

研究課題名：食品添加物等の遺伝毒性発がんリスク評価のための新戦略法に関する研究

研究代表者： 本間正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長

研究要旨

遺伝毒性試験は発がん性物質のスクリーニング試験であると同時に、その遺伝毒性メカニズムが、発がん性リスク評価の上で重要な情報となる。本研究では、OECD が提唱する「有害性転帰事象（AOP）」を取り入れた遺伝毒性評価ストラテジーと、追跡型試験系を開発し、遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化を目指す。主な研究のテーマは、発がん AOP の分子初期事象である「化学物質→DNA 付加体→突然変異」のプロセスから（A）「化学物質→DNA 付加体」と、（B）「DNA 付加体→突然変異」を分離し、独立に定性、定量的に解析する試験系を構築すること。（C）発がん AOP からはずれるエピ遺伝毒性物質の検出系の開発することである。

（A）DNA 付加体に関しては PhIP 修飾オリゴヌクレオチドの合成を行った。脱保護の方法による影響についても今後検討する必要がある。また、ベンゾピレン（BaP）の付加体合成では、ピレノールから始める合成が適しており、ジオールエポキサイドの合成までの方法論が明らかになった。MeIQx および IQ を含む DNA の合成ではアダホスホロアミダイト体の合成法の確立を試みた。Buchwald-Hartig 反応のリガンドや溶媒、反応時間等を検討するとともに、さらにステップ数を削減するべく、2 位無保護における反応条件を検討した。ジクロロメタンおよび 1,2-ジクロロプロパン（DCP）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。DCP の変異原性誘発メカニズムの解明のため DCP に由来する付加体の探索を行ったところ、デオキシグアノシン由来の付加体である DCP86 が同定できた。

（B）バルキー-DNA 付加体の dG-C8-PhIP を TATAM 法により XPC もしくは ERCC6 を改変細胞のゲノム DNA に導入し、その突然変異頻度と変異スペクトルを正常細胞と比較したところ、大きな違いは観察されなかった。このことは dG-C8-PhIP 付加体の DNA 修復に関与していないこと、もしくは TATAM 解析がバルキー付加体に適用できない可能性があることが示唆された。

（C）エピ変異原に関しては凝集遺伝子 *FLO1* プロモーター活性を指標としたエピ変異原検出系の構築を目指した。レポーター遺伝子には非破壊で測定可能な Green fluorescent protein（GFP）遺伝子を用い、被検物質には昨年度の研究からエピ変異原の可能性が推測されたプルプリンを使用した。*FLO1* レポーター活性に及ぼすプルプリンの効果については、凝集性に対する効果と矛盾ない濃度依存的な GFP 蛍光強度の上昇が確認された。プルプリンが *FLO1* レポーター活性に示した本効果は凝集促進作用を有するアリザリン処理においても認められた。

## 研究分担者

安井 学	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長
杉山圭一	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長
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
高村岳樹	神奈川工科大学工学部 分子生物学研究室 教授
出水庸介	国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部 部長

## A . 研究目的

食品の安全性に対して、多くの国民が関心を寄せている今日、食品添加物や残留農薬等の食品中に含まれる微量の化学物質の安全性が問題となっている。多くの化学物質の毒性は、健康リスクを評価する場合、理論的、実証的研究から、これ以下であれば健康影響が見られないレベル、すなわち閾値がある用量反応モデルが用いられてきた。これにより一日摂取許容量 (Acceptable Daily Intake; ADI) を定めることができる。しかしながら、その化学物質の発がん性が問題となり、さらに遺伝毒性が認められるとやっかいである。他の毒性と異なり遺伝毒性には閾値がないとされているため、摂取量をゼロにしない限り、健康リスクもゼロにならないとの論理から ADI を設定することができない。ここに遺伝毒性発がん物質のリスク管理の問題点がある。同様の問題は、福島第一原発事故からの低レベル放射線の発がんリスクの議論においても焦点となっている。我々は日常的に、食物を通して多くの発がん物質を摂取しており、また、太陽からの紫外線、自然環境からの放射線も先史からの発がん因子である。さらに、現代社会で生活する限り、工業製品等からの微量の発がん可能性物質の暴露を避けることはできない。現在必要なのは、食品中に含ま

れる化学物質の危険性とそのリスクを国民に対して合理的、且つ高い透明性をもって、説明可能な評価方法と管理方法を確立することである。このための重要な研究は、リスクをもたらすハザードのメカニズムの解明と、定量化であると考え (Hazard Characterization)。

