

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28年度～30年度 総合研究報告書

研究代表者 武田 俊一

令和元（2019）年 5月

## 目 次

I . 総合研究報告	
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 . 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 10

## 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損傷を正確かつ迅速に修復できる）を使うからである。本研究は、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新たな社会的投資を必要としない変更によって、既存のTK変異試験の感度を向上する。

本研究の第1の目的は、どのDNA修復ミュータン

トをどの変異原性検出試験に応用すると、多様な変異原性を最も高感度に検出できるか明らかにすることである。我々は、野生型TK6細胞の代わりにXPA<sup>-/-</sup>/XRCC1<sup>-/-</sup>細胞を使うと、TK変異試験の感度が数倍改善することを確認した。本研究の第2の目的は、XPA<sup>-/-</sup>/XRCC1<sup>-/-</sup>細胞を使い再現性の高いTK変異試験を実施することである。本間グループは、第2の目的を達成する為に、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変異試験を実施した。そしてオーラミンとパラフェニレンジアミンの変異原性を確認した。

本研究の第3の目的は、変異原性が検出できた化学物質について、その変異原性の機序を知る実験手法を確立することにある。変異原性の原因になるDNA損傷は、その大部分がDNA複製を停止させ増殖細胞の生存率を低下させる。それから、DNA損傷の多様な種類に対応して生命体はそれぞれの種類のDNA損傷を修復する修復酵素・修復経路を進化させた。以上の理由から、各修復酵素を欠損させたDNA修復ミュータントのライブラリーを創り、各ミュータントを変異原性化学物質に曝露した後、生存率を測定すれば、どのような種類のDNA損傷が発生したか推定できる。本研究の第3の目的を達成する為に、

DNA修復TK6ミュータントのライブラリーやMCF-7ヒト乳癌細胞由来のDNA修復欠損株を樹立する。

本研究の第4の目的は、これまで未知であった機序のDNA毒性を新たに解明することである。申請者は、ミトコンドリアDNA (mtDNA) に生じたシスプラチン損傷が修復されることと、損傷が修復できないDNA修復ミュータントは低濃度のシスプラチンの長期曝露によって生存率が低下することを明らかにした。mtDNAは、各細胞に数千コピー存在するのに対し染色体DNAは2コピーしか存在しないので、DNA毒性を持つ化学物質の細胞毒性は、染色体DNAへの損傷が原因であるとこれまで考えられ、mtDNAへの損傷は細胞に影響しないとこれまで考えられてきた。本研究はmtDNA特異的に機能するDNA修復経路を発見することにより、腎臓を構成する細胞など休止期にある細胞のmtDNA損傷に対する影響を解析できる新たなバイオアッセイを樹立した。

## B. 研究方法

### 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発現ベクター、ガイドRNA発現ベクターを同時に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およびウエスタンブロットにより確認する。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。ヒト乳癌細胞株、MCF-7で遺伝子破壊する時には、相同組換えプラスミドを使わずに遺伝子破壊した。CRISPR/Cas9発現ベクターとガイドRNA発現ベクターを同時にトランスフェクトした後、細胞をサブクロニングし、2-3週間後に増えてきたコロニーのなかでガイドRNA認識サイト付近に3 ± 1塩基の欠失があるクローンを選ぶ。遺伝子破壊は、ウエスタンブロットにより確認する。

