

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：82601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650124

研究課題名(和文) DNA損傷応答因子欠損細胞を用いた迅速、簡便かつ高感度な遺伝毒性検出法の研究

研究課題名(英文) Study of a fast, convenient and sensitive genotoxicity test utilizing cells lacking DNA damage response factors

研究代表者

赤木 純一 (Akagi, Jun-ichi)

国立医薬品食品衛生研究所・病理部・研究員

研究者番号：60512556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではTLSポリメラーゼのうちPol γ 、Pol δ 、Pol ϵ を三重に欠損したTKO細胞の高感受性を利用した遺伝毒性試験法の実験条件および有用性の検討を行った。TKO細胞はさまざまな遺伝毒性物質に高感受性を示し、野生型細胞とTKO細胞のIC50の比は11種中10種の遺伝毒性物質に対して2倍以上であった。一方で6種の非遺伝毒性物質に対しては、TKO細胞は野生型細胞と同程度の感受性を示した。これらの結果から遺伝毒性物質に対するTKO細胞の高感受性を利用した新規in vitro遺伝毒性試験の有効性が予想され、IC50WT/IC50TKOが化学物質の遺伝毒性を判定する指標となりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Genotoxicity of environmental chemicals mainly arise from modifications of genomic DNA, such as alkylation, oxidation and adduct formation. Majority of point mutations in genomic DNA are considered to be caused as the consequence of translesion synthesis (TLS) that allows direct replication past DNA lesions. On the other hand, when TLS fails, cell survival is severely affected as a result of replication fork collapse. We have analyzed the triple knockout (TKO) mouse embryonic fibroblasts lacking three TLS DNA polymerases, Pol γ , Pol δ and Pol ϵ . The TKO cells showed increased sensitivity to various genotoxins compared to the wild-type cells. The IC50WT/IC50TKO ratios that represent the difference of cellular sensitivity between TKO cells and the wild-type cells in 10 out of 11 genotoxins were more than 2, while that in 6 nongenotoxins were less than 2.0. Thus, the hypersensitivity of TKO cells to genotoxins is useful to evaluate genotoxicity of chemicals.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：損傷乗り越え複製 遺伝毒性試験

1. 研究開始当初の背景

発がん性は化学物質の慢性曝露による影響の中でも特に懸念すべきハザードである。化学発がんの機序には化学物質が直接 DNA を傷害することによる遺伝毒性と、増殖刺激作用などによる非遺伝毒性という二つの機序が存在するが、遺伝毒性については閾値がないとの前提でリスク評価がなされるため、慢性曝露のリスクを考慮する上で遺伝毒性の有無を判定することは重要な意味を持つ。環境中の化学物質による遺伝毒性の多くはゲノム DNA がアルキル化、酸化、付加体形成などの修飾を受けることに起因し、ゲノムに生じる点突然変異の大部分はこれらの損傷塩基を鋳型として複製を行う損傷乗り越え DNA 合成 (translesion synthesis; TLS) により生じると考えられている。一方で TLS が働かなければ、複製フォークの崩壊により細胞の生存に重大な影響を引き起こす。本代表者らは TLS において主要な役割を果たしている γ ファミリー DNA ポリメラーゼのうち Pol η (イータ)、Pol ι (イオタ)、Pol κ (カッパ) を欠損した triple knockout (TKO) マウス胎性繊維芽細胞を用いた解析を行っている。TKO 細胞は紫外線に対して、それらの単独欠損細胞よりもさらに高い感受性を示す。TLS ポリメラーゼは紫外線損傷のみならず多様な DNA 損傷の乗り越えに関与していることから、本代表者らは野生型 (WT) 細胞と TKO 細胞の感受性の差を指標として遺伝毒性を評価することができるのではないかと考えた。そこで TKO 細胞がさまざまな遺伝毒性物質に対して高感受性を示すかどうか、一方で非遺伝毒性物質に対しては野生型細胞と同程度の感受性であるかを検討して、TKO 細胞の感受性を利用した遺伝毒性試験法 (TKO アッセイ) の有効性を検証した。

2. 研究の目的

本研究では損傷乗り越え複製型 DNA ポリメラーゼ (Pol η 、Pol ι 、Pol κ) を三重に欠損したマウス由来胚性繊維芽細胞 (TKO 細胞) を用いて化学物質の遺伝毒性を迅速、簡便かつ高感度に検出する試験法の確立および有効性検証を目的とした。

3. 研究の方法

Pol η ^{-/-}、Pol ι ^{-/-}、Pol κ ^{-/-}、TKO 細胞、および野生型細胞は既に樹立された細胞を作成者より分与を受けて使用した。これらの細胞は 10% ウシ胎児血清を添加したダルベッコ変法イーグル培地で培養した。細胞生存率アッセイでは細胞を 96 ウェルプレートに撒き、一晩置いて接着させた後、さまざまな濃度の被験物質を各 6 ウェルずつ添加した。対象群および培地のみを添加した。代謝活性化を行う際には被験物質とともに終濃度 1% の染色体異常試験用 S9 mix (キッコーマン) を添加した。

