

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、以下の2点の問題がある：① 感度が低い、② 変異原性の機序（化学物質が作るDNA損傷の種類）を解析できない。2つの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。

我々は、① 感度を改善することを目指し、2種類のDNA損傷修復酵素（XPA、XRCC1）の2重欠損株をヒトTK6細胞株から創った。この2重欠損TK6株を、化審法で利用が定められた変異原性検出試験、チミジンキナーゼ遺伝子（TK）試験に応用した。この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変異試験（野生型TK6株のみを使う）と比べ5倍程度上昇していた。分担研究者の本間博士は、この新しいTK変異試験を使い、野生型TK6株を使った変異原性試験によって従来 変異原性陰性とされてきた、オーラミンとパラフェニレンジアミンの変異原性を検出した。

我々は、② 変異原性の機序を解析するバイオアッセイを樹立することを目標に100種以上のDNA修復ミュータントを作製し、ネットに公開した。ミトコンドリアDNAのDNA損傷の効果を解析できる、新たなバイオアッセイを樹立した。

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、チミジンキナーゼ変異試験（TK変異試験）とは、細胞を化学物質に曝露し、チミジンキナーゼ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。野生型TK6細胞の代わりにDNA修復ミュータントをTK変異試験に使うという最小限の変更によって、既存のTK変異試験の感度を向上する行政的必要性は高い。

我々は、感度を改善することを目指し、2種類のDNA損傷修復酵素（XPA、XRCC1）の2重欠損株を

TK変異試験に応用することを選択した。その応用の理由を以下に記載する。塩基損傷は、修復されないまま残るとDNA複製時に損傷乗越え経路によって点変異に変換される。損傷乗越えが、変異原性化学物質が点変異を作る主要な機序である。点変異は、化審法で規定された変異原性検出試験のなかで、TK変異試験によって最も高感度に検出される。塩基除去修復とヌクレオチド除去修復がすべての種類の塩基損傷を修復する。XRCC1は前者の修復経路を促進し、XPAは後者に必須である。故に、この2種類のDNA修復酵素が両方欠損した $XPA^{-/-}/XRCC1^{-/-}$ TK6細胞は、多様な種類の変異原性を高感度に検出できる。

武田グループは、野生型TK6細胞の代わりに $XPA^{-/-}/XRCC1^{-/-}$ TK6細胞を使うとどれだけTK変異試験の感度が改善するかを解析する目的で、典型的変異原性化学物質としてcis-diamminedichloroplatinum (II) (cisplatin)、mitomycin-c (MMC)、methyl methane sulfonate (MMS) を選択し、TK変異試験を実施した。本間グループは、菌を使うエイムス試験では変異原性陽性を示すが、哺乳類細胞を用いるマウスリンフォーマ試験では変異原性陰性を示すような、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変異試験を応用するモデル被験物質として選択した。この範疇に属する化学物質として、まずオーラミン、マラカイトグリーン、ナフチルエチレンジアミン、パラフェニレンジアミンを選択した。そして、これら

の化合物は変異原性偽陽性が実は変異原性陽性である可能性を調べた。

本間グループがモデル被験物質として選択したオーラミンは、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))。パラフェニレンジアミンは、白髪染めに使われている。IARCにおいてヒトに対して発がん性が分類できないグループ3と分類されている。

武田グループは、*XPA*^{-/-}/*XRCC1*^{-/-}株を解析する過程で、*XRCC1*が紫外線損傷 (6-4光産物) とシスプラチン損傷を、ヌクレオチド除去修復 (XPAが必須) とは独立して修復していることが解った。従来の学説では、6-4光産物とシスプラチン損傷は、ヌクレオチド除去修復によってのみ修復され塩基除去修復では修復されないと考えられてきた。*XRCC1*^{-/-}細胞が紫外線損傷やシスプラチンに感受性を示す場合があることは知られていたが、そのデータは*XRCC1*がヌクレオチド除去修復にも関与することがあると解釈されてきた。我々は、ヌクレオチド除去修復が全く機能しない*XPA*^{-/-}細胞に比べて*XPA*^{-/-}/*XRCC1*^{-/-}細胞はその紫外線感受性とシスプラチン感受性が大きく上昇したことから、細胞核において紫外線損傷とシスプラチン損傷を塩基除去修復が修復するという仮説を着想したのである。申請者は、この仮説は正しいことを証明し、トポイソメラーゼIが紫外線損傷の近傍で塩基除去修復を活性化することを証明した (図1)。なぜこれまで『紫外線損傷とシスプラチン損傷を塩基除去修復が修復する』可能性が見過ごされてきたのかその理由も明らかにした。理由とは、ヌクレオチド除去修復を解析する時に使う皮膚由来繊維芽細胞はトポイソメラーゼIの発現が非常に低いからである。

