

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総括研究報告書

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

研究代表者 佐藤 薫

国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター
薬理部第一室 室長

—研究要旨—

近年、化学物質等が細胞分裂終了後の体細胞に DNA 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明らかとなり、ヒト健康影響が懸念されている。本研究ではゲノム毒性の in vitro リスク評価系を開発することを 3 年間の研究目的とする。今年度は以下の成果を得た。

化学物質によるゲノム毒性検出法の開発

- ① 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突然変異を検出可能とした error-corrected sequencing（ecNGS）を適用する。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、PCR 法により従来法の 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に成功した。また、細胞・DNA 量の少ない条件に適用する手法を検討し、従来法の 10 分の 1 程度の DNA 量（100ng 程度、2 万細胞程度）で ecNGS による解析を可能とする条件を見いだした。
- ② DNA メチル化等のいわゆるエピジェネティックな変化も、ゲノムの不安定性誘発の原因として無視できない。肝臓での遺伝子発現データを元に、遺伝毒性物質特異的に発現変化する 4 遺伝子（Bax, Btg2, Ccng1, Cdkn1a）が遺伝毒性の予測に有効であることを論文発表した。さらに、神経細胞、ミクログリアにおいてメチル化等エピジェネティクス異常を呈するターゲット遺伝子群等を文献調査した。その結果、グルココルチコイド受容体遺伝子（NR3C1）、オキシトシン受容体（OXTR）、TAR DNA-binding protein 43（TDP-43）などを候補として見いだした。また、DNA メチル化異常を引き起こす側の化学物質、いわゆる“epi-mutagen”の存在についても調査を行った。
- ③ DNA メチル化異常の検出系として、ナノポアシーケンサー MinION を用いて直接メチル化塩基を検出することによる簡便迅速な解析手法の開発を行った。さらに最近報告された片側鎖の変異、すなわち mismatch 変異も検出できるという ecNGS 法である HiDEF-Seq 法についても応用可能性を調査した。
- ④ サイレントな細胞での DNA 影響のメカニズムとして、転写に関連した突然変異生成（Transcription-associated mutagenesis; TAM）に注目した。TAM の検出、解析には DNA 複製の影響を抑制しなければならぬため、CDK 阻害剤等を用いた適切な細胞分裂制御条件を見いだした。

神経細胞、ミクログリアの採材法開発と細胞老化指標の明確化

Miltenyi Biotec 社の MACS Sample Preparation 法を導入し、若齢マウスと老齢マウスから、ゲノム毒性解析チームが求めるクオリティ（細胞数、生存率、純度）での神経細胞とミクログリアの分離手法を確立した。細胞レベルでの老化指標の整備を進め、分取細胞の培養方法を確立した。

化学物質によるゲノム毒性等生体影響の最小化に関する検討

ミクログリアのゲノム毒性リカバリー法の基礎条件抽出と最適化を行った。そのために、Colony stimulating factor-1 受容体（CSF1R）拮抗薬の ON/OFF とミクログリアの（1）経鼻移植、及び（2）局所注入 の組み合わせにより、ミクログリアを移植、置換する技術を確立した。

研究分担者

最上由香里（国立医薬品食品衛生研究所）
杉山圭一（国立医薬品食品衛生研究所）
堀端克良（国立医薬品食品衛生研究所）
伊澤和輝（国立医薬品食品衛生研究所）
鈴木孝昌（国立医薬品食品衛生研究所）
小泉修一（山梨大学）
柳井修一（東京都健康長寿医療センター）

A. 研究目的

本研究ではゲノム毒性の in vitro リスク評価系を開発することを 3 年間の研究目的とする。近年、化学物質等が細胞分裂終了後の体細胞に DNA 突然変異（Knobel et al., 2022）やメチル化等のエピジェネティクス異常（Lodato, Ziegenfuss, 2022）を引き起こすことが明らかとなり、ヒト健康影響が懸念されている。そこで、このような体細胞突然

