

厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）  
トキシコゲノミクスとシステムバイオロジーとの融合による  
新型化学物質有害性評価系の実装研究  
（21KD2001）

令和3年度 分担研究報告書

反復曝露影響のエピゲノム機構解析

研究分担者 北嶋 聡

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター  
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 安全性生物試験研究センター  
毒性部 第五室 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）を組み合わせた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指とする。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。

令和3年度は、サリドマイドの14日間反復曝露によるヒストン修飾解析を ChIP-Seq 法により解析する実験を実施した。サリドマイドの反復によって、Cyp4a10 のプロモーター領域において、活性型ヒストン修飾である H3K4me3 が低下していることが明らかになった。また、Cyp4a14 のプロモーター領域においても、活性型ヒストン修飾である H3K4me3 が低下していることが明らかになった。また、Cyp7b1 のプロモーター領域においては、活

性型ヒストン修飾である H3K27Ac が増加していることが明らかになった。また次年度以降、多臓器のゲノム DNA メチル化解析を本格的に実施するにあたり、組織保存条件やデータ解析に際して解決しなければならない技術的問題の対応策の検討を進めている。

-----  
(\*) 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。

(\*\*) 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、独自構築したトキシコゲノミクス・データベース (DB) にインフォマティクス、及び、人工知能 (AI) を拡大適用し、化学物質が実験動物に惹起する遺伝子発現変動等の分子毒性学情報から、科学的根拠に基づく有害性予測評価手法を確立する。これにより「安全係数」を用いる従来の有害性評価手法を補強するとともに、迅速、高精度、省動物を具現化する新たな評価システムを構築することを目的とする。

即ち、先行研究にて構築済みの延べ 8 億 5 千万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及び反復曝露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、さらに臓器別のゲノム DNA メチル化及び代表的物質の反復曝露によるヒストン修飾情報を加えて、毒性ネットワーク解析による、短期間試験での反復曝露毒性の予測評価技術を開発する。この際、インフォマティクス専門家によりシステムトキシコロジーや人工知能の技術を融合し、反復曝露にも対応する新型化学物質有害性評価系の実装を進める。

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。

## B. 研究方法

●次世代シーケンサーを用いたクロマチン免疫沈降シーケンス法 (ChIP-Seq)

サリドマイド (700mg/kg) を 14 日間反復投与した後、溶媒 (0.5%メチルセルロース水溶液) を投与し 2 時間後のマウス肝および、0.5%メチルセルロース水溶液を単回投与した 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た各マウス肝 (30  $\mu$ g) を材料として、1) 4  $\mu$ l (30  $\mu$ g) 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  $\mu$ l (30  $\mu$ g) の H3K27Ac3 抗体 (Active Motif, cat # 39133) (H3K27Ac3: 転写活性化に働くヒストン H3 リジン 27 のアセチル化)、3) 4  $\mu$ l (30  $\mu$ 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)、4) 5  $\mu$ l (30  $\mu$ g) 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う。

クロマチン免疫沈降の有効性の確認ができた ChIP DNA より次世代シーケンサ解析用のライブラリを作成し、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 in silico で 200 bp まで各リードを延長し、SICER アルゴリズムを用いてピークコール (ピーク検出) を行う。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う。

### C. 研究結果

反復曝露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等の遺伝子発現修飾機構 (所謂エピジェネティクス) 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を利用し、反復経口曝露した際の肝サンプルについてエピジェネティックな変化を網羅的に検討した。

令和 3 年度においては、新たにサリドマイド (700mg/kg) を 14 日間反復曝露した後、溶媒 (0.5% メチルセルロース水溶液) を投与し 2 時間後のマウス肝および、0.5% メチルセルロース水溶液を単回投与した 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た各マウス肝 (30 μg) を材料として、ヒストン修飾の解析を行なった。

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 (15, 923、16, 870)、  
 抗 H3K27Ac 抗体 (24, 003、23, 484)、  
 抗 H3K27me3 抗体 (15, 339、22, 000)、  
 抗 H3K9me3 抗体 (18, 930、15, 667)、

