

化学物質の新規リスク評価のためのライブシングルセル解析手法の開発

大阪大学大学院基礎工学研究科

倉岡 功

Risk assessment studies of chemical substances that induce DNA lesions are important, because DNA lesions in genomic DNA result in cancer in humans. Many classes of DNA lesions induced by chemical agents are eliminated via DNA repair nucleotide excision repair (NER) for the maintenance of genomic integrity. Ames test is one of the most commonly applied tests in toxicology. In the test, NER-deficient mutant bacterial cells are used to detect the mutagenic capacity of chemical substances. Unscheduled DNA synthesis test is also popular test for toxicology and measures DNA repair synthesis after excision of oligonucleotides containing DNA lesions during NER. And in human, individuals with NER-defective xeroderma pigmentosum are cancer-prone. For toxicology research in human, therefore, it might be important to identify NER-repairable bulky DNA lesions induced by chemical substances. So far, simple and quick assays to detect such damaging agents have not been developed using human living cells. Here, we report a simple, non-isotopic assay for determining DNA damaging agents that induce NER-repairable DNA lesions by visualizing gene expression from treated fluorescent protein vectors in a mammalian living cell system. This assay is based on a comparison of fluorescent protein expression in NER-proficient and NER-deficient living cells. When we tested UV-irradiated fluorescent protein vectors, the fluorescent protein was observed in NER-proficient living cells, but not in NER-deficient living cells. Similar results were obtained for vectors treated with the anticancer drug, cisplatin. By contrast, when treated with the DNA alkylating agent methyl methanesulfonate, believed to cause no NER-repairable lesion, no difference in gene expression was observed in between NER-proficient and NER-deficient living cells. Using fluorescent protein expression and living test cells, our assay can specifically detect DNA-damaging agents that induce NER-repairable DNA lesions, and could be used to analyze chemicals with the potential to cause cancer.

1. 緒 言

化学物質のデータベースであるケミカルアブストラクト誌によれば、地球上に存在する化学物質は1億種をこえ、日常生活において7万以上の化学物質に囲まれ、さらに新規の化学物質が毎日のように登録されている。このような無数とも思われる物質があるため、迅速に人に対する健康影響を予測し、その影響の大きさの順位づけを行い、安全対策に結びつけるということは重要なことであると考えられる。しかしながら、人に影響を与える化学物質をすべて網羅して、分析し評価することは困難を極め、さらに環境中の化学物質は混合した状態で存在し、その影響はより複雑かつ複合的に示される。

現在、化学物質の安全性評価の方法は、復帰突然変異試験および染色体異常試験で基本解析されている。この2つの試験法は比較的簡便にまた短期間で化学物質の安全性を評価することができる。しかしながら、それぞれ遺伝子組換え生物および細胞分裂の時間を必要とするし、またそれぞれ突然変異誘発性および染色体異常誘発性を指標として

おり、これらは分子生物学的観点からすると明らかに複雑でまた遅い反応である。またこれらの方法論は50年以上昔の生物学基盤により開発されている。

今回、申請課題の基になるバイオアッセイは、上記の化学物質に係る試験よりさらに簡便でまた短期間にその安全性を評価することができる。なぜならば、近年の分子生物学から得られた知見を基に従来の試験法と異なった指標（損傷に応答した転写反応）を用いているからである。我々は、このバイオアッセイを従来の細胞株を用いて構築し、毒性に応答した転写反応およびその有用性を報告した¹⁻⁴⁾。今回さらにその応用として、生きたヒト細胞を用いて生きたままりアルタイムで、化学物質の安全性を評価できる方法を開発することを目標とした。

当初、DNA修復によってタンパク質の蓄積が観察できるCSBタンパク質を標的として、予定の実験を開始した。このタンパク質は、化学物質などで生じたDNA損傷を修復するヌクレオチド除去修復機構に関するもので、特に転写と共役することからその反応は非常に早いことが予測された。また幾つかの論文によれば、確かにCSBおよびそれに関連する修復遺伝子の細胞内局在はそれぞれ細胞核内の核小体に高頻度で存在することが報告されていた。そのため我々はそれらのタンパク質と蛍光タンパク質を融合した発現ベクターを構築し、まずヒト細胞株であるHeLa細胞およびHEK293細胞に導入してその遺伝子発現を解析した。発現はウエスタンブロットにより確認し、タンパク質が確かに目的の大きさに観察できることが明らかになっ