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する。このために、生後、体細胞分裂がほとんど起こらない神経細胞と体細胞分裂が非常にゆるやかなミクログリアをモデル細胞として使用することにした。若齢マウスと老齢マウスからこれらの細胞を分取し、経年蓄積した体細胞突然変異やエピジェネティクス異常等を評価可能とする検出技術を確認する。一方、体細胞突然変異は細胞老化度と関連していることも報告されていることから (Miller et al., 2022)、体細胞突然変異と細胞老化指標との関連性を検証する。加えて、化学物質影響への脆弱性、体細胞突然変異、細胞老化、との関連性を検証する。以上の研究により 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管理推進のために重要である。今年度は化学物質によるゲノム毒性検出法の開発、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、化学物質によるゲノム毒性等生体影響の最小化に関する検討、に取り組んだ。

B. 研究方法

化学物質によるゲノム毒性検出法の開発

- ① ゲノム毒性検出法として、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。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が、これまで ecNGS は細胞や DNA 量が潤沢な条件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、まず ecNGS 解析に必要な量の DNA 断片分子を確保する手法を検討した。まず、PCR 法による DNA 断片分子確保を行った。ラット由来のゲノム DNA 50ng から、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。従来手法のプロトコル改良による DNA 断片分子確保も行った。従来の ecNGS 手法である PECC-Seq 法 (You et al., 2020) においては、酵素反応による DNA 断片化ステップにおいて、ビーズ精製によるフラグメントスクリーニングで多くの DNA を損失していると考えられた。そこで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。

- ② DNA メチル化異常は、細胞内のエピジェネティックな制御機構の破綻を示す指標となり得る。こうした背景から、DNA メチル化異常の検出系開発は、ゲノムの不安定性のスクリーニングと化学物質の安全性評価の両面で極めて重要な意義を持つ。最近、第三世代の一分子シーケンサーとされるナノポア型のシーケンサーを用いることにより、煩雑な前処理なく直接 DNA メチルを検出できることが報告された。このナノポアシーケンサーを用いた DNA メチル化検出法の開発を進めた。
- ③ 神経細胞、ミクログリアにおける体細胞変異およびエピジェネティクス異常のターゲット遺伝子、誘導因子を文献調査した。その原因物質として、エピジェネティックな異常を誘発する物質、いわゆる”epi-mutagen”の存在に関しても、これまでわかっていることを調査した。
- ④ DNA 複製以外で体細胞突然変異に直接関わる主な細胞内機能は転写である。"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おける TAM の寄与を明らかにする評価系を確認した。

神経細胞、ミクログリアの採材法開発と細胞老化指標の明確化

老化促進 SAM 系統マウスの遺伝子背景に関する研究班内議論に基づき、まずは自然老化マウスからの細胞収集を優先することにした。若齢マウス (C57BL/Ncr 3 ヶ月齢♂) 老齢マウス

(C57BL/Ncr 24 ヶ月齢♂) は東京都健康長寿医療センター研究所より入手した。マウスを深麻酔下で心灌流により脱血し、迅速に脳を摘出した後、顕微鏡下で前脳を採取した。脳サンプルを Gentle MACS Dissociators (Miltenyi Biotec 社) を用いて分散した。その後、磁気ビーズ抗体を用いた MACS 法により神経細胞とミクログリアを分離した。MACS Quant Analyser 10 (Miltenyi Biotec 社) を用いて FACS 解析を行い、分離した細胞の細胞数、純度、生存率を検討した。老化指標検討の基礎技術として単離神経細胞、ミクログリア細胞の培養プロトコルを確認した。これらの細胞は免疫組織化学的に検討を行い、各細胞マーカーの発現、機能タンパク質発現を共焦点レーザー顕微鏡システムにて確認した。

化学物質によるゲノム毒性等生体影響の最小化に関

する検討

ミクログリアのゲノム毒性リカバリー法の基礎条件抽出と最適化を行った。ミ Colony stimulating factor-1 受容体 (CSF1R) 拮抗薬の ON/OFF によりミクログリアをリセットするための濃度、タイミングを最適化した。ミクログリアの移植には2つの方法を用いた。(1) 完全非侵襲的置換によるミクログリアの全脳置換：ミクログリアの経鼻移植。(2) 微侵襲的なミクログリアの局所的置換：ミクログリアの外科的移植。以上の処置によるミクログリアの定着状況を解析し、実験条件を最適化した。

(倫理面への配慮)

「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針」、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守して研究遂行した。

