

令和7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

定量的化学物質発がん性予測のためのゲノム安全性評価新規解析手法の開発研究
分担研究課題名: DNA損傷応答反応や関連する分子反応を定量定性的に捉える新手法
(DDR法) の開発

研究分担者: 松田 俊
所属 京都大学大学院工学研究科

研究要旨

本分担研究では、発がん性定量的評価に資する情報がない化学物質の評価を迅速かつ効率的に進めるため、発がん性定量評価の新しい指標としてDNA損傷応答に着目した評価手法を開発することを目的とする。

発がん主要因のDNA損傷に応じて各種DNA損傷応答・修復タンパク質が損傷部位のクロマチンに集積する分子メカニズムに着目して、質量分析装置のターゲット測定によるクロマチン定量プロテオミクス法の開発に着手した。まず既報（松田ら, *Genes Environ.* 45:37 2023）をもとに、夾雑物や副反応（タンパク質のN末端や側鎖のアミノ基のカルバミル化）を低減したクロマチン分画、タンパク質消化方法を改良した。ヒトリンパ芽球由来TK6(IVGT)細胞を、臨床で起こり得る濃度（0.115 μM ）の遺伝毒性発がん物質エトポシドに曝露した結果、5種DNA損傷応答・修復タンパク質（ γH2AX 、RAD50、MDC1、53BP1、及びXRCC6）のクロマチン画分中の存在量が3.9倍以上増加することを確認した。本手法は化学物質による発がん関連応答を捉える評価系として有用であることを示した。

A. 研究目的

化学物質の定量的発がん性評価は、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」（化審法）等の化学物質安全対策行政上の種々のリスク評価において必要であり、遺伝毒性の定性的評価結果と発がん性試験結果に基づき有害性評価値を導出する。しかし、遺伝毒性陽性と判断され発がん性の懸念があるにもかかわらず、発がん性定量的評価に資する情報がない化学物質については、発がん性定量的評価を行うことができない。これらの評価を迅速かつ効率的に進めるために、多大な労力等を要する発がん試験に代わる、新たな発がん性定量的評価手法の開発と確立が求められている。本研究班では、発がん性定量評価を可能とするような新しい指標をゲノム安全性の観点

から見出し、それらを活用した評価手法を開発するとともに、新手法と既存の発がん性試験結果等との定量定性的な相関性を明らかにすることで定量的化学物質発がん性予測への適用性を検証するとともに、OEC Dテストガイドライン等へ反映させることを目指す。

本分担研究では、発がん性定量評価の新しい指標としてDNA損傷応答に着目した評価手法の開発を目的とする。具体的には、発がん主要因のDNA損傷に応じて各種DNA損傷応答・修復タンパク質が損傷部位のクロマチンに集積する分子メカニズムに着目して、質量分析装置のターゲット測定によるクロマチン定量プロテオミクス法を開発する。これにより、ゲノム毒性発現初期反応であるDNA損傷応答や関連する分子

反応等を定量定性的に捉える。

最終的には研究班全体として新手法の適用性検証を踏まえ、既存の発がん性試験等の入手可能な検体等への幅広い適用検証を試み、既存の方法と新手法との定量定性的な相関関係を明らかにするとともに、国際ガイドライン等への適用を進める。

B. 研究方法

ヒトリンパ芽球由来TK6(IVGT)細胞を所定濃度および時間のエトポシド (ETP) に曝露した後、液体窒素による凍結融解で細胞の膜を破壊した。細胞ペレットを等張液で洗浄し、遊離 (クロマチンに結合していない) タンパク質を抽出除去した。ペレットを高張液で洗浄することで、クロマチンに弱く結合するタンパク質を抽出した (画分①)。残ったペレットに2 M NaClを添加して超音波破碎処理でクロマチンを破壊後、遠心分離で上清を回収した (画分②)。各画分のタンパク質をトリクロロ酢酸沈殿法で回収した。タンパク質をデオキシコール酸ナトリウム (SDC) を含む緩衝液で再溶解し、内部標準として測定対象のペプチドに対応する安定同位体を添加した。これをジチオスレイトール及びヨードアセトアミドで還元アルキル化し、トリプシン消化を行った。固相抽出で消化物 (ペプチド) を脱塩精製して5%アセトニトリルに再溶解し、高速液体クロマトグラフィー-タンデム型質量分析装置 (LC-MS/MS) で、測定対象タンパク質に特異的なペプチドを定量した。LC-MS/MSにはWaters社Xevo TQ-Sを使用し、Multiple reaction monitoringモードで測定した。

C. 研究結果

使用する培養細胞としてTK6(IVGT)細胞を、遺伝毒性発がん物質としてトポイソメラーゼII阻害剤ETPを選択した。まず用量設定のために細胞毒性試験を行い、24 h曝露で生細胞密度が陰性対照の半分となる濃度 (IC50: 0.115 μ M) を求めた。次に、

