

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

**一研究要旨一**

近年、化学物質等が細胞分裂を伴うことなく、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. 化学物質による体細胞突然変異検出法の開発**

前年度までのプロトコルの改良に加え、本年度のライブラリ作製試薬の検討・変更によって、より DNA の損失を抑え、少量 DNA から ECS 解析ライブラリを作製するプロトコルを作成した。本課題でモデル細胞とする老齢神経細胞・ミクログリアについて、細胞分取後、細胞を集積・DNA を抽出する条件について検討し、同一サンプルから ECS 解析とメチル化解析を行うために十分な量の DNA が抽出できるプロトコルを確立した。それぞれのサンプルから ecNGS 解析用のライブラリを作製した。実際に老齢、若齢神経細胞サンプルの ecNGS 解析を行ったが、老齢サンプルにおける変異頻度上昇を検出するにはさらなるサンプル数が必要であることが示唆された。すなわち、老化細胞においては、N=3 で有意差がつくほどの劇的な体細胞突然変異は見られないことがわかったが、例数をあげることで有意差がつく微細な変異が起こっている可能性が示唆された。

**2. DNA メチル化異常を介した化学物質によるゲノム毒性の検出**

ナノポアシーケンサーを用いたメチル化解析法を用いて、老齢、若齢マウス神経細胞、ミクログリアのグローバルメチル化レベルを簡便迅速に解析することができた。老齢／若齢間のグローバルメチル化レベルでは神経細胞、ミクログリアとも大きな差がなかった。しかし、神経細胞／ミクログリア間では老齢、若齢、ともにミクログリアのメチル化が低い傾向を見いだした。

**3. 転写に関連した突然変異生成の解析**

ROS により S 期進行を抑制した条件下においても、DOX 添加による転写誘導により gpt 変異体頻度が上昇することを明らかにした。この結果は、DNA 複製の寄与が低下した条件下でも、転写誘導に関連した突然変異生成が生じ得ることを示唆している。一方、アルキル化剤 ENU を処理した条件では、ENU による gpt 変異体頻度の上昇は認められたものの、DOX 添加による転写誘導が ENU 誘発変異体頻度を明確に増強する傾向は認められなかった。したがって、今回の ENU 処理条件では、ENU 誘発突然変異に対する転写誘導の影響は限定的である可能性が示された。以上より、CHO/TAM 解析系は、細胞分裂抑制条件下における転写関連突然変異生成を解析するための有用な実験系であると考えられた。今後は TAM の検出条件およびその機構をより詳細に明らかにする。

**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**

老齢神経細胞と老齢ミクログリアにおいて、細胞老化度等の脆弱性が亢進している可能性が示された。今後得られる scRNAseq データと共に、体細胞変異、エピジェネティクス異常と関連があるかどうかについても検討し統合することにより、的確なゲノム毒性評価系を確立する予定である。

**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**

老齢ミクログリアは数・形態・機能が大きく低下していた。また、老齢ミクログリア独自の置換法開発も必要であることがわかった。

**自然老化マウスの提供**

次年度の研究実施に向け、複数コホートのマウスの飼育を継続する。また、定期的な病原微生物検査や健康観察も引き続き実施し、清浄環境の維持、並びに個体の健康状態の適切な管理に務める。

**来年度への展望**

老齢/若齢マウスの神経細胞、ミクログリアにおいて、細胞老化等の細胞脆弱性マーカーが検出され、ミクログリアの体細胞突然変異が増加傾向を示したが、N=3 で有意な差がつくほどの大きな影響はないことが示された。老齢動物における細胞老化等、細胞脆弱性とゲノム脆弱性との関連については定量性が得られる特徴量を見いだしてまとめることを目的として次年度取り組む。中間評価ヒアリングでは、化学物質影響の評価にシフトすることを推奨された。当班では今年度までに、ゲノム脆弱性（体細胞突然変異、エピジェネティクス変異）の検出系を確立した。そこで、R8 には神経細胞系細胞株を採用し、増殖期、静止期における化学物質影響評価を行うこととした。陽性/陰性対象化学物質、PFOS 等の化学物質選択については、OECD ガイドラインのうち、哺乳類動物細胞を用いた in vitro 評価系で指定されている化学物質を選択することとした。

## 研究分担者

杉山圭一（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）  
堀端克良（国立医薬品食品衛生研究所）  
最上由香里（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と、それに伴う細胞性状変化を検討可能なゲノム毒性検出法を確立する。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にはゲノム毒性が蓄積していると思込まれる。そこで、老齢動物からこれらの細胞を分取しモデル細胞として使用し、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の検出技術を確認する。体細胞突然変異やエピジェネティクス異常は細胞老化度と関連していることが報告されていることから (Miller et al., 2022)、細胞老化度等の細胞脆弱性亢進の評価法も確立し、ゲノム不安定性評価と統合する。加えて、化学物質影響としてのゲノム毒性を検証する。以上の検討を総括し *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指標の明確化、ゲノム毒性一細胞老化等脆弱性との関連検討、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. 化学物質による体細胞突然変異検出法の開発

##### ① DNA 抽出条件の検討

Miltenyi Biotec 社の MACS により分取されたマウスの神経細胞・ミクログリア細胞サンプルについて、細胞回収時の遠心速度などの条件を複数用意し、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Netherlands) を用いて DNA を抽出した。

##### ② DNA 断片分子確保プロトコル最適化・ライブラリ作製

前年度行ったライブラリ作製プロトコルの改良に加え、本年度は酵素による断片化とニック処理の後工程を変更した。別課題において、既存プロトコルと比較して、よりステップが少なく 1 チューブで反応させることができる NEBNext® Ultra™ II DNA PCR-free Library Prep Kit for Illumina® のキットを用いる事によりさらに DNA の損失を抑えながら ecNGS 解析用のライブラリを作製できることが明らかとなっていた。そこで、本研究においても PECC-Seq 法におけるライブラリ作製プロトコルについてこれを採用した。ゲノム DNA を NEBNext® dsDNA Fragmentase® (New England Biolabs, USA) により、37°C, 30 分の条件で断片化を行った。断片化した DNA を Nuclease P1 (New England Biolabs, USA) で 30°C, 30 分処理した。得られた約 150bp 程度の DNA 断片について NEBNext® Ultra™ II DNA PCR-free Library Prep Kit for Illumina® (New England Biolabs, 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。シーケンスには国立医薬品食品衛生研究所設置の NextSeq2000 (Illumina, Inc., USA) を用いた。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、公開されているマウスのゲノム配列 (GRCm39) 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。ECS 解析手法としては PECC-Seq を用いた。