A new method for detecting new biological risk assessment of chemical substance using live cell analysis

Isao Kuraoka

Graduate School of Engineering Science,
Osaka University

た。また細胞内の局在を解析し、蛍光タンパク質としての発現も確認することができた。しかしながら、その発現が安定せず、結果的に細胞においてこのタンパク質が分解されやすいということがわかった。加えて、これらのタンパク質発現安定発現株の構築を試みたが、これも細胞内での局在が安定しなかった。この原因として、融合タンパク質としては、予定した修復タンパク質は不安定であり、今回の我々の目的とした方法論では観察できないということがわかった。

以上の結果から、当初想定していた方法論ではリスク評価をすることは困難だと考え、新規の実験を行うことにした。この新規方法では、蛍光タンパク質発現ベクターをDNA損傷剤(テスト試薬)と反応させることで、DNA上に損傷を生み出し、その損傷が修復されるかどうかを観察することで、損傷剤の危険性を評価する。また、この損傷を評価するために特にヌクレオチド除去修復機能を欠損した細胞(XPA欠損細胞)、さらにこの修復機能を相補した細胞(XPA相補細胞)を作成し、その差異によって評価することとした(Fig. 1)。これは化学物質を評価する最も多く用いられているエームス法においては、DNA修復特にヌクレオチド除去修復を欠損した細菌を用いて、損傷を検出しやすくしている。そこでこの実験方法においても同様にヌクレオチド除去修復を欠損したヒトXPA欠損細胞を用いることとした⁵⁾。この方法だと実際に生じたプラスミド上のDNA損傷の修復を生きた細胞を蛍光顕微鏡で観察することができるはずである。これらの作業仮説をもとに、以下に示すように実験を行い、予測された通り一定のDNA損傷を測定することができた。さらに今回我々が構築した試験細胞株はXP細胞であるため、基本的にはNERで修復されるはずのDNA損傷を検出していることになった。XP患者が高頻度発がんおよび精神神経症状を呈することから⁶⁾、このNERで修復されるDNA損傷は高頻度発がんおよび精

神神経症状を引き起こす原因の一つとも考えられ、その損傷を検出できることが示唆された。これによって、化学物質のリスク評価を求める新規の実験方法を構築できたと考えられる。

2. 方法

2. 1. 試験プラスミド、導入確認用のプラスミドおよびXPA発現ベクターの構築

試験プラスミドとして、pEBMulti-Neo-tdTOMATOおよび導入確認用のプラスミドとして、pBluescript II KS(-)-EGFPをそれぞれ以下のように作製した。

2. 1. 1 pEBMulti-Neo-tdTOMATO

赤色発光タンパク質をコードしたtdTOMATO cDNAを挿入するために、wtTDP43 tdTOMATOHA⁷⁾ プラスミドを鋳型としてPCRにより両端に*Bam*H Iと*Xho* Iの制限酵素サイトをもつtdTOMATO cDNAを増幅した。このPCR産物をpEBMulti-Neoの*Bam*H Iおよび*Xho* I制限酵素部位にT4 DNA Ligaseを用いて挿入した。

試験用のプラスミドには、紫外線、シスプラチンおよびMMSによりDNA損傷が導入された。

2. 1. 2 pBluescript II KS(-)-EGFP

緑色発光タンパク質をコードしたEGFP cDNAを挿入するために、pEGFP-C1 プラスミドを鋳型としてPCRにより両端に*Bss*HIIの制限酵素サイトをもつEGFP cDNAを増幅した。このPCR産物をpBluescript II KS(-)の*Bss*HII制限酵素部位にT4 DNA Ligaseを用いて挿入した。

