

## 研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	酸化ストレスを誘導する遺伝毒性物質の低用量における量反応関係の解析 (課題番号：1201) (研究期間：平成24年度～平成25年度)
主任研究者名	研究者名：青木 康展 所属機関：独立行政法人国立環境研究所

生体内での活性酸素種 (Reactive oxygen species, ROS) の産生は、電離放射線や様々な化学物質の曝露により増強される。ROS は DNA やその前駆体のヌクレオチドを攻撃し、その結果、DNA 上に様々な酸化的塩基の生成を誘導する。これらの修飾塩基の中でも、8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG) は高い変異誘導能を持つ DNA 損傷である。8-oxoG 生成を原因とする変異原性や発がん性を防御する機構には、代謝活性化 (酸化) の抑制、損傷乗り越え (translesional) DNA 合成や DNA の修復が含まれていることが知られている。

MUTYH は 8-oxoG の反対側に取り込まれたアデニンを除去して DNA を修復する DNA グリコシダーゼであり、哺乳類細胞で G:C to T:A 変異の誘導を防いでいる。Mutyh 遺伝子欠損マウスに典型的な酸化ストレス誘導剤である臭素酸カリウム (KBrO<sub>3</sub>) を 2 g/L の用量で 16 週間飲水投与すると野生型マウスに比べて小腸腫瘍誘発が劇的に増加していたが、より低用量 (0.5 g/L) では小腸腫瘍誘発の頻度が殆ど観察されなかった。生体内では、ある用量より低い用量の酸化的ストレス誘導剤的作用により生成された DNA 損傷を正確に修復することが可能であり、そのため腫瘍が誘発され難くなり実質的な発がんの閾値が形成されることが示唆された。

Nrf2 は第 II 相薬物代謝酵素や抗酸化タンパク質の発現に必須な転写因子であり、その遺伝子欠損マウスの臓器では ROS 産生の亢進が観察されている。KBrO<sub>3</sub> を飲水投与し、野生型 gpt delta マウスと Nrf2 欠損 gpt delta マウスの小腸で示す変異原性を評価した。両者のマウスとも、0.6 g/L の用量で突然変異体頻度 (mutant frequency) は有意に増加し、0.2 g/L が KBrO<sub>3</sub> による突然変異誘導の実質的閾値と考えられた。野生型 gpt delta マウスでは、用量に依存した 8-oxoG 産生増加に並行して G:C to A:T 変異頻度の上昇が観察され、酸化的ストレスのレベルが閾値の決定要因である可能性が示された。

DNA ポリメラーゼ ζ (ゼータ) は損傷乗り越え DNA 合成で重要な役割を果たしている。野生型よりも DNA ポリメラーゼ ζ の活性が低いヒト細胞 D2781N 細胞では、KBrO<sub>3</sub> と他の ROS 産生剤である Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> の曝露による TK (Thymidine kinase) 遺伝子変異誘導と小核形成の感受性が高くなり、一方、DNA 複製の忠実度が減弱している細胞 M2618M では SCE (姉妹染色分体交換) の感受性が高くなっていた。DNA ポリメラーゼ ζ は酸化的ストレスによる遺伝毒性の閾値形成に重要な役割を果たしていると考えられた。

以上の研究より、ROS の産生などの酸化的ストレスによる腫瘍誘発/突然変異誘導の実質的閾値形成には、損傷乗り越え DNA 合成や DNA の修復が関与していることが示唆された。

## 研究成果報告書（本体）

研究課題名	酸化ストレスを誘導する遺伝毒性物質の低用量における量反応関係の解析 (研究期間：平成24年度～平成25年度)
主任研究者名	所属：独立行政法人国立環境研究所 氏名：青木 康展（研究課題番号：1201）

### I 研究の期間及び研究目標等

#### 1 研究期間

平成24年度から平成25年度まで

#### 2 研究目的

臭素酸カリウム等の酸化ストレスを誘導する化学物質をモデル化合物として用い、弱い遺伝毒性発がん物質の低用量での「用量-発がん率」の量反応関係、および「用量と標的臓器で発生する突然変異」の量反応関係から実質的閾値あるいは事実上の閾値の有無を解析する。さらに、酸化DNA損傷の代表である8-oxoGの生成や除去・修復に関与する遺伝子のノックアウト（遺伝子欠損）マウスやヒト培養細胞を用い、閾値の形成機序の解明を目指す。

DNAと直接反応する遺伝毒性発がん物質については、多くの場合、閾値が存在しないとしてリスク評価が実施されている。一方、間接的にDNAを修飾し弱い遺伝毒性を示す発がん物質については、実質的に閾値が存在するような量反応関係を示すことがあり、閾値「なし」と「あり」の二択の手法で評価値を算出して、より低い値を採用することが行われている。しかし、このような場合、閾値「なし」の手法を用いて算出した評価値の方が低く算出されることが多く、過剰に安全側にリスクを評価してしまう可能性がある。弱い遺伝毒性発がん物質の閾値の「あり」「なし」を判別して、リスクを的確に評価できるようにするためには、低用量曝露での量反応関係を詳細に検討するとともに、投与した物質に対する感受性を増大あるいは低下させた状態で、量反応関係に変化をもたらす生体側の要因を解明し、閾値の形成機序を明らかにしていく必要がある。

間接的にDNAを修飾し弱い遺伝毒性を示す発がん物質の典型が、体内で酸化ストレスを誘導する遺伝毒性物質である。これらの物質が標的臓器に取り込まれると、活性酸素種を発生してDNAを修飾し、8-オキソグアニン（8-oxoG）などの酸化DNA損傷が生成される。この酸化DNA損傷は突然変異誘発の原因となり、さらに発がんに関与すると考えられている。本研究では、酸化ストレスを誘導する遺伝毒性発がん物質の低用量での「用量-発がん率」の量反応関係の解析、およびトランスジェニックマウスによる*in vivo*試験系を用いて、発がんと密接に関連する「標的臓器で発生する突然変異」や「DNA付加体生成量」等についての量反応関係を解析して実質的閾値の有無を明らかにする。具体的には、8-oxoGを生成する臭素酸カリウムをモデル化合物として実質的閾値の有無を検証し、さらに、8-oxoGの生成や除去・修復に関与する遺伝子のノックアウト・マウスやヒト培養

細胞を用い、これら遺伝子の欠損により臭素酸カリウムに対する感受性が上昇し、結果として実質的閾値が減少するか、または、閾値がなくなるのかを実験的に検証し、閾値の形成機序の解明を目指す。さらに、臭素酸カリウムで認められた発がんの実質的閾値の有無に関する現象が、重クロム酸など他の酸化ストレス誘導剤の投与によっても引き起こされるか否かを検討し、酸化ストレスを誘導する遺伝毒性物質の作用として一般化できるかを明らかにしていく。これらの研究により、酸化ストレスを誘導する遺伝毒性物質による発がんには、実質的閾値の形成や感受性上昇による閾値の減少がみられるか否かを明らかにすることで、酸化ストレスを誘導する化学物質一般の毒性学上の性質が明らかになり、リスク評価手法を開発する上に大きく貢献するものと期待される。

生体内には通常の代謝過程で生じる内在性の酸素ストレスに加え、環境中の放射線や遺伝毒性を示すある種の化学物質によっても活性酸素種が生じる。活性酸素種は DNA を酸化し、発がんや老化を引き起こす。このような酸化ストレスによる遺伝毒性の誘導に対して、生体は、(1)抗酸化酵素活性、(2)酸化 DNA 損傷修復系、(3)トランスレージョン DNA 合成、(4)アポトーシス（細胞死）活性などの因子により通常は無毒化を行なっている。しかし、これら生体防御に関わる因子の活性が減弱した時、あるいは（多重の）生体防御系に ~~よ~~よる無毒化の範囲を超えるストレスが負荷された時には、8-oxoG 生成量は増加し、結果として閾値は減少・消失する場合もあると予測される。そこで本研究では、8-oxoG 生成量を規定あるいはその影響を減弱する代表的な因子（Nrf2, Mutyh, DNA ポリメラーゼ  $\zeta$  (Pol zeta)）の機能欠損条件下で、低用量での想定される発がん性や突然変異発生の感受性を増大させて実質的閾値形成とその機序を解析する。具体的には、Nrf2 ノックアウトマウスや Mutyh ノックアウトマウスで臭素酸カリウム等の酸化ストレス誘導剤の投与により高頻度に誘発される消化管の腫瘍が、どのくらいの低用量域まで検出され、野生型マウスに比べて腫瘍発生の実質的閾値がどの程度低下するかを明らかにする。さらに、ノックアウトマウスから作出した *in vivo* 試験系を用いて、実質的閾値あるいはそれ以下の用量で誘発された突然変異のスペクトラム等を詳細に解析する。また、ラットの場合と異なり、マウスで腎臓腫瘍の発生を示す知見は少ないが、本研究では、腎臓の突然変異頻度の解析と病理学的変化の観察を実施し、標的臓器としてマウスの腎臓を用いて閾値の有無を解析できるかどうかを検討する。また、DNA ポリメラーゼ  $\zeta$  遺伝子の機能変異細胞を用いて、酸化ストレスを誘導する化学物質に対して感受性がどの程度増大するか明らかにする。これらの研究を通して、遺伝毒性発がん物質の閾値の形成機序を明らかにすることにより、それぞれの化学物質の主な作用機序に基づく閾値の有無の判定が可能になり、算出される評価値の確実性が高まることも期待される。

3 研究体制 (※研究項目ごと個別課題ごとに研究担当者及び所属機関名を記入すること。)

