

らに、メチル化された 2'-デオキシシチジンと同一である、 $m/z$  242.11 を有するピークが検出された。

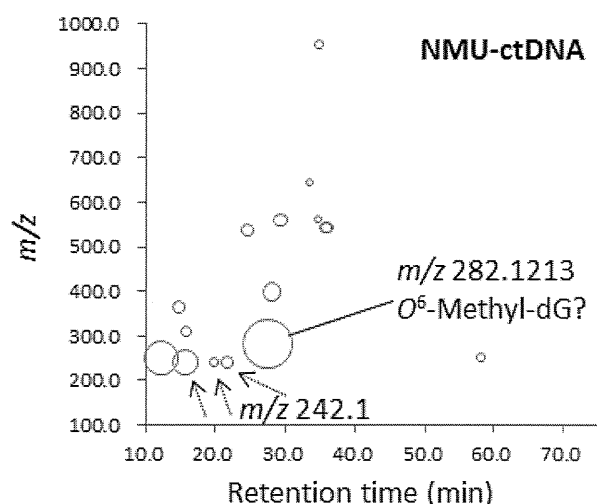


図1 NMU-ctDNA のアダクトーム解析

#### D. 考察

本研究において、LC-TOF MS を用いてアダクトーム法を確立した。本方法は、飛行時間型の質量分離部を備えた LC-MS により解析を行うことで、小数第二位までの質量を非常に高い精度で検出できるため、本法のようなノンターゲット分析で最も厄介な問題となるピークの構造解析を、高い信頼性を保って行うことが出来る。 $m/z$  282.12 を有する NMU と 2'-デオキシグアノシンの付加体として、これまでに  $O^6$ MedG が報告されている。そこで今後  $O^6$ MedG の標品を調製して、co-injection 試験を行うことで、 $m/z$  282.12 のピークが  $O^6$ MedG であるか確認する必要がある。また、 $m/z$  242.11 は 5-メチル-2'-デオキシシチジン(5MedC)と同じ質量であるが、異なる保持時間で 3 ピーク検出されていることから、仮に 5MedC が生成されていると仮定しても、残り 2 つは未知の付加体の可能性がある。一方、これまでにニトロソ化合物により 2'-デオキシシチジンの 3 位や 4 位が修飾されることがわかっている。これらの理由から、残り 2 つのピークは、3 位あるいは 4 位がメチル化された付加体ではないかと推測される。他のピークについて現在の知見からは化学構造を推測することが困難であるため、精密質量とフラグメンテーションパターンを参考に、今後、構造推定を行う必要がある。

NMU と ctDNA を反応させた結果、ctDNA に存在

しない 16 種類の DNA 付加体が生成された。上記の  $m/z$  を有する付加体については化学構造を推測できそうであったが、その他の付加体はフラグメントイオンの検出や NMR 測定などの更なる解析を行うことで、どのような付加体かを推測する必要があるものと思われる。

#### E. 結論

本研究では、DNA アダクトーム法を確立し、DNA 損傷のより詳細な評価を行い、化学物質の *in vitro* 安全性評価法として妥当かどうかについて確かめた。NMU と ctDNA を反応後、モノデオキシリボヌクレオシドに酵素消化し、LC-MS で分析したところ、既知の DNA 付加体に加え、native な ctDNA に存在しない未知の DNA 付加体が複数検出された。他の遺伝毒性物質についても今後解析する予定であり、DNA との反応性がはっきりわからない化学物質についても、アダクトーム法で解析することにより DNA 付加体を生成するポテンシャルを有するかどうかを探索できるものと期待される。次年度以降は、他の化学物質の DNA アダクトーム解析を *in vitro* 反応系において精力的に実施し、種々の化学物質が生成する DNA 付加体の種類や生成量に関する知見を蓄積するとともに、それらの成果を論文として発表することを念頭に置いて研究を推進したい。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
特になし
2. 学会発表  
特になし

#### G. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得  
特になし。
2. 実用新案登録  
特になし。
3. その他  
特になし。

## ヒストン修飾を指標とした *in vitro* 発がんリスク評価系の開発

研究分担者 伊吹裕子 静岡県立大学環境科学研究所環境毒性学 准教授

### 研究要旨

本研究ではヒストンの化学修飾に焦点をあてた新規 *in vitro* 評価系を開発することを目的とし、最終的に本研究事業の中心課題である中・短期動物発がん実験系との対比検討を行うことにより、その有用性を確認することを目標としている。化学物質によるヒストン修飾変化の基礎データを蓄積し、評価に使用するヒストン修飾パターンを決定するために、本年度は、化学物質によるヒストン修飾を H2AX(Ser139)、H3 リン酸化(Ser10, Ser28)、アセチル化(global, Lys9, Lys14)に焦点を絞り、来年度に向けた予備実験を行った。その結果、H2AX リン酸化により DNA 損傷を検出しながら、H3 リン酸化により *proto-oncogene* の発現制御を捉えることが可能であることが示され、来年度以降、幾つかの化学物質を対象に評価を行い、これらのヒストン修飾を利用した *in vitro* リスク評価系を構築していくこととした。

### A. 研究目的

近年、多岐にわたる化学物質が開発されているが、その使用は幾つかの毒性試験により規制されている。発がん性予測の第一スクリーニング法として、Ames 試験、小核試験等の遺伝毒性試験は有用であるが、それらの遺伝毒性試験では陰性でも発がん性を示す化学物質の存在が報告される等、最終的には動物における長期の発がん試験が必要とされる。動物愛護の観点から、その代替法の開発が望まれており、新しい観点からの新規 *in vivo*, *in vitro* 評価法の構築が期待されている。

