

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、複数の遺伝毒性/非遺伝毒性発がん物質の肝臓における 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（付加体の網羅的解析）により検討した。

遺伝毒性ラット肝発がん物質として、N-Nitrosodiethylamine (DEN)及び3,3'-Dimethylbenzidine 塩酸塩 (o-Tolidine-2HCl)、遺伝毒性ラット非肝発がん物質として、4-Chloro-o-phenylenediamine (COP)、N-Nitroso-N-ethylurea (ENU)、非遺伝毒性ラット肝発がん物質として、Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)、1,4-Dioxane (DO)をそれぞれラットに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。得られたデータを PCA 解析により分類したところ、コントロール、非遺伝毒性発がん物質、遺伝毒性発がん物質の3つのグループに分離できた。非遺伝毒性発がん物質の分離に寄与している DNA 付加体をデータベースとの比較により探索した結果、抽出された付加体は酸化ストレスに起因する付加体が多いことが推測された。

今後、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、昨年度までに確立した 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する。今年度は、複数の遺伝毒性/非遺伝毒性発がん物質の肝臓における 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（付加体の網羅的解析）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 DEN(0.001%)、o-Tolidine-2HCl(0.015%)、COP(1.0%)、ENU(0.001%)、DEHP(1.2%)、DO(0.5%)を4週間飲水投与を行った後、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。

（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

各種化学物質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、コントロール、非遺伝毒性発がん物質、遺伝毒性発がん物質の3つのグループに分離されることがわかった。一方、遺伝毒性発がん物質とコントロールとの比較では、肝発がん性の有無で2つのクラスターとして分離されることがわかった（図2）。また、非遺伝毒性発がん物質の分離に寄与しているDNA付加体をデータベースとの比較により探索した結果、抽出された付加体は酸化ストレスに起因する付加体が多いことが推測された。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。

図1 遺伝毒性/非遺伝毒性発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価 (PCA解析による)

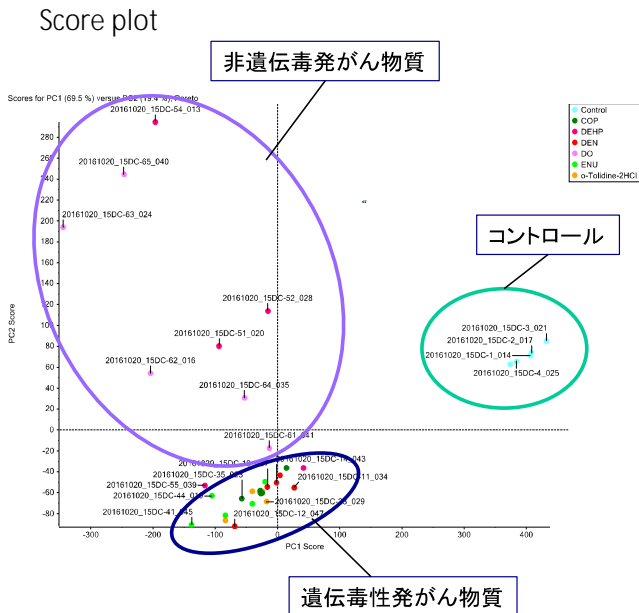
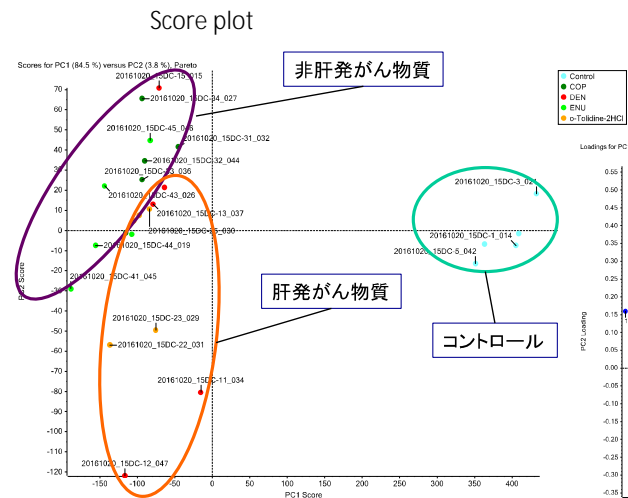


図2 遺伝毒性発がん物質の肝臓におけるDNA損傷性の評価(PCA解析による)



D. 考察

遺伝毒性/非遺伝毒性肝発がん物質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、コントロール、非遺伝毒性発がん物質、遺伝毒性発がん物質の3つのクラスターに分離されることがわかった。非遺伝毒性肝発がん物質(DEHP, DO)投与に相関するものとして、炎症及び酸化ストレスに起因する付加体が複数個抽出された。したがって、これら非遺伝毒性肝発がん物質投与により、ラット肝臓に炎症及び酸化ストレスが誘発されていた可能性が示唆され、非遺伝毒性物質の発がんメカニズムとして、炎症等が大きく関与することが推測された。今後、本解析で抽出された非遺伝毒性肝発がん物質に相関する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更に検討を行なう必要がある。一方、遺伝毒性発がん物質(DEN, *o*-Tolidine-2HCl, COP, ENU)とコントロールとの比較では、肝発がん性の有

無で2つのクラスターとして分離されることがわかった。現在、肝発がん性の有無の分離に寄与している特徴的なDNA付加体の探索を行っている。

アダクトーム法の化学物質のリスク評価へ応用することの妥当性については、更に複数の化学物質について検討をすることが必要である。

表1 非遺伝毒性発がん物質に相関する付加体リスト

Adduct	M/Z [M+H]	RT (min)	データベースとの比較 [M+H]	付加体の由来
3292	374.2284	3.91	BeMedC(K)	炎症(脂質過酸化)
1720	279.0977	1.48	5-Cl-dC(NH ₃), N ⁴ -Cl-dC	炎症(次亜塩素酸)
3469	386.2264	0.95	HNE-dC	炎症(脂質過酸化)
2298	315.1746	2.87	Tg(K), Croton-dC(NH ₃)	酸化, アルデヒド
1476	263.1027	1.87	Cyanuric acid (dY, CA)(NH ₃)	酸化
3664	395.2262	2.20	HeMedC(NH ₃)	炎症(脂質過酸化)
3513	388.1844	3.30	HedA, CPPdA	炎症(脂質過酸化), 酸化脂質
2458	324.1803	3.08	FapyG(K)	酸化
3572	391.1623	1.96	CEPdA(NH ₃)	酸化脂質
1689	277.1179	1.63	Tg	酸化
3097	362.2174	2.55	8-OH-PdG(8-OH-ACR-dG)(K)	アルデヒド
3461	386.2004	2.88	HNE-dC, Propanone-εdG(K)	炎症(脂質過酸化)
2832	346.1717	1.56	BedA	炎症(脂質過酸化)
4276	437.2387	2.66	CHPdC(NH ₃)	酸化脂質
3573	391.1766	4.90	CEPdA(NH ₃)	酸化脂質
4838	477.2370	2.36	CHPdG(NH ₃)	酸化脂質
4115	425.2533	5.95	HNE-dA(NH ₃)	炎症(脂質過酸化)
3189	368.1453	2.35	BedA(Na)	炎症(脂質過酸化)
3486	408.2291	4.13	HNE-dA, HNE-dC(Na)	炎症(脂質過酸化)
1808	285.1343	2.31	8-OH-dA(NH ₃), 2-OH-dA(NH ₃)	酸化
2437	323.1795	5.68	MDA-dA(NH ₃)	炎症(脂質過酸化)
3188	368.1441	1.28	BedA(Na)	炎症(脂質過酸化)
2792	344.2006	2.54	5,6-dihydro-M1dG(K), MDA-dA(K)	炎症(脂質過酸化)
2898	350.1337	2.35	CEPdC	酸化脂質
2285	314.2074	2.09	εdA(K)	炎症(脂質過酸化)
3112	363.1845	3.36	BedA(NH ₃)	炎症(脂質過酸化)
2900	350.1377	1.16	CEPdC	酸化脂質
1236	247.1287	1.49	Oz	酸化
3869	410.1743	1.99	HedA(Na)	炎症(脂質過酸化)
1811	285.1457	3.46	8-OH-dA(NH ₃), 2-OH-dA(NH ₃)	酸化
4574	460.2396	2.97	CHPdG	酸化脂質
1548	268.1193	3.44	8-OH-dA, 2-OH-dA	酸化
1899	291.1459	3.75	Gh(NH ₃)	酸化
3399	381.1761	1.63	CPPdC(NH ₃)	酸化脂質
3294	374.2295	2.65	BeMedC(K)	炎症(脂質過酸化)
4315	441.2243	3.01	HNE-dG(NH ₃)	炎症(脂質過酸化)
2836	346.1970	1.82	Propanone-εdC(K)	炎症(脂質過酸化)
3377	379.1999	1.03	BedG(NH ₃)	炎症(脂質過酸化)
3797	405.2271	1.17	HedA(NH ₃)	炎症(脂質過酸化)
3025	358.1963	2.43	6-oxo-M1dG(K)	炎症(脂質過酸化)
1493	264.1453	2.86	Oz(NH ₃)	酸化
4673	466.1928	2.09	CHPdA(Na)	酸化脂質
4061	422.2207	2.38	CPPdG(K)	酸化脂質
3669	396.1396	4.46	CEPdA(Na)	酸化脂質

