

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（Ⅰ）

目 次

課題番号		
KH11001	バイオフィトニクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 …… 1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 …… 16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 21
KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発	望月直樹 …… 30
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 …… 40
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 …… 100
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 …… 126
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 …… 144
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 …… 154
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 …… 168
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 181
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 …… 196
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法の作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 …… 208
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 …… 221
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 …… 235
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山耕造 …… 247
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出利光 …… 262
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島正弘 …… 286
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木哲朗 …… 300
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西正孝 …… 310
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤準一 …… 318

KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功 刀 浩 …… 344
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉 岡 澄 江 …… 358
KH31025	生薬及び漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究	合 田 幸 広 …… 373
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工 藤 由 起 子 …… 390
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能 美 健 彦 …… 402
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉 里 勝 利 …… 417
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜 山 行 雄 …… 435
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクス的手法の開発に関する研究	斎 藤 嘉 朗 …… 449
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山 口 照 英 …… 466
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 謙 …… 481
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川 崎 ナ ナ …… 494
KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内 田 恵 理 子 …… 509
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純 一 …… 525
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永 井 洋 士 …… 537
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	網 脇 祥 子 …… 551
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍 兒 …… 566
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名 和 行 文 …… 576

ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築

所属 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部
研究者 能美 健彦

研究要旨 安全性検索段階の初期に有用なヒト型ハイ・スループット微生物遺伝毒性試験の開発と実用化を進め、リスク評価に有用なトランスジェニックラット、マウス培養細胞遺伝毒性試験の改良を進めた。ヒト CYP 遺伝子を発現するマウス細胞を樹立し thalidomide の催奇形性機構を検討した。

分担研究者

- (1) 高崎健康福祉大学 鎌滝哲也
- (2) 明治製菓株式会社 林 宏行
- (3) 中外製薬株式会社 渡部一人
- (4) 食品薬品安全センター秦野研究所 須井 哉
- (5) 株式会社 JIMRO 金谷一司
- (6) 大阪府公衆衛生研究所 小田美光

A. 研究目的

ゲノム研究の進展により、これまでになく多数かつ少量の候補物質の中から、安全で有効な化合物をいかに迅速にスクリーニングするかが、効果的な創薬を進める上で重要なりつつある。薬理作用の検索に関してはリセプター・アッセイなどの新手法が考案されスループット性の増大が図られているが、安全性の検索に関しては従来からの方法が踏襲されている例が多く、安全性検索の段階が律速となって創薬開発の全体の速度が制約される恐れがある。

遺伝毒性試験は、ゲノム DNA に対する化学物質の毒性を検出・評価する試験であり、DNA を遺伝情報の担い手とする多様な生物（微生物からラット・マウスまで）が毒性試験のテスターとして用いられる点に特徴がある。遺伝毒性試験の結果は発がん性と強く相関するが、発がん性試験に比べてその実施期間は短く、このため遺伝毒性試験は創薬の初期段階に実施されることが多い。実際、

微生物を用いる遺伝毒性試験（Ames テスト）やマウスを用いる小核試験で陽性となった化合物は、創薬の初期段階で医薬品としての開発が断念されることが一般的である。また遺伝毒性を示す発がん物質には閾値が無いと考えられており、医薬品の使用に伴う発がんのメカニズムに遺伝毒性（DNA に対する変異作用）が介在するか否かは重要な問題である。

本研究班では、ハイ・スループットな微生物遺伝毒性検出系を開発するとともに、キット化を通じてその実用化を進めている（図1）。また遺伝毒性検出用のレポーター遺伝子を導入したトランスジェニックラットおよびマウス細胞を用い、発がんの標的臓器において遺伝毒性を検出する *in vivo* 試験系の開発評価を行っている。微生物遺伝毒性試験のうち *umu* 試験に用いる菌株には、ヒト薬物代謝酵素を導入し、ヒト型のテスター株を開発している。これらの株は、医薬品候補化合物の初期スクリーニングにおいて貴重な情報を提供する。トランスジェニックマウス、ラットを用いる *in vivo* 試験は、発がん標的臓器において候補化合物の発がん作用に遺伝毒性が関与しているかを検討する際に有用である。さらに本研究班では、次世代への医薬品の影響を検索するため、ヒト薬物代謝酵素遺伝子を導入したトランスジェニックマウス催奇形性試験の開発を進めている。創薬においては、適切な遺伝毒性試験を実施し、遺伝毒

性を示さない候補化合物を選択することが大切である(図1)。

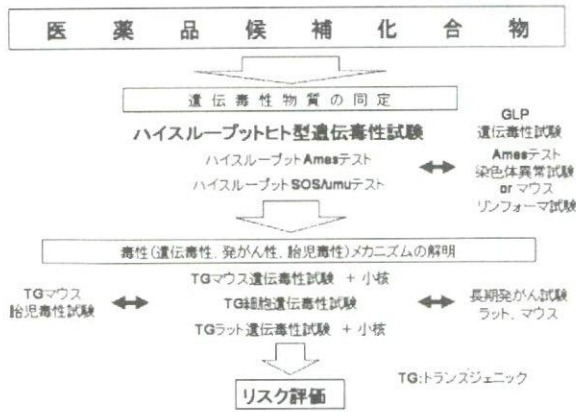


図1 遺伝毒性、発がん性、胎児毒性を勘案した毒性スクリーニングのフローチャート

今年度は、ヒト CYP1A2 を発現する *umu* テストのハイ・スループット化を進めるとともに、損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼ である大腸菌 Pol IV (DNA Pol IV) を発現するテスト株 (YG5161) がハイ・スループット Ames 試験に有用であることを明らかにした。さらに DNA Pol IV のヒト・ホモログである DNA ポリメラーゼ κ (hDNA pol κ) の構造と機能について検討し、ヒト胎児特異的に発現する CYP3A7 を発現するマウス細胞を用い thalidomide の催奇形性に核内受容体 (RAR) が重要な役割を果たすことを示した。