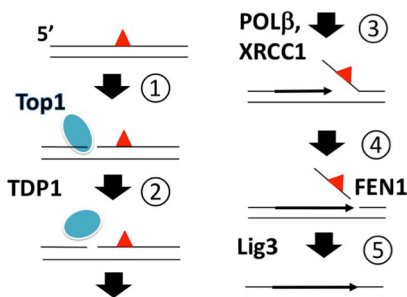


図1 紫外線損傷がトポイソメラーゼI (Top1) で活性化される塩基除去修復によって修復される

赤三角は、6-4光産物 (6-4PP)を示す。Top1は恒常的に1本鎖切断と切断の再結合を繰り返す。6-4PPの近傍にTop1が1本鎖切断すると、しばしば再結合できなくなる (6-4PPがDNAの構造を歪ませる)。Top1が1本鎖切断の3'末に共有結合したままになる (①)。この共有結合はTDP1と呼ばれる加水分解酵素によって切断され、1本鎖切断からTop1が除去される (②)。1本鎖切断が塩基除去修復を活性化し、1本鎖切断3'末から修復DNA合成が始まる。DNA合成は多数塩基続き紫外線損傷を含む鎖をフリップする (③)。紫外線損傷を含む鎖はFEN1 DNA切断酵素によって除去され (④)、Ligase IIIの働きによってDNA修復反応が完了する (⑤)。

我々は、ミトコンドリアDNA (mtDNA) に生じたシスプラチン損傷を塩基除去修復が修復する可能性を実験的に検証した。ヌクレオチド除去修復はミトコンドリアで機能しない故に、従来、mtDNAに生じたシスプラチン損傷は修復されないとされてきた。しかし塩基除去修復がシスプラチン損傷も除去できるとすると、塩基除去修復はミトコンドリアで機能するが故に、6-4光産物とシスプラチン損傷がミトコンドリアでも修復されている可能性がある。この可能性を検証した。

B. 研究方法

武田グループ

遺伝子破壊細胞の作製

武田グループは、DNA修復遺伝子の(多重)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。

細胞生存率の測定

細胞生存率を、処理してから24時間後のRelative Increase Cell Count (RICC)を下記の式を用いて算出した。陰性対照のRICCを100%と定義した。RICC(%) = 処理した培養細胞における細胞数の増加 / 対象培養細胞における細胞数の増加 × 100

TK変異試験

TK変異試験は、OECDガイドライン (TG490) を参考

に、用量設定試験から始め、本試験の順に実施した。処理細胞数は 10^7 細胞、処理時間は4時間である。TK変異試験の本試験の陰性対照群は2系列、被験物質群は1系列で実施した。形質発現期間は3日間とした。統計解析は大森法 (Omori et al., *Mutat. Res.* 517,199-208 (2002)) を用いた。

ミトコンドリアDNAのコピー数測定 (ミトコンドリアにおけるシスプラチン損傷の修復の評価)

