

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

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
分担研究項目：転写に関連した突然変異生成の解析

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

突然変異の生成には DNA 複製が密接に関与することが知られているが、神経系などの細胞分裂がほとんど起きないサイレントな組織・細胞においても、突然変異やがんは生じる。このことは、DNA 複製に依存しない突然変異生成機構の存在を示唆している。本研究では、サイレントな組織・細胞における化学物質による突然変異誘発メカニズムとして、転写に関連した突然変異生成（Transcription-associated mutagenesis; TAM）に着目し、これまでに樹立している CHO 系細胞をベースとした TAM 解析系（CHO/TAM 解析系）を用いて、細胞分裂抑制条件下における TAM および化学物質の影響を解析した。

令和7年度は、前年度に明らかにした S 期進行阻害条件を TAM 解析に適用し、Roscovitine (ROS) 処理により S 期進行を抑制した条件下で、ドキシサイクリン (DOX) 添加による転写誘導およびアルキル化剤であるエチルニトロソウレア (ENU) 処理が *gpt* 遺伝子変異体頻度に及ぼす影響を検討した。その結果、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が示された。一方、ENU 処理条件下では、DOX 添加による転写誘導の有無によって *gpt* 変異体頻度に大きな差は認められなかった。以上より、CHO/TAM 解析系において、S 期進行抑制下でも転写誘導に伴う突然変異生成が生じ得ることが示唆された一方、今回の ENU 処理条件では、転写誘導が ENU による突然変異誘発性を明確に増強する傾向は認められなかった。

A. 研究目的

DNA 損傷が修復されないまま DNA 複製が行われると、損傷部位に由来する塩基置換、欠失、挿入などが固定され、突然変異が誘発される。したがって、DNA 複製と突然変異生成には密接な関連があり、活発に細胞分裂する組織では突然変異が生じやすい一方、神経系などの細胞分裂がほとんど起きないサイレントな組織・細胞では、突然変異は生じにくいと考えられてきた。しかしながら、実際にはこのようなサイレントな組織・細胞においても突然変異やがんが生じることから、DNA 複製に依存しない、あるいは DNA 複製以外の細胞内反応と関

連した突然変異生成機構の存在が示唆される。

DNA 複製以外で DNA に直接関わる主要な細胞内反応として、遺伝情報の発現過程である転写が挙げられる。転写時には RNA ポリメラーゼの進行、DNA の一過性の一本鎖化、転写共役修復、R-loop 形成、DNA トポロジ変化など、DNA 構造および DNA 上のタンパク質複合体の状態が大きく変化する。これらの事象は、DNA 損傷の修復、残存、あるいは突然変異としての固定に影響を及ぼす可能性がある。このような転写に関連して生じる突然変異生成は、転写に関連した突然変異生成（Transcription-as

sociated mutagenesis; TAM) として知られている。

本研究では、サイレントな組織・細胞における化学物質による突然変異誘発メカニズムとして TAM に着目する。研究分担者がこれまでに樹立している CHO 系細胞をベースとした TAM 解析系 (CHO/TAM 解析系) を用い、細胞分裂抑制条件下において、転写誘導および遺伝毒性化学物質処理が突然変異生成に与える影響を明らかにすることを目的とした。

令和7年度は、前年度に CHO/TAM 解析系で明らかにした S 期進行阻害条件を実際の TAM 解析へ適用し、S 期進行抑制条件下において転写誘導が *gpt* 遺伝子変異体頻度に及ぼす影響、ならびにアルキル化剤 ENU による突然変異誘発性に転写誘導が与える影響を検討した。

B. 研究方法

本研究では、これまでに研究分担者が樹立している 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 λ 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。

前年度においては、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。

図1に示した通り、具体的には、CHO-KTG5 細胞株に対して Roscovitine (ROS) を 20 μ M 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 μ g/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 μ g/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。

C. 研究結果

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 (図2)。その結果、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。

