

厚生労働科学研究費 補助金

化学物質リスク研究事業

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

平成30年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 武田 俊一

令和1（2018）年 5月

目 次

I . 総括研究報告	
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	----- 1
武田俊一	
II . 分担研究報告	
XRCC1/XPA二重欠損細胞を用いるチミジンキナーゼ遺伝子変異試験の最適化-----	7
本間正充	
III . 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 13

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。感度が低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。感度が低い原因は、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。

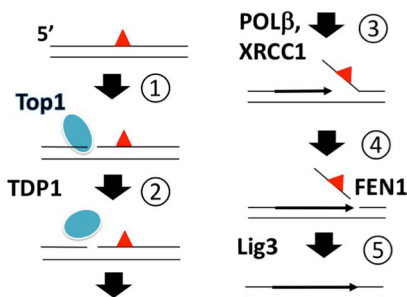


図1 紫外線損傷がトポイソメラーゼI (Top1) で活性化される塩基除去修復によって修復される

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	PDPF28		KYOTO
SSBP1, MRE11		KYOTO	PDPF28, POLH		KYOTO
Abnans		KYOTO	PDPF28, POLH, XPA		KYOTO
ALC1		KYOTO, TOKYO	PDPF28, PrimPol		TOKYO
ALC1, PARP1		KYOTO	PDPF28, 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