2. 1. 3 XPA発現ベクター

DNA修復タンパク質をコードしたXPA cDNAをサブクローニングし、PCRにより両端に*Bam*H Iと*Xho* Iの制限酵素サイトをもつXPA cDNAを増幅した。このPCR産物をpEBMulti-Neoの*Bam*H Iおよび*Xho* I制限酵素部位にT4 DNA Ligaseを用いて挿入した。また、全てのプラ

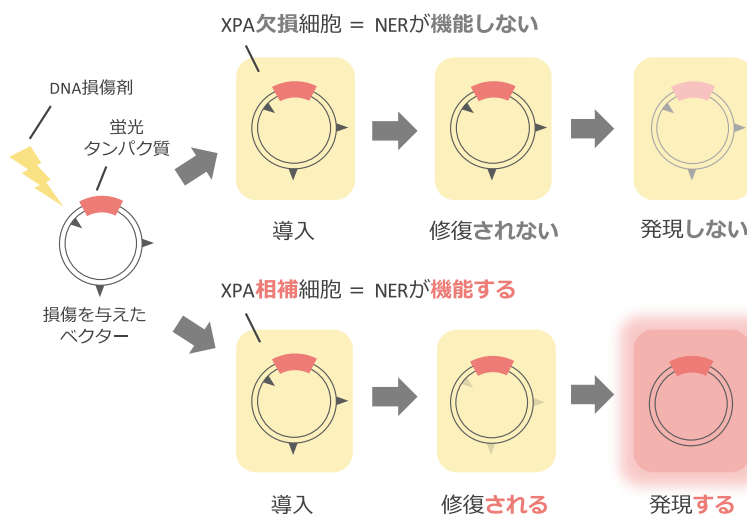


Fig. 1 検出系の概要

スミドベクターの塩基配列は、シーケンサーによって確認された。

2. 2. 試験細胞の構築

修復タンパク質XPAが欠損したXP-A患者の細胞(XP2OS細胞)に、今回作成したXPAを発現するpEBMulti-XPAベクターを導入した。使用したpEBMulti-Neoベクターには、Neomycin耐性遺伝子が組み込まれている。Neomycin耐性遺伝子が組み込まれているベクターを細胞に導入し、その細胞を抗生物質であるG-418 Sulfateを含む培養液で増殖させることで、DNAが正しく導入された細胞のみを選択することができる。ベクターを導入したXP2OS細胞をG-418 Sulfateを含む培養液で培養し、ベクターが正しく導入され、生存した細胞のみを選択した。また、これらの樹立された細胞におけるXPAタンパク質の発現をウェスタンブロッティングにより確認し、試験細胞である(XP2OS/pEBMulti-XPA細胞：XP2OS/XPA細胞)を樹立した。さらにこの時、同様にしてpEBMulti-Neoベクターのみを導入し、Neomycin耐性で選択をしたコントロール細胞(XP2OS/pEB細胞)も樹立した。これらの試験細胞(XP2OS細胞、XP2OS/pEB細胞、XP2OS/XPA細胞)は、10% FCS (ウシ胎仔血清) を添加したDMEM培地を用いて、37度5%二酸化炭素濃度を保ったCO₂ インキュベーターにて培養された。

加えて、それぞれの試験細胞に紫外線を照射し、その感受性を確認したところ、XPAを発現する細胞のみが紫外線に抵抗性であった。このことは外来のXPAタンパク質が細胞内で機能していることを示している。

2. 3. 修復試験テスト(紫外線)

2つの1.5mL tubeに①OPTI-MEM、pEBMulti-tdTOMATO、pBS-GFP、②OPTI-MEM、損傷を与えたpEBMulti-tdTOMATO、pBS-GFPを加えた。OPTI-MEMとLipofectamine® 2000 Reagentを混合したものを加え、室温でインキュベートした(5 min)。前日に12 well plateに撒いたXP2OS細胞、XP2OS/pEB細胞、XP2OS/XPA細胞(8.0×10^5 cells/mL)の1 wellずつに125 μ Lずつ加え、37度5%二酸化炭素濃度を保ったCO₂ インキュベーターにて培養された(O/N)。24 h後に細胞を蛍光顕微鏡で観察した。

