

平成27年度厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業、H27-化学-指定-001）  
化学物質の有害性評価手法の迅速化、高度化に関する研究  
- 新型反復暴露実験と単回暴露実験の網羅的定量的遺伝子発現情報の対比による毒性予測  
の精緻化と実用版毒性予測評価システムの構築 -

## 分担研究報告書

分担研究課題：「化学物質の反復暴露による基線反応成立のエピジェネティクス  
機構解析」

研究分担者	北嶋 聡	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者	小野竜一	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部

### 研究要旨

本研究は、先行実施されたPerce llome\*トキシコゲノミクス研究を基盤に、分子メカニズムに依拠した網羅的毒性評価手法を構築し、毒性予測と評価の一層の迅速化、高精度化を進めることを目的とする。反復投与時の過渡反応を修飾する基線反応の成立には、当該遺伝子のヒストン修飾やDNAメチル化等の遺伝子発現修飾機構（所謂Epigenetics）が関わる可能性が指摘される事から、本分担研究では次世代シーケンサーを利用し、反復経口投与した際の肝サンプルについてヒストン修飾やDNAメチル化状態を網羅的に検討することを目的とする。

平成27年度は、まず次世代シーケンサーを利用するDNAメチル化解析手法の性能評価を陽性対照サンプルを用いて行った。陽性対照サンプルとして、雄性C57BL/6Jと雌性JF1とのF1マウス（4週齢）の肝サンプルを実験に用いた。C57BL/6JとJF1系統間には系統間に約1千万の一塩基多型(SNPs)が存在する。このサンプルを用いる事で、親由来のメチル化の違いにより発現制御される事が既知のインプリンティング遺伝子のDNAメチル化について、親の由来に分けて決定でき、本解析法の性能評価が可能となる。加えて、DNAのメチル化の測定法としてPost-bisulfite adaptor-tagging (PBAT)法が知られているが、この手法と最近になって市販された、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kitを用いる手法（Accel-NGS法）との比較検討もおこなった。

検討の結果、PBAT法よりも、Accel-NGS法の方が、網羅的にDNAメチル化状態を把握できる事が明らかとなった。またC57BL/6Jマウス及びJF1マウスの遺伝子多型を用いて、既知の父性発現インプリンティング遺伝子であるPeg10及びMestのDMR (Differentially Methylated Region)にマップされるリードの親由来を解析したところ、全てのメチル化されたシーケンスリードはC57BL/6Jマウス由来であり、他方、全ての非メチル化されたシーケンスリードはJF1マウス由来であることが確認できたことから、ゲノムDNAのbisulfite処理は完全に行われており、Accel-NGS法を利用する次世代シーケンサーを用いた本解析法により、DNAメチル化状態を網羅的に検討できることが確認できた。

引き続き本解析手法を用いて、先行研究において取得済みの、溶媒（コーンオイル）を単回投与した際、及び四塩化炭素を14日間反復投与した際の、12週齢の雄性C57BL/6Jマウスの肝サンプルについて、DNAメチル化状態を網羅的に解析中であり、平成27年度中に解析が終了する見通しである。

(\* ) mRNA発現値を細胞1個当たりのコピー数として絶対定量する方法。

## A. 研究目的

本研究は、化学物質が生体に及ぼす毒性影響の評価手法を、生体反応の分子メカニズムに基づいて迅速化、高精度化、省動物化し、インフォマティクス技術と統合して実用化する事を目的とする。即ち、先行研究にて構築済みの延べ6.5億遺伝子情報からなる高精度トキシコゲノミクスデータベースと単回暴露時の毒性ネットワーク解析技術を基盤に、これらを維持・拡充しつつ、反復暴露のネットワーク解析、及び、その予測評価技術を開発する。ここにインフォマティクス専門家によるシステムトキシコロジーの概念を導入し、反復暴露にも対応する網羅的毒性予測評価システムの構築を進める。

