

令和7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

定量的化学物質発がん性予測のためのゲノム安全性評価新規解析手法の開発研究
**分担研究課題名:DNA損傷応答反応や関連する分子反応を定量定性的に捉える新手法
 (DDR法)の開発(堀端担当部分)**

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

研究要旨

化学物質の遺伝毒性評価結果は発がん性評価における重要な指標であるが、既存の遺伝毒性試験は、遺伝子突然変異、小核形成、染色体異常等の比較的下流のエンドポイントを検出するものが中心であり、曝露後早期に生じるDNA損傷応答反応や関連する分子反応を定量定性的に捉えることは困難である。本分担研究では、DNA損傷応答反応をクロマチン上の分子応答として検出する新手法、すなわちDDR法の開発を目的として、クロマチン免疫沈降法（ChIP法）およびクロマチン分画ウエスタンブロット法（ChWB法）の検討を行った。ChIP法では、昨年度までの先行研究で見出した「拡大希釈および終夜脱架橋」による固定組織可溶化条件を用いて、ENU、EMS等を投与したマウス肝臓組織標本を解析した。その結果、培養細胞を用いたChIP法と比較して%Input値が著しく低く、投与群間の明確な有意差を検出するには至らなかった。これは、長時間ホルマリン固定された組織標本では、可溶化・脱架橋過程によりDNA損傷応答タンパク質がクロマチン画分から遊離し、検出感度が低下する可能性を示すものと考えられた。一方、ChWB法では、紫外線照射後のクロマチン画分において γ H2AXおよびモノユビキチン化PCNAの経時的増加を検出した。また、ENU処理後には、APE1およびPOLBについて、高塩濃度可溶化画分およびクロマチン画分で処理依存的な増加が認められた。これらの結果から、ChWB法により、DNA損傷の種類や処理後時間に応じたクロマチン上のDNA損傷応答反応を検出できる可能性が示された。以上より、固定化組織標本を用いたChIP法には感度面で課題が残る一方、ChWB法はDNA損傷応答関連タンパク質のクロマチン分画変化を検出するDDR法の基盤技術として有用である可能性が示された。

A. 研究目的

化学物質の発がん性評価において、遺伝毒性評価結果は極めて重要な情報である。特に、DNA損傷を誘発し、遺伝子突然変異や染色体異常を引き起こす化学物質は、発がん性を有する可能性があるため、リスク評価上慎重な取扱いが求められる。しかし、既存の遺伝毒性試験は、主として遺伝子突然変異、小核形成、染色体異常等の比較的

下流のエンドポイントを検出するものであり、曝露直後から生じるDNA損傷応答反応、DNA修復反応、損傷乗り越えDNA合成等の分子応答を、発がん性定量評価に資する形で解析する手法は十分に確立されていない。

また、遺伝毒性陽性と判断される化学物質であっても、発がん性試験データが存在しない、あるいは定量的発がん性評価に利用可能な情報が限られる場合がある。その

ような場合、遺伝毒性の有無だけでなく、どのようなDNA損傷応答が、どの程度、どの時間軸で誘発されるのかを明らかにすることは、発がん性の強さや作用機序を推定する上で有用な情報となる可能性がある。

本分担研究では、DNA損傷応答反応や関連する分子反応を、クロマチン上で生じる分子イベントとして定量定性的に捉える新手法、すなわちDDR法の開発を目的とした。昨年度までの先行研究では、クロマチン免疫沈降法（ChIP法）を用いて、固定化動物組織標本におけるDNA損傷応答反応を解析するための基盤的検討を行い、特にAPE1を指標としたアルキル化DNA損傷応答反応検出の可能性を示した。本年度は、その後継課題として、固定化動物組織標本へのChIP法適用性をさらに検証するとともに、培養細胞を用いたクロマチン分画ウエスタンブロット法（ChWB法）により、DNA損傷応答関連タンパク質のクロマチン画分への分画変化を解析し、DDR法としての有用性を検討した。

