

課題名 RF-1005 遺伝毒物学を使った、ハイスループットな有害化学物質検出法の開発

課題代表者名 廣田耕志（首都大学東京 理工学研究科 分子物質化学専攻 生物化学研究室 教授）

研究実施期間 平成22～24年度

累計予算額 14,582千円（うち24年度4,444千円）
予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード(5～10個以下程度) 遺伝毒性物質、がん、DNA損傷、DNA修復、遺伝学、遺伝毒物学

研究体制

(1) 遺伝毒物学を使った有害化学物質検出法の開発（首都大学東京）

研究協力機関

京都大学 医学研究科

研究概要

1. はじめに(研究背景等)

これまで遺伝毒物の検出方法として、化審法に定められたエームテストやマウス小核試験が用いられている。また、遺伝毒物以外の毒性に関しても、毒性の種類に応じて様々な検出法が開発されている。しかし、これまでの方法による検査は必ずしも正確になされていない点が問題であった。例えば、エームテストやマウス小核試験では、大量の偽陰性と偽陽性とが発生することが問題となっている(Kirkland et al 2005 Mut. Res.)。

我々は、この問題を克服するために毒物試験に遺伝学を融合させた「遺伝毒物学」手法を提案している。図1に、遺伝毒物学手法を説明する。

偽陽性と偽陰性を解決する為の手段： 遺伝毒物学・Chemical Genetics

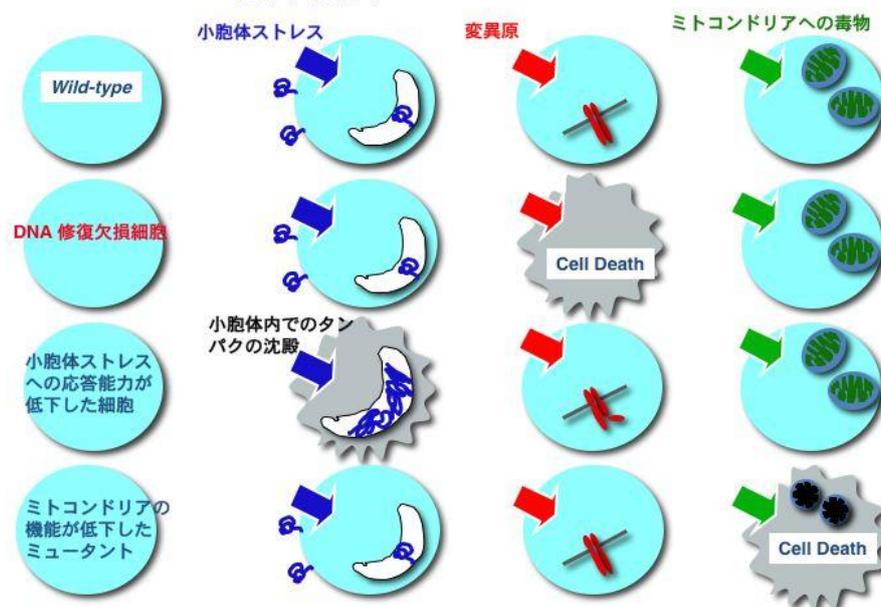


図1 これまでの毒性検査では野生型細胞のみを用いて検査をしてきた。遺伝毒物手法では、野生型細胞を陰性対照において、各種経路の変異体細胞をアッセイする。上図では細胞死をエンドポイントとしてアッセイした例を示す。仮に薬品が野生型細胞を殺したとしても、もの言わず細胞の死から、その原因を探ることは事実上不可能である。一方、もしDNA修復の変異体細胞が特異的に死ぬのであれば、その原因はDNAが傷ついたことによる死であることが結論できる。上図では、DNA修復の変異体、小胞体ストレス応答の変異体、ミトコンドリア機能の変異体を用いたアッセイを例示している。各代謝経路の変異体を並べて、最も簡単に測定できる「細胞死」を調べるだけで、化学物質が毒性を持つのか？どのような毒性なのか？（遺伝毒性か否か）など正確にアッセイできる。

2. 研究開発目的

これまでの遺伝毒性物質の検査には、細菌細胞を用いたエームス試験や、マウスを用いた小核試験が用いられてきた。これらの試験の問題点は、偽陰性や偽陽性が大量に発生することであった。本研究では、DT40(ニワトリBリンパ球細胞株)を用いて、偽陰性、偽陽性を低減させた次世代の有害化学物質の検出法を開発することである。DT40細胞の特徴は、遺伝子の標的破壊の効率が高いことである。我々はこの細胞から100種を超える、DNA修復関連因子の遺伝子破壊を系統的に行い、世界最大のノックアウト細胞のライブラリーを持っている。DT40細胞の特色として、細胞の70%がS期(DNA複製期)にあり、G1(DNA複製の前の時期)からS期に移行する際のDNA損傷チェックポイントが全く機能しないことが挙げられる。この特徴は、DNA損傷を高感度に捉えるのに適している。それは、G1期にDNAが損傷を受けたとしても、DNA複製を行うので、DNA上の些細な損傷もDNA複製後にはDNA2重鎖切断に発展するからである。これまでに、このDNA2重鎖切断は染色体の断裂として、顕微鏡下で観察する技術があった。実際に染色体分析は、遺伝毒性物質の検出に用いられている。しかし、この方法はDNA断裂を可視化するので、他の損傷(例えば、UV光によるDNA鎖上の損傷)は、感度よく検出できなかった。DT40ではG1期のチェックポイントが機能せず、複製中の細胞が70%を占めるので、高確率にDNAのキズがDNA2重鎖切断に発展し、高感度にDNA損傷を捉えることができる。本研究では、(i)細胞死をエンドポイントとする遺伝毒物学を応用したアッセイの開発と、(ii)染色体分析法を遺伝毒物学手法で改善することを目指した。

3. 研究開発の方法

(1) 遺伝毒物学を使った、ハイスループットな有害化学物質検出法の開発(首都大学東京)

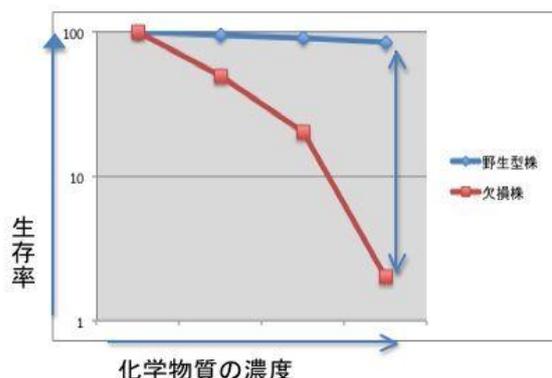
(i) 細胞死をエンドポイントとする遺伝毒物学を応用したアッセイの開発

DT40のDNA修復変異体と野生型細胞を用いた本アッセイ方法の概要を図2に示す。

遺伝毒物学手法を使った毒物検査

生存を指標に野生型 vs DNA修復変異体

野生型を陰性対象に用いるので、偽陽性↓。
変異体を調べるので、偽陰性↓。



生存率の差が変異原性の有無を表す

図2 遺伝毒物学手法を使った毒物検査

野生型細胞とDNA修復因子の欠損した変異体を並べて、様々な濃度(横軸)の化学物質に暴露したときの生存率(縦軸(対数軸で表示))のグラフを示す。もし、変異体が野生型よりも生存率が有意に低下すれば、その化合物は遺伝毒性を持つと結論できる。

上記の方法で化合物を試験した場合の偽陰性と偽陽性の発生について、解析を行なった。この目的のため、既知の遺伝毒性物質と非遺伝毒物について解析し、偽陽性と偽陰性を測定した（図3）。その結果、偽陽性は0%であり、偽陰性は6.2%であることがわかり、この成績は既存の方法（エームテストやマウス小核試験）に比べて良いことが確認できた。

遺伝毒物学手法の検査成績

Genotoxin	発がん性	Nongenotoxin	発がん性
重クロム酸カリウム	○	アニリン	×
エチジウムプロマイド	○	クロラムフェニコール	×
スーダン I	○	ソルビン酸	×
ICRF	○	ナフトレン	×
過酸化水素	○	1-ナフトール	×
メタンスルホン酸メチル	○	H2O2	×
VP16(エトポシド)	○	エタノール	×
ベンゾピレン	×	メタノール	×
マイトマイシンC	○	DMSO	×
5-FU	○		
カンプトテシン	○		
シスプラチン	○		
ヒドロキシ尿素	○		
aphidicolin	○		
メルファラン	○		
MNNG	○		

偽陰性=6.2%

偽陽性=0%

ベンゾピレンが偽陰性となった

図3 細胞死をエンドポイントとしたアッセイ法の既知の化学物質に対するアッセイ結果を示す。偽陰性、偽陽性ともにたいへん低く好成績である。

本試験で、ベンゾピレンにのみ偽陰性を示すことがわかった。ベンゾピレンは代謝毒性物質であることがわかっており、我々の方法では代謝毒性物質が検出できないという問題があることが明らかとなった。そこで、代謝毒性物質が検出できない問題を解決するために、肝臓抽出液（S9 mix）を用いた新しいアッセイ方法を確立した（図4）。この新しいアッセイ法では、低濃度のベンゾピレンの遺伝毒性を検出することが出来た。

代謝活性化法で再評価すると、 ベンゾピレンの遺伝毒性が検出できた

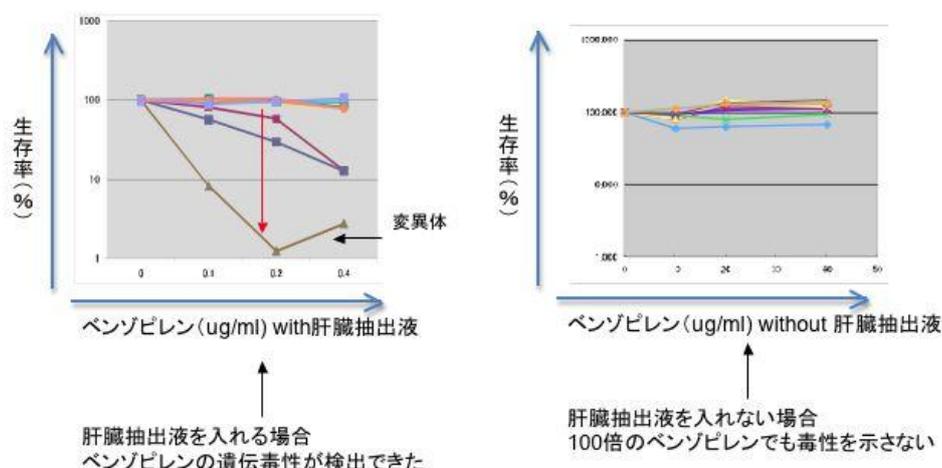


図4 肝臓抽出液を用いて代謝毒性物質を検出するために改善した方法をもちいて、ベンゾピレンの毒性をアッセイした結果を示す。
 野生型細胞とDNA修復因子の欠損した変異体を並べて、様々な濃度（横軸）の化学物質に暴露したときの生存率（縦軸（対数軸で表示））のグラフを示す。図左は肝臓抽出液を試験する化合物にあらかじめ加え加温した後に試験した結果である。図右は肝臓抽出液を用いない方法の結果である。
 肝臓抽出液を加えることで、DNA修復変異体で感受性の増加が見られるようになった（図左）。この時、感受性を検出した濃度が肝臓抽出液を使用しない場合（図右）よりも、100倍低濃度であることに注目したい。この試験では、Rev3変異体（図左で生存率が低下した茶色のライン）が抗感受性となることから、ベンゾピレンが誘導するDNA損傷はアダクトであることが予想できる。これは、既知のベンゾピレンの性質と一致する。

(ii) 染色体分析法を遺伝毒物学手法で改善する

本研究では、遺伝毒物学手法を染色体分析に応用することで改善した。本研究の開始に先立ち、アメリカ国立衛生研究所(NIH)において確立、運用を既に行なったハイスループット法で、1408の化合物から47のポジティブ化合物を得ていた。本研究では、染色体分析法を遺伝毒物学手法で改善した(図5)。確立した遺伝毒物学手法を用いた染色体分析法により、47のポジティブ化合物の中で特に遺伝毒性が顕著であった8種の再評価を行ない、それらの化合物が確かに遺伝毒性を持つことを検証した(Yamamoto et al 2011 EMM)。

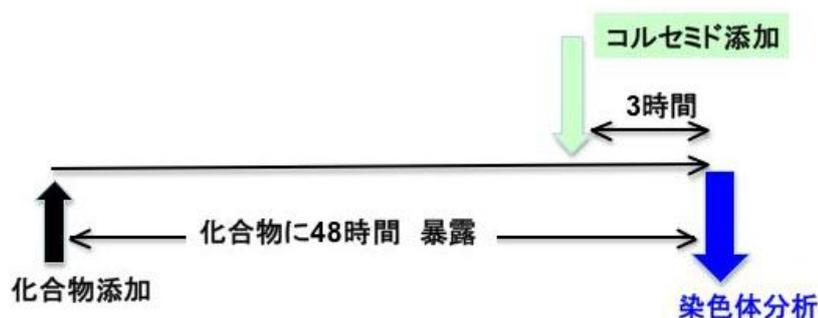


図5 遺伝毒物学手法を用いた染色体分析法の方法の概要。

さらに、NIHでのスクリーニングで偽陽性と判定された複数の複製阻害薬品の評価を行った。これまでに、葉酸拮抗剤のピリメサミンやリボヌクレオチドリダクターゼ阻害薬品のヒドロキシ尿素(HU)などの複製阻害効果が報告されている薬品が、野生型とDNA修復変異体の両方を同程度に殺すことが判明していた。そこで、これらの薬品の及ぼす生物効果を遺伝毒物学手法で詳細に検討した。複製阻害薬品として、HU、5-FU、Aphidicolinの3種を検討した。これらの薬品が、野生型とDNA修復変異体を同程度に殺すことが、細胞死をエンドポイントとしたアッセイ手法で確認できた。さらに、これらの薬品によって、誘導される染色体断裂を染色体分析手法で調べたところ、野生型細胞とDNA修復変異細胞とで同程度の断裂が誘導されることがわかった(図6)。この結果は、複製阻害によって発生する染色体断裂は、DNA切断を伴わないことを示唆する。この結果は、これまで信じられてきた「染色体断裂は常に切れたDNAを反映している」という概念を覆す発見である(Fujita et al. 2013 Plos ONE)。

DNA複製阻害薬品は、野生型と2重鎖切断修復変異体とで、同程度の染色体断裂を導入する

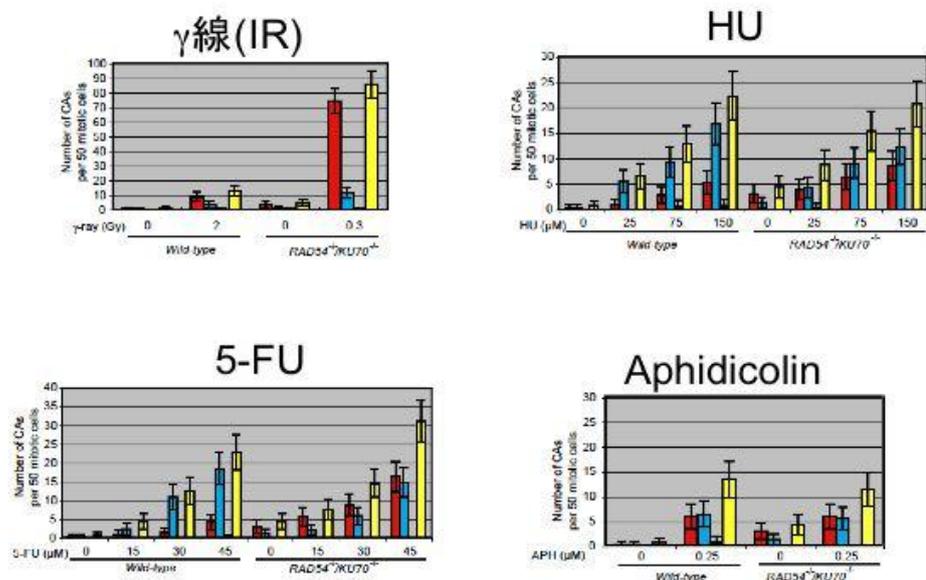


図6 野生型細胞とDNA修復因子の欠損した変異体を並べて、様々な濃度（横軸）の化学物質3種やγ線（既知のDNAを切断する処理）に暴露したときの染色体断裂の発生率（縦軸）のグラフを示す。本研究では、切断したDNAを修復できない変異体を用いた。γ線に対して、変異体は野生型細胞に比べ有意に多くの染色体断裂を示すが、3種のDNA複製阻害薬品では、有意な差がみられなかった。この結果から、DNA複製阻害薬品による染色体断裂はDNAの切断を伴わないというこれまで

この結果は、ヒト細胞においても再現され、ニワトリ細胞に特異の現象ではなく、一般的な現象として複製阻害ではDNA切断を伴わない新タイプの染色体断裂を誘導することがわかった。

さらに、DNA複製が停止しやすい変異体細胞2種を新たに作製し、

(1)これらの細胞がHUなどの複製阻害薬品に超感受性となること、(2)これらの細胞が野生型細胞に比べ、HUなどによって有意に多くの染色体断裂を示すこと、を示し、複製の停止は、DNA切断を伴わない新タイプの染色体断裂を引き起こし、染色体分析法で偽陽性を引き起こす原因となることを突き止めた。

4. 結果及び考察

(1) 遺伝毒物学を使った、ハイスループットな有害化学物質検出法の開発

エームテストよりも成績の良い（偽陰性と偽陽性とが少ない）試験法を確立した。本研究で作製した、遺伝学手法を応用した毒物検査法では、偽陽性の生じるメカニズムまで理解することが出来る。さらに、本研究の試験法では複製阻害薬品で発生する染色体断裂が実際には、DNA2重鎖切断を伴わないことを明らかにした。遺伝学手法を毒物検査に取り入れることにより、偽陽性や偽陰性を低下させるだけでなく、その原因を予想することが出来る。以下に本研究の結論をまとめる。

