

令和6年度 厚生労働科学研究費 補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

化学物質による体細胞ゲノム毒性の検出手法および *in vitro* リスク評価法開発のため  
の研究

分担研究項目：転写に関連した突然変異生成の解析

研究分担者 堀端 克良 国立医薬品食品衛生研究所 ゲノム安全科学部

研究分担者 杉山 圭一 国立医薬品食品衛生研究所 ゲノム安全科学部

**研究要旨**

突然変異の生成とDNA複製には密接な相関関係があり、神経系などの細胞分裂がほとんど起きないサイレントな組織ではDNA複製の頻度も少なく、突然変異は生じにくいとされているが、実際にはそういったサイレントな組織・細胞でも突然変異やがんが生じる。DNA複製以外でDNAに直接影響を与える細胞内機能は遺伝情報の発現とその中心的機構である転写である。本研究ではサイレントな組織・細胞での突然変異誘発メカニズムとして、“転写に関連した突然変異生成” (transcription-associated mutagenesis; TAM)に着目し、これまでに研究分担者が樹立しているCHO系細胞をベースとしたTAM解析系（CHO/TAM解析系）を用いて、転写制御下において化学物質が介在する突然変異誘発にTAMが与える影響を明らかにすることを目的とする。

一般的に突然変異誘発にはDNA複製が主に関連することが知られており、DNA複製が活発に行われている場合、TAMの詳細を解析することが困難となる。そこで、初年度である今年度は、CHO/TAM解析系においてDNA複製の影響を抑制する実験条件を明らかにするため、CHO/TAM解析系での細胞分裂活性抑制条件を検討した。一般的な培養細胞では接触阻害や無血清下により細胞分裂活性が抑制されることが知られていることから、これらの条件下でのCHO/TAM解析系での細胞分裂活性を解析するとともに、CDK阻害剤等の処理下での細胞分裂活性抑制条件を検討した。その結果、CHO/TAM解析系においては接触阻害や無血清下では細胞分裂活性がほとんど抑制されないが、CDK阻害剤等の処理下では細胞分裂活性が抑制される実験条件を明らかにした。

**A. 研究目的**

DNA損傷が修復されないままDNA複製が起こることで突然変異が誘発される。すなわち、DNA複製と突然変異生成には密接な正の相関関係があり、活発に細胞分裂する組織ではDNA複製が盛んであり突然変異は生じやすいが、神経系のような細胞分裂が起きないか、ほとんど起きない組織ではDNA複製の頻度も少なく突然変異は生じにくいとされている。しかしながら、実際にはサイレントな組織や細胞でも突然変異やがんが生じる。この事実は、細胞分裂とそれに付随するDNA複製には依らない、これまで

に知られていない突然変異誘発メカニズムの存在を示唆する。

DNA複製以外でDNAに直接関わる主な細胞内機能は、DNA上の遺伝情報を読み出す機能である転写である。この転写の際に様々な事象が生じて突然変異が誘発される、“転写に関連した突然変異生成” (transcription-associated mutagenesis; TAM)の存在が指摘されており、実際に酵母を用いた研究からDNA topoisomerase IがTAMに関与する可能性が示唆されていることに加え、TAMは高度に転写が行われているtRNA遺伝子内およびその周囲の配列変動パターン

### 別添 3

の重要な決定要因であることも報告されている。

その一方で、最近では化学物質等についても細胞分裂終了後の体細胞にDNA突然変異を引き起こすことが明らかとなっているが、その詳細なメカニズム等は不明である。そこで、本研究ではサイレントな組織・細胞での化学物質による突然変異誘発メカニズムとして、TAMに着目し、これまでに研究分担者が樹立しているCHO系細胞をベースとしたTAM解析系(CHO/TAM解析系)を用いて、転写制御下において化学物質が介在する突然変異誘発にTAMが与える影響を明らかにすることを目的とする。

#### B. 研究方法

本研究では、これまでに研究分担者が樹立しているCHO/TAM解析系で用いるCHO-KTG5細胞株を用いる。この細胞株は、突然変異解析の標的遺伝子である大腸菌*gpt*遺伝子のプロモーターからターミネーターを含んだ*gpt*カセットを利用して作成したλファージDNAコンストラクト(図1)をClontech社のCHO Tet-On 3G細胞に安定に導入して作成したものである。このλファージDNAコンストラクトは、Tetプロモーター(*P<sub>TRE3G</sub>*)下流に標的遺伝子領域である*gpt*カセットが挿入されており、Tet-ON/OFFにより自在に*gpt*カセット上を転写装置が通るように転写反応を制御する(図2)。その後、細胞ゲノムDNA中のファージDNA領域を*in vitro* packagingでファージとして回収し、*cre*組換え酵素を発現する大腸菌に感染させて菌内においてプラスミド化し、細胞内のTAMで生じた*gpt*カセット上の突然変異の表現型と遺伝子型を大腸菌で解析する。