### 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

### 被験化学物質

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。

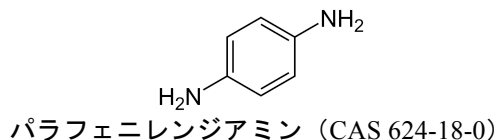
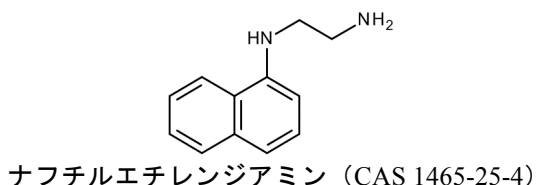
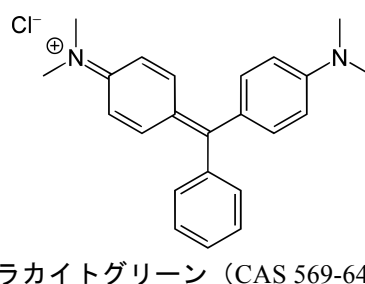
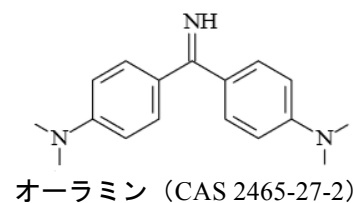


図1 本研究で使用したモデル化合物の化学構造

### 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。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。

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)

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』を説明した(図2)。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。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)が欠損した $TOP1MT^{-/-}$ 細胞と $XPA^{-/-}$ 細胞をMCF-7から創った。shRNAを発現できるレンチウイルスをMCF-7に感染させ、塩基除去修復に関与する酵素、LigaseIIIとFen1(図2)をそれぞれ発現低下したMCF-7細胞を作った。 $TOP1MT^{-/-}$ 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(金沢大学薬学研究所、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)。

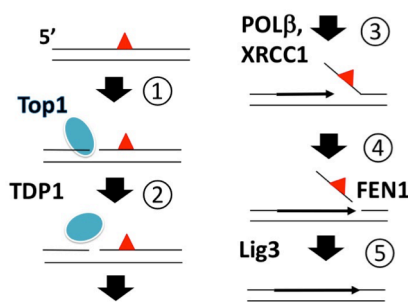


図2 紫外線損傷がトポイソメラーゼI(Top1)で活性化される塩基除去修復によって修復される  
赤三角は、6-4 光産物(6-4PP)を示す。Top1は恒常的に1本鎖切断と切断の再結合を繰り返す。6-4PPの近傍にTop1が1本鎖切断すると、しばしば再結合できなくなる(6-4PPがDNAの構造を歪ませる)。Top1が1本鎖切断の3'末に共有結合したままになる(①)。この共有結合はTDP1と呼ばれる加水分解酵素によって切断され、1本鎖切断からTop1が除去される(②)。1本鎖切断が塩基除去修復を活性化し、1本鎖切断3'末から修復DNA合成が始まる。DNA合成は十数塩基続き紫外線損傷を含む鎖をフリップする(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)。

(倫理面への配慮)

該当なし

## C. 研究結果

### (1) 2重欠損TK6細胞( $XPA^{-/-}/XRCC1^{-/-}$ 株と $XPA^{-/-}/POLb^{-/-}$ 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PolbもしくはXRCC1を欠損した $XPA^{-/-}/POLb^{-/-}$ 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)。

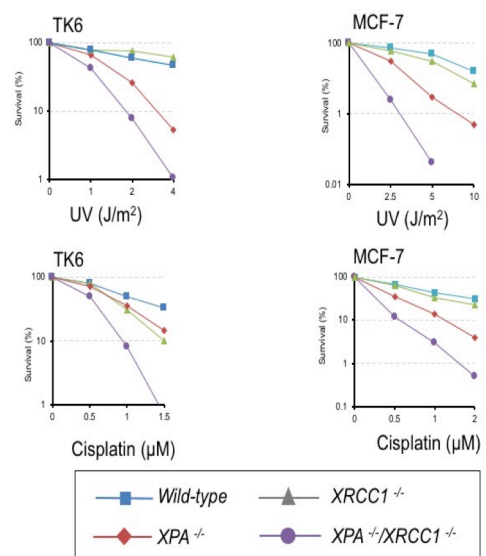


図3 紫外線感受性とシスプラチン感受性

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)。

$XPA^{-/-}/POLb^{-/-}$ 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*<sup>-/-</sup>/*XRCC1*<sup>-/-</sup>TK6細胞の方が*XPA*<sup>-/-</sup>/*POLβ*<sup>-/-</sup>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。同様に、*POLη*<sup>-/-</sup>や*RAD18*<sup>-/-</sup>の各TK6細胞も、*XPA*<sup>-/-</sup>/*XRCC1*<sup>-/-</sup>細胞ほど高い変異原感受性を示さなかった。そこで、*XPA*<sup>-/-</sup>/*XRCC1*<sup>-/-</sup>TK6細胞を使い、TK変異試験を実施することにした。

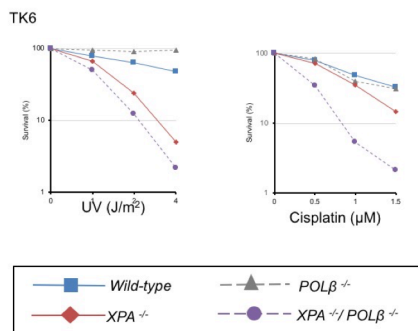


図4 紫外線感受性とシスプラチン感受性

TK6細胞を図3と同じ手法で解析した。DNA polymerase β (POLβ) 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。

(4) *XPA*<sup>-/-</sup>/*XRCC1*<sup>-/-</sup>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 (処理してから24時間後のRelative Increase Cell Count (RICC)) は、野生型細胞よりも*XPA*<sup>-/-</sup>/*XRCC1*<sup>-/-</sup>TK6細胞を用いた時の方がわずかに感受性を示した (図5)。

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)。0.5µMシスプラチンが*XPA*<sup>-/-</sup>/*XRCC1*<sup>-/-</sup>株にTK変異を誘導する頻度は、2µM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*<sup>-/-</sup>/*XRCC1*<sup>-/-</sup>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。

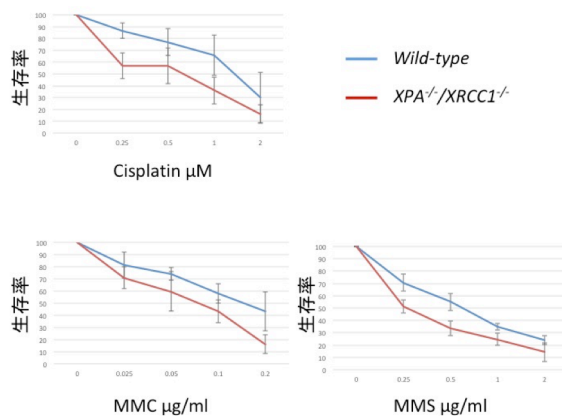


図5 シスプラチン、MMC、MMSのそれぞれの薬剤に対する感受性

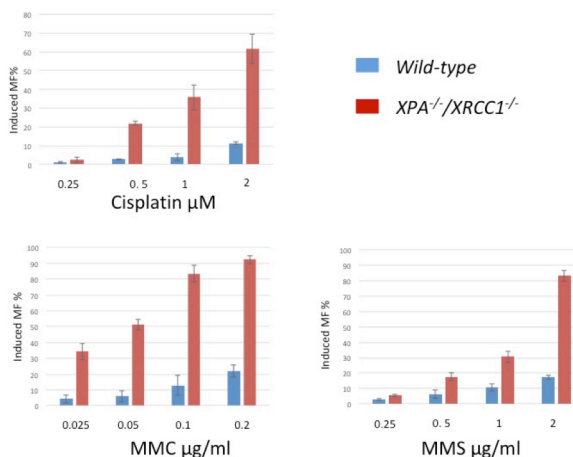


図6 シスプラチン、MMC、MMSのそれぞれの薬剤に対する変異誘導率 (薬剤処理細胞のTK変異率 - 自然発生TK変異率)

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なく陰性であった。一方、オーラミンについては、*XPA*<sup>-/-</sup>/*XRCC1*<sup>-/-</sup>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*<sup>-/-</sup>/*XRCC1*<sup>-/-</sup>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 (図8)。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。



