

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

2015.3.30

主任研究者: 青木康展

(国立環境研究所・センター長)

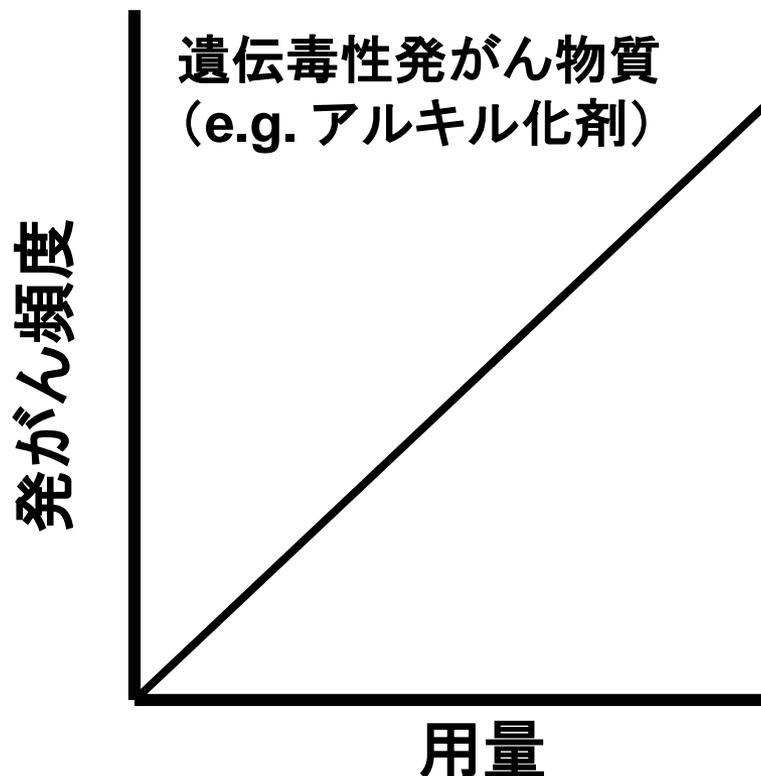
分担研究者: 續 輝久

(九州大学医学研究院・教授)

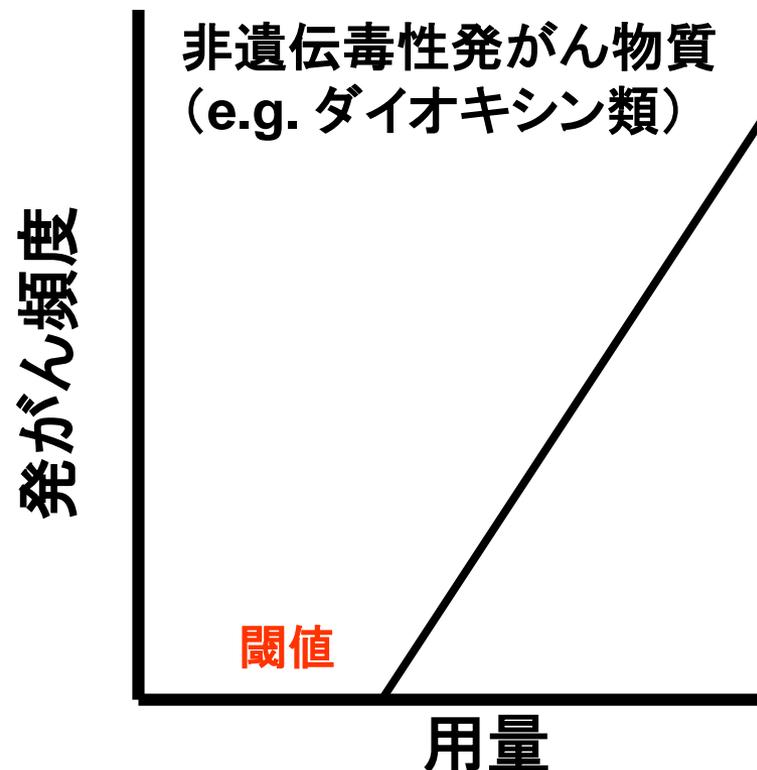
能美健彦

(国立医薬品食品衛生研究所・客員研究員)

遺伝毒性発がん物質の作用には 閾値が存在しないと考えられている



食品添加物、農薬、動物用医薬品としての
ADI は設定されない



ADIはNOAELに基づいて設定される

間接的にDNAを修飾し弱い遺伝毒性を示す発がん物質は、実質的に閾値が存在するような量反応関係を示すと考えられている。
例：酸化ストレスを惹起しDNA損傷を誘導する化学物質のリスク

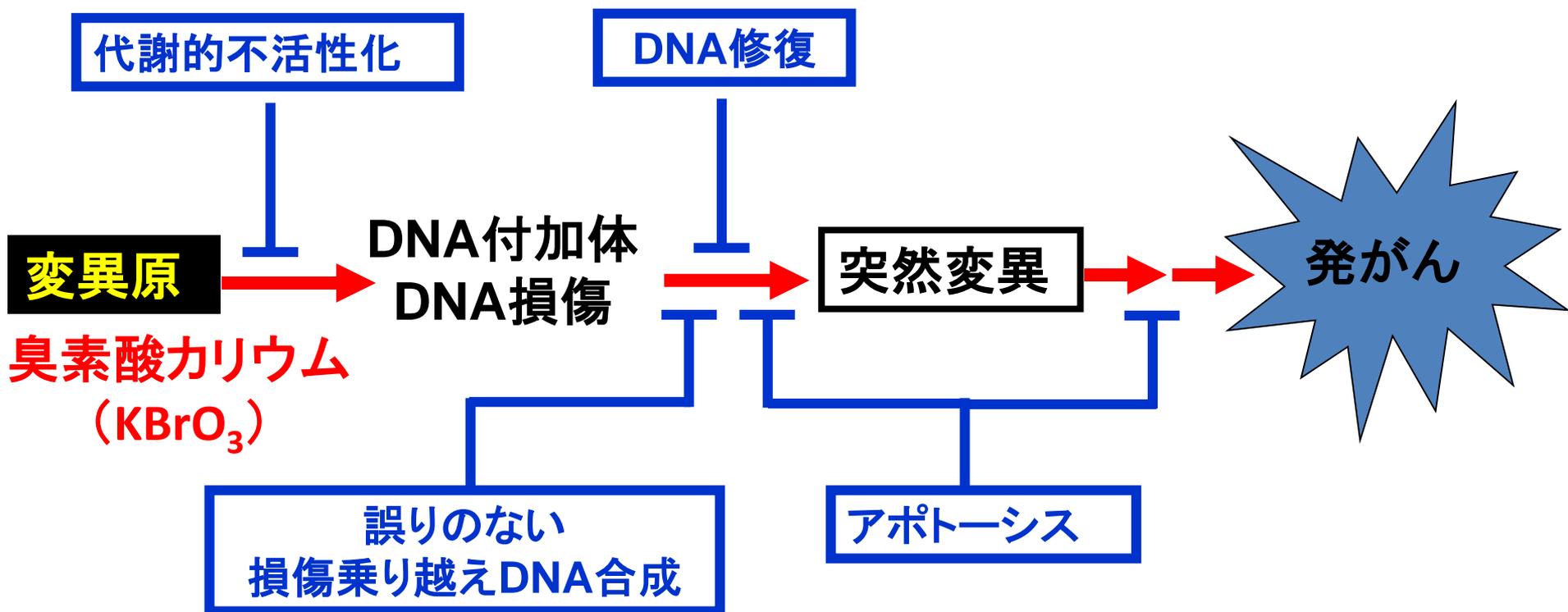
○必要な研究事項

1. 弱い遺伝毒性物質の発がんリスクを的確に評価するために、低用量での量反応関係を詳細に検討する。
2. Mode of Actionからの閾値「なし」・「あり」の判別は可能か？
 - ＞生体側の感受性要因を解明し、閾値の形成機序を明らかにする。
 - ＞高感受性の状態で閾値は低下するか？

「本研究の目的」

- 酸化DNA損傷を誘導するモデル化合物として‘臭素酸カリウム (KBrO_3)あるいは重クロム酸ナトリウム ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)’を用い、低用量における「用量－発がん」の量反応関係から、弱い遺伝毒性発がん物質の「実質的閾値 (practical threshold)」の有無を解析する。
- 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をノックアウト(KO)したマウスやヒト培養細胞を用い、これらの遺伝子の欠損により KBrO_3 に対する実質的閾値の低下がおこるか否かを実験的に検証する。(本研究の特徴)
- トランスジェニックKOマウスによるin vivo 試験を用いて、発がんと密接に関連する「用量と標的臓器で発生する突然変異」の量反応関係を解析し、さらに8-oxoGの生成の量反応関係など他の知見も合わせ閾値の形成機序の解明を目指す。

遺伝毒性発がん物質の閾値形成に 関与すると考えられるメカニズム



遺伝毒性発がん物質の閾値形成に関与すると考えられるメカニズム

Nrf2-KOマウス(青木)

Mutyh-KOマウス(續)

~~代謝的不活性化~~

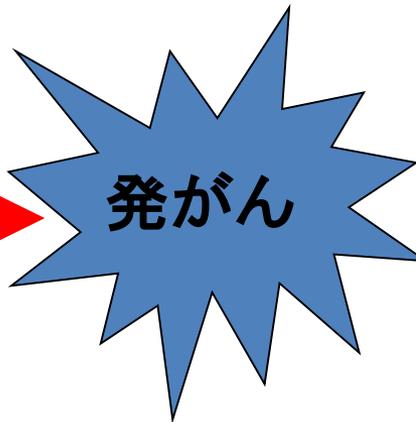
~~DNA修復~~

変異原

臭素酸カリウム
($KBrO_3$)

