

化審法で規定された変異原性検出試験（チミジンキナーゼ試験）を改善する手法の開発

研究代表者 武田 俊一 京都大学・教授

研究要旨

化学物質審査規制法（化審法）は有害物質を規制する。変異原性（発がん性）は、化学物質が染色体DNAを損傷し、DNA損傷が不正確に修復されることによって起こる。DNA損傷は多種類ある。化審法で規定された変異原性検出試験は、2点の問題がある：感度と特異性が低い、変異原性のメカニズム（化学物質が作るDNA損傷の種類）を解析できない。問題を解決する為に、ヒトTK6細胞（OECDや化審法が変異原性検出試験に利用することが推奨）からDNA損傷修復酵素の遺伝子欠損細胞（DNA修復ミュータント）を作製・利用することを提案する。そして、化審法で規定されたバイオアッセイ（野生型のみを使う）に、DNA損傷修復欠損株も併用することを提案する。この併用試験では、野生型細胞を陰性対照として使う。例えば小核テストでは、DNA修復ミュータントで野生型細胞よりも多く小核が出現したとき、当該化学物質が変異原性陽性と判定する。我々が提案する手法は、従来の手法に比べて、感度と特異性の両方を改善できる。従来の変異原性検出試験は正常（野生型）細胞のみを利用したバイオアッセイであった。野生型細胞は迅速かつ正確にDNA損傷を修復できるが故に、変異原性検出の感度が低いのは当然である。我々は、感度を改善することを目指し、複数種類のDNA損傷修復酵素（例、XRCC1）の欠損株をヒトTK6細胞株から創った。XRCC1欠損TK6株を使い、典型的DNA損傷剤（電離放射線やアルキル化剤）の変異原性を小核テスト（化審法で規定）で解析したところ、検出感度が5-10倍程度上昇していた。我々が提案する手法では、DNA修復ミュータントが野生型細胞よりも多く小核を出現させた場合のみ変異原性陽性と判定する。すなわち、野生型を陰性対照におくことにより変異原性検出試験の特異性を改善できる。本研究は、我々が過去に小核テストで実施したこの研究手法を、化審法で利用が定められたもう1つの変異原性検出試験、チミジンキナーゼ（tk）試験に応用する。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

本間 正充・国立医薬品食品衛生研究所・部長

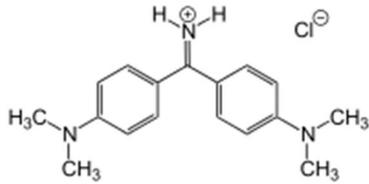
A. 研究目的

化学物質の毒性の中で最も重要なものは発がん性であり、発がんは主に変異原性による。化審法で規定された変異原性検出試験は、感度と特異性があまり高くない（*Mutat. Res.* 588: 47-57, 2005）。化審法で利用が定められた検出試験の1つ、チミジンキナーゼ（tk）試験とは、細胞を化学物質に曝露し、tk酵素をコードする遺伝子（TK遺伝子）を不活性化する変異が入る頻度を定量する、変異原性検出試験である。感度が高くない、転座・組換えを起こす変異原を事実上検出できないという弱点がある一方、特異性が高く、実験手法が簡単という長所がある。感度が高くない原因は、化審法で規定された変異原性検出試験が野生型細胞（DNA損傷・複製を正確かつ

迅速に修復できる）を使うからである。DNA修復・複製ミュータントのtk試験を併用するという最小限の変更によって、既存のtk試験の感度を向上する行政的必要性は高い。

我々の提案は、化審法で規定された変異原性検出試験、tk試験において、野生型細胞に加えDNA修復・複製ミュータントも併用し、変異原性の検出感度を改善することにある。併用により、過去のデータ（野生型細胞のみのtk試験の結果）と比較しながら、有害化学物質のより合理的な規制ができる。本研究の目的は、どのミュータントを併用すれば、tk試験の感度が最も改善するかを決定することにある。

DNA修復・複製ミュータントを併用する新しいtk試験は、その感度が従来のtk試験よりも改善することが期待できる。そこで、菌を使うエイムス試験では陽性を示すが、哺乳類細胞を用いるマウスリンフォーマ試験では陰性を示すような、従来、変異原性偽陽性と一応説明されてきた化学物質を、新しいtk試験を応用するモデル被験物質として選択する。この範疇に属する化学物質として、まずオーラミン（下に化学構造）を選択した。