B. 研究方法

B-1 ヒト型 *umu* テストの最適化の検討

Salmonella typhimurium (以下サルモネラと略) OY1002/1A2 (ヒト CYP1A2 と NADPH-CYP 還元酵素及びサルモネラのアセチル転移酵素 (NAT) 高産生株) の一夜培養液を TGYT broth あるいは L-broth で 50 倍あるいは 100 倍希釈し、その菌液を 37°C で 1 時間培養した。菌液 96 μ L に被験物質溶液 4 μ L を加え、37°C、3 時間振盪培養した。その後、発色基質である chlorophenolred- β -D-galactopyranoside (CPRG) を加え 37°C、1 時間反応後、菌液の β -D-galactosidase 活性を測定した。濃度に

依存して酵素活性が増加し陰性対照 (溶媒) の 1.5 倍以上となった場合を陽性と判定した (小田)。

B-2 キット化 *umu* テストの条件検討

ウェルプレートに被験物質を含む液 10 μ L、試験菌液 (サルモネラ TA1535/pSK1002) を 100 μ L 加え、37°C で 2 時間培養した。反応終了後、発色基質として CPRG あるいは X-Gal を加え、575nm あるいは 620nm の吸光度を測定した。また被験物質の代わりに L-histidine あるいは L-tryptophane を加え、アミノ酸の SOS 反応に対する影響を検討した (金谷)。

B-3 改良法フラクチュエーション Ames 試験 (FAT)

試験菌株にはサルモネラ TA98 あるいは YG5161 株を用いた。被験物質による処理は 24 ウェルマイクロプレートを用いた。37°C、90 分間培養した後、各ウェルに bromocresol purple、histidine、biotin および glucose を含む指示培地溶液を 2.5mL 加え、その一部を 384 ウェルマイクロプレートに分注した。37°C で 3 日間静置培養後、黄変したウェル (黄変ウェル) の出現頻度 (%) を算出した。黄変ウェルの出現頻度が陰性対照の 3 倍以上となり用量依存性が認められた場合に陽性と判定した (須井)。

B-4 hDNA pol κ によるトランスリジョン DNA 合成 (以下 TLS と略)

5' 端から 19 個目の塩基に損傷を持った 36mer の合成オリゴヌクレオチド (鋳型鎖) に、5' 端を蛍光色素 (Cy3) でラベルした 14mer のプライマーをアニールさせ、精製した hDNA pol κ (50nM)、dNTP (250 μ M) と共に 37°C で 30 分間インキュベーションした。hDNA pol κ の 112 番目のチロシンをアラニンあるいはバリンに置換した変異体 (以下の Y112A あるいは Y112V と略) の性質を調べる際には、hDNA pol κ の代わりに Y112A あるいは Y112V を 50nM 加えた (能美)。

B-5 GDL1 マウス細胞での hDNA pol κ の発現と DNA pol κ ノックインマウスの樹立

国立衛研よりヒト及びマウスの DNA pol κ 遺伝子を含むプラスミドを入手し、これを GDL1 細胞へ導入した。得られた細胞株について mRNA の発現を RT-PCR により確認した。不活性型 pol κ ノックインマウスの作製においては国立衛研よりターゲティングベクターを入手し、これを ES 細胞へ導入した。これを胚盤胞中にインジェクションし、キメラマウスを作製した（渡部）。

B-6 Phenacetin の長期間混餌投与における遺伝子突然変異解析

Phenacetin を 52 週間混餌投与した *gpt delta* ラットの腎臓から回収した *gpt* 遺伝子についてシーケンス解析を行った。無処理群（6 匹）から分離された 18 コロニー、投与群（15 匹）から分離された 40 コロニーについてシーケンス解析を行った（林）。

B-7 Hras128 ラットとの交配種を用いた PhIP の遺伝毒性評価

SD 系の *gpt delta* ラットに短期発がん物質検出用 Hras128 ラットを交配させ、得られた産仔を用いて遺伝毒性評価を実施した。産仔は *gpt* (+/-) Hras (-/-)、*gpt* (+/-) Hras (+/-)、*gpt* (-/-) Hras (-/-)、*gpt* (-/-) Hras (+/-) の 4 群に分け、乳がんを誘発する PhIP を 100mg/kg で腹腔内に 1 日 2 回、4 週間連続投与し、投与開始から 6 週間後に *gpt* (+/-) Hras (-/-) および *gpt* (+/-) Hras (+/-) から乳腺を採取し、*gpt* 突然変異体頻度 (MF) を測定した（林）。

B-8 トランスジェニックマウスを用いた thalidomide の催奇形性機構に関する検討

ヒト CYP3A7 を発現するマウス胚由来 F9 細胞に retinoic acid receptor (RAR) β 2 由来の RAR 応答配列 (RARE) 2 コピーを含むレポータープラスミドを導入した。その細胞を用いて all-*trans*

retinoic acid (ATRA) が誘導するルシフェラーゼ活性に thalidomide が及ぼす影響を検討した（鎌滝）。

（倫理面への配慮）全ての動物実験は、実施施設における「動物実験管理に関する指針」に従い、動物実験管理委員会の承認を受けて実施された。マウス培養細胞ならびに微生物を用いる実験は、倫理面の問題は無いものと判断した。

