

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10589

研究課題名(和文) ゲノム編集技術を用いた1,2-ジクロロプロパンの毒性機序の解明

研究課題名(英文) Investigation the mechanism of 1,2-dichloropropane toxicity using CRISPR screening.

研究代表者

吉岡 範幸 (Yoshioka, Noriyuki)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・衛生学公衆衛生学・助教)

研究者番号：70365229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：胆管がん発生と関連するとされる1,2-dichloropropane (DCP)について、その毒性メカニズムを明らかにする第一歩として胆管由来細胞においてどのような遺伝子がDNA損傷と関連しているか明らかにすることを目的にCRISPR ノックアウトスクリーニングを行った。DNA損傷と関連する314の遺伝子がノックアウトスクリーニングより同定された。その遺伝子群のエンリッチメント解析の結果、DCP曝露によるDNA損傷は活性酸素種によることが示唆された。細胞のストレス応答をノックアウトスクリーニングにより捉えることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではCRISPRノックアウトスクリーニングにより胆管がん発生と関連するとされる1,2-dichloropropane (DCP)について、その代謝産物による胆管細胞のDNA損傷が活性酸素によることが示唆された。この結果は近年の科学技術の発展に伴う新しい技術が毒性学にも応用可能であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：As a first step to investigate the toxicity mechanism of 1,2-dichloropropane (DCP), which might be associated with cholangiocarcinogenesis, CRISPR knockout screening was performed to identify which genes are associated with DNA damage in cholangiocyte cell line. A total of 314 genes associated with DNA damage were identified in the knockout screening. Enrichment analysis of the genes suggested that DNA damage caused by DCP exposure is due to reactive oxygen species. We were able to capture the cellular stress response with a knockout screening.

研究分野：衛生学

キーワード：1,2-ジクロロプロパン ノックアウトスクリーニング

## 1. 研究開始当初の背景

塩素系有機溶剤である1,2-ジクロロプロパン (DCP) やジクロロメタン (DCM) を含んでいる洗浄剤が使用されていた大阪の印刷事業場のオフセット印刷部門の従業員や元従業員に胆管がんが多発した。この発生した胆管がんは、DCPに長期間、高濃度曝露したことが原因で発症した蓋然性が極めて高いと判断されている。2014年6月に「労働安全衛生法の一部を改正する法律」が公布、化学物質管理のあり方が見直され、2014年10月、DCPは特定化学物質障害予防規則の規制対象物質となった。また、国際がん研究機関 (IARC) はDCPをGroup 1に、DCMをGroup 2Aに分類、日本産業衛生学会による許容濃度の勧告では、DCPの発がん性について2015年に第1群とした。

日本バイオアッセイ研究センター (Matsumoto M, *Inhal Toxicol.* 2013) による雌雄各群50匹のマウスのDCP吸入曝露試験において、雄にハーダー腺腫の発生増加、雌に細気管支-肺胞上皮がんを含む肺腫瘍の発生増加が認められ、雌雄各群50匹のラットのDCP吸入曝露試験において、雌雄に鼻腔扁平上皮乳頭腫の発生増加が認められた。しかしながら、ヒトにおいてみられた胆管がんは動物では再現できていない。これは、ヒトと動物では代謝酵素の種類や発現量が異なることが考えられている。

これら塩素系有機溶剤の代謝について、DCMはチトクロームP450 2E1 (CYP2E1) が関与するCYP経路とグルタチオンS-転移酵素 (GST) が関与するGST経路が存在する。低濃度曝露では、主にCYP経路で代謝され、高濃度曝露になるとCYP経路が飽和状態となり、GST経路が活性化される。GST経路ではDCMはグルタチオン抱合されS-(クロロメチル) グルタチオン、ホルムアルデヒド、ギ酸を経て二酸化炭素に代謝される。また、この代謝過程で産生された中間代謝物 (S-(クロロメチル) グルタチオン、ホルムアルデヒド) がDNA損傷を誘発し、発がんに至るメカニズムが考えられている。DCPについては2013年の検討会で「DCPと構造の類似する1,2-ジクロロエタンや1,2-ジクロロプロモエタンの研究から、DCPについても、高濃度曝露によるCYP経路の飽和から、GST経路が活性化し、DCPがグルタチオン抱合され、ハーフマスタードと呼ばれるグルタチオン抱合体が生成され、さらにエピスルフォニウムイオンに変換されてDNAと反応しDNA付加体を形成し、DNA損傷を引き起こすのではないかと推測されていた。

