

称号及び氏名 博士（獣医学） 坂井 里奈

学位授与の日付 平成26年9月30日

論文名 Studies on identification of novel genomic biomarkers for classifying DNA damage-induced clastogenicity and application of a discrimination tool for clastogenicity screening based on toxicogenomics technologies (トキシコゲノミクス手法を用いた DNA 損傷誘発性染色体異常を分類する新規バイオマーカー遺伝子の同定及び染色体異常スクリーニングにおける判別ツールの適用に関する研究)

論文審査委員 主査 久保 喜平
副査 松尾 三郎
副査 竹内 正吉
副査 小森 雅之

論文要旨

新規医薬品の開発において、医薬品候補化合物に関する毒性試験は安全性を担保するために必要不可欠である。薬理、動態研究に加え多くの特殊毒性試験が医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準 GLP (good laboratory practice) の下に実施され、これらのうち遺伝毒性試験は必須の特殊毒性試験である。

哺乳類培養細胞を用いた細胞遺伝学的試験(染色体異常及び小核試験)は遺伝毒性標準試験の一つであり化合物の染色体異常誘発性を同定する試験である。染色体異常は形態学的に構造異常と数的異常に分類される。DNA アルキル化剤、DNA 架橋剤、トポイソメラーゼ阻害剤や DNA 合成代謝阻害剤など DNA 損傷性化合物は主に染色体構造異常を誘発する。一方、紡錘体タンパク質への化合物作用は、DNA 非損傷性メカニズムで染色体数的異常を誘発する。更に、染色体異常は DNA 前駆体やタンパク合成阻害剤、非生理的な浸透圧の変化といった培養環境により、DNA 非損傷的に誘発されることが知られている。したがって細胞遺伝学的試験における陽性結果を示した化合物の遺伝毒性リスクを正確に評価するため、染色体異常の誘発作用メカニズムを説明可能なフォローアップ試験の開発が望まれる。

トキシコゲノミクスは、毒性表現型の変化に内在するメカニズムを解明する強力な手法であり、肝毒性、腎毒性、心毒性、発がん性などの個々の毒性エンドポイントのバイオマーカー遺伝子を同定する有用な手法として多数報告されている。遺伝毒性試験においてもトキシコゲノミクスによって重要かつ飛躍的な科学的解明が成し遂げられてきた。これらの研究はトキシコゲノミクスが遺伝毒性リスク評価に有用である事を示唆しているものの、多様なメカニズム、多くの化合物への適用に関する研究分野については満たされていない。

本研究では、トキシコゲノミクス手法を用いて染色体異常メカニズムに基づく医薬品候補の判別ツールを構築することを目的とした。細胞種は、DNA 損傷応答における基本的な役割を担う p53 を野生型で有し、多くの遺伝毒性試験で使用されている背景から、ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 を用いた。

第 1 章では、8 遺伝毒性物質—DNA 損傷性:DNA 架橋剤 mitomycin C (MMC), cisplatin (CP) , アルキル化剤 methyl methanesulfonate (MMS), ethyl methanesulfonate (EMS), トポイソメラーゼ II 阻害剤 etoposide (ETOP), DNA 合成代謝阻害剤 hydroxyurea (HU) , DNA 非損傷性:紡錘体阻害剤 colchicine (COLCH), DNA 塩基 adenine (ADE)—を 4 時間曝露した TK6 細胞についてマイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を実施し、DNA 損傷と DNA 非損傷遺伝毒性物質とを判別するバイオマーカー遺伝子を探索した。結果、22,000 プローブから DNA 損傷と非損傷の 2 クラスを判別する、有意に発現変動を示した 103 プローブが抽出された。103 プローブの中で DNA 損傷/非損傷クラスを最も有意に判別する遺伝子として *CDKN1A/p21* が同定された。DNA 損傷判別候補 103 プローブを用いた機能ネットワーク解析では、*CDKN1A* を中心としたネットワークが最も有意に検出された。以上のトキシコゲノミクス手法によって、*CDKN1A* 遺伝子を DNA 損傷バイオマーカーとして着目することとした。

第 2 章では、TK6 における *CDKN1A* の発現について、バイオマーカーとしての有用性及び信頼性を他の遺伝毒性物質や新規合成医薬品候補化合物を用いて検証した。*CDKN1A* の発現変動は細胞毒性条件に影響を受けることが報告されており、医薬品開発における意思決定の際には注意を払わねばならない。そこで DNA 損傷化合物 (MMC, CP, MMS, EMS, ETOP, HU) の種々の細胞毒性を示す曝露条件からクラス判別に最適な *CDKN1A* 発現上昇を示す条件を定量的 RT-PCR (QPCR)を用いて検討した。Relative cell growth (RCG) 50, 60, 70%の曝露条件によって用量相関的な *CDKN1A* の発現上昇が得られ、RCG50 において新規合成化合物 (染色体異常試験陽性 1 化合物, 陰性 2 化合物)を用いた場合において明確なクラス判別を示した。以上より DNA 損傷判別における最適条件を RCG50 と設定した。*CDKN1A* のバイオマーカーとしての有用性について、第 1

