

厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）  
新型毒性試験法とシステムバイオロジーとの融合による有害性予測体系の構築  
（H30-化学-指定-001）

平成30年度 分担研究報告書

分担研究課題：「化学物質の反復曝露による毒性発現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 部長  
研究協力者 小野竜一 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 第5室 室長

研究要旨

本研究は、化学物質曝露が実験動物に惹起する遺伝子発現を網羅的にネットワークとして描出する技術と、バイオ・インフォマティクス技術とを実用的に統合し、従来の毒性試験に不確定係数（安全係数）を組み合わせる評価手法を補強するとともに、さらに迅速、高精度、省動物を具現化した新たな有害性評価システムとして従来法を代替することを目標とする。特に先行研究（平成24～29年度）で実施したPercellome法\*を基盤とした「新型」反復曝露実験\*\*により、化学物質の反復投与による生体影響のデータベース構築が進みつつある。単回投与のデータベースと共にこれを利用すれば、現在は長い時間と多額の費用を要している長期反復曝露の毒性評価を大幅に効率化できる可能性が高い。

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、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。先行研究（平成24～29年度）での検討ではDNAメチル化状態よりも、ヒストンのメチル化・アセチル化状態に影響している可能性が強く示唆されたことから、この網羅的解析を中心に検討する。

平成30年度は当初、アセフェートの場合のエピジェネティクス機構解析を予定していたが、バルプロ酸ナトリウム（VPA）に変更した。この理由は、すでにVPAの単回及び反復投与の際の遺伝子発現データを有し、かつ、ヒストン脱アセチル化酵素1（HDAC1）の阻害を介してヒストンのアセチル化を増加させることが知られており、本研究分担課題における陽性対照物質としてより適切であると考えられるためである。VPAのエピジェネティック機構解析、具体的には、クロマチン免疫沈降（ChIP）アッセイと次世代シーケンサーを組み合わせ、クロマチン免疫沈降シーケンス（ChIP-Seq）法を利用して、VPAを14日間反復投与した際のマウス肝サンプルにおけるヒストン修飾の網羅的解析を進めている。ChIPアッセイの際の抗体は、以下の4種、すなわち抗H3K4me3、抗H3K27me3、抗H3K27Ac、及び抗H3K9me3抗体を用いた。

解析の結果、VPAの反復投与によりH3K9me3がグローバルに阻害されるという、当初の予想とは違った結果が得られた。これは、肝においてH3K9me3を抑制する陽性対照物質としてVPAを利用できる新発見が得られたものと考えられる。

更に、先行研究で実施した四塩化炭素を14日間反復投与した際のマウス肝サンプルにおけるヒストン修飾の解析を進めた。ヒストン修飾部位を有するものとして抽出された遺伝子リストについて、四塩化炭素の単回投与あるいは反復投与した際の発現変動を検討したところ、多くの遺伝子について、元々の発現量が少ない（コピー数が1以下）あるいは発現変動が認められない事がわかり、反復投与によりヒストン修飾の変化を経て発現変動する遺伝子を抽出する際には、当該遺伝子の発現量と発現変動を実際に確認する必要があることが明らかとなった。

（\*） 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。

（\*\*） 全動物に同量の検体を反復投与し、遺伝子発現測定直前の投与時に、溶媒群、低用量群、中用量群、高用量群に分けて最終投与を一回行う。実験の反復曝露と単回曝露の回数をもとに[14+1]、[4+1]、[0+1]等と表記することとした。

## A. 研究目的

本研究は、化学物質曝露が実験動物に惹起する遺伝子発現を網羅的にネットワークとして描出する技術と、バイオ・インフォマティクス技術とを実用的に統合し、従来の毒性試験に不確実係数(安全係数)を組み合わせる評価手法を補強するとともに、さらに迅速、高精度、省動物を具現化した新たな有害性評価システムとして従来法を代替することを目標とする。即ち、先行研究にて構築済みの延べ8.5億遺伝子発現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曝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、反復曝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融合し、反復曝露にも対応する網羅的有害性予測体系の構築を進める。

