別紙

令和３～４年度　食品健康影響評価技術研究　研究成果報告書（終了時）

研究課題名 （研究項目名）	無機ヒ素のヒト体内での健康影響発現メカニズムに関する研究 （課題番号 JPCAFSC20212102） （2 健康影響発現メカニズムの解明 （1）食品中の微量化学物質・汚染物質の健康影響発現メカニズムに関する研究）
主任研究者	研究者名：魏　民 所属機関：公立大学法人大阪　大阪公立大学

Ⅰ 研究期間及び研究目的等

１　研究期間

令和３年度～令和４年度（２年間）

２　研究目的

疫学研究により、無機ヒ素に汚染された飲料水を摂取する地域において、膀胱、皮膚、肺、及び肝臓に発がん性が認められ、ヒ素ばく露による発がんリスクは世界的な問題となっている。我が国でも少量ながらも海産物由来の無機ヒ素摂取による影響が懸念され、種々の食品からの加算摂取によるリスク評価が必要である。しかしながら、低用量域での発がんリスクを評価することは疫学研究のみでは不可能であり、かつ無機ヒ素による発がんメカニズムについての知見が未だに不足しているため(食品中のヒ素 食品安全委員会 2013年)、無機ヒ素のヒト体内での動態と有害性発現メカニズムに基づいた発がんリスク評価は喫緊の重要課題である。

無機ヒ素のヒト発がんリスク評価及びそのメカニズムの解明には、解決すべき課題が大きく2つ存在する。1つ目は、無機ヒ素は生体内で代謝され、種々のヒ素代謝物が生成されることである。その代謝物の割合には種差があり、ヒトの代謝を反映した実験モデルでの検討が必要である。2つ目は、無機ヒ素の生体内での各種代謝物のヒト標的臓器への有害性、特に発がんへの影響を検討する必要ある。

そこで本研究では、ヒトにおける無機ヒ素の代謝を反映しうるヒト化肝臓マウスを用いて、肝臓及び尿中の無機ヒ素代謝物の同定及びその濃度を検討し、無機ヒ素を摂取したヒトにおける体内動態の詳細を明らかにする。また、有害性の検証に関して、不死化正常ヒト膀胱上皮細胞を利用し、よりヒト膀胱粘膜上皮に近いモデルを構築し、生体内で生成された各ヒ素代謝物の毒性を検証するとともに、発がんメカニズムの解明に取り組む。加えて、無機ヒ素の主要な有機代謝物であるジメチルアルシン酸(DMA^{V})誘発ラット膀胱がんを用いて、ヒ素によるエピジェネティックな異常を検証し、その発がんメカニズムへの関与を確認する。これらの結果を基に、ヒトの無機ヒ素ばく露による発がんリスク評価を行う。

３　研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者（所属機関）
無機ヒ素のヒト体内での健康影響発現メカニズムに関する研究	ヒト化肝臓マウスを用いた無機ヒ素の体内動態及び毒性の検討	公立大学法人大阪　大阪公立大学 （魏　民） 公益財団法人実験動物

		中央研究所 （末水 洋志） 公立大学法人大阪　大阪公立大学 （藤岡 正喜）
	不死化ヒト正常膀胱上皮細胞を用いたヒ素の*in vitro*毒性評価系の構築と膀胱発がんメカニズムの検討	国立研究開発法人 国立がん研究センター （清野 透） 公立大学法人大阪　大阪公立大学 （魏　民） 公立大学法人大阪　大阪公立大学 （藤岡 正喜）
	ヒ素誘発エピジェネティック修飾異常の探索	公立大学法人大阪　大阪公立大学 （魏　民） 公立大学法人大阪　大阪公立大学 （藤岡 正喜）

４　倫理面への配慮について

本研究は、人権の保護、個人情報の取り扱いに関して配慮すべき項目は含まれていない。

動物実験に関する倫理審査を所属機関において受け、承認された後に実験を開始するとともに、動物の愛護及び管理に関する法律、実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン（日本学術会議）を遵守する。実験終了後には結果報告書を所属機関に提出する。

Ⅱ 研究内容及び成果等

１ 研究項目

研究項目１）ヒト化肝臓マウスを用いた無機ヒ素の体内動態及び毒性の検討（末水洋志：（実験動物中央研究所）、魏　民（大阪公立大学）、藤岡正喜（大阪公立大学））

ヒト化肝臓マウスの作製として、変異型 Herpes simplex virus thymidine kinase 遺伝子 (HSVtk mut30) を肝細胞特異的に発現する肝障害誘導発症型免疫不全マウス(NOG-TKm30)と、IQI 免疫不全マウスとの交配により作出した F1 雑種 (F1-TKm30) マウスを作製した。その 5 週齢雌マウスにガンシクロビルを投与し、マウス肝細胞を選択的に破壊した後、脾臓門脈経由でヒト肝細胞を移植した。移植から約 12 週後に、血漿中のヒトアルブミン濃度を指標としてヒト肝細胞置換率が 70%以上に達した個体をヒト化肝臓マウスとして選抜し、下述の三価無機ヒ素 sodium arsenite (iAs^{Ⅲ})、5 価無機ヒ素 sodium arsenate (iAs^{Ⅴ}) 及びその尿中の主なヒ素代謝物である dimethylarsinic acid (DMA^{Ⅴ})投与試験に供した。

