

論文の内容の要旨

氏名：福田 隆之

博士の専攻分野の名称：博士（薬学）

論文題名：Ames 試験陽性物質に対するフォローアップ評価法に関する研究

—TK6 細胞及びその修復系遺伝子欠損株を用いた新しい遺伝毒性評価法の開発—

【背景及び目的】

遺伝毒性とは化学物質や UV 及び放射線などの物理的因子が、DNA や染色体あるいはそれらと関連するタンパク質に遺伝的变化をもたらす現象を示す。遺伝毒性が体細胞に生じた場合は発がんのリスクとなり、生殖細胞に生じた場合は遺伝性疾患の原因となる。遺伝的变化（エンドポイント）は DNA 損傷、染色体異常及び遺伝子突然変異に大別され、これらは細菌、細胞あるいは動物を用いた遺伝毒性試験によって評価される（図 1）。医薬品の遺伝毒性ガイドライン ICH S2(R1)は承認申請では細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）の結果が陰性であることを必須としている。一般に、Ames 試験陽性物質は DNA に直接的に作用することで、突然変異を誘発し、その反応性には閾値がないと考えられている（ICH M7 ガイドライン、図 2）。すなわち、医薬品等の

承認申請において Ames 試験陽性物質は DNA 反応性物質とみなされるため、発がんリスクの観点から開発中止が妥当と考えられている。こうした状況下でも薬効面から有用な化合物の開発を継続する場合、そのフォローアップ試験としてトランスジェニック動物を用いる遺伝子突然変異試験（TGR 試験、OECD TG488）が規制当局から要求されることがある。しかし、TGR 試験はコストの

負担が非常に大きく（Ames 試験の 20～30 倍）、開発スケジュールの大幅な遅延も余儀なくされ、更には多くの動物を追加使用することから動物福祉における 3Rs 原則の点からも推奨できない。

Tweats らはフェキシニダゾールが細菌特異的なニトロリダクターゼによって代謝活性化されることを実証しており（Mutagenesis, 27(5): 523–532, 2012）、Ames 試験陽性が細菌特異的な反応で、かつヒトに対する発がんリスクが低いことを作用機序に基づき証明できれば、承認申請において開発継続根拠となり得ることを示している。Ames 試験とげっ歯類発がん性試験結果の相違は、DNA 修復機構、酸化ストレスからの防御機構及び代謝反応などの種の違いに起因すると考えられている。ヒト DNA 修復酵素、p53 タンパク質及び薬物代謝酵素の発現が細菌とは異なり正常であるヒトリンパ芽球細胞 TK6 の遺伝毒性試験への応用は、Ames 試験陽性結果のヒトへの外挿性を考慮する上で重要であると考えられる。

そこで、本研究では遺伝毒性機序解明に主眼を置き、TK6 細胞及びその DNA 修復系遺伝子欠損株を用いることで、Ames 試験陽性により開発中断していた有用な医薬品候補化合物をレスキューし得る評価法の開発を目的とした。

【実験材料及び方法】

【実験 1】

Ames 試験陽性/げっ歯類発がん性試験陰性の 10 物質（表 1）において、短時間処理法（4 時間処理）及び連続処理法（24 時間処理）による TK6 アッセイを行った（図 3）¹⁾。細胞毒性の指標には Relative survival (RS) を用い、細胞毒性を示した場合、本試験における最高用量の RS が 10～20%となるよう用量設定し