研究項目名	個別課題名	研究担当者名 (所属機関名)
1) <i>Nrf2</i> ノックアウトマウスを用いた酸化ストレス誘導剤への感受性と低用量での量反応関係の解析	<p>①低用量域の臭素酸カリウム飲水投与による <i>Nrf2</i> 遺伝子欠損マウス (ノックアウトマウス) での発がん解析 (略称: 発がん解析)</p> <p>②臭素酸カリウムの低用量投与による <i>Nrf2</i> 遺伝子欠損マウスでの突然変異解析 (略称: 突然変異解析)</p> <p>③重クロム酸等の酸化ストレス誘導剤による腫瘍発生/突然変異誘導の検討 (略称: 酸化ストレス誘導剤の検討)</p>	青木康展 (国立環境研究所)
2) <i>Mutyh</i> ノックアウトマウスを用いた低用量での量反応関係の解析	<p>①低用量域の臭素酸カリウム飲水投与による <i>Mutyh</i> 遺伝子欠損マウスでの発がん解析 (略称: 発がん解析)</p> <p>②臭素酸カリウム飲水投与による <i>Mutyh</i> 遺伝子欠損マウスでの突然変異解析 (略称: 突然変異解析)</p>	續 輝久 (九州大学)
3) <i>Pol zeta</i> 機能変異細胞を用いた化学物質への感受性の解析	<p>①DNA ポリメラーゼを遺伝的に改変したヒト細胞を用いた酸化ストレス誘導剤誘発突然変異に関する閾値研究 (略称: 突然変異解析)</p> <p>②DNA ポリメラーゼを遺伝的に改変したヒト細胞を用いた酸化ストレス誘導剤誘発染色体異常に関する閾値研究 (略称: 染色体異常解析)</p>	能美健彦 (国立医薬品食品衛生研究所)

4 倫理面への配慮について

下記により実験実施の承認を受けている。

青木康展

遺伝子組換え実験「異物代謝系および DNA 修復系欠損マウスを用いた環境化学物質に対する感受性機構の解明」（平成 24 年 4 月～平成 27 年 3 月）

動物実験： 投与実験毎に、機関内で動物実験に関する倫理審査を受ける。

續 輝久

遺伝子組換え実験「DNA 傷害の防止並びに修復に関する分子制御機構の解明」（含む：動物使用実験）（平成 21 年 9 月～平成 26 年 8 月）

動物実験「突然変異と発がんの抑制に関する分子遺伝学的研究」（平成 24 年 4 月～平成 26 年 3 月）

## II 研究内容及び成果等

### 1 研究内容及び方法

(1) 研究項目名：Nrf2 ノックアウトマウスを用いた酸化ストレス誘導剤への感受性と低用量での量反応関係の解析

(研究担当者名：青木康展 (所属機関名：国立環境研究所) )

1) 個別課題名：低用量域の臭素酸カリウム飲水投与による Nrf2 遺伝子欠損マウスでの発がん解析 (略称：発がん解析)

臭素酸カリウムはマウス小腸に 8-oxoG を生成し、腫瘍を誘導する化学物質であり、弱い遺伝毒性物質による閾値形成の有無を明らかにするモデル化学物質として優れた特性をもつ。主任研究者の先行研究により、Nrf2 ノックアウトマウス (Nrf2-KO マウス) は臭素酸カリウムによる標準的な用量 (2 g/L) の飲水投与では死亡する個体が発生し、抗酸化酵素活性抑制条件下では臭素酸カリウムへの感受性が高くなっていることが既に明らかになっている。そこで、0.6 g/L より低い用量で臭素酸カリウムを Nrf2-KO マウスおよび C57BL マウス (野生型マウス) に投与し、小腸の腫瘍発生について実質的閾値の有無を明らかにした。また、ラットの場合とことなり臭素酸カリウム投与によるマウスの腎臓での腫瘍発生を示す知見は少ないが、本研究では、前がん病変等の病理学的変化の観察を行い、腎臓を標的臓器として実質的閾値の有無の分析が可能か否かを検討した。

2) 個別課題名：臭素酸カリウムの低用量投与による Nrf2 遺伝子欠損マウスでの突然変異解析 (略称：突然変異解析)

Nrf2-KO マウスと *gpt delta* マウスを交配して Nrf2-KO *gpt delta* マウスを作出した。この Nrf2-KO *gpt delta* マウスおよび *gpt delta* マウス (野生型マウス) に臭素酸カリウムを投与し、小腸での突然変異発生について実質的閾値の有無を明らかにし、発生した突然変異 (塩基置換) の性質を解析した。

小腸上皮からゲノム DNA を高分子量の状態で採取した。ゲノム DNA 上のシャトルベクター  $\lambda$  EG10 をファージ粒子として回収し、大腸菌 YG6020 に感染させ、6-チオグアニンとクロラムフェニコールを含む培地上に播種し、耐性となったコロニー (*gpt* 変異体コロニー) を検出する。*gpt* 変異体コロニー数を回収したレポーター遺伝子の総数 (タイター) で除し、小腸と腎臓での突然変異体頻度 (Mutant frequency : *gpt* 遺伝子変異体数/タイター) と突然変異体頻度 (Mutation frequency : *gpt* 遺伝子変異数 (独立した変異体数) / タイター) を算出した。

また、変異体 *gpt* 遺伝子は PCR で増幅した後、DNA 配列を決定し、発生した突然変異の性質 (塩基置換、欠失など; 突然変異スペクトル) を解析した。特に、8-oxoG 生成に特徴的な、G:C→T:A 変異と自然発生頻度が最も高い G:C→A:T 変異については、動物 1 個体あたり 15 コロニー以上の突然変異体を単離して、これらの突然変異体の発生頻度 (Mutant Frequency) の用量依存性を解析した。

これと並行して、酸化ストレス誘導のマーカーである 8-oxodG の生成量を高速液体クロマトグラフ・電気化学検出器により定量し、また、増殖細胞のマーカーである PCNA の小腸組織における発現の分布を免疫染色法により調べた。これらにより、抗酸化酵素活性抑制状態での感受性上昇の程度を明らかにし、閾値形成の機構を検討した。

3) 個別課題名：重クロム酸等の酸化ストレス誘導剤による腫瘍発生/突然変異誘導の検討  
(略称：酸化ストレス誘導剤の検討)

重クロム酸カリウムなど他の酸化ストレス誘導剤を用いて、臭素酸カリウムと同様に、発がんおよび標的臓器での突然変異発生について実質的閾値が存在するか否かを明らかにする。上記個別課題2)の突然変異の解析を行い、酸化ストレスの誘導による突然変異発生の実質的閾値の有無を確認する。

(2) 研究項目名：Mutyh ノックアウトマウスを用いた低用量での量反応関係の解析  
(九州大学大学院医学研究院、續 輝久)

1) 個別課題名：低用量域の臭素酸カリウム飲水投与による Mutyh 遺伝子欠損マウスでの発がん解析 (略称：発がん解析)

予備的な実験で消化管腫瘍の発生を認めていない0.05%を含め、0.1%、0.15%の臭素酸カリウム飲水投与に関して、それぞれの用量について十分な匹数のマウス個体(♂、♀それぞれ10匹を予定)を確保し、Mutyh 遺伝子欠損マウスにおける酸化ストレス誘発発がんを、野生型マウスと比較しつつ解析することを進めた。安楽死させたマウスから摘出した腸管を10%ホルマリンで固定して病理標本作製した後、固定液を70%エタノールに置換え、腸粘膜を実体顕微鏡下で観察することで、腫瘍の形成を確認している。検出した腫瘍から病理切片を作製し、病理解析を行った。

2) 個別課題名：臭素酸カリウム飲水投与による Mutyh 遺伝子欠損マウスでの突然変異解析 (略称：突然変異解析)

臭素酸カリウムを Mutyh 遺伝子欠損マウス並びに対照群の野生型マウス(+/+)に投与し、ホモ欠損マウス(-/-)個体における発がんの実質的閾値あるいはそれ以下の用量で誘発された突然変異の頻度・スペクトラムを、トランスジーンである rpsL 遺伝子を標的として解析した。臭素酸カリウムを4週間投与したマウスを安楽死させた後に小腸を摘出し、十二指腸を含む小腸上部1/3の領域を用いてゲノムDNAを抽出し、突然変異解析に用いた。

(3) 研究項目名：Pol zeta 機能変異細胞を用いた化学物質への感受性の解析  
(国立医薬品食品衛生研究所、能美健彦)

1) 個別課題名：DNA ポリメラーゼζを遺伝的に改変したヒト細胞を用いた酸化ストレス誘導剤誘発突然変異に関する閾値研究 (略称：突然変異解析)

DNA ポリメラーゼζは、DNA 損傷の乗り越え(トランスレージョンDNA合成)の際に重要な役割を果たすことが示唆されており、その遺伝的改変は、低用量域における細胞毒性および突然変異誘発に関する感受性に大きな影響を与えるものと予想される。そこでDNA ポリメラーゼζ遺伝子(REV3)を欠損させたヒト細胞株(Pol ζ KO)を Nalm-6 MSH+株を基に樹立し、その遺伝毒性物質に対する感受性を、細胞毒性を指標に

して検討した。また、DNA ポリメラーゼの DNA ポリメラーゼ活性を低下させた株 (D2781N)、DNA ポリメラーゼの忠実度を低下させた株 (L2618M) を作製し、その臭素酸カリウム ( $\text{KBrO}_3$ )、重クロム酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) に対する感受性を、遺伝子突然変異誘発を指標に検討した。

供試細胞は、 $37^\circ\text{C}$ 、5%二酸化炭素濃度を維持する炭酸ガス恒温培養装置中で組織培養用フラスコまたは組織培養用直径 60 mm プレートを用いて無菌的に培養した。増殖用培地は RPMI 1640 液体培地 (L-グルタミン不含) を用いた。ウシ血清は非働化したものを使用した。RPMI 1640 液体培地は使用する直前にウシ血清、抗生物質、その他の添加物 (L-グルタミン、2-メルカプトエタノール) を加えて完全培地とした。