令和3年度は、ヒト化肝臓マウス及びホストマウス（野生型）を用いて、iAs^{Ⅲ}投与試験を行った。ヒト化肝臓マウス及びホストマウスをそれぞれ無処置群、iAs^{Ⅲ} 投与群に分け、iAs^{Ⅲ} を25 ppm（ヒ素濃度として）で投与し検討を行ったが、1週間後でも一般状態が良好であったため、iAs^{Ⅲ}投与群を2群に分け、半数を同じ用量群（25 ppm 群）、残りのマウスに対して第2週から投与終了（第4週）まで、投与濃度を50 ppmに上げた（25→50 ppm 群）。投与期間中に、ヒト化肝臓マウスの25→50 ppm 群で顕著な体重増加抑制がみられ、4週間投与試験における最大耐量が50 ppmであると考えられた。4週間投与終了後に、膀胱及び肝臓を採取し病理組織学的解析を行った結果、ヒト化肝臓マウス及びホストマウスいずれにおいてもiAs^{Ⅲ}投与による病理組織学的変化及び細胞増殖能変化はみられなかった。ヒト化肝臓マウス及びホストマウス尿中のヒ素代謝物の相違を検討するため、HPLC/ICP-MSを用いて25→50 ppm 群での尿中の無機ヒ素及びヒ素代謝物の定量的解析を行った。その結果、DMA^{Ⅴ}はヒト化肝臓マウス及びホストマウスいずれにおいても、最も多い尿中ヒ素代謝物だった。一方、monomethylarsous acid (MMA^{Ⅴ}) がヒト化肝臓マウスで26.4%、ホストマウスで4.7%の割合で存在し、ホストマウスに比較してヒト化肝臓マウスで圧倒的に多く存在することが明らかになった。この結果は、ヒトはマウスよりもMMA^{Ⅴ}からDMA^{Ⅴ}へのメチル化代謝能が低い報告と一致している。また、ヒト化肝臓マウスの尿中における各ヒ素代謝物の濃度分布は、無機ヒ素にばく露したヒトの尿中代謝物濃度分布にも類似している。以上の結果より、ヒト化肝臓マウスはヒトの生体内におけるヒ素代謝を反映したモデルであることが強く示唆された。

令和４年度は、iAs^{Ⅲ}の代謝メカニズムの詳細を明らかにするために、25→50 ppm 群の肝臓及び膀胱より RNA を抽出し、網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、肝臓において iAs^{Ⅲ}投与により発現変動を認めた遺伝子数がヒト化肝臓マウス（ヒト肝細胞）で 421 個、ホストマウス（マウス肝細胞）で 197 個存在したが、共通して発現変動を認めた遺伝子は僅か 5 個であり、iAs^{Ⅲ}の肝臓に及ぼす影響がヒト化肝臓マウスとホストマウス間で大きく異なることが明らかになった。興味深いことに、ヒ素メチル基転移酵素（As3MT）の発現が、ホストマウスでは iAs^{Ⅲ}投与により有意に増加した一方で、ヒト化肝臓マウスでは変化しなかったことが判明し、ヒト化肝臓マウスにおけるヒ素のメチル化代謝能がマウスよりも低い性質を裏付ける結果が得られた。さらに、膀胱では同じマウス膀胱粘膜で構成されるのにも関わらず、発現変動遺伝子のプロファイリングがヒト化肝臓マウスと野生型マウス間で大きく異なることが明らかになり、尿中のヒ素代謝物濃度分布の違いが膀胱に対して異なる影響を与える可能性を示し

た。

また、ヒト化肝臓マウス及びホストマウスに五価無機ヒ素iAs^{V}及びDMA^{V}を投与した際の体内動態及び毒性について検討した。ヒト化肝臓マウス及びホストマウスに対して、iAs^{V}を0、100 ppm（ヒ素濃度として)、DMA^{V}を100 ppm （ヒ素濃度として）の濃度で2週間飲水投与した。投与開始2日後に、ヒト化肝臓マウスのiAs^{V}群及びDMA^{V}群で顕著な体重増加抑制がみられたため、すべてのマウスに対して3日目から投与終了（第2週）まで、投与濃度を50 ppmに下げた（100→50 ppm 群）。投与終了後に屠殺・剖検し、肝臓及び膀胱を採取し、RNAを抽出、網羅的遺伝子発現解析を行った。また、HPLC/ICP-MSを用いた尿中の無機ヒ素及びヒ素代謝物の定量的解析を行った。その結果、iAs^{V}投与試験では、ヒト化肝臓マウスで尿中のiAs^{III}及びMMA^{V}濃度がホストマウスと比較して高いことが明らかになった。この結果は、令和3年度に実施したiAs^{III}投与試験と同様に、ヒトがマウスよりもヒ素に対するメチル化代謝能が低い報告と一致している。また、DMA^{V}投与試験では、尿中における毒性の強いdimethylarsinous acid (DMA^{III})濃度がホストマウスに比較してヒト化肝臓マウスで明らかに低いことが判明し、DMA^{V}による膀胱に対する感受性の種差に関与すると考えられた。また、肝臓及び膀胱における網羅的遺伝子発現解析を行った結果、iAs^{V}及びDMA^{V}投与による発現変動遺伝子のプロファイリングがヒト化肝臓マウスと野生型マウス間で大きく異なることが明らかになった。以上より、ヒト化肝臓マウスとホストマウスを比較することで、ヒ素のヒト肝臓への影響及び尿中代謝物を介した膀胱への特異な影響を明らかにした。また、ヒト化肝臓マウスモデルが、ヒト体内代謝を介したヒ素の健康影響を解析するのに非常に有用であることが明らかになった。