本研究の結論

- (1) 本研究では細胞死をアッセイのエンドポイントとする毒物評価法を遺伝学手法で改善することにより、エームテストよりも好成績のアッセイ法を作ることが出来た。
- (2) 染色体分析法に遺伝学主婦尾を応用し改善した。
- (3) 生存率をエンドポイントとしたアッセイ、染色体分析法のどちらも遺伝毒物学手法を用いることで、高感度化と偽陽性低下を同時に実現させることが出来た。さらに、遺伝毒物学手法では、

遺伝毒性があると判定されたとき、その毒物が導入するDNA損傷の種類を論理的に予測できる基礎データを与えることが出来る。

- (4) 複製の阻害薬品（抗がん剤として用いられる）によって、導入される染色体断裂はDNA 2重鎖切断を伴わないことを明らかにした。複製の阻害では染色体断裂を試験すると偽陽性がでる。この偽陽性は、複製のストールによってクロマチンが脱凝縮したことが原因となっていると考えられる。
- (5) 遺伝毒物学手法（野生型-変異体の比較）で、偽陰性と偽陽性を低下できる。そして、DNA損傷を誘導する化合物の性質を予想するための有用な基礎データを与えることができる。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

本研究で作製した、遺伝毒物学手法に基づく（1）細胞死をエンドポイントとした方法、（2）染色体分析手法は、偽陰性と偽陽性の低い、信頼のおけるアッセイ方法であることが確認できた。さらに、本試験を応用し、複製阻害薬品によって引き起こされる染色体断裂が、DNA切断を伴わないという、これまでの常識を覆す結論を得た。

考察及び今後の展望

本試験で作製した細胞死をエンドポイントとしたアッセイ手法は、誰でも短期間に簡便に実施可能なアッセイ法であり、ハイスループット化しやすいというメリットもある。今後、新しい毒物評価法として取り入れてほしい。

申請者は、本方法を抗がん剤のスクリーニングに応用したいと考えている。高齢化の進む今日において、がんの克服は急を要する課題である。ガン細胞の特徴として、特定のDNA修復経路が減弱していることが挙げられる。DNA修復研究が進み、各修復経路の関係が詳細にわかってきており、ガン細胞で減弱した経路と相補的關係にある経路を予想できる時代になっている。そこで、申請者は、各DNA修復経路の阻害薬品の同定をし、ガン細胞ごとに最適な抗がん剤を作製したいと思っている。つまり、ガン細胞で減弱した経路と相補的關係にある経路を特異的に阻害できる薬品を作製したいのである。

本研究で作製したバイオアッセイ法は、この目的に向けた薬品探索に最適であり、本方法を応用し、将来に薬品開発に資する技術に繋げて行きたい。

(2) 環境政策への貢献

本試験で作製した細胞死をエンドポイントとしたアッセイ手法は、誰でも短期間に簡便に実施可能なアッセイ法であり、ハイスループット化しやすいというメリットもある。

さらに、遺伝学手法を用いた本アッセイシステムのフィロソフィーは、遺伝毒性物質のみならず、他の毒性検査においてもすぐに使用可能な技術となる。今後、DNA修復経路の変異体以外の様々な代謝経路（例；小胞体ストレス経路、ミトコンドリアストレス経路、タンパク質合成経路 など、）の変異体を作製すれば、様々な生物内での代謝経路に悪影響を及ぼす化学物質の検出に用いることが出来る。以上の2点から、本研究の成功は今後の環境政策に大きく貢献する。

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない

<行政が活用することが見込まれる成果>

- (1) 遺伝毒物学手法による細胞死をエンドポイントにしたアッセイ手法を確立した。
- (2) 遺伝毒物学手法を応用した染色体分析手法を確立した。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) Fujita M, Sasanuma H, Yamamoto KN, Harada H, Kurosawa A, Adachi N, Omura M, Hiraoka M, Takeda S, and Hirota K.

Interference in DNA replication can cause mitotic chromosomal breakage unassociated with double-strand breaks. PlosONE (2013)

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) 第69回日本癌学会学術総会 (大阪) 2010年9月22日 廣田耕志
'DNAポリメラーゼ δ によるAP部位の損傷乗越え'
- 2) 第34回日本分子生物学会 (横浜) 2011年12月15日
The involvement of SLX4 in interstrand cross-link repair is regulated by the Fanconi anemia pathway. (Kouji Hirota and Shunichi Takeda)
- 3) 第35回日本分子生物学会 (博多) 2011年12月14日
SUMO-targetted Ubiquitin Ligase RNF4 Guards Genome Stability by suppressing error-prone Homologous Recombination (Kouji Hirota and Shunichi Takeda)

7. 研究者略歴

課題代表者: 廣田 耕志

2001年3月 東京大学大学院理学研究科修了(博士(理学))

2001年4月~2008年3月 理化学研究所(和光) ポスドク研究員

2008年4月~2010年6月 京都大学医学研究科助教

2010年6月~2012年3月 京都大学医学研究科准教授

2012年4月~現在 首都大学東京 理工学研究科 分子物質化学専攻 生物化学研究室 教授

研究参画者

(1) 廣田 耕志 (同上)

RF-1005 遺伝毒物学を使った、ハイスループットな有害化学物質検出法の開発

(1) 遺伝毒物学を使った有害化学物質検出法の開発

首都大学東京 理工学研究科

分子物質化学専攻

生物化学研究室

廣田 耕志

<研究協力者>

京都大学医学研究科 山本君代、藤田真梨

平成22～24年度累計予算額：14,582千円

(うち、平成24年度予算額：4,444千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

これまで遺伝毒物の検出方法として、化審法に定められたエームテストやマウス小核試験が用いられている。これまでの方法による検査は必ずしも正確になされていない点が問題であった。例えば、エームテストやマウス小核試験では、大量の偽陰性と偽陽性とが発生することが問題となっている(1)。

我々は、この問題を克服するために毒物試験に遺伝学を融合させた「遺伝毒物学」手法を提案している。本研究では、化合物の遺伝毒性を検出する方法として以下の2点の開発を行なった。

(1) 遺伝毒物学手法による細胞死をエンドポイントとしてアッセイの開発、(2) 遺伝毒物学手法による染色体分析法の開発。

本研究で開発した、遺伝毒物学手法による遺伝毒性物質の検出方法は、偽陽性や偽陰性が極めて低いことがわかった。さらに、本研究ではアッセイプロトコールを改善し、代謝毒性物質も検出できるようにした。

本研究で開発した方法は、誰でも短期間に簡便に実施が可能なアッセイ法であり、ハイスループット化しやすいというメリットもある。さらに、遺伝学手法を用いた本アッセイシステムのフィロソフィーは、遺伝毒性物質のみならず、他の毒性検査においてもすぐに使用可能な技術となる。今後、DNA修復経路の変異体以外の様々な代謝経路(例;小胞体ストレス経路、ミトコンドリアストレス経路、タンパク質合成経路 など)の変異体を作製すれば、様々な生物内での代謝経路に悪影響を及ぼす化学物質の検出に用いることが出来る。

以上の2点から、本研究の成功は今後の環境政策に大きく貢献する。

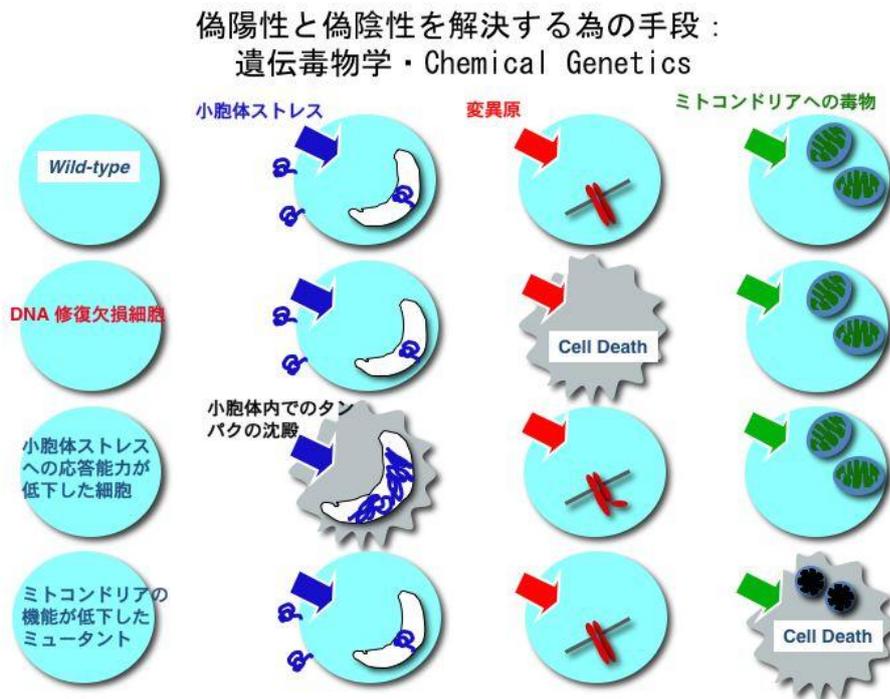
[キーワード]

遺伝毒性物質、がん、DNA損傷、DNA修復、遺伝毒物学

1. はじめに

これまで遺伝毒物の検出方法として、化審法に定められたエームテストやマウス小核試験が用いられている。また、遺伝毒物以外の毒性についても、毒性の種類に応じて様々な検出法が開発されている。しかし、これまでの方法による検査は必ずしも正確になされていない点が問題であった。例えば、エームテストやマウス小核試験では、大量の偽陰性と偽陽性とが発生することが問題となっている(1)。

我々は、この問題を克服するために毒物試験に遺伝学を融合させた「遺伝毒物学」手法を提案している。図1に、遺伝毒物学手法を説明する(2)。



図(1)-1 これまでの毒性検査では野生型細胞のみを用いて検査をしてきた。遺伝毒物手法では、野生型細胞を陰性対照において、各種経路の変異体細胞をアッセイする。上図では細胞死をエンドポイントとしてアッセイした例を示す。仮に薬品が野生型細胞を殺したとしても、もの言わず細胞の死から、その原因を探ることは事実上不可能である。一方、もしDNA修復の変異体細胞が特異的に死ぬのであれば、その原因はDNAが傷ついたことによる死であることが結論できる。上図では、DNA修復の変異体、小胞体ストレス応答の変異体、ミトコンドリア機能の変異体を用いたアッセイを例示している。各代謝経路の変異体を並べて、最も簡単に測定できる「細胞死」を調べるだけで、化学物質が毒性を持つのか？どのような毒性なのか？（遺伝毒性か否か）など正確にアッセイできる。

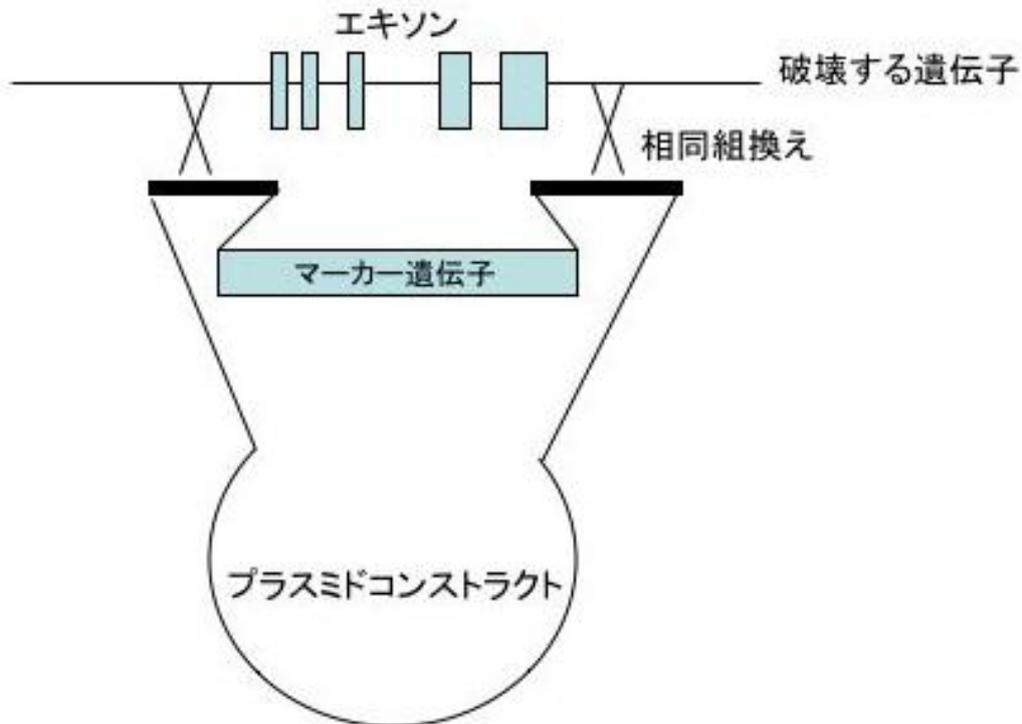
2. 研究開発目的

これまでの遺伝毒性物質の検査には、細菌細胞を用いたエームス試験や、マウスを用いた小核試験が用いられてきた。これらの試験の問題点は、偽陰性や偽陽性が大量に発生することであっ

た。本研究では、DT40(ニワトリBリンパ球細胞株)を用いて、偽陰性、偽陽性を低減させた次世代の有害化学物質の検出法を開発することである。DT40細胞の特徴は、遺伝子の標的破壊の効率が高いことである。我々はこの細胞から100種を超える、DNA修復関連因子の遺伝子破壊を系統的に行い、世界最大のノックアウト細胞のライブラリーを持っている。DT40細胞の特色として、細胞の70%がS期(DNA複製期)にあり、G1(DNA複製期の前の時期)からS期(DNA複製期)に移行する際のDNA損傷チェックポイントが全く機能しないことが挙げられる。この特徴は、DNA損傷を高感度に捉えるのに適している。それは、G1期にDNAが損傷を受けたとしても、DNA複製を行うので、DNA上の些細な損傷もDNA複製後にはDNA2重鎖切断に発展するからである。これまでに、このDNA2重鎖切断は染色体の断裂として、顕微鏡下で観察する技術があった。実際に染色体分析は、遺伝毒性物質の検出に用いられている。しかし、この方法はDNA断裂を可視化するので、他の損傷(例えば、UV光によるDNA鎖上の損傷)は、感度よく検出できなかった。DT40ではG1期のチェックポイントが機能せず、複製中の細胞が70%を占めるので、高確率にDNAのキズがDNA2重鎖切断に発展し、高感度にDNA損傷を捉えることができる。本研究では、(1)細胞死をエンドポイントする遺伝毒物学を応用したアッセイの開発と、(2)染色体分析法を遺伝毒物学手法で改善することを目指した。

3. 研究開発方法

我々は図(1)-1 に示す「遺伝毒物学手法」を基本概念として、ニワトリ B リンパ球 DT40細胞を用いたバイオアッセイを開発する。DT40細胞では、図(1)-2 に示すような組換えDNAを用いて、自在に目的の遺伝子の破壊を行なうことができる。



図(1)-2 ニワトリ B リンパ球 DT40 細胞に上記のようなプラスミドコンストラクトを導入すると、高頻度にコンストラクトに存在する相同配列とゲノム上の遺伝子領域内で相同組換えが起こり、目的の遺伝子の破壊が出来る。この方法で、申請者らは既に 100 を超える DNA 修復経路の変異体細胞を作製し、世界最大のライブラリーを保有している。

DT40 細胞の特徴として、細胞分裂が早く (8 時間 / 1 分裂)、浮遊細胞なので取扱が容易であることが挙げられる。

DT40 は以下の組成の培養液で培養を行なう。

RPMI 1640 (ナカライ)

5 μ M 2-ME

1% Chicken serum

10% heat inactivated FBS

培養は、湿潤な環境で 5%CO₂ の存在下、39.5 度で行なった。

変異体作製に用いたマーカー遺伝子の選択には、以下の薬品を用いた。

Pur ^R 遺伝子による選択	ピュロマイシン	0.5ug/ml
Bsr ^R 遺伝子による選択	ブラストサイジン	25ug/ml
Neo ^R 遺伝子による選択	G418	2mg/ml
His ^R 遺伝子による選択	L-ヒスチジノール	1mg/ml

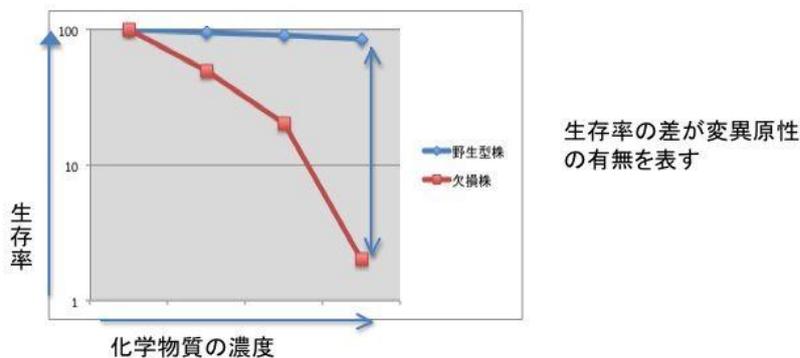
(1) 細胞死をエンドポイントとする遺伝毒物学を応用したアッセイの開発

細胞死をエンドポイントとしたアッセイ法の概略 (図 (1) - 2) と、実験方法 (図 (1) - 3) を示す。

遺伝毒物学手法を使った毒物検査

生存を指標に野生型 vs DNA修復変異体

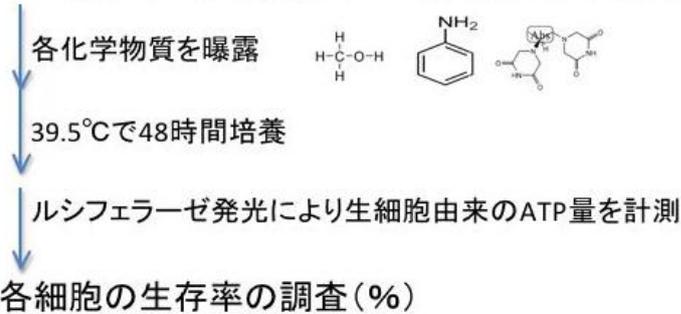
野生型を陰性対象に用いるので、偽陽性↓。
変異体を調べるので、偽陰性↓。



図(1)-3 野生型細胞とDNA修復因子の欠損した変異体を並べて、様々な濃度 (横軸) の化学物質に暴露したときの生存率 (縦軸 (対数軸で表示)) のグラフを示す。もし、変異体が野生型よりも生存率が有意に低下すれば、その化合物は遺伝毒性を持つと結論できる。

