

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4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。

化学物質の反復投与においては、溶媒も反復投与される訳で、溶媒の反復影響によるエピジェネティック変化を考慮する必要があることから、令和4年度研究においては、メチルセルロース 14 日間反復曝露およびメチルセルロース単回曝露のエピゲノム解析を行った。その結果、サリドマイドの反復投与で検出されたエピジェネティック変化の多くが、溶媒影響によるものであることが明らかになった。しかしながら、一部においてはサリドマイドの反復曝露影響によるものであると想定される結果を得た。

(*) 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、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)

【令和3年度研究対象サンプル】

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

【令和4年度研究対象サンプル】

溶媒 (0.5%メチルセルロース水溶液) 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

上記サンプル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 μ g) を材料として、1) 4 μ l (30 μ 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 μ l (30 μ 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 μ l (30 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)、4) 5 μ l (30 μ 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ー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ーを利用し、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 μ g) 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(repeat) | Gene List H3K4me3 down | Dist to Start | Position | Start-end |
|--------------|---------------------------|-------------------|--------------------------------|---------------------------|
| -0.28 | Eg1 | 1,843 | upstream | chr4:41218600-4122299 |
| -0.27 | Cad4 | 2,844 | in gene | chr5:10217600-10219799 |
| -0.25 | Lnc1 | 35,768 | in gene | chr5:14643000-14643799 |
| -0.25 | Cyp4a10 | 1,286 | upstream | chr4:15513000-15520799 |
| -0.20 | | | | chr7:14540000-14550399 |
| -0.19 | | | | chr6:11724000-11730999 |
| -0.19 | Page9 | 6,382 | downstream | chr9:9544800-95451799 |
| -0.18 | Scn5b | 52,296 | in gene | chr4:65718000-65723799 |
| -0.18 | Cyp4a14 | 942 | in gene | chr4:15443000-15449399 |
| -0.16 | Ctcf | 37,122 | in gene | chr5:15272000-15276399 |
| -0.16 | Lnc1, Vpfl1 | 4844, -12064 | in gene, upstream | chr4:10726000-10730799 |
| -0.17 | Esp9 | 209,338 | downstream | chr1:11717000-11744099 |
| -0.17 | Eg1 | 24,493 | in gene | chr7:14478000-14478599 |
| -0.17 | Ctcf | 3,304 | in gene | chr1:110137000-1101381799 |
| -0.17 | Tord1, LOC101059948, Nph2 | 1951, 2033, -5436 | upstream, downstream, upstream | chr1:15627200-15631399 |
| -0.17 | Gabb2 | 36,015 | in gene | chr4:46947000-46952799 |
| -0.17 | | | | chr4:76823000-76831799 |
| -0.16 | | | | chr5:53182000-53187399 |
| -0.16 | Slk2c1 | 62,406 | in gene | chr7:139118400-13918399 |
| -0.16 | | | | chr6:49014800-49019199 |

H3K27me3(抑制型)が増加

| log2(repeat) | Gene List H3K27me3 up | Dist to Start | Position | Start-end |
|--------------|--|--|---|---------------------------|
| 0.28 | G3001, I006Rk, Mtd1 | 13751, -11747 | downstream, upstream | chr7:90737200-90745399 |
| 0.23 | Tp53, Cacna2h3 | 29646, 37584 | downstream, in gene | chr7:25379400-25412999 |
| 0.23 | Ucn3, Ucn1, Mir1882, Linc93, Lam7, Sppl2 | 21201, 8943, 6802, 8440, 19610, -19676 | upstream, downstream, downstream, in gene, downstream, upstream | chr10:80221200-80249399 |
| 0.22 | Egr1 | 20,057 | in gene | chr7:90797200-90811799 |
| 0.21 | Sact1, T000345249a | 999, 13797 | in gene, downstream | chr6:112557000-11259499 |
| 0.21 | Frrm1, T100023908a, T3gn3b2 | 13841, 2379, 33033 | in gene, downstream, downstream | chr1:101164000-101637799 |
| 0.21 | Lnc1, LOC101059715, Mtd1 | 9339, -13259, 18192 | in gene, upstream, downstream | chr1:27106400-27122999 |
| 0.21 | Cmp1 | 4,219 | in gene | chr6:37238600-37252999 |
| 0.21 | Mafk1, Ctrn, 473247101Ra, Lipe | 50035, 2625, 9620, 28788 | downstream, downstream, upstream, downstream | chr7:251831000-25187399 |
| 0.21 | Gme5 | 6,999 | upstream | chr7:21497200-21523999 |
| 0.21 | Vsig10, Igfbp5, 4931400818Rk, Gm2511 | 26148, 724, 16639, 29248 | downstream, in gene, downstream, downstream | chr7:43472000-43505999 |
| 0.21 | Linc3, Emln3 | 32729, -1071 | downstream, upstream | chr2:160903000-160923199 |
| 0.21 | | | | chr15:7913000-7941199 |
| 0.21 | Argef20 | 203,206 | downstream | chr4:420412000-420451799 |
| 0.21 | Gab1, Nr3f3 | 21465, 77732 | downstream, in gene | chr11:98484000-98472999 |
| 0.20 | | | | chr4:131355200-131371199 |
| 0.20 | Gme1 | 75,505 | in gene | chr1:72142000-72443999 |
| 0.20 | Dnm1, Mir19b | 18005, 16839 | in gene, downstream | chr2:32324000-32345199 |
| 0.20 | Ror2 | 163,910 | in gene | chr7:1353114000-135329999 |
| 0.20 | Sn2 | 1,659 | in gene | chr7:85648000-85704999 |

