

称 号 及 び 氏 名	博士(獣医学) Md. Anamul Haque
学位授与の日付	2 0 2 4 年 9 月 2 3 日
論 文 名	Effect of long-term low-concentration inorganic arsenic exposure on erythropoietin production and autophagy induction (長期間の低濃度無機ヒ素曝露がエリスロポエチン産生およびオートファジー誘導に及ぼす影響)
論 文 審 査 委 員	主 査 松 林 誠 副 査 森 山 光 章 副 査 金 子 武 人 副 査 西 村 和 彦

論文要旨

Introduction

Arsenic, a naturally occurring element widely dispersed in the earth's crust, exists primarily in two forms: organic and inorganic. Inorganic arsenic, which includes arsenite (As^{3+}) and arsenate (As^{5+}), is more harmful than organic arsenic, depending on exposure levels and duration. Its primarily found in groundwater and agricultural products, poses significant health risks, including cancer, skin lesions, and anemia. Epidemiological studies have shown a strong correlation between high arsenic exposure and anemia, but the analysis of its causes has not progressed. Improving anemia involves increasing erythropoietin (EPO) production, with reports indicating that arsenite can both enhance and inhibit EPO production. Long-term exposure to low concentrations of arsenic from the environment is expected to have various effects, even at non-toxic levels. However, research into the long-term effects of arsenic

exposure, including its effect on EPO production, remains limited. Exposure to arsenic activates various cellular defense mechanisms, though the effects of long-term exposure to low concentrations are unclear. One crucial cellular protective mechanism is autophagy, which contributes to cell survival by recycling damaged organelles and proteins. It helps maintain cell survival and is considered an important mechanism for protecting cells from low concentrations of toxic substances.

This study aimed to analyze the effects of long-term exposure to low concentrations of arsenate on EPO production and autophagy induction in EPO-producing HepG2 cells. Understanding these effects is essential for developing strategies to mitigate arsenic induced health issues, particularly in areas with lower arsenic concentrations, which are often perceived as safe but still pose long-term health risks.

Chapter 1: Effect of long-term low-concentration arsenate exposure in HepG2 Cells

1.1 Cell proliferation and viability by long-term low-concentration arsenate exposure

This chapter investigates the effects of arsenate, a form of inorganic arsenic as abundant in the environment, on cellular homeostasis and viability, particularly focusing on oxidative stress and detoxification mechanisms. The safety standard for arsenic in drinking water in Bangladesh is 50 µg/L, with levels above this posing potential health risks. This study focused on the effects of arsenate at concentrations between 1 and 10 µM, representing low-risk areas. Arsenate exposure induces oxidative stress by generating reactive oxygen species (ROS), leading to cellular damage and impaired functions. Arsenate enters the body and is converted to arsenite bound to glutathione within cells, with arsenic methyltransferase (AS3MT) playing a crucial role in detoxification. However, this process also generates ROS, adding to oxidative stress. EPO producing HepG2 cells were treated with arsenate for up to 3 weeks. Cell proliferation significantly decreased at 10 µM arsenate, but cell viability was not affected at any concentration, indicating no cytotoxicity at levels up to 10 µM. Arsenic concentration and AS3MT mRNA expression in HepG2 cells increased in a dose-dependent manner, suggesting that arsenate exposure promotes arsenic metabolism.

1.2 Reactive oxygen species (ROS) production and ROS scavenging by long-term low-concentration arsenate exposure

This section investigates the effects of long-term arsenate exposure on oxidative stress. The study found no significant changes in ROS levels or malondialdehyde (MDA) content, an oxidative damage marker, between arsenate treated and control cells, confirmed that long-term arsenate exposure did not increase oxidative stress. Long-term arsenate exposure led to increased nuclear localization of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2), a transcription factor regulating antioxidant responses, indicating elevated ROS production and enhanced ROS scavenging ability. Additionally, the total glutathione levels and superoxide dismutase activity, both key indicators of ROS scavenging capacity, were significantly elevated in arsenate treated cells. These findings suggest that long-term low-concentration arsenate exposure boosts cellular detoxification processes and ROS scavenging mechanisms, helping mitigate potential cytotoxic effects. Despite the increased ROS production due to arsenic metabolism, the cells enhance their antioxidant defenses, maintaining redox balance and protecting against oxidative stress.

