

博士（薬学） 澤 田 稔

学位論文題名

変異原性物質の活性化機構の解析に有用な
モデル細胞系の樹立

学位論文内容の要旨

生体に取り込まれた変異原性物質の多くは、肝臓などの特定の臓器や標的細胞内で代謝的な活性化あるいは不活性化を受けることが知られている。本研究の目的は、チャイニーズ・ハムスター肺由来の培養線維芽細胞（CHL 株）から、ある種の化合物の活性化あるいは不活性化に関わる酵素について活性レベルの変化したモデル細胞株を樹立し、細胞内での代謝的変換と変異原性発現の関係を考察することである。

本研究においては、チャイニーズハムスター線維芽細胞（CHL 株）から以下に示す 3 つの方法でモデル細胞株を樹立し、酵素レベルの変動を明らかにするとともに、染色体異常誘発性における感受性の変化を中心に検討を加えた。

1. 過酸化水素抵抗性細胞株の樹立とその性質

CHL 細胞を 50% 程度の致死作用を示す過酸化水素で処理し、生き残った細胞を集めて再び過酸化水素で処理した。過酸化水素の濃度を少しづつ高めながらこの操作を繰り返すことにより、過酸化水素に対する抵抗性が徐々に増大した。5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の過酸化水素処理から始めて、150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 処理に至る間に LD₅₀ は約 50 倍に増大した。しかし過酸化水素を含まない培地で継代すると、抵抗性は次第に減少した。そこで、さらに 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の過酸化水素で処理し、生き残ったコロニーを単離して得られたクローンについて調べたところ、クローン R-8 は親細胞である CHL の約 10 倍の過酸化水素抵抗性を示し、通常の培地中で 2 か月間にわたり安定であった。R-8 株における細胞当たりのカタラーゼ活性は CHL の約 10 倍に増大していた。スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、グルタチオンパーオキシダーゼの活性については CHL と R-8 の間で有意な差は認められなかった。過酸化水素はバクテリアに対し DNA 傷害ならびに復帰突然変異を誘発するとともに、哺乳類培養細胞に対し染色体異常を引き起こすことが報告されている。CHL 細胞においても過酸化水素 2.5~7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で染色体に構造的異常が誘発されたが、R-8 株では約 10 倍の抵抗性を示した。

培地にグルコースオキシダーゼを添加した場合にも、CHL 細胞では顕著に染色体異常が出現したが、R-8 株では約10倍の抵抗性を示した。従って、この場合の異常の出現は、グルコースオキシダーゼが培地中の β -D-グルコースを酸化して D-グルコノ- δ -ラクトンに変換する際に生成する過酸化水素によるものと考えられた。

スーパーオキシドアニオンラジカル (O_2^-) 発生系としてよく用いられるヒポキサンチンとキサンチンオキシダーゼを培地に加えると、CHL 細胞ではヒポキサンチンの濃度に依存して染色体異常が観察される。一方、R-8 株では異常の誘発は完全に抑えられた。従って、この発生系による異常の誘発は、 O_2^- それ自体によるのではなく、自発的あるいは培地中の SOD によって不均化されて生ずる過酸化水素（あるいは O_2^- と過酸化水素から生成されるヒドロキシルラジカル）によると考えれる。

2. メナジオン抵抗性細胞の樹立

メナジオン(2-メチル-1,4-ナフトキノン)による細胞毒性は、NADPH-チトクローム P-450還元酵素（以下、P-450還元酵素と略す）などによって還元されてセミキノン体となり、酸化還元サイクルを介して O_2^- が生成することに起因すると考えられている。本研究において、CHL 細胞を強力な変異原物質である MNNG で処理した後、メナジオン抵抗性コロニーを単離した。このうち MM 1 と命名した細胞株のメナジオン抵抗性は、CHL 細胞の約 3 倍に増大しており、他のナフトキノン類に対しても同様の抵抗性を示した。MM 1 株では、P-450還元酵素の比活性が CHL 細胞の 50% に減少していた。一方、SOD やカタラーゼについては変化がみられなかった。従って、MM 1 株のメナジオン抵抗性は P-450還元酵素活性の低下によって活性酸素の生成が減少したために生じた可能性が示唆される。

