

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成31年度（2019年度）研究進捗評価用〕

平成28年度採択分
平成31年3月12日現在

ヒトゲノム編集細胞を使った、化学物質の薬理作用・有害性を
解析するシステムの構築

Establishment of Novel Bioassays for in vivo
Genotoxicity Prediction and Mechanism Characterization

課題番号：16H06306

武田 俊一 (Takeda, Shunichi)

京都大学・大学院医学研究科・教授



研究の概要

化学物質審査規制法（化審法）は有害物質を規制する。有害性の中で最も重要なものは変異原性（発がん性）である。化審法で規定された変異原性検出試験は、感度が低い、変異原性の機序が不明という問題がある。我々は、従来の変異原性検出試験（野生型ヒト TK6 細胞を利用）に加え DNA 修復欠損 TK6 細胞を併用し、従来型変異原性検出試験の問題点を解決する。

研究分野：環境解析評価およびその関連分野

キーワード：トキシコロジー、人体有害物質、遺伝毒物学、発がん物質、変異原

1. 研究開始当初の背景

化審法で規定された変異原性検出試験の問題は感度の低さである。従来の変異原性検出試験に使う野生型細胞は、変異原性化学物質が作った DNA 損傷を迅速かつ正確に修復するので、検出感度が低くて当然である。もう1つの問題は、変異原性化学物質が作る DNA 損傷の種類を全く解析できないことである。

有害物質を規制する為に、将来に必要な技術は、化学物質の構造から各化学物質の有害性をコンピューター(AI)によって予測する技術である。化学構造から AI によって変異原性を正確に予測する目標を達成する時のボトルネックは、学習データの質（偽陰性や偽陽性の低さ）が必ずしも十分でないことである。多様な作用機序の DNA 毒性がある変異原性化学物質を、作用機序毎に分類してから AI に学習させた方が良いのも自明である。

本研究は、AI によって変異原性を正確に予測する最終目標を目指し、学習データの質を向上する為に変異原性検出試験を改善・開発するのを目標とする。安全性を証明する手法は、知的財産として保護される。

2. 研究の目的

- 化審法で規定された変異原性検出試験（野生型 TK6 細胞）に DNA 修復 TK6 細胞を併用する、新たな変異原性検出試験を樹立
- 変異原性のメカニズムについて、様々な新規の経路を解明

3. 研究の方法

ゲノム編集で DNA 修復酵素欠損 TK6 細胞を作る。それを化審法で規定された変異原性検出試験に応用する。

4. これまでの成果

- 既知の全修復経路を網羅する 100 種類以上の DNA 修復酵素の遺伝子破壊細胞を TK6 細胞から創った。
- 化審法で規定された変異原検出試験である小核テスト（論文1）と Thymidine kinase (TK) 試験の感度を、XPA/XRCC1 2重欠損 TK6細胞を利用することによってそれぞれ5倍以上改善した。TK試験は、もともと特異性が非常に高いことを考慮すると、DNA 修復 TK6細胞を使う TK試験は非常に優れた変異原検出試験である。
- Ames 試験を基にした QSAR の学習データの改善

Ames 試験の結果（~20,000 化合物、本間正充博士・医薬品食品衛生研究所・部長が収集）は、AI による変異原の予測（QSAR と呼ばれる）の為に標準学習データとして世界中で使われている。Ames 試験結果の問題は、Ames 試験で変異原性陽性だが哺乳類を用いる遺伝毒性試験で陰性を示す化合物が存在することである。このような化合物は、従来「Ames 試験偽陽性化合物」として扱われてきた。このような化合物のなかでオーラミンとパラ

フェニレンジアミンは,(2)で記載した TK 試験で解析したところ,変異原性陽性であった。

(4) 女性ホルモン,エストロゲンの DNA 切断活性の発見 (論文3)

