

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ゆえに、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。本研究は、XPA/XRCC1 2重欠損TK6株を、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）試験に応用した。2重欠損TK6株を使うと、アルキル化剤による変異原性の検出感度が従来のtk試験（野生型TK6株のみを使う）と比べ10倍程度上昇していた。この新しいtk試験を使いオーラミン(Auramine 0)の変異原性を検出できた。

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ム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、まずオーラミンを選択した。オーラミンは、Ames testでは変異原性陽性になるのに、哺乳動物細胞では変異原性陰性になる。この実験結果は、細菌を使ったバイオアッセ

イによる変異原性の偽陽性と一応説明されてきた。

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。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。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）。

武田グループは、DNA修復遺伝子の多重欠損株を創る。XRCC1とXPAは、重複したDNA損傷修復機能を持つ。すなわちXRCC1欠損はXPAによって部分的に相補され、一方、XPA欠損はXRCC1によって部分的に相補される。ゆえにXPA/XRCC1 2重欠損株は、XPA欠損株およびXRCC1欠損株よりも多様な変異原性化学物質（様々な種類のDNA損傷を作る）の変異原性を高感度に検出するのに有利である。DNA polymerase (Pol) は、DNA損傷を持った鋳型鎖においてDNA複製が停止したときに、複製DNAポリメラーゼに代わって損傷鋳型鎖を使って正確にDNA合成するDNAポリメラーゼである。Pol が欠損すると、損傷鋳型鎖を使ってDNA合成する時の変異率が増加する。すなわちPol 欠損細胞は、野生型細胞に比べ、化学物質の変異原性をtk試験によってより高感度に検出できる。以上の知見から、武田グループは、XPA/XRCC1/Pol の3重欠損株を創る。

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）ヒトTK6細胞株から遺伝子破壊株の作製

図1は、我々が創った遺伝子破壊株のリストである。このリストは、TK6コンソーシアムというweb site（<http://www.nihs.go.jp/dgm/tk6.html>）に公開されている（図1）。

（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 2重欠損TK6細胞(XPA^{-/-}/XRCC1^{-/-}細胞)の作製とその表現型の確認

紫外線損傷やDNA架橋剤（例、抗がん剤、シスプラチ

ン)はヌクレオチド除去修復経路(NER)のみが修復し塩基除去修復経路(BER)は修復できないとされていた。我々は、NERを開始するのに必須なXPAとBERに重要な働きをうるXRCC1に両方を欠損したXPA^{-/-}/XRCC1^{-/-} TK6細胞を創った。XPA^{-/-}/XRCC1^{-/-} TK6細胞は、XPA^{-/-}細胞よりも紫外線や架橋剤により高い感受性を示した(図4、5)。以上の実験結果から紫外線や架橋剤による損傷が、NERが開始できないにはBERによって修復されると結論した。したがってBERとNERの2重欠損TK6細胞を使った変異原性試験は、多様なDNA損傷を作る化学物質をこの1種類の細胞で検出できるだけでなく、DNA架橋剤を従来の手法に比べて10倍以上の高感度に検出できるのである(本間グループの報告書参照)。

(4) XPA/XRCC1/PoI の3重欠損TK6株の作製

XPA/XRCC1/PoI の3重欠損株を数クローン創った。細胞増殖速度は、野生型に比べ20%遅いが、変異原性試験に十分使えることを確認した。3重欠損TK6株を使った変異原性試験(tk試験)を新たに樹立する為に本間グループに譲渡した。

(5) 紫外線やDNA架橋剤による損傷を修復する、新規修復経路の発見

従来、紫外線損傷(CPDと6-4光産物)はミトコンドリア(NERが機能しない)では修復されないと考えられてきた。抗体を使った新規紫外線損傷検出方法(CPDと6-4光産物の区別して測定)を使い、紫外線損傷がミトコンドリアDNAにおいて修復されるか否かを調べた。その結果、6-4光産物がミトコンドリアDNAで迅速に修復されていることを発見した(図6)。この修復を過去に見逃したのは、CPDと6-4光産物を区別しないで損傷の量を測定したからである(CPDの方が6-4光産物より数倍多い)。CPDはミトコンドリアDNAの複製を阻害しないが、6-4光産物は阻害する。したがって「6-4光産物がミトコンドリアDNAで迅速に修復されている」ことの発見は、DNA複製を含むミトコンドリアDNA維持機構の理解に重要である。図6の実験結果と生化学的実験結果から図7に示した機構によって、6-4光産物が修復されていると結論した。

(6) シスプラチンの腎毒性はミトコンドリアDNAの損傷による

Top1mt欠損TK6細胞株の解析から、ミトコンドリアのみ存在するトポイソメラーゼ1(Top1mt)はDNA架橋を修復することが解った。DNA架橋は、抗がん剤(例、シスプラチン、マイトマイシンC)として広く使われている。我々は、シスプラチンの腎毒性はミトコン