オーラミンは、繊維製品、革製品、そして紙やインクの着色剤として利用されている色素である（図1）。世界のオーラミン年間売上高は、約1000トン（エチルオーラミンも含む）にのぼる（Gessner et al., Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 7th Ed., New York, John Wiley & Sons, Inc., 55pp）。オーラミンの製造工場において職業暴露が問題となり、労働者で膀胱がんが誘発した（Muller A, Z. Urol. Chir., 36, 202-219 (1933)）。

B. 研究方法

武田グループ

武田グループはDNA修復・複製TK6ミュータントの作製を担当する。Rad18とDNA polymerase (Pol)の欠損TK6細胞およびDNA polymerase 校正機能欠損TK6細胞(Pol)を作製する。さらにXPAとXRCC1の2重欠損TK6細胞を創る（それぞれの1重欠損は作製済み）。

以下に上記の各DNA修復・複製ミュータントを作製する理由を解説する。変異原性化学物質は、必ずDNA損傷を作り、その損傷が不正確にDNA修復・複製される時に損傷が変異に変換される。ゆえに損傷を正確にDNA修復・複製する経路を遺伝子破壊によって人工的に機能低下させてやれば、tk試験によって変異原性を検出する感度は高まる。塩基除去修復に機能するXRCC1とヌクレオチド除去修復に機能するXPAは、互いに独立して損傷塩基を正確に修復する。ユビキチン化酵素、Rad18とDNA polymerase (Pol)およびDNA polymerase (Pol)校正機能は、いずれも損傷した鋳型鎖をDNA合成酵素が正確に複製するのに貢献する。これらの遺伝子破壊細胞では、野生型TK6細胞に比べて、変異原性化学物質が変異を起こしやすくその変異がtk試験によって検出されやすくなる（感度が上がる）。

遺伝子破壊は、遺伝子破壊のための相同組換えプラスミド（+薬剤選択マーカー）とCRISPR/Cas9、ガイドRNAを同時にTK6細胞に導入した後、薬剤選択して出現したコロニーの中で両対立遺伝子ともに破壊されたクローンを選ぶ。予想された遺伝子破壊が起

こっていることは、RT-PCRおよびその産物の塩基配列決定により確認する。さらに候補クローンのDNA損傷剤に対する感受性を調べ、目的通りの遺伝子破壊が起こっていることを最終確認する。

本間グループ

本間は、野生型TK6細胞を使って実施する従来型tk試験に加えてDNA修復・複製TK6ミュータントも併用する新規tk試験を応用するモデル被験物質として、オーラミンを用いた。工業用グレードのオーラミンは、齧歯類で肝臓等に腫瘍を誘発させることから、IARCにおいてヒトに対して発がん性がある可能性があるグループ2Bと分類されている。エイムス試験でオーラミンの陽性結果は数多く存在するが、陽性を示す哺乳類細胞を用いる遺伝毒性試験の報告は非常に少ない。Amacherらの報告では、オーラミンはマウスリンフォーマ試験で代謝、非代謝活性化条件下ともに陰性である（Amacher et al., Mutat. Res. 72, 447-474 (1980)）。本間は、武田からXPA^{-/-}/XRCC1^{-/-}TK6細胞を既に譲渡された。そしてまずオーラミンに対する感受性を野生型とXPA^{-/-}/XRCC1^{-/-}の各TK6細胞の間で比較した。

（倫理面への配慮）

該当なし

C. 研究結果

武田グループ

（1）Rad18欠損TK6細胞（RAD18^{-/-}細胞）の作製とその表現型の確認

図1AはRAD18^{-/-}細胞の作製手法を示す。作製したRAD18^{-/-}細胞は予想通りにアルキル化剤（シスプラチン）に感受性を示すことを確認した（図1C）。