上記CHO-KTG5細胞株を、5%FBS含有Ham's F-12培地および100 mm x 20 mm 細胞培養用ディッシュを用いて培養表面積の40~50%を占めるように播種し、定着後に5%FBS含有Ham's F-12培地または無血清Ham's F-12培地に交換して終夜培養(約16時間)した後、TC10全自動セルカウンター

(BIO-RAD)を用いて細胞濃度を計測した。その結果、血清の有無による細胞数の変化は見られなかった(data not shown)。引き続き、CHO-KTG5細胞株を、5%FBS含有Ham's F-12培地および100 mm x 20 mm 細胞培養用ディッシュを用いて培養表面積の約90%を占めるように播種し、そのまま経時的に5%FBS含有Ham's F-12培地交換を続けた。培養表面積の約100%を超えてもそのまま5%FBS含有Ham's F-12培地交換を続けた結果、過剰増殖となり、接触阻害による分裂阻害は見られないと判断した(data not shown)。

CHO-KTG5細胞株を、5%FBS含有Ham's F-12培地および100 mm x 20 mm 細胞培養用ディッシュを用いて培養表面積の40~50%を占めるように播種し、定着後、陰性対照群として5%FBS含有Ham's F-12培地のみの処理群、ALLN (Sigma-Aldrich 208719)を10 μMまたは20 μM含有する5%FBS含有Ham's F-12培地処理群、または、Roscovitine (Sigma-Aldrich 557360)を15 μMまたは30 μM含有する5%FBS含有Ham's F-12培地処理群を設定し、各培地で終夜培養(約16時間)した後、TC10全自動セルカウンターを用いて細胞濃度を計測した。その結果、陰性対照群と比較し、ALLNおよびRoscovitine処理群の細胞濃度が半分程度であった(data not shown)。引き続き、これらの条件下における細胞周期解析を、Click-iT™ Plus EdU Alexa Fluor™ 488 Flow Cytometry Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc. C10632)、Cell Cycle Assay Solution Deep Red(富士フィルム和光純薬348-09591)およびBD FACScan toIIフローサイトメーターを用いて実施した。特に、新生DNA合成はClick-iT™ Plus EdU Alexa Fluor™ 488 Flow Cytometry Assay Kit、既存のDNAはCell Cycle Assay Solution Deep Redにより分けて染色した。

#### C. 研究結果

CHO-KTG5細胞株を用いるCHO/TAM解析系において、細胞濃度計測により接触阻害や無血清下での細胞分裂活性を確認した

### 別添 3

結果、どちらの条件でもまったく細胞分裂活性の抑制が見られなかった。他方、CDK阻害剤等の処理下では細胞分裂活性が抑制される処理条件を明らかにした。これらの条件下での細胞周期を解析した結果、陰性対照群と比較し、ALLNの10 µM処理群ではほとんどの細胞でのS期の抑制が見られ、さらに20 µM処理群ではほぼすべての細胞でのS期の抑制が見られた(図3)。Roscovitine 15 µM処理群ではかなりのS期の抑制が見られるものの、完全な抑制ではなかった。Roscovitine 30 µM処理群では、ALLN 20 µM処理群と同様に、ほぼすべての細胞でのS期の抑制が見られた(図3)。

#### D. 考察

CHO細胞は増殖効率が非常に高いことが知られており、接触阻害や無血清下での増殖抑制が見られない可能性は概ね予想していたが、続くTAM解析では目的外の化学物質による影響を可能な限り排除する必要があるため、初案として化学物質を使用しない方法での細胞分裂活性の抑制を目指した。その結果、やはりCHO-KTG5細胞株を用いるCHO/TAM解析系において、接触阻害や無血清下においては細胞分裂活性の抑制が見られなかった。

引き続き、細胞周期の進行を抑制することが知られているALLNまたはRoscovitine処理を行った結果、今回採用した実験条件でS期を十分に抑制できることを明らかにした。他方、新生DNA合成と既存のDNAを区別するため、それぞれをClick-iT™ Plus EdU Alexa Fluor™ 488 Flow Cytometry Assay KitまたはCell Cycle Assay Solution Deep Redにより分けて染色したが、Cell Cycle Assay Solution Deep RedはEdU等を用いる新生DNA染色との同時使用により凝集体が見られることやフローサイトメーター解析時のサイトグラムが若干乱れることなどから、上記の二重染色の相性が最適では無いと考える。したがって、より詳細なS期抑制を解析するため、BrdUや7-AADを用いる二重染

色を用いるなどの工夫が必要である。

今回の結果により、ALLNまたはRoscovitine処理によりS期の抑制条件が確認できたため、今後はこれらの条件下において、アルキル化剤などによるTAM解析を実施する。