研究項目２）不死化ヒト正常膀胱上皮細胞を用いたヒ素の*in vitro*毒性評価系の構築と膀胱発がんメカニズムの検討（清野透（国立がん研究センター）、魏　民（大阪公立大学）、藤岡正喜（大阪公立大学））

不死化ヒト正常膀胱上皮細胞を用いた2次元及び3次元培養下で、iAs^{III}及びその代謝物の毒性を検討することで、ヒト膀胱上皮に対する個々のヒ素の影響を検証し得る実験系を確立するとともに、ヒト膀胱上皮への毒性や発がんに資する情報を得ることを目的に行った。

令和3年度は、変異型CDK4及びTERT伝子の導入により樹立した不死化ヒト正常膀胱上皮細胞（HBladEC1-K4/T）を2次元的に培養した条件で、iAs^{III}及びその代謝物の毒性について検討した結果、半数致死濃度 (LC_{50})は、DMA^{III}で一番低く、dimethylmonothioarsinic acid ($DMMTA^{V}$)、iAs^{III}、iAs^{V}、DMA^{V}、MMA^{V}の順であった。特に3価の有機ヒ素化合物であるDMA^{III}が最も毒性が強く、次に5価ながら含硫有機ヒ素化合物である$DMMTA^{V}$において、毒性の強い無機ヒ素iAs^{III}と同程度の毒性を認めた。さらに、ヒト尿中に存在する主なヒ素代謝物であるDMA^{V}及びMMA^{V}のLC_{50}はmMレベルに対して、DMA^{III}、$DMMTA^{V}$、iAs^{III}及びiAs^{V}はμMレベルであり、DMA^{V}及びMMA^{V}よりはるかに毒性が強いことが明らかになった。また、3次元培養膀胱モデルの構築条件を検証し、ヒト膀胱組織と同様な分化を示す多層化した3次元培養膀胱モデルを構築できた。

令和4年度は、TERTのみ導入したHBladEC1-T細胞においてもHBladEC1-K4/Tと比して同様に培養可能であることが確認出来たので、変異型CDK4導入の有無によるヒ素毒性への影響を検証する目的で、HBladEC1-Tを2次元的に培養した条件で、無機ヒ素及びその代謝物の毒性を検討した。その結果、3価の有機ヒ素化合物monomethylarsinous acid (MMA^{III})が最も毒性が強く、$DMMTA^{V}$が2番目に強いことが確認された。ヒト尿中に存在する主なヒ素代謝物であるDMA^{V}及びMMA^{V}のLC_{50}はmMレベルに対して、iAs^{V}、As^{III}、MMA^{III}、DMA^{III}及び$DMMTA^{V}$はμMレベルであり、DMA^{V}及びMMA^{V}よりはるかに毒性が強いことが明らかになった。これらの結果は、令和3年度に得られたHBladEC1-K4/Tでの結果と同様であるため、2次元培養条

件において変異型CDK4はヒ素の毒性に影響を及ぼさないことが明らかになった。また、HBladEC1-T細胞において、各種のヒ素化合物を25 %致死濃度（LC_{25}）の用量でばく露した際の遺伝子発現変化を網羅的に解析した結果、検討したヒ素化合物いずれにおいても共通して活性化されたパスウェイとして、Nrf2を介した酸化ストレス応答が明らかになった。一方、細胞死や細胞増殖及び分化などのパスウェイは、ヒ素化合物ごとの特徴がみられた。

