

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790059

研究課題名(和文) DNAアダクトーム解析を応用した *in vivo* 遺伝子傷害性・変異原性試験の確立

研究課題名(英文) Development of *in vivo* DNA damage/gene mutation assays using DNA adductome analysis

研究代表者

石井 雄二 (ISHII, YUJI)

国立医薬品食品衛生研究所・病理部・主任研究官

研究者番号：70544881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：LC-MS/MSを用いたDNA adductome解析によるエストラゴール又はルピアジン特異的DNA付加体の検索を行い、本法による網羅的DNA解析の有用性を明らかにした。さらに、本法をレポーター遺伝子導入動物を用いた *in vivo* 変異原性試験へ応用した結果、腎発がん物質であるアリストロキア酸を投与した *gpt delta* マウスの腎臓及び肝臓における特異的DNA付加体形成とA:T-T:A transversionを特徴とする突然変異誘発性を明らかにした。以上より、本法は遺伝毒性評価のための有用なツールになりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The applicability of the DNA adductome analysis using LC-MS/MS was demonstrated by the detection of various specific DNA adducts in the livers or kidneys of rats given estragole or rubiadin. In addition, application of DNA adductome analysis to reporter gene mutation assay demonstrated several specific-DNA adducts formation and gene mutation accompanied by characteristic A:T-T:A transversion in the kidneys and livers of *gpt delta* mice given aristolochic acid, a renal carcinogen. These data suggest that application of DNA adductome analysis to *gpt delta* animals can be a powerful tool for investigating the genotoxicity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：物理系薬学

キーワード：DNA損傷 突然変異 遺伝毒性 化学発がん

1. 研究開始当初の背景

DNA 損傷と遺伝子突然変異は化学発がん過程の初期段階における重要なステップである。その評価には古くから放射性同位体によるポストラベル法が用いられてきた。本法は高感度かつ網羅的検索が可能な手法であるが、定量的解析ができない。特殊な設備を必要とする。DNA 損傷の構造情報が得られない。そして実験者の安全性が確保できない。といった問題点があげられる。一方、近年の機器分析技術の発展と用途の拡大に伴い、機器分析による DNA 付加体解析が試みられてきた。中でも、液体クロマトグラフィー/質量分析計 (LC-MS もしくは LC-MS/MS) の進歩は目覚ましく、この10年間で質量分析法による DNA 付加体の分析に関する報告は大幅に増加した。しかしながら、質量分析法では測定対象物質の標準品や内標準物質 (安定同位体) の合成が必要である。測定対象物質以外の未知の付加体を検出できない。といった欠点を有する。そのため、ポストラベル法のような DNA 付加体形成を網羅的に検索可能な新たな一次スクリーニングの手法の構築が求められている。その解決策の一つとして、DNA アダクトーム解析が挙げられる。DNA アダクトーム解析は、修飾デオキシヌクレオシドがエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) によってプラスイオンを生じ、用意に質量 116 のデオキシリボースの開裂を引き起こすことに着目し、質量数 200 から 700 程度までの親イオンと、親イオンから 116 を引いた値をフラグメントイオンとして設定し、その組み合わせで検出されるピークを網羅的に解析する手法である。松田らは本法から得られたアダクトームマップにおいて、非喫煙者と喫煙者における DNA 損傷の違いや、未知の DNA 付加体の存在を示しその有用性を報告している。一方、遺伝毒性の評価において、近年、レポーター遺伝子を導入したトラスジェニック動物を用いた *in vivo* 試験系が注目されている。本法は化学物質の吸収・分布・代謝・排泄といった ADME を考慮し、臓器特異的な変異原性の評価が可能である点でこれまでの遺伝毒性試験よりも優れた評価手法と考えられている。本研究ではこれら二つの手法を組み合わせることで、同一個体の同一臓器における DNA 損傷と突然変異という化学発がん過程早期のイベントを捉えられる新たな遺伝毒性試験法の構築を試みた。

