

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	基盤研究(B)
研究期間：	2010～2012
課題番号：	22390126
研究課題名（和文）	遺伝子破壊メダカとニワトリBリンパ球細胞を使用した化学物質の複合影響評価
研究課題名（英文）	Assessment of combined effect of chemicals with using mutant DT40s and gene knock out Medaka.
研究代表者	
	河野 公一 (Kouno Kouichi)
	大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：	30111016

## 研究成果の概要（和文）：

化学物質の変異原性を検出するため DNA 障害を DSB の検出を免疫染色による GammaH2ax foci を機械により自動カウントする系と生存曲線評価によるバイオアッセイを確立した。今回、モノクロロ酢酸（MCA）のアッセイを行い、MCA が変異原性を有し、アポトーシス阻害剤であることを明らかにした。このような変異原性とアポトーシス阻害の両方の性質を有する化学物質は報告されておらず今後の水質基準等の策定に役立つものと考えられる。

## 研究成果の概要（英文）：

The purpose of this project was to establish the assay that can be used to assess the genotoxicity of chemicals. Two methods were used to assess the genotoxicity. The first used immunostaining to reveal GammaH2ax foci, which were then counted automatically with a machine. The number of GammaH2ax foci correlated to the number of double strand breaks of DNA. The other method assessed the growth curve of mutant DT40s with impaired DNA repair pathways after chemical exposure. The genotoxicity of Monochloroacetate (MCA) was assessed and found to cause DNA damage. Since MCA was also found to be an apoptosis inhibitor, its carcinogenicity may be aggregated. Therefore, further assessment should be done carefully.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：化学物質、バイオアッセイ、DNA 修復経路、発がん性、変異原性

## 1. 研究開始当初の背景

産業現場では、膨大な数の化学物質が使用され、有害物質に関して化審法などの法規制がある。しかし、毎年 1,000 種類以上の化学物質が新規に登録され、それらの毒性の評価が明らかでないうちに使用されている。

現在、産業現場・環境中の存在する物質で発がんが疑われるものは多数存在するが、近年問題となっている石綿のように何十年もたつて発症するものもあり、結果も確率的なものであることから評価は非常に困難である。

## 2. 研究の目的

今回、我々は化学物質の毒性検索のため遺伝子破壊メダカ・ニワトリ DT40 細胞を使ったバイオアッセイを提案した。

## 3. 研究の方法

### 1) ニワトリ DT40 細胞を用いたバイオアッセイ

発がんは DNA の損傷による変異によりおこり、発がん性のある化学物質は DNA を損傷する。しかし、正常な細胞では DNA の損傷をいくつもの経路で修復してしまい、発がんは確率的要因である。そこで DNA 損傷修復経路の破壊された細胞の増殖を見ることである化学物質の DNA 損傷の程度、つまり発がん性を見ることができる。この研究は、産業現場において頻用される物質で発がん性が未だ明らかでない物質の DNA 損傷を見るものである。

細胞増殖（分裂）速度は、細胞の健康状態を包括的に知ることができ、かつ自動測定可能

な指標である。しかし、増殖速度を低下させる原因は多種多様である。しかし、もし左図のように、有害物質に曝露された時に、DNA 損傷を効率よく除去できないミュータントだけ細胞分裂の速度が低下すれば、その有害物質に DNA 損傷を誘導する作用があると、結論できる。

### 2) 遺伝子破壊メダカを用いたバイオアッセイ

発がんは DNA の損傷による変異によりおこり、発がん性のある化学物質は DNA を損傷する。しかし、正常な細胞では DNA の損傷をいくつもの経路で修復してしまい、発がんは確率的要因である。そこで DNA 損傷修復経路の破壊された細胞の増殖を見ることである化学物質の DNA 損傷の程度、つまり発がん性を見ることができる。この研究は、産業現場において頻用される物質で発がん性が未だ明らかでない物質の DNA 損傷を見るものである。

細胞増殖（分裂）速度は、細胞の健康状態を包括的に知ることができ、かつ自動測定可能な指標である。しかし、増殖速度を低下させる原因は多種多様である。しかし、もし左図のように、有害物質に曝露された時に、DNA 損傷を効率よく除去できないミュータントだけ細胞分裂の速度が低下すれば、その有害物質に DNA 損傷を誘導する作用があると、結論できる。

