

論文審査の結果の要旨

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—

審査委員：(主査) 教授 戸塚 ゆ加里

(副査) 教授 加藤 孝一 教授 榛葉 繁紀

教授 小林 俊亮

医薬品を開発する際には、様々な安全性試験の実施が義務付けられている。一般に、Ames 試験陽性物質は DNA に直接作用し突然変異を誘発することから、その反応性には閾値がないと考えられている。つまり、医薬品等の承認申請において Ames 試験陽性物質は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。しかしながら、Ames 試験陽性物質の中にも有用な医薬品が多く含まれている可能性があり、細菌のみで医薬品の突然変異誘発性を決定することには疑念があることも事実である。こうした状況下で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) が規制当局から要求される場合がある。しかし、TGR 試験はコスト面や開発スケジュールの遅延、および動物福祉における 3Rs (Replacement, Reduction, Refinement) 原則の観点からも、ヒトへの外挿性の高い代替法の開発が重要な課題とされる。

本論文では、Ames 試験陽性物質のレスキューから作用機序解明までを網羅した体系的なフォローアップスキームを確立することを目的とし、ヒトリンパ芽球細胞である TK6 細胞およびその DNA 修復系遺伝子欠損株を用いた評価系開発について取り組み、以下の成果を得ている。

まず、標準的な *in vitro* 突然変異試験 (TK6 アッセイ) による Ames 試験陽性物質のフォローアップの有用性について検討した。Ames 試験陽性/げっ歯類発がん性試験陰性の 10 物質において、短時間 (4 時間) 処理法および連続 (24 時間) 処理法による TK6 アッセイを試みた結果、2 物質 (2,5-Diaminotoluene、Iodoform) がすべての処理法で明確な陰性を示し、本手法における Ames 試験陽性物質に対するレスキュー率は 20% に達することを明らかにしている。さらに、連続処理法のみで陽性反応を示した 2 化合物 (HC Blue No. 2、4-Nitroanthranilic acid) では、長時間曝露条件下における酸化ストレスの増加が二次的な DNA 損傷を誘発している可能性をトキシコプロテオミクス解析により見出した。このことから、標準的な TK6 アッセイのみではレスキューできない 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の区別が可能となることを見出した。この二次的作用を TK6 アッセイ陰性とすることで、最終的に Ames 試験陽性物質に対するレスキュー率は 40% に向上することを示した。

次に、申請者は TK6 アッセイで陰性を示す物質が科学的に妥当な陰性結果であるかを確認するため、ヒトにおいて DNA 修復機構の中心的役割を担う塩基除去修復 (XRCC1)、およびヌクレオチド修復 (XPA) 遺伝子を二重に欠損した細胞を用いた高感度型 TK6 アッセイの開発を試みた。Ames 試験陽性/げっ歯類発がん性試験陽性の 1 物質 (Auramine) に加え、Ames 試験陽性/げっ歯類発がん性試験陰性の 3 物質 (*N*-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (NEDA)、*p*-phenylenediamine (PPD)、および malachite green (MG)) について検討した結果、NEDA、PPD 及び MG は XRCC1^{-/-}/XPA^{-/-}細胞で陰性を示すことを明らかにした。この結果は Ames 試験陽性結果が細菌特異的な反応によることを示唆するものであり、ヒトでは非 DNA 反応性であることを示すものである。一方、Auramine は XRCC1^{-/-}/XPA^{-/-}細胞で陽性を示し、Ames 試験や発がん性試験との結果と合致したことから、DNA 反応性発がん物質である可能性を示唆するものである。このように、本手法を用いることで、DNA 反応性物質に対する感度を向上させるのみならず、細菌とヒトにおける DNA 修復機構の相違に基づいた特異性についても評価が可能であることを明らかにした。本研究により、標準

的な TK6 アッセイと遺伝子欠損株を組み合わせることで、Ames 陽性結果が DNA 反応性であるかを判別できる評価系を構築することに成功した。

最後に、申請者は、ヌクレオチド修復経路におけるサブ経路である全ゲノム型ヌクレオチド除去修復 (GG-NER) および転写共役型ヌクレオチド除去修復 (TC-NER) の主要遺伝子 (*XPC* 及び *CSB*) をそれぞれ欠損させた細胞株を TK6 アッセイに導入することで、上述の高感度型 TK6 アッセイにて陽性を示した場合のメカニズムベースでの評価系構築に取り組んだ。本研究では、異なる作用機序でがんを誘発する化学物質 (紫外線、電離放射線、多環芳香族炭化水素、ヘテロサイクリックアミンなど) をモデル化合物とし、細胞毒性の感受性変化を指標に、DNA 損傷誘発メカニズムの評価に使用可能かを検証した。その結果、GG-NER および TC-NER 欠損 TK6 細胞は、各種モデル化合物に対して、概ね各々の毒性発現メカニズムを反映した細胞応答を示すことを明らかにした。このことから、本手法は TK6 アッセイで陽性を示した医薬品における DNA 損傷、ひいては発がんメカニズムの一端を明らかにするために有用なツールであることが示されたことになる。

以上のように、申請者は、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を示した。また、*XRCC1*^{-/-}/*XPA*^{-/-}細胞を用いた高感度型 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。さらに、*XRCC1*^{-/-}/*XPA*^{-/-}細胞で陽性を示した医薬品においては、*XPC*^{-/-}細胞および *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を示した。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ことが期待できるものである。

よって本論文は、博士 (薬学) の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

令和 4 年 1 月 2 0 日