

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710084

研究課題名(和文) ナノ粒子により生成されるDNA損傷と変異誘発メカニズムの解析

研究課題名(英文) Formation of DNA adducts and mechanism of mutagenesis induced by nanomaterials

研究代表者

石野 孔祐 (Ishino, Kousuke)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：60584878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：マグネタイト(MGT)は医療分野や産業分野で利用されているが、ヒトの健康への影響についてはよくわかっていない。そのためMGTの安全性を早急に調べる必要がある。本研究では、MGT投与により生じたDNA損傷の発生メカニズムを推測するため、網羅的にDNA付加体を検出するDNAアダクトーム法を用いて、MGT投与マウス肺のDNAを分析した。その結果、炎症に際して生じることが知られるエテノdAやヘプタノンエテノdCなどのDNA付加体の生成を見出した。このことから、MGT投与マウス肺に生じる遺伝毒性を誘発する機序に、炎症が関わっていることが推測された。

研究成果の概要(英文)：Nanomaterials are useful owing to their characteristic properties and are commonly used in various fields. Nanosized magnetite (MGT) is widely utilized in medicinal and industrial fields; however, their toxicological properties are not well studied. In our previous study, we found that DNA damage analyzed by the comet assay of the lungs of ICR mice intratracheally instilled with a single dose of MGT at 0.05 or 0.2 mg/animal was approximately two- to three-fold greater than that of vehicle-instilled ICR mice. In this study, a comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome) revealed that a broad array of DNA adducts, including etheno-dA and heptanone-etheno-dC, were produced and that most of the DNA adducts determined as the major contributors in the MGT-exposed group could be derived from inflammation. These findings suggest that inflammatory responses are probably involved in the genotoxicity induced by MGT in the lungs of mice.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学、放射線・化学物質影響科学

キーワード：DNA付加体 突然変異 ナノマテリアル 酸化ストレス LC-MS/MS アダクトミクス マグネタイト アダクトーム解析

1. 研究開始当初の背景

カーボンナノチューブやフラーレン、マグネタイト (MGT) といったナノ粒子の機能が注目され、医療器具や生活用品に利用されている。一方で、近年、ナノ粒子の安全性についての試験が盛んに行われている。動物実験の結果、ナノ粒子の高い変異原性が明らかになりつつあることに加え、一部のナノ粒子では発がん性も報告されている。今後ナノ粒子の市場はさらに拡大していくと予想され、ナノ粒子を取り扱う人々への被害を未然に防ぐためにも、早急にナノ粒子の毒性について調べる必要がある。

マウスの気管内へのナノ粒子投与実験により、組織傷害および遺伝毒性に関して次のことが明らかとなっている。

- ・肺組織におけるナノ粒子の蓄積と肉芽腫の形成
- ・肺組織中 DNA に 8-oxo-dG などの DNA 損傷の蓄積
- ・肺組織の遺伝子の突然変異
- ・突然変異スペクトル G:C C:G の好発 (Totsuka et al., 2009, *Part. Fibre Toxicol.*, p23-34.)

しかしながら、ナノ粒子により引き起こされる DNA 損傷や組織学的な変化がどのように生じるかについてはほとんどわかっていないのが現状である。ナノ粒子を気管内投与したマウスの肺組織 DNA においてカーボンナノチューブ、フラーレンなどのナノ粒子共通に誘発される G:C C:G の突然変異は、多環芳香族化合物やアルキル化剤により主に誘発される変異とは異なる。一方で、紫外線照射などでは G:C C:G の変異が誘発されるが、紫外線照射による細胞傷害では既に活性酸素種 (ROS) が関与することが強く示唆されている。これらの報告から、ナノ粒子の変異原性は、直接的あるいは間接的な ROS 産生による細胞の酸化傷害が原因であると予想される。

2. 研究の目的

本研究では、ナノ粒子を気管内に投与したマウスの肺組織 DNA において生成される DNA 付加体を詳細に解析し、ナノ粒子がゲノム DNA に突然変異を誘発するメカニズムの推測を目的とする。

3. 研究の方法

実験動物において遺伝毒性が報告されているナノマテリアルの一種である、マグネタイト (MGT, 0.05% Tween20 に懸濁) を経気道的に ICR マウス (オス, 5 週齢) に曝露した。その際、同時に 0.05% Tween20 のみを投与したマウスを準備しコントロールとした。投与から 24 時間後に屠殺し、肺を摘出した。肺から DNaseI、ヌクレアーゼ P1、アルカリ