また画像処理ソフトImage Jにより、蛍光強度を測定した。

3. 結果

本研究におけるアッセイを検証するために、UVによるDNA損傷を検証した。

太陽光など、UVにより生じるDNA損傷として、隣接チミン同士が架橋したcyclobutane pyrimidine dimer (CPD)

や6-4 pyrimidone photoproducts ((6-4) 光産物) が知られている⁸⁾。これらのUV損傷DNAは隣接ピリジン塩基間において光環化反応が起こることで生じる。生成の割合はCPDが80～90%、(6-4)光産物が10～20%程度であるが、(6-4)光産物は構造の変化の大きさからCPDよりも変異原性が高いことが知られている。そしてこれら2つの損傷は、いずれもNERにより修復されることが分かっている。よって、UV損傷DNAを用いることで、このアッセイが正しく機能するかを確かめた。また実際にDNA修復段階を明らかにするため、まず細胞内で確かに修復されるか、また修復時間がどのように変化するかを検討するため、UV非照射のベクターおよび照射ベクターをそれぞれ作製した試験細胞に導入した。その結果、UV非照射のベクターを導入した全ての細胞は導入後24 h後にRFPを産生し、蛍光が観察された (Fig. 2)。UV照射されたベクターを導入したXP2OS/XPA細胞もRFP遺伝子が発現し、蛍光が見られた。しかし、XP2OS細胞およびXP2OS/pEB細胞では蛍光は観察されなかった。これは、UVにより生じたDNA損傷が蛍光タンパク質ベクターにおける遺伝子発現を妨害し、この損傷は、XPAタンパク質の存在下ではNERにより修復され得ることを示唆した。

しかしこの方法では、試験に用いる発現ベクターが6時間までに導入されていない可能性も考えられる。またXP2OS細胞およびXP2OS/pEB細胞には発現ベクターが導入されにくい可能性およびトランスフェクションによる細胞死の可能性も考えられる。そこで我々は、これらのことを回避すべく、pEB-RFPベクター同時に試験細胞に