となっている。この内、特に H3K27me3 のピーク数が 15, 339 から 22, 000 へ、43. 4% 増加しており、サリドマイドの反復投与によって H3K27me3 が亢進することが明らかになった (その他は、H3K4me3: 5. 9 % 増加、H3K27Ac: 2. 2 % 減少、H3K9me3: 17. 2 % 減少)。したがってサリドマイド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。

また、各種抗体を用いた ChIP-seq 解析の結果により、溶媒対照群と反復投与群の間で、ピークの値の変動が大きかった領域の上位 20 領域とそれらのマッピング結果の一例を以下に示す。

各ヒストン修飾において変動の大きかった領域の上位には、薬剤代謝酵素である Cyp が数多く含まれていた。

#### H3K4me3(活性型)が減少

log2(Fold)	Gene List	H3K4me3 down	Dist to Start	Position	Start-end
-0.28	Fat1		1,843	upstream	chr6:41218600-41222999
-0.27	Cxcl5	2,844		in gene	chr15:102176600-102195799
-0.25	cut	95,704		in gene	chr7:74644800-146500799
-0.25	Cyp4a10	1,288		upstream	chr4:115513200-115520799
-0.25					chr7:140404000-140503999
-0.24					chr11:1294000-11700999
-0.18	Paqr9	6,382		downstream	chr9:95548800-95583799
-0.18	Scav5l	52,236		in gene	chr14:60713600-60727799
-0.17	Cyp4a14	342		in gene	chr4:115492000-115498399
-0.16	Cttnb1	15,122		in gene	chr9:115279000-115278399
-0.14	Dna1, Tfp1	4844, 12064		in gene, upstream	chr1:10729400-10730799
-0.17	Serp9	209,839		downstream	chr1:111737000-117488999
-0.12	Accl	24,639		in gene	chr7:14410200-14474099
-0.11	Chn3	1,304		in gene	chr3:10397600-10381399
-0.17	Tnfrsf5, LOC10195989, Nph2	1993, 2039, 5438		upstream, downstream, upstream	chr1:156297200-15631399
-0.17	Ccstb2	36,015		in gene	chr6:6848200-68492139
-0.17					chr4:74825100-74831399
-0.16					chr6:53194200-53218799
-0.16	Skyl3c	82,408		in gene	chr7:139118400-13918399
-0.14					chr6:66016400-66031139

#### H3K4me3(活性型)が増加

log2(Fold)	Gene List	H3K4me3 up	Dist to Start	Position	Start-end
0.39					chr19:38343200-38375199
0.38	Emec1	8,009		upstream	chr12:8117600-81013799
0.35	amt	5,971		in gene	chr12:16516600-16569399
0.35	1810053823Rn, M682	-10756, 579		upstream, downstream	chr16:93364800-93373799
0.30	Ccna3b	3,644		in gene	chr6:100079400-100088399
0.30	Hnf4a	22,908		downstream	chr12:2625200-12297199
0.30	Zkscan3	-11,885		upstream	chr6:4322800-43027799
0.29	Gm14551, Orncut1	31362, 17876		downstream, in gene	chr6:74860800-74898799
0.29	Arnt2	29,452		in gene	chr9:8931300-89384399
0.29	Hha1a4	155,228		upstream	chr6:14186400-141880799
0.29	Hnf3b3	5,229		in gene	chr3:98756800-98765199
0.28	Apob, Zkscan2	2905, 35250		in gene, downstream	chr7:123441400-123468799
0.28					chr12:2134600-21301799
0.28	Pseud, 1810013A23Rn	52245, 13291		in gene, downstream	chr17:28277200-28292799
0.28	Ar15	292,791		in gene	chr13:14882400-148992199
0.27	Skyl3b	4,386		upstream	chr9:39278000-39285399
0.27	Ccnd8	13,588		in gene	chr4:13416400-134160099
0.27	Serpina3k	3,213		in gene	chr12:10434200-104348199
0.26	Zfp76, Tmem131	19838, 187828		in gene, downstream	chr1:36780200-36781319
0.24					chr12:2386400-13871199