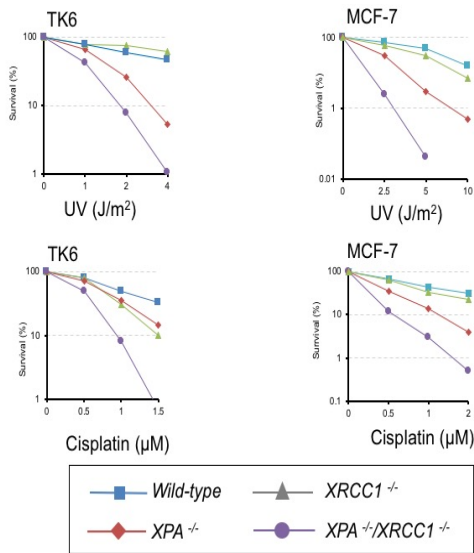


図3 紫外線感受性とシスプラチン感受性の試験結果

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)。

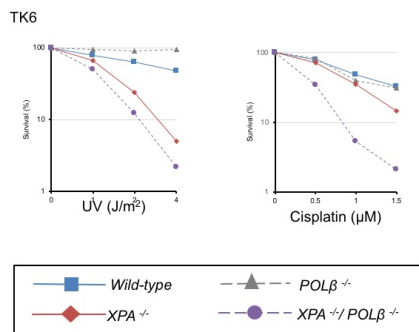


図4 紫外線感受性とシスプラチン感受性の試験結果

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)。

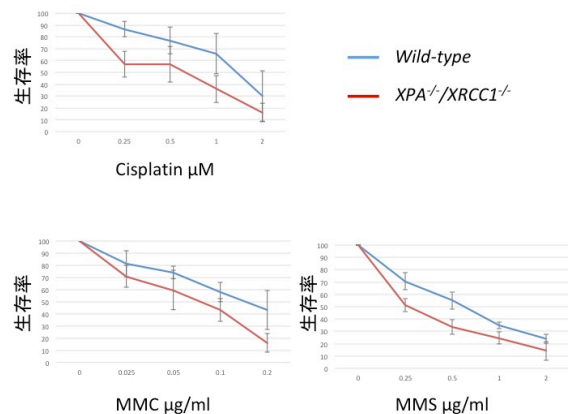


図5 シスプラチン、MMC、MMSのそれぞれの薬剤に対する感受性

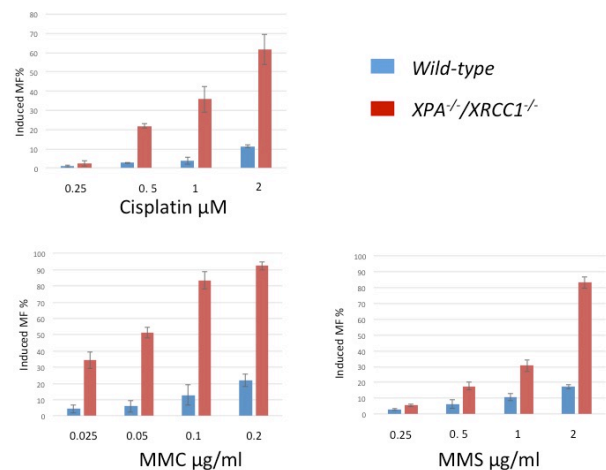


図6 シスプラチン、MMC、MMSのそれぞれの薬剤に対する変異誘導率(薬剤処理細胞のTK変異率 - 自然発生TK変異率)

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 μ M シスプラチンが $XPA^{-/-}/XRCCI^{-/-}$ 株にTK変異を誘導する頻度は、2 μ M 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 $XPA^{-/-}/XRCCI^{-/-}$ 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。

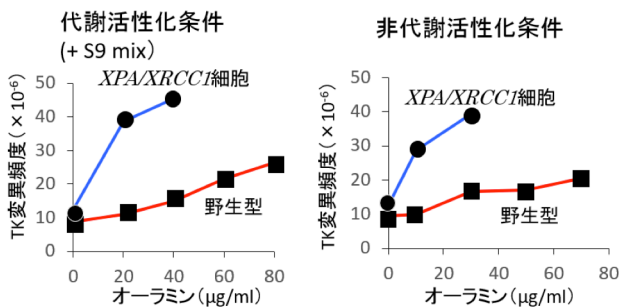


図7 オーラミンのTK変異試験結果

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、 $XPA^{-/-}/XRCCI^{-/-}$ 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、 $XPA^{-/-}/XRCCI^{-/-}$ 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のが分かった。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。

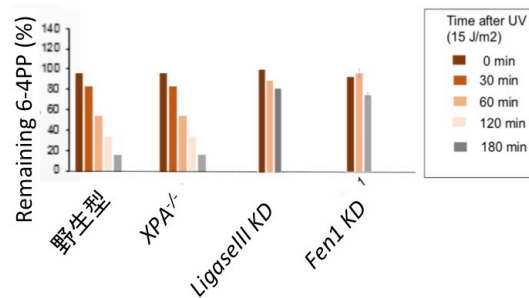


図8 ミトコンドリアDNAにおける紫外線損傷、6-4光産物の修復速度 血清飢餓でG₀期に4J/m²紫外線を照射（time zero）の6-4光産物の量を100%と定義し、照射3時間後までの残存する6-4光産物の量を示した。

(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 μ M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。

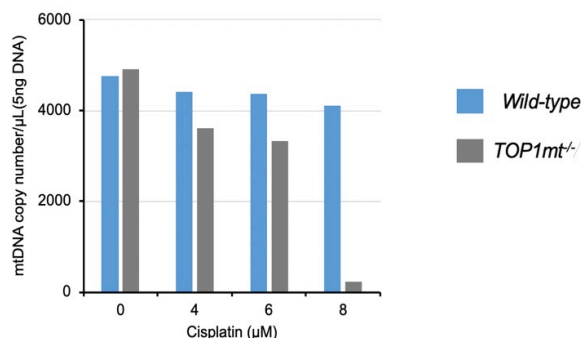


図9 シスプラチンに10日曝露後のミトコンドリアDNAのコピー数 8 μ Mの時に非常に強いミトコンドリアDNA複製の抑制がTop1MT欠損細胞でのみ観察された。

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

平成 30 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品医薬品等リスク分析研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：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

分担研究課題名：XRCC1/XPA二重欠損細胞を用いるチミジンキナーゼ遺伝子変
異試験の有用性の検討

分担研究者： 本間正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長
協力研究者： 安井 学 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長

