

## 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

研究分担者 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

既存の *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 GSCH<sub>2</sub>-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ゾル、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、GSCH<sub>2</sub>-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、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。次に、マウスを用いた *in vivo* モデルにおける DNA 付加体の生成を、LC-MS を用いたアダクトーム解析(付加体の網羅的解析)により検討した。DCM 及び DCP を 500ppm で連続 3 日間投与したマウスの肝臓から抽出した DNA を用いてアダクトーム解析を行なったところ、DCM 及び DCP 投与群における総付加体数は溶媒対照群に比べて顕著に増加していることがわかった。しかしながら、DCM の既知付加体である GSCH<sub>2</sub>-DNA や、DCP 由来と推定される DNA 付加体は検出されなかった。これら付加体の PCA(主成分解析)の結果、DCM 及び DCP 投与との相関が強い付加体がそれぞれ 4 種及び 1 3 種スクリーニングされた。更に、そのうちの多くの付加体は、炎症及び酸化ストレスに由来する付加体であることを、DNA 付加体データベースを用い、m/z 値を比較する事により推測した。このことから、これら被検物質の投与で、マウス肝臓に炎症及び酸化ストレスが誘発されていたことが示唆された。これら被検物質に由来するバイオマーカーの探索の為に、投与量等を工夫し、炎症等を押さえた条件下で行なう事が必要であると考えられた。このような付加体の網羅的解析により、バイオマーカーを見出すことが出来れば、DCM 及び DCP のヒト胆管癌発症との関係が明らかになることが期待される。

### 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、ヒトが曝露す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管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、これらヒト胆管がんの発生とジクロロメタン(DCM)、1,2-ジクロロプロパン(DCP)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* 及び *in vivo* 実験系を用いて試みた。

### B . 研究方法

#### 1. *in vitro* 反応

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。

## 2. *in vivo* 反応

DCM 及び DCP のバイオマーカー探索のため、雄性 B6C3F1 マウス(8 週齢)に DCM 及び DCP を 500 ppm の濃度で 3 回連続胃内強制投与を行い、肝臓 DNA 中のバイオマーカーとなり得る DNA 付加体を 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。

実験方法を以下に示す。

- 1) マウスへの被検物質投与と DNA 調整  
雄性 B6C3F1 マウス(8 週齢)に DCM を 500 ppm の濃度で 3 回連続胃内強制投与を行なった。コントロール及び被検物質投与同鶏物の肝臓から DNA を抽出した後、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) 得られたデータを主成分 (PCA) 解析により解析し、バイオマーカー探索を実施した。

(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

### 1. *in vitro* 反応

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 GSCH<sub>2</sub>-DNA 付加体 (GSCH<sub>2</sub>-dG, GSCH<sub>2</sub>-dC, GSCH<sub>2</sub>-dA, GSCH<sub>2</sub>-dT) の生成について調べたところ、GSCH<sub>2</sub>-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 GSCH<sub>2</sub>-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 GSCH<sub>2</sub>-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 GSCH<sub>2</sub>OAc 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、GSCH<sub>2</sub>-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、GSCH<sub>2</sub>-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。

### 2. *in vivo* 反応

DCM 及び DCP を投与したマウス肝臓 DNA のアダクトーム解析を行なった結果を図 1 に示す。溶媒対象と比較し、複数の付加体スポットが DCM 及び DCP の投与により観察されることがわかった。しかしながら、DCM の既知付加体である GSCH<sub>2</sub>-DNA や、DCP 由来と推定される DNA 付加体は検出されなかった。更に、主成分 (PCA) 解析を行なったところ、DCM 投与では4種の付加体 (A1, A2, A3, A8) が、DCP 投与では13種の付加体がそれぞれの被検物質投与と相関することが示された。これら付加体の m/z 値を DNA 付加体データベースと比較したところ、そのうちの殆どが酸化ストレス及び炎症に関連する付加体と一致することが分かった(図 2 - 4)。

## D. 考察

本研究では、ヒト胆管がん発症との関係が疑われている DCM 及び DCP のバイオマーカーを探索することを目的として、*in vitro* 反応による DNA 付加体の解析及びマウスを用いた *in vivo* モデルにおける DNA 付加体の生成を、LC-MS を用いたアダクトーム解析により検討した。その結果、*in vitro* 反応では既報の GSCH<sub>2</sub>-dG に加え幾つかの DNA 付加体が観察された。一方、*in vivo* 反応では、DCM

及びDCPに由来する付加体は観察されず、酸化ストレスや炎症に関連した付加体が多く観察された。このことから、これら被検物質の投与で、マウス肝臓に炎症及び酸化ストレスが誘発されていたことが示唆された。これら被検物質に由来するバイオマーカーの探索の為に、投与量等を工夫し、炎症等を押さえた条件下で行なう事が必要であると考えられた。