実験操作

・DT40の野生型株と各種のDNA修復経路の代謝経路の欠損株



図(1)-4 上図では、細胞死をエンドポイントとしたアッセイ法の手順を示す。本試験方法では、わずか2日の検定期間で、誰でも簡単に化学物質の遺伝毒性を試験することが出来る。

DT40細胞は、アッセイの開始に先立ち2日以上培養を行なう。この間細胞濃度が 1×10^5 /ml ~ 1×10^6 /mlの範囲になるように適宜培地で希釈を行なう。

細胞濃度を測定し、 1×10^4 /mlなるように培地で希釈し、24穴プレート（グライナー）に1ml分注する。この細胞培養液に対し、様々な濃度の化学物質を添加し、48時間さらに培養を続ける。培養終了後、培養液0.1 mlを96穴プレート（グライナー）にとり、ATP検出用発光試薬（CellTiterGlo: Plomega社）を0.1 ml加え、よく攪拌を行なう。この試薬は生細胞に存在する細胞内ATPに従って、発光反応をする。したがって生細胞数が多いほど強い発光として検出できる。検出はマルチウェル発光検出装置（Fluoroskan Ascent : Thermo社）を用いて行なった。

(2) 染色体分析法の遺伝毒物学手法による改善

図(1)-5に示す方法で、細胞の培養と染色体分析を行なった。



図(1)-5 遺伝毒物学手法を用いた染色体分析法の方法の概要。

DT40細胞は、アッセイの開始に先立ち2日以上培養を行なう。この間細胞濃度が 1×10^5 /ml～ 1×10^6 /mlの範囲になるように適宜培地で希釈を行なう。

細胞濃度を測定し、 1×10^4 /mlなるように培地で希釈し、24穴プレート（グライナー）に1ml分注する。この細胞培養液に対し、様々な濃度の化学物質を添加し、48時間さらに培養を続ける。培養終了直前3時間にコルセミド（0.06%[Gibco]）を培養に加える。コルセミドは、微小管阻害薬品であり、細胞に処理すると分裂期中期に細胞が停止する。この時期に細胞核のDNAは目に見える染色体として現れるので、ギムザ染色を行なうと容易に光学顕微鏡下で観察することが出来る。

4. 結果及び考察

(1) 細胞死をエンドポイントする遺伝毒物学を応用したアッセイの開発

図（1）- 3および4に示す方法で化合物を試験した場合の偽陰性と偽陽性の発生について、解析を行なった。この目的のため、既知の遺伝毒性物質と非遺伝毒物について解析し、偽陽性と偽陰性を測定した（図（1）- 6）。その結果、偽陽性は0%であり、偽陰性は6.2%であることがわかり、この成績は既存の方法（エームテストやマウス小核試験）に比べて良いことが確認できた。

遺伝毒物学手法の検査成績

Genotoxin	発がん性	Nongenotoxin	発がん性
重クロム酸カリウム	○	アニリン	×
エチジウムブロマイド	○	クロラムフェニコール	×
スーダン I	○	ソルビン酸	×
ICRF	○	ナフタレン	×
過酸化水素	○	1-ナフトール	×
メタンスルホン酸メチル	○	H2O2	×
VP16(エトポシド)	○	エタノール	×
ベンゾピレン	×	メタノール	×
マイトマイシンC	○	DMSO	×
5-FU	○		
カンプトテシン	○		
シスプラチン	○		
ヒドロキシ尿素	○		
aphidicolin	○		
メルファラン	○		
MNNG	○		

偽陰性=6.2%

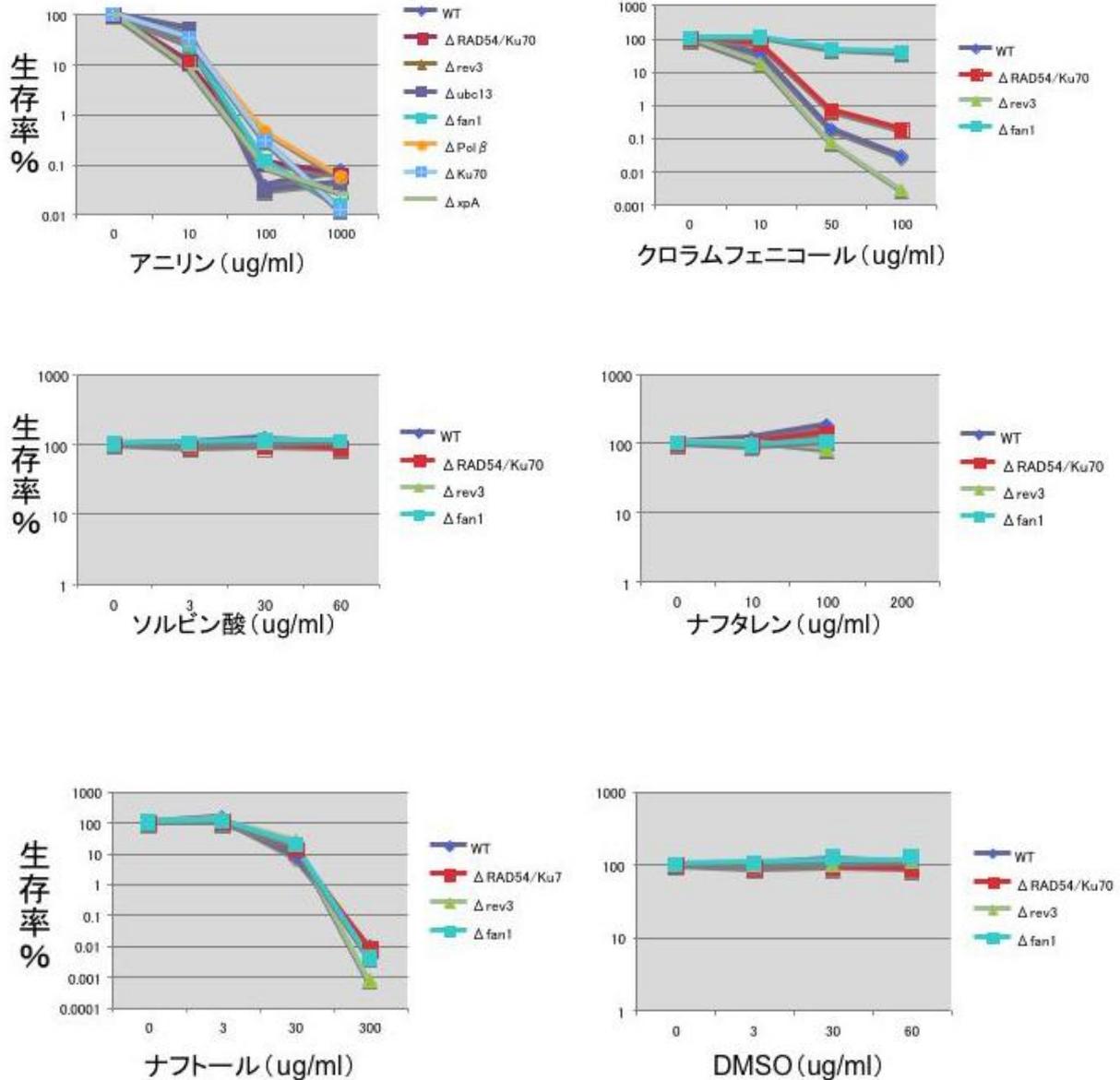
偽陽性=0%

ベンゾピレンが偽陰性となった

図(1)-6 細胞死をエンドポイントとしたアッセイ法の既知の化学物質に対するアッセイ結果を示す。偽陰性、偽陽性ともにたいへん低く好成績である。

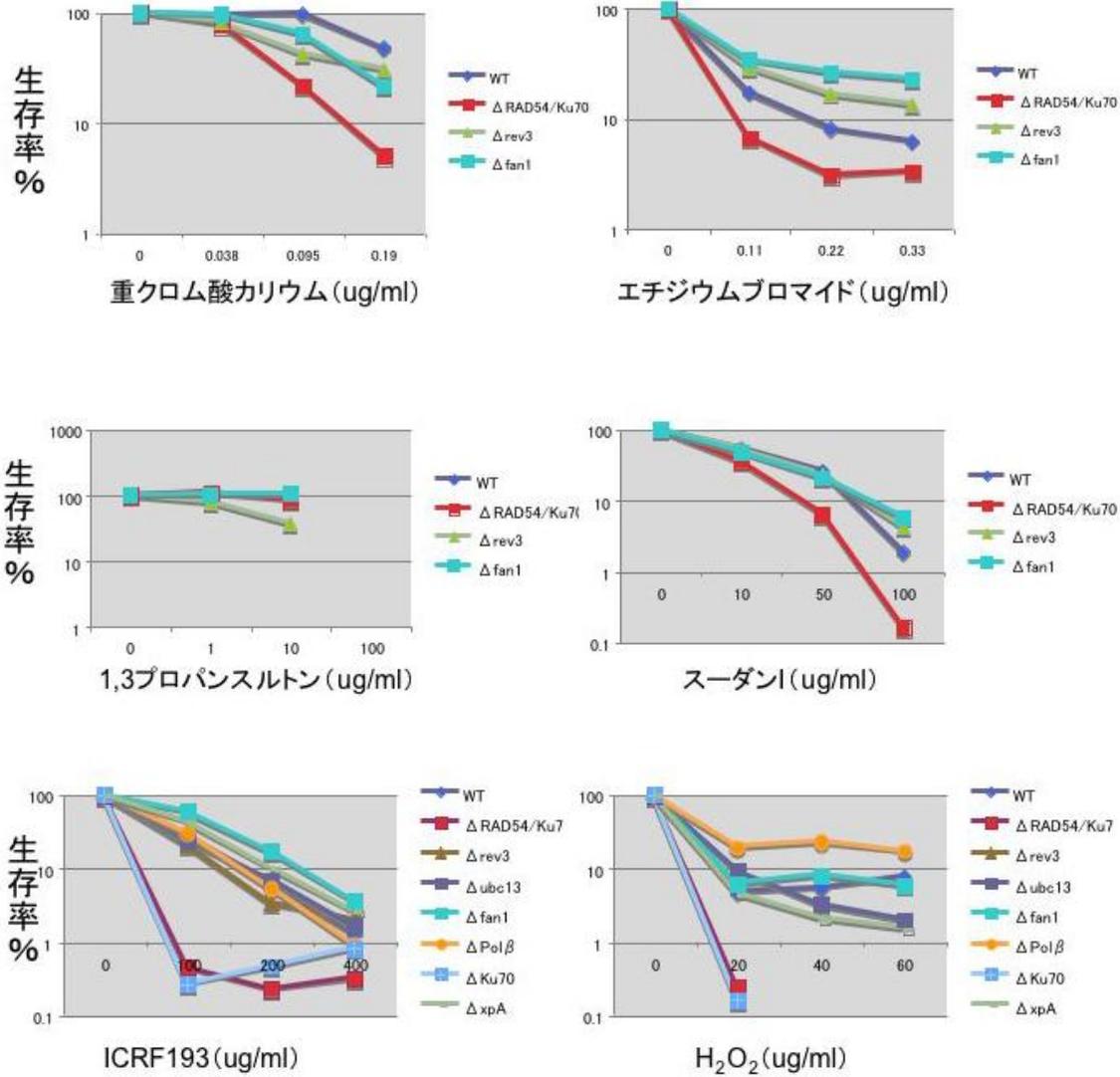
次ページ以降に図（1）- 6に示す結果の元となる、アッセイ結果を示す。

非遺伝毒性物質

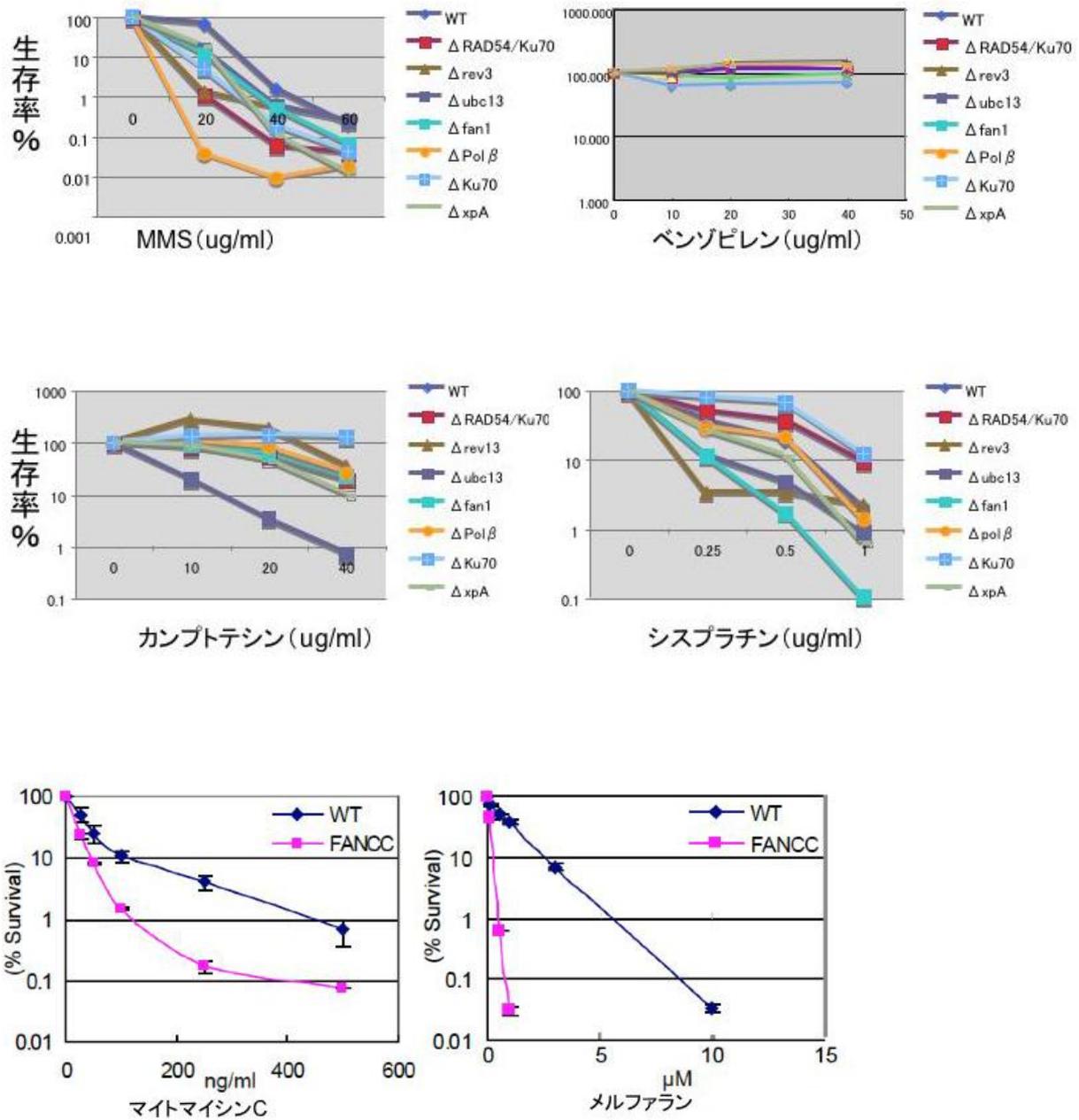


図(1)-7 野生型細胞とDNA修復因子の欠損した変異体を並べて、様々な濃度（横軸）の非遺伝毒性化学物質に暴露したときの生存率（縦軸（対数軸で表示））のグラフを示す。DNA修復変異体は、野生型よりも生存率が低下しないことから、遺伝毒性を持たないと判断できる。WTは野生型細胞、 Δ RAD54/KU70は2重鎖切断修復の変異、 Δ rev3はアダクトの修復の変異、 Δ fan1は鎖間架橋の修復の変異を表す。