ホスファターゼ、ホスホジエステラーゼによりモノデオキシリボヌクレオシドに消化した後、水-メタノールの溶媒系を用い超高速液体クロマトグラフィー (UPLC, Waters 社) で分離し、連結された質量分析器 (Xevo-QTOFMS, Waters 社) で DNA 消化物を分析した。全ての DNA 付加体を分析できるように、総イオン分析を行った。Waters 社が提供するソフトウェア MarkerLynx を用いてピークピッキングを行うことで、分析データから DNA 付加体の候補となりうるピークを抽出した。また、デオキシリボヌクレオチドに特徴的なニュートラルロス -116.04736 を生じたピークを選択的に抽出することで、ノイズなどを抽出しないように系を調整した。各ピークの m/z、保持時間、面積値から DNA 付加体マップを作製した。また本研究で行った動物実験は、国立がん研究センターを含む各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行った。

MGT 投与群とコントロール群における DNA 付加体の差異をより詳細に評価するため、統計処理解析を導入し、統計的有意差などについても算出した。

4. 研究成果

マグネタイトをマウスに経気道曝露し、投与後 24 時間後に肺を摘出し DNA を抽出後、UPLC-QToF-MS を用いて DNA 付加体を分析した。その結果、vehicle 投与群 (コント

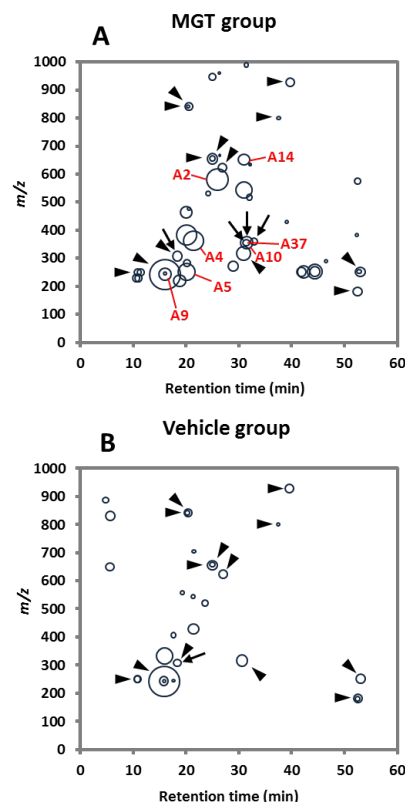


図1 MGT 投与マウス肺の DNA 付加体

ロール群、30 個)と比べて、MGT 投与群(42 個)においてより多くの DNA 付加体が生成されていた(図 1)。

しかしながら、これらのピークがどういった化学構造を有するか、またどれがナノマテリアルの遺伝毒性に関連するかを特定するのは難しいものと推測された。一方でこれまでに、ナノマテリアルの遺伝毒性に酸化ストレスが関与することを示唆するデータが得られている。そこで、MGT 投与群において特異的に生成される付加体を同定するために、実験方法で述べた以下の 2 点を試みた。1) 既知の DNA 付加体の標品と比較した。2) 酸化ストレスや炎症反応により誘発される DNA 付加体についてもアダクトーム法により別途解析し(in vitro モデル反応)、ナノマテリアル投与群で検出された DNA 付加体と比較し、酸化ストレスや炎症反応に由来する既知および未知の DNA 付加体を検索した。その結果、MGT 投与群の肺 DNA で生成された DNA 付加体のうち複数、酸化反応ならびに炎症反応のモデル反応から見出された。

また、MGT 投与群とコントロール群において検出された DNA 付加体を、存在量の多いものから順に並べ比較した。正常塩基(T, 5MedC)を含め、多くの付加体で存在量がありかわらないが、正常塩基のデオキシアデノシン(dA)はMGT投与群で減少傾向にあった。

これらの DNA 付加体の化学構造を推測するために、本研究では生理的反応で生じる活性種を人工的に DNA と反応させて調製した in vitro モデル反応と比較した。その結果、MGT 投与群マウス肺の DNA 付加体と in vitro モデル反応の DNA 付加体で 43 個の付加体が一一致することを見出した。そのうち、m/z 308.14 を有する DNA 付加体が脂質過酸化物質であるマロンジアルデヒド(MDA)の dG 付加体あるいはアクロレインの dA 付加体であることが分子量ならびに保持時間から示唆された。しかしながら、他の DNA 付加体については既知の DNA 付加体とは異なることが示唆されたため、化学構造は今後の課題である。MGT 投与群における dA の減少が観察された。dA は正常塩基の中では比較的反応性の高い塩基に分類されることから、MGT 投与により肺で生じた活性種と反応し付加体に変化したことで減少したものと推察された。そのため、MGT 投与により生じた DNA 付加体には dA 由来の付加体が多数含まれるものと考えられる。MGT 投与群で生成された DNA 付加体のうち、in vitro モデル反応においても生成されなかった他の付加体については、元素組成解析やフラグメントイオンの解析、NMR 測定などの更なる解析を行うことで、どのような付加体かを推測する必要である。

本研究では、DNA アダクトーム法を確立し、ナノマテリアルのうち特にマグネタイトについてマウス肺への DNA 損傷能について解析した。その結果、酸化反応や炎症反応により生成される DNA 付加体が肺で生成されている可能性が示唆された。それらの DNA 付加体は in vitro モデル反応により、理論上大量調製が可能であるが、すべての付加体を検討することは経済的、労力的な面から困難なため、MGT により誘発された遺伝毒性を説明しうる DNA 付加体の候補を数個まで絞り込んだ上で、化学構造の決定に取り掛かる必要がある。

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)

In vitro and in vivo genotoxicity induced by fullerene (C60) and kaolin. Totsuka Y, Kato T, Masuda S, Ishino K, Matsumoto Y, Goto S, Kawanishi M, Tagi T, Wakabayashi K, Genes and Environment, 33, p14-20, 2011.

DOI: 10.3123/jemsge.33.14

Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both in vitro and in vivo assay systems. Kato T, Totsuka Y, Ishino K, Matsumoto Y, Tada Y, Nakae D, Goto S, Masuda S, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Matsuda T, Watanabe M, Wakabayashi K, Nanotoxicology, 7, p452-461, 2013.

DOI: 10.3109/17435390.2012.674571

Genotoxicity and reactive oxygen species production induced by magnetite nanoparticles in mammalian cells. Kawanishi M, Ogo S, Ikemoto M, Totsuka Y, Ishino K, Wakabayashi K, Yagi T, Journal of Toxicological Sciences, 38, p503-511, 2013.

DOI: 10.2131/jts.38.503

Magnetite nanoparticles induce genotoxicity in the lungs of mice via inflammatory response. Totsuka Y, Ishino K, Kato T, Goto S, Tada Y, Nakae D, Watanabe M, Wakabayashi K, nanomaterials, 4, p175-188, 2014.

DOI: 10.3390/nano4010175

[学会発表](計 5 件)

石野 孔祐、加藤 竜也、戸塚 ゆ加里、中釜 齊、ナノマテリアルによりマウス肺に誘発される DNA 付加体の網羅的解析、第 59 回 質量分析総合討論会、大阪、9 月、2011 年

石野 孔祐、戸塚 ゆ加里、加藤 竜也、中釜 齊、A comprehensive analysis of DNA adducts in mice exposed to nanomaterials、

第70回 日本癌学会学術総会，名古屋，
10月，2011年

石野 孔祐、加藤 竜也、松田 知成、戸塚 ゆ
加里、中釜 斉，ナノマテリアルによりマ
ウス肺に誘発される DNA 付加体の網羅的解
析，日本環境変異原学会 第40回大会，東
京，11月，2011年

Kousuke Ishino, Akihiro Sekine, Sumio
Goto, Hitoshi Nakagama, Yukari Totsuka,
Analysis of DNA damage induced by
nanomaterials using comprehensive
analysis of DNA adducts (DNA adductome
analysis), 3rd Asian Conference on
Environmental Mutagens, Hangzhou, China,
October, 2012

石野 孔祐、関根 彬弘、後藤 純雄、中釜 斉、
戸塚 ゆ加里，DNA 付加体の網羅的解析によ
る新規付加体の探索，日本環境変異原学会
第41回大会，静岡，11月，2012年

〔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

<http://www.nms-pathology.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石野 孔祐 (ISHINO KOUSUKE)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：60584878