研究要旨

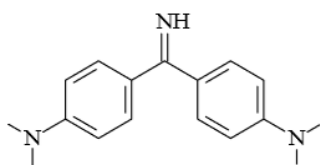
これまでに、変異原性の検出感度を上げるために DNA 修復に関わる Xeroderma pigmentosum group A (XPA)と X-ray repair cross complementing 1 (XRCC1)タンパク質を欠損させた XPA/XRCC1 二重欠損細胞（ヒトリンパ芽球細胞 TK6 由来のミュータント）を使用する新しいチミジンキナーゼ遺伝子（TK）変異試験を確立した。本年度では、再現性の高い TK 変異試験を実施することが可能となり、実際にオーラミン、マラカイトグリーン、ナフチルエチレンジアミン、パラフェニレンジアミン（Ames 試験陽性だが哺乳類を用いる遺伝毒性試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、どれくらい検出感度を改善できるか明らかにすることを目的とした。その結果、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 二重欠損細胞を用いると +/-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。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 二重欠損細胞では 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。以上のことから、従来の TK 変異試験に比べ XPA/XRCC1 二重欠損細胞を用いることによって約 5 倍程度の感度を上げることができた。

A. 研究目的

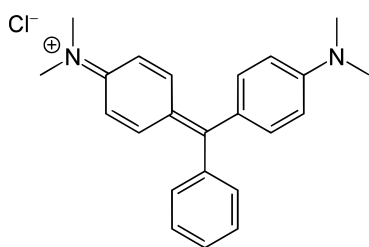
昨年度までに、野生型 TK6 細胞のみを使って調べる従来のチミジンキナーゼ遺伝子（TK）変異試験の方法に加え、変異原性の検出感度を上げるために DNA 修復に関わる Xeroderma pigmentosum group A (XPA)と X-ray repair cross complementing 1 (XRCC1)タンパク質を欠損させた XPA/XRCC1 二重欠損細胞（ヒトリンパ芽

球細胞 TK6 由来のミュータント）を使用する新しい TK 変異試験の条件設定、および最適化を行った。そのことにより、本年度は再現性の高い TK 変異試験を実施することが可能となり、実際にオーラミン、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（Ames 試験陽性だが哺乳類を用いる遺伝毒性試験で陰性あるいは偽陽性を示す物質）をモ

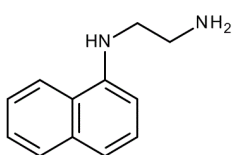
デル化合物 (図 1) として, XPA/XRCC1 二重欠損細胞を用いる TK 変異試験が, どれくらい検出感度を改善できるか明らかにすることを目的とする。



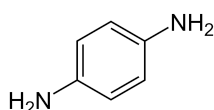
オーラミン (CAS 2465-27-2)



マラカイトグリーン (CAS 569-64-2)



ナフチルエチレンジアミン (CAS 1465-25-4)



パラフェニレンジアミン (CAS 624-18-0)

図 1. 本研究で使用したモデル化合物の化学構造式

B. 研究方法

1. 細胞と培養

TK6 細胞, および XPA/XRCC1 二重欠損細胞は, 10% 馬血清 (JRH Bioscience), 200 µg/mL ピルビン酸ナトリウム (和光純薬工業株), 100 U/mL ペニシリン, 100 µg/mL ストレプトマイシン (ナカライテスク株) を含む RPMI 培地 (ナカライテスク株) で培養した (37 度, 5% CO₂)。

2. 被験物質

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化合物として, EURL ECVAM Genotoxicity and Carcinogenicity Consolidated Database of Ames Positive Chemicals (<https://ec.europa.eu/jrc/en/scientific-tools/Ames>) のデータベースを参照に, 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モデル化合物 (図 1) として選んだ。

3. 二重欠損細胞を用いる 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 10⁷ 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。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。

4. 一重欠損細胞を用いる *in vitro* 小核試験

XRCC1 あるいは XPA の一重欠損細胞を用いる小核試験は, OECD ガイドライン TG487 の哺乳類細胞を用いた *in vitro* 小核試験に従って実施した。被験物質の処理時間は 4 時間, 小核試験の標本は 48 時間後に作成した。細胞毒性指標は, 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。

$$\text{RICC}(\%) = \frac{\text{処理した培養細胞における細胞数の増加}}{\text{対象培養細胞における細胞数の増加}} \times 100$$