ドリアDNAの損傷が原因か否かを調べた。そしてTop1mt^{-/-}マウスはシスプラチンに感受性であり尿細管上皮が強く障害されることを確認した。Top1mt^{-/-}マウスは、ミトコンドリアDNAを障害する化学物質を検出するのに有効であると結論した。

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

合計100種類以上のDNA修復酵素の欠損株をTK6から創り、その情報を公開した。既に国内の3社から欠損株の譲渡依頼があり、京都大学の手続きにのっとり譲渡した。

PoI 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。以上の理由から、XPA/XRCC1の2重欠損TK6株に比べ、XPA/XRCC1/PoIの3重欠損TK6株を使えば、tk試験による変異原性の検出感度をさらに数倍改善しうる。

シスプラチンは、DNA複製を邪魔することによって増殖細胞（悪性腫瘍を含む）を殺す。シスプラチンが増殖しない細胞（腎臓尿管や末梢神経）にどのような機序で副作用を發揮するか、従来解析しようがなかった。我々は、ミトコンドリアDNA修復にのみ関与する酵素（ミトコンドリア特異的トポイソメラーゼ1 = Top1mt）が欠損したマウスを米国NIHから譲渡してもらった。この欠損マウスを解析すれば、シスプラチンの、ミトコンドリアDNA毒性を特異的に解析できる。

行政や化学産業のニーズは、コンピューター(AI)により新規化合物の化学構造から変異原性を予測することである。この予測(QSARと呼ばれる)の為に、質の高い学習データが必要である。現在のところ、AIの学習データには世界中で本間博士らが収集したAmes testの結果(~20,000化合物)が使われている。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変異原性検出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。この範疇の化学物質が「変異原性偽陽性」ではなく陽性であることが証明できれば、学習データの質を高めることができる。

E . 結論

XRCC1/XPA 二重欠損細胞 (*XPA*^{-/-}/*XRCC1*^{-/-} 細胞) は、tk試験に応用した場合に、化学物質の変異原性の検出感度が10倍上がることを確認した。tk試験は特異性が高く比較的容易であることから、化審法で規定され従来型tk試験(野生型のみを使う)に二重欠損細胞を使うtk試験を併用すると、従来型tk試験の感度を大きく改善できる。

Top1mt欠損マウスは、休止期の細胞から成る様々な臓器(神経、腎臓、肝臓、筋肉など)でミトコンドリアDNAを損傷することによって毒性を發揮する化学物質を同定するのに有用である。

F . 健康危険情報

該当なし

G . 研究発表

1. 論文発表

1) Liton KS, Kim S, Kang H, Akter S, Choi K, Sakuma T, Yamamoto T, Sasanuma H, Hirota K,

Nakamura J, Honma M, Takeda S. (2018) Differential micronucleus frequency in isogenic human cells deficient in DNA repair pathways is a valuable indicator for evaluating genotoxic agents and their genotoxic mechanisms. *Environ Mol Mutagen.* (in press)

2) 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* 8 (20): 33457-33474.

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

Generation of *Pol1 η* ^{-/-} TK6 cells

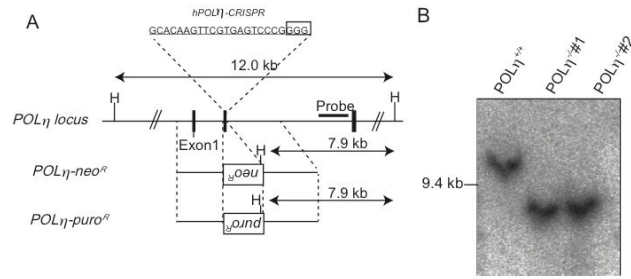


図2 (A) *POL1 η* ^{-/-}細胞の作製方法、(B) ゲノムDNAのサザンブロットによる遺伝子破壊(#1, #2クローン)の確認

(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*POL1 η* 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^R*と*PURO^R*は選択マーカー遺伝子。(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でサザンブロットハイブリダイゼーションした。*NEO^R*と*PURO^R*が両対立遺伝子のエクソン2にそれぞれノックインすると、正常な*POL1 η* 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。