#### 2. DNA メチル化異常を介した化学物質によるゲノム毒性の検出

グローバルメチル化の評価に関しては、ナノポアシーケンサーを用いたメチル解析法を用いた。本解析法は研究分担者が確立した手法であり簡便迅速という利点がある。本研究班では、5 週令及び 84 週令の C57BL/6 マウスの脳、肝臓、腎臓における DNA メチル化について検討した。部位特異的なメチル化の検討に向けて、老化によりメチル化レベルの変化することが知られている Epigenetic clock 遺伝子のマウスにおける報告を調べ、ゲノム上の位置をリストアップした。

#### 3. 転写に関連した突然変異生成の解析

これまでに樹立している CHO/TAM 解析系で用いる CHO-KTG5 細胞株を用いた。本細胞株は、突然変異解析の標的遺伝子である大腸菌 *gpt* 遺伝子を含む *gpt* カセットを有する  $\lambda$  ファージ DNA コンストラクトを、CHO Tet-On 3G 細胞に安定導入して作製したものである。本解析系では、Tet 応答性プロモーターの下流に *gpt* カセットが配置されており、ドキシサイクリン (DOX) 添加により *gpt* カセット上の転写を誘導することができる。転写誘導後、細胞ゲノム DNA 中に組み込ま

れたλファージ DNA 領域を in vitro packaging により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ることでプラスミド化し、gpt アッセイにより標的遺伝子上に生じた突然変異を解析する。前年度、CHO/TAM 解析系で接触阻害や無血清培養では細胞分裂活性が十分には抑制されない一方、ALLN または Roscovitine 処理により S 期進行を抑制できる条件を見出しており、本年度はその条件を TAM 解析へ適用した。具体的には、CHO-KTG5 細胞株に対して Roscovitine (ROS) を 20 μM の濃度で 16 時間事前処理し、S 期進行を抑制した。また、比較対照として ROS を事前処理しない群も設定した。その後、ROS 存在下または非存在下で、遺伝毒性物質であるエチルニトロソウレア (ENU; Ethylnitrosourea) を 12 μg/mL の濃度で 4 時間処理した。さらに、ENU 処理後、ROS 存在下または非存在下で DOX を 1 μg/mL の濃度で 20 時間処理し、gpt カセット上の転写を誘導した。これにより、S 期進行抑制の有無、アルキル化剤処理の有無、および転写誘導の有無を組み合わせた処理群を設定し、各条件が gpt 遺伝子変異体頻度に及ぼす影響を解析した。

## **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**

#### 細胞単離

若齢マウス (C57BL/6J 3 ヶ月齢, ♂)、老齢マウス (C57BL/6J 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、顕微鏡下で前脳領域を採取した。脳サンプルの細胞分散は Adult Brain Dissociation kit の Manual に従い、Gentle MACS Dissociator (Miltenyi Biotec 社) を用いて分散した。

#### ポピュレーション解析

単離した神経細胞、ミクログリアの純度、細胞数、生細胞の割合を MACS Quant Analyser10

(Miltenyi Biotec 社) を用いて解析した。神経細胞は、Anti-Biotin APC、Anti-NeuN-AF488、Viability Fixable Dye 405/452 を使い、Transcription Factor Staining Buffer set を用いて、細胞外、細胞核をラベルした。ミクログリアは、CD45-FITC、CD11b-PE、TMEM119-CoraLite647、Viability Fixable Dye 405/452 を使い、Inside Stain kit を用いて細胞外、細胞内をラベルした。

#### ミクログリア培養

神経細胞陰性分画を、Poly-L-Lysine (10 μg/mL, 3 時間、室温; P9155, Sigma-Aldrich) でコートした T25 フラスコに播種した。培地は、10% 牛胎児血清および 1% ペニシリン-ストレプトマイシン (15140-122, Gibco) を含む DMEM/F12 (11965-092, Gibco; 11765-054, Gibco) を基礎

培地とし、マクローファージコロニー刺激因子 (M-CSF, 10 ng/mL, 315-02, PeproTech) およびトランスフォーミング増殖因子 β1 (TGF-β1, 50 ng/mL, 100-21, PeproTech) を添加した。培地は 2~3 日に 1 回交換し、3~4 週間培養後、フラスコを振幅約 20 cm で毎分 60 回程の早さで 1-2 分間振盪し、回収した培地中の細胞を Poly-L-Lysine コート 8 well chambered coverslip (80826, ibidi) に播種した。

#### 免疫細胞染色

8 well チャンバーに播種後、ミクログリア用培養プロトコル用いて 1 日間培養した細胞標本を、ミクログリアマーカー Iba1 (1:500, 090-19741, Wako) 及び Hoechst の 2 重染色を行った。免疫染色後の標本は、共焦点レーザー顕微鏡システム A1R (Nikon) を用いて撮影を行った。

#### 免疫組織染色

マウスを深麻酔下で心灌流し脱血した後、4% PFA により灌流固定を行った。脳を摘出し、4% PFA 中で一晩固定した後 30% sucrose 溶液で置換し、OCT-compounds に包埋した。クライオスタット (CM3050, Leica) を用いて、30 μm スライス切片を作成しスライドに接着させ、スライス標本作製した。スライス標本は、必要に応じ、熱賦活化抗原開示処理を行った。その後、0.3% TritonX、3% Goat Serum-PBS 中にて室温 3 時間インキュベーションし、一次抗体 (Anti-MAP2, 1:100, Anti-Iba1, 1:500, Anti-CD68, 1:100, Anti-LaminB1, 1:10000, Anti-p21, 1:1000) にて 4°C 16 時間インキュベートした。洗浄後、二次抗体 (Anti-rabbit or mouse IgG, 1:1000) にて室温 2 時間インキュベーションした後、洗浄後 DAPI (1:1000) でカウンターステインした。洗浄した後、切片を乾燥させ蛍光退色保護剤を滴下し、カバーガラス内に封入した。LaminB1、p21 は、Tris-EDTA バッファー (pH 9.0) を用いた熱媒介抗原回収を実施した。染色画像は共焦点レーザー顕微鏡システム A1R (Nikon) を用いて撮像し、NIS-Element を用いて解析を行った。

#### β-Galactosida (SA-β-Gal) 染色

SA-β-Gal 染色は、Senescence β-Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology) を用いて実施した。厚さ 30 μm の凍結脳薄切標本に β-Galactosidase Staining 溶液を滴下し、37°C で 24 時間インキュベーションした。その後、オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X710 (KEYENCE) を用いて撮影を行った。

