

磁性ナノ粒子を用いたiPS細胞の誘導

Generation of the iPS cells using magnetic nano particles



上 大介(写真) 梅澤明弘 渡邊昌俊

Daisuke KAMI^{1,2}, Akihiro UMEZAWA³ and Masatoshi WATANABE⁴

横浜国立大学大学院¹, 同医工融合グローバル COE²,

国立成育医療センター研究所生殖・細胞医療研究部³, 横浜国立大学物質工学科バイオコース⁴

◎人工多能性幹細胞(iPS細胞)は、体細胞に4遺伝子(*Oct3/4*, *Sox2*, *cMyc*, *Klf4*)を導入することにより、胚性幹細胞と同等の多分化能(pluripotency)をもつ細胞である。このiPS細胞の研究は特定疾患のメカニズムの解明や新薬開発、再生医療に用いられる細胞ソースなど、多岐にわたる活躍が期待されている。一般的に、iPS細胞作製における遺伝子導入にはレトロウイルスやレンチウイルスが用いられている。しかし、宿主細胞のゲノムDNA内にウイルス由来DNA配列が残存する、細胞が癌化するという問題点があるため、現状のままでは医療への応用には適していない。そこで、ウイルスを用いない新たなiPS細胞作製方法が求められている。本稿では、非ウイルス性であり高効率な遺伝子導入を可能とする磁性ナノ粒子を用いた手法の利点と進行状況について報告する。



磁性ナノ粒子, 非ウイルス性遺伝子導入, 人工多能性幹細胞(iPS細胞)

ナノ粒子の医学・生物分野への開発と応用

近年、ナノデバイスの研究は、その素材の開発から利用・応用にかけて盛んに行われており、産業界におけるナノデバイスの活躍がおおいに期待されている。ナノデバイスのひとつであるナノ粒子はナノメートル(10^{-9} m)オーダーの微粒子であり、同一素材のマイクロ(10^{-6})オーダーサイズの粒子と比べて、その流動性の向上、表面積の増加といった性質を示す。このようなナノ粒子の物性変化を応用することで、粒子の圧縮成形時の密度向上、吸着容量の増大、化学反応触媒としての機能向上、他の物質との複合化を簡便に可能とする技術の開発が期待されている。

ナノ粒子の生化学や分子生物学、医学分野への応用はすでに行われており、ナノ粒子表面に何らかの標識化合物を結合させて特定の分子構造を同定、検出、定量、可視化することなどに用いられている。とくに磁性ナノ粒子は、外部からの磁場により体内での移動や固定が可能である。また、

磁性ナノ粒子の粒子径は数nmから数十nm範囲で制御が可能であり、蛋白質(5~50nm)や遺伝子(幅2nm)と比較しても同等以下の大きさにコントロールできる。このため磁力による外部モニタリングも容易なため、標識としても使用されている。さらに、磁性ナノ粒子は外部からの磁力を熱エネルギーに変換することが可能なため、腫瘍細胞を加温により死滅させるハイパーサーミアの発熱体として利用されようとしている。

このほかにも磁性ナノ粒子は、細胞の磁気による選別と単離(magnetic cell separation system: MACS)、薬剤のキャリア(drug delivery system: DDS)、MRI(magnetic resonance imaging)の造影剤としても利用されている。通常、このような磁性ナノ粒子には鉄やコバルト、マンガンなどの金属を酸化させたものが用いられる。しかし、金属酸化物の粒子表面を標識物質で被膜するとより凝集性が強くなるため、凝集した粒子の二次粒子径が大きくなり、その機能が低下するという欠点をも

つ。なぜなら、この磁性ナノ粒子の溶液中の安定性は、粒子径、熱エネルギーおよび引力(van der Waals および相極子間相互作用)、斥力(立体および静電)の釣り合いで決定するからである。そこで、界面活性剤による立体障害斥力、あるいは電気二重層相互作用による斥力によって磁性ナノ粒子の分散を維持させることが重要となってくる(「サイドメモ1」参照)¹⁾。

磁性ナノ粒子を用いた遺伝子導入法の開発と、iPS細胞作製への応用

このような背景のなか、著者らは磁性ナノ粒子(γ -Fe₂O₃, $d=3$ nm, 横浜国立大学・一柳優子准教授提供)²⁾を用いた培養細胞への遺伝子導入方法を開発している。現在、培養細胞への遺伝子導入は、①polyethylenimine(PEI)に代表されるトランスフェクション試薬を用いたもの、②ウイルス(アデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス)を用いたもの、③エレクトロポレーション法を用いたもの、に大別することができる。

近年話題になっている人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell:iPS細胞)も、当初はレトロウイルスを用いた遺伝子導入法で作製されてきた^{3,4)}。このiPS細胞は体細胞を宿主細胞としながらも、胚性幹細胞(embryonic stem cell:ES細胞)と非常によく似た性質をもっており、多分化能と自己複製能、ジャームライン・トランスミッション(「サイドメモ2」参照)ですら可能な驚くべき細胞である。現在、すでにヒトiPS細胞の作製は成功しており、種々の遺伝病患者由来iPS細胞も作製されており、あらたな治療法や新薬の開発が期待されている^{3,5)}。実際に疾患モデルマウ

ス由来iPS細胞を用いて同マウスに細胞移植したところ、疾患モデルマウスの病態が改善したという報告もあり^{6,7)}、iPS細胞を用いた新しい医療の可能性が示された。

しかし、iPS細胞の作製には高効率な遺伝子導入が必要である。そのため、レトロウイルスやレンチウイルスを用いた作製法は、核ゲノム内にウイルス由来DNA配列が挿入されるうえに、導入遺伝子による細胞の癌化の危険性も指摘されている。そこで、2008年にウイルスを用いない非ウイルス性のiPS細胞作製法が開発された⁸⁾。このiPS細胞作製法は、CAGGSプロモーター下流にiPS細胞作製に必要な4遺伝子(*Oct3/4*, *Sox2*, *cMyc*, *Klf4*)を配置したプラスミドDNAとトランスフェクション試薬を用いていた。しかし、この手法はウイルスを用いた方法に比べて遺伝子導入効率が低く、iPS細胞への誘導効率が悪い⁸⁾。これは、トランスフェクション試薬で導入した場合、プラスミドDNAは培養液中をランダムな方向に漂うためとされている(図1-A)。このため、トランスフェクション試薬を用いた遺伝子導入効率は低いという欠点がある。

そこで著者らは、磁性ナノ粒子をプラスミドDNAのキャリアとした遺伝子導入法の確立を目的とした。本手法の特徴はランダムに漂うプラスミドDNAを磁性ナノ粒子に吸着させる点にある。このプラスミドDNAに吸着させた磁性ナノ粒子は、培養プレート底に設置したマグネットシートの磁力によって培養細胞方向に引き寄せることが可能となり、遺伝子導入効率が上昇すると予想される(図1-B)。

磁性ナノ粒子を用いた遺伝子導入の問題点

磁性ナノ粒子をプラスミドDNAのキャリアと

サイドメモ1

界面活性剤と分散剤

界面活性剤は、磁性ナノ粒子の表面を被膜し、その立体障害によって粒子どうしの凝集を抑制し、溶媒中に安定に分散する。分散剤は、高分子窒素化合物などでナノ粒子表面を被覆することで、ナノ粒子表面をプラスに帯電させ、電気二重層の作用のみによってナノ粒子の分散を安定的に可能にする。

サイドメモ2

ジャームライン・トランスミッション

ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞が生殖細胞に分化でき、多能性幹細胞由来の遺伝子がキメラを介して次世代に伝わることを意味する。これにより、その多能性幹細胞に由来する個体が産まれる。

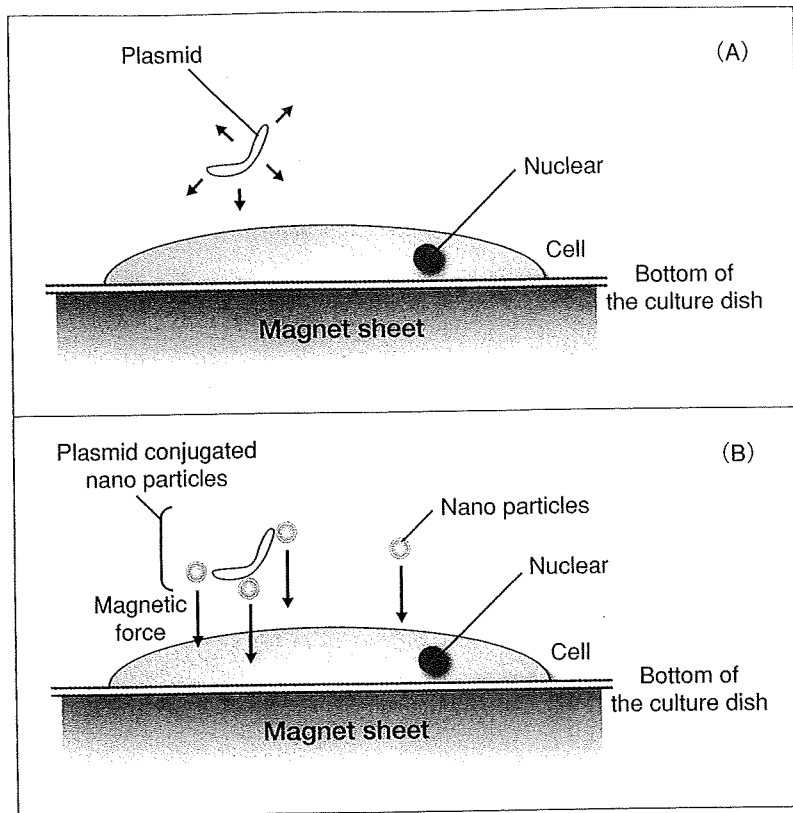


図 1 ナノ粒子を用いた細胞へのプラスミドDNA導入モデル
 A: 通常のトランスフェクション方法の略図。トランスフェクション試薬で導入する際、プラスミド DNA は培養液中をブラウン運動に従ってランダム方向に移動していると予想される。
 B: 開発中のトランスフェクション方法の略図。プラスミド DNA と磁性ナノ粒子を接着させた複合体を磁力で細胞表面に輸送することで、接触できるプラスミド DNA 数を上昇させ、遺伝子導入効率を向上させる。