C. 研究結果および考察

化学物質によるゲノム毒性検出法の開発

- ① PCR 法による DNA 断片分子 (ライブラリ) 必要量確保のためには、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。より少ない 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。従来手法のプロトコル改良による DNA 断片分子確保も行った。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ケンシング・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、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。
- ② 本研究にて必要となる簡便迅速な DNA メチルの検出法の開発に関しては、DNA のグローバルメチレーション (5mC, 5hmC) を比較的簡便に測定できる系を開発できている、来年度はその手法を用いて本研究課題におけるサンプルのメチル化レベルの検討に応用が可能となっている。

。また、現在はグローバルメチル化レベルの解析のみであるが、来年度には個別遺伝子のメチル化レベルの解析も可能となる。

- ③ 脳神経系疾患を例にエピジェネティックな影響を受ける標的遺伝子として、メチル化に焦点を絞って調査したところ、
 - ・うつ病や心的外傷後ストレス障害 (PTSD)等のトラウマとグルココルチコイド受容体遺伝子 (NR3C1) メチル化
 - ・虐待などのマルトリートメント (不適切な養育) とオキシトシン受容体 (OXTR) のメチル化
 - ・筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) のメチル化等の例を見いだした。エピジェネティック異常は、酸化ストレスや炎症、ミトコンドリア機能の喪失などを介して各種疾患や老化へ結び着くと考えられ、化学物質によりもたらされるエピジェネティックな異常の評価は、今後重要な課題となる。また、肝臓での遺伝子発現データを元に、遺伝毒性物質特異的に発現変化する4遺伝子 (Bax, Btg2, Ccng1, Cdkn1a) が遺伝毒性の予測に有効であることを論文発表した。エピジェネティック異常を引き起こす epi-mutagen については、これまであまり調べられていないため、文献調査を行った。diethylphosphate, cotinine, octachlorodipropyl ether, mercury, selenium の5化合物がヘテロクロマチンの状態に変化を与え、Hg と Se は DNA メチル化異常を引き起こすこと、benzene, hydroquinone, styrene, carbon tetrachloride, trichloroethylene がグローバルメチレーションの低下を誘発すること、が報告されていた。本研究班で用いる神経系の細胞では、分裂頻度が高いため二本鎖間の変異として固定される確率が低く、通常の ecNGS 法では検出が難しいことが懸念されるが、一本鎖状態での変異も検出する新規 ecNGS 法である HiDEF-Seq 法、Revio シークエンサー活用も考慮したい。
- ④ 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 処理により S 期の抑制が見られた Roscovitine は 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 では、ほぼすべての細胞での S 期の抑制が見られた。今回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二重染色での工夫が必要であると考えられる。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。

神経細胞、ミクログリアの採材法開発と細胞老化指標の明確化

FACS 解析の結果、神経細胞の平均取得細胞数は、成体マウスで 8.92×10^4 個/匹、老齢マウスで 5.74×10^4 個/匹であり、純度は成体マウスで 95.13%、老齢マウスで 96.19%、生存率は成体マウスで 89.14%、老齢マウスで 99.13% であった。ミクログリアの平均取得細胞数は、成体マウスで 4.12×10^4 個/匹、老齢マウスで 3.02×10^4 個/匹であり、純度は成体マウスで 92.14%、老齢マウスで 88.01%、生存率は成体マウスで 98.33%、老齢マウスで 98.68% であった。ゲノム毒性解析チームが求めるクオリティで細胞を取得できた。若齢マウスと比較して老齢マウスでは、体重が 2 倍になっているにもかかわらず、前脳の大きさはほとんど変化していないことが示された。回収後の神経細胞、ミクログリアの細胞数、生存率、純度は MACS Quant Analyzer10 で検証した。若齢マウスでは平均神経細胞数が 8.9×10^4 、純度は 95.14%、細胞生存率 89.14% であること、またそのうち成熟神経細胞のマーカーとして知られる NeuN 陽性細胞の平均細胞数は 7.5×10^4 、純度は 84.3% であることが示された。一方、老齢マウスでは細胞数が平均細胞数 5.7×10^4 、純度は 96.19%、細胞生存率 99.14% であること、またそのうち NeuN 陽性平均細胞数は 4.3×10^4 、純度は 75.14% であることが示された。ミクログリアについては、若齢マウスでは平均細胞数が 4.12×10^4 、純度は 92.15%、細胞生存率 98.33% であること、そのうちミクログリア特異的マーカーとして知られる TMEM119 陽性細胞の平均細胞数は 3.53×10^4 、純度は 85.78% であることが示された。老齢マウスでは平均細胞数が 3.02×10^4 、純度は 88.02%、細胞生存率 98.68% であること、そのうち TMEM119 陽性平均細胞数は 2.34×10^4 、純度は 77.34% であることが示された。