2. 研究の目的

本研究では LC-MS/MS による DNA アダクトーム解析による化学物質特異的 DNA 付加体の検出についてその有用性を検討し、ポストラベル法に代わる新たな DNA 傷害性評価法を確立する。さらに、DNA アダクトーム解析をレポーター遺伝子動物である *gpt delta* マウスによる *in vivo* 変異原性試験に応用した *in*

in vivo 遺伝子傷害性・変異原性試験を用いて、腎発がん物質であるアリストロキア酸 (AA) についてマウス腎臓及び肝臓における評価を実施し、本試験法の有用性を検討した。

3. 研究の方法

3 - 1. 材料及び試薬

AA は Sigma-Aldrich 社より購入した。DNA アダクトーム解析の有用性評価には、エストラゴール (ES) を 3、30 又は 300 mg/kg/day の濃度で 4 週間強制経口投与した F344 ラットの肝臓と、ルピアジン (Rub) を 0.06 又は 1.5% の濃度で 1 週間混餌投与したラット腎臓及び肝臓を用いた。

3 - 2. DNA アダクトーム解析

LC-MS/MS は Agilent 社製 LC 1100 シリーズ (G1322A, Degasser; G1312A, Bin Pump; G1316A, COLCOM; G1329A, ALS) 及び Micromass Quattro Ultima mass spectrometry system (Micromass 社製) を用いた。カラムは関東化学社製 Mightysil RP-18GP (2.0 x 150 mm, 5 μ m) を用いた。移動相は溶液 A: 蒸留水 (0.001% ギ酸添加) と溶液 B: アセトニトリル (0.001% ギ酸添加) の混液を流速 0.2 ml/min で送液した。カラムを溶液 A/B=95/5 で安定させ、グラジエント機能を用いて測定開始 30 分後に溶液 A/B=10/90 とした。MS/MS のイオン化にはエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法のポジティブイオンモードを用い、Cone voltage 及び Collision energy はそれぞれ 35 V 及び 15 V とした。検索質量は DNA を構成する dG、dA、dC 及び dT の各分子量 (267.2、251.2、227.2 及び 242.2) の平均値 247.0 に被験物質の分子量を加え、その \pm 50 の範囲とした。

3 - 3. サンプル調整

DNA 損傷解析のための DNA 抽出は既法を参考にした。DNA 抽出に使用する肝臓及び腎臓はそれぞれ 180 及び 80 mg とし、DNA の抽出には和光純薬社製 DNA エキストラクター-WB キットを使用した。Deferoxamine mesylate を加えた Lysis buffer で組織をホモジナイズした後、遠心分離 (10,000 rpm, 1 min, 4°C) し、沈殿物を Enzyme reaction solution で再懸濁した。RNase を加えインキュベーション (50°C, 10 min) 後、さらに Protease K を加えインキュベーション (50°C, 60 min) した。反応後、NaI buffer 及び 2-プロパノールを加えて DNA を析出させ、遠心分離 (10,000 rpm, 10 min, 4°C) によってペレット状の DNA を得た。ペレットは 2-プロパノール及び 70% エタノールで洗浄後、乾燥させた。ペレットを 100 μ l の DW 水に溶解後、Nano Drop® 1000 を用いて DNA 濃度を測定し、100 μ g/150 μ l に調整した。DNA の消化には和光純薬社製 8-OHdG Assay Preparation Reagent Set® を利用し、Acetic acid buffer 及び Nuclease P1 を加えてインキュベーション (37°C, 3 hr)

した。さらに Tris buffer 及び Alkaline phosphatase を加えてインキュベーション (37°C, 3 hr) し、100,000 NMWL Filter Unit で遠心分離 (10,000 rpm, 20 min) した。得られた試料から 100 μ l ずつを各群 (n=5) でまとめ、450 μ l をエバポレーターで乾固後、メタノールで再溶解し、遠心分離 (15,000 rpm, 15 min, 4°C) した。メタノール層をエバポレーターで再度乾固した後、30% DMSO 溶液 150 μ l で再溶解し、網羅的 DNA 損傷解析測定のための試料とした。