また、令和3年度に改良した3次元培養膀胱モデル（ヒト正常膀胱線維芽細胞を含むコラーゲンゲル(Raft)と不死化ヒト正常膀胱上皮細胞との組み合わせ）を用いて、HBladEC1-Tを3次元的に培養し、$iAs^{Ⅲ}$及びその主な尿中ヒ素代謝物である$DMA^{Ⅴ}$をばく露させ、毒性評価を実施した。その結果、3次元培養膀胱モデルで細胞死を認めた用量が2次元培養条件下よりも明らかに高いことが判明した。その原因として、3次元培養膀胱モデルにおいては、ヒト膀胱組織と同様に分化し多層化した構造の表層に、バリア機能を有する傘細胞が存在することが考えられた。しかし、検証を行っている過程で、HBladEC1-Tが一定の継代数を超えた際に尿路上皮のマーカーであるUroplakin 1bの発現が低下していることが判明した。一方、HBladEC1-K4/Tにおいては継代数に伴ったUroplakin 1bの低下がみられず、HBladEC1-K4/Tがより安定した分化能を維持している可能性が示唆された。以上より、3次元分化培養条件下では、HBladEC1-K4/Tが各種の試験に適していると考えられた。さらに、HBladEC1-K4/Tを用いた3次元培養膀胱モデルによる$iAs^{Ⅲ}$及び$DMA^{Ⅴ}$の毒性評価を実施した結果、$DMA^{Ⅴ}$のLC_{50}はmMレベルに対して、$iAs^{Ⅲ}$はμMレベルであり、$iAs^{Ⅲ}$が$DMA^{Ⅴ}$よりはるかに毒性が強いことを確認できた。また、$iAs^{Ⅲ}$及び$DMA^{Ⅴ}$の細胞毒性に細胞死やDNA傷害の誘導が関与することを確認し、これらがヒ素膀胱発がん性にも関与することが示唆された。以上より、3次元培養膀胱モデルがヒト膀胱上皮の各ヒ素代謝物による影響を検証可能とし、種々のヒ素による複合的な影響の評価に有用であると考えられた。

研究項目３）ヒ素誘発エピジェネティック修飾異常の探索（（魏　民（大阪公立大学）、藤岡正喜（大阪公立大学））

ヒ素およびその代謝物は遺伝毒性がみられない報告があり、その発がん機序にエピジェネティクな変化が重要であることが報告されている。そこで、DNAメチル化に着目しヒ素による膀胱発がんメカニズムの解明を行った。

令和3年度は、尿中の主なヒ素代謝物である$DMA^{Ⅴ}$に着目し、これまでに我々が作製した$DMA^{Ⅴ}$誘発ラット膀胱がん及び同週齢ラットの正常膀胱粘膜を用いて、次世代シークエンサーを用いたReduced Representation Bisulfite Sequencingによる全ゲノム網羅的DNAメチル化解析と、マイクロアレイ解析による網羅的遺伝子発現解析を実施した。また、$DMA^{Ⅴ}$投与早期からDNAメチル化異常により不活性化された遺伝子を同定するために、$DMA^{Ⅴ}$を4週間投与したラット膀胱粘膜を用いた遺伝子発現解析を行った。その結果、$DMA^{Ⅴ}$誘発ラット膀胱がんにおいて246遺伝子のプロモーター領域が高メチル化状態にあることが明らかになった。その中にはシグナル伝達経路活性化や転写因子の制御、蛋白質の翻訳後修飾に関与する遺伝子が多く含まれていた。また、マイクロアレイ解析との比較解析を行った結果、プロモーター領域の高メチル化及び遺伝子発現低下が確認された遺伝子として40遺伝子が同定された。さらに、そのうちの4遺伝子が、$DMA^{Ⅴ}$を4週間投与したラット膀胱粘膜においても、正常膀胱粘膜に比較して発現が低下していた。これらの結果により、ヒ素誘発膀胱発がんにおいて発がん早期からDNAメチル化異常が関与することが強く示唆された。

令和4年度は、発がん早期からDNAメチル化異常による制御を受けたと考えられる4遺伝子について、バイオインフォマティクス手法を用いて解析した結果、ヒト膀胱がん及び各種のヒト膀胱がん細胞株においてもプロモーター領域の高メチル化及び遺伝子発現低下が認められた。今後は、これら遺伝子の機

能を解明することで、ヒ素膀胱発がんにおけるDNAメチル化異常の詳細な役割が解明されることが期待される。

さらに、無機ヒ素を短期投与した膀胱粘膜上皮におけるDNAメチル化異常を検証し、DMA^{V}ばく露による影響と比較することで、異なるヒ素による膀胱発がんに対するDNAメチル化異常の関与及び相違について検討を行った。具体的には、ラットに0、100 ppm iAs^{III}、200 ppm iAs^{V}、200 ppm DMA^{V}をそれぞれ4週間飲水投与し、膀胱粘膜の網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、iAs^{III}とiAs^{V}を投与した膀胱粘膜における遺伝子発現プロファイルは類似しているが、DMA^{V}では大きく異なることが明らかになった。さらに、上述したDMA^{V}誘発膀胱発がんの発がん早期からDNAメチル化異常による制御を受けたと考えられる遺伝子は、iAs^{III}もしくはiAs^{V}を投与した膀胱粘膜においては有意な変動はみられなかった。今後は、無機ヒ素投与により尿中代謝物として多く存在するDMA^{V}が、無機ヒ素ばく露による膀胱発がん性の主体であるかを明らかにするため、これらの無機ヒ素を投与したラットの尿中DMA^{V}及びヒ素代謝物の比較解析や、それらのヒ素による複合影響について検討する必要があると考えられた。

