

令和元年5月24日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K00556

研究課題名(和文) 環境や生体内生成のN-ニトロソアミンの光化学反応解析とその遺伝毒性・細胞機能影響

研究課題名(英文) Analysis of photochemical activation of endogenous and environmental N-nitrosamines and its photogenotoxicity and disturbance on cell functions

研究代表者

有元 佐賀恵 (Arimoto, Sakae)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90212654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：N-ニトロソアミン類は、N-ニトロソプロリン(NPRO)に加えて、N-ニトロソピロリジンとN-ニトロソモルホリンも光遺伝毒性を示した。光活性化体は37℃で10日以上安定、かつpH 5からpH 11までの液性で変異原性を保った。UVA活性化NPROによるGC→TA、GC→CGとAT→GCの点変異が観察された。UVA活性化NPROによるDNA付加体形成は好氣的条件・嫌氣的条件ともに見られ、グアニンの8位、アデニンの2位及び8位へのピロリジル付加体6種を同定した。NPRO存在下UVA照射したHaCaT細胞内でcGMPの増加が見られ、cGMPの関与するシグナル伝達を擾乱している可能性が分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境などから体内に取り込まれたN-ニトロソアミンや生体内で生成したN-ニトロソアミノ酸が、日光・UVAなどの光照射により遺伝毒性の活性化体を作り出すことがわかった。活性化体は生体条件で安定に活性を保つことがわかったため、全身循環して細胞のDNAに達し、DNAにアルキル付加体・酸化的DNA傷害などのDNA損傷を生じ、光遺伝毒性・変異を起こしうることがわかった。また、細胞内で光反応によるNO放出でcGMPの関与するシグナル伝達を擾乱している可能性のあることが分かった。光を考慮しない場合には毒性がない化合物でも、光毒性を考慮する必要があることがわかり、安全性研究としても意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：UVA irradiated N-nitrosamines (N-nitrosoproline (NPRO), N-nitrosopyrrolidine and N-nitrosomorpholine) was shown to be mutagenic towards *S. typhimurium* and human derived keratinocyte cell line (HaCaT). Mutagenic activity of irradiated NPRO was maintained for over 10 days at 37℃ from pH 5 to pH 11. UVA activated NPRO induced point mutations of GC to TA, GC to CG, and AT to GC in M13mp2 phage. Formation of photoadducts of UVA activated NPRO towards DNA was observed under both aerobic and anaerobic conditions. Pyrrolidyl-dA and -dG adducts was isolated and identified from DNA treated with NPRO and UVA. Increased production of cGMP was found in the UVA irradiated HaCaT cells in the presence of NPRO. Disturbance of the signal transmission related to cGMP might be caused. Phototoxicity of environmental and endogenous N-nitrosamine should be considered for the environmental safety.

研究分野：分子毒性学

キーワード：光遺伝毒性 光活性化 N-ニトロソプロリン DNA付加体形成 N-ニトロソピロリジン N-ニトロソモルホリン ヒト由来表皮角化細胞 活性酸素種

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

N-ニトロソ基(N-NO)を基本構造する化合物群N-ニトロサミン類は、タバコ煙や工場排気などに含まれる発癌物質であり、発生源より放出後、浮遊・付着・移動し、環境汚染として非喫煙者などにも2次曝露によるヒト影響を及ぼす。さらにニコチンなどの成分は、大気汚染成分NO<sub>x</sub>などと2次反応してN-ニトロソアミンなどを生じ、3次曝露する可能性が報告されている(IARC, 2012)。皮膚に付着したN-ニトロソアミンが皮膚を透過するという報告もあり(Brainら, 1995)、生体内に吸収されて薬物代謝酵素系で代謝的活性化を受け、発癌性を示す。一方、同じN-ニトロソ化合物でも、生体内で生成するN-ニトロソアミノ酸、例えばN-ニトロソプロリン(NPRO)は代謝活性化されないため、非毒性・非発癌性と考えられて来た。

太陽光紫外線は皮膚がんのリスク要因であり、皮膚透過性の高い長波長部の近紫外線(UVA)は、皮膚血管層まで到達が知られている。光エネルギーを細胞内の何らかの物質が吸収し、DNAやタンパクに伝えて光傷害を起こす光増感反応が起き、DNA傷害や変異を引き起こす(IARC, 2012)。が、細胞内の何が光増感物質かは諸説があり、はっきりしない。