B. 研究方法

1. 固定化動物組織標本を用いたChIP法によるDNA損傷応答解析

ChIP法では、昨年度までの先行研究での検討により適用可能性が見出された「拡大希釈および終夜脱架橋」による固定組織可溶化条件を用いた。解析対象には、従来の*in vivo*遺伝毒性評価で実施されている*in vivo*末梢血小核試験の投与プロトコルを参照して作成したマウス組織標本を用いた。

C57BL/6NCrSlcマウス（8週齢、雄、各群3匹）に、PBS、N-ethyl-N-nitrosourea（ENU）（100、50または25 mg/kg体重/回）、ethyl methanesulfonate（EMS）（200、100または50 mg/kg体重/回）または2-acetylaminofluorene（2-AAF）（200、100または50 mg/kg体重/回）を24時間ごとに2回腹腔内投与した。最終投与24時間後に肝臓および血液を採取し、肝臓は10%中性緩衝ホルマリン液で終夜固定した後、PBSで洗浄し、凍結保存し

た。血液については*in vivo*小核試験に適用した。

固定化肝臓組織標本を可溶化し、超音波処理によりChIPに適したDNA断片を調製した後、塩基除去修復に関与するAPE1を認識する抗体を用いて免疫沈降を行った。得られたDNA画分を鋳型として、rDNA上に設定した標的領域に対する定量PCRを実施し、APE1と共沈するDNA量を%Input値として算出した。これにより、アルキル化DNA損傷等に伴うAPE1のクロマチン上への結合変化を指標として、DNA損傷応答反応の検出を試みた。

2. クロマチン分画ウエスタンブロット法（ChWB法）によるDNA損傷応答解析

ChWB法では、培養細胞を用いたパイロットスタディとして、紫外線照射またはENU処理によりDNA損傷を誘発し、DNA損傷応答関連タンパク質の細胞内分画変化を解析した。

DNA損傷誘発後の細胞を、塩濃度の異なる可溶化バッファーで段階的に可溶化し、可溶化画分を回収した。さらに、残存する不溶性画分をSDS sample bufferで可溶化し、クロマチン画分として解析に供した。得られた各画分について、 γ H2AX、モノユビキチン化PCNA、APE1およびPOLBを認識する抗体を用いたウエスタンブロット解析を実施し、DNA損傷の種類および処理後時間に応じた各タンパク質の分画変化を解析した。

（倫理面の配慮）

動物を用いた実験は、所属機関における「動物実験の適正な実施に関する規定」、わが国における「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」ならびに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に準拠して行った。加えて、試験実施機関による動物実験に関する倫理委員会の承認を得るなど、実験動物に対す

る動物愛護を配慮の上で実施した。

C. 研究結果

1. 固定化動物組織標本を用いたChIP法の検討

昨年度までの先行研究での検討により、固定化組織標本に対しては、「ホルマリン固定下の肝小核試験法」を参照した強アルカリ条件による可溶化では過剰なDNA障害が生じ、ChIP法への適用が困難である一方、「拡大希釈および終夜脱架橋」による条件では、ChIP法に適用可能なDNA断片を調製できる可能性が示されていた。本年度は、この条件を用いて、先行研究で作成したENUおよびEMS投与マウス肝臓組織標本の解析を進めた。その結果、血液を用いた*in vivo*小核試験では陽性が確認された条件であったが、固定化肝臓組織標本を用いたChIP法では、培養細胞を用いた先行研究に比べて%Input値が著しく低かった。また、各投与群と対照群との間に統計学的に有意な差は認められなかった（図1）。

これらの結果から、固定化組織標本に対してChIP法を適用する場合、組織可溶化および脱架橋過程がDNA損傷応答タンパク質とクロマチンとの結合状態に影響し、検出感度を低下させる可能性が示唆された。特に、長時間ホルマリン固定された組織標本では、可溶化に強い条件または長時間の脱架橋処理が必要となるため、DNA-タンパク質間相互作用の保持と組織可溶化効率の両立が大きな技術的課題であると考えられた。

2. ChWB法による紫外線誘発DNA損傷応答の検出

ChWB法を用いて、紫外線照射後のDNA損傷応答関連タンパク質のクロマチン画分への分画変化を解析した。その結果、紫外線照射後のクロマチン画分において、照射後の培養時間に依存した γ H2AXの増加が検出された（図2A）。 γ H2AXはDNA損傷応答、特にDNA二本鎖切断や複製ストレスに

