

令和6年度 厚生労働科学研究費補助金 補助金（化学物質リスク研究事業）

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

分担報告書名：化学物質によるゲノム毒性検出法の開発

研究分担者 伊澤和輝 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

近年、化学物質等が細胞分裂終了後の体細胞に体細胞突然変異やメチル化等のエピジェネティクス異常を引き起こすことが報告されており、ヒト健康影響が懸念されている。そのため、体細胞突然変異やエピジェネティクス異常等のゲノム毒性の検出法を確立し、細胞分裂終了後の細胞を用いたin vitroゲノム毒性リスク評価系を開発することは化学物質安全管理推進のために重要である。

ゲノム毒性のうち、体細胞突然変異に関してはin vitro、in vivoの試験がこれまでに開発されているが、近年においては従来手法よりも精緻な変異原性評価が可能な手法として、次世代シーケンサー（NGS）のエラーを低減し低頻度の体細胞変異を検出可能とするerror-corrected sequencing（ecNGS）が開発され、世界的に注目されている。ecNGSを用いた手法においては、原理的にゲノム全体の変異を検出することが可能であり、レポーター遺伝子など特定の遺伝子に限定されない変異原性評価法であるため応用の幅も広い。

本分担研究においては、分裂終了後の細胞に対して ecNGS を適用することで、化学物質による影響を評価する手法の確立を目指す。前提条件として、ある生体組織において細胞分裂を終了した細胞は、細胞分裂を終了していない細胞に比べ、時間経過とともに細胞集団内でその割合を小さくしていくと考えられる。これまで ecNGS は細胞やDNA 量が潤沢な条件（10 万細胞程度、500ng 程度）で利用されてきたため、本研究で着目するような、少数細胞あるいは採取可能な DNA 量が少ない条件での実施例が少ない。そのため、本年度においては、まず ecNGS 解析に必要な量の DNA 断片分子を確保する手法について検討した。

本年度においては、まず先行研究で用いられている PCR 法を検討した。その結果、従来法の 10 分の 1 程度の DNA 量（50ng 程度、1 万細胞程度）から十分量の DNA 断片分子を確保することができた。また従来法の 100 分の 1 程度の DNA 量でも十分量の DNA 断片が回収可能であることが示唆された加えて PCR 法の検討と平行して、既存手法のプロトコルを改良し、細胞・DNA 量の少ない条件に適用する手法を検討した。一部プロトコルの改良の結果、従来法の 10 分の 1 程度の DNA 量（100ng 程度、2 万細胞程度）の DNA 量で十分量の分子を回収し、ecNGS による解析が可能であることが示唆された。

A. 研究目的

近年、化学物質等が細胞分裂終了後の体細胞に体細胞突然変異やメチル化等のエピジェネティクス異常を引き起こすことが報告されており、ヒト健康影響が懸念されている。そのため、体細胞突然変異やエピジェネティクス異常等のゲノム毒性の検出法を確立し、細胞分裂終了後の細胞を用いたin vitroゲノム毒性リスク評価系を開発することは化学物質安全管理推進のために重要である。

ゲノム毒性のうち、体細胞突然変異に関してはin vitro、in vivoの試験がこれまでに開発されているが、近年においては従来手法よりも精緻な変異原性評価が可能な手法として、次世代シーケンサー (NGS) のエラーを低減し低頻度の体細胞変異を検出可能とするerror-corrected sequencing (ecNGS) 法が開発され、世界的に注目されている。ecNGSを用いた手法においては、原理的にゲノム全体の変異を検出することが可能であり、レポーター遺伝子など特定の遺伝子に限定されない変異原性評価法であるため応用の幅も広い。

本分担研究においては、分裂終了後の細胞に対してecNGSを適用することで、化学物質による影響を評価する手法の確立を目指す。前提条件として、ある生体組織において細胞分裂を終了した細胞は、細胞分裂を終了していない細胞に比べ、時間経過とともに細胞集団内でその割合を小さくしていくと考えられる。これまでecNGSは細胞やDNA量が潤沢な条件 (10万細胞程度、500ng程度) で利用されてきたため、本研究で着目するような、少数細胞あるいは採取可能なDNA量が少ない条件での実施例が少ない。そのため、本年度においては、まずecNGS解析に必要な量のDNA断片分子を確保する手法について検討した。

B. 研究方法

B-1. PCR 法による DNA 断片分子確保

ラット由来のゲノム DNA 50ng から、

ThruPLEX® Tag-Seq HV kit (タカラバイオ株式会社, 日本) を用い、キット付属のプロトコルに従って NGS 解析可能な DNA 断片分子 (ライブラリ) を作製した。シーケンスには NovaSeq (Illumina, Inc., USA) を用い、シーケンスデータの解析についてはキット付属のプロトコルに従った。