#### E. 結論

一般的に突然変異誘発にはDNA複製が主に関連することが知られており、DNA複製が活発に行われている場合、TAMの詳細を解析することが困難となる。そこで、初年度である今年度は、CHO/TAM解析系においてDNA複製の影響を抑制する実験条件を明らかにするため、CHO/TAM解析系での細胞分裂活性抑制条件を検討した。その結果、CHO-KTG5細胞株を用いるCHO/TAM解析系において、ALLNまたはRoscovitine処理によりS期が十分に抑制できることを明らかにした。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### G.1. 論文発表

1. Parsons BL, Beal MA, Dearfield KL, Douglas GR, Gi M, Gollapudi B, Heflich RH, Horibata K, Kenyon M, Long AS, Lovell D, Lynch AM, Myers MB, Pfulher S, Vespa A, Zeller A, Johnson G, White PA. Severity of Effect Considerations Regarding the Use of Mutation as a Toxicological Endpoint for Risk Assessment: A Report from the 8th International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT). *Environmental and Molecular Mutagenesis*. in press

##### G.2 学会発表

1. 堀端克良, 佐々木沙耶, 杉山圭一 : Detection of genotoxic reactions by analyzing DNA damage response using

### 別添 3

- chromatin immunoprecipitation. 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7)
2. 磯貴子, 村田康允, 広瀬望, 馬野高昭, 津田雅貴, 堀端克良, 杉山圭一, 増村健一, 松本真理子: In vivo mutagenicity evaluation of cobalt acetate tetrahydrate. 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7)
  3. 堀端克良, 佐々木沙耶, 杉山圭一: クロマチン免疫沈降法を利用したアルキル化剤誘発遺伝毒性反応の検出. 第 83 回日本癌学会学術総会 (2024.9)
  4. 堀端克良, 安東朋子, 吉田愛海, 杉山圭一: 遺伝情報発現に付随する突然変異誘発. 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会 (2024.12)
  5. 松本真理子, 磯貴子, 馬野高昭, 村田康允, 広瀬望, 増村健一, 堀端克良, 杉山圭一: トルエンジイソシアネート経口投与による MutaMouse 肝臓における変異原性. 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会 (2024.12)
  6. 羽倉昌志, 加藤雅之, 川上久美子, 皿田巳子, 須井哉, 杉山圭一, 堀端克良, 峯川和之, 山本美佳, 山田雅巳: TA100 株の全ゲノム解析: 遺伝子変異のロット間比較 (BMS pilot study). 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会 (2024.12)
  7. 増村健一, 安東朋子, 堀端克良, 石井雄二, 杉山圭一: アクリルアミドが誘発する生殖系列突然変異の解析. 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会 (2024.12)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

