

## 就任講演

# DNA 付加体定量によるヒト発がんの分子疫学的研究

許 南 浩

富山医科薬科大学医学部医学科第二生化学教室

### はじめに

ヒトの発がんの大部分は環境中の化学物質の作用によると考えられている。化学物質の発がん作用の主な標的は DNA であり、大部分の発がん物質はそれ自体か、代謝活性化を受けた後で、DNA と結合して付加体を形成する。この DNA の構造変化が突然変異・発がんにつながるのである。

### DNA 付加体と発がん

実験動物や培養細胞をつかって行われた DNA 損傷と発がんの関連性の研究から、発がんの頻度は DNA 損傷の質と量とよることが明らかになった。

このことに関して最も研究が進んでいるのは N-ニトロソ化合物である。N-ニトロソ化合物は環境中にあまねく存在し、多様な動物種に組織特異的な発がん作用を示すことから、ヒト発がんにも重要な役割を果たしていると考えられている化合物群である<sup>1)</sup>。この N-ニトロソ化合物が細胞に作用すると、DNA の十数カ所がアルキル化された付加体ができる<sup>2)</sup>(図-1)。そのうち突然変異・発がんにつながるのは、比較的少量しか形成されない O<sup>6</sup>-アルキルグアニンと O<sup>4</sup>-アルキルチミンである<sup>3,4)</sup>。N7-アルキルグアニンや N3-アルキルアデニンは細胞毒性は示すが、突然変異を誘起する確率は低い。これが付加体の質ということである。

各種付加体の生成量は、細胞が実際に暴露される化合物の量や代謝活性化の能率によって絶対量が決まり、化合物の性質によって相対量が違ってくる。一方、こうした DNA 付加体は細胞の DNA 修復機構の作用を受けて除去される。その効率は、付加体

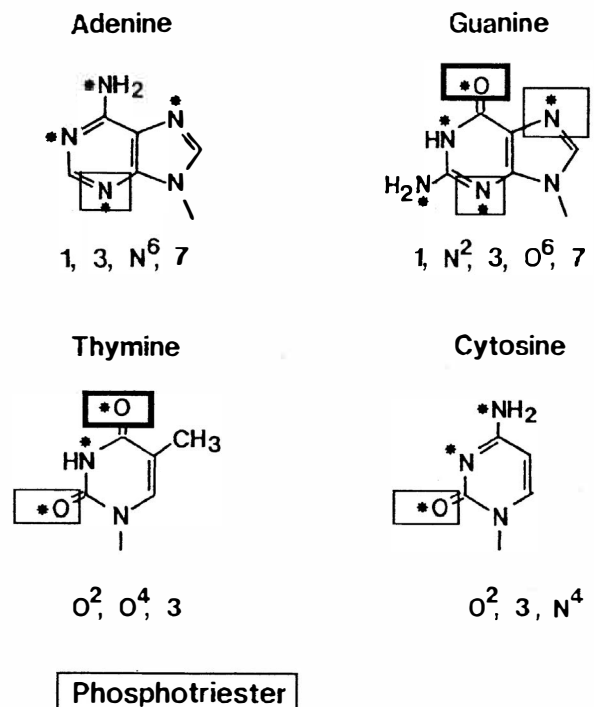


Fig. 1 Alkylation sites in DNA by N-nitroso compounds. More than ten different alkylation products are formed by representative N-nitroso compounds. The bald square indicates the major pre-mutagenic sites. The sites with normal square are preferentially alkylated in DNA.

によっても、細胞によっても異なる。すなわち、ある時点での動物組織中の付加体の量は、こうした暴露量、体内への吸収、組織分布、代謝、排泄、修復除去などの総体的結果を反映している(図-2)。逆に言えば、DNA 付加体量を定量するということは突然変異の直前の段階を調べていることになり、これが発がんとの強い相関関係が得られる基盤である。

