

- 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 -
(H27-化学-指定-001)

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した結果、現時点では、DNAメチル化状態が顕著に変化している部位は見いだされていないが、引き続き微細にDNAメチル化状態が変化する領域の見出す検討を継続している。

平成28年度は、クロフィブレートまたはバルプロ酸ナトリウム塩を14日間反復投与した際の肝サンプルについて、本解析手法を適用しDNAメチル化状態を網羅的に解析中であり、これまでに顕著に変化している部位は見いだされていないが、引き続き微細にDNAメチル化状態が変化する領域の見出す検討を継続している。この微細にDNAメチル化状態が変化する領域を見出す手法として、BismarkおよびBSMAPを検討している。

（*） 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が、平成28年度は、クロフィプレートまたはバルプロ酸ナトリウム塩を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）あるいは C57BL6/NCrSlc（日本エスエルシー）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 [C8267、シグマ アルドリッチ社] または、0.5%メチルセルロース (MC) [133-17815、和光純薬工業]）を単回投与した際、あるいは四塩化炭素、クロフィプレートまたはバルプロ酸ナトリウム塩を 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 O/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 を用いて、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

平成 27 年度は、まず本解析手法の性能評価を行った。その結果、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。具体的には、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。

加えて、得られたシーケンスのマッピング方法が適切か否かについての検討を行った。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、Mest 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。

続いて、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した。その結果、現時点では、DNA メチル化状態が顕著に変化している部位は見いだされていない

が、引き続き微細に DNA メチル化状態が変化する領域の見出す検討を継続している。

平成 28 年度は、引き続き、クロフィプレートまたはバルプロ酸ナトリウム塩を 14 日間反復投与した際の肝サンプルについて、DNA メチル化状態につき網羅的に検討した。

C-1: クロフィプレートまたはバルプロ酸ナトリウム塩を 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

本解析手法を用いて、12 週齢の雄性 C57BL/6J あるいは C57BL6/NCrSlc マウスについて、先行研究において取得済みの、溶媒(0.1%DMSO 添加 0.5%MC)を単回投与した際、及びクロフィプレートまたはバルプロ酸ナトリウム塩を 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。解析の結果、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。その他、現時点では、DNA メチル化状態が顕著に変化している部位は見いだされていないが、引き続き微細に DNA メチル化状態が変化する領域の見出す検討を継続している。

なお、Bisulfite 処理後のゲノム配列のマッピング計算は非常に複雑であり、1 サンプルあたり 1 週間ほどの時間が掛かり、解析上のボトルネックとなっているため、

これについても解析パイプラインの最適化等、今後、改善策を検討する。

D. 考察

現在までの結果では、化学物質を反復投与したマウスを N=3 で、網羅的に DNA メチル化解析を行っている。N=3 の全ての個体で DNA メチル化が変化する領域は見いだされていないが、N=1 および N=2 で DNA メチル化が変化する領域は得られている。網羅的に DNA メチル化解析を行っているが、シーケンスされる領域にはばらつきがあり、リード数の少ない領域も存在する。リード数が少ないことが原因で、N=3 で DNA メチル化が変化する領域を見いだせていない可能性も考えられる。対策としては、N=2 もしくは N=1 で検出させた DNA メチル化に変化が見出されたゲノム領域については、各領域ごとに個別に PCR プライマーを設計し、DNA メチル化をより詳細に解析する方法か、DNA メチル化が遺伝子発現に重要な領域として、CpG アイランドのゲノム DNA を濃縮した上で、DNA メチル化解析を行い、CpG アイランドのリード数を大幅に増やす（数十倍）方法が有効と考えられる。

E. 結論

平成 27 年度は、先ず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された。次いで、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した。その結果、顕著に変化している領域は見いだされていないが、微細に DNA メチル化状態が変化する領域を複数検出した。

平成 28 年度は、クロフィブレートまたはバルプロ酸ナトリウム塩を 14 日間反復投与した際の肝サンプルについて、DNA メチル化状態につき網羅的に解析した。その結果、四塩化炭素と同様に、顕著に変化している領域は見いだされていないが、微細に DNA メチル化状態が変化する領域を複数検出した。

平成 29 年度は、引き続き微細に DNA メチル化状態が変化する領域のスクリーニングを検討する。この微細に DNA メチル化状態が変化する領域を検出する手法として Bismark および BSMAP を検討中である。また、測定時間の短縮化に向け、解析パイプラインの最適化等、改善策を検討する。加えて、DNA メチル化には影響していないが、ヒストンアセチル化状態に影響している可能性も考えられることから、ヒストンアセチル化の網羅的解析についても検討を進める。

なお、次世代シーケンサーの試薬が ver2 にアップグレードしている為、この試薬の性能評価を行う目的で、ver1 の時と同様に 1 フローセルを使用して、2 サンプル（クロフィブレートまたはバルプロ酸ナトリウム塩）の網羅的メチル化解析を行なう。

これらの検討結果により、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考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

Furukawa Y, Tanemura K, Igarashi K, deta-Otsuka M, Aisaki K, Kitajima S, Kitagawa M, Kanno J. Learning and memory deficits in male adult mice treated with a benzodiazepine sleep-inducing drug during the juvenile period. *Front Neurosci* 10: 339- ,2016.

2. 学会発表

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Lung Percellome Project: Profile analysis of Sick-Building-Syndrome level inhalation and oral exposure data for prediction of lung toxicity.

第 43 回日本毒性学会学術年会(2016.6.29)

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Percellome Project on Sick-Building-Syndrome level inhalation for the prediction of lung and brain involvement. 14th International Congress of Toxicology 2016 (ICT 2016) (2016.10.3), Merida, Mexico

菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡

Percellome Project の進捗 - 単回および新型反復曝露の比較による予測性向上 -

第 43 回日本毒性学会学術年会(2016.7.1)

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-Ichi

Aisaki, Percellome Toxicogenomics of Newly Designed Repeated Dose Study.

The 52nd Congress of EUROTOX (EUROTOX2016) (2016.9.6), Seville, Spain.

種村 健太郎、古川 佑介、北嶋 聡、菅野 純
キシレンの経気道吸入曝露によるマウス行動影響解析

第 43 回日本毒性学会学術年会(2016.6.30)

種村 健太郎、古川 佑介、北嶋 聡、菅野 純
キシレン吸入曝露によるマウスへの中枢機能影響解析

第 159 回日本獣医学会学術集会(2016.9.)

Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima, and Jun Kanno, Double strand break repair by capture of unintentional sequences, an emerging new risk for the leading-edge technology.

Keystone Symposia Conference / Precision Genome Engineering (2017.1.10), Breckenridge, USA

G. 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