TK6(IVGT)細胞をIC50のETPに曝露した後、5種類のDNA損傷応答及び修復タンパク質のクロマチン画分中存在量の経時変化を最長24 hまで測定した。DNA損傷のバイオマーカーとして知られる γ H2AX (H2AXのS139リン酸化体) は、曝露6 h以降にクロマチン画分中から検出され、24 hまで経時的に増加した (図1(a))。DNA損傷応答タンパク質について、MDC1のクロマチン画分中の総量は曝露1 hから増加してほぼプラトーに達し (0 h比で最大4.6倍)、53BP1は曝露1 hから増加し、曝露24 hで最大 (同54.9倍) となった (図1(b)及び(c))。DNA二本鎖切断修復を担うRAD50及びXRCC6のクロマチン画分中の総量は曝露1 hから増加し、RAD50は曝露6 hで最大 (同3.9倍) となり、XRCC6は曝露24 hまで経時的に増加した (同157.1倍) (図1(d)及び(e))。一方、非リン酸化H2AXのクロマチン画分中の総量に2倍以上の変動は見られなかった (図1(f))。

D. 考察

既報 (松田ら, Genes Environ. 45:37 2023) の前処理法を改変した。具体的にはトリプシン消化に用いるタンパク質変性剤を尿素からSDCに変更し、尿素に起因する副反応 (タンパク質のN末端や側鎖のアミノ基のカルバミル化) を抑制した。さらに、ゲノムDNA断片化をDNase I添加による消化から超音波破碎に変更し、夾雑成分を低減した。本研究ではETP曝露により、TK6(IVGT)細胞中の γ H2AX含め各種DNA損傷応答・修復タンパク質のクロマチン結合量が増加した一方、これらの変動はタンパク質によって異なることを明らかにした。ETPの血漿タンパク質結合率 (94%) に基づけば、標準用量 (100 mg/m²) の投与患者の遊離体血中最大濃度は約1-2 μ Mであり、血中終末半減期6-18 hを考慮する (IARC Monographs Vol.76) と、本研究で採用した濃度 (0.115 μ M) はヒトで実際に到達する条件であると考えられる。現在さらなる

低用量域における、ETPとクロマチン画分中各種DNA損傷応答及び修復タンパク質の用量応答を測定中である。さらに他のDNA損傷応答・修復タンパク質や、細胞周期制御やヒストン修飾など、測定対象の拡大も進めており、これにより多様なメカニズムを有する遺伝毒性発がん物質の発がん性評価に貢献できる可能性がある。

E. 結論

前処理法を改良し、処理中の副反応（タンパク質のN末端や側鎖のアミノ基のカルバミル化）の抑制、試料に添加する夾雑物の低減を行った。確立した手法の概念実証のために、TK6(IVGT)細胞と遺伝毒性発がん物質ETPを用いた曝露実験を実施した。ETP曝露によりクロマチン画分中のDNA損傷応答・修復タンパク質（ γ H2AX、MDC1、53BP1、RAD50、XRCC6）が増加したことを確認し、これらタンパク質のクロマチン結合量の増加が発がん性評価の指標となり得ることを示した。IARC資料に基づくETPの臨床用量における遊離体の血漿中最大濃度（1–2 μ M）及び血中終末半減期（6–18 h）を考慮すると、本研究で採用した曝露濃度（0.115 μ M）は、臨床用量で実際に到達し得るETP濃度域に相当し、この実際的な濃度条件下で生じるクロマチン結合タンパク質の変動を捉えた点において、生物学的に妥当な発がん関連応答の評価系であることを示している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G.1. 論文発表

1. T Hotani, M Goto, Y Otsuki, **S Matsuda**, N Wada, M Shinohara, T Matsuda, M Yokoi, K Sugawara, Y Ohsaki, W Sakai. Dynamics of Fanconi anemia protein D2 in association with nuclear lipid droplet formation. *J Cell Sci.* 138(21):jcs264430, 2025

G.2 学会発表

1. M Han, T Matsuda, **S Matsuda**, Biotransformation of orexin receptor antagonists in activated sludge, 9th International Symposium of the Kyoto Biomolecular Mass Spectrometry Society (Kyoto) (2025.12)
2. S Oka, T Matsuda, **S Matsuda**, Proposal of a quantitative chromatin proteomics-based method for assessing chemical carcinogenicity, 9th International Symposium of the Kyoto Biomolecular Mass Spectrometry Society (Kyoto) (2025.12)
3. **S Matsuda**, Visualization and absolute quantification of the DNA damage responses for chemical genotoxicity assessment, The National Cheng Kung University–Kyoto University Research Exchange Forum: Sustainability and Disaster Prevention (Tainan, Taiwan) (2025.12)
4. 岡辰太郎、松田知成、**松田俊**、クロマチン定量プロテオミクス法による化学物質発がん性判別法の提案、日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会（静岡）（2025.11）
5. 溝口夏生、松田知成、**松田俊**、遺伝子治療用ウイルスベクターの環境リスク評価—メダカ胚細胞を用いたベクターの感染能評価—、日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会（静岡）（2025.11）
6. 吉野純、松田知成、**松田俊**、遺伝子治療に用いられるアデノ随伴ウイルスベクターのメダカに対する感染リスクの in vitro 評価、日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会（静岡）（2025.11）
7. 吉野純、松田知成、**松田俊**、遺伝子治療に用いられるアデノ随伴ウイルスベクターのメダカに対する感染リスクの in vitro 評価、京都大学環境衛生工学研究会第 47 回シンポジウム（京都）（2025.7）

別添 4

8. 岡辰太郎、松田知成、松田俊、石川良賀、岡めぐみ、ディーゼル排気微粒子が誘導する突然変異パターンと DNA 付加体の解析、京都大学環境衛生工学研究会第 47 回シンポジウム（京都）
(2025.7)

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

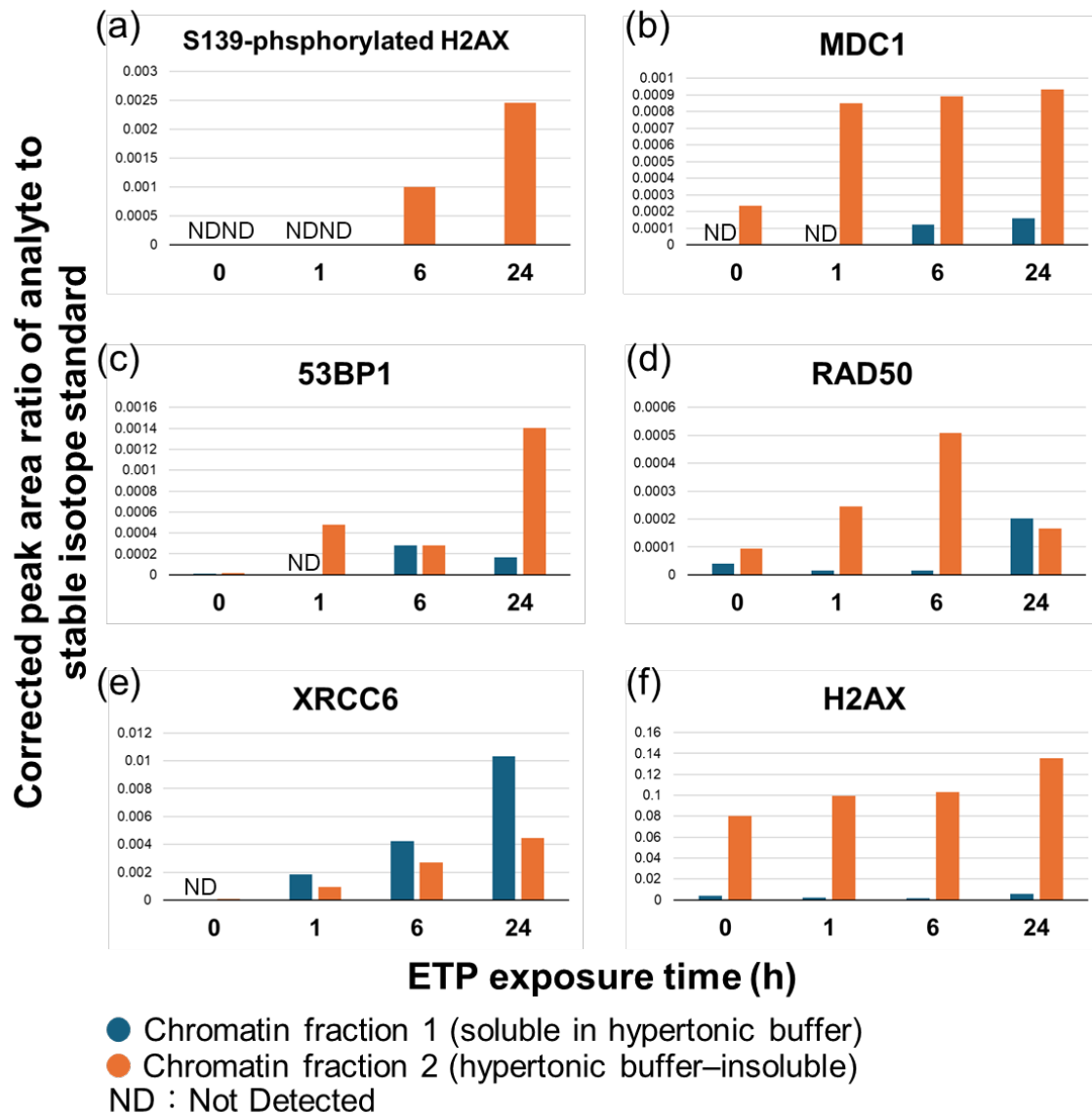


図 1. ETP 曝露後の DNA 損傷応答・修復タンパク質のクロマチン画分中存在量の変化
 TK6 (IVGT) 細胞を 0.115 μ M ETP に各時間曝露した後、クロマチン結合タンパク質を分画抽出した。画分中の (a) S139 リン酸化 H2AX (γ H2AX)、(b) MDC1、(c) 53BP1、(d) RAD50、(e) XRCC6、(f) H2AX (非リン酸化体) を LC-MS/MS で定量した。