ジエチルニトロソアミンの経口投与による肝臓癌

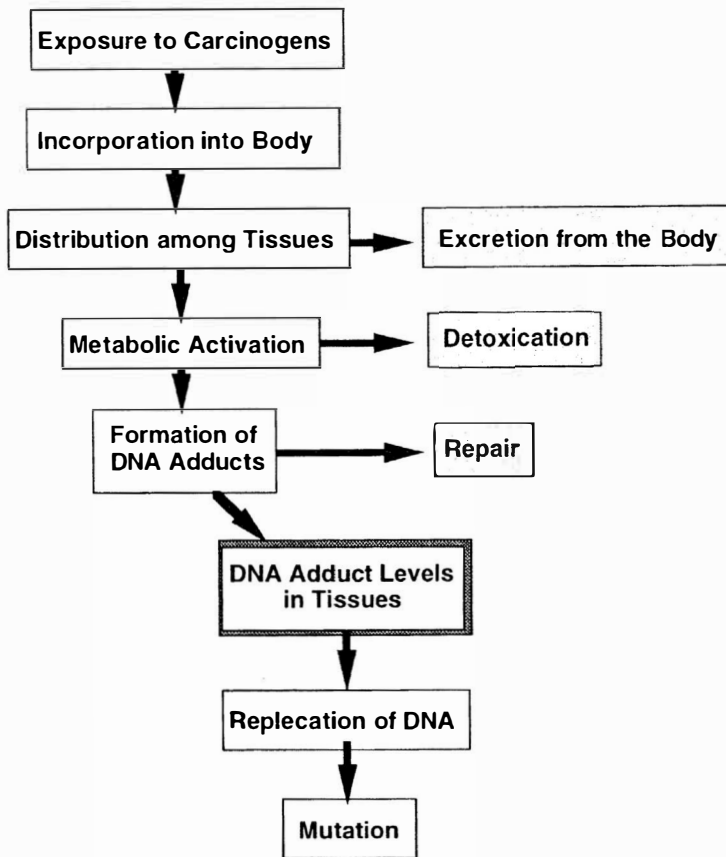


Fig. 2 Multiple steps from exposure to mutation. Analysis of DNA adduct levels in tissues is the most proximate to mutation among the monitoring methods of human exposure to environmental carcinogens.

の発生，エチルニトロソウレアの経胎盤投与による脳腫瘍の発生など典型的な動物発がん実験系において，標的臓器 DNA 中の付加体を調べてみると，それぞれ O<sup>4</sup>-エチルチミン，O<sup>6</sup>-エチルグアニンが正常塩基 10<sup>5</sup>に一個程度存在していた<sup>3,5)</sup>。つまり，この程度の付加体レベルがあって，細胞増殖活性があれば，ほぼ全ての動物の標的臓器にがんが発生することになる。

DNA 付加体の質と量が実験的動物発がんの決定要因であるなら，ヒトではどうか。もしヒトの組織 DNA 中に発がんにつながる DNA 損傷が検出されれば，ヒト発がんに関与する要因を推定できるだけでなく，高リスクグループの同定を通じて早期診断やがんの予防にもつなげることができよう。このような研究を DNA 付加体定量による分子疫学という(図-3)。