２　研究全体の成果、考察及び結論

成果

ヒト化肝臓マウスを用いた無機ヒ素の体内動態及び毒性の検討では、ヒト化肝臓マウス及びホストマウス（野生型）に無機ヒ素（iAs^{III}及びiAs^{V}）及びその主な尿中代謝物であるDMA^{V}を投与する実験を実施した。iAs^{III}及びiAs^{V}投与試験では、ヒト化肝臓マウスでの尿中ヒ素代謝物の濃度分布はMMA^{V}濃度が高く、ヒトがマウスよりも、無機ヒ素に対するメチル化代謝能が低い報告と一致していた。また、DMA^{V}投与試験では、ヒト化肝臓マウスで尿中における毒性の強いDMA^{III}濃度がホストマウスに比べ明らかに低いことが判明し、尿中DMA^{III}濃度の高低がDMA^{V}の膀胱に対する影響の種差に関与すると考えられた。また、肝臓及び膀胱における網羅的遺伝子発現解析を行った結果、iAs^{III}、iAs^{V}及びDMA^{V}投与による発現変動遺伝子のプロファイリングがヒト化肝臓マウスと野生型マウス間で大きく異なることが明らかになり、ヒ素のヒト肝臓への影響及び尿中代謝物を介した膀胱への特異な影響が存在することが明らかにした。

不死化ヒト正常膀胱上皮細胞を用いたヒ素の *in vitro* 毒性評価系の構築と膀胱発がんメカニズムの検討では、ヒト尿中に存在する主なヒ素代謝物であるDMA^{V}及びMMA^{V}のLC_{50}はmMレベルであるのに対して、iAs^{V}、iAs^{III}、MMA^{III}、DMA^{III}及び$DMMTA^{V}$はμMレベルであり、DMA^{V}及びMMA^{V}よりはるかに毒性が強いことが明らかになった。また、網羅的遺伝子発現解析の結果、検討したヒ素化合物いずれも酸化ストレス応答が共通して活性化された。一方、細胞死や細胞増殖及び分化などへの影響はヒ素化合物ごとに異なる特徴が存在した。さらに、不死化ヒト正常膀胱上皮細胞を用いた3次元培養膀胱モデルの構築に成功し、より生体内のヒト膀胱粘膜上皮に近い形態で、無機ヒ素及びそのヒ素代謝物の毒性評価を行い、2次元培養よりもヒ素による毒性耐性が強いことを確認した。

ヒ素誘発エピジェネティック修飾異常の探索では、DMA^{V}誘発ラット膀胱がん及び正常膀胱粘膜を用いて、膀胱発がんに関わるDNAメチル化異常を同定した。また、DMA^{V}誘発膀胱発がんにおいて発がん早期からDNAメチル化異常が関与することを示し、それらのDNAメチル化がヒト膀胱がん及びがん細胞株においても重要であることを確認した。これらの結果は、ヒト膀胱がんへの外挿や発がんメカニズム解明に貢献すると考えられた。

考察

ヒト化肝臓マウスが、ヒトの生体内ヒ素代謝を反映したモデルであることが示され、ヒ素のヒト体内での健康影響発現メカニズムの解析に非常に有用であることが明らかになった。ヒト化肝臓マウスに DMA^{V} を投与した際の低い尿中 DMA^{III} 濃度は、膀胱への影響を含めヒトへ外挿する際の有益な結果となる。

無機ヒ素ばく露の指標について、諸外国では無機ヒ素（iAs^{V} 及び iAs^{III}）、MMA^{V} 及び DMA^{V} の合計値が用いられているが、海産物を常用摂取する本邦においては、職業的に無機ヒ素ばく露がなくても尿中から多量の DMA^{V} が検出された報告がある。不死化ヒト正常膀胱上皮細胞を用いた結果から、食品からのヒ素摂取による健康影響を検討する上で、無機ヒ素のほか、代謝過程で生ずる毒性の強い MMA^{III} や $DMMTA^{V}$、DMA^{III} の評価も重要であり、今後はこれらヒ素代謝物による複合影響についても検討する必要があると考えられた。また、3 次元培養膀胱モデルにより、無機ヒ素及びそのヒ素代謝物の複合ばく露による毒性について、より生体内のヒト膀胱粘膜上皮に近い状態で詳細に評価できると考えられた。

ヒ素誘発膀胱発がんにおいて発がん早期から DNA メチル化異常による制御を受けた遺伝子の同定が、ヒ素によるエピジェネティックな異常を証明し、その発がんメカニズムへの関与を確認できた。一部の DNA メチル化異常は、ヒト膀胱がんや膀胱がん細胞株でも同様に確認出来ており、ヒト膀胱がんの発がんメカニズム解明にも有益な結果と考えられた。

結論

①ヒト化肝臓マウスによるヒト生体内ヒ素代謝動態解析モデルの確立と膀胱及び肝臓における病態解明、②不死化正常ヒト膀胱上皮を用いた 3 次元分化培養モデルの構築と生体内ヒ素代謝物の毒性評価と発がんメカニズム解明、③ヒ素誘発ラット膀胱発がん過程における早期からの DNA メチル化異常の寄与を明らかにした。本研究で得られた研究モデル及び成果はヒトへの外挿性が高く、ヒトに対する無機ヒ素の毒性・発がんリスク評価に直接的に寄与し、国民の健康維持に大いに貢献することが期待される。また、ヒト化肝臓マウスがヒト生体内ヒ素代謝動態をよく反映したモデルであり、海藻や魚介類に多く含まれる有機ヒ素化合物であるアルセノシュガー及びアルセノリピッド等のヒト生体内ヒ素代謝動態解析や健康影響評価にも活用できると期待される。

Ⅲ 本研究を基にした論文等

１ 本研究を基にした論文と掲載された雑誌名のリスト

なし

２ 本研究を基にした学会発表の実績

1) Min Gi, Shugo Suzuki, Satoshi Yamashita, Masaki Fujioka, Ann Kakehashi, Tomoki Yamamoto, Guiyu Qiu, Hideki Wanibuchi. Aberrant DNA Methylation in Dimethylarsinic Acid-induced Rat Bladder Carcinogenesis. 第81回日本癌学会学術総会, 2022年9月, ポスター.