（2）Pol 欠損TK6細胞（POL^{-/-}細胞）の作製とその表現型の確認

図2はPOL^{-/-}細胞の作製手法を示す。作製したPOL^{-/-}細胞は予想通りに紫外線に感受性を示すことを確認した（図3）。

(3) XPA, XRCC1 二重欠損TK6細胞(*XPA*^{-/-}/*XRCC1*^{-/-}細胞)の作製とその表現型の確認

XPA^{-/-}細胞と*XRCC1*^{-/-}細胞は既に作製済みであった。作製した*XPA*^{-/-}/*XRCC1*^{-/-}細胞は予想通りにシスプラチンに対し*XPA*^{-/-}細胞および*XRCC1*^{-/-}細胞よりもさらに高い感受性を示すことを確認した(図4)。すなわち予想通りの二重欠損細胞ができていることを確認できた。さらに予想外のことには*XPA*^{-/-}/*XRCC1*^{-/-}細胞が*XPA*^{-/-}細胞より高い紫外線感受性を示すことを確認した(図5)(論文作成中)。

(4) Pol 校正機能欠損TK6細胞(*POL*^{*D269A*}/*exo*^{-/-}細胞 = *POL*^{*exo*}/*exo*^{-/-}細胞)の作製とその表現型の確認

図6は*POL*^{*D275A*}細胞の作製手法を示す。*D269A*とは、*POL* 遺伝子のN末端から269番目にあるアスパラギン酸がアラニンに置換されるような点変異が片方の対立遺伝子にノックインされたことを示す。Pol は、細胞の増殖に必須であるので、*D269A*の点変異をノックインするには3ステップのゲノム編集を行う必要があった(図6)。作製した*POL*^{*exo*}/*exo*^{-/-}細胞は予想通りにシタラピンに感受性を示すことを確認した(図7)。シタラピンは、ヌクレオシドアナログの抗がん剤でありAra-Cとも呼ばれ、急性骨髄性白血病の治療に第一選択薬として使われる。シタラピンは、DNA合成酵素Pol によってDNA鎖3'末端に取り込まれても、校正機能によってすぐに除去される限りDNA複製を停止させずDNAの損傷を起こさない。ゆえにシタラピン感受性は、*POL*^{*exo*}/*exo*^{-/-}細胞が当初の計画通り作製できたことを意味する。

図7に示した感受性試験からPol 校正機能は、DNA鎖3'末端に取り込まれたシタラピン(Ara-C)の他に、DNA鎖3'末端に取り込まれたLamivudine(抗レトロウイルス薬)やAZT(第一世代の抗AIDSウイルス薬)も効率よく除去出来ることが解った。

本間グループ

S9mix非存在下で、オーラミン(最終濃度50, 75, 100, 125 µg/mL)を4時間処理したときのTK6、および二重欠損細胞の生存率実験の結果を図8に示した。最高用量の125 µg/mLでは、TK6細胞は4つコロニー数が見られたが、そのRS値は、二重欠損細胞と共にゼロであった。用量を下げると両細胞ともにコロニー形成が観察された。それに従い、RS値も用量依存

的に回復し、50 µg/mLの用量で、両細胞ともRS値は約20%程度であった。

S9mix存在下で、オーラミン(最終濃度50, 75, 100, 125 µg/mL)を4時間処理したときのTK6、および二重欠損細胞の生存率実験の結果を図9に示した。TK6細胞は、最高用量125 µg/mLで7つコロニーを観察することができたが、二重欠損細胞は、最高用量125と100 µg/mLの2つの用量で死滅した。また、50 µg/mLの用量では、TK6細胞は陰性対照群の約半分の相対生存率(RS = 48%)があったが、二重欠損細胞のRS値は、著しく低く10%程度であった。このことから、TK6と二重欠損細胞のRSには約5倍程度の差があり、S9mix存在下で二重欠損細胞は感受性を有すると考えられた。以上の実験結果からオーラミンは肝臓で代謝されその代謝産物がDNA損傷を起こすと結論した。

D. 考察

Rad18はPol を活性化する。そしてPol は紫外線損傷の他にも多様な塩基損傷を持つ鋳型鎖を正確にDNA合成できる。したがって、*RAD18*^{-/-}細胞と*POL*^{-/-}細胞では多様な塩基損傷を起こす変異原性化学物質が点変異を起こしやすい。ゆえに*RAD18*^{-/-}細胞と*POL*^{-/-}細胞は、塩基損傷を起こす変異原性化学物質をtk試験によって検出するのに向いている。