### ヒト肝組織中の O<sup>4</sup>-エチルチミン

我々はまず，ジエチルニトロソアミンの経口投与によるラットの肝臓癌の発生の経験に鑑みて，ヒトの肝組織に O<sup>4</sup>-エチルチ

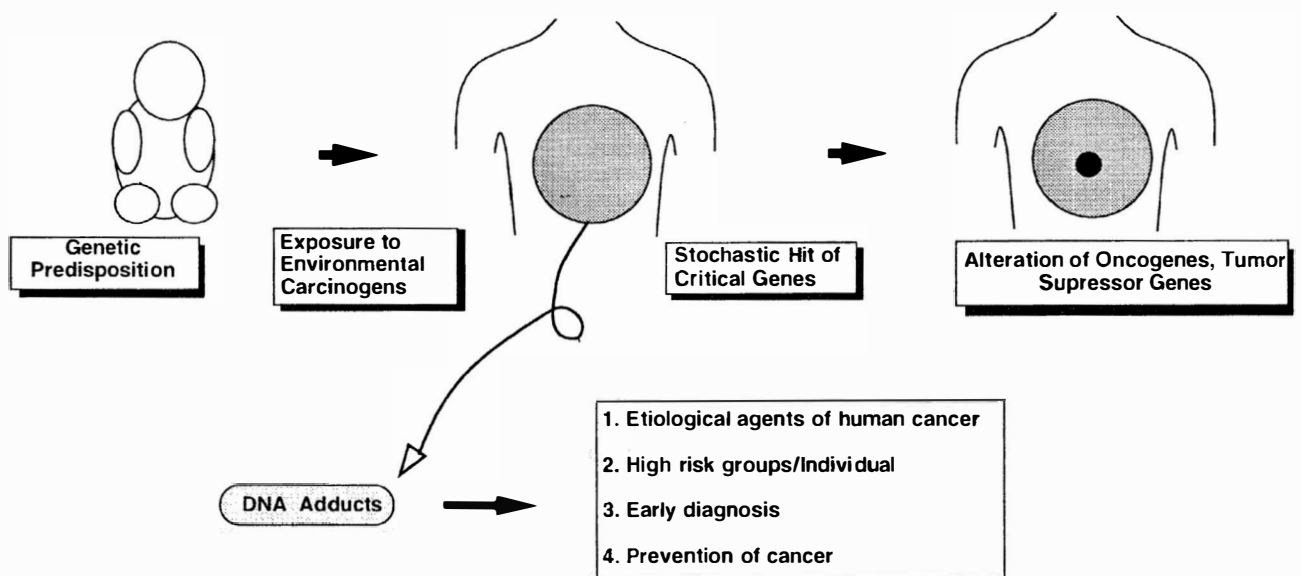


Fig. 3 Molecular epidemiology on human cancer by quantitation of DNA adducts.

ミンが検出できるかどうかを検討した。33剖検例から肝組織を採取し、DNAを抽出、加水分解してHPLCで分画した後、RIAでO<sup>4</sup>-エチルチミンを定量したところ、30例でO<sup>4</sup>-エチルチミンが検出された<sup>6)</sup>。そのレベルは、10<sup>8</sup>の正常チミンあたりにして、肝臓がん患者群12例の平均値39.9 (3.6~113)、肝臓以外の担がん患者群7例の平均値53.4 (3.6~206)、非がん患者群11例の平均値11.7 (3.4~25.8)であり、担がん患者群と非がん患者群の付加体レベルの間には統計的な有意差があった。このことは、ヒトがエチル化剤に曝されて発がんにつながるDNA損傷を確かに受けていることを示している。

#### O-アルキル付加体の高感度定量法 (PREPI) の開発

上記の研究に用いたHPLCによる分画とRIAを組み合わせた定量法は、特異性も高く信頼のおける定量法であるが、ヒト組織を解析するには感度が不十分で、そのために試料として数十gの組織から抽出したDNAを使う必要があった。これでは、生体材料を含む広範な解析を進めることが困難であるため、より感度の高い方法の開発を試みた (図-4)。

DNAを3'-ヌクレオチドに加水分解し、HPLCで分画してそれぞれのO-アルキル付加体を分取した。ポリヌクレオチドキナーゼと高比活性の<sup>32</sup>P-ATPで5'-をラベルした後、3'-側のリン酸を除去しHPLCで再分画した。最後に、各々のアルキル化付加体に対するモノクローナル抗体で免疫沈降してその放射活性を測定した。その結果、O<sup>6</sup>-メチルグアニン、O<sup>4</sup>-メチルチミン、O<sup>4</sup>-エチルチミンの三種の付加体を1fmolレベルで検出することができた<sup>7)</sup>。このことは100μg~150μg程度のDNAを使って10<sup>8</sup>の正常塩基あたり一個の付加体を検出できることになり、HPLCとRIAを組み合わせた従来の方法と比べると約1000倍感度が上昇した。しかも、この方法には、HPLCによる分画、特異的な酵素反応、モノクローナル抗体による免疫沈降と3段階の手順によって非常に高い特異性が保証されるという特長がある。ヒトは多様な化合物に暴露されており、DNAにはいろいろな構造変化が引き起こされていると考えられるので、この点は特に重要な意味をもつ。問題点としては、手順が多段階にわたる

ため時間と費用がかかり、超微量の物質を扱うための技術に習熟する必要があることである。

#### PREPI法によるヒト組織DNA中のアルキル付加体の定量<sup>8)</sup>

##### a) ヒト肝臓

感度・特異性ともに高いPREPI法を15例のヒト肝臓に応用して、O-アルキル付加体を定量した。その結果、O<sup>6</sup>-メチルグアニンは13例で検出され、そのレベルは11~67/10<sup>8</sup>グアニンであった。O<sup>4</sup>-メチルチミンは全例で検出され1~14/10<sup>8</sup>チミン、O<sup>4</sup>-エチルチミンも全例で検出され11~140/10<sup>8</sup>チミンであった。

