、Liu and Waalkes 2008)。
- ・ As(III)による DNA の酸化的損傷は、DNA のメチル化パターンに変化をもたらした (Cerda and Weitzman 1997)。
- ・ DNA メチル化パターンの変化は、細胞内 S⁺アデノシルメチオニン (SAM) 蓄積の変化及び DNA メチル化転移酵素の活性低下に由来する可能性がある (Hamadeh et al. 2002、Benbrahim-Tallaa et al. 2005a、Reichard et al. 2007、Liu and Waalkes 2008)。
- ・ ヒ素に曝露されたヒトにおいても DNA メチル化の変化が確認されている (Chanda et al. 2006、Marsit et al. 2006)。

(4) 細胞形質転換

ヒ素の曝露により、細胞の形質転換が誘導されることが示されている。

ヒ素は、シリアンハムスター胚細胞、BALB/3T3 細胞及びラット肝細胞 TRL1215 において細胞の形質転換を誘導する。後者の細胞をヌードマウスに接種することにより、肺への転移を示す線維肉腫の形成が確認されている (Lee et

al. 1985a、IARC 2004)。また、ヒト骨肉腫細胞における As(III)の長期間かつ低濃度の曝露により、遺伝的不安定性の二次的影響として変異及び形質転換を生じるが、これらの変化は MMA(III)ではみられないとしている (Mure et al. 2003、IARC 2012)。

(5) 細胞増殖の変化

ヒ素の曝露による細胞増殖の増加は、様々な実験系で直接的又は間接的に示されている。IARC (2004) によると、例えば、*in vitro*では、ヒ素により正常なヒト皮膚角化細胞で細胞増殖がみられ、DMA(V)を投与されたラットにおいて、膀胱の肥厚化が観察されている。また、細胞増殖のバイオマーカーであるオルニチン脱炭酸酵素活性の増加は、ヒ素を投与されたラットの腎臓又は肝臓で認められている (IARC 2004)。

(6) 細胞シグナル伝達の変化

As(III)により影響を受ける重要なシグナル伝達経路の一つは、腫瘍抑制遺伝子である *p53* を介した経路である (IARC 2012)。無機ヒ素化合物は、*p53* を含む細胞増殖及び防御に関連した様々な遺伝子発現を修飾することが示されている (ATSDR 2007)。3 価のヒ素化合物は、PARP 及び *p53* タンパク質の活性化に影響を及ぼすが、これは DNA 修復系に及ぼす影響及び染色体異数性の誘発を介して起こるかもしれない。PARP は、DNA 修復や正常な紡錘体の形成及び機能に必須であるが、3 価のヒ素化合物は PARP の活性化を阻害する。*p53* タンパク質は DNA 損傷応答において重要な役割を果たし、ゲノム安定性を維持し細胞周期チェックポイントとして機能するがん抑制遺伝子産物であるが、3 価のヒ素化合物は *p53* タンパク質を介したシグナル伝達を阻害する (Rossman and Klein 2011)。

As(III)は、DNA 損傷後に *p53* タンパク質の活性化や *p21* の遺伝子発現の低下を抑制する。この抑制は、DNA 損傷を受けた細胞における G1 期から S 期への細胞周期の停止 (DNA 複製前に行われる正常な DNA 修復の機会を得るため) に影響を及ぼすことから、変異原性増強の一部の原因を説明しているかもしれない。*p53* は核酸除去修復能においても重要である。As(III)、MMA(III)及び DMA(III)によるチオレドキシ還元酵素の阻害は、酸化型チオレドキシンの蓄積を生じ、*p53* の機能不全の一因となっている可能性がある。As(III)によって生じる Cyclin D のような細胞増殖調節遺伝子の発現増加は、細胞周期の調節機構を破綻に至らせる可能性があると考えられる (IARC 2012)。

ヒ素化合物は、細胞分裂因子活性化プロテインキナーゼファミリーに属する Jun キナーゼを刺激し、DNA 結合転写因子である AP-1 を増加させる。またヒ

素は、*c-jun*、*c-fos*、*c-myc* 及び腫瘍増殖因子 (TNF) - α といった前がん遺伝子の発現も誘導する。Mdm2 タンパク質の増加に付随して生じる p53 タンパク質の減少は、ヒ素を添加したヒト角化細胞 (HaCaT 細胞) で認められている。ヒ素誘導性皮膚発がんのモデルとして、*p53-MDM2* フィードバック制御ループの形成を阻害して、正常な細胞増殖の制御を破綻するものと考えられている (IARC 2004)。

(7) ステロイド受容体結合と遺伝子発現の変化

無機ヒ素は、糖質コルチコイド受容体へのステロイドの結合を阻害するが、アンドロゲン、エストロゲン、鉱質コルチコイド又はプロゲステロン受容体へのリガンド結合に影響は及ぼさない。この阻害は、乳がん組織に含まれるプロゲステロン受容体の評価を行う上で糖質コルチコイド受容体への選択的阻害剤として、ヒ素を活用できる可能性がある。しかし、MCF-7 細胞では、ヒ素はエストラジオールのエストロゲン受容体- α (ER- α) への結合を阻害したという報告もある。さらに、ヒ素は乳がん細胞系において ER- α の発現を阻害するが、ER- β の発現は影響を受けないことから、ヒ素は ER- α 陽性乳がんに対して新規治療手法となりうるとする報告もある (IARC 2004)。

(8) 遺伝子増幅

遺伝子の増幅は、ヒ素の発がん性に関与する一つのメカニズムとして考えられている (IARC 2004)。無機ヒ素はマウス 3T6 細胞においてジヒドロ葉酸還元酵素 (*DHFR*) 遺伝子の増幅を増大し、この作用は As(III) より As(V) の方が強いとされている (IARC 2002、ATSDR 2007)。

(9) 突然変異／遺伝毒性の促進

ヒ素の発がん作用は、発がんの促進作用に起因する可能性が示唆されている。ヒ素単独曝露ではマウスで皮膚腫瘍を引き起こさないが、ヒ素と紫外線の複合曝露により、紫外線単独曝露によって生じるものより個数や大きさが増加した皮膚腫瘍を生じることが報告されている (ATSDR 2007)。紫外線を含む多くの遺伝毒性をもつ因子 (genotoxic agents) との組合せにおいて、ヒ素は相乗的に遺伝毒性を増強する共変異原 (co-mutagen) であるとされている (IARC 2004)。