遺伝毒性試験は発がん性物質のスクリーニング試験であると同時に、発がん性が認められた場合には、その遺伝毒性メカニズムが安全性評価の上で重要な情報となる。また、遺伝毒性発がん物質のリスク評価においても、近年では、ある一定レベル以下のリスクであれば許容されるという考えが浸透しつつあるが、この場合でも、適切な遺伝毒性メカニズムと、定量評価による透明性の高い説明が求められている。これまでの一般的な遺伝毒性試験としてはエームス試験 (バクテリア; 遺伝子変異)、染色体異常試験 (哺乳類; 染色体構造異常)、小核試験 (げっ歯類動物; 染色体構造および数的異常) が利用されてきた。これらの組み合わせ試験は、異なる生物種、複数のエンドポイントを用いることにより、様々なタイプの遺伝毒性物質を広範に検出するためにデザインされたものである。しかしながら、この結果から発がんに関連する遺伝毒性メカニズムの情報は得ることは困難であり、また、試験結果自体も発がん性との相関性が低い。本研究では、これまでの既成概念を破り、最新の情報と分子生物学的技術に基づく評価系を構築し、遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化を目指す。

OECD では化学物質と生体 (組織) の相互作用から個体での毒性発現を関連づけて説明する手法 (Adverse Outcome Pathway; AOP) と、それに基づく統合的試験法と評価方法 (Integrated Approaches to Testing and Assessment; IATA) を提唱し、化学物質の安全性評価の合理化と、実験動物削減を目指している。本研究では、発がん AOP の分子初期事象 (Molecular Initial Event; MIE) である「化学物質→DNA 付加体→突然変異」に注目し、

この MIE プロセスを追跡し、定性、定量的に解析する試験系を構築し、メカニズムと定量性に基いた新たな遺伝毒性 IATA を開発することを目的とする。本研究では、1. DNA 付加体検出、2. 付加体合成、3. 遺伝子ターゲットによるゲノム中への付加体の導入、が技術の核心である。特に、3 の技術に関しては、わずか 1 分子の DNA 付加体をゲノム中に導入し、その結果生じる突然変異の定性・定量的に解析することができる。1 分子の DNA 損傷は究極的な低用量モデルであり、本試験系で DNA 付加体が突然変異をもたらさなければ、その DNA 付加体（損傷）は閾値を持つか、閾値が無くとも突然変異を引き起こさないことを理論的に証明したことになる。

また、本研究班では DNA 付加体形成が認められず、発がん AOP のスキームに載らない非遺伝毒性発がん物質の評価法にも取り組んでいる。これら化学物質は DNA の一次構造に変化を与えず、がんや他の疾患を引き起こすエピ遺伝毒性物質と考えられる。エピ遺伝毒性物質に反応する新たなトランスジェニック生物を作成し、エピ遺伝毒性物質の評価系の開発も行った。

本研究班は上記の目的を達成するため、5 名の分担研究者が以下の研究に取り組んだ。

#### 1) バルキー-DNA 付加体 dG-C8-PhIP に関するヌクレオチド除去修復機構に関する基礎的研究 (安井):

これまで 1 分子の DNA 付加体をゲノム中に導入し、その運命を定性・定量的に解析できる TATAM 法の開発に成功した。この TATAM の系を用いてヘテロサイクリックアミン類である PhIP の変異原性の解析を、正常細胞、および DNA 修復欠損細胞を用いて比較検討を行った。PhIP は、バルキー-DNA 付加体を形成させ、発がんに至らせる遺伝毒性発がん物質である。一般的に、バルキー-DNA 付加体は、ヌクレオチド除去修復機構 (NER) によって DNA から除去されることが知られているが、ほとんどの

付加体は、NER 機構に存在するグローバルゲノム NER (GG-NER)、あるいは転写共役型 NER (TC-NER) のどちらで修復されるかは不明であり、HCA の発がん作用機序を理解するうえで大きな障害となっている。本研究では、GG-NER および TC-NER に必須の遺伝子である XPC および ERCC6 を、それぞれ改変した細胞を用いて、ゲノム導入された dG-C8-PhIP 付加体の突然変異誘発能の解析を行った。

#### 2) エピ遺伝毒性物質の評価系の開発 (杉山):

発がんメカニズムとして、近年エピジェネティックな変異の関与も指摘されている。エピ遺伝毒性物質のスクリーニング試験については、短期・長期に関わらず現時点では確立されていない。これまでエピ遺伝毒性の一つである DNA メチル化阻害剤検出系を構築することを目的としてヒト DNA methyltransferase (DNMT) 遺伝子形質転換酵母 (ヒト DNMT 酵母) を作出に成功し、DNMT 阻害剤に対する応答性を検討してきた。本年度では、昨年度までの結果を踏まえ、凝集性と比較してより定量的でかつ頑健性が期待できる凝集遺伝子 (FLO1 遺伝子) のプロモーターを用いたレポーターアッセイによるエピ変異原検出システムの構築を試みた。