C. 研究結果

C-1 ヒト CYP1A2 を発現する *umu* テストの最適化

OY1002/1A2 株を遺伝毒性物質 IQ で処理し、検出感度の最適化を図った。L-brothの方が TGyT broth よりも IQ による *umu* 遺伝子誘導効果が高感度に検出された。また L-broth で希釈する際には 100 倍希釈の方が 50 倍希釈よりも検出感度が高かった。4 種の芳香族アミンについてその *umu* 遺伝子誘導能を比較すると IQ > MeIQ > Glu-P-1 = Trp-P-2 であり、いずれの化合物も S9 mix による代謝活性化なしに *umu* テストに陽性結果を示した（小田）。

C-2 キット化 *umu* テストの条件検討

被験物質には S9mix 非添加群として furylfuramide (AF-2)、streptozotocine、 β -propiolactone、S9 mix 添加群として 2-aminoanthracene (2-AA)、Trp-P-1 および Trp-P-2 の 6 化合物を用いた。 β -Propiolactone を除く 5 化合物では、これまでの基質 X-Gal よりも CPRG 用いた方が、検出感度が高かった。また L-histidine、L-tryptophan は SOS 反応に影響を与えなかった（金谷）。

C-3 改良法 FAT における菌株と実験条件の改良

Ames 試験では陽性であるが、改良法 FAT では陽性結果が得られなかった 4 化合物

(3,4-diaminotoluene、9-nitroanthracene、*o*-nitrophenyl acetonitrile、4-nitro-*m*-phenylenediamine) について YG5161 株を用いて改

良法 FAT を実施した。その結果、S9 mix 添加の条件下で 9-nitroanthracene、4-nitro-*m*-phenylenediamine について陽性の結果が得られた (須井)。

C-4 hDNA pol κ による TLS

hDNA pol κ およびその変異体 (Y112A, Y112V) による TLS 活性を比較した。hDNA pol κ は、芳香族炭化水素である benzo[a]pyrene diolepoxide (BPDE)、酸化損傷である 8-oxoguanine (8-oxoG)、thymine glycol (TG) およびアルキル化損傷である *O*⁶-methylguanine (*O*⁶MeG)、*O*⁶-methylthymine (*O*⁶MeT) を乗り越えて DNA 合成を行うことが示された。だがいずれの場合も、損傷部位の手前で DNA 合成の阻害が見られた。紫外線損傷であるピリミジン二量体については、損傷部位の乗り越えは観察されなかった。Y112A および Y112V は、BPDE の TLS については hDNA pol κ と同程度か、むしろやや高い活性を示したが、BPDE 以外の損傷 (8oxoG、*O*⁶MeG、*O*⁶MeT、TG) については、hDNA pol κ よりも顕著に低い活性を示した。特に TG については、hDNA pol κ に比べてその TLS 活性は約 10% (Y112A)、20% (Y112V) であった (能美)。

C-5 *gpt* delta L1 細胞を用いた変異解析

ヒト及びマウス DNA pol κ 遺伝子を導入した GDL1 細胞においては、それぞれの DNA pol κ の mRNA が発現していることが確認された。しかし一方で、トランスフェクトしていない GDL1 細胞においても内因性 DNA pol κ の mRNA が発現していることが明らかとなった。このことは、別途国立衛研で実施された Western blot の結果によっても裏付けられた。不活性型 DNA pol κ ノックインマウスの作製においては、ターゲティングベクターの導入に成功した ES 細胞 7 クローンを胚盤胞中にインジェクションし、このうち 5 クローンにおいてキメラマウスを得た (渡部)。

C-6 Phenacetin の長期間混餌投与における遺伝

子突然変異解析

フェナセチン投与群の肝臓では、*gpt* 遺伝子の 26 番目および 27 番目における G:C to A:T 変異が投与期間に応じて増加したが、腎臓ではこのようなホットスポットは観察されなかった (林)。

C-7 Hras128 ラットとの交配種を用いた PhIP の遺伝毒性評価

無処理群の *gpt* MF ($\times 10^{-6}$) は Hras (-/-) で 3.92 ± 2.17 、Hras (+/-) で 2.39 ± 0.97 、PhIP 投与群では Hras (-/-) で 11.30 ± 1.83 、Hras (+/-) で 10.55 ± 4.73 であった。PhIP による MF の増大は観察されたが、Hras 導入によって自然突然変異頻度や PhIP に対する感受性に変化は認められなかった。次に PhIP 投与群で得られた 6-TG 耐性コロニーについて、*gpt* 遺伝子のシーケンス解析を実施した。クローナルな変異を除いた Hras (-/-) から 49 変異、Hras (+/-) から 51 変異についてその変異スペクトルを解析した。Hras (-/-)、Hras (+/-) とともに GC \rightarrow AT、GC \rightarrow TA の変異が多く、変異スペクトルからも Hras 導入による影響は認められなかった (林)。