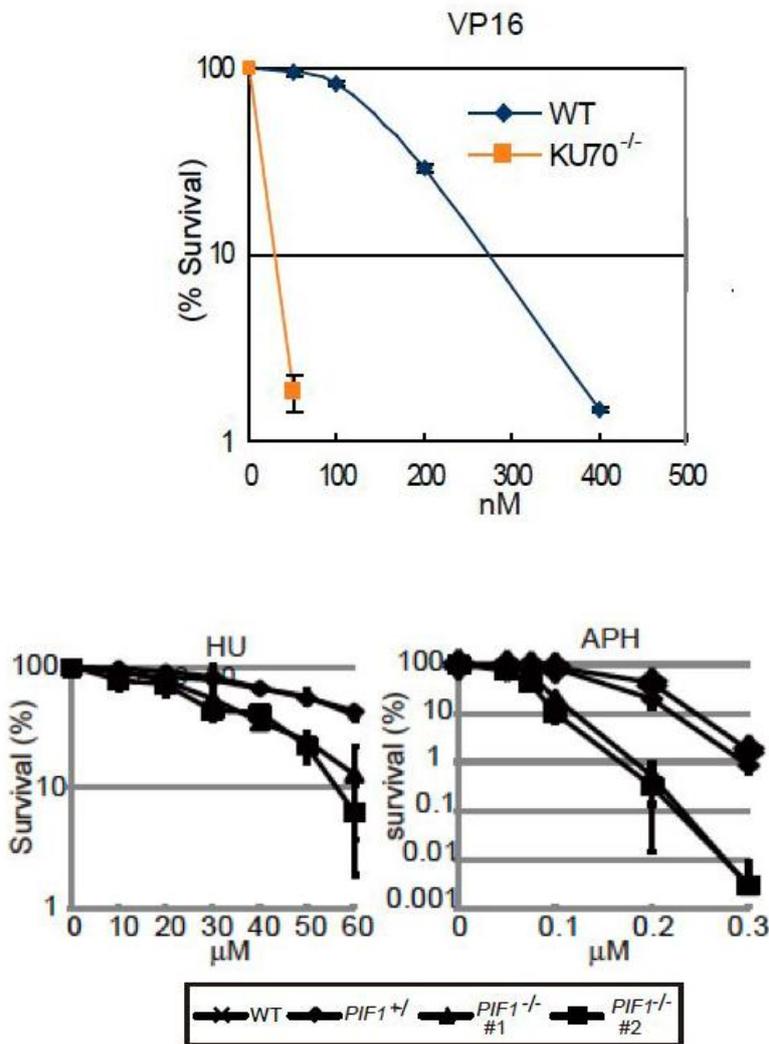
遺伝毒性物質



図(1)-7 野生型細胞とDNA修復因子の欠損した変異体を並べて、様々な濃度（横軸）の遺伝毒性化学物質に暴露したときの生存率（縦軸（対数軸で表示））のグラフを示す。DNA修復変異体は、野生型よりも生存率が低下することから、遺伝毒性を持つと判断できる。WTは野生型細胞、 Δ RAD54/KU70は2重鎖切断修復の変異、 Δ rev3はアダクトの修復の変異、 Δ fan1は鎖間架橋の修復の変異を表す。



図(1)-7 (続き) 野生型細胞とDNA修復因子の欠損した変異体を並べて、様々な濃度(横軸)の遺伝毒性化学物質に暴露したときの生存率(縦軸(対数軸で表示))のグラフを示す。DNA修復変異体は、野生型よりも生存率が低下することから、遺伝毒性を持つと判断できる。ベンゾピレンのみ遺伝毒性を検出できなかった。WTは野生型細胞、 Δ RAD54/KU70は2重鎖切断修復の変異、 Δ rev3はアダクトの修復の変異、 Δ fan1は鎖間架橋の修復の変異、 Δ Pol β は塩基ダメージの修復の変異、 Δ XPAはUVの損傷などの修復の変異、FANCCは鎖間架橋の修復の変異を表す。

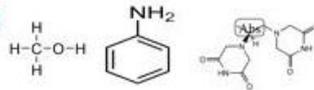


図(1)-7 (続き) 野生型細胞とDNA修復因子の欠損した変異体を並べて、様々な濃度(横軸)の遺伝毒性化学物質に暴露したときの生存率(縦軸(対数軸で表示))のグラフを示す。DNA修復変異体は、野生型よりも生存率が低下することから、遺伝毒性を持つと判断できる。WTは野生型細胞、PIF1^{-/-}は2複製ストールからの回復の変異、△ KU70は2重鎖切断の修復の変異を表す。

本試験で、ベンゾピレンにのみ偽陰性を示すことがわかった。ベンゾピレンは代謝毒性物質であることがわかっており、我々の方法では代謝毒性物質が検出できないという問題があることが明らかとなった。そこで、代謝毒性物質が検出できない問題を解決するために、肝臓抽出液(S9mix)を用いた新しいアッセイ方法を確立した(図(1)-8)。この新しいアッセイ法では、低濃度のベンゾピレンの遺伝毒性を検出することが出来た(図(1)-9)。

改善後の実験操作

各化学物質と**肝臓抽出液**
を混合する



DT40の野生型株と各種のDNA修復経路
の代謝経路の欠損株へ暴露

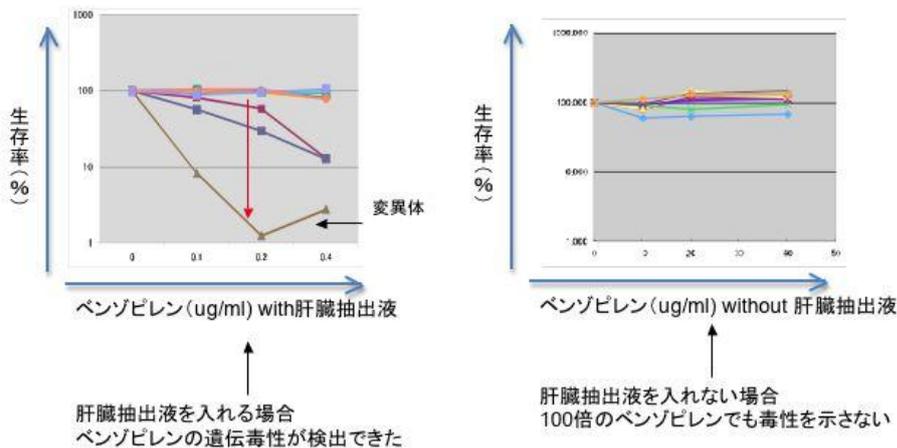
39.5°Cで48時間培養

ルシフェラーゼ発光により生細胞由来のATP量を計測

各細胞の生存率の調査(%)

図(1)-8 上図では、肝臓抽出液を用いて代謝毒性物質を検出するために改善
した方法を示す。肝臓抽出液として、S9mix(家田貿易)を使用した。

代謝活性化法で再評価すると、 ベンゾピレンの遺伝毒性が検出できた

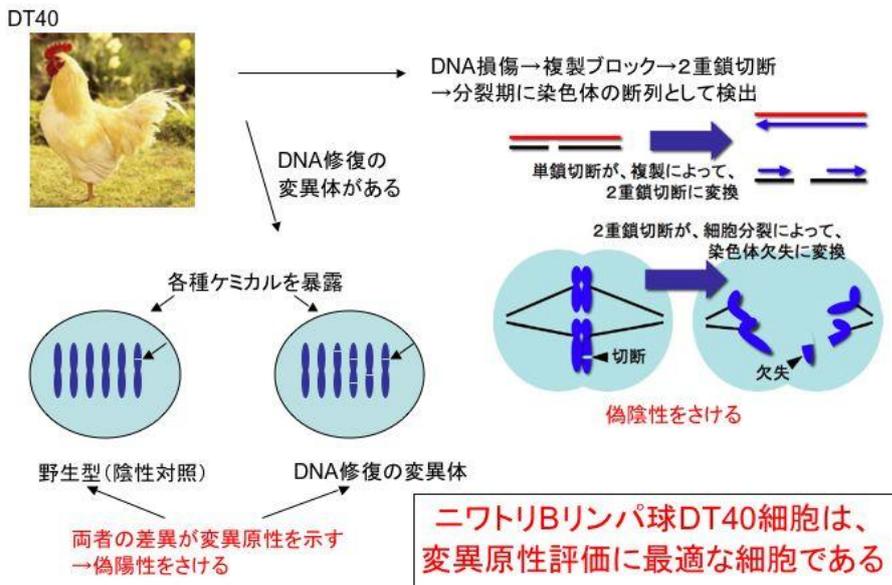


図(1)-9 上図では、肝臓抽出液を用いて代謝毒性物質を検出するために改善した
方法ももちいて、ベンゾピレンの毒性をアッセイした結果を示す。

(2) 染色体分析法の遺伝毒物学手法による改善

本研究では、遺伝毒物学手法を染色体分析に応用することで改善した。図(1) - 5に示す方法で、野生型細胞とDNA修復の変異体とを培養し、染色体分析を行なった。図(1) - 10に示すように、野生型細胞より有意にDNA修復変異体で多くの染色体断裂を示す時、暴露した化学物質は変異源性を持つことが結論できる。DT40の特色として、細胞の70%がS期(DNA複製期)にあり、G1からS期に移行する際のDNA損傷チェックポイントが全く機能しないことが挙げられる。この特徴は、DNA損傷を高感度に捉えるのに適している。それは、G1期にDNAが損傷を受けたとしても、DNA複製を行うので、DNA上の些細な損傷もDNA複製後にはDNA2重鎖切断に発展するからである(図(1) - 10右)。これまでに、このDNA2重鎖切断は染色体の断裂として、顕微鏡下で観察する技術があった。実際に染色体分析は、遺伝毒性物質の検出に用いられている。しかし、この方法はDNA断裂を可視化するので、他の損傷(例えば、UV光によるDNA鎖上の損傷)は、感度よく検出できなかった。DT40ではG1期のチェックポイントが機能せず、複製中の細胞が70%を占めるので、高確率にDNAのキズがDNA2重鎖切断に発展し、高感度にDNA損傷を捉えることができる。

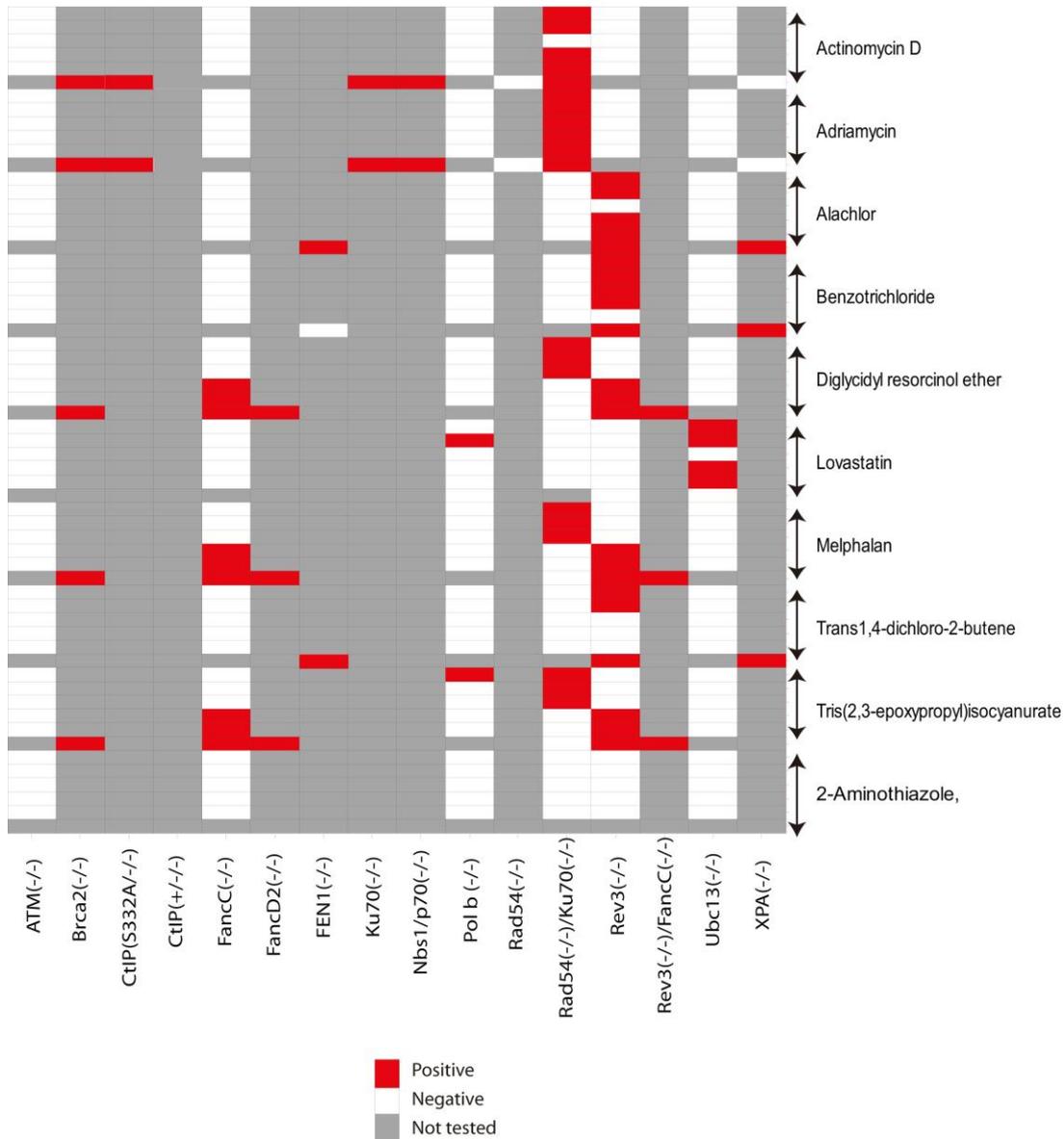
ニワトリBリンパ球DT40細胞を用いた、 遺伝毒物学的手法による変異原性評価法の確立



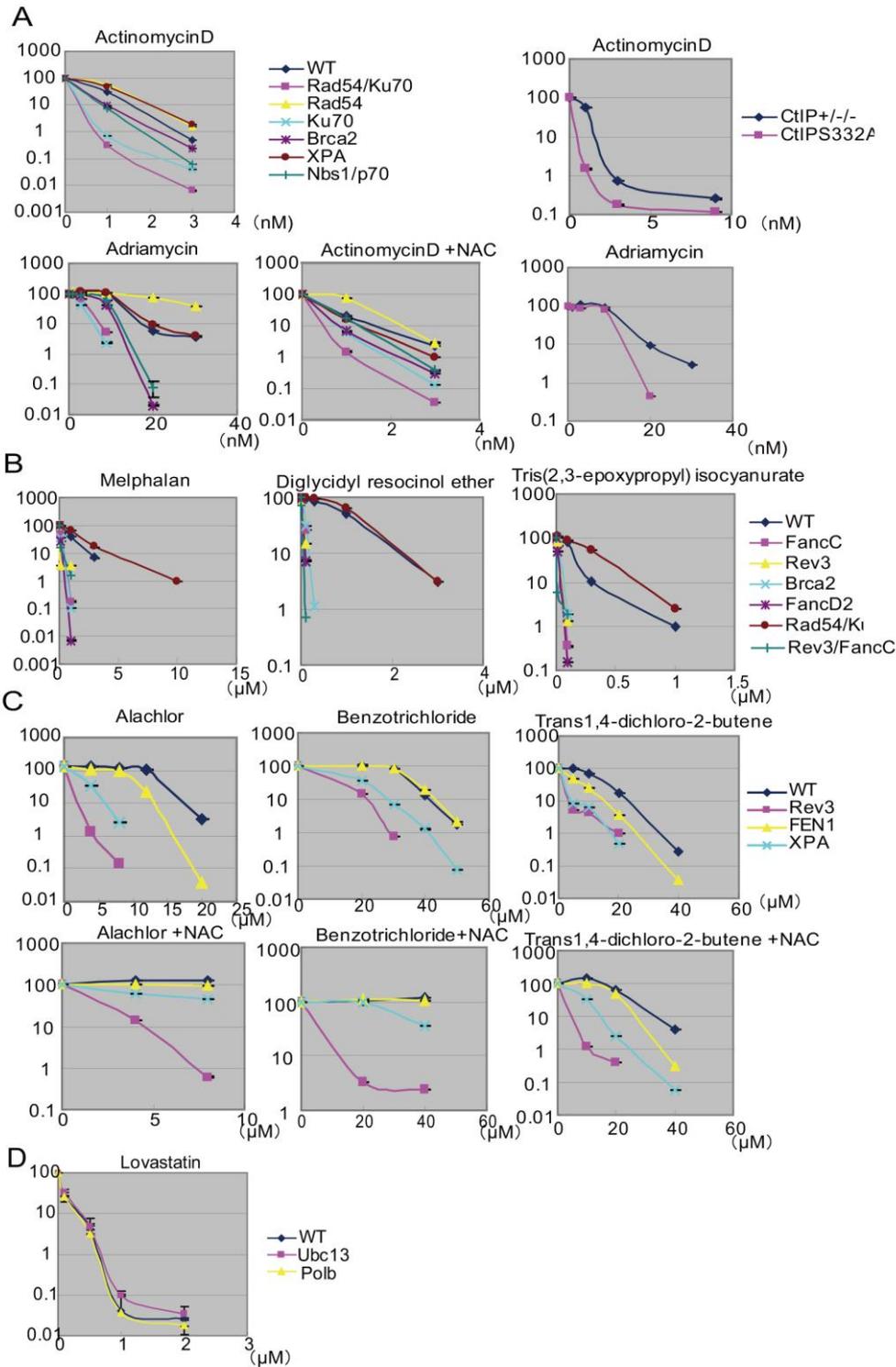
図(1)-10 DT40細胞を用いた遺伝毒物学手法による染色体分析法の利点。DT40細胞はDNA複製期(S期)がヒト細胞よりも全細胞周期中の多く(70%)を占め、DNA損傷によるチェックポイントが機能しないため、DNAの切断以外の損傷(UVによる損傷など)が、複製を経てDNAの切断に発展する。染色体分析では、DNAの切断に起因する染色体断裂を検出するため、このようなDT40細胞の特徴は有利となる。さらに、DT40細胞では、既に100を超えるDNA修復の変異体が構築されており、すぐに遺伝毒物学的『野生型対変異体細胞』の比較を行なうことができる。