我々は、この研究開始までに、N-ニトロソピペリジン(NPIP)がUVAに曝露すると、光化学反応を起こして、代謝活性化過程によらず、変異原性を示す活性化体になることを見出した。さらに、NPIPやN-ニトロソジメチルアミンは活性化体形成とは別に、光分解も起こしてN-ニトロソ基が光開裂し、NOラジカル放出し、活性酸素種ならびにメチルあるいはアルキルラジカルを発生することが分かった。生じた活性酸素種はDNAのグアニン塩基を酸化障害して8-オキシグアニンを生じた。また、非毒性とされていたN-ニトロソプロリン(NPRO)も光反応により活性化することを見出した。光活性化NPROの放出するNOラジカルによりペプチドのチロシン残基がニトロチロシンに変化した。このNOラジカル放出は、水中・有機溶媒中いずれでも、好気・嫌気条件ともに見られた。従って、皮膚・外気的好気条件と体内の嫌気条件を問わず、また、体液中・脂質膜中いずれでも、光照射によりNO放出を伴う光分解と活性酸素種放出は起こると考えられ、それに伴う化学修飾は生理機能に影響を与える可能性があることを見出した。

### 2. 研究の目的

我々はそれまでの研究成果から、環境などから体内に取り込まれたN-ニトロサミンや生体内で生成したN-ニトロソアミノ酸が全身循環して皮膚に達し、日光などの光照射により反応して、活性酸素種・NOラジカル・アルキルラジカルなどを生じ、酸化的DNA傷害に加えてアルキル付加体などのDNA損傷を生じ、光遺伝毒性・変異・蛋白機能傷害を起こしうると考えた。同時にタンパク損傷や膜傷害などを引き起こして、炎症や細胞死なども引き起こしうると考えた。

そこで、これまでの研究をもとに、

- (1) N-ニトロサミン類の太陽光,UVA,UVB等による光化学反応の定性・定量的解析を行う。光反応環境影響やN-ニトロサミン類の構造影響や、反応機構を解明する。
- (2) N-ニトロサミンの光活性化による遺伝毒性と細胞内応答を解明する。細菌に対する遺伝毒性、皮膚培養細胞における光毒性、DNAやタンパク等の損傷・突然変異誘起を解析し、シグナル伝達擾乱・ROSストレス応答影響・細胞死への関与を明らかにする。
- (3) 皮膚におけるN-ニトロサミンの光活性化による遺伝毒性・皮膚炎症を解析し、表皮細胞におけるDNA損傷・タンパク損傷・シグナル伝達異常等を解析する。
- (4) N-ニトロソアミノ酸についても、光活性化反応を解析するとともに、生物毒性を明らかにする。

以上を目的に研究を行った。

### 3. 研究の方法

- (1) 皮膚モデルとして、ヒト由来皮膚角化細胞(HaCaT)を用いた光遺伝毒性系を確立しており、この系で光遺伝毒性や細胞内影響を研究した。N-ニトロサミンの光反応で放出されるNOラジカルはグアニル酸シクラーゼを活性化して細胞内cGMP量を上昇させ、cGMP依存性のキナーゼやホスホジエステラーゼなどの活性を擾乱すると予想される。また、ROSはROSストレス応答を誘発すると予想される。N-ニトロサミンの光反応におけるcGMP量変動やストレス応答シグナル伝達系の蛋白発現・活性変動を測定し、影響を研究した。
- (2) N-ニトロサミン類の光遺伝毒性を、サルモネラ菌による光エイムス試験、HaCaT細胞を用いた小核試験で研究した。さらにM13mp2ファージを用いて、突然変異を起こしたファージの塩基配列変化を解析し、突然変異のスペクトラムを明らかとし、UVA活性化N-ニトロサミンによるDNA傷害との関連を研究した。
- (3) N-ニトロサミンをUVA,UVBや300nm-400nmの単色光で照射し、共存する核酸塩基やDNAに対するアルキル化等の付加体形成、酸化的反応やDNA切断などの反応を解析し、光反応により生成した損傷核酸や蛋白の構造をUV検出、LCMSMS、NMRなどの機器分析により解析した。また反応の照射波長依存特性を研究した。
- (4) 光反応環境(水中/脂質中・好気/嫌気条件)におけるN-ニトロサミン類の光反応を解析した。水環境ではN-ニトロソ基は水素イオンによる電子吸引によりNOラジカルを放出しやすいとされているが、加えて疎水環境での光反応を明らかにし、水環境との反応機構比較を行った。また好気条件での活性酸素種の発生機構と、嫌気条件での反応性を解析した。さらに、水中/脂質中という光反応環境がおよぼす光遺伝毒性に対する影響を解析した。

