

研究課題名：食品添加物等における遺伝毒性評価のための戦略構築に関する研究

分担研究課題名：食品添加物における遺伝毒性発がん物質の評価法に関する研究

分担研究者： 續 輝久 九州大学大学院医学研究院基礎医学部門
生体制御学講座 基礎放射線医学（分子遺伝学）分野 教授

研究要旨

食品添加物等の遺伝毒性に対する閾値形成機構について検討するために、低用量臭素酸カリウムを経口投与して発がん実験を行い、*Mutyh* 遺伝子欠損マウスへ臭素酸カリウムを投与する発がん・突然変異誘発の実験系は、遺伝毒性に対する閾値形成機構について検討する上で、有用な評価系であることが示された。昨年度に引き続き、*Mutyh* 遺伝子が欠損した個体でも酸化剤の発がん性に関して「閾値」が存在することを示唆する結果を得た。さらに「閾値」周辺の低用量臭素酸カリウムによる誘発突然変異の解析を行った結果、酸化剤の突然変異誘発に関しても「閾値」が存在することを示唆する結果を得た。

キーワード: 臭素酸カリウム、*Mutyh* 遺伝子、*rpsL* トランスジェニックマウス

A . 研究目的

遺伝毒性物質の作用には一般に閾値がないとされており、どのように微量であってもヒトに対してリスクを示すと考えられている。このため遺伝毒性を示す発がん物質には ADI（Acceptable Daily Intake）が設定されず、食品添加物等に発がん性が認められた場合、その発生機序に遺伝毒性が関与するかは、行政上重要な問題になっている。だが、ヒトにはさまざまな生体防御機能（DNA 修復、解毒代謝、損傷乗り越え DNA 合成、アポトーシスなど）が備わっており、ある限度（閾値）以下の作用は、事実上無毒化される可能性が考えられる。

生命にとって必須の酸素は、エネルギー産生系で利用される際に活性酸素種の生成を伴い、遺伝情報を司る DNA、RNA 並びにそれらの前駆体を

酸化する。これら内在性の酸素ストレスに加え、環境中の放射線や遺伝毒性を示すある種の化学物質、さらには感染に伴う炎症によっても活性酸素種が生じている。活性酸素種は生体高分子を酸化し、発がんや老化を引き起こす。様々な酸化的損傷の中で、核酸のグアニン塩基の酸化体 8-オキソグアニン（8-oxoG）は遺伝情報保持及び伝達に異常を引き起こす点で最も重要である。8-oxoG はシトシンと同程度にアデニンとも対合できるので、DNA 中の 8-oxoG は突然変異の原因となる。8-oxoG による突然変異生成に対処するために生物は種々の酵素系を持っている。ヒトでは、OGG1 が DNA 中の 8-oxoG を取り除き、MUTYH が 8-oxoG に対して取り込まれたアデニンを除去する。また MTH1 はヌクレオチドプール中に生じた 8-oxo-dGTP を分解し、DNA 複製の際に

8-oxoG が DNA へ取り込まれるのを防いでいる。我々はこれらの酵素の遺伝子を欠損したマウスを樹立し、これらのマウスでは自然発がんが上昇していることを示し、酸化 DNA 損傷が自然発がんの要因であることを明らかにしてきた。さらに *MutYh* 遺伝子欠損マウスに酸化剤である臭素酸カリウムの 0.2% 溶液を経口投与すると、野生型マウスと比較すると突然変異および発がん頻度が劇的に上昇することを見出し、*MutYh* 遺伝子が酸化による遺伝毒性に対する閾値形成に關与している可能性を指摘した。一方、低用量 (0.05%) 臭素酸カリウムを経口投与した場合には発がん頻度の有意な上昇は認められず、*MutYh* 遺伝子が欠損した個体でも遺伝毒性に対する閾値が形成されている可能性を見出した。

本年度は、この実験系を用いて遺伝毒性に対する閾値形成機構についてさらに検討するために、比較的低用量域 (0.05-0.15%) の臭素酸カリウムを経口投与して発がん実験を行うと共に、*rpsL*-トランスジェニック (Tg) マウスを用いて突然変異解析を実施した。

B . 研究方法

1) *MutYh* 遺伝子欠損マウスの飼養

C57BL6/J の遺伝的背景を持つ *MutYh* 遺伝子欠損マウスのヘテロ接合体同士の掛け合わせにより *MutYh* 遺伝子欠損マウスと対照群の野生型マウスを得た。また、*rpsL*-Tg マウスとの交配を行い、*MutYh* 遺伝子欠損 / *rpsL*-Tg マウスと対照群の野生型 / *rpsL*-Tg マウスを得た。マウスの飼養については、九州大学遺伝子組換え実験安全管理規則並びに動物実験規則に従って実施した。

2) 臭素酸カリウム溶液の投与

臭素酸カリウム (Sigma-Aldrich) を純水に溶解し、0.05~0.15% 溶液を調製後に濾過滅菌し、マウスの飲料水とした。投与方法としては、発がん解析には 16 週間、突然変異の解析には 4 週間自由飲水で行い、消費量については週一回モニターした。

3) 発がん実験

6 週齢の野生型および *MutYh* 遺伝子欠損マウスに臭素酸カリウムを 16 週間投与した後、安楽死させたマウスから腸管を摘出して 4% パラフォルムアルデヒドを用いて固定した。その後、固定液を 70% エタノールに置換えて、腸粘膜を実体顕微鏡下で観察し、腫瘍の形成を確認した。

4) 突然変異解析

4 週齢の *rpsL*-Tg を持つ野生型および *MutYh* 遺伝子欠損マウスに臭素酸カリウムを 4 週間投与後、通常の飲み水に切り替えてさらに 2 週間飼養した後、安楽死させたマウスから摘出した腸管から DNA を抽出し、*rpsL* 遺伝子突然変異解析法に従い、誘発突然変異の解析を行った。

5) 統計的手法

すべての測定値について平均値と標準偏差を求めた。

C . 研究結果

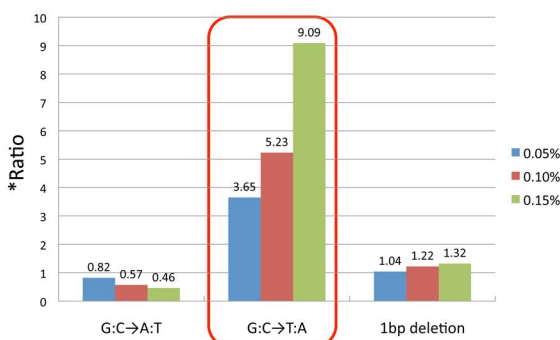
1) 臭素酸カリウム誘発消化管発がん

これまでの *MutYh* 遺伝子欠損マウスを用いた 0.2% 臭素酸カリウム溶液を 16 週間連続飲水投与した誘発消化管発がん実験では、*MutYh* 遺伝子欠損マウスの十二指腸・空腸で多数の上皮性腫瘍の発生を認めた。一方、低用量の 0.05% 臭素酸カリウムを経口投与して発がん実験を行った結果、0.05% 臭素酸カリウムの投与では *MutYh* 遺伝子欠損マウスの十二指腸・空腸には上皮性腫瘍を発生させなかった。

昨年度に引き続き、遺伝毒性に対する閾値形成について詳細に検討するため、マウスを追加して 0.05~0.15% 臭素酸カリウムを経口投与して発がん実験を行った。これまでと同様に、0.10~0.20% 臭素酸カリウム溶液の用量では、*MutYh* 遺伝子欠損マウスの十二指腸・空腸でそれぞれ、用量依存的に上皮性腫瘍の発生を認めが、0.05% 投与群では発がんは認められなかった。

2) 臭素酸カリウム誘発突然変異

上述のように *Mut*h 遺伝子が欠損した個体でも酸化剤臭素酸カリウムによる発がん性に関して「閾値」が存在することを示唆する結果を得た。この実験系における遺伝毒性に対する閾値形成機構についてさらに検討するために、「閾値」周辺の低用量臭素酸カリウムによる誘発突然変異の解析を行った。0.10%および0.15%投与群を用いた突然変異解析の結果では、野生型マウスに比べて *Mut*h 遺伝子欠損マウスでは全体の突然変異頻度がそれぞれ約 1.5 倍および 1.8 倍上昇していた。一方、0.05%投与群の *Mut*h 遺伝子欠損マウスの突然変異は、野生型マウスの突然変異頻度とほぼ同程度 (0.94 倍) であった。8-oxoG に起因すると考えられる G:C→T:A 型の変異頻度を *Mut*h 遺伝子欠損マウスと野生型マウスで比較すると、0.10%投与群では約 5.2 倍、0.15%投与群では約 9.1 倍上昇していたが、0.05%投与群では非投与群における比率 (約 3.3 倍) と同程度の約 3.7 倍しか上昇していなかった (図 1)。



* 野生型マウス突然変異頻度に対する *Mut*h 遺伝子欠損マウス突然変異頻度の比

図 1 野生型および *Mut*h 遺伝子欠損マウスの小腸における KBrO_3 誘発突然変異のスペクトル別の比

D. 考 察

遺伝毒性物質の作用には閾値がないとされるため、遺伝毒性に基づく発がん作用が検出された場合には、食品添加物等には ADI が設定されない。しかし、遺伝毒性発がん物質であっても「事実上の閾値」(それ以下では有意な発がん頻度の上昇が見られない用量) のあることが示唆されている

(Carcinogenesis, 26, 1835-1845, 2005) ヒトにはさまざまな生体防御機構 (DNA 修復、解毒代謝、誤りのない損傷乗り越え DNA 合成、アポトーシス等) が存在し、これらが遺伝毒性発がん物質の作用を抑制し「事実上の閾値」を形成する可能性が考えられる。本研究では、酸化 DNA 損傷に起因する突然変異を抑制する *Mut*h 遺伝子を欠損したマウスを用い、パンの製造過程でも使用され酸化ストレスを負荷することが知られている食品添加物の臭素酸カリウムを投与する実験を行い、DNA 修復が遺伝毒性に関する「事実上の閾値」形成に貢献する可能性について検討するための試験系の樹立をめざした。

*Mut*h 遺伝子欠損マウスを用いた臭素酸カリウム溶液投与による誘発消化管発がん実験の結果、0.1%~0.2%臭素酸カリウムを投与された *Mut*h 遺伝子欠損マウス群では 1 個体当たりの小腸発がんの発生数は投与された臭素酸カリウムの濃度に相関して増加したが、0.05%臭素酸カリウム投与群の *Mut*h 遺伝子欠損マウスでは追加実験分も含めて全く腫瘍の発生が認められなかった。これらの結果は、臭素酸カリウムによる消化管発がんには閾値が存在し、その形成に *Mut*h 遺伝子が関与していることを示している。また、*Mut*h 遺伝子が欠損した個体においても臭素酸カリウムの発がん性に関して「閾値」が存在することを示している。

臭素酸カリウムによる誘発突然変異解析の結果、*Mut*h 遺伝子欠損マウスでは酸化 DNA 損傷に起因する G:C→T:A 型の変異頻度が野生型マウスと比較して、非投与群では 3.3 倍、0.05%では 3.7 倍、0.10%では 5.2 倍、0.15%では 9.1 倍、0.20%では 11.8 倍上昇する。この G:C→T:A 型変異の誘発頻度の上昇は、臭素酸カリウムによる小腸発がん頻度の上昇と良く一致していることから、臭素酸カリウムによる消化管発がんにみられる閾値の形成には、酸化 DNA 損傷に起因する突然変異の発生を効率良く抑制する *Mut*h 遺伝子がコードするアデニン DNA グリコシラーゼの機能が関与していることを示唆している。

酸化ストレスによって自然発がんが生じることは既に複数の DNA 修復系の遺伝子改変マウスを用いて明らかになっている。*Mut* 遺伝子欠損マウスはヒトの遺伝性大腸がん (MAP: MUTYH-associated polyposis) の疾患モデルであり、消化管における自然発がんの発生頻度が野生型マウスに比して有意に上昇している。このように *Mut* 遺伝子の欠損という酸化ストレス誘発発がんにも最も感受性が高いマウス個体を用いて発がん感受性や遺伝毒性に関する研究を行うことで、遺伝毒性に対する *Mut* 遺伝子産物以外の多重の防御機構の寄与を明らかにすることが可能となる。すなわち、食品添加物として使用されている化学物質臭素酸カリウムの低用量に起因する酸化ストレスによる消化管発がんを、他の修復系や DNA 損傷応答系等でどの程度まで抑制できるのかを明らかにできると考えられる。今回の低用量 (0.05%) 臭素酸カリウム投与群における発がん性および突然変異誘発に関する研究成果は、このことを強く示唆している。

E. 結論

Mut 遺伝子マウスへ臭素酸カリウムを投与する発がん実験系は、遺伝毒性に対する閾値形成機構について検討する上で有用な試験系であると考えられる。また、*Mut* 遺伝子産物は酸化剤の遺伝毒性に関する「事実上の閾値」形成に貢献していると示唆される。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

[学術雑誌]

1. Piao, J., Nakatsu, Y., Ohno, M., Taguchi, K. and Tsuzuki, T., Mismatch repair deficient mice show susceptibility to oxidative stress-induced intestinal carcinogenesis.

Int. J. Biol. Sci., 10 (1): 73-79 (2014) [査読有]

2. Takahashi-Yanaga, F., Yoshihara, T., Jingushi, K., Igawa, K., Tomooka, K., Watanabe, Y., Morimoto, S., Nakatsu, Y., Tsuzuki, T., Nakabeppu, Y. and Sasaguri, T., DIF-1 inhibits tumor growth *in vivo* reducing phosphorylation of GSK-3b and expressions of cyclin D1 and TCF7L2 in cancer model mice, Biochem. Pharmacol., 89, 340-348 (2014) [査読有]
3. Ohno, M., Sakumi, K., Fukumura, R., Furuichi, M., Iwasaki, Y., Hokama, M., Ikemura, T., Tsuzuki, T., Gondo, Y. and Nakabeppu, Y., 8-Oxoguanine causes spontaneous *de novo* germline mutations in mice, Scientific Reports, 4:4689 DOI: 10.1038/srep04689 (2014) [査読有]
4. Isoda, T., Nakatsu, Y., Yamauchi, K., Piao, J., Yao, T., Honda, H., Nakabeppu, Y., Tsuzuki, T., Abnormality in Wnt signaling is causatively associated with oxidative stress-induced intestinal tumorigenesis in MUTYH-null mice, Int. J. Biol. Sci., 10 (8), 940-947 (2014) [査読有]
5. Kyuragi, R., Matsumoto, T., Harada, Y., Saito, S., Onimaru, M., Nakatsu, Y., Tsuzuki, T., Nomura, M., Yonemitsu, Y., Maehara, Y., BubR1 insufficiency inhibits neointimal hyperplasia through impaired vascular smooth muscle cell proliferation in mice, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 35, 341-347 (2015) [査読有]
6. Kanao, R., Yokoi, M., Ohkumo, T., Sakurai, Y., Dotsu, K., Kura, S., Nakatsu, Y., Tsuzuki, T., Masutani, C., Hanaoka, F., UV-induced mutations in epidermal cells of mice defective in DNA polymerase β and/or γ DNA Repair, in press (2015) [査読有]

学会発表

1. 2014年12月10日 Teruhisa Tsuzuki, Mizuki Ohno, Noriko Takano, Kenichi Taguchi, Yusaku Nakabeppu, Yasunobu Aoki, Takehiko Nohmi, Yoshimichi Nakatsu [Oxidative stress-induced intestinal tumors in *Mutyh*-deficient mice treated with low doses of potassium bromate] 4th Asian Conference on Environmental Mutagen, Kolkata, India [12月10日~12日] 招待講演(旅費等は新学術領域研究の方から支出)
2. 2014年12月5日、*Mutyh* 遺伝子欠損マウスにおける酸化ストレス誘発突然変異の解析、鷹野典子、大野みずき、稲葉洋平、志村勉、櫻田尚樹、中別府雄作、中津可道、續輝久 [Oxidative DNA damage-induced mutagenesis in *Mutyh*-deficient mice, Noriko Takano, Mizuki Ohno, Yohei Inaba, Tsutomu Shimura, Naoki Kunugida, Yusaku Nakabeppu, Yoshimichi Nakatsu, Teruhisa Tsuzuki] 日本環境変異原学会第43回大会、東京 [12月4日~5日]
3. 2014年12月5日、*Mutyh* 遺伝子欠損マウスを用いた酸化ストレス誘発消化管がんの解析、大野みずき、鷹野典子、佐々木史子、田口健一、中別府雄作、青木康展、能美健彦、中津可道、續輝久 [Oxidative stress-induced intestinal tumors in *Mutyh* deficient mice, Mizuki Ohno, Noriko Takano, Fumiko Sasaki, Kenichi Taguchi, Yusaku Nakabeppu, Yasunobu Aoki, Takehiko Nohmi, Yoshimichi Nakatsu, Teruhisa Tsuzuki] 日本環境変異原学会第43回大会、東京 [12月4日~5日]
4. 2014年11月26日、非標的部位におけるミスマッチの配列変換(遺伝子修復)への影響、西垣奈津希、池田彰弘、湯川誠也、守田由子、中津可道、續輝久、原島秀吉、紙谷浩之、日本分子生物学会第37回年会、横浜 [11月25日~27日]
5. 2014年11月25日、*Mutyh* 遺伝子欠損マウスにおける酸化ストレス誘発突然変異の解析、鷹野典子、大野みずき、稲葉洋平、志村勉、櫻田尚樹、中別府雄作、中津可道、續輝久、日本分子生物学会第37回年会、横浜 [11月25日~27日]
6. 2014年11月25日、8-oxoguanine に起因する *de novo* germline mutation の解析、作見邦彦、大野みずき、福村龍太郎、榎藤洋一、岩崎裕貴、池村淑道、續輝久、中別府作、日本分子生物学会第37回年会、ワークショップ：生命の起源・進化・本質、横浜 [11月25日~27日]
7. 2014年10月29日、Oxidative stress-induced intestinal tumors in *Mutyh*-deficient mice treated with low doses of potassium bromate、Teruhisa Tsuzuki, Mizuki Ohno, Noriko Takan¹, Kenichi Taguchi, Yusaku Nakabeppu, Yasunobu Aoki, Takehiko Nohmi, Yoshimichi Nakatsu, 5th US-Japan DNA Repair Meeting, Grand XIV Naruto, Tokushima [10月28日~31日] 招待講演
8. 2014年10月2日、酸化ストレス誘発突然変異と消化管がん解析、大野みずき、鷹野典子、佐々木史子、橋詰拓弥、李賛、田口健一、中別府雄作、中津可道、續輝久、日本放射線影響学会第57回大会、鹿児島 [10月1日~3日]
9. 2014年10月2日、ミスマッチ修復欠損マウスにおける酸化ストレス誘発突然変異の解析、橋詰拓弥、中津可道、大野みずき、佐々木史子、鷹野典子、續輝久、日本放射線影響学会第57回大会、鹿児島 [10月1日~3日]
10. 2014年10月1日、DNA修復欠損マウスを用いた発がん研究：低用量化学物質投与研究から見えること、續輝久、シンポジウム：低線量・低線量率放射線による発がんを考える、

日本放射線影響学会第57回大会 鹿児島 [10月1日～3日]

11. 2014年9月27日、Oxidative stress-induced mutagenesis and tumorigenesis in the small intestine of *Mutyh*-deficient mice treated with low doses of potassium bromate、Mizuki Ohno, Noriko Takano, Yoshimichi Nakatsu, Yusaku Nakabeppu, Teruhisa Tsuzuki [低用量臭素酸カリウムの飲水投与により*Mutyh*遺伝子欠損マウスの消化管で誘発された突然変異並びに発がんの解析、大野みずき、鷹野典子、中津可道、中別府雄作、續輝久]、日本癌学会第73回学術総会、横浜 [9月25日～27日]
12. 2014年9月27日、Microsatellite instability is induced by DNA replication stress in association with massive induction of mutations、Yuko Atsumi, Kotoe Katayama, Teppei Shimamura, Yoshimichi Nakatsu, Mitsuko Masutani, Satoru Miyano, Hitoshi Nakagama, Teruhisa Tsuzuki, Ken-ichi Yoshioka [マイクロサテライト不安定性は変異導入を伴ってDNA複製ストレス下で誘導される、熱海悠子、片山琴絵、島村徹平、中津可道、益谷美都子、宮野悟、中釜斉、續輝久、吉岡研一]、日本癌学会第73回学術総会、横浜 [9月25日～27日]
13. 2014年9月26日、DIF-1 inhibits tumor growth in vivo reducing phosphorylation of GSK-3 β and expressions of cyclin D1 and TCF7L2、Fumi Takahashi, Yoshimichi Nakatsu, Teruhisa Tsuzuki, Yusaku Nakabeppu, Toshiyuki Sasaguri [DIF-1はGSK-3 β のリン酸化抑制とcyclin D1およびTCF7L2の発現低下により抗腫瘍効果を発揮する、高橋富美、中津可道、續輝久、中別府雄作、笹栗俊之]、日本癌学会第73回学術総会、横浜 [9月25日～27日]
14. 2014年9月17日、DNA酸化損傷修復欠損マウスの継代実験で捉えられた遺伝現象、作

見邦彦、大野みずき、福村龍太郎、権藤洋一、岩崎裕貴、池村淑道、續輝久、中別府雄作、日本遺伝学会第86回大会、長浜市 [9月17～19日]

15. 2014年9月17日、*Mutyh*欠損マウスにおける酸化ストレス誘発発がんおよび突然変異の解析、鷹野典子、大野みずき、中別府雄作、中津可道、續輝久、日本遺伝学会第86回大会、長浜市 [9月17～19日]

G. 知的所有権の取得状況

特になし