本研究の開始に先立ち、アメリカ国立衛生研究所(NIH)において確立、運用を既に行なったハイ

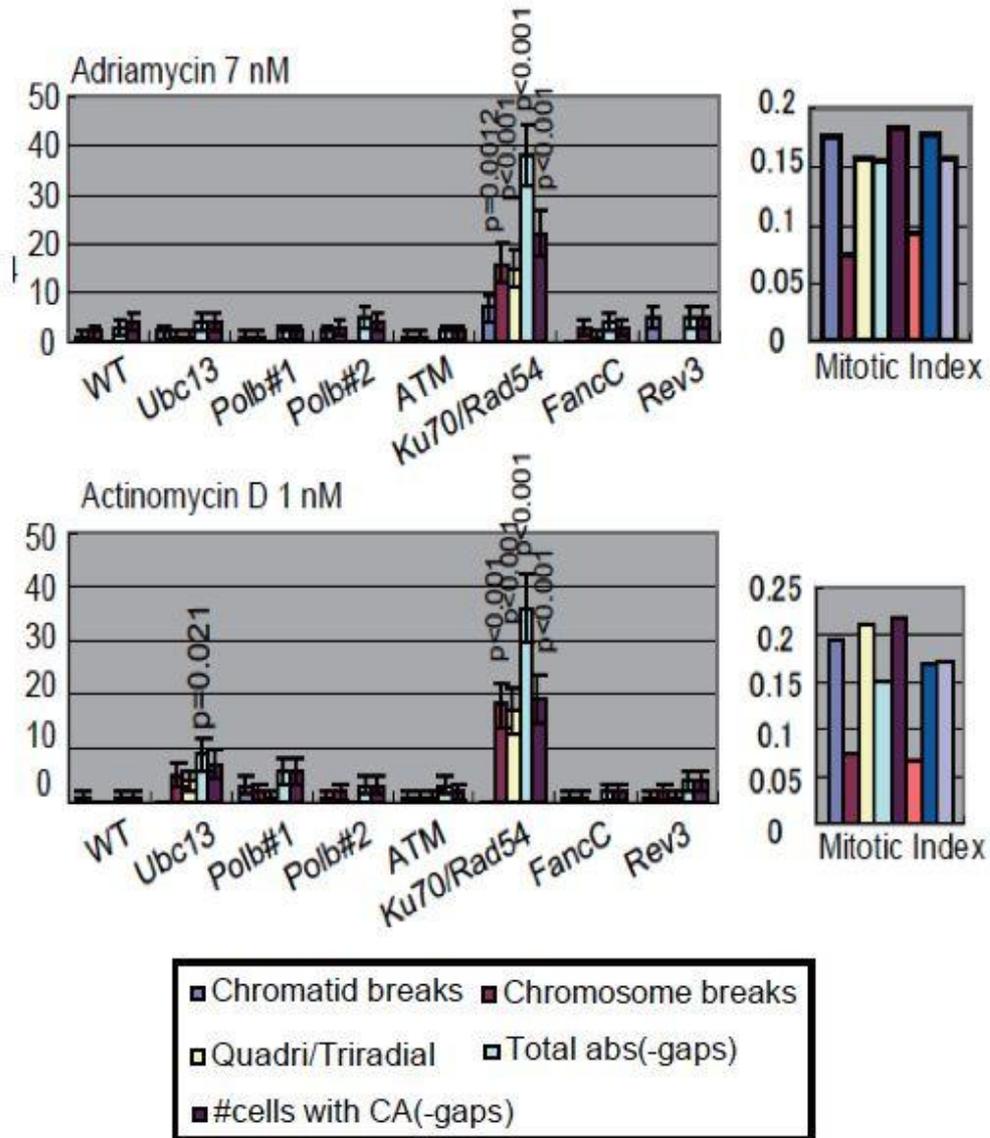
スループット法で、1408の化合物から47のポジティブ化合物を得ていた（図（1）- 1 1）。
 これの中から、特に遺伝毒性が顕著であると診断された8種の化合物について、遺伝毒物学手法による細胞死をエンドポイントとしたアッセイ（図（1）- 1 2）と染色体分析手法（図（1）- 1 3）で、再評価を行なった。



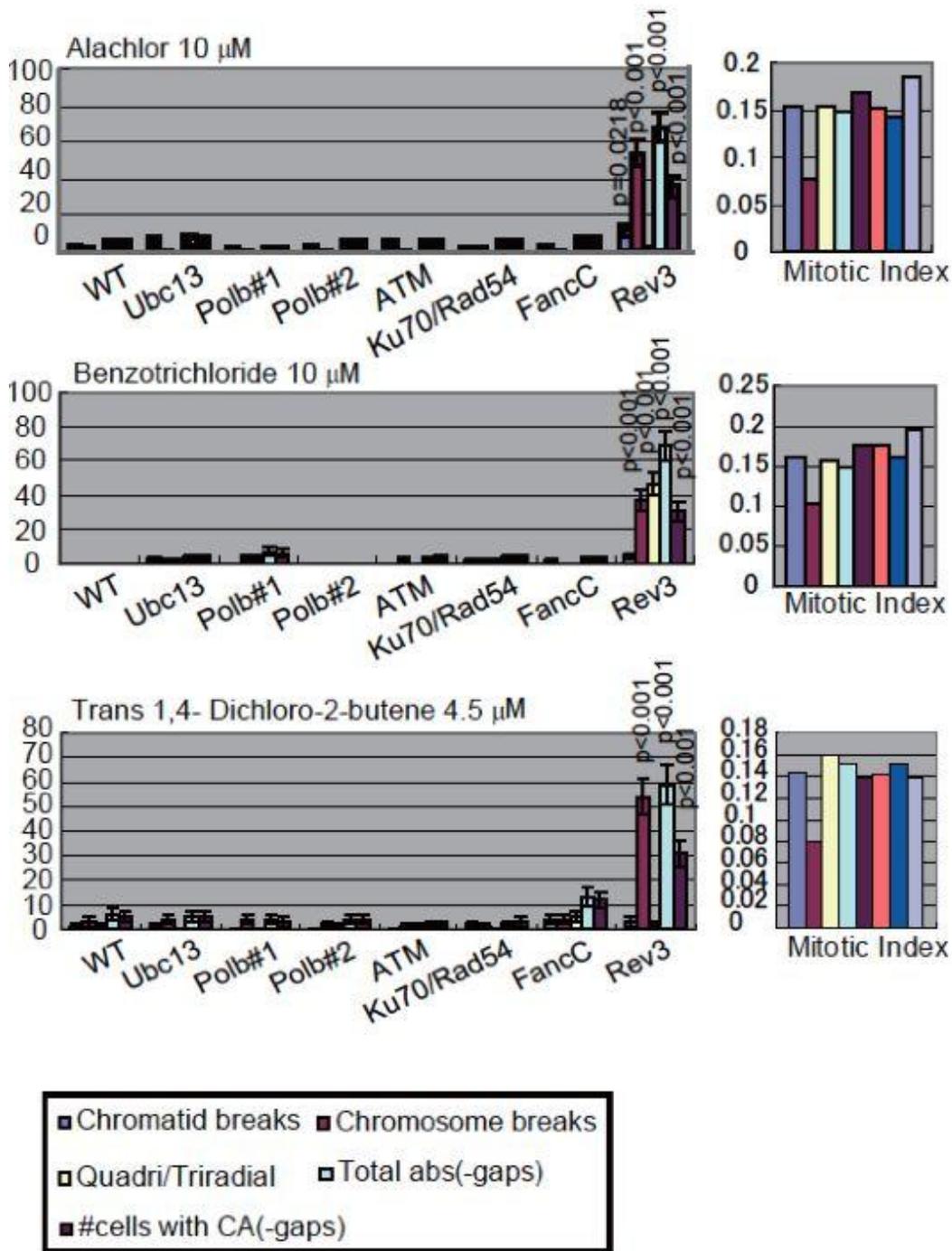
図(1)-11 ハイスループット法で1408種の化合物の遺伝毒性をスクリーニングした結果の一例。
 このように、変異体パネルと野生型細胞とを化合物ライブラリーに暴露し、変異体で有意に生存が低下するものをテーブルにして、最終的に47種のポジティブ化合物を発見した。
 横軸に野生型細胞との比較に用いたDNA修復変異体細胞、縦軸に化合物を示す。
 赤でハイライトした部分は、野生型より有意に生存率が低下し、遺伝毒性を検出したものを示す。



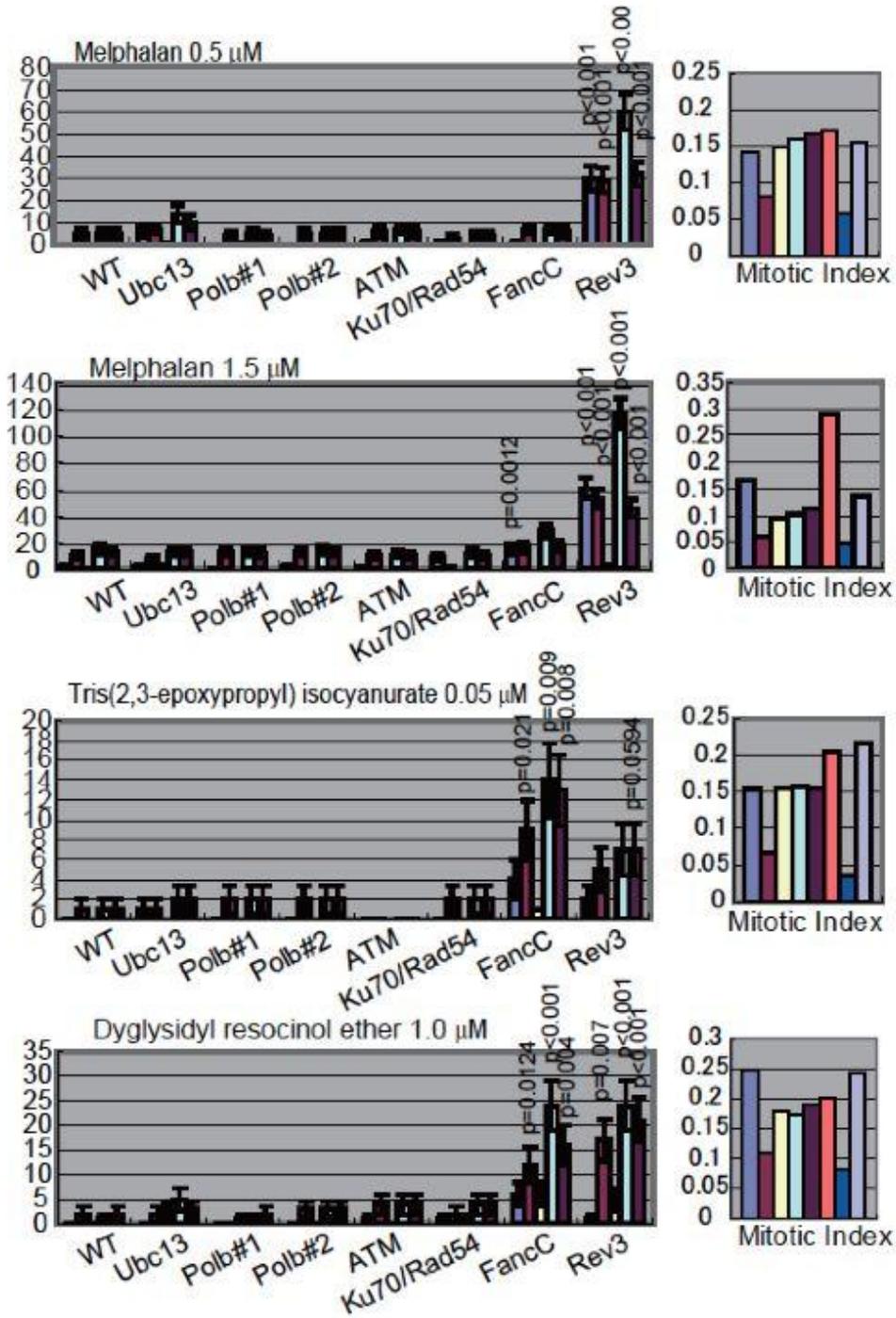
図(1)-12 ハイスクリーン法の結果を、細胞死をエンドポイントとして遺伝毒性を検出する遺伝毒物学手法で再評価した例。AはRad54/Ku70という、DNAの切断の修復が低下した変異体で生存率が低下したグループを示す。これらの化合物は、DNAの切断を誘導する活性を持つことが示される。BはFancCという、DNA 2重鎖間架橋の修復に欠損を示す細胞で生存率が低下した化合物を示す。これらの化合物はDNA 2重鎖間架橋を誘導すると考えられる。CはRev3というDNA塩基上のアダクトなどを乗り越えて複製する酵素の変異体で生存が低下した化合物を示す。これらはDNA塩基上にアダクトを誘導する活性があると考えられる。Dは変異源性を示さないネガティブコントロールの例。



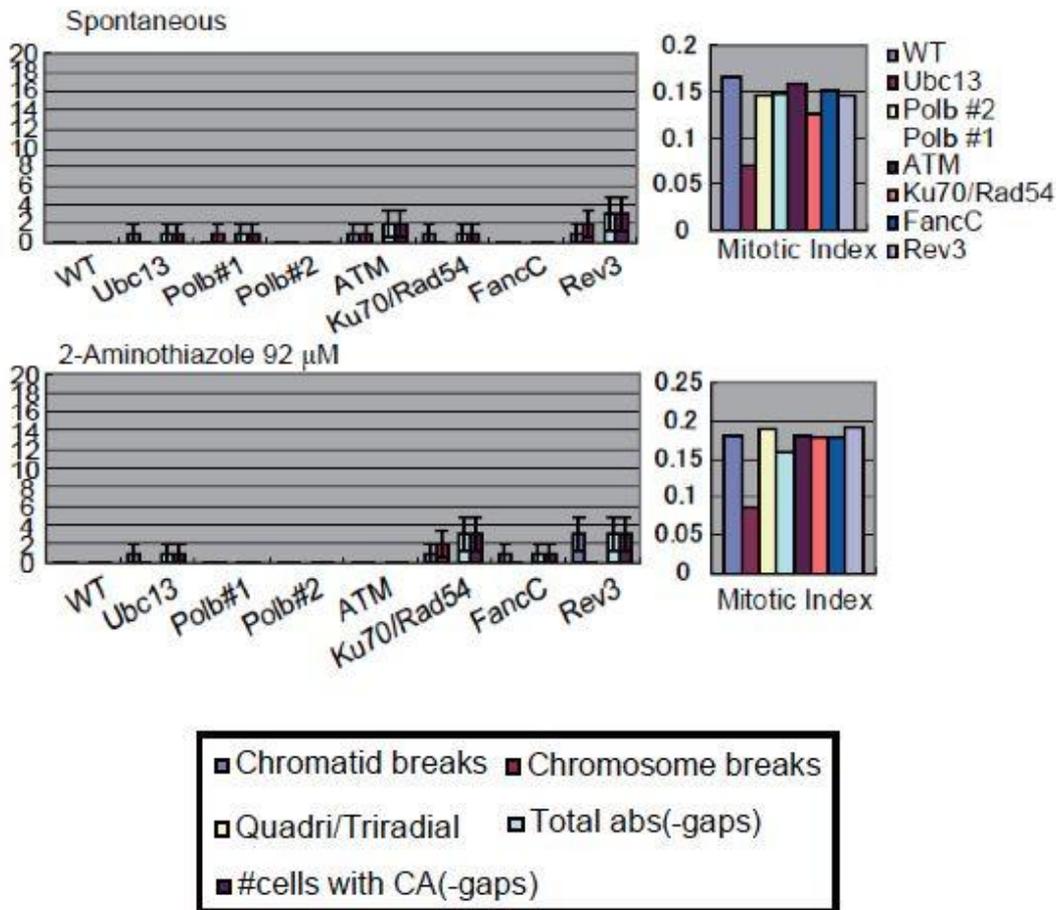
図(1)-13 染色体分析結果。横軸は野生型細胞との比較を行なったDNA修復変異体細胞を示す。縦軸は、染色体分析で検出した、染色体異常の頻度を示す。Rad54/Ku70という、DNAの切斷の修復が低下した変異体で染色体斷裂が増加したグループを示す。この結果から、これらの化合物は、DNAの切斷を誘導する活性を持つことが示される。



図(1)-13 (つづき) 染色体分析結果。横軸は野生型細胞との比較を行なったDNA修復変異体細胞を示す。縦軸は、染色体分析で検出した、染色体異常の頻度を示す。Rev3というDNA塩基上のアダクトなどを乗り越えて複製する酵素の変異体で染色体異常が増加した化合物を示す。これらはDNA塩基上にアダクトを誘導する活性があると考えられる。



図(1)-13 (つづき) 染色体分析結果。横軸は野生型細胞との比較を行なったDNA修復変異体細胞を示す。縦軸は、染色体分析で検出した、染色体異常の頻度を示す。FancCという、DNA 2重鎖間架橋の修復に欠損を示す細胞で染色体異常が増加した化合物を示す。これらの化合物はDNA 2重鎖間架橋を誘導すると考えられる。ClはRev3というDNA塩基上のアダクトなどを乗り越えて複製する酵素の変異体で生存が低下した化合物を示す。



図(1)-13 (つづき) 染色体分析結果。横軸は野生型細胞との比較を行なったDNA修復変異体細胞を示す。縦軸は、染色体分析で検出した、染色体異常の頻度を示す。この実験は、化合物を加えないネガティブコントロールと、非遺伝毒性化合物を添加したときのデータ。

非遺伝毒性化合物では、化合物を加えないときと同等に少ない染色体異常を示すことから、遺伝毒性を検出しないという結果を得た。偽陽性を示さないアッセイであることが確認された。

染色体分析手法の結果から、8種の化合物の遺伝毒性が再度確認できた。さらに、これらの化合物が誘導するDNA損傷の種類を予測することが出来た(3) (図(1) - 14)。

actinomycin D	2重鎖切断
Adriamycin	2重鎖切断
Alachlor	TLSによって修復される (アダクト等)
Benzotrichloride	TLSによって修復される (アダクト等)
diglycidyl resorcinol ether	FA経路 (ICL)
Melphalan	FA経路 (ICL)
trans-1,4-dichloro-2-butene	TLSによって修復される (アダクト等)
tris(2,3-epoxypropyl) isocyanurate	FA経路 (ICL)