して用いるには、磁性ナノ粒子の分散と磁性ナノ粒子とプラスミド DNA 間の結合方法について考慮すべきである。なぜなら粒子径が 100 nm 以下のナノ粒子の分散制御は非常に困難で、何らかの分散剤を用いてナノ粒子表面を修飾する必要があり、プラスミド DNA とナノ粒子の吸着はプラスミド DNA の配列を損ねず安定的に遺伝子発現できるようにすべきだからである。これらのことから、著者らはトランスフェクション試薬として用いられている PEI に着目した。というのも、PEI はトランスフェクション試薬だけでなく、粒子表面を修飾して電気二重層相互作用を示す分散剤としても用いられているからである。また、PEI はカチオン性のため、アニオン性のプラスミド DNA と電気的に結合すると予想される。そこで PEI を用いてナノ粒子表面を被膜化し、ナノ粒子の分散とプラスミド DNA の結合を同時に試みた

(図 2)。

現在、適当な条件下で磁性ナノ粒子 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ と PEI の被膜化は成功しており、良好な分散状態が観察された。PEI によって被膜化していない粒子 (図 3-B) は被膜化したナノ粒子 (図 3-A) に比べて早く凝集し沈降した。さらに、磁性ナノ粒子は PEI で被膜した後も磁力によって凝集 (図 4-A) と再分散 (図 4-B) が可能であった。今後はこの磁性ナノ粒子を用いたプラスミド DNA の吸着、ならびに細胞への遺伝子導入を試みていく。

磁性ナノ粒子を用いた遺伝子導入法の利点と今後の展望

本手法の最大の利点は、ウイルス由来 DNA 配列が挿入されない遺伝子導入が可能である点と、理論上、通常のトランスフェクション法に比べて高効率な遺伝子導入が可能である点である (図 1)。

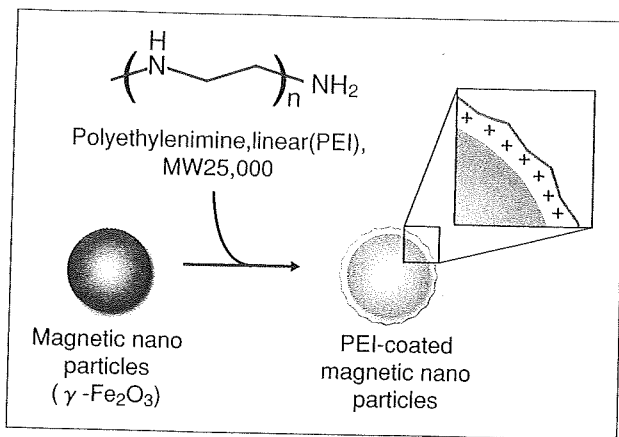


図 2 磁性ナノ粒子へのPEI被膜化と粒子表面の電荷
磁性ナノ粒子 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ は直鎖状の PEI (分子量 25,000) で被膜化する。粒子表面は被膜化した PEI によって+に帯電すると予想している。

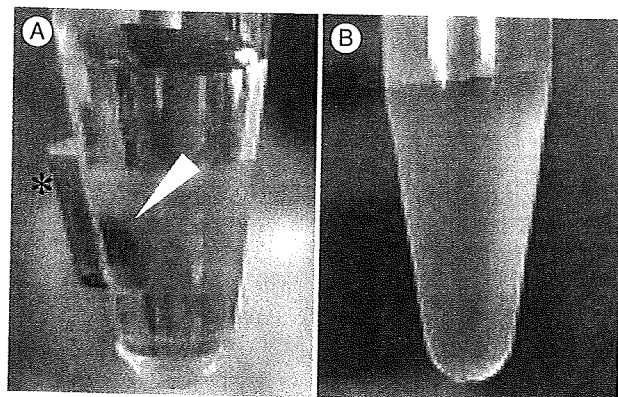


図 4 磁性ナノ粒子の吸着と再分散
A: 磁性ナノ粒子をネオジム磁石(*)で吸着した(矢尻)。
B: 再度かき混ぜたところ、再分散した。

この2点は iPS 細胞の作製にたいへん有利な特徴である。現在、iPS 細胞の作製には宿主細胞への4遺伝子導入にレトロウイルスやレンチウイルスを用いている。このため、ウイルス由来 DNA 配列は iPS 細胞のゲノム DNA 内に挿入され、残存している。このウイルス由来 DNA 配列の残存は、iPS 細胞の性質に影響を与えている可能性が高い。というのも、レンチウイルスで作製した iPS 細胞に挿入された4遺伝子の DNA 配列を Cre/loxP システムを用いて排除した(正確には一部の DNA 配列は残存している)ところ、排除していない iPS 細胞に比べてマイクロアレイにて ES 細胞に近い遺伝子発現パターンを示したからである⁹⁾。本手法で作製された iPS 細胞はこの外来性 DNA 配列が宿主細胞のゲノム内に残りにくいため、

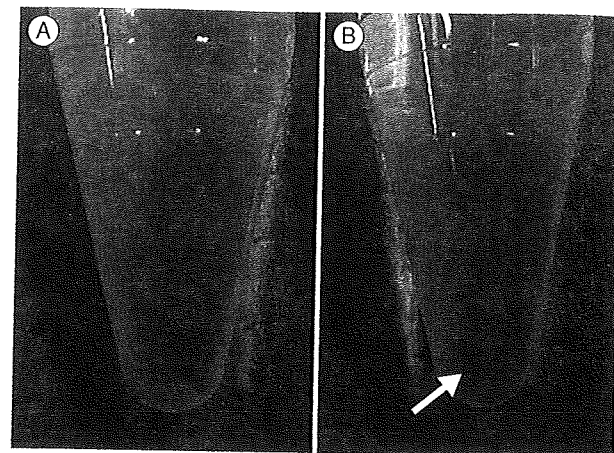


図 3 PEI被膜化した磁性ナノ粒子と、PEI被膜化していない磁性ナノ粒子の分散性
分散剤である PEI で被膜化した磁性ナノ粒子は、室温に30分間おいても沈殿しなかった(A)。一方、PEI で被膜化していない磁性ナノ粒子は、同様の条件下で沈殿が確認された(B, 矢印)。

Cre/loxP システムを用いた手法より ES 細胞に近い性質を示す可能性が高い。

このように本手法によって作製された iPS 細胞は、特定疾患のメカニズムの解明や新薬開発、再生医療に用いられる細胞ソースとして重要な役割を果たす可能性がある。その一方で、遺伝子導入に使用した磁性ナノ粒子の細胞毒性についても検討する必要があるため、解析を進めている。今後はより遺伝子導入に適した磁性ナノ粒子表面の修飾法の検討と本手法を用いた iPS 細胞を作製していく。

文献

- 1) バラチャンドラン・ジャヤデワン: 磁性粒子・流体の調整と医療応用、関連技術と技術動向。磁性ビーズのバイオ・環境技術への応用展開(半田宏・他監)。シーエムシー出版、2006、pp. 259-278。
- 2) Moritake, S. et al.: Functionalized nano-magnetic particles for an *in vivo* delivery system. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 7: 937-944, 2007.
- 3) Takahashi, K. et al.: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131: 861-872, 2007.
- 4) Takahashi, K. and Yamanaka, S.: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126: 663-676, 2006.
- 5) Eggan, K.: Using stem cells and reprogramming to understand disease. *Regen. Med.*, 3: 799-801, 2008.
- 6) Hanna, J. et al.: Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*, 318: 1920-1923, 2007.

- 7) Wernig, M. et al. : Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105** : 5856-5861, 2008.
- 8) Okita, K. et al. : Generation of mouse induced pluri-

potent stem cells without viral vectors. *Science*, **322** : 949-953, 2008.

- 9) Soldner, F. et al. : Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*, **136** : 964-977, 2009.

* * *

潰瘍性大腸炎と DNA メチル化との関連 —one-carbon metabolism 関連遺伝子多型を中心に—

小坂俊仁	芳野純治	乾 和郎	若林貴夫	奥嶋一武
小林 隆	三好広尚	渡邊真也	服部昌志	林 繁和
白石泰三	山本隆行	渡邊昌俊	中澤三郎	

消化器医学 Vol. 7 別刷

アークメディア

潰瘍性大腸炎とDNAメチル化との関連

—one-carbon metabolism関連遺伝子多型を中心に—

小坂俊仁*・芳野純治*・乾 和郎*・若林貴夫*・奥嶋一武*
 小林 隆*・三好広尚*・渡邊真也*・服部昌志*・林 繁和**
 白石泰三***・山本隆行****・渡邊昌俊*****・中澤三郎*****

KEY WORDS

潰瘍性大腸炎, DNAメチル化, one-carbon metabolism,
 DNA methyltransferase (DNMT)

はじめに

潰瘍性大腸炎(Ulcerative Colitis: UC)は再発と緩解を繰り返す, 腸管粘膜の炎症を主体とする疾患である。原因は不明であるが, 免疫異常, 脂肪摂取などの食事因子, 生育時の環境, 細菌感染および遺伝要因などが関連する多因子病と認識されている。遺伝要因としてさまざまな遺伝子多型がUCの疾患感受性遺伝子の候補として挙げられているが, 一定の見解を得られていない。

また現在, 癌を中心に疾患の原因として, DNAメチル化を含むエピジェネティックな異常が主要なものとして考えられている。DNAメチル化異常は腫瘍のみならず, 正常部でも加齢に伴うage-related methylationが存在することが知られている。さらに炎症性腸疾患の消化管粘膜, バレット食道や肝炎の組織でもDNA

メチル化が認められている。本稿ではDNAのメチル化と潰瘍性大腸炎の関連について, 特にone-carbon metabolism関連遺伝子多型に焦点を合わせた当科の研究結果を踏まえ述べる。

DNAメチル化異常のしくみ

消化器癌の発生・進展におけるゲノム構造異常についてはさまざまな研究がなされてきたが, 遺伝子変異や欠失とならんでエピジェネティックな異常が重要であることが明らかになりつつある。エピジェネティックな変化とは塩基配列の変化を伴わない遺伝性の遺伝子発現の変化と定義され, DNAメチル化やヒストン修飾が代表的なものである。

DNAメチル化とはシトシン塩基の5位の炭素に結合している水素がメチル基に置換されることを言い, DNA methyltransferase (DNMT) familyにより制御されている。遺伝子プロモーター領域におけるCpGアイランドにメチル化が起こると, ヒストン修飾の変化や転写因子との結合性の変化を通じて, 転写を強力に抑制する¹⁾。CpGアイランドにおける高メチル化は癌細胞においてRetinoblastoma (RB), von-Hip-