細胞老化指標について検討するため、分取した神経細胞、ミクログリアの長期培養条件の検討および免疫組織化学的検討によるマーカータンパク質、機能タンパク質発現の確認を行った。細胞数が多くとれないことから、ドロップ培養法が適切であることが示された。若齢、老齢マウス由来神経細胞を 14 日間培養した結果、両群において、複数の Tuj1(+)MAP2(+)神経突起を有する神経細胞を確認した。老齢マウス由来神経細胞の生存細胞数は、若齢マウス群と比較して顕著に低かった (data not shown)。若齢、老齢マウス由来ミクログリアを 7 日間培養した結果、両群由来細胞においてミクログリアマーカーである Iba1 が発現していることを確認した。老齢マウス由来ミクログリアでは、炎症応答活性化マーカーである iNos の発現が高く、細胞体内に複数の大きなドット状のシ

グナルが観察された。また、培養後のミクログリアの生存細胞数は、若齢、老齢マウス間で顕著な相違は認められなかった。神経細胞は、脳細胞集団より、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア、血管内皮細胞、線維芽細胞を除いた濃縮液であり、神経細胞に加え、神経前駆細胞、グリア前駆細胞、その他の脳細胞などが含まれる可能性があるが、約 8 割が NeuN 陽性であることが示され、ほぼ成熟した神経細胞であることが確認できた。さらに我々は、採材神経細胞の培養プロトコルを整備し、取得神経細胞に Tuj1(+)MAP2(+)神経突起観察に成功した。また、若齢、老齢マウス由来神経細胞は培養 14 日目では、若齢マウス群と比較して老齢マウス群では、顕著に生存率が低下していた (Data not shown)。細胞老化との関連が示唆される。

化学物質によるゲノム毒性等生体影響の最小化に關

する検討

CSF1R 拮抗薬 PLX5622 (1,200ppm) を 1-2 週間餌に混ぜて投与することで、すべての脳部位においてミクログリアの 90% 以上を除去できることが明らかとなった。また、CSF1R 拮抗薬を OFF にし、翌日ミクログリアの経鼻移植、局所外科移植を行うことにより、いずれの方法でも、移植後最低 2 ヶ月間は移植ミクログリアが正常に定着でき、今後のさらなる検討に使用可であることが明らかとなった。ミクログリア移植技術を開発し、化学物質及び加齢により異常となったミクログリアを置換することが可能となった。今後、ゲノム毒性とミクログリア異常の因果関係解明、毒性発現メカニズム解明、ゲノム毒性最小化への応用が期待できる。

D. 結論

化学物質によるゲノム毒性検出法の開発

- ① 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突然変異を検出可能とする error-corrected sequencing (ecNGS) を適用する。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、PCR 法により従来法の 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に成功した。また、細胞・DNA 量の少ない条件に適用する手法を検討し、従来法の 10 分の 1 程度の DNA 量 (100ng 程度、2 万細胞程度) で ecNGS による解析を可能とする条件を見いだした。
- ② DNA メチル化等のいわゆるエピジェネティックな変化も、ゲノムの不安定性誘発の原因として無視できない。肝臓での遺伝子発現データを元に、遺伝毒性物質特異的に発現変化する 4 遺伝子 (Bax, Btg2, Ccng1, Cdkn1a) が遺伝毒性の予測

に有効であることを論文発表した。さらに、神経細胞、ミクログリアにおいてメチル化等エピジェネティクス異常を呈するターゲット遺伝子群等を文献調査した。その結果、グルココルチコイド受容体遺伝子 (NR3C1)・オキシトシン受容体 (OXTR)、TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43)などを候補として見いだした。また、DNA メチル化異常を引き起こす側の化学物質、いわゆる“epi-mutagen”の存在に関しても調査を行った。