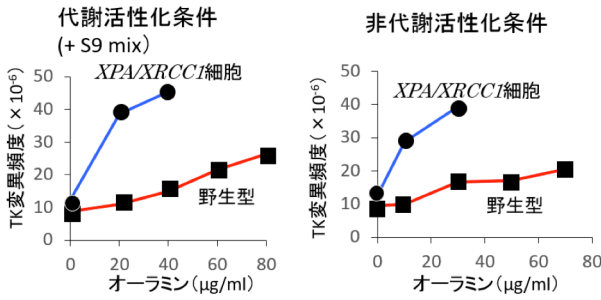


図7 オーラミンのTK変異試験結果

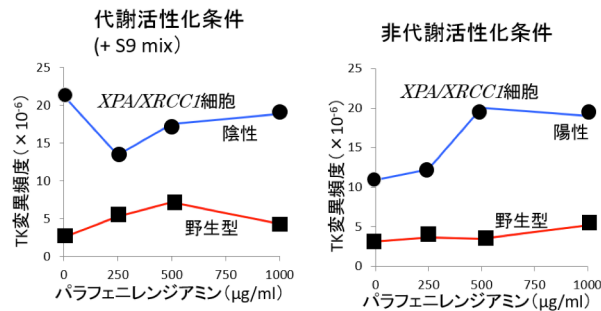


図8 パラフェニレンジアミンのTK変異試験結果

Table 1: TK6 mutants (JAN. 2019<sup>5</sup>)

Gene name	Ref.	Laboratory	Gene name	Ref.	Laboratory
53BP1	14	KYOTO	PARP2 +/-		KYOTO
53BP1, BRCA1	14	KYOTO	PDP38		KYOTO
53BP1, MRE11		KYOTO	PDP38, POLH		KYOTO
<b>Abraxas</b>	<b>KYOTO</b>		PDP38, POLH, XPA		KYOTO
ALC1		KYOTO, TOKYO	PDP38, PrimPol		TOKYO
ALC1, PARP1		KYOTO	PDP38, XPA		KYOTO
APLF		TOKYO	PIAS1	15	KYOTO
APRF, XRCC1		TOKYO	PIAS1, PIAS4	15	KYOTO
<b>ATM</b>	<b>TOKYO</b>		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, SMARCAL1		KYOTO	POLD1		KYOTO
BLM, XPF		KYOTO	POLD3		TOKYO
BRCA1	14	KYOTO	POLE		KYOTO
<b>BRCA2</b>	<b>KYOTO</b>		POLH		KYOTO
BRCA1, REV7		KYOTO	POLH, PrimPol		KYOTO, TOKYO
CHP	8	KYOTO	POLH, PrimPol, RAD54		KYOTO, TOKYO
CHP, MRE11		KYOTO	POLH, RAD18, XPA		KYOTO, TOKYO
DNA2 +/-		KYOTO	POLH, RAD54		KYOTO, TOKYO
DNA-PKcs	9	KYOTO	POLH, XPA		KYOTO
DNA-PKcs, SMARCAL1	9	KYOTO	POLL		KYOTO
ERC6		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	<b>RAP80</b>	<b>KYOTO</b>	
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	<b>RNF168</b>	<b>KYOTO</b>	
Lig4, SMARCAL1	9	KYOTO	RPA, SMARCAL1		KYOTO
MLH1		KYOTO	<b>SLFN11</b>	<b>KYOTO</b>	
MLH1, MLH3		KYOTO	SLX1		KYOTO
MLH1, MLH3, PMS2		KYOTO	SLX4		HIROSHIMA
MLH1, MUS81		KYOTO	SMARCAD1		KYOTO
MLH1, PMS2		KYOTO	SMARCAL1	9	KYOTO
MLH3		KYOTO	<b>SMARCAL1, RAD54</b>	<b>KYOTO</b>	
MLH3, PMS2		KYOTO	SPRTAN		KYOTO, TOKYO
MRE11	8	KYOTO	<b>SPRTAN, TDP1, TDP2</b>	<b>KYOTO</b>	