オーラミンのDNA損傷の機構についても不明であるが、オーラミンで陽性を示すエイムス試験菌株がフレームシフト型のTA98とTA1538, 塩基置換型のTA1535(Zeiger et al, *Environ. Mol. Mutagen*, 19 Suppl 21; 2-141(1992), Parodi et al, *Carcinogenesis*, 2, 1317-1326 (1981), Varella et al, *Food Chem. Toxicol.* 42, 2029-2035 (2005))の両方であることから、DNA鎖切断やDNA付加体など多様なDNA損傷が関与していると考えられてきた。一方、本実験結果からオーラミンによるDNA損傷がXRCC1あるいはXPAによってDNA修復されていることが予想される。すなわちオーラミンによるDNA損傷は、DNA鎖切断だけでなく、塩基損傷も起こしていることが明らかになった。

E. 結論

XRCC1/XPA 二重欠損細胞(*XPA*^{-/-}/*XRCC1*^{-/-}細胞)は、代謝活性化されたオーラミンに対して感受性を示すことが分かった。よって、二重欠損細胞をtk遺伝子変異試験に用いれば、*XRCC1*あるいは*XPA*修復遺伝子

が関与する遺伝毒性物質を感度良く検出できると考えられる。

F．健康危険情報

該当なし

G．研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsuda M, Terada K, Ooka M, Kobayashi K, Sasanuma H, Fujisawa R, Tsurimoto T, Yamamoto J, Iwai S, Kadoda K, Akagawa R, Huang SN, Pommier Y, Sale JE, Takeda S, Hirota K. (2017) The dominant role of proofreading exonuclease activity of replicative polymerase in cellular tolerance to cytarabine (Ara-C). Oncotarget (in press)

2. 学会発表

該当なし

H．知的財産権の出願・登録状況

該当なし

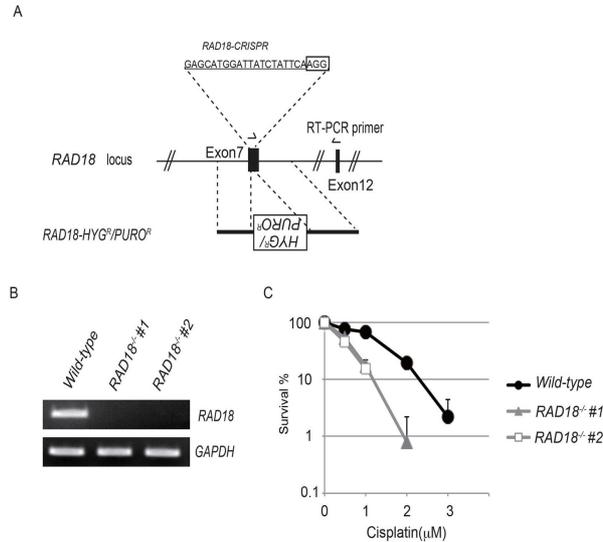


図1 (A) *RAD18*^{-/-} 細胞の作製方法、(B) RT-PCRによる遺伝子破壊 (#1, #2クローン)の確認、(C) シスプラチン感受性試験結果。

(A)の1行目がゲノム編集に使ったガイドRNA配列、2行目が *RAD18* 遺伝子座のゲノム配列、3行目がノックアウト用組換えプラスミドの構造を示す。 *HYG^o* と *PURO^o* は選択マーカ遺伝子。これらのマーカ遺伝子を両方の *RAD18* 対立遺伝子のエキソン7にノックインすることによって、両対立遺伝子の遺伝子破壊を行う。(A)の矢印は(B) RT-PCR で使ったプライマーを示す。(C)の感受性試験は、1個1個ばらばらにした細胞を、シスプラチンを含むメチルセルロース添加培地にまきこんで実施した。縦軸はコロニー形成効率(まきこんで2週間目)、横軸はシスプラチン濃度を示す。

