

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
OECDプロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究

令和3年度 分担研究報告書

遺伝毒性のAOP開発

研究分担者 堀端 克良

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 変異遺伝部 室長

研究要旨

発がん性（遺伝毒性）の AOP への組み込みを想定し、遺伝毒性初期応答反応の早期検出システムの構築を試みた。遺伝毒性初期応答反応の検出にはクロマチン免疫沈降法（Chromatin immunoprecipitation; ChIP）を応用し、定量的 PCR を用いた DNA 損傷応答の分子生物学的解析を実施した。特に、数百コピーから成るクラスターを形成し、転写のメカニズムについての知見も豊富である rDNA を DNA 損傷応答解析の標的領域とした。RPA194、 γ H2AX、または Ku80 を ChIP の標的タンパク質とした解析結果から、本手法が DNA 上で直接的に生じている DNA 損傷応答を定量・定性的かつ早期に検出できることが示された。また、ChIP に用いる抗体をアレンジすることで解析の標的タンパク質を自在に設定することができるため、汎用性が高く、この試験法の発がん性・遺伝毒性 AOP 開発に対する高い有効性を示すことができると考えられる。

A. 研究目的

化学物質の生体曝露から遺伝毒性発現（遺伝毒性 AOP）に至る流れを全体的に捉えると、図 1 で示す経路で示すことができる。すなわち、化学物質に曝露後、場合によっては代謝を経たのちに DNA 上に付加体や DNA 損傷が形成される。それに対し、DNA 修復や DNA 複製などの損傷応答を経由することで、最終的に突然変異、DNA 鎖切断または染色体異常といったエンドポイントとしての遺伝毒性が発現する。したがって、遺伝毒性の発現結果そのものを検出する従来の一般的な遺伝毒性試験法では、結果を得るためにこれらの遺伝毒性発現サイクルが完了するまでの時間を要する。言い換えれば、バクテリアを用いる試験では遺伝毒性発現サイクルが短いため、短期間で試験が終了するが、トランスジ

ェニック変異試験のような試験ではより長い期間を要する。

その一方で、これらの遺伝毒性発現の基本的な概念は、バクテリア、培養細胞、高等生物で普遍的であり、また一般的に曝露から損傷応答反応が生じる期間は遺伝毒性発現期間と比べて非常に短時間である。すなわち、この流れをタイミングよく効率的に捉えることで化学物質の遺伝毒性を短期間で検出することができる。そのためには特に、DNA 付加体や DNA 損傷そのものはそれ自体が最終的に遺伝毒性に結びつかないことがあるため、遺伝毒性に直接結びつく細胞内の応答反応を直接捉える必要がある。以上を踏まえ、本研究では、発がん性の AOP への組み込みを想定し、遺伝毒性初期応答反応の早期検出システムを構築することを研究目的とする。

B. 研究方法

遺伝毒性初期応答反応の早期検出システムを構築するため、クロマチン免疫沈降法 (Chromatin immunoprecipitation; ChIP) 及び定量的 PCR を用いた DNA 損傷応答の分子生物学的解析を実施した。なお、一般的なコーディング DNA 領域と比べて、リボソーム DNA (ribosomal DNA; rDNA) は 1 細胞あたりヒトでは 200~700 コピーから成るクラスターを形成しており、また、DNA 代謝反応である転写のメカニズムについての知見も豊富であることから、rDNA を ChIP 及び定量的 PCR を利用した DNA 損傷応答解析の標的領域とした。