#### シングルセルトランスクリプトーム解析 (Flex サンプル作成)

若齢、老齢マウス由来神経細胞および若齢、老齢マウス由来ミクログリアは、各群 9 匹のマウスより採材し、プールした。単離した神経細胞およびミクログリア細胞は GEM-X Flex Sample Preparation v2 Kit (PN-1000781, 10X GENOMICS)

を用いて固定化した。固定化細胞はPIを用いてセルカウントした後、Stock 溶液中に細胞を分散し、-80℃にて凍結保存した。作成したFlex サンプルは、タカラバイオ遺伝子解析センターに送付し、Chromium GEM-X Fixed RNA ライブラリー作成、NovaSeq シークエンス、Cell Ranger を用いたシングルセル発現解析を実施した。

## 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

24 ヶ月齢の老齢マウスを用いた。ミクログリアの形態解析は、Iba1 抗体を用いて行った。またミクログリア置換のための、ミクログリア除去はCology stimulating factor-1 受容体(CSF-1R)拮抗薬のPLX3397 (1,200ppm) を餌に混ぜて、2 週間投与することで行った。

### 自然老化マウスの提供

ブリーダーから 4 週齢のマウスを購入し、適齢に達するまで長期飼育を行った。飼育環境は温度  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、12 時間の明暗サイクルとして、1 ケージあたり 4~5 匹で群飼育を行った。飼料と水は自由摂取とした。品質管理のためケージ観察を毎日実施し、外観異常や行動異常などの健康状態を継続的に確認した。顕著な病理所見が見受けられた個体は解析対象から除外するとともに、エンドポイントに達した場合は速やかに安楽致死処置を施し、動物福祉へ配慮した。また、清浄度の維持・監視のため、図動物を用いた病原微生物検査を 3 ヶ月に一度の頻度で実施した。検査対象はサルモネラ菌やLCM ウィルスなどの人獣共通感染症に加え、日和見感染症関連病原体や飼育環境の指標となる 15 種の微生物とした。長期飼育を実施するコホートについて、当センターが保有する老化マウスの生存曲線や病理所見発症率と比較検討を行い、飼育条件および個体特性の妥当性を評価した。老齢マウスが 23 ヶ月齢、若齢マウスが 2 ヶ月齢に達した時、合計 3 コホートのマウスを国立医薬品食品衛生研究所と山梨大学へ輸送し、研究に供した。

### (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. 化学物質による体細胞突然変異検出法の開発

##### ①DNA抽出条件および分取細胞数と抽出DNA濃度

DNA抽出条件の検討の結果、1000Gの遠心速度で

5分間遠心をした場合に解析十分量 (>100ng) のDNAが回収可能であることが明らかとなった。ECS解析とメチル化解析を同一個体から得られたサンプルを用いて行うため、十分なDNA量が見込めるサンプルを採用した。またこれらのサンプルについてはメチル化解析班に分与した。

##### ②ライブラリ濃度

上記サンプルについて 100 ng ~ 300 ng 程度のDNAを用いて改良したプロトコルによりライブラリを作製した。一部のサンプルにおいて得られたライブラリ濃度が一般的なNGS受託解析の濃度である5nMを下回ったが、他のサンプルでは5nM以上のライブラリが得られた。

##### ③ECS解析結果

若齢神経細胞サンプル No. 13、14、15、および老齢神経細胞サンプル No. 08、13、14 について ECS 解析を行った。解析の結果、若齢神経細胞において平均  $3.7 \times 10^{-8}$ 、老齢神経細胞において平均  $2.6 \times 10^{-8}$  と変異頻度が計算された。統計解析の結果、若齢と老齢サンプル間で有意な変異頻度差が見られなかった。若齢ミクログリア細胞サンプル No. 4、5、10 および老齢ミクログリア細胞サンプル No. 04、05、11 について ECS 解析を行った。解析の結果、若齢ミクログリア細胞において平均  $7.9 \times 10^{-8}$ 、老齢神経細胞において平均  $11.0 \times 10^{-8}$  と変異頻度が計算された。老齢サンプルにおいて、変異頻度の上昇傾向が見られたものの、統計解析の結果、若齢と老齢サンプル間で有意な変異頻度差が見られなかった。

サンプル間の比較においては、神経細胞サンプルよりもミクログリアサンプルの方が回収できるDNA量が多い傾向が示唆された。これは神経細胞がほぼ分裂しない一方で、ミクログリアは速度が非常に遅いものの、分裂能があることに由来すると考えられた。これまでの採材において、マウス各個体から  $1 \times 10^5$  以上の神経細胞およびミクログリアが回収できており、これらのサンプルからecNGS解析およびメチル化解析に十分なDNA量が回収可能であることが明らかとなった。若齢・老齢の神経・ミクログリア細胞における変異頻度の比較について、本年度はそれぞれ3サンプルずつの比較を行った。その結果、老齢個体において、変異頻度の有意な上昇は見られなかった。先行研究として、脳における変異頻度を遺伝子改変マウスを用いて算出した報告があるが (Zhang et al., *Annu Rev Genet.* 2018, Dollé et al., *Nat Genet.* 1997)、細胞老化に伴う変異頻度上昇は微量かつ個体間のバラつきが大きいことが示されている。そのため老齢個体における変異頻度上昇を検出するには、さらに例数を上げて統計解析を行う必要があることが示唆された。一方で、遺伝子改変マウスよりも精緻に変異頻度を検出可能なECS解析を用いていることから、従来よりも少ない使用動物数での議論が可能であることが期待される。老化細胞においては、N=3で有意差がつく