- ③ DNA メチル化異常の検出系として、ナノポアシーケンサーMinION を用いて直接メチル化塩基を検出することによる簡便迅速な解析手法の開発を行った。さらに最近報告された片側鎖の変異、すなわち mismatch 変異も検出できるという ecNGS 法である HiDEF-Seq 法についても応用可能性を調査した。
- ④ サイレントな細胞での DNA 影響のメカニズムとして、転写に関連した突然変異生成 (Transcription-associated mutagenesis; TAM) に注目した。TAM の検出、解析には DNA 複製の影響を抑制しなければならぬため、CDK 阻害剤等を用いた適切な細胞分裂制御条件を明らかにした。

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

Miltenyi Biotec 社の MACS Sample Preparation 法を導入し、成体マウスと老齢マウスから、ゲノム毒性解析チームが求めるクオリティ (細胞数、生存率、純度) での神経細胞とミクログリアの分離手法を確立した。細胞レベルでの老化指標の整備を進め、分取細胞の培養方法を確立した。

化学物質によるゲノム毒性等生体影響の最小化に関する検討

する検討

ミクログリアのゲノム毒性リカバリー法の基礎条件抽出と最適化を行った。そのために、Colony stimulating factor-1 受容体 (CSF1R) 拮抗薬の ON/OFF とミクログリアの (1) 経鼻移植、及び (2) 局所注入 の組み合わせにより、ミクログリアを移植、置換する技術を確立した。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sugiyama K, Grúz P, Sato K, Honma M. Effects of carminic acid on gene expressions under epigenetic regulation. *Biochem Biophysics Rep.* (in press)
2. *佐藤 薫, 高橋裕次, 鈴木郁朗: in vivo イメージングと MPS 導入による非臨床評価系の予測性向上の可能性—中枢神経系痙攣リスク予測と吸入薬の肺胞送達を例として. *YAKUGAKU ZASSHI*, in press (*: Corresponding author)

3. Nakayama-Kitamura K, Shigemoto-Mogami Y, Piantino M, Naka Y, Yamada A, Kitano S, Furihata T, Matsusaki M, *Sato K. Collagen I Microfiber Promotes Brain Capillary Network Formation in Three-Dimensional Blood-Brain Barrier Microphysiological Systems. *Biomedicines*. 2024, 12 (11) 10.3390/biomedicines12112500.
4. Shigemoto-Mogami Y, Nakayama-Kitamura K, *Sato K. The arrangements of the microvasculature and surrounding glial cells are linked to blood-brain barrier formation in the cerebral cortex. *Front Neuroanat*. 2024, 18:1438190.
5. Takahashi K, *Sato K. The conventional and breakthrough tool for the study of L-glutamate transporters, *Membranes*. 2024, 14, 77.
6. Sugiyama K*, Grúz P, Sato K, Honma M. Effects of carminic acid on gene expressions under epigenetic regulation. *Biochem Biophysics Rep.* in press.
7. Furuhashi A., Sugiyama, K. and Honma, M: Ames mutagenicity of 15 aryl, benzyl, and aliphatic ring N-nitrosamines, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 156 105763 (2025).
<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2024.105763>
8. Muto, S., Furuhashi A., Yamamoto, M., Otagiri, Y., Koyama, N., Hitaoka, S., Nagato, Y., Ouchi, H., Ogawa, M., Shikano, K., Yamada, K., Ono, S., Hoki, M., Ishizuka, F., Hagio, S., Takeshita, C., Omori, H., Hashimoto, K., Chikura, S., Honma, M., Sugiyama, K. and Mishima, M: Local QSAR based on quantum chemistry calculations for the stability of nitrenium ions to reduce false positive outcomes from standard QSAR systems for the mutagenicity of primary aromatic amines, *Genes and Environ.* 46, 24 (2024).
<https://doi.org/10.1186/s41021-024-00318-4>
9. 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, Pfuhler 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
10. 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
11. Iso, T., Suzuki, K., Murata, Y., Hirose, N., Umamo, T., Horibata, K., Sugiyama, K., Hirose, A., Masumura, K. and Matsumoto, M: Lack of in vivo mutagenicity of carbendazim in the liver and glandular stomach of MutaMice, *Genes and Environ.* 46, 7 (2024). <https://doi.org/10.1186/s41021-024-00299-4>
12. 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, Pfuhler 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*. Online