DNA 損傷の定量化が可能な紫外線照射による DNA 損傷を誘導した Flp-In 293 細胞を用いて、rDNA 上の転写装置である RNA polymerase I (RNAPI) の構成サブユニット RPA194、DNA 損傷応答マーカーであるヒストンバリエント γ H2AX、または DNA 損傷応答タンパク質の一つとして知られる Ku80 を標的とした ChIP を実施し、RNAPI、 γ H2AX または Ku80 が局在する DNA 画分をそれぞれ調製した。これらの DNA 画分を鋳型 DNA とし、rDNA unit を転写領域及び非転写領域を含む領域に分けてそれらを標的とした 9 つのプライマーセット (H1~H42.9、図 2A) を用いた定量的 PCR により、DNA 損傷誘導時における RNAPI、 γ H2AX または Ku80 の rDNA 上での位置的相対量変化を解析することで、DNA 上で直接的に生じている DNA 損傷応答の定量・定性的検出を試みた。

(倫理面への配慮)
該当なし

C. 研究結果

遺伝毒性初期応答反応の早期検出シス

テム構築に用いた rDNA unit 上のプライマーセット H1~H42.9 の内、H1~H13 は転写領域、H18~H42.9 は非転写領域を検出することができる。DNA 損傷を誘発しない条件において、RNAPI 共沈 DNA 中には H1~H13 の転写領域の DNA のみが均一に存在する一方で、紫外線 DNA 損傷誘発時の RNAPI 共沈 DNA 中には、転写領域の中でも H1 と H4 の DNA 領域が特に多く存在することが示された (図 2B)。一方で、DNA 損傷を誘発しない条件において、 γ H2AX 及び Ku80 共沈 DNA 中には rDNA unit 全領域の H1~H42.9 がわずかに、かつ、均一に存在しているが、紫外線 DNA 損傷誘発時の γ H2AX 及び Ku80 共沈 DNA 中には H1~H42 がさらに多く存在し、その中でも特に H18 及び H27 の DNA 領域が多く存在することが示された (図 2C 及び D)。

D. 考察

発がん性の AOP への組み込みを想定した遺伝毒性初期応答反応の早期検出システム構築の研究では、RNAPI、 γ H2AX または Ku80 を標的とした ChIP 及び rDNA unit 領域の定量的 PCR の結果から、通常時の RNAPI は rDNA unit 中の転写領域のみに満遍なく存在している一方で、紫外線 DNA 損傷誘導時には転写領域の上流に局在することが明らかになった。これらのことから、通常時の RNAPI は滞りなく rDNA を転写しているが、紫外線 DNA 損傷誘導時には DNA 損傷上で転写が阻害され、RNAPI が転写開始領域近辺に蓄積していることが示唆される。他方、 γ H2AX 及び Ku80 については、通常時には rDNA 領域にはわずかにしか存在せず、DNA 損傷誘導時に強く rDNA 領域に局在することが明らかになった。特に、これらの局在は rDNA の非転写領域の上流 H18 及び H27 に偏っ

ており、この DNA 領域において γ H2AX 及び Ku80 が修復に関わるような DNA 損傷である DNA 鎖切断が生じていることを示唆する。

本手法は ChIP に用いる抗体をアレンジすることで解析の標的タンパク質を自在に設定することができる。今後は化学物質による DNA 損傷誘導時、そして、RPA194、 γ H2AX、または Ku80 以外の DNA 損傷応答タンパク質や DNA 修復・複製タンパク質等を標的とした同様の解析により、この試験法の発がん性・遺伝毒性 AOP 開発に対する高い有効性を示すことができる。

E. 結論

発がん性の AOP への組み込みを想定した遺伝毒性初期応答反応の早期検出システム構築の研究では、RPA194、 γ H2AX、または Ku80 を標的とした ChIP 及び rDNA 領域の定量的 PCR を利用した DNA 損傷応答の解析結果から、本手法が DNA 上で直接的に生じている DNA 損傷応答を定量・定性的かつ早期に検出できることが示された。また、ChIP に用いる抗体をアレンジすることで解析の標的タンパク質を自在に設定することができるため、汎用性が高く、この試験法の発がん性・遺伝毒性 AOP 開発に対する高い有効性を示すことができると考えられる。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Chen R, You X, Cao Y, Masumura K, Ando T, Hamada S, Horibata K, Wan J, Xi J, Zhang X, Honma M, Luan Y. Benchmark dose analysis of multiple genotoxicity endpoints in gpt delta mice exposed to aristolochic acid I. *Mutagenesis*. (2021) 36(1):87-94.