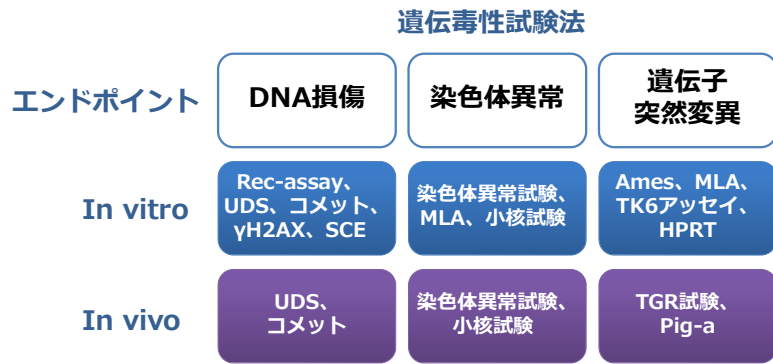


図1 遺伝的エンドポイントと遺伝毒性試験

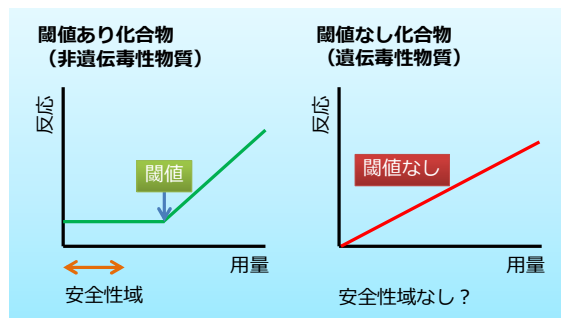


図2 遺伝毒性物質における閾値なしのモデル

た。結果の判定には遺伝子突然変異の指標として Mutant Frequency (MF) を大森らの方法 (Mutat. Res. 517, 199-208, 2002) によって統計解析した。連続処理法のみで陽性を示し、低用量で明確な用量依存性を示した 4-Nitroanthranilic acid について、0、400 及び 800 $\mu\text{g/mL}$ の用量を対象にプロテオミクス解析を行った。

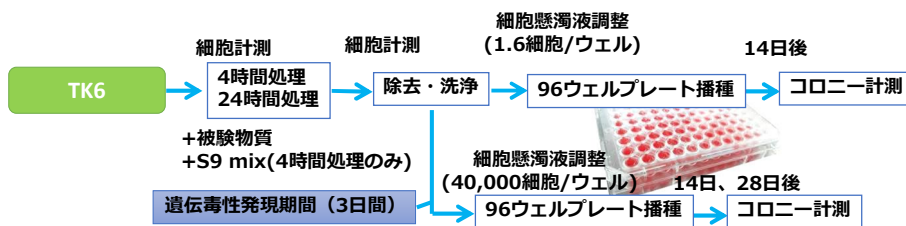


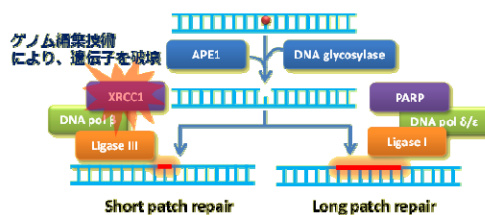
図3 TK6アッセイの作業フロー

【実験 2】

実験 1 より、TK6 アッセイ単独では遺伝毒性誘発機序に関する詳細な情報を得ることは困難であった。申請者はヒトにおいて DNA 修復機構の中核的役割を担う塩基除去修復 (BER) 及びヌクレオチド修復 (NER) に着目し、これらの遺伝子を二重に欠損した XRCC1^{-/-}/XPA^{-/-}細胞を従来の TK6 アッセイに組み込むことで、広範囲の化学物質の遺伝毒性をより高感度かつ特異的に評価でき、その作用機序も解析できる新しい遺伝毒性システム(改良型 TK6 アッセイ)の開発を目指した (図 4)。

本研究では Ames 試験が陽性あるいは不確かな結果を示す化学物質：N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (NEDA)、p-phenylenediamine (PPD)、auramine 及び malachite green (MG)に対して改良型 TK6 アッセイを行った²⁾。実験方法は実験 1 と同様である。

塩基除去修復機構におけるXRCC1の破壊



ヌクレオチド除去修復機構におけるXPAの破壊

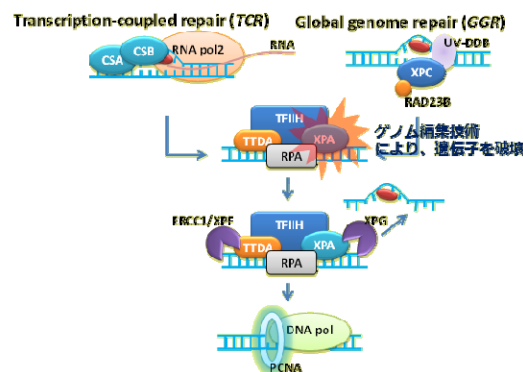


図4 BER及びNER経路とゲノム編集による標的遺伝子の破壊

【実験 3】

実験 2 において、遺伝子欠損細胞の遺伝毒性試験への利用は、従来法では得られなかった遺伝毒性メカニズムの新たな切り口を提供した。NER 経路には全ゲノム型ヌクレオチド除去修復 (GG-NER) と転写共役型ヌクレオチド除去修復 (TC-NER) の