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ことから、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。先行研究(平成24~29年度)での検討ではDNAメチル化状態よりも、ヒストンのメチル化・アセチル化状態に影響している可能性が強く示唆されたことから、この網羅的解析を中心に検討する。

平成30年度は、クロマチン免疫沈降シーケンス(ChIP-Seq)法を利用して、バルプロ酸ナトリウム(VPA)を14日間反復投与した際の肝サンプルにおけるヒストン修飾の解析を進めた。ChIPアッセイの際の抗体は、以下の4種、すなわち抗H3K4me3、抗H3K27me3、抗H3K27Ac、及び抗H3K9me3抗体を用いた。

平成30年度は当初、アセフェートの場合のエピジェネティクス機構解析を予定していたが、バルプロ酸ナトリウム(VPA)に変更した。この理由は、すで

にVPAの単回及び反復投与の際の遺伝子発現データを有し、かつ、VPAがヒストン脱アセチル化酵素1(HDAC1)の阻害を介してヒストンのアセチル化を増加させる事が知られており、本研究分担課題における陽性対照物質としてより適切であると考えられるためである。

## 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(Carbon tetrachloride: 分子量: 153.8、Cas No.: 56-23-5、純度99.8%、WAKO)またはバルプロ酸ナトリウム塩(VPA)(Sodium Valproate: 分子量: 166.19、Cas No.: 1069-66-5、純度>98%、シグマアルドリッチ)を14日間反復投与した際の肝サンプルを実験に用いた。

### B-2: 次世代シーケンサを用いたChIP-Seq

VPAを14日間反復投与した翌日に溶媒(MC)投与2時間後のマウス肝および、溶媒(MC)を単回投与2時間後のマウス肝のヒストンのメチル化およびアセチル化を比較検証し、反復投与によるクロマチン修飾の変化を明らかにする。

本ChIP-Seq解析は、タカラバイオ株式会社・バイオメディカルセンター・高速シーケンス解析受託受付担当経由で、Active Motif社(米国)に委託した。

各マウス肝(30  $\mu$ g クロマチン調整液)(各n=1)(必要サンプル重量を超えるように、投与群、溶媒群ともに各3例をそれぞれ1つにまとめた。必要サンプル量: 200~500 mgの凍結組織重量のところ、四塩化炭素の場合は、「投与群: 計260 mg [160, 10及び100 mg]、溶媒群: 計320 mg [160, 180及び80 mg]」、VPAの場合は、「投与群: 計386 mg [207, 208及び

161 mg]、溶媒群：計 576 mg [129, 157 及び 100 mg]」を材料として、下記 4 種の抗体、すなわち 1) 4  $\mu$ l の抗ヒストン H3K4me3 抗体 (Active Motif, cat # 39159) (H3K4me3: 転写活性化に働くヒストン H3 のリジン 4 トリメチル化)、2) 4  $\mu$ g の H3K27me3 抗体 (Active Motif, cat # 39155) (H3K27me3: 転写抑制に働くヒストン H3 リジン 27 のトリメチル化)、3) 4  $\mu$ g の H3K27Ac 抗体 (Active Motif, cat # 39133) (H3K27Ac: 転写活性化に働くヒストン H3 リジン 27 のアセチル化)、4) 5  $\mu$ l の H3K9me3 抗体 (Active Motif, cat # 39161) (H3K9me3: 転写抑制に働くヒストン H3 リジン 9 のトリメチル化)、および Input (抗体無しコントロール) を用いてクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行った。その際、サンプル間の補正を行うために、Drosophila のクロマチンが spike in として添加されている。ChIP 後の DNA は、それぞれの抗体に対する既知の陽性コントロールおよび陰性コントロールを qPCR により定量し、そのクロマチン免疫沈降の有効性の定量を行なう。

クロマチン免疫沈降の有効性の確認できた ChIP DNA より次世代シーケンサ解析用のライブラリーを作成し、75 bp のシングルリードで網羅的シーケンス解析を行った。シーケンス結果は、マウス標準ゲノム (mm10) に対してマッピング後に SICER アルゴリズムを用いてピークコール (ピーク検出) を行なう。SICER アルゴリズムは default のパラメータ ( $p=1e-7$  (narrow peak),  $p=1e-1$  (broad peak)) を用いる。各サンプルは、Drosophila DNA 断片のリード数により補正を行なう。