反復暴露影響の分子機序解析による、既存の単回暴露実験データベースからの反復毒性予測の性能評価においては、先行研究において、肝及び肺における四塩化炭素の新型反復暴露実験により、単回暴露時に発現変動した遺伝子のほぼ全てについて、基線反応成分（暴露回数を重ねるに連れて発現値のベースライン（基線）が徐々に変動する反応成分）は、過渡反応成分（単回暴露時の2, 4, 8, 24時間のうちに発現が変動する速い変化の成分）が増加する場合は増加、減弱する場合は減少することを見いだした。増加する事例があることから、反復投与による代謝誘導による化学物質の分解促進では説明できない事象であると考えられた。むしろ、この過渡反応と基線反応の関連性に関する知見は、生物学的・毒性学的に新規性が高くエピジェネティクスに関わる分子機序の関与が示唆されることから、これを明らかにすることは、反復毒性の分

子毒性学的理解の促進、及び、単回暴露実験データベースからの反復毒性予測法を開発するにあたり重要と考えられる。

本分担研究では、反復投与時の過渡反応を修飾する基線反応の成立には、当該遺伝子のヒストン修飾やDNAメチル化等の遺伝子発現修飾機構（所謂、Epigenetics）が関わる可能性が指摘される事から、この可能性を検討する為、次世代シーケンサーを利用し、反復経口投与した際の肝サンプルについてヒストン修飾やDNAメチル化状態を網羅的に検討することを目的とする。平成27年度は、次世代シーケンサーを利用するDNAメチル化解析手法の性能評価と、先行研究において取得済みの、四塩化炭素を14日間反復投与した際の肝サンプルのDNAメチル化状態につき網羅的に検討した。

## B. 研究方法

### B-1: サンプル

12週齢の雄性 C57BL/6J マウス（日本チャールスリバー）について、先行研究において取得済みの、溶媒（コーンオイル）を単回投与した際、あるいは四塩化炭素を14日間反復投与した際の肝サンプルを実験に用いた。また本解析系の陽性対照サンプルとして、雄性 C57BL/6J と雌性 JF1 との F1 マウス（4週齢）の肝サンプルを実験に用いた。

### B-2: bisulfite 処理

肝サンプルを、ProK (10mg/ml) 55 0/N 処理後、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿、及び 70 % エタノール洗浄により、DNA を抽出、精製した。抽出した DNA は Pico Green dsDNA 定量試薬 (Thermo) を用いて DNA 濃度を決定し、DNA

500 ng を用いて bisulfite 処理を EZ DNA Methylation-Gold kit (Zymo Research 社) により行った。

### B-3: 次世代シーケンサーを用いた whole genome bisulfite sequencing

Bisulfite 処理後の DNA 500 ng 用いて、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit (Swift 社) を用いて、Illumina 社の次世代シーケンサー NextSeq500 用の whole genome bisulfite sequencing に対応したライブラリーを作成した。ライブラリーは、0.2 N NaOH による denature を行った後に、NextSeq500 v1 試薬に付属の HT1 溶液を用いて 1.8 pM に希釈し、コントロールとして phiX ライブラリーを 20% 加えてシーケンスを行った。シーケンス反応は、dual index (8bp x 2), 151 cycle single read の設定とした。シーケンス終了後は、bcl2fastq ソフトウェアにより fastq ファイルを生成し、fastq groomer ソフトウェアによる grooming を行った後に、マッピングソフト bowtie2 による bisulfite 処理済みのマウスゲノム (MM10) に対してマッピングを行った。マッピング後は、シーケンス可視化ソフト IGV の bisulfite mode を用いて DNA メチル化を解析した。

### **(倫理面への配慮)**

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、下記、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程 (平成 27 年 4 月版)」。

## **C. 研究結果及び考察**

### C-1: 次世代シーケンサーを利用する DNA メチル化解析手法の性能評価

反復投与時の過渡反応を修飾する基線反応の成立には、当該遺伝子のヒストン修飾や DNA メチル化等の遺伝子発現修飾機構 (所謂 Epigenetics) が関わる可能性が指摘される事から、本分担研究では次世代シーケンサーを利用し、反復経口投与した際の肝サンプルについて DNA メチル化状態を網羅的に検討する。