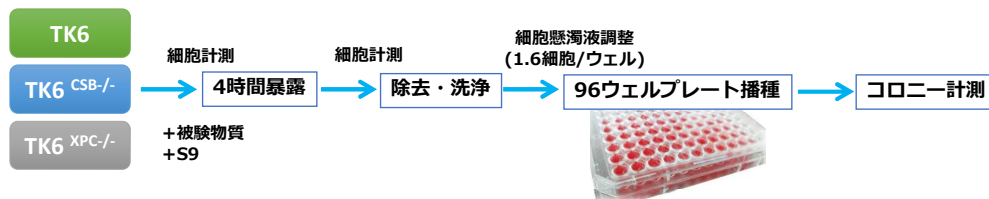


図5 GG-NER/TC-NERアッセイの作業フロー

2つのサブ経路 (図 4) が存在するが、これらの機能不全が遺伝毒性物質存在下でどのような影響を受けるかは未だ不明である。本実験では GG-NER では XPC 遺伝子を、TC-NER では CSB 遺伝子をそれぞれ CRISPR/Cas9 により欠損した XPC^{-/-}細胞及び CSB^{-/-}細胞を作製した。実験では NER 経路のいずれかで修復されることが既知である ultraviolet C (UVC) light、benzo [a] pyrene (B[a]P)、heterocyclic amine (MeIQx、PhIP)、 γ 線及び 2-acetylaminofluorene (2-AAF)を用いて、野生株、XPC^{-/-}細胞及び CSB^{-/-}細胞における感受性の比較実験を行った (図 5)。野生株に対して、毒性指標である RS の有意な低下を示した場合、当該遺伝子が関与する修復経路に影響しているものとみなした。

【結果及び考察】

【実験 1】

2,5-Diaminotoluene 及び Iodoform の 2 物質はすべての処理法で陰性を示した。本結果から、TK6 アッセイの Ames 試験陽性物質に対するレスキュー率は 20%と限定的であったが (表 1)、Ames 試験とげっ歯類発がん性試験における陽性不一致 (偽陽性) 率が約 20%であることを考えると、妥当な結果である。陽性を示

した化合物のうち、HC Blue No.2 及び 4-Nitroanthranilic acid は連続処理法のみで陽性を示した。この原因を探る目的で 4-Nitroanthranilic acid の曝露終了後の細胞沈査についてトキシコプロテオミクス解析を行った。その結果、連続処理法では *in vitro* 特有の酸化ストレスに関連するタンパク質発現の増加が認められた。長時間曝露条件では、酸化ストレスの増加が二次的に DNA 損傷を誘発している可能性が示唆された。したがって、標準的な TK6 アッセイのみではレスキューで

表1 Ames試験陽性/げっ歯類発がん試験陰性物質におけるTK6アッセイの結果

No.	Chemical Name	CAS No.	TK mutation assay ^a			Bacterial reverse mutation assay	
			Without S9	With S9	Long term	Without S9	With S9
1	4-(Chloroacetyl)-acetanilide	140-49-8	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos
2	2-(Chloromethyl) pyridine HCl	6959-47-3	Pos	Pos	NP	Pos	Pos
3	2,6-Diaminotoluene	823-40-5	Neg	Pos	Pos	Neg	Pos
4	2,5-Diaminotoluene	95-70-5	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos
5	HC Blue No.2	33229-34-4	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos
6	8-Hydroxyquinoline	148-24-3	Neg	Pos	NP	Neg	Pos
7	Iodoform	75-47-8	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos
8	4-Nitroanthranilic acid	619-17-0	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos
9	1-Nitronaphthalene	86-57-7	Pos	Pos	NP	Pos	Pos
10	4-Nitro-o-phenylenediamine	99-56-9	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos

^aPerformed in this study. NP Not applicated

きな Ames 試験陽性物質でもプロテオミクス解析のような新技術を融合することで、遺伝毒性陽性のメカニズムが化学物質の直接的な作用か、酸化ストレスなどの二次的作用かを区別ができるものと考えた。

【実験 2】

次に申請者はヒト DNA 修復系を完全に破壊した細胞で陰性を示せば、細菌でみられた陽性反応は DNA 損傷に依存しない結果であると考え、遺伝子欠損細胞 (XRCC1^{-/-}/XPA^{-/-}細胞) を用いた改良型 TK6 アッセイ