3 - 4 . 動物実験操作

動物は当研究所で系統維持している C57BL/6J *gpt delta* マウスと野生型 C3H マウス (日本チャールズ・リバー株式会社) の交配によって作出した 6 週齢の雌性 B6C3F₁ *gpt delta* マウスを実験に供した。

動物の飼育はバリヤースシステムの動物室にて行った。室内の環境は温度 24 \pm 1°C、湿度 55 \pm 5%、換気回数 18 回/時 (オールフレッシュ)、12 時間蛍光灯照明 / 12 時間消灯であり、この条件下で飼育を行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに 2 又は 3 匹ずつ収納し、床敷は三共ラボサービス (東京) のソフトチップを用い、週 2 回交換を行った。実験プロトコルを図 1 に示す。*gpt delta* マウス 20 匹を各群 5 匹に配し、AA を 0.2、1.0 及び 5.0 mg/kg/day の用量で 4 週間強制経口投与した。対照群には被験物質の溶媒としてコーンオイルを強制経口投与した。試験期間中、飲水及び飼料の交換は週 1 回、一般状態観察を連日実施した。また、体重および飲水量の測定は週 1 回行った。4 週間の投与後、動物はイソフルラン麻酔下にて放血致死させ、肝臓及び腎臓について肉眼的に観察後摘出し、DNA アダクトーム解析、*gpt* 及び *Spi* assay 用のサンプルとして液体窒素により凍結後、-80°C で保存した。

4 . 研究成果

4 - 1 . DNA アダクトーム解析の有用性評価

エストラゴール (ES) を投与したラット肝臓を用いて、DNA アダクトーム解析の有用性評価を実施した結果、5 種の spot が検出され、これらのうち Spot III、V 及び VI は既知の ES 特異的 DNA 付加体、ES-3' -N²-dG、ES-3' -C8-dG 及び ES-3' -N⁶-dA、ES と一致した。また、Spot I 及び II は Spot III 及び V と同一の保持時間で検出され、質量差は 22 であったことから、それぞれの Na⁺付加体と同定した。さらに、MS スペクトラム解析の結果、Spot VII は ES と dC の付加体と同定された。高用量群でのみ認められた spot IV は、既に報告されている ES-1' -C8-dG と考えられた (図 1)。

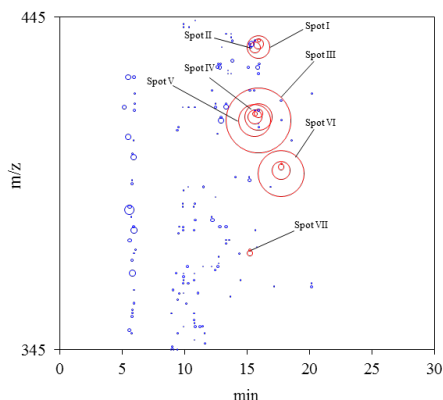


図 1 ES (300 mg/kg/day) を投与したラット肝臓の DNA アダクトームマップ

ES の投与量とアダクトームマップの各付加体を示す Spot III、V、VI 及び VII の面積との相関を検討した結果、何れも 0.98 以上の高い直線性が認められた (図 2)。

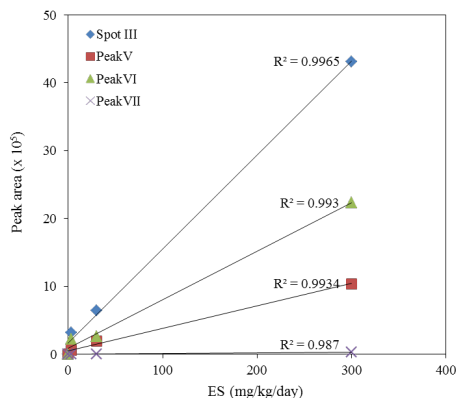


図 2 ES の投与量と Spot 面積の直線性

Rub を投与したラット肝臓及び腎臓について DNA アダクトーム解析を実施した結果、Rub 投与群のラット腎臓及び肝臓において 8 種の特異的 DNA 付加体を示すスポットが検出され (図 3) spot I 及び IV は Luc-N²-dG 及び Luc-N⁶-dA と一致した。

