

令和元年6月18日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05109

研究課題名(和文)酸化ストレスによる発がんの指標となる突然変異の特性：突然変異ホットスポットの同定

研究課題名(英文) Characterization of mutation as a marker for carcinogenesis induced by oxidative stress: identification of mutation hotspot

研究代表者

青木 康展 (AOKI, Yasunobu)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・フェロー

研究者番号：20159297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：体内突然変異検出用遺伝子導入動物gpt deltaマウスに、酸化ストレス誘導剤・臭素酸カリウムを経口投与し突然変異を解析した。その結果、小腸で5'-TGAA-3'の配列のグアノシン残基(dG)にG-to-T transversion(点突然変異の一種)が発生していたが、さらに、このdGに8-オキシデオキシグアノシンが生成していることを見出した。また、DNAミスマッチ修復酵素・Msh2が欠失したgpt deltaマウスを作出し、臭素酸カリウムを投与したところ、アデノシン残基(A)が連続した配列で1塩基のAの欠失や挿入が観察され、この点突然変異も酸化ストレスの誘導を特徴づけることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸化ストレスによる酸化的DNA損傷の発生は、発がんとの強い関連性があるとされるが、活性酸素種が「ゲノムDNA上のどのような位置で高頻度にDNA損傷を引き起こし、突然変異誘導して発がんに至るか？」といった課題は未解決である。臭素酸カリウムの投与によりマウス小腸に発生した腫瘍において、がん原性遺伝子(Apc)に5'-T(A)GAA-3'での点突然変異が発生していることはすでに知られているが、酸化ストレスが5'-TGAA-3'など特定の塩基配列上で8-オキシデオキシグアノシン(8-oxo-dG)を生成し、さらに、突然変異を誘発して、腫瘍発生の原因となることを示唆する知見を初めて得ることができた。

研究成果の概要(英文)：To characterize mutations induced by oxidative stress, we analyzed the mutants arisen in gpt delta mice (transgenic mice for detecting in vivo mutation) to which a model oxidative stress inducer, potassium bromate, was orally administered, resulting that G-to-T transversion was induced on dG (deoxyguanosine) residue on a sequence of 5'-TGAA-5' of gpt gene in the small intestine. We also observed that this dG was oxidized to 8-oxo-deoxyguanosine. In Msh2 (DNA mismatch repair enzyme)-deficient gpt delta mice, administration of potassium bromate induced one base deletion and one base insertion of dA (deoxyadenosine) on dA-run sequences. These point mutations are shown to be those characteristics to generation of oxidative stress.

研究分野：毒性学

キーワード：変異原物質 酸化ストレス 発がん リスク評価 体内変異原性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酸素呼吸は生命維持に必須である。一方、生体内の代謝過程で酸素ラジカルなどの活性酸素種が生成し、酸化ストレスを引き起こすことで、有害作用をもたらす原因にもなると考えられている。生体内での酸化ストレスは様々の生体分子レベルでの変化として現れる。例えば、活性酸素種は DNA のグアニン (G) 塩基を酸化し 8-オキシデオキシグアノシン (8-oxo-dG) などの酸化的 DNA 付加体を生成する。多様な分子レベルの影響は、重層的に絡み合うことで生体恒常性を攪乱し、有害作用を引き起こすと理解されている。中でも、8-oxo-dG など酸化的 DNA 付加体の生成は突然変異を誘導し、さらに、がんを誘発することが明らかになっていることから、数多くの酸化ストレスの影響の中でもその変異原性は特に重要である。

本研究の代表者・青木は、酸化ストレスの誘導剤である臭素酸カリウム (KBrO₃) を 0.06、0.2、0.6 g/L の用量で、in vivo mutagenesis (体内突然変異) 検出用遺伝子導入マウス・*gpt delta* マウスに 90 日間経口投与すると、0.6 g/L の用量で小腸において *gpt* 遺伝子の 5'-TGAA-3' 配列中の G 塩基 (406 番塩基) に G-to-T transversion が誘導されることを見出した (Y. Aoki: 11th International Conference of Environmental Mutagens, Foz do Iguassu, Brazil, Nov. 2013)。

