

令和元年8月29日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26281029

研究課題名(和文) 遺伝毒性発がん物質の閾値形成におけるDNAポリメラーゼの役割に関する研究

研究課題名(英文) Roles of DNA polymerase kappa on establishment of threshold for genotoxic carcinogens

研究代表者

能美 健彦 (NOHMI, TAKEHIKO)

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・客員研究員

研究者番号：30150890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：DNAポリメラーゼ(カッパ、Polkと略)のDNAポリメラーゼ活性を不活化させた Polk ノックインマウス(Polk KIマウス)が、炎症に基づく突然変異と発がんに対して高感受性を示すことを明らかにした。この結果は、Polkが炎症により生じたDNA損傷を誤りなく乗り越え、炎症に基づく突然変異を抑制している可能性を示唆する。炎症は化学物質や感染によって生じ、ヒト発がんの約25%に関連していると言われている。本研究は、Polkが炎症に基づく突然変異と発がんの抑制に重要な役割を果たし、炎症誘発により発がん性を示す化学物質の閾値形成に寄与していることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAに傷を付けて突然変異を起こす発がん物質は遺伝毒性発がん物質と呼ばれ、その発がん作用に閾値は無いとして各種の規制が行われている。しかしヒトには各種の生体防御機能が備わっており、低用量であれば遺伝毒性発がん物質の作用を無毒化し事実上の閾値を形成する可能性が考えられる。DNAポリメラーゼ(カッパ、Polkと略)は、DNA損傷を誤りなく乗り越えてDNA合成を続けるトランスリージョン型DNAポリメラーゼである。本研究は、Polkが遺伝毒性発がん物質の閾値形成に関与する可能性を検討し、炎症に基づく突然変異と発がんの閾値形成への寄与を示唆した。

研究成果の概要(英文)：DNA polymerase kappa (Polk) is a specialized DNA polymerase that bypasses several DNA lesions efficiently and accurately. We generated knock-in mice that express inactive Polk and crossed with gpt delta mice that possess reporter genes for mutations in vivo. The resulting mice were hypersensitive to mutations and tumor formation in colon induced by inflammation caused by treatments with dextran sulfate sodium. The results suggest that Polk mediates error-free bypass DNA synthesis across DNA lesions induced by inflammation and also that it suppresses inflammation-induced carcinogenesis, which accounts for 25% of human cancer. In regulatory toxicology, it is assumed that genotoxic carcinogens have no thresholds or safe dose. It is pointed out, however, that self-defense mechanisms may suppress genotoxicity at low doses, thereby constituting practical threshold. Polk may be a constituent of the practical threshold against genotoxic carcinogens that induce inflammation.

研究分野：遺伝毒性

キーワード：炎症 遺伝毒性 発がん 酸化DNA損傷 DNAポリメラーゼ カッパ トランスリージョンDNA合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝毒性発がん物質の作用には閾値がないとされ、極めて低用量であってもヒトに対して発がんリスクを負わせるものとして、各種の行政上の規制が行われている。しかしヒトは様々な生体防御機能(解毒代謝、DNA修復、アポトーシス等)を有しており、これらが低用量の遺伝毒性発がん物質の作用を抑制し「事実上の閾値」を形成する可能性が考えられる。トランスリージョン DNA 合成(DNA 損傷を乗り越えて進む DNA 合成)は、遺伝毒性の抑制に重要な役割を果たしており、トランスリージョン DNA 合成が、遺伝毒性発がん物質の閾値形成に役割を果たしていることが示唆されていた。

DNA ポリメラーゼ(カッパ、以下 Polk と略)は、遺伝毒性発がん物質であるベンツピレンの代謝活性化体であるベンツピレンジオールエポキシドの N⁶-デオキシグアノシン DNA 付加体(以下、BPDE-dG 付加体と略)を *in vitro*において、誤りなく効率良く乗り越えて DNA 合成を行うことから、ベンツピレンによる突然変異や発がん作用を抑制し、個体レベルでの閾値形成に役割を果たしていることが予想されていた。

マウス個体でベンツピレンの突然変異、発がんを調べる手法として、ベンツピレンを経口投与した後、大腸に炎症を誘発するデキストラン硫酸ナトリウム(以下、DSS と略)を投与すると大腸における突然変異、発がん頻度が顕著に増大することが報告されていた。Polk の DNA ポリメラーゼ活性を特異的に不活化させたノックインマウスに、突然変異検出のレポーター遺伝子である *gpt* 遺伝子を組み込んだ *gpt delta* Polk ノックインマウス(以下、Polk^{-/-}マウスと略)が樹立され、マイトマイシン C(以下、MMC と略)の突然変異誘発作用を野生型マウスよりも高い感度で検出できることが明らかにされていた。