関連する代表的なマーカーであり、本結果はChWB法によりクロマチン上で生じるDNA損傷応答を検出可能であることを示すものと考えられた。また、モノユビキチン化PCNAについても、紫外線照射後の培養時間に依存した増加が認められた（図2B）。モノユビキチン化PCNAは、損傷乗り越えDNA合成に関与する重要な分子応答であり、DNA損傷後に複製を継続する過程で突然変異誘発に関与する可能性がある。したがって、モノユビキチン化PCNAを指標とすることで、単なるDNA損傷の有無だけでなく、変異誘発につながり得る損傷応答過程を捉えられる可能性が示された。なお、モノユビキチン化PCNAはクロマチン画分のみならず、特に生理的塩濃度条件で得られる可溶化画分においても、クロマチン画分と同様の変化を示した。この結果は、モノユビキチン化PCNAの検出において、画分調製条件が重要であることを示すとともに、クロマチン結合性の強弱を含めた分画解析により、DNA損傷応答の状態をより詳細に把握できる可能性を示している。

3. ChWB法によるENU誘発DNA損傷応答の検出

ENU処理細胞を用いて、塩基除去修復に関連するAPE1およびPOLBの分画変化を解析した。150 mM NaCl条件の可溶化画分では、APE1およびPOLBの検出量にENU処理の有無による明確な変化は認められなかった。一方、生理的塩濃度条件で可溶化されずに残った不溶性画分に対して高塩濃度バッファーを処理して得られる可溶化画分では、APE1およびPOLBはいずれもENU処理後4時間で検出量の増加を示し、24時間後にもその増加が残存した。さらに、クロマチン画分においても同様の増加傾向が認められた（図3）。

これらの結果から、ENUによって誘発されるアルキル化DNA損傷に対して、塩基除去修復に関与するAPE1およびPOLBがクロマチン近傍またはクロマチン画分へ動員さ

れることを、ChWB法により検出できる可能性が示された。特に、ChIP法では固定化組織標本における感度低下が課題となった一方、ChWB法では培養細胞におけるDNA損傷応答関連タンパク質の分画変化を比較的明瞭に検出できたことから、DDR法の基盤技術として有用であると考えられた。

D. 考察

本分担研究では、DNA損傷応答反応や関連する分子反応を、クロマチン上またはクロマチン近傍で生じる分子応答として定量定性的に検出するDDR法の開発を目的として、ChIP法およびChWB法の検討を行った。

ChIP法については、昨年度までに固定化組織標本への適用可能性を見出していたものの、本年度の追加解析では、培養細胞を用いたChIP法と比較して%Input値が著しく低く、投与群間の有意差を明確に検出するには至らなかった。この原因として、組織標本のホルマリン固定条件が、一般的なChIP法で用いられるホルムアルデヒド架橋条件と比較して強く、また固定時間も長いことが挙げられる。固定化組織標本を可溶化するためには終夜脱架橋等の処理が必要となるが、この過程でDNA損傷応答解析の標的であるAPE1等のタンパク質がクロマチン画分から遊離し、免疫沈降により回収されるDNA-タンパク質複合体が減少した可能性がある。この点から、発がん性試験や毒性試験で得られる既存の固定化組織標本にChIP法を適用するには、可溶化効率、DNA断片化、抗原性保持、DNA-タンパク質間相互作用の保持を同時に満たす条件設定が必要であり、技術的難度は高いと考えられる。一方で、固定化組織標本を用いてDNA損傷応答を解析できれば、既存の発がん性試験材料と遺伝毒性応答解析を直接結びつけることが可能となる。そのため、ChIP法については、現時点で実用化には課題が残るものの、発がん性試験材料を活用した遺伝毒性・発がん性相関解析のための技術として、引き続き検討する意義がある。