2) 藤岡正喜, 魏　民, Vachiraarunwon Arpamas, 鈴木周五, 鰐渕英機. 無機ヒ素曝露ヒト肝マウスにおける尿中及び糞中ヒ素の化学形態別性状の解析. 第 27 回ヒ素シンポジウム, 2022 年 12 月, 口頭.

3) 魏　民, 藤岡正喜, 鈴木周五, 山本与毅, Vachiraarunwon Arpamas, 梯アンナ, 鰐渕英機. ヒ素誘発膀胱発がん過程における DNA メチル化異常の関与. 第 27 回ヒ素シンポジウム、2022 年 12 月, 口頭.

4) Arpamas Vachiraarunwong, Min Gi, Tohru Kiyono, Shugo Suzuki, Anna Kakehashi, Masaki Fujioka, Hideki Wanibuchi. Toxicities of Various Arsenicals on Immortalized Normal Human Bladder Epithelial Cell. 第 39 回日本毒性病理学会総会及び学術集会, 2023 年 1 月, 口頭.
5) 山本与毅, 魏　民, 鈴木 周五, 藤岡正喜, Vachiraarunwong Arpamas, 邱桂鈺, 芝野佳奈, 梯アンナ, 鰐渕英機. ジメチルアルシン酸誘発ラット膀胱がんにおける DNA メチル化異常. 第 39 回日本毒性病理学会総会及び学術集会, 2023 年 1 月, 口頭.
6) 芝野佳奈, 魏　民, 藤岡正喜, Vachiraarunwon Arpamas, Aroonrat Pharapirom, Qiu Guiyu, 鈴木周五, 鰐渕英機. ヒト化肝臓マウスにおける無機ヒ素の体内動態及び毒性. 第 39 回日本毒性病理学会総会及び学術集会, 2023 年 1 月, ポスター.

３　特許権等の出願・申請等の状況
なし

４　プログラムの著作物及びデータベースの著作物
なし

５　その他（各種受賞、プレスリリース等）
藤岡正喜, 第 27 回ヒ素シンポジウム奨励賞. 「無機ヒ素曝露ヒト肝マウスにおける尿中及び糞中ヒ素の化学形態別性状の解析」. 2022 年 12 月.

Ⅳ 研究開始時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

1　達成目標の自己評価

達成目標	評価結果	自己評価コメント
(1)　ヒト化肝臓マウスを用いた無機ヒ素の体内動態及び毒性の検討 1)　ヒト化肝臓マウスを用いて、ヒトにおける無機ヒ素の体内動態を明らかにする。 2)　無機ヒ素ばく露によるヒト化肝臓マウスの肝臓及び膀胱に対する影響を明らかにする。	5	概ね計画通りに進捗している。 1)　ヒト化肝臓マウスに無機ヒ素及びその代謝物を投与する実験を行い、肝臓及び尿中のヒ素代謝物の同定及びその濃度を測定し、無機ヒ素を摂取したヒトにおける体内動態の詳細を明らかにした。 2)　肝臓及び膀胱における病理組織学的検討及び遺伝子発現解析を行い、野生型マウスと比較することで、ヒト肝臓における特異的な毒性及び、膀胱への影響などの相違を明らかにした。
(2)　不死化ヒト正常膀胱上皮細胞を用いたヒ素の *in vitro* 毒性評価系の構築と膀胱発がんメカニズムの検討 1）不死化ヒト正常膀胱上皮細胞における無機ヒ素及びその代謝物の毒性を明らかにし、ヒ素膀胱発がんに適した*in vitro*実験系を構築する。 2）無機ヒ素及びその代謝物による膀胱発がんメカニズムを解明する。	5	概ね計画通りに進捗している。 1)　不死化ヒト正常膀胱上皮細胞を 2 次元的に培養し、無機ヒ素及びヒ素代謝物の毒性を評価した。3 次元培養膀胱モデル（ヒト正常膀胱線維芽細胞を含むコラーゲンゲルと不死化ヒト正常膀胱上皮細胞との組み合わせ）を構築し、より生体内の膀胱粘膜上皮に近い形態で、無機ヒ素及びそのヒ素代謝物の毒性評価を実施した。 2)　尿中に検出されるヒ素化合物ごとの遺伝子発現変化の特徴が明らかになった。また、共通する影響として酸化ストレス応答を同定し、無機ヒ素の毒性及び発がん性の発現メカニズムの解明に関与する有用なデータが得られた。
(3)　ヒ素誘発エピジェネティック修飾異常の探索 これまでに我々の研究室で作製した DMA^{V} 誘発ラット膀胱がん及びラット正常膀胱粘膜を用いて、膀胱発がんに関わる DNA メチル化異常を同定する。	5	概ね計画通りに進捗している。 膀胱発がんに関わるDNAメチル化異常を同定し、DMA^{V}誘発膀胱発がんにおいて発がん早期からDNAメチル化異常が関与することを示した。また、一部はヒト膀胱がんにおいても関与することを確認した。今後は、選出された遺伝子の機能を解明することで、ヒ素膀胱発がんにおけるDNAメチル化異常の詳細な役割が解明されることが期待される。