2. Kasamatsu T, Kitazawa A, Tajima S, Kaneko M, Sugiyama KI, Yamada M, Yasui M, Masumura K, Horibata K, Honma M. Development of a new quantitative structure-activity relationship model for predicting Ames mutagenicity of food flavor chemicals using StarDrop™ auto-Modeller™. *Genes Environ.* (2021) 43(1):16.
3. Honma M, Yamada M, Yasui M, Horibata K, Sugiyama KI, Masumura K. In vivo and in vitro mutagenicity of perillaldehyde and cinnamaldehyde. *Genes Environ.* (2021) 43(1):30.
4. Iso T, Natsume M, Murata Y, Shigeta Y, Hirose N, Umamo T, Horibata K, Masumura K, Sugiyama K, Matsumoto M, Hirose A. Absence of in vivo mutagenicity of 4,4'-oxybis (benzenesulfonylhydrazide) in liver and glandular stomach of Muta™ Mouse. *Fundamental Toxicological Sciences*. (2022) 9(2):31-36.
5. Grúz P, Yasui M, Ukai A, Horibata K, Honma M, Sugiyama K. Potent mutagenicity of an azide, 3-azido-1,2-propanediol, in human TK6 cells. *Mutation Research*. (2022) 876-877: 503475.

F.2 学会発表

1. 堀端克良. Pig-a アッセイ. 哺乳動物試験研究会 第 78 回定例会. On line. (2021.6)
2. 堀端克良. IWGT の Ames 論文の概説：特に Ames 試験の評価について. 微生物変異原性試験研究会第 64 回定例会. On line. (2021.6)
3. 磯貴子, 村田康允, 重田善之, 広瀬望, 堀端克良, 増村健一, 杉山圭一, 松本真理子, 広瀬明彦. Genotoxicity assessment

of 4,4'-oxybis(benzenesulfonohydrazide): a substance designated in the positive list for food utensils, container and packaging. 第 48 回日本毒性学会学術年会. 神戸. (2021.7)

4. Horibata K, Hojo M, Ando T, Yokota S, Taquahashi Y, Kobayashi N, Takasawa H, Hamada S, Sugiyama K, Honma M. In Vivo Genotoxicity Assessment of Multi-Walled Carbon Nanotubes Using the Optimized Lung Micronucleus Assay. Environmental Mutagenesis and Genomics Society 52nd Virtual Annual Meeting. On line. (2021.9)
5. Gruz P, Yasui M, Ukai A, Horibata K, Honma M, Sugiyama K. Strong Mutagenicity of 3-azido-1,2-propanediol in Human Cells. Environmental Mutagenesis and Genomics Society 52nd Virtual Annual Meeting. On line. (2021.9)
6. 堀端克良, 北條幹, 安東朋子, 横田理, 高橋祐次, 小林憲弘, 高沢博修, 濱田修一, 杉山圭一, 本間正充. 最適化肺小核試験法を用いた多層カーボンナノチューブの in vivo 遺伝毒性評価. 日本環境変異原学会第 50 回大会. 横須賀. (2021.11)
7. Petr GRÚZ, 安井学, 鶴飼明子, 堀端克良, 本間正充, 杉山圭一. 培養ヒト細胞における 3-アジド-1,2-プロパンジオールの変異原性. 日本環境変異原学会第50回大会. 横須賀. (2021.11)