表2 改良型TK6アッセイとAmes試験及び発がん性試験の比較

化学物質名	CAS No.	Ames	発がん性	TK6アッセイ		ヒト細胞における作用機序		
				TK6	XRCC1 ^{-/-} /XPA ^{-/-}	酸化的 DNA 損傷	アルキル化 損傷	バルキー DNA 付加体
NEDA	1465-25-4	陽性	陰性	陰性	陰性	関連性なし	関連性なし	関連性なし
PPD	106-50-3	陽性	陰性	陰性	陰性	関連性なし	関連性なし	関連性なし
Auramine	2465-27-2	陽性	陽性	陽性	陽性	関連性あり	関連性あり	関連性あり
MG	569-64-2	陽性	陰性	陰性	陰性	関連性なし	関連性なし	関連性なし

イの開発に取り組んだ。その結果を表 2 に示す。

NEDA は Ames 試験の陽性結果に反して両細胞で陰性を示したことから、げっ歯類発がん性試験の陰性結果と一致して、哺乳類細胞では非遺伝毒性非発がん物質である可能性を強く示唆した。ヒトと細菌ゲノムの酸化ストレスに対する感受性相違の原因としては、ゲノムの高次構造の違いに起因する可能性があげられる。大腸菌ゲノムはクロマチン構造を持たないのに対して、真核生物はクロマチン構造を形成し、ダイナミックな構造変化によって複製・転写・修復まで複雑に制御されている。この構造の相違が DNA 損傷の感受性の違いから修復機構や効率にも影響していると考えられる。

同様に PPD も両細胞で陰性であった。PPD は活性酸素種共存下で酸化的 DNA 損傷を誘発することが知られているが、XRCC1^{-/-}/XPA^{-/-}細胞は酸化的 DNA 損傷の修復に必要な BER/NER 両経路を欠損しているにもかかわらず陰性を示したことから、PPD はヒト生理的条件下の内因性の活性酸素レベルでは酸化的 DNA 損傷やバルキーDNA 付加体形成を誘発しないことが示唆された。

オーラミンは、ジフェニルメタン系色素で、発がん性を示す可能性が指摘されている。野生株に比較して XRCC1^{-/-}/XPA^{-/-}細胞では MF が 3~4 倍に増加したことから、改良型 TK6 アッセイはオーラミンに対する検出感度を著しく向上させた (図 6)。両細胞の比較から、オーラミンは哺乳類細胞において BER や NER によって修復される可能性のある酸化的 DNA 損傷やバルキーDNA 付加体

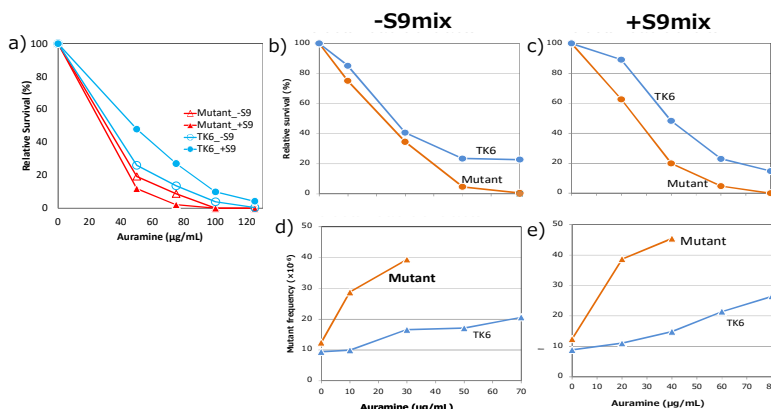


図6 オーラミンのTK6アッセイの結果

a) 用量設定試験 (生存率)、b) 本試験 短時間処理法 非代謝活性化 (生存率)、c) 本試験 短時間処理法 代謝活性化 (生存率)、d) 本試験 短時間処理法 非代謝活性化 (突然変異)、e) 本試験 短時間処理法 代謝活性化 (突然変異)

形成を誘発することが示された。

MG は活性酸素生成を促進することで細胞毒性を示し、酸化 DNA 損傷を誘発する機序が提唱されている。本研究は *in vivo* 試験での評価と一致して MG の突然変異誘発性を陰性と判定したことから、MG は活性酸素による遺伝毒性発現機序を有さないと考えられた。

原核生物から真核生物まで高度に保存された DNA 修復機構である BER/NER 経路の機能喪失は、化学物質の遺伝毒性誘発能の有無を理解するのみならず、機序解明に有用であることが明らかとなった。