24 時間後被験物質を含む培地を除去し、新鮮な培地で一度ウェルを洗った後に再び培地を添加して 96 時間培養した。その後 MTS 試薬 (Promega) を添加した培地に交換し、1 時間インキュベートし、吸光プレートリーダーを用いて 495 nm の吸光度を測定した。DNA 損傷応答因子の解析では細胞を 6 cm ディッシュに撒き、一晩置いて接着させた後、被験物質を添加してインキュベートした。その後細胞を氷上で回収し、0.5% Triton X-100 を含むバッファーに懸濁して可溶性画分と不溶性画分に分離し、ユビキチン化 PCNA、 γ -H2AX、リン酸化 Chk1 等を Western blot により検出した。

4. 研究成果

4-1. 遺伝毒性物質に対する TLS 欠損細胞の高感受性を簡便に検出する試験法の確立

遺伝毒性物質は急性の細胞死だけでなく、細胞周期の停止による増殖遅延、遅延性の細胞老化やアポトーシスも引き起こすため、被験物質処理後の回復時間の長さが感受性の測定結果に重要な影響を与えると考えられた。そこで細胞を 24 時間 MMS 処理し、新鮮な培地に交換して 48 時間または 96 時間後に非処理群を 100% として相対増殖率を測定したところ、48 時間に比べて 96 時間では同じ濃度の MMS 処理でより大きな相対増殖率の低下が見られた。特に TKO 細胞で顕著な相対増殖率の低下がみられ、野生型細胞との差が拡大していた。96 時間の回復時間経過時点で細胞密度がサブコンフルエントになるためには細胞をきわめて低密度で撒く必要があり、このときの相対増殖率はコロニー形成法により測定したクローン原性生存率と近似した結果であった。このようにセミクローナルな増殖条件下での MTS アッセイにより、コロニー形成法と同様に細胞増殖への影響等を加味した遺伝毒性感受性を簡便に測定可能な手法を確立した。

4-2. TKO 細胞はさまざまな作用機序の遺伝毒性物質に対して高感受性を示した

TKO 細胞がさまざまな作用機序の遺伝毒性物質に対して高感受性を示すかどうか調べるため、アルキル化剤であるメチルメタンスルホン酸 (MMS)、DNA 架橋剤であるマイトマイシン C (MMC) およびシスプラチン (CDDP)、酸化ストレスを誘発する臭素酸カリウム (KBrO₃)、トポイソメラーゼ I を阻害して一本鎖切断を誘発するカンプトテンシン (CPT) に対する野生型細胞、TKO 細胞、および Pol η 、Pol ι 、Pol κ それぞれの単独欠損細胞である Pol η ^{-/-}、Pol ι ^{-/-}、Pol κ ^{-/-} の感受性を測定した。その結果、TKO 細胞はいずれの損傷に対しても最も高い感受性を示した。

これらの結果から、TLS ポリメラーゼは損傷の種類によって異なる冗長性を持っており、三重欠損により相加的に感受性が亢進す

る損傷と、特定のポリメラーゼの欠損がエピスタティックである損傷が存在することが示された。そして、TKO 細胞はいずれの種類の損傷に対しても最も感受性の高い単独欠損細胞と同程度か、またはさらに高い感受性を示すことが明らかになった。

4-3 . TKO 細胞の高感受性は遺伝毒性物質特異的であった

TKO 細胞の高感受性が遺伝毒性物質に特異的かどうか、既知の遺伝毒性物質および非遺伝毒性物質の WT 細胞と TKO 細胞に対する半数阻害濃度 (IC₅₀) の比、IC₅₀^{WT}/IC₅₀^{TKO} を測定した。先に示した 5 種類の遺伝毒性物質、MMS、KBrO₃、MMC、CDDP および CPT に加えて、食品中に非意図的に含まれることが懸念されている遺伝毒性物質であるグリシドール、およびアクリルアミドの活性代謝産物グリシドアミド、突然変異を誘発しないもの的高用量では DNA 損傷を誘発する