野生型細胞, および 2 種類の欠損細胞を同時に使用することから, 至適用量を幅広く採用し, RICC が 30~70% となる用量を最高用量として

試験した。統計解析は、陰性対照群の小核発生頻度と被験物質のそれとの間でフィッシャー確率検定を行い、有意水準レベルを5%とした。有意差のあった用量群にアスタリスク*を付した(図7および図9)。

C. 研究結果

1. XPA/XRCC1 二重欠損細胞を用いる TK 変異試験

本研究で TK 変異試験を実施した4物質のうち、マラカイトグリーンとナフチルエチレンジアミンに対する各細胞生存率は、野生型細胞を用いても、二重欠損細胞を用いても顕著な差は観察されなかった(+/-S9 mix 両条件下)。また、それらを用いて TK 変異試験した結果、+/-S9 mix 両条件下で TK 変異頻度を上昇させることはなく、よって、マラカイトグリーンとナフチルエチレンジアミンは、陰性であることが分かった。

一方、オーラミンに対する細胞生存率は、野生型細胞よりも二重欠損細胞を用いた時の方が、+S9 mix 条件下でわずかに感受性を示した(図2左)。オーラミンの TK 変異試験結果は、+/-S9 mix 両条件下において野生型細胞で TK 変異頻度が緩やかな増加を示し陽性だった。また、二重欠損細胞の TK 変異頻度は顕著に増加し、明らかな陽性の結果が得られた(図3)。

次に、パラフェニレンジアミンに対する細胞生存率は、S9 mix を使用しない非代謝活性化条件下において、野生型細胞よりも二重欠損細胞がより高い感受性を示した(図4右)。TK 変異試験を実施した結果(図5)、野生型細胞では +/-S9 mix 両条件下で陰性と判定されたが、感受性を高めた二重欠損細胞を用いると非代謝活性化条件下において陽性になることが分かった(+S9 mix 条件下の実験は少しばらつきがあったため、再試験する予定)。以上の結果から、野生型細胞のみを用いる従来の TK 変異試験に比べて、XPA/XRCC1 二重欠損細胞を用いた方が、変異原物質の検出感度を明らかに上昇

