

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・予防研究分野 ユニット長

研究要旨

我々は新規のヒト発がんリスク評価法として、DNA 付加体の網羅的解析手法(DNA アダクトーム法)の構築に取り組んできた。本年度は、遺伝毒性発がん物質である 2-Acetamidofluorene(AAF)及び N-Nitrosodiethylamine(DEN)の遺伝毒性の評価を、ラットを用いた *in vivo* モデルでの DNA 付加体の生成を指標とし、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。0.025% AAF 及び 0.001% DEN をラットに 4 週間投与し、肝臓に生成される DNA 付加体を網羅的に解析した。AAF は代謝活性化の後にデオキシグアノシンの C8 位または N2 位と結合し、DNA 付加体を生成することから、まずはこれら付加体の m/z 値を指標に AAF-dG 付加体の生成について調べてみた。その結果、AAF-dG に相当する m/z 値[M+H: 489.2]を示すシグナルが、AAF 投与群に多く検出された。DEN はデオキシグアノシンの O6 位へのメチル化(O^6 -MedG)がその主要な付加体であることから、AAF と同様についても調べてみたところ、 O^6 -MedG に相当する m/z 値[M+H: 298.1]を示すシグナルが、DEN 投与群に多く検出された。現在、これら投与化学物質に由来する付加体以外の付加体の生成に関して、アダクトーム法を用いて検索している。それぞれの化学物質に特徴的な付加体が検出された際には、これら付加体の構造解析を行うとともに、これら付加体をリスク評価に用いることの妥当性についても検討を行なう予定である。

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。これまで我々は、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てきた。また、昨年度は確立した LC-TOF-MS による DNA アダクトーム法を用いて、非遺伝毒性発がん物質のリスク評価をラットを用いた *in vivo* モデルでの DNA 付加体の生成を指標とし、DNA アダクトーム法で行う事の妥当性について検討した。今年度は、遺伝毒性発がん物質である 2-Acetamidofluorene(AAF) 及び N-Nitrosodiethylamine(DEN)の DNA 損傷性の評価を、ラットを用いた *in vivo* モデルでの DNA 付加体の生成を指標とし、LC-MS を用いたアダクトーム解析により検討した。

B . 研究方法

雄性 F344 ラット(各群それぞれ 5 匹)に 2-AAF を 0.02%の濃度で 4 週間混餌を行った。また、DEN は 0.001%の濃度で 4 週間飲水投与を行った。2 週間の休薬の後、

肝臓を摘出した。DNA を抽出後、各種ヌクレアーゼにより DNA をモノヌクレオシドに分解し、DNA 付加体を質量分析機器を用いて解析した。

得られたデータを主成分(PCA)解析により解析し、それぞれの化学物質投与に相関する付加体の抽出を実施した。今年度はまず、AAF 及び DEN に由来する既知付加体の生成について検討を行った。

(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

2-AAF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。主成分(PCA)解析を行なったところ、各投与群毎のクラスターに分類されることがわかった。2-AAFは代謝活性化の後にデオキシグアノシンのC8位またはN2位と結合し、DNA付加体を生成することから、まずはこれら付加体のm/z値を指標にAAF-dG付加体の生成について調べてみた。その結果、AAF-dGに相当するm/z値[M+H: 489.2]を示すシグナルが、AAF投与群に多く検出された(図 1)。一方、DENについても同様にアダクトーム解析を行った。結果を図 2 に示す。DENはデオキシグアノシンのO6位へのメチル化(O^6 -MedG)がその主要な付加体であることから、 O^6 -MedGに相当するm/z値[M+H: 298.1]を示すシグナルを探索したところ、該当するシグナルはDEN投与群に多く検出された(図 2)。現在、これら投与化学物質に由来する付加体以外