H3K4me3(活性型)が増加

| log2(repeat) | Gene List H3K4me3 up | Dist to Start | Position | Start-end |
|--------------|----------------------|---------------|---------------------|--------------------------|
| 0.39 | | | | chr19:38383000-38371199 |
| 0.38 | Esmc1 | 4,009 | upstream | chr2:281017800-8193799 |
| 0.33 | Linc1 | 3,971 | in gene | chr2:10517600-10519399 |
| 0.33 | L101059298a, Mtd2 | 10744, 579 | downstream | chr9:93386000-93373799 |
| 0.30 | Cas3b | 3,644 | in gene | chr6:105074000-105098399 |
| 0.30 | Mtd1a | 13,989 | downstream | chr6:2272000-22721799 |
| 0.30 | Dnb3d | 11,885 | upstream | chr4:43228000-43242799 |
| 0.29 | Gm18551, Oneuc1 | 31362, 17878 | downstream, in gene | chr9:74868000-74887799 |
| 0.29 | Acar2 | 25,452 | in gene | chr4:493812000-49384399 |
| 0.29 | Snc1a4 | 16,278 | upstream | chr6:11846000-14180799 |
| 0.29 | Hcd33 | 5,229 | in gene | chr3:98758000-98765199 |
| 0.29 | Aqpl, Dscc2 | 2905, 35250 | in gene, downstream | chr7:123461000-123487799 |
| 0.29 | | | | chr1:2294000-23917799 |
| 0.28 | Pink1, P18013A23Rk | 52445, 13391 | in gene, downstream | chr7:128277000-28292799 |
| 0.28 | Ar15 | 292,791 | in gene | chr1:14480400-14492199 |
| 0.27 | Cyp4a19 | 4,386 | upstream | chr9:3977000-3929399 |
| 0.27 | Cecl5 | 15,846 | in gene | chr4:18144000-181460799 |
| 0.27 | Serpina3k | 3,213 | in gene | chr1:104342000-104349199 |
| 0.26 | Zfp70, Tmem131 | 18938, 157828 | in gene, downstream | chr1:36780200-36783199 |
| 0.26 | | | | chr1:3946000-3931299 |

H3K9me3(抑制型)が減少

| log2(repeat) | Gene List H3K9me3 down | Dist to Start | Position | Start-end |
|--------------|------------------------|---------------|------------------------|---------------------------|
| -0.31 | Cad6 | 95,578 | in gene | chr10:70133200-70172199 |
| -0.31 | Cyp12 | 108,792 | in gene | chr6:116617800-116620599 |
| -0.31 | Esmc1 | 96,047 | in gene | chr1:11206200-11647799 |
| -0.30 | Kln3, Hmnp4b | 5071, 21057 | upstream, downstream | chr7:35809500-35811799 |
| -0.30 | Wuc2 | 66,752 | in gene | chr6:47913400-47934199 |
| -0.30 | Esm11, Taz | 93486, 26599 | downstream, downstream | chr6:104718000-104209399 |
| -0.29 | Tsbl | 45,795 | downstream | chr10:121524000-121557799 |
| -0.29 | Map3a1 | 45,261 | in gene | chr1:12263000-12287799 |
| -0.29 | Cad6, T10010820Rk | 99876, -1468 | in gene, upstream | chr10:70188000-70200199 |
| -0.29 | Gm13053, Png4b | 4249, 10568 | upstream, upstream | chr9:95364600-95361099 |
| -0.28 | Yaf1, Cank2b | 17141, 9248 | downstream, in gene | chr1:15947600-50719199 |
| -0.27 | Cyp12 | 135,392 | in gene | chr6:116578000-116615399 |
| -0.27 | Esm119 | 96,047 | in gene | chr1:79431800-20445199 |
| -0.27 | Pfice | 88,514 | in gene | chr1:78625000-96283999 |
| -0.27 | Egfr5, Siglec15 | 106802, 12769 | downstream, in gene | chr18:76037200-76051799 |
| -0.27 | Wwox | 21,747 | in gene | chr1:14459000-14463799 |
| -0.27 | | | | chr6:60063000-90120799 |
| -0.27 | Apo2b | 66,918 | in gene | chr6:6653600-66567199 |
| -0.27 | Ar15, A300901, F1Rk | 330491, 26593 | in gene, in gene | chr1:311414000-134139999 |
| -0.27 | Wwox | 699,447 | in gene | chr8:11508000-115118199 |