- ahead of print, 2024.
13. Furihata C., Suzuki T. Four functional genotoxic marker genes (Bax, Btg2, Ccng1, and Cdkn1a) discriminate genotoxic hepatocarcinogens from non-genotoxic hepatocarcinogens and non-genotoxic non-hepatocarcinogens in rat public toxicogenomics data, Open TG-GATEs. *Genes Environ.* 2024; 46: 28.
 14. Hosoi S, Hirose T, Matsumura S, Otsubo Y, Saito K, Miyazawa M, Suzuki T., Masumura K, Sugiyama K. Effect of sequencing platforms on the sensitivity of chemical mutation detection using Hawk-Seq™. *Genes Environ.* 2024;46:20.
 15. Corton JC, Auerbach SS, Koyama N., Mezencev R., Yauk CL., Suzuki T Review and meta-analysis of gene expression biomarkers predictive of chemical-induced genotoxicity in vivo. *Environ. Mol. Mutagen.* 2024 in press
 16. Froetschl R., Corton JC., Li H., Aubrecht J., Scott S. Auerbach SS., Caiment F., Doktorova TY., Fujita Y., Jennen D., Koyama N., Meier MJ., Mezencev R., Recio L., Suzuki T., Yauk CL. Consensus findings of an IWGT Workshop on using Transcriptomic Biomarkers to Predict Genotoxicity. *Environ. Mol. Mutagen.* 2024 in press
 17. 築茂由則, 吉田徳幸, 大岡伸通, 内田恵理子, 鈴木孝昌, 米満研三, 上間匡, 本間正充, 合田幸広, 井上貴雄: 共通ウイルスゲノム RNA を用いた COVID-19 診断用核酸増幅検査薬の一斉性能評価試験. *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*, 2024;55:295-310
 18. Ikeuchi S, Hirose S, Shimada K, Koyama A, Ishida S, Katayama N, Suzuki T, Tokairin A, Tsukamoto M, Tsue Y, Yamaguchi K, Osako H, Hiwatashi S, Chiba Y, Akiyama H, Hayashidani H, Hara-Kudo Y. Isolation of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from the Surfaces of Beef Carcasses in Slaughterhouses in Japan. *J Food Prot.* 2024; 87:100263.
 19. Kim SH, Lee J, Jang M, Roh SE, Kim S, Lee JH, Seo J, Baek J, Hwang JY, Baek IS, Lee YS, Shigetomi E, Lee CJ, Koizumi S., *Kim SK and *Kim SJ.(2025) Cerebellar Bergmann glia integrate noxious information and modulate nocifensive behaviours. *Nat Neurosci*, doi: 10.1038/s41593-024-01807-z. Online ahead of print (Jan.02)
 20. Kobayashi Y, Sakai K, Tran NQV, Ishimaru K, Sato T, Nakamura Y, Nakagomi D, Tanaka S, Koizumi S and Nakao A.(2024) IL-33 sensitizes mast cells to PIEZO1 stimulation leading to degranulation. *Allergy*, 79, 3517-3520. Doi:10.1111/all.16397
 21. Kubota Y, Shigetomi E, Saito Ko, Shinozaki Y, Kobayashi K, Tanaka M, Bijay P, Tanaka KF, and *Koizumi S. (2024) Establishment and Use of Primary Cultured Astrocytes from Alexander Disease model mice. *Int J Mol Sci*, 25(22), 12100. Doi:10.3390.ijms252212100
 22. Shigetomi E, Suzuki H, Hirayama YJ, Sano F, Yoshihara K, Koga K, Tateoka T, Yoshioka H, Shinozaki Y, Kinouchi H, Tanaka KF, Bito H, Tsuda M and *Koizumi S. (2024) Reactive astrocytes enhance neuronal excitability via IGFBP2: pathological effects of P2Y1 receptor upregulation. *Nat Commun* 15, 6525.
 23. Parajuli B, Koizumi S. Unexpected role of microglia and P2Y12 in the induction of and emergence from anesthesia. *Purinergic Signalling* 20(6) 573-575 2024
 24. Kim SH, Lee J, Jang M, Roh SE, Kim S, Lee JH, Seo J, Baek J, Hwang JY, Baek IS, Lee YS, Shigetomi E, Lee CJ, Koizumi S, Kim SK, Kim SJ. Cerebellar Bergmann glia integrate noxious information and modulate nocifensive behaviors. *Nat Neurosci.* 28(2) 336-345 2025
 25. Hirayama Y, Le NGH, Hashimoto H, Ishii I, Koizumi S. and *Anzai N. (2024) Preconditioning-induced facilitation of lactate release from astrocytes is essential for brain ischemia tolerance. *eNeuro*, 11(4):ENEURO.0494-23.2024. doi:10.1523/ENEURO.0494-23.2024
 26. S.Kakizawa, T.Arasaki, A.Yoshida, A.Sato, Y.Takino, A.shigami, T.Akaike, S.Yanai, S.Endo. *Redox Biology*, 70, 103053 (2024) •
 27. T.Shintani, S.Yanai, A.Kanasaki,T.Iida, S.Endo. *Experimental Gerontology*, 196, 112555 (2024)
- ## 2. 学会発表
1. Shigemoto-Mogami Y., et al., Study about the cell composition of blood brain barrier-microphysiological system (BBB-MPS) for reproducing pathological conditions. *MPSWS 2024*, Seattle, 6. 2024