注）評価結果欄は「５」を最高点、「１」を最低点として５段階で自己採点。

2　研究全体の自己評価

項　目	評価結果	自己評価コメント
（1）研究目標の達成度	5	概ね計画通りに実験を進めている。当初設定した目標を達成した。
（2）研究成果の有用性	5	本研究で得られた研究成果はヒトに対する無機ヒ素の毒性・発がんリスク評価に直接的に寄与し、国民の健康維持に大いに貢献する。加えて、本研究で得られるヒ素代謝に関する様々な知見及び確立した評価系は、無機ヒ素のばく露・摂取の影響のみならず、海藻や魚介類に多く含まれる有機ヒ素化合物であるアルセノシュガー及びアルセノリピッド等のヒト生体内ヒ素代謝動態解析や健康影響評価にも活用できると期待される。
総合コメント 個別目標はいずれも予定通りに実験が実施された。ヒト化肝臓マウスを用いたヒト生体内ヒ素代謝研究及び、不死化ヒト正常膀胱上皮細胞を用いたヒ素代謝物の毒性検証など、ヒトへの外挿性の高い実験データが得られている。引き続き DMA^{V} 誘発膀胱発がんで DNA メチル化異常がみられた遺伝子の機能解析を行うことで、ヒ素膀胱発がんにおける DNA メチル化異常の詳細な役割の解明が期待される。		

注）評価結果欄は、「５」を最高点、「１」を最低点として５段階で自己採点。

（別添１）

研究成果の概要（和文）

ヒ素ばく露は世界的な問題であり、我が国でも海産物由来の無機ヒ素摂取による影響が懸念され、種々の食品からの加算摂取によるリスク評価が必要である。しかし、無機ヒ素による毒性や発がん性機序には不明な点が多く、無機ヒ素のヒト体内動態や有害性発症機序を解明し、発がんリスク評価可能な試験系を構築することは喫緊の重要課題である。本研究で、無機ヒ素ばく露したヒト化肝臓マウスの尿中代謝物がヒトの尿中代謝物に類似し、本マウスがヒトの無機ヒ素代謝を反映する有用なモデルであることを示した。また、肝臓及び膀胱における遺伝子発現解析を実施し、ヒ素のヒト肝臓への影響及び尿中代謝物を介した膀胱への特異な影響を明らかにした。不死化ヒト正常膀胱上皮細胞を用いて、各ヒ素化合物の毒性と遺伝子発現変化の特徴が明らかになった。特にヒ素ばく露による共通した遺伝子発現変化として酸化ストレス応答が見出された。また、新たに3次元培養膀胱モデル構築に成功し、ヒト膀胱上皮に近い状態でのヒ素複合ばく露による毒性が評価できると考えられた。さらに、ヒ素誘発ラット膀胱発がん過程において早期からのDNAメチル化異常の寄与を明らかにし、一部はヒト膀胱がんでも認められることを確認した。本研究で得られた研究モデル及び成果はヒトへの外挿性が高く、ヒトに対する無機ヒ素の毒性・発がんリスク評価に直接的に寄与し、国民の健康維持に大いに貢献することが期待される。

（別添２）

研究成果の概要（英文）

Title of research project	Exploring the Mechanism of Toxic Effects Induced by Inorganic Arsenic in Humans
Research project number	JPCAFSC20212102
Research period	FY 2021 – 2022
Name of principal research investigator (PI)	Min Gi

Summary

[Introduction]

The cancer risk associated with arsenic exposure is a global concern. There have been worries about the carcinogenic effects of arsenic in Japan, even though the intake amounts of inorganic arsenic derived from seafood and other foods are minor. However, the carcinogenicity of inorganic arsenic, especially the underlying mechanisms of carcinogenesis, remains to be fully understood. Therefore, it is both urgent and important to elucidate the carcinogenic mechanisms of inorganic arsenic in humans and to establish a system for evaluating carcinogenic risk. The aim of the current studies was to elucidate the metabolism and carcinogenic mechanisms underlying urinary bladder carcinogenicity of inorganic arsenice using a humanized liver mouse model, immortalized human normal bladder epithelial cells, and a rat urinary bladder carcinogenesis model.