図9 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の細胞は本間研究室で作成。

(5) ヒトTK6細胞株から遺伝子破壊株の作製

図9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。本研究において作製された遺伝子破壊TK6細胞を寄贈する、武田薬品と国立がんセンターが共同運営する化合物スクリーニングセンター (i-Park) (<https://www.takeda.com/ja-jp/who-we-are/company/shon-an/>) また3社から一部細胞の譲渡依頼があった。

(6) Polε校正機能欠損TK6細胞 (POLε<sup>D269A/-</sup>細胞 = POLε<sup>exo-/-</sup>細胞) を変異原性の機序の解析

以下にヌクレオシドアナログを例に、DNA修復ミュータントのライブラリーが変異原性の作用機序解析に有効であることを解説する。ヌクレオシドアナログは、抗癌剤や抗ウイルス薬として使われる。ヌクレオシドアナログの変異原性の機序は、2つの可能性 (i) ヌクレオチドとしてDNA複製ポリメラーゼに取り込まれた後にポリメラーゼを阻害、(ii) ヌクレオチドとしてDNA鎖に取り込まれた後にDNA複製を阻害) が想定される。

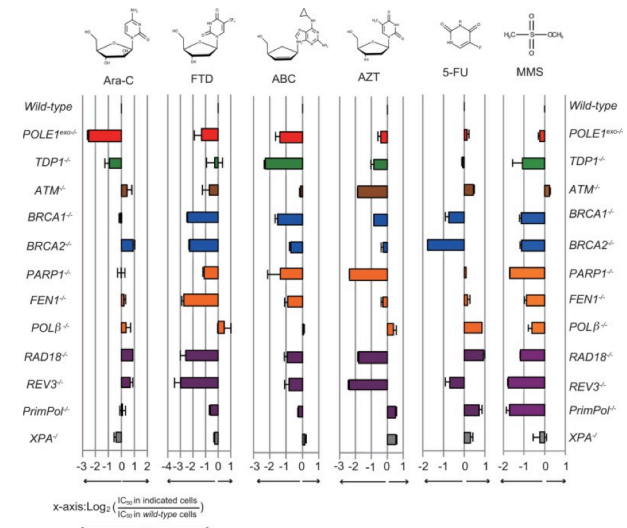


図10 感受性プロファイルの例

左右の列は、ニフトリ DT40 から作った 12 種類のミュータント細胞で破壊した遺伝子の名前である。1行目は野生型細胞である。図の最上段に実験に使った化合物の化学構造を示した。最も右は MMS である。ヒストグラムは、各ミュータントを化学物質に曝露した後、コロニー形成率で測定した生存率である。ヒストグラムは、Log2(各ミュータントの生存率/野生型の生存率)であり、左向きヒストグラムは野生型より感受性の程度、右向きヒストグラムは野生型より耐性の程度を示す。測定すれば、どのような種類の DNA 損傷が発生したか推定できる。この感受性のプロファイルを調べれば、各化学物質の変異原性の機序が解る。