図1 GSCH<sub>2</sub>OAcとdG反応液のDNAアダクトーム解析

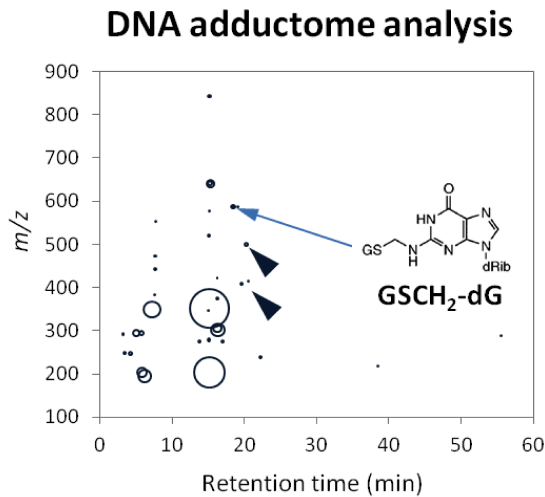


図2 DCM及びDCP投与マウス肝臓におけるDNA付加体の網羅的解析

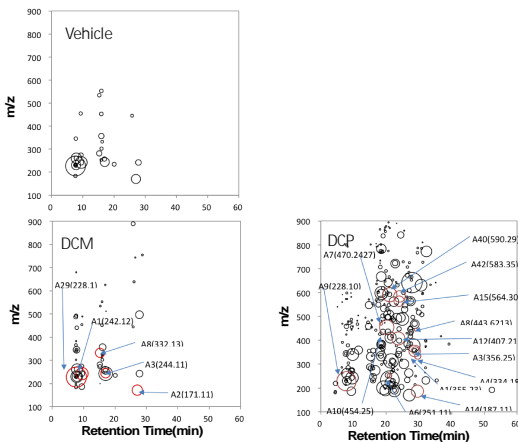


図3 主成分(PCA)解析によるDCM投与に特徴的な付加体の抽出

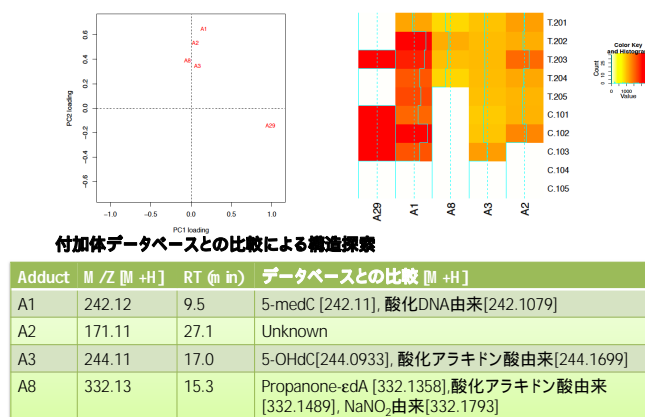
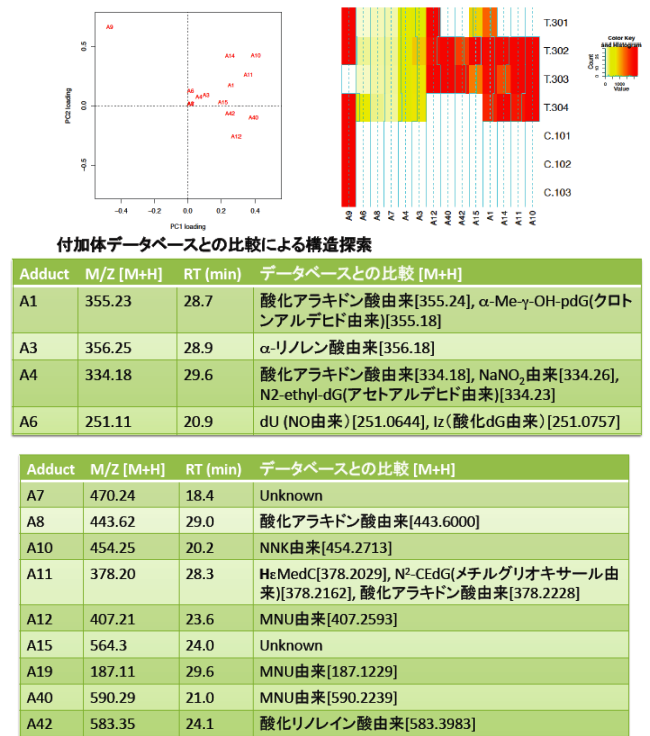