B-2. 従来手法のプロトコル改良による DNA 断片分子確保

従来の ecNGS 手法である PECC-Seq 法 (You et al., 2020) においては、ビーズ精製によるフラグメントスクリーニングのステップが存在し、これによって 150bp 程度の DNA 断片を取得していたが、このステップにおいて多くの DNA を損失していると考えられた。

一方で、事前のプロトコル改良の検討により、酵素反応による DNA 断片化ステップにおいては、DNA 断片が 150bp 程度に断片化されているため (図 1)、ビーズ精製によるフラグメントスクリーニングのステップを行わないことで少量 DNA に対応可能であると考えられた。

そこで PECC-Seq 法におけるライブラリ作製プロトコルを改良し、モデル非分裂性細胞である HepaSH 細胞由来のゲノム DNA 100ng を NEBNext® dsDNA Fragmentase® (New England Biolabs, USA) により、37℃, 30 分の条件で断片化を行った。断片化した DNA を Invitrogen™ S1 Nuclease (Thermo Fisher Scientific, USA) で 30℃, 30 分処理した。得られた約 150bp 程度の DNA 断片について TruSeq DNA PCR-Free Kit (Illumina, Inc., USA) を用いて illumina 社シーケンサー用のライブラリを作製した。シーケンスには NovaSeq (Illumina, Inc., USA) を用いた。この時、フラグメントスクリーニングのステップをスキップした。得られたリードデータについて、アダプター配列を Trimmomatic (v0.39) を用いて除去した。その後、公開されているヒトのゲノム配列 (GRCh38.p14) に対し、Burrows-Wheeler

aligner (BWA) の bwa mem モードによってリードのマッピングを行った。

C. 結果及び考察

C-1. PCR 法による DNA 断片分子確保

PCR 法による DNA 断片分子 (ライブラリ) 必要量確保のため ThruPLEX® Tag-Seq HV kit を用いた。DNA50ng から本キットを用いて 2 回の処理を行った結果平均して約 443nM の濃度のライブラリが得られた。標準的なライブラリの濃度としては 5nM 程度の濃度が目標となるため、十分量のライブラリが得られたと言える。また標準プロトコルにより目標濃度の約 90 倍の濃度のライブラリが作製されたことから、50ng よりも少ない DNA 量からでも十分量のライブラリが作製できると考えられる。加えて、ecNGS 解析の際には PCR によるエラーがバックグラウンドの変異頻度として検出されてしまうと考えられるが、標準プロトコルにおける PCR サイクルをより少ない回数に設定することが可能であり、これにより PCR エラーを低減することができると考えられる。

実際に R7 年度研究計画を先行し、1 サンプルについて解析を行ったところ、本年度において作製したライブラリにおいてはバックグラウンドの変異頻度においても 1.0×10^{-6} 以上の変異頻度があると考えられ、プロトコルの改良が必須であることが示唆された。

C-2. 従来手法のプロトコル改良による DNA 断片分子確保

実際にフラグメントスクリーニングのステップを行わずに作製したライブラリは約 4.6nM で目標濃度に近い濃度が得られた。

得られたライブラリについてシークエンス・マッピング解析を行った結果から DNA 断片長を計算したところ、100bp 以下、および 250bp 以上の部分まで幅広くリードが存在している一方で 150bp 付近にピークが存在し (図 2)、量・質共に既存手法での解析

に十分なライブラリが得られたと考えられる。

D. 結論

本分担課題と並行して「神経細胞、ミクログリアの採材法開発と細胞老化度標の明確化」の課題が進行しており、班会議報告においては次年度以降 ecNGS を適用すべき細胞は、一匹のマウスから $3.0 \sim 4.0 \times 10^4$ 細胞程度得られると報告されており、ここから取得可能な DNA 量は最大 200~500ng 程度と考えられる。本年度行った従来手法のプロトコル改良による DNA 断片分子確保においては 100ng 程度の DNA 量から ecNGS が可能であることが示唆されているため、次年度以降に目的の細胞を用いて ecNGS が可能であると考えられる。

加えて、本年度に得られた知見は、今後の ecNGS による低頻度体細胞変異の解析の適応範囲を拡大する上で重要であると考えられる。ecNGS は既存の動物試験を代替する手法として国際的なガイドライン化を目指した議論が急速に進行している。ecNGS に関する議論においては、技術の精度、特にバックグラウンドとしての変異頻度について着目されることが多いが、必要な細胞数や DNA 量など、本技術が適応可能な範囲については知見が少なかった。