DNA ポリメラーゼの遺伝毒性発がん物質に対する基本的な性質を明らかにするため、KO 細胞の benzo[a]pyrene diolepoxide (BPDE)、mitomycin C (MMC)、臭素酸カリウム、*N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) に対する致死感受性を野生型細胞と比較した。各細胞の化学物質に対する致死感受性は、テトラゾリウム塩の還元により生ずる水溶性ホルマザン色素の生成を指標にして測定した (MTS 試験)。

*TK*(thymidine kinase) 遺伝子を指標にした突然変異測定法は、*HPRT* 遺伝子突然変異よりも、大きな欠失 (LOH など) を検出できる点で有利である。*TK* 遺伝子突然変異頻度は、trifluorothymidine (TFT) に対する抵抗性を指標に、96 ウェルプレートを用い、 $\text{KBrO}_3$  あるいは  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  で 4 時間処理後、細胞増殖 (コロニー形成) が観察されなかったウェル数を計測し、ポアソン分布に基づいて計算した。

## 2) 個別課題名: DNA ポリメラーゼを遺伝的に改変したヒト細胞を用いた酸化ストレス誘導剤誘発染色体異常に関する閾値研究 (略称: 染色体異常解析)

*in vitro* 小核の解析: OECD テストガイドライン TG487 に従い実施した。すなわち、各細胞 (野生型、D2781N、L2618M) をプレートに播種し、翌日、臭素酸カリウムあるいは重クロム酸ナトリウムで 4 時間処理後、洗浄し、サイトカラシン B 存在下で 24 時間培養後、アクリジンオレンジで主核および小核を染色した。二核の細胞 1000 個あたり小核を有する細胞の頻度を記録した。

姉妹染色分体交換 (SCE) の解析: 各細胞を  $1 \times 10^5$  個/mL の濃度で 60 mm プレート (培地量 5 mL) 2 枚に播種した。翌日、臭素酸カリウムあるいは重クロム酸ナトリウムで 4 時間処理後、洗浄し、ブロモデオキシウリジン (BrdU) 原液を各プレートに 25  $\mu\text{L}$  ずつ添加し (最終培地濃度 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、40~50 時間培養した。培養終了後、染色体標本を作製し、4Na-EDTA ギムザ染色により姉妹染色分体分染を行った。各プレートあたり 25 個、各細胞株あたり 50 個の中期分裂細胞について顕微鏡下 1000 倍で SCE の頻度を記録した。

## 2 研究成果、考察、今後の課題

(1) 研究項目名：Nrf2 ノックアウトマウスを用いた酸化ストレス誘導剤への感受性と低用量での量反応関係の解析

(研究担当者名：青木康展 (所属機関名：国立環境研究所))

1) 個別課題名：低用量域の臭素酸カリウム飲水投与による Nrf2 遺伝子欠損マウスでの発がん解析 (発がん解析)

後述の個別課題 2) で実施した Nrf2-KO *gpt delta* マウスへの 90 日間 0.6 g/L 臭素酸カリウム投与実験 (予備試験) の試料採取に合わせ、小腸 (全長の上部 6 分の 1 の部位を 1.5 cm ほどを採取) と腎臓 (右を採取) をホルマリン固定した。肉眼で見る限り、臭素酸カリウムの投与による小腸内面での腫瘍発生は認められなかった。

そこで、より長期の 6 か月間、および 12 か月間の臭素酸カリウム投与 (Nrf2-KO マウスと野生型マウスについて、0.6 g/L 投与群と対照群を設定; 各群 3 匹) を実施した。しかし、実体顕微鏡下で観察したが、小腸全体で Nrf2-KO マウス、野生型マウス共に腫瘍発生は観察されなかった。従って、小腸における突然変異解析に重点をおき、研究を進めることとした。

また、臭素酸カリウムを投与した Nrf2-KO マウス腎臓の HE 染色像では、尿細管の拡張 (dilatation) と再生 (regeneration) が認められた (図 1-1) が、Nrf2-KO マウスで感受性な感受性は認められなかった。

図 1-1 臭素酸カリウム投与による腎臓の病理学的変化

Organ and findings	Sex ----- Male	Group no. -----			
		1	2	3	4
	Genotype -----	(-/-)	(-/-)	(+/+)	(+/+)
	Level (g/L) -----	0	0.6	0	0.6
	No. of animals/group	7	9	6	6
Kidney					
Normal		5	3	5	6
Cellular infiltration, lymphocyte/(2) <sup>a</sup>		1	0	0	0
Dilatation, pelvis/(3) <sup>a</sup>		1	2	0	0
Karyomegaly/(1) <sup>a</sup>		0	2	0	0
Tubule dilatation/(1) <sup>a</sup>		1	6	1	0
Tubule regeneration/(1) <sup>a</sup>		0	1	0	0
Tubule regeneration/(2) <sup>a</sup>		0	1	0	0

a : Numbers in parenthesis indicate the grades of lesion : (1) Minimal (2) Slight (3) Moderate (4) Marked (5) Severe

2) 個別課題名：臭素酸カリウムの低用量投与による Nrf2 遺伝子欠損マウスでの突然変異解析 (突然変異解析)

0.6 g/L 臭素酸カリウムの 28 日間投与実験の結果、突然変異頻度の上昇は認められなかったため、90 日間投与実験を行うこととした。

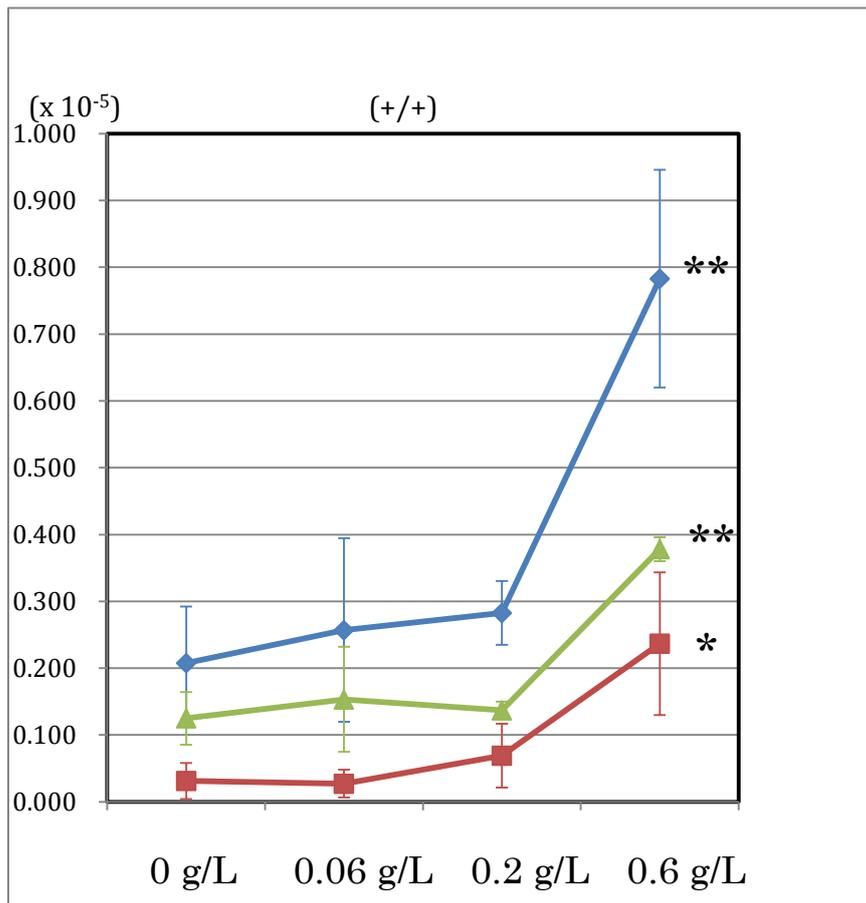
予備試験として、1 用量 (0.6 g/L) の投与実験を行った結果、Nrf2-KO マウスおよび野生型マウスにおいて、非投与対照動物に比べて突然変異頻度が有意に上昇したが、Nrf2-KO マウスと野生型マウスの間で突然変異頻度に有意差は認められなかった。そこで、0.6 g/L より低い用量で Nrf2-KO マウスおよび野生型マウスに臭素酸カリウムを投与し、

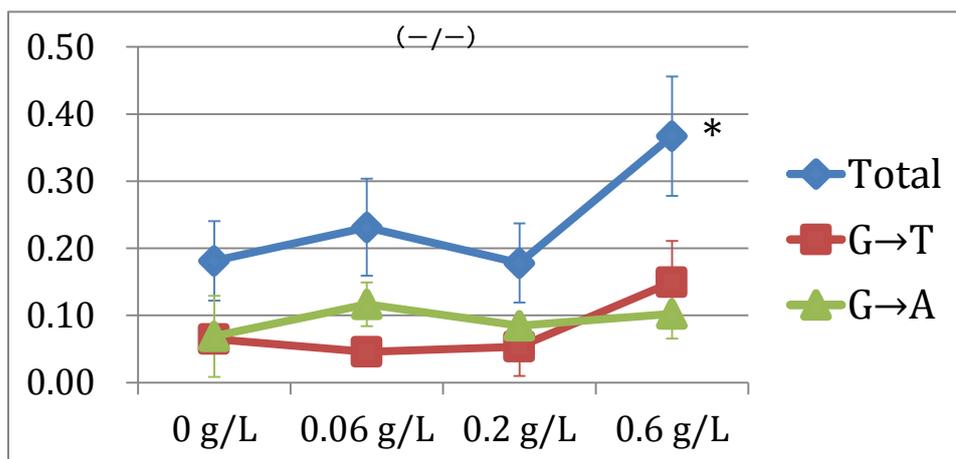
*Nrf2*-KO マウスで臭素酸カリウムに対する感受性が上昇している可能性を調べることとした。