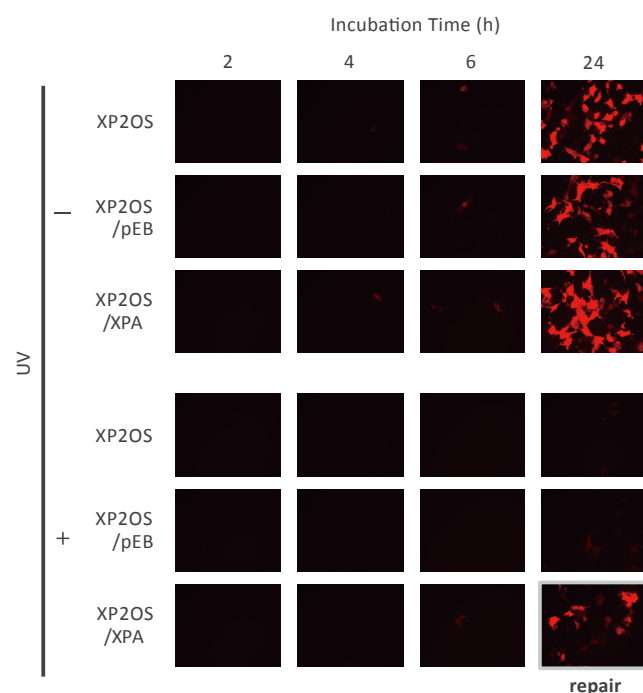


Fig. 2 UV損傷を与えたpEB-RFPを導入した試験細胞の時間経過

導入するモニターベクター (pBS-EGFP) を作製した。これを試験するため、UV を照射して損傷を与えている pEB-RFP ベクター、および UV を照射していない pEB-RFP ベクターと、損傷を与えていない pBS-GFP ベクターを同時に試験細胞に導入した。損傷を与えていない pEB-RFP と pBS-GFP を導入した3つの細胞は、全ての細胞において GFP および RFP 遺伝子を発現し、蛍光が見られた。損傷を与えた pEB-RFP と pBS-GFP を導入した細胞については、XPA タンパク質を産生している XP2OS/XPA 細胞においては、GFP と RFP 両方の蛍光が観察された (Fig. 3 & 4)。これは、DNA の細胞中の核内への導入が正しく行われ、NER により修復が可能である DNA 損傷が除去されたということを示唆している。一方で、XPA タンパク質が存在せず NER が欠損した細胞である XP2OS 細胞および XP2OS/pEB 細胞においては、GFP 遺伝子のみ発現していた。これにより、この検出系が正しく NER による損傷を検出しているということがわかった。

続けて我々はシスプラチンにより生じる DNA 損傷が検出可能かを検討した。シスプラチンは広く利用されている抗がん剤であり、がん細胞におけるその細胞毒性活性は複製または転写を阻害するシスプラチン-DNA 付加物に起因する歪みによって媒介されると考えられている。最も多いシスプラチンによる DNA 損傷であるシスプラチン-DNA 付加物は、鎖内架橋 (intrastrand crosslink) である 1,2-intrastrand d(GpG) crosslink および d(ApG) crosslink であるが、これに加え、1,3-intrastrand d(GpNpG) crosslink や鎖間架橋 (interstrand crosslink) を少量生じる⁹⁾。NER は、これらの intrastrand crosslink を効果的に除去するが、interstrand crosslink は NER とは別の機構である相同組み換え修復で修復されると考えられている。

pEB-RFP ベクターをシスプラチンと処理し、G-25 カラムに通して精製した後に試験細胞にトランスフェクトした。高濃度 (10 ~ 100 μ M) のシスプラチン処理の細胞においては、全ての試験細胞で GFP の蛍光は観察されたが、RFP の蛍光は観察されなかった。これは、シスプラチンが遺伝子発現を妨害するいくつかの DNA 損傷を生じ、それらが NER では修復されない interstrand crosslink を含むより複雑な DNA 損傷であり得ることを示唆している¹⁰⁾。一方で、1 μ M のシスプラチン処理をした細胞においては、XP2OS/XPA 細胞では RFP 遺伝子が発現したが、XP2OS 細胞、XP2OS/pEB 細胞では発現しなかった (Fig. 5 & 6)。よって、この濃度においては、RFP ベクターに NER で修復が可能な DNA 損傷を生成することが示唆された。