H3K27Ac(活性型)が減少

| log2(repeat) | Gene List H3K27Ac down | Dist to Start | Position | Start-end |
|--------------|------------------------|---------------------|-------------------------------|-------------------------|
| -0.44 | Cad4 | 2,844 | in gene | chr5:10217600-10219799 |
| -0.40 | Tnd1 | 14,351 | downstream | chr6:2889400-28899399 |
| -0.39 | | | | chr12:10516000-10514599 |
| -0.38 | Page9 | 6,382 | downstream | chr9:9544800-95451799 |
| -0.38 | Tnd1 | 254,201 | in gene | chr6:2878800-2879399 |
| -0.38 | Kanad2, Dcc6b | 4793, 47936 | upstream, in gene | chr9:1021000-1280999 |
| -0.34 | Lnc1 | 35,768 | in gene | chr5:14643000-14643799 |
| -0.34 | | | | chr7:14540000-14550399 |
| -0.34 | | | | chr4:76815000-76814399 |
| -0.32 | Hmnr1, Hsp1 | 129316, 2938 | downstream, in gene | chr9:942000-20411199 |
| -0.31 | | | | chr4:11728000-11730999 |
| -0.31 | Ccl5a1 | 34,967 | in gene | chr4:7278000-72747399 |
| -0.30 | | | | chr4:76823000-76831799 |
| -0.30 | Hnh2b, Cks1, Fam32a | 18931, 6938, -13983 | downstream, in gene, upstream | chr6:7198400-7221399 |
| -0.30 | Ragap1 | 117,679 | in gene | chr2:29734000-29740799 |
| -0.30 | Esm114 | 257,859 | in gene | chr7:7474800-5764199 |
| -0.30 | L101059298a, Snc1a4 | 20100, 39327 | downstream, in gene | chr4:43228000-43242799 |
| -0.30 | AW548542 | 3,759 | in gene | chr5:19517000-19582199 |
| -0.29 | Gabb2 | 122,115 | in gene | chr4:46884000-46872999 |
| -0.29 | | | | chr1:39003000-39005199 |

H3K9me3(抑制型)が増加

| log2(repeat) | Gene List H3K9me3 | Dist to Start | Position | Start-end |
|--------------|-----------------------------------|----------------------------------|--|--------------------------|
| 0.24 | Serpina3k | 3,213 | in gene | chr1:104342000-104349199 |
| 0.24 | Egfr, E20015159Rk | 58496, 20003 | in gene, downstream | chr1:116779000-16844399 |
| 0.23 | Lnc1, G50011006Rk | 29646, -1982 | in gene, upstream | chr7:25379400-25412999 |
| 0.23 | Cas3b | 3,644 | in gene | chr6:105074000-105098399 |
| 0.21 | Dnao1 | 27 | upstream | chr7:26501000-26511199 |
| 0.21 | Tnc1a4 | 43,927 | in gene | chr6:38637800-38646999 |
| 0.20 | Krt11, Hhex | 63696, 3258 | downstream, in gene | chr19:37431000-37443999 |
| 0.19 | Cyp7h1 | 2,461 | upstream | chr1:1823500-1825699 |
| 0.19 | Cyp24a4 | 1,214 | in gene | chr19:4064400-40077199 |
| 0.19 | Aif1 | 74,318 | in gene | chr1:1821000-1821799 |
| 0.18 | Gm18551, Oneuc1 | 31362, 17878 | downstream, in gene | chr9:74868000-74887799 |
| 0.18 | Axah1, Efm3p3, Sm1, Aph3, Slc35a4 | 103196, 281, 6512, 15567, -15416 | downstream, upstream, downstream, downstream, upstream | chr18:36655200-36672999 |
| 0.18 | Ftad4 | 92,329 | in gene | chr10:2565800-10205199 |
| 0.18 | L101059298a | 1,082 | in gene | chr1:93551800-93560599 |
| 0.18 | G3001, I006Rk, Mtd1 | 13751, -11747 | downstream, upstream | chr7:90737200-90745399 |
| 0.18 | Gpm3 | 8,191 | in gene | chr6:9408000-50427199 |
| 0.18 | | | | chr12:185000-1185799 |
| 0.17 | Igf1, Gm1984 | 36343, 1742 | in gene, in gene | chr10:8783300-8793999 |
| 0.17 | Nr12, Mtd1 | 10429, 57461 | in gene, downstream | chr18:3827200-38297799 |
| 0.17 | Lnc10, Dcp1a, Bmyc | 19073, 1725, 4680 | downstream, in gene, upstream | chr2:2564200-2571999 |

