

化学物質による体細胞突然変異検出法の開発

研究分担者 伊澤 和輝、杉山圭一
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ゲノム安全科学部

研究要旨

近年、細胞分裂が終了した体細胞に化学物質等が DNA 突然変異 (Knobel et al., 2022) やメチル化等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。しかし、これまでに体細胞突然変異やエピジェネティクス異常の評価系は確立されておらず、生体影響についても十分に検討されていない。そこで、これらゲノム毒性の検出系、ゲノム毒性リスクの *in vitro* 評価系を確立することを 3 年間の目的とする。検出系確立のためのモデル細胞として、上記メカニズムによるゲノム変異蓄積が予想される老齢（自然老化）マウスから採材した脳神経細胞（分化後に分裂しない）、ミクログリア（顕著に分裂速度が遅い）、コントロール細胞として若齢マウスから採材した両細胞を採用した。ゲノム毒性は細胞老化度に関連していることも示唆されているため (Miller et al., 2022) 検証する。

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) 解析の手法が開発され、世界的に注目されている。ecNGS 解析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 解析を適用することで、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 解析は細胞や 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。

本年度においては、別班から提供された若齢・老齢マウスの神経細胞およびミクログリア細胞から十分量の DNA を回収する条件の確立を目指した。また回収された DNA サンプルから ecNGS 解析用のライブラリを作製し、ecNGS 解析を行った。

まず若齢・老齢マウスの神経細胞およびミクログリア細胞を分取したサンプルについて、細胞を集積し DNA 抽出を行う条件の検討、および ecNGS 解析を行い解析にかかるパラメーターを最適化した。細胞集積・DNA 抽出条件の検討の結果、若齢神経細胞において 200ng~600ng、老齢神経細胞では 160ng~600ng、若齢ミクログリア細胞では 400ng~600ng、老齢ミクログリア細胞では 500ng~900ng 程度の DNA を抽出することができる条件を確立した。神経細胞およびミクログリア細胞由来の DNA に関し、十分量の DNA が存在するサンプルについては同一サンプルからメチル化解析も実施することが可能であると考えられたため、100ng 程度を別班に分与した。加えて、前年度までに検討されていたプロトコルをさらに改良したプロトコルを用いて ecNGS 解析用のライブラリを作製し、ecNGS 解析を行った。解析の結果、若齢マウス神経細胞において平均 3.7×10^{-8} 、老齢マウス神経細胞において平均 2.6×10^{-8} と変異頻度が計算された。また、若齢マウスミクログリア細胞において平均 7.9×10^{-8} 、老齢マウスミクログリア細胞において平均 11.0×10^{-8} と変異頻度が計算された。ミクログリア細胞において老齢個体において変異頻度の上昇傾向が見られたものの、神経細胞とミクログリア細胞の何れにおいても、統計的に差があるとはいえなかった。先行研究においては加齢によりヒトの神経細胞で変異頻度が上昇することが報告されている (Ganz et al., 2024)。マウス脳においても変異頻度が上昇することが報告されているが、個体間でのバラつきが大きいため (Zhang et al., 201)、本研究においても細胞老化に関連した変異を検出するためには、より多くのサンプル数が必要であることが示唆された。

A. 研究目的

近年、細胞分裂が終了した体細胞に化学物質等が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。しかし、これまでに体細胞突然変異やエピジェネティクス異常の評価系は確立されておらず、これらの生体影響についても十分に検討されていない。そこで、これらのゲノム毒性の検出系、ゲノム毒性リスクの *in vitro* 評価系を確立することが全体計画の目的である。検出系確立のためのモデル細胞として、上記メカニズムによるゲノム変異蓄積が予想される、老齢（自然老化）マウスから採材した脳神経細胞（ほとんどの細胞が分化後に分裂しない）、ミクログリア（細胞分裂はおこすものの、他臓器よりも顕著に分裂速度が遅い）、コントロール細胞として、若齢マウスから採材した両細胞を採用した。また、ゲノム毒性は細胞老化度に関連している (Miller et al., 2022) という知見もあるため、これを検証する。

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) 解析の手法が開発され、世界的に注目されている。ecNGS解析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 解析を適用することで、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 解析は細胞や 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。本年度においては、別班から提供された若齢・老齢マウスの神経細胞およびミクログリア細胞から十分量の DNA を回収する条件の確立を目指した。また回収された DNA サンプルから ecNGS 解析用のライブラリを作製し、ecNGS 解析を行った。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

ecNGS法を用いたゲノム毒性評価系の開発

① DNA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。この条件において分取された細胞数と抽出DNA濃度について表1にまとめた。

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（下記灰色行）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。それぞれのサンプルから作製されたライブラリの濃度を表2に示す。