*藤田保健衛生大学坂文種報徳會病院内科 **八千代病院検診センター ***三重大学医学研究科腫瘍病態解明学講座 ****四日市社会保険病院IBDセンター *****横浜国立大学工学研究院 *****医療法人山下病院

pel-Lindau (VHL), P16などの癌抑制遺伝子で見られることが報告されている²⁾。癌抑制遺伝子におけるCpGアイランドのメチル化による転写の抑制は癌の発生・進展に重要な役割を果たすと考えられている。癌におけるもう一つのDNAメチル化異常としてゲノムワイドな低メチル化が見られることも知られている。ゲノムワイドな低メチル化により正常細胞では発現が抑制されている癌遺伝子の活性化や染色体不安定性を引き起こすと考えられている³⁾。

■潰瘍性大腸炎とDNAメチル化

癌以外の消化管疾患において、DNAメチル化が認められるものには加齢、*H.pylori*感染、逆流性食道炎、潰瘍性大腸炎(UC)が挙げられる。IssaらはUC患者の大腸粘膜では*Estrogen receptor (ER)*, *p16*などの遺伝子のCpGアイランドのメチル化が加齢により促進していると報告している⁴⁾。大腸癌部のCpGアイランドにおけるメチル化はcancer-restricted methylation (type C)とage-related methylation (type A)の2つのタイプに大別される⁴⁾。UCの大腸粘膜ではage-related methylationが多く認められたと報告されている⁴⁾。その原因として、炎症による細胞周期の加速や酸化ストレスなどが考えられている。メチル化は細胞増殖している組織において増加する傾向にあり、この現象は大腸癌における*ER*遺伝子で証明されている⁵⁾。このことより、細胞周期が加速していると考えられるUCなどの慢性炎症ではage-related methylationが増加傾向にあると考えられる。またTominagaらはUC患者において腺腫あるいは癌を発症した患者の大腸粘膜では正常粘膜でも*ER*遺伝子のメチル化が高度に検出されることを報告している⁶⁾。筆者らはage-related methylationが増加することはUCにおける癌化の初期に見られる現象であると推察している。また*p14^{ARF}*遺伝子においてUCにおけるcolitic cancerの患者では癌部だけでなく、非癌

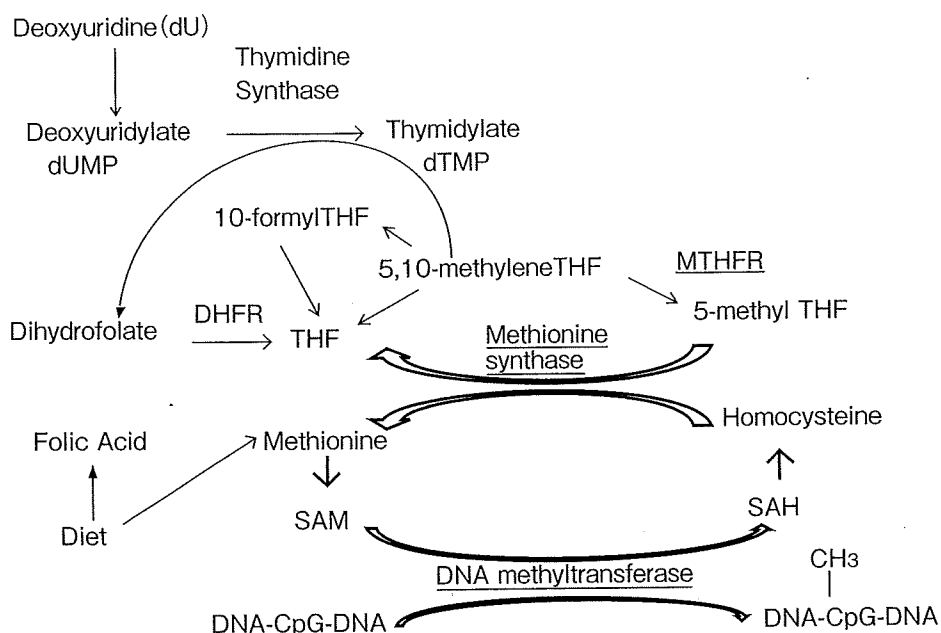
部の粘膜においても高メチル化が認められることが報告されている⁷⁾。*p14^{ARF}*は癌抑制遺伝子の一つで*p53*遺伝子のMDM2を介した活性の低下を阻害する役割がある。*p14^{ARF}*遺伝子のCpGアイランドにおいて高メチル化が起こることは、その活性を低下させると考えられる。同様にUC患者において*p14^{ARF}*遺伝子のメチル化の頻度を解析した研究で*p14^{ARF}*遺伝子の高メチル化が直腸に検出されたUC患者はdysplasiaを発症する例が多く、*p14^{ARF}*遺伝子の高メチル化がUCの発癌の予測因子となる可能性を示唆された⁸⁾。このようにUC患者における発癌において、特定遺伝子のメチル化が重要な役割を果たすことが示唆されている。

またTaharaらは*protease-activated receptor 2 (PAR2)*遺伝子における解析で、直腸型より全結腸型のUC患者において*PAR2*遺伝子のプロモーター領域の高度のメチル化が認められたことを報告した⁹⁾。*PAR2*はさまざまな細胞に発現し、炎症の制御に関与する。*PAR2*遺伝子のメチル化による*PAR2*遺伝子の機能への影響は明らかではないが、この結果から筆者らは*PAR2*遺伝子のメチル化はUCの重症化と関連があるとしている。

このようにUCとDNAメチル化については研究が進んでいる。

■One-carbon metabolismとDNAメチル化

葉酸を介したone-carbon metabolismはDNAメチル化と密接な関連があることが知られている。葉酸は一炭素基を与えるドナーとしてone-carbon metabolismに寄与している¹⁰⁾。葉酸はDNAメチル化以外にDNA修復やヌクレオチドの合成にも関連している¹¹⁾。またメチオニンはこの代謝経路内で重要な役割を果たしている¹²⁾。これらの代謝経路を図1に示す¹⁰⁾。この経路中で葉酸は数段階を経て、methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)によ



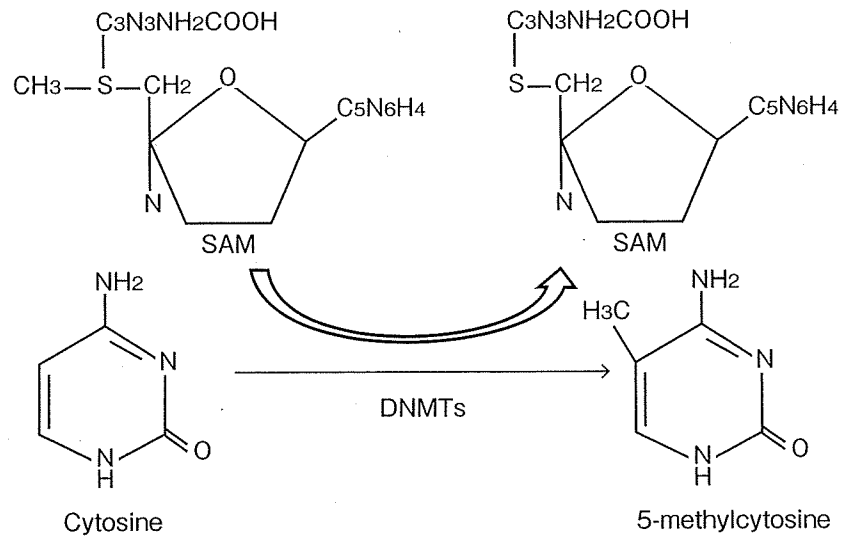
dUMP: deoxyuridine monophosphate, dTMP: deoxythymidine monophosphate
 DHFR: dihydrofolate reductase, THF: tetrahydrofolate
 MTHFR: 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase
 SAM: S-adenosylmethionine, SAH: S-adenosylhomocysteine

図1 one-carbon metabolismにおける代謝経路(文献10より引用, 一部改変)

り 5-methyl tetrahydrofolate (THF) に変換される。5-methylTHFは methionine synthase (MS)により THFへと変換される。また MSはホモシステインをメチオニンに変換する。メチオニンはDNAメチル化におけるメチルドナーとして働く。メチオニンはこの代謝回路内で S-adenosylmethionine (SAM)に変換される。SAMは DNMTの作用により、S-adenosylhomocysteine (SAH)に変換される。SAMはメチル基供与体として機能する。また DNMTの反応がSAMの供給およびSAHの除去に依存しているため、SAMとSAHの比はいわゆる methylation indexとして用いられる¹¹⁾。すなわち SAM/SAHの比により高メチル化あるいは低メチル化といった状態が示されるのである。DNMTの作用によりシトシン基の5位の炭素にメチル基が結合するというDNAメチル化が起こる¹³⁾(図2)。このようにDNAメチル化には葉酸を介した一炭素代謝が重要な役割を果たしている。

■ UC と one-carbon metabolism 関連遺伝子多型

One-carbon metabolism関連遺伝子における主要な遺伝子多型を表1に示す。*MTHFR*遺伝子は1p36に存在し、主な遺伝子多型として *C677T*多型および *A1298C*多型が知られている。*MTHFR*遺伝子の677部位でシトシン(C)がチミン(T)に変換される変異が起こると当該部位のアミノ酸基がアラニンからバリンに変化する。この変異の存在が血中のホモシステイン値の上昇と関連があるとされる。UC患者においても *MTHFR*遺伝子 *C677T*多型の TT遺伝子型を有する割合が健常者より多く、これらの患者は血中のホモシステイン値が健常者よりも高値であることが報告されている¹⁴⁾。血中のホモシステイン値が高値であるといわゆる過凝固状態を招き、UC患者の合併症の一つである静脈血栓症と関連があると考えられている。



SAM: S-adenosylmethionine, SAH: S-adenosylhomocysteine
 DNMT: DNA methyltransferase

図2 DNMTの作用とDNAメチル化(文献13より引用)

表1 one-carbon metabolism 関連遺伝子と主な遺伝子多型

遺伝子名	遺伝子座	主な遺伝子多型	関連文献
MTHFR	1p36	C677T	Mahmud et al, 1999 ¹⁵⁾
		A1298C	Herrlinger KR et al, 1995 ¹⁶⁾
MS	1q43	A2756G	Chen M et al, 2008 ¹⁷⁾
DNMT3B	20q11.2	-149CT	Shen H et al, 2002 ¹⁸⁾
		-579GT	Hong YS et al, 2007 ²²⁾