塩基除去修復は、その分子機構が詳細に解析され、その損傷認識機構が紫外線損傷を認識できないことが解明されている。武田グループは、文部科学省の研究助成を受けて『紫外線損傷の近傍においてトポイソメラーゼIが1本鎖切断を作り、切断が紫外線損傷の上流に生じた場合には塩基除去修復が紫外線損傷を除去できる』を解明した (図1)。次に塩基除去修復がミトコンドリアDNA (mtDNA) を修復する可能性を調べた。まずTK6から $XPA^{-/-}/POL\beta^{-/-}$ 株を、CRISPR/Cas9とガイドRNA、遺伝子破壊コンストラクトを用いて創った。次に、ミトコンドリアにおいて特異的に機能するトポイソメラーゼI (Top1MT) のDNA修復機構を解析する為に、CRISPR/Cas9とガイドRNAを用いてヒトMCF-7乳癌細胞株からTop1MT欠損 ($TOP1MT^{-/-}$) 細胞と $XPA^{-/-}$ 細胞を創った。shRNAを発現できるレンチウイルスをMCF-7に感染させ、LigaseIIIとFen1 (図1) をそれぞれ発現低下した細胞を作った。遺伝子破壊や発現低下はウエスタンブロット解析によって確認した。 $TOP1MT^{-/-}$ 細胞のmtDNA修復能を解析する為に、 $4J/m^2$ 紫外線を照射後様々な時間に細胞を回収し、キット (BioVision Ltd) を使ってmtDNAを精製し、mtDNA上の紫外線損傷 (6-4光産物とシクロブタン型ピリミジンダイマー) の量を、ELISAを使って定量した (金沢大学薬学研究科、若杉光生 准教授との共同研究)。 $TOP1MT^{-/-}$ 細胞をシスプラチンに10日間曝露後に、mtDNAのコピー数をdigital PCRにて測定した (ThermoFisher Ltd)。

本間グループ

TK変異試験

TK変異試験は、OECDガイドライン (TG490) を参考に、用量設定試験から始め、本試験の順に実施した。処理細胞数は 10^7 細胞、処理時間は4時間、陽性対照物質はシスプラチン (非代謝活性化条件) とシクロホスファミド (代謝活性化条件) を使用した。実験の手法は、武田グループのそれと同じである。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

(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2)。3社から一部細胞の譲渡依頼があった。

Table 1: TK6 mutants (JAN. 2019⁶)

Gene name	Ref.	Laboratory	Gene name	Ref.	Laboratory
SSBP1	14	KYOTO	PARP2 +/-		KYOTO
SSBP1, BRCA1	14	KYOTO	PDIP38		KYOTO
SSBP1, MRE11		KYOTO	PDIP38, POLH		KYOTO
Abnans		KYOTO	PDIP38, POLH, XPA		KYOTO
ALCL		KYOTO, TOKYO	PDIP38, PrimPol		TOKYO
ALCL, PARP1		KYOTO	PDIP38, XPA		KYOTO
APLF		TOKYO	PIAS1	15	KYOTO
APRF, XRCC1		TOKYO	PIAS1, PIAS4	15	KYOTO
ATM		TOKYO	PIAS1, PIAS4	15	KYOTO
ATRX		KYOTO	PIAS1, PIAS4, POLH	15	KYOTO
BLM	6	NIHS	PIAS1, PIAS4, POLH, XPA	15	KYOTO
BLM, EXO1		KYOTO	PIAS1, PIAS4, XPA	15	KYOTO
BLM, MLH1		KYOTO	PIAS4, XPA	15	KYOTO
BLM, MLH3		KYOTO	PMS2		KYOTO
BLM, MUS81		KYOTO	POLB		NIHS, KYOTO
BLM, SMARCA1		KYOTO	POLD1		KYOTO
BLM, XPF		KYOTO	POLD3		TOKYO
BRCA1	14	KYOTO	POLE		KYOTO
BRCA2		KYOTO	POLH		KYOTO
BRCA1, REV1		KYOTO	POLH, PrimPol		KYOTO, TOKYO
ChIP	8	KYOTO	POLH, PrimPol, RAD54		KYOTO, TOKYO
ChIP, MRE11		KYOTO	POLH, RAD18, XPA		KYOTO, TOKYO
DNA2 +/-		KYOTO	POLH, RAD54		KYOTO, TOKYO
DNA-PKcs	9	KYOTO	POLH, XPA		KYOTO
DNA-PKcs, SMARCA1	9	KYOTO	POLL		KYOTO
ERCC6		NIHS	POLQ		KYOTO, TOKYO
EXO1		KYOTO	PrimPol		KYOTO, TOKYO
EXO1, FAN1		KYOTO	RAD18		KYOTO
FAN1		KYOTO	RAD18, XPA		KYOTO
FANCC		KYOTO	RAD51AP1		KYOTO
FANCD2	11	KYOTO	RAD51AP1, RAD54		KYOTO
GEN1		KYOTO, HIROSHIMA	RAD51AP1, RAD54, RAD54B		KYOTO
GEN1, MLH3		KYOTO	RAD54	8, 9, 10	KYOTO
GEN1, MLH3, PMS2		KYOTO	RAD54B		KYOTO
GEN1, MUS81		KYOTO	RAP80		KYOTO
GEN1, RAD54		KYOTO	RECQL5		HIROSHIMA
LIG4	9, 10	KYOTO	REV3		KYOTO, TOKYO
LIG4, POLQ		KYOTO, TOKYO	REV7		KYOTO
LIG4, POLQ, RAD54		KYOTO, TOKYO	RNASEH2A		KYOTO
LIG4, RAD54		KYOTO	RNF8		KYOTO
LIG4, RNF8		KYOTO	RNF168		KYOTO
LIG4, SMARCA1	9	KYOTO	RPA, SMARCA1		KYOTO
MLH1		KYOTO	SLFN11		KYOTO
MLH1, MLH3		KYOTO	SLX1		KYOTO
MLH1, MLH3, PMS2		KYOTO	SLX4		HIROSHIMA
MLH1, MUS81		KYOTO	SMARCA1		KYOTO
MLH1, PMS2		KYOTO	SMARCA1	9	KYOTO
MLH3		KYOTO	SMARCA1, RAD54		KYOTO
MLH3, PMS2		KYOTO	SPRTAN		KYOTO, TOKYO
MRE11	8	KYOTO	SPRTAN, TDP1, TDP2		KYOTO

