



TITLE:

Enhancing the sensitivity of the thymidine kinase assay by using DNA repair-deficient human TK6 cells( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Mahmoud, Abdelghany Ibrahim

---

CITATION:

Mahmoud, Abdelghany Ibrahim. Enhancing the sensitivity of the thymidine kinase assay by using DNA repair-deficient human TK6 cells. 京都大学, 2020, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2020-09-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k22723>

RIGHT:

京都大学	博士 ( 医 学)	氏 名	Mahmoud Abdelghany Ibrahim
論文題目	Enhancing the sensitivity of the thymidine kinase assay by using DNA repair-deficient human TK6 cells (DNA 修復欠損 TK6 細胞を使った化学物質の DNA 毒性の向上を目指した実験評価系の開発)		
(論文内容の要旨) The OECD guidelines define the bioassays of identifying mutagenic chemicals, including the thymidine kinase ( <i>TK</i> ) assay, which specifically detects the mutations that inactivate the <i>TK</i> gene in the human TK6 lymphoid line. However, the sensitivity of this assay is limited because it detects mutations occurring only in the <i>TK</i> gene but not any other genes. Moreover, the limited sensitivity of the conventional <i>TK</i> assay is caused by the usage of DNA repair-proficient <i>wild-type</i> cells, which are capable of accurately repairing DNA damage induced by chemicals. Mutagenic chemicals produce a variety of DNA lesions, including base lesions, sugar damage, crosslinks, and strand breaks. Base damage causes point mutations and is repaired by the base excision repair (BER) and nucleotide excision repair (NER) pathways. To increase the sensitivity of <i>TK</i> assay, two genes encoding <i>XRCC1</i> , an important BER factor, and XPA, which is essential for NER, were simultaneously disrupted, generating <i>XRCC1</i> <sup>-/-</sup> / <i>XPA</i> <sup>-/-</sup> cells from TK6 cells. The mutation frequency induced by four typical mutagenic agents, methyl methane sulfonate (MMS), cis-diamminedichloro-platinum(II) (cisplatin, CDDP), mitomycin-C (MMC), and cyclophosphamide (CP) were measured by the conventional <i>TK</i> assay using <i>wild-type</i> TK6 cells and also by the <i>TK</i> assay using <i>XRCC1</i> <sup>-/-</sup> / <i>XPA</i> <sup>-/-</sup> cells. The usage of <i>XRCC1</i> <sup>-/-</sup> / <i>XPA</i> <sup>-/-</sup> cells increased the sensitivity of detecting the mutagenicity by 8.6 times for MMC, 8.5 times for CDDP, and 2.6 times for MMS in comparison with the conventional <i>TK</i> assay. In conclusion, the usage of <i>XRCC1</i> <sup>-/-</sup> / <i>XPA</i> <sup>-/-</sup> cells will significantly improve <i>TK</i> assay.			

(論文審査の結果の要旨)

産業で作られる変異原性化学物質は法律で規制されており、その方法は OECD ガイドラインで規定される。変異原性化学物質は、染色体 DNA を損傷し、その損傷塩基が不正確に DNA 複製されて変異を起こす。ガイドラインが規定している、変異原性検出のためのバイオアッセイの 1 つがチミジンキナーゼ (tk) 試験である。tk 試験は、特異性が高い反面、感度が低いという問題があった。感度の低い原因は、tk 試験が、DNA 修復能力が正常な細胞 (ヒト TK6 B 細胞) を使い、この細胞が DNA 損傷を迅速かつ正確に修復するからである。

本研究は、この感度を向上させることを目的とする。その手法は、DNA 損傷修復経路が機能低下した TK6 を使うことである。申請者は塩基除去修復を促進する XRCC1 とヌクレオチド除去修復に必須な XPA を両遺伝子とも破壊した 2 重欠損 TK6 を使い tk 試験を行えば、多様な変異原性化学物質を、従来の tk 試験より高感度に検出できると着想した。典型的な変異原性化合物を使い、2 重欠損 TK6 を使う tk 試験は従来法よりも変異誘導効率が 2-8 倍程度改善することを実際に確認した。この新しい tk 試験は、従来法と同じ手法で変異原を検出できるが故に、行政が新たな投資をすることなく取入れることができる。

以上の研究成果は、変異原性化学物質からゲノム構造を維持する機構の解明に貢献し、レギュラトリーサイエンスに寄与するところが多い。したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、令和 2 年 5 月 27 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降