MTHFR: Methylenetetrahydrofolate reductase
 MS: Methionine Synthase
 DNMT: DNA methyltransferase

MTHFR 遺伝子の A1298C 多型が存在すると当該部位のアミノ酸基がグルタミン酸からアラニンに変化する。A1298C 多型の CC 遺伝子型を有する場合、MTHFR の酵素活性が低下する。ステロイド抵抗性などの理由でメトトレキサート (MTX) を使用した UC 患者について MTHFR A1298C 多型との関連を検討した報告があり ¹⁵⁾、MTHFR 遺伝子の 1298C アレルを有する患者は MTX による副作用 (嘔気、皮疹など) が多かった。MTX による副作用は 5-methyl THF の値が低下することに関連があるとされ、A1298C 多型の存在により MTHFR の活性が低下するために副作用が増加すると考えられる。

Methionine synthase (MS) 遺伝子は 1q43 に存在し、主要な遺伝子多型として A2756G 多型がある。A2756G 多型の酵素活性に対する影響は明らかではないが、A2756G 多型を有するとホモシステインが高値な傾向にある。MS 遺伝子の A2756G 多型と UC との関連を調べた研究では UC 患者で A2756G 多型の G アレルを有する例が健常者より有意に多く UC 発症のリスクに関連があるとしている ¹⁶⁾。

DNMT3B 遺伝子は 20q11.2 に存在し、主要な遺伝子多型には -149CT および -579GT 多型がある。-149CT 多型が存在するとプロモーター領域における DNMT の酵素活性が 30% 増加する。-579GT 多型はプロモーター領域に

においては酵素活性には影響しないとされる。*-149CT*多型は肺癌¹⁷⁾および前立腺癌¹⁸⁾におけるリスクの増加に関連しているとされる。また遺伝性非ポリポーシス型大腸癌(HNPCC)では年齢によるリスクとの関連が報告されている¹⁹⁾。これは*DNMT3B*遺伝子の*-149CT*多型においてTアレルを有するHNPCC患者では他のアレルを有する患者よりHNPCCの発症年齢が若いというものである。*-579GT*多型は肺癌²⁰⁾および大腸癌²¹⁾についてリスクの低下に関連があるとされる。こうした関連を受けてわれわれはUC患者136名(男性75名, 女性61名)および健常者137名(男性69名, 女性68名)を対象とし, *MTHFR*, *MS*および*DNMT*遺伝子の各多型についてUC患者の臨床因子(発症年齢, 性別, 罹患範囲, 臨床経過による病型, 重症度およびステロイド抵抗性)との関連およびUC発症のリスクとの関連を検討した。患者から文書により同意を受け, 検体を得た。DNAの解析はPCR-RFLP法およびDirect sequence法を用いた。結果は現在解析中であるが, *MTHFR* *C677T*多型についてUC患者の臨床因子と関連がある可能性や, リスク解析についても*DNMT-579GT*多型においてUCの発症リスクとの関連が示唆されており, 現在さらに解析中である。

■ 考 察

UCとホモシステインなどのone-carbon metabolism代謝産物との関連は以前から指摘されていた。たとえばDrzewoskiらは血中ホモシステイン値の上昇は活動期のUCにおいてより顕著に認められるとの報告しており²²⁾, ホモシステイン値の上昇はUCの病勢を反映するものと考えられる。IBD患者では血中のみならず大腸粘膜においてもホモシステイン値が上昇している²³⁾。ホモシステインの代謝が乱れることは酸化ストレスの発生と関連があり, 酸化ストレスはIBDの炎症を惹起する。ホモシステイン値

の上昇は*MTHFR* *C677T*多型が要因となっており, この多型の存在がIBDの発症と関連するものと考えられる。今回のわれわれの検討でもデータ解析中ではあるが*MTHFR* *C677T*多型がUCの臨床因子と関連しており, これは他の研究の結果とも合致している。

DNAメチル化はDNA methyltransferase (DNMT)により制御されている。DNMTには主要なものとして*DNMT1,3A,3B*がある。他に*DNMT2*というサブタイプもあるが, その機能は明らかにはなっていない。*DNMT1*は主にメチル化の維持に働き²⁴⁾, *DNMT3A,3B*はメチル化を*de novo*に導入する働きがある²⁵⁾。*de novo*なメチル化とはDNAにおいてメチル化していない領域あるいはhemimethylationが見られる領域にメチル化を導入することである。*DNMT1*はDNAのメチル化におけるパターンを転写するのに必要とされる。*DNMT1*ノックアウトマウスを用いた研究により*DNMT1*はDNA転写およびX染色体の不活化に関連することが報告されている²⁶⁾。*DNMT1*ノックアウトマウスにおいてもDNAの*de novo*なメチル化が生じることが報告され, これが*DNMT3 family*の発見されるきっかけとなった²⁵⁾。*DNMT1,3A,3B*について大腸, 腎臓, 膀胱および脾の癌組織および正常組織における各酵素の活性を調べた研究があり²⁷⁾, それによると各腫瘍組織では*DNMT1,3A*は中程度の上昇に過ぎなかったのに対し, *DNMT3B*は高度に発現していた。このことから*DNMT3B*は腫瘍の発生に密接な関連があるとしている。前述したように*DNMT3B*遺伝子多型はさまざまな癌において関連が報告されている。肺癌に関して*-149CT*多型のTアレルを有する患者は肺癌を発症するリスクが高いとの報告がある¹⁹⁾。*-149CT*多型の存在によりプロモーター領域におけるDNMT酵素活性が増加することが知られている。*-149CT*多型における肺癌のリスク増加はDNMT酵素活性の増加によるメチル化の促進が関連しているものと考えられる。こ

れに対し、*DNMT3B-579GT*多型においてGアレルを有する患者は肺癌を発症するリスクが低いとされる²¹⁾。また*DNMT3B*遺伝子の*39179GT (-579GT)*多型のGTおよびGG遺伝子型を有する患者では60歳未満での大腸癌のリスクが低いとの報告がある²¹⁾。このことから筆者らは*DNMT-579GT*多型が大腸癌の疾患感受性のマーカーとなるとしている。同様に*-579GT*多型を有する患者は健常者より有意に頻度が低く、大腸癌を発症するリスクが低いとされる²⁸⁾。*DNMT3B-579GT*多型はDNMTの酵素活性には直接の影響を与えないが、こうした関連から*DNMT3B*遺伝子の機能に何らかの影響を与えることが考えられる。

UCとDNMT遺伝子多型については今まで関連は報告されていないが、現在検討中であるが、われわれの検討により*DNMT3B-579GT*多型がUCのリスクと関連がある可能性が示唆されている。この結果からDNAメチル化とUCの発症に関連があることが考えられた。

■ おわりに

これまで述べてきたように潰瘍性大腸炎とDNAメチル化について研究が進んでおり、またUCにone-carbon metabolism関連遺伝子多型が関連するといういくつかの研究が報告されている。one-carbon metabolismとDNAメチル化は密接な関連があることからUCとDNAメチル化およびone-carbon metabolismについて関連を研究することはUCの病態の解明に役立つものと考えられた。

文 献

- 1) Bird A : DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Gene & Dev* 16 : 6-21 (2002)
- 2) Feinberg AP, Tycko B : The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 4 : 143-153 (2004)
- 3) Gaudet F, Hodgson JG, Eden A et al : Induc-

tion of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 300 : 489-492 (2003)

- 4) Issa JP, Ahuja N, Toyota M et al : Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis. *Cancer Res* 61 : 3573-3577 (2001)
- 5) Issa JP, Ottaviano Y, Celano P et al : Methylation of the oestrogen receptor CpG island links aging and neoplasia in human colon. *Nat Genet* 7 : 536-540 (1994)
- 6) Tominaga K, Fujii S, Mukawa K et al : Prediction of colorectal neoplasia by quantitative methylation analysis of estrogen receptor genes in nonneoplastic epithelium from patients with ulcerative colitis. *Clin Cancer Res* 11 : 8880-8885 (2005)
- 7) Sato F, Harpaz N, Shibata D et al : Hypermethylation of the p14 ARF gene in ulcerative colitis-associated colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 62 : 1148-1151 (2002)
- 8) Moriyama T, Matsumoto T, Nakamura S et al : Hypermethylation of p14 ARF may be predictive of colitic cancer in patients with ulcerative colitis. *Dis Colon Rectum* 50 : 1384-1392 (2007)
- 9) Tahara T, Shibata T, Nakamura M et al : Promotor methylation of protease-activated receptor (PAR2) is associated with severe clinical phenotypes of ulcerative colitis. *Clin Exp Med* 9 : 125-130 (2009)
- 10) Kim YI : Folate and DNA methylation: a mechanistic link between folate deficiency and colorectal cancer? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13 : 511-519 (2004)
- 11) Duthie SJ : Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. *Br Med Bull* 39 : 106-111 (1999)
- 12) Waterland RA : Assessing the effects of high methionine intake on DNA methylation. *J Nutr* 136 : 1706S-1710S (2006)
- 13) Luczak MW, Jagodzinski PP : The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochem Cytobiol* 44 : 143-154 (2006)
- 14) Mahmud N, Molloy A, McPartlin J et al : Increased prevalence of methylentetrahydrofolate reductase C677T variant in patients with