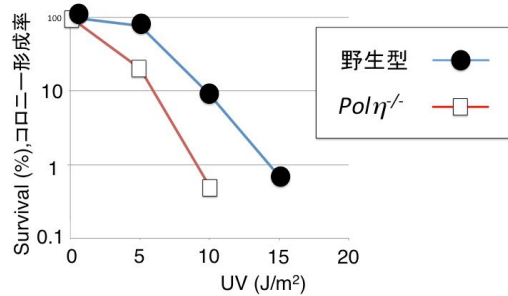


図3 紫外線感受性の試験結果。

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。

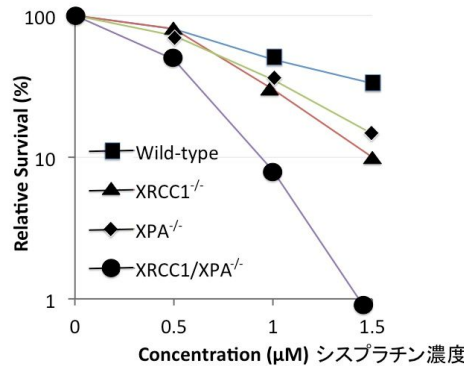


図4 シスプラチン感受性試験結果

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。

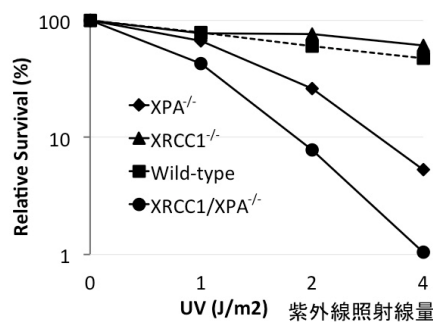


図5 紫外線感受性の試験結果

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。

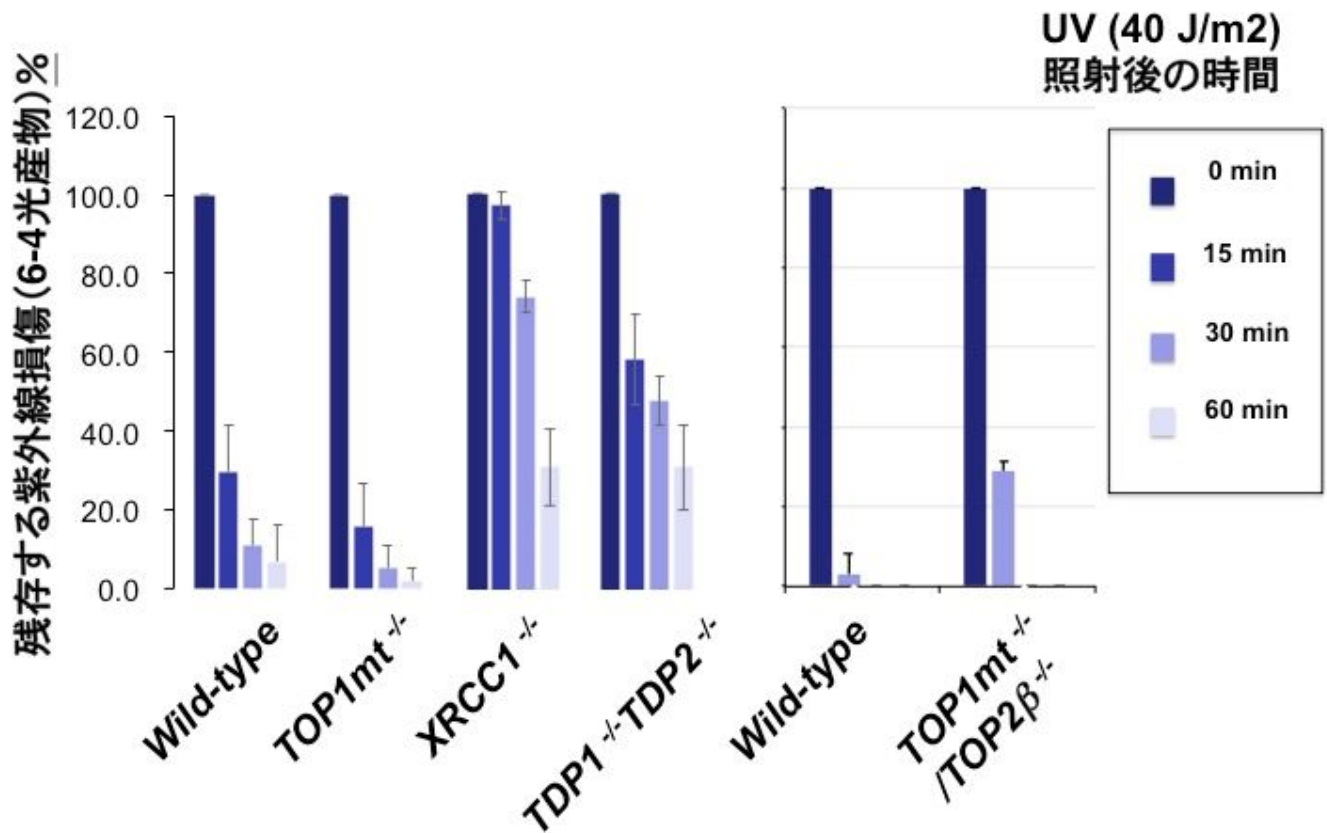


図6 ミトコンドリアDNAに生成された紫外線損傷は修復される
 紫外線損傷は、6-4 光産物 (6-4PP)と cyclobutane pyrimijine dimer (CPD)と呼ばれる 2種類がある。図に示した遺伝子型の TK6 細胞に 2 J/m² の紫外線照射した後に、直後、15分、30分、60分にミトコンドリア DNA に存在する CPD と 6-4 光産物を定量した。