C-8 ヒト CYP3A7 を用いる催奇形性試験

F9 細胞において ATRA 処置によって RAR を介した転写活性は誘導された。F9 細胞において ATRA と thalidomide の共処置によって、ATRA によって活性化された RAR を介した転写活性は thalidomide の濃度依存的に抑制された。以上のことから thalidomide は RAR の転写活性を抑制する可能性が示唆された (鎌滝)。

D. 考察

医薬品開発の初期には、少量・多数の候補化合物の中から毒性が低く薬効の高い物質を如何に迅速に検索するかが重要である。遺伝毒性は、創薬の初期に開発の意志決定に強い影響を与えることから、少量の試料で迅速にスクリーニングするシステムの確立が望まれている。今年度は、ヒト薬

物代謝酵素 (CYP1A2) を発現する *umu* テスト株を用いる試験法の最適化を図るとともに、新しい発色試薬 (CPRG) を用いたキット化の検討を行った。また FAT の改良を進め、DNA ポリメラーゼ IV を発現する株 (YG5161) を用いることにより Ames テストとの相関をさらに改善した。さらにトランスジェニックマウス、トランスジェニックラットを用いて候補化合物の遺伝毒性や催奇形性を評価する系の開発を進めた。

ヒト CYP1A2 およびヒト NADPH-P450 還元酵素をサルモネラ株で発現させることにより、今回試験に供した全ての芳香族アミンが、S9 mix による代謝活性化なしに *umu* 試験において陽性を示すことを明らかにした。また、その検出感度は用いる培養液の種類や希釈法によっても影響を受けることを示した。今回、用いたマイクロプレート法は、試験管やマイクロチューブを用いる手法よりも、ハイ・スループット化に適している。今後は、他のヒト型 CYP 遺伝子を導入した試験菌株を用いることにより、創薬のハイ・スループット化に貢献できるものとする (小田)。

umu テストのキット化を進める上で、発色試薬の選択は重要である。今回、赤色の CPRG と青色の X-Gal を比較し、CPRG がより高い吸光度を示すことを明らかにした。医薬品候補化合物の中には色が付いたものもあり、青色の検体については CPRG が有用である。微生物を用いる遺伝毒性試験のうち Ames 試験はアミノ酸要求性の変化を指標に化合物の変異原性を検索するため、標品中に L-histidine が混在すると試験の実施が困難になる。今回、L-histidine や L-tryptophan は SOS 反応に影響を与えないことを明らかにした。アミノ酸を含有する標品の遺伝毒性検索には Ames 試験よりも *umu* 試験が有用である (金谷)。

国立衛研にて前年度に開発された大腸菌 DNA Pol IV を発現する Ames テスト用サルモネラ株 (YG5161) を、より少量の被験物質で Ames 試験の結果を予測し得る改良法 FAT に応用した。YG5161 株と TA98 株は、共に TA1538 株を親株にしているが、

異なった DNA ポリメラーゼ (YG5161 では DNA Pol IV、TA98 株では DNA Pol RI) が発現している。これまでに YG5161 株を用いることで、多環芳香族炭化水素および芳香族アミンに対する改良法 FAT の感受性が向上することを示した。また、Ames 試験における菌株間 (TA98 株と YG5161 株) の感受性の相違が改良法 FAT においても反映されることを明らかにした。今年度は、TA100 株および TA98 株を用いた改良法 FAT では陽性結果が得られなかった 4 種の NTP 選定化合物 (Ames 試験では陽性) について、YG5161 株と TA98 株を用いて改良法 FAT による遺伝毒性検索を行った。その結果、TA98 株においてはいずれの化合物についても陰性だったのに対し、YG5161 株では S9 mix 存在下において 2 種の化合物について陽性結果を得た。これら 2 種の化合物については、いずれも Ames 試験 (TA98 株、S9 mix 存在下) で陽性結果が得られている。これらの結果から、TA98 株を用いた Ames 試験で陽性となる化合物について、YG5161 株を用いて改良法 FAT を実施することにより、Ames 試験の結果との相関性が高くなることが示唆された (須井)。

遺伝毒性の誘発は、主に (1) CYP などの代謝酵素により化学物質が活性化されて DNA 付加体を作る段階と (2) 付加体を持った DNA が突然変異に固定される段階に分けられる。ヒト CYP については、小田班員の報告が示すように、遺伝毒性試験に用いられるサルモネラ株で発現させ、バクテリアにヒトの性質を付与することに成功している。だが (2) の段階に関わる TLS 型ヒト DNA ポリメラーゼについては、未だサルモネラ株において活性を保持したまま発現させることに成功していない。今回の研究で、hDNA pol κ は鋳型鎖上のベンツピレン付加体、アルキル化損傷、酸化損傷を乗り越えて DNA 合成を続け、112 番目のチロシンを置換すると、ベンツピレン以外の DNA 損傷を乗り越える TLS 活性が大きく減少することが示された。hDNA pol κ をはじめとしたヒト TLS 型 DNA ポリメラーゼの構造と機能を明らかにする研究を通じて、ヒト TLS 型 DNA ポリメラーゼを発現するサルモネラ・テス