H3K27Ac(活性型)が増加

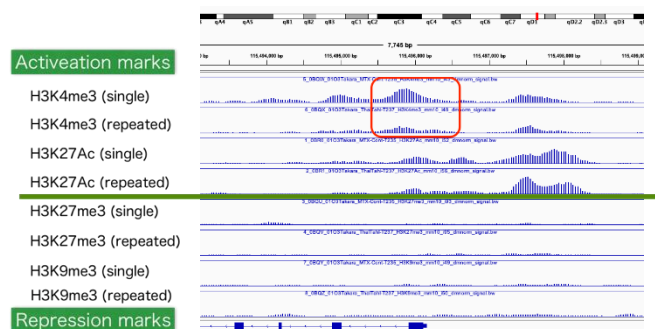
| log2(repeat) | Gene List H3K27Ac up | Dist to Start | Position | Start-end |
|--------------|-----------------------|---------------|----------------------|--------------------------|
| 0.80 | LOC101059993, Cyp2b10 | 1335, -13365 | in gene, upstream | chr7:25851000-25917999 |
| 0.57 | | | | chr9:7432200-7433199 |
| 0.52 | | | | chr6:10294300-10291999 |
| 0.51 | Rah3gap1 | 30,226 | in gene | chr1:127897000-127900999 |
| 0.44 | | | | chr9:7432100-7433399 |
| 0.43 | Phy2h1 | 3,461 | in gene | chr5:1823500-1825699 |
| 0.43 | Phy2h1 | 34,027 | in gene | chr5:16667000-16615599 |
| 0.42 | | | | chr19:18143200-18149399 |
| 0.42 | | | | chr1:10586000-10592199 |
| 0.42 | Dnb3d | 11,885 | in gene | chr4:4322800-43242799 |
| 0.41 | Mchr1, 843042806Rk | 12800, 3563 | downstream, in gene | chr13:81242000-81243999 |
| 0.40 | | | | chr19:37432000-37447199 |
| 0.40 | Dnb3d | 11,885 | in gene | chr4:43228000-43242799 |
| 0.39 | 2615471Mtd1Rk | 16,835 | downstream, in gene | chr1:28653000-28707999 |
| 0.39 | | | | chr5:11283000-51290999 |
| 0.39 | Gm18551, Oneuc1 | 31362, 17878 | downstream | chr9:74868000-74887799 |
| 0.38 | Lvt1 | 146,484 | upstream, downstream | chr5:153139200-53204199 |
| 0.38 | Mapkap3, Cln3 | 13122, 5310 | in gene | chr5:10728400-107310599 |
| 0.37 | Foxp1 | 132,246 | in gene | chr6:9930200-9930999 |
| 0.37 | | | | chr6:7481000-7481799 |