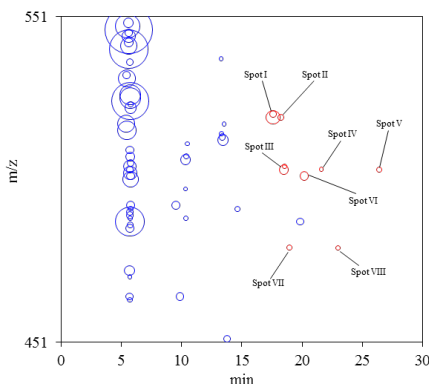


図 3 Rub (1.5%) を投与したラット腎臓の DNA アダクトームマップ

また、MS スペクトラム解析の結果、Spot II、III 及び V は Luc- N^2 -dG 及び Luc- N^6 -dA の構造異性体と同定された。また、Spot VII 及び VIII は dC とルビアジンの付加体と考えられた。Spot VI は dA とルビアジンに由来するスポットと推定されたものの、同定には至らなかった。これらのスポットの面積はいずれも 0.06% に比して 1.5% Rub 投与群で約 2 倍の大きさを示した。

本研究において、DNA アダクトーム解析による網羅的 DNA 損傷解析は既知の付加体に加え、複数の未知の付加体の検出が可能であった。さらに、得られた Spot の大きさと被験物質の投与量の間には高い直線性が認められたことから、Spot の大きさから DNA 損傷の量についても評価できる可能性が示された。

4 - 2 . アリストロキア酸の *in vivo* 遺伝子傷害性・変異原性試験

AA を投与したマウス腎臓の DNA アダクトームマップを図 4 に示す。

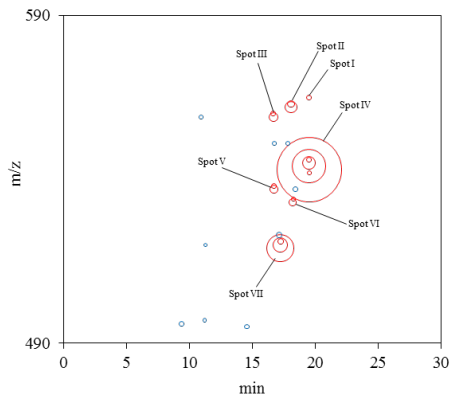


図 4 AA (5.0 mg/kg/day) を 4 週間投与したマウス腎臓の DNA アダクトームマップ

マップ上には AA 特異的付加体と考えられる計 7 個の Spot が検出され、これらのスポットの面積は AA の投与量依存的に増加した。これらのうち Spot III、IV 及び VII は既知の付加体である AAI- N^2 -dG、AAI- N^6 -dA 及び AAI- N^6 -dC と考えられた。また、Spot I の保持時間は Spot IV と一致し、質量数の差が 22 であったことから、AAI- N^6 -dA の Na⁺付加体と判断した。Spot II、V 及び VI は未知の AA 特異的付加体と考えられた。また、AAI- N^6 -dA 及び AAI- N^6 -dC を示す Spot IV 及び VII は非発がん標的臓器である肝臓においても検出されたものの、それら Spot の面積は腎臓の 1/10 以下であった。高用量群の腎臓及び肝臓で認められた Spot の詳細を表 1 に示す。