### H3K27Ac(活性型)が減少

log2(repeat)	Gene List	H3K27Ac down	Dist to Start	Position	Start-end
-0.44	Ctcf		2,844	in gene	chr15:102176600-102195799
-0.40	Snf2l		416,351	downstream	chr6:28894400-28898999
-0.39	Snf2l		955,800	downstream	chr5:95548000-95583799
-0.38	Page8		6,382	downstream	chr6:2873800-2873999
-0.38	Snf2l		254,051	in gene	chr9:21801800-21809999
-0.38	Kans2, Dcc1d		4793, 47130	upstream, in gene	chr2:14444800-14450399
-0.36	Linc1		55,704	in gene	chr7:14504000-14505399
-0.34					chr4:7881800-78824999
-0.32	Hmnc1, Rbp1		129216, 2938	downstream, in gene	chr8:9424000-9424199
-0.31	Ctcf1a3		34,987	in gene	chr4:4723800-4724799
-0.30					chr4:7665200-7665999
-0.30	Hmnc2, Ck3, Fam32a		18231, 6938, 13831	downstream, in gene, upstream	chr8:2194800-2213399
-0.30	Rappart1		117,679	in gene	chr2:2973400-29740799
-0.30	Zahn14		257,899	in gene	chr7:5744800-5745199
-0.30	110208238a, Sic13a4		20190, 19327	downstream, in gene	chr6:3627000-3627399
-0.30	AW549542		3,759	in gene	chr5:19571000-19582199
-0.29	Tab2l2		122,115	in gene	chr4:4684400-4687299
-0.29					chr1:2007800-20081799

### H3K9me3(抑制型)が増加

log2(repeat)	Gene List	H3K9me3	Dist to Start	Position	Start-end
0.24	Serpinak		3,213	in gene	chr12:10433400-10434999
0.24	Egr1, E2F0015159ik		58496, 20003	in gene, downstream	chr1:11677900-11684399
0.23	Taf11, G530011006ik		295623, 1982	in gene, upstream	chr1:16971600-16981399
0.23	Cash3		1,644	in gene	chr6:10507400-10508399
0.23	Dusp1		27	upstream	chr17:26591800-26591999
0.23	Tsc1e4		43,827	in gene	chr6:36517600-36548999
0.23	Rel1, Rfx8		82596, 3258	downstream, in gene	chr19:32431800-32443999
0.19	Cyp7a1		2,461	upstream	chr1:18235800-18256999
0.19	Cyp24a4		1,014	in gene	chr19:4008400-40077199
0.18	Aid		24,338	in gene	chr19:1882400-1902799
0.18	Gm1651, Oneuc1		11362, 17878	downstream, in gene	chr9:7486800-7488799
0.18	Arad1, Ehfep3, Sm1, Apbb3, Sls35a4		103196, 261, 6512, 15567, 15416	downstream, upstream, downstream, downstream, upstream	chr18:36655200-36672399
0.18	Pde4b		323,257	in gene	chr4:10549400-10549199
0.18	S10a13		1,982	in gene	chr6:89311800-8936999
0.18	G30011006ik, Mcd1		13751, 11747	downstream, upstream	chr7:9073200-90745399
0.18	Gpn33		8,191	in gene	chr6:5940800-5942799
0.18					chr12:185000-1218799
0.17	gfl1, Gm1989a		36343, 1742	in gene, in gene	chr10:9793300-9793999
0.17	Nr12l, Maa1b1		10423, 57461	in gene, downstream	chr16:3827200-3829799
0.17	Linc10, Opa2b, Rmyc		19073, 1725, 5080	downstream, in gene, upstream	chr2:2962900-2971999

### H3K27Ac(活性型)が増加

log2(repeat)	Gene List	H3K27Ac up	Dist to Start	Position	Start-end
0.80	LOC10105993, Cyp2b10		1535, -13385	in gene, upstream	chr7:29851000-29917999
0.57					chr9:7452200-7453199
0.52					chr7:178800-1786199
0.51	Rah3gap1		30,226	in gene	chr11:2789700-12790099
0.44					chr9:7432100-7433399
0.44	gfl1		2,461	upstream	chr1:18235800-18236999
0.43	Phc2p1		34,027	in gene	chr5:5666700-56661599
0.42					chr19:18145200-18149399
0.42					chr11:1054800-1059199
0.42	Dm2d		54,215	in gene	chr16:4326200-4326799
0.41	Molv1, B430426.069ik		12800, 3563	downstream, in gene	chr5:8124200-8125499
0.40	Dm2d		11,885	upstream	chr19:3745200-3746799
0.39					chr16:4326800-4326799
0.39	E18471M019a		16,835	downstream, in gene	chr11:2883800-2879799
0.38					chr5:5128880-5129099
0.38	Gm1651, Oneuc1		11362, 17878	downstream	chr9:7486800-7489799
0.38	Cat		146,484	upstream, downstream	chr5:1383200-13834199
0.38	Mashpak3, Cih		-12122, 5310	in gene	chr5:107293400-107310599
0.37	Foxp1		132,246	in gene	chr6:9930200-9930999
0.37					chr9:7447800-74474799