- inflammatory bowel disease, and its clinical implications. *Gut* 45 : 389-394 (1999)
- 15) Herrlinger KR, Cummings JR, Barnardo MC et al : The pharmacogenetics of methotrexate in inflammatory bowel disease. *Pharmacogenet Genomics* 15 : 705-711 (2005)
- 16) Chen M, Peylin-Biroulet L, Xia B et al : Methionine synthase A2756G polymorphism may predict ulcerative colitis and methylenetetrahydrofolate reductase C677T pancolitis in Central China. *BMC Medical Genetics* 9 : 78 (2008)
- 17) Shen H, Wang L, Spitz MR et al : A novel polymorphism in human cytosine DNA-methyltransferase-3B promoter is associated with an increased risk of lung cancer. *Cancer Res* 62 : 4992-4995 (2002)
- 18) Singal R, Das PM, Manoharan M et al : Polymorphisms on the DNA methyltransferase 3b gene and prostate cancer risk. *Oncol Rep* 14 : 569-573 (2005)
- 19) Jones JS, Amos CY, Pande M et al : DNMT3b polymorphism and hereditary nonpolyposis colorectal cancer age of onset. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15 : 886-891 (2006)
- 20) Lee SJ, Jeon HS, Jang JS et al : DNMT3B polymorphisms and risk of primary lung cancer. *Carcinogenesis* 26 : 403-409 (2005)
- 21) Hong YS, Lee HJ, You CH et al : DNMT3b-39179GT polymorphism and the risk of adenocarcinoma of the colon in Koreans. *Biochemical Genetics* 45 : 155-163 (2007)
- 22) Drzewoski J, Gasiorowska A, Malecka-Panas E et al : Plasma total homocysteine in the active stage of ulcerative colitis. *J Gastroenterol and Hepatol* 21 : 739-743 (2006)
- 23) Morgenstern I, Rajmakers MT, Peters WH et al : Homocysteine, cysteine, and glutathione in human colonic mucosa: elevated levels of homocysteine in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 48 : 2083-2090 (2003)
- 24) Bestor TH : The DNA methyltransferases of mammals. *Human Molecular Genetics* 9 : 2395-2402 (2000)
- 25) Okano M, Bell DW, Haber DA et al : DNA methyltransferases Dnmt 3a and Dnmt 3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99 : 247-257 (1999)
- 26) Robertson KD, Wolffe AP : DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet* 1 : 11-19 (2000)
- 27) Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G et al : The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res* 27 : 2291-2298 (1999)
- 28) Fan H, Zhang F, Hu J et al : Promotor polymorphisms of DNMT3B and the risk of colorectal cancer in Chinese: a case-control study. *J Exp Clin Cancer Res* 27 : 24 (2008)

*

*

*

Research Article

Genotoxicity of Acrylamide In Vitro: Acrylamide Is Not Metabolically Activated in Standard In Vitro Systems

Naoki Koyama,^{1,2} Manabu Yasui,¹ Yoshimitsu Oda,³ Satoshi Suzuki,⁴
Tetsuo Satoh,⁴ Takuya Suzuki,⁵ Tomonari Matsuda,⁵ Shuichi Masuda,²
Naohide Kinoshita,² and Masamitsu Honma^{1*}

¹Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, Japan

²Laboratory of Food Hygiene, Graduate School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Shizuoka-shi, Shizuoka, Japan

³Department of Applied Chemistry, Faculty of Science Engineering, Kinki University, 3-4-1, Kowakae, Higashiosaka-shi, Japan

⁴HAB Research Institute, Cornea Center Building, Ichikawa General Hospital, 5-1-1-13 Sugano, Ichikawa, Chiba, Japan

⁵Research Center for Environmental Quality Management, Kyoto University, 1-2 Yumihama, Otsu, Shiga, Japan

The recent finding that acrylamide (AA), a genotoxic rodent carcinogen, is formed during the frying or baking of a variety of foods raises human health concerns. AA is known to be metabolized by cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) to glycidamide (GA), which is responsible for AA's in vivo genotoxicity and probable carcinogenicity. In in-vitro mammalian cell tests, however, AA genotoxicity is not enhanced by rat liver S9 or a human liver microsomal fraction. In an attempt to demonstrate the in vitro expression of AA genotoxicity, we employed *Salmonella* strains and human cell lines that overexpress human CYP2E1. In the *umu* test, however, AA was not genotoxic in the

CYP2E1-expressing *Salmonella* strain or its parental strain. Moreover, a transgenic human lymphoblastoid cell line overexpressing CYP2E1 (h2E1v2) and its parental cell line (AHH-1) both showed equally weak cytotoxic and genotoxic responses to high (>1 mM) AA concentrations. The DNA adduct N7-GA-Gua, which is detected in liver following AA treatment in vivo, was not substantially formed in the in vitro system. These results indicate that AA was not metabolically activated to GA in vitro. Thus, AA is not relevantly genotoxic in vitro, although its in vivo genotoxicity was clearly demonstrated. *Environ. Mol. Mutagen.* 00:000–000, 2010. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

Key words: acrylamide; glycidamide; cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), in vitro tests; *Salmonella*

INTRODUCTION

Recently, low levels of acrylamide (AA), a synthetic chemical widely used in industry, were detected in a variety of cooked foods [Tareke et al., 2000; Mottram et al., 2002]. It has been proposed that AA forms during frying and baking principally by the Maillard reaction between asparagine residues and glucose [Stadler et al., 2002; Tornqvist, 2005]. This finding raised concerns about a health risk for the general population [Tareke et al., 2002; Rice, 2005].

The International Agency for Research on Cancer classifies AA as 2A, a probable human carcinogen [IARC, 1994]. Because AA clearly induces gene mutations and micronuclei in mice, it could be a genotoxic carcinogen [Cao et al., 1993; Abramsson-Zetterberg, 2003; Manjanatha et al., 2005]. AA is metabolized by cytochrome

P450 2E1 (CYP2E1) to glycidamide (GA), which can react with cellular DNA and protein [Sumner et al., 1999; Ghanayem et al., 2005a; Rice, 2005]. Two major GA-DNA adducts, N7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-gua-

Grant sponsor: Health and Labor Sciences Research Grant, Japan; Grant Number: H21-food-general-012; Grant sponsor: Human Science Foundation, Japan; Grant Number: KHB1007.

*Correspondence to: Masamitsu Honma, Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan. E-mail: honma@nihs.go.jp

Received 8 October 2009; provisionally accepted 5 January 2010; and in final form 19 January 2010

DOI 10.1002/em.20560

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

nine (N7-GA-Gua) and N3-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-adenine (N3-GA-Ade), have been identified in mice and rats treated with AA or GA [Segeberback et al., 1995; Gamboa da Costa et al., 2003; Doerge et al., 2005], with the level of N7-GA-Gua being 100 times as high as the level of N3-GA-Ade in the test organ [Gamboa da Costa et al., 2003]. It is likely that these DNA adducts are responsible for AA's *in vivo* genotoxicity [Carere, 2006; Ghanayem and Hoffler, 2007]. In our previous study, however, AA did not induce micronuclei in human lymphoblastoid TK6 cells in the presence of rat liver S9, although the genotoxicity of *N*-di-*N*-butylnitrosamine (DBN), which is also metabolized by CYP2E1, was enhanced under the same conditions [Koyama et al., 2006]. Other *in vitro* genotoxicity studies have also failed to demonstrate the metabolic activation of AA in the presence of S9 [Knaap et al., 1988; Tsuda et al., 1993; Dearfield et al., 1995; Friedman, 2003]. It may be because most S9 preparations have low CYP2E1 activity [Calleman et al., 1990; Hargreaves et al., 1994].

In an attempt to demonstrate the genotoxicity of AA *in vitro*, we tested the compound using bacteria and mammalian cell lines that express CYP2E1. *S. typhimurium* OY1002/2E1 strain expresses respective human CYP2E1 enzyme and NADPH-cytochrome P450 reductase (reductase), and bacterial *O*-acetyltransferase [Oda et al., 2001]. Using the strain, as well as its parental strain not expressing these enzymes, we conducted an *umu* assay to evaluate induction of cytotoxicity and DNA damage by AA relative to that induced by its metabolite GA. The principle of the *umu* assay is based on the ability of the DNA-damaging agents inducing the *umu* operon. Monitoring the levels of *umu* operon expression enables us to quantitatively detect environmental mutagens [Oda et al., 1985]. In addition, we evaluated the relative mutagenicity of AA vs. GA in assays using transgenic human lymphoblastoid cell lines. Induction of gene mutation at the *TK* locus and of chromosome damage leading to micronucleus (MN) formation were assessed in the h2E1v2 which overexpress human CYP2E1 [Crespi et al., 1993a], vs. its parental cell line, AHH-1. We also investigated the relationship between AA genotoxicity and the formation N7-GA-Gua (derived from GA) in the *in vitro* mammalian cell system.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains, Cell Lines, Chemicals, and Human Liver Microsomal Fraction

For the bacterial tests, we used *umu* strain *S. typhimurium* OY1002/2E1, which expresses human CYP2E1, reductase, and bacterial *O*-acetyltransferase, and its parental strain, *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 that does not express these enzymes [Oda et al., 2001].

For the mammalian cell tests, we used human lymphoblastoid cell lines, TK6, AHH-1, and h2E1v2. The TK6 cell line has been described previously [Honma et al., 1997]. The AHH-1 and h2E1v2 cell lines were kindly gifted from Dr. Charles Crespi (BD Bio Sciences, Bedford, MA).

AHH-1 is a clonal isolate, derived from RPMI 1788 cells, which was selected for sensitivity to benzo[*a*]pyrene [Crespi and Thilly, 1984]. AHH-1 shows high activity of endogenous CYP1A1. Heterozygosity of AHH-1 cells at thymidine kinase (TK) locus was derived in a two-step selection process utilizing the frameshift mutagen, ICR-191. The AHH-1 cell line was then transfected with plasmids encoding human CYP2E1 enzymes, generating h2E1v2 cell line. AHH-1 expresses CYP1A1 and h2E1v2 expresses both CYP1A1 and CYP2E1 [Crespi et al., 1993a,b].

We purchased AA (CAS No. 79-06-1) and GA (CAS No. 5694-00-8) from Wako Pure Chemical (Tokyo) and dissolved them in phosphate-buffered saline just before use. We purchased *N*-di-*N*-methylnitrosamine (DMN) (CAS No. 62-75-9) from Sigma Aldrich Japan (Tokyo) and dissolved it in DMSO as a positive control for use. We purchased liver S9 prepared from SD rats treated with phenobarbital and 5,6-benzoflavone from the Oriental Yeast (Tokyo). The human liver S9 (HLS-104) was prepared from a human liver sample, which was legally procured from the NDRI (National Disease Research Interchange) in Philadelphia, USA, with permission to use for research purpose only. HLS-104 showed high activity of CYP2E1 [Hakura et al., 2005]. We prepared microsomal fraction from the S9 according to an established procedure [Suzuki et al., 2000]. We prepared the S9- or microsome-mix by mixing 4 ml S9 or microsomal fraction with 2 ml each of 180 mg/ml glucose-6-phosphate, 25 mg/ml NADP, and 150 mM KCl. CYP2E1 activity of the S9 and microsomal fractions were determined as the activity of chlorzaxazone 6-hydroxylation according to the method of Ikeda et al. [2001].