Generation of *Polη*^{-/-} TK6 cells

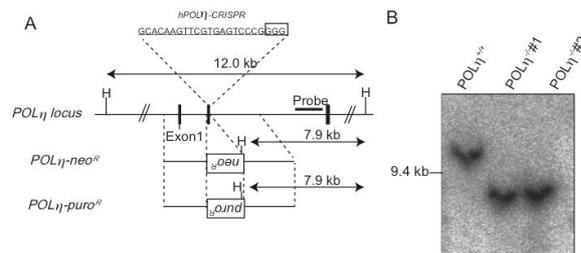


図2 (A) *POLH*^{-/-} 細胞の作製方法、(B) ゲノムDNAのサザンプロットによる遺伝子破壊 (#1, #2クローン)の確認

(A)の1行目がゲノム編集に使ったガイドRNA配列、2行目が *POLH* 遺伝子座のゲノム配列、3行目と4行目がノックアウト用組換えプラスミドの構造を示す。 *NEO^o* と *PURO^o* は選択マーカ遺伝子。(B) HindIII制限酵素で野生型細胞と#1, #2クローンのゲノムDNAをそれぞれ切断し、電気泳動し、(A)で示したプローブDNAでサザンプロットハイブリダイゼーションした。 *NEO^o* と *PURO^o* が両対立遺伝子のエキソン2にそれぞれノックインすると、正常な *POLH* 遺伝子座由来の12kbのバンドが消え、7.9kbのバンドが出現する。

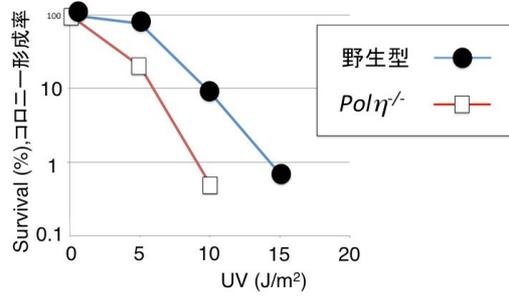


図3 紫外線感受性の試験結果。

野生型細胞と *POL*^{-/-} 細胞を最小量のPBSバッファーで懸濁し、横軸に示した線量の紫外線を照射した。そして1個1個ばらばらにした細胞をメチルセルロース添加培地にまきこんだ。2週間後にコロニー数をカウントした。縦軸の100%は紫外線を照射しないときのコロニー数である。Pol η は、紫外線損傷の他にも多様な塩基損傷を持つ鋳型鎖を正確にDNA合成できる。したがって、*POL*^{-/-} 細胞は多様な塩基損傷を起こす変異原性化学物質をtk試験によって検出するのに向いているはずである。

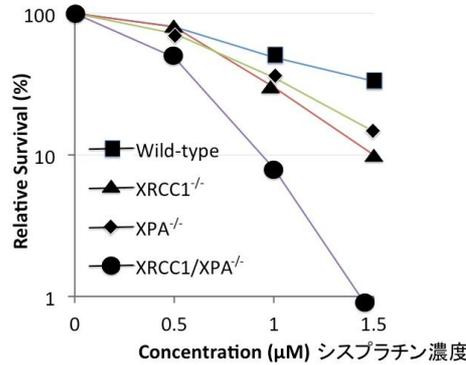


図4 シスプラチン感受性試験結果

1個1個ばらばらにした細胞を、シスプラチンを含むメチルセルロース添加培地にまきこんだ。まきこんで2週間目にコロニー数をカウントした。縦軸はコロニー形成の相対効率（100%はシスプラチン処理なしの時のコロニー数）、横軸はシスプラチン濃度を示す。

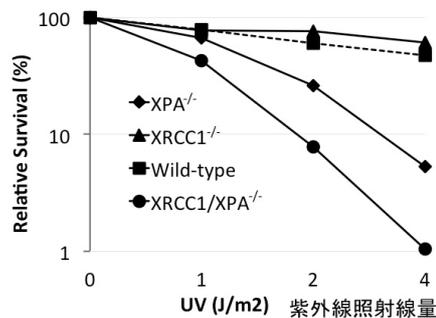


図5 紫外線感受性の試験結果

野生型細胞と図に示した遺伝子破壊細胞を最小限のPBSバッファーで懸濁し、横軸に示した線量の紫外線を照射した。そして1個1個ばらばらにした細胞をメチルセルロース添加培地にまきこんだ。2週間後にコロニー数をカウントした。縦軸の100%は紫外線を照射しないときのコロニー数である。このデータは、ヌクレオチド除去修復が全く機能しない時に限って塩基除去修復が紫外線損傷の修復に貢献することを示唆する。