O<sup>6</sup>-メチルグアニンとO<sup>4</sup>-メチルチミンはメチル化剤によって同時に生成され、その相対的生成量は通常のニトロソ化合物で100:1程度である。肝臓組織中のO<sup>6</sup>-メチルグアニンとO<sup>4</sup>-メチルチミンの平均値の相対比は約6:1であり、これはO<sup>6</sup>-メチルグアニンが肝臓においてより速やかに修復除去された結果であると考えられる。PREPI法で定量した肝臓のO<sup>4</sup>-エチルチミンのレベルは、HPLCによる分画とRIAを組み合わせた方法によって測定したレベルとほぼ一致しており、測定法によって結果が影響されることはないことを示す。

##### b) ヒト末梢白血球

15名のボランティアから、末梢血を15~20ml採取して、全白血球からDNAを抽出し、PREPI法によってアレルギー化付加体を定量した。その結果、O<sup>6</sup>-メチルグアニンは全例で検出され、そのレベルは0.7~4.6/10<sup>8</sup>グアニンで、肝臓のO<sup>6</sup>-メチルグアニン含量の3~6%に相当するに過ぎなかった。また、O<sup>4</sup>-メチルチミンとO<sup>4</sup>-エチルチミンは検出限界の0.2~0.8/10<sup>8</sup>チミン以下であった。肝臓組織と末梢血を採取したヒト集団が違っているため正確な比較はできないが、それでも両者のO-アルキル付加体レベルの差は歴然としており、これは両組織のアルキル化剤への暴露量、代謝活性化能の差に由来すると考えられる。ヒトのアルキル化剤への暴露の主要な経路は食物を介した消化管であると想定されており、消化管からの血液を門脈を通じて集める肝臓に高い付加体レベルが見いだされたことは、理解

# PREPI

(Pre-fractionation, Post-labeling, and Immunoprecipitation)