#### (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 30 年度は、VPA (定用量: 100 mg/kg) を 14 日間反復投与 ([14+1]) した際、及び溶媒 (コーンオイル) を単回投与した際の 12 週齢の雄性 C57BL6/NCrSlc マウスの肝サンプルについて (投与 2 時間後のもの、それぞれ  $n=3$ 、これを必要サンプル重量 [200 mg 以上] となるように、それぞれ 1 つにまとめた: 溶媒投与の場合は計 576 mg、VPA 投与の場合は計 386 mg となった)、まずクロマチン免疫沈降を行なった。H3K4me3 抗体、H3K27me3 抗体、H3K27Ac 抗体、H3K9me3 抗体の各抗体の場合の濃縮について確認中であり、これにより、ChIP は正常に行われたか否かが判断できる。これらの ChIP 済み DNA よりライブラリーを作成し、次世代シーケンスによる 75 bp のシングルリードの網羅的シーケンス解析を行ない、現在データについて解析中であり、基線反応の成立に関わる知見が得られるものと期待される。

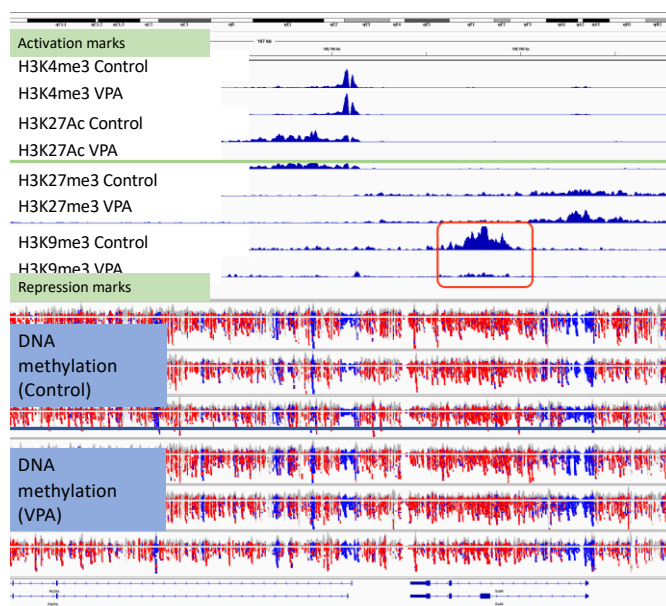
今回得られた VPA を 14 日間反復投与した際のマウス肝サンプルにおけるヒストン修飾の解析結果は以下である。

各抗体について、溶媒対照群と反復投与群において認められた各ピーク数はそれぞれ (以下、溶媒対照群、反復投与群)、

抗 H3K4me3 抗体 (15, 883、15, 538)、  
抗 H3K27Ac 抗体 (21, 006、19, 948)、  
抗 H3K27me3 抗体 (19, 879、20, 382)、  
抗 H3K9me3 抗体 (27, 786、7, 085)、

となっている。この内、特に H3K9me3 のピーク数が 27, 786 から 7, 085 へ、25.5%に減少しており、VPA の反復投与によって H3K9me3、即ちヒストンのエチル化が阻害されることが明らかになった (それぞれ、2.2%減少、5.0%減少、2.5%増加、及び 74.5%減少)【図 1】。他方、ヒストンのアセチル化 (H3K27Ac) は増加せず、

むしろ逆に 5% 低下することが明らかになった。これらの結果から、VPA の反復投与による基線反応の変化は、ヒストン修飾の変化で一部は説明できる可能性がある。今後、実際に ChIP-PCR などを行い確認する。



【図 1】溶媒および VPA の反復投与をおこなったマウス肝における ChIP-seq 解析および DNA メチル化解析をまとめた一例 (Sa114)。図上半分の赤枠部分は H3K9me3 の溶媒投与 (枠内上段) および VPA 投与 (枠内下段) を示しており、大幅なピークの低下が見られる。一方、図下半分の DNA のメチル化状態 (赤=メチル化、青=非メチル化、n=3) には、VPA 投与 (上 3 列=対照、下 3 列=VPA 投与群) による変化は見られない (先行研究結果)。