図4

主成分(PCA)解析によるDCP投与に特徴的な付加体の抽出



## E. 結論

ヒト胆管がん発症との関係が疑われている DCM 及び DCP のバイオマーカーを探索することを目的として、GSCH<sub>2</sub>OAc 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、GSCH<sub>2</sub>-dG に加え、未知の DNA 付加体が複数検出された。更に、マウスを用いた in vivo モデルにおける DNA 付加体の生成を、LC-MS を用いたアダクトーム解析により検討した。その結果、DCM 及び DCP に由来する付加体は観察されず、酸化ストレスや炎症に関連した付加体が多く観察された。このことから、これら被検物質の投与で、マウス肝臓に炎症及び酸化ストレスが誘発されていたことが示唆された。今後は、投与量等を工夫し、炎症等を押さえた条件下で行なう事が必要であると考えられた。このような付加体の網羅的解析により、バイオマーカーを見出すことが出来れば、職業性胆管癌の原因候補物質であるハロゲン系炭化水素への曝露状況の把握が可能となり、DCM 及び DCP の胆管癌発症との関係が明らかになると期待される。

## F. 健康危険情報

特になし。  
(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kato T, Totsuka Y, Hasei T, Watanabe T, Wakabayashi K, Kinai N, Masuda S, In vivo examination of the genotoxicity of the urban air and surface soil pollutant, 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene, with intraperitoneal and intratracheal administration. Environ., Toxicol., 2013, 28:588-94
2. 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. 2013, 23:233-42.
3. 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 systems. Nanotoxicology, 2013 7: 452-61
4. Kawanishi M, Ogo S, Ikemoto M, Totsuka Y, Ishino K, Wakabayashi K, Yagi T. Genotoxicity and reactive oxygen species production induced by magnetite nanoparticles in mammalian cells. J Toxicol Sci. 2013;38(3):503-511.
5. Watanabe M, Yoneda M, Morohashi A, Hori Y, Okamoto D, Sato A, Kurioka D, Nittami T, Hirokawa Y, Shiraishi T, Kawai K, Kasai H, Totsuka Y. Effects of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Magnetic Nanoparticles on A549 Cells. Int J Mol Sci. 2013, 14:15546-60.

### 2. 学会発表

1. 石野孔祐、戸塚ゆ加里、松島芳隆、鰐淵英機、魏民、山野莊太郎、中森正二、柴田龍弘、土原一哉、落合淳志、中釜 斉；職業性胆管がんの原因候補物質であるハロゲン系炭化水素由来の DNA 付加体及び変異原性の解析、第 72 回日本癌学会学術総会（横浜、H25 年 10 月 3 - 5 日）
2. 中釜 斉、戸塚ゆ加里、三牧幸代、中森正二、鈴木 穰、柴田龍弘、落合淳志、土原一哉；1,2-DCP, DCM 曝露歴のある印刷工胆管癌に認められた高頻度ゲノム変異、第 72 回日本癌学会学術総会（横浜、H25 年 10 月 3 - 5 日）

3. 戸塚ゆ加里、石野孔祐、中江 大、渡辺昌俊、若林敬二、中釜 斉；マグネタイトナノ粒子は炎症反応を介してマウス肺に遺伝毒性を誘発する、第 72 回日本癌学会学術総会（横浜、H25 年 10 月 3 - 5 日）
4. Totsuka Y, Tada Y, Nakae D, Watanabe M, Wakabayashi K.; Mechanisms of genotoxicity in the lungs by nanomaterials, 11<sup>th</sup> ICEM (ブラジル、H25 年 11 月 3 - 8 日)
5. Totsuka Y, Tada Y, Nakae D, Watanabe M, Wakabayashi K.; Magnetite nanoparticles induce genotoxicity in the lung of mice via inflammatory response, NanOEI (名古屋、H25 年 10 月 28 - 31 日)
6. 後藤 正憲、松島 芳隆、中釜 斉、戸塚 ゆ加里；ジクロロメタン由来の DNA 付加体を含むシャトルプラスミドを用いたヒト細胞内変異原性試験、第 42 回日本環境変異原学会（岡山、H25 年 11 月 29 - 30 日）
7. 馬場 明、後藤純雄、松島芳隆、中釜 斉、戸塚 ゆ加里；職業性胆管癌の候補物質、ジクロロメタン及び 1,2-ジクロロプロパンの変異原性及び変異スペクトラムの解析、第 42 回日本環境変異原学会（岡山、H25 年 11 月 29 - 30 日）
8. 辻田俊寛、石野孔祐、加藤 護、柴田龍弘、後藤純雄、魏民、松島芳隆、中釜 斉、戸塚ゆ加里；職業性胆管がん発生に關与するハロゲン系炭化水素の DNA 付加体の網羅的な解析（アダクトーム解析）第 42 回日本環境変異原学会（岡山、H25 年 11 月 29 - 30 日）  
（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

## H. 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。