表 1 DNA アダクトーム解析のまとめ

Organ	Peak No.	m/z	Retention time (min)	Peak area	Presumed adducts	Ionized type
Liver	Spot I	565	19.5	1747	AAI- N^6 -dA	[M+Na] ⁺
	Spot II	562	18.0	9563	unknown	[M+H] ⁺
	Spot III	559	16.7	6135	AAI- N^2 -dG	[M+H] ⁺
	Spot IV	543	19.5	550115	AAI- N^6 -dA	[M+H] ⁺
	Spot V	537	16.7	8501	unknown	[M+H] ⁺
	Spot VI	533	18.2	7197	unknown	[M+H] ⁺
	Spot VII	519	17.3	69164	AAI- N^6 -dC	[M+H] ⁺
Kidney	Spot IV	543	19.5	36273	AAI- N^6 -dA	[M+H] ⁺
	Spot VII	519	17.3	4332	AAI- N^6 -dC	[M+H] ⁺

In vivo 変異原性試験の結果、点突然変異頻度を示す *gpt* 変異体頻度 (MF) と、欠失変異頻度を示す Spi MF はいずれも高用量群の腎臓において有意な高値を示した (図 5)。

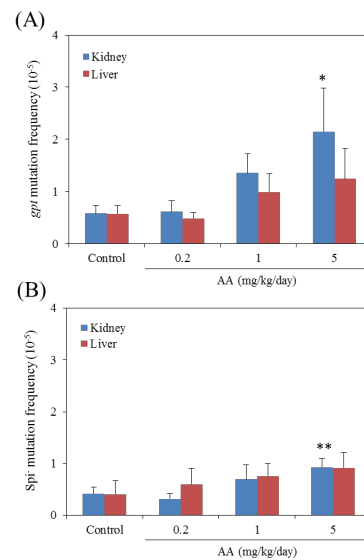


図 5 腎臓及び肝臓における *gpt* 及び Spi 変異体頻度

対照群の高用量群の腎臓及び肝臓の変異スペクトラムを図 6 に示す。対照群のマウス腎臓において A:T:T:A transversion は 2% だったのに対し、*gpt* MF の有意な高値が認められた高両群の腎臓では 41% に増加した。また、*gpt* MF の上昇傾向が認められた肝臓においても A:T-T:A transversion の増加が認められた (39%)。

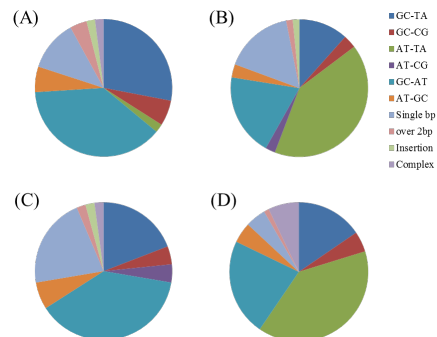


図 6 *gpt* 変異体のスペクトラム解析 (A) 対照群の腎臓、(B) AA 投与群の腎臓、(C) 対照群の肝臓及び (D) AA 投与群の肝臓

DNA アダクトーム解析を応用した *in vivo* 遺伝子傷害性・変異原性試験による AA の評価を実施した結果、AA の発がん標的臓器である腎臓において AAI- N^6 -dA は最大の Spot として検出され、*gpt* assay では本付加体から生じると考えられている A:T-T:A transversion を特徴とする点突然変異頻度の有意な上昇を検出することが可能であった。また、非発がん標的臓器である肝臓においても AAI- N^6 -dA 及び AAI- N^6 -dC を示すスポットが検出され、A:T-T:A transversion の増加を伴う *gpt* MF の上昇傾向が認められたことから、肝臓は潜在的な発がん臓器であることが明らかになった。これらの結果から、本研究で構築した *in vivo* 遺伝子傷害性・変異原性試験は、化学物質の遺伝毒性を正確に評価できる有用なツールであることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

石井雄二、高須伸二、松下幸平、黒田 顕、能美健彦、小川久美子、梅村隆志、LC-MS/MS を用いた網羅的 DNA 損傷解析によるエストラゴールの DNA 傷害性評価、第 26 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS2013) (2013 年 8 月、東京)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
石井 雄二 (ISHII, Yuji)

研究者番号：70544881

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：