させられることが分かった。

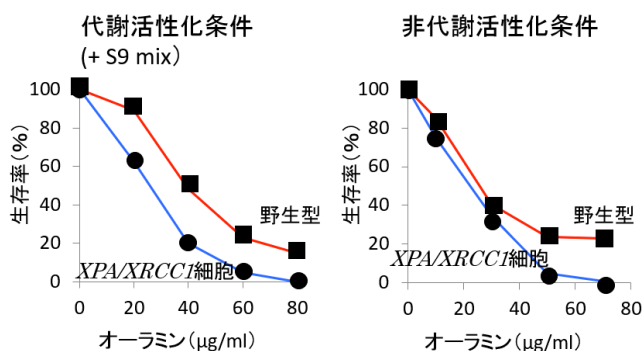


図2. オーラミンに対する細胞生存率

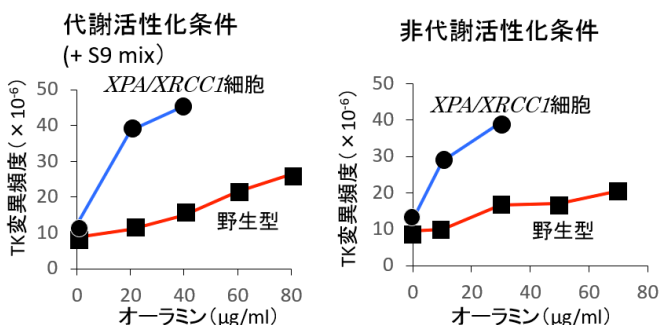


図3. オーラミンの TK 変異試験結果

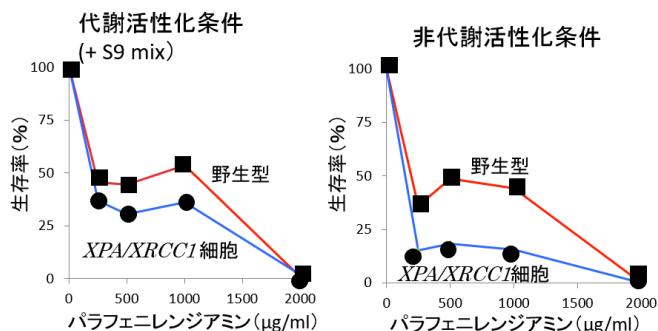


図4. パラフェニレンジアミンに対する細胞生存率

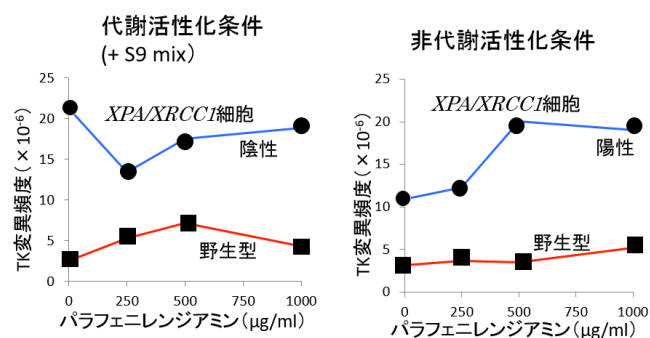


図5. パラフェニレンジアミンの TK 変異試験結果

2. XPA および XRCC1 一重欠損細胞を用いる小核試験

TK 変異試験で陽性であったオーラミンとパラフェニレンジアミンの遺伝毒性メカニズムを調べるために、XPA あるいは XRCC1 一重欠損細胞を用いて小核試験を実施した。オーラミンに対しては、TK 変異試験で明らかに陽性となったように、小核試験においても使用したすべての細胞で、代謝活性化の有無に関わらず陽性であった(図7)。その際、XPA および XRCC1 一重欠損細胞、並びに野生株細胞の小核発生頻度は、どれも類似していた。

パラフェニレンジアミンの小核試験の結果、非代謝活性化条件の XPA 一重欠損細胞を用いたときだけ、10 $\mu\text{g/ml}$ 用量でかろうじて有意差が得られた(図9右)。この結果は、TK 変異試験の陽性結果(図5右)と一致した。また、S9 を添加した代謝活性化条件の XRCC1 細胞を用いた時の小核発生頻度が用量依存的に増加したが、統計的有意差はなかった(図9左)。この時の最高用量群の細胞毒性(RICC=約70%)は比較的弱かったため(図8左)、さらに高い用量では、陽性になる可能性があった(現在、2回目の小核試験を実施している)。

