

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

分担研究課題名：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

分担研究者： 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

ジクロロメタンおよび 1,2-ジクロロプロパン(1,2-DCP)は、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、これらハロゲン系炭化水素と印刷業従事者で多発するヒト胆道がんとの関係は未だ良くわかっていない。ハロゲン系炭化水素の代謝活性化にはグルタチオン-S-転移酵素(GSTT1)が関与することが報告されているが、昨年度の研究の結果から、GSTT1 は 1,2-DCP の代謝活性化には寄与しないことが示唆された。そこで、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。主成分解析(PCA)の結果、コントロールと DCP 暴露群で綺麗に 2 つのクラスターに分離されることがわかった。PCA>Loading plot の結果、DCP 暴露に関するものとして複数の付加体が検出された。このうち、[m/z 368.1560; M+H](DCP22)と [m/z384.1514; M+H](DCP86)に注目してみたところ、両者とも DCP 暴露によりそれぞれの存在レベルが顕著に上昇していることが確認できた。DCP22 及び DCP86 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、DCP22 はデオキシアデノシン由来の、DCP86 はデオキシグアノシン由来の付加体であることが推測できた。また、[m/z 117.05; M+H]のフラグメントピークが DCP22 及び DCP86 の両方に観察されており、このことから、同じ官能基がそれぞれ dA 及び dG に付加した付加体であることが推測された。

A . 研究目的

ジクロロメタンやジクロロエタン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いる。また、ジクロロメタンおよび 1,2-ジクロロプロパン(1,2-DCP)は、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、これらハロゲン系炭化水素と印刷業従事者で多発するヒト胆道がんとの関係は未だ良くわかっていない。ハロゲン系炭化水素の代謝活性化にはグルタチオン-S-転移酵素

(GSTT1)が関与することが報告されているが、昨年度の研究の結果から、GSTT1 は 1,2-DCP の代謝活性化には寄与しないことが示唆された。そこで、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。

B . 研究方法

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に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シドに分解し、生成するDNA付加体を質量分析機器(AB SCIEX, TripleTOF TT6600)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(Peak View; AB SCIEX)により行った。

C. 研究結果・考察

1,2-DCPを曝露したバクテリア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、コントロールとDCP暴露群で2つのクラスターに分類されることがわかった。次にPCA解析のLoading plotの結果から、1,2-DCPに相関する付加体の探索を行ったところ、複数の付加体が検出された(図2)。このうち、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、両者ともDCP暴露によりそれぞれの存在レベルが顕著に上昇していることが確認できた(図3)。DCP22及びDCP86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を図4に示す。両者とも、デオキシリボース骨格に由来する-116.0474のneutral lossが観察された。また、DCP86ではグアニンに相当する[m/z 152.0562]のフラグメントが、DCP22ではアデニンに相当する[m/z 136.0617]の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。また、[m/z 117.05; M+H]のフラグメントピークがDCP22及びDCP86の両方に観察されており、このことから、同じ官能基がそれぞれdA及びdGに付加した付加体であることが推測された。

D. 健康危機情報

なし

E. 研究発表

論文発表

1. 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. 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)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. 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）

7. 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）
8. 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）
9. Totsuka Y : Adductomics IWGT 2017（東京、2017年11月）
10. 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）
11. 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）
12. 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）

F. 知的所有権の取得状況

なし

図1 1,2-DCP 曝露したバクテリアのアダクトーム解析結果

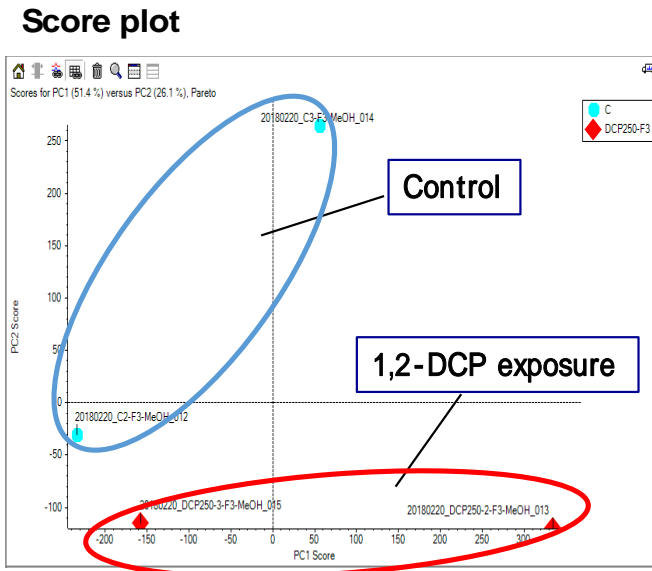


図3 抽出した付加体の存在レベル

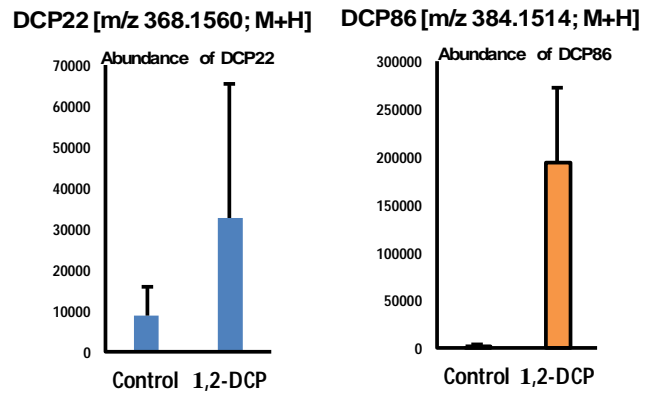


図2 1,2-DCP曝露と相関する付加体の探索結果

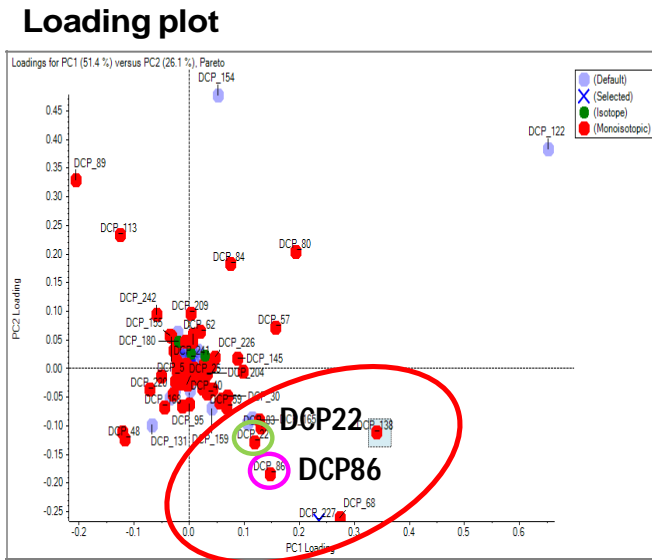


図4 抽出した付加体の組成式とMS/MSフラグメント