ほどの劇的な体細胞突然変異は見られないことがわかったが、例数をあげることで有意差がつく微細な変異が起こっている可能性が示唆された。

## 2. DNA メチル化異常を介した化学物質によるゲ

### ノム毒性の検出

老齢および若齢マウスの神経細胞とミクログリアのDNAメチル化 (5-methyl C及び5-hydroxymethyl C) レベルを調べた結果、CpGサイトのメチル化は50-60%であり、両者に大きな差は見られなかった。CpGサイトに限定しない場合にも同様の傾向が見られたが、そのレベルは10%以下と低く、DNAのメチル化は主にCpGサイトで起きることが確認できた。また、神経細胞—ミクログリアの比較では、若齢、老齢ともに神経細胞に比べてミクログリアのメチル化レベルが低い傾向が見られた。考察のため、5週令及び84週令のC57BL/6マウスの脳、肝臓、腎臓におけるDNAメチル化も検討した。これらの臓器においても、週齢による明らかな差は認められなかった。従って、DNAメチル化に関しては特定部位について解析する必要があることがわかった。今後は、その有力な候補として、LINE-1配列やepigenetic clock遺伝子のメチル化レベルの解析を行う予定である。この解析に向けて、マウスにおけるエピジェネティッククロック遺伝子に関する情報を調べ、それらをゲノム上の位置情報と共にリストアップした。一般的に、老化によりゲノムDNAのメチル化レベルの変化が起きることが知られており、特定遺伝子のメチル化レベルは、epigenetic clockとして、細胞年齢の推定に利用できる。今後の解析に向けて、マウスにて報告されているepigenetic clock遺伝子を調べ、それらのマウスゲノム上での位置情報を取得した。今回の検討では特定の遺伝子ではなくゲノム全体のグローバルなメチル化の変化を解析したため、大きな変化は検出できなかったと考えられる。ただし、神経細胞とミクログリアの間でメチル化レベルの差が見られたことは重要な新知見である。神経細胞とミクログリアの細胞起源が大きく異なる点や、各細胞の生理学的機能との関連が示唆される。特にミクログリアは脳神経系において、外部影響を最初に受ける細胞であるため、in vitro評価系に最適な細胞選択において考慮する点となり得る。一方で、ゲノム不安定性のバイオマーカーとして、特定遺伝子のメチル化状態に注目するべきかもしれない。シーケンスデータのマッピングを行いゲノム上の位置情報を得たのちに、LINE-1やepigenetic clock遺伝子などの特定部位のメチル化の変化を検出したいと考えている。

## 3. 転写に関連した突然変異生成の解析

CHO-KTG5 細胞株を用いた TAM 解析において、各処理条件下で gpt 遺伝子変異体頻度を解析

した。細胞周期阻害剤を処理せず、かつ ENU も処理しない条件では、DOX 添加により gpt 変異体頻度に弱い上昇が認められた。この結果は、DOX による gpt カセット上の転写誘導が、gpt 遺伝子上の突然変異生成を促進し得ることを示唆する。ROS 単独処理群では、処理なし群と比較して gpt 変異体頻度の上昇が認められた。また、ROS 処理条件下においても、DOX 添加により gpt 変異体頻度がさらに上昇した。これは、ROS により S 期進行を抑制した条件下においても、gpt カセット上の転写誘導に伴い突然変異頻度が上昇し得ることを示す結果であった。一方、ENU 処理群では、細胞周期阻害剤を処理しない条件において、ENU 処理により gpt 変異体頻度の明確な上昇が認められたが、DOX 添加によってさらに変異体頻度が上昇する傾向は認められず、むしろわずかな低下が見られた。S 期進行抑制条件下においても、アルキル化剤である ENU による突然変異誘発性が認められることが示唆された。しかしながら、ROS および ENU の併用条件下では、DOX 添加による gpt 変異体頻度の明確な変化は認められなかった。以上の結果から、CHO/TAM 解析系において、S 期進行を抑制した条件下でも転写誘導により gpt 変異体頻度が上昇することが示された。一方、今回の ENU 処理条件下では、DOX 添加による転写誘導が ENU 誘発突然変異を明確に増強する傾向は認められなかった。ROS による S 期進行抑制条件下でも DOX 添加により gpt 変異体頻度が上昇したことは、DNA 複製の寄与を相対的に低下させた条件下においても、転写誘導に関連した突然変異生成が生じ得ることを示唆している。TAM は、細胞分裂が乏しい組織・細胞において突然変異が生じる機構を理解するうえで重要な概念であり、本結果は、CHO/TAM 解析系がその解析に有用であることを示すものである。一方、ROS 単独処理により gpt 変異体頻度が処理なし群よりも上昇した点については、慎重な解釈が必要である。ROS は S 期進行抑制を目的として使用しているが、細胞周期制御以外の細胞内反応にも影響を及ぼす可能性も考慮する必要がある。ROS 以外の S 期進行阻害条件との比較、処理濃度および処理時間の最適化、細胞毒性および細胞周期状態の詳細な確認を行うことで、S 期抑制条件下での TAM の寄与をより明確に評価する必要があるであろう。ROS と ENU の併用条件では、ROS 単独処理よりも高い gpt 変異体頻度が認められたことから、S 期進行抑制条件下でも ENU による高い突然変異誘発性が見られることが示唆された。しかしながら、ENU 単独処理と ENU + DOX 処理を比較した場合、DOX 添加による gpt 変異体頻度の明確な上昇は認められなかった。同様に、ROS による S 期進行抑制条件下でも、ENU 処理と ENU + DOX 処理の間で gpt 変異体頻度に大きな差は見られなかつ

た。したがって、今回の ENU 処理条件では、DOX 添加による転写誘導が ENU による突然変異誘発性を明確に増強するとは判断できなかった。この理由として、ENU による DNA アルキル化損傷は、DNA 複製時のミスインコーポレーションにより突然変異として固定される寄与が大きく、今回の条件では転写誘導に伴う変異生成の寄与が ENU による変異誘発の背景に埋もれた可能性がある。今後は、ENU 以外の作用機序を有する遺伝毒性物質、異なる DNA 損傷型、転写誘導のタイミング、S 期抑制条件の違いを比較することで、化学物質誘発性 TAM の検出条件を明確化する必要がある。

## **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**

脱血後脳サンプルは、氷冷下において前脳領域を摘出し秤量した。体重は、若齢マウスと比較して老齢マウスでは 37.4% 増大しているのに対し、前脳領域の重量は、ほとんど変化していなかった。前年度確立した細胞分散単離プロトコルに基づいて、マウス前脳より神経細胞、ミクログリアを単離した。いずれの細胞も生存率は 95% 以上であった。単離した神経細胞、ミクログリアの細胞数、純度を MACSQuant Analyzer10 で検証したところ、若齢マウス神経細胞は細胞数  $1.23 \times 10^5$ 、純度 96.48%、老齢マウス神経細胞数は  $5.84 \times 10^4$ 、純度 96.58% であり高い純度が確認された。そのうち NeuN 陽性細胞（注：神経細胞の核タンパク質であるが、全ての神経細胞が陽性ではない）は、若齢マウスで 87.47%、老齢マウスで 84.23% であった。一方、若齢マウスミクログリアでは、細胞数  $1.83 \times 10^5$ 、純度 92.23%、老齢マウスミクログリアは細胞数  $1.56 \times 10^5$ 、純度 92.48% であった。ミクログリア特異的マーカー TMEM119 陽性細胞（血中マクロファージは発現していない）は、若齢マウスで 70.99%、老齢マウスで純度 74.91% であった。上記の結果は 3 回の実験で再現性を確認した。回収細胞は、①ゲノム毒性検出系確立グループへの提供、②シングルセルトランスクリプトーム解析、③細胞培養に使用した。加えて、同週齢動物の④免疫組織染色を行った。