平成 27 年度は、まず本解析系の陽性対照サンプルとして、雄性 C57BL/6J と雌性 JF1 との F1 マウス (4 週齢) の肝サンプルを実験に用いた。C57BL/6J と JF1 系統間には系統間に約 1 千万の一塩基多型 (SNPs) が存在する。このサンプルを用いる事で、親由来のメチル化の違いにより発現制御される事が既知のインプリンティング遺伝子の DNA メチル化について、親の由来に分けて決定でき、本解析法の性能評価が可能となる。

加えて、DNA のメチル化の測定法として Post-bisulfite adaptor-tagging (PBAT) 法が知られているが、この手法と最近になって市販された、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を用いる手法 (Accel-NGS 法) との比較検討もおこなった。1 枚のフローセルを用いてシーケンスを行い、得られたシーケンス数は、PBAT 法で、およそ 1.6 億リードに対し、Accel-NGS 法では 2.7 億リードと、Accel-NGS 法の方が 1.7 倍多いシーケンスが得られた。また、得られたシーケンスをマウスゲノムに対してマッピングすると、PBAT 法では 3 千万リード、他方 Accel-NGS 法ではおよそ 1.4 億リードと、Accel-NGS 法の方がおよそ 5 倍のシーケンスリードをマッピングできた。この結果は、

ランダムプライミングによってアダプターを付加する PBAT 法よりも、酵素によってアダプターを付加する Accel-NGS 法の方が次世代シーケンスライブラリーの作製効率が高いことを意味している。以上のことから、PBAT 法よりも、Accel-NGS 法の方が、網羅的に DNA メチル化状態を把握できる事が明らかとなった。

上記の通り、Accel-NGS 法では、1.4 億リードのシーケンスがマップされたことから、各 150bp の長さがあるので、総計 210 億塩基対のシーケンスを得た計算であり、マウスゲノムのリピートを除いた部分はおよそ 12 億塩基対であることから、約 20 倍の depth でシーケンスができる。網羅的メチル化解析にあたり、1 サンプルあたり、約 10 倍の depth でシーケンスする必要がある為、1 フローセルあたり 2 サンプルまでシーケンス可能である。

次いで、陽性対照サンプルを用いた解析を検討した。凍結肝サンプルよりゲノム DNA を抽出し、bisulfite 処理後、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を用いてライブラリを作成後、NextSeq500 V1 試薬 (150 cycles) を用いて whole genome bisulfite シーケンスを行った結果、Q30 値 (シーケンスのエラー率が 0.1% 以下の比率) は、80.0%、計 2 億 8 千万リードの出力を得た。また、得られたシーケンスリードをマウスゲノム (MM10) に対してマップさせたところ、8 千万リードがマップし、シーケンスの depth はおよそ 20x であった。C57BL/6J マウス及び JF1 マウスの遺伝子多型を用いて、既知の父性発現インプリンティング遺伝子である Peg10 及び Mest の DMR (Differentially Methylated Region) にマ

ップされるリードの親由来を解析したところ、全てのメチル化されたシーケンスリードは C57BL/6J マウス由来であり、また、全ての非メチル化されたシーケンスリードは JF1 マウス由来であることが確認できた。この結果より、ゲノム DNA の bisulfite 処理は完全に行われており、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を利用する次世代シーケンサーを用いた本解析法により、DNA メチル化状態を網羅的に検討できることが確認できた。