DNA付加体
DNA損傷

突然変異



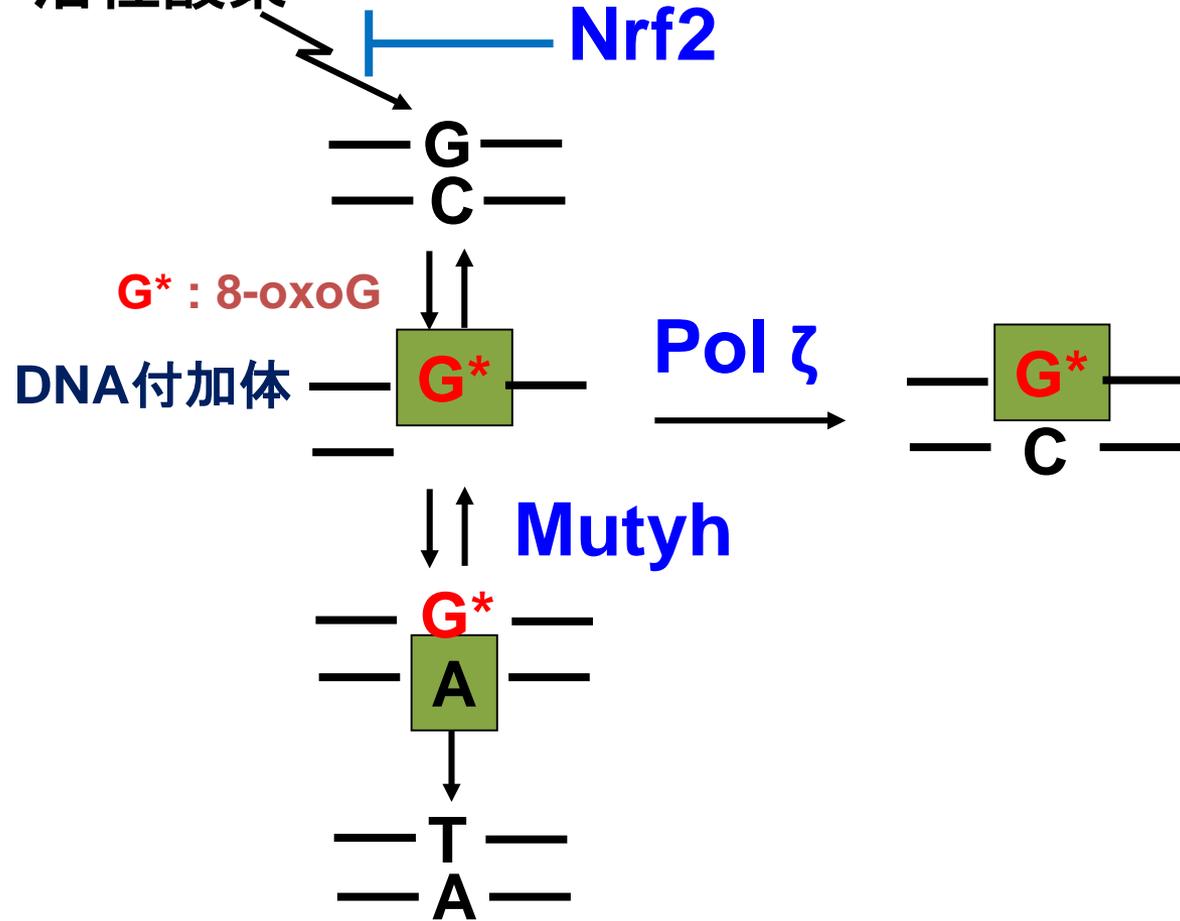
~~誤りのない
損傷乗り越えDNA合成~~

アポトーシス

DNAポリメラーゼ ζ (ゼータ)-KO細胞(能美)

活性酸素による変異原性メカニズム

臭素酸カリウム (KBrO₃) → 活性酸素



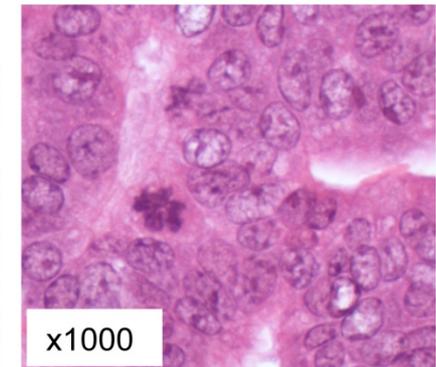
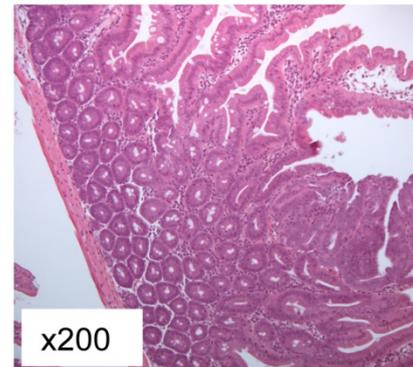
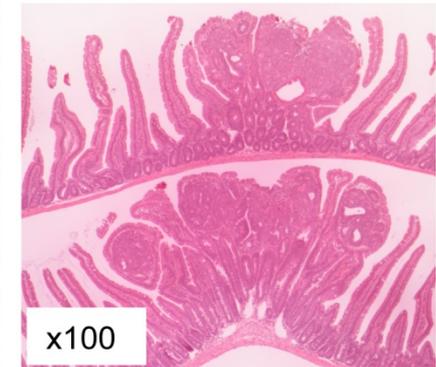
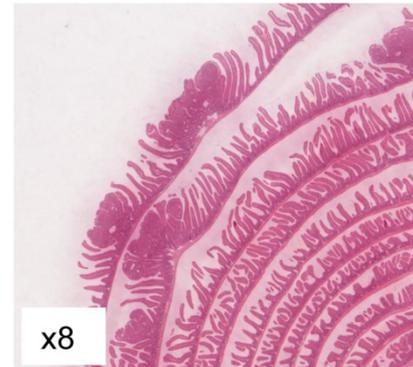
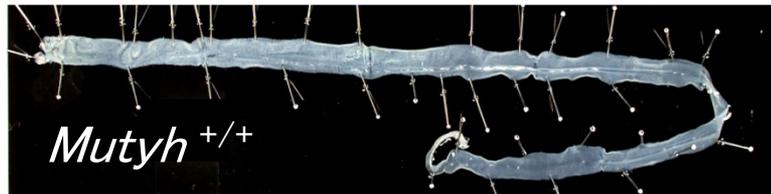
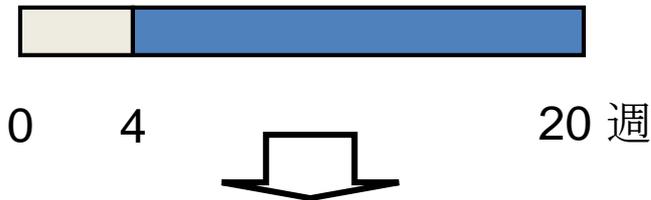
G:C → T:A (8-oxoG生成に特徴的な突然変異)

 : 除去される(修飾)塩基

Mut^{yh} 遺伝子欠損マウスにおけるKBrO₃誘発 消化管(小腸)腫瘍の解析 (0.15%投与)

SPF飼育条件下で、約1年半後に
Mut^{yh}^{-/-}は自然発がんが上昇。

KBrO₃の飲水投与



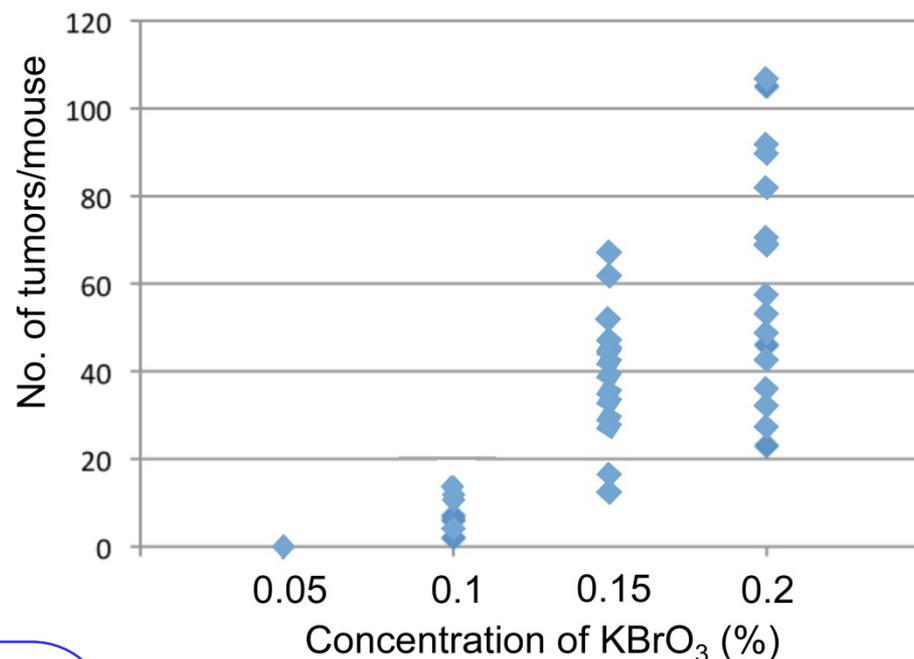
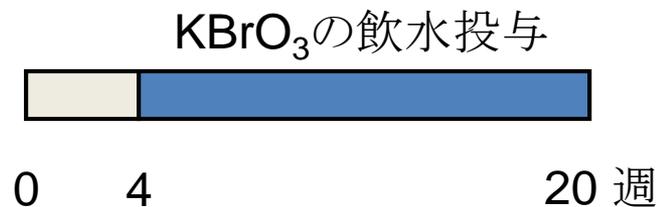
Mut^{yh}^{-/-} HE染色(病理解析)