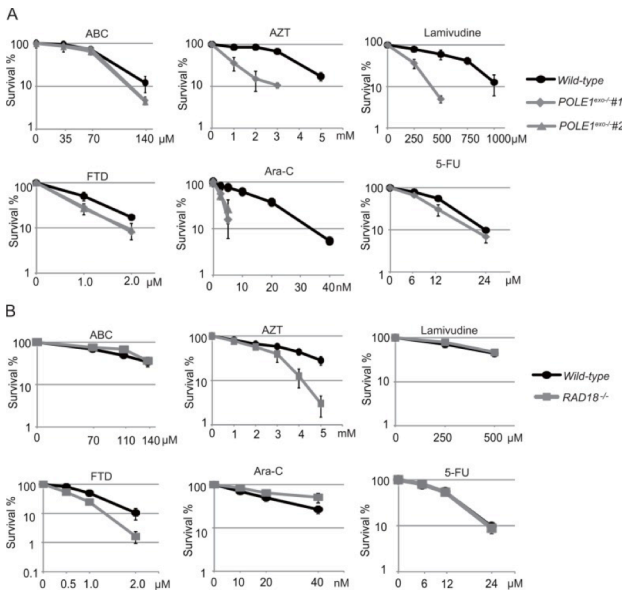


図 11 感受性プロファイルを調べる為のコロニー生存率解析の例

図 10 で使ったヌクレオシドアナログを、ヒト Polε 校正機能欠損 TK6 細胞と損傷乗り越え機能低下 TK6 細胞 (*RAD18<sup>-/-</sup>*) に曝露し、コロニー生存率を測定した。損傷乗り越えとは、鋳型鎖の損傷部位 (例、ヌクレオチドアナログやアルキル化塩基) を複製ポリメラーゼが DNA 合成することを指す。*RAD18<sup>-/-</sup>* 細胞は AIDS ウイルスに対する治療薬、AZD に感受性を示す (上から3行目の真ん中)。このデータは、AZD のリン酸化物 (AZDMP) はヒト染色体 DNA に取り込まれ、損傷乗り越えが十分機能しないと AZDMP 部位で DNA 複製が停止することを示す。ヒト Polε 校正機能欠損 TK6 細胞は、AZD に感受性である (上から1行目の真ん中) ことから、複製 DNA ポリメラーゼ、Polε も、AIDS ウイルスの逆転写酵素と同様に、AZDTP を基質として使い、プライマー3' に取込まれた AZDMP のうちの~90% が Polε 校正機能によって排除される。

図10と図11に示したデータは、5種類のヌクレオシドアナログの感受性を解析したものである。抗癌剤、シタラビン (Ara-C) は、Polε校正機能欠損細胞のみが感受性を示す (図10) ことから、「(i) ヌクレオチドとしてDNA複製ポリメラーゼに取り込まれた後にポリメラーゼを阻害」して細胞毒性を発揮することが分かる。一方、AZT (第一世代の抗AIDsウイルス薬) には、損傷乗り越えDNA合成の機能低下細胞 (例、*RAD18<sup>-/-</sup>*) が感受性を示す。この感受性は、DNA複製ポリメラーゼがAZTのリン酸化物をゲノムDNAに高頻度に取り込まれることを示す。取り込まれたAZTのリン酸化物が次の細胞周期の複製期においてDNA合成を阻害するのである。これまで抗ウイルス薬として使われるタイプのヌクレオシドアナログ (例、AZT) には、変異原性がないと考えられてきた。しかし図10と図11に示したデータは、AZTが

損傷乗り越えDNA合成が原因の、強い変異原性を持つことを示している (Tsuda et al., Oncotarget 8, 33457-33474, 2017)。

### (7) 女性ホルモン、エストロゲンのDNA切断活性の検出

エストロゲンは細胞増殖を強く刺激することによって発癌性を発揮する。エストロゲンが変異原性を持っているとは考えられてこなかった。申請者は、家族性乳癌・卵巣癌症候群 (HBOC) の原因遺伝子、BRCA1を欠損した乳癌細胞株、MCF-7に生理濃度 (10nM) 17OH-estradiolを曝露すると、DNA切断が誘導されることを発見した (図12)。この切断活性はトポイソメラーゼIIとエストロゲン受容体に依存的であった (Sasanuma et al., Proc Natl Acad Sci USA. 115, E10642-E10651, 2018)。同様のDNA切断活性は、20 mg/L Bisphenol-Aでも検出できた (韓国の共同研究者