Polk は、ベンツピレン代謝物の DNA 付加体だけでなく、酸化 DNA 損傷であるチミングリコール(以下、TG と略)のトランスリージョン DNA 合成に関与していることが示唆されており、多様な遺伝毒性発がん物質の閾値形成に関与していることが示唆されていた。活性酸素種は、さまざまな化学物質暴露によって生じ、かつヒト発がん要因の一つと考えられており、その遺伝毒性に対する事実上の閾値形成に Polk が関与しているかは重要な課題であった。

2. 研究の目的

(1) ベンツピレンによる突然変異、発がん作用の閾値形成に Polk が果たす役割を *in vivo*(マウス個体レベル)で検討すること(2) Polk が酸化 DNA 損傷物質の閾値形成に役割を果たす可能性をヒト培養細胞レベルで検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 10-14 週齢の雄 Polk^{-/-}マウスと Polk 野生型 *gpt delta* マウス(以下、Polk^{+/+}マウスと略)に、ベンツピレン(50 mg/kg, 125 mg/kg)を 5 日間連続経口投与し、10 日間の休薬後、DSS(2%)を 5 日間連続飲水投与した。対照群として溶媒(サラダ油)のみを投与した群、ベンツピレンのみを投与した群、DSS のみを投与した群を設定した。投与開始から 15 週目に屠殺し、臓器(大腸、肺)を採取し病理学的解析、変異解析、DNA 付加体解析に供した。病理学的解析により、大腸における腺腫、腺がんの発生数を計測した。また、近位大腸、遠位大腸、肺における *gpt* 突然変異体頻度(以下、*gpt* MF と略)を計測し、DNA シークエンスにより変異スペクトルを明らかにした。大腸、肺の DNA 付加体(BPDE-dG 付加体等)は LS/MS/MS 法により定量した。ベンツピレン投与終了後 2 日目に末梢血を採取し、小核赤血球の頻度を求めた。

(2) ミスマッチ修復欠損 Nalm-6 ヒト細胞株(以下、MSH^{-/-}株と略)と、同株のミスマッチ修復能を野生型に戻した株(以下、MSH^{+/+}株と略)の Polk 遺伝子をノックアウトした株(以下、MSH^{-/-} KO 株、MSH^{+/+} KO 株と略)、Polk の DNA ポリメラーゼ触媒活性を特異的に不活化させた株(以下 MSH^{-/-} CD 株、MSH^{+/+} CD 株と略)を用い、過酸化水素、メナジオン、パラコートによる染色体異常の見かけ上の閾値(Non-observed-genotoxic-effect-level、以下 NOGEL と略)を求めた。

4. 研究成果

(1) ベンツピレンによる突然変異、発がん作用の閾値形成に Polk が果たす役割の検討

ベンツピレンと DSS を投与した群の大腸の腫瘍(腺腫、腺がん)の数は、ベンツピレンの用量に依存して増加し、腫瘍は近位大腸よりも遠位大腸により多く発生した。ベンツピレンのみの投与で DSS 処理を行わなかった場合には、腫瘍は発生しなかった。また溶媒のみを投与した群や DSS のみを投与した群でも腫瘍は発生しなかった。しかし、ベンツピレンと DSS を投与した群の腫瘍の発生数に Polk^{-/-}マウスと Polk^{+/+}マウスに差は見られなかった。肺では、いずれのマウスでも腫瘍の発生は見られなかったが、ベンツピレン(125 mg/kg)と DSS を投与した Polk^{-/-}マウス(9 匹中 2 匹)の胸腺において悪性リンパ腫が観察され、リンパ腫は肺と腎臓に転移していた。ベンツピレンと DSS を投与した群の *gpt* MF は、遠位大腸、近位大腸、肺ともにベンツピレンの用量依存的に増加した。ベンツピレンのみの投与で DSS 処理を行わなかった群でも *gpt* MF は増加した。しかし、大腸の *gpt* MF は Polk^{-/-}マウスと Polk^{+/+}マウスで差はなかった。以上の結果から、Polk はベンツピレンによる大腸の腫瘍発生、突然変異誘発に対して抑制効果を示さないものと結論した。肺においては、ベンツピレン(50 mg/kg)と DSS を投与した群の *gpt* MF は Polk^{-/-}マウスが Polk^{+/+}マウスよりも有意に高い(約 2 倍)値を示した。また、骨髄の小核誘発もベンツピレン投与群(50 mg/kg)において、Polk^{-/-}マウスが Polk^{+/+}マウスよりも有意に高

