

網羅的な DNA 付加体解析法を用いた化学物質の DNA 損傷性評価

研究代表者 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

研究要旨

既存 *in vitro* 遺伝毒性試験を用いた方法では化学物質の発がん性の予測は難しく、別の視点から遺伝毒性を評価する試験法を更に追加することが必要である。本研究は、*in vitro* 系による遺伝毒性物質あるいは毒性の有無が分からない化学物質の DNA 損傷性を試験する新しい評価法の提案を目標としている。ジクロロメタンなどのハロゲン系炭化水素はグルタチオン-S-転移酵素(GST T1-1)によりグルタチオン(GSH)が付加されることで活性化体となり DNA を修飾し、DNA-アルキル-GSH 付加体を形成すると報告されている。ヒト胆道がん発生におけるジクロロメタンの関連を明らかにする目的で、別途合成した既報のジクロロメタン代謝活性化体と DNA あるいは各種デオキシリボヌクレオシドを反応し、生成される DNA 付加体 GSCH₂-dG などの LC-MS/MS による分析系を確立した。また、ジクロロメタンと GST T1-1 を含むヒト肝サイトソール、GSH、dG を混合した系からも同じ DNA 付加体が生成されることを確認した。しかしながら、GSCH₂-dG はアルカリ性で不安定であることから、安定性の高い、新たなジクロロメタンによる DNA 付加体を探索する必要がある。そこで、昨年の本研究で開発した、LC-MS による DNA 付加体の網羅的解析法（DNA アダクトーム解析法）を用い、ジクロロメタンにより誘発される DNA 損傷の評価を行った。その結果、未知の DNA 付加体を 2 つ見出した。さらに、それらの付加体から MS/MS フラグメント解析によりジクロロメタン由来のメチル基を含む修飾 dG 由来のフラグメントイオンが検出されたため、ジクロロメタン由来の新規な DNA 付加体であることが示唆された。

A. 研究目的

既存の *in vitro* 遺伝毒性試験としては、Ames 試験（変異原性試験）、コメットアッセイ（DNA 損傷試験）、小核試験（染色体異常試験）などが簡便な試験法として汎用されている。しかしながら、これらの *in vitro* 試験のみでは化学物質の発がん性の予測は難しく、別の視点から遺伝毒性を評価する試験法を更に追加することが必要であると考えられる。そこで昨年は、LC-MS/MS により DNA 付加体を網羅的に解析する方法（アダクトーム法）を用い、DNA 損傷のより詳細な評価を行ない、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。本年は、昨年度に確立した LC-TOF-MS による DNA アダクトーム法を用いて、ヒトが曝露しうる化学物質が誘発する DNA 損傷性の評価ならびに新規 DNA 付加体の解析を行う。

最近、ジクロロメタンや 1,2-ジクロロプロパン等のハロゲン系炭化水素は職業性胆道がんの原因物質であることが示唆されているが、これらハロゲン系炭化水素と印刷業者で多発するヒト胆道がんとの関係は未だ良くわかっていない。そのため、これらヒト胆道がんの発生とジクロロメタン、1,2-ジクロロプロパンなどのハロゲン系炭化水素の関与を判断しうる、安定性が高く、診断に用いることが出来るような信頼性の高い診断マーカーが必要となる。本研究では、遺伝子変異の基となり、バイオマーカーになりうるハロゲン系炭化水素由来の DNA 付加体の解析を、*in vitro* 反応系を用いて試みた。本年度はジクロロメタンにより生成される DNA 付加体の解析から行った。

B. 研究方法

ハロゲン系炭化水素はグルタチオン-S-転移酵素(GST T1-1)により GSH が付加されることで活性化体となり DNA を修飾し、DNA-アルキル-GSH 付加体を形成すると報告されている。DNA-アルキル-GSH 付加体の生成を *in vitro* 系を検討するために、以下のように研究を実施した。

- 1) ジクロロメタン由来の DNA 付加体の標準品を化学合成し、分析条件の確立を LC-ESI-MS/MS を用いて行った。
- 2) これら付加体がハロゲン系炭化水素と GSH の共存下で GSTT1-1 の作用により生成するかについて検討をおこなった。
- 3) 既報の DNA-アルキル-GSH 付加体以外の未報告の DNA 付加体の生成について、LC-TOF-MS を用いた網羅的解析法（アダクトーム法）により検討した。

各項目における実験条件を以下に示す。

- 1) ジクロロメタンの活性化体である S-アセトキシメチルグルタチオン (GSCH₂OAc) とウシ胸腺 DNA (CT-DNA) あるいは 4 種のデオキシリボヌクレオシド [2'-デオキシグアノシン (dG)、2'-デオキシシチジン (dC)、2'-デオキシアデノシン (dA)、チミジン (dT)] を 37°C で 1 時間反応させた。CT-DNA サンプルについては反応後 DNA 消化酵素でヌクレオシドレベルまで分解し、LC-ESI-MS/MS (Quattro Ultima Pt) に供した。
- 2) マウス、ラット及びヒト由来の GSTT1-1 を含む画分である肝 cytosol 存在下で、ジクロロメタン、GSH 及び 4 種のデオキシリボヌクレオシド (dG、dC、dA、dT) を