一部のサンプル(下記灰色行)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。

② ECS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 3.7×10^{-8} 、老齢神経細胞において平均 2.6×10^{-8} と変異頻度が計算された(図 1)。統計解析の結果、若齢と老齢サンプル間で変異頻度に差があるとはいえなかった。

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 7.9×10^{-8} 、老齢神経細胞において平均 11.0×10^{-8} と変異頻度が計算された(図 2)。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変異頻度に差があるとはいえなかった。

D. 考察

ecNGS法を用いたゲノム毒性評価系の開発

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 1×10^5 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、それぞれの老齢個体における変異頻度の上昇を検出することはできなかった。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)、加齢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。

E. 結論

ゲノム毒性検出法の開発

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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)
2. 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)

2. 学会発表

- 1 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)
- 2 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)

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

表 1. 分取細胞数と抽出 DNA 濃度

サンプル名	細胞数($\times 10^5$)	DNA量 (ng)
若齢神経07	3.1	194
若齢神経08	2.9	472
若齢神経09	1.6	363
若齢神経13	5.6	512
若齢神経14	4.5	652
若齢神経15	4.1	524
若齢ミクログリア04	2.7	716
若齢ミクログリア05	3.7	840
若齢ミクログリア10	3.2	628
若齢ミクログリア11	3.0	448
若齢ミクログリア12	3.8	536
老齢神経07	4.1	313
老齢神経08	3.3	582
老齢神経09	7.4	167
老齢神経13	2.9	396
老齢神経14	4.9	428
老齢神経15	3.0	238
老齢ミクログリア04	3.4	816
老齢ミクログリア05	4.0	604
老齢ミクログリア10	3.0	516
老齢ミクログリア11	3.4	912
老齢ミクログリア12	3.7	496

表2. 各サンプルから作製されたライブラリ濃度

サンプル名	ライブラリ濃度 (nM)
若齢神経13	2.7
若齢神経14	4.7
若齢神経15	6.4
若齢ミクログリア04	3.4
若齢ミクログリア05	5.8
若齢ミクログリア10	5.0
老齢神経08	9.2
老齢神経13	10.2
老齢神経14	6.4
老齢ミクログリア04	8.9
老齢ミクログリア05	6.9
老齢ミクログリア11	7.3

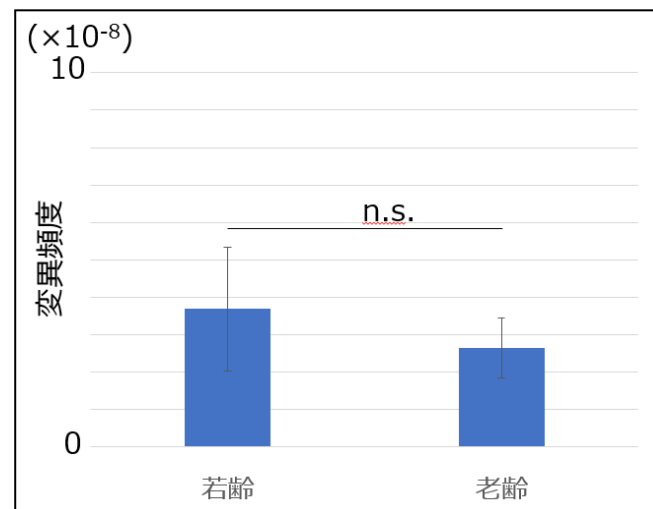


図 1. 神経細胞における変異頻度

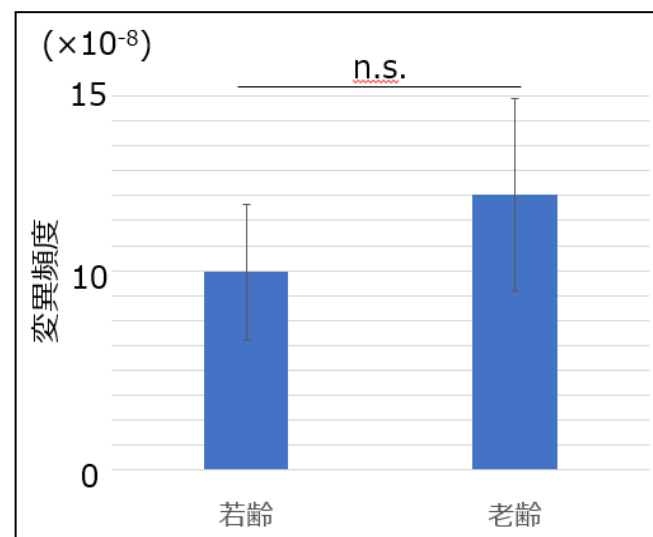


図 2. ミクログリア細胞における変異頻度