- (5) 光活性化により生じる遺伝毒性活性体の安定性を研究し、それぞれの温度・pH において 10 日以上の期間を取って活性変動を研究した。それにより全身循環して毒性影響を出しうる活性寿命を持つかどうかを調べた。

#### 4 . 研究成果

- (1) 皮膚モデルとして、ヒト由来表皮ケラチノサイト HaCaT 細胞に対する、N-ニトロソプロリン(NPRO)の UVA 光反応を解析した。NPRO の光反応で放出される NO ラジカルはグアニル酸シクラーゼを活性化して細胞内 cGMP 量を上昇させ、cGMP 依存性のキナーゼやホスホジエステラーゼなどの活性を擾乱すると予想される。NPRO 存在下、UVA 照射した HaCaT 細胞内の cGMP 量を定量したところ、対照と比べ cGMP の増加が見られた。従って、光反応による NO 放出で cGMP の関与するシグナル伝達を擾乱している可能性のあることが分かった。
- (2) UVA 活性化 NPRO が誘起する突然変異のスペクトラムを M13mp2 ファージで解析したところ、グアニンをホットスポットとする GC TA と GC CG のトランスバージョンが 47% を占め、GC CG の変異割合が増加した。変異の原因として、UVA 活性化 NPRO によるグアニン付加体が考えられる。また、アデニンをホットスポットとする突然変異が観察された。
- (3) UVA により活性化した NPRO によるデオキシアデノシン(dA)への反応を LCMSMS 等で定量解析したところ、dA の 2 位及び 8 位への新規のピロリジル付加体を見出した。8 位付加体形成は NPRO の UVA 吸収曲線にそっており、光エネルギーが NPRO に吸収されて反応を起こしたことを示している。が、2 位付加体形成は光依存性ではあるが、NPRO の UVA 吸収曲線には沿わなかったため、なんらかの 2 次反応が介在していると考えられる。
- (4) UVA 活性化 NPRO の光反応による DNA 付加体形成を、LCMSMS 測定で定量解析を行った結果、NPRO の光反応で子牛胸腺 DNA に、デオキシグアノシン(dG)の 8 位、dA の 2 位及び 8 位へのピロリジル付加体 6 種と 8-オキソグアニンを見出した。
- (5) また、NPRO の光反応による DNA 付加体形成機構の解析のため、好気性および嫌気性条件における DNA 損傷量を LCMSMS 測定による定量的比較を行った。その結果、付加体形成は好气的条件・嫌气的条件ともにみられた。dA 付加体は嫌气的条件で生成量が増しており、光反応は主に活性酸素を経由しない Type I 機構で起こると考えられる。一方、dG 付加体は好气的条件での生成がやや多く、活性酸素種も関与している可能性がある。
- (6) 水環境に加えて疎水環境でも、NPRO が光遺伝毒性を示すことを明らかとした。
- (7) NPRO に加えて、N-ニトロソピロリジン(NPYR)と N-ニトロソモルホリン(NMOR)の光遺伝毒性研究を行った。NPYR および NMOR は、NPRO と同じく、UVA 活性化によりヒト由来表皮角化細胞 HaCaT へ小核形成を誘導し、光遺伝毒性を示すことを見出した。
- (8) さらに、NPRO および NMOR の光活性化体は 37 ° で 10 日以上安定、かつ pH 5 から pH 11 までの液性で変異原性を保つことがわかった。したがって、皮膚で生成した活性化体が全身循環するモデルが成立しうるということがわかった。
- (9) 環境化学物質の光遺伝毒性研究を行った。その結果、N-ニトロサミンを含むことが知られているタバコ副流煙は UVA 照射によりむしろ変異原性を減弱することが分かった。これは、変異原性成分の光分解によるものと思われ、大気など環境滞留中における光化学変化は無視できないと考えられる。
- 以上から、環境などから体内に取り込まれた N-ニトロサミンや生体内で生成した N-ニトロソアミノ酸が、日光・UVA・UVB などの光照射により反応して遺伝毒性の活性化体を作りうるということがわかった。活性化体は 37 ° ・中性の生体条件で安定に活性を保つことがわかり、全身循環して細胞の DNA に達し、DNA にアルキル付加体・酸化的 DNA 傷害などの DNA 損傷を生じ、光遺伝毒性・変異を起こしうるということがわかった。また、細胞内で光反応による NO 放出で cGMP の関与するシグナル伝達を擾乱している可能性のあることが分かった。N-ニトロソプロリンのように、光を考慮しない場合には毒性がないと判断される化合物でも、光毒性を示すことがわかり、光安全性研究としても意義があると考えられる。