HEPES バッファー (pH 7.0) 中で 37 °C で 1 時間インキュベートした。限界ろ過膜に通し、LC-ESI-MS/MS に供した。

3) 1) のサンプルのうち GSCH₂OAc と dG 反応液を LC-TOF-MS に供し、DNA アダクトーム解析法(詳細な解析方法は前年度分担研究報告書を参照)により解析した。また、検出された未知の DNA 付加体について MS/MS フラグメント解析を実施した。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験にあたっては、国立がん研究センターを含む各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。

C. 研究結果

各実験項目の結果を以下のように示す。

1) CT-DNA との反応で生成させたジクロロメタン由来の 4 種の GSCH₂-DNA 付加体 (GSCH₂-dG, GSCH₂-dC, GSCH₂-dA, GSCH₂-dT) の生成について調べたところ、GSCH₂-dG がその他の塩基由来の付加体と比べ 40 - 1400 倍も多く生成することがわかった。

2) マウス、ラット及びヒト由来の GSTT1-1 を含む画分である肝 cytosol 存在下で、ジクロロメタン、GSH 及び 4 種のデオキシリボヌクレオシドを反応させたところ、反応混液中に GSCH₂-dG に相当するピークのみが観察され、dC、dA および dT に由来する付加体は検出されなかった。このことから、ジクロロメタン由来の GSH 付加体は GSCH₂-dG がメジャーな付加体であることが示唆された。

3) 1) のサンプルの GSCH₂OAc と dG 反応液を LC-TOF-MS を用いた網羅的解析法 (アダクトーム法) により解析したところ、GSCH₂-dG が検出されただけでなく、他にも多数の DNA 付加体が観察されたことから、GSCH₂-dG 付加体以外にも多くの未報告の DNA 付加体が生成されていることがわかった (図 1)。それらのうち、図 1 の arrowhead の DNA 付加体について MS/MS フラグメント解析を行った。その結果、メチル基 + dG に由来するものと思われるフラグメントイオンが検出された。

D. 考察

本研究では、動物モデルにおいて胆管がんを誘発する可能性のあるジクロロメタンについて、グルタチオン抱合型の活性化体ならびに GSTT1-1 存在下での DNA 付加体の生成について、LC-MS を用いて解析した。それにより、未報告の DNA 付加体を見出すことが出来た。しかしながら、それらが GSCH₂OAc と dG の反応産物であることがわからなければ、診断マーカーとしての信頼性は低くなってしまふ。そのため、図 1 で見出した未知の DNA 付加体の構造解析を行う必要があった。既報の GSCH₂-dG の MS/MS フラグメント解析を行うと、m/z 308 や m/z 471 など、構造情報と矛盾の無いフラグメントイオンが検出される。GSCH₂-dG に由来するフラグメントイオンは他にも数多く生成されるが、その中にメチル基 + dG を示す、未報告の DNA 付加体から検出されたフラグメントイオンと同一のフラグメントイオンが検出された。このことからメチル基はジクロロメタン由来のメチル基と推測され、

DNA adductome analysis

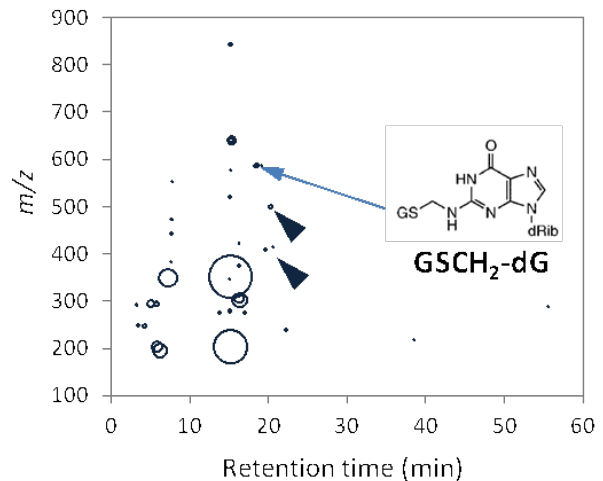


図 1. GSCH₂OAc と dG 反応液の DNA アダクトーム解析

図 1 の arrowhead で示した DNA 付加体はジクロロメタンに由来する付加体である可能性が示唆された。また、これら未報告の DNA 付加体は、2) のサンプルのヒト肝サイトゾルとの反応サンプルからも検出されたことから、ジクロロメタンに曝露したヒトの生体中においても生成している可能性が示された。

また、バイオマーカーとして用いられる化合物は、化学的に安定かどうかが重要である。GSCH₂-dG はアルカリ条件下で大変不安定であることがわかっており、組織サンプルや細胞から DNA を抽出する過程がアルカリ性条件下で行われるため、抽出過程で壊れてしまうことが危惧される。今後、未知の DNA 付加体がサンプル処理の条件下で不安定でないかを調べる必要がある。