### H3K27me3(抑制型)が減少

log2(repeat)	Gene List	H3K27me3 down	Dist to Start	Position	Start-end
-0.36	Miz1, M1		3081, -3390	downstream, upstream	chr8:9416600-94184799
-0.30	Cyp2b10		27,035	in gene	chr7:29914800-29920799
-0.34					chr6:10264300-10266199
-0.24	LOC10105993, Cyp2b10		1535, -13385	in gene, upstream	chr7:29851000-29917999
-0.23	Tc		6,299	in gene	chr5:8943400-89470799
-0.22	Hrb1, D110616189k		16200, 2000	in gene, in gene	chr16:4326200-4326999
-0.21	Seg, Gm16548, F5		19335, -4582, 5340	downstream, upstream, in gene	chr11:56417800-164166599
-0.21					chr6:1561700-1562599
-0.19	Pfwi1		58,961	in gene	chr11:19010400-19015999
-0.19	Pfwi1, Pf2a		39984, -3858	downstream, upstream	chr5:1278600-1278199
-0.19	Ppp13c		2,005	in gene	chr19:3672820-3673999
-0.19	Phf18, Gm19939		7101, -5564	in gene, upstream	chr8:5116200-5113799
-0.19	Cyp2l, Cc, Cyp21a		31600, 5667, 26538	upstream	chr10:12813800-12826199
-0.19	Mkrl1		725	upstream	chr4:16642800-1666199
-0.19	Gm19933		29,145	downstream	chr6:6934800-69383399
-0.19	Tc		135,809	in gene	chr6:8271400-82402999
-0.18	Cybb		2,438	in gene	chr6:2748320-10714099
-0.18	Cy4b		21,385	in gene	chr18:8484700-84888199
-0.18	Mifal7c-2, Mifal7b		25434, -26120	upstream, upstream	chr19:85651000-85711999
-0.18	Stewart		1,921	in gene	chr6:7951400-796399