#### **① ゲノム毒性評価**

ゲノム毒性検出系グループへ若齢マウス神経細胞 8 例、ミクログリア 5 例を、老齢マウス神経細胞 8 例、ミクログリア 5 例を細胞懸濁液として提供した。

#### **② シングルセルトランスクリプトーム解析**

単離した細胞をシングルセルレベルで細胞性状解析するため、シングルセルトランスクリプトーム解析を実施した。上記のように単離した神経細胞、ミクログリアを GEM-X Flex Sample Preparation v2 Kit を用いて、4℃で 23 時間固定した。固定した神経細胞、ミクログリアは PI 染色し

て細胞核数をカウントした後、-80℃保存した。

GEM-X Flex シングルセルゲノム解析は、神経細胞（若齢マウス 9 個体より  $1.51 \times 10^6$  細胞、老齢マウス 9 個体より  $1.22 \times 10^6$  細胞）、ミクログリア

（若齢マウス 9 個体より  $3.57 \times 10^6$  細胞、老齢マウス 9 個体より  $3.80 \times 10^6$  細胞）ともにタカラバイオ株式会社遺伝子解析センターに委託し、生データセットを得た。今後、高次解析を行い、老齢マウスにあらわれる細胞性状と体細胞変異・エピジェネティクス変化を紐付けていく予定である。

#### **③ 細胞培養**

若齢および老齢マウス由来ミクログリア細胞を用いた *in vitro* 評価系の構築を目的として、ゲノム解析に使用しない細胞の培養プロトコルの整備を行った。4 週間培養後、振盪操作により回収した培地中の細胞を免疫染色した結果、若齢マウスでは  $1.47 \times 10^5$  細胞、老齢マウスでは  $5.2 \times 10^4$  細胞の Iba1 陽性ミクログリアが確認出来た。

#### **④ 免疫組織染色**

*in vivo* において神経細胞とミクログリアの細胞老化等の細胞性状変化を評価するため、免疫組織染色を行った。若齢マウス 5 例、老齢マウス 4 例の固定脳サンプルより凍結スライス切片を作成し、神経細胞、ミクログリアの選択的マーカー抗体および細胞老化等を検出する抗体を用いて免疫染色を行った。観察領域は神経細胞とミクログリアの判別が容易な海馬領域に注目した。MAP2 は微小管を調節するチューブリンタンパク質であり、神経細胞の細胞体、樹状突起に発現する。若齢マウスの海馬 CA1、DG 領域では、神経細胞の構造が明確であった。一方、老齢マウスでは、MAP2 シグナルが減弱し、突起構造が不連続になっていた。Iba1 は単球やマクロファージで発現する  $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白タンパク質であり、ミクログリアのマーカーとしても用いられる。海馬 CA1 領域において、若齢マウスと比較して、老齢マウスでは Iba1 陽性ミクログリアの細胞数が増大し、形態も突起が短く細胞体が大い活性型へと変化していた。CD68 は貪食活性化したミクログリアのマーカーとして用いられ、主にリソソーム、エンドソームに局在する。老齢マウスの CA1 領域では、CD68 + Iba1 + ミクログリアが複数観察でき、貪食活性の亢進したミクログリアが多数存在していることが示された。CD68 シグナルの定量解析を行ったところ、老齢マウスでは Iba1 陽性ミクログリアに局在する CD68 Object 数、総シグナル強度が若齢マウスに比較して有意に増加しており、貪食活性が亢進している事が示された。

2024 年に細胞老化実験ガイドライン (Ogrodnik et al., Cell 2024 187(16):4150-4175.) で提唱された細胞老化マーカーの発現についても検討した。Lipofuscin は酸化したタンパク質や脂質により構成された凝集体であり、細胞老化とともにリソソ



ーム内に蓄積する不溶性の色素である。自家蛍光を発することから、ピンク色のシグナルとして観察できる。老齢マウスでは海馬神経細胞層に沿って、Lipofuscin シグナルが観察された。若齢マウスでは観察されなかった。核膜の裏打ち網目状構造ラミナの主要成分である LaminB1 は細胞老化とともにその発現が低下することが報告されている。若齢、老齢マウス双方において染色像が確認できたが、老齢マウスでは LaminB1 発現が低下している細胞核が多かった。サイクリン依存性キナーゼ阻害因子である p21 も細胞老化マーカーの一つである。老齢マウスでは、p21 のシグナルが強く、発現細胞数が増大していた。p21 シグナルを定量化したところ（核内の p21 ドット数、核内の p21 面積%、核内の p21 平均シグナル強度）、神経細胞、ミクログリア共に、老齢動物において核内の p21 シグナルが増大していた。老齢神経細胞核内部の p21 シグナル陽性領域は蛍光強度が低く、小さな領域が多数存在しており、老齢ミクログリア核内部の p21 シグナル陽性領域は、蛍光強度が高く、大きいという特徴があった。細胞老化が進むとβ-gal 陽性となることが知られている。老齢動物では青色のβ-gal シグナルが観察された。以上の結果は老齢動物において、神経細胞とミクログリアの細胞老化度が亢進していることを示している。

## 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

#### (1) 老齢マウスのミクログリア形態

ミクログリアの数及び形態は、老齢マウス（24ヶ月齢）と若齢マウス（3ヶ月齢）では大きく異なっていた。老齢マウスのミクログリア数は、大脳皮質では約 85%、海馬では約 50%、と若齢マウスと比較して顕著に低下していた。ミクログリアの形態を Sholl analysis で解析した。老齢ミクログリアはアメボイド状であり、突起の複雑性が海馬では約 70%に、海馬では 40%程度にまで低下していた。

#### (2) 老齢マウスミクログリアの CSF-1R 拮抗薬 PLX3397 感受性

ミクログリアの PLX3397 感受性は、老齢及び若齢で大きく異なっていた。PLX3397 により、若齢ミクログリアは大脳皮質及び海馬ともに 95%以上が除去された。老齢ミクログリアは、大脳皮質で約 75%、海馬では約 50%が除去されたに過ぎなかった。

老齢マウスでは、ミクログリアの数、形態及び CSF-1R 拮抗薬感受性が大きく低下しており、これらは、シナプス、神経細胞さらに周辺細胞機能の機能低下に寄与している可能性が示唆された。また脳部位による差異も認められ、脳部位特異的な機能低下との関連性が示唆された。今後は、老

齢マウスにおいてミクログリアのリセット（除去/自己増殖）、移植による置換が可能であるか否かを確認し、老齢ミクログリアによる悪影響を最小化できるか否か、またそのメカニズムの解析を行う。