一方、研究分担者・續は G-to-T transversion の修復に関与する塩基除去修復酵素 Mutyh 遺伝子の欠損マウスへの KBrO₃ の経口投与で、小腸に腫瘍が多発することを見出した。また、発生した腫瘍の β -カテニン遺伝子 (Ctnnb1) の変異解析を行い、GSK-3 によるリン酸化部位である 33、37 番目のセリンとその近傍のアミノ酸をコードする部位に突然変異を検出した。これらの突然変異の殆どが 5'-AGAA-3' や 5'-TGAA-3' 配列中の G 塩基に生じた G-to-T transversion であった。 (T. Isoda et al., Int. J. Biol. Sci. 10, 940-947, 2014)

上記の知見を総合的に考察すると、酸化ストレスは様々な DNA 損傷を誘発する中で、がんのターゲット遺伝子の特定の塩基配列上に突然変異を引き起こし、がん誘発に大きく寄与していると考えられる。本研究は、この可能性を検証し、酸化ストレスによる発がんメカニズムを理解するために実施することとした。

2. 研究の目的

酸化ストレスによる 8-oxo-dG などの酸化的 DNA 損傷の発生は、発がんとの強い関連性があるとされるが、活性酸素種が「ゲノム DNA 上のどのような位置で高頻度に DNA 損傷を引き起こし、突然変異誘導して発がんに至るか?」といった課題は未解決である。本研究では、酸化ストレスによる突然変異を高頻度で発生するゲノム DNA 上の特定の塩基配列部分 (ホットスポット) を同定し、さらに、このような特徴的な突然変異が、*Msh2* 等 DNA 修復酵素遺伝子欠損マウスにおいて、酸化ストレス誘導剤の投与で誘発した腫瘍の発がんターゲット遺伝子でも発生していることを明らかにする。これにより、8-oxo-dG などの生成により誘導される突然変異の特性を解析し、突然変異のホットスポットの誘導が、酸化ストレスによる発がんの引き金になっている可能性を検証する。

3. 研究の方法

gpt delta マウスに酸化ストレス誘導剤を投与や炎症により、小腸や肺で発生した突然変異のスペクトルを解析し、さらに、酸化ストレスにより発生する突然変異のホットスポットを同定する。次に、酸化ストレスの突然変異スポット発生への寄与を解明するために、*Msh2* など DNA 修復酵素遺伝子が欠損した高感受性のマウスに、KBrO₃ などの酸化ストレス誘導剤投与により酸化ストレスを誘導し、突然変異のホットスポットが存在するかを明らかにする。

(1) 酸化ストレス誘導剤投与による突然変異ホットスポットの解析:

小腸; KBrO₃ を *gpt delta* マウスに飲水経口投与する。用量は 0.6 g/L あるいは 2 g/L で 4-12 週間投与する。同様の酸化ストレス誘導剤として、亜ヒ酸 Na や重クロム酸 Na の投与実験を行う。肺; 1,2-ナフトキノン を *gpt delta* マウスの肺内に、2 週間の間において 2 回気管内投与する。

小腸上皮組織や肺を採取してゲノム DNA を抽出し、変異体 *gpt* 遺伝子をゲノム DNA から回収し DNA 塩基配列を決定する。これにより、406 番塩基 (GAA 配列中の G 塩基) の G→T 塩基置換や他の小腸で酸化ストレスにより誘導される突然変異のホットスポットを同定する。

さらに、谷口らが開発した primer extension 法による DNA 塩基位置特異的 8-oxo-dG 生成の同定手法 (Taniguchi Y. et al. Angew Chem Int Ed Engl. 2015;54:5147-51) を用いて、*gpt* 遺伝子の 406 番塩基 (5'-TGAA-3' 配列中の G 塩基) における 8-oxo-dG の生成を確認する。

(2) 炎症により誘導される突然変異ホットスポットの同定:

炎症は酸化ストレスを惹起することが知られている。薬剤投与によらない酸化ストレスによる突然変異誘導を解析するために、その予試験として、C57BL マウスに炎症誘導剤・デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) および KBrO₃ を経口投与して大腸に炎症を誘導し、さらに腫瘍の誘発を確認する。DSS 投与による炎症モデル系には、共同研究者・羽倉昌志 (エーザイ(株)つくば安全性研究部) が多くの経験を持ち、本研究に適切なアドバイス等を頂いた。腫瘍が誘発された場合は、*gpt delta* マウスに (DSS) および KBrO₃ を投与し、大腸など消化管上皮組織から DNA を抽出し、炎症と酸化ストレスにより突然変異頻度がどの程度上昇するかを評価す

る。

(3) DNA 修復酵素 Msh2 遺伝子欠損 *gpt delta* マウスにおけるホットスポットの同定

DNA ミスマッチ修復酵素 Msh2 遺伝子の欠損マウス・*Msh2(-/-)*マウスと *gpt delta* マウスを交配し、*Msh2(-/-)gpt(+/0)*の遺伝型をもつマウス (*Msh2-KO gpt delta* マウス) を作出する。

Msh2-KO gpt delta マウスと野生型 *gpt delta* マウスに、KBrO₃ を 1.5 g/L の用量で、4 週間飲水経口投与する。小腸上皮組織を採取してゲノム DNA を抽出し、体内で発生した突然変異を解析する。これにより、ミスマッチ修復欠損、あるいはミスマッチ修復欠損下での酸化ストレス誘導剤投与により、突然変異頻度がどの程度上昇するかを評価する。さらに、5'-TGAA-3' 配列中の G 塩基 (406 番塩基) の G-to-T transversion のほかに、どのような突然変異のホットスポットが出現するかを明らかにする。

また、*Msh2(-/-)*マウスの小腸に自然発生した腫瘍および小腸の腫瘍周辺の正常組織、また、基本的に器官形成後には細胞分裂を行わない状態の心臓から DNA を調製してエクソーム解析 (対象塩基配列: 50Mb) を行う。

4. 研究成果

(1) 酸化ストレス誘導剤投与による突然変異ホットスポットの誘発:

gpt delta マウスに、0.2、0.6、2 g/L KBrO₃ を 4 週間飲水経口投与し、投与終了日の翌日に小腸上皮粘膜を採取した。谷口らが開発した primer extension 法を用いて解析したところ、G-to-T transversion が発生する 0.6、2 g/L KBrO₃ の用量で、*gpt* 遺伝子の 406 番塩基 (5'-TGAA-3' 配列中の G 塩基) に 8-oxo-dG の生成が確認できた。この配列での G-to-T transversion は KBrO₃ が誘発する小腸腫瘍の Apc 遺伝子でも検出されており、特定の塩基配列における 8-oxo-G の生成が突然変異を誘発し、腫瘍発生の原因となることを示唆する知見を初めて得ることができた。

酸化ストレス誘導剤として、亜ヒ酸 Na や重クロム酸 Na の投与実験を行った。86 mg/kg の亜ヒ酸 Na を 3 週間オス C57BL マウスに混餌投与したが、小腸での腫瘍発生は認められなかった。また、重クロム酸 Na を、最高用量 257.4 g/L で 28 日間、最高用量 85.7 g/L で 90 日間オス *gpt delta* マウスに飲水投与したが、小腸粘膜での突然変異頻度の上昇は見られなかった。

1,2-ナフトキノン を 300 ng および 600 ng を肺内に 2 回投与すると、600 ng の用量で G-to-T transversion の発生頻度が優位に増加した。

(2) 薬剤投与によらない酸化ストレスによる突然変異誘導の解析:

2 g/L KBrO₃ を C57BL マウスに 4 週間飲水投与した後、1% デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を 1 週間さらに飲水投与し炎症を誘導した。酸化ストレスと炎症により小腸と大腸に腫瘍が発生することを期待したが、投与終了後 3 か月後および 6 か月後の解剖でも、腫瘍は観察されなかった。