→Category 4

(Vienna classification of gastrointestinal
epithelial neoplasia)

Mut^{yh} 遺伝子欠損マウスにおけるKBrO₃誘発 消化管発がんの解析

発がん解析



KBrO₃を0.2% (2g/L), 0.15% (1.5 g/L), 0.1% (1g/L), 0.05% (0.5 g/L)の用量で飲水投与。

0.05%投与群で*Mut^{yh}*遺伝子欠損マウスでの発がんを認めていない。



Mut^{yh} 遺伝子欠損状態でも、**発がんに関して実質的な閾値 (0.5 g/L)**に相当する用量が存在する可能性。

⇒ **他の防御システムの存在?**

Mut^{yh} 遺伝子欠損マウスにおけるKBrO₃誘発消化管発がんの解析 「Mut^{yh} (-/-) (+/-) (+/+) の比較」

	KBrO ₃ 0.05%		KBrO ₃ 0.1%		KBrO ₃ 0.15%		KBrO ₃ 0.2% (Yamauchi data)	
	number of tumor	number of sample	number of tumor	number of sample	number of tumor	number of sample	number of tumor	number of sample
KO (-/-)	0	9	8.8 ± 4.7	12	41.6 ± 12.7	20	61.8 ± 26.4	17
He			1.4 ± 0.9	29	2.2 ± 1.2	23	2.8 ± 1.5	4
WT (+/+)			0.4 ± 0.6	14	0.9 ± 1.0	22	0.9 ± 0.6	17

Mut^{yh}(-/-)では野生型(+/+)に比べて高頻度で腫瘍が誘発される

腫瘍組織での変異解析

• β-カテニン (*Cttnb1*) 遺伝子

Mut^{yh}(-/-)

変異の検出率: 58.1% (36 / 62)

G:C→T:A は 35[GAA]

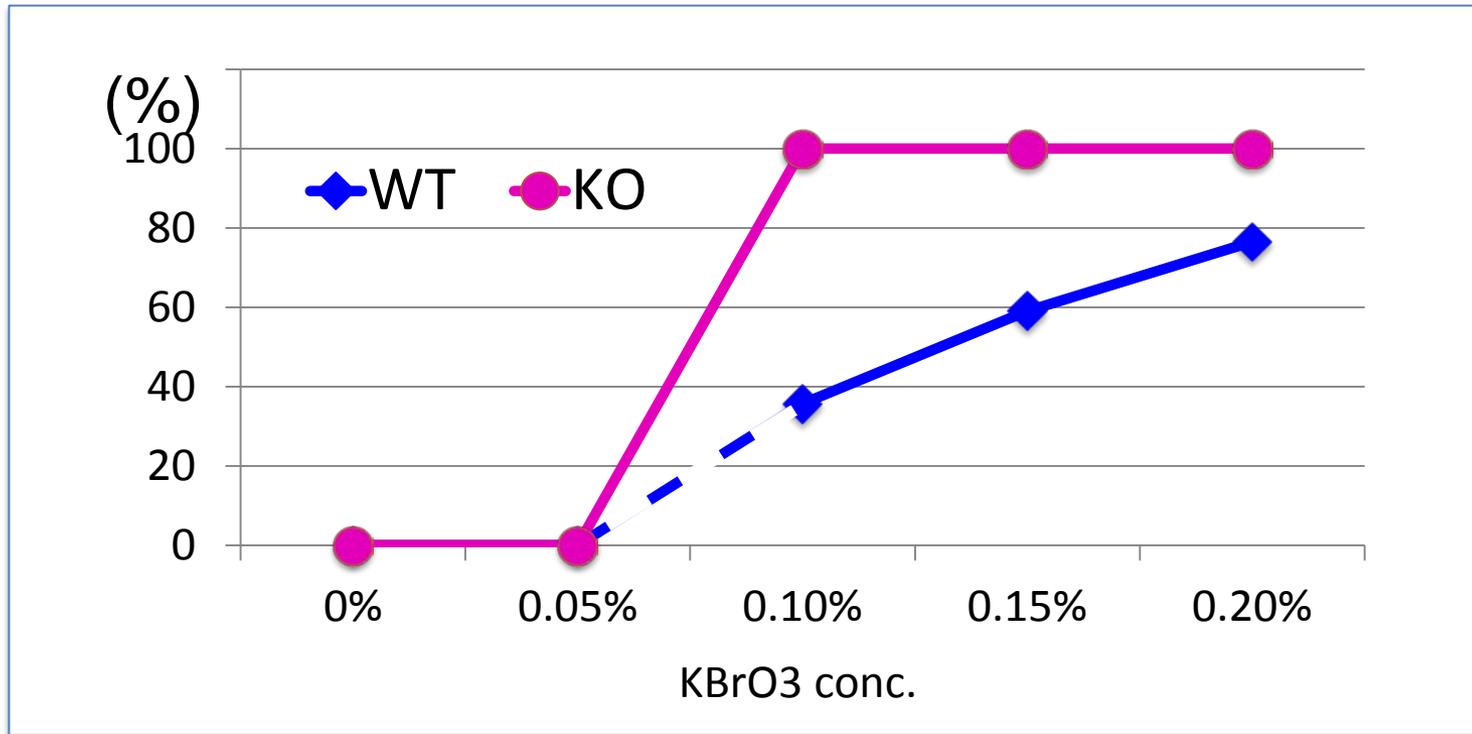
→ ほとんどが8-oxoGに起因する

Msh2(-/-)

変異の検出率: 30.3% (27 / 89)

G:C→T:A は 2[GAA]

Number of mice with tumors



KBrO ₃ conc. (%)	<i>Mutyh -/-</i>					<i>Mutyh +/+</i>				
	0	0.05	0.10	0.15	0.20	0	0.05	0.10	0.15	0.20
mice analyzed	3	9	12	20	17	6	nd	14	22	17
mice with tumor	0	0	12	20	17	0	nd	5	13	13
% with tumor	0	0	100	100	100	0	nd	35.7	59.1	76.5

Mut^{yh} 遺伝子欠損マウスにおけるKBrO₃誘発 突然変異の解析

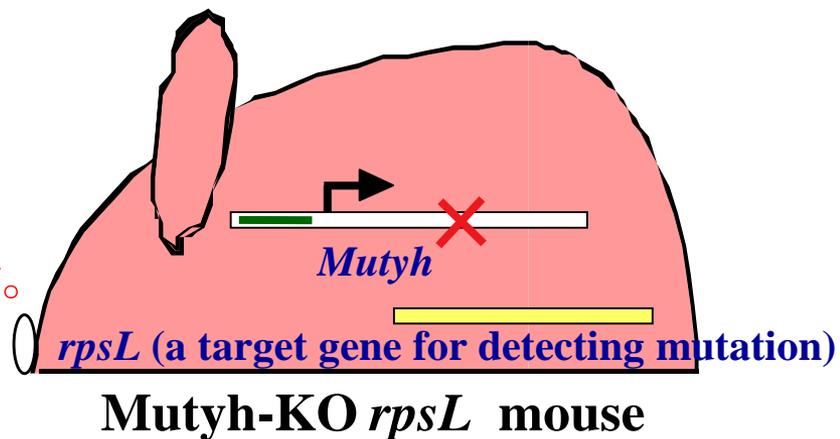
突然変異解析

Mut^{yh}^{-/-}, *rpsL* Tgマウスを
作製し、KBrO₃を投与

KBrO₃の飲水投与



突然変異頻度並びに
変異スペクトラムを解析。



Genotype	KBrO ₃	MF (x10 ⁻⁵)	Ratio(M/W)
+/+ (3)	0.15%	3.00	
-/- (3)	0.15%	5.73	1.91
+/+ (2)	0.10%	4.32	
-/- (3)	0.10%	6.64	1.53
+/+ (2)	0.05%	4.33	
-/- (2)	0.05%	4.67	1.08