### 自然老化マウスの提供

研究期間中に実施した 4 回の病原微生物検査では、全検査項目で陰性を確認し、飼育環境が高い清浄度で維持されていることが示された。また、3 コホートの老齢マウスについて、搬出時（23ヶ月齢）における生存率は 80%前後であった。さらに、いずれのコホートにおいても数個体に軽度の腹部膨満や被毛の脱落、痂皮形成などが認められた。いずれも加齢に伴う軽度の病変であり、重篤な異常は認められなかった。マウスでは生存曲線が老化の指標の一つとされている。研究で使用した 3 コホートの生存曲線は、当センターが保有する基礎データと概ね合致しており、ロット差による大きな影響は認められなかった。また、病原微生物検査が陰性であったことから、本研究で用いたマウスは良好な SPF 環境下で維持されており、感染症による影響を受けていないことが確認された。これにより、観察された病変は主として加齢に起因するものであると考えられる。以上の結果から、本研究で作出・維持した老化マウスは、安定した条件下で飼育された標準的な老化モデルとして妥当であり、本研究における基盤的生物資源として有用であると考えられる。

## D. 結論

### 化学物質によるゲノム毒性検出法の開発

#### 1. 化学物質による体細胞突然変異検出法の開発

前年度までのプロトコルの改良に加え、本年度のライブラリ作製試薬の検討・変更によって、より DNA の損失を抑え、少量 DNA から ECS 解析ライブラリを作製するプロトコルを作成した。本課題でモデル細胞とする老齢神経細胞・ミクログリアについて、細胞分取後、細胞を集積・DNA を抽出する条件について検討し、同一サンプルから ECS 解析とメチル化解析を行うために十分な量の DNA が抽出できるプロトコルを確立した。それぞれのサンプルから ecNGS 解析用のライブラリを作製した。実際に老齢、若齢神経細胞サンプルの ecNGS 解析を行ったが、老齢サンプルにおける変異頻度上昇を検出するにはさらなるサンプル数が必要であることが示唆された。すなわち、老化細胞においては、N=3 で有意差がつくほどの劇的な体細胞突然変異は見られないことがわかったが、例数をあげることで有意差がつく微細な変異が起こっている可能性が示唆された。

## 2. DNA メチル化異常を介した化学物質によるゲノム毒性の検出

ナノポアシーケンサーを用いたメチル化解析法を用いて、老齢、若齢マウス神経細胞、ミクログリアのグローバルメチル化レベルを簡便迅速に解析することができた。老齢／若齢間のグローバルメチル化レベルでは神経細胞、ミクログリアとも大きな差がなかった。しかし、神経細胞／ミクログリア間では老齢、若齢、ともにミクログリアのメチル化が低い傾向を見いだした。

## 3. 転写に関連した突然変異生成の解析

ROS により S 期進行を抑制した条件下においても、DOX 添加による転写誘導により gpt 変異体頻度が上昇することを明らかにした。この結果は、DNA 複製の寄与が低下した条件下でも、転写誘導に関連した突然変異生成が生じ得ることを示唆している。一方、アルキル化剤 ENU を処理した条件では、ENU による gpt 変異体頻度の上昇は認められたものの、DOX 添加による転写誘導が ENU 誘発変異体頻度を明確に増強する傾向は認められなかった。したがって、今回の ENU 処理条件では、ENU 誘発突然変異に対する転写誘導の寄与は限定的である可能性が示された。以上より、CHO/TAM 解析系は、細胞分裂抑制条件下における転写関連突然変異生成を解析するための有用な実験系であると考えられた。今後は TAM の検出条件およびその機構をより詳細に明らかにする。

## 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

老齢神経細胞と老齢ミクログリアにおいて、細胞老化度等の脆弱性が亢進している可能性が示された。今後得られる scRNAseq データと共に、体細胞変異、エピジェネティクス異常と関連があるかどうかについても検討し統合することにより、的確なゲノム毒性評価系を確立する予定である。

## 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

老齢ミクログリアは数・形態・機能が大きく低下していた。また、老齢ミクログリア独自の置換法開発も必要である。

## 自然老化マウスの提供

次年度の研究実施に向け、複数コホートのマウスの飼育を継続する。また、定期的な病原微生物検査や健康観察も引き続き実施し、清浄環境の維持、並びに個体の健康状態の適切な管理に務める。

## 来年度への展望

老齢/若齢マウスの神経細胞、ミクログリアにお

いて、細胞老化等の細胞脆弱性マーカーが検出され、ミクログリアの体細胞突然変異が増加傾向を示したが、N=3 で有意な差がつくほどの大きな影響はないことが示された。老齢動物における細胞老化等、細胞脆弱性とゲノム脆弱性との関連については定量性が得られる特徴量を見いだしてまとめることを目的として次年度取り組む。中間評価ヒアリングでは、化学物質影響の評価にシフトすることを推奨された。当班では今年度までに、ゲノム脆弱性（体細胞突然変異、エピジェネティクス変異）の検出系を確立した。そこで、R8 には神経細胞系細胞株を採用し、増殖期、静止期における化学物質影響評価を行うこととした。陽性/陰性対象化学物質、PFOS 等の化学物質選択については、OECD ガイドラインのうち、哺乳類動物細胞を用いた in vitro 評価系で指定されている化学物質を選択する予定である。

## 4. 健康危険情報 特になし。

## 5. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Takahashi K, Quan A, Shigemoto-Mogami Y, Zhang B, Ohwada T, Abe I, Awakawa T, Sato K\*. Search for Inhibitors against Inflammatory Responses of Microglia in a Meroterpenoid Library Constructed by Synthetic-Biological Manipulation of Biosynthetic Pathways. ACS Omega. Cite this: ACS Omega. 2026 Mar 24;11(13):20547-20558. doi: 10.1021/acsomega.5c12080. eCollection 2026 Apr 7. (\*: corresponding author)
2. Shigemoto-Mogami Y, Nakayama-Kitamura K, Sato K\*. Search for marker proteins to assess blood-brain barrier development. Front Neuroanat. 2026 Feb 24;20:1717532. doi: 10.3389/fnana.2026.1717532. eCollection 2026. PMID: 41816640
3. 佐藤 薫\*, 高橋祐次, 鈴木郁郎. 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. 2025;145(6):501-505. doi: 10.1248/yakushi.24-00165-
4. Mishima M, Izawa K, Tsuda M, Higuchi Y, Uehara S, Suemizu H, Sugiyama KI\*. Development of a DNA damage assay system using stable human hepatocytes Genes and Environment 48:3 (2026)
5. Sugiyama KI, Furuhashi A, Horibata K, Tsuda M, Izawa K, Tsuji G, Demizu Y, Matsushita K, Toyoda T, Hirabayashi Y, Saito Y, Honma M. Assessment of mutagenic potential of puberulic acid contaminated in red yeast rice (beni-koji) health food supplements. Mutagenesis. 41:110-118. (2026)
6. Matsumura, S., Hosoi, S., Hirose, T., Otsubo, Y., Saito, K., Miyazawa, M., Kawade, A., Hakura, A., Kakiuchi, D., Asakura, S., Koyama, N., Okada, Y., Chikura, S., Kimoto, T., Masumura, K., Suzuki, T. and Sugiyama,



