

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31/令和元年度 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。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31/令和元年度は当初、ジエチルニトロサミン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、クロフィブレートに変更した。これは、昨年度検討したバルプロ酸ナトリウムのPPAR α 作用との差分を確認する必要があると考えたことから、PPAR α の陽性対照物質であるクロフィブレートに変更、優先して実施したためである。クロフィブレート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、クロフィブレートを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、クロフィブレードの反復投与により、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ているH3K27me3のゲノムワイドな亢進を明らかにした。また、バルプロ酸ナトリウムの反復投与の結果の再解析により、バルプロ酸ナトリウムにおいても、H3K27me3のゲノムワイドな亢進が起こっていることを確認できた。クロフィブレードとバルプロ酸ナトリウムは、PPAR α 作用という点で共通していることから、H3K27me3のゲノムワイドな亢進は、PPAR α 作用によるものと示唆された。一方、バルプロ酸ナトリウムの反復投与によるH3K9me3のゲノムワイドな低下は、PPAR α 作用以外によるものと考えられた。

(*) 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31/令和元年度は、クロマチン免疫沈降シーケンス(ChIP-Seq)法を利用して、クロフィブレードを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31/令和元年度は、当初、ジエチルニトロサミン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、クロフィブレードに変更した。これは、昨年度検討したバルプロ酸ナトリウムのPPAR α 作用との差分を確認する必要があると考えたことから、PPAR α の陽性対照物質であるクロフィブレードに変更、優先して実施したためである。

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

一) について、先行研究において取得済みの、溶媒 (0.5%メチルセルロース+0.1% DMSO 水溶液) を単回投与した際、あるいはクロフィブレート (Clofibrate : 分子量 : 242.7、Cas No.: 637-07-0、BIOMOL) 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

クロフィブレートを 14 日間反復投与した翌日に溶媒 (0.5%メチルセルロース+0.1% DMSO 水溶液) 投与 2 時間後のマウス肝および、溶媒 (0.5%メチルセルロース+0.1% DMSO 水溶液) 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 μ 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]」、バルプロ酸ナトリウムの場合は、「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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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。

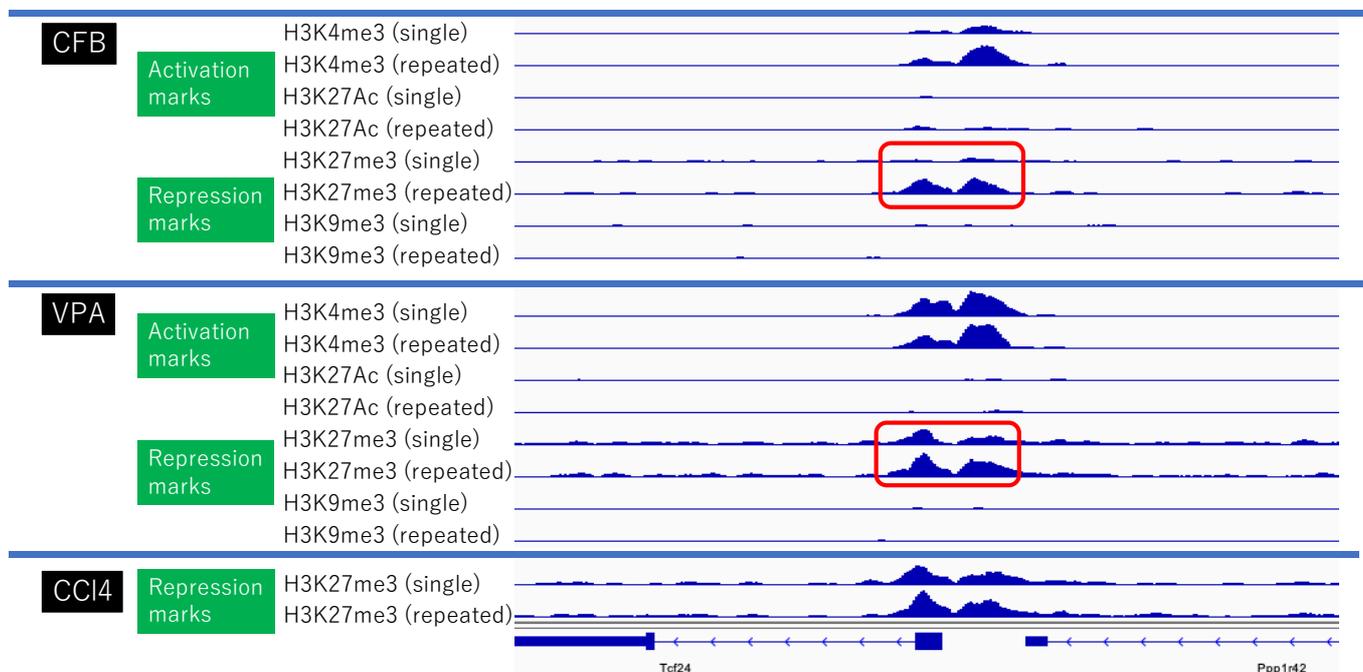
(倫理面への配慮)

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 31/令和元年度は、クロフィブレート (定用量 : 70 mg/kg) を 14 日間反復投与 ([14+1]) した際、及び溶媒 (0.5%メチルセルロース+0.1% DMSO 水溶液) 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、クロマチン免疫沈降を行なった。H3K4me3