-/-は腫瘍誘発の用量
(0.15%, 0.10%)で突然
変異頻度上昇:
濃度依存的に減少傾向

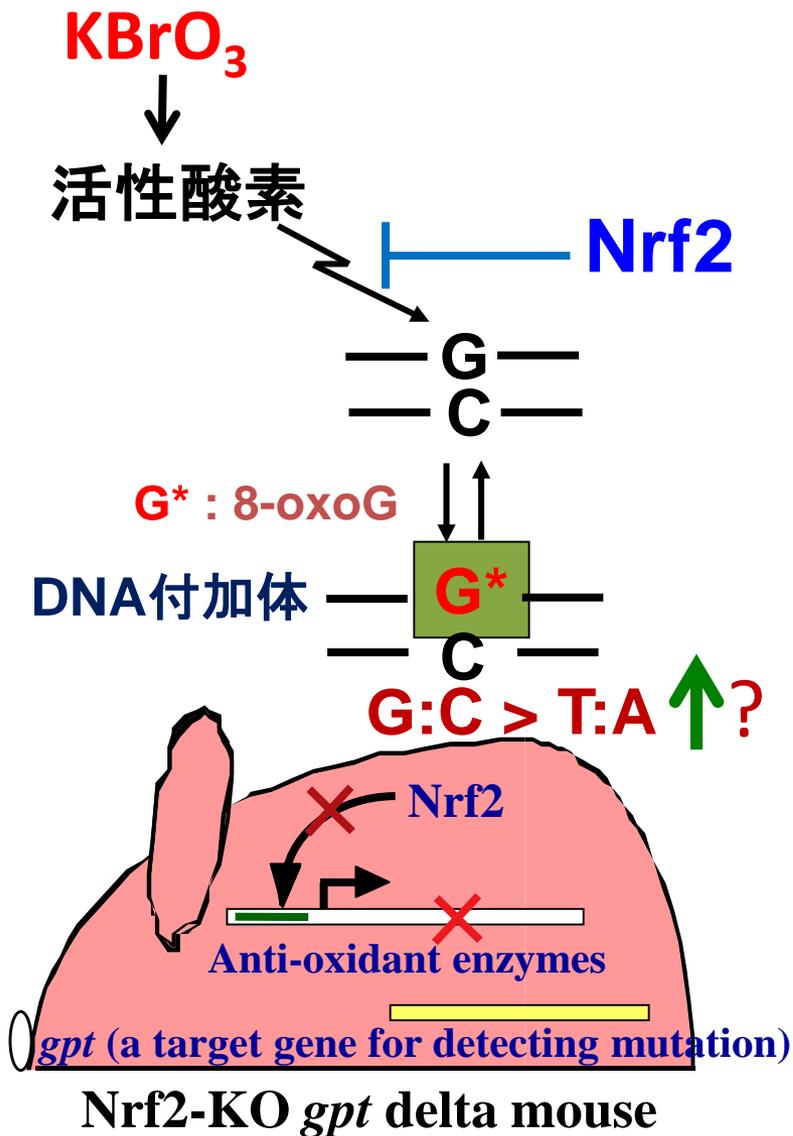
野生型および *Mutyh* 遺伝子欠損マウスの小腸での KBrO₃ 誘発突然変異

KBrO ₃ (%)	0.15		0.1		0.05	
<i>Mutyh</i> genotype	+/+	-/-	+/+	-/-	+/+	-/-
Transition						
G:C → A:T	5	3	19	12	8	11
A:T → G:C	1			2		
Transversion (MF × 10⁻⁵)						
G:C → T:A	3 (0.59)	29 (2.89)	5 (0.78)	29 (3.61)	2 (0.37)	8 (0.93)
G:C → C:G			1		1	
A:T → T:A		1				
A:T → C:G			1			
Frameshift						
1 bp deletion	7	9	3	4	8	13
1 bp addition	1					
>2 bps frameshift	8	6	1	7	4	8
Others						
unknown	1	8	1	1	1	
Total	27*	57	31	55**	26***	40

腫瘍誘発が見られない用量でも、野生型に比べ特徴的なG→T変異が増加

* Double mutationを1つ含む ** Double mutationを3つ含む *** Double mutationを2つ含む

Nrf2遺伝子欠損マウスにおけるKBrO₃誘発突然変異



(+/+)	titer	変異体数	突然変異頻度 MF (x E-5)	Ave.(x E-5)	SD(X E-5)
0 g/L	7,251,000	19	0.262		
	16,362,000	18	0.11		
	8,367,000	21	0.251	0.208	0.085
0.06 g/L	5,877,000	23	0.263		
	7,221,000	19	0.263		
	5,997,000	7	0.117	0.257	0.137
0.2 g/L	5,340,000	17	0.318		
	6,561,000	15	0.229		
	5,640,000	17	0.301	0.283	0.048
0.6 g/L	4,374,000	31	0.709		
	2,577,000	25	0.97		
	2,238,000	15	0.67	0.783**	0.163
(-/-)	13,158,000	32	0.243		
	10,233,000	18	0.176		
	14,403,000	18	0.125	0.181	0.059
0.06 g/L	6,498,000	19	0.292		
	5,988,000	15	0.251		
	12,555,000	19	0.151	0.231	0.072
0.2 g/L	9,894,000	24	0.243		
	17,307,000	22	0.127		
	9,732,000	16	0.164	0.178	0.059
0.6 g/L	7,431,000	28	0.377		
	14,412,000	19	0.177		
	4,293,000	17	0.396		
	8,394,000	38	0.453	0.367*	0.089

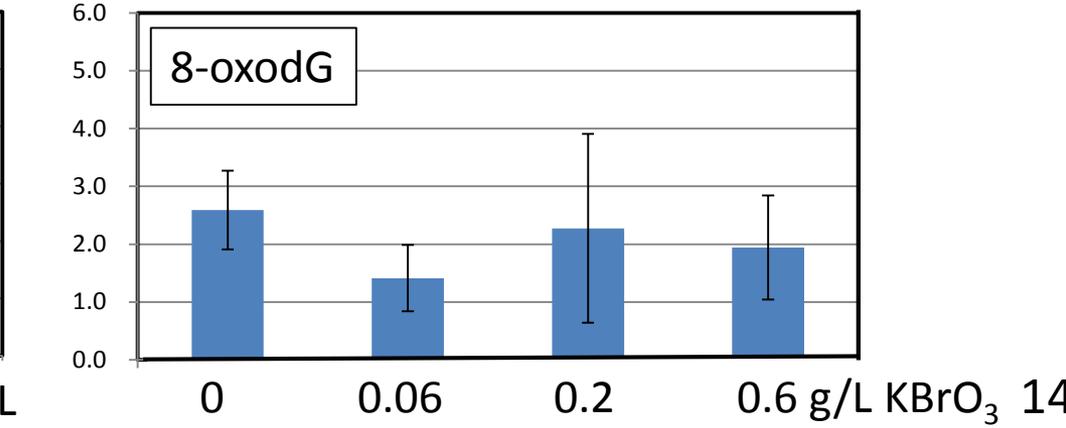
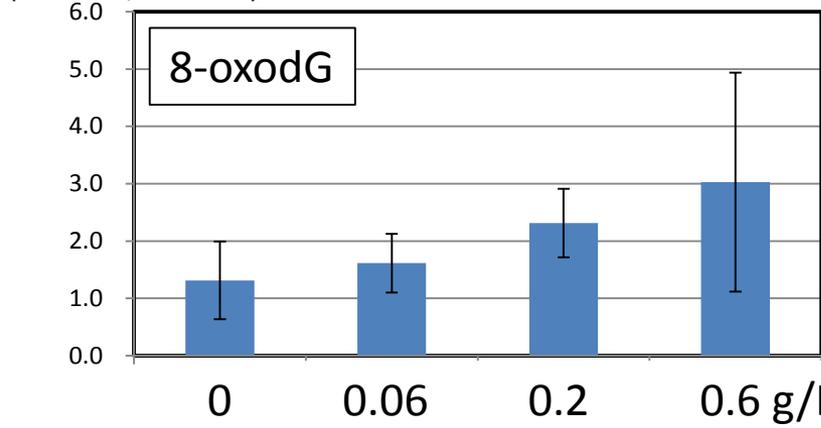
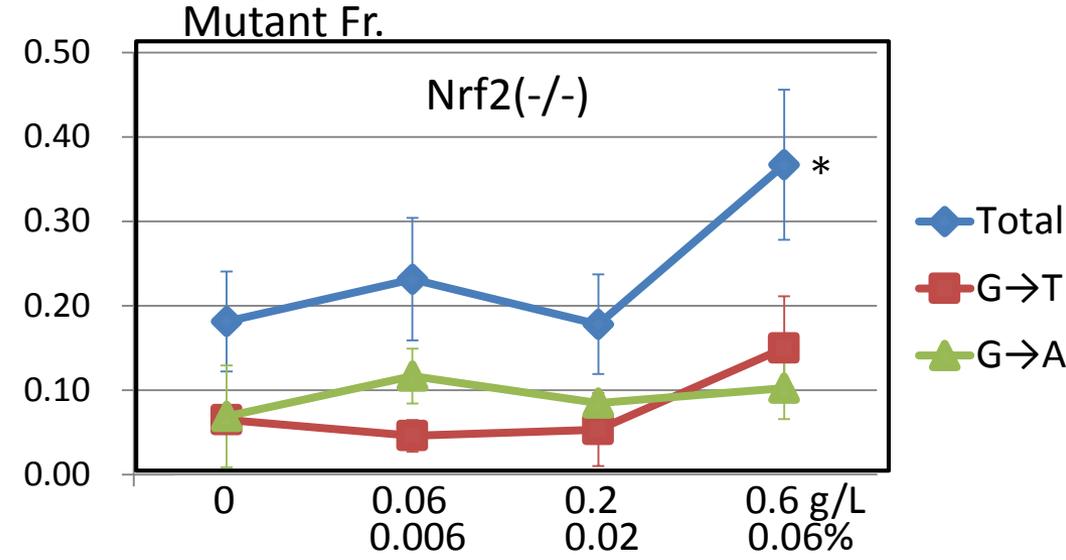
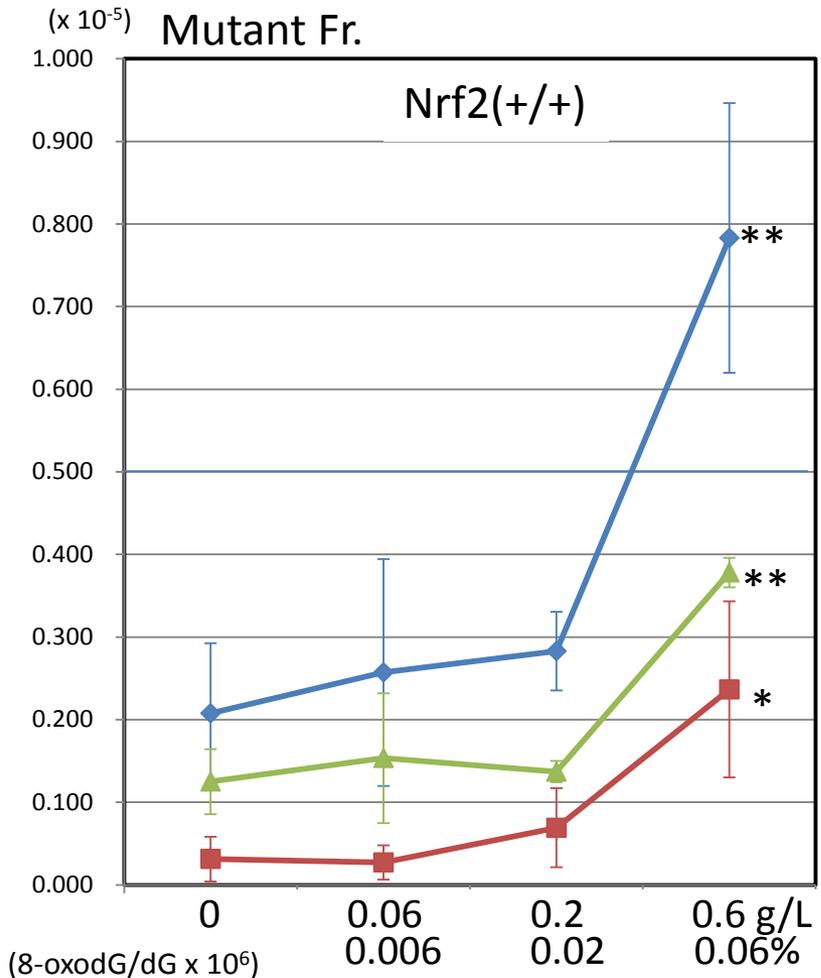
有意な増加:
閾値の存在