図2 TK6細胞から作製したDNA損傷修復ミュータントのリスト

KYOTOと書かれている遺伝子破壊細胞は武田研究室で作られ、NIHSと書かれている細胞は本間研究室で作られた。

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

我々は、ヌクレオチド除去修復経路を開始するのに必要なXPAに加えて塩基除去修復経路に重要な働きをするPol β もしくはXRCC1を欠損した $XPA^{-/-}/POL\beta^{-/-}$ と $XPA^{-/-}/XRCC1^{-/-}$ TK6細胞を創った。同様にMCF-7 ヒト乳癌細胞株からも $XPA^{-/-}/XRCC1^{-/-}$ 細胞を作った。 $XPA^{-/-}/XRCC1^{-/-}$ のTK6細胞とMCF-7細胞は、 $XPA^{-/-}$ 細胞よりも紫外線により高い感受性を示した (図3)。シスプラチンに対しても同様であった (図3)。 $XPA^{-/-}/POL\beta^{-/-}$ TK6細胞も $XPA^{-/-}$ 細胞よりも高い感受性を、紫外線とシスプラチンの両方に対し示した (図4)。以上の実験結果から紫外線や架橋剤による損傷が、ヌクレオチド除去修復経路が開始できないには塩基除

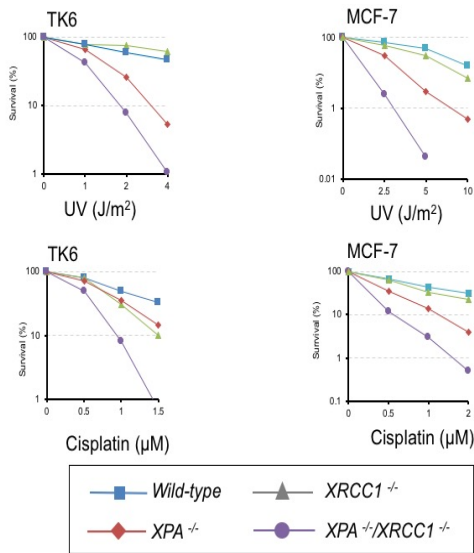


図3 紫外線感受性とシスプラチン感受性の試験結果

1個1個ばらばらにしたTK6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、メチルセルロース添加培地にまきこんだ。あるいは、TK6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。付着細胞であるMCF-7の場合は、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、その後PBSバッファーを完全培地に置換する。あるいは、MCF-7細胞をシスプラチンを含む培地で培養する。培養開始後2-3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)、横軸は紫外線の照射線量もしくはシスプラチン濃度を示す。実験は三回繰返し、エラーバーはSDを示す(非常に小さい)。