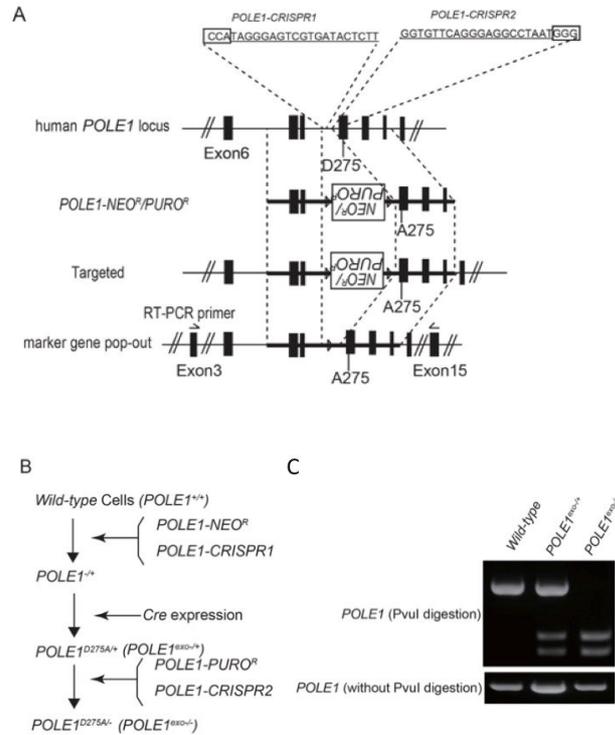


図6 Pol 校正機能欠損TK6細胞 ($POL^{D269A/-}$ 細胞 = $POL^{exo/-}$ 細胞) の作製

(A) Pol は4種類の分子から成るホロ酵素である。4種類のうちのp261と呼ばれる最大分子量のタンパクに校正機能の活性中心が存在する。1行目はPol p261の遺伝子座の構造を示す。この遺伝子座にD269Aのアミノ酸置換をするためのノックアウト用組換えプラスミドを2種類作った(2行目: $hPOL^{-neo/puro}$)。それぞれのノックアウト用組換えプラスミドを個別にノックインするために、ガイドRNA ($hPOL^{-CRISPR1}$, $hPOL^{-CRISPR2}$)を2種類準備した(1行目の上)。ノックアウト用組換えプラスミド、ガイドRNA、CRISPR/Cas9を同時に野生型細胞に導入した。そして野生型p261遺伝子座のイントロンに選択マーカーが挿入した(Targetedの3行め)細胞を作った。選択マーカーが挿入されると、その対立遺伝子が破壊される。この細胞にCre組換え酵素を一過性発現することによって選択マーカー遺伝子を除去する(marker gene pop-outの4行め)。この時にD269Aの点変異は残される(POL^{D269A} 対立遺伝子ができる)。この対立遺伝子は、校正機能が欠損したPolを発現する。

(B) $POL^{D269A/-}$ 細胞の作製法。野生型 ($POL^{+/+}$) 細胞にノックアウト用組換えプラスミドを導入し、 $POL^{+/+}$ 細胞を作り(A)の1行めから3行めに転換)その後選択マーカーを除去し(A)の3行めから4行めに転換) $POL^{D269A/+}$ 細胞を作る。その後野生型の+対立遺伝子を破壊し(A)の1行めから3行めに転換) $POL^{D269A/-}$ 細胞を作る。

(C) RT-PCRによるD269Aの点変異のノックインの確認。(A)の矢印で示されたプライマーを使い、野生型、 $POL^{D269A/+}$ 、 $POL^{D269A/-}$ の各細胞由来のmRNAをRT-PCRした。RT-PCRの結果できたDNAを電気泳動した。上の試料はPvuI制限酵素でこのDNAを切断してから電気泳動し、下の試料はPvuIでDNAを切断しないで電気泳動した。PvuIは、D269Aの点変異が挿入された遺伝子から生成したmRNA由来のcDNAのみ切断できる。一番右の試料ではD269Aの点変異が両対立遺伝子にノックインされたことが判る。