このようにDCPの発がんメカニズムは、動物実験による胆管がんが再現できていないこと、関与する代謝酵素が詳細に明らかにされていないことから、動物種差を考慮せずDCPの発がんメカニズムを解明できる評価方法の発見が望まれおり、その評価方法の発見が本研究の問いである。

## 2. 研究の目的

本研究はDCPの曝露により、胆管がんが発生するメカニズムを解明するために、ヒトiPS細胞由来肝細胞を用い、ゲノム編集技術を使ったCRISPR sgRNAライブラリーによるノックアウトスクリーニングを行い、胆管がん発生に関与する遺伝子を探索することが目的である。CRISPR-Cas9は第3世代のゲノム編集ツールで、ZFNやTALENがタンパク質のDNA認識・結合ドメインによって標的塩基配列へ結合するのに対して、CRISPR-Cas9は短鎖RNAを利用して塩基対形成により結合する。標的配列の切断はガイドRNAと複合体を形成するCas9ヌクレアーゼが行い、前世代のツールより簡単に遺伝子改変が可能であり、2013年以降、急速に普及してきた。さらに、このゲノム編集ツールを応用し、Feng Zhangら (*Sanjana NE, Nat Methods.* 2014) は網羅的に遺伝子を破壊するCRISPRライブラリーを作成することにより、がん関連遺伝子の探索に成功した。これはヒトの全ての遺伝子を標的とするsgRNA発現レンチウイルスベクターを作製し、細胞株へ感染させる。それぞれの細胞で1つ1つの遺伝子が破壊され、抗がん剤などにより選択圧をかけることにより表現型を示す細胞を選択、さらにその選択細胞でノックアウトされた遺伝子を次世代シーケンサーで同定することにより、がん関連遺伝子を探索する。この技術はがん関連遺伝子だけではなく毒性学の分野への応用も期待されている。

2012年よりリプロセル社よりヒトiPS細胞由来肝細胞が供給されている。この細胞は高山ら (Takayama K, *J Hepatol.* 2012) の技術で作成され、ヒト初代培養肝細胞と同等の薬物代謝酵素の遺伝子発現レベルを有しており、ヒトの生体内の肝臓に近い状態での毒性評価が可能となっている。この細胞を使用すれば動物による種差を考慮することなく、ヒトの毒性評価をヒトの細胞で行えると考えられる。

本研究では、以前は存在しなかったヒトiPS細胞由来肝細胞や近年急速に発展したゲノム編集技術を用いて、動物種差を考慮せずDCPの毒性評価を行うことが目的である。

### 3. 研究の方法

(1) 網羅的に遺伝子を破壊する CRISPR ライブラリーがパッケージされたレンチウイルス (addgene#73178) を Cas9 を安定発現 (addgene#52962) させたヒト不活化胆管由来細胞株 MMNK-1 (JCRB1554) に導入し全遺伝子ノックアウト細胞集団を作成した。(図1)

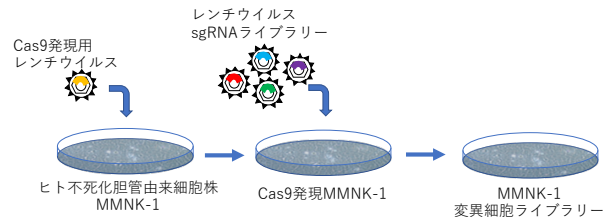


図1. 変異細胞ライブラリーの作成  
MMNK-1にCas9発現用レンチウイルスを感染させCas9を導入する。さらに、Cas9安定発現細胞にsgRNAライブラリーを感染させ、変異細胞ライブラリーを作成する。

(2) DCP をヒト iPS 由来肝細胞である ReproHepato (ReproCell) の培養液に加え、その上清をノックアウトされた MMNK-1 に曝露した。DNA 損傷(二本鎖切断)が発生した細胞をセルソーターにより選別した。(図2)

次世代シーケンサーにより sgRNA をカウントし、細胞の DNA 損傷に関連する遺伝子群を探索した。探索された遺伝子群についてウェブツールである Metascape を利用してエンリッチメント解析を行った。