We grew the cell lines in RPMI1640 medium (Gibco-BRL, Life Technology, Grand Island, NY) supplemented with 10% heat-inactivated horse serum (JRH Biosciences, Lenexa, KS), 200 µg/ml sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin, and we maintained the cultures at 10^5 – 10^6 cells/ml at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere with 100% humidity.

umu Assay

The *umu* assay was carried out by the method of Aryal et al. [1999, 2000] with slight modification. Overnight cultures of tester strains were diluted 100-fold with TGlyT medium (1% Bactotryptone, 0.5% NaCl (w/v), 0.2% glycerol (v/v), and 1 µg of tetracycline/ml, 1.0 mM IPTG, 0.5 mMβ-ALA, and 250 ml of trace element mixture/l) [Sandhu et al., 1994]. The culture was incubated for 1 hr at 37°C and then 0.75 ml aliquots of TGA culture (OD₆₀₀: 0.25–0.3) and human. Induction of the *umuC* gene by HCAs in different strains was determined by measuring cellular β-galactosidase activity, as described by Oda et al. [1985]. Cell toxicity was determined in reaction mixture by measuring the optical density change at 600 nm.

Mammalian Cell Assays Measuring Gene Mutation and Chromosome Damage

We incubated 20-ml aliquots of TK6, AHH-1, or h2E1v2 cell suspensions (5.0×10^5 cells/ml) treated with serially diluted AA, GA, or DMN in the presence or absence of S9 or microsomes at 37°C for 4 hr, washed them once, resuspended them in fresh medium, and cultured them in new flasks for the MN and TK assays. For TK6 cells, we also seeded cells into the 96-well plates (1.6 cells/well) to determine plating efficiency (PE0).

Forty-eight hours after treating the cells, we prepared the MN test samples as previously reported [Koyama et al., 2006]. At least, 1,000 intact interphase cells for each treatment were examined, and the cells containing MN were scored. The MN frequencies between nontreated and treated cells were statistically analyzed by Fisher's exact test. The concentration–response relationship was evaluated by the Cochran-Armitage trend test [Matsushima et al., 1999].

We maintained the cultures another 24 hr to allow phenotypic expression prior to plating for determination of the mutant fractions. After the expression time, to isolate the TK deficient mutants, we seeded the cells into 96-well plates in the presence of 3.0 µg/ml trifluorothymidine (TFT).

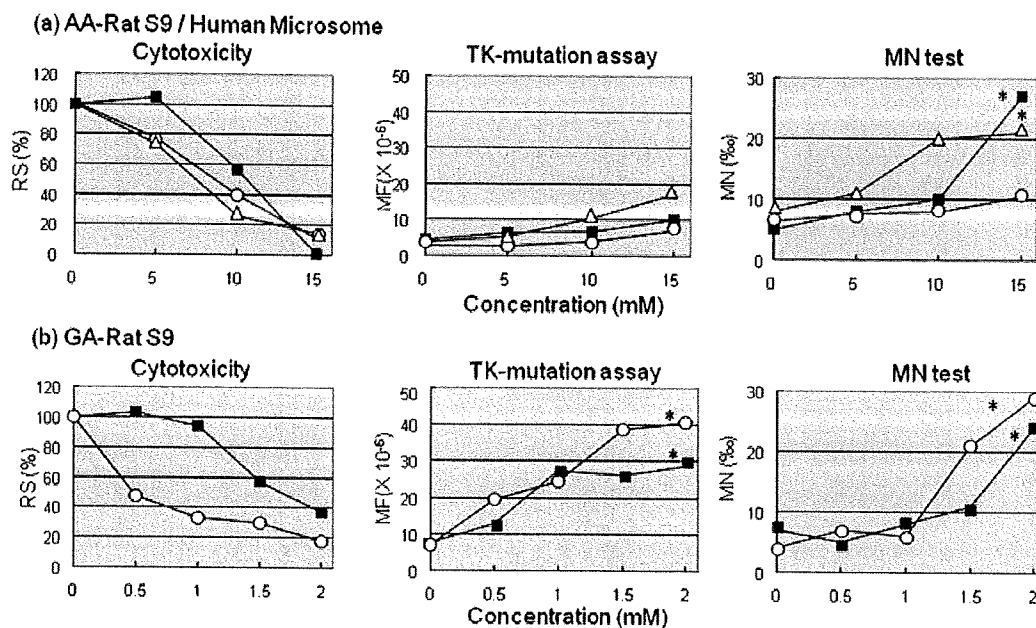


Fig. 1. Cytotoxic (relative survival, RS) and genotoxic (TK and MN assays) responses of TK6 cells treated with AA or GA for 4 hr with or without metabolic activation. (a) TK6 cells were treated with AA without (■) or with (○) rat liver S9 or human microsomes (△). (b) TK6 cells were treated with GA without (■) or with (○) rat liver S9. * $P < 0.05$ (Omori method for TK-mutation assay, trend test for MN assay).

We also seeded cells into the 96-well plates in the absence of TFT to determine plating efficiency (PE3). TK6 cells were seeded at 40,000 cells/well and 1.6 cell/well for TFT and PE plates, respectively. AHH-1 and h2E1v2 cells were seeded at 5,000 cells/well and 3.2 cells/well for TFT and PE plates, respectively. All plates were incubated at 37°C in 5% CO₂ in a humidified incubator. We scored for the colonies in the PE plates at 14th day after plating, and scored for the colonies in the TFT plate on the 28th day after plating. Mutation frequencies were calculated according to the Poisson distribution [Furth et al., 1981]. The data were statistically analyzed by Omori's method, which consists of a modified Dunnett's procedure for identifying clear negative, a Simpson-Margolin procedure for detecting downturn data, and a trend test to evaluate the dose-dependency [Omori et al., 2002]. We evaluated cytotoxicity for TK6 by relative survival (RS), which is calculated from plating efficiency (PE0), and for AHH-1 and h2E1v2 by relative suspension growth (RSG), which is calculated from cell growth rate during 3 days expression period.

Western Blot Analysis

A goat polyclonal anti-rat CYP2E1 antibody (Daiichi Pure Chemical, Tokyo) and rabbit anti-rat actin (Sigma, St. Louis, MO) were used as primary antibodies. AP-conjugated secondary antibody (Cappel, Organon Technika Corp., West Chester, PA) was used to detect primary antibody signals.

DNA Adduct Assay

As a standard for LC/MS/MS analysis, N7-GA-Gua and [¹⁵N₅]-labeled N7-GA-Gua were synthesized as described previously [Gamboa da Costa et al., 2003]. DNA was extracted from the cells by using DNeasy 96 Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Düsseldorf) and incubated at 37°C for 48 hr for depurination. An aliquot of the [¹⁵N₅]-labeled N7-GA-Gua standard was added to each sample and filtered through an ultrafiltration membrane to remove DNA. The eluted-solution was evaporated thoroughly and dissolved in water, and then the solutions were subsequently quantified by LC/MS/MS.

RESULTS

Cytotoxicity and Genotoxicity of AA and GA Under Metabolic Activation

We used human microsomal preparation and phenobarbital- and 5,6-benzoflavone-treated rat liver S9 for metabolic activation. CYP2E1 activity of the human microsomal preparation was more than twice that of the rat liver S9 preparations (2,917 vs. 1,295 pmol/mg/min).

Figure 1 shows the cytotoxicity (RS; relative survival), MN, and TK-mutations induced by AA (a) and GA (b) with and without rat liver S9 or human microsomes. Rat liver S9 or human microsomes enhanced cytotoxicity (RS) of AA and GA. On the other hand, AA showed weak genotoxicity only at relatively high concentrations (>10 mM) without S9, but neither activating system enhanced the weak genotoxicity. GA induced TK-mutations dose-dependently from the low concentration (0.5 mM) and induced MN from 1.5 mM both with and without S9. Thus, neither the rat nor human metabolizing system activated AA or inhibited the expression of GA genotoxicity.

umu Assay Using Strains Expressing Human CYP2E1

We used *S. typhimurium* OY1002/2E1 strain to assess the cell toxicity and genotoxicity of AA at exposures up to 10mM (Fig. 2c). We also examined AA and GA with

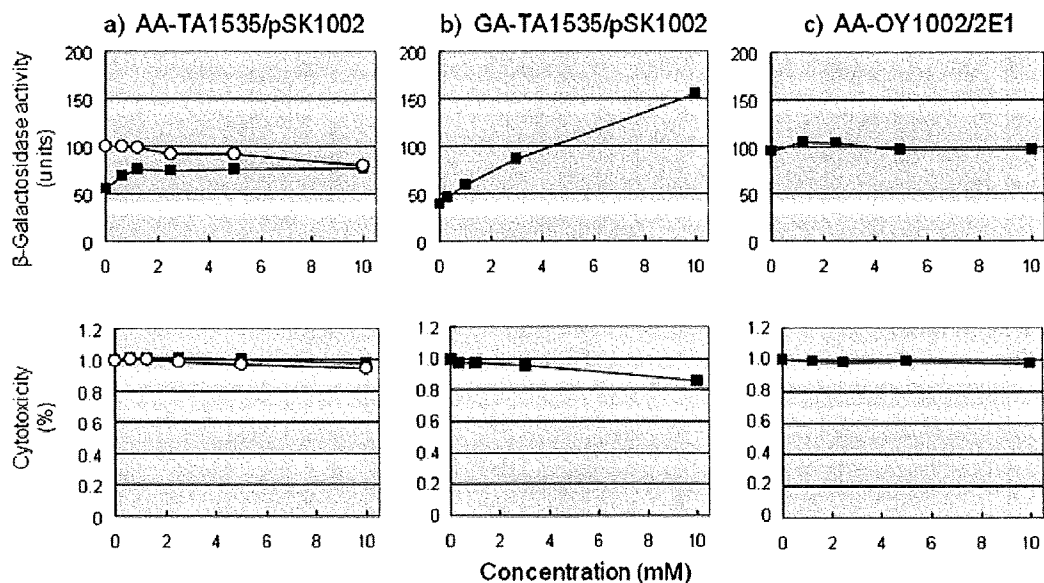


Fig. 2. Induction of *umuC* gene expression and cytotoxic response by AA (a, c) or GA (b) in *S. typhimurium* tester strains TA1535/pSK1002 (a, b) and OY1002/2E1 (c). The *umu* tests were conducted without (■) or with rat S9 (○). β -Galactosidase activity (units) was determined as described in Materials and Methods. Cytotoxic activities are expressed as % optical density change at 600 nm.

or without rat S9 using TA1535/pSK1002 strain. Although GA clearly produced a dose-related increase in response to DNA damage (Fig. 2b), AA elicited no genotoxic or cell toxic response with and without S9 (Fig. 2a). Thus, we could not demonstrate any *in vitro* genotoxicity of AA in the bacterial system.