Chapter 2: Effect of long-term low-concentration arsenate exposure on EPO production

2.1 EPO production by long-term low-concentration arsenate exposure

This chapter investigates the effects of long-term arsenate exposure on EPO production in HepG2 cells and mice. Initially, *EPO* mRNA levels in arsenate-exposed cells increased for the first 48 hours, likely as a stress response. However, after one week, EPO mRNA levels returned to baseline, and after two weeks, they decreased in a concentration-dependent manner. At the protein level, EPO was significantly depleted after three weeks of exposure, indicating reduced EPO synthesis. ROS scavenger 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-Oxyl (TEMPOL) abolished the increase in *EPO* mRNA induced by acute arsenate exposure, highlighting ROS as a critical signaling molecule. Long-term arsenate exposure diminished the cells responsiveness to EPO production promoters like pyocyanin and hypoxia related ROS, but not cobalt, suggesting altered EPO production mechanisms. In mice (ddY), long-term arsenate exposure did not affect body weight or hematocrit percentage, indicating no anemia. *EPO* mRNA levels in liver and kidney tissues remained unchanged. Under hypoxic conditions, *EPO* mRNA expression decreased in liver and kidney cortical cells from arsenate

treated mice, showing reduced responsiveness to EPO production stimulation. Long-term exposure reduced the response to ROS mediated EPO production stimulation both *in vitro* and *in vivo*, suggesting that it affected EPO production capacity.

2.2 Sirtuin 1 (SIRT1) mediated EPO production by long-term low-concentration arsenate exposure

In this section, the effects of long-term arsenate exposure on the EPO production mechanism in HepG2 cells were analyzed, focusing on hypoxia inducible factor (HIF) and sirtuin1 (SIRT1). HIF is a regulator of *EPO* mRNA expression, and the amount of α subunit regulates HIF activity. SIRT1 is increased by ROS and is a regulator that suppresses the action of HIF. After 3 weeks of arsenate exposure, *HIF-1 α* and *HIF-2 α* mRNA levels increased, however, the protein levels of HIF-1 α and HIF-2 α did not change, suggesting post-transcriptional regulation or increased protein degradation. SIRT1 also accumulated in response to long-term arsenate exposure. This indicates that arsenate-induced oxidative stress activates SIRT1. When long-term arsenate exposure cells treated with the SIRT1 inhibitor EX527, *EPO* mRNA levels significantly increased, suggesting that SIRT1 suppresses EPO production by promoting the degradation of HIF proteins.

Chapter 3: Effect of long-term low-concentration arsenate exposure on autophagy induction

This chapter investigates the effects of long-term, low concentration arsenate exposure on autophagy in HepG2 cells. Autophagy, a crucial cell survival mechanism, was significantly induced by arsenate exposure at 24 hours, helping recycle damaged components. This increase was confirmed by increasing in ratio of LC3-I to LC3-II protein, key autophagy markers. The ROS scavenger TEMPOL inhibited the induction of autophagy after 24-hour exposure. Long-term exposure also enhanced autophagy. The protective role of autophagy was highlighted when inhibiting it with SBI0206965 increased cell death in both short-term and long-term arsenate exposure. These findings suggest that autophagy helps protect HepG2 cells from arsenate exposure, with both short-term and long-term exposures promoting cell survival. This suggests potential therapeutic strategies targeting autophagy to mitigate arsenate's harmful effects.

Conclusion

- Long-term exposure with low concentrations of arsenate, which is not cytotoxic to HepG2 cells, produces ROS. However, the amount of ROS does not increase due to enhanced ROS scavenging activity.
- During long-term arsenate exposure *in vitro* and *in vivo*, the response to ROS-mediated stimulation of EPO production was reduced.
- Activation of SIRT1 by long-term arsenite exposure suppressed EPO production via suppression of HIF-1.
- Autophagy induction was maintained at a high level in cells treated with arsenate for a long-term.
- The decrease in response to EPO production stimulation due to long-term arsenate exposure means that EPO production cannot be expected to increase in situations where it is needed, and it is expected to lead to the worsening of anemia.