エストロゲンの DNA 毒性は,知られていない。我々は,BRCA1 の欠損した乳がん細胞株,MCF-7 を作製した。これを 10nM エストロゲンに2時間曝露すると,G₁期において曝露後1日経ても細胞あたり複数個のゲノム DNA 切断が再結合されることなく残った。切断の機序は,エストロゲン受容体によって活性化されたトポイソメラーゼ II(Top2)が触媒反応に失敗し,Top2-DNA 切断複合体が生じたことによる。

(5) 環境ホルモン活性を化学構造から AI に予測させるシステムを創った (論文4)。

(6) 紫外線損傷とシスプラチン損傷を修復する新規 DNA 修復経路の発見

従来の定説に反し,紫外線損傷のうち 6-4PP とシスプラチン損傷は,ミトコンドリア DNA から除去されることを見つけた。この修復では,ミトコンドリア特異的トポイソメラーゼ I (Top1MT) が損傷上流領域を1本鎖切断し,切断から塩基除去修復と呼ばれる修復反応が開始されて損傷を除去した。Top1MT 欠損細胞は低濃度シスプラチンに長期曝露するとミトコンドリア DNA が大きく減少し細胞死を起こした。

5. 今後の計画

- 100 種類以上の DNA 修復酵素の遺伝子破壊細胞を,国内の研究者が自由に使えるように公共バイオリソース (ホームページ2) に破壊細胞を寄贈。
- 米国 National Institutes of Health (Dr. Xia, Menghang) に研究者を2018年7月から派遣した。そして環境ホルモンの DNA 切断活性を検出するハイスループット解析手法を樹立した。これから環境ホルモン活性のある化合物全部について,DNA 切断活性の有無を調べる。
- シスプラチンの最も重篤な副作用は,腎障害である。シスプラチンは,DNA 複製を阻害して増殖細胞を殺すが,なぜ増殖が非常に遅い腎尿細管細胞が障害されるのかその機序は不明であった。Top1MT 欠損マウス (取得済み) にシスプラチンを注射し,腎障害を再現する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Saha LK (six authors) Sasanuma H, Hirota K, Nakamura J, Honma M, *Takeda S. Differential micronucleus frequency in isogenic human cells deficient in DNA repair pathways is a valuable indicator for

evaluating genotoxic agents and their genotoxic mechanisms. *Environ Mol Mutagen*. 59: 529-538, 2018, 査読有

2. Mohiuddin M, Evans TJ, Rahman MM, Keka IS, Tsuda M, Sasanuma H, *Takeda S. SUMOylation of PCNA by PIAS1 and PIAS4 promotes template switch in the chicken and human B cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*. 115: 12793-12798, 2018, 査読有

3. *Sasanuma H, Tsuda M (13 authors) Nussenzweig A, *Takeda S. (2018) BRCA1 ensures genome integrity by eliminating estrogen-induced pathological Topoisomerase II-DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 115: E10642-E10651, 2018, 査読有

4. Rakers C (three authors) Takeda S, *Brown JB. (2018) Chemogenomic active learning's domain of applicability on small, sparse qHTS matrices: a study using CYP450 and nuclear hormone receptor families. *ChemMedChem*. 13: 511-521, 2018, 査読有

5. Hoa NN (nine authors) Takeda S, *Sasanuma H. Mre11 Is Essential for the Removal of Lethal Topoisomerase 2 Covalent Cleavage Complexes. *Mol Cell* 64: 580-592, 2016, 査読有

7. ホームページ等

1. 本研究において作製された遺伝子破壊 TK6 細胞を, TK6 Mutants Consortium ホームページとして下記の URL で公開し, 世界中の研究者に遺伝子破壊細胞を分与している。
<http://www.nihs.go.jp/dgm/tk6.html>

2. 本研究において作製された遺伝子破壊 TK6 細胞を寄贈する、武田薬品と国立がんセンターが共同運営する化合物スクリーニングセンター(i-Park)
<https://www.takeda.com/ja-jp/who-we-are/company/shonan/>