 2. Shigemoto-Mogami Y., et al., Three BBB developmental stages determined by the configurations of brain microvasculature, astrocytes, and microglia. *Neuro2024*, 福岡, 7. 2024
 3. Takahashi K., Quan Z., Awakawa T. Shigemoto-Mogami Y., Ohwada T., Abe I., Sato K. Search for meroterpenoids that inhibit microglia activation. *APPW2025*, 幕張, 3. 2025
 4. 高橋 華奈子, 淡川 孝義, Zhiyang Quan, 最上由香里, 大和田 智彦, 阿部 郁朗, 佐藤 薫. ミクログリア活性化抑制作用を持つ超天然化合物メロテルペノイドの探索. *日本薬学会第 145 年会 (福岡)* 3. 2025
 5. 堀端克良, 佐々木沙耶, 杉山圭一 : Detection of genotoxic reactions by analyzing DNA damage response using chromatin immunoprecipitation. 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7)
 6. 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)
 7. 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)
 8. 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)
 9. 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)
10. 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)
 11. 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)
 12. 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)
 13. 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)
 14. 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 回構造活性関連シンポジウム, 2024 年 12 月 (神奈川)
 15. 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)
 16. 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, 岡山県 (2024.12)
 17. 鈴木孝昌 様々な EC-NGS 法の特徴 日本環境変異原ゲノム学会第 84 回 MMS 研究会, 東京都 (2024. 6)
 18. 鈴木孝昌 Error-corrected next generation sequencing (ecNGS)の現状 第 51 回日本毒性学会学術年会 福岡市 (2024.7)
 19. 鈴木孝昌, 尤馨悦, 伊澤和輝, 津田雅貴, 本間正充, 欒洋, 杉山圭一. PECC-Seq 法の開発から学ぶエラー修正 NGS(ecNGS)法の残存エラーの要因 第 83 回日本癌学会学術総会, 福岡市 (2024.9)
 20. 鈴木孝昌, 西川可穂子. 河川水のメタゲノム解析による細菌叢と薬剤耐性遺伝子の探索 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会, 岡山市 (2024.12)
 21. 鈴木孝昌, 杉山圭一. ナノポアシークエンサーを用いた簡便迅速な DNA メチル化解析手法の開発 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会, 岡山市 (2024.12)
 22. 降旗千恵, 鈴木孝昌. In vivo トキシコゲノミクス試験に有用な 4 つの遺伝毒性マーカー遺伝子 (Bax, Btg2, Ccng1, Cdkn1a) 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会, 岡山市 (2024.12)
 23. 東航平, 鈴木孝昌, 青木康展, 山田雅巳. 魚類腸内細菌叢解析を用いた水環境中の界面活性剤のモニタリングに関する研究 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会, 岡山市 (2024.12)
 24. Susuki T. "Error-corrected next-generation sequencing (NGS)" as an ultimate tool for genetic toxicology 第 47 回インド環境変異原学会年会 アンナマライ/インド (2025.1)
 25. Shigemoto-Mogami Y., et al., Study about the cell composition of blood brain barrier-microphysiological system (BBB-MPS) for reproducing pathological conditions. MPSWS 2024, Seattle, 6. 2024
 26. Shigemoto-Mogami Y., et al., Three BBB developmental stages determined by the configurations of brain microvasculature, astrocytes, and microglia. Neuro2024, 福岡, 7. 2024
 27. Koizumi S, Frontiers in glial disease research. (シンポジウム), NEURO2024, 2024 年 7 月 24 日, 福岡 (大会長)
 28. Koizumi S. Control of Alexander disease by microglia. (招待) 28th TMIIMS International Symposium The Tokyo Glia Symposium Glial Cells in Health and Disease. 2024 年 7 月 29 日, 東京
 29. 小泉修一, ミクログリアに制御される脳 (招待), 生化学若い研究者の会第 64 回生命科学夏の学校, 2024 年 8 月 31 日, オンライン
 30. 小泉修一, アストロサイト病の分子病態と制御 (招待), 第 3 回北海道大学遺伝子病制御研究所・生理学研究所ジョイントシンポジウム, 2024 年 9 月 3 日, 北海道大学
 31. Koizumi S. Molecular pathogenesis of Alexander disease. ASPIRE-GLIA Symposium. (口頭) 2024 年 9 月 14 日, Lausanne, Switzerland
 32. 小泉修一, グリア細胞を入れ替えて脳を変える (口頭), グリア細胞展特別セミナー, 2024 年 9 月 28 日, 甲府
 33. 小泉修一, グリア細胞の異常と疼痛 (招待), 第 28 回日本神経感染症学会総会・学術大会, 2024 年 10 月 12 日, 東京
 34. Koizumi S. Myelin phagocytosis by astrocytes in Alexander disease model. (招待), The National Institute for Physiological Sciences The 54th International Symposium. 2024 年 10 月 23 日, 岡崎
 35. 小泉修一, てんかん原性とグリア細胞 (口頭), 第 54 回日本臨床神経生理学会, 2024 年 10 月 25 日, 札幌
 36. 小泉修一, ミクログリア置換による脳機能の制御 (招待), 第 7 回新潟大学共用設備基盤センター (CCRF) シンポジウム, 2024 年 10 月 31 日, 新潟
 37. 柳井修一. 老化研究における行動科学. 日本行動科学学会第 39 回ウィンターカンファレンス (2024.2.18-20)
 38. 柳井修一・高瀬堅吉. 正しく研究するとは, 正しく生きるとは~杉岡先生が残したもの. 日本

