

腫瘍形成の機序等に係るご提供文献 評価書記載 (案)

(ご提供文献 No.4) (*in vitro*、ヒト、腎、細胞周期、DNA 複製)

HK-2 細胞 (ヒト近位尿細管上皮細胞由来株) を用いて、チミジンアナログの 5-ヨード-2'-デオキシウリジン (IdU) を添加して、20 分間インキュベーション後に、引き続き 0、10、25 又は 50 μM の OTA を添加して 1 時間インキュベーションを行って複製 DNA を標識した後に、別のチミジンアナログである 5-クロロ-2'-デオキシウリジン (CldU) を含む培養液で 40 分間インキュベーションすることにより新たに合成された DNA を標識し、両標識の長さ (トラック) を比較する DNA ファイバーアッセイを実施した結果、全ての OTA の処理濃度で複製 DNA フォーク速度が低下したが、フォーク停止はほとんど認められなかった。さらに、OTA (10 μM) はゲノム全体で均一にトラック長を短縮させ、DNA 複製を全体的に遅延させることが示された。

また、過剰なチミジン添加を二回繰り返すチミジン二重阻害法により、細胞を後期 G₁/S に同期させた後に、引き続き S 期に 5-エチニル-2'-デオキシウリジン (EdU) と 0、10、25 又は 50 μM の OTA で 4 時間インキュベーションした結果、OTA の濃度依存的に EdU の取り込みが減少し、DNA 合成が抑制された。

HK-2 細胞を 0、1、5、10、25 又は 50 μM の OTA で 1 又は 4 時間処理した結果、ウェスタンブロット法にて 1 時間処理では γ -H2AX の誘導を認めなかったものの、4 時間処理で濃度依存的な増加を認めた。免疫蛍光解析では、核内の γ -H2AX フォーカスは主に CldU 陽性の S 期細胞に出現し、DNA 複製との関連が示された。また、チミジン二重阻害処理により、細胞を後期 G₁/S 期に同期させた後に、引き続き S 期に 0、10、25 又は 50 μM の OTA で 4 時間インキュベーションした結果、用量依存的に γ -H2AX 誘導が増加した (増加は 50 μM 群で有意)。一方、HK-2 細胞を CDK1 阻害剤の RO3306 で 24 時間処理して G₂ 期後期に同期させ後に、引き続き M 期 (有糸分裂期) に 0、10、25 又は 50 μM の OTA で 4 時間インキュベーションした結果、 γ -H2AX の誘導に影響はなかった。また、HK-2 細胞を 0 又は 50 μM の OTA で 1 時間インキュベーション後に EdU を添加し 30 分間インキュベーションしてクロマチン線維を免疫蛍光抗体法にて染色した結果、新たに複製されたクロマチン線維に沿って γ -H2AX の誘導が確認され、DNA 複製ストレスとの関連が支持された。

HK-2 細胞をチミジン二重阻害法により後期 G₁/S 期に同期させた後に、S 期に 0、10、25 又は 50 μM の OTA で 4 時間処理し、さらに 17 時間の経過により有糸分裂を経て G₁ 期に至った細胞で、50 μM OTA で γ -H2AX と共に 53BP1 の核内フォーカスが増加した。以上の結果は、OTA により S 期に生じた DNA

1 損傷が G2 期および M 期で完全に修復されず、次の G1 期まで持ち越される可
2 能性が示唆された。

3 HK-2 細胞を細胞周期を同期させずに、又はチミジン二重阻害により後期 G1/S
4 期で停止させた後の S 期に 0、1、5、10、25 又は 50 μ M の OTA で 1-4 時間イ
5 ンキュベーションした結果、DNA 損傷反応経路として ATR-Chk1 の活性化は
6 認められず、ATM-Chk2 もわずかな活性化を示したのみであった。さらに、細
7 胞周期制御因子 Wee1 および CDC25C にも変化は見られず、OTA による複製
8 ストレスは DNA 複製チェックポイントを十分に活性化しない可能性が示され
9 た。

