

遺伝子破壊細胞を使った、化学物質の生物効果をハイスループットに解析するシステム

Establishment of high-throughput screening of toxic chemical compounds

武田 俊一 (TAKEDA SHUNICHI)

京都大学・大学院医学研究科・教授



研究の概要

従来のバイオアッセイは、野生型細胞のみを使い、有害化学物質や化学物質の薬理作用を検出した。我々は、以下の目的遂行のために、遺伝子破壊細胞を使ったバイオアッセイを開発する：(1)化学物質の発がん性をハイスループットに検出し、化審法で採用；(2)アレルゲンや小胞体ストレス原因物質の同定、(3)電離放射線の発がんへの作用機序を解明。

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：生物影響

1. 研究開始当初の背景

● 有害化学物質の規制

化審法で採用されている発がん性（変異原性）化学物質の検出手法（バイオアッセイ）は、偽陽性と偽陰性が多い。この問題に対応するために、米国政府は、National Toxicology Program (NTP) が中心になって Toxicology 21 program を開始した。そして、発がん性化学物質を含めて、様々な有害化学物質を検出する新規のバイオアッセイを公募した。我々が提案した複数種類のバイオアッセイは、NTPによって採用され、その妥当性が、National Institute of Health (NIH) の附属機関、Chemical genomics Center (NCGC) において検証されている。この検証にはゴールドスタンダードケミカルライブラリーを必要とするが、そのライブラリーは米国政府しか所有していない。ゆえに、有害化学物質を検出するバイオアッセイの開発には、米国政府は、(NTP) と共同研究する必要がある。

● 遺伝子破壊細胞を使った、化学物質の生物効果の判定手法

化審法で採用されているバイオアッセイは、野生型（正常）細胞・動物を使って、有害化学物質を同定する。バイオアッセイには、偽陽性と偽陰性がある。臨床検査のように、多くのユーザー（医師）がいる場合には、どのような時に偽陽性や偽陰性がおこるかを解明できる。しかし、化審法で採用されている

バイオアッセイでは、偽陽性や偽陰性を検出しようがない。では、バイオアッセイの感度や特異性をどのように高めていけば良いだろうか？

我々の提案は、遺伝子破壊細胞（動物）を使うことである。仮に、ある化学物質に細胞を曝露したときに、DNA 損傷修復酵素の1つが欠損した細胞の方が親株（正常細胞）よりも細胞増殖速度が低下したとしよう。この実験結果から化学物質の毒性にはDNA 損傷修復酵素の機能が関係していると結論でき、その毒性は化学物質のDNA 毒性（変異原性）と推定できる。

この遺伝学的解析手法は、野生型（正常）細胞・動物のみを解析する従来の手法に比べて、以下のメリットをもっている。

- (i) DNA 損傷修復酵素欠損細胞の方が、正常細胞よりもDNA 毒性をより高感度に検出できる（偽陰性が少ない）のは自明である。
- (ii) DNA 損傷修復酵素欠損細胞の実験データを評価するときに、正常細胞を陰性対照に使えるので、偽陽性を除外できる。
- (iii) 細胞増殖速度を測定する等、ハイスループット解析に向く評価方法を使える。

2. 研究の目的

- (1) 遺伝子破壊株（ニワトリ DT40 細胞およびヒト TK6 細胞株）も使って、化学物質の発がん性をハイスループットに検出する手法を開発

- (2) 米国 NIH と共同研究して、開発した手法を改善し、そしてその妥当性を検証する。
- (3) 発がんを抑制する DNA 修復遺伝子、ミトコンドリア品質管理、小胞体ストレス応答の、各経路の遺伝子破壊細胞を作り、表現型解析する。

3. 研究の方法

- (1) DNA 修復、小胞体ストレス応答、ミトコンドリア品質管理機構の各経路の分子機構を解明する目的で、これら3つの経路に関与する遺伝子を DT40 細胞において破壊し、表現型解析する。
- (2) 化審法で規定された小核試験 (変異原性を検出) に使われるヒト TK6 B 細胞株において DNA 修復酵素の遺伝子破壊を行う。