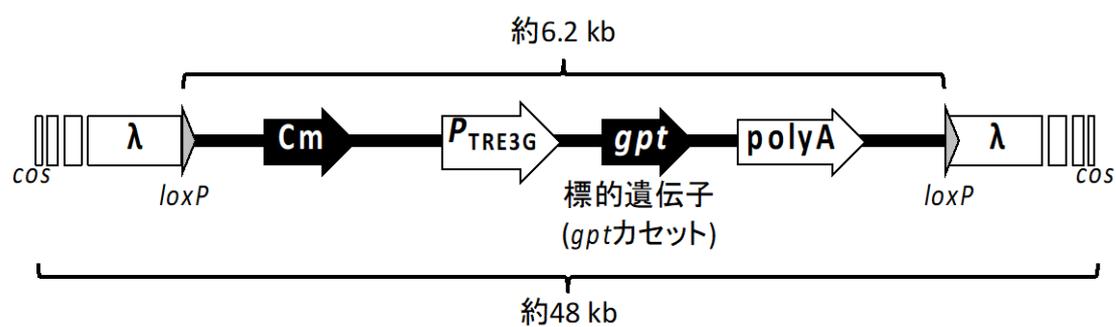


図1. CHO/TAM解析系で用いるファージDNAコンストラクトの略図

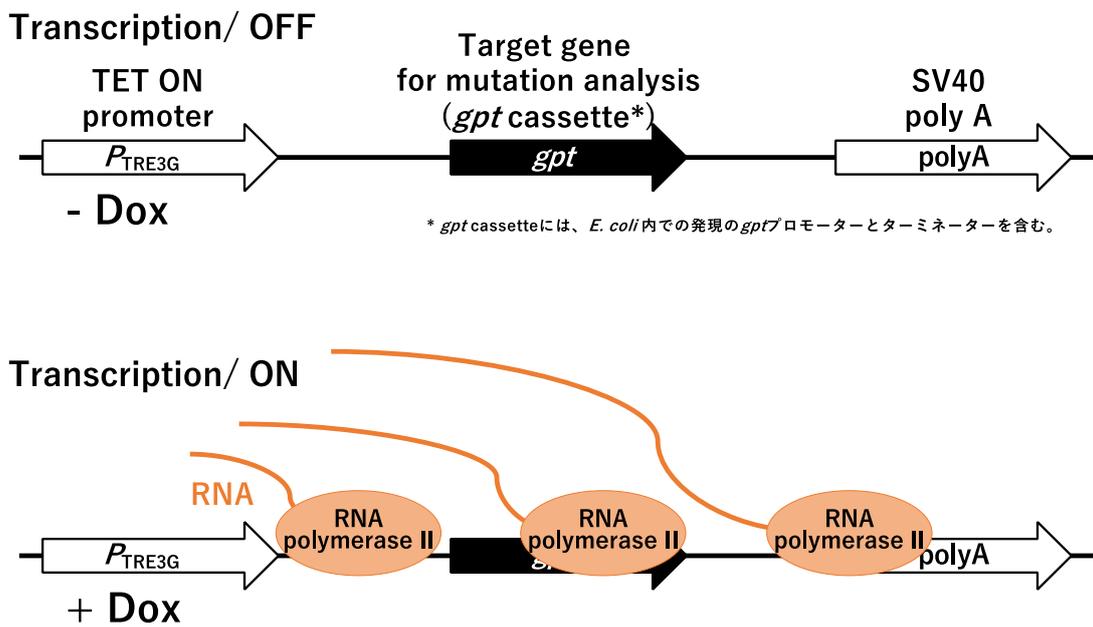


図2. ドキシサイクリン添加によるTAM解析系での転写の制御

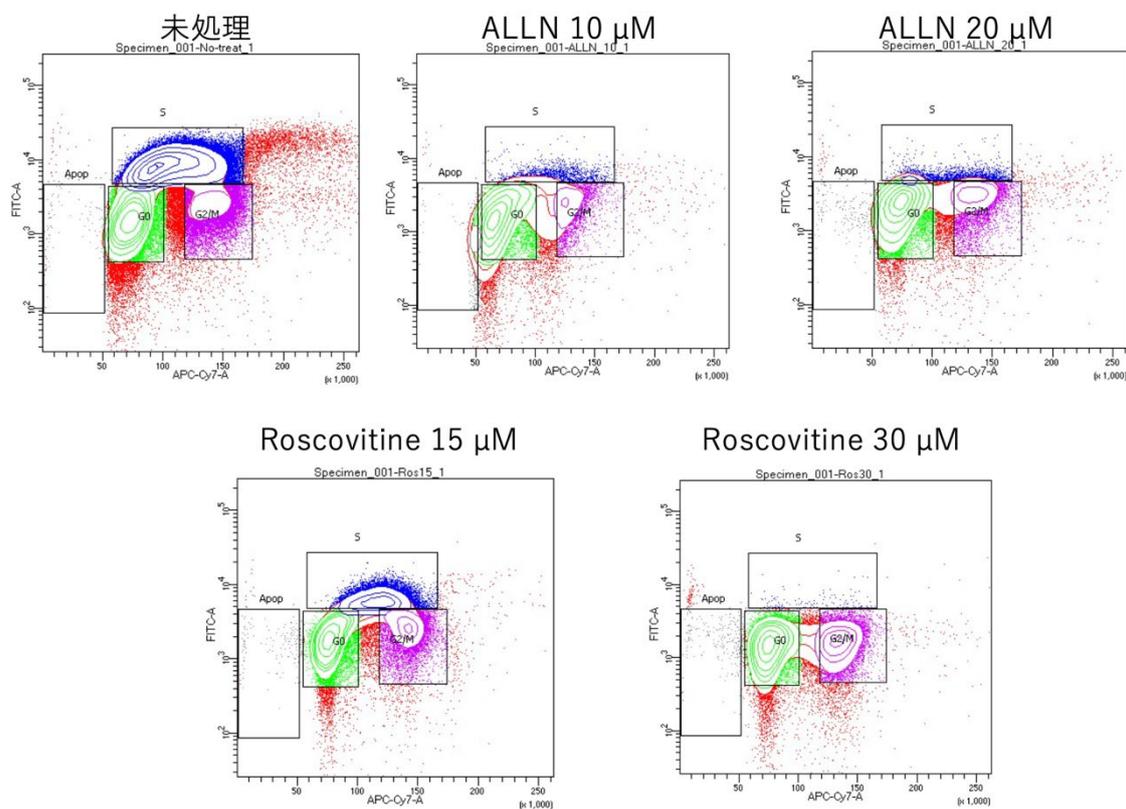


図3. TAM解析系におけるS期抑制の条件検討