#### 3) DNA アダクトの定性・定量評価とアダクトのカタログ化に関する研究 (戸塚):

ジクロロメタン (DCM) や 1,2-ジクロロプロパン (DCP) 等のハロゲン系炭化水素は主に工業溶剤として幅広く使用されており、最近、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、その関連性は未だ良くわかっていない。昨年度の研究から代謝物の影響はないことが示唆されたため、本年度は DCP と DNA の直接反応によって形成される DNA 付加体の同定を試みた。

#### 4) DNA アダクトの合成と、ターゲットベクターへの導入に関する研究 (高村):

焼肉などの加熱食品中に含まれるがん原性ヘテロサイクリックアミンの一つである PhIP

は Ames 試験などバクテリアを用いる変異原性試験では比較的低い変異原性を示すが、ラットに対し大腸がんや乳がんを誘発することが知られている。PhIP の TLS 試験では APC 遺伝子に部位特異的に PhIP 修飾を施したものを用いた *in vitro* の系が知られているが、*in vivo* TLS のデータは存在しない。そこで、*in vivo* TLS に向けた PhIP 修飾オリゴヌクレオチドの合成をおこなった。また、加熱食品の加熱時に生成する可能性のある発ガン性物質ベンゾピレンが dG に付加した dG-N2 付加体の別途合成方法の開発、さらに、O6 位にグリコール酸 (GA) 修飾した付加体 dG-O6-GA の合成を試みた

#### 5) 重要な DNA アダクトの合成に関する研究 (出水):

TATAM 法に必要な DNA アダクト含有オリゴ DNA を供給するために、その DAN アダクトとホスホロアミダイト体の合成を行った。IQ 平の付加体合成 (dG-C8-IQ) への検討を行ってきたが、本年度は反応のリガンドや溶媒、反応時間等を検討するとともに、さらにステップ数を削減するべく、2 位無保護における反応条件を検討した。

### **B . 研究方法**

#### 1) バルキー-DNA 付加体 dG-C8-PhIP に関するヌクレオチド除去修復機構に関する基礎的研究 (安井):

ヌクレオチド除去修復機構 (NER) のにグローバルゲノム NER (GG-NER) に関与する XPC 遺伝子 (XPC タンパク質) と、転写共役型 NER (TC-NER) に関与する ERCC6 遺伝子 (CSB タンパク質) のノックアウト (KO) あるいはノックイン (KI) した改変細胞をヒトリンパ芽球 TSCER122 細胞から CRISPR/CAS9 を用いて作成した。また、研究分担者である高村より供与された部位特異的に dG-C8-PhIP を 1 分子含む DNA オリゴマーから作成したターゲティングベクターを構築した。このターゲッティン

グベクターを TATAM (Tracing DNA adducts in targeted mutagenesis) 法により正常細胞、GG-NER 細胞、TC-NER 細胞に導入し、突然変異頻度を計測すると共に、変異スペクトルを DNA シークエンスにより解析した。

#### 2) エピ遺伝毒性物質の評価系の開発 (杉山):

Green fluorescent protein (GFP) 変異体 (eGFP) をレポーター遺伝子として *FLO1* レポータープラスミドを構築した。構築したプラスミドを酵母に形質転換し、アリザリンおよびアリザリン類縁体のプルプリンが *FLO1* レポーター活性に及ぼす影響を解析した。

#### 3) DNA アダクトの定性・定量評価とアダクトのカタログ化に関する研究 (戸塚):

Ames 試験に用いる試験菌株である、*Salmonella typhimurium* TA100 に 1,2-DCP (15000ppm) を 2 時間気層曝露した後バクテリアを回収し、ゲノム DNA の抽出を行った。DNA を各種ヌクレアーゼによりモノヌクレオチドに分解し、生成する DNA 付加体を質量分析機器を用いて網羅的に解析した。得られたデータを主成分 (PCA) 解析により解析し、1,2-DCP 曝露に相関する付加体の抽出を実施した。精密質量数を用いて抽出した任意の付加体の分子組成式の推測をソフトウェアにより行った。

#### 4) DNA アダクトの合成と、ターゲットベクターへの導入に関する研究 (高村):

昨年度の同様の方法で、dG-C8-PhIP のアミダイトの合成を試みているが、合成の困難さも有り、現時点ではオリゴヌクレオチドまで合成できていない。PhIP で修飾された dG-C8-PhIP のアミダイトまではあと少しの行程であるが、昨年度までの合成時と若干、反応性が異なることが明らかになっており、その原因について検討が必要である。またベンゾピレンの付加体については付加体反応の手前までの合成を行った。また GA 付加体については、定法により合成を進めた。