*Nrf2*-KOマウスと野生型マウスに 0.6, 0.2, 0.06 g/Lの用量（1群3匹）で90日間飲水投与した後、小腸上皮における突然変異の誘導を解析した。特に本研究では、1個体のタイターを通常の10倍超の5,000,000以上とし、個体ごとの突然変異スペクトルの解析を可能にした。

野生型マウスでは、0.6 g/L臭素酸カリウム投与により、突然変異体頻度は有意に上昇し、突然変異誘導の実質的閾値は0.2 g/Lであった（図1-2、+/+）。一方、*Nrf2*-KOマウスでも（図1-2、-/-）、野生型と同様に0.6 g/L臭素酸カリウム投与により突然変異体頻度の有意な上昇が認められたが、野生型に比べて全体として突然変異体頻度は低いレベルであった。

図1-2 臭素酸カリウム投与による小腸における突然変異の誘導





突然変異スペクトル解析の結果 (図 1-3)、野生型マウス (+/+) では、臭素酸カリウム投与により G:C→A:T 変異の発生割合は上昇しなかったが、G:C→T:A 変異は臭素酸カリウムの用量を増すに従い上昇した。一方、*Nrf2*-KO マウス (-/-) の非投与群では、G:C→T:A 変異の発生割合は野生型に比べて約 2 倍高くなっていたが、臭素酸カリウムを投与しても顕著な上昇は見られなかった。G:C→A:T 変異の発生割合も 0.6 g/L 臭素酸カリウムを投与しても増加しなかった。この G:C→T:A 変異の発生割合が野生型マウスで上昇し、*Nrf2*-KO マウスでは上昇しない現象は、予備試験でも観察された。

図 1-3 臭素酸カリウム投与による突然変異スペクトルの変化

(+/+)	G→A		A→G		G→T		G→C		A→T		A→C		Ins.		Del.		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
0 g/L	36	61	3	5	8	14	1	2	0	0	3	5	0	0	8	14	59	100
0.06	29	59	3	6	5	10	2	4	1	2	3	6	1	2	5	10	49	100
0.2	24	48	3	6	12	24	0	0	2	4	8	16	0	0	1	2	50	100
0.6	35	49	1	1	20	28	2	3	5	7	1	1	0	0	7	10	71	100

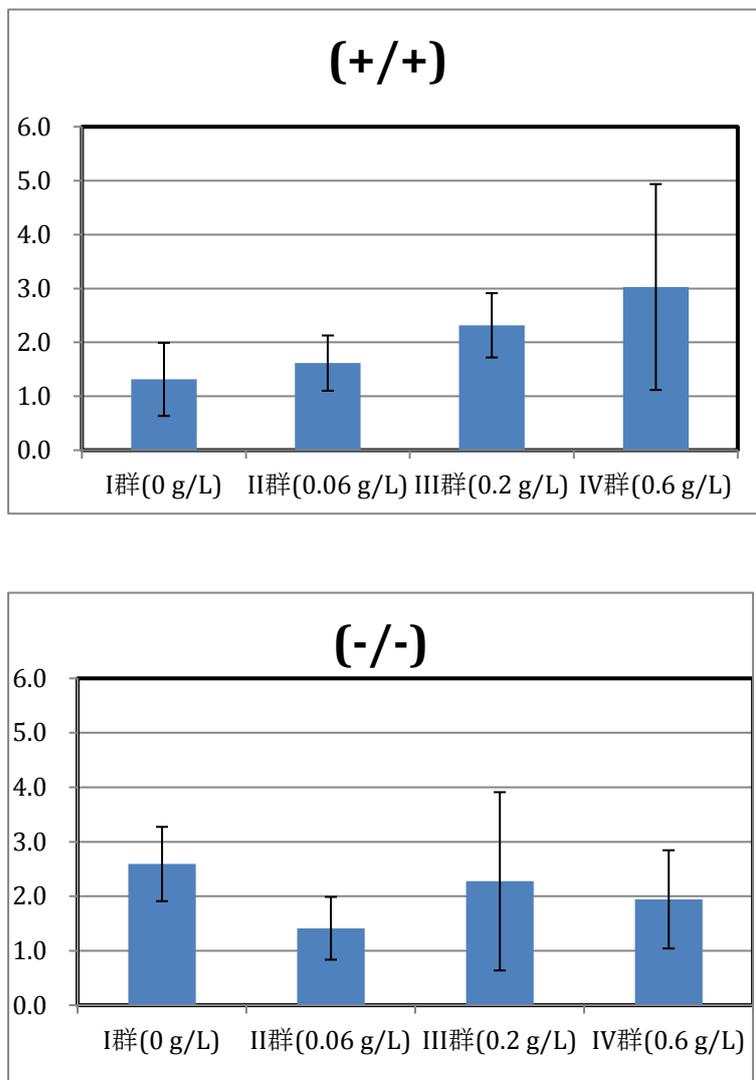
(-/-)	G→A		A→G		G→T		G→C		A→T		A→C		Ins.		Del.		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
0 g/L	26	37	3	4	24	34	2	3	5	7	4	6	1	1	5	7	70	100
0.06	26	54	1	2	9	19	3	6	3	6	2	4	0	0	4	8	48	100
0.2	31	50	2	3	17	27	1	2	2	3	4	6	1	2	4	6	62	100
0.6	36	33	8	7	47	43	3	3	10	9	6	5	3	2	6	5	110	100

G:C→T:A 変異と G:C→A:T 変異の突然変異体頻度の用量依存性 (図 1-2) をみると、野生型マウスでは、G:C→T:A 変異および G:C→A:T 変異ともに、0.6 g/L の用量で突然変異体頻度が有意に上昇した。0.6 g/L 臭素酸カリウム投与により酸化ストレスが充進して G:C→T:A 変異が誘導され、その結果、突然変異体頻度が上昇したことが示唆された。

一方 *Nrf2*-KO マウスでは、0.6 g/L の用量で G:C→T:A 変異、G:C→A:T 変異ともに突然変異体頻度の有意な上昇は認められなかった (図 1-2)。*Nrf2*-KO マウスにおける臭素酸カリウムによる突然変異体頻度の上昇は、野生型マウスとは違ったメカニズムで引き起こされている可能性がある。

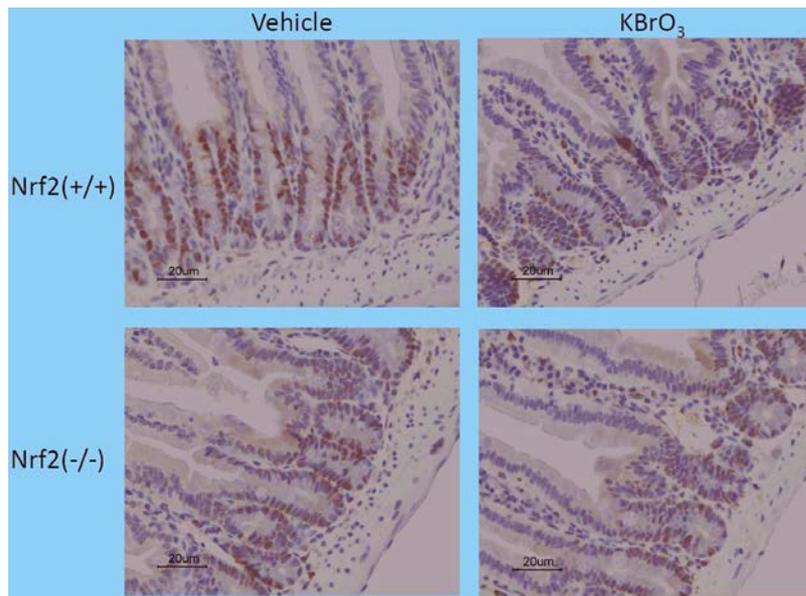
8-oxodG を定量した結果、野生型マウス (+/+) では有意差はないものの、臭素酸カリウムの用量に従い 8-oxodG 含量は上昇した (図 1-4)。この上昇は G:C→T:A 変異の発生割合の増加と並行関係にあり、活性酸素種の発生が体内での点突然変異発生上昇の原動力となっている可能性が明らかとなった。しかし、*Nrf2*-KO マウス (-/-) では、対照群での 8-oxodG 含量が野生型と比べて 2 倍ほど高かったものの、G:C→T:A 変異の発生と同様に、臭素酸カリウムを投与しても増加しなかった。これらの結果より、*Nrf2*-KO マウスでは、内在性の因子により酸化ストレスが亢進しているために、対照群で G:C→T:A 変異の頻度が上昇しており、さらに、臭素酸カリウムの作用により活性酸素種が生成しても、G:C→T:A 変異の上昇をもたらさないと考えられた。

図 1-4 臭素酸カリウム投与による小腸上皮における 8-oxodG の生成量  
(縦軸 : 8-oxodG/dG x 10<sup>6</sup>)



PCNA の免疫染色により、対照群 (Vehicle) 野生型マウス (+/+) 小腸の絨毛基底部の上皮細胞に強い染色が認められたが、*Nrf2*-KO マウス (-/-) では陽性細胞数が低下していた。この結果から、対照群 *Nrf2*-KO マウスでは細胞増殖活性が低下しており、そのため、突然変異が低下していることが示唆された。また、臭素酸カリウム投与 (0.6 g/L 90 日間) により、PCNA 陽性の細胞数は、野生型、*Nrf2*-KO とともに減少していた。

図 1-5 小腸の PCNA 免疫染色



3) 個別課題名：重クロム酸等の酸化ストレス誘導剤による腫瘍発生/突然変異誘導の検討 (略称：酸化ストレス誘導剤の検討)