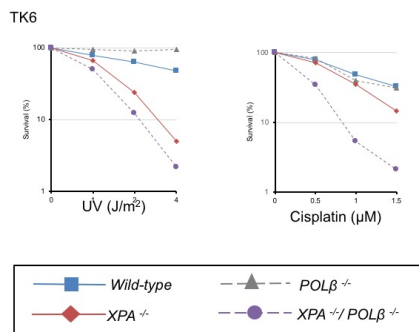


図4 紫外線感受性とシスプラチン感受性の試験結果

TK6細胞を図3と同じ手法で解析した。DNA polymerase β (POL β) とXRCC1は共に塩基除去修復に関与する。これらがヌクレオチド除去修復(XPA)とは独立して、紫外線およびシスプラチンに対する耐性に貢献することが分かる。

去修復経路によって修復されると結論した。したがって塩基除去修復経路とヌクレオチド除去修復経路の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。*XPA*^{-/-}/*XRCC1*^{-/-} TK6細胞の方が*XPA*^{-/-}/*POLβ*^{-/-} TK6細胞よりもシスプラチンに対して高い感受性を示し、変異原性の検出感度が高いことが期待された。そこで、*XPA*^{-/-}/*XRCC1*^{-/-} TK6細胞を使い、TK変異試験を実施することにした。

(3) *XPA*^{-/-}/*XRCC1*^{-/-}細胞を使うTK変異試験と従来型TK変異試験(野生型細胞を使用)の感度の比較

シスプラチン、MMC、MMSに対する細胞生存率は、野生型細胞よりも*XPA*^{-/-}/*XRCC1*^{-/-} TK6細胞を用いた時の方がわずかに感受性を示した(図5)。

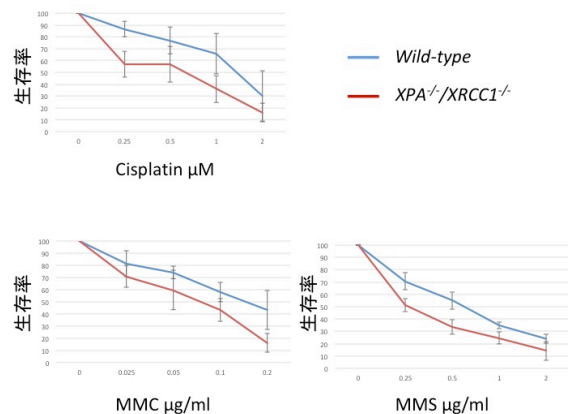


図5 シスプラチン、MMC、MMSのそれぞれの薬剤に対する感受性

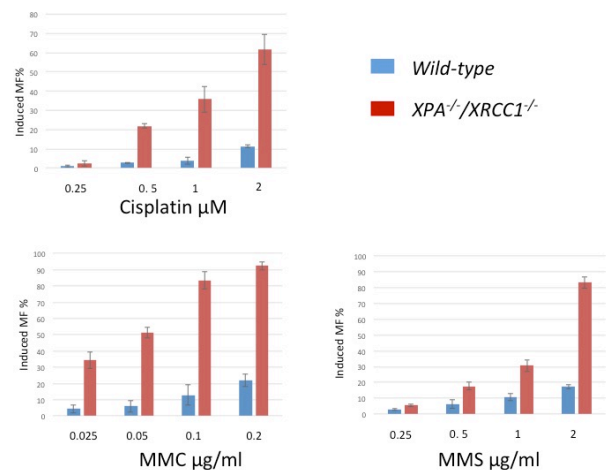


図6 シスプラチン、MMC、MMSのそれぞれの薬剤に対する変異誘導率(薬剤処理細胞のTK変異率 - 自然発生TK変異率)