ジニトロピレン (DNP) 類は、強い変異原活性を有する環境汚染物質であり、動物に対する癌原性も立証されている。バクテリア中では、ニトロ還元酵素によって還元され、さらにO-アセチル化体を経てニトレニウムイオンを生じ、DNA に結合すると考えられている。動物細胞中でも変異原性発現のためにニトロ還元が必要なことが知られているが、触媒する酵素についてはよく分かっていない。一般的に、動物細胞中でニトロ化合物の還元に関わる酵素はいくつか挙げられるが、P-450還元酵素もその一つである。そこで、1, 3-, 1, 6-, 1, 8-DNP について、その染色体異常誘発性を CHL 細胞 MM 1 株で検討した。その結果、いずれも MM 1 で顕著に減少することから、DNP 類の細胞内での活性化に P-450還元酵素が関与していることが示唆された。

3. P-450およびP-450還元酵素 cDNA の導入と安定的発現細胞株の樹立

変異原性物質や癌原性物質の多くは、チトクロームP-450（以下、P-450）を中心とする薬物代謝酵素による代謝的活性化を受けて初めてその作用を発揮する。しかし、CHL細胞を含め長期継代可能な株細胞の大部分は、P-450活性を欠損している。そこで、P-450のcDNAを発現ベクターに組み込んでトランスフェクトし、安定的に発現する細胞株を選択することにより、変異原性物質に高い感受性を示すモデル細胞の樹立が期待できる。また、この方法により特定の変異原性物質の活性化（あるいは不活性化）における特定のP-450分子種の役割を解析することが可能になると考えられる。

まず、サルのP-450 I A 1のcDNA（MKah 1）を挿入した発現プラスミドを、ネオマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドと共にリン酸カルシウム共沈法によりCHL細胞にトランスフェクトし、G-418で選択した。ノーザンプロット分析によりP-450 I A 1のmRNAの高い発現が確認された細胞株A-15は、アフラトキシンB₁（AFB₁）に対する感受性がCHL細胞の約30倍に達していた。A-15株は、6-チオグアニン耐性細胞の出現を指標とするAFB₁の突然変異誘発試験においても濃度に依存した陽性結果を示した。

P-450系が機能するためにはP-450還元酵素が必要であるが、培養細胞、特に肝以外の組織に由来する細胞ではその活性も低下していることが知られている。そこで、A-15株にマウスP-450還元酵素のcDNAをトランスフェクトし、高い還元酵素活性を示す細胞株を得た。これらの株はAFB₁の致死作用に対し、A-15株の約10倍、CHLの約300倍という高い感受性を示した。また、AFB₁による染色体異常の誘発に関しても、これらの株で感受性の著しい増大が認められた。

以上のように、異なる3つの方法を用い、変異原性物質の活性化や不活性化に係わる重要な酵素について活性レベルの増減したモデル細胞株を樹立することに成功した。さらにこれらの細胞を用いて、染色体異常誘発試験を中心に、代表的な変異原性物質の作用機構を検討し興味ある新知見を見いだすことができた。

学位論文審査の要旨

主　查　教　授　鎌　滝　哲　也
副　查　教　授　長　澤　滋　治
副　查　教　授　有　賀　寛　芳
副　查　助教授　横　井　毅

申請者は、環境中に存在する多くの変異原性物質が生体内で様々な酵素系によって活性化され、その活性代謝物（化学的に反応性に富む）がDNAを損傷することによって発癌のイニシエーションや狭義の遺伝毒性を示すことに注目し、活性化機構に立脚した変異原性物質検出用モデル細胞系を樹立することを目指し、それに成功した。本研究は特にヒトにおける発癌物質の予測に有用な概念を提供するものであり、以下に詳述するように極めて優れた研究成果であると評価される。