一方、ChWB法では、紫外線処理により誘発されるDNA損傷応答関連タンパク質の分画変化を比較的明瞭に検出することができた。紫外線照射後には γ H2AXおよびモノユビキチン化PCNAのクロマチン画分における経時的増加が認められ、ENU処理後にはAPE1およびPOLBの高塩濃度可溶化画分ならびにクロマチン画分における増加が認められた。これらの結果は、ChWB法が、DNA損傷の種類に応じたDDR関連タンパク質のクロマチン動員またはクロマチン保持状態を捉える手法として有用であることを示している。特に、モノユビキチン化PCNAは損傷乗り越えDNA合成に関与する重要な分子反応であり、DNA損傷が単に存在することを示すだけでなく、その後の変異誘発過程に関与し得る応答を反映する可能性がある。したがって、ChWB法によるモノユビキチン化PCNAの検出は、発がん性定量評価に資するDDR指標の一つとして有望であると考えられる。また、APE1およびPOLBの分画変化は、アルキル化DNA損傷に対する塩基除去修復反応を反映する可能性があり、化学物質の作用機序に応じたDDRプロファイルの構築につながると期待される。

さらに、班内で松田により進められているクロマチン定量プロテオミクス法は、現時点では本分担研究者の直接の担当課題ではないものの、将来的にはChWB法と相補的に活用できる可能性がある。ChWB法は、特定のDDR関連タンパク質について、比較的簡便に分画変化を確認できる利点を有する。一方、クロマチン定量プロテオミクス法は、多数のDNA損傷応答・修復関連タンパク質を定量的に解析できる可能性がある。したがって、今後、ChWB法により候補となるDDRマーカーを絞り込み、クロマチン定量プロテオミクス法によりより広範な分子応答プロファイルを取得する、あるいは逆にプロテオミクス解析で得られた候補分子をChWB法で検証するような連携が可能となれば、DDR法全体の有用性を高めるこ

とができると考えられる。

以上より、本年度の検討から、固定化組織標本を用いたChIP法には技術的課題が残る一方、ChWB法は培養細胞におけるDNA損傷応答関連タンパク質のクロマチン分画変化を検出する手法として有用である可能性が示された。今後は、複数の遺伝毒性物質および非遺伝毒性物質を用いた比較解析、用量反応性および時間反応性の検討、ならびに既存の遺伝毒性エンドポイントとの対応関係の解析を進めることで、DDR法を発がん性定量予測に資する新規ゲノム安全性評価手法として発展させることが重要である。

E. 結論

本分担研究では、DNA損傷応答反応や関連する分子反応を定量定性的に捉える新手法、すなわちDDR法の開発を目的として、ChIP法およびChWB法の検討を行った。

固定化動物組織標本を用いたChIP法では、昨年度見出した「拡大希釈および終夜脱架橋」による可溶化条件を用いて解析を進めたが、培養細胞を用いたChIP法と比較して%Input値が著しく低く、投与群間の統計学的有意差を明確に検出するには至らなかった。この結果から、長時間ホルマリン固定された組織標本にChIP法を適用するには、DNA-タンパク質間相互作用の保持と組織可溶化を両立する条件のさらなる最適化が必要であると考えられた。一方、ChWB法では、紫外線照射後の γ H2AXおよびモノユビキチン化PCNAのクロマチン画分での増加、ならびにENU処理後のAPE1およびPOLBの高塩濃度可溶化画分およびクロマチン画分での増加を検出した。これらの結果は、ChWB法により、DNA損傷の種類や処理後時間に応じたクロマチン上のDNA損傷応答反応を検出できる可能性を示している。

以上より、ChWB法は、DDR法の基盤技術として有用であり、遺伝毒性物質により誘発されるDNA損傷応答や関連する分子反

応を定量定性的に捉える新規評価手法として発展し得ると考えられた。今後は、用量反応性および時間反応性の検討、異なる作用機序を有する化学物質間でのDDRプロファイル比較、ならびに他のクロマチン解析技術との連携により、発がん性定量予測に資するDDR指標の確立を目指す。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G.1. 論文発表

1. Matsumoto M, Natsume M, Iso T, Umamo T, Murata Y, Masumura K, Horibata K, Sugiyama KI. Increased mutagenicity in the liver of MutaMouse females following oral treatment with commercial-grade toluene diisocyanate. *Genes Environ.* 2025;47:12.