すべての**positive compound**で、変異体に染色断裂誘導が見られた遺伝毒性物質の性質を予測できた。

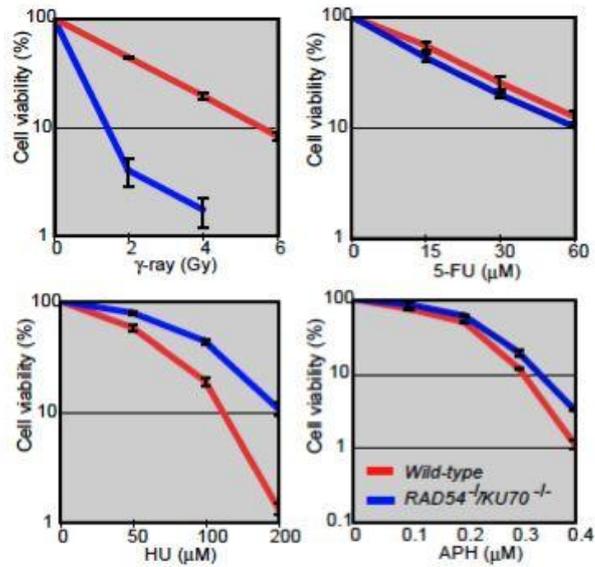
Yamamoto et al (2011) EMM

図(1)-14 染色体分析手法を遺伝毒物学によって改善した方法を用いて、検定した結果、ハイスループット法で特に顕著な遺伝毒性が予想された8種の化合物すべての遺伝毒性が確認された。さらに、これらの化合物が誘導するDNA損傷のタイプが上記のように予想された。ICLはDNA 2重鎖間架橋損傷を示す。

興味深いことに、NIHでのスクリーニングでは、複数の複製阻害薬品が偽陽性と判定された。ハイスループット法では、葉酸拮抗剤のピリメサミンやリボヌクレオチドリダクターゼ阻害薬品のヒドロキシン尿素（HU）などの複製阻害効果が報告されている薬品が、野生型とDNA修復変異体の両方を同程度に殺すことが判明していたのである。そこで、染色体分析手法を用いて、複製阻害薬品による偽陽性の原因究明を行なった。そこで、これらの薬品の及ぼす生物効果を遺伝毒物学手法で詳細に検討した。

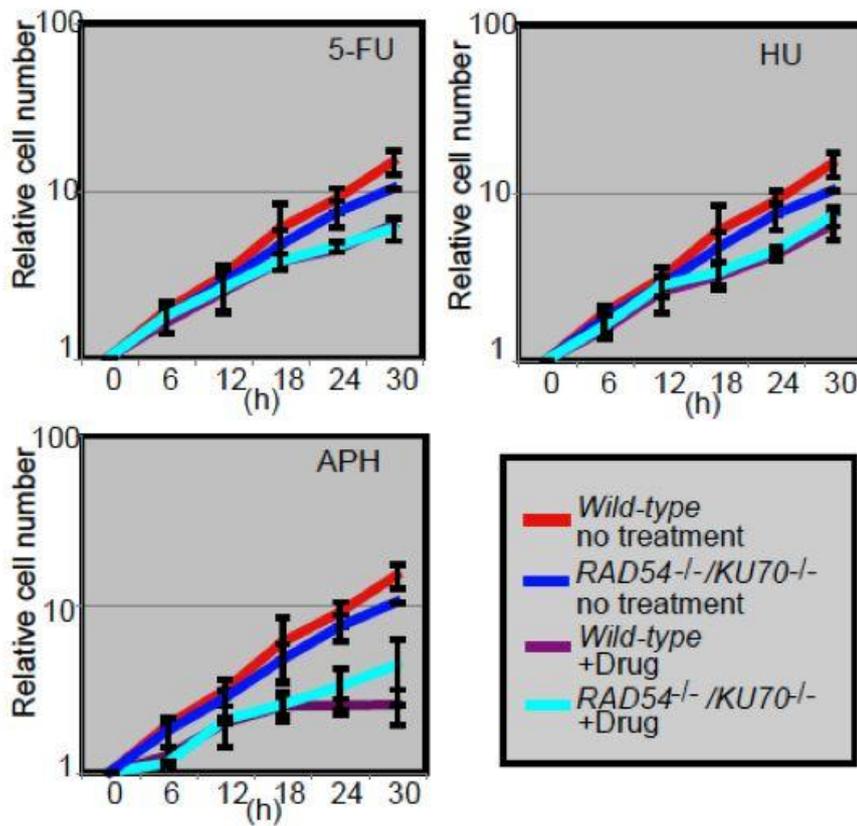
複製阻害薬品として、HU、5-FU、Aphidicolinの3種を検討した。これらの薬品が、野生型とDNA修復変異体を同程度に殺すことが、細胞死をエンドポイントとしたアッセイ手法で確認できた（図（1）- 15）。アッセイに用いた濃度の複製阻害薬品では、細胞の増殖（図（1）- 16）や、DNA複製（図（1）- 17）は有意に低下していないことから、DNA複製全般は阻害されておらず、部分的な複製阻害にとどまっていることが結論できる。注目すべきことに、本アッセイで使用している薬剤濃度は、抗がん治療に用いられている濃度に対応する。

DNA複製阻害薬品は野生型と2重鎖切断修復変異体とで、同程度生存率を低下させる。

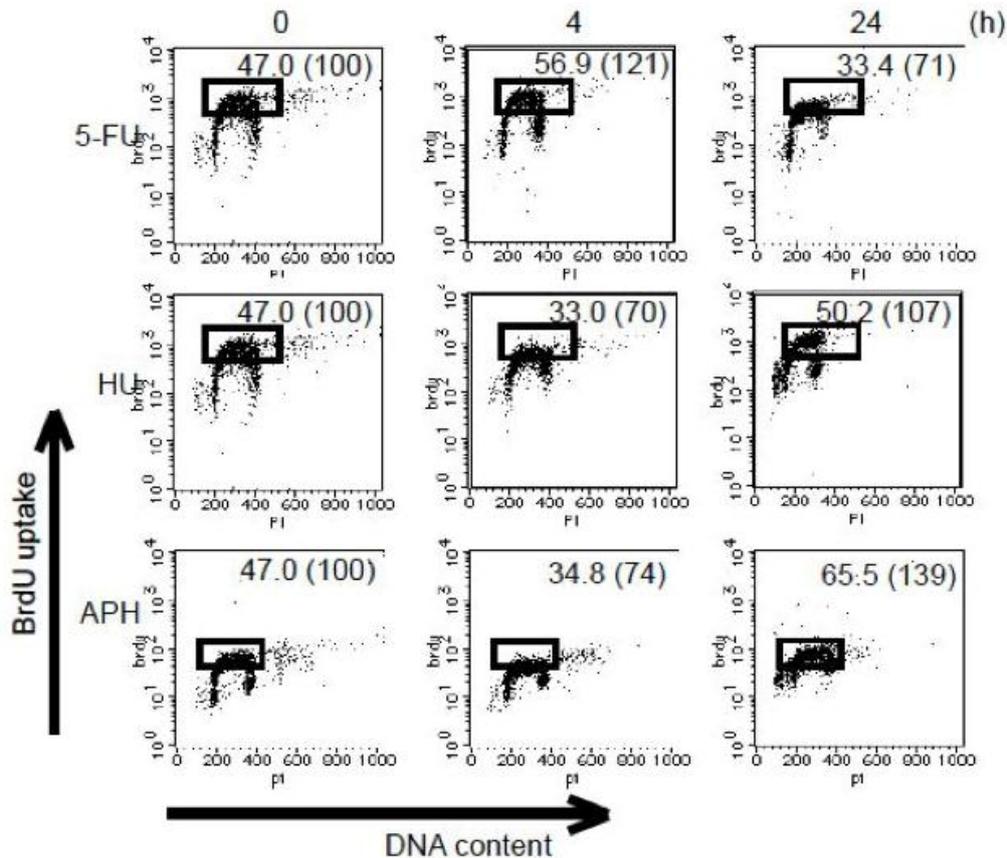


抗がん剤として臨床で使われている濃度

図(1)-15 上図では、野生型細胞とDNA修復因子の欠損した変異体 (*RAD54⁻¹/Ku70^{-1/-}*)を並べて、様々な濃度 (横軸) の化学物質3種やγ線 (既知のDNAを切断する処理) に暴露したときの生存率 (縦軸 (対数軸で表示)) のグラフを示す。本研究では、切断したDNAを修復できない変異体を用いた。γ線に対して、変異体は野生型細胞に比べ有意に生存率が低下するが、3種のDNA複製阻害薬品では、有意な生存率低下がみられなかった。この結果から、DNA複製阻害薬品はDNAを切断しないことが示唆された。



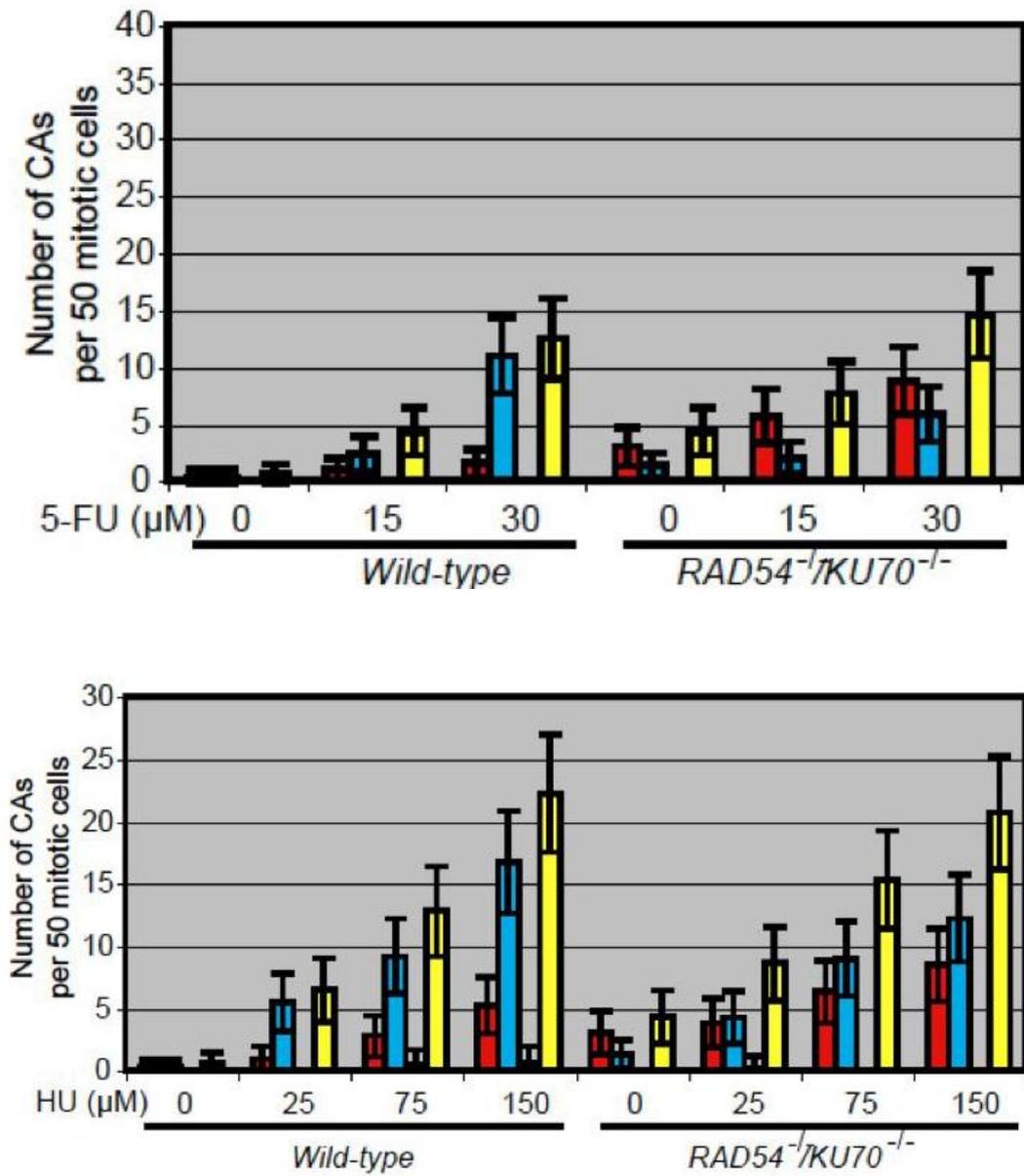
図(1)-16 野生型細胞とRAD54^{-/-}/KU70^{-/-} 変異体 (DNA切斷を修復できない変異体) を、5FU(45 μ M)または、HU(ヒドロキシ尿素) (25 μ M)、またはアフィディコリン(APH) (0.25 μ M)存在下で培養を行なった。横軸に培養時間、縦軸(対数軸)に細胞数を示す。野生型も変異体細胞もかご物の存在化でも増殖を続けることができる。



図(1)-17

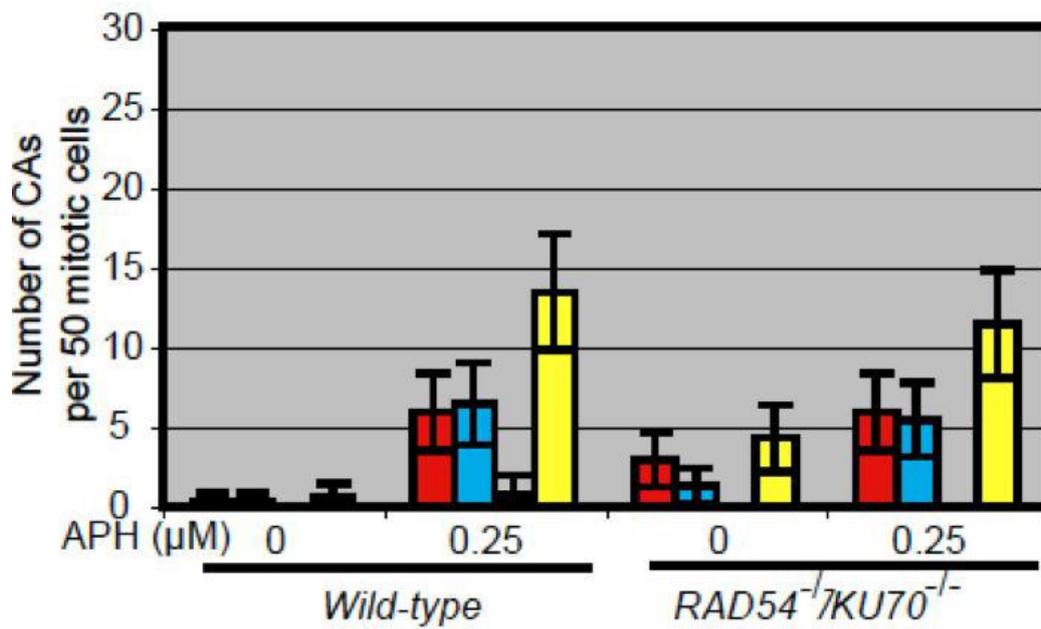
野生型細胞を5FU(45 μ M)または、HU(ヒドロキシ尿素)(25 μ M)、またはアフィディオリン(APH)(0.25 μ M)存在下で培養を行なった。0, 4, 24時間後の細胞を一部採取し、DNAの複製活性をみるためにBrdUを15分間取り込ませた。BrdUは複製に伴ってDNAに取り込まれる薬品である。横軸に細胞内DNA含量(PIによる染色)、縦軸にBrdUの取り込み量を示す。図中に書き込まれている数値は複製中の細胞(四角のゲート)に入る細胞のパーセンテージを示し、括弧中の数値は薬品の暴露前(0h)との比較を示す。

次に、これらの薬品によって、誘導される染色体断裂を染色体分析手法で調べ、野生型とDNA切断の修復が低下している変異体RAD54-/KU70細胞で比較した。その結果、野生型細胞とDNA修復変異細胞とで同程度の断裂が誘導されることがわかった(図(1)-18)。一方、DNAを切断することの知られている放射線では野生型細胞の60倍も多くの染色体異常をDNA修復変異細胞は示した(図(1)-19)。同様の結果はヒトNaIm6細胞でも再現された。このことから、複製ブロックにより発生する染色体異常は、ヒトでもDNAの切断を伴わないことが示唆された(図(1)-20)。この結果は、複製阻害によって発生する染色体断裂は、DNA切断を伴わないことを示唆する。この結果は、これまで信じられてきた「染色体断裂は常に切れたDNAを反映している」という概念を覆す発見である(4)。