本年度においては、ecNGS を可能とするライブラリを作製するための初期 DNA 量についての知見が得られた。特に既存手法のプロトコルの改良と利用については、依然として改良の余地があり、より少ない細胞数・DNA 量から ecNGS に適したライブラリ分子が作製可能であると考えられる。

現状において、ecNGS は遺伝毒性試験である遺伝子改変げっ歯類 (TGR) 試験に代わり、TGR を用いない *in vivo* 毒性試験である発がん性試験や一般毒性試験の試験試料に対し、ecNGS 手法を用いることによって変異原性評価までを行うような試験のマルチエンドポイント化および代替が期待されている技術である。一方で、本課題で取り組ん

でいる、少数細胞・少量 DNA についての知見が集積することで、例として動物血中に存在する DNA 等を用いた遺伝毒性評価が可能となり、さらなる動物試験の 3Rs に貢献できる可能性がある。

E. 研究発表

E-1. 論文発表

1. Shimizu N, Izawa K, Washif M, Morozumi R, Hirota K, Tsuda T: Role of TDP2 in the repair of DNA damage induced by the radiomimetic drug Bleomycin. *Genes Environ.* 28;47(1):7. 2025

E-2. 学会発表

1. 伊澤和輝. ecNGS ってなんだ？日本環境変異原ゲノム学会 第 84 回 MMS 研究会, 2024 年 6 月（東京）
2. 伊澤 和輝、津田 雅貴、鈴木 孝昌、本間 正充、杉山 圭一. ラット試料を用いた ecNGS による in vivo 変異原性評価法の確立に向けた研究. 第 47 回 日本分子生物学会 2024 年 11 月 27 日（福岡）
3. 伊澤和輝、津田雅貴、鈴木孝昌、本間正充、杉山圭一、NGS を用いたラット試験試料からの in vivo 変異原性データ取得への取り組み、第 52 回構造活性相関シンポジウム、2024 年 12 月（神奈川）
4. 伊澤和輝、データ解析におけるドメイン知識の重要性：ecNGS 解析編、日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会 Potential for Computational Genotoxicity シンポジウム、2024 年 12 月（岡山）