#### 5) 重要な DNA アダクトの合成に関する研究

(出水):

MeIQx および IQ を含む DNA の合成ではアダホスホロアミダイト体の合成法の確立を試みた。十分に窒素置換した 3 ml の THF に化合物 4 (44.3 mg, 0.05 mmol), IQ (22.1 mg, 0.1 mmol), xantphos (30.2 mg, 0.05 mmol), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (33.6 mg, 0.1 mmol), Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (10.6 mg, 0.01 mmol) を添加し, microwave 照射下, 100 °C, 6h 撪拌した。上記反応条件をもとに、溶媒 (DMSO、DMF、toluene 等)、リガンド (JohnPhos、SPhos、XPhos、) DavePhos 等)、塩基 (t-BuOK、NaPO<sub>4</sub> 等)、触媒、反応時間、量比等を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は多くは文献調査、バクテリア、酵母、哺乳類培養細胞による *in vitro* 試験に基づくものであり、倫理上の問題はない。

## C . 研究結果

1) バルキ-DNA 付加体 dG-C8-PhIP に関するヌクレオチド除去修復機構に関する基礎的研究 (安井):

野生株である TSCER122 細胞に dG-C8-PhIP を含むターゲティングベクターを TATAM 法によりゲノムに導入し、解析した結果、164 細胞中に 6 つの細胞で dG-C8-PhIP のゲノム導入部位周辺の塩基変異 (4.2%) が検出され、また、2 つの細胞からは大きな欠失 (1.4%) が観察された (合計 5.6%)。一方、コントロールベクターで得られる自然突然変異頻度は 1.7% (Yasui, M. *et al.*, *DNA repair* 15, 11-20 (2014)) であるため、dG-C8-PhIP によって突然変異誘発頻度が約 3 倍増加したことが分かった。

一方、XPC KO 細胞、および ERCC6 KI 細胞のゲノムに dG-C8-PhIP 付加体を導入して同様の実験を行ったが、XPC KO 細胞では 186 細胞中に 4 つの細胞で塩基変異と一塩基欠失 (2.4%)、また、ERCC6 KI 細胞では 172 細胞

中にわずか 1 細胞 (塩基変異と一塩基欠失を同時に誘発; 0.6%) しか検出されなかった。

2) エピ遺伝毒性物質の評価系の開発 (杉山):

酵母凝集性に対するプルプリンの作用を検討した結果、凝集促進作用と *FLO1* の mRNA レベル上昇を認めた。ヒストンへの影響を検討した結果、プルプリンはバルクレベルでコアヒストン H3 量を減少させることが明らかになった。また、プルプリン処理時における核染色像の異常も観察された。*FLO1* レポーター活性に及ぼすプルプリンの効果については、凝集性に対する効果と矛盾ない濃度依存的な GFP 蛍光強度の上昇が確認された。プルプリンが *FLO1* レポーター活性に示した本効果は凝集促進作用を示すアリザリン処理においても認められた。以上の結果は、凝集試験より簡便でかつ定量性が担保された *FLO1* レポーターアッセイが、エピ変異原検出系として利用可能であることを示唆している。

3) DNA アダクトの定性・定量評価とアダクトのカタログ化に関する研究 (戸塚):

PCA 解析を行なった結果、1,2-DCP に相関する付加体として抽出されたもののうち、DCP22 [m/z 368.1560; M+H] と DCP86 [m/z 384.1514; M+H] に注目してみたところ、両者の精密質量数から推測した分子組成式と MS/MS フラグメンテーションデータから、DCP86 ではグアニンに相当するフラグメントが、DCP22 ではアデニンに相当するフラグメントが観察され、このことから、DCP86 はデオキシグアノシン由来の、DCP22 はデオキシアデノシン由来の付加体であることが推測できた。

4) DNA アダクトの合成と、ターゲットベクターへの導入に関する研究 (高村):

dG の 8 位のプロモ体 (8-Br-dG) 誘導体の合成からはじめた。シリル基で保護をしたデオキシグアノシンのプロモ化は十分に進行しなかった。また保護を行った dG 誘導体は PhIP との Buchwald アミノ化反応をもちいて反応させた。

得られた付加体誘導体を、トリクロロ酢酸を用いて脱保護を行ったが、目的とする化合物が得られていないことが多く見られた。一方で、トリチル基が存在したままでも O6 位のベンジル基は Pd black 存在下、水素添加反応により脱保護可能であることが判明したため、今後脱保護の方法論も含めて検討を行う予定である。