ター株を開発することが重要と考える（能美）。

DNA pol κ 遺伝子をトランスフェクトすることで GDL1 細胞の遺伝毒性物質に対する感受性が変化するかを検討する予定であったが、内因性マウス DNA pol κ の発現が明らかとなったため、この方法では DNA pol κ の機能解析は困難であると判断した。今後は、RNA 干渉等を用いることにより GDL1 細胞の DNA pol κ の発現を抑制し既知変異原物質への反応性を確認する等の手法を検討すべきと考える。不活性型 DNA pol κ ノックインマウスの作製に関しては、キメラマウスの作製まで完了した。今後は得られたマウスを交配し、安定した系列を確立すると共に、Cre 発現ベクターを受精卵へ導入し、マーカー遺伝子である Neo を除き DNA pol κ が特異的に不活化した遺伝毒性試験用ノックインマウスを作製する。このマウスを用いることにより、低用量域における多環芳香族炭化水素、アルキル化剤、酸化ストレス誘発剤の遺伝毒性を検査し、遺伝毒性の閾値を形成する要因について検討する（渡部）。

昨年度までに *gpt delta* ラットに phenacetin を長期連続投与すると、発がん標的臓器である腎臓よりも非標的臓器である肝臓において強い遺伝毒性が認められることを明らかにした。腎臓での遺伝毒性についてさらに検討するため、長期投与（52 週投与）で得られた変異コロニーについて、シーケンス解析を行った。その結果、肝臓での変異の hotspot (*gpt* 遺伝子の 26 および 27 番目の塩基の G→A 変異) は認められなかったが、変異スペクトラムに大きな違いはなく腎臓においても G→A 変異が主であった。Phenacetin の誘発する G→A 変異が腎臓における腫瘍誘発にはたす役割の解明が期待される（林）。

これまで *gpt delta* ラットに特異的に認められると考えていた 299 番目の A→T 変異は、6-TG を含まない培地に生えてきたコロニー（数十個）からも検出された。さらに、*gpt delta* ラット由来の 332 個の *gpt* 変異体中に 55 個の 299 A→T 変異が検出されたのに対して、*gpt delta* マウス由来の

約 1,700 個の *gpt* 変異体からは全く見出されなかった。よって、299 A→T 変異は、*gpt delta* ラット作製時に導入された λ EG10 DNA 中の *gpt* 遺伝子に既に起きていた変異であると推測された。その出現頻度 ($55/322=1/6$) と *gpt delta* ラットの λ EG10 導入コピー数 (5 コピー程度) から、6 コピーの 1 つに変異が起きていたものと考えられる。これまで 299 A→T 変異が単独で検出されたケースはまれであり、299 A→T 変異は Gpt を不活化 (6-TG 耐性) できないと考えられる。*gpt delta* ラット由来の *gpt* 変異スペクトルを解析する際には、299 A→T 変異を除くことが適切と結論した（林）。

発がん性の迅速評価を目的とした Hras128 ラットとの交配種を用いて MNU（昨年度）、PhIP（今年度）の遺伝毒性を検討した。Hras 遺伝子の導入によって乳腺の自然突然変異頻度ならびに誘発変異頻度および変異スペクトラムに変化は見られなかった。この結果から、Hras 遺伝子導入による乳腺発がんの感受性増大は、突然変異誘発の感受性が高くなったためではなく、突然変異が起きた導入ヒト *ras* 遺伝子がラット乳腺において強い発がん性を示すためであることが示唆された。内因性のラット *ras* 遺伝子の場合には、たとえ突然変異により活性化しても、その発がん作用を抑制する他の機構が存在し、多段階の変異を経て発がんに至ると考えられるが、ヒト *ras* 遺伝子がラットで活性化した場合には、一段階で発がんに至ることが予想される。*gpt delta* ラットと Hras128 ラットのダブルトランスジェニック動物が、発がん性と遺伝毒性の関連を検討する貴重なモデルになりうることを期待される（林）。

化学物質が誘発する催奇形性やヒト胎児の発がん性を予測するため、ヒトの薬物代謝酵素を発現するトランスジェニックマウスを作出して化学物質のヒトにおける胎児毒性を予測可能にすることを目指している。昨年度までにヒト CYP3A7 を発現するトランスジェニックマウスでは、thalidomide 処置によって四肢に奇形が誘発されることを明らかにした。本年度は、ヒト CYP3A7 発

現マウス胚由来細胞であるF9細胞にthalidomideを処置した場合、胎児の四肢の発生に重要な役割を果たす核内受容体RARを介した転写が抑制されることを明らかにした。以上のことからthalidomideのRARシグナル伝達経路の抑制はthalidomideが誘発する催奇形性の一因となることが考えられた(鎌滝)。