F. 知的所有権の取得状況

F-1. 特許取得

該当なし

F-2. 実用新案登録

該当なし

F-3. その他

該当なし

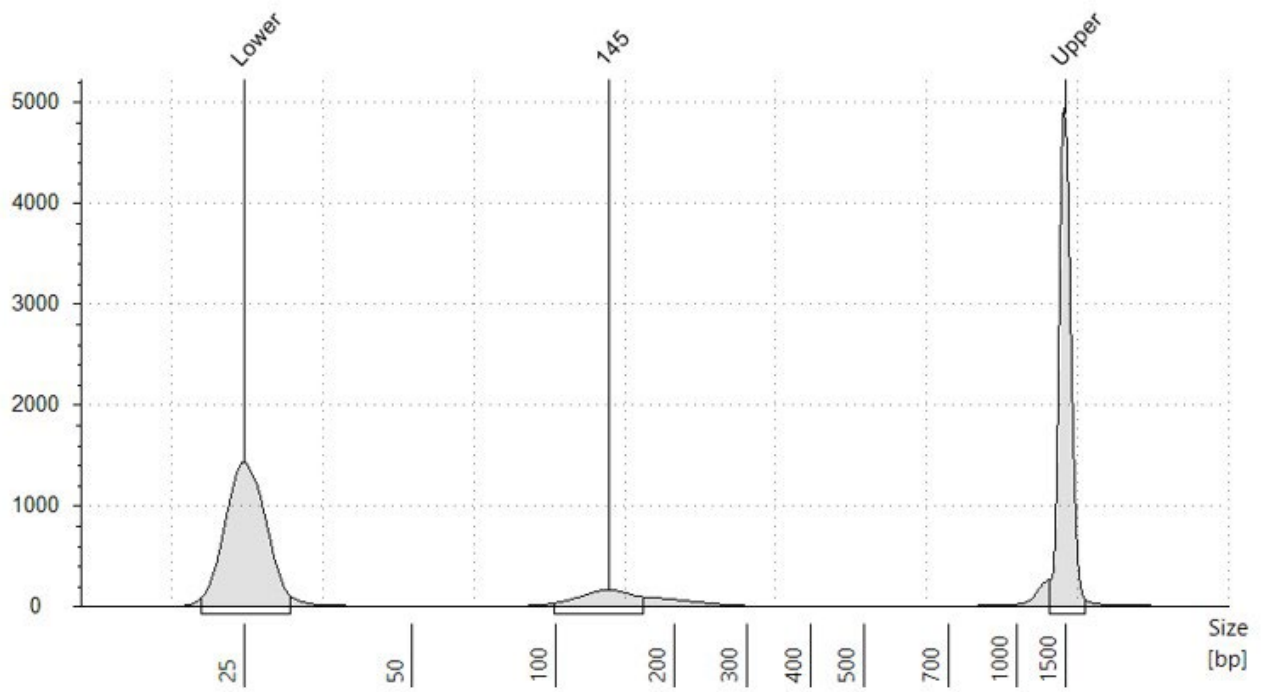


図 1. 酵素反応による DNA 断片化における DNA 断片長の分布例

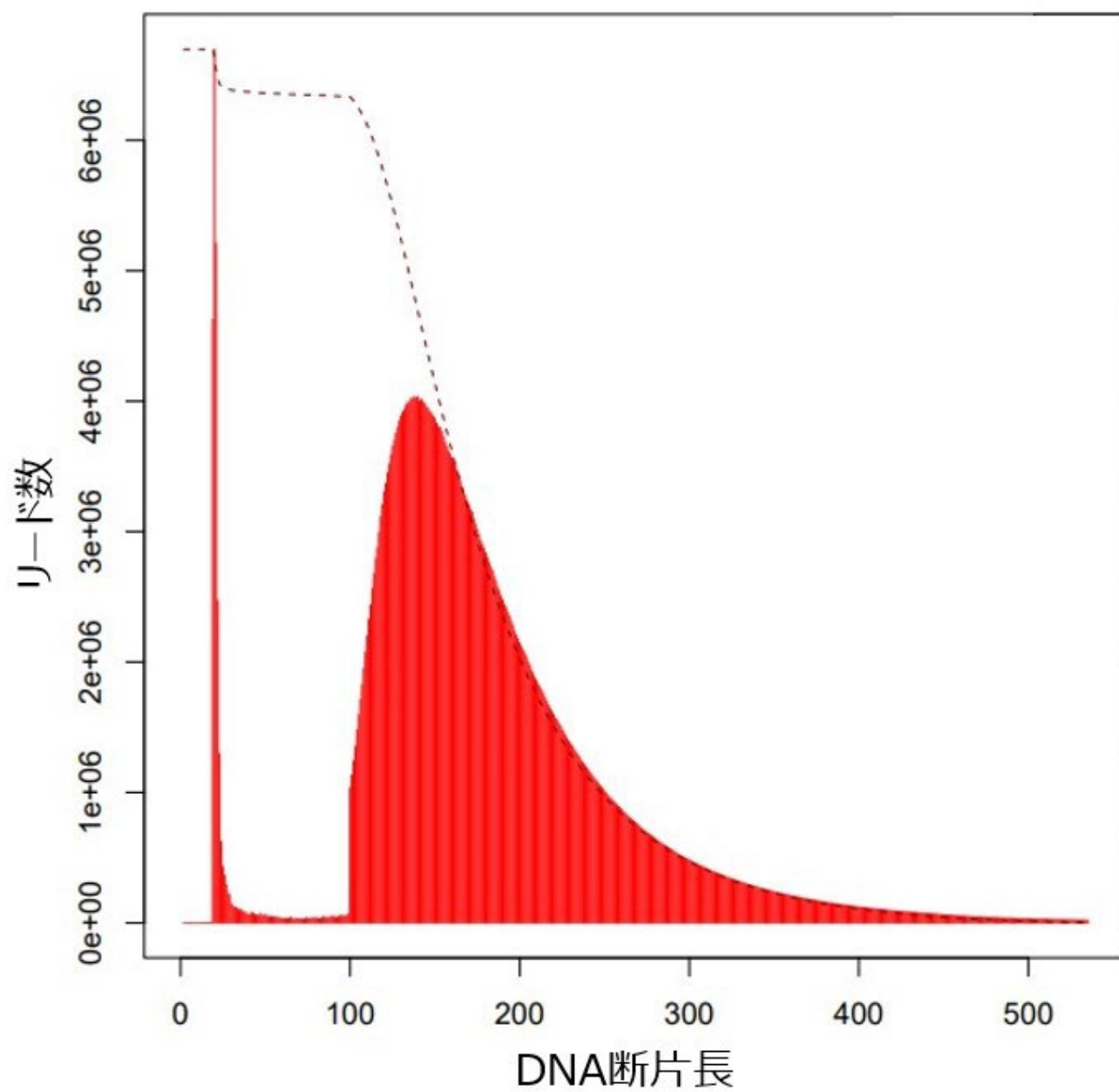


図 2. フラグメントスクリーニングをスキップしライブラリ作製した際の DNA 断片長分布