[Methods and Results]

To investigate arsenic metabolism, we administered inorganic arsenic ($iAs^{Ⅲ}$ and $iAs^{Ⅴ}$) to humanized liver mice and host mice (wild mice). We found that the concentration of $MMA^{Ⅴ}$ was significantly higher in humanized liver mice than in host mice. This is consistent with previous reports suggesting that humans exhibit lower methylation metabolism for inorganic arsenic compared to mice. Finally, a comprehensive gene expression analysis in the liver and bladder showed substantial differences in the expression-changing gene profiles resulting from $iAs^{Ⅲ}$ and $iAs^{Ⅴ}$ administration between humanized liver mice and host mice.

In our *in vitro* arsenic toxicity evaluation studies using immortalized human normal bladder epithelial cells, we found that $iAs^{Ⅴ}$, $As^{Ⅲ}$, $MMA^{Ⅲ}$, $DMA^{Ⅲ}$, and $DMATA^{Ⅴ}$, are highly toxic than $DMA^{Ⅴ}$ and $MMA^{Ⅴ}$. Furthermore, our analysis of gene expression changes revealed that oxidative stress responses were activated by all the arsenic compounds tested. On contrast, pathways such as cell death, cell proliferation, and differentiation exhibited compound-specific characteristics. In addition, we successfully developed a three-dimensional bladder model using immortalized human normal bladder fibroblasts and immortalized human normal bladder epithelial cells. This model more closely mimics the in vivo environment of the bladder mucosal epithelium. We also demonstrated that this 3D model exhibits greater resistance to arsenic toxicity compared to the two-dimensional culture.

To examine the epigenetic abnormalities induced by arsenic, we identified DNA methylation anomalies involved in bladder carcinogenesis using a $DMA^{Ⅴ}$-induced rat bladder cancer model and

normal rat bladder mucosa. Additionally, we demonstrated that these DNA methylation abnormalities play a role from the early stages of carcinogenesis in DMA^{V}-induced bladder cancer.

[Discussion]

Our results showed that Humanized liver mice is a model that reflects arsenic metabolism in the humans, and it is extremely useful in analyzing the mechanism of toxic effects of arsenic in the humans.

Studies using immortalized human normal bladder epithelial cells suggest that in addition to inorganic arsenic, high toxic metabolites MMA^{III}, $DMMTA^{V}$, and DMA^{III} should be considered when evaluating the toxic effects of arsenic intake from food in Japan. Furthermore, we believe that the toxicity of inorganic arsenic and its metabolites due to combined exposure can be assessed more accurately by using a three-dimensional culture bladder model.

We also identified genes affected by DNA methylation abnormalities from the early stages of carcinogenesis in DMA^{V}-induced rat bladder cancers. This finding not only confirms the existence of epigenetic abnormalities triggered by arsenic, but also verifies their role in the arsenic-induced urinary bladder carcinogenesis.

[Conclusion]

Our findings possess high extrapolability to humans and directly contribute to assessing the toxicity and carcinogenic risk of inorganic arsenic in humans. They are expected to significantly contribute to the maintenance and improvement of public health.

1. List of papers published on the basis of this research

N/A

2. List of presentations based on this research

1) Min Gi, Shugo Suzuki, Satoshi Yamashita, Masaki Fujioka, Ann Kakehashi, Tomoki Yamamoto, Guiyu Qiu, Hideki Wanibuchi. Aberrant DNA Methylation in Dimethylarsinic Acid-induced Rat Bladder Carcinogenesis. The 81st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2022/9, Poster presentation.
2) Masaki Fujioka, Min Gi, Vachiraarunwong Arpamas, Shugo Suzuki, Hideki Wanibuchi. Characterization of Urinary and Fecal Arsenic by Chemical Forms in humanized liver mice exposed to inorganic arsenic. The 27th arsenic symposium, 2022/12, Oral presentation.
3) Min Gi, Masaki Fujioka, Shugo Suzuki, Tomoki Yamamoto, Vachiraarunwong Arpamas, Ann Kakehashi, Hideki Wanibuchi. Aberrant DNA Methylation in Arsenic-induced Bladder Carcinogenesis. The 27th arsenic symposium, 2022/12, Oral presentation.

4) Arpamas Vachiraarunwong, Min Gi, Tohru Kiyono, Shugo Suzuki, Anna Kakehashi, Masaki Fujioka, Hideki Wanibuchi. Toxicities of Various Arsenicals on Immortalized Normal Human Bladder Epithelial Cell. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology, 2023/1, Oral presentation.
5) Tomoki Yamamoto, Min Gi, Shugo Suzuki, Masaki Fujioka, Vachiraarunwong Arpamas, Guiyu Qiu, Kana Shibano, Anna Kakehashi, Hideki Wanibuchi. Aberrant DNA Methylation in Dimethylarsinic acid-induced Rat Bladder Carcinogenesis. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology, 2023/1, Oral presentation.
6) Kana Shibano, Min Gi, Masaki Fujioka, Vachiraarunwon Arpamas, Aroonrat Pharapirom, Qiu Guiyu, Shugo Suzuki, Hideki Wanibuchi. Toxicities of sodium arsenite in humanized liver mi ce. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology, 2023/1, Or al presentation.

3. The number and summary of patents and patent applications

N/A

4. Others (awards, press releases, software and database construction)

Masaki Fujioka, The 27th Arsenic Symposium Award, 2022/12.