なお、先行研究で実施した四塩化炭素を 14 日間反復投与した際のマウス肝サンプルにおけるヒストン修飾の解析をさらに進めた。

各抗体について、溶媒対照群と反復投与群において認められた各ピーク数はそれぞれ (以下、溶媒対照群、反復投与群)、

- 抗 H3K4me3 抗体 (16, 500、15, 996)、
- 抗 H3K27Ac 抗体 (20, 379、20, 826)、
- 抗 H3K27me3 抗体 (20, 927、23, 816)、
- 抗 H3K9me3 抗体 (29, 756、31, 046)、

となっている。この内、特に H3K27me3 は、DNA メチル化非依存的に遺伝子発現を抑制することが知られ、反復投与により 13.8% も peak 数が上昇していることから、反復投与による遺伝子発現の低下に寄与していることが示唆された (それぞれ、3.1% 減少、2.2% 増加、13.8% 増加、及び 4.3% 増加)。したがって四塩化炭素の反復投与による基線反応の変化は、ヒストン修飾の変化で一部は説明できる可能性がある。今後、実際に ChIP-PCR などを行い確認する。

各 peak を網羅的に解析し、溶媒対照群に対して増加あるいは減少 (具体的にはそれぞれ 2 倍以上、もしくは 1/2 以下) した peak 数で、数の多い方の peak 数が 20 以上という条件にて抽出したところ、それぞれ (以下括弧内はピーク数で [増加、減少] をあらわす)、

- 抗 H3K4me3 抗体 (48、19)、
- 抗 H3K27Ac 抗体 (191、50)、
- 抗 H3K27me3 抗体 (160、1)、
- 抗 H3K9me3 抗体 (627、6)、

という解析結果となった。このように、反復投与により有意な変化 (増加あるいは減少) を示すヒストン修飾部位を抽出できた。

#### D. 考察

平成 30 年度は、ChIP-Seq により VPA 反復投与により有意な変化を示すヒストン修飾部位が抽出され、基線反応の成立に関わる知見が得られた。当初、VPA について、ヒストン脱アセチル化酵素 1 (HDAC1) の阻害を介してヒストンのアセチル化を増加させる、という本研究分担課題における陽性対照物質のデータを得られると想定されたが、実際はヒストンのアセチル化 (H3K27Ac) は増加せず、むしろ逆に 5% 低下することが明らかになった。他方、H3K9me3 が 74.5% 低下することが明らかとなり、H3K27Ac の結果と比較

すると、少なくともマウス肝においてはVPAはHDACの阻害ではなく、H3K9me3を阻害していることが示唆された。新たにVPAによりH3K9me3阻害が起こるといふ知見が得られた意義は今後、研究を進めるに当たって大きいものとする。H3K9me3などのヒストン修飾とDNAメチル化は、ともに、遺伝子発現を抑制的に制御している。本研究においては、グローバルにH3K9me3が減少していることから、グローバルな遺伝子発現の活性化が想定された。しかしながら、既に得られている遺伝子発現解析の結果を見ると、VPAの反復投与による基線反応に変化の起こる遺伝子、即ち、反復投与によって遺伝子発現が増加する遺伝子は多くない(数百遺伝子)。そこで、遺伝子発現制御に関わるDNAメチル化に関してVPAの反復投与の結果を見ると、DNAメチル化には変化が起こっていなかった【図1下半分】。そのことから、H3K9me3はグローバルに低下するが、DNAメチル化による制御が残っており、今回の解析条件においては、H3K9me3の低下は、遺伝子発現制御に対して「silent」な状態である可能性が考えられた。

また、先行研究により取得・解析済みの四塩化炭素におけるChIP-Seqデータと比較解析を進めることで、反復曝露時の過渡反応を修飾する基線反応の成立など、反復毒性の分子機序解析を促進するものと期待される。