+/+より突然変異頻度は低い

G→T変異とG→A変異の誘導

Nrf2(+/+): 0.6 g/L KBrO₃投与により、G→T変異とG→A変異は共に有意に増加。8-oxodGの生成は用量に依存して増加。0.2 g/Lが実質的閾値。

Nrf2(-/-): G→T変異と8-oxodGの生成は対照群でも(+/+)に比べ高いレベル。KBrO₃投与でも有意に増加しない。腫瘍誘発も観察されない。



◆ Total
 ■ G→T
 ▲ G→A

gpt遺伝子上の突然変異誘導位置

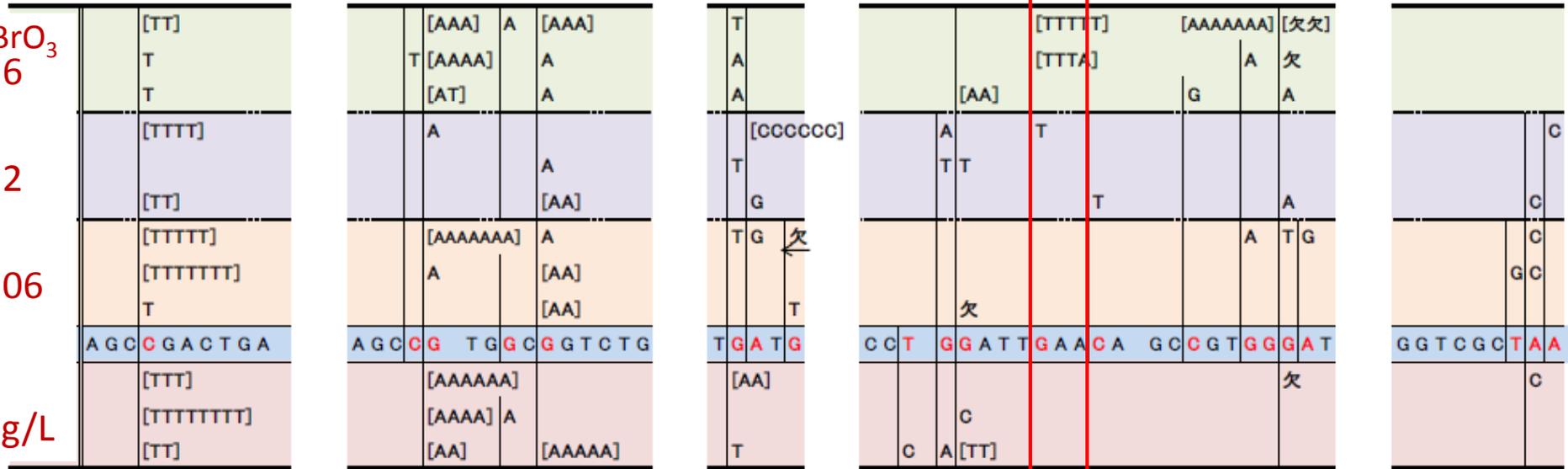
Nrf2(+/+)

KBrO₃
0.6

0.2

0.06

0 g/L



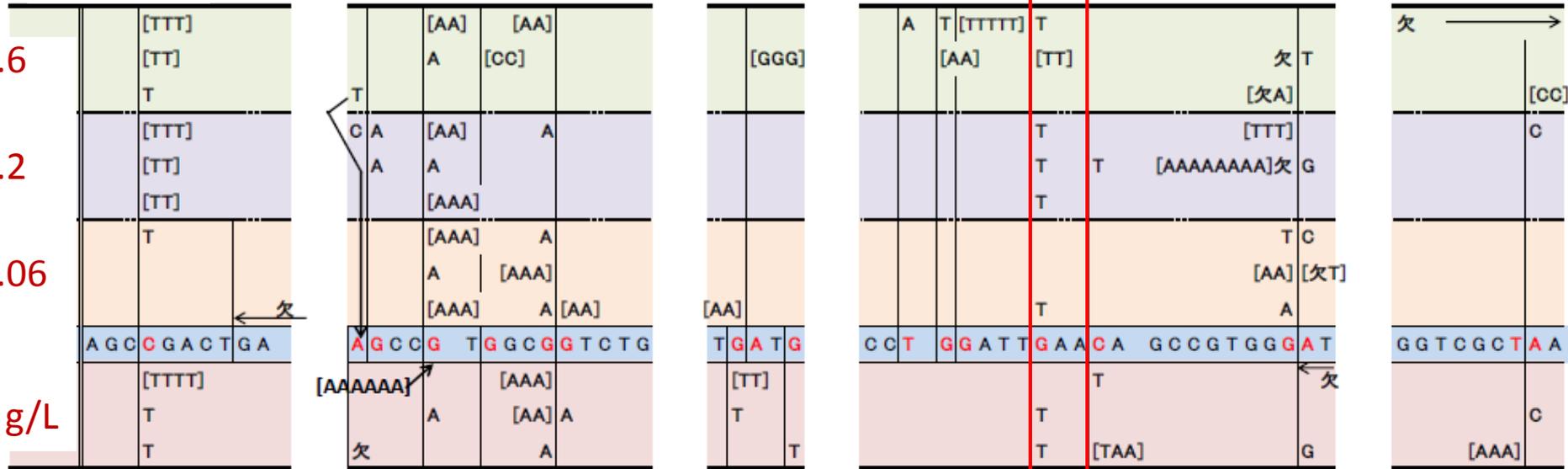
Nrf2(-/-)

