

遺伝毒性試験は、創薬における化合物の安全性評価のなかでも重要な項目のひとつであり、その評価方法は日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）によって定められている。遺伝毒性が陽性であれば、医薬候補品の開発を停止しなければならない場合もあるが、その作用機序が DNA 直接的でなければ、閾値を設けて開発を継続することができる。そのため、遺伝毒性の機序解明の評価系は重要であると考え、 $\gamma$ -H2AX と細胞周期に注目して本研究を行った。

Histone H2AX は、DNA が損傷されると迅速にリン酸化され、 $\gamma$ -H2AX と呼ばれるリン酸化タンパク質となるため、DNA 鎖切断のマーカーとして注目されている。一方、多くの遺伝毒性物質は、DNA 複製時や有糸分裂時にその作用機序に基づいて作用するため、細胞周期停止を引き起こす。そのため、化合物による細胞周期停止は、遺伝毒性の有用なマーカーとなると考えられた。 $\gamma$ -H2AX と細胞周期停止をハイコンテントスクリーニング (HCS) 法を用いて同時に検出することで、定量的かつハイスループットに遺伝毒性機序を推定できる系の構築は新規性があり、遺伝毒性機序解明の効率化に有用であると考えられた。以上のような背景により、ハイコンテントスクリーニング系を用いて遺伝毒性機序解明系の構築を行うことを目的として研究を行った。

本研究では、まず Apredica 社が開発した HCS 系である肝毒性予測システムの技術移管を受け、 $\gamma$ -H2AX と細胞周期を検出できる系の構築を行った。また、Apredica 社の解析システムでは変化を捉えられないケースが見られたため、NTT 数理システムと共同で解析システムを開発した。開発した解析システムでは、新たに最少反応濃度（MEC）という指標を導入することで、従来捉えられなかった変化を捉えることに成功した。

その後、19 種の様々なメカニズムを持つ遺伝毒性物質と 7 種の非遺伝毒性物質を HCS 系で評価し、各メカニズムに則した結果が得られるかを検証した。

26 種の化合物のうち、そのメカニズムより DNA 鎖切断を生じると考えられた化合物は 10 化合物であった。1 時間曝露の結果、 $\gamma$ -H2AX の検出感度は 80% (8 化合物/10 化合物) であり、特異度は 87.5% (14 化合物/16 化合物) であった。一方、24 時間曝露の結果、 $\gamma$ -H2AX の検出感度は 100% (10 化合物/10 化合物) であったが、特異度は 50% (8 化合物/16 化合物) であった。24 時間曝露の特異度が低かった要因としては、化合物の細胞毒性によるアポトーシスの結果生じた DNA 断片化によって  $\gamma$ -H2AX が増加したためと考えられた。実際、代表的な化合物を曝露した HepG2 細胞では、3 時間後から 24 時間後にかけてアポトーシスの指標である Caspase9 及び Cleaved PARP が増加していることが確認できた。そのた

め、 $\gamma$ -H2AX を用いた遺伝毒性の検出には、1 時間曝露が最適であると考えられた。

細胞周期に関しては、Hoechst33342 の染色により 2N/4N 比を検出し、その増減を用いて G1 期停止 (増加) と S、G2 及び M 期停止 (減少) を識別した。また M 期特異的に histone H3 がリン酸化されることを利用して、抗 phospho-histone H3 の蛍光強度の増減を観察することで、S-G2 期 (変化なしもしくは減少) と M 期 (増加) の識別を行った。その結果、DNA 鎖切断を生じると考えられた遺伝毒性物質では、S-G2 期での細胞周期停止が観察され、Paclitaxel などの Tubulin に作用する遺伝毒性物質では M 期での細胞周期停止が観察された。一方、高濃度の Sodium saccharin などでは、G1 期での細胞周期停止が観察された。よって、遺伝毒性物質は、そのメカニズムに基づいて、各細胞周期において細胞周期停止反応を示すことが明らかになった。以上のことから、細胞周期停止が、遺伝毒性メカニズム推定の有用なマーカーとなりうることが示された。

以上の研究成果により、HCS法を用いて $\gamma$ -H2AX 及び細胞周期の状態を観察することで、従来法と比較してハイスループットに遺伝毒性の機序解析を行うことができる系の構築を行うことに成功した。この系を創薬の早期スクリーニングに使用することで、より効率よく遺伝毒性機序解明を行うことができると考えられた。以上から、本審査委員会は博士 (学術) の学位を授与するにふさわしいものと認定する。