H3K27me3(抑制型)が減少

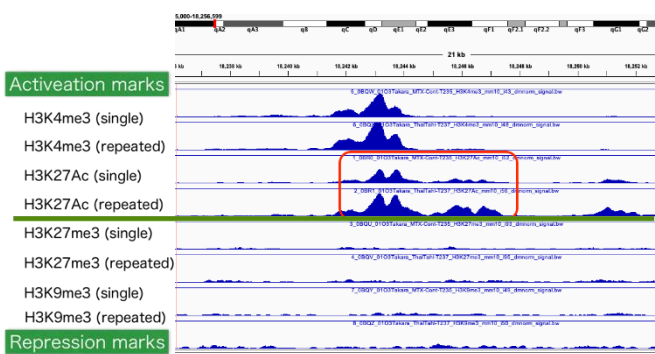
| log2(repeat) | Gene List H3K27me3 down | Dist to Start | Position | Start-end |
|--------------|-------------------------|--------------------|---------------------------------|--------------------------|
| -0.36 | Mtd1, Mtd1 | 1081, -3390 | downstream, upstream | chr8:9416800-9418799 |
| -0.36 | Cyp4a10 | 27,095 | in gene | chr7:25974000-25980799 |
| -0.34 | | | | chr4:10294300-10291999 |
| -0.24 | LOC101059993, Cyp2b10 | 1335, -13365 | in gene, upstream | chr7:25851000-25917999 |
| -0.23 | Gc | 5,299 | in gene | chr5:80434000-80472999 |
| -0.22 | Hh3, T10061718Rk | 19209, 2090 | in gene, in gene | chr4:1521000-15240999 |
| -0.21 | Sep, Gm16548, F5 | 41935, -4582, 5340 | downstream, upstream, in gene | chr1:16417800-164166599 |
| -0.21 | | | | chr6:15617000-15625399 |
| -0.19 | Pnc1 | 18,981 | in gene | chr7:16074000-16081999 |
| -0.19 | P2w1, P2w4 | 59985, 3658 | downstream, upstream | chr5:12295400-122712199 |
| -0.19 | Ppp13c | 1,005 | in gene | chr1:36728200-36739999 |
| -0.19 | Mt1k, Gm19939 | 7101, -5584 | in gene, upstream | chr1:5116300-5113799 |
| -0.19 | Cyp1, Cc, Cc101a | 19204, 5667, 26538 | downstream, in gene, downstream | chr10:28133000-12823199 |
| -0.19 | Mtd1 | 725 | upstream | chr1:16642800-16641999 |
| -0.19 | Gm18033 | 29,145 | downstream | chr6:6934900-6938399 |
| -0.19 | Hh3 | 115,669 | in gene | chr6:3736000-6824999 |
| -0.19 | Cybb5 | 2,438 | in gene | chr6:107145200-107160999 |
| -0.18 | Cybb5 | 21,385 | in gene | chr18:84847400-84888199 |
| -0.18 | Mtd17c-2, Mtd17b | 25434, 26120 | upstream, upstream | chr1:58451000-8711399 |
| -0.18 | Stewart | 2,927 | in gene | chr5:7651400-7663999 |

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

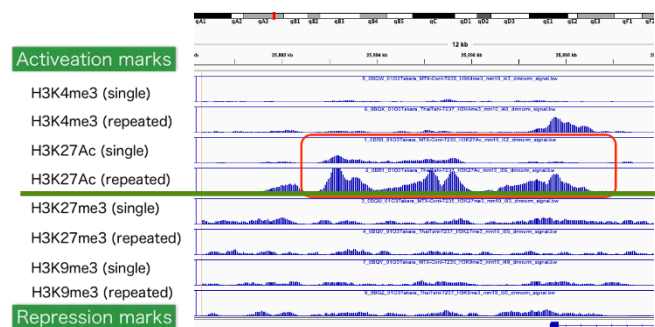
また、Cyp4a 14 のプロモーター領域においても、活性型ヒストン修飾である H3K4me3 が低下していることが明らかになった。



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ー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。

令和 4 年度においては、新たに 0.5%メチルセルロース水溶液を 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 μ g) を材料として、ヒストン修飾の解析を行なった。

これは、0.5%メチルセルロース水溶液の反復投与により、ヒストン修飾が影響を受けるかどうかを明らかにすること、すなわち、溶媒影響があるのかを検証する目的で行なっている。

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)、

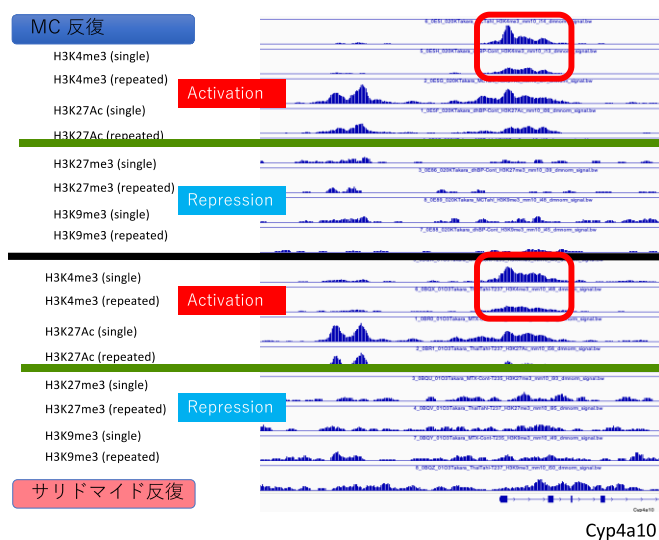
抗 H3K4me3 抗体 (17, 205、18, 566)、
 抗 H3K27Ac 抗体 (24, 329、27, 259)、
 抗 H3K27me3 抗体 (20, 289、22, 147)、
 抗 H3K9me3 抗体 (18, 961、22, 803)、