0.6

0.2

0.06

0 g/L



64

110 115

120

261

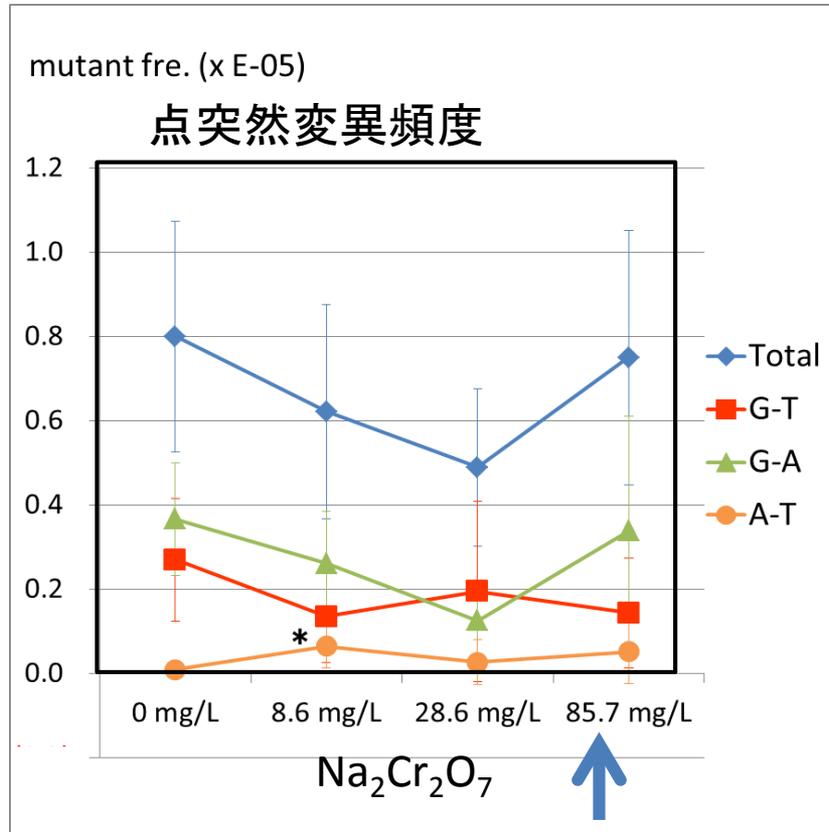
420

15

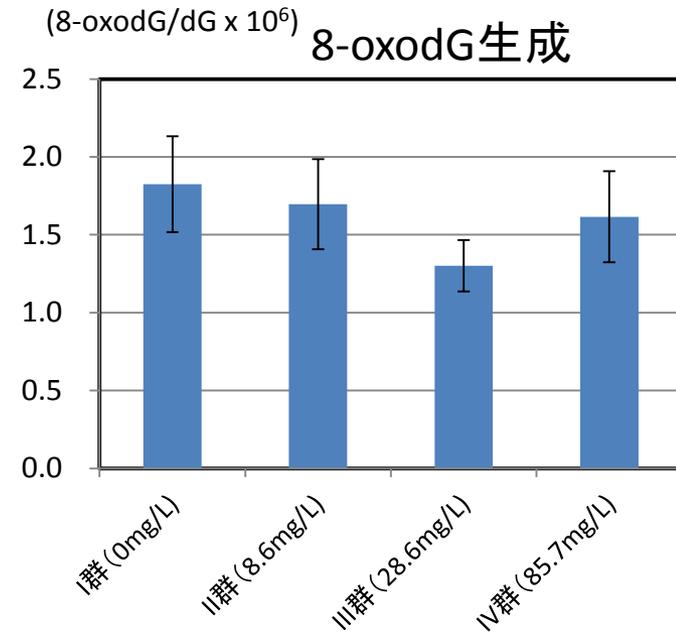
459

406: **GAA**が活性酸素種のHot spot

重クロム酸ナトリウム(90日間飲水投与)がgpt delta マウス小腸内突然変異誘導に及ぼす影響



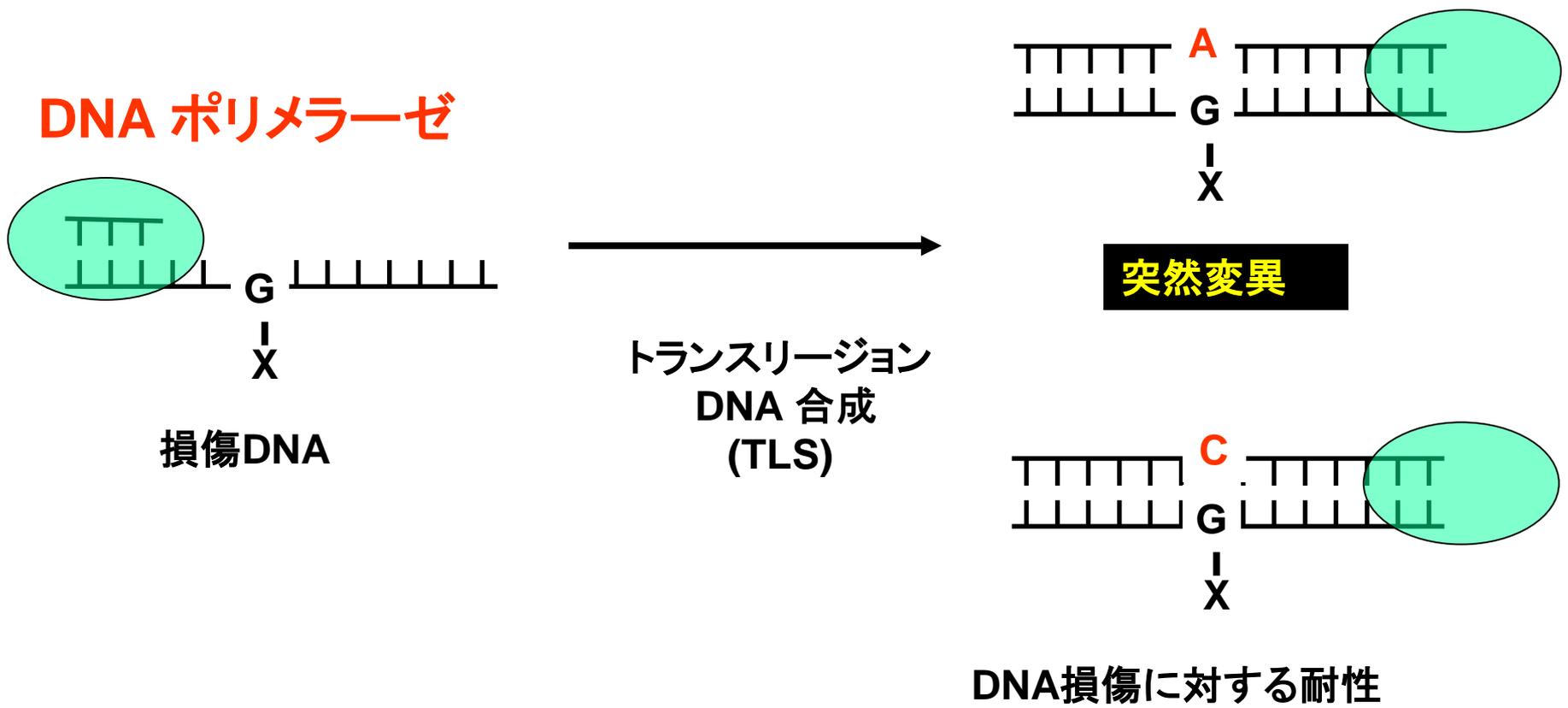
小腸に腫瘍を誘発する用量



腫瘍を誘発する用量で重クロム酸ナトリウムを投与しても、点突然変異は誘導されない。

8-oxodG生成を原因とする点突然変異誘導は重クロム酸ナトリウムの腫瘍誘導の主要な原因ではない。DNA鎖切断などが考えられる。

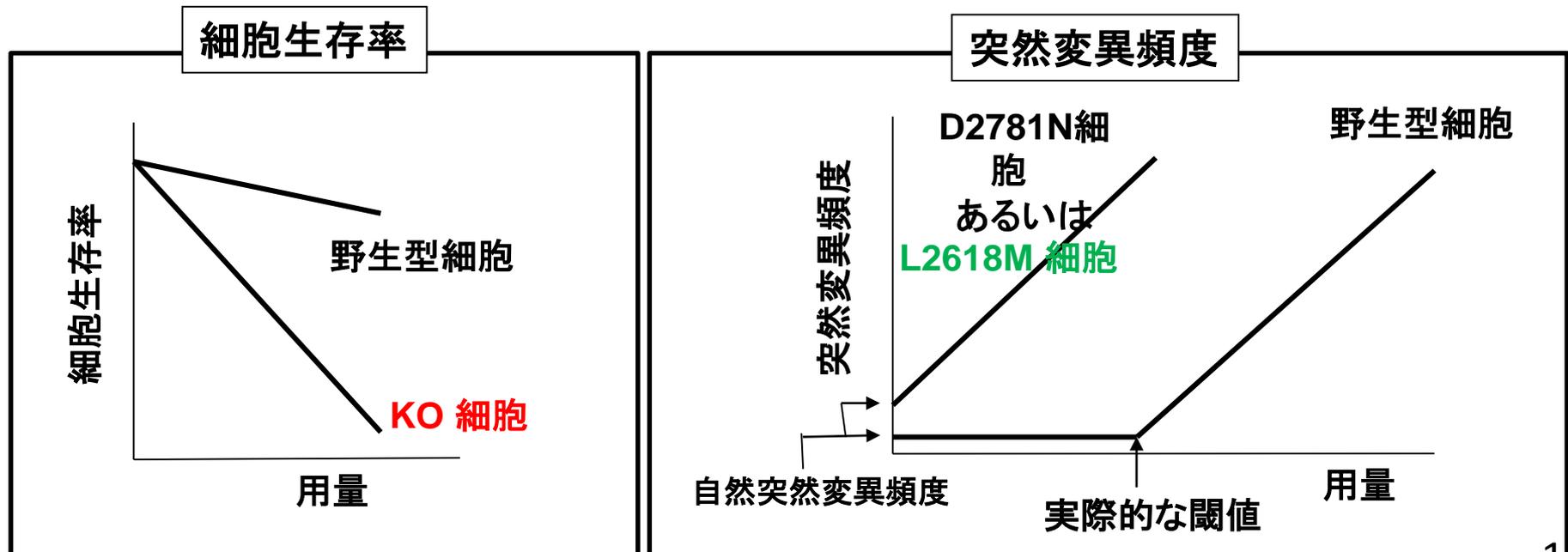
トランスリージョンDNA合成は、 突然変異の誘発と抑制に重要な役割をはたしている