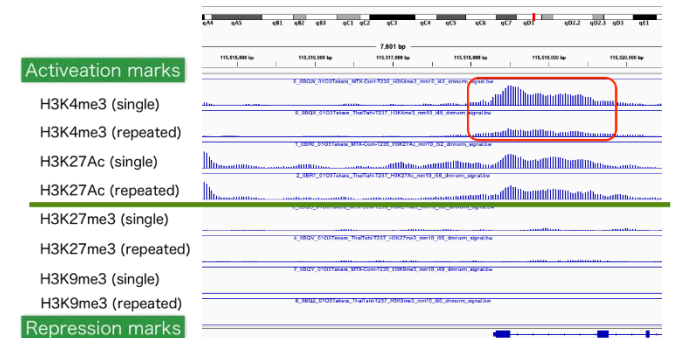
### H3K27me3(抑制型)が増加

log2(repeat)	Gene List	H3K27me3 up	Dist to Start	Position	Start-end
0.29	G30011006ik, Mcd1		13751, -11747	downstream, upstream	chr7:9073200-90745399
0.29	Eng1, Casar1b		2844, 37684	downstream, in gene	chr17:2579400-25412999
0.27	Chc1, Mcl192, Ling3, Lm7, Spp2b		22181, 8843, 8802, 6480, 19610, -19670	upstream, downstream, downstream, in gene, downstream, upstream	chr10:6281600-6284999
0.27	Ctcf1		20,057	in gene	chr7:8079700-80813799
0.27	Ser1, T700294249k		999, 13797	in gene, downstream	chr5:12957800-12958499
0.27	Prmt1, T100270496k, Spah3		1364, 23776, 33823	in gene, downstream, downstream	chr1:10214800-102023799
0.27	lpr1, LOC101059713, Maf1		57395, -13259, 19192	in gene, upstream, downstream	chr17:27186400-2712999
0.27	Cmp1		4,219	in gene	chr5:3723800-3725299
0.27	Mag1b, Cmh, 472471.019k, Lipe		50935, 2525, -9620, 28788	downstream, downstream, upstream, downstream	chr7:25361800-2537299
0.27	Gm1		6,890	upstream	chr17:2447200-2753399
0.27	Hig13, Iglon5, 49314068189k, Gm2511		26148, 724, 16639, 29248	downstream, in gene, downstream, downstream	chr7:4347400-4350699
0.27	lnc1, Emln3		32726, -1071	downstream, upstream	chr2:6099800-16092199
0.27					chr5:7931000-7941199
0.20	Ankaf10f1		303,006	downstream	chr4:14041000-140513799
0.20	Gtbf1, Hnf1b		21465, 77732	downstream, in gene	chr11:9844300-9847299
0.20					chr4:1126500-13197199
0.20	Gm1		75,505	in gene	chr17:2743400-27441399
0.20	Dmnl1, Mx199b		18005, 16839	in gene, downstream	chr2:3232400-32345199
0.20	Hnf1b		163,910	in gene	chr13:5114400-5112999
0.20	Hnf1b		1,851	in gene	chr17:1664800-16718199

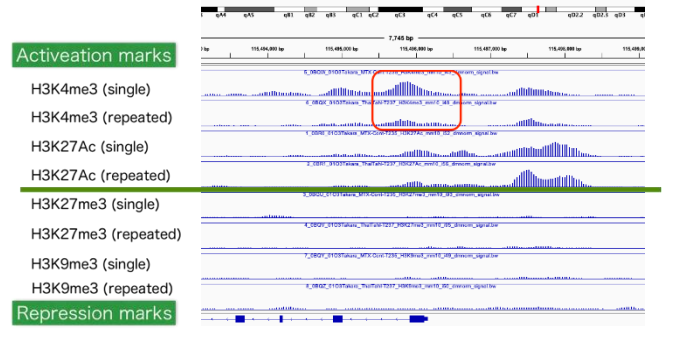
### H3K9me3(抑制型)が減少

log2(repeat)	Gene List	H3K9me3 down	Dist to Start	Position	Start-end
-0.31	Ctd8f		35,578	in gene	chr10:70133200-70172199
-0.31	Cy2f		198,792	in gene	chr6:10417800-10420099
-0.31	Prmt5		38,047	in gene	chr1:1452800-14546799
-0.30	Klhl3, Hmnpa2		-5071, 21957	upstream, downstream	chr11:5809400-58119599
-0.30	Wec2		66,792	in gene	chr8:4791400-47934199
-0.30	Hmnc1, Tk2		91486, 26559	downstream, downstream	chr16:121300-1043099
-0.29	Tbk1		45,795	downstream	chr10:12152400-12155799
-0.29	Mag3b4		45,261	in gene	chr17:1228300-12283799
-0.29	gfl1, D110118209k		24976, -11668	in gene, upstream	chr1:18235800-18236999
-0.28	Gm15263, Pcp2		4945, -25068	upstream, upstream	chr16:3634400-36381599
-0.28	Yk6, Cam2b		17141, 92849	downstream, in gene	chr11:5967600-5978199
-0.27	Cy2f		135,392	in gene	chr6:10417800-10419399
-0.27	Gp13		66,961	in gene	chr16:121300-2846199
-0.27	Prca		86,514	in gene	chr17:8625000-8628299
-0.27	Egfr, Siglec13		106023, 12769	downstream, in gene	chr18:7802700-78051799
-0.27	Wec2		21,747	in gene	chr11:444800-11463799
-0.27					chr16:3634400-36381599
-0.27	Abp2		66,918	in gene	chr5:6653800-66567199
-0.27	Ar15, A4300901179k		130491, 26593	in gene, in gene	chr13:1141400-11413099
-0.27	Prca		86,547	in gene	chr17:1664800-16718199