(3) DNA 修復酵素 Msh2 遺伝子欠損 *gpt delta* マウスにおけるホットスポットの同定

Msh2-KO gpt delta マウスに KBrO₃ を経口投与し、小腸における突然変異を解析した結果、Msh2 欠損により突然変異体発生頻度は野生型マウスに比べて約 9 倍有意に上昇した。また、G-to-A transition と G-to-T transversion の発生頻度も、それぞれ約 15 倍、および約 6 倍有意にした。突然変異発生頻度を解析した場合にも、同様の上昇が観察された。しかし、さらに KBrO₃ を投与しても突然変異 (体) 発生頻度には上昇は見られなかった。一方、突然変異のスペクトルを解析したところ、KBrO₃ を投与した *Msh2-KO gpt delta* マウスでは、非投与の *Msh2-KO* マウスより高い頻度で、A 塩基の 4 塩基あるいは 5 塩基の連続配列での一塩基フレームシフト変異 (7-12 番塩基での 1 塩基欠失、315-318 番塩基での 1 塩基欠失、342-345 番塩基での 1 塩基欠失と挿入) が検出された。しかしながら、KBrO₃ を投与による 406 番塩基での G-to-T transversion は観察されなかった。

他の体内突然変異検出用遺伝子導入マウス (大腸菌のストレプトマイシン感受性決定遺伝子 *rpsL* を遺伝子導入したマウス) から作出した *Msh2-KO rpsL-Tg* マウスに同様に臭素酸カリウムを投与し、小腸に誘発される突然変異頻度および変異スペクトルを解析した。突然変異頻度は野生型マウスに比べ約 20 倍高く、KBrO₃ によりさらに上昇した。変異のスペクトルを解析したところ、G-to-A transition、および *Msh2-KO gpt delta* マウスと同様の A 塩基の連続配列での一塩基フレームシフト変異が高頻度に検出され、酸化剤投与でこれらの変異がさらに上昇した。A 塩基の連続配列での一塩基フレームシフト変異は *Msh2* 遺伝子欠損状態での酸化ストレスの影響による突然変異ホットスポットの可能性がある。

Msh2 遺伝子欠損マウスの小腸に自然発生した腫瘍、小腸の腫瘍周辺の正常組織、心臓のサンプルでコールされた 1000 以上の変異サイトをフィルタリングした結果、腫瘍特異的変異として一塩基置換約 800、欠失/挿入約 500 サイトが検出された。特にマイクロサテライト配列での数ユニットの増減が多数検出された。今後、変異サイトの配列特徴などの詳細な解析を進める必要がある。

Msh2 遺伝子および *gpt* 遺伝子導入の位置は共に 17 番染色体であるため、*Msh2-KO gpt delta* マウスでは 17 番染色体上で相同組換えが発生している可能性があった。そこで、次世代

シークエンサーにより全ゲノム解析を行ったところ、*Msh2* 遺伝子と *gpt* 遺伝子は共に 17 番染色体上に存在しており、予想通りの相同組換えの発生が確認された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