Cytotoxic and Genotoxic Responses to AA in Transgenic Cell Lines

Western blot analysis revealed that h2E1v2 accumulated more CYP2E1 than either of its parental cell lines (Fig. 3). Both the h2E1v2 and AHH-1 cells exhibited weak responses (TK-gene mutations and MN) to AA at ≤ 3 mM with little difference in cytotoxicity (RSG, relative suspension growth) (Fig. 4a). h2E1v2 differed from AHH-1, however, in that it showed clear genotoxic and cytotoxic responses (RSG) to DMN, which is a representative substrate for CYP2E1 (Fig. 4b). Thus, the h2E1v2 cell line had CYP2E1 activity but did not activate AA.

DNA Adduct Formation by AA and GA in the Cell Lines

AA induced trace amounts of N7-GA-Gua adduct in TK6 cells (with and without S9) (Fig. 5a) and in AHH-1 and h2E1v2 cells (Fig. 5b). GA, on the other hand, induced a substantial number of N7-GA-Gua adducts in TK6 cells (Fig. 5c). These results suggest that the expression of genotoxicity may be dependent on N7-GA-Gua

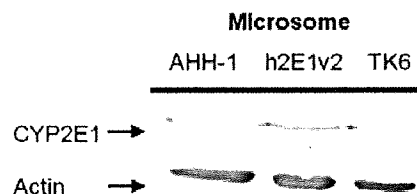


Fig. 3. Western blot analysis of CYP2E1 in AHH-1, h2E1v2, and TK6 cells. Equal amount of materials were loaded for each sample. CYP2E1 protein was stained with the anti-CYP2E1 antibody. Actin was used as a loading control.

adduct formation, and the *in vitro* metabolic activation system did not metabolize AA into GA.

DISCUSSION

A large number of studies about the *in vitro* genotoxicity of AA have been reported [Dearfield et al., 1995; Besaratinia and Pfeifer, 2005]. AA was negative in Ames assay in both the presence and absence of S9 [Zeiger et al., 1987; Knaap et al., 1988; Tsuda et al., 1993]. In mammalian cell assays, cytogenetic tests such as chromosome aberration test and sister chromatid exchange tests were positive [Sofuni et al., 1985; Tsuda et al., 1993]. AA also induced *Tk* mutation in the MLA but did not induce *Hprt* mutation in V79 cells [Moore et al., 1987;

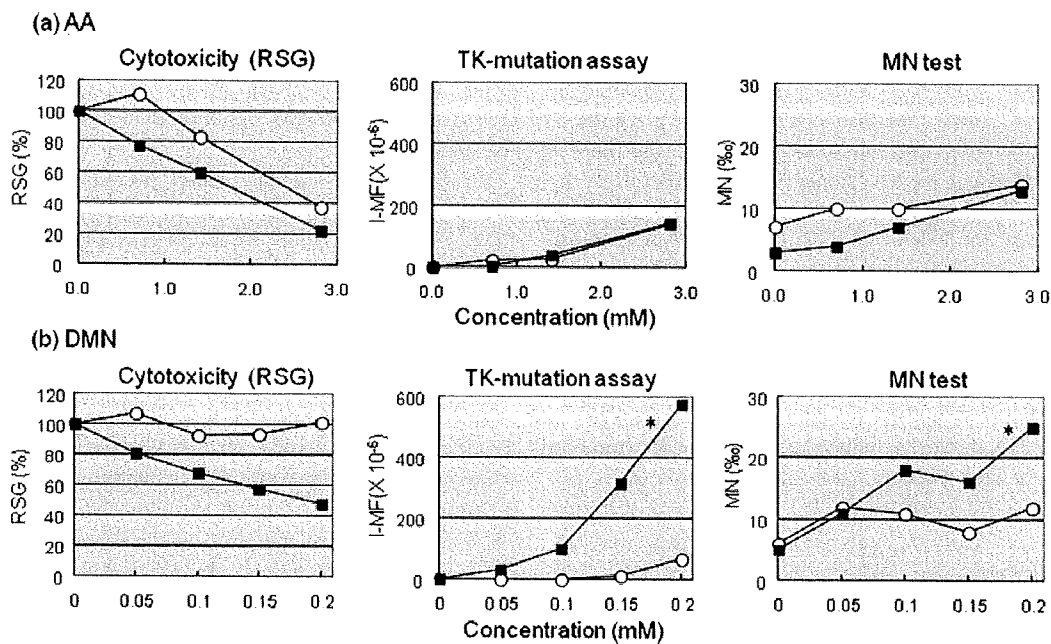


Fig. 4. Cytotoxic (relative suspension growth, RSG) and genotoxic (TK assay and MN test) responses of AHH-1 (○) or h2E1v2 (■) cells treated with AA or DMN for 4 hr. I-MF means induced mutation fraction, in which back ground mutation frequency is subtracted. **P* < 0.05 (Omori method for TK-mutation assay, trend test for MN assay).

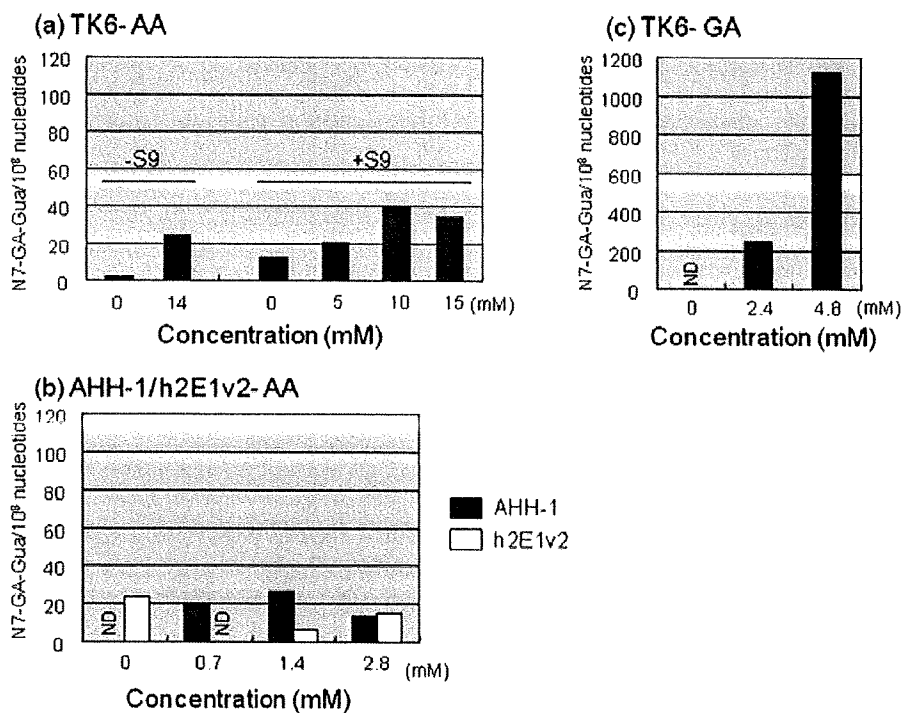


Fig. 5. Levels of N7-GA-Gua adduct in TK6 (a, c), AHH-1 (b), or h2E1v2 (b) cells treated with AA (a, b) or GA (c) for 4 hr at different concentrations. Data are expressed as the number of adducts in 10⁸ nucleotides.

Knaap et al., 1988; Tsuda et al., 1993; Baum et al., 2005; Mei et al., 2008], and produced negative results in the Comet assay with V79 cells and human lymphocytes [Baum et al., 2005]. We also obtained positive results in *TK* gene mutation and micronuclei assays, but not in Comet assay using human lymphoblastoid TK6 cell in the absence of S9 [Koyama et al., 2006]. To obtain the positive results in the MLA and TK6 cells, however required very high dose of AA, which was sometimes beyond the top dose of the OECD testing guideline (>10 mM) [Koyama et al., 2006; Mei et al., 2008]. The spectrum of AA-induced *TK* mutations in TK6 and *cII* mutations in Big Blue[®] mouse embryonic fibroblasts were not significantly different from the spontaneous one, although its metabolite GA distinctly induced a specific point mutation [Besaratina and Pfeifer, 2003, 2004; Koyama et al., 2006]. Thus, the *in vitro* genotoxicity of AA is still controversial.

In contrast, the *in vivo* genotoxicity of AA has been clearly demonstrated by various rodent genotoxicity tests including micronuclei tests in peripheral blood [Cao et al., 1993; Abramsson-Zetterberg, 2003; Manjanatha et al., 2005], transgenic gene mutation in liver [Manjanatha et al., 2005], and Comet assay in various organs [Ghanayem et al., 2005b]. AA has also proven to be genotoxic to germ cells [Dearfield et al., 1995]. AA induced micronuclei in mice spermatids, and heritable chromosome translocations and specific locus mutations in postmeiotic sperm and spermatogonia [Lahdetie et al., 1994; Xiao and Bates, 1994]. AA also elevated the frequency of dominant lethal mutations probably accompanying with chromosome aberrations leading to death of embryo [Shelby et al., 1987; Adler et al., 1994]. The International Agency for Research on Cancer (IARC) classified it as 2A, a probable human carcinogen based on finding of rodent carcinogenicity [IARC, 1994]. AA caused tumors in various organs including mammary gland, peritesticular mesothelium, thyroid, and central nervous system [Carere, 2006], although the AA-inducing genotoxicity in these organs have not been demonstrated.

AA is metabolized either via direct glutathione conjugation followed by excretion of mercapturic acid or via oxidative pathways catalyzed by CYP2E1 to yield GA [Calleman et al., 1990; Wu et al., 1993; Sumner et al., 1999]. GA reacts quickly with DNA, mainly forming N7-GA-Gua adduct. Genotoxicity of GA has been demonstrated *in vitro* and *in vivo*. In contrast to AA, GA is positive in most genotoxicity tests [Hashimoto and Tani, 1985; Dearfield et al., 1995; Besaratina and Pfeifer, 2004; Baum et al., 2005; Koyama et al., 2006]. Manjanatha et al. [2005] demonstrated in transgenic Big Blue[®] mice that both AA and GA induces endogenous *Hprt* and transgenic *cII* mutation at same level, and also produced similar mutational spectra. The predominant type of mutations observed in these two systems was G:C to T:A

transversion, which is presumably derived from N7-GA-Gua [Besaratina and Pfeifer, 2005]. The *in vivo* results with transgenic Big Blue[®] mice indicate that *in vivo* expression of AA genotoxicity is mediated via its GA metabolite.