ROS および ENU を併用した条件では、ROS 単独処理群よりも高い *gpt* 変異体頻度を示した。このことから、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。

D. 考察

本研究では、CHO-KTG5 細胞株を用いた CHO/TAM 解析系において、S 期進行抑制条件下での転写誘導および ENU 処理が *gpt* 遺伝子変異体頻度に及ぼす影響を解析した。前年度までの検討により、CHO/TAM 解析系では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、CDK 阻害剤等の処理により S 期進行を抑制できることが明らかになっていた。本年度はこの知見に基づき、ROS 処理による S 期進行抑制条件で TAM 解析に適用した。

DOX 添加のみで *gpt* 変異体頻度が上昇する傾向は、これまでの先行的な検討でも観察されていた。本年度の結果においても、細胞周期阻害剤非処理かつ ENU 非処理条件下で DOX 添加により弱い *gpt* 変異体頻度の上昇が認められたことから、*gpt* カセット上の転写誘導そのものが、標的遺伝子上の突然変異生成に寄与する可能性が支持された。

また、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。このことは、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。

一方で、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がある。したがって、ROS 処理自体が DNA 損傷応答、修復、細胞生存性、あるいは変異体選択に影響した可能性も考慮する必要がある。今後は、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。

ENU 処理条件では、ENU 単独処理により *gpt* 変異体頻度が上昇したことから、CHO/TAM 解析系において ENU のアルキル化剤としての突然変異誘発性を検出できることが確認された。また、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った。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。また、ENU 処理濃度、処理時間、DOX による転写誘導タイミング、損傷修復の時間経過

などが、TAM の検出感度に影響している可能性も考えられる。

以上より、本年度の結果は、S 期進行抑制条件下でも転写誘導に伴う突然変異生成が生じる可能性を示す一方で、アルキル化剤 ENU による突然変異誘発性と TAM との関係については、処理条件のさらなる最適化が必要であることを示している。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。

E. 結論

本分担研究では、サイレントな組織・細胞における化学物質による突然変異誘発メカニズムとして、転写に関連した突然変異生成 (TAM) に着目し、CHO-KTG5 細胞株を用いた CHO/TAM 解析系により、S 期進行抑制条件下での転写誘導および ENU 処理が *gpt* 遺伝子変異体頻度に及ぼす影響を解析した。

その結果、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、異なる遺伝毒性物質、処理濃度、処理時間、転写誘導条件、ならびに

S 期進行抑制条件を組み合わせることで、化学物質による 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。

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, 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.

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

別添 4

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. TAM解析に適用したS期進行阻害剤等の処理条件

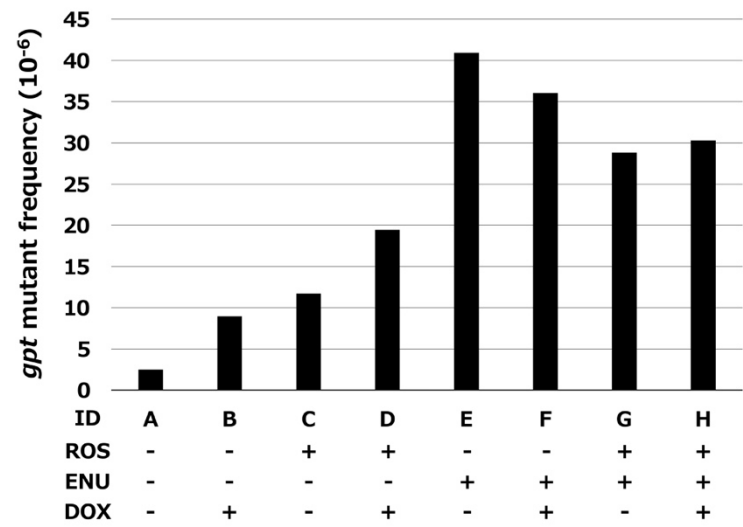


図 2. TAM解析における各実験区での *gpt* 変異体頻度