G.2. 学会発表

1. 増村健一, 安東朋子, 堀端克良, 石井雄二, 杉山圭一：マウスを用いたアクリルアミドの *in vivo* 変異原性と次世代に誘発される生殖細胞系列突然変異の解析. 第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025.7)
2. 吉田愛海, 江田侑未, 杉山圭一, 堀端克良：遺伝情報発現に付随する突然変異誘発と細胞周期の影響. 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会 (2025.11)
3. 江田侑未, 佐々木沙耶, 吉田愛海, 杉山圭一, 堀端克良：クロマチン画分上の DNA 損傷応答解析を利用した遺伝毒性反応の検出. 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会 (2025.11)
4. 松本真理子, 磯貴子, 馬野高昭, 大道友香, 広瀬望, 若山美智子, 増村健一, 堀端克良, 杉山圭一：グリシジルメタクリ

別添 4

レート経口投与による雄 MutaMouse
における in vivo 変異原性の検討. 日本
環境変異原ゲノム学会第 54 回大会
(2025.11)

5. 羽倉昌志, 須井哉, 川上久美子, 加藤雅之, 皿田巳子, 杉山圭一, 堀端克良, 峯川和之, 山本美佳, 山田雅巳 : TA100 株の感受性の違いについての一考察 (BMS pilot study). 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会 (2025.11)
6. グルーズピーター, 山田雅巳, 堀端克良, 杉山圭一 : AlkB と触媒活性を欠損した DNA ポリメラーゼ IV が Ames 試験で hisG46 標的の変異誘発に及ぼす影響. 日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会 (2025.11)