章及び曝露条件検討で使用した化合物に加え、新たに 9 遺伝毒性物質—DNA 損傷性：N-ethyl-N-nitrosourea, 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea, camptothecin, 5-fluorouracil, DNA 非損傷性：paclitaxel, colcemid, 2-deoxyadenosine, cycloheximide, sodium chloride—を用いて TK6 に曝露し(RCG50), QPCR による検証を行った。結果, *CDKN1A* 発現変動は DNA 損傷染色体異常物質と, DNA 非損傷性(遺伝毒性及び陰性)化合物とを明確にクラス判別した。*CDKN1A* の DNA 損傷誘発性染色体異常バイオマーカーとしての利用は, TK6 を用いた細胞遺伝学的試験の陽性に対するメカニズムベースの確認に有用であることを示唆した。

第 3 章では、特に多数の複数施設で本評価ツールが運用された際に考えられる *CDKN1A* 単一遺伝子による誤判別のリスクを最小限に低減するべく、更に研究を行った。*CDKN1A* は DNA 損傷応答として p53 より強力に転写誘導を受ける cyclin-dependent kinase inhibitor として知られるが、分化や細胞老化にも関与し様々な転写因子によっても誘導を受ける。実際に、一定の閾値より低いものの *CDKN1A* の発現上昇を示す陰性化合物が存在した(第 2 章)。本章では、複数の遺伝子発現を用いた複合評価は誤判別のリスクを低減させると仮定し、DNA 損傷によって発現低下を示す *KIF20A* 遺伝子に着目した。*KIF20A* は、*CDKN1A* を中心としたネットワーク上の遺伝子であり、細胞周期制御を司る RB/E2F パスウェイを *CDKN1A* と共有することが想定された。RB/E2F パスウェイは細胞周期の G1/S や G2/M チェックポイントの進行において重要な役割を担っている。マイクロアレイデータから全ての DNA 損傷性化合物による *KIF20A* の発現低下が示され、*KIF20A* のバイオマーカーとしての有用性を検証した。第 2 章で用いた化合物（遺伝毒性 17 化合物、試験陽性 1 化合物、陰性 2 化合物）を用いて QPCR を実施した結果、*KIF20A* は全ての DNA 損傷性化合物曝露によって発現低下を示した。一方で、ADE や 2-deoxyadenosine などの DNA 非損傷性である DNA 構成物の曝露によっても発現低下を示した。また、*CDKN1A* がやや上昇した陰性 2 化合物について *KIF20A* は低下を示さず、DNA 非損傷性として明確な分類を可能とした。*KIF20A* の発現変動と RB/E2F パスウェイとの関連性について明らかにする為に RB/E2F 転写標的 8 遺伝子 (*CENPE*, *CDC25C*, *CDCA8*, *KIF11*, *ECT2*, *NEK2*, *CCNA2*, *KIF18A*)についてマイクロアレイデータを確認したところ、DNA 損傷化合物によって全ての遺伝子が発現低下を示していた。これにより *KIF20A* の低下は E2F 転写活性の抑制によるものと推察された。*KIF20A* は紡錘体関連モータータンパク質であり、染色体分離に必須の機能を持つ G2/M 期関連遺伝子である。また、DNA 損傷性化合物の曝露により、p53 パスウェイ及び G2/M 期移行が有意な生物学的プロセスとして誘発された(Gene ontology 解析)。したがって DNA 損傷応答は RB/E2F 転写活性の低下を介し G2/M 期停止を誘導することが示唆された。*CDKN1A* がやや上昇した陰性 2 化合物が *KIF20A* の低下を示さなか

った現象は、G2/M 期停止を誘導せず、つまり DNA 損傷応答が誘発されなかったものと解釈できた。一方、ADE においても E2F 転写標的遺伝子の発現低下が認められ、*KIF20A* が DNA 損傷のみならず DNA 構成物の曝露によっても発現低下する現象を解明するべく、ADE のみで発現変動を示す 1236 プローブを抽出し E2F 転写活性抑制に関与するネットワーク解析を実施した。結果、ADE の曝露では、*CDKN1A* ではなく *p16* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) の活性化を介して E2F 活性が抑制されることが明らかになった。

以上より *KIF20A* は *CDKN1A* 依存的、非依存的にも発現低下を示すが、*CDKN1A* の下流で制御を受ける *KIF20A* の発現低下は、DNA 損傷において有意なプロセスである G2/M 期停止の指標となり、DNA 損傷応答性 *CDKN1A* をベースとしたクラス判別能を増強すると結論付けた。*CDKN1A* と *KIF20A* の染色体異常における関連性を明らかにする更なる検証研究が必要とされるが、*CDKN1A* と *KIF20A* の遺伝子発現複合評価は DNA 損傷性染色体異常誘発物質を効果的にかつ簡便に判別する評価系として、医薬品候補化合物の遺伝毒性スクリーニングの際に適切な意思決定を与えることが期待される。