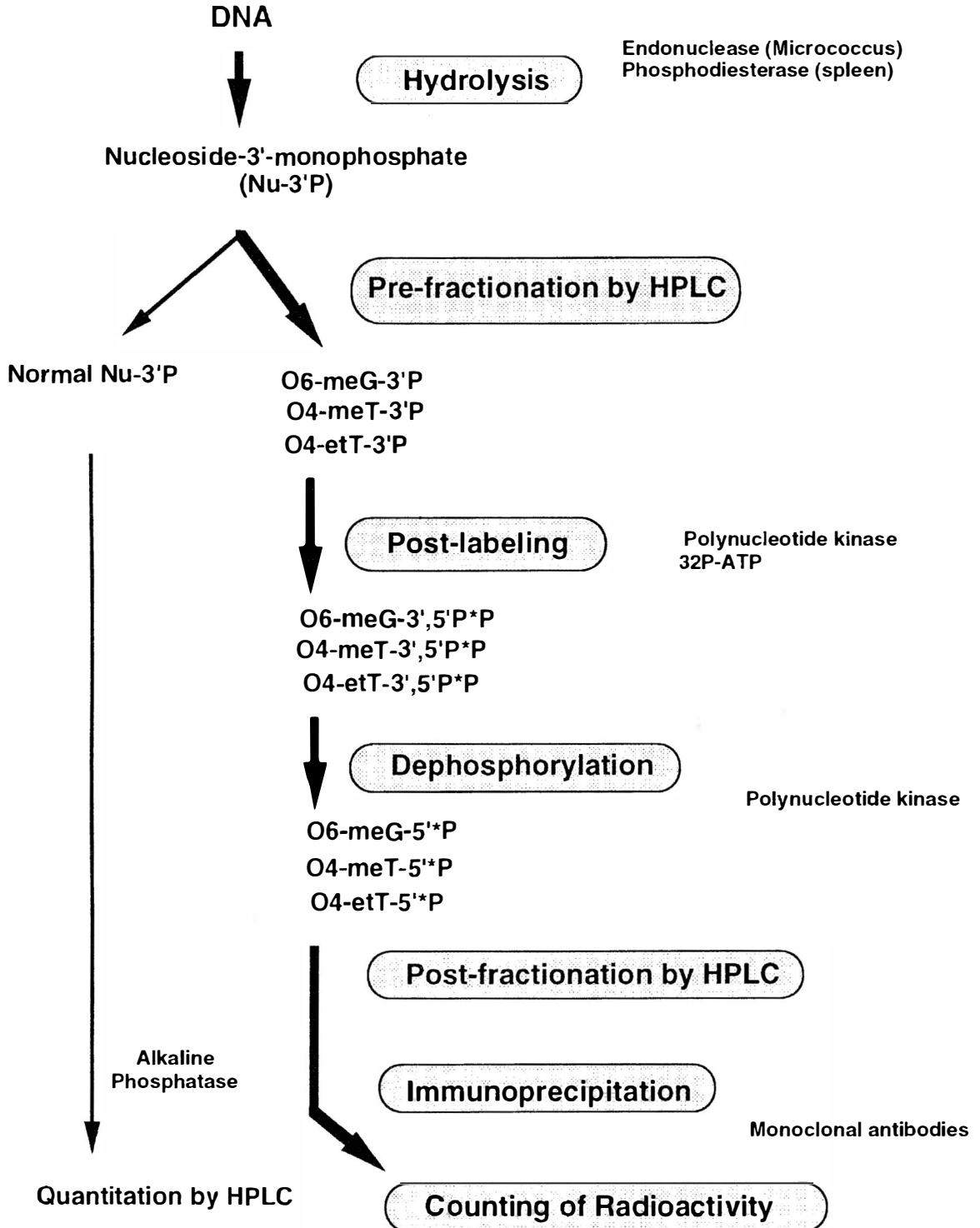


Fig. 4 Procedure of a highly sensitive and specific method to quantitate O-alkyl DNA adducts, PREPI.

しやすいことである。

### ヒト組織の O-アルキル化付加体レベルとその意義

以上の結果と、その他に現在進めている解析結果をあわせて、ヒト組織中の 3 種の O-アルキル付加体レベルをまとめたのが図-5 である。まず、殆どの解析例で付加体が検出されたことから、特別の暴露歴のない通常の生活を営んでいるヒトも、日常的

にアルキル化剤に曝されて、体内の様々な組織に発がんにつながる DNA 損傷を受けていることが確認されたことになる。その付加体レベルは、肝臓で高く末梢血で低い傾向があるが、おしなべていえば実験動物で殆ど100%の発がん頻度を示すレベルの 1/100 から 1/1000 程度に分布しているといえよう。ヒトと実験動物では、寿命、標的臓器の大きさ、代謝活性等、様々な違いがあるため、その意味付けについては今後さらに検討を進める必要があるにして

も、高感度定量法の開発によってようやくヒト組織を直接解析し、その発がんへの関与を追求する基盤ができたと考えている。

(本論文は、1996年1月12日に行われた就任記念講演の前半の一部をまとめたものである。)