2 年間の投与によりマウス小腸に腫瘍が発生する用量である 85.7 mg/L 重クロム酸ナトリウムを 28 日間飲水投与したが、突然変異体頻度は  $0.958 \pm 0.658 \times 10^{-5}$  (対照群  $0.576 \pm 0.307 \times 10^{-5}$ ) と有意な増加は認められなかった。そこで、投与期間を 90 日間に延長したが、 $0.766 \pm 0.277 \times 10^{-5}$  (対照群  $0.799 \pm 0.273 \times 10^{-5}$ ) であり有意に増加しなかった。重クロム酸は酸化ストレス誘導する化学物質であることが知られているが、実験した条件下で、点突然変異頻度の増加は認められなかった。また、重クロム酸ナトリウムの投与によっても 8-oxodG の生成の増加は認められなかった。

結論

- *Nrf2* 野生型マウスでは、8-oxodG の生成により誘導される G:C→T:A 変異が有意に増加し、これが *in vivo* 突然変異の LOAEL である 0.6 g/L での突然変異体頻度の増加を促進することが示された。活性酸素種の産生は *in vivo* 突然変異を上昇する原動力になっていることが示された。活性酸素種の産生が *in vivo* 突然変異の閾値形成の要因になっている可能性が考えられた。
- 体内で活性酸素種の産生が亢進していると考えられる *Nrf2*-KO マウスでは、0.6 g/L で突然変異体頻度が有意に増加したものの、野生型に比べて全体として突然変

異体頻度は低く、また、G:C→T:A 変異、G:C→A:T 変異ともに突然変異体頻度の有意な上昇は認められなかった。PCNA 陽性の小腸細胞数は、*Nrf2*-KO マウスでは野生型に比べて減少しており、*Nrf2*-KO マウスでの細胞増殖活性が低下しており、このことが突然変異体頻度の減少をもたらしている可能性が考えられた。

(2) 研究項目名：Mutyh ノックアウトマウスを用いた低用量での量反応関係の解析  
(九州大学大学院医学研究院、續 輝久)

1) 個別課題名：低用量域の臭素酸カリウム飲水投与による *Mutyh* 遺伝子欠損マウスでの発がん解析 (略称：発がん解析)

臭素酸カリウムの高用量として 0.15% について、*Mutyh* 遺伝子欠損マウス (-/-) の♂6 匹、♀14 匹を用いて飲水投与を行った。その結果、♂マウスでは個体当たり平均  $36.9 \pm 9.7$  個の腫瘍が発生しており、♀マウスでは個体当たり平均  $43.9 \pm 13.4$  個の腫瘍が発生していた。一方、対照群である野生型マウス (+/+) の♂12 匹、♀10 匹を用いた 0.15% の臭素酸カリウム飲水投与では、♂マウスでは個体当たり平均  $0.8 \pm 1.0$  個の腫瘍が発生しており、♀マウスでは個体当たり平均  $1.0 \pm 0.9$  個の腫瘍が発生していた。図 2-1 に、0.15% の臭素酸カリウムを飲水投与した *Mutyh* 遺伝子欠損マウスの小腸に発生した腫瘍の代表的な病理解析のマクロ像、拡大像を示している (HE 染色)。

図 2-1 *Mutyh* 遺伝子欠損マウスにおける臭素酸カリウム誘発消化管 (小腸) 腫瘍の解析—0.15% 投与

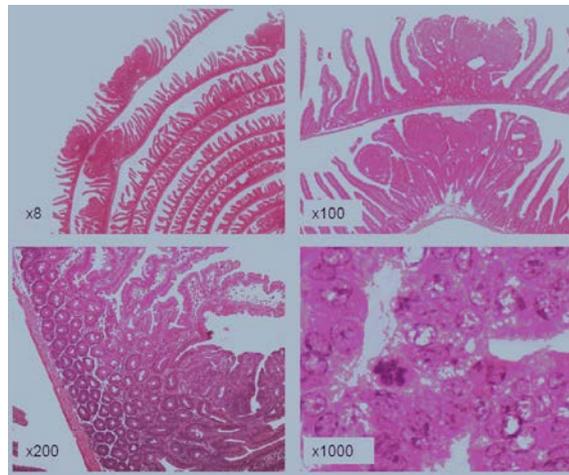


図 2-2 に、*Mutyh* 遺伝子欠損マウスの発がん感受性を解析する目的で、野生型 (+/+) 並びにホモ欠損 (-/-) マウスについて、0.05%、0.1%、0.15% の臭素酸カリウム投与した際に発生する腫瘍の数に関するデータを雌雄の合計としてまとめた。なお、0.05% の臭素酸カリウムの投与実験は、発がん感受性が高いホモ欠損 (-/-) マウスについてのみ実施している。0.2% に関しては、前に実施した実験結果を参考として含めた。

図 2-2 *Mut<sup>yh</sup>* 遺伝子欠損マウスにおける臭素酸カリウム (KBrO<sub>3</sub>) 誘発腫瘍の解析 (小腸)

genotype	KBrO <sub>3</sub> 0.05%		KBrO <sub>3</sub> 0.1%		KBrO <sub>3</sub> 0.15%		KBrO <sub>3</sub> 0.2%	
	number of tumor	number of sample	number of tumor	number of sample	number of tumor	number of sample	number of tumor	number of sample
-/-	0	9	8.8 ± 4.7	12	41.6 ± 12.7	20	61.8 ± 26.4	17
+/+			0.4 ± 0.6	14	0.9 ± 1.0	22	0.9 ± 0.6	17

図 2-3 に、野生型マウスに比べて臭素酸カリウム誘発消化管発がんの感受性が高い *Mut<sup>yh</sup>* 遺伝子欠損マウスについて、現時点での 0.05%、0.1%、0.15% の臭素酸カリウム誘発発がんのデータを含めてまとめて図示している。0.2% に関しては、以前実施した実験結果を参考として図示した。

図 2-3 *Mut<sup>yh</sup>* 遺伝子欠損マウスにおける臭素酸カリウム誘発腫瘍の解析 (小腸) - 低用量の検討

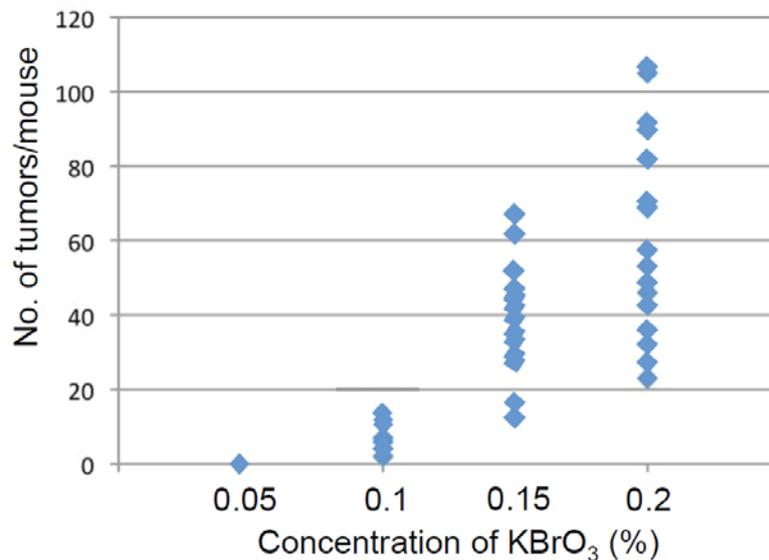


図 2-3 に示すように、高用量域 (0.2%、0.15%) から低用量域に向かって腫瘍発生に関して量反応関係 (逆相関) が確認されている。今回使用した低用量域 0.05% の臭素酸カリウム投与群では全く腫瘍の発生が認められていないことから、*Mut<sup>yh</sup>* 遺伝子欠損個体でも、酸化剤臭素酸カリウムの発がん性に関して、実質的な「閾値」が存在することを示唆していると考えられる。

2) 個別課題名：臭素酸カリウム飲水投与による *Mut<sup>yh</sup>* 遺伝子欠損マウスでの突然変異解析 (略称：突然変異解析)

臭素酸カリウムを *Mut*h 遺伝子欠損マウス並びに対照群の野生型マウス (+/+) に投与し、ホモ欠損マウス (-/-) 個体における発がんの実質的閾値あるいはそれ以下の用量で誘発された突然変異の頻度とスペクトラムを詳細に解析した。臭素酸カリウムを4週間投与したマウスを安楽死させた後に小腸を摘出し、十二指腸を含む小腸上部 1 / 3 の領域を用いてゲノム DNA を抽出し、突然変異解析に用いた。0.05%、0.1%の臭素酸カリウムを4週間投与した各遺伝子群について、各群2個体ずつの解析を行った。腫瘍が平均 8.8 個検出された 0.1%投与のホモ欠損マウス (-/-) では、0.1%投与の野生型マウス (+/+) と比較して、平均の突然変異頻度は約 1.5 倍に上昇していた。一方、腫瘍が検出されなかった 0.05%投与のホモ欠損マウス (-/-) では、0.05%投与の野生型マウス (+/+) と比較して、平均の突然変異頻度は 1.17 倍と、顕著な上昇は観察されなかった。変異のスペクトラムを解析すると、8-oxoG によって引き起こされる G:C→T:A 型トランスページョン変異の頻度が、ホモ欠損マウス (-/-) では、野生型マウス (+/+) の 3.3 倍の値を示した。臭素酸カリウム 0.05%投与の *Mut*h 遺伝子の欠損マウス個体において、特徴的な G:C→T:A 型トランスページョン変異の頻度が上昇しているものの腫瘍発生が認められていないことから、DNA 損傷に起因する突然変異を防ぐ分子機構以外にも発がん誘発の閾値形成に関わる機構が存在することを示唆していることも考えられ、実質的な「閾値」形成に関わる分子機構について、今後より詳細な解析を行う必要がある。