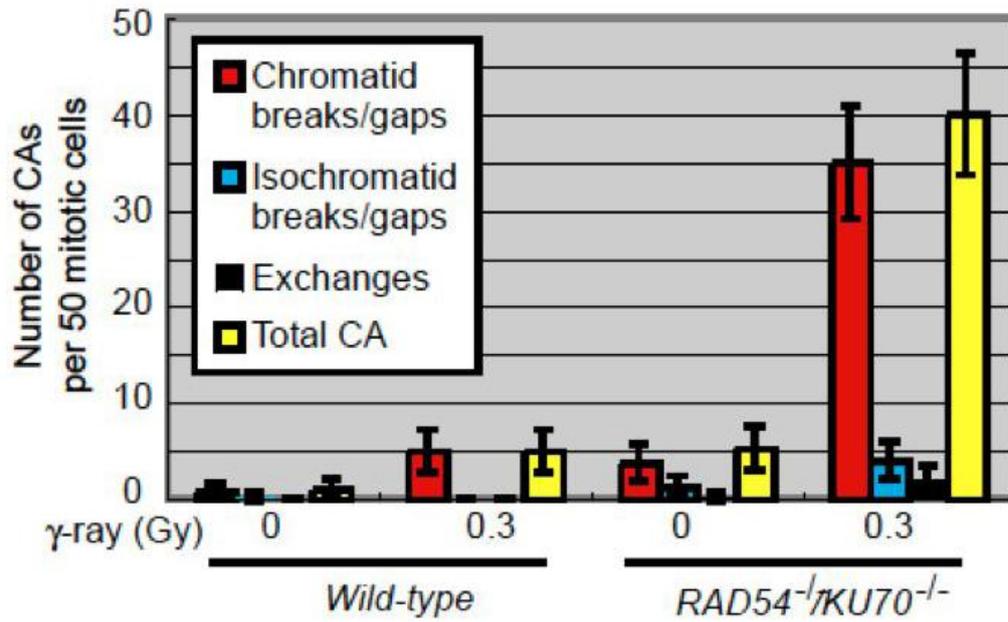
図(1)-18

野生型細胞とDNA修復因子の欠損した変異体(RAD54⁻¹/Ku70^{-1/-})を並べて5FU(45μM)または、HU(ヒドロキシ尿素)(25μM)、またはアフィディコリン(APH)(0.25μM)存在下で培養を行なった。横軸は暴露した化学物質の濃度を、縦軸は検出した染色体異常の数を示す。野生型細胞と変異体細胞とで「同程度の」染色体断裂が観察された。この結果は、複製ブロックによって発生する染色体断裂はDNAの切断を伴わないことを示唆する。



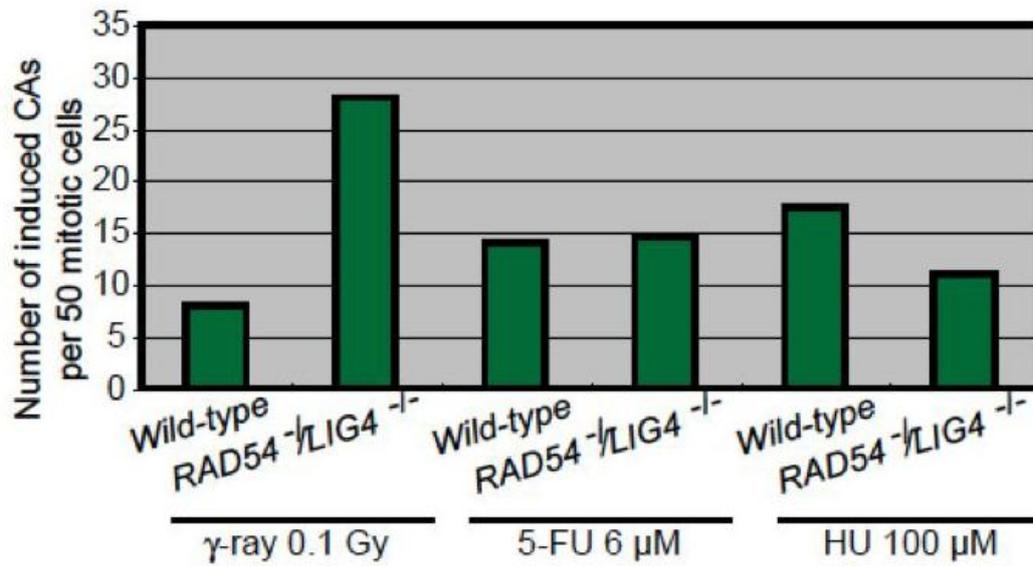
図(1)-18 (続き)

野生型細胞とDNA修復因子の欠損した変異体($RAD54^{-1}/KU70^{-1-}$)を並べて5FU(45 μM)または、HU(ヒドロキシ尿素)(25 μM)、またはアフィディコリン(APH)(0.25 μM)存在下で培養を行なった。横軸は暴露した化学物質の濃度を、縦軸は検出した染色体異常の数を示す。野生型細胞と変異体細胞とで「同程度の」染色体断裂が観察された。この結果は、複製ブロックによって発生する染色体断裂はDNAの切断を伴わないことを示唆する。



図(1)-19

野生型細胞とDNA修復因子の欠損した変異体($RAD54^{-1}/KU70^{-1-}$)を並べて γ 線で照射し、3時間培養した。横軸は暴露した化学物質の濃度を、縦軸は検出した染色体異常の数を示す。放射線による染色体断裂は $RAD54^{-1}/KU70^{-1-}$ 細胞で野生型細胞よりも有意に多く観察された。このことは、放射線がDNA切断を引き起こすという事実に一致する。

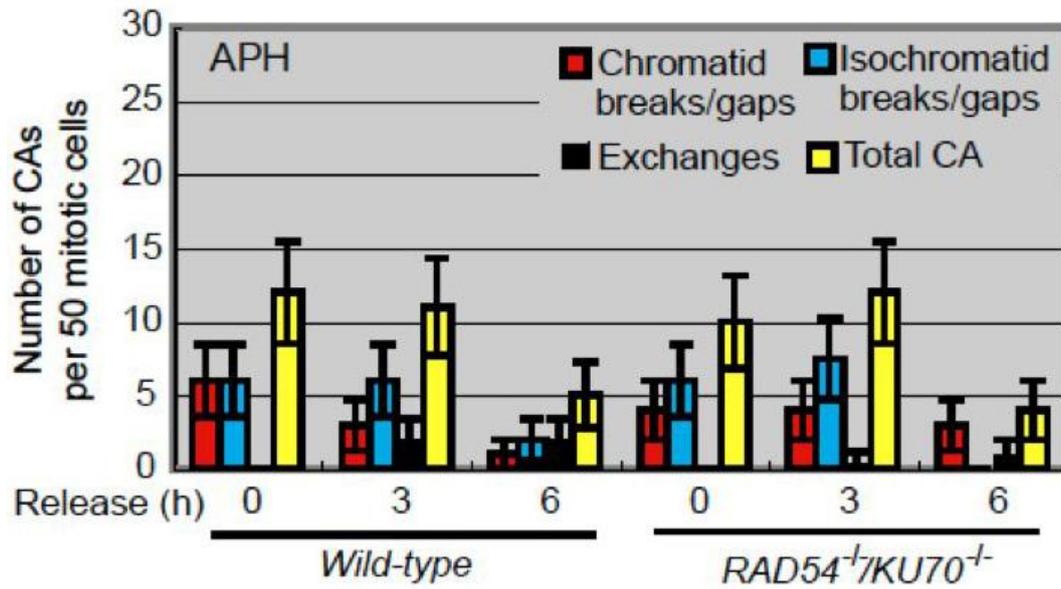


図(1)-20

ヒトNaIm6細胞由来の野生型細胞とDNA修復因子の欠損した変異体 (RAD54^{-/-}/LIG4^{-/-})を並べて5FU(45μM)または、HU(ヒドロキシ尿素)(25μM)、またはアフィディコリン(APH)(0.25μM)存在下で培養を行なった。横軸は暴露した化学物質の濃度を、縦軸は検出した染色体異常の数を示す。野生型細胞と変異体細胞とで「同程度の」染色体断裂が観察された。この結果は、複製ブロックによって発生する染色体断裂はDNAの切断を伴わないことを示唆する。

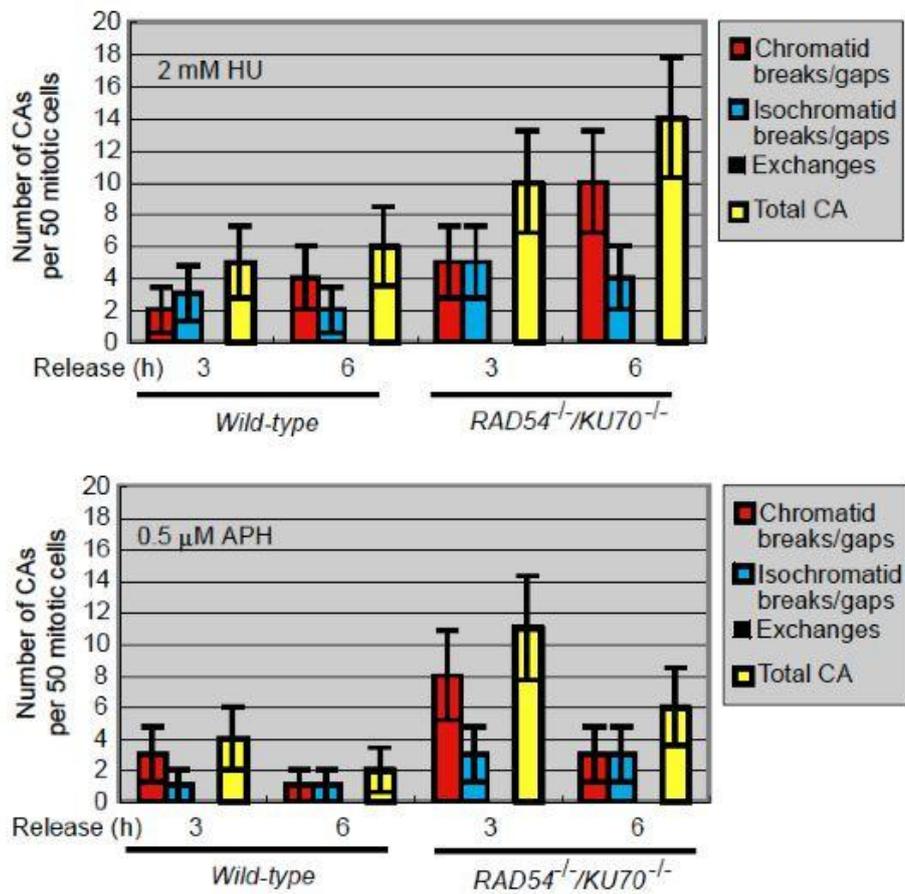
DNA切断を修復する経路には、相同組換えと非相同末端結合とが存在する。本試験で使用したRAD54-/KU70-細胞では、相同組換えに必要なRAD54遺伝子と非相同末端結合に必要なKU70遺伝子の両方を欠損しているため、DNA切断の修復活性が著しく低下している。相同組換え過程には、DNAの複製過程が含まれるので、野生型細胞で起こる相同組換えが複製阻害薬品によって抑えられて、相同組換えが低下している可能性が考えられた。そこで、複製阻害薬品による処理後、細胞培養液から複製阻害薬品を取り除いて、相同組換えによる修復時間を与える実験を行なった。その結果、野生型細胞もRAD54-/Ku70- (DNA切断の修復が低下した細胞) も同様の早さで、染色体断裂が修復時間に応じて減少することが確認された。このことから、野生型細胞とDNA修復変異体細胞とで、同じ数の染色体異常を示したのは、DNAの切断以外の要因によって、染色体断裂が誘導されていることが示唆された (図 (1) - 2 1)。

複製の完全停止によって、DNA切断が誘導されることが知られていた。そこで、上記の実験を2mM(上記の実験の100倍濃度)処理に変更して、リピートした。この濃度では、DT40細胞の複製は完全に抑制されていることを確認した。この複製を完全に停止させた細胞を薬品の含まれていない培養液において、培養して染色体断裂の数を様々な時間において測定した (図 (1) - 2 2)。その結果、RAD54-/KU70-変異体は野生型細胞よりも有意に多くの染色体断裂を示した。この結果から、高濃度の複製阻害薬品によって発生する染色体断裂は、少なくとも部分的にはDNA切断を伴うことが示唆され、過去の知見と一致した結果となった。以上の結果から、複製阻害薬品は使用する濃度によって異なるタイプの染色体断裂を引き起こすことが示唆された。



図(1)-21

野生型細胞とDNA修復因子の欠損した変異体($RAD54^{-1}/KU70^{-1}$)を並べてアフィディコリン(APH) (0.25 μ M)存在下で48時間培養を行なった。その後、薬品を含まない培養液に細胞を移し、0, 3, 6時間培養を続けた。横軸は薬品を含まない培養液での培養時間を、縦軸は検出した染色体異常の数を示す。野生型細胞と変異体細胞とで「同程度の」染色体断裂の修復時間に応じた減少が観察された。この結果は、複製ブロックによって発生する染色体断裂はDNAの切断を伴わないことを示唆する。

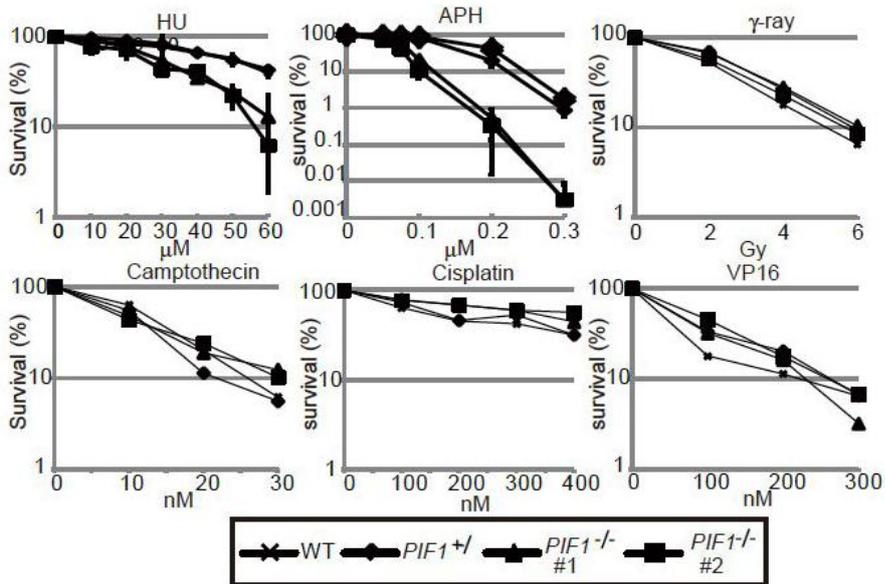


図(1)-22

野生型細胞とDNA修復因子の欠損した変異体(RAD54⁻¹/Ku70⁻¹)を並べてHU(ヒドロキシ尿素)(2mM)または、アフィディコリン(APH)(0.5μM)存在下で12時間培養を行なった。その後、薬品を含まない培養液に細胞を移し、0, 3, 6時間培養を続けた。横軸は薬品を含まない培養液での培養時間を、縦軸は検出した染色体異常の数を示す。RAD54⁻¹/KU70⁻¹変異体細胞で野生型細胞よりも多くの染色体断裂を検出した。この結果は、高濃度の複製阻害薬品はDNA切断を伴う染色体断裂を引き起こすことを示唆する。

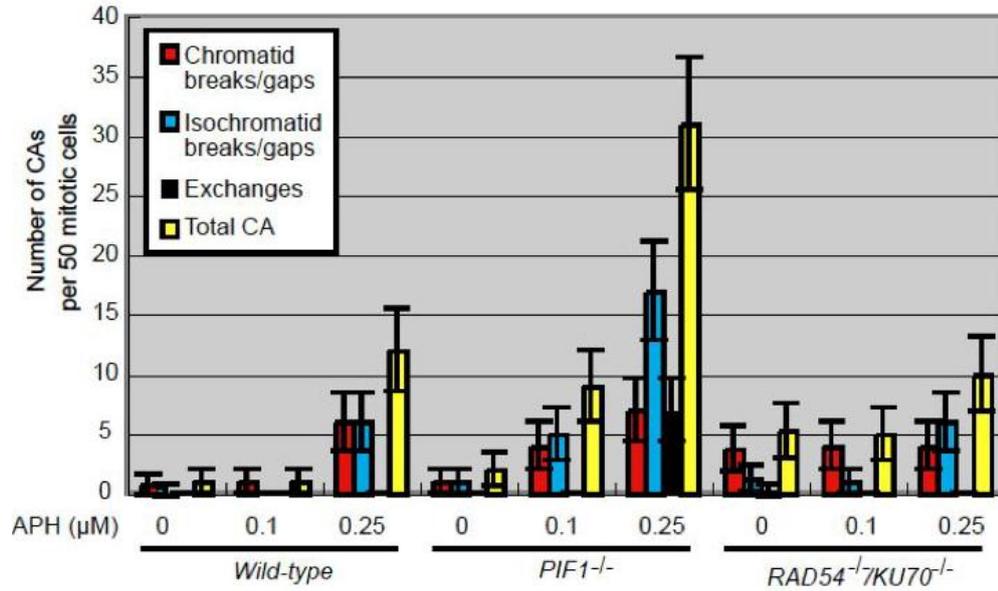
本研究では、複製のスムーズな進行を助ける酵素PIF1の変異体PIF1⁻細胞を樹立した。PIF1⁻細胞は、複製阻害薬品にのみ高い感受性を示した。(図(1)-23)。この結果は、DNA切断の修復の低下した変異体RAD54⁻/KU70⁻の細胞が、感受性を示さないことと対照的であった。PIF1⁻細胞と野生型細胞とで、複製阻害薬品によって誘導される染色体断裂の数を比較したところ、PIF1⁻細胞は有意に多くの染色体断裂を示した(図(1)-24)。同様に複製ブロックの解除に働く酵素のATIPの遺伝子破壊を行なったところ、同様に複製阻害薬品によって、大量の染色体断裂が誘導された(図(1)-25)。このことから、複製阻害薬品によって引き起こされる染色体断裂はDNA切断を伴わず、複製の部分的な停止によって引き起こされることが示唆された。

以上の結果より、染色体断裂をエンドポイントにアッセイした場合、低濃度の複製阻害薬品を検定した場合、DNAの損傷を伴わない染色体断裂を引き起こし、偽陽性となることが判明した。また、その考えられるメカニズムとして、低濃度の複製阻害薬品によって、局所的に複製が停止した部位(複製脆弱部位と呼ばれる)において、クロマチンの脱凝縮が生じ、複製停止部位での染色体のギムザ染色像が切断されているように見えていたことによる、と考えている。