3. その他
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

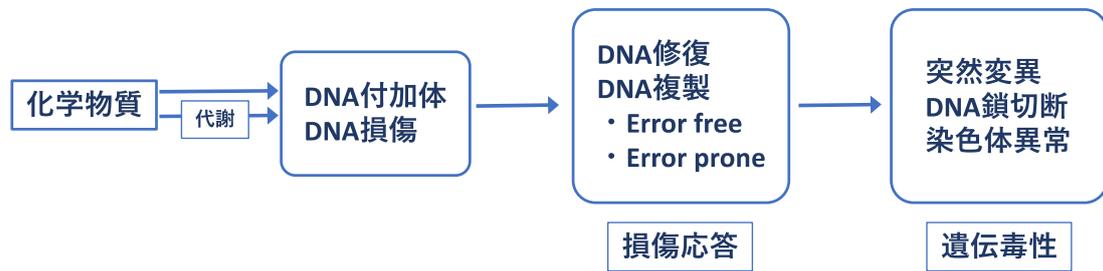


図 1. 化学物質の曝露から遺伝毒性発現まで

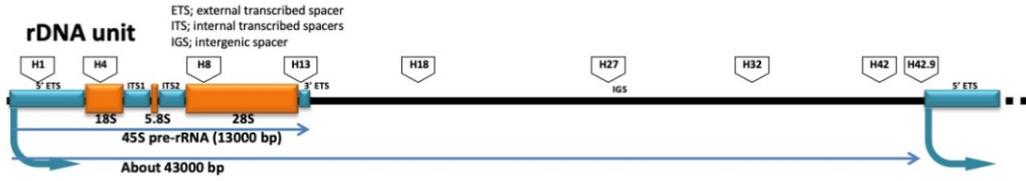
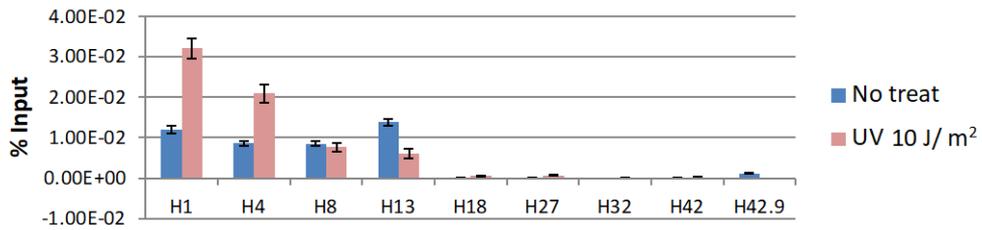
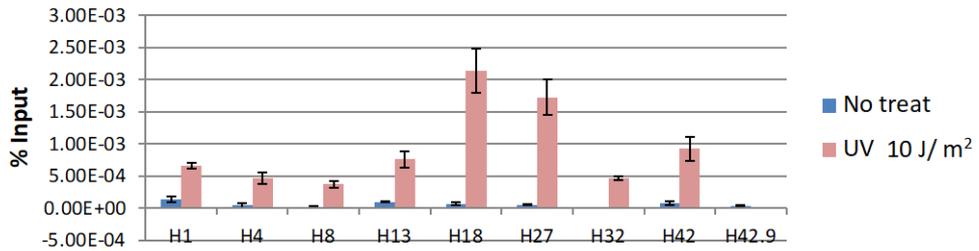
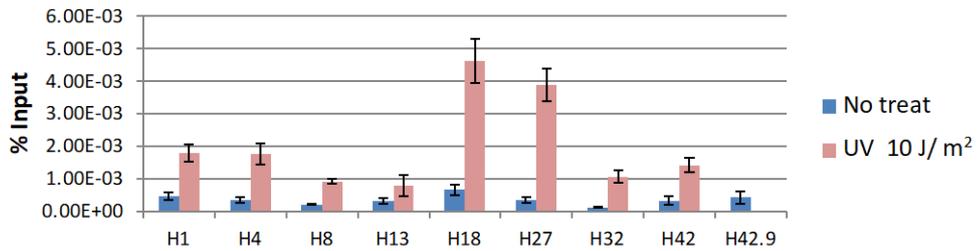
A**B****RPA194****C****Ku80****D****H2A.X**

図 2. クロマチン免疫沈降法及び定量的 PCR を用いた DNA 損傷応答解析