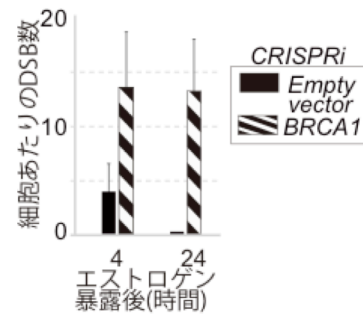


図 12 血清飢餓状態で 24 時間培養した MCF-7 において *CRISPRi* によって BRCA1 の転写を抑制した。10nM 17OH-estradiol (E2) に 2 時間曝露後 E2 を除去し、さらに 4 時間もしくは 24 時間培養し、DNA 2 重鎖切断 (DSB) の数を  $\gamma$ H2AX 免疫染色により測定した。縦軸は、エストロゲン追加後に増えた DSB 数を示す。Empty vector は、対照実験である。BRCA1 が欠損すると、E2 除去後 1 日経っても修復されない DNA 切断が残ることが解る。

からの情報)。

(8) 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13)。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2) 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13)。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。

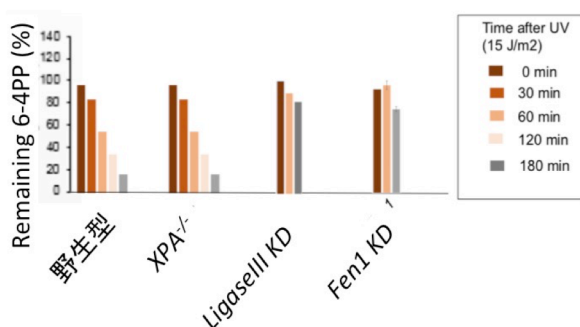


図13 ミトコンドリア DNA における紫外線損傷、6-4光産物の修復速度 血清飢餓でG<sub>0</sub>期に4J/m<sup>2</sup>紫外線を照射 (time zero) の6-4光産物の量を100%と定義し、照射3時間後までの残存する6-4光産物の量を示した。

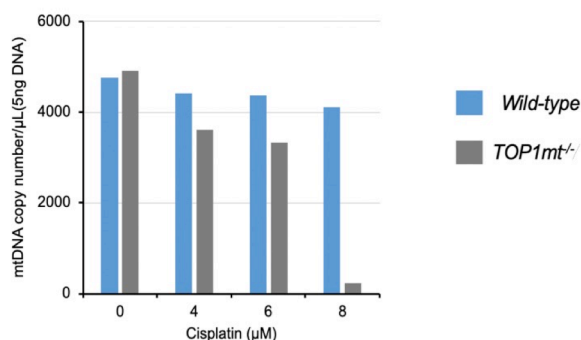


図14 シスプラチンに10日曝露後のミトコンドリア DNA のコピー数 8mM の時に非常に強いミトコンドリア DNA 複製の抑制がTop1MT 欠損細胞でのみ観察された。

(9) 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。8μM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14)。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。

#### D. 考察

##### 実験結果 (4) に対する考察

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<sup>-/-</sup>/XRCCI<sup>-/-</sup>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<sup>-/-</sup>/XRCCI<sup>-/-</sup>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。

オーラミンのDNA損傷の機構についても不明であるが、オーラミンで陽性を示すエイムス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)) の両方であることから、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てきた。一方、本実験結果からオーラミンによるDNA損傷がXRCCIあるいはXPAによってDNA修復されていることが予想される。すなわちオーラミンによるDNA損傷は、DNA鎖切断だけでなく、塩基損傷も起こしていることが明らかになった。

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分担研究者、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。

##### 実験結果 (7) に対する考察

性ホルモンのDNA毒性は従来知られていなかった。我々は血清飢餓状態において培養したMCF-7を使い、性ホルモンや環境ホルモンのDNA毒性を検出できる実験系を樹立した。現在、米国のNational Toxicology Programに助成されたNIHの共同研究者 (Dr. Xia, Menghang) に我々が樹立した実験系を譲渡し、ハイスループットに環境ホルモンのDNA毒性を検出するアッセイ系を樹立することを試みている。