行動科学学会第 39 回ウィンターカンファレンス (2024.2.18-20)

39. 柳井修一・新崎智子・遠藤昌吾. オスの C57BL/6J マウスにおける行動学的・機能的老化. 第 71 回日本実験動物学会総会 (2024.5.29-31)
40. S.Yanai, T.Arasaki, S. Endo. Assessment of physical and cognitive decline in aging mouse model. 第 47 回日本基礎老化学会大会 (2024.6.15-16)
41. J. Chen, Y Takino, S.Yanai, A. Ishigami, Y. Knodo. Effect of dietary protein ratio on lipid metabolism in the mouse liver. 第 47 回日本基礎老化学会大会 (2024.6.15-16)
42. R. Inoue, S.Yanai, H. Nishimune. Coenzyme Q10 supplementation improves gait in aged mice. Neuro 2024 (2024.7.24-27)
43. 柿澤昌・新崎智子・赤池孝章・柳井修一・遠藤昌吾. 活性酸素による小脳依存的運動学習及び

小脳長期抑圧の制御. Neuro 2024 (2024.7.24-27)

44. S. Kakizawa, T. Arasaki, T. Akaike, S. Yanai, S. Endo. Essential roles of ROS in long-term synaptic plasticity in the cerebellum. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting “Molecular Mechanisms of Neuronal Connectivity”(2024.9.10-14)
45. S. Kakizawa, S. Yanai, S. Endo. Essential roles of ROS – 8-nitro-cGMP signals in long-term memory of motor learning and cerebellar synaptic plasticity. Neuroscience 2024 (2024.10.5-9)

G. 知財財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
 2. 実用新案登録
 3. その他
- 現在のところ該当なし。