なお、先行研究で実施した四塩化炭素を14日間反復投与した際のマウス肝サンプルにおけるヒストン修飾の解析をさらに進めた。反復投与により有意な変化(増加あるいは減少)を示すヒストン修飾部位を抽出できた。明らかにヒストン修飾に差異のある領域が複数見つかると、それらの領域(エンハンサー)の制御下の遺伝子群の発現などを解析する必要がある。そこでヒストン修飾部位を有するものとして抽出された遺伝子リストについて、四塩化炭素の単回投与あるいは反復投与した際の発現変動を検討したところ、多くの遺伝子について、元々の発現量が少

ない(コピー数が1以下)あるいは発現変動が認められない事がわかり、反復投与によりヒストン修飾の変化を経て発現変動する遺伝子を抽出する際には、当該遺伝子の発現量と発現変動を実際に確認する必要があることが明らかとなった。

今後、H3K9me3阻害の陽性対照物質と考えられるVPAを利用することにより、peak数の閾値をいくつ以上にしたがよいか等、ヒストン修飾変化の抽出条件を、より詳細に検討する必要があるものとする。なおサンプル数が1であるため、統計的な有意差による抽出はできない。

## E. 結論

平成30年度は、ChIP-Seqにより、HDAC1阻害剤として知られるVPAの反復投与により有意な変化を示すヒストン修飾部位を抽出し解析した結果、HDACの阻害ではなく、H3K9me3を阻害していることが示唆された。VPAによりH3K9me3阻害が起こるといふ新見知が得られた意義は今後、研究を進めるに当たって大きいものとする。また、先行研究で実施した四塩化炭素を14日間反復投与した際のマウス肝サンプルにおけるヒストン修飾の解析をさらに進めた。その結果、H3K27me3は、DNAメチル化非依存的に遺伝子発現を抑制することが知られるが、四塩化炭素の14日間反復投与の際に、13.8%もpeak数が上昇していることから、H3K27me3が反復投与による遺伝子発現の低下に寄与していることが示唆された。

今後は、VPAの反復投与による基線反応に変化の起こる遺伝子に関して詳細にH3K9me3の低下との関与を解析する予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Yoko Hirabayashi., Exosome-mediated horizontal gene

transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. *Commun Biol* 2, Article number: 57, 2019.

Mishima M, Hoffmann D, Ichihara G, Kitajima S, Shibutani M, Furukawa S, Hirose A., Derivation of acceptable daily exposure value for alanine, N,N-bis(carboxymethyl)-, trisodium salt. *Fund Toxicol Sci* 5: 167-170, 2018.

## 2. 学会発表

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Percellome Project on Sick-Building-Syndrome level inhalation for the prediction of neurobehavioral toxicity. OpenTox Asia Conference 2018 (2018.5.24.) Tokyo, Japan

北嶋 聡、種村 健太郎、菅野 純、シックハウス症候群レベルの室内揮発性有機化合物の吸入暴露の際の海馬 Percellome トキシコゲノミクスによる中枢影響予測と情動認知行動解析、第 45 回日本毒性学会学術年会 (2018.7.18.)

Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Kenji Mizuguchi, Jun Kanno, Inferred role of crosstalk between PPAR $\alpha$  and ER signaling pathways in the toxicity of valproic acid: systems toxicology approach, International Society for Computational Biology (ISMB) 2018, (2018.7.6-10) Chicago, USA

菅野 純、小野 竜一、相崎 健一、北嶋 聡、「新型」反復曝露試験における基線反応と過渡反応の分子メカニズム解析—ヒストン修飾を中心に—、第 45 回日本毒性学会学術年会 (2018.7.19.)

夏目やよい、相崎健一、北嶋 聡、水口賢司、菅野 純、TargetMine による標的予測、第 45 回日本毒性学会学術年会 (2018.7.19.)

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ryuichi Ono, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics Project: Newly Designed Repeated Dose Study, the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018.9.2-5) Brussels, Belgium

Takashi Yamada, Mariko Matsumoto, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Category Assessment of Repeated-dose Hepatotoxicity of Phenolic Benzotriazoles for OECD IATA Case Studies Project in 2016, the 54th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2018), (2018.9.2-5) Brussels, Belgium

## 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

なし