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

- 1) Shuhei Aoyama, Chiharu Asahi, Kayoko Sano, [Sachiko Kimura](#), Toshinori Suzuki, Tsutomu Hatano, [Sakae Arimoto-Kobayashi](#) (2019) Isolation and identification of photoproducts from UVA-irradiated mixture of N-nitrosoproline with 2'-deoxyadenosine, Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, Volume 377, Pages159-166, 査読あり  
doi.org/10.1016/j.jphotochem.2019.03.016
- 2) Yumi Horai, Yoshiko Ando, [Sachiko Kimura](#) and [Sakae Arimoto-Kobayashi](#) (2017) Mutation spectrum resulting in M13mp2 phage DNA exposed to N-nitrosoproline with UVA irradiation. Mutation Research, Volume 821, Pages 1-4, 査読あり  
doi.org/10.1016/j.mrgentox.2017.06.003

〔学会発表〕(計 10 件)

- 1) Sakae Arimoto-Kobayashi, Shuhei Aoyama, Chiharu Asahi, Kayoko Sano, Tsutomu Hatano, Sachiko Kimura, Identification and characterization of new photoadducts from UVA mediated reaction between N-nitrosoproline and DNA, 17th Congress of the International Union of Photobiology (2019)
- 2) 有元佐賀恵、旭千春、青山周平、佐野嘉容子、ニトロソプロリンと DNA との UVA 反応により生成する dG 及び dA 付加体解析、第 41 回日本光医学・光生物学会 (2019)
- 3) 妹尾詠美、友實直美、有元佐賀恵、N-ニトロソピロリジンの UVA 活性化による小核誘発、日本環境変異原学会第 47 回大会 (2018)
- 4) 彌久末晶子、友實直美、田中範子、有元佐賀恵、N-ニトロソプロリンの UVA 照射により生じる変異原性物質の安定性、第 40 回日本光医学・光生物学会 (2018)
- 5) Sakae Arimoto-Kobayashi, Yumi Horai, Yoshiko Ando, Tomoe Negishi and Sachiko Kimura, Mutation Spectrum Resulting In M13mp2 Phage DNA Exposed To N-Nitrosoproline With UVA Irradiation, The 12th International Conference and 5th Asian congress on Environmental Mutagens (2017)
- 6) 有元佐賀恵、木村幸子、蓬萊友美、安東佳子、N-ニトロソプロリン存在下 UVA 照射による M13mp2 ファージ DNA の変異スペクトルと DNA 付加体形成、第 39 回日本光医学・光生物学会 (2017)
- 7) Naomi Tomozane, Noriko Tanaka, Tomoe Negishi, Sakae Arimoto-Kobayashi, UVA irradiated N-nitrosoproline released nitric oxide and produced photo-genotoxic effects and disturbance of cGMP concentration in human keratinocyte cells. The 9th International Conference on the biology, chemistry, an therapeutic applications of nitric oxide (2016)
- 8) 友實直美、田中範子、根岸友恵、有元佐賀恵、UVA 活性化を受けた N-ニトロソプロリンのヒト表皮角化細胞に与える光毒性と細胞内 cGMP 量の変化、日本環境変異原学会第 45 回大会 (2016)
- 9) Sakae Arimoto-Kobayashi, Chiharu Asahi, Shuhei Aoyama, Naomi Tomozane and Tomoe Negishi, DNA adducts formation with UVA-activated N-nitrosoproline with aerobic and anaerobic conditions, The 7th Asia and Oceania Conference on Photobiology (2015)
- 10) 有元佐賀恵、旭千春、青山章平、横山達也、根岸友恵、嫌気条件での UVA 活性化ニトロソプロリンによる DNA 損傷解析、第 37 回日本光医学・光生物学会 (2015)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：木村 幸子

ローマ字氏名：Sachiko Kimura

所属研究機関名：兵庫県立大学

部局名：環境人間学部

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：70225035

(2)研究協力者

研究協力者氏名：根岸 友恵

ローマ字氏名：Tomoe Negishi