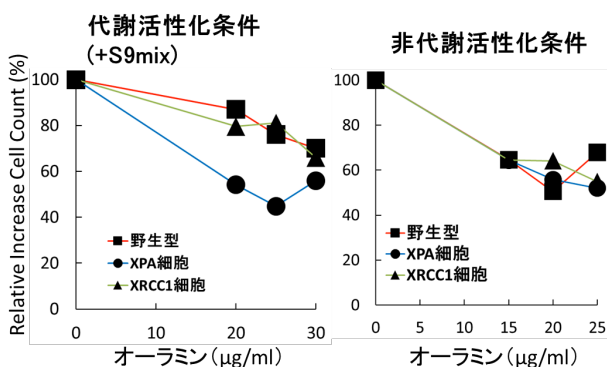


図6. オーラミンに対する細胞毒性指標 RICC

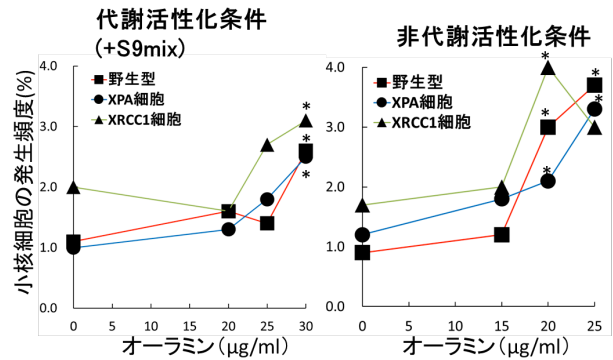


図7. オーラミンの小核試験結果

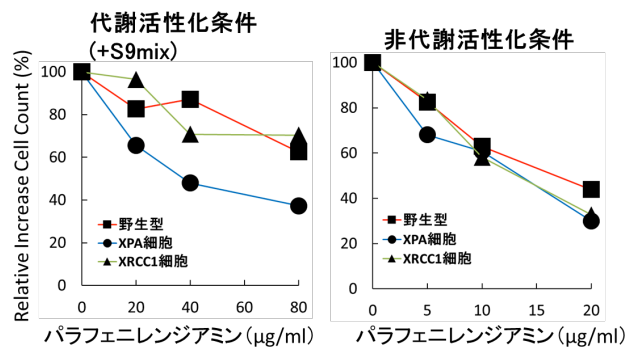


図8. パラフェニレンジアミンに対する細胞毒性指標 RICC

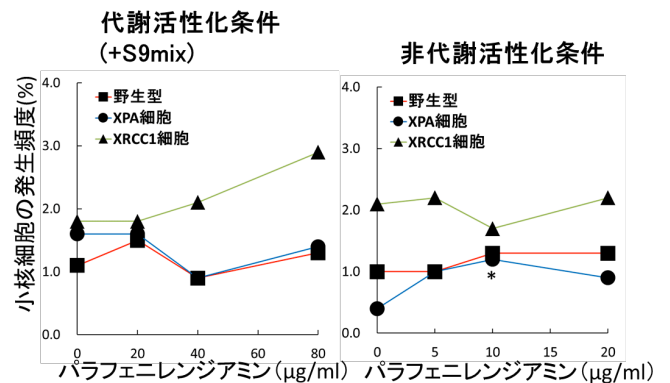


図9. パラフェニレンジアミンの小核試験結果

D. 考察

図2および図4で示した通り、細胞生存率データでは、野生型細胞と二重欠損細胞の間で大きな差が得られなかったが、遺伝子変異をエンドポイントとすると、オーラミンの場合は非常に明確な差が得られることが分かった(図3)。XPA/XRCC1 二重欠損細胞を用いることによって、約3~5倍の検出感度が改善されたと考えられた。しかしながら、図5右に示したパラフ

フェニレンジアミンに対しては、TK 変異試験において二重欠損細胞は、野生型細胞よりもわずかに検出感度が上がっただけであった。このことから、検出感度はやはり被験物質の変異原性メカニズムに大きく依存すると考えられた。つまり、検出感度を上昇させる要因として、被験物質が XPA か XRCC1 修復タンパクの働きに関与していること、そして、XPA か XRCC1 欠損によって蓄積した DNA 損傷が、他の DNA 修復バックアップ機構によって除去されないことが、TK 変異頻度を上昇させると考えられた。

このことから本研究では、XPA あるいは XRCC1 一重欠損細胞を用いて小核試験を実施することにより、TK 変異試験で陽性であったオーラミンとパラフェニレンジアミンの変異原性メカニズムを調べた。図 7 に示した通り、オーラミンによって形成する小核は、XPA と XRCC1 の両方の一重欠損細胞、並びに野生株細胞に対して、また、+/- S9 mix 両条件下で観察された。この結果は、オーラミンで陽性を示す Ames 試験菌株が、フレームシフト型の TA98 と TA1538、塩基置換型の TA1535 (Zeiger *et al*, *Environ. Mol. Mutagen*, 19 Suppl 21; 2-141(1992), Parodi *et al*, *Carcinogenesis*, 2, 1317-1326 (1981), Varella *et al*, *Food Chem. Toxicol.* 42, 2029-2035 (2005)) の両方であることと一致している。すなわち、オーラミンによって DNA 鎖切断や DNA 付加体など多様な DNA 損傷が関与していると考えられる。今回の実験では、おそらく XPA と XRCC1 一重欠損細胞と野生株細胞の間で小核発生頻度には、有意差は無いと考えられるが、両方の一重欠損の DNA 修復タンパク質がオーラミンの DNA 損傷の修復に関与していることが予想される。残念ながら、オーラミンの代謝物や DNA 付加体構造の詳細はわかっていない (Some Aromatic Amines, Organic Dyes, and Related Exposures, IARC Monographs Volume 99, 111-135 (2010))。