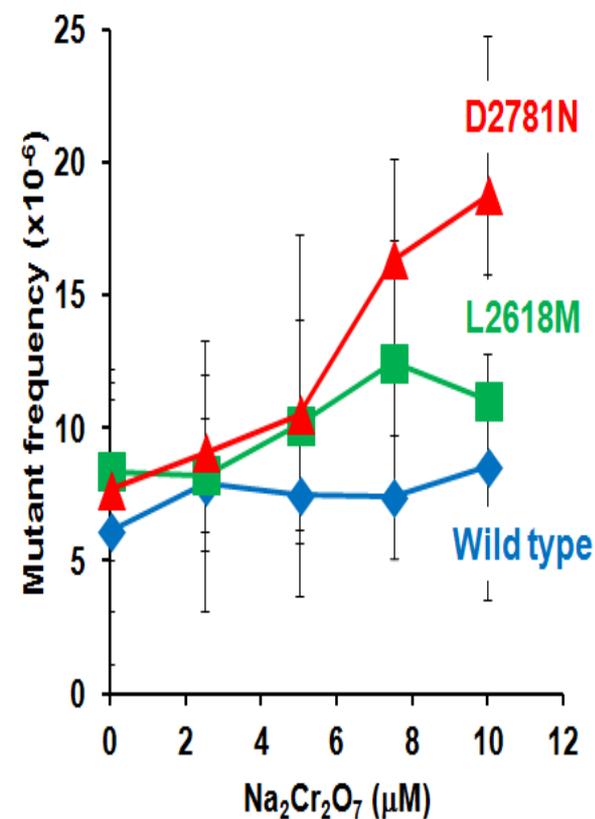
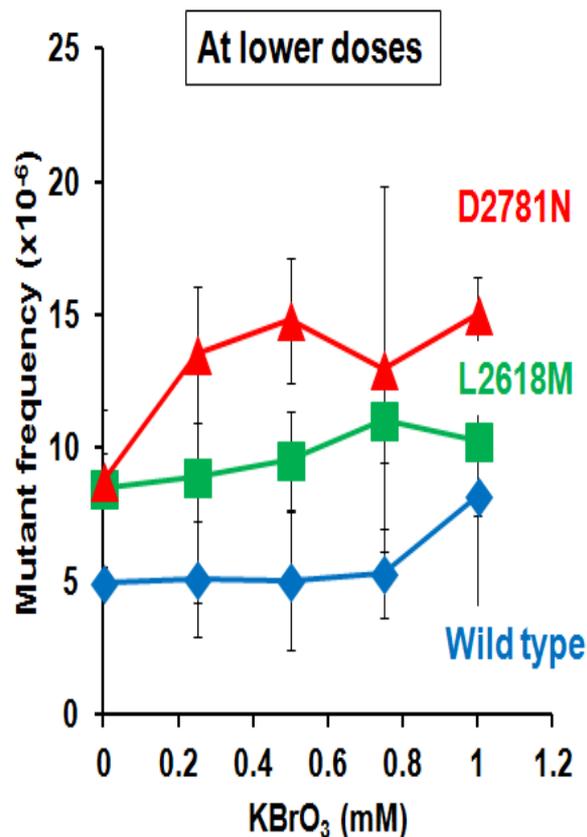
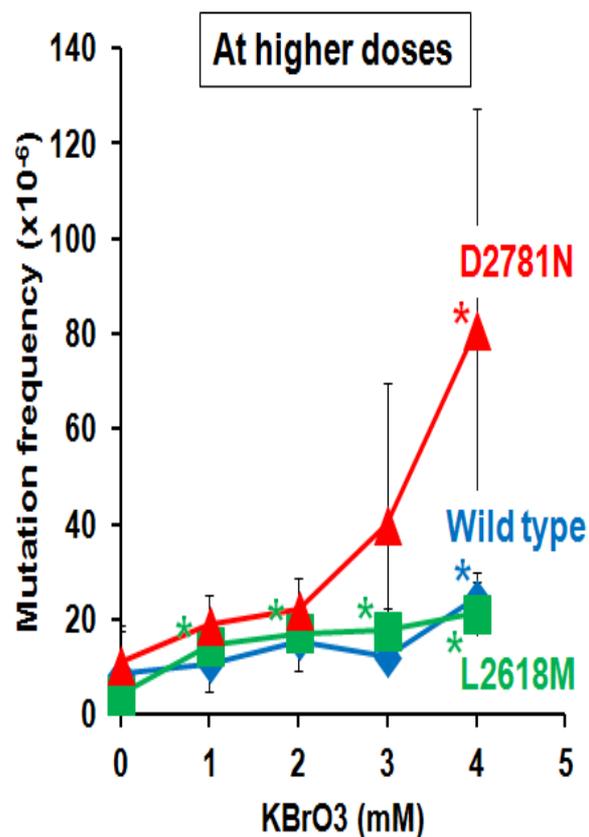
TLSにおいて中心的な役割を果たすDNAポリメラーゼ ϵ (ゼータ)のDNAポリメラーゼ活性を修飾したヒト細胞株の樹立

DNAポリメラーゼ ϵ が遺伝毒性の実際的な閾値形成に寄与しているかを検討するため

- (1) DNAポリメラーゼ ϵ を欠損したヒト細胞株(KO細胞)
 - (2) DNAポリメラーゼ ϵ の活性が減弱したヒト細胞株(D2781N)
 - (3) DNA合成の忠実度が低下したDNAポリメラーゼ ϵ を発現するヒト細胞株(L2618M)
- を樹立した。

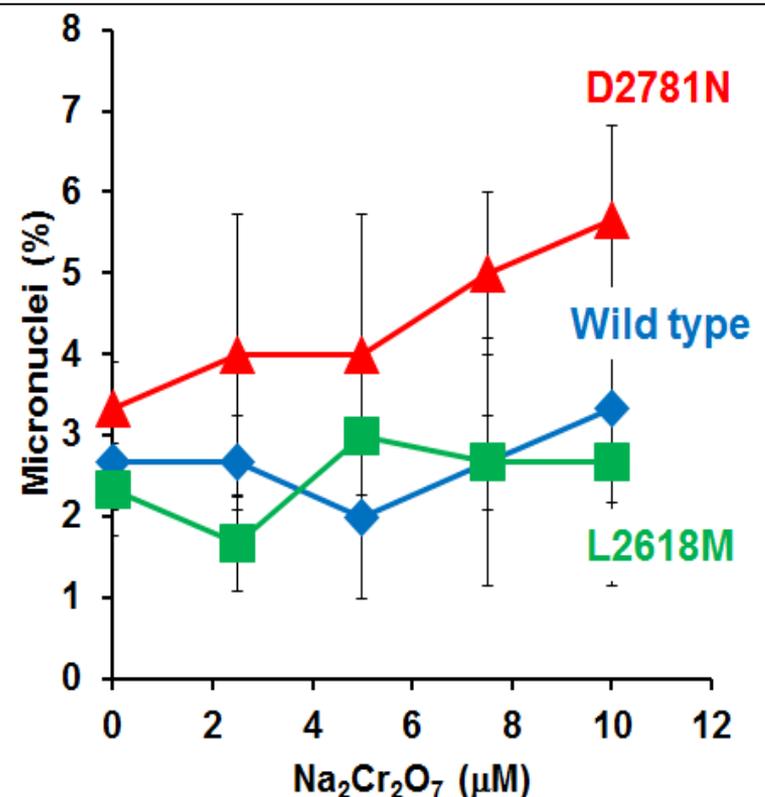
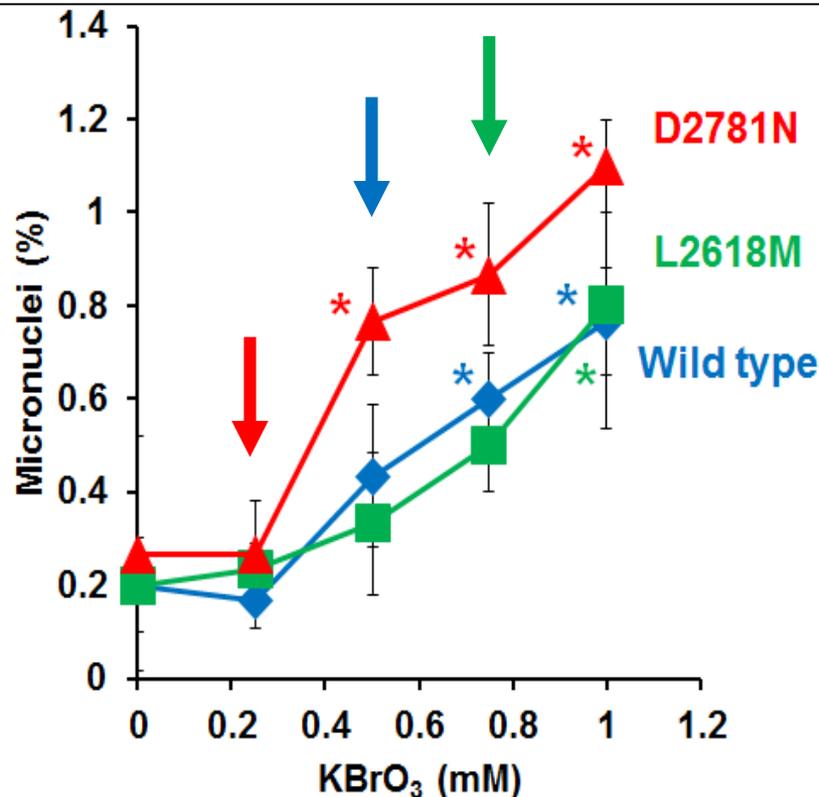


DNAポリメラーゼと活性の減少したD2781N細胞は、 臭素酸カリウム、重クロム酸ナトリウムによるTK突然変異誘発作用 に関して野生型細胞やL2618M細胞よりも高い感受性を示した