となっている。この内、特に H3K9me3 のピーク数が 22, 803 から 18, 961 へ、26.8% 減少しており、溶媒である 0.5%メチルセルロース水溶液の反復投与によって H3K9me3 が減少することが明らかになった (その他は、H3K4me3:7.3% 減少、H3K27Ac: 10.7% 減少、H3K27me3: 8.3% 減少)。したがって VPA の反復投与で見られた H3K9me3 のグローバルな抑制は、0.5%メチルセルロース水溶液の反復投与が原因である可能

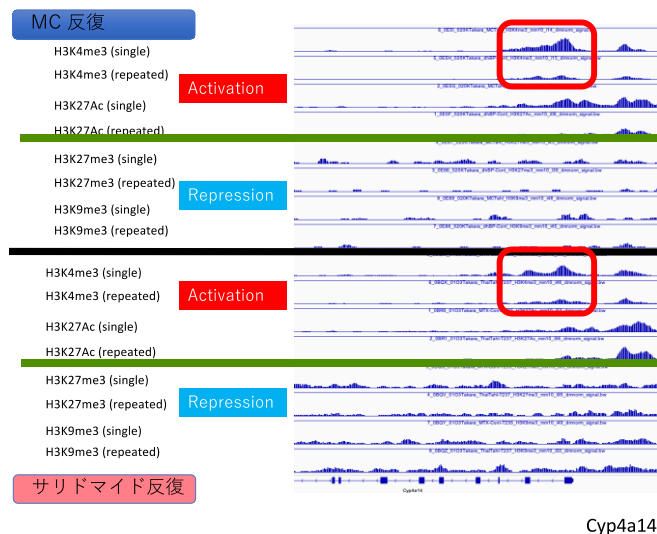
性がある。

令和3年度研究においては、サリドマイドの反復投与において、多くの薬物代謝酵素の制御領域のヒストン修飾に変化が確認されたが、その多くが溶媒影響である可能性が明らかになった。個別のデータを以下に示す。

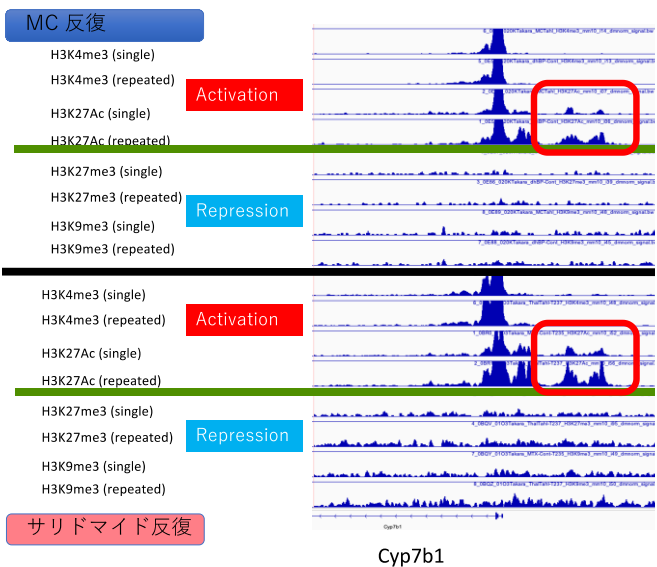
サリドマイドの反復によって、Cyp4a10のプロモーター領域において、活性型ヒストン修飾であるH3K4me3が低下していたが、溶媒の反復投与でも低下していることが明らかとなった。