武田グループは、TK変異を測定し、変異誘導頻度（薬剤処理細胞のTK変異率 - 自然発生TK変異率）を計算した（図6）。0.5 μM シスプラチンが *XPA*^{-/-}/*XRCC1*^{-/-}株にTK変異を誘導する頻度は、2 μM シスプラチンが野生型TK6細胞にTK変異を誘導する頻度より高かった。以上の結果から *XPA*^{-/-}/*XRCC1*^{-/-}株を使うTK変異試験は従来型TK変異試験（野生型TK6を使う）よりシスプラチンの変異原性検出感度が4倍以上向上したと結論した。同様に、MMCの変異原性検出感度が8倍以上、MMSの変異原性検出感度が約4倍向上した。

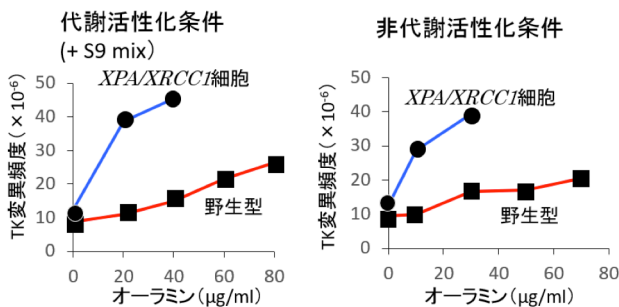


図7 オーラミンのTK変異試験結果

本間グループは、Ames試験陽性だが哺乳類を用いる遺伝毒性試験等で陰性あるいは偽陽性を示す物質をモデル化合物としてTK変異試験を実施した。マラカイトグリーンとナフチルエチレンジアミンは、+/-S9mix両条件下でTK変異頻度を上昇させることはなく陰性であった。一方、オーラミンについては、*XPA*^{-/-}/*XRCC1*^{-/-}株を用いると +/-S9mix両条件下でTK変異頻度が顕著に上昇し、容易に陽性となった（図7）。また、非代謝活性化条件下のパラフェニレンジアミンについては、野生型細胞では陰性であったが、*XPA*^{-/-}/*XRCC1*^{-/-}株ではTK変異頻度がわずかに上昇し、統計的に有意に陽性となることが分かった。以上の結果から、オーラミンとパラフェニレンジアミンは『Ames試験陽性だが哺乳類を用いる遺伝毒性試験等で陰性あるいは偽陽性を示す』ではなく、Ames試験と哺乳類を用いる遺伝毒性試験の両方で変異原性陽性を示したのである。

(4) ミトコンドリアで紫外線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、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8）。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）。ミトコンドリアではヌ

クレオチド除去修復（XPAが必須）が機能しないという知見から予想されるように、6-4光産物の修復速度はXPAの有無に影響されなかった。一方、塩基除去修復に関与するLigaseIIIとFen1（図1）をそれぞれ発現低下させると、6-4光産物の修復速度が遅くなった（図8）。以上の実験結果から、ミトコンドリアでは塩基除去修復が6-4光産物を素早く修復できると結論した。

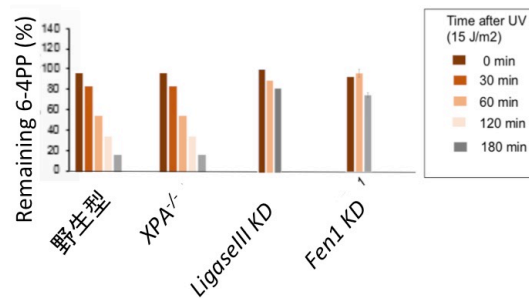


図8 ミトコンドリア DNA における紫外線損傷、6-4 光産物の修復速度 血清飢餓で G₀ 期に 4J/m² 紫外線を照射 (time zero) の 6-4 光産物の量を 100%と定義し、照射3時間後までの残存する 6-4 光産物の量を示した。