- K\*: Whole genome mutagenicity evaluation using Hawk-Seq™ demonstrates high interlaboratory reproducibility and concordance with the transgenic rodent gene mutation assay, *Genes and Environ.* 47, 13 (2025). <https://doi.org/10.1186/s41021-025-00336-w>
7. Yauk CL, Lynch AM, Dobrovolsky VN, Schuler M, Smith-Roe SL, Fitzgerald D, Higgins J, Honarvar N, Le Curieux F, Matsumura S, Minocherhomji S, Recio L, Salk JJ, Sugiyama KI, Suzuki T, Wills JW, Marchetti F. Application of error-corrected sequencing technologies for in vivo regulatory mutagenicity assessment. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2026, 164:105985.
  8. Honda H, Suzuki T, Kitajima M, Kondo NI, Miyata K, Utsumi S, Yamada M. The new era shaped by environmental genome monitoring - symposium of the Japanese environmental mutagen and genome society (JEMS), 2024. *Genes Environ.* 2025, 47: 6.
  9. 鈴木孝昌\*. Error-corrected next generation sequencing (ecNGS) の現状. 毒性質問箱. 2025;27:50-55
  10. Matsumoto M, Natsume M, Iso T, Umano 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.
  11. Shimozono K, Kim YJ, Hata T, Nan H, Saito K, Mori Y, Ueno Y, Isono F, Iwasaki M, Koizumi S, Ohtsuka T, Takiyama Y. (2025) 4-Phenylbutyric acid improves gait ability of UBAP1-related spastic paraplegia mouse model: Therapeutic potential of SPG80. *Int J Mol Sci.* Oct 8;26(19):9779. doi: 10.3390/ijms26199779.
  12. Ono Y, Tanaka K, Sato E, Ito M, Zhang D, Honda M, Ogawa T, Tagaya H, Fukuda T, Shinozaki Y, Kato K, Koizumi S, Yoshino O. (2025) Activated eosinophil plays a role in promoting fibrosis in endometriotic lesion. *Sci Rep.* Jul 31;15(1):28015. doi: 10.1038/s41598-025-13855-x.
  13. Kubota Y, Shigetomi E, Parajuli B and \*Koizumi S. (2025) Astrocytes: Crucial signal transducers that convert norepinephrine inputs to ATP signaling in the brain. *Purinergic Signalling.* Aug 19. doi: 10.1007/s11302-025-10109-3s.
  14. Parajuli B, Doi H, Shigetomi E, Suzuki H, Saito K, \*Sawada K, \*Koizumi S. (2025) Development of a label-free Ca<sup>2+</sup> image sensor to visualize extracellular Ca<sup>2+</sup> dynamics in the biological samples. *Biosensors and Bioelectronics (IF=10.5)*, June27, 287, 117729. doi: 10.1016/j.bios.2025.117729
  15. Shimozono K, Kim YJ, Hata T, Nan H, Saito K, Mori Y, Ueno Y, Isono F, Iwasaki M, Koizumi S\*, Ohtsuka T, Takiyama Y. (2025) 4-Phenylbutyric acid improves gait ability of UBAP1-related spastic paraplegia mouse model: Therapeutic potential of SPG80. *Int J Mol Sci.* Oct 8;26(19):9779. doi: 10.3390/ijms26199779.
  16. Ono Y, Tanaka K, Sato E, Ito M, Zhang D, Honda M, Ogawa T, Tagaya H, Fukuda T, Shinozaki Y, Kato K, Koizumi S\*, Yoshino O. (2025) Activated eosinophil plays a role in promoting fibrosis in endometriotic lesion. *Sci Rep.* Jul 31;15(1):28015. doi: 10.1038/s41598-025-13855-x.
  17. Shuichi Yanai. Cooperation between behavioral science and gerontology to better understand and attack cognitive decline in an aging world. *Behavioral Science Research*, 63, 123-134. (2025). doi 無し
  18. Shipan Fan, Carina Ramallo-Guevara, Monika Frenzel, Shuichi Yanai, Sataro Goto, Michiru D. Sugawa, Norbert A. Dencher, Ansgar Poetsch. Not aging but calorie restriction strongly affects protein oxidation in heart and brain mitochondria. *Aging Cell*, 25, e70339 (2025). <https://doi.org/10.1111/accel.70339>
- ## 2. 学会発表
1. Takahashi K, Quan Z, Shigemoto-Mogami Y, Zhang B, Ohwada T, Abe I, Awakawa T, Sato K\*. ミクログリア活性化抑制化合物の探索—天然物化合物から合成生物学的に創製したメロテルペノイドライブラリーの活用. 日本薬学会第 146 年会, 2026.3. 国内, 口頭.
  2. 最上(重本)由香里, 北村(中山)貴美子, 佐藤 薫\*. 生後ラット大脳皮質微小血管血液脳関門 (Blood-brain barrier: BBB) 発達と血管周囲ミクログリア・アストロサイトの立体配置変動、BBB タンパク質発現変動の関連-BBB-生体模倣システム (microphysiological system: MPS) の品質管理項目の抽出-日本薬学会第 146 年会, 2026.3. 国内, ポスター.
  3. Sato K\*. Mindset for the implementation of Microphysiological Systems (MPSs) in the drug development process. 第 25 回日本再生医療学会総会シンポジウム 座長・シンポジスト「生体模倣システム (MPS) アップデート ～繋ぐ～」 2026.3. 国内, シンポジウム.
  4. Shigemoto-Mogami Y, Takahashi K, Suzuki T, Izawa K, Masayuki M, Yanai S, Horibata K, Koizumi S, Sugiyama K, Sato K\*. Analysis of genomic changes and phenotypic alterations associated with cellular senescence in neurons and microglia. 第 99 回日本薬理学会年会. 2026.3. 国内, ポスター.
  5. Shigemoto-Mogami Y, Takahashi K, Nakayama-Kitamura K, Suga K, Saito H, Sato K\*. Application potential of magnetic resonance imaging (MRI) in preclinical seizure risk evaluation. 第 17 回日本安全性薬理研究会学術年会. 2026.2. 国内, ポスター.
  6. Shigemoto-Mogami Y, Nakamura-Kitamura K, Sato K\*. The temporal expression patterns of brain microvascular endothelial cells' proteins until blood-brain barrier (BBB) maturation-an attempt to make a recipe to determine the BBB developmental stage. MPS 実用化推進協議会第 3 回学術シンポジウム. 2026.1. 国内, ポスター.
  7. Nakayama-Kitamura K, Shigemoto-Mogami Y, Sato K\*. Blood-brain barrier (BBB) permeability test protocols for humanized BBB -microphysiological systems (MPS) incorporating human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived BBB cells should be optimized for the substrate modalities. MPS 実用化推進協議会第 3 回学術シンポジウム. 2026.1. 国内, ポスター.
  8. Nakayama-Kitamura K, Shigemoto-Mogami Y, Sato