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

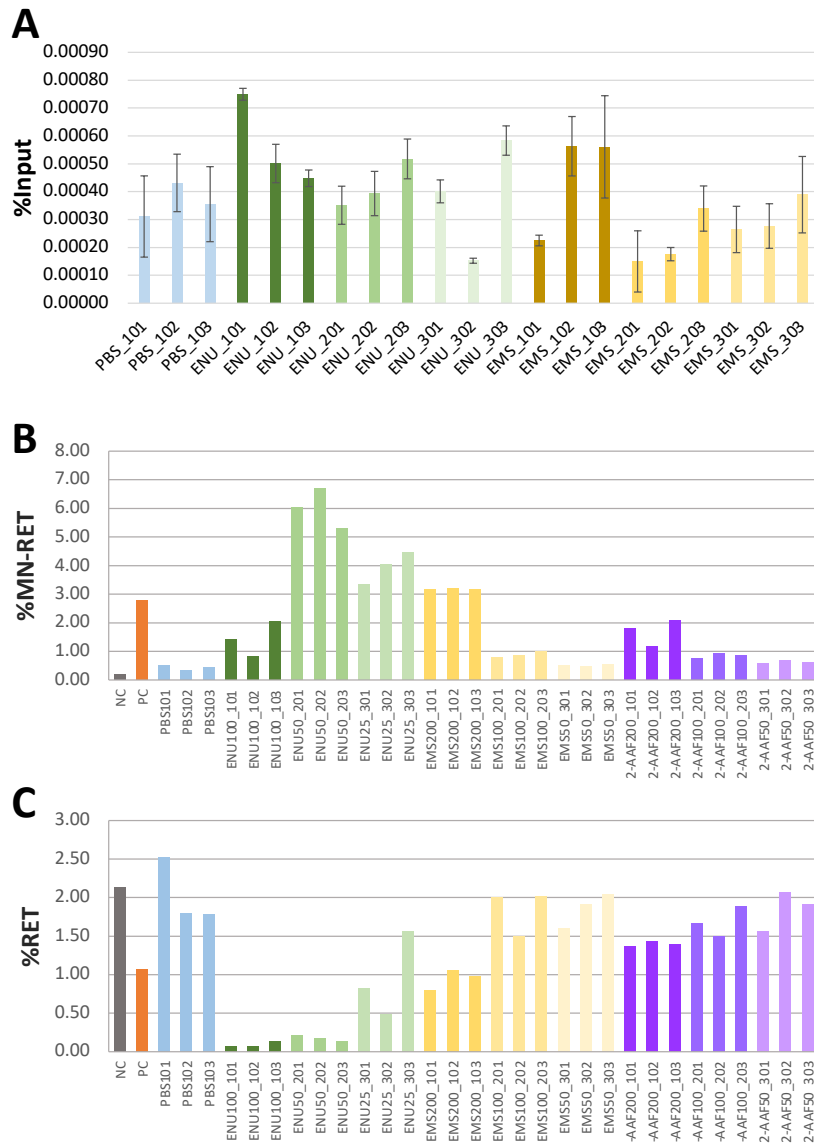


図 1. ホルマリン固定肝臓組織標本を用いた APE1 ChIP 解析および in vivo 小核試験
 ENU、EMS または 2-AAF を投与したマウスから採取したホルマリン固定肝臓組織標本を用い、抗 APE1 抗体による ChIP 解析を実施した。ChIP 解析では、rDNA 上の標的領域における APE1 結合量を%Input として算出し、未処理群および各投与群間で比較した (A)。同一投与条件における末梢血を用いた in vivo 小核試験の結果を B に、骨髓抑制の評価結果を C に示す。小核試験では遺伝毒性陽性が確認された条件を含む一方、ホルマリン固定肝臓組織標本を用いた ChIP 解析では、APE1 のクロマチン結合量に明確な投与依存的増加は認められなかった。

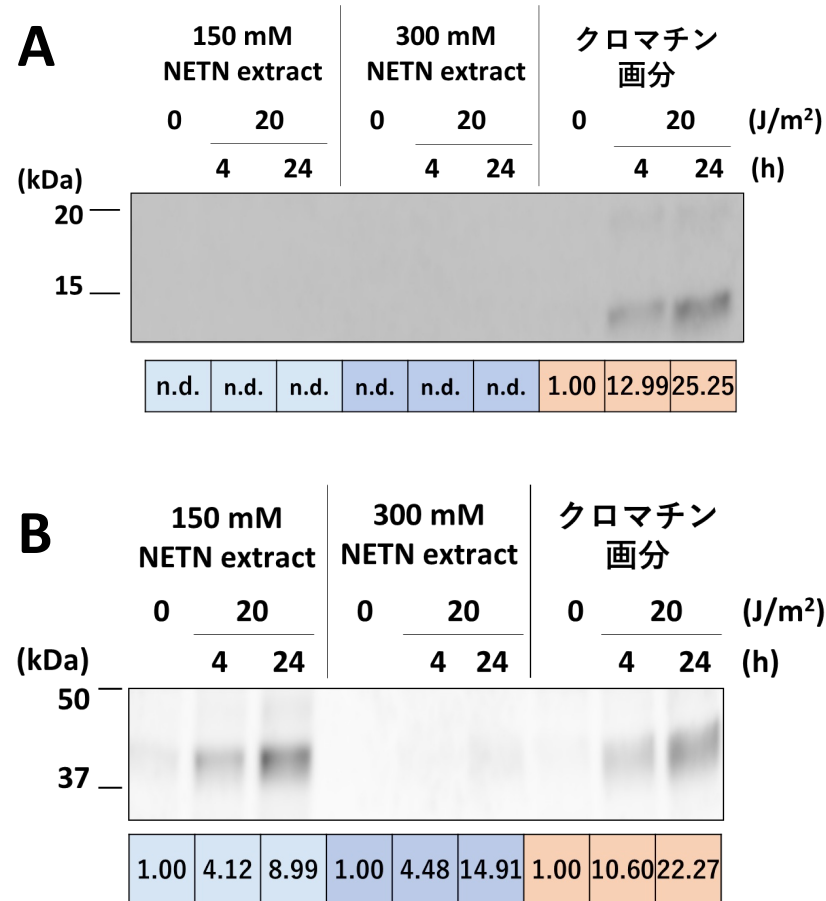


図 2. UV-C 照射後に誘導される DNA 損傷応答タンパク質の細胞内分画変化

UV-C 照射後の細胞を、150 mM NETN buffer 可溶化画分、300 mM NETN buffer 可溶化画分、およびクロマチン画分に分画し、 γ H2AX (A) およびモノユビキチン化 PCNA (Ub-PCNA) (B) の分布をウエスタンブロットにより解析した。各図下の表には、ImageJ により定量したバンド強度について、未処理サンプルを 1 とした相対値を示す。UV-C 照射後、クロマチン画分において γ H2AX および Ub-PCNA の経時的な増加が認められ、ChWB 法により紫外線誘発 DNA 損傷に伴うクロマチン上の DNA 損傷応答を検出できることが示された。n.d.; not detected.