一方、ベンゾピレンの dG 付加体合成に関しては既存の方法を用いた。ピレンアルコール5を脱水する反応で、トルエンスルホン酸をもちいて脱水させ、2重結合を生成させた。得られた化合物6を、ベンゼン溶媒中で I2 と安息香酸銀を用いる Prévost 法によりトランス1,2グリコールを生成した。これにはいくつかの合成方法を検討したが、反応混合物を光から保護し、室温で約1日、攪拌させた後に1時間還流させる方法で合成を行うと収率(80%)よく目的化合物7が得られることがわかった。得られた化合物は DDQ を用いて酸化反応を行い、目的化合物8を得ることが出来た。

#### 5) 重要な DNA アダクトの合成に関する研究(出水):

6位無保護の化合物を用いて IQ 付加体合成時における Buchwald-Hartwig 反応の溶媒(DMSO、DMF、toluene 等)、リガンド(JohnPhos、SPhos、XPhos、DavePhos 等、figure 3)、塩基(t-BuOK、NaPO4 等)、触媒(Pd2(dba)3、Pdacac 等)、反応時間、量比、microwave のありなし等を検討した。しかしながら、初期に見出した条件を上回る条件を見出すことができなかった。また、合成ルートのさらなる短縮化を目指し、2、6位無保護による Buchwald-Hartwig 反応を検討した。様々なリガンドにて検討したところ、LCMS および TLC で反応生成物が確認できたものもあったが、十分な収率で目的化合物を得ることができなかった。Microwave の影響については、どちらについても microwave を用いるほうが反応性の向上が認められた。

## D. 考察

遺伝毒性試験は発がん性物質のスクリーニング試験であると同時に、その遺伝毒性メカニズムが、発がん性リスク評価の上で重要な情報となる。本研究では、OECD が提唱する「化学物質と生体の相互作用から個体での毒性発現までのメカニズムを関連づけて説明する手法(AOP)」を取り入れた新たな遺伝毒性評価ストラテジーと、階層からなる追跡型試験系を開発し、遺伝毒性発がんリスク評価法の精緻化を目指す。主な研究のテーマは、発がんの AOP の分子初期事象である「化学物質→DNA 付加体→突然変異」のプロセスから、(A)「化学物質→DNA 付加体」と、(B)「DNA 付加体→突然変異」を分離し、独立に定性、定量的に解析する試験系を構築すること。(C) 発がん AOP からはずれるエピ遺伝毒性物質の検出系の開発である。

(A)の「化学物質→DNA 付加体」に関しては、国立がんセンターの戸塚が、DCP の変異原性誘発メカニズムの解明のため、バクテリアを用い、DNA 付加体の網羅的解析手法により、DCP に由来する付加体の探索を行った。その結果、グアニン及びアデニン塩基の付加体が生成していることが示唆された。また、これら付加体のフラグメントピークから、[m/z 117.05; M+H]を持つフラグメントが共通で観察されており、このことから、DCP の暴露に由来する官能基がそれぞれ dA 及び dG に付加した付加体であることが推測された。先行研究の結果から、DCP は G:C 塩基に変異を導入することから、おそらく、本研究で抽出されたグアニン付加体が DCP の変異導入に寄与している可能性が示唆された。

(B)の「DNA 付加体→突然変異」に研究に関しては、国立衛研の安井らが開発した TATAM 法による解析が重要である。XPC と ERCC6 の改変細胞で、dG-C8-PhIP 導入による突然変異誘発頻度の増加と変異スペクトルの変化から GG-NER、もしくは TC-NER のど

ちらかの修復機構の関与が期待された。しかしながら、dG-C8-PhIP 付加体を XPC KO , および ERCC6 KI 細胞のゲノムに導入して調べたが、野生株の突然変異誘発頻度よりも低い結果が得られた。dG-C8-PhIP を含むターゲティングベクターのゲノム導入効率が、野生株と変異株で類似の値を示したことから、各細胞のゲノムに同じような効率で付加体が導入されていると考えられたことから、XPC と ERCC6 は dG-C8-PhIP の DNA 修復に関与しておらず NER 以外の DNA 修復機構が働いていること、あるいは TATAM 解析がバルキー付加体に適用できない可能性があることが示唆された。