E. 結論

医薬品の開発初期に有用な遺伝毒性試験系の構築を行った。ヒト遺伝子を発現するハイ・スループレット微生物試験菌株を確立し、その評価を行った。発がん性と遺伝毒性の相関を検討するためのトランスジェニックラットおよびトランスジェニックマウス細胞試験系を樹立し、その有用性について検討を進めた。催奇形性を検索する新たな試験系を開発し、thalidomideが誘発する催奇形性にはヒト胎児特異的に発現するCYP3A7さらに核内のシグナル伝達系が重要な役割をはたすことを示唆した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimizu, M., Gruz, P., Kamiya, H., Masutani, C., Xu, Y., Usui, Y., Sugiyama, H., Harashima, H., Hanaoka, F. and Nohmi, T. Efficient and erroneous incorporation of oxidized DNA precursors by human DNA polymerase η , *Biochem.*, in press.
- 2) Barone, F., McCullough, S.D., McPherson, P., Maga, G., Yamada, M., Nohmi, T., Minoprio, A., Mazzei, F., Kunkel, T.A., Karran, P. and Bignami, M. Replication of 2-hydroxyadenine-containing DNA substrates and recognition by human MutS α , *DNA Repair*, 6: 355-366 (2007)
- 3) De Felice, M., Medagli, B., Esposito, L., De Falco, M., Pucci, B., Rossi, M., Gruz, P., Nohmi, T. and Pisani, F.M. Biochemical evidence of a physical interaction between *Sulfolobus solfataricus* B-family and Y-family DNA polymerases, *Extremophiles*, 11: 277-282 (2007)
- 4) Xu, A., Smilenov, L.B., He, P., Masumura, K., Nohmi, T., Yu, Z. and Hei, T.K. New insight into intrachromosomal deletions induced by chrysotile in *gpt* delta transgenic, *Environ. Health Perspective*, 115: 87-92 (2007)
- 5) Ikeda, M., Masumura, K., Sakamoto, Y., Wang, B., Neno, M., Sakuma, K., Hayata, I. and Nohmi, T. Combined genotoxic effects of radiation and a tobacco-specific nitrosamine in the lung of *gpt* delta transgenic mice, *Mutat. Res.*, 626: 15-25 (2007)
- 6) Kuroiwa, Y., Umemura, T., Nishikawa, A., Kanki, K., Ishii, Y., Kodama, T., Masumura, K., Nohmi, T. and Hirose, M. Lack of in vivo mutagenicity and oxidative DNA damage by flumequine in the livers of *gpt* delta mice, *Arch. Toxicol.*, 81: 63-69 (2007)
- 7) Tweats, D.J., Blakey, D., Heflich, R.H., Jacobs, A., Jacobsen, S.D., Morita, T., Nohmi, T., O'donovan, M.R., Sasaki, Y.F., Sofuni, T. and Tice, R. Report of the IWGT working group on strategies and interpretation of regulatory in vivo tests I. Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards, *Mutat. Res.*, 627: 78-91 (2007)
- 8) Tweats, D.J., Blakey, D., Heflich, R.H., Jacobs, A., Jacobsen, S.D., Morita, T., Nohmi, T., O'donovan, M.R., Sasaki, Y.F., Sofuni, T. and Tice, R. Report of the IWGT working group on strategy/interpretation for regulatory in vivo tests II. Identification of in vivo-only positive compounds in the bone marrow micronucleus test, *Mutat. Res.* 627: 92-105 (2007)
- 9) Umemura, T., Kanki, K., Kuroiwa, Y., Ishii, Y., Okano, K., Nohmi, T., Nishikawa, A. and Hirose, M. In vivo mutagenicity and initiation following oxidative DNA lesion in the kidneys of rats given potassium bromate, *Cancer Sci.*, 97: 829-835 (2006)
- 10) Takeiri, A., Mishima, M., Tanaka, K., Shioda, A., Harada, A., Watanabe, K., Masumura, K. and Nohmi, T. A newly established GDL1 cell line from *gpt* delta

- mice well reflects the in vivo mutation spectra induced by mitomycin C, *Mutat. Res.*, 609: 102-115 (2006)
- 11) Jiang, L., Zhong, Y., Akatsuka, S. Liu, Y., Dutta, K.K., Lee, W., Onuki, J., Masumura, K., Nohmi, T. and Toyokuni, S. Deletion and single nucleotide substitution at G:C in the kidney of *gpt* delta transgenic mice after ferric nitrilotriacetate treatment, *Cancer Sci.*, 97: 1159-1167 (2006)
 - 12) Ikeda, M., Masumura, K., Matsui, K., Kohno, H., Sakuma, K., Tanaka, T. and Nohmi, T. Chemopreventive effects of nobiletin against genotoxicity induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in the lung of *gpt* delta transgenic mice, *Genes and Environ.* 28: 84-91 (2006)
 - 13) Yamada, M., Nunoshiba, T., Shimizu, M., Gruz, P., Kamiya, H., Harashima, H., Nohmi, T. Involvement of Y-family DNA polymerases in mutagenesis caused by oxidized nucleotides in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 188: 4992-4995 (2006)
 - 14) Matsui, K., Yamada, M., Imai, M., Yamamoto, K. and Nohmi, T. Specificity of replicative and SOS-inducible DNA polymerases in frameshift mutagenesis: Mutability of *Salmonella typhimurium* strains overexpressing SOS-inducible DNA polymerases to 30 chemical mutagens. *DNA Repair*, 5: 465-478 (2006)
 - 15) Sato, Y., Takahashi, S., Kinouchi, Y., Shiraki, M., Endo, K., Matsumura, Y., Kakuta, Y., Tosa, M., Motida, A., Abe, H., Imai, G., Yokoyama, H., Nomura, E., Negoro, K., Takagi, S., Aihara, H., Masumura, K., Nohmi, T. and Shimosegawa, T. IL-10 deficiency leads to somatic mutations in a model of IBD. *Carcinogenesis*, 27: 1068-1073 (2006)
 - 16) Mitani, Y., Lezhava, A., Kawai, Y., Kikuchi, T., Oguchi-Katayama, A., Kogo, Y., Itoh, M., Miyagi, T., Takakura, H., Hoshi, K., Kato, C., Arakawa, T., Shibata, K., Fukui, K., Masui, R., Kuramitsu, S., Kiyotani, K., Chalk, A., Tsunekawa, K., Murakami, M., Kamataki, T., Oka, T., Shimada, H., Cizdziel, P.E. and Hayashizaki, Y., Rapid SNP diagnostics using asymmetric isothermal amplification and a new mismatch-suppression technology. *Nat Methods*, in press.
 - 17) Uno, Y., Kumano, T., Kito, G., Nagata, R., Kamataki, T. and Fujino, H., CYP2C76-mediated species difference in drug metabolism: A comparison of pitavastatin metabolism between monkeys and humans. *Xenobiotica*, 37: 30-43 (2007)
 - 18) Yamazaki, H., Fujita, H., Gunji, T., Zhang, J., Kamataki, T., Cashman, J.R. and Shimizu, M., Stop codon mutations in the flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) gene responsible for trimethylaminuria in a Japanese population. *Mol. Genet. Metab.*, 90: 58-63 (2006)
 - 19) Peamkrasatam, S., Sriwatanakul, K., Kiyotani, K., Fujieda, M., Yamazaki, H., Kamataki, T. and Yoovathaworn, K., *in vivo* evaluation of coumarin and nicotine as probe drugs to predict the metabolic capacity of CYP2A6 due to genetic polymorphism in Thais. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 21: 475-484 (2006)
 - 20) Saruwatari, J., Matsunaga, M., Ikeda, K., Nakao, M., Oniki, K., Seo, T., Mihara, S., Marubayashi, T., Kamataki, T. and Nakagawa, K., Impact of CYP2D6*10 on H1-antihistamine-induced hypersomnia. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 62: 995-1001 (2006)
 - 21) Sarikaya, D., Bilgen, C., Kamataki, T. and Topcu, Z., Comparative cytochrome P450 -1A1, -2A6, -2B6, -2C, -2D6, -2E1, -3A5 and -4B1 expressions in human larynx tissue analysed at mRNA level. *Biopharm. Drug Dispos.*, 27: 353-359 (2006)
 - 22) Takasuna, K., Hagiwara, T., Watanabe, K., Onose, S., Yoshida, S., Kumazawa, E., Nagai, E. and Kamataki, T. Optimal antidiarrhea treatment for antitumor agent irinotecan hydrochloride (CPT-11)-induced delayed diarrhea. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 58: 494-503 (2006)
 - 23) Uno, Y., Fujino, H., Kito, G., Kamataki, T. and Nagata, R., CYP2C76, a novel cytochrome P450 in cynomolgus monkey, is a major CYP2C