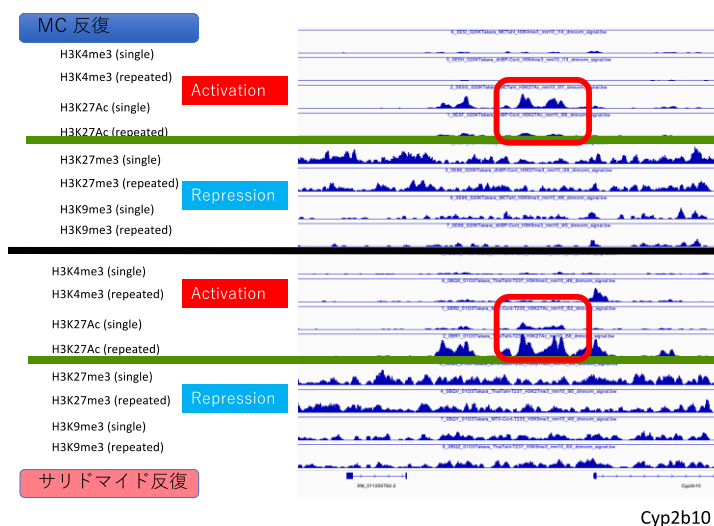
また、サリドマイドの反復によって、Cyp4a14のプロモーター領域においても、活性型ヒストン修飾であるH3K4me3が低下していたが、溶媒の反復投与でも低下していることが明らかとなった。



また、サリドマイドの反復によって、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が増加していたが、溶媒の反復投与でも低下していることが明らかとなった。



Cyp2b10 のプロモーター領域においては、サリドマイドの反復によって活性型ヒストン修飾である H3K27Ac および H3K4me3 が増加していたが、溶媒の反復投与とは、逆の相関を示すことが明らかとなった。



D. 考察

令和3年度研究において、サリドマイドの反復曝露によるヒストン修飾解析を行い、薬物代謝酵素の制御領域の多くで変化が見られていた。令和4年度においては、その変化が本当にサリドマイドの反復曝露による影響なのか、それとも溶媒の反復曝露による影響なのかを検証するために、サリドマイドの溶媒であるメチルセルロース水溶液 (MC) の反復曝露影響の解析を行った。

今年度の解析結果からは、メチルセルロース水溶液 (MC) の反復曝露による溶媒影響があることが想定される。

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ていたが、多くは溶媒影響の可能性はある。しかしながら、Cyp2b10 に関しては、溶媒影響ではないと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Takahiro Sasaki, Hirokatsu Saito, Yusuke Furukawa, Takashi Tominaga, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Kentaro Tanemura: Exposure to bisphenol A or its phenolic analogs during early life induces different types of anxiety-like behaviors after maturity in male mice. *J. Toxicol. Sci.* 2023; 48(4): 211-219. [doi.org/10.2131/jts.48.211]
- (2) Satoshi Yokota, Hidenobu Miyaso, Toshinori Hirai, Kousuke Suga, Tomohiko Wakayama, Yuhji Taquahashi and Satoshi Kitajima: Development of a non-invasive method for testicular toxicity evaluation using a novel compact magnetic resonance imaging system. *J Toxicol Sci.* 2023; 48(2): 57-64. [doi.org/10.2131/jts.48.57]
- (3) Seiya Kanno, Yusuke Okubo, Tatsuto Kageyama, Lei Yan, Satoshi Kitajima, Junji Fukuda: Establishment of a Developmental Toxicity Assay based on Human iPSC Reporter to Detect Fibroblast Growth Factor Signal Disruption. *iScience.* 2022; 25(2): 103770. [doi.org/10.1016/j.isci.2022.103770]

④ Aisaki KI, Ono R, Kanno J, Kitajima S. [Percellome Project: research on molecular mechanisms of toxicological responses based on transcriptomics and epigenetics]. Nihon Yakurigaku Zasshi. 2022;157(3):200-206. [doi.org/10.1254/fpj.21122] (Japanese).

(5) Yuhji Taquahashi, Shuji Tsuruoka, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Kousuke Suga, Ken-ich Aisaki, Satoshi Kitajima: A novel high-purity carbon-nanotube yarn electrode used to obtain biopotential measurements in small animals: flexible, wearable, less invasive, and gel-free operation. Fundam. Toxicol. Sci. 2022; 9: 17-21. [doi.org/10.2131/fts.9.17]

(6) Shihori Tanabe, Sabina Quader, Ryuichi Ono, Horacio Cabral, Kazuhiko Aoyagi, Akihiko Hirose, Hiroshi Yokozaki, Hiroki Sasaki: Molecular network analysis of RNA viral infection pathway in diffuse- and intestinal-type gastric cancer Fundamental Toxicological Sciences 2022; 9 (2): 37-46. [doi.org/10.2131/fts.9.37]

(7) Shihori Tanabe, Sabina Quader, Ryuichi Ono, Horacio Cabral, Kazuhiko Aoyagi, Akihiko Hirose, Edward J. Perkins, Hiroshi Yokozaki and Hiroki Sasaki: Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition Pathway and Artificial Intelligence-Based Modeling for Pathway Activity Prediction. Onco 2023, 3(1), 13-25. [doi.org/10.3390/onco3010002]