神奈川工科大学の高村と、国立衛研の出水は同定された DNA 付加体を化学合成し、オリゴヌクレオチド化する研究を行っている。高村はデオキシグアノシンの C8 位に PhIP のアミノ基が結合した付加体を部位特異的に含むオリゴヌクレオチドの合成を試みた。脱トリチル基後の反応の停止処理 (Workup) 方法によっては、トリチル基の再結合が観察された。より効率的な脱トリチル基の方法が望まれる他、脱ベンジル保護を先に行うほうがアミノ基の塩基性が下がるため、脱離しやすいことが考えられるため、脱保護の方法による影響についても今後検討する必要がある。一方、ベンゾピレン (BaP) の付加体合成では、ピレノールから始める合成が適しており、ジオールエポキサイドの合成までの方法論が明らかになった。既知文献とは、反応条件を異なることがあるため、さらに詳細に反応条件の検討を行っていく。また C8,N2 の付加体の他 O6 の付加体の代表である、O6 - グリコール酸 - dG の付加体の合成を進めた。ミツノブ反応による O6 位の付加体生成反応では、不純物との分離が困難であり、またアミダイトの1つ手前の合成ステップにおいても、不純物との分離が困難である結果となった。これにおいても他の方法論が必要であるが、ベンゾトリアゾールを用いる不可体生成反応は進行しなかったため、他の方法を現在検討中であ

る。

出水は DNA アダクトのホスホロアミダイト体を合成することを最終目標として、そのキーとなる反応である Buchwald-Hartwig 反応に着目し、その反応条件の検討を行った。今回用いたヘテロサイクリックアミン類は比較的高い構造を有しており、そのため、触媒やリガンドの構造的特徴の影響を受けやすいと考えられる。Xantophos は 2 つのベンゼン環それぞれに、パラジウム触媒に配位するリン原子があり、二座でパラジウムに配位するのが特徴である。ヘテロサイクリックアミン類には二座配位が可能なりガンドが有利であることが考えられる。Microwave の影響については、一般的な SN2 反応で、同様の傾向が見出されており、Buchwald-Hartwig 反応においても microwave が有用であることがわかった。今後、反応時間や照射パワーの検討などを行い、より最適な反応条件を見出すことが必要である。

(C)の発がん AOP からはずれるエピ遺伝毒性物質の検出系の開発に関しては、国立衛研の杉山が、ヒト DNMT 酵母が示す凝集反応を指標とした DNA メチル化阻害作用をもつ薬剤の検出を行っているが、本年度は FLO1 プロモーターを用いたエピ変異原応答性レポーターアッセイ系の構築を試みた。本系においても、凝集反応促進作用を有するアリザリンと同類縁体プルプリンが、濃度依存的に凝集性と FLO1 レポーター活性を誘導することを明らかにした。この結果は、凝集試験以上にハイスループット性並びに精度向上が期待できる本レポーターシステムをエピ遺伝毒性物質の評価系に活用できる可能性を示したもので、成果としては大きいと判断される。

試験法として真核微生物酵母をプラットフォームとした本エピ遺伝毒性物質の評価系を考察した場合、凝集試験および FLO1 レポーターアッセイ共に極めて簡便なアッセイ方法であることから、食品添加物等の化学物質全般のスクリーニング毒性試験系として好適であり、

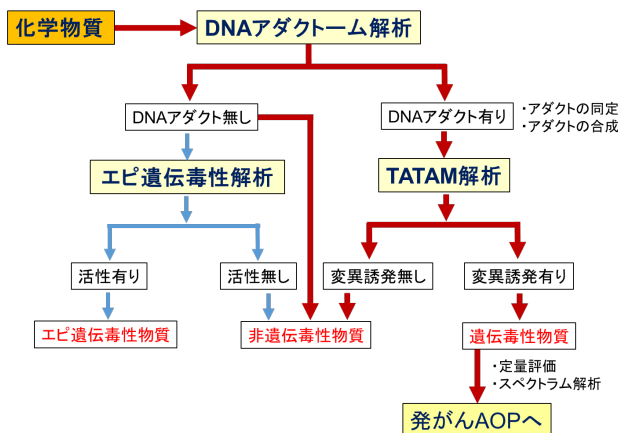
また動物愛護管理法が定める「3R」にも資する点でもその有用性は高いとも言えよう。

## E. 結論

本研究では、新たな遺伝毒性発がん物質の評価法として、化学物質と生体分子の相互作用から、個体・集団レベルでの毒性発現（AOP）までの一連の生物学的な反応を関連づけ、それに基づく統合的試験法と評価方法（IATA）を開発し、化学物質の安全性評価の科学的合理化と、実験動物削減を目指す。化学物質による発がんのAOPの分子初期事象（MIE）は、遺伝毒性・変異原性で有り、このプロセスは「化学物質→DNA付加体（損傷）→突然変異」に集約される。

一方、この仮定されたMIEが定性・定量的に正当であるかを検証する必要があると考えられる。そのためには「化学物質→突然変異」のデータを取得、解析する必要がある。今後、実際の*in vitro*試験、もしくは文献情報により対象とする化学物質の遺伝子突然変異誘発能に関する情報を収集する。最終的にはこれら研究結果と、化学物質構造から、*in silico*で化学物質の変異原性を予測するモデルを開発し、試験の迅速化、3Rに貢献する。

また、このMIEを化学物質の遺伝毒性評価の新たなスキームにする。



DNA付加体解析により、特定の付加体が検

出されなければ、非遺伝毒性物質とすることができる。この場合、エピ遺伝毒性の可能性が残されているので、本研究班で開発中のエピ遺伝毒性解析を行い、非遺伝毒性発がん物質の可能性を検討する。一方、DNA付加体が検出されたからといっても、変異原性があるわけではない。修復や、損傷乗り越えDNA合成がおきれば突然変異は起こさない。おそらく、大部分のDNA付加体は修復されるが、その一部は修復されず、突然変異を引き起こすものと考えられる。TATAM法はこれら性質を定性・定量的に解析できる。十分に特徴的な突然変異がみとめられた場合、本化学物質は遺伝毒性物質（遺伝毒性変異原物質）と判断され、次の発がんAOPのスキームに載る。また、TATAM法で明らかな突然変異誘発が認められない場合、本化学物質は遺伝毒性非変異原物質（非遺伝毒性物質）とし、発がんの懸念は無いと判断することができる。

このような分子レベルで可視化された変異メカニズムの情報の蓄積が、最終的に*in silico*で化学物質の変異原性・発がん性の定量的予測を実現させるものとする。変異原性は化学物質にあるのではなく、化学物質によって引き起こされるDNA付加体（損傷）にある。この当たり前の考え方は、遺伝毒性（変異原性）の評価の合理化にも繋がると考える。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 誌上発表

1. Suzuki T, Matsumoto K, Honma M, Nohmi T. Impact of DNA polymerase  $\zeta$  mutations on genotoxic thresholds of oxidative mutagens. *Mutat Res.* 2018, 828:10-14. doi:



- 10.1016/j.mrgentox.2018.02.001.
2. You X, Ando T, Xi J, Cao Y, Liu W, Zhang X, Honma M, Masumura K, Luan Y. Gene mutation and micronucleus assays in gpt delta mice treated with 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether. *Mutagenesis*. 2018 Feb 15. doi: 10.1093/mutage/gey002.
  3. Petkov, PI, Schultz TW, Honma M, Kirilov K, Kotov S, Mekenyan OG. Predicting in vitro genotoxicity by mouse lymphoma L5178Y thymidine kinase mutation assay (MLA): Accounting for simulated metabolic activation of chemicals. *Computational Toxicology*. 4, 45-53, 2017. Doi:10.1016/j-comtox.2017.10.002
  4. Gadaleta D, Porta N, Vrontaki E, Manganelli S, Manganaro A, Sello G, Honma M, Benfenati E. Integrating computational methods to predict mutagenicity of aromatic azo compounds. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 35, 239-257, 2017. doi: 10.1080/10590501.2017.1391521.
  5. 本間正充、食品中に含まれる化学物質のリスクアセスメントと遺伝毒性評価、FFI ジャーナル、Vol.223 No.01、8-16、2018
  6. Grúz P, Shimizu M, Sugiyama KI, Honma M. Mutagenicity of  $\omega$ -3 fatty acid peroxidation products in the Ames test. *Mutat Res*. 2017 Jul;819:14-19. doi:10.1016/j.mrgentox.2017.05.004.
  7. Kanemaru Y, Suzuki T, Sassa A, Matsumoto K, Adachi N, Honma M, Numazawa S, Nohmi T. DNA polymerase kappa protects human cells against MMC-induced genotoxicity through error-free translesion DNA synthesis. *Genes Environ*. 2017 Jan 7;39:6. doi: 10.1186/s41021-016-0067-3.
  8. Sugiyama, K., Furusawa, H., Grúz, P. and Honma, M: Detection of epigenetic mutagens including anthracene-derived compounds using yeast FLO1 promoter GFP reporter gene assay, *Mutagenesis* 32, 429-435 (2017).
  9. Sugiyama, K., Furusawa, H., Grúz, P. and Honma, M: Functional role of DNA methylation at the FLO1 promoter in budding yeast, *FEMS Microbiol. Lett*. 364, doi: 10.1093/femsle/fnx221 (2017).
  10. Hashimoto, Akiko; Yamanaka, Takehiro; Takamura-Enya, Takeji, (2017) Synthesis of novel fluorescently labeled water-soluble fullerenes and their application to its cellular uptake and distribution properties *Journal of Nanoparticle Research*, 19: 402
  11. Kazue Someya, Hiroko Nakatsukasa, Minako Ito, Taisuke Kondo, Kenn-ichi Tateda, Takashi Akanuma, Ikuko Koya, Tsukasa Sanosaka, Jun Kohyama, Yu-ichi Tsukada, Takeji Takamura-Enya, Akihiko Yoshimura, (2017) Improvement of Foxp3 stability through CNS2 demethylation by TET enzyme induction and activation *International Immunology*, 29: 365-375
  12. Akiba N, Shiizaki K, Matsushima Y, Endo O, Inaba K, Totsuka Y. Influence of GSH S-transferase on the mutagenicity induced by dichloromethane and

1,2-dichloropropane. Mutagenesis, 2017, 32:455-462.