の付加体の生成に関して、アダクトーム法を用いて検索している。

図 1 2-AAF投与群及びDEN投与群のPCA解析結果

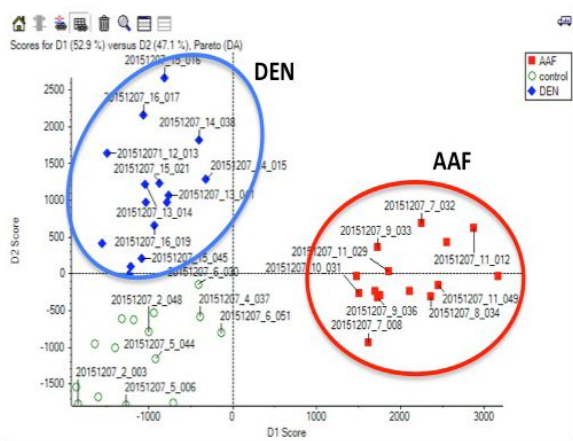


図 2 2-AAF由来の付加体(2-AAF-dG)の探索結果

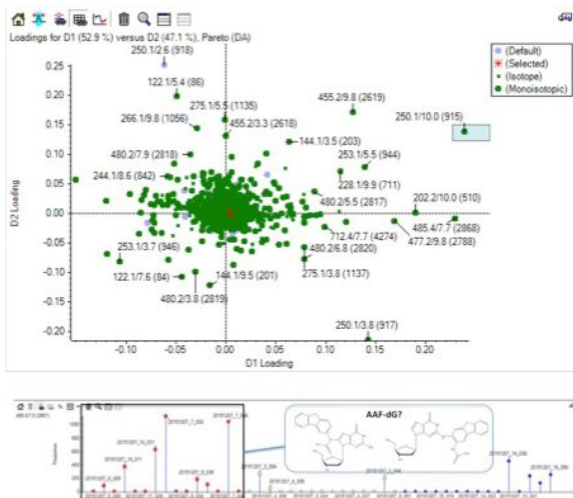
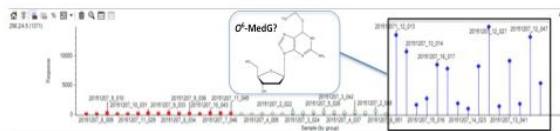
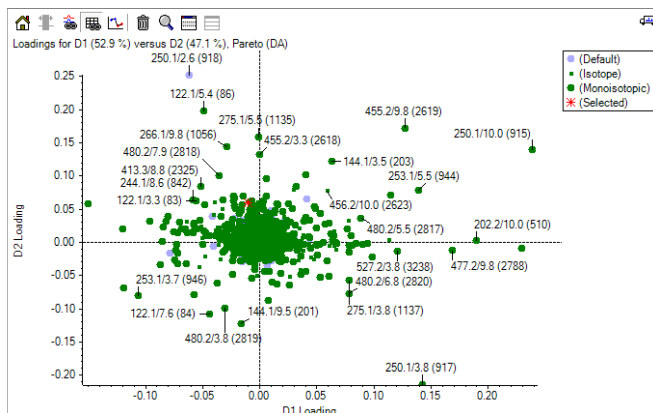


図 3 DEN由来の付加体(β -MedG)の探索結果



D. 考察

2-AAF及びDENを投与したラットの肝臓からDNAを抽出し、アダクトーム法を用いてDNA付加体の解析を行なった。主成分 (PCA) 解析を行なったところ、各投与群毎のクラスターに分類されることがわかった。このことから、2-AAF及びDEN投与によって生成される付加体はそれぞれ異なったものであることが示唆された。また、2-AAF及びDEN投与に相関する付加体として、それぞれの既知付加体であるdG-C8-AAFまたはdG-N2-AAF、 β -MedGの生成について確認した。dG-AAFまたは β -MedGに相当するm/z値を示すシグナルが、それら化学物質投与群で多く検出されていた。よって2-AAFおよびDEN投与により、ラット肝臓にこれら化学物質が運搬・分布され、DNA損傷が誘発されたことを確認することが可能となった。現在、これら付加体以外の生成に関して、アダクトーム法を用いて検索し、それら付加体の類似性や差異などについて検討する予定である。それぞれの化学物質に特徴的な付加体が発見された際には、これら付加体の構造解析を行うとともに、これら付加体をリスク評価に用いることの妥当性についても検討を行なう必要がある。更に、アダクトーム法の他の遺伝毒性及び非遺伝毒性発がん物質のリスク評価への応用についても検討を行なう必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Ishino K, Kato T, Kato M, Shibata T, Watanabe M, Wakabayashi K, Nakagama H, Totsuka Y. Comprehensive DNA adduct analysis reveals pulmonary inflammatory response contributes to genotoxic action of magnetite nanoparticles. *Int J Mol Sci*. 2015, Feb 4;16(2):3474-92.
- Komiya M, Fujii G, Miyamoto S, Takahashi M, Ishigamori R, Onuma W, Ishino K, Totsuka Y, Fujimoto K, Mutoh M. Suppressive effects of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on intestinal tumorigenesis in obese KK-Ay and Apc mutant Min mice. *Cancer Sci*. 2015 Aug 27.

2. 学会発表

- 戸塚ゆ加里, 中釜 斉: 質量分析機器を用いた DNA 付加体の網羅的解析による中国の食道癌発症要因の解明
第 4 2 回日本毒性学会学術大会. 2015 年 7 月
- Yukari Totsuka, Yingsong Lin, Mamoru Kato, Yasushi Totoki, Tatsuhiro Shibata, Yoshitaka Matsushima, Hitoshi Nakagama: Exploration of cancer etiology

using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis)第 74 回日本癌学会学術総会. 2015 年 10 月

3. 戸塚ゆ加里：ゲノム解析および DNA 付加体の網羅的解析による発がん要因の探索，第 44 回日本環境変異原学会．2015 年 12 月
4. 秋場 望、椎崎一宏、遠藤 治、三牧幸代、土原一哉、中釜 育、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に対するグルタチオン-S-転移酵素の影響、第 44 回日本環境変異原学会．2015 年 12 月

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