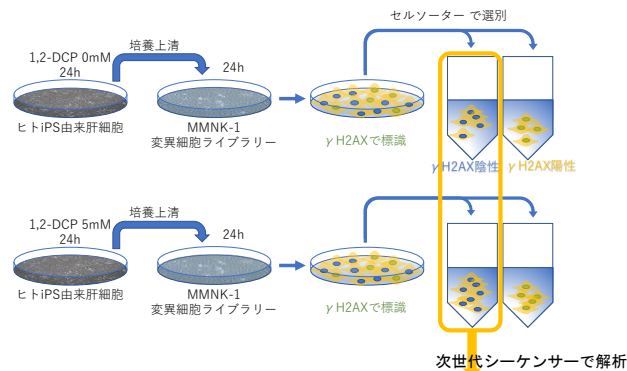


図2. ノックアウトスクリーニング実験の概要  
ポジティブセレクション：DCPによりDNA損傷を免れた細胞についてのsgRNAが濃縮されていたかを評価する。  
統計解析の結果314のsgRNAが同定された。  
314  
コントロールと比較して有意にsgRNAが増加した遺伝子群

### 4. 研究成果

DNA 損傷と関連する 314 の遺伝子がノックアウトスクリーニングより同定された。その遺伝子群のエンリッチメント解析の結果、UTM-SGCE-DAG1-CAV1-NOS3 complex、Transport of inorganic cations/anions and amino acids/oligopeptides、lung development、ERK/MAPK targets、regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors、cellular homeostasis、cellular response to cytokine stimulus、cellular response to UV-B、multicellular organismal homeostasis、cellular response to reactive oxygen species などの term がエンリッチされていた。(図3)

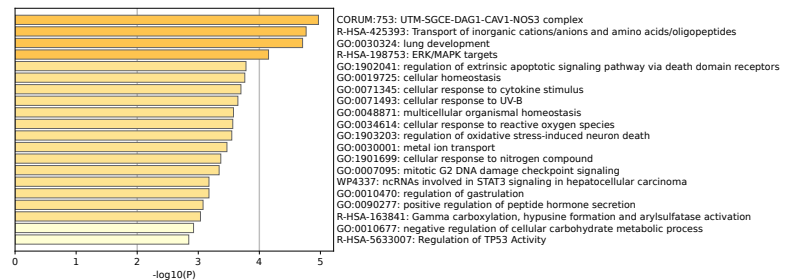


図3. エンリッチメント解析の結果  
遺伝子リストについて、KEGG Pathway, GO Biological Processes, Reactome Gene Sets, Canonical Pathways, CORUM, そしてWikiPathwaysのオントロジーソースでパスウェイおよびプロセスのエンリッチメント解析を実施した。上位20クラスターとその代表的なエンリッチタームをグラフに示している。Log10(P) は、p 値を log base 10 で表したものである。

さらに、それら term 間の関係を把握するために、Cytoscape によりそれぞれのクラスターをネットワークで可視化した。(図4)

DCP 曝露による DNA 損傷は活性酸素種によることが示唆された。また、転写因子に関連する term が多くエンリッチされており、細胞のストレス応答をノックアウトスクリーニングにより捉えることができた。

DCP 曝露による活性酸素種の生成はマクロファージと MMNK-1 の共培養の条件下で A. Ekuban ら

(Toxics. 2021) らにより報告されている。本研究では iPS 由来肝細胞による DCP の代謝産物を曝露しており、活性酸素種を生成するには DCP が胆管細胞以外の細胞との作用が必要であることが示唆された。

当初、予期していた CYP2E1、GSTT1 といった薬物代謝酵素は 314 の遺伝子リストには入ってい

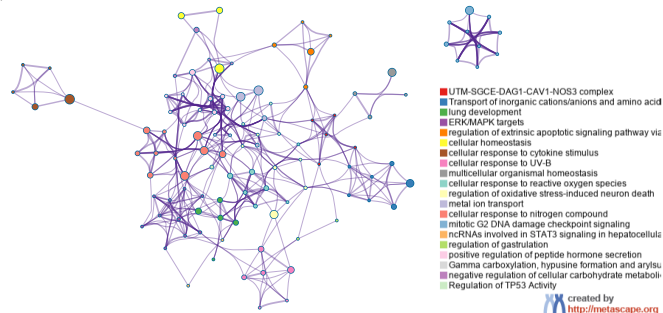


図4. エンリッチされたtermのネットワーク

なかった。しかしながらエンリッチメント解析により、転写因子等の term が多くエンリッチされており、DCP 曝露による DNA 損傷に対する反応を大局的に捉えることができた。薬物代謝等の役割については今後、個々に機能解析する必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>吉岡範幸 鈴木聡子 岩澤聡子 三好優香 坂元崇洋 橋本逸美 大野智裕 星野賢人 角田正史      |
| 2. 発表標題<br>CRISPR-Cas9によるノックアウトスクリーニングの毒性学への応用 -1,2-DCPを用いて- |
| 3. 学会等名<br>第93回日本衛生学会学術総会                                    |
| 4. 発表年<br>2023年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|