#### 学会発表

1. 本間正充、Ames/QSAR International Collaborative Study、口頭、第7回国際遺伝毒性試験国際ワークショップ、東京、2107/11/8
2. 本間正充、In Silico Approaches in Genetic Toxicology -Progress and Future- 口頭、第12回国際環境変異原学会、韓国、2017/11/15
3. 本間正充、AOP-based Evaluation of Chemical Mutagenicity and Development of New Endpoints and Models 口頭、第12回国際環境変異原学会、韓国、2017/11/14
4. 本間正充、In Silico Approaches in Genetic Toxicology -Progress and Future- 口頭、第17回中国環境変異原学会年次大会、中国、2017/12/7
5. 本間正充、QSARの最近の進歩について、第2回ICH M7関連ワークショップ、東京、2017/5/23
6. 戸塚ゆ加里：DNA付加体形成と突然変異誘発 第44回日本毒性学会（横浜 2017年7月）
7. Totsuka Y, Lin Y, He Y, Sato H, Matsuda T, Matsushima Y, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Shan B, Nakagama H: Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis) EEMGS (ノースカロライナ、2017年9月)
8. Totsuka Y : Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis 第76回日本癌学会学術総会(横浜 2017年9月)
9. 今井俊夫、落合雅子、成瀬美衣、松浦哲也、戸塚ゆ加里、筆宝義隆：マウス正常上皮の3次元培養系を用いる化学発がん家庭の早期変化検出系 第76回日本癌学会学術総会（横浜 2017年9月）
10. 佐藤 春菜、落合雅子、今井俊夫、戸塚ゆ加里：マウス正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性解析法の構築 第46回日本環境変異原学会（東京、2017年11月）
11. 前迫裕也、善家 茜、アスマ エルザワハリ、古川英作、加藤 護、白石航也、河野隆志、椎崎一宏、戸塚ゆ加里：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46回日本環境変異原学会（東京、2017年11月）
12. 秋場 望、佐藤春菜、松田知成、遠藤 治、稲葉一穂、戸塚ゆ加里：モデル生物を用いた化学物質により誘発される変異シグネチャーの解析 第46回日本環境変異原学会（東京、2017年11月）
13. 神尾翔真、斎藤春吾、渡邊昌俊、椎崎一宏、戸塚ゆ加里：生体を模倣したナノマテリアルの新規毒性評価システムの確立 第46回日本環境変異原学会（東京、2017年11月）
14. Totsuka Y : Adductomics IWGT 2017（東京、2017年11月）
15. Totsuka Y, Lin Y, He Y, Sato H, Matsuda T, Matsushima Y, Kato M, Elzawahry A, Totoki Y, Shibata T, Shan B, Nakagama H: Exploration of esophageal cancer etiology using DNA adductome analysis

12thICEM-5thACEM (仁川、2017年11月)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

16. Totsuka Y : Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. International Conference on Environmental Health and Environmental-related Cancer Prevention 2017 (つくば、2017年12月)
17. Totsuka Y : Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. 18th All India Congress of Cytology and Genetics (コルカタ、2018年1月)
18. 中村真生, 鵜飼明子, 佐々彰, 高部道仁, 福田隆之, 高村岳樹, 本間正充, 安井学; TK6 及び変異株を用いたヌクレオチド除去修復機構におけるゲノム全体修復と転写共役修復を区別する方法の開発. 日本環境変異原学会第46回大会, 東京 (2017年11月)
19. Sugiyama, K., Furusawa, H., Grúz, P. and Honma, M: Detection of epigenetic mutagens by GFP reporter activity driven by yeast FLO1 promoter, Environmental Mutagenesis & Genomics Society 48th Annual Meeting (2017, 9 ローリー・米国).
20. 杉山圭一: エピジェネティック変異原試験系の開発、日本環境変異原学会第46回大会 (2017・東京) (2017, 11).
21. ナノダイヤモンド-臭化エチジウム複合体の細胞毒性評価, ○森 みずき・高村 岳樹、日本化学会 第98春季年会 (2018, 船橋)
22. 蛍光フラーレンの合成と評価. 01.口頭A講演. ○橋本 亜紀子・山中 岳寛・高村 岳樹、日本化学会 第98春季年会 (2018, 船橋)