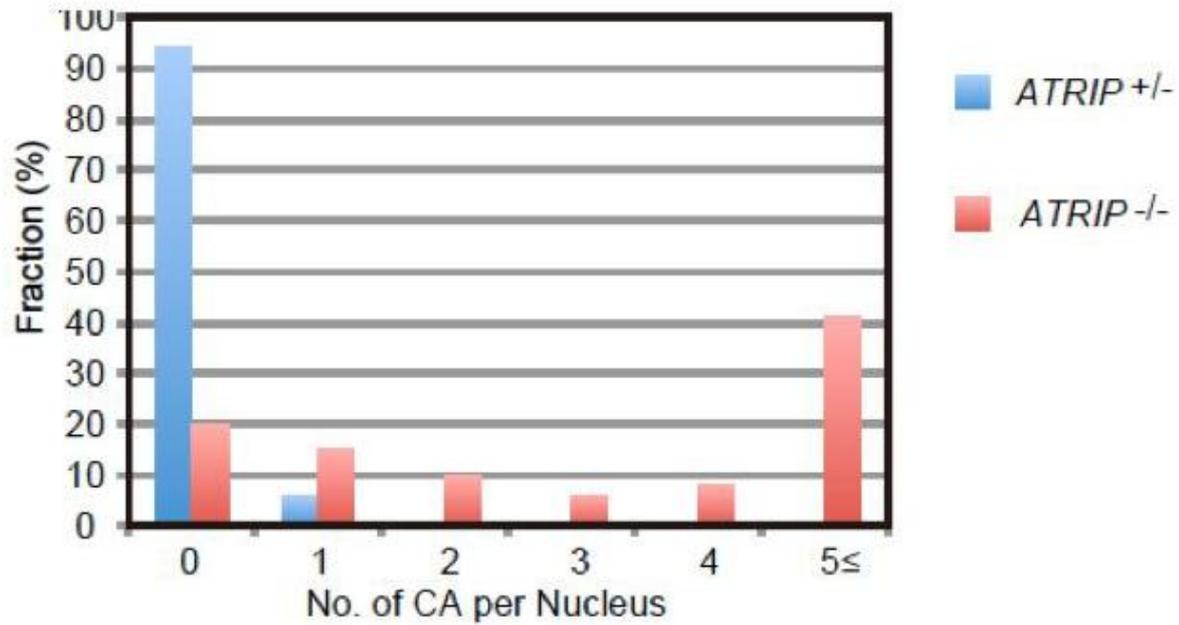
図(1)-23

野生型細胞とDNA修復因子の欠損した変異体($PIF1^{-}$)を並べて様々な化合物や γ 線に暴露した。横軸は薬品濃度を、縦軸は生存率を示す。



図(1)-24

野生型細胞とDNA修復因子の欠損した変異体(RAD54-/Ku70-およびPIF1-)を並べてアフィディコリン(APH)存在下で48時間培養を行なった。横軸は暴露した化学物質の濃度を、縦軸は検出した染色体異常の数を示す。野生型細胞とRAD54-/KU70-変異体細胞とで「同程度の」染色体断裂が観察された。この結果は、複製ブロックによって発生する染色体断裂はDNAの切断を伴わないことを示唆する。一方、PIF1-変異細胞では、有意に多くの染色体断裂が計測された。PIF1は複製の進行を助ける働きがあるので、複製の停止が、DNA切断を伴わないで、染色体断裂を引き起こしていることが示唆された。



図(1)-25

野生型細胞とDNA修復因子の欠損した変異体(ATRIP-)を並べてアフィディコリン(APH)存在下で24時間培養を行なった。この変異体では、大量の染色体断裂がみられ、数を正確に定量することは不可能であった。そこで、1細胞あたりの染色体断裂数のヒストグラムとして、定量を行なった。横軸は1細胞あたりの断裂数、縦軸は全体に示す割合%を示す。ATRIP-変異細胞では、有意に多くの染色体断裂が計測された。ATRIPは複製の進行を助ける働きがあるので、複製の停止が、DNA切断を伴わないで、染色体断裂を引き起こしていることが示唆された。

本研究で作製した、遺伝毒物学手法に基づく（１）細胞死をエンドポイントとした方法、（２）染色体分析手法は、偽陰性と偽陽性の低い、信頼のおけるアッセイ方法であることが確認できた。さらに、本試験を応用し複製阻害薬品によって引き起こされる染色体断裂が、DNA切断を伴わないという、これまでの常識を覆す結論を得た。

本研究の結論

- （１） 本研究では細胞死をアッセイのエンドポイントとする毒物評価法を遺伝学手法で改善することにより、エームテストよりも好成績のアッセイ法を作ることが出来た。
- （２） 染色体分析法に遺伝学主婦尾を応用し改善した。
- （３） 生存率をエンドポイントとしたアッセイ、染色体分析法のどちらも遺伝毒物学手法を用いることで、高感度化と偽陽性低下を同時に実現させることが出来た。さらに、遺伝毒物学手法では、遺伝毒性があると判定されたとき、その毒物が導入するDNA損傷の種類を論理的に予測できる基礎データを与えることが出来る。
- （４） 複製の阻害薬品（抗がん剤として用いられる）によって、導入される染色体断裂はDNA 2重鎖切断を伴わないことを明らかにした。複製の阻害では染色体断裂を試験すると偽陽性がでる。この偽陽性は、複製のストールによってクロマチンが脱凝縮したことが原因となっていると考えられる。
- （５） 遺伝毒物学手法（野生型-変異体の比較）で、偽陰性と偽陽性を低下できる。そして、DNA損傷を誘導する化合物の性質を予想するための有用な基礎データを与えることができる。

考察及び今後の展望

本試験で作製した細胞死をエンドポイントとしたアッセイ手法は、誰でも短期間に簡便に実施可能なアッセイ法であり、ハイスループット化しやすいというメリットもある。今後、新しい毒物評価法として取り入れてほしい。

申請者は、本方法を抗がん剤のスクリーニングに応用したいと考えている。高齢化の進む今日にあって、がんの克服は急を要する課題である。ガン細胞の特徴として、特定のDNA修復経路が減弱していることが挙げられる。DNA修復研究が進み、各修復経路の関係が詳細にわかってきており、ガン細胞で減弱した経路と相補的關係にある経路を予想できる時代になっている。そこで、申請者は、各DNA修復経路の阻害薬品の同定をし、ガン細胞ごとに最適な抗がん剤を作製したいと思っている。つまり、ガン細胞で減弱した経路と相補的關係にある経路を特異的に阻害できる薬品を作製したいのである。

本研究で作製したバイオアッセイ法は、この目的に向けた薬品探索に最適であり、本方法を応用し、将来に薬品開発に資する技術に繋げて行きたい。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

これまで、環境化学物質の毒性やその性質（遺伝毒性か否かなど）を調べるには、調べたい試験項目ごとの独自のアッセイが必要であったが、遺伝毒物学手法を用いた本方法では、用いる変異体の種類を変更するだけでどのようなタイプの毒物も正確（偽陰性偽陽性を避けて）に検定できる。本研究の最大の成果は、遺伝毒性物質を（1）細胞死で検出する方法、（2）染色体分析法で検出する方法、の2つの方法を遺伝毒物学手法の融合により、偽陰性と偽陽性との低い新規の検出法に進化させたことである。今後、論文発表やプレスリリース、新聞報道を通じ、成果の広報・普及に努める。そして、環境省の政策に貢献したい。

第2に、本研究では染色体分析法の主要な偽陽性として、複製ブロックを引き起こす化合物の作用について解明した。これまで、染色体断裂は必ずDNAの切断を伴うと考えられており、染色体分析は、細胞に照射された放射線量の推定などのために広く用いられている。本研究の結果は、染色体断裂の中には実際にはDNAの切断を伴わないものも含まれるという意外な結果を示した。複製阻害薬品が引き起こす染色体断裂は、DNA切断を伴わないタイプの断裂であり、複製の局所的な停止によって、おそらくクロマチンの脱凝縮などによって目に見える染色体断裂として現れているのではないかと考えられる。本研究では、DNA切断を伴わない、新規のタイプの染色体断裂を同定した。

(2) 環境政策への貢献

本試験で作製した細胞死をエンドポイントとしたアッセイ手法は、誰でも短期間に簡便に実施可能なアッセイ法であり、ハイスループット化しやすいというメリットもある。

さらに、遺伝学手法を用いた本アッセイシステムのフィロソフィーは、遺伝毒性物質のみならず、他の毒性検査においてもすぐに使用可能な技術となる。今後、DNA修復経路の変異体以外の様々な代謝経路（例；小胞体ストレス経路、ミトコンドリアストレス経路、タンパク質合成経路 など）の変異体を作製すれば、様々な生物内での代謝経路に悪影響を及ぼす化学物質の検出に用いることが出来る。

以上の2点から、本研究の成功は今後の環境政策に大きく貢献する。

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない

<行政が活用することが見込まれる成果>

遺伝毒物学手法による細胞死をエンドポイントに遺伝毒性を検出する方法

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文 (査読あり) >

1) Fujita M, Sasanuma H, Yamamoto KN, Harada H, Kurosawa A, Adachi N, Omura M, Hiraoka M, Takeda S, and Hirota K.

Interference in DNA replication can cause mitotic chromosomal breakage unassociated with double-strand breaks PlosONE (2013)

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない

<その他誌上発表 (査読なし) >

- 1) 基礎の基礎 細胞工学 (2010年) 29-(1)14-20 廣田耕志、武田俊一
- 2) シスプラチン耐性の分子機構 医学の歩み (2011) 239(4) 302-304 廣田耕志、武田俊一
- 3) 血液内科領域における抗腫瘍薬の作用機序・副作用に基づく使い分け シスプラチン耐性の分子機構 月刊血液内科 (2012) 65(4)498-503 笹沼博之、廣田耕志、武田俊一

(2) 口頭発表 (学会等)

- 1) 第69回日本癌学会学術総会 (大阪) 2010年9月22日 廣田耕志
'DNAポリメラーゼδによるAP部位の損傷乗越え'
- 2) 第34回日本分子生物学会 (横浜) 2011年12月15日
The involvement of SLX4 in interstrand cross-link repair is regulated by the Fanconi anemia pathway. (Kouji Hirota and Shunichi Takeda)
- 3) 第35回日本分子生物学会 (博多) 2012年12月14日
SUMO-targetted Ubiquitin Ligase RNF4 Guards Genome Stability by suppressing error-prone

Homologous Recombination (Kouji Hirota and Shunichi Takeda.)

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) シンポジウム、セミナー等の開催 (主催のもの)

特に記載すべき事項はない

(5) マスコミ等への公表・報道等

2011年 京都新聞 日経新聞 他、京都大学よりプレスリリース

2013年 京都新聞、日刊工業新聞 他、京都大学よりプレスリリース

(6) その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- 1) D. J. Kirkland, L. Henderson, D. Marzin, L. Muller, J. M. Parry, G. Speit, D. J. Tweats and G. M. Williams. Testing strategies in mutagenicity and genetic toxicology: an appraisal of the guidelines of the European Scientific Committee for Cosmetics and Non-Food Products for the evaluation of hair dyes. *Mutat Res* 588, 88-105. (2005).
- 2) T. J. Evans, K. N. Yamamoto, K. Hirota and S. Takeda. Mutant cells defective in DNA repair pathways provide a sensitive high-throughput assay for genotoxicity. *DNA Repair (Amst)* 9, 1292-8. (2010).
- 3) K. N. Yamamoto, K. Hirota, K. Kono, S. Takeda, S. Sakamuru, M. Xia, R. Huang, C. P. Austin, K. L. Witt and R. R. Tice. Characterization of environmental chemicals with potential for DNA damage using isogenic DNA repair-deficient chicken DT40 cell lines. *Environ Mol Mutagen* 52, 547-61. (2011).
- 4) Fujita M, Sasanuma H, Yamamoto KN, Harada H, Kurosawa A, Adachi N, Omura M, Hiraoka M, Takeda S, and Hirota K. Interference in DNA replication can cause mitotic chromosomal breakage unassociated with double-strand breaks *PlosONE* (2013)

Development of High-throughput Screening of Genotoxins Using Genetic Approach

Principal Investigator: Kouji HIROTA
Institution: Department of Chemistry, Graduate School of Science and Engineering,
Tokyo Metropolitan University
Minamiosawa 1-1, Hachioji-shi, Tokyo 192-0397, JAPAN
Tel: +81-42-677-2542 / Fax: +81-42-677-2542
E-mail: khirota@tmu.ac.jp.jp

[Abstract]

Key Words: Genetics, Genetic Toxicology, DNA repair, Genotoxic agent, DNA damage

In this study, we developed novel method to detect genotoxic reagents using GENETIC approach. Our quantitative high throughput screening system (qHTP) for identifying genotoxic compounds based on the detection of increased cytotoxicity in mutant DT40 clones, each with a specific DNA repair pathway deficiency, compared to that exhibited by the isogenic repair-proficient parental cell line. First, we screened 1408 compounds for genotoxic reagents and we got 42 positive compounds. 42 out of 1408 compounds tested were identified as positive genotoxic compound seems low given the results of other genotoxicity assays. To increase the sensitivity of our genetic approach to detect genotoxi reagents, we modified our method. (1) Increasing culture time from 24h to 72h significantly sensitized our method. (2) Using rat liver extract (S9mix) gave us novel opportunity to detect potential genotoxins by metabolic activation.

We analyzed chromosome aberration (CA) for validating precision of qHTS. Our CA analysis demonstrated that this screening method exactly identifies compounds with genotoxicity. The spectrum of the sensitivity to each chemical compound among DNA repair deficient mutants might supply informative clue to understand the type of DNA damage induced by chemical compound. For example, actinomycin D induced CAs in Ku70/Rad54 mutant cells pronouncedly, suggesting that it induces DNA double strand breaks (DSBs). Alkylating agents such as melphalan induced CAs in FancC mutant, suggesting that it induces inter-strand cross links (ICLs). And alachlor, benzotrichloride, and trans 1,4-dichloro-2-butane induced CAs in *Rev3*-deficient cells, suggesting that they induce lesions on DNA strand that cause replication stall. The data set of the relationship between gene-compound that can be identified with the current method might become useful data source to estimate the nature of compound in future.

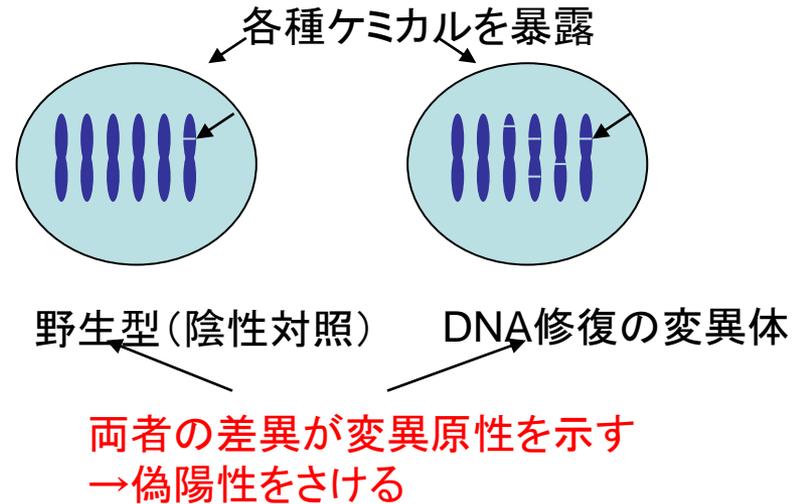
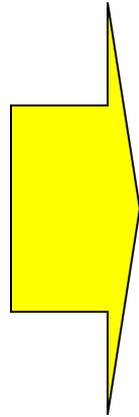
CA analysis is used to detect mutagenic chemical compounds and to estimate the dose of ionizing radiation to be administered. It has long been believed that chromosomal breaks are always associated with DSBs. We provided compelling evidence against

this canonical theory using our genetic approach. We measured the number of chromosomal breaks induced by three replication-blocking agents (aphidicolin, 5-fluorouracil, and hydroxyurea) in DSB-repair-proficient *wild-type* cells and cells deficient in DSB-repair. Exposure of cells to the three replication-blocking agents resulted in comparable numbers of chromosomal breaks for *RAD54^{-/-}/KU70^{-/-}* DT40 clones and *wild-type* cells, indicating that the replication-blocking agents can cause chromosomal breaks unassociated with DSBs.

遺伝毒物学手法での検出法

従来の染色体試験

野生型細胞のみを検査
→偽陰性、偽陽性の発生が問題

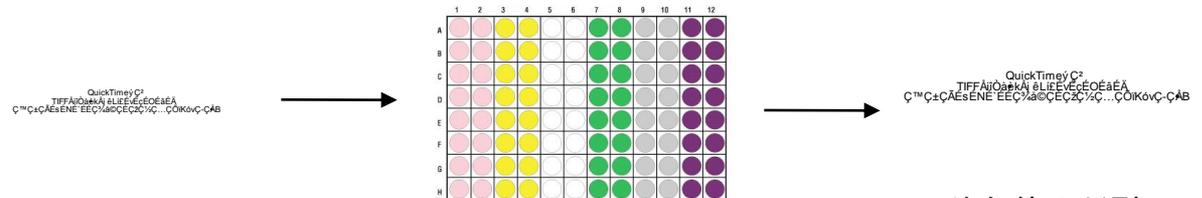


変異体を用いることで感度が向上 (偽陰性低下)
野生型を陰性対象に用いることで偽陽性が低下

本研究のゴール;ハイスループットの遺伝毒物学スクリーニング法を開発する



NIHのハイスループット解析用ロボット



染色体の断裂

1408ケミカルから47ケミカルで遺伝毒性を検出した
本試験方法ではじめて見いだした活性もあった