次に、NER とは異なる経路で修復されることが分かっている methyl methanesulfonate (MMS) で損傷を与えた。

MMS は、7-メチルグアニン (7-meG) および 3-メチルアデニン (3-meA) のようなベクター DNA 中の DNA アルキル化

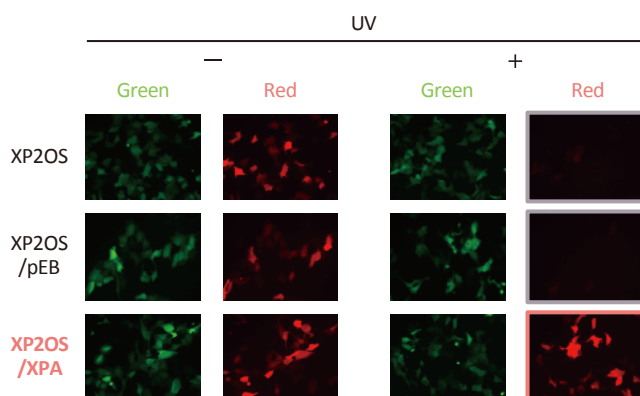


Fig. 3 UV 損傷を与えたベクターを導入した試験細胞の蛍光観察

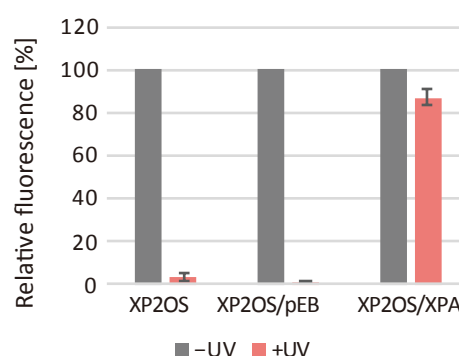


Fig. 4 UV 損傷を与えたベクターを導入した試験細胞の蛍光定量化

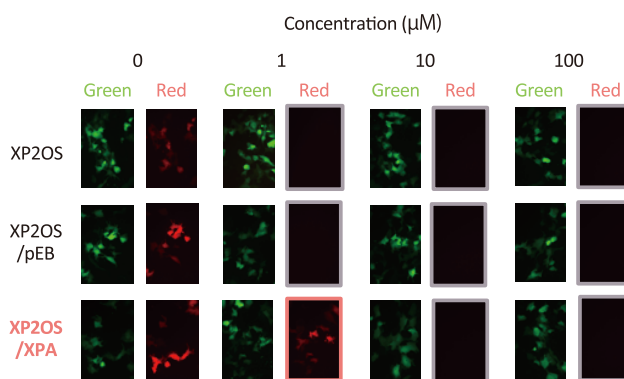


Fig. 5 シスプラチン損傷を与えたベクターを導入した試験細胞の蛍光観察

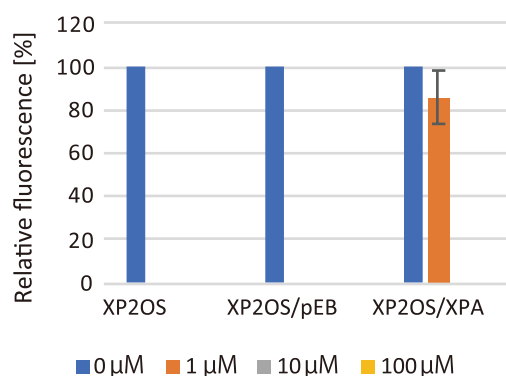


Fig. 6 シスプラチン損傷を与えたベクターを導入した試験細胞の蛍光定量化

塩基損傷、並びにAPサイトを誘導することができる¹¹⁾。DNA修復酵素のアルキルアデニンDNAグリコシラーゼは、DNA上の損傷塩基を認識し、アルキル塩基を除去してAPサイトを生成する¹²⁾。MMSにより誘発されるDNA損傷は、塩基除去修復 (BER) の対象と考えられており、NERとは別の経路で修復されると考えている。よって、XPAが欠損しておりNERが機能しない細胞であってもBERは機能すると考えられるため、損傷を受けた蛍光タンパク質によっても蛍光が観察されることが予想される。

pEB-RFPベクターをMMSと処理し、G-25 カラムに通して精製した後に試験細胞にトランスフェクトした。すると、予想通りに全ての細胞においてGFPとRFP遺伝子の発現が観察された (Fig. 7 & 8)。これは、MMSにより誘発されるDNA損傷は遺伝子発現に影響を及ぼさず、本研究におけるアッセイはBERにより修復されるDNA損傷の検出には使用することができないことが示唆された。しかし、1mMのMMSでは濃度が小さすぎて、損傷が適切に誘導されなかった可能性も否定することはできない。

4. 考 察

本研究では、DNA損傷を与えた蛍光タンパク質をNERが欠損しているXP-A患者の細胞に導入し、損傷が修復されれば蛍光タンパク質遺伝子の発現を蛍光顕微鏡で検出することができるという原理を用いて、DNA損傷の検出系を開発した。

UV照射したpEB-RFPベクターを細胞にトランスフェクションすると、UV照射されていないpEB-RFPベクターが全ての細胞においてRFPを産生したのに対し、NER欠損細胞 (XP2OS細胞およびpEBベクターのみがトランスフェクトされたXP2OS/pEB細胞) ではRFPは産生されず、一方でNER相補細胞 (XP2OS/XPA細胞) ではRFPの蛍光を観察することができた。同様に、嵩高いDNA損傷を誘発するDNA損傷剤であるシスプラチンで処理すると、NER相補細胞では濃度が小さい場合には蛍光タンパク質を産生するが、NER欠損細胞では全く蛍光が観察されなかった。一方、DNAアルキル化塩基損傷を誘発するMMSと共にインキュベートされたベクターを導入した試験細胞では、全ての細胞において蛍光タンパク質の蛍光を観察することができた。UVおよびシスプラチンはNERで修復が可能なDNA損傷を誘発するが、MMSはBERで修復されるDNA損傷を誘発するので、本研究ではNERによって修復されたDNA損傷を誘発するDNA損傷剤を検出することができると結論づけた。