in liver, metabolizing tolbutamide and testosterone. *Mol. Pharmacol.*, 70: 477-486 (2006)

- 24) Kuribayashi, S., Ueda, N., Naito, S., Yamazaki, H. and Kamataki, T., Species differences in hydrolase activities toward OT-7100 responsible for different bioavailability in rats, dogs, monkeys and humans. *Xenobiotica*, 36: 301-314 (2006)
- 25) Iwano, S., Shibahara, N., Saito, T. and Kamataki, T., Activation of p53 as a causal step for atherosclerosis induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEBS Lett.*, 580: 890-893 (2006)
- 26) Oda, Y., Totsuka, Y., Wakabayashi, K., Guengerich, F.P., and Shimada, T., Activation of aminophenylnorharman, Aminomethylphenylnorharman and aminophenylharman to genotoxic metabolites by human *N*-acetyltransferases and cytochrome P450 enzymes expressed in *Salmonella typhimurium umu* tester strains, *Mutagenesis*, 21: 411-416 (2006)

2. 学会発表

- 1) Yamada, M., Hidaka, K., Kamiya, H., Masutani, C., Harashima, H., Hanaoka, F. and Nohmi, T., Specificity of mutations associated with misincorporation of oxidized dNTPs by human DNA polymerase ϵ in vitro Gordon Research Conference-Mammalian DNA Repair (February, 2007)
- 2) Nohmi, T., Ikeda, M., Masumura, K., Sakamoto, Y., Wang, B., Neno, M., Sakuma, K. and Hayata, I., Combined genotoxicity of low-dose-rate radiation and tobacco-specific nitrosamine NNK, CODATA 2006 in Beijing, China (October, 2006)
- 3) Yamada, M., Nunoshiba, T., Shimizu, M., Gruz, P., Kamiya, H., Harashima, H. and Nohmi, T., Involvement of Y-family DNA polymerases in oxidized dNTPs-induced mutagenesis in *Escherichia coli*, 37th Annual Meeting of the Environmental Mutagen Society in Vancouver, Canada, (September, 2006)
- 4) Oda, Y., Totsuka, Y. and Wakabayashi, K.,

Genotoxic activation of *N*-hydroxyaminophenylnorharman by human sulfotransferases expressing in *Salmonella typhimurium umu* tester strains, 37th Annual Meeting of the Environmental Mutagen Society in Vancouver, Canada, (September, 2006)