い(約2倍)値を示した。ただし、肺でも骨髄でもベンツピレン(125 mg/kg)群では、 $Polk^{-/-}$ マウスと $Polk^{+/+}$ マウスの間に差は見られなかった。 $Polk$ のベンツピレンに対する遺伝毒性抑制作用には臓器特異性があり、骨髄、肺では一定の抑制作用を示すのかもしれない。

興味深いことに、予想とは異なって $Polk^{-/-}$ マウスはDSS単独処理群において $Polk^{+/+}$ マウスよりも有意に高いgpt MFを大腸と肺で示した(図1)。DSS処理により $Polk^{-/-}$ マウスで増加した変異は、G:C C:G, G:C T:A, CpG部位でのG:C A:Tであった。特にG:C C:Gは、近位大腸において $Polk^{-/-}$ マウスが $Polk^{+/+}$ マウスよりも約30倍高い変異頻度を示した。

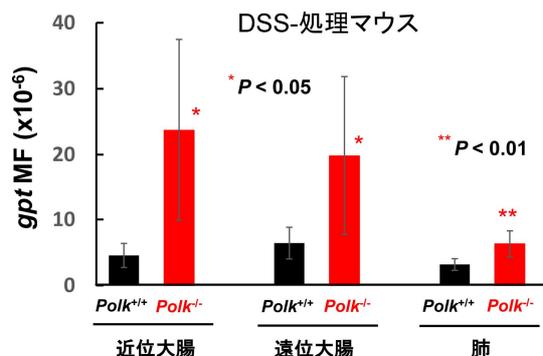


図1 DSS処理 $Polk^{+/+}$ および $Polk^{-/-}$ マウスの近位大腸、遠位大腸、肺における突然変異体頻度
* $P < 0.05$ by Welch's test ** $P < 0.01$ by Student's t-test

屠殺時に得た臓器(大腸、肺)について、BPDE-dG付加体と脂質過酸化物によるDNA付加体である1- N^6 -etheno-2'-deoxyadenosine(dA)、8-hydroxypropano-2'-deoxyguanosine(8-OH-AdG)、heptano-etheno-2'-deoxycytidine(HdC)を定量した。dA量は、いずれの処理群においても、大腸が肺より顕著に高い値を示したが、DSS処理による影響は見られなかった。また、ベンツピレン処理群においてもBPDE-dG付加体は検出されなかった。これは臓器採取がベンツピレン投与終了後14週目、DSS投与終了後12週目であったため、DNA修復や細胞のターンオーバーによりDNA付加体が除去されたためと考えられる。

上記の結果を基に、 $Polk$ の炎症に対する抗変異作用を以下のように考察した(図2)。すなわち $Polk$ は炎症によってDNAに生じた何らかの付加体(たとえばグアニン N^6 -付加体)を誤りなく効率的に乗り越えてトランスリージョンDNA合成を行うため、 $Polk^{+/+}$ マウスでは炎症が起きても突然変異は起こらないが、 $Polk^{-/-}$ マウスでは誤りの無いトランスリージョンDNA合成が起こらないために、他のDNAポリメラーゼがDNA付加体を乗り越える際に誤ったdNTPが挿入されG:C C:Gなどの変異が増加するものと考えられる。変異の増加は腫瘍発生の増加に結びつく可能性が高く、 $Polk$ は炎症による突然変異、発がんに対する閾値形成因子として重要な役割を果たしているものと考えられる。

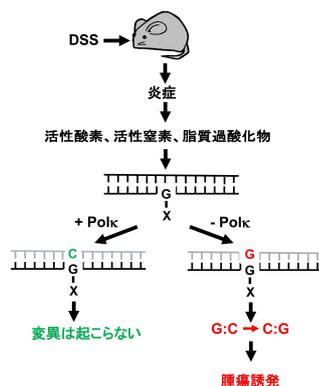


図2 $Polk$ が炎症に基づく突然変異を抑制するメカニズム

マウスをDSSで処理すると炎症が起こり活性酸素種等によりDNA損傷が誘発される。 $Polk$ はこの損傷の向かい側に正しいdNTPを挿入してDNA合成を行うことため $Polk^{+/+}$ マウスでは突然変異は起こらないが、 $Polk^{-/-}$ マウスでは他のDNAポリメラーゼが誤ったdNTPを挿入するためG:C C:Gなどの変異が増加する。変異の増大は炎症に基づく腫瘍を誘発すると考えられる。