一般的に使用されているDNA損傷剤のスクリーニング法であるエームス試験は、NERが欠損している突然変異細菌細胞を用いて特定の化学物質が突然変異を誘発する可能性を分析することができる。しかし、転写や複製を妨害

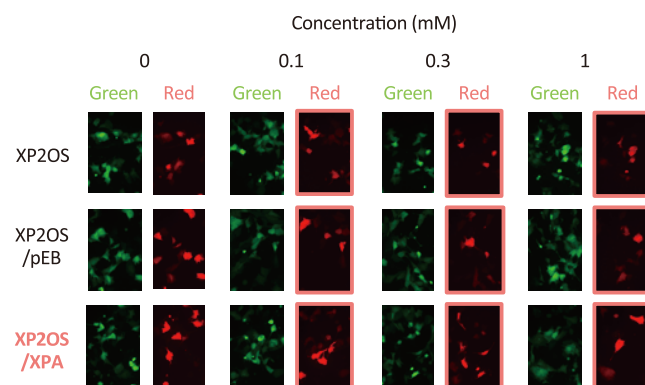


Fig. 7 MMS損傷を与えたベクターを導入した試験細胞の蛍光観察

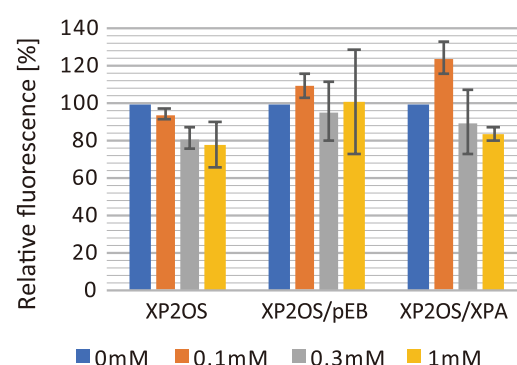


Fig. 8 MMS損傷を与えたベクターを導入した試験細胞の蛍光定量化

するDNA損傷は、化学物質の細胞毒性作用によりほとんど検出されない。さらに、細菌細胞と哺乳類細胞のDNA代謝には大きな差異があるため、哺乳類細胞中で分析することが求められる。

また、UDS試験は、哺乳類培養細胞中の細胞周期のS期のDNA合成に進まないDNAに、放射性トリチウム標識チミジン (^3H -dT)を組み込むことに基づいており、取り込まれた ^3H -dTは、X線に感受性を示すオートラジオグラフィにより、ハロゲン銀粒子として検出されることによりDNA損傷を検出している¹³⁾。UDS試験は、古くから一般的に用いられている *in vivo*における遺伝毒性試験であり、XP相補性診断試験としても使用されている。しかし、UDS試験は複雑な過程を経る必要があり、さらに放射性同位体の使用を余儀なくされる。

本研究における検出系では、これらの欠点を克服することができる。損傷をプラスミド自体に与えるため、細胞への影響はなく細胞毒性を考慮する必要は少ない上に、細菌細胞ではなくヒトの生細胞を用いているため、よりヒトにとって有害である化学物質を見極めることができる。さらに、過程は蛍光タンパク質遺伝子発現ベクターに損傷を与え、細胞に導入するだけの簡単なものであるし、放射性同位体も用いる必要はない。

さらに多くの試験試薬を用いて損傷と修復の関係を検討する必要はあるものの、この検出系は、エームス法などのようにDNA損傷を誘発するさらなる新しいDNA損傷剤の発見、すなわち新規の化学物質の評価法に役立つことが期待できる。