審査結果の要旨

ヒ素は環境中に広く分布する元素で、特に無機ヒ素は毒性が強く、水溶性が高く地下水に多く含まれる。地下水から飲水や農産物を介して、ヒトに摂取され、がん、皮膚病変、貧血など、重大な健康リスクがある。ヒ素の毒性発現に関する研究は 3 価の無機ヒ素である亜ヒ酸で多く行われているが、環境からの曝露に相当する長期間の低濃度曝露の研究、特に環境中に多く存在する 5 価の無機ヒ素であるヒ酸についての研究はほとんどない。また、ヒ素曝露と健康リスクの 1 つである貧血の因果関係を明らかにする知見は乏しい。貧血を改善するにはエリスロポエチン (EPO) 産生の増加が必須とされる。亜ヒ酸は EPO 産生を促進または阻害することが報告されているが、ヒ酸と EPO 産生の関連は明らかではない。また、ヒ素曝露が細胞防御機構を活性化する報告があるが、低濃度の長期曝露による活性化は明らかではない。低濃度の暴露下での細胞の生存は、損傷した細胞小器官等のリサイクルが重要と考えられ、これを担っているのがオートファジーである。しかし、これを証明する報告はなされていない。

本研究は、長期間の低濃度ヒ酸曝露が、貧血発生に関与が大きい EPO 産生に及ぼす影響を EPO 産生細胞である HepG2 細胞およびマウスを用いて調べた。さらに、長期間の低濃度ヒ酸曝露時のオートファジー誘導について解析することを目的とした。

第 1 章では、HepG2 細胞を 3 週間 10 μ M までの低濃度のヒ酸存在下で継代培養し、

ヒ酸代謝による酸化ストレスについて評価した。ヒ酸代謝の過程で活性酸素種 (ROS) が産生することが知られているが、ROS 量、および酸化ストレスの指標であるマロンジアルデヒド量は、ヒ酸曝露による変化は認められなかった。ROS 産生により亢進する細胞保護機構である、nuclear factor erythroid 2-related factor 2 の核内移行、総グルタチオン量、superoxide dismutase 活性はヒ酸曝露により増加した。これらの結果から、長期間の低濃度ヒ酸曝露により産生する ROS は ROS 除去活性の増加により処理され、酸化ストレス自体は増加していないことが明らかになった。

第 2 章では、3 週間ヒ酸曝露した HepG2 細胞における EPO 産生について評価した。EPO 産生は ROS によっても促進されるが、ヒ酸曝露による EPO 産生の増加は認められなかった。さらに、ROS 産生を伴う事が報告されている低酸素状態、あるいは ROS 産生物質のピオシアニンの EPO 産生刺激効果はヒ酸曝露により抑制された。8 週間、10 μ M ヒ酸を飲水投与したマウスの腎臓および肝臓の *EPO* mRNA 発現は対照群と差は認められなかった。腎臓と肝臓から回収した初代培養細胞において、低酸素状態による EPO 産生の促進はヒ酸曝露マウスで抑制された。ROS 産生の増加は細胞保護機構の 1 つである調節因子 Sirtuin1 (SIRT1) を増加させ、SIRT1 は *EPO* mRNA 発現を調節している低酸素誘導因子 (HIF) の分解を促進し、活性を抑制することが知られている。ヒ酸曝露した HepG2 細胞では *SIRT1* mRNA 発現が増加しており、SIRT1 阻害剤の処置で *EPO* mRNA 発現が増加したことから、ヒ酸曝露による SIRT1 の活性化が HIF 活性を抑制していたと考えられた。これらの結果から、長期間の低濃度ヒ酸曝露では ROS 量の増加の抑制、および SIRT1 を介した HIF 活性の抑制を介して EPO 産生の促進が抑制されることが明らかになった。

第 3 章では、低濃度曝露時に関与が大きいと考えられる細胞保護機構の 1 つであるオートファジー誘導について評価した。3 週間のヒ酸曝露はモノダンシルカダベリン染色、および LC3 蛋白質量を指標としたオートファジー誘導を増加させた。オートファジー阻害剤の処置は細胞生存率を低下させた。これらの結果から、長期間の低濃度ヒ酸曝露は EPO 産生とは異なり、オートファジー誘導が増加しており、細胞生存に寄与していることが明らかになった。

本研究では、(1) 長期間の低濃度ヒ酸曝露は ROS 除去能力を増加させること、(2) ROS 除去能力の亢進により ROS を介した EPO 産生の増加が抑制されること、(3) SIRT1 活性化により EPO 産生が抑制されること、(4) オートファジー誘導の活性化は維持され細胞生存に寄与すること、を明らかにした。長期間の低濃度ヒ酸曝露では毒性発現は認められないが、EPO 産生促進が制限されることから、EPO 産生の増加が必要とされる状況下での EPO 産生の不足が健康状態の悪化や改善の遅延に関与する可能性がある。長期間の低濃度ヒ素曝露の影響を理解することは、ヒ素によって引き起こされる健康問題を軽減する戦略を開発するために不可欠である。従って、本研究は医学・獣医学の発展に貢献すると判断され、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。