4. これまでの成果

(1) 有害化学物質を同定するバイオアッセイを樹立: 米国立医学保健研究所 (NIH) に研究員を派遣してプロジェクトを進めている。

(2) 変異原性の作用機序解析

(2-1) 染色体検査で見つかる断裂の作用機序解明

化学物質の変異原性を証明するのに、化学物質で曝露した細胞の分裂期染色体を観察することが広く使われる。この手法を染色体検査と呼ぶ。我々は、染色体検査で見つかる断裂が、DNA 2 重鎖切断が原因でない

場合があることを証明した (Fujita, M. et al., PLoS One, 2013)。抗がん治療薬、5-FU は染色体断裂を起こす (すなわち変異原性がある) が故に、X 放射線のように DNA 2 重鎖切断を誘導することによってがん細胞を殺すと考えられてきた。その考えは、我々の研究によって、誤っていることが解明できた。

(2-2) Mus81 と XPF の機能重複

Mus81 と XPF との 2 重欠損細胞を作製することによって、両方の DNA 切断酵素が相同組換えの後期に機能し、かつ互いに相補性があることが証明できた。DNA 損傷するタイプの抗がん治療 (放射線、シスプラチン、トポデカン等) のうち、特にシスプラチンによって生じた DNA 損傷を修復する場合に、両方の DNA 切断酵素は相補し合いながら DNA 修復する (Kikuchi, K. et al., Cancer Res., 2013)。

5. 今後の計画

(1) Mre11, CtIP, DNA2 の機能解析

ニワトリ DT40 細胞で上記の遺伝子の破壊を行ったところ、予想されたものとは異なった表現型を示した。ヒト TK6 B 細胞株に

において同じ遺伝子を破壊して、DT40 での実験の再現性を確認する。

(2) 小核テストの改善

小核テストには野生型ヒト TK6 B 細胞株が使われてきた。代わりに、DNA 切断酵素の遺伝子の破壊株を使うことによって、小核テストの感度と特異性が上昇できないかを解析する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Al Abo M, Dejsuphong D, Hirota K, Yonetani Y, Yamazoe M, Kurumizaka H, *Takeda S. (2014) Compensatory functions and interdependency of the DNA-binding domain of BRCA2 with the BRCA1-PALB2-BRCA2 complex. *Cancer Res.* 74: 797-807.
2. Maede Y, Shimizu H, Fukushima T, Kogame T, Nakamura T, Miki T, Takeda S, *Pommier Y, Murai J. (2014) Differential and common DNA repair pathways for topoisomerase I- and II-targeted drugs in a genetic DT40 repair cell screen panel. *Mol Cancer Ther.* 13: 214-20.
3. Kikuchi K, Narita T, Pham VT, Iijima J, Hirota K, Islam SK, Mohiuddin M, Okawa K, Hori T, Fukagawa T, Essers J, Kanaar R, Whitby MC, Sugawara K, Taniguchi Y, Kitagawa K, *Takeda S. (2013) Structure-specific endonucleases Xpf and Mus81 play overlapping but essential roles in DNA repair by homologous recombination. *Cancer Res.* 73: 4362-71.
4. Fujita M, Sasanuma H, Yamamoto KN, Harada H, Kurosawa A, Adachi N, Omura M, Hiraoka M, Takeda S, *Hirota K. (2013) Interference in DNA replication can cause mitotic chromosomal breakage unassociated with double-strand breaks. *PLoS One* 8: e60043.
5. Sasanuma H, Tawaramoto MS, Lao JP, Hosaka H, Sanda E, Suzuki M, Yamashita E, Hunter N, Shinohara M, Nakagawa A, Shinohara A. (2013) A new protein complex promoting the assembly of Rad51 filaments. *Nat Commun.* 4: 1676.
6. Qing Y, Yamazoe M, Hirota K, Dejsuphong D, Sakai W, Yamamoto KN, Bishop DK, Wu X, *Takeda S. (2011) The epistatic relationship between BRCA2 and the other RAD51 mediators in homologous recombination. *PLoS Genet.* 7: e1002148.