(5) シスプラチンのミトコンドリアDNA損傷は、ミトコンドリア特異的トポイソメラーゼI (Top1MT) 依存的に修復される

シスプラチンは染色体DNAの複製を阻害することによって増殖細胞を殺す。ミトコンドリアDNAの合成阻害の影響を解析する為に低濃度のシスプラチンに10日間曝露した後にミトコンドリアDNAのコピー数を測定した。8 μMのシスプラチンに曝露すると、3日めからTop1MT欠損MCF-7細胞の方が野生型細胞よりも増殖速度が遅れだし、10日めにはTop1MT欠損細胞のみコピー数が大きく低下した（図9）。以上の結果からTop1MTがミトコンドリアにおいてシスプラチン損傷の修復に関与すると結論した。

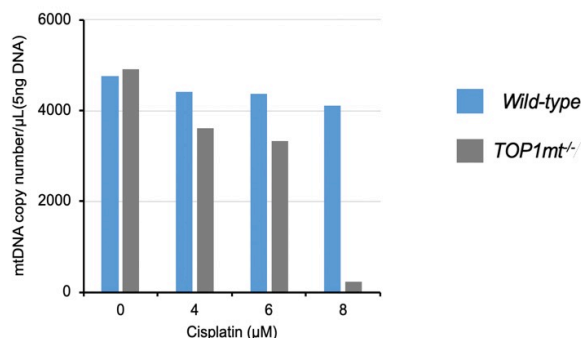


図9 シスプラチンに10日曝露後のミトコンドリア DNA のコピー数 8 μM の時に非常に強いミトコンドリア DNA 複製の抑制が Top1MT 欠損細胞でのみ観察された。

D. 考察

塩基除去修復およびヌクレオチド除去修復は、化学物質が塩基損傷を作った時に、その損傷が点変異に変換されるのを防止する。そして点変異の原因になる化学物質はTK変異試験によって最も高感度に検出できる。以上の理由から、化審法で規定された変異原性検出試験のなかでTK変異試験が $XPA^{-/-}/XRCCI^{-/-}$ 株を応用するのに適切なバイオアッセイと考えた。実際、MMS、MMC、シスプラチンの変異原性検出感度を4-10倍程度改善できた。TK変異試験が特異性の非常に高い(偽陽性がほとんど無い)バイオアッセイであることを考慮すると、 $XPA^{-/-}/XRCCI^{-/-}$ 株を使うTK変異試験は非常に優れた変異原性検出試験である。

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(腎臓尿細管や末梢神経)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(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。

AIにより新規化合物の化学構造から変異原性を予測できるようになれば、行政や化学産業にも資することになると考えられる。この予測(QSARと呼ばれる)の為には、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。そして実際に、本間グループはオーラミンとパラフェニレンジアミンが「変異原性偽陽性」ではなく陽性であることを証明した。

E. 結論

$XRCCI/XPA$ 二重欠損細胞($XPA^{-/-}/XRCCI^{-/-}$ 細胞)は、TK変異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4-10倍上がることを確認した。

Top1MTが欠損した細胞株とマウスは、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) Tsuda M, Ogawa S, Ooka M, Kobayashi K, Hirota K, Wakasugi M, Matsunaga T, Sakuma T, Yamamoto T, Chikuma S, Sasanuma H, Debatisse M, Doherty AJ, Fuchs RP, Takeda S. (2019) PDIP38/PolDIP2 controls the DNA damage tolerance pathways by increasing the relative usage of translesion DNA synthesis over template switching. *PLoS One* 14 (3): e0213383.
- 2) Mohiuddin M, Evans TJ, Rahman MM, Keka IS, Tsuda M, Sasanuma H, Takeda S. (2018) SUMOylation of PCNA by PIAS1 and PIAS4 promotes template switch in the chicken and human B cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 115 (50): 12793-12798.
- 3) Sasanuma H, Tsuda M, Morimoto S, Saha LK, Rahman MM, Kiyooka Y, Fujiike H, Cherniack AD, Itou J, Callen Moreu E, Toi M, Nakada S, Tanaka H, Tsutsui K, Yamada S, Nussenzweig A, Takeda S. (2018) BRCA1 ensures genome integrity by eliminating estrogen-induced pathological topoisomerase II-DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 115 (45): E10642-E10651.
- 4) Saha LK, 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.* 59 (6): 529-538.

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