2. 学会発表

(1) 相崎健一、小野竜一、菅野 純、北嶋 聡: Percellome プロジェクト ～トランスクリプトミクスとエピジェネティクス、インフォマティクスによる毒性分子機序の探求～、第 96 回日本薬理学会年会、(2022.12.2)、横浜

(2) 高橋祐次、鶴岡秀志、大久保佑介、種村健太郎、相崎健一、北嶋 聡: バイタルサインの統合的評価をエンドポイントとした急性毒性試験の近代化、第 96 回日本薬理学会年会、(2022.12.2)、横浜

(3) 小野 竜一、田埜 慶子、安田 智、佐藤 陽治、内田 恵理子、平林 容子、北嶋 聡 ゲノム編集技術を利用した際の、オンターゲット部位における非意図配列の挿入と、その検出方法の確立 日本食品衛生学会第 118 回学術講演会 2022. 11. 11 長崎 (口頭発表)

④ J. Kanno, K.-I. Aisaki, R. Ono, S. Kitajima: Histone Modification, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposure to a Chemical. The XVITH International Congress of Toxicology (ICT2022), (2022.9.19), Maastricht, The Netherlands Oral.

⑤ 菅野純、相崎健一、小野竜一、北嶋 聡 Percellome project からみた毒性 AI の展望. 第 49 回日本毒性学会学術年会、(2022.7.2)、札幌コンベンションセンター、シンポジウム、口演.

(6) 五十嵐智女、藤井咲子、釣本真理子、高橋祐次、北嶋 聡、栗形麻樹子: ビスフェノール類似体 4,4'-(1,3-dimethylbutylidene)diphenol の卵巣摘出マウスにおける皮下および経口投与による子宮肥大試験、第 49 回日本毒性学会学術

年会 (2022.7.2)

- (7) 五十嵐智女、松村万里、小川いづみ、矢川千織、早川孝彦、越智美代子、齊藤 洋克、栗形麻樹子、北嶋 聡:「新規の食品」の安全性を確保するための諸外国の制度比較 第49回日本毒性学会学術年会(2022.7.1)
- (8) 齊藤洋克、種村健太郎、菅野純、北嶋聡:アセフェート単回経口投与による雄マウスの情動認知行動解析—化学物質曝露影響から考える神経発達障害—第49回日本毒性学会学術年会、(2022.7.1)、札幌コンベンションセンター、シンポジウム、口演.
- (9) 大久保佑亮、菅野聖世、北嶋 聡、平林容子、福田淳二:ヒト iPS 細胞を用いたシグナル伝達かく乱作用のダイナミクスに基づく高精度かつ網羅的ヒト発生毒性試験法の開発、第49回日本毒性学会学術年会(2022.7.1)
- ⑩ 菅野純、相崎健一、小野竜一、北嶋 聡 新型反復曝露トランスクリプトミクスから見た発癌エピジェネティクスの考察. 第49回日本毒性学会学術年会、(2022.6.30)、札幌コンベンションセンター、シンポジウム、口演.
- (11) 高橋祐次、鶴岡秀志、大久保佑亮、相崎健一、北嶋 聡: バイタルサインの統合的評価による急性毒性試験の致死性予測 第49回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30)
- (12) 小野竜一、山本 雄介、成瀬 美衣、田邊 思帆里、吉岡 祐亮、相崎 健一、広瀬 明彦、落谷 孝広、平林 容子、北嶋 聡 cfDNA による毒性評価 第49回日本毒性学会学術年会(2022.6.29.) 札幌コンベンションセンター、シンポジウム、口演.

- (13) Ryuichi Ono. Horizontal Gene transfer mediated by exosomes: a possible new risk for genome editing. International Congress of Toxicology, Maastricht, October, 2022 (口頭発表; シンポジウムオーガナイザー)
- (14) 小野 竜一、田埜 慶子、安田 智、佐藤 陽治、内田 恵理子、平林 容子、北嶋 聡 ゲノム編集技術を利用した際の、オンターゲット部位における非意図配列の挿入と、その検出方法の確立 日本食品衛生学会第118回学術講演会 2022.11.11 長崎 (口頭発表)
- (15) Ryuichi Ono. Toxicity Concerns of Exosome Products. American College of Toxicology, Denver, Novembr, 2022 (invited)
- ⑪ J. Kanno, K. Aisaki, R. Ono, and S. Kitajima: Comprehensive Histone, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposed to Chemicals: Percellome Project 2022 Update. Society of Toxicology (SOT) 61st Annual Meeting (SOT2022), (2022.3.30), San Diego, USA, Poster.

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