1. Aoki Y, Matsumoto M, Matsumoto M, Masumura K, Nohmi T: **Mutant Frequency is not Increased in Mice Orally Exposed to Sodium Dichromate.** *Food Safety* 2019, **7(1):2-10**. DOI:10.14252/foodsafetyfscj.2018014 査読あり
2. Hayashida G, Shioi S, Hidaka K, Fujikane R, Hidaka M, Tsurimoto T, Tsuzuki T, Oda S, Nakatsu Y: **Differential genomic destabilisation in human cells with pathogenic MSH2 mutations introduced by genome editing.** *Experimental Cell Research* 2019, **377(1):24-35**. DOI:10.1016/j.yexcr.2019.02.020 査読あり
3. Aoki Y, Nakajima D, Matsumoto M, Yagishita M, Matsumoto M, Yanagisawa R, Goto S, Masumura K, Nohmi T: **Change over time of the mutagenicity in the lungs of gpt delta transgenic mice by extract of airborne particles collected from ambient air in the Tokyo metropolitan area.** *Genes and Environment* 2018, **40(1):25**. DOI:10.1186/s41021-018-0113-4 査読あり
4. Ohno M: **Spontaneous de novo germline mutations in humans and mice: rates, spectra, causes and consequences.** *Genes & Genetic Systems* 2018, **advpub**. 10.1266/ggs.18-0005 査読あり
5. Aoki Y: **Evaluation of in vivo mutagenesis for assessing the health risk of air pollutants.** *Genes and Environment* 2017, **39(1):16**. DOI:10.1186/s41021-016-0064-6 査読あり
6. Egashira I, Takahashi-Yanaga F, Nishida R, Arioka M, Igawa K, Tomooka K, Nakatsu Y, Tsuzuki T, Nakabeppu Y, Kitazono T *et al*: **Celecoxib and 2,5-dimethylcelecoxib inhibit intestinal cancer growth by suppressing the Wnt/beta-catenin signaling pathway.** *Cancer science* 2017, **108(1):108-115**. DOI:10.1111/cas.13106 査読あり
7. Evans MD, Mistry V, Singh R, Gackowski D, Rozalski R, Siomek-Gorecka A, Phillips DH, Zuo J, Mullenders L, Pines A, Nakabeppu Y, Sakumi K, Sekiguchi M, Tsuzuki T, Bignami M, Farmer PB, Olinski R, Cooke MS: **Nucleotide excision repair of oxidised genomic DNA is not a source of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine.** *Free radical biology & medicine* 2016, **99:385-391**. DOI:10.1016/j.freeradmed.2016.08.018 査読あり

[学会発表](計 47 件)

Tsuzuki T, Ohno M, Takano N, Taguchi K, Nakatsu Y: Oxidative stress-induced tumorigenesis: Lesson from the experiments with DNA repair-deficient mice. Beijing Symposium on 'Genomic Stability and Accurate Gene Expression under Oxidative Stress' (2018)

大野みずき、鷹野典子、中津可道、續輝久： ミスマッチ修復欠損マウスにおける体細胞および生殖細胞自然突然変異の解析 日本放射線影響学会第 61 回大会 (2018)

織田信弥、林田元気、日高京子、藤兼亮輔、日高真純、續輝久、中津可道： ゲノム編集を用いて有害な MSH2 変異を導入したヒト細胞におけるリピート配列の特異的な不安定性 第 41 回日本分子生物学会 (2018)

Aoki Y: In vivo mutagenicity of airborne particles in an urban area. 日本環境変異原学会第 47 回大会 (2018)

Tsuzuki T, Ohno M, Takano N, Taguchi K, Nakabeppu Y, Nakatsu Y: DNA repair system as a constituent of mechanism underlying practical threshold of oxidative stress-induced tumorigenesis. The 12th International Conference and the 5th Asian Congress on Environmental Mutagens (2017)

Aoki Y: Practical dose-response threshold for environmental carcinogens and implication for regulatory action. The 12th International Conference and the 5th Asian Congress on Environmental Mutagens (2017)

林田元気、中津可道、日高京子、藤兼亮輔、日高真純、織田信弥、釣本敏樹、續輝久： リンチ症候群患者に見出された変異型 MSH2 を持つヒト細胞株の樹立と解析 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (2017)

續輝久 遺伝子改変マウスを用いた酸化 DNA 損傷に起因する発がん機序の解明 日本環境変異原学会第 46 回大会 (2017)

Takano N, Ohno M, Hidaka K, Nakatsu Y, Tsuzuki T: Oxidative stress-induced mutagenesis in *Msh2*-deficient mice. 日本癌学会第 76 回学術総会 (2017)

大野みずき、鷹野典子、日高京子、作美邦彦、中別府雄作、中津可道、續輝久： 大腸癌

モデルマウスを用いた酸化ストレス誘発がんと体細胞突然変異の解析 日本癌学会第76回学術総会 (2017)