TK 変異試験の非代謝活性化条件下で陽性になったパラフェニレンジアミンを小核試験し

た結果、非代謝活性化条件下の XPA 一重欠損細胞を用いた時のみ、統計的有意に小核発生頻度が上昇することが分かった (図 9 右)。XRCC1 一重欠損細胞の小核発生頻度には変化がなかった (図 9 右)。つまり、パラフェニレンジアミンによる TK 変異試験の陽性は、おそらく XPA 修復タンパク質がパラフェニレンジアミンの DNA 損傷の修復に関与しており、それが欠損することにより当該 TK 変異試験で検出できたと考えられる (図 5 右)。既報では、パラフェニレンジアミンの DNA 損傷は、酸化的 DNA 損傷によって種々の遺伝毒性で陽性を示すと考えられている (Zanoni *et al.*, *Toxicol. Lett.* 239, 194-204 (2015); Qin *et al.*, *Food Chem. Toxicol.* 123, 424-430 (2019))。今回明らかになった XPA 欠損細胞で小核発生頻度が上昇したことから、パラフェニレンジアミンはバルキー DNA 付加体を形成させる可能性が示唆されるが、その DNA 付加体の研究に関する報告例は今のところない。

E. 結論

野生型 TK6 細胞のみを使って調べる従来の TK 変異試験と比べ、XRCC1/XPA 二重欠損細胞を用いると約 5 倍程度感度を上げることができた。新しい TK 変異試験の確立によって、モデル化合物であるオーラミンとパラフェニレンジアミン (Ames 試験陽性だが哺乳類を用いる遺伝毒性試験で陰性あるいは偽陽性を示す化合物) の変異原性を証明することができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sassa A, Yasui M, Honma M. (2019) Current perspectives on mechanisms of ribonucleotide incorporation and processing in mammalian DNA. *Genes and Environment* 41:3. doi: 10.1186/s41021-019-0118-7.

2. 学会発表

- 1) 安井学, 鵜飼明子, 福田隆之, 馬庭二郎, 山本春菜, 今村匡志, 藤島沙織, 大谷尚子, 成見香瑞範, 松崎香織, 岡田祐樹, 中川宗洋, 上田摩弥, 小川久美子, 本間正充:Ames 試験陽性のフォローアップに関するチミジンキナーゼ遺伝子突然変異試験の有用性の検討:MMS 共同研究の報告. 日本環境変異原学会第47回大会(2018.11.2)
- 2) 竹入章, 松崎香織, 田中健司, 小川久美子, 安井学, 本間正充, 三島雅之:Ames 試験陽性のフォローアップとしての TK6 細胞を用いた γ H2AX 評価系の有用性検討;MMS 共同研究オプション項目の報告. 日本環境変異原学会第47回大会(2018.11.1)

G. 知的所有権の取得状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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, <u>Takeda S.</u>	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	2019
Sassa A, Yasui M, <u>Honma M.</u>	Current perspectives on mechanisms of ribonucleotide incorporation and processing in mammalian DNA.	Genes and Environment	41	3	2019
Mohiuddin M, Evans TJ, Rahman MM, Keka IS, Tsuda M, Sasanuma H, <u>Takeda S.</u>	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	2018
Sasanuma H, Tsuda M, Morimoto S, Saha LK, Rahman MM, Kiyooka Y, Fujiiike H, Cherniack AD, Itou J, Callen Moreu E, Toi M, Nakada S, Tanaka H, Tsutsui K, Yamada S, Nussenzweig A, <u>Takeda S.</u>	BRCA1 ensures genome integrity by eliminating estrogen-induced pathological topoisomerase I-DNA complexes.	Proc Natl Acad Sci U S A.	115 (45)	E10642-E10651	2018
Saha LK, Kim S, Kang H, Akter S, Choi K, Sakuma T, Yamamoto T, Sasanuma H, Hirota K, Nakamura J, Honma M, <u>Takeda S.</u>	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	2018

平成 31 年 4 月 19 日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 京都大学

所属研究機関長 職 名 医学研究科長

氏 名 岩井 一宏 印

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 医学研究科・教授
(氏名・フリガナ) 武田 俊一・タケダ シュンイチ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。