【実験 3】

GG-NER および TC-NER 欠損細胞に対する毒性の結果を図 7 に示す。CSB^{-/-}細胞は UVC、B(a)P、MeIQx 及び PhIP に対して高感受性を示した。一方、XPC^{-/-}細胞は野生株と比較して UVC 及び PhIP に対して高感受性を示したが、B(a)P と MeIQx に対しては感受性を示さなかった。他の遺伝毒性物質とは対照的に PhIP に対する XPC^{-/-}細胞の感受性は、CSB^{-/-}細胞よりも有意に増加した。γ線と 2-AAF の毒性は、XPC と CSB のどちらを破壊しても、細胞間で感受性の差は認められなかった。これらの結果は、Ames 試験陽性物質における損傷が NER のどちらの経路に強く依存して修復されるかを判定するのに有用であり、発がん物質としての個体への作用推定を可能にする。

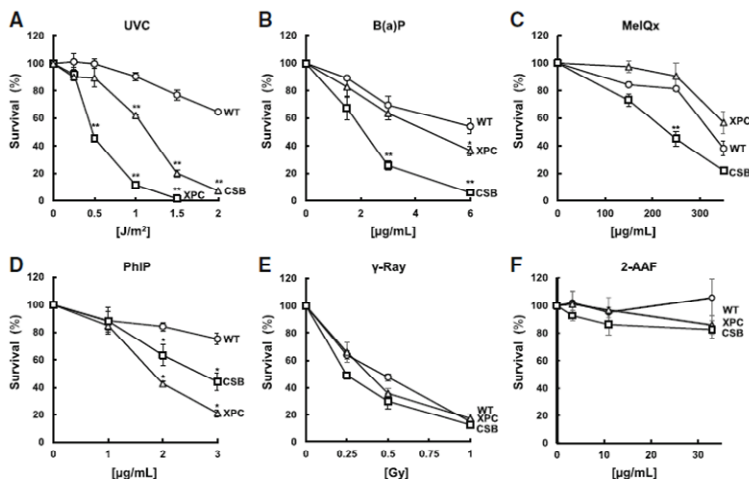


図7 TK6、CSB^{-/-}細胞及びXPC^{-/-}細胞における遺伝毒性因子に対する細胞毒性
Cytotoxicity of genotoxic agents in XPC- and CSB-deficient human TK6 cells. Survival of WT (circles), XPC^{-/-} (triangles), and CSB^{-/-} (squares) cells was shown after exposure to UVC (a), B(a)P (b), MeIQx (c), PhIP (d), γ-ray (e), and 2-AAF (f). Values presented are means ± SEM of 2–4 independent experiments. Experiments were performed as described in Materials and Methods. Significant differences are indicated by asterisks (**p < 0.01, *p < 0.05)

【結論】

本研究より、改良型 TK6 アッセイは Ames 試験陽性物質がヒトに DNA 損傷を誘発するか否かをメカニズムベースで判断できる強力なフォローアップ試験となり得ることを見出した。標準的な TK6 アッセイではレスキューできない医薬品でもプロテオミクス解析を組み合わせることで、DNA 反応性によらない二次的影響を排除できる可能性が示唆された。さらに、XRCC1^{-/-}/XPA^{-/-}細胞で陽性を示した医薬品において、XPC^{-/-}細胞及び CSB^{-/-}細胞を併用して評価に利用することで、発がん性の有無のみならず、メカニズムベースで個体への具体的な影響までを推定できる可能性が示された。本研究の成果は、Ames 試験陽性により中断された医薬品候補化合物の再開発を促すのみならず、追加で実施する *in vivo* 遺伝毒性試験をも回避できる可能性があり、結果として動物福祉への配慮にも繋がるのが期待できるものである。

参考文献

- 1) M Yasui, T Fukuda, et al. Weight of evidence approach using a TK gene mutation assay with human TK6 cells for follow-up of positive results in Ames tests: a collaborative study by MMS/JEMS. *Genes Environ.*, 43(1):7, 2020.
- 2) A Sassa[†], T Fukuda[†], et al. Follow-up genotoxicity assessment of Ames-positive/equivocal chemicals using the improved thymidine kinase gene mutation assay in DNA repair-deficient human TK6 cells. *Mutagenesis*. geab025, 2021.
[†] A.S. and T.F. contributed equally to this work.
- 3) A Sassa, T Fukuda, et al. Comparative study of cytotoxic effects induced by environmental genotoxins using XPC- and CSB-deficient human lymphoblastoid TK6 cells., *Genes Environ.*, 41:15, 2019.