## 結論

- *Mut*h 遺伝子産物 (アデニン DNA グリコシラーゼ) は、臭素酸カリウムによって誘発される酸化 DNA 損傷に起因する突然変異の抑制に寄与し、発がん性に関する実質的な「閾値」形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

### (3) 研究項目名：Pol zeta 機能変異細胞を用いた化学物質への感受性の解析

(国立医薬品食品衛生研究所、能美健彦)

#### 1) 個別課題名：DNA ポリメラーゼζを遺伝的に改変したヒト細胞を用いた酸化ストレス誘導剤誘発突然変異に関する閾値研究 (略称：突然変異解析)

化学物質による細胞毒性回避に DNA ポリメラーゼζが関与するかを明らかにするため、DNA ポリメラーゼζの触媒サブユニットをコードする *REV3* 遺伝子のエクソン 5 を欠失させたヒト細胞 (Pol ζ KO 細胞) を樹立し、多様な作用機構を持つ遺伝毒性物質に対する致死感受性を比較した。Pol ζ KO 細胞は、BPDE、MMC、臭素酸カリウム (KBrO<sub>3</sub>)、MNNG に対して高い致死感受性を示した (図 3-1)。BPDE は、主にプリン塩基に付加体を形成し、塩基置換変異、染色体異常を誘発する。MMC は、DNA の対合する鎖に架橋することにより細胞毒性、染色体異常を誘発する。また、同一鎖内のグアニン同士を架橋することにより塩基置換変異を誘発する。臭素酸カリウムは、酸化損傷塩基 8-オキシグアニンを形成し、塩基置換 (G:C→T:A) および欠失変異を誘発する。MNNG はアルキル化剤として O<sup>6</sup>-メチルグアニンを含む多様な塩基修飾を行う。Pol ζ KO 細胞が、BPDE、MMC、KBrO<sub>3</sub>、MNNG に対して高い致死感受性を示したことは、多様な DNA 損傷に基づく細胞

死（染色体複製の停止）の回避に DNA ポリメラーゼ $\zeta$ が関与していることを示唆している。

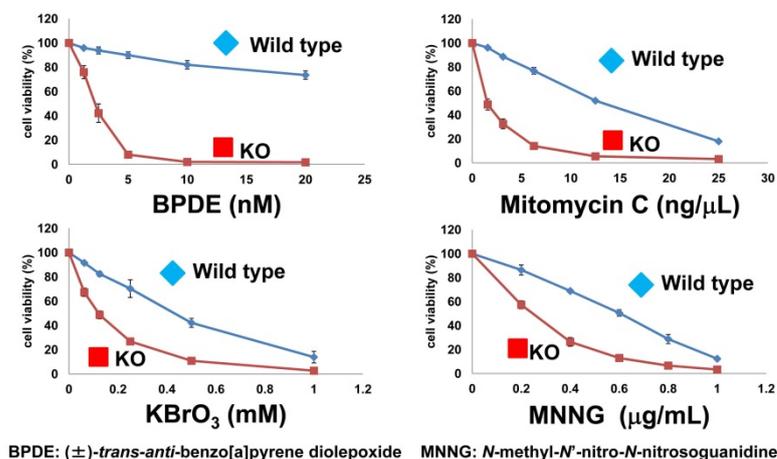


図 3-1 REV3 KO 細胞の致死感受性

次に、臭素酸カリウムおよび重クロム酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) の誘発する酸化ストレス突然変異に対する感受性を、DNA ポリメラーゼ $\zeta$ の活性を減弱させた細胞株 (D2781N)、DNA ポリメラーゼ $\zeta$ の複製における忠実度を減弱させた細胞株 (L2618M)、野生型細胞の間で比較した(図 3-2)。Pol $\zeta$  KO 細胞は、図 3-1 に示すように臭素酸カリウムの致死作用に対して高い感受性を示すが、無処置条件下でも細胞増殖速度が遅く遺伝毒性試験には不適である。このため、DNA ポリメラーゼ活性が減弱してはいるものの活性が一部残存する D2781N 細胞及び DNA ポリメラーゼの忠実度を低下させた L2618M 細胞を用いて突然変異を測定した。前者は、DNA ポリメラーゼ $\zeta$ の 2781 番目のアスパラギン酸がアスパラギンに置換しており、DNA ポリメラーゼ $\zeta$ の活性が減弱しているが、細胞周期は野生型細胞とほぼ同一である (野生型細胞 19 時間、D2781N 20 時間)。後者は、DNA ポリメラーゼ $\zeta$ の 2618 番目のロイシンがメチオニンに置換しており、DNA ポリメラーゼ $\zeta$ の忠実度が減弱し、細胞周期がやや伸びている (約 25 時間)。D2781N は、L2618M、野生型細胞よりも、臭素酸カリウムの突然変異誘発作用に対して高い感受性を示した。この傾向は、臭素酸カリウムの高用量 (0-4mM) (図 3-2 左図)、低用量 (0-1.0mM) (図 3-2 中央図) いずれの場合も同様であった。また、重クロム酸ナトリウムの突然変異誘発作用に対しても、D2781N は L2618M、野生型細胞に比較して、高い感受性を示す傾向が見られた (図 3-2 右図)。

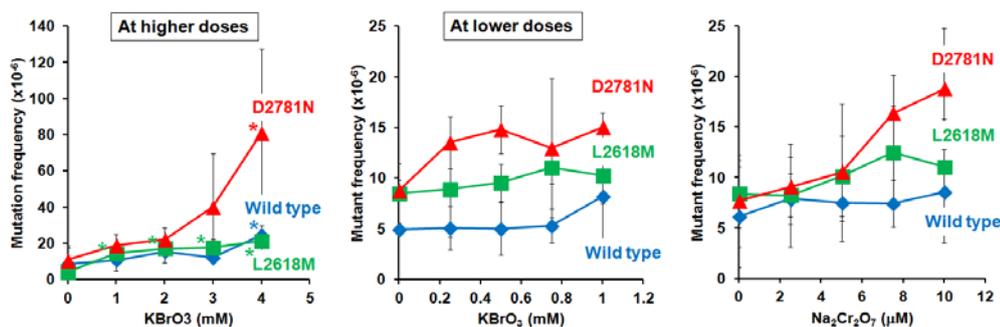


図 3-2 D2781N、L2618M、野生型細胞の臭素酸カリウム及び重クロム酸ナトリウムに対する変異感受性

2) 個別課題名: DNA ポリメラーゼ $\gamma$ を遺伝的に改変したヒト細胞を用いた酸化ストレス誘導剤誘発染色体異常に関する閾値研究 (略称: 染色体異常解析)

樹立した DNA ポリメラーゼ $\gamma$ の遺伝的改変細胞を用いて、臭素酸カリウムの染色体異常誘発性に関する *in vitro* 小核試験を実施した (図 3-3 左図)。D2781N は、L2618M および野生型細胞よりも、高い感受性を示した。無処理群に対して小核誘発頻度が有意に増加しなかった最高用量を「事実上の閾値」とすると、D2781N が 0.25mM であったのに対し、野生型細胞は 0.50mM、L2618M は 0.75 mM であった。また、重クロム酸ナトリウムの小核誘発頻度においても、D2781N は、L2618M、野生型細胞よりも、高い感受性を示す傾向にあったが、いずれの細胞株においても無処理群に対して統計的に有意な増加は認められなかった (図 3-3 右図)。

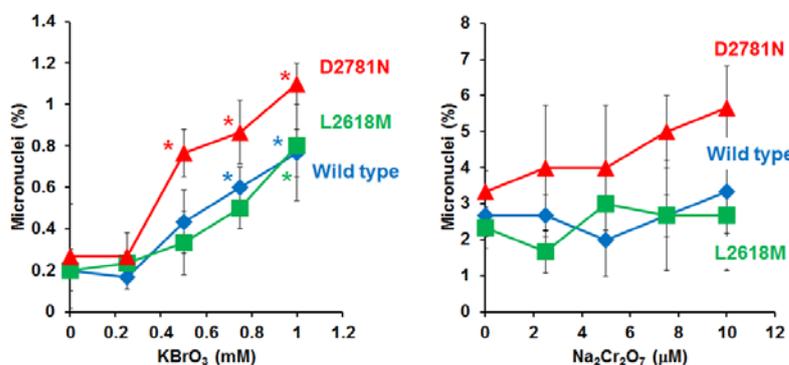


図 3-3 D2781N、L2618M、野生型細胞の臭素酸カリウム及び重クロム酸ナトリウムに対する小核誘発感受性 (無処理群に対する有意差、\*P<0.05, Dunnett's test)

次に臭素酸カリウム及び重クロム酸ナトリウムの誘発する SCE に関する感受性を、0-1.0mM または 0-1.0  $\mu$ M の用量で、3 株の間で比較した (図 3-4、図 3-5)。その結果、SCE 誘発に関しては、L2618M が D2781N、野生型株よりも高い感受性を示した。無処理群よりも有意に SCE 頻度が増加しなかった最高用量を「事実上の閾値」とすると、臭素酸カリウムに関し、L2618M では 0.2mM 未満、D2781N および野生型細胞では 0.6mM 以下に「事実上の閾値」があるものと考えられる。また重クロム酸ナトリウムに関しては、

L2618M では  $0.2 \mu\text{M}$  以下、D2781N では  $0.6 \mu\text{M}$ 、および野生型細胞では  $1.0 \mu\text{M}$  以上に「事実上の閾値」があるものと考えられる。