その結果、CPD は修復されないが、6-4PP は修復されることが解った。XRCC1^{-/-} 細胞や TDP1^{-/-}/TDP2^{-/-} 2重欠損細胞、ミトコンドリア型 Top1^{-/-}/Top2^{-/-} 2重欠損細胞では野生型に比べ修復が遅れていることから、6-4 光産物の修復にはミトコンドリアでは XRCC1、TDP1、TDP2、トポイソメラーゼの各修復酵素が関与していることがわかる。

紫外線損傷とシスプラチン損傷

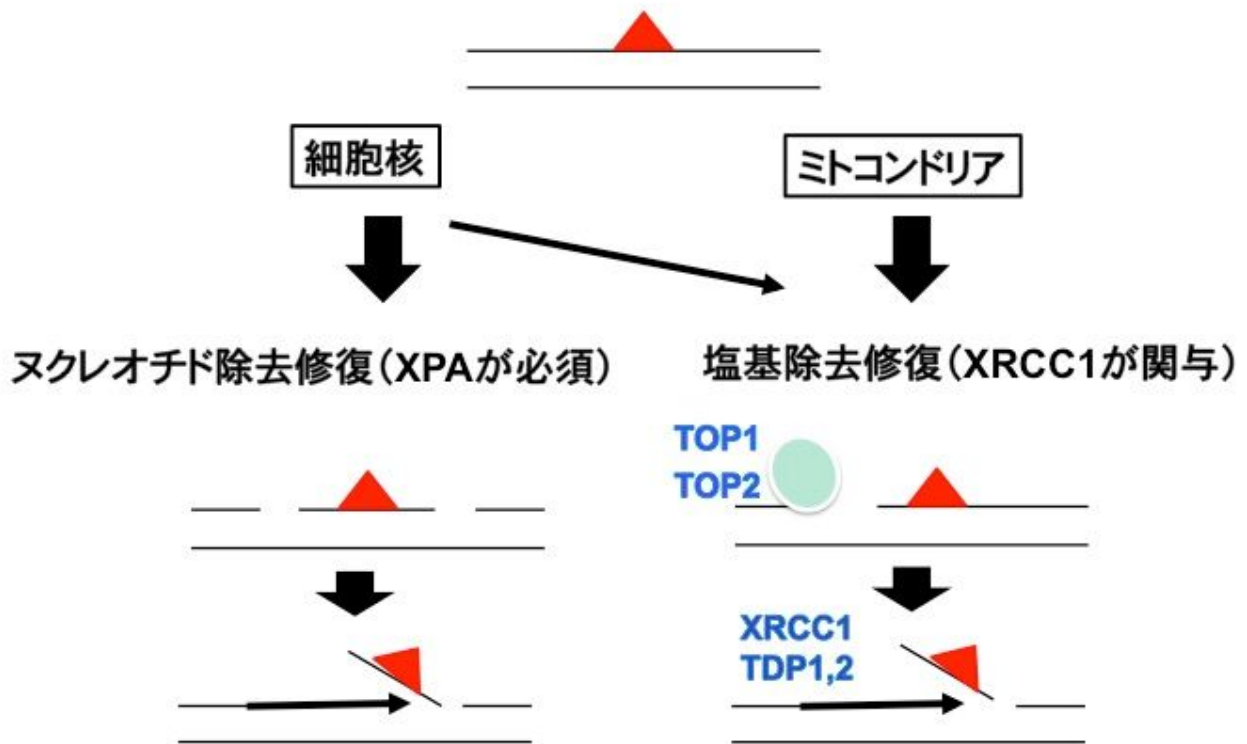


図7 ミトコンドリアDNAに生成された紫外線損傷は修復される

紫外線損傷は、6-4 光産物 (6-4PP) と cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) と呼ばれる 2 種類がある。6-4 光産物は、ミトコンドリアにおいて図の機序で修復される。修復は、トポイソメラーゼ (TOP1 もしくは TOP2) が紫外線損傷付近の DNA において 1 本鎖切断を起こすことから始まる。1 本鎖切断は、塩基除去修復経路が修復する。この修復のときに、紫外線損傷も除去されることを生化学的実験で確認した。1 本鎖切断に共有結合したトポイソメラーゼは、TDP1 や TDP2 と呼ばれる加水分解酵素が除去する。