本研究では新しい *in vitro* 評価系を開発することを目的とし、構築した手法について、本研究事業での中心課題である中・短期動物実験系の結果と対比させながらその実用性の可能性について検証を行う。評価法としては、化学物質作用後のヒストンの修飾変化に焦点をあてる。これまでの遺伝毒性評価では不可能であった DNA 変異に基づかない毒性や、その誘導機構の予測について検討する。

### B. 研究方法

来年度に向け、化学物質によるヒストン修飾として、H2AX(Ser139)、H3 リン酸化(Ser10, Ser28)、アセチル化(global, Lys9, Lys14)に焦点を絞り検討することとし、そのヒストン修飾選択の適正を確認するための予備実験を行った。

ヒト培養細胞株 (A549 肺上皮細胞) にホルムアルデヒドを作用させ、その後、時間依存的なヒストン修飾変化を western blotting により検出した。ホルムアルデヒドは、発がん性物質であるが、変異原性試験で判定が難しいとされ、ヒストンに対して高い反応性を有することが知られている。

### C. 研究結果

ホルムアルデヒド作用後のヒストン修飾パターンを図 1 に示す。作用後、顕著なヒストン H3(Ser10, Ser28)

のリン酸化が示された。ヒストンアセチル化は、一時的に (~6 時間) アセチル化が低下し、その後回復するパターンを示した。ヒストン H2AX(Ser139)リン酸化は時間依存的に増加した (図 1)。

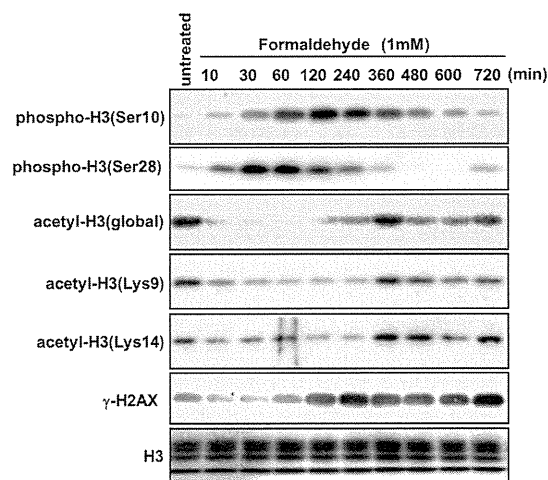


図 1 ホルムアルデヒド作用後のヒストン修飾パターン

### D. 考察

ホルムアルデヒドはヒストンのリン酸化・アセチル化状態変化をダイナミックに変化させることが明らかになった。ヒストン H3(Ser10)のリン酸化については、*proto-oncogene* の発現を制御していることが報告されていることから、H3(Ser10)のリン酸化を検出すれば、従来の *in vitro* 遺伝毒性試験では捉えることが出来ない発がんプロモーション作用を捉えることができると考えられた。DNA 損傷生成を反映する H2AX(Ser139)リン酸化と同時に測定することにより、イニシエーション、プロモーション両者を同時に解析することが可能な評価方法であることが示唆された。

## E. 結論

ヒストン H2AX(Ser139)リン酸化により DNA 損傷を検出しながら、H3(Ser10)のリン酸化により前がん遺伝子の発現制御を捉えることが可能であることが示唆され、これにヒストンアセチル化を加え in vitro 新規発がんリスク評価指標候補としてさらに検証していくこととした。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## G. 知的所有権の出願・登録状況

(予定を含む)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takahashi, S. et al	Therapeutic targeting of angiotensin II receptor type 1 to regulate androgen receptor in prostate cancer.	Prostate	in press		2012
Nakatani S, Kakehashi A, Ishimura E, Yamano S, Mori K, Wei M, Inaba M, Wanibuchi H.	Targeted proteomics of isolated glomeruli from the kidneys of diabetic rats: Sorbin and SH3 domain containing 2 is a novel protein associated with diabetic nephropathy.	Exp Diabetes Res.	in press		2012
Xie XL, Wei M, Kakehashi A, Yamano S, Tajiri M, Wanibuchi H.	2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) promotes mouse hepatocarcinogenesis by activating transforming growth factor- $\beta$ and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathways.	Toxicol Sci.	in press		2012
Nakatani S, Wei M, Ishimura E, Kakehashi A, Mori K, Nishizawa Y, Inaba M, Wanibuchi H.	Proteome analysis of laser microdissected glomeruli from formalin-fixed paraffin-embedded kidneys of autopsies of diabetic patients: nephronectin is associated with the development of diabetic glomerulosclerosis.	Nephrol Dial Transpl.	in press		2012

#### IV. 研究班員名簿（平成23年度）

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業  
化学物質の安全性と発がん性リスク評価のための短・中期バイオアッセイ系の開発  
研究班員名簿

区分	名前	所属	職名
研究代表者	吉見直己	琉球大学大学院医学研究科腫瘍病理学	教授
研究分担者	高橋智	名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学	教授
	塚本徹哉	藤田保健衛生大学医学部病理診断科	准教授
	久野壽也	岐阜大学大学院医学研究科腫瘍病理学	准教授
	魏民	大阪市立大学大学院医学研究科都市環境病理学	准教授
	横平政直	香川大学医学部腫瘍病理学	助教
	小川久美子	国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター 病理部実験病理学	部長
	戸塚ゆ加里	国立がん研究センター研究所発がんシステム研究分野	ユニット長
	伊吹裕子	静岡県立大学環境科学研究所環境毒性学	准教授
協力者	西川秋佳	国立衛試安全性生物試験研究センター	センター長
	酒々井真澄	名古屋市立大学大学院医学研究科分子毒性学	教授
	田中卓二	岐阜大学	非常勤講師