(2) $Polk$ が酸化DNA損傷物質の閾値形成に果たす役割の検討

過酸化水素、メナジオン、パラコートによる染色体異常誘発の見かけ上の閾値NOGELに及ぼす $Polk$ とミスマッチ修復の影響を検討した。その結果、過酸化水素、メナジオンの場合、ミスマッチ修復が欠損していると $Polk$ の活性の有無はNOGELに影響しないが、ミスマッチ修復が野生型の場合、NOGELは $Polk$ 活性が消失した株で有意に低下していた(MSH^{+/+}CD株=MSH^{+/+}KO株 < 野生型株)。これに対しパラコートの場合は、ミスマッチ修復、 $Polk$ いずれもNOGELに影響を与えなかった。これらの結果から、ミスマッチ修復と $Polk$ は、協調して過酸化水素とメナ

ジオンの染色体異常誘発に関する NOGEL に影響を与えること パラコートと過酸化水素、メナジオンでは染色体異常誘発の原因となる活性酸素種が異なることが示唆された。パラコートによる染色体異常の原因は一重項酸素であること、過酸化水素、メナジオンによる染色体異常の原因は水酸化ラジカルであることが報告されており、今回の結果はこれらの報告と良い一致を示した。上記の結果を基に、Polk が過酸化水素、メナジオンの染色体異常誘発に影響を与えるメカニズムを以下のように考察した (図 3)。

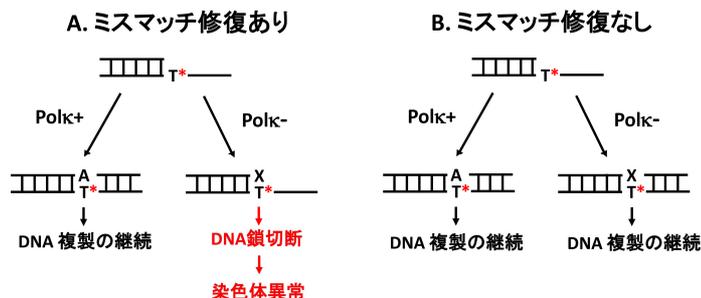


図 3 Polk が過酸化水素、メナジオンの染色体異常誘発に影響を与えるメカニズム

A ミスマッチ修復がある場合、Polk があると酸化 DNA 損傷 (T^{*}) の向かい側に正しい dNTP を挿入し DNA 複製が継続されるが、Polk が無いと誤った dNTP が酸化 DNA 損傷の向かい側に挿入され、この塩基ミスマッチがミスマッチ修復機構によって認識され DNA 鎖切断が起こり、染色体異常が誘発する。B ミスマッチ修復が無い場合、Polk が無く誤った dNTP が酸化 DNA 損傷の向かい側に挿入されても、ミスマッチ修復機構がないため DNA 鎖切断は起こらず、DNA 複製が継続される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