大野みずき、鷹野典子、中津可道、佐々木史子、作美邦彦、中別府雄作、續輝久： 遺伝性大腸癌モデルマウスにおける酸化ストレス誘発がんと体細胞突然変異の解析 日本放射線影響学会第60回大会 (2017)

Hayashida G, Nakatsu Y, Hidaka K, Fujikane R, Hidaka M, Oda S, Tsuzuki T: MSH ATPase domain mutants found in Lynch syndrome patient show a marked instability in human cells. 日本癌学会第76回学術総会 (2017)

Tsuzuki T, Ohno M, Takano N, Taguchi K, Nakabuppu Y, Aoki Y, Nohmi T, Nakatsu Y: Oxidative stress-induced intestinal tumors in Mutyh-deficient mice treated with low dose of potassium bromate. 6th US-Japan DNA Repair Meeting (2017)

Hayashida G, Nakatsu Y, Hidaka K, Fujikane R, Hidaka M, Tsurumoto T, Tsuzuki T: Development of assay systems to characterize the variants of mismatch repair factor MSH2 found in Lynch syndrome. The 10th International 3R (Replication, Recombination and Repair) Symposium (2016)

鷹野典子、大野みずき、中津可道、中別府雄作、續輝久： Mutyh 欠損マウスにおける酸化ストレスによる消化管腫瘍発生頻度上昇と特異的体細胞突然変異シグニチャーの解析 日本分子生物学会第39回大会 (2016)

林田元気、中津可道、日高京子、藤兼亮輔、日高真純、織田信弥、釣本敏樹、續輝久： ヒト細胞由来ミスマッチ修復遺伝子変異体の作製とその解析 日本分子生物学会第39回大会 (2016)

大野みずき、鷹野典子、中津可道、中別府雄作、續輝久： 酸化ストレスによる消化管腫瘍発生頻度上昇と特異的体細胞突然変異シグニチャー： Mutyh 欠損マウスを用いた解析 日本癌学会第75回学術総会 (2016)

林田元気、中津可道、日高京子、藤兼亮輔、日高真純、續輝久： ヒト細胞を用いたミスマッチ修復因子 MSH2 の変異体の解析 日本癌学会第75回学術総会 (2016)

林田元気、中津可道、日高京子、藤兼亮輔、日高真純、織田信弥、釣本敏樹、續輝久： Characterization of mismatch repair factor MSH2 variants found in Lynch syndrome. 日本放射線影響学会第59回大会 (2016)

青木康展： 環境変異原によって誘発された生体内突然変異の解析とそのリスク評価 日本環境変異原学会第45回大会 (2016)

〔図書〕(計2件)

Aoki Y: Threshold of Genotoxic Carcinogen, From Mechanism to Regulation Chapter 10: Nrf2 as a possible determinant for the threshold for carcinogenesis. Academic Press (2016) pp. 155-170

Nohmi T, Tsuzuki T: Threshold of Genotoxic Carcinogen, From Mechanism to Regulation Chapter 4: A possible mechanisms underlying genotoxic threshold. Academic Press (2016) pp. 49-66

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

国立環境研究所ホームページ

<http://www.nies.go.jp/whatsnew/2017/20170224/20170224-1.html>

青木康展フェローが日本環境変異原学会・学会賞を受賞

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：續 輝久

ローマ字氏名：TSUZUKI, Teruhisa

所属研究機関名：福岡歯科大学

部局名：口腔歯科学部

職名：客員教授

研究者番号(8桁)：40155429

研究分担者氏名：大野みずき

ローマ字氏名：OHNO, Mizuki

所属研究機関名：九州大学

部局名：医学研究院
職名：助教
研究者番号（8桁）：70380524

研究分担者氏名：松本 理
ローマ字氏名：MATSUMOTO, Michi
所属研究機関名：国立環境研究所
部局名：環境リスク・健康研究センター
職名：シニア研究員
研究者番号（8桁）：60132867

研究分担者氏名：野原恵子
ローマ字氏名：NOHARA, Keiko
所属研究機関名：国立環境研究所
部局名：環境リスク・健康研究センター
職名：フェロー
研究者番号（8桁）：50160271

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。