

京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書

平成26年 1月26日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 辻 井 昭 雄 様

所属部局・研究科 医学研究科

職 名・学 年 博士課程4年

氏 名 西 原 佳 那

助 成 の 種 類	平成25年度 ・ 若手研究者在外研究支援 ・ 在外研究長期助成		
研 究 課 題 名	遺伝毒性・発がん性を持つ化学物質検出のためのハイスループットスクリーニング系の確立		
受 入 機 関	アメリカ国立衛生研究所		
渡 航 期 間	平成25年 4月 1日 ～ 平成25年12月26日 (うち一時帰国 平成25年6月2日～6月12日)		
成 果 の 概 要	タイトルは「成果の概要／報告者名」として、A4版2000字程度・和文で作成し、添付して下さい。「成果の概要」以外に添付する資料 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有()		
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,900,000円	
	使用した助成金額	1,900,000円	
	返納すべき助成金額	0円	
	助成金の使途内訳	渡航費	500,400円
		滞在費	1,532,500円
当財団の助成について	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) この助成を受けて、アメリカに滞在し大変有意義な時間を過ごすことができました。海外の研究室で実験をすることで、日本には学べないであろう多くのことを学ぶことができました。また、渡航前に全額を支給していただき、大変助かりました。ありがとうございました。		

成果の概要/西原 佳那

私は、アメリカ国立衛生研究所(National Institutes of Health) National Chemical Genomics Center に約 9 ヶ月間滞在し、Dr. Menghang Xia のもとで共同研究をおこなった。研究内容は、遺伝毒性・発がん性を持つ化学物質検出のためのハイスループットスクリーニング系の確立である。



<アメリカ国立衛生研究所 NCGC 外観>

[研究目的・背景]

毎年 1000 種類以上の新規に開発された化学物質が市場に出ている。新規に開発された化学物質の毒性を評価することは、安全性を確保するために必須である。現在、薬剤の遺伝毒性や発がん性の評価には 40 年以上前に開発されたサルモネラ菌を用いた Ames 試験やマウス細胞をもちいた小核試験が主に用いられている。これらの方法は複雑でないため、簡単に行うことができる。しかし、特に Ames 試験は偽陽性・偽陰性の確立が高いことが問題となっている。このため、簡便かつより特異性の高い有害化学物質の毒性評価系の確立が急務となっている。新たな有害化学物質検出法を開発するために米国 NIH(National Institutes of Health)と米国 NCGC(National Chemical Genomics Center)は、Tox21 プロジェクトを立ち上げ、世界中から検出法を公募した。我々が提案した DT40 細胞を使用した有害化学物質検出法は Tox21 プロジェクトに採用された。NCGC は新たに創られた有害化学物質検出法の妥当性を検証するための 12,000 種類からなる化学物質ライブラリー (ゴールドスタンダード) を所有し、さらにオートメーション化された実験装置を所有している。国内にはこのような化学物質ライブラリーは存在しない。これまでに、第一段階として 1,400 種類の化学物質から構成される化学物質ライブラリーを使用して妥当性検証試験を行った (Yamamoto et al., 2011)。今回の滞在中に私は、第二段階として 12,000 種類からなるゴールドスタンダードライブラリーを使用し、我々のアッセイ系のさらなる検証、アッセイ系の確立を目的に実験を行った。

[方法・結果]

以下に記載する実験はすべて、ニワトリ B リンパ球 DT40 細胞を用いておこなった。

野生型細胞、DNA 損傷修復因子欠損細胞 2 種類を化学物質に暴露した。DNA 損傷修復因子欠損細胞と野生型細胞の生存率を比較することで化学物質の毒性を評価した。ある化学物質が、野生型に比べ DNA 損傷修復因子欠損細胞の生存率をさらに低下させた場合、その化学物質は毒性がある、と判定することができる。

一次スクリーニングでは、1536 穴プレートを使用し、12,000 種類の化学物質へ 3 種類の細胞を 40 時間暴露し、細胞の生存率を測定した。それぞれの薬剤は 15 点の濃度に希釈されており、それぞれの濃度の細胞生存率から生存曲線を描くことができる。この生存曲線を野生型と DNA 損傷修復因子欠損細胞で比較することにより薬剤の毒性を評価した。得られた細胞生存曲線のデータを統計的手法を用いて解析し、野生型と比較して DNA 損傷修復因子欠損細胞の生存率を大きく低下させた薬剤を選び出した。結果を解析した結果、約 150 種類の薬剤が、DNA 損傷修復因子欠損細胞の生存率を野生型と比較して大きくて低下させた。これらの薬剤には DNA 毒性が既知の薬剤のみならず、これまでに DNA 毒性が全く知られていない薬剤も含まれている。

一次スクリーニングで得られた結果を確かめるために二次スクリーニングを行った。二次スクリーニングは、一次スクリーニングで選び出された薬剤（約 150 種類）を使用し、一次スクリーニングと同一条件で行った。この結果、約半分の薬剤で結果の再現性が確認できた。また、アッセイの質の向上を目的に一次スクリーニングで使用した二種類の DNA 損傷修復因子欠損株以外に別の 6 種類の DNA 損傷修復因子欠損株も用いて同様の実験を行い結果を比較した。現在、データを解析中である。

[まとめ]

我々の創ったニワトリ DT40 細胞を用いた新たなスクリーニング系を評価するために実験を行った。一次スクリーニングでは 12,000 種類の化学物質から約 150 種類を DNA 毒性をもつ可能性がある化学物質として選び出した。さらに、二次スクリーニングで結果の再現性を調べた結果、約半数の薬剤で再現性が確認できた。選び出されたこれらの化学物質中には DNA 毒性が既知の薬剤のみならず、これまでに毒性が全く知られていない薬剤も含まれている。これは、我々の創ったアッセイ系が今まで検出不可能であった薬剤の毒性も検出する能力がある、ということを示唆している。今後、二次スクリーニングで選ばれた化学物質を対象に、これらの化学物質が本当に DNA に損傷を与えているかどうかを確認する必要がある。このために、小核テスト、染色体分析、損傷誘導特異的なタンパク質

の発現を確認する実験を行う予定である。

今回、アメリカへの留学の機会を与えてくださった武田教授、滞在中に大変お世話になったアメリカ国立衛生研究所のメンハン先生と研究室の皆さん、京都大学教育研究財団にお礼申し上げます。