However, no one has succeeded in demonstrating metabolically activated AA genotoxicity *in vitro* [Knaap et al., 1988; Tsuda et al., 1993; Dearfield et al., 1995; Friedman, 2003; Emmert et al., 2006]. In this study, we used induced rat liver S9 and human microsomal fraction for the metabolic activation. Although they have high CYP2E1 activity, the AA-inducing genotoxicity was never influenced by the presence of the exogenous metabolic activation system (Fig. 1a). We assumed that GA, a reactive epoxide, could be rapidly inactivated through microsomal epoxide hydrolase or glutathione in any S9 or microsomal fraction resulting in either the metabolism or the conjugation and detoxification of GA [Sumner et al., 2003; Decker et al., 2009]. However, presence of rat S9 did not prevent GA from inducing *TK*-mutation and micronuclei.

The *umu* assay could not detect the genotoxicity of AA even by the strain (Fig. 2). Emmert et al. [2006] also failed to demonstrate the mutagenicity of AA in the Ames test using the metabolically competent *S. typhimurium* strain YG7108pinERb₅ that expresses CYP2E1. In mammalian cell system, such as the human lymphoblastoid cell line, h2E1v2 overexpressing human CYP2E1 did not show different response in *TK*-gene mutation and MN induction compared to its parental cell line, AHH-1, although these cell lines exhibited distinct difference to DMN, which is a representative substrate for CYP2E1. We also investigated the genotoxicity of AA in h2E1v2 cells after long exposure (24 hr), because AA may be slowly metabolized to GA. The result was also negative (data not shown). Thus, we could not obtain any evidence of *in vitro* genotoxicity of AA *via* metabolic activation.

Glatt et al. [2005] developed a Chinese hamster V79-derived cell line that stably expresses human CYP2E1 and sulphotransferase (SULT), and applied it to investigate sister chromatid exchanges (SCE) induced by some chemicals. They demonstrated that AA induced SCE in the transgenic cell line but not in the parental line. Although the reason for the discrepancy between their results and ours is not clear, it is possible that another enzyme, such as SULT, may be involved in metabolic activation of AA.

The DNA adduct analysis clearly revealed that h2E1v2 cells does not generate N7-GA-Gua adduct *in vitro*. Because exposure of human cells to GA results in significant accumulation of N7-GA-Gua adduct, but DNA adduct analysis following exposure of h2E1v2 with AA does not generate N7-GA-Gua adduct *in vitro*, lead one a conclusion that the presence of CYP2E1 alone is not enough to metabolize AA to GA in mammalian cells. The

DNA adduct analysis also strongly supports a hypothesis that GA contribute to its genotoxicity by forming N7-GA-Gua adduct. Interestingly, very small amount of N7-GA-Gua adduct was generated in TK6 cells in a dose-dependent manner regardless of the presence of S9 (Fig. 5a). TK6 cells themselves may have an enzymatic activity to metabolize AA to GA, although its activity must be extremely low. Ghanayem et al. [2005b] showed that AA was not mutagenic or genotoxic in CYP2E1-null mice. Intraperitoneal injection of AA (25, 50 mg/kg) by once daily for 5 days induced micronuclei in erythrocyte and DNA damage assessed by Comet assay in leukocyte and liver cells of wild-type, but not in the CYP2E1-null mice. The plasma concentration of AA in the CYP2E1-null mice was 115-times higher than in the wild-type mice, while the GA concentration in the CYP2E1-null mice was negligible compared to that in the wild-type mice [Ghanayem et al., 2000]. Ghanayem et al. [2005c] also demonstrated that AA produces dominant lethal in mice that express CYP2E1, but not in mice that do not express CYP2E1, indicating that induction of germ cell mutations by AA in mice in vivo is also dependent upon CYP2E1 metabolism. These results clearly suggest that CYP2E1 is the principal enzyme responsible for the metabolism of AA to GA in vivo.

In conclusion, AA could not be metabolized to GA by in vitro metabolic activation system commonly used in genotoxicity tests. In vivo, on the other hand, GA is apparently responsible for AA-inducing genotoxicity. Although AA may exhibit genotoxicity in in vitro mammalian cells at high concentrations, its positive response is not relevant for its major genotoxicity. AA could be classified into in vivo specific genotoxic chemical.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Dr. Crespi (BD Bio Sciences) for kindly providing the AHH-1 and h2E1v2 cell lines.

REFERENCES

- Abramsson-Zetterberg L. 2003. The dose-response relationship at very low doses of acrylamide is linear in the flow cytometer-based mouse micronucleus assay. *Mutat Res* 535:215–222.
- Adler ID, Reitmeir P, Schmoller R, Schriever-Schwemmer G. 1994. Dose response for heritable translocations induced by acrylamide in spermatids of mice. *Mutat Res* 309:285–291.
- Aryal P, Yoshikawa K, Terashita T, Guengerich FP, Shimada T, Oda Y. 1999. Development of a new genotoxicity test system with *Salmonella typhimurium* OY1001/1A2 expressing human CYP1A2 and NADPH-P450 reductase. *Mutat Res* 442:113–120.
- Aryal P, Terashita T, Guengerich FP, Shimada T, Oda Y. 2000. Use of genetically engineered *Salmonella typhimurium* OY1002/1A2 strain coexpressing human cytochrome P450 1A2 and NADPH-cytochrome P450 reductase and bacterial *O*-acetyltransferase in SOS/umu assay. *Environ Mol Mutagen* 36:121–126.
- Baum M, Fauth E, Fritzen S, Herrmann A, Mertes P, Merz K, Rudolph M, Zankl H, Eisenbrand G. 2005. Acrylamide and glycidamide: Genotoxic effects in V79-cells and human blood. *Mutat Res* 580:61–69.
- Besaratinia A, Pfeifer GP. 2003. Weak yet distinct mutagenicity of acrylamide in mammalian cells. *J Natl Cancer Inst* 95:889–896.
- Besaratinia A, Pfeifer GP. 2004. Genotoxicity of acrylamide and glycidamide. *J Natl Cancer Inst* 96:1023–1029.
- Besaratinia A, Pfeifer GP. 2005. DNA adduction and mutagenic properties of acrylamide. *Mutat Res* 580:31–40.
- Calleman CJ, Bergmark E, Costa LG. 1990. Acrylamide is metabolized to glycidamide in the rat: Evidence from hemoglobin adduct formation. *Chem Res Toxicol* 3:406–412.
- Cao J, Beisker W, Nusse M, Adler ID. 1993. Flow cytometric detection of micronuclei induced by chemicals in poly- and normochromatic erythrocytes of mouse peripheral blood. *Mutagen* 8:533–541.
- Carere A. 2006. Genotoxicity and carcinogenicity of acrylamide: A critical review. *Ann Ist Super Sanita* 42:144–155.
- Crespi CL, Thilly WG. 1984. Assay for gene mutation in a human lymphoblast line, AHH-1, competent for xenobiotic metabolism. *Mutat Res* 128:221–230.
- Crespi CL, Langenbach R, Penman BW. 1993a. Human cell lines, derived from AHH-1 TK+/- human lymphoblasts, genetically engineered for expression of cytochromes P450. *Toxicology* 82:89–104.
- Crespi CL, Penman BW, Gonzalez FJ, Gelboin HV, Galvin M, Langenbach R. 1993b. Genetic toxicology using human cell lines expressing human P-450. *Biochem Soc Trans* 21:1023–1028.
- Dearfield KL, Douglas GR, Ehling UH, Moore MM, Segal GA, Brusick DJ. 1995. Acrylamide: A review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk. *Mutat Res* 330:71–99.
- Decker M, Arand M, Cronin A. 2009. Mammalian epoxide hydrolases in xenobiotic metabolism and signalling. *Arch Toxicol* 83:297–318.
- Doerge DR, da Costa GG, McDaniel LP, Churchwell MI, Twaddle NC, Beland FA. 2005. DNA adducts derived from administration of acrylamide and glycidamide to mice and rats. *Mutat Res* 580:131–141.
- Emmert B, Bunger J, Keuch K, Muller M, Emmert S, Hallier E, Westphal GA. 2006. Mutagenicity of cytochrome P450 2E1 substrates in the Ames test with the metabolic competent *S. typhimurium* strain YG7108pin3ERb5. *Toxicology* 228:66–76.
- Friedman M. 2003. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *J Agric Food Chem* 51:4504–4526.
- Furth EE, Thilly WG, Penman BW, Liber HL, Rand WM. 1981. Quantitative assay for mutation in diploid human lymphoblasts using microtiter plates. *Anal Biochem* 110:1–8.
- Gamboa da Costa G, Churchwell MI, Hamilton LP, Von Tungeln LS, Beland FA, Marques MM, Doerge DR. 2003. DNA adduct formation from acrylamide via conversion to glycidamide in adult and neonatal mice. *Chem Res Toxicol* 16:1328–1337.
- Ghanayem BI, Hoffer U. 2007. Investigation of xenobiotics metabolism, genotoxicity, and carcinogenicity using Cyp2e1(-/-) mice. *Curr Drug Metab* 8:728–749.
- Ghanayem BI, Wang H, Sumner S. 2000. Using cytochrome P-450 gene knock-out mice to study chemical metabolism, toxicity, and carcinogenicity. *Toxicol Pathol* 28:839–850.
- Ghanayem BI, McDaniel LP, Churchwell MI, Twaddle NC, Snyder R, Fennell TR, Doerge DR. 2005a. Role of CYP2E1 in the epoxidation of acrylamide to glycidamide and formation of DNA, hemoglobin adducts. *Toxicol Sci* 88:311–318.
- Ghanayem BI, Witt KL, Kissling GE, Tice RR, Recio L. 2005b. Absence of acrylamide-induced genotoxicity in CYP2E1-null mice: Evidence consistent with a glycidamide-mediated effect. *Mutat Res* 578:284–297.
- Ghanayem BI, Witt KL, El-Hadri L, Hoffer U, Kissling GE, Shelby MD, Bishop JB. 2005c. Comparison of germ cell mutagenicity in male CYP2E1-null and wild-type micetreated with acrylamide: Evidence supporting a glycidamide-mediated effect. *Biol Reprod* 72:157–163.