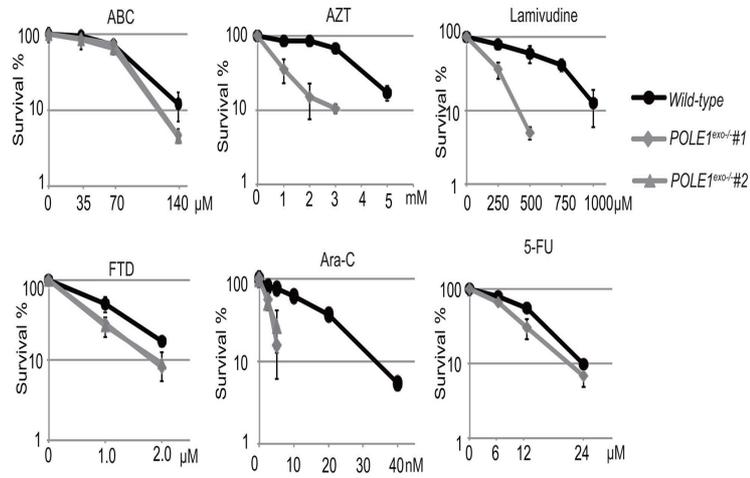


図7 Pol 校正機能欠損TK6細胞 (*POL*^{exo-/-} 細胞の2つのクローン、#1,#2)と野生型細胞の薬剤感受性。1個1個ばらばらにした細胞を、6種類の薬剤の1つを含むメチルセルロース添加培地にまきこんで実施した。まきこんで2週間目にコロニー数をカウントした。縦軸はコロニー形成の相対効率(100%はシスプラチン処理なし)、横軸は薬剤の濃度を示す。6種類の薬剤はすべてヌクレオシドアナログと呼ばれる範疇の薬剤である。

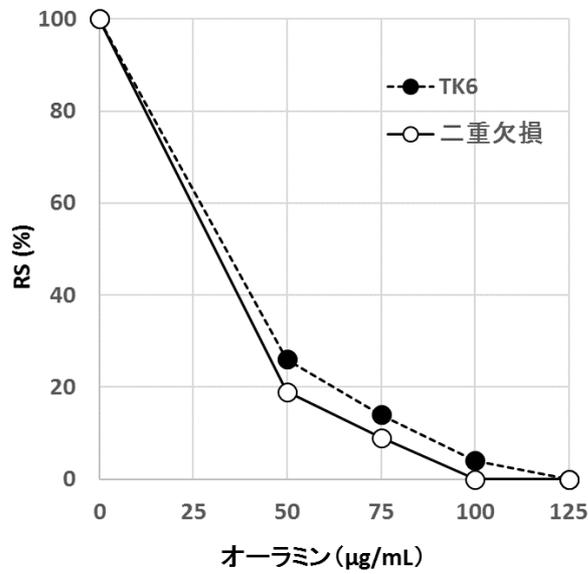


図8 S9mix 非存在下のオーラミンに対する細胞相対生存率

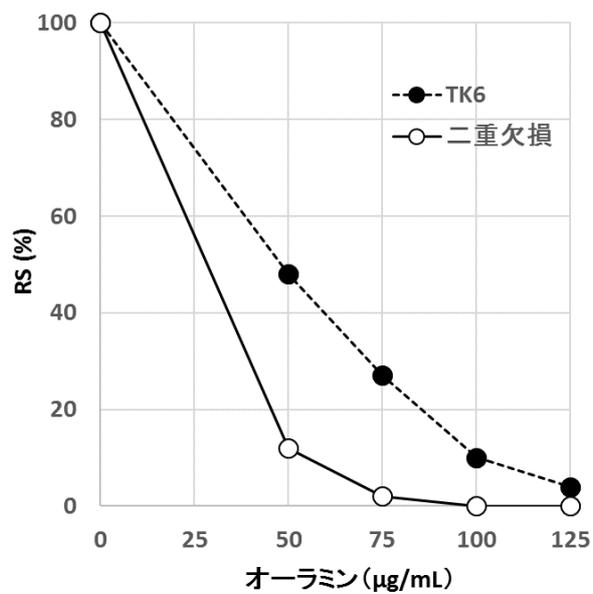


図9 S9mix 存在下のオーラミンに対する細胞相対生存率