1) 過酸化水素抵抗性細胞の樹立と活性酵素生成系による染色体異常誘発試験への応用

チャイニーズハムスター線維芽細胞株 CHL-11(以下 CHL と略記)を過酸化水素濃度を徐々に上げつつ繰り返し処理することにより、過酸化水素に抵抗性をもった安定な細胞株 R-8を得ることができた。クローン化された R-8 株はもとの CHL 細胞の10倍のカタラーゼ活性を有し、過酸化水素による細胞毒性や染色体異常誘発性に対する抵抗性も約10倍に増大していた。さらに過酸化水素生成系であるグルコース／グルコースオキシダーゼ系やスーパーオキシド生成系であるヒポキサンチン／キサンチンオキシダーゼ系による染色体異常誘発に対しても R-8 株は CHL 細胞に比べ著しい抵抗性を示した。興味あることに、細胞内でスーパーオキシドラジカルを発生させることで知られるパラコートを添加しても染色体異常の出現頻度に R-8 株と CHL 細胞の間で差がなく、スーパーオキシドラジカルの不均化→過酸化水素生成→細胞毒性や染色体異常の誘発というメカニズム以外のメカニズムでパラコートが染色体異常を誘発している可能性が示唆された。

2) メナジオン抵抗性細胞株の樹立とジニトロピレンによる染色体異常誘発試験への応用

CHL 細胞を直接変異原である MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) で処理したのち、メナジオンに対する抵抗性を示す細胞株 MM 1を得た。メナジオンは NADPH-チトクローム P-450還元酵素や NADH-チトクローム b₅還元酵素から1個の電子を受け取りセミキノン体となったのち、分子状酸素に電子を渡しスーパーオキシドラジカルを生成し、自

身はメナジオンに戻る。従って、メナジオン抵抗性であることは、MNNG 処理によって、上記の酵素活性の低下した細胞、またはスーパーオキシドラジカルやその他の活性酸素消去系の酵素が増加した細胞が得られた可能性が考えられたが、検討の結果、MM 1 株は特異的に低い P-450 還元酵素活性を示した。P-450還元酵素は、メナジオン以外にも種々のナフトキノン類やベンゾキノン類にも電子を渡し活性酸素を生成することが知られている。MM 1 株はこれらの化合物に対しても CHL 細胞に比較して 2~3 倍の抵抗性を示した。さらに、ディーゼルエンジンの排気ガス等に含まれる強力な変異原として注目されている 1, 8-ジニトロピレンなどの化合物による染色体異常の誘発に関しても MM 1 株は抵抗性を示した。

3) P-450およびP-450還元酵素の cDNA の導入による変異原高感受性細胞株の樹立

P-450はステロイドなど内因性物質の代謝や薬毒物の解毒、さらに変異・癌原物質の活性化など多彩な機能をもつヘム酵素である。そこで、細胞内での変異原性物質の活性化を期待して、サルの P-450 I A 1 cDNA を CHL 細胞に導入し、P-450 I A 1 を安定的に発現する新しい細胞株 A-15 を樹立した。A-15 株は、強力な癌原性マイコトキシンであるアフラトキシン B₁ の細胞毒性と突然変異誘発性に対し高い感受性を示した。この高感受性は P-450 I A の選択的な阻害剤である α -ナフトフラボンを共存させることにより消去されたことから、A-15 株において発現した P-450 I A 1 がアフラトキシン B₁ を活性化し、細胞毒性を示したことが立証された。P-450が機能するために必要な P-450還元酵素は CHL 細胞にも低いながら存在するが、さらに高い活性を期待してマウスの P-450還元酵素の cDNA を A-15 株に導入し、AR-10, AR-13, AR-18 株などを得た。これらの AR 株は、アフラトキシン B₁ に対し A-15 株より一層高い感受性を示し、もとの CHL 細胞と比べると約 300 倍の高感受性を有することが分かった。アフラトキシン B₁ と同様に癌原性マイコトキシンとして知られるステリグマトシスチンに対しても AR 株は高い感受性を示したことから、AR 株は P-450 I A 1 によって活性化される変異原性物質の検出に威力を発揮する新しい細胞株として有用性が高いことが示唆された。

以上、本研究は変異株の選択による過酸化水素抵抗性やメナジオン抵抗性細胞株の樹立とその応用、さらに P-450 や P-450還元酵素遺伝子を賦与した人工的な細胞系の樹立という新しい方法論の導入により、世界的にもユニークな研究を開拓しており、分子毒性学的見地からは極めてレベルの高い研究と評価される。本論文『変異原性物質の活性化機構の解析に有用なモデル細胞系の樹立』に含まれる研究成果は薬学における基礎および応用のいずれにおいても優れており、博士（薬学）の学位を受けるに充分値するものと認めた。