E. 結論

遺伝毒性/非遺伝毒性肝発がん物質をラットに投与し、肝臓に生成されるDNA付加体を網羅的に解析した。付加体の網羅解析により得られたデータの生物統計解析を行なったところ、コントロール、非遺伝毒性発がん物質、遺伝毒性発がん物質の3つのクラスターに分離されることがわかった。非遺伝毒性肝発がん物質の投与に相関する付加体として、酸化ストレスや炎症由来の複数のDNA付加体がスクリーニングされた。これらの結果から、

非遺伝毒性肝発がん物質投与により、ラット肝臓に炎症及び酸化ストレスが誘発されていた可能性が示唆され、非遺伝毒性物質の発がんメカニズムとして、炎症等が大きく関与することが推測された。今後は、本解析で抽出された非遺伝毒性肝発がん物質に相関する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更に検討を行なう必要がある。一方、遺伝毒性発がん物質(DEN, *o*-Tolidine-2HCl, COP, ENU) とコントロールとの比較では、肝発がん性の有無で2つのクラスターとして分離されることがわかった。今後は、肝発がん性の有無の分離に寄与している特徴的なDNA付加体の探索を行なう予定である。アダクトーム法を化学物質のリスク評価へ応用することの妥当性については、更に複数の化学物質について検討をすることが必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mimaki S, Totsuka Y, Suzuki Y, Nakai C, Goto M, Kojima M, Arakawa H, Takemura S, Tanaka S, Marubashi S, Matsuda T, Shibata T, Nakagama H, Ochiai A, Kubo S, Nakamori S, Esumi H, Tsuchihara K. Hypermutation and Unique Mutational Signatures of Occupational Cholangiocarcinoma in Printing Workers Exposed to Halolkanes. *Carcinogenesis* 2016 37:817-26.

2. 学会発表

1. Totsuka Y, Lin Y, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Matsushima Y, Nakagama H: Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis) 50th Anniversary Conference IARC (リヨン、2016年6月)
2. Totsuka Y, Watanabe M, Hayashi K, Nakae D: Development of a novel in vitro mechanism-based evaluation system of the genotoxicity of nanomaterials 45th Annual Meeting of the European Environmental Mutagenesis and Genomics Society (コペンハーゲン、2016年8月)
3. 戸塚ゆ加里, 林 櫻松、加藤 護、十時 泰、柴田龍弘、松島芳隆、中釜 斉: DNA アダクトーム解析により中国食道癌の要因を探索する 第75回日本癌学会学術総会(横浜

2016年10月)

4. 伴野 勸、山地太樹、岩崎 基、成島大智、加藤 護、戸塚ゆ加里、三好規之、今井俊夫: 血漿中 cis-4-decenal の大腸がんリスクマーカーとしての可能性 第75回日本癌学会学術総会(横浜 2016年10月)
5. 三牧幸代、中森正二、久保正二、木下正彦、戸塚ゆ加里、中釜 斉、落合淳志、江角浩安、土原一哉: 職業性胆管がん1症例に認められた同時多発腫瘍の変異プロファイルの比較 第75回日本癌学会学術総会(横浜 2016年10月)
6. 戸塚ゆ加里: ゲノム解析およびDNA付加体の網羅的解析の統合による発がん要因の探索 第59回日本放射線影響学会。(広島 2016年10月)
7. 佐藤 春菜、坂本義光、中江 大、戸塚ゆ加里: 多層カーボンナノチューブの繊維長の違いが遺伝毒性に及ぼす影響 第45回日本環境変異原学会(つくば、2016年11月)
8. 前迫裕也、善家 茜、古川英作、加藤 護、椎崎一宏、中釜 斉、戸塚ゆ加里: 職業性胆管がん発生に關与する1,2-ジクロロプロパンのDNA付加体の網羅的な解析(アダクトーム解析) 第45回日本環境変異原学会(つくば、2016年11月)
9. 戸塚ゆ加里、善家 茜、古川 英作、加藤 護、十時 泰、柴田龍弘、中釜 斉: 次世代シーケンサーとDNAアダクトーム解析の統合による発がん要因の探索 第45回日本環境変異原学会(つくば、2016年11月)

(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。