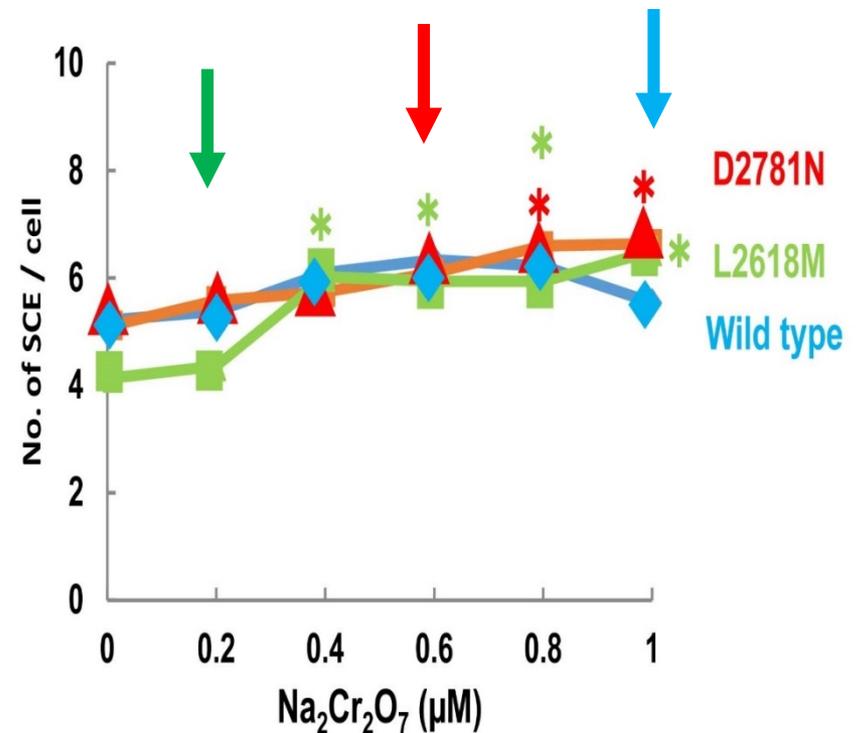
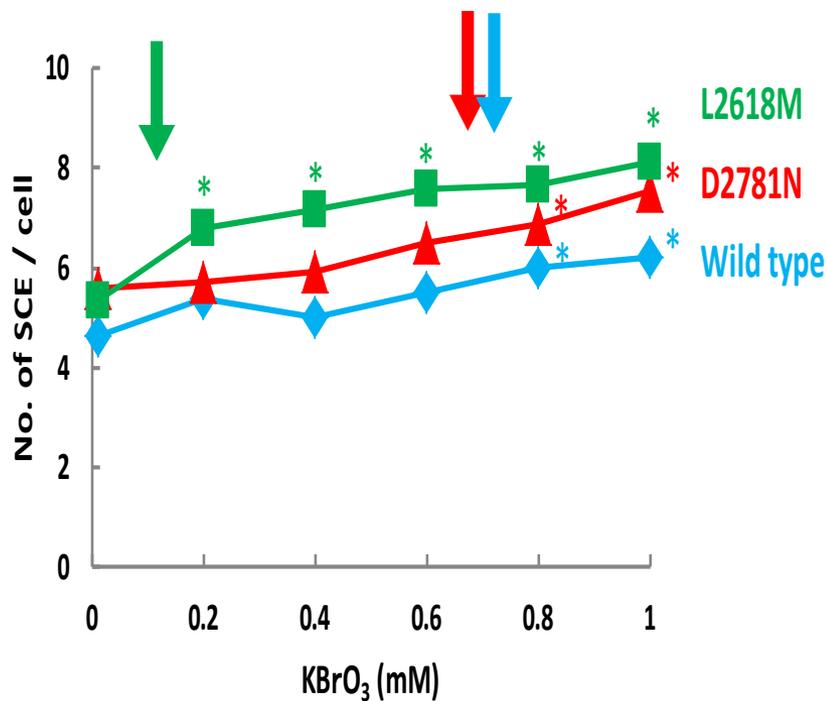
小核誘発に関しても、D2781N細胞が野生型細胞やL2618M細胞よりも高い感受性を示した

臭素酸カリウムに関し、無処理群に対し小核誘発頻度が有意に増加しなかった最高用量を「実質的閾値」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。（「**実質的閾値**」の低下）



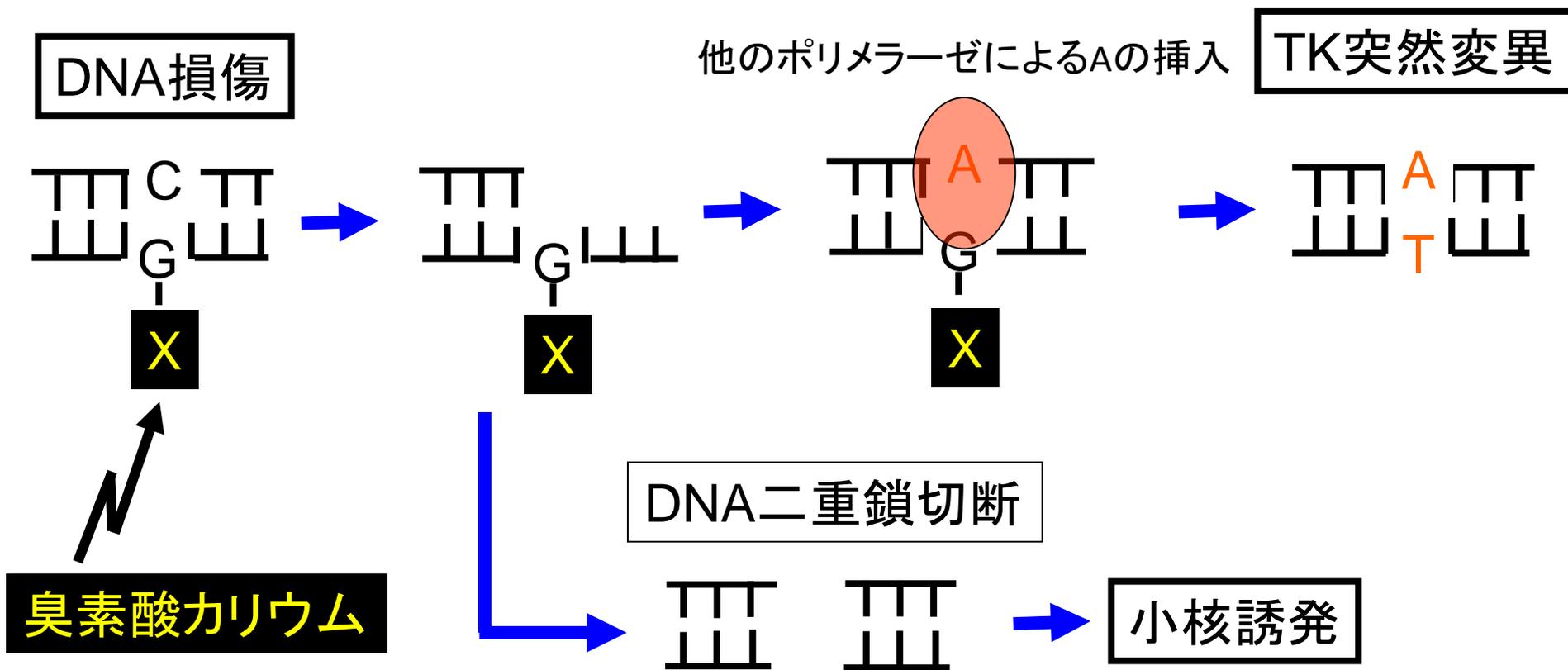
SCE誘発に関しては、 L2618MがD2781N、野生型株よりも高い感受性を示した

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「実質的閾値」とすると、 KBrO_3 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「実質的閾値」があるものと考えられた。また $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ に関しては、L2618Mでは0.2 μM 以下、D2781Nでは0.6 μM 、および野生型細胞では1.0 μM 以上に「実質的閾値」があるものと考えられた。**(実質的閾値の低下)**



DNAポリメラーゼは、臭素酸カリウムによる突然変異と小核の誘発に関して防護的な役割を果たし、「実質的閾値」の形成に関与している可能性が示唆された

DNAポリメラーゼの活性が減弱していると、点突然変異とDNA二重鎖切断が増大する



重クロム酸ナトリウムの作用に対しても同様の役割

まとめ

・ *Mutyh*ノックアウト(-KO)マウス： 臭素酸カリウムの作用により、野生型に比べて高頻度に、腫瘍が誘発される。実質的な閾値(0.5 g/L)が存在。突然変異の解析でも特徴的なG:C→T:Aトランスバージョン型の変異の上昇が観察される。

・ DNAポリメラーゼの活性が低下したヒト細胞： 正常細胞に比べて、臭素酸カリウムの誘発遺伝毒性が増強される。実質的閾値が存在。

⇒ 酸化DNA損傷修復系とトランスリージョンDNA合成系の2つの系の活性が、酸化ストレスの作用の実質的閾値を決定する要因であることが示唆された。

・ *Nrf2*-KOマウス： 突然変異誘発は増強されなかった。

⇒ 抗酸化酵素活性は実質的閾値の大きな決定要因ではない。

⇒ 但し、小腸上皮細胞の増殖抑制のため、突然変異頻度が上昇せず？

重クロム酸ナトリウム(他の酸化ストレス誘導剤)の影響

DNAポリメラーゼ活性低下細胞では、臭素酸カリウムばかりでなく‘重クロム酸ナトリウム’の作用による遺伝毒性への感受性が高くなる。

*gpt delta*マウスでは、重クロム酸ナトリウムは点突然変異を誘導しない。

⇒ 活性酸素種により生成されたDNA鎖損傷(切断)が、トランスリージョンDNA合成系の働きで防護されることにより、実質的閾値が形成されている？

⇒ *gpt delta*マウス(Spi assay; deletionのassay法)での検証が必要

まとめ(2)

gpt deltaマウスによる解析

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。

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。

⇒ 活性酸素種生成は、体内での点突然変異誘導の原動力となっており、点突然変異誘導の閾値を規定する要因の一つであることが示唆された。(閾値形成のMode of Action)

G:C→T:A変異が誘導される臭素酸カリウム(0.6 g/L)用量に近い用量(0.5 g/L)で、マウス小腸での腫瘍誘発は観察されないものの、1 g/Lで腫瘍は観察される。

Mutyh-KOマウスでも、低用量(0.5 g/L)では、G:C→T:A変異が野生型に比べると上昇しているものの、腫瘍誘発は観察されない。

⇒ 活性酸素種的作用による8-oxodG生成を防ぐ(DNA損傷を防ぐ)分子機構以外にも、腫瘍発生を防ぐ(閾値形成に関わる)機構は存在し、これを同定する必要がある。