#### C-2: 四塩化炭素を 14 日間反復投与した際の肝サンプルにおける DNA メチル化状態の網羅的な解析

引き続き本解析手法を用いて、12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスについて、先行研究において取得済みの、溶媒 (コーンオイル) を単回投与した際、及び四塩化炭素を 14 日間反復投与した際の肝サンプルについて (投与 2 時間後のもの、それぞれ n=3) DNA メチル化状態を網羅的に解析した。現在までに、これら全てのサンプルのシーケンスを終了しており、Q30 値は全てのサンプルで 70% を超える出力を得た。得られたシーケンスを、quality による trimming のある場合とない場合でマッピング率の検討を行なったところ、Q20 以上の塩基が 90% 以上で trimming を行なった結果、51505499 リードがマップされ、trimming をしない場合は 77454276 リードがマップされた。マッピングの効率を上げるためにシングルリードで 150bp をシーケンスしているため、多少 quality の低い塩基があってもマッピング可能であると考えられる。また、陽性対照部位であるインプリンティング遺伝子、

Peg10 遺伝子の DMR 部位を観測したところ、通常のインプリント型メチル化をしており、bisulfite 処理などに問題はないと考える。

基線反応の変動が認められる遺伝子上流に位置すると考えられる Rictor、E2f1 および Xbp1 遺伝子について、プロモーター部位の DNA メチル化状態について検討したところ、大きな変化は認められなかった。引き続き、網羅的な解析を検討中であり、今年度中に解析を終了する予定である。

#### D. 結論

平成 27 年度は本解析手法の性能評価を行った結果、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を利用する次世代シーケンサーを用いた本解析法により、DNA メチル化状態を網羅的に検討できることが確認できた。引き続き、四塩化炭素を 14 日間反復投与した際の肝サンプルについて、DNA メチル化状態を網羅的に解析中であり、平成 27 年度中に解析終了の見込みである。この結果により、反復投与時の過渡反応を修飾する基線反応の成立への、当該遺伝子の DNA メチル化による遺伝子発現修飾機構（所謂 Epigenetics）の関与について明らかになるものとする。来年度は、先行研究あるいは今年度研究において、基線反応の著しかった物質を反復投与した際の肝サンプルについて、同様な検討を実施する予定である。

#### E. 健康危険情報

特になし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ono R., Ishii M., Fujihara Y., Kitazawa M.,

Usami T., Kaneko-Ishino T., Kanno J., Ikawa M., Ishino F. Double strand break repair by capture of retrotransposon sequences and reverse-transcribed spliced mRNA sequences in mouse zygotes. Scientific Reports 2015 Jul 28;5:12281.

Irie M., Yoshikawa M., Ono R., Iwafune H., Furuse T., Yamada I., Wakana S., Yamashita Y., Abe T., Ishino F., Kaneko-Ishino T. Cognitive Function Related to the Sirh11/Zcchc16 Gene Acquired from an LTR Retrotransposon in Eutherians. PLoS Genetics 2015 Sep 24;11(9):e1005521.

##### 2. 学会発表

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki and Jun Kanno, Dynamic biomarkers translatable to clinical outcomes generated by Percellome Toxicogenomics, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology(ASIATOX2015) (2015.6.24), Jeju, Korea

北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純

医療現場への還元に向けた Percellome Toxicogenomics による中枢神経毒性の動的バイオマーカー抽出研究  
第 42 回日本毒性学会学術年会(2015.6.29)

北嶋 聡、種村健太郎、古川佑介、小川幸男、高橋祐次、大西 誠、相磯成敏、相崎健一、菅野 純

シックハウス症候群レベルの極低濃度暴露の際の海馬における Percellome 法による吸入トキシコゲノミクスと遅発性中枢影響解析

第 42 回日本毒性学会学術年会(2015.6.30)

菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡

Percellome Toxicogenomics における動的バイオマーカー (Dynamic Biomarker) のカタログ化とその毒性予測利用

第 42 回日本毒性学会学術年会(2015.7.1)

Ono, R.

Double strand break repair by capture of retrotransposon and mRNA sequences via reverse transcription in the mouse zygote. FASEB "Mobile DNA in Mammalian Genomes", Palm Beach (2015.6.)

#### **H. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)**

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他