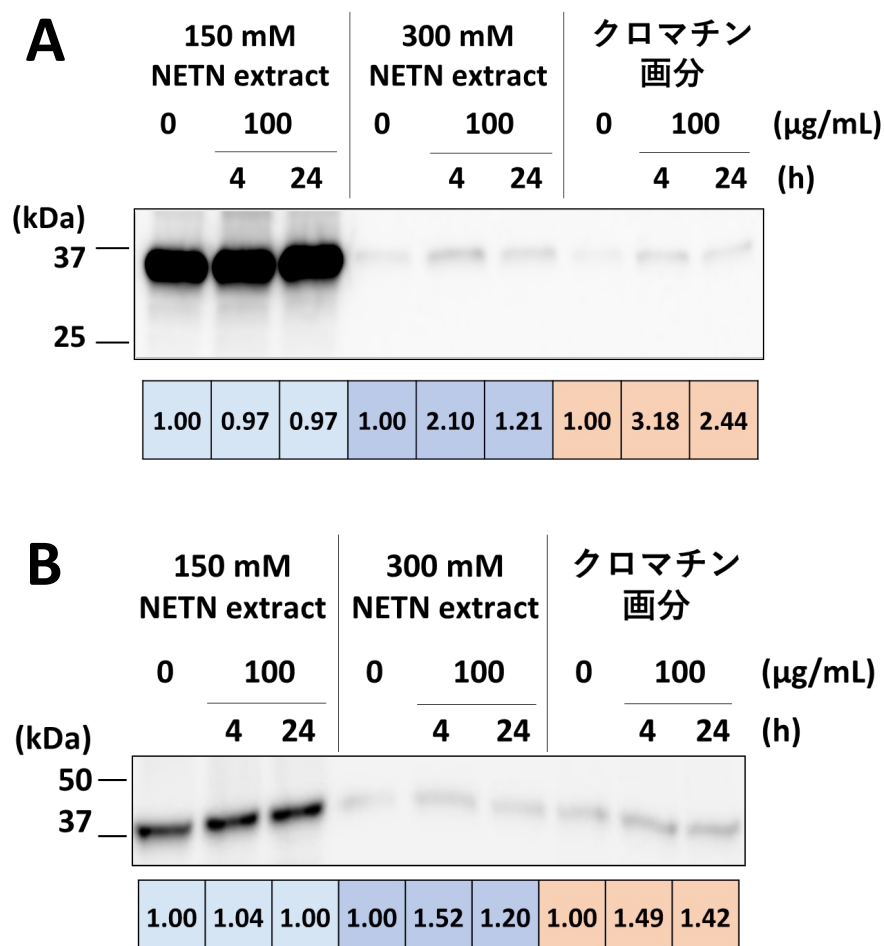


図 3. ENU 処理後に誘導される塩基除去修復関連タンパク質の細胞内分画変化

ENU 処理後の細胞を、150 mM NETN buffer 可溶化画分、300 mM NETN buffer 可溶化画分、およびクロマチン画分に分画し、塩基除去修復に関与する APE1 (A) および POLB (B) の分布をウエスタンブロットにより解析した。各図下の表には、ImageJ により定量したバンド強度について、未処理サンプルを 1 とした相対値を示す。ENU 処理後、APE1 および POLB は 300 mM NETN buffer 可溶化画分およびクロマチン画分で増加傾向を示し、アルキル化 DNA 損傷に応答した修復関連タンパク質のクロマチン近傍またはクロマチン画分への動員を ChWB 法により検出できる可能性が示された。n.d.; not detected.