#### 実験結果 (9) に対する考察

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発揮するか、従来解析しようがなかった。我々が開発した培養細胞実験系 (化合物に対する細胞応答を、野生型とTop1MT欠損MCF-7細胞とで比較) は世界で初めて樹立されたミトコンドリアDNAに対する毒性を特異的に評価できる実験系である。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。

#### 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。感度上昇の程度は、変異原性の作用機序によって異なる。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。

性ホルモンや環境ホルモンのDNA毒性を検出できる実験系を樹立した。ミトコンドリアDNAに対する毒性を特異的に評価できる実験系を樹立した。

#### F. 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) PDI P38/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) Sassa A, Yasui M, Honma M. (2019) Current pe

- pectives on mechanisms of ribonucleotide incorporation and processing in mammalian DNA. *Gene s Environ.* 41:3. doi: 10.1186/s41021-019-0118-7.
- 3) Mohiuddin M, Evans TJ, Rahman MM, Keka IS, Tsuda M, Sasanuma H, Takeda S. (2018) SUMOylation of PCNA by PIAS1 and PIAS4 promote s template switch in the chicken and human B cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 115 (50): 12793-12798.
  - 4) Sasanuma H, Tsuda M, Morimoto S, Saha LK, Rahman MM, Kiyooka Y, Fujiike H, Cherniack A D, 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.
  - 5) 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.
  - 6) 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  $\epsilon$  in cellular tolerance to cytarabine (Ara-C). *Oncotarget* 8 (20): 33457-33474.
  - 7) Suzuki T, Yasui M, Honma M; Mutator phenotype and DNA double-strand break repair in BLM helicase-deficient human cells. *Mol. Cell Biol.* 36, 2877-2889 (2016)

##### 2. 学会発表

- 1) 安井学, 鶴飼明子, 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 $\gamma$ 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)
- 3) 福田隆之, 中村真生, 佐藤亮佑, 藤原聖, 佐々彰, 鶴飼明子, 武田俊一, 安井学, 本間正充;

TK6 及びその DNA 修復遺伝子破壊変異体を用いた高感度遺伝毒性試験法の開発 第 46 回日本環境変異原学会、東京(2017 年 11 月)

- 4) Takayuki Fukuda、Maki Nakamura、Ryosuke Sato、Sho Fujiwara、Akira Sassa、Akiko Ukai、Shunichi Takeda、Manabu Yasui、Masamitsu Honma; Highly sensitive genotoxicity test system for detection of ames-positive compounds in TK6 and its DNA repair mutants. 12th International Conference of Environmental Mutagens、韓国(2017 年 11 月)
- 5) 鈴木愛、Bonnaud P、佐々彰、安井学、宮本明、本間正充; 8-oxoG 付加数の異なる DNA に対する修復タンパク hOGG1 の高速化量子分子動力学法による親和性評価. 第 45 回日本環境変異原学会、つくば(2016 年 11 月)

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
該当なし

2. 実用新案登録  
該当なし

3. その他  
該当なし

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 Environ.	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 switching 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, Ito 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 II-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, <u>Honma M, 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

Tsuda M, Terada K, Ooka M, Kobayashi K, Sasanauma H, Fujisawa R, Tsurimoto T, Yamamoto J, Iwaino S, Kadoda K, Akagawa R, Huang SN, Pommier Y, Sale JE, Takeda S, Hirota K.	The dominant role of proofreading exonuclease activity of replicative polymerase in cellular tolerance to cytarabine (Ara-C).	Oncotarget	8 (20)	33457-33474	2017
Suzuki T, Yasui M, <u>Honma M</u>	Mutator phenotype and DNA double-strand break repair in BLM helicase-deficient human cells.	Mol. Cell Bio	36	2877-2889	2016