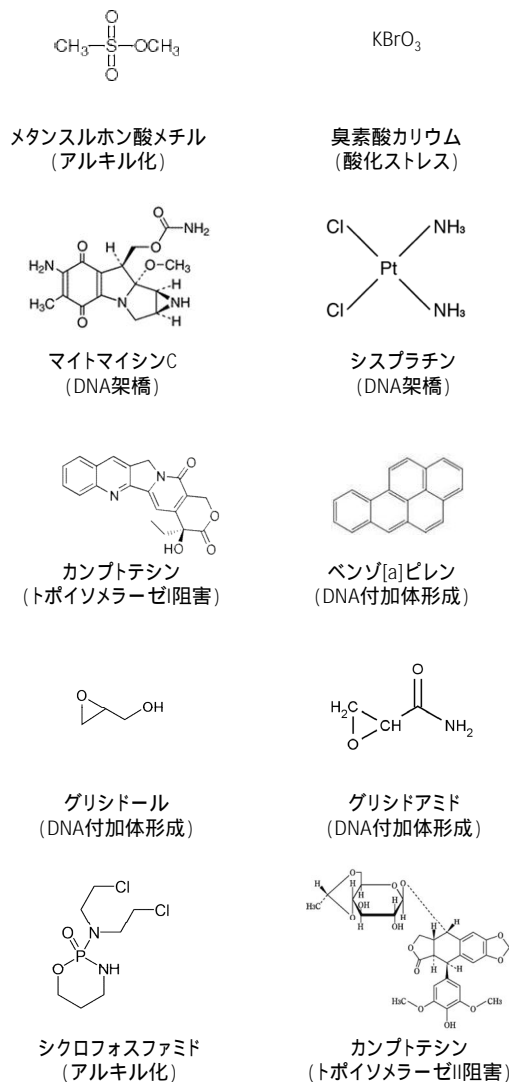


図 1. TKO アッセイに使用したさまざまな作用機序の遺伝毒性物質

ことが報告されているアセトアミノフェン、毒性発現に代謝活性化を必要とするアルキル化剤であるシクロフォスファミド、代謝活性化を受けて DNA に付加体を形成するベンゾ[a]ピレン、トポイソメラーゼ II を阻害して二重鎖切断を誘発するエトポシドの 11 種類の遺伝毒性物質のうち 10 種類で TKO 細胞は WT 細胞に比べて有意に高い感受性を示し、IC₅₀^{WT}/IC₅₀^{TKO} >2 を判定規準とした場合の感受性は 90.9%であった。一方で、非遺伝毒性物質である塩化ナトリウム、エタノール、塩化アンモニウム、クルクミン、ジクロフェナクナトリウム、および過酸化水素の 6 種類の非遺伝毒性物質に対して TKO 細胞は WT 細胞と同程度の感受性を示し、その IC₅₀^{WT}/IC₅₀^{TKO} は 2 以下であった。

4-4 . TKO 細胞では PCNA ユビキチン化が WT 細胞よりも亢進していた

WT 細胞と TKO 細胞における DNA 損傷応答因子の活性化を調べると、MMS 処理した TKO 細胞では WT 細胞と比べて複製型 DNA ポリメラーゼから TLS ポリメラーゼへのスイッチングに必須である PCNA のユビキチン化が MMS 濃度依存的に亢進していた。さらに、DNA 二重鎖切断マーカーである γ-H2AX の発現も WT 細胞に比べて TKO 細胞で亢進していた。これらの結果から、遺伝毒性物質に対する TKO 細胞の高感受性は複製フォークの進行阻害に起因すると考えられ、TKO アッセイの理論的根拠が裏付けられた。

4-5 . 結論

本研究により、TKO 細胞がアルキル化、付加体形成、酸化損傷、鎖内および鎖間架橋、一本鎖切断などのさまざまな作用機序の遺伝毒性に対して高い感受性を特異的に示すことが明らかになった。従来用いられている哺乳類細胞を用いる *in vitro* 遺伝毒性試験法の多く (染色体異常試験、小核試験、コメットアッセイ等) は顕微鏡下で異常染色体、小核、コメットテール等の計数を必要とするため熟練者の労力と相応の作業時間を要するが、本研究の手法では 96 ウェルプレート上の細胞に MTS 試薬を加え、そのままマイクロプレートリーダーで吸光度を測定するだけで結果が得られるため迅速かつ簡便であると考えられる。今回用いた被験物質の中で、二重鎖切断を誘発するエトポシドのみ遺伝毒性に対する TKO 細胞の高感受性が見られなかったが、二重鎖切断はコメットアッセイ等の既存の試験法で容易に検出可能であり、一方でコメットアッセイでは偽陰性を生じるおそれのある DNA 架橋剤を TKO アッセイでは陽性として検出可能であったことから、既存の試験法とは異なる原理で遺伝毒性を検出する本試験法は組み合わせ試験の一つとして有用性が高いと考えられる。

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)

[学会発表](計 2件)

損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼ $\eta \cdot \iota \cdot \kappa$ 三重欠損細胞の変異原に対する高感受性を用いた遺伝毒性検出法の検討

Study of the in vitro genotoxicity testing utilizing hypersensitivity of Pols $\eta \cdot \iota \cdot \kappa$ and κ triple knockout cells to mutagens

赤木純一、チョウヨンマン、豊田武士、横井雅幸、大森治夫、花岡文雄、小川久美子

第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25~27 日 パシフィコ横浜 (横浜市)

Hypersensitivity of Pols η , ι , and κ triple knockout cells to mutagens is a valuable indicator of genotoxicity

Pol η , Pol ι , Pol κ 三重欠損細胞の変異原に対する高感受性は遺伝毒性の指標として有用である

Jun-ichi Akagi, Masayuki Yokoi, Young-Man Cho, Takeshi Toyoda, Fumio Hanaoka, Kumiko Ogawa

第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8 ~10 日 名古屋国際会議場 (名古屋市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

赤木 純一(AKAGI JUN-ICHI)

国立医薬品食品衛生研究所・病理部・研究員

研究者番号：60512556