10 後期 G1/S 期に細胞周期停止させた HK-2 細胞において、2 回目のチミジン阻
11 害処理時の最後の 1 時間にキナーゼ阻害剤を添加し、S 期に移行後、それぞれの
12 阻害剤の存在下で 50 μ M の OTA を添加して 4 時間インキュベーションした結
13 果、ATR¹の阻害剤である VE-821 では OTA 誘導 γ -H2AX 発現は抑制されず、
14 ATM²の阻害剤である KU-55933 では γ -H2AX がわずかに減少したのみであっ
15 た。それに対して、DNA-PKcs³の阻害剤である NU-7026 では γ -H2AX シグナ
16 ルが顕著に減少し、DNA-PKcs リン酸化 (Ser2056) は OTA 濃度依存的に増加
17 した。

18 以上の結果から、OTA は S 期において DNA 複製フォークの進行を遅延させ、
19 DNA 合成を抑制することが示され、DNA 複製の阻害が OTA 遺伝毒性の初期
20 イベントである可能性が示唆された。OTA による γ -H2AX の増加は主に DNA
21 複製に依存して生じることが確認されたが、通常の DNA 損傷応答である ATR-
22 Chk1 および ATM-Chk2 チェックポイントは十分に活性化されなかった。その
23 結果、DNA 損傷細胞や DNA 複製中の細胞が有糸分裂へ進行し、染色体分離異
24 常やゲノム不安定性を引き起こす可能性がある。また、 γ -H2AX 誘導には DNA-
25 PKcs が主要な役割を果たすことが示唆された。このことから、OTA による遺
26 伝毒性は DNA 複製ストレスに起因する可能性が示唆された。

1 DNA 一本鎖切断や複製ストレスを検知し、チェックポイント機構で細胞周期を停止させる重
要な DNA 損傷応答因子

2 DNA の二本鎖切断 (DSB) などのゲノムストレスを感知し、修復や細胞周期の停止を行う
DNA 損傷応答因子

3 DNA-DSB を修復する非相同末端結合経路で中心的な役割を果たす酵素である DNA 依存性
プロテインキナーゼの触媒サブユニット

1 (ご提供文献 No.5) (*in vitro*、ヒト、腎、伝達経路)

2 OTA を化学的に固定したビーズ (OTA カラム) を作製し、HK-2 細胞 (ヒト

3 近位尿細管上皮細胞由来株) の細胞溶解液に含まれる OTA 結合タンパク質を回

4 収して定量的ラベルフリー質量分析法にて分子種を同定した。

5 DAVID を用いた遺伝子オントロジー・エンリッチメント解析により、OTA 相

6 互作用タンパク質の高度に濃縮されたサブグループとして最も高いエンリッチ

7 メントスコアと最も高いエンリッチメント倍率を GTP 結合タンパク質が示し

8 た。GTP 結合タンパク質の約 73%が低分子量 GTPase の Ras スーパーファミ

9 リーで、その中で、Ras、Rho、Rab、Sar1/Arf 及び Ran の 5 つのサブファミ

10 ーの代表タンパク質が同定され、大部分は Rab サブファミリーと Ras サブファミ

11 リーに属していた。

12 OTA と標的タンパク質との相互作用を解析するため、分子ドッキング解析お

13 よび分子動力学シミュレーション (MD) 解析を行い、タンパク質-リガンド複

14 合体の結合様式と安定性を評価した結果、OTA が Rab サブファミリーに属する

15 Rab5a、Rab7a 及び Rab11a、Ras サブファミリーに属する Rras、Ran サブフ

16 ァミリーの Ran、Rho サブファミリーに属する RhoA 及び Sar1/Arf サブファミ

17 リーに属する RhoA のヌクレオチド結合ポケット (GDP/GTP 結合部位) に結合

18 可能であることが示された。

19 二乗平均平方根 (RMSD) 解析の結果、OTA は GDP 結合状態の Rab5a との

20 複合体では安定したが、GTP 結合状態の Rab5a との複合体では分離した。一

21 方、Rab7a および Rab11a との複合体では、GTP/GDP 結合状態に関係なく相

22 互作用する可能性を示した。

23 以上より、OTA の潜在的な分子標的として低分子量 GTPase が同定された。

24 これにより、OTA の毒性および発がん機構において低分子量 GTPase の機能異

25 常の関与が示唆された。