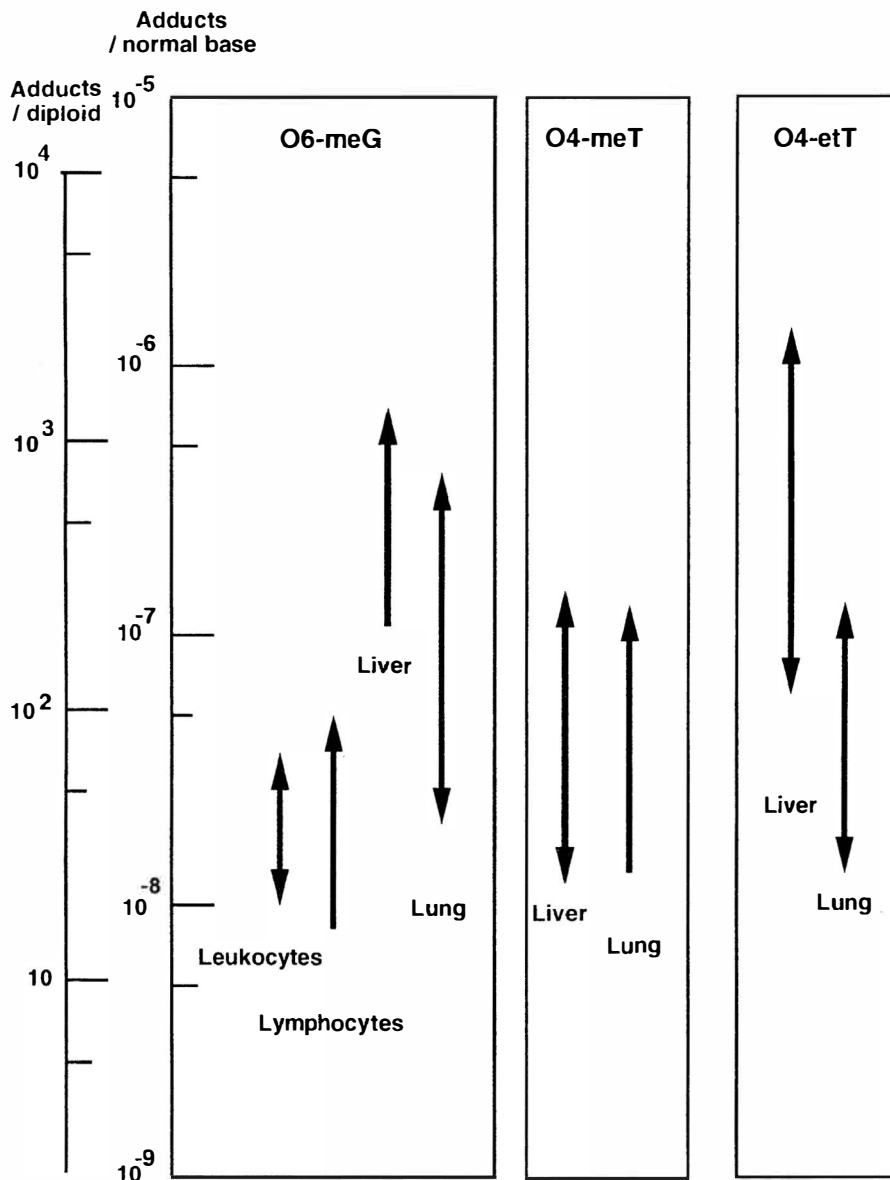


Fig. 5 O-Alkyl adducts in human tissues. O6-Methylguanine, O4-methylthymine, and O4-ethylthymine levels in human tissues are shown against two ordinates, the relative molecular ratio of adduct to normal counter-part and the number of adducts per diploid genome.

## 文 獻

- 1) Bartsh H. and Montesano R.: Relevance of nitrosamines to human cancer. *Carcinogenesis (Lond.)* **5**: 1381–1393, 1984.
- 2) Beranek D.T., Weis, C.C and Swenson D.H.: A comprehensive quantitative analysis of methylated and ethylated DNA using high pressure liquid chromatography. *Carcinogenesis (Lond.)* **1**: 595–606, 1980.
- 3) Goth R. and Rajewsky M.F.: Persistence of O<sup>6</sup>-ethylguanine in rat-brain DNA. *Proc. Natl. Sci. USA*, **71**: 639–643, 1974.
- 4) Thomale J., Huh N., Nehls P., et al.: Repair of O<sup>6</sup>-ethylguanine in DNA protects rat 208F cells from tmorigenic conversion by N-ethyl-N-nitrosourea. *Proc. Natl. Sci. USA*, **87**: 9883–9887, 1990.
- 5) Swenberg J.A., Dyroff M.C., Bedell M.A., et al.: O<sup>4</sup>-Ethyldeoxythymidine, but not O<sup>6</sup>-ethyldeoxyguanosine, accumulates in hepatocyte DNA of rats exposed continuously to diethylnitrosamine. *Proc. Natl. Sci. USA*, **81**: 1692–1695, 1984.
- 6) Huh N., Satoh M.S., Shiga J., et al.: Immunoanalytical detection of O<sup>4</sup>-ethylthymine in liver DNA of individuals with or without malignant tumors. *Cancer Res.*, **49**: 93–97, 1989.
- 7) Kang H., Konishi C., Eberle G., et al.: Highly sensitive, specific detection of O<sup>6</sup>-methylguanine, O<sup>4</sup>-methylthymine, and O<sup>4</sup>-ethylthymine by the combination of high-performance liquid chromatography prefractionation, <sup>32</sup>P-postlabeling, and immunoprecipitation. *Cancer Res.*, **52**: 5307–5312, 1992.
- 8) Kang H., Konishi C., Kuroki T., et al.: Detection of O<sup>6</sup>-methylguanine, O<sup>4</sup>-methylthymine, and O<sup>4</sup>-ethylthymine in human liver and peripheral blood leukocyte DNA. *Carcinogenesis (Lond.)* **16**: 1277–1280, 1995.