## 4. 研究成果

### 1) ニワトリ DT40 細胞を用いたバイオアッセイ

## モノクロロ酢酸による変異原性

モノクロロ酢酸 (MCA) は水道水の塩素添加により発生し水道法において規制の対象となっている。MCA は解糖系酵素、GAPDH を阻害することが知られているが、GAPDH はアポトーシスにおいて重要な役割を担う。MCA の発がん性について、いまだ明らかになっておらず、MCA の DNA 障害、アポトーシス阻害につき検討した。その結果、UBC13 遺伝子欠損 DT40 株が MCA に感受性を示すことが分かった。MCA 暴露により GammaH2ax 集積は増加し、染色体断裂試験では染色体断裂を認めたことより MCA による DNA 障害は存在することが明らかとなった。そして UBC13 と共役する RNF8, Rad18, RNF168, Rad18/RNF168 欠損 DT40 株では MCA に感受性を示すものはなかった。UBC13 欠損 DT40 株は MCA に感受性を示すが、どのような機序で感受性を示すのか今後検討が必要である。MCA はアポトーシスに必要な GAPDH を阻害するが、Caspase3/7 活性が低下しており、TUNEL 染色によるアッセイにおいてアポトーシス障害がみとめられたことから MCA はアポトーシスを阻害していると結論付けられた。今後 UBC13 と GAPDH の関連を検討する必要がある。また身近な物質でアポトーシス阻害剤は報告されておらず、DNA 障害をきたす他の物質との複合影響評価が必要であると考えられた。

## 2) 遺伝子破壊メダカを用いたバイオアッセイ

遺伝子破壊メダカを作成するためにイオンチャンネルの Cl<sup>-</sup> チャンネルである CFTR を破壊しようとした。HRM を用いて安価で遺伝子破壊を行う方法を模索し、HRM を用いる方法を確立したが、SNP の為広範囲の遺伝子変異を検出できなかったこともあり CFTR 遺伝子破壊メダカの作成を試みたが遺伝子破壊できなかった。

## 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 4 件)

1. Evans TJ, Yamamoto KN, Hirota K, Takeda S. Mutant cells defective in DNA repair pathways provide a sensitive high-throughput assay for genotoxicity. DNA Repair (Amst). 2010 Dec 10;9(12):1292-8.
2. Yamamoto KN, Kobayashi S, Tsuda M, Kurumizaka H, Takata M, Kono K, Jiricny J, Takeda S, Hirota K. Involvement of SLX4 in interstrand cross-link repair is regulated by the Fanconi anemia pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Apr 19;108(16):6492-6.
3. Yamamoto KN, Hirota K, Kono K, Takeda S, Sakamuru S, Xia M, Huang R, Austin CP, Witt KL, Tice RR. Characterization of environmental chemicals with potential for DNA damage using isogenic DNA repair-deficient chicken DT40 cell lines. Environ Mol Mutagen. 2011 Aug;52(7):547-61.
4. Fujita M, Sasanuma H, Yamamoto KN, Harada H, Kurosawa A, Adachi N, Omura M, Hiraoka M, Takeda S, Hirota K. Interference in DNA replication can cause mitotic chromosomal breakage unassociated with double-strand breaks. PLoS One. 2013;8(4):e60043.

〔学会発表〕（計 2 件）

1. 遺伝子破壊ニワトリ B リンパ球を用いた  
クロロ酢酸の DNA 障害とアポトーシス阻害の  
検討 清水 宏泰、モヒウディン、武田俊一、  
河野公一 第 83 回日本衛生学会総会（金沢）  
（2013）

2. A novel bioassay to detect carbon  
nanotube-induced genotoxicity Mohiuddin,  
Islam Shamima Keka, Terry Jhon Evans,  
Hiroyasu Shimizu, Koichi Kono, Shunichi  
Takeda, Seishiro Hirano 28th RBC-NIRS  
INTERNATIONAL SYMPOSIUM, Kyoto （2013）

〔図書〕（計 0 件）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河野 公一 (Kouno Kouichi)  
大阪医科大学・医学部・教授  
研究者番号：30111016

### (2) 研究分担者

清水 宏泰 (Hiroyasu Shimizu)  
大阪医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：60340551

### (3) 連携研究者

武田俊一 (Shunichi Takeda)  
京都大学・医学（系）研究科（研究院）・  
教授  
研究者番号：60188191