- Hakura, H. Sui, J. Sonoda, T. Matsuda and T. Nohmi, DNA polymerase kappa counteracts inflammation-induced mutagenesis in multiple organs of mice, *Environ. Mol. Mutagen.* 60, 320-330 (2019) <https://doi.org/10.1002/em.22272>
- T. Nohmi, Thresholds of genotoxic and non-genotoxic carcinogens, *Toxicol. Res.*, 34, 281-290 (2018) <https://doi.org/10.5487/TR.2018.34.4.281>
- T. Suzuki, K. Matsumoto, M. Honma and T. Nohmi, Impact of DNA polymerase mutations on genotoxic thresholds of oxidative mutagens, *Mutat. Res.* 828, 10-14 (2018) <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.02.001>
- K. Masumura, N. Toyoda-Hokaiwado, N. Niimi, P. Grúz, N. A. Wada, A. Takeiri, K. Jishage, M. Mishima and T. Nohmi, Limited ability of DNA polymerase kappa to suppress benzo[a]pyrene-induced genotoxicity in vivo, *Environ. Mol. Mutagen.*, 58, 644-653 (2017) <https://doi.org/10.1002/em.22146>
- Y. Kanemaru, T. Suzuki, A. Sassa, K. Matsumoto, N. Adachi, M. Honma, S. Numazawa and T. Nohmi, DNA polymerase kappa protects human cells against MMC-induced genotoxicity through error-free translesion DNA synthesis, *Genes and Environment*, 39, 6 (2017) <https://doi.org/10.1186/s41021-016-0067-3>
- T. Nohmi, K. Masumura and N. Toyoda-Hokaiwado, Transgenic rat models for mutagenesis and carcinogenesis, *Genes and Environ.*, 39, 11 (2017) <https://doi.org/10.1186/s41021-016-0072-6>
- T. Nohmi and T. Suzuki, Possible mechanisms underlying genotoxic thresholds: DNA repair and translesion DNA synthesis, in *Thresholds of Genotoxic Carcinogens: from mechanisms to regulation*, Eds T. Nohmi and S. Fukushima, Elsevier, p49-63, 2016. <https://www.sciencedirect.com/book/9780128016633/thresholds-of-genotoxic-carcinogens>
- T. Suzuki, P. Grúz, M. Honma, N. Adachi and T. Nohmi, The role of DNA polymerase zeta in translesion synthesis across bulky DNA adducts and cross-links in human cells, *Mutat. Res.*, 791-792, 35-41 (2016) <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2016.08.004>
- T. Suzuki, P. Grúz, M. Honma, N. Adachi and T. Nohmi, Sensitivity of human cells expressing low-fidelity or weak-catalytic-activity variants of DNA polymerase to genotoxic stresses, *DNA Repair*, 45, 34-43 (2016) <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.06.002>
- Y. Kanemaru, T. Suzuki, N. Niimi, P. Gruz, K. Matsumoto, N. Adachi, M. Honma and T. Nohmi, Catalytic and non-catalytic roles of DNA polymerase kappa in protection of human cells against genotoxic stresses, *Environ. Mol. Mutagen.*, 56, 650-662 (2015) <https://doi.org/10.1002/em.21961>

〔学会発表〕(計 9 件)

能美健彦、*gpt delta* ラット：突然変異、発がん研究のためのトランスジェニックラット、第 12 回ラットリソースリサーチ研究会 2019 年

T. Nohmi, Introduction: Experimental approaches to investigate the constituents of genotoxic and carcinogenic thresholds, The 12th International Conference and 5th Asian Congress on Environmental Mutagens, 2017

T. Nohmi, Risk assessment of genotoxic and non-genotoxic carcinogens, The 12th International Conference and 5th Asian Congress on Environmental Mutagens, 2017

能美健彦、遺伝毒性物質とは何か？：DNA と反応する遺伝毒性物質、DNA と反応しない遺伝毒性物質、第 44 回日本毒性学会学術年会、2017 年

T. Nohmi, Knock-in and knockout strategies to analyze in vivo protective roles of specialized DNA polymerases, 6th US-Japan DNA repair meeting, 2017

T. Nohmi, Translesion DNA synthesis: its implication in toxicology, the 2016 KSOT/KEMS Spring International Symposium, 2016

T. Suzuki, P. Grúz, M. Honma, N. Adachi and T. Nohmi(発表者), Protective Roles of DNA Polymerase zeta in Human Cells Against Environmental Genotoxins, Environmental Mutagenesis and Genomics Society, the 46th Annual Meeting, 2015

Y. Kanemaru, T. Suzuki, N. Niimi, P. Grúz, K. Matsumoto, N. Adachi, M. Honma and T. Nohmi(発表者), Catalytic and structural roles of DNA polymerase in genome integrity of human cells, Zing Conferences: Genomic Integrity, 2015

A. Takeiri, N.A. Wada, S. Motoyama, K. Matsuzaki, H. Tateishi, K. Matsumoto, N. Niimi, A. Sassa, P. Grúz, K. Masumura, M. Yamada, M. Mishima, K. Jishage and T. Nohmi(発表者), Sensitivity of inactivated DNA polymerase kappa knock-in mice to mitomycin C, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOXC 2015), 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：須井 哉

ローマ字氏名：Sui Hajime

所属研究機関名：一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所

部局名：安全性事業部 安全性評価室

職名：グループリーダー

研究者番号(8桁)：50426433

(2)研究協力者

研究協力者氏名：なし