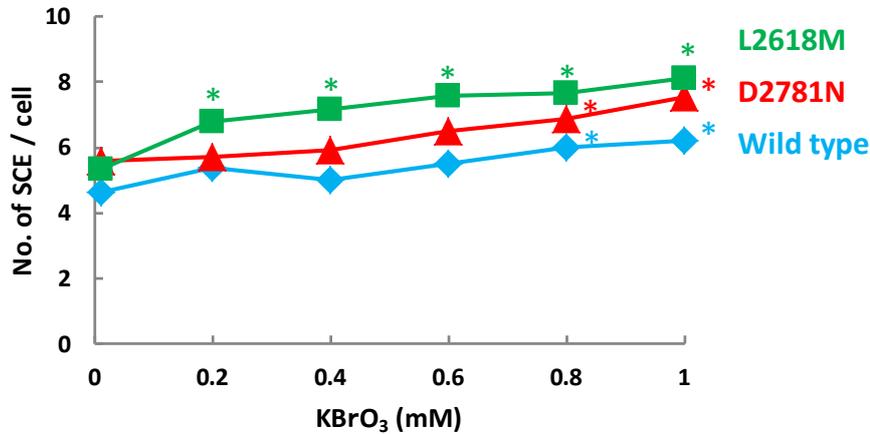


図 3-4 臭素酸カリウムの誘発する SCE に対する D2781N、L2618M、野生型細胞の感受性  
(無処理群に対する有意差、\* $P < 0.05$ , Dunnett's test)

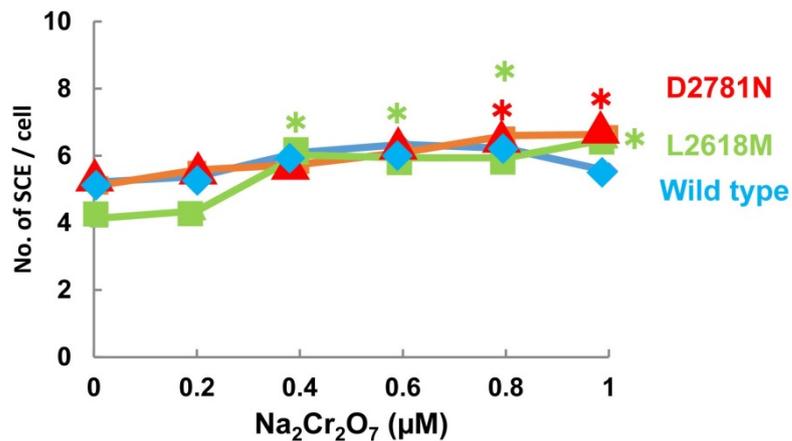


図 3-5 重クロム酸ナトリウム誘発する SCE に対する D2781N、L2618M、野生型細胞の感受性  
(無処理群に対する有意差、\* $P < 0.05$ , Dunnett's test)

臭素酸カリウム及び重クロム酸ナトリウムの誘発する遺伝子突然変異、小核、SCE を、低用量域において定量的に検討した。遺伝子突然変異と小核形成に関しては D2781N が最も高い感受性を示したが、SCE に関してはむしろ L2618M が高い感受性を示した。以上の結果から、遺伝的に改変した DNA ポリメラーゼ $\zeta$ の、酸化誘発遺伝毒性における役割を推測した(図 3-6)。すなわち野生型の DNA ポリメラーゼ $\zeta$ は、DNA 上の 8-オキソグアニンに対する誤りのないトランスレージョン DNA 合成を促進する役割をはたし、酸化ストレスに基づく致死および変異誘発から細胞を防護する役割を果たしている。一方、DNA ポリメラーゼ活性の減弱した D2781N では、DNA 鎖の伸長活性が減弱していることから、酸化損傷部位での DNA 鎖の切断が起こり、欠失変異、小核誘発の頻度が

上昇している。また DNA 複製の忠実度が減弱した L2618M では、8-オキソグアニンの向かい側に誤った塩基（アデニン）が挿入され、ミスマッチ部位での SCE が増大しているものと推測した。

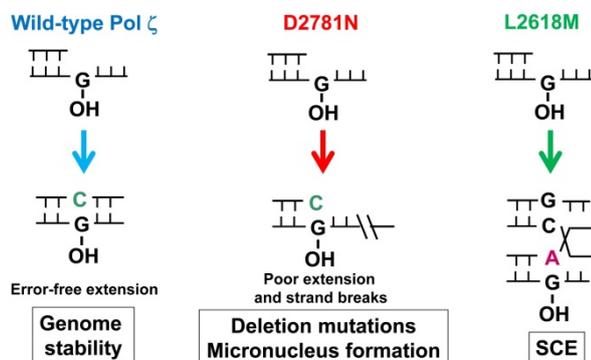


図 3-6 酸化ストレス遺伝毒性に対する野生型および改変型 DNA ポリメラーゼζの役割

## 結論

- DNA ポリメラーゼζは、低用量臭素酸カリウムおよび重クロム酸ナトリウムの遺伝毒性の発現および「事実上の閾値」（実質的閾値）形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。
- 遺伝毒性の閾値形成機構は、遺伝毒性の指標（突然変異、小核誘発、SCE）により異なることが示唆された。

## （４）研究全体の成果、考察及び結論

生体内では通常の代謝活動や炎症、環境中の放射線や化学物質の作用により活性酸素が生じる。これらは様々な生体分子を酸化するが、中でも DNA の酸化損傷は自然突然変異・自然発がんの要因となる。酸化 DNA 損傷の中で、グアニンの酸化体 8-オキソグアニン (8-oxoG) はシトシンと同程度にアデニンとも対合できるので、DNA 中の 8-oxoG は強い突然変異原性を示し、G:C→T:A 変異を引き起こす。変異原性や発がん性から生体をまもる機構には代謝活性化、トランススクリプション DNA 合成、DNA 修復が知られている。

「Nrf2 ノックアウトマウスを用いた酸化ストレス誘導剤への感受性と低用量での量反応関係の解析」 Nrf2 は第 II 相薬物代謝酵素や抗酸化タンパク質の遺伝子発現に必須の転写因子であり、活性酸素種の生成増強や代謝活性化能の低下が Nrf2-ノックアウト (OK) マウスで観察されている。活性酸素種の生成と実質的閾値の関係を調べるために、食品添加物として使用されている酸化剤であり、典型的な活性酸素種生成剤でもある臭素酸カリウム (KBrO<sub>3</sub>) を *gpt delta* マウスと Nrf2-KO マウスを交配して作出した Nrf2-KO *gpt delta* マウス、および *gpt delta* マウス (野生型マウス) の小腸で誘導される突然変異を解析した。0, 0.06, 0.2 and 0.6 g/L の用量で臭素酸カリウムを 90 日間飲水投与すると、0.6 g/L の用量で野生型、Nrf2-KO *gpt delta* マウス共に突然変異体頻度 (MF) が有意に増加した。0.2 g/L 臭素酸カリウムが実質的閾値と考えられた。G:C→T:A 変異の増加は 8-oxodG の生

成と並行に上昇しており、活性酸素種の発生が体内での点突然変異発生上昇の原動力となっている可能性があり、さらに、酸化ストレス誘導が閾値を決定するメカニズムの一つであることが示唆された。しかし、予測しなかった結果として、臭素酸カリウム非投与の *Nrf2*-KO マウスでの 8-oxodG 発生と G:C→T:A 変異のレベルは、ともに野生型マウスの 2 倍であったが、小腸での突然変異の発生は臭素酸カリウム投与によっても増加せず、投与、非投与に拘らずむしろ抑制されているようであった。増殖細胞のマーカーである PCNA 陽性の細胞は *Nrf2*-KO マウスの小腸で野生型より低下しており、細胞増殖能が *Nrf2* の欠失で低下していることが示唆された。この細胞増殖の低下が *Nrf2*-KO マウス小腸での突然変異発生抑制を引き起こしていると考えられた。

「*Mutyh* ノックアウトマウスを用いた低用量での量反応関係の解析」 *MUTYH* は 8-oxoG と誤対合したアデニンを除去することで、8-oxoG に起因する突然変異を抑制している。*Mutyh* 遺伝子欠損（ノックアウト）マウスでは消化管において G:C→T:A 変異の頻度が上昇すると共に、消化管がんの発生頻度が上昇していることを見出した。これらの結果は、*MUTYH* が酸化ストレス誘発消化管がんの抑制に大きな役割を果たしていることを示す。私達は臭素酸カリウムをマウスに飲水投与することにより酸化ストレスを負荷し、消化管がんを比較的短期間で誘発する実験系を確立した。この系を用いた解析で得られた *Mutyh* 遺伝子欠損マウスの表現型は、劣性の家族性大腸腺腫症（MAP: *MUTYH*-associated polyposis）患者の呈する症状とよく一致し、MAP の分子病態を解析する上で有用なモデル系と考えられる。今回、低用量域（0.05%, 0.1%）の臭素酸カリウムをマウスに飲水投与して、小腸での発がん並びに突然変異に関して解析した結果、*Mutyh* 遺伝子産物（アデニン DNA グリコシラーゼ）は、臭素酸カリウムによって誘発される酸化 DNA 損傷に起因する突然変異の抑制に寄与し、発がん性に関する実質的な「閾値」形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