審査結果の要旨

新規医薬品の開発において、医薬品候補化合物に関する毒性試験は安全性を担保するために必要不可欠である。種々の特殊毒性試験が医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準の下に実施され、これらのうち遺伝毒性評価は必須の毒性試験である。

哺乳類培養細胞を用いた細胞遺伝学的試験(染色体異常及び小核試験)は遺伝毒性標準試験の一つであり化合物の染色体異常誘発性を同定する試験である。染色体異常のうち、構造異常は DNA アルキル化剤、DNA 架橋剤など DNA 損傷性メカニズムで、数的異常は紡錘体タンパク質への作用等により DNA 非損傷性メカニズムで誘発される。染色体異常評価は、DNA 損傷に由来する染色体構造異常の有無を検出することが目的で、これにより陽性を示した化合物の遺伝毒性リスクを正確に評価するためには、DNA 損傷に基づく異常であることを明らかにするためのフォローアップ試験の開発が望まれる。

トキシコゲノミクスは、毒性表現型の変化に内在するメカニズムを解明する強力な手法であり、遺伝毒性分野においてもリスク評価における有用性が示唆

されている。本研究は、トキシコゲノミクス手法を用いて染色体異常メカニズムに基づく医薬品候補の判別ツールを構築することを目的として行われた。

第1章では、統計解析に基づいたDNA損傷マーカー候補遺伝子の選定及びその生物学的意義を検討した。DNA損傷性遺伝毒性物質 mitomycin C, cisplatin, methyl methanesulfonate, ethyl methanesulfonate, etoposide, hydroxyurea およびDNA非損傷性遺伝毒性物質 colchicine, adenine を曝露したヒトリンパ芽球細胞株 TK6 細胞についてマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を実施し、DNA損傷とDNA非損傷性遺伝毒性物質とを判別するバイオマーカー遺伝子を探索した。結果、22,000プローブからDNA損傷性と非損傷性の2クラスを有意に判別する103プローブが抽出され、この中で最も有意なクラス判別能を示す遺伝子として *CDKN1A/p21* (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) を同定した。*CDKN1A* はDNA損傷応答としてp53より転写誘導を受けるサイクリン依存性キナーゼ阻害因子でRB/E2F経路を経て細胞周期を制御することから、*CDKN1A* をDNA損傷バイオマーカーとして着目することとした。

第2章では、*CDKN1A* のDNA損傷性染色体異常判別能の検証を行った。*CDKN1A* の発現変動は曝露条件に影響を受けることが報告されており、医薬品開発における意思決定の際には注意を要する。そこでDNA損傷化合物の細胞毒性を示す曝露条件からクラス判別に適した*CDKN1A*発現上昇を示す条件を定量的RT-PCR (QPCR)を用いて検討した。細胞数の陰性対照比 Relative cell growth (RCG)を指標に、RCG 50, 60, 70%を示す薬剤濃度の曝露によってDNA損傷で用量相関的な*CDKN1A*の発現上昇が得られた。RCG50を示す薬剤濃度で、*CDKN1A*のマーカー有用性について、QPCRによる検証を行った結果、*CDKN1A*発現レベルはDNA損傷性物質と、非損傷性化合物とを明確にクラス判別することを明らかにし、DNA損傷誘発性染色体異常バイオマーカーとしての有用性を示唆する成績を得た。

第3章では、サポートマーカー候補遺伝子のDNA損傷性染色体異常判別能の検証を行った。*CDKN1A*発現変動が曝露条件に影響を受けやすく、様々な転写因子によっても誘導を受けることから、誤判別のリスクを最小限にするべく、*CDKN1A*を中心としたネットワーク上に存在し、マイクロアレイデータから全てのDNA損傷性化合物による発現低下を示し、バイオマーカーとしての有用性が期待された *KIF20A* (kinesin family member 20A) の有用性の検討を行った。*KIF20A*は細胞分裂時の染色体分離に必須のG2/M期関連遺伝子である。20化合物を用いてマーカー有用性をQPCRにより検証した結果、*KIF20A*は全てのDNA損傷性化合物で発現低下を示し、陰性2化合物については低下せずDNA非損傷性として明確にクラス分類した。DNA損傷性化合物の曝露により、p53経路およびG2/M期移行プロセスが有意に誘発されたことから、G2/M期関連遺

伝子である *KIF20A* の低下は G2/M 期停止をもたらす DNA 損傷の指標として有用であることを明らかにした.

以上のように, 本研究は, トキシコゲノミクス的手法を用いて, *CDKN1A* の発現上昇と *KIF20A* の発現低下が DNA 損傷依存性の遺伝毒性リスクの評価指標として極めて有用である可能性を明らかにした. これらの研究成果は, 薬剤の安全性評価に加えて, 獣医学, 薬学および医学の毒性学, 薬理学などの関連分野の発展に寄与することが期待され, 本論文の審査および最終試験の成績と併せて博士 (獣医学) の学位を授与することを適当と認める.