

令和3年度 厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書

研究課題名:気管内投与による化学物質の有害作用とくに発癌性の効率的評価手法の開発に関する  
研究:迅速化かつ国際化に向けて

分担研究課題名:酸化ストレス由来 DNA 付加体による炎症誘導

分担研究者 伴野勸 愛知医科大学 医学部 感染・免疫学講座

### 研究要旨

化学物質や多層カーボンナノチューブ(MWCNT)曝露による発がん機序の解明を目的とした。化学物質や MWCNT 曝露によって産生される活性酸素種や活性窒素種は生体内の脂質やアミノ酸、核酸などを酸化分解し、活性カルボニル化合物(Reactive Carbonyl species:RCs)を産生する。RCsは化学構造にアルデヒド基やケトン基を有することからDNAと容易に付加体を形成し、遺伝子突然変異を誘導することから発がんとの関連性が強く示唆されている。

本研究では、DNA 付加体の炎症誘導の有無を明らかとするために、生体内に豊富に含有し活性酸素種による酸化分解で多種の RCs を産生させる脂肪酸であるリノール酸(C18:2)を酸化させた脂質過酸化物質と DNA と反応させた後、マクロファージ様細胞 RAW264.7 に曝露させた。曝露 24 時間後の培養上清中の炎症性サイトカインである IL-6 の濃度を ELISA で測定した結果、脂質過酸化物質 DNA 付加体の曝露によって IL-6 の産生増強が確認された。このことから、脂質過酸化物質はDNAとの付加反応による突然変異誘導能以外にも生じたDNA付加体により炎症誘発も惹起することが示唆された。

#### A. 研究目的

化学物質や多層カーボンナノチューブ(MWCNT)曝露による発がん機序の解明を目的とした。化学物質や MWCNT 曝露によって産生される活性酸素種や活性窒素種は生体内の脂質やアミノ酸、核酸などを酸化分解し、活性カルボニル化合物(Reactive Carbonyl species:RCs)を産生する。RCsは化学構造にアルデヒド基やケトン基を有することからDNAと容易に付加体を形成し、遺伝子突然変異を誘導することから発がんとの関連性が強く示唆されている。本研究では、DNA 付加体の炎症誘導の有無を検討した。

#### B. 研究方法

DNA 付加体の炎症誘導の有無を明らかとするため

に、生体内に豊富に含有し活性酸素種による酸化分解で多種の RCs を産生させる脂肪酸であるリノール酸(C18:2)を酸化させた脂質過酸化物質溶液、代表的な脂質過酸化物質である 4-hydroxy-2-nonenal(HNE)、acrolein および glyoxal をそれぞれ DNA、deoxyguanosine (dG)と反応させた。生成した DNA 付加体および positive control として CpG-B-ODN とカチオン性脂質 DOTAP リポソーム製剤を混合したもの、または、DNA、dG 付加体単体をマウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 に曝露させた。曝露 24 時間後の培養上清中の炎症性サイトカインである IL-6 の濃度を ELISA で測定した。

(倫理面への配慮)

本研究では、培養細胞を用いており、倫理面で

配慮が必要となるヒト検体や動物等は使用していない。

### C. 研究結果

リノール酸由来脂質過酸化物質、HNE、acrolein、glyoxal-DNAまたは dG 付加体単体を曝露させた培養上清では IL-6 の産生は見られなかった。しかし、カチオン性脂質リポソーム製剤 DOTAP と混合し、細胞内への取り込みを促進させた場合、種々の DNA 付加体-DOTAP リポソームを 1、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  になるように曝露したマクロファージ培養上清中の IL-6 濃度を ELISA 法により測定すると、DOTAP 単体、DNA-DOTAP、Glyoxal-DNA-DOTAP では IL-6 の産生増強は確認することはできなかった。一方で、Positive control である CpG-B-ODN、リノール酸由来脂質過酸化物質-DNA 付加体-DOTAP (Fig.1)、HNE-DNA-DOTAP では有意な IL-6 産生増加が確認できた。

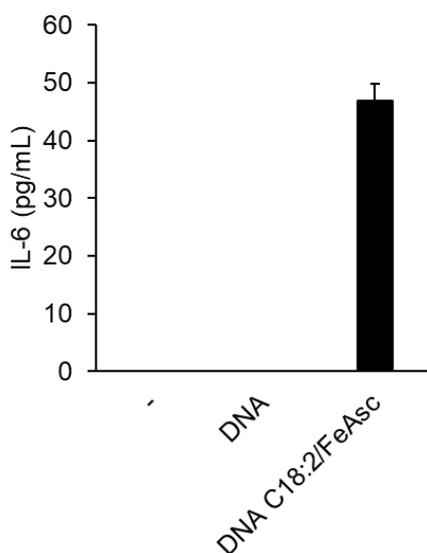


Figure 1 リノール酸由来 DNA 付加体による IL-6 産生

### D. 考察

これまでに脂質過酸化分解物である活性カルボニル化合物は、アルデヒド基やケトン基を化学構造に有する事から、タンパク質のアミノ基や DNA や RNA のアミノ基と反応することで、タンパク質の機能不全、DNA 損傷や突然変異誘導を惹起することで発がんに関与する事が分かっている。本研究結果により、DNA 付加体自体にも炎症反応誘導能を持つことが

示唆された。一般的に細菌やミトコンドリア由来の核酸は TLR7 や TLR9 といった自然免疫に関わる受容体を介して炎症反応を誘導する。今後、脂質過酸化反応物由来 DNA 付加体についても TLR7 や TLR9 との関わりについて詳細に検討する必要がある。

### E. 結論

本研究では、in vitro 毒性試験における毒性評価方法として、化学物質曝露に伴う酸化ストレスに着目した。酸化ストレス惹起によって生じる脂質過酸化物質 DNA 付加体の炎症誘導の有無をマクロファージによる IL-6 産生によって評価した結果、脂質過酸化物質 DNA 付加体は IL-6 産生を増強することを見出した。今後、詳細な炎症誘発メカニズムの解明を試みる必要がある。

### F. 健康危機情報

酸化ストレスに伴い生じる脂質過酸化物質由来 DNA 付加体は DNA 損傷、突然変異誘導以外にも炎症反応を誘導し、細胞を傷害することが示唆された。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

Kobayashi A, Ito A, Shirakawa I, Tamura A, Tomono S, Shindou H, Hedde PN, Tanaka M, Tsuboi N, Ishimoto T, Akashi-Takamura S, Maruyama S, Suganami T. Dietary Supplementation with Eicosapentaenoic Acid Inhibits Plasma Cell Differentiation and Attenuates Lupus Autoimmunity. *Frontiers in Immunology*. 2021. 12:650856.

Ariyoshi T, Hagihara M, Tomono S, Eguchi S, Minemura A, Miura D, Oka K, Takahashi M, Yamagishi Y, Mikamo H. Clostridium butyricum MIYAIRI 588 Modifies Bacterial Composition under Antibiotic-Induced Dysbiosis for the Activation of Interactions via Lipid Metabolism between the Gut Microbiome and the Host. *Biomedicines*. 2021. 9(8):1065.

2. 学会発表

なし

**H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）**

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし