

4. 遺伝子変化を指標とした環境化学物質による発がんリスク評価および 機構究明のための手法の開発に関する研究

担 当 機 関 厚生労働省 国立医薬品食品衛生研究所 林 真

重点強化事項 リスク 研究期間 平成12年度～14年度
研究予算総額 57,319千円

研究の背景と目的

本研究では、がん発生の原因物質特定のための基礎データとして、トランスジェニックマウスを使った変原性試験法を用いて、化合物ごとに誘発される突然変異をシークエンスレベルで解析し、化合物ごとに特徴的なパターンを明らかにすることを目的とした。さらに、これらの特徴的な変異を実際のヒト由来のサンプルで評価する上で必要となる遺伝子型に基づいた高感度な変異検出法の開発を試みた。

一方、化学物質曝露による新たな遺伝子変化に関する情報として、近年注目されているDNAマイクロアレイを用いた発現解析の手法を取り入れた。マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析の技術により得られる膨大な発現パターン情報から、化学物質特異的な変化をとらえることが可能になると期待できる。多くの化合物に関してこうしたデータを蓄積することにより、遺伝子発現変化という観点から、遺伝子傷害性物質の作用のメカニズムを解析するとともに原因物質の特定への利用の可能性に関して検討することを目的とした。

研究の成果

1. トランスジェニックマウスを用いる変異原性試験

実験に用いたMuta™Mouseには、遺伝子突然変異検出のための指標として、大腸菌の*lacZ*遺伝子が、ラムダファージベクターに組み込まれた形で導入されており、すべての組織において突然変異の検出が可能となる。*lacZ*遺伝子の変異は、ポジティブセレクションにより比較的簡便に検出が可能であるが、*lacZ*遺伝子は全長約3kbと長く、シークエンス解析による変異の同定が困難であった。そこで我々は、ラムダファージベクター上の*cII*遺伝子に注目し、この遺伝子の突然変異を*hfl*プロテアーゼ欠損大腸菌を用いてポジティブセレクション法により検出した。*cII*遺伝子は全長294bpと短いため、突然変異の同定が容易であった。

本研究においては、この手法を用いて以下の30種以上の化合物に関して検討を行った結果、多くの化合物に関して複数の臓器において陽性の結果が得られた。

(陽性結果が得られた化合物)

dinitropyrenes (DNP)、benzo[*a*]pyrene (BP)、10-aza-benzopyrene (ABP)、dibenzo[*a,l*]pyrene (DBP)、*o*-aminoazotoluene (AAT)、7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA)、quinoline (Q)、5-fluoroquinoline (5FQ)、1,7-phenanthroline (Phe)、chrysene (CR)、1,10-diazachrysene (1,10-DAC)、4,10-diazachrysene (4,10-DAC)、monocrotaline (MCT)、mitomycin C (MMC)、3-nitrobenzanthrone (NBA)、furazolidone (FZD)、nitrosodiethylamine (DNA)、nitrosodiethanolamine (EONA)、nitrosomorpholine (NML)、nitrosodipropylamine (PRNA)、nitrosodiisopropanolamine (PONA)

(陰性結果が得られた化合物)

3-fluoroquinoline (3FQ)、benzo[*h*]quinoline (BhQ)、benzo[*f*]quinoline (BfQ)、aristolochic acid (AA)、ochratoxin (OCT)、nivarenol (NIV)、patulin (PAT)、microcystin LR (MCLR)、 α -

naphthylamine (α NA)、 β -naphthylamine (β NA)、furylfuramide (AF2)、nitrosodibutylamine (BUNA)、nitrosodiisobutylamine (IBNA)、nitrosobutylbuthanolnitrosoamine (BBNA)

そこで、陽性結果が得られた化合物に関して、*cII*変異体のシーケンス解析を行った。

2. *cII*遺伝子を用いたシーケンス解析による化合物ごとの変異スペクトル同定

*cII*遺伝子のシーケンス解析により、化合物ごとの変異スペクトルの特徴が明らかとなった。(図1) コントロールに見られる変異では、GCからATのトランジション型変異が特徴で、その大部分がCpGサイトで起きていた。これは、5メチルサイトシンの脱アミノ化によるCからTへの変異によると考えられる。これに対し、DNP、BP、ABP、AAT、NBA、FZD、CRYなどの化合物においては、GCからTAへのトランスバージョン型変異が増加した。DBPはBPと類似した多環芳香族炭化水素であるが、ATからTAの変異が増加するという差が見られた。またAAはDNP、NBAと同じ芳香族ニトロ化合物でありながら、変異のパターンは異なり、ATからTAの変異が増加していた。また、最も特徴的な変異スペクトルを示したのはQおよびその誘導体の5FQであり、他には比較的珍しいGCからCGへのトランスバージョン型変異を誘発した。この変異は、Phe、CRでも若干増加しており、サイズの小さい芳香族化合物により誘発されることが示唆された。この他、特徴的な変異としては、頻度はそれほど高くないもののMMCとMCTによりcomplexタイプの変異が見られた。これらは、隣り合う二塩基が同時に変異するという特徴を持っており、架橋型のDNAアダクトにより誘発されると考えられる。また、構造の類似した一連のニトロソアミンを用いた検討では、アルキル基のわずかな違いにより非常に異なる変異スペクトルが得られることが明らかとなり(表1) そのメカニズムに興味を持たれた。*cII*遺伝子上の変異部位として、GおよびAの6塩基繰り返し部位が変異を起こしやすい部位ではあったが、化合物に特徴的なホットスポットは見られず、配列特異性に関しては化合物による特異性は見られなかった。なお、得られた変異スペクトルのデータに関しては、ホームページを介して一般に情報公開を開始した。

3. 遺伝子型に基づいた高感度変異検出法の開発

紫外線特異的と考えられる、CCからTTへの変異をマウス*p53*遺伝子上で高感度に検出するための、変異アレル特異的PCRの手法を開発した。図2に示すように、変異体の希釈サンプルを用いた検討では、 10^{-5} レベルの頻度まで検出が可能な系を作成できた。今後、紫外線処理したマウスの皮膚サンプルを用いて、実際に変異が検出できるかを検討する予定である。

4. DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現変化の解析

遺伝子型に基づいた変異の検出法を用いて、ある程度高感度に変異の検出が可能にはなったが、手技的に一塩基のみの変異を検出するのはさらに困難であり、変異のパターンのバリエーションも期待したほど高くなかったことから、別の視点からも遺伝子変化を捉える目的で、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析の手法を応用し、遺伝子傷害性物質による遺伝子発現パターンの変化を調べることにした。実験には市販のclontech社製Atlas™ガラスマイクロアレイおよびNovusGene社製マウスカスタムアレイを用いた解析を行った。In vitroの実験としては、ヒト培養細胞を用いて検討を行い、in vivoでの検討として、マウスに肝発がん物質を投与した際の、肝臓での遺伝子発現変化を検討した。In vitroの実験では、 β -線、4-nitroquinoline-1-oxide、methylmethanesulfonate処理による影響を調べた結果、細胞周期やアポトーシス関連遺伝子など、発現の変化するいくつかの遺伝子を同定することができた。これらのうち多くの遺伝子は、共通性を持った変化を示し、これらが遺伝子傷害性の予測に有効であることが示唆された。また、化合物特異的な変化も見られた。 β -線を用いて細胞周期の同調による効果を調べたところ、同調による高感度化は見られなかったものの、細胞周期に特異的に変化する遺伝子を同定することができた。これらの遺伝子は、細胞の放射線感受性

に影響を持つと予想される。次に、肝臓発ガン物質を投与したマウスの肝臓での遺伝子変化を調べた例を表2に示す。BP、Q処理による発現変化はin vitroよりも大きく、化合物間に共通性も見られた。特にQの誘導体である4-methylQを用いた場合には、Qと非常に類似した変化が見られ、遺伝子発現変化のパターンも原因化合物の特定や作用機作の解明に有効であることが示唆された。今後さらに検討する化合物を増やし、データを蓄積していくことが重要である。ただし、異なるタイプのアレイや異なる配列のプロンプを用いた際には、異なったデータが得られる場合があり、定量的RT-PCR法などによるデータの再現性の確認が重要であるという知見が得られた。

研究のまとめ

本研究においては、トランスジェニックマウスを用いる変異原性試験において、シークエンス解析に有用な*c11*遺伝子の利用により、数多くの化学物質により誘発される突然変異の特徴的なパターンを明らかにすることができた。短期間でこれだけ多くの化合物に対してデータを蓄積できた意義は大きい。これら化合物ごとの変異データベースは、今後分子疫学的なリスク評価における基礎的なデータとして有用である。また、これらの特徴的な変異を、遺伝子型に基づいて高感度に検出する手法の開発においては、ある程度の感度を達成できたものの、特定部位での特異的な変異の頻度はかなり低いことが予想され、現実的には難しい課題も含んでいることが判った。

我々はさらに、DNAマイクロアレイを用いた網羅的解析により、遺伝子発現変化を指標としたアプローチを試みた。いくつかの遺伝子傷害物質に関して、in vitro, in vivo両方の系において検討を行ったところ、処理により発現の変化する遺伝子を網羅的に解析することができ、いくつかの共通する遺伝子変化を見出すことができた。化合物ごとの遺伝子発現変化のパターンは、そのメカニズムを反映するものであり、こうしたデータを蓄積することにより原因物質の特定、機構究明のために重要な情報となると期待できる。

研究発表

発表題名	掲載法/学会等	発表年月	発表者
(誌上発表)			
・ CC to TT mutation in the mitochondrial DNA of normal skin : relationship to ultraviolet light exposure.	Mutation Res. 468: 35- 43.	平12.6	川崎、鈴木、上田、市橋、Reguer、山崎
・ Hepatocarcinogen quinoline induces G:C to C:G transversions in the <i>cII</i> gene in the liver of lambda/ <i>lacZ</i> transgenic mice (MutaMouse)	Mutation Res. 456: 73- 81.	平12.11	鈴木、王、宮田、佐伯、小原、川添、林、祖父尼
・ Mutation spectrum of <i>o</i> -amino-azotoluene in the <i>cII</i> gene of lambda / <i>lacZ</i> transgenic mice (MutaMouse)	Mutation Res. Vol.491: 211-220.	平13.4	小原、鈴木、本間、平野、大澤、大和田、林
・ Dinitropyrenes induce gene mutations in multiple organs of the lambda/ <i>lacZ</i> transgenic mouse (Muta Mouse).	Mutation Res. Vol. 515: 73- 83.	平14.3	小原、鈴木、本間、大和田、林
・ Mutagenicity of aristolochic acid in the lambda/ <i>lacZ</i> transgenic mouse (MutaMouse).	Mutation Res. Vol.515: 63-72.	平14.3	小原、鈴木、本間、大和田、林
・ Effect of 10-aza-substitution on benzo[<i>a</i>]pyrene mutagenicity in vivo and in vitro.	Mutation Res. Vol.521: 187-200.	平14.11	山田、鈴木、小原、林、羽倉、水谷、佐伯
(学会発表)			
・ トランスジェニックマウス(Muta TM Mouse)を用いたニトロソジェタノールアミンの遺伝子傷害性の検出とその特徴	日本癌学会総会	平14.10	鈴木、小原、本間、林
・ トランスジェニックマウスを用いたAF2および赤色2号の変異原性の再評価	日本環境変異原学会	平14.11	鈴木、小原、小泉、本間、林
・ DNAマイクロアレイの変異原性試験への応用に関する共同研究: ガラスアレイを用いたDEN投与後のマウス肝臓における遺伝子発現解析	日本環境変異原学会	平14.11	鈴木、中嶋、稲垣、兵庫、田中、浜田、降旗

図1 各種化合物により誘発された*cII*遺伝子の変異スペクトル (括弧内は解析変異体数)

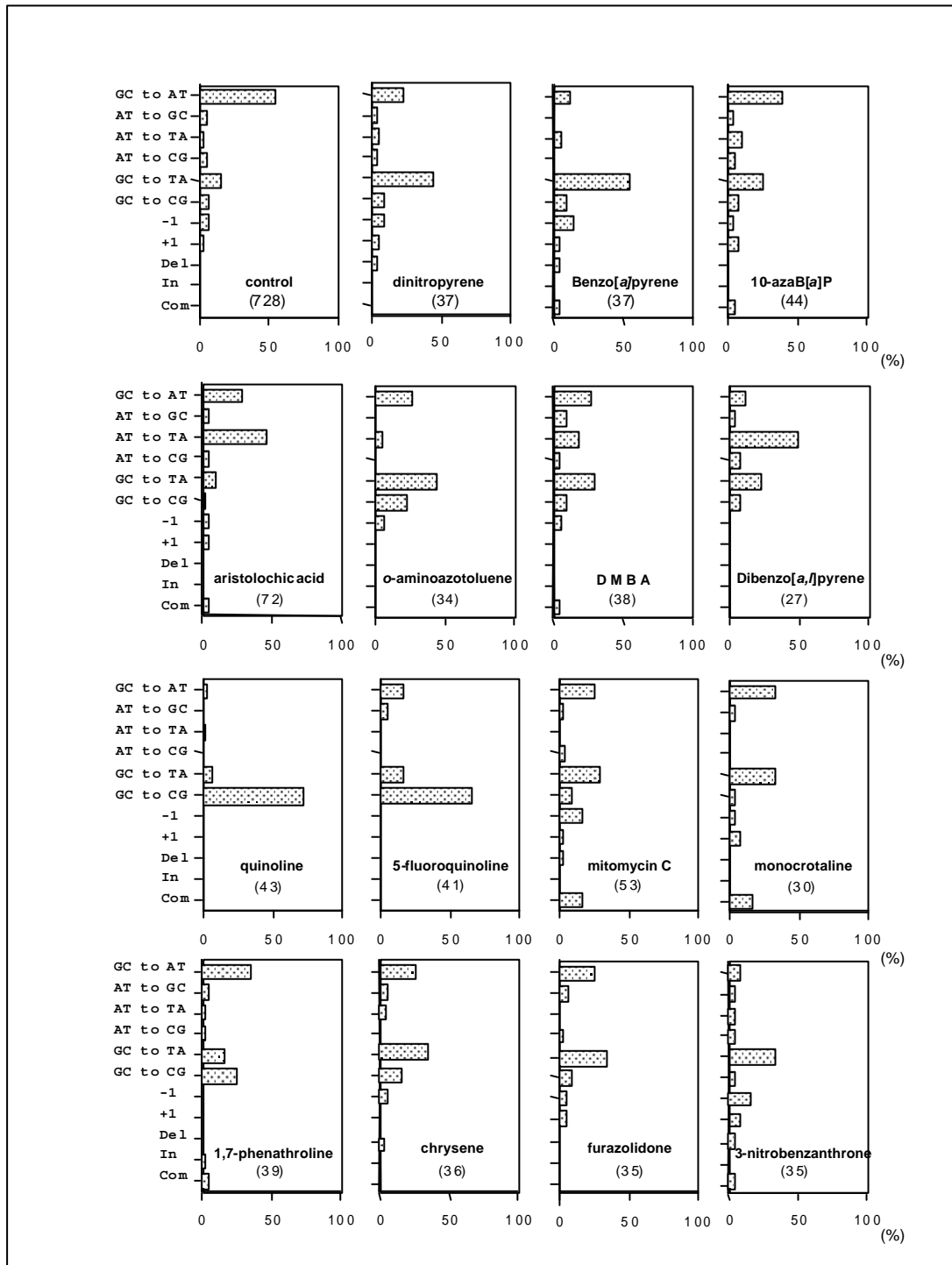


表1 各種ニトロソアミン類により誘発された遺伝子変異の特徴


ニトロソアミンの種類	アルキル基	誘発された変異のタイプ
ジメチルニトロサミン	-CH ₃	GC AT deletion
ジエチルニトロサミン	-CH ₂ CH ₃	AT TA GC AT
ジエタノールニトロサミン	-CH ₂ CH ₂ OH	AT GC AT TA
ジプロピルニトロサミン	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	AT TA GC AT
ジイソプロパノールニトロサミン	$\begin{matrix} \text{OH} \\ \\ -\text{CH}_2\text{CHCH}_3 \end{matrix}$	GC AT AT CG -1 frameshift
ジブチルニトロサミン	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	negative
ジイソブチルニトロサミン	$\begin{matrix} \text{H}_3 \\ \\ -\text{C}-\text{H}-\text{C}-\text{H}_3 \\ \\ \text{H}_2 \end{matrix}$	negative
ブチルブタノールニトロサミン	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃ or -CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	AT GC AT TA AT CG
ニトロソモルフォリン		AT GC AT TA AT CG

図2 アレル特異的PCR法の原理と変異体希釈サンプルによる検出感度の検討

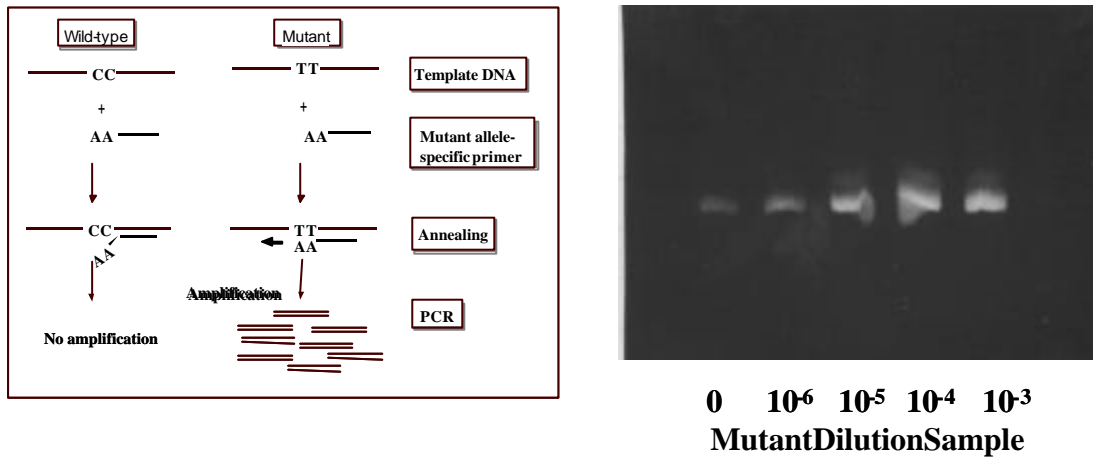


表2 肝発癌物質によるマウス肝臓での遺伝子発現変化

Benz[a]pyrene		Quinoline	
Bcl-2 associated death promoter	116	desmocollin 2	49.1
cytochrome P450 1A1	41.5	wingless-related MMTV integration site 3	25.0
talin	24.2	talin	22.8
mitogen activated protein kinase 10	14.5	Bcl-2 associated death promoter	16.2
myeloid cell leukemia sequence 1	11.2	fibroblast growth factor 6	13.3
wingless-related MMTV integration site 3	9.1	EGF receptor pathway substrate 8	11.8
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13	6.5	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13	11.8
src homology 2 domain-containing transforming protein C3	2.5	myeloid cell leukemia sequence 1	11.5
linker for activation of T cells	2.4	activating transcription factor 2	4.9
integrin beta 2 (Cd18)	2.3	calcium binding protein A11 (calgizzarin)	4.7
myelin transcription factor 1	0.22	serine protease inhibitor 2-2	0.27
E74-like factor 1	0.30	myelin transcription factor 1	0.33
wingless-related MMTV integration site 3A	0.33	semaphorin 4C	0.38
transcription factor 4	0.35	GATA-binding protein 4	0.38
solute carrier family 30 (zinc transporter), member 4	0.36	angiogenin	0.39
glutamate receptor, ionotropic, kainate 1	0.37	E74-like factor 1	0.39
GATA-binding protein 4	0.39	related to Drosophila groucho gene	0.40
T-cell leukemia, homeobox1	0.39	T-cell leukemia, homeobox 1	0.40
G protein-coupled receptor 19	0.42	ribosomal protein S29	0.41
interferon regulatory factor 1	0.43	early growth response 1	0.43