「*Pol zeta* 機能変異細胞を用いた化学物質への感受性の解析」 DNA ポリメラーゼ ζ は、DNA 損傷の乗り越え（トランスレージョン DNA 合成）の際に重要な役割を果たすことが示唆されており、その遺伝的改変は、遺伝毒性に関する閾値形成に大きな影響を与えるものと予想される。そこで DNA ポリメラーゼ ζ の触媒サブユニットである REV3 をコードする *REV3* 遺伝子を欠損させたヒト細胞株（*Pol ζ* KO）を樹立し、その遺伝毒性物質に対する感受性を、細胞毒性を指標にして検討した。*Pol ζ* KO は、benzo[*a*]pyrene diolepoxide、mitomycin C、臭素酸カリウム（ $\text{KBrO}_3$ ）、*N*-methyl-*N*-nitrosoguanidine に対して高い致死感受性を示した。これらの結果は、DNA ポリメラーゼ ζ が多様な DNA 損傷に基づく細胞死の回避に重要な役割を果たしていることを示唆している。*Pol ζ* KO 細胞は、遺伝毒性物質の致死作用に対して高い感受性を示すが、無処置条件下でも細胞増殖速度が遅く遺伝毒性試験には不適であった。このため、DNA ポリメラーゼ活性が減弱してはいるものの活性が一部残存する D2781N 細胞を樹立した。この細胞では、DNA ポリメラーゼ ζ の 2781 番目のアスパラギン酸がアスパラギンに置換しており、DNA ポリメラーゼ ζ の活性が減弱しているが、細胞周期は野生型細胞とほぼ同一である。また、DNA ポリメラーゼ ζ の 2618 番目のロイシンをメチオニンに置換して、DNA 複製の忠実度を低下させた L2618M 細胞を樹立した。そして、DNA ポリメラーゼ ζ の DNA ポリメラーゼ活性を低下させた株（D2781N）、DNA ポリメラーゼ ζ の忠実度を

低下させた株 (L2618M)、野生型株の臭素酸カリウム、重クロム酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) に対する感受性を、遺伝子突然変異、小核形成、姉妹染色分体交換誘発を指標に比較検討した。その結果、遺伝子突然変異と小核形成に関しては D2781N が最も高い感受性を示したが、姉妹染色分体交換に関してはむしろ L2618M が高い感受性を示した。この結果は、DNA ポリメラーゼが酸化 DNA 損傷に基づく遺伝毒性の閾値形成において重要な役割を果たしていること、そして遺伝毒性の閾値に影響を与える因子が、遺伝毒性の指標 (遺伝子突然変異、小核形成、姉妹染色分体交換) により異なることを示唆している。遺伝的に改変した DNA ポリメラーゼが酸化誘発遺伝毒性において果たす役割について考察した。

### ●全体の結論

*Mutylh* ノックアウトマウス (-KO) では野生型マウスに比べて、臭素酸カリウム投与により高頻度で小腸で腫瘍が発生していた。また、DNA ポリメラーゼの活性が減弱した D2781N 細胞では正常細胞に比べて、臭素酸カリウムによる誘発遺伝毒性が増強されていた。酸化 DNA 損傷修復系とトランスリージョン DNA 合成活性の減弱により、感受性が野生型に比べて増加したことから、これら 2 つの系が臭素酸カリウムによる実質的閾値形成に関与していることが示唆された。一方、*Nrf2*-KO マウスでは、臭素酸カリウムによる小腸での突然変異誘導の感受性が増加しなかったことから、抗酸化酵素活性は実質的閾値の形成に大きな影響を及ぼさないと考えられた。しかし、*Nrf2*-KO マウスでは小腸上皮細胞の増殖が抑制されているために、突然変異頻度の上昇が見られなかった可能性も考えられた。DNA ポリメラーゼ活性減弱細胞 (D2781N) では、臭素酸カリウムばかりでなく重クロム酸ナトリウムの作用によっても遺伝毒性の感受性が高くなる傾向が観察された。臭素酸カリウムと重クロム酸ナトリウムへの感受性が D2731N 株でともに高まったことから、活性酸素種により生成された DNA 傷害がトランスリージョン DNA 合成系の働きで抑制されることで実質的閾値が形成されている可能性が示唆された。また、*gpt delta* マウス小腸での臭素酸カリウム投与による点突然変異誘導には実質的閾値 (0.2g/L) が存在することが観察された。突然変異体頻度の増加は G:C→T:A 変異の誘導に伴って引き起こされ、並行して 8-oxodG の生成も上昇していた。活性酸素種の発生が体内での点突然変異発生上昇の原動力となり、点突然変異誘導の閾値を決定するメカニズムの一つとなっていることが示唆された。しかし、*gpt delta* マウスで点突然変異が誘導される臭素酸カリウムの用量でも、腫瘍は誘導されなかった。同様に、*Mutylh*-KO マウスでも G:C→T:A 変異の頻度が上昇しているものの腫瘍発生が認められず、これらの知見は DNA 損傷に起因する突然変異を防ぐ分子機構以外にも発がん誘発の閾値形成に関わる機構が存在することを示唆している。一方、同じ酸化ストレスを誘導する薬剤であっても、主に DNA 切断により遺伝毒性を発揮する重クロム酸ナトリウムでは、臭素酸カリウムの場合とは逆に、腫瘍が発生する用量でも小腸での点突然変異の頻度上昇は観察されなかった。腫瘍誘導の「実質的閾値」形成に関わる分子機構について、今後より詳細な解析を行う必要があると考えられる。

### III 本研究を基に発表した論文等

#### 1 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト

- 1) T. Suzuki, A. Ukai, M. Honma, N. Adachi and T. Nohmi, Restoration of mismatch repair functions in human cell line Nalm-6, which has high efficiency for gene targeting, PLoS.One, 8, e61189 (2013)
- 2) T. Nohmi, M. Yamada and K. Masumura, *in vivo* approaches to identify mutations and *in vitro* research to reveal underlying mechanisms of genotoxic thresholds, Genes and Environ., 34, 146-152 (2012)
- 3) T. Nohmi, M. Honma, M. Yamada, K. Masumura, M. Yasui, K. Horibata and S. Fukushima, 2nd International symposium on genotoxic and carcinogenic thresholds, Genes and Environ., 34, 141-145 (2012)
- 4) Y. Aoki. Health risk assessment of air pollutants: Air pollutant genotoxicity and its enhancement by suppression of phase II drug-metabolizing enzymes. Genes and Environment 34, 186-190 (2012)

#### 2 本研究を基にした学会発表の実績

1. 青木康展, 松本みちよ, 松本理, 増村健一, 續輝久, 能美健彦, 臭素酸カリウムが *gpt delta* マウス小腸で誘発する突然変異の閾値と変異スペクトルの用量依存性変化, 日本環境変異原学会第42回大会, 岡山 (2013年11月29日)
2. Y. Aoki, *In vivo* mutagenesis resulting from oxidative stress in mice with suppressed phase II drug-metabolizing enzyme expression, 11<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens, Iguacu, Brazil, November 6, 2013
3. T. Tsuzuki, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestines of *Mutyh*-deficient mice: the effect of low-level exposure to KBrO<sub>3</sub>, 11<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens, Iguacu, Brazil, November 6, 2013
4. T. Tsuzuki, M. Ohno, Y. Nakabeppu, Y. Nakatsu, Oxidative stress-induced tumorigenesis in the small intestines of *Mutyh*-deficient mice: the effect of low-level exposure to KBrO<sub>3</sub>, 日本癌学会第72回学術総会, 横浜 (2013年10月5日)
5. 鈴木哲矢, 佐々 彰, ピーターグループ, 足立典隆, 本間正充, 能美健彦, DNAポリメラーゼはBPDE-N2-dGの損傷乗り越え合成後の伸長時にエラーを誘発する, 第36回日本分子生物学会年会, 神戸 (2013年12月3日)
6. T. Nohmi, T. Suzuki, K. Matsumoto and M. Honma, Introduction and roles of self-defense mechanisms in thresholds for genotoxic chemicals, 11<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens, Iguacu, Brazil, November 6, 2013
7. T. Nohmi, T. Suzuki, K. Matsumoto and M. Honma, DNA repair and translesion DNA synthesis as constituents of “threshold” of genotoxicity, The XIII International Congress of Toxicology, Seoul, Korea, July 3, 2013

8. T. Nohmi, DNA repair and translesion DNA synthesis as possible mechanisms underlying genotoxic thresholds, UKEMS, Swansea, UK, July 17, 2012

9. 鈴木哲矢, 足立典隆, 能美健彦, 損傷を誘発する化学物質の細胞毒性に対するヒト DNA ポリメラーゼの役割, 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡 (2012 年 12 月 12 日)

3 特許及び特許出願の数と概要  
なし

4 その他 (各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等)  
2012 年 Genes and Environment Best Paper Award (環境変異原学会)

#### IV 主任研究者による研究全体の自己評価

項目	評価結果	評価コメント
1 研究の妥当性	4	酸化ストレスを誘導するモデル化合物として臭素酸カリウムを選び、その投与による活性酸素種の発生が体内での突然変異発生上昇の原動力となり、腫瘍形成や突然変異誘導の閾値を決定するメカニズムの一つとなっていることを示す知見を得ることができた。
2 研究目標の達成度	4	酸化 DNA 損傷修復系とトランスレージョン DNA 合成系が実質的閾値形成に関与していることを示す知見を得ることが出来た。特に、トランスレージョン DNA 合成系については、臭素酸カリウムばかりでなくと重クロム酸ナトリウムを用いることで知見を補強することができた。
3 研究成果の有用性	3	酸化ストレスを誘導する化学物質による遺伝毒性や腫瘍形成の誘導に実質的閾値が存在することを示すことはできたが、発がんのリスク評価における「閾値あり」「閾値なし」の判断に資する十分な知見を得るまでには至らなかった。
合計	11	

総合コメント 閾値は毒性学上基本的かつ重要な概念であるが、その形成メカニズムに踏み込んだ研究は行われてこなかった。本研究では、閾値形成に関与すると考えられる生体防御系 (代謝活性化、トランスレージョン DNA 合成、DNA 修復) につき、感受性を上昇させて解析することにより、幾つかの DNA 修復系の腫瘍/遺伝毒性誘導の閾値形成への関与を示唆する知見を得ることができた。現時点で、閾値の有無を判断できるだけの知見を得ることはできなかったが、酸化ストレスを誘導する化学物質の発がん性のリスク評価に際して、閾値の存在を考慮する必要性をより明確に示すことが出来た。

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述する。