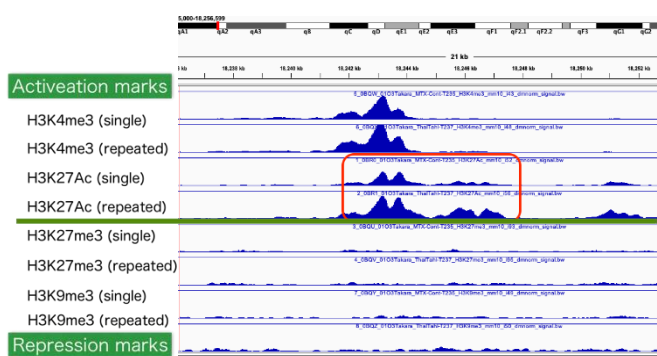
サリドマイドの反復によって、Cyp4a10 のプロモーター領域において、活性型ヒストン修飾である H3K4me3 が低下していることが明らかになった。



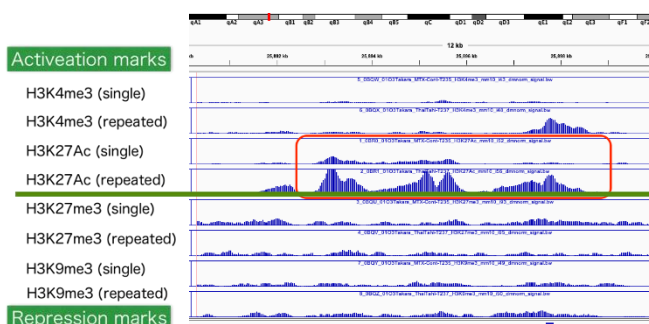
また、Cyp4a 14 のプロモーター領域においても、活性型ヒストン修飾である H3K4me3 が低下していることが明らかになった。



また、Cyp7b1 のプロモーター領域においては、活性型ヒストン修飾である H3K27Ac が増加していることが明らかになった。



さらに、Cyp2b10 のプロモーター領域においても、活性型ヒストン修飾である H3K27Ac および H3K4me3 が増加していることが明らかになった。



一方、肝臓以外の臓器のゲノム DNA のメチル化解析方法については、各種臓器よりゲノム DNA を抽出した後は、基本的には先行研究でプロトコルを確立している肝臓での全ゲノムバイサルファイト解析方法と同じと確認された。

## D. 考察

令和3年度はサリドマイドの反復曝露によるヒストン修飾解析データが得られる予定である。これにはサリドマイドの反復曝露影によるエピゲノム影響の解析といった直接的な意義だけでなく、サリドマイドの溶媒はメチルセルロース水溶液 (MC) であることから副次的な意義が認められている。即ち、先行研究において VPA の反復曝露によりグローバルな H3K9me3 の低下が見られていることから、これが溶媒影響かどうか、溶媒が同じ MC であるサリドマイドの反復曝露の解析結果から判別可能と考えられる。もしグローバルな H3K9me3 の低下が溶媒影響であった場合は、MC がよく利用される溶媒であるだけに影響が大きいと予想されるため、MC の反復曝露影響の詳細解析を速やかに実施すべく、来年度は MC の反復曝露影響について検討予定である。

さらに今年度のサリドマイド反復曝露の解析結果においては、各種薬物代謝酵素のプロモーター領域において、ヒストン修飾に大きな変動がみられた。

これは、サリドマイドという薬物により、発現が誘導および抑制され、そのままエピジェネティック修飾も固定されたのではないかと考えられる。

今後は、これらのヒストン修飾が、サリドマイドの反復を止めることで元に戻りうるのかを検証するための良い対象遺伝子となるのではないかと考えられる。

今年度は、個別の領域の解析を行ったが、ゲノムワイドには、H3K27me3 のピーク数が、サリドマイドの反復投与により 43.4% 増加していることに関して、その原因の解明を行いたい。

一方、肝臓以外の臓器のゲノム DNA のメチル化解析方法については、各種臓器よりゲノム DNA を抽出した後は、基本的には先行研究でプロトコルを確

立している肝臓での全ゲノムバイサルファイト解析方法と同じと確認されたが、サンプリング可能な臓器片の量や、臓器を構成する細胞種の多寡、細胞種ごとの存在比率やエピゲノムに関連しているであろう細胞種毎の分化状態など、組織片全体をホモジナイズして解析する際に問題となり得る要素の検討を継続する必要がある。