5. 総 括

当初は、損傷を受けた細胞内のタンパク質の局在変化によって、生きた細胞で化学物質の安全性を評価する実験系を確立することを目指した。しかしながら、局在変化では様々な細胞の状態（遺伝的背景の違いおよび損傷の生成頻度）により損傷による局在変化が観察されなかった。そこで従来の生化学的手法および遺伝学的手法の延長線上として今回の検出法を考案した。この方法では、試験細胞を遺伝学的に統一することで安定した細胞を確保し、また損傷の生成頻度も外来遺伝子である発現プラスミドを用いることにより克服し、さらに発現プラスミドのモニターとして蛍光タンパク質を用いることで生きた細胞でリアルタイムに損傷のタイプおよび修復の効率を考察することができる実験系を確立することができた。細胞を様々な変異株を用いることで、また、発現プラスミドをさらに改変することによって応用研究が発展できることが期待できる¹⁴⁾。

(引用文献)

- 1) Hasegawa M, Iwai S, Kuraoka I. A non-isotopic assay uses bromouridine and RNA synthesis to detect DNA damage responses. *Mutat Res.* 699. 62-66. 2010
- 2) Morita Y, Iwai S, Kuraoka I. A method for detecting genetic toxicity using the RNA synthesis response to DNA damage. *J Toxicol Sci.* 36. 515-521. 2011
- 3) Kametani Y, Iwai S, Kuraoka I. An RNA synthesis inhibition assay for detecting toxic substances using click chemistry. *J Toxicol Sci.* 39. 293-299. 2014
- 4) Sonohara Y, Iwai S, Kuraoka I. An in vitro method for detecting genetic toxicity based on inhibition of RNA synthesis by DNA lesions. *Genes Environ.* 1. 37:8. doi: 10.1186/s41021-015-0014-8. eCollection 2015
- 5) Tanaka K, Miura N, Satokata I, Miyamoto I, Yoshida MC, Satoh Y, et al., Analysis of a human DNA excision repair gene involved in group A xeroderma pigmentosum and containing a zinc-finger domain, *Nature* 348. 73-76. 1990
- 6) Lehmann AR, McGibbon D, Stefanini M. Xeroderma pigmentosum, Orphanet J. Rare Dis. 6. 70. 2011
- 7) Yang C, Tan W, Whittle C, Qiu L, Cao L, Akbarian S, Xu Z. The C-terminal TDP-43 fragments have a high aggregation propensity and harm neurons by a dominant-negative mechanism. *PLoS One* 5. e15878. 2010
- 8) Mori T. et al., Simultaneous establishment of monoclonal antibodies specific for either cyclobutane pyrimidine dimer or (6-4) photoproduct from the same mouse immunized with ultraviolet-irradiated DNA, *Photochem Photobiol.* 54. 225-232.1991
- 9) Moggs JG, Yarema KJ, Essigmann JM, Wood RD. Analysis of incision sites produced by human cell extracts and purified proteins during nucleotide excision repair of a 1,3-intrastrand d (GpTpG) -cisplatin adduct. *J Biol Chem.* 271.7177-7186. 1996
- 10) Wood RD. Mammalian nucleotide excision repair proteins and interstrand crosslink repair. *Environ Mol Mutagen.* 51. 520-526. 2010
- 11) Karran P, Macpherson P, Ceccotti S, Dogliotti E, Griffin S, Bignami M. O⁶-methylguanine residues elicit DNA repair synthesis by human cell extracts. *J Biol Chem.* 268. 15878-15886. 1993
- 12) O'Brien PJ, Ellenberger T. Human alkyladenine DNA glycosylase uses acid-base catalysis for selective excision of damaged purines. *Biochemistry.* 42. 12418-29. 2003
- 13) Kelly CM, Latimer JJ. Unscheduled DNA synthesis: a functional assay for global genomic nucleotide excision repair, *Methods Mol. Biol.* 291. 303-320. 2005
- 14) Takatsuka R, Ito S, Iwai S, Kuraoka I. An assay to detect DNA-damaging agents that induce nucleotide excision- repairable DNA lesions in living human cells, *Mutat Res.* 8201-8207. 2017