- K\*. The performance characteristics of the commercially available blood brain barrier (BBB)-model installing human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived BBB cells. CBI 学会 2025 年大会. 2025.10. 国内, ポスター.
9. 最上 (重本) 由香里, 北村 (中山) 貴美子, 佐藤 薫\*. 生後ラット blood brain barrier (BBB) 発達に伴う脳微小血管周囲グリア細胞立体配置および BBB タンパク質発現変化に関する検討- BBB-生体模倣システム (MPS) の品質向上を目指して-. 第 153 回日本薬理学会関東部会. 2025.10. 国内, ポスター.
  10. Shigemoto-Mogami Y, Kitamura K, Hoshikawa K, Sato K\*. The role of microglia on the functional maturation of the blood brain barrier (BBB) in the rat postnatal cerebral cortex (CC). 第 68 回日本神経学会大会. 2025.9. 国内, ポスター.
  11. 山崎大樹, 木村啓志, 足利太可雄, 堀武志, 佐藤 薫, 最上由香里, 石田誠一. 生体模倣システム (MPS) の行政的利用の推進戦略と評価法構築における考慮事項. 第 2 回レギュラトリーサイエンス学会学術大会. 2025.9. 国内, ポスター.
  12. Takahashi K, Quan Z, Awakawa T, Shigemoto-Mogami Y, Ohwada T, Abe I, Sato K\*. Search for compounds with inhibitory effects on microglial activation in a small-molecule library constructed by synthetic biology. 第 48 回日本神経科学大会. 2025.7. 国内, ポスター.
  13. 最上 (重本) 由香里, 北村 (中山) 貴美子, 佐藤 薫\*. ヒト型血液脳関門 (BBB) -MPS の BBB 成熟段階を判定するための品質管理 (Quality control: QC) 項目の探索—脳微小血管周囲のグリア細胞立体配置および BBB 機能タンパク質発現に関する動物モデルでの検討-. 第 32 回 HAB 研究会. 2025.5. 国内, ポスター.
  14. Sato K\*, Kawabata K, Nakatani N, Matsusaki M, Ito Y. Progress in the product implementation of “BBB-NET”, the receptor-mediated transport assay platform incorporating humanized 3 dimensional (3D) blood brain barrier (BBB) network microphysiological system (MPS). MPS World Summit 2025. 2025.6. 国外, ポスター.
  15. 最上 (重本) 由香里\*. ミクログリアの新しい生理機能の発掘を目指して ミニ口演 第 68 回日本神経化学大会 (愛知 2025. 9)
  16. 伊澤和輝、諸角涼介、津田雅貴、杉山圭一、ecNGS methods for detecting low-frequency somatic mutations and example of practical application、IIBMP2025、2025 年 9 月 (名古屋)
  17. 伊澤和輝、津田雅貴、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、日本環境変異原ゲノム学会第 54 回大会、2025 年 11 月 (静岡)
  18. 鈴木孝昌, 杉山圭一, 降旗千恵 Robustness of the four maker genes (Bax, Btg2, Ccng1, and Cdkn1a) for predicting genotoxic hepatocarcinogens. 第 84 回日本癌学会学術総会 (2025 9 26, 金沢)
  19. 鈴木孝昌, 三島雅之, 笠原杏奈, 最上由香里, 高橋華奈子, 佐藤 薫, 杉山圭一\*: ナノポアシーケンサーを用いた簡便迅速な DNA メチル化解析. 第 53 回日本環境変異原ゲノム学会年次大会 (2025.11.22, 静岡)
  20. 降旗千恵, 杉山圭一. 鈴木孝昌\*. 遺伝毒性肝発がん物質の予測に有用な 4 マーカー遺伝子 (Bax, Btg2, Ccng1, and Cdkn1a) 第 84 回日本癌学会学術総会 (2025.9)
  21. 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)
  22. 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)
  23. 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)
  24. 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)
  25. 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)
  26. 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)
  27. 柳井修一\*・石神昭人. 9 ヶ月齢までの C57BL/6 マウスにおける成長曲線と血液生化学の亜系統差と性差. 第 72 回日本実験動物学会総会, 名古屋国際展示場ポートメッセなごや, 2025/5/21-23
  28. 井上律子・柳井修一\*. 老化マウスの歩行とエンザイム Q10 補充による介入. 第 48 回日本基礎老化学会大会. 幕張メッセ, 2025/6/27-29
  29. 柳井修一\*・遠藤昌吾. 老齢マウスにおける認知機能と身体機能の性差. 第 48 回日本基礎老化学会大会. 幕張メッセ, 2025/6/27-29
  30. Shuichi Yanai\*, Tetsuro Tago, Jun Toyohara, & Shogo Endo. Phosphodiesterase 3 inhibition by cilostazol reverses spatial memory impairment associated with reduced neuroinflammation and increased cerebral glucose uptake in aged mice. 第

48 回日本神経科学大会，朱鷺メッセ，  
2025/7/24-27

31. 柳井修一\*・遠藤昌吾．C57BL/6J マウスの行動学的表現型に基づく老化の様相．第 59 回日本実験動物技術者協会総会．米子市文化ホール・米子コンベンションセンター，2025/10/23-25
32. 柳井修一\*．行動から探る老化のサイン－網羅的解析による表現型の定量－．第 98 回日本生化学会大会，京都国際会館，2025/11/3-5
33. 大友竣生・目時美和子・柳井修一・福井浩二．アデニンによる慢性腎臓病モデルでの全身性炎症と複合抗酸化物質によるその抑制効果の検討．第 36 回腎とフリーラジカル研究会，川崎医

科大学総合医療センター，2025/11/15

34. 柳井修一\*．年次大会とウィンターカンファレンスから振り返る日本行動科学学会 65 年の歩み．日本行動科学学会第 41 回ウィンターカンファレンス．軽井沢芸術倶楽部，2026/2/9-11

## 6. 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。