CFBの反復投与により、H3K27me3 の大幅な亢進が全ゲノム的に見られた。
VPAにおいても20%程の亢進が見られる。

【図1】 溶媒およびクロフィブレート（CFB）の反復投与をおこなったマウス肝における ChIP-seq 解析、溶媒およびバルブ
ロ酸ナトリウム（VPA）の反復投与をおこなったマウス肝における ChIP-seq 解析、さらに、溶媒および四塩化炭素（CCl4）
の反復投与をおこなったマウス肝における ChIP-seq 解析をまとめた一例（Tcf24 遺伝子および Pppar42 遺伝子のプロモータ
ー領域）。図中の赤枠部分は、H3K27me3 の溶媒投与（枠内上段）および CFB, VPA, および CCl4 の反復投与（枠内下段）
を示しており、CFB および VPA において大幅なピークの亢進が見られる。一方、CCl4 の反復投与において大幅な亢進は
見られなかった。

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。

今回得られたクロフィブレート（CFB）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（18,185、19,425）、
抗 H3K27Ac 抗体（21,740、16,450）、

抗 H3K27me3 抗体（8,650、20,770）、
抗 H3K9me3 抗体（21,847、20,583）、

となっている。この内、特に H3K27me3 のピーク数
が 8,650 から 20,770 へ、140.1% 増加しており、CFB
の反復投与によって H3K27me3 が亢進されることが
明らかになった【図1】。したがって CFB 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 などをを行い確認する。

なお、CFB の反復投与において、H3K4me3、
H3K27me3、H3K27Ac、H3K9me3 の各 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 (63、15)、
抗 H3K27Ac 抗体 (28、66)、
抗 H3K27me3 抗体 (12198、0)、
抗 H3K9me3 抗体 (1、321)、

という解析結果となった。このように、反復投与によりゲノムワイドな変化(増加)をヒストン修飾(H3K27me3)が示すことを明らかにした。実際に、H3K27me3 が反復投与により増加した遺伝子の大半が基線反応の低下を伴っており、逆に反復投与により基線反応が有意に上昇した少数の遺伝子のプロモータ領域に該当すると考えられる位置のヒストンの変化には H3K27me3 の増加は見られず、他の発現誘導を示唆する変化を伴っていた。

D. 考察

平成 31/令和元年度は、ChIP-Seq によりクロフィブレート (CFB) 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新たな知見が得られた。当初、平成 30 年度に行ったバルプロ酸ナトリウム (VPA) の反復投与のヒストン修飾解析は、VPA による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。

VPA は、PPAR α 作用を持つことから、VPA による H3K9me3 阻害が、PPAR α シグナルを介して起こるか

否かは重要な課題である。そこで、平成 31/令和元年度は、VPA 同様に PPAR α 作用を持つクロフィブレートを反復投与したマウスの肝における ChIP-Seq 解析を行い、H3K27me3 のゲノムワイドな亢進という結果を得た。そこで、VPA の反復投与とは共通項を探索するために、VPA の反復投与における H3K27me3 の再解析を行った結果、ピーク値に 20 % 程の亢進が見られた。よって、VPA の反復投与で見られた H3K9me3 阻害は、PPAR α 作用によるものではないが、H3K27me3 の 20 % ほどの亢進については、PPAR α 作用によるものと考えられる。

図 1 にもあるように、溶媒投与群と CFB、VPA、および四塩化炭素の反復投与群の比較において、CFB で大幅な H3K27me3 ピークの亢進が見られるが、CFB の溶媒と同じ組成の溶媒の単回投与でのみ、H3K27me3 のピーク的大幅に減少しているとも考えられる。よって、CFB の溶媒である 0.5 % MC + 0.1 % DMSO のヒストン修飾に及ぼす影響についても詳細に解析する必要がある。

E. 結論

平成 31/令和元年度は、ChIP-Seq により、クロフィブレート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、H3K27me3 がゲノムワイドに亢進していることが示唆された。平成 30 年度に ChIP-seq 解析を行った HDAC の阻害剤である VPA の反復投与により、H3K27Ac ではなく、H3K9me3 阻害が起こるという新知見が得られており、この H3K9me3 阻害が PPAR α 作用によるものでないことが、クロフィブレートの解析から明らかにできた意義は大きい。

今後は、クロフィブレート、バルプロ酸ナトリウムによる H3K27me3 の亢進作用がこれらの化学物質の反復投与による基線反応に変化にどう影響をしているかを詳細に解析する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki KI, Kitajima S, Kanno J, Hirabayashi Y. Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. *Commun Biol.* 2019, 2: 57. doi:10.1038/s42003-019-0300-2.

2. 学会発表

① Ryuichi Ono, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, and Jun Kanno Molecular Basis of the 'Baseline Response' and 'Transient Response' Observed in the Newly Designed Repeated Dose Study: Epigenetic Modifications Gordon Research Conference 2019.8.11-16, USA Massachusetts

② Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Ryuichi Ono and Satoshi Kitajima. Epigenetic Mechanism of Modification of Gene Expression Network by a Repeated Exposure to a Chemical. Society of Toxicology and Japanese Society of Toxicology Symposium: Epigenetic Modification of Chronic Pathology and Toxicology Lecturers. The SOT 58th Annual Meeting, (2019.3.12), Baltimore, USA, Invited Symposium.

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