

遺伝毒性の閾値の有無に関する基礎的研究

1. 研究の背景と目的

遺伝毒性とは、遺伝子の本体となる DNA や染色体に発生する DNA 損傷性や変異原性を包括的に表した言葉であり、一般的に「DNA や染色体の構造的、もしくは量的変化を引き起こす性質」を言う。代表的な遺伝毒性試験法は、エームス試験、染色体異常試験、*in vivo* 小核試験が挙げられ、医薬品を初めとする多くの化学物質の安全性を評価する上で必須の試験として義務づけられている。

遺伝毒性は重要な発がんメカニズムの 1 つであり、遺伝毒性の有無と性質（特に DNA との反応性）は、化学物質等の発がんリスク評価を大きく左右する。すなわち、DNA に作用しない非遺伝毒性発がん物質であれば一般に閾値があると考えられ、一日摂取許容量（ADI）の設定が可能である。一方、DNA 反応性を持つ遺伝毒性発がん物質と評価された場合は、使用を禁止するか、実質安全性量（VSD）や毒性学的懸念の閾値（TTC）の概念を利用した許容リスクレベルを考慮した管理が必要となる⁽¹⁾。

しかしながら、そもそも本当に遺伝毒性には閾値が無いのだろうか？ ヒトは、様々な生体防御機構（代謝解毒、DNA 修復など）を備えており、極低用量の発がん物質は、発がんリスクを上昇させないと信じられている（practical threshold；見かけ上の閾値と言う）。逆に、理論的にわずか 1 分子の DNA 損傷であつても遺伝子変異をもたらし、致命的な変異はがん原細胞を生じさせ、最終的に発がんに至るという考え方もある。しかしながら、これまでに理論ではなく実験的に、1 分子の損傷がどれくらい遺伝子変異や発がんに寄与しているかを証明した報告は無い。

そこで本研究の目的は、1 分子の DNA 損傷を TSCER122 細胞株（ヒトリンパ芽球細胞 TK6 由来）のチミジンキナーゼ遺伝子領域に部位特異的に導入させ、その損傷の遺伝的影響を解析することによって、閾値形成のメカニズムを明らかにすることである（図 1）⁽²⁾。なお本研究は遺伝毒性の閾値に関して取り組むもので、発がん性の閾値とは区別して考えなければならない。

2. 実験方法と結果

コントロールとして DNA 損傷を含まない未修飾、および酸化的 DNA 損傷（8-オキシグアニン、キサンチン、5-ブロモシトシン）の 1 分子を含む修飾ターゲティングベクターをそれぞれ作製した^(2,3)。次に、ゲノムの 1 ヶ所だけに二本鎖切断（DSB）を形成させることができる TSCER122 細胞⁽⁴⁾を用いて、先のターゲティングベクターをその DSB 部位へ相同組換えによって、各損傷をゲノム導入させた（図 1）。選択培地で 2 週間培養後、損傷が導入されたクローン細胞だけを回

収し、ゲノム DNA を抽出した。導入部位周辺を PCR で増幅後、シーケンスを行った⁽²⁾。その結果、8-オキシグアニンとキサンチンは、それぞれ G・C→T・A (5.9 %), G・C→A・T (20.5 %) の一塩基変異を主に誘発させた。一方、5-ブロモシトシンを導入した時は、703 クローン中わずか 2 細胞 (0.3 %) から G・C→C・G 変異が観察された。この 5-ブロモシトシン付加体は、既に non-mutagenic な DNA 付加体であることが *in vitro* 二層ゲル解析で報告されているが⁽⁵⁾、本研究では、解析するクローンの標本数を増やせば突然変異を検出できることが分かった。これらの結果は、たった 1 分子の DNA 損傷でも、それによる突然変異誘発頻度は決してゼロにならないことを示唆している。

3. 考察

細胞が、極めて低レベルな放射線や遺伝毒性発がん物質に暴露され、そのゲノム DNA に 1 分子の損傷が形成したことを想定し、我々はヒト培養細胞のゲノムへ損傷 1 分子を部位特異的に配置、追跡した。その結果、わずか 1 分子であっても、酸化的損傷は突然変異を誘発できることが分かった。これは、“遺伝毒性発がん物質には閾値が無い” という従来からの仮説をサポートしている。しかしながら、本研究で用いた極低用量暴露モデル系は、次の 2 つの欠点を有する。①ゲノムに導入されなかった余剰のターゲティングベクター上の損傷が細胞内に残存し、導入された損傷に対する DNA 修復が不十分だった可能性がある。②本研究は、損傷をゲノム DNA 内に直接運搬させるため、遺伝毒性発がん物質が DNA に作用する前の代謝解毒・排泄機構を考慮していないこと。以上の点から、本データだけでその仮説を完全に証明できない。よって、我々は更にデータを蓄積していく必要があると考えている。しかし、少なくとも本研究によって、ゲノム DNA 上にある酸化的損傷 1 分子の変異頻度は、決してゼロにはならないことが明らかとなった。

結論として、遺伝毒性の評価は閾値の有無に基づく定性的な評価ではなく、暴露量とリスクレベルを考慮した定量的評価が科学的且つ、現実的アプローチであると考えられる。

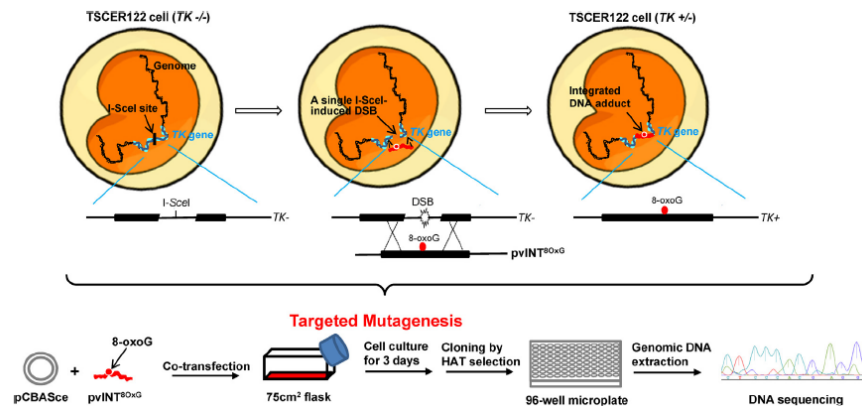


図1. DNA 付加体 1 分子をゲノムの特定部位に導入することができる極低用量暴露モデル

参考文献

- (1) 本間正充 (2009) 遺伝毒性物質に閾値はあるのか? ファルマシア 45, 143-148.
- (2) Yasui, M. *et al.* (2014) Tracing the fates of site-specifically introduced DNA adducts in the human genome. *DNA Repair* 15, 11-20.
- (3) Arakawa, T. *et al.* (2011) A polymerase chain reaction-based method for constructing a linear vector with site-specific DNA methylation. *Anal. Biochem.* 416, 211-217.
- (4) Honma, M. *et al.* (2003) Deletion, rearrangement, and gene conversion; genetic consequences of chromosomal double-strand breaks in human cells. *Environ. Mol. Mutagen* 42, 288-298.
- (5) Sassa, A. *et al.* (2011) Mutational specificities of brominated DNA adducts catalyzed by human DNA polymerases. *J. Mol. Biol.* 406, 679-686.