- 5) Nohmi, T., Kokubo, K., Yamada, M. and Gruz, P., Control of multiple DNA polymerases dealing with lesions induced by environmental mutagens, 36th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society in Prague, Czech (July, 2006)
- 6) Gruz, P., Niimi, N., Sassa, A. and Nohmi, T., New system for the production of mammalian DNA polymerase kappa in *E. coli*: purification, characterization and immunochemistry of the human and mouse POLK proteins, 36th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society in Prague, Czech (July, 2006)
- 7) Yamada, M., Matsui, K., and Nohmi, T., Novel *Salmonella* tester strains highly sensitive to photochemical sources and oxidative damage, 36th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society in Prague, Czech (July, 2006)
- 8) Nohmi, T., Roles of multiple DNA polymerases in mutagenic bypass of DNA lesions by various environmental chemicals, Gordon Research Conference, DNA damage, mutation and cancer, in Ventura, CA, U.S.A., (March, 2006)
- 9) Nohmi, T., Development of novel detection systems of environmental mutagens and molecular genetic analysis of Y-family DNA polymerases, 日本環境変異原学会第35回大会 (2006, 11)
- 10) Yamada, M., Matsui, K. and Nohmi, T., Development of bacterial tester strains highly sensitive to oxidative mutagens, 日本環境変異原学会第35回大会 (2006, 11)
- 11) Gruz, P., Niimi, N., Sassa, A. and Nohmi, T., Physical and functional interactions of the mammalian DNA polymerase kappa purified from *E. coli* with the stereoisomers of the benzo[a]pyrene N2-guanine adduct, 日本環境変異原学会第35回大会 (2006, 11)

- 12) Yamauchi, K., Kakinuma, S., Sudo, S., Kito, S., Oota, Y., Nohmi, T. and Shimada, Y., Mutation frequency of thymocytes after combined exposure of X-rays with N-ethyl-N-nitrosourea is dependent on X-ray-dose, 日本環境変異原学会第35回大会 (2006, 11)
- 13) Sakamoto, Y., Masumura, K., Takahashi, S., Nakae, D. and Nohmi, T., Dietary choline deficiency induces oxidative mutagenesis in the liver of *gpt delta* rats, 日本環境変異原学会第35回大会 (2006, 11)
- 14) Niimi, N., Sassa, A., Gruz, P. and Nohmi, T., Bypass and preferential binding to DNA lesion by human DNA polymerase kappa *in vitro*, 日本環境変異原学会第35回大会 (2006, 11)
- 15) 湯本聡一、斉藤俊光、小田美光、金谷一司、umu 試験用試薬キット (マイクロプレート法) のアミノ酸の影響評価と高感度ハイスループット化に向けた検討、日本環境変異原学会第35回大会 (2006, 11)
- 16) 小田美光、ヒト型硫酸転移酵素を発現する新規 umu 試験の確立とその評価、日本環境変異原学会第35回大会 (2006, 11)
- 17) 小田美光、HPLC-バイオアッセイを用いた下水処理排水中の DNA 損傷性および AhR リガンド活性の解析、環境工学研究フォーラム第43回大会 (2006, 11)
- 18) 梅村隆志、岡野圭太、黒岩有一、田崎雅子、児玉幸夫、能美健彦、西川秋佳、広瀬雅雄、マウス肝発癌剤 dicyclanil が誘発する *gpt delta* マウス肝の酸化的DNA損傷および *in vivo* 変異原性、第65回日本癌学会学術総会 (2006, 9)
- 19) 蔣麗、鐘毅、赤塚慎也、劉玉亭、増村健一、能美健彦、豊國伸哉、トランスジェニックマウス *gpt delta* を用いた鉄ニトリロ三酢酸誘導の腎発がんモデルのDNA変異を検出、第65回日本癌学会学術総会 (2006, 9)
- 20) 大森雅子、魏民、木下アンナ、柚木孝之、土井賢一郎、加藤あゆみ、増村健一、能美健彦、福島昭治、鰐淵英機、*gpt delta* ラット肝における1,4-ジオキサンの発がん性および変異原性、第65回日本癌学会学術総会 (2006, 9)
- 21) 池田恵、増村健一、松井恵子、甲野裕之、佐久間慶子、田中卓治、能美健彦、*gpt delta* トランスジェニックマウスの肺におけるNNK誘発突然変異に対するNobiletinの化学予防効果の解析、第65回日本癌学会学術総会 (2006, 9)
- 22) 山田雅巳、松井恵子、能美健彦、多環芳香族炭化水素の変異原性を高感度、特異的に検出するバクテリアテスター株の開発、第65回日本癌学会学術総会 (2006, 9)
- 23) 増村健一、中江大、坂元康晃、高橋正一、鰐淵英機、梅村隆志、広瀬雅雄、能美健彦、F344系およびSD系 *gpt delta* ラットを用いたコリン欠乏アミノ酸食による内因性ラット肝発がん突然変異誘発能の解析、第65回日本癌学会学術総会 (2006, 9)
- 24) 坂元康晃、増村健一、黒岩有一、今井聖子、林宏行、西川秋佳、広瀬雅雄、津田洋幸、能美健彦、ヒトプロト型c-Ha-ras導入 *gpt delta* トランスジェニックラットを用いた化学発がん高感受性モデルにおける突然変異誘発能の解析、第65回日本癌学会学術総会 (2006, 9)
- 25) Nohmi, T., Ikeda, M., Masumura, K., Sakamoto, Y., Wang, B., Neno, M., Sakuma, K. and Hayata, I. Evaluation of combined genotoxicity of low-dose-rate radiation and tobacco-specific nitrosamine NNK, The 49th Annual Meeting of the Japan Radiation Research Society in Sapporo (2006, 9)
- 26) 能美健彦、増村健一、マウス個体で観察される欠失変異と点突然変異の分子解析、日本放射線影響学会 第49回大会 (2006, 9)
- 27) 小田美光、戸塚ゆ加里、若林敬二、N-Hydroxyaminophenylnorharman のヒト硫酸転移酵素による代謝的活性化、日本トキシコロジー学会 第33回大会 (2006, 7)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

平成18年度
政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル(小伝馬町駅前)4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社