E. 結論

本研究では、GSCH₂OAc と DNA あるいは各種デオキシリボヌクレオシドの *in vitro* 反応サンプルを、DNA アダクトーム法を用いて分析し、既知の DNA 付加体以外に生成される DNA 付加体の探索を行った。その結果、GSCH₂-dG に加え、未知の DNA 付加体が複数検出された。未知の DNA 付加体のうち、MS/MS フラグメント解析を行うことで、検出された未知の DNA 付加体がジクロロメタンに由来する DNA 付加体であることが示唆された。このように、*in vitro* 系での既知および未知付加体の解析により、職業性胆管癌の原因候補物質である八口ゲン系炭化水素への曝露状況の把握が可能になることが期待された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1). Kato T, Totsuka Y, Ishino K, Matsumoto Y, Tada Y, Nakae D, Goto S, Masuda S, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Matsuda T, Watanabe M, Wakabayashi K. Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both *in vitro* and *in vivo* assay system. *Nanotoxicology*, 2013 7: 452-61.

2). Nakano T, Matsushima-Hibiya Y, Yamamoto M,

Takahashi-Nakaguchi A, Fukuda H, Ono M, Takamura-Enya T, Kinashi H, Totsuka Y. ADP-ribosylation of guanosine by SCO5461 protein secreted from *Streptomyces coelicolor*, *Toxicon* 2012, *in press*.

3). Ishino K, Mutoh M, Totsuka Y, Nakagama H. Metabolic syndrome: A novel high-risk state for colorectal cancer. *Cancer Lett*, 2012, *in press*.

4). Lin Y, Totsuka Y, He Y, Kikuchi S, Qiao Y, Ueda J, Wei W, Inoue M, Tanaka H. Comparative epidemiology of esophageal cancer between Japan and China. *J Epidemiol*. 2012, *in press*.

5). Matsubara S, Takasu S, Tsukamoto T, Mutoh M, Masuda S, Sugimura T, Wakabayashi K, Totsuka Y. Induction of Glandular Stomach Cancers in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian Gerbils by 1-Nitrosoindole-3-acetonitrile. *Int J Cancer*, 130: 259-266, 2012.

2. 学会発表

1). Totsuka Y, Kato T, Ishino K, Nakae D, Tada Y, Oyama K, Ogata A, Kawanishi M, Yagi T, Watanabe M, Wakabayashi K, Nakagama H: Genotoxicity induced by nanomaterials, The 6th International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations (ドーハ、カタール、26-29, March, 2012).

2). 戸塚ゆ加里、石野孔祐、若林敬二、渡辺哲志、中釜 斉；メイラード反応生成物、アミノベンゾアゼピノキノリノン(ABAQ)の *in vivo* 変異原性と生体内における生成、第 71 回日本癌学会学術総会(札幌、9月 19- 21日)

3). 石野孔祐、戸塚ゆ加里、武藤倫弘、中釜 斉；ヒト白血球を用いた肥満関連 DNA 付加体の網羅的解析、第 71 回日本癌学会学術総会(札幌、9月 19- 21日)

4). Ishino K, Sekine A, Goto S, Nakagama H, Totsuka Y；Analysis of DNA damage induced by nanomaterials using comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis), 3rd Asian Conference on environmental mutagens (杭州、中国、10月 23- 26日)

5). Totsuka Y, Ishino K, Wakabayashi K, Watanabe T, Masuda S, Nakagama H；In vivo mutagenicity and formation of a Maillard reaction product, aminobenzoazepinoquinoline derivative (ABAQ), (杭州、中国、10月 23- 26日)

6). 戸塚ゆ加里；ナノマテリアルの遺伝毒性発言メカニズム、第 41 回大会 日本環境変異原学会(静岡、11月 29- 30日)

7). 戸塚ゆ加里、石野孔祐、松島芳隆、中釜 斉；ハロゲン系炭化水素由来の DNA 付加体の解析、第 41 回大会 日本環境変異原学会(静岡、11月 29- 30日)

8). 石野孔祐、関根彬弘、後藤純雄、中釜 斉、戸塚ゆ加里；DNA 付加体の網羅的解析による新規付加体の探索、第 41 回大会 日本環境変異原学会(静岡、1

1月 29- 30日)

9). 堺澤絢、後藤純雄、若林敬二、渡辺徹志、中釜 斉、戸塚ゆ加里；トリプトファンとグルコースのメイラード反応生成物アミノベンゾアゼピノキノリノン誘導体の *in vivo* 変異原性、第 41 回大会 日本環境変異原学会(静岡、11月 29- 30日)

10). 大野絢、中野毅、中釜 斉、松島芳隆、布柴達男、戸塚ゆ加里；ゲノム中に存在する DNA 付加体の免疫沈降法を用いた濃縮法、第 41 回大会 日本環境変異原学会(静岡、11月 29- 30日)

11). 関根彬弘、石野孔祐、後藤純雄、中釜 斉、戸塚ゆ加里；マグネタイト(MGT)により誘発される DNA 付加体のアダクトーム解析、第 41 回大会 日本環境変異原学会(静岡、11月 29- 30日)

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。