## E. 結論

サリドマイドの反復により、薬物代謝酵素群のプロモーター領域において、ヒストン修飾の変動が検出された。これは、発現誘導または抑制状態がエピジェネティックな変化により、固定されたとも考えられる。2年目においては、サリドマイドの反復投与により43.4%の増加が見られたH3K27me3について、変化のあった領域にどのような共通性があるのかを明らかにする必要がある。また、肝臓以外の臓器のゲノムDNAメチル化解析方法については、基本的には先行研究で実施した肝臓での解析方法と同等と確認され、次年度以降、適切な臓器を選定の上、適切に実施してゆく予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Kuwagata, M., Hasegawa, T., Takashima, H., Shimizu, M., Kitajima, S. Yamazaki, H., Pharmacokinetics of primary metabolites 5-hydroxythalidomide and 5'-hydroxythalidomide formed after oral administration of thalidomide in the rabbit, a thalidomide-sensitive species. *J Toxicol Sci.* 2021; 46: 553-560.[doi.org/10.2131/jts.46.553]
- (2) Yuhji Taquahashi, Hirokatsu Saito, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima, Development of an

inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler (pMDI) formulation for small experimental animals. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2021; 8: 169-175.[doi.org/10.2131/fts.8.169]

- (3) Toshime Igarashi, Yukuto Yasuhiko, Ryuichi Ono, Erika Tachihara, Miki Uchiyama, Atsuya Takagi, Yu Takahashi, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima, Diverse unintended on-target mutations induced by zygote genome-editing using CRISPR/Cas9 system. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2021; 8: 161-167.[doi.org/10.2131/fts.8.161]

- (4) Eiichi Yamamoto, Yuhji Taquahashi, Makiko Kuwagata, Hirokatsu Saito, Kohei Matsushita, Takeshi Toyoda, Futoshi Sato, Satoshi Kitajima, Kumiko Ogawa, Ken-ichi Izutsu, Yoshiro Saito, Yoko Hirabayashi, Yasuo Iimura, Masamitsu Honma, Haruhiro Okuda, Yukihiro Goda: Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- $\mu$ m aerosol of ciclesonide by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging. *Int J Pharmaceutics* 2021; 595: 120241.[doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120241]

### 2. 学会発表

- (1) J. Kanno, K.-I. Aisaki, R. Ono, S. Kitajima, Analysis of Murine Liver mRNA Expression, DNA Methylation, And Histone After Repeated Exposure To Chemicals. EUROTOX 2021 virtual congress、(2021.9.29)、Oral
- (2) 菅野純、北嶋聡、相崎健一、齊藤洋克、種村健太郎、肺の遺伝子発現応答と毒性機序予測解析. 第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.9)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(3) 菅野純、高木篤也、相崎健一、北嶋聡、異物発癌に関わるトランスクリプトミクス特性. 第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(4) 相崎健一、小野竜一、菅野純、北嶋聡、トランスクリプトミクスから見た発癌物質の特性. 第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(5) 齊藤洋克、北嶋聡、菅野純、種村健太郎、低用量化学物質の発生-発達期ばく露による成熟後の神経行動毒性の検出と評価－発生-発達期マウスへのネオニコチノイド系農薬ばく露影響解析を中心に－. 第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(6) 菅野純、相崎健一、小野竜一、北嶋聡、毒性OmicsとAIによる慢性毒性予測. 第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.7)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(7) 夏目やよい、相崎健一、北嶋聡、Samik GHOSH、北野宏明、水口賢司、菅野純：PPAR $\alpha$  リガンドの比較毒性オミクス. 第48回日本毒性学会学術年会、(2021.7.7)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

(8) J. KANNO, K. AISAKI, R. ONO, S. KITAJIMA, Comprehensive Histone, DNA Methylation and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposed to Chemicals. CTDC11, (2021.6.15), Virtual, Oral

(9) Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Ryuichi Ono and Satoshi Kitajima, Application of PERCELLOME database as a part of big data to toxicological research: The 36th

Annual Meeting of KSOT/KEMS, Special lecture, Web, Oral presentation.

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし