

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5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年度には、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実施、令和4年度研究においては、溶媒の反復影響によるエピジェネティック変化を評価すべく、メチルセルロース14日間反復曝露のヒストン修飾解析を行って、サリドマイドの反復投与で検出されたヒストン修飾の変化の多くが、溶媒影響によるものであることを示した。令和5年度も追加解析を行い、昨年度発見した Cyp 遺伝子群での変化だけでなく、Car 遺伝子群など、他の遺伝子領域においても顕著な変化が見られた。さらに、サリドマイド影

響の可逆性検討のため、サリドマイド 14 日間反復曝露、15 日目から 14 日間無処置、29 日目サリドマイド 4 用量単回曝露の実験を実施したところ、サリドマイドの明らかなエピジェネティクス影響は、休薬することで、元に戻る事が明らかになった。

(*) 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曝露し、遺伝子発現測定直前の曝露時に、溶媒群、低用量群、中用量群、高用量群に分けて最終曝露を一回行う。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 5 年度は、サリドマイド影響の可逆性検討のため、サリドマイド (700mg/kg) を 14 日間反復投与した後、15 日目から 14 日間無処置、29 日目に溶媒 (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 時間後のマウス肝を用いてヒストン修飾解析を実施している。

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

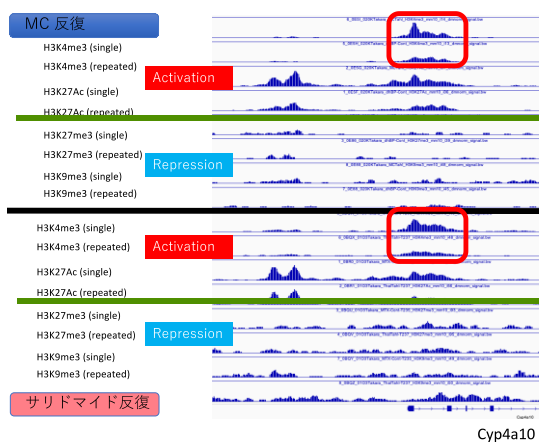
spike in として添加されている。ChIP 後の DNA は、それぞれの抗体に対する既知の陽性コントロールおよび陰性コントロールを qPCR により定量し、そのクロマチン免疫沈降の有効性の定量を行う。

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。

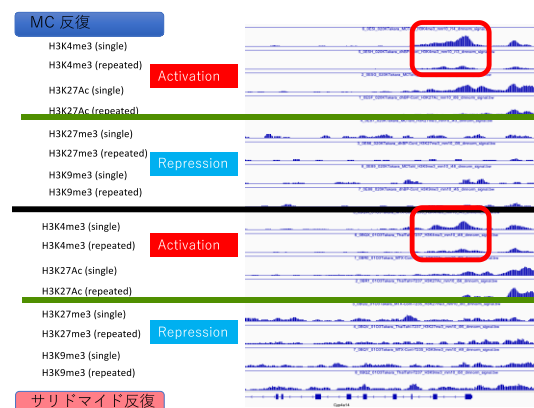
C. 研究結果

令和 4 年度に測定したメチルセルロース (MC) 14 日間反復曝露および MC 単回曝露のエピゲノム解析の追加解析を行なった。昨年度、多くの Cyp 遺伝子群が MC の反復投与により、そのエピジェネティック状態に変化が生じることを報告していた(下図)。

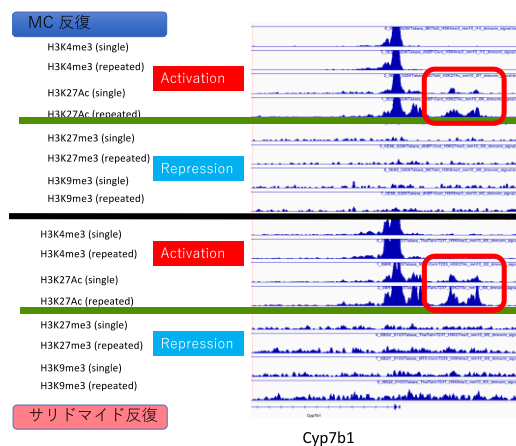
Cyp4a10



Cyp4a14



Cyp7b1



探索範囲を拡大したところ、その他の遺伝子領域においても顕著な変化が見られた。中でも Car (carbonic anhydrase) 遺伝子群に関連した H3K27Ac が、大きな領域において、MC の反復投与により増加していることがわかったが、サリドマイドの反復投与 (令和 3 年度に測定) においては増加していないことが判明した。

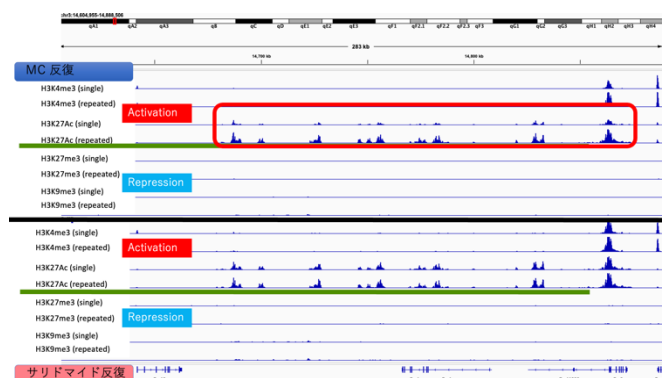
エピジェネティックな状態の変化がこのようにクラスターを形成し、大きな領域で制御されていることから、インスレーターのような制御が存在している可能性がある。

一方、多臓器ゲノム DNA メチル化解析については、肝、肺、腎、海馬の臓器サンプルを採取し、全ゲノムバイサルファイト解析に代わり、より効率が良いとされる全ゲノムメチル解析（酵素法、EM-Seq）を採用して実施した。従来法であるバイサルファイト法で得たデータと比較した結果、一般的な EM-Seq の評価通り、より高精度のデータであることを確認した。

D. 考察

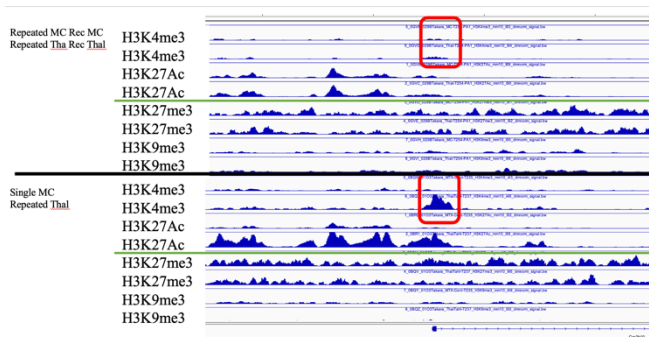
令和 3 年度研究において、サリドマイドの反復曝露によるヒストン修飾解析を行い、薬物代謝酵素の制御領域の多くで変化を捉えていたが、その変化が本当にサリドマイドの反復曝露による影響なのか、それとも溶媒の反復曝露による影響なのかを検証するために、令和 4 年度は、溶媒として使用しているメチルセルロース水溶液（MC）の反復曝露影響の解析を行った。その結果、メチルセルロース水溶液（MC）の反復曝露による溶媒影響が存在することが想定されていたが、昨年度発見した *Cyp* 遺伝子群だけでなく、今年度は *Car* 遺伝子群への影響を確認した。さらに、サリドマイドの反復投与により誘導および抑制された H3K4me3 が、休薬によって元に戻る領域もあることがわかった。同様のばく露実験が幼若動物に行われていたのなら、サリドマイドの休薬によって元に戻ったエピジェネティクス影響がそのまま維持される可能性もあると考えられる。

一方、肝以外の臓器のゲノム DNA メチル化解析については、解剖手順や実験条件を最適化し、Perccellome データベースに収録されている多くのトランスクリプトームデータに対応すべく、肝臓に加えて、肺、海馬、腎の正常組織をサンプリングし、受託機関にて EM-Seq(酵素法)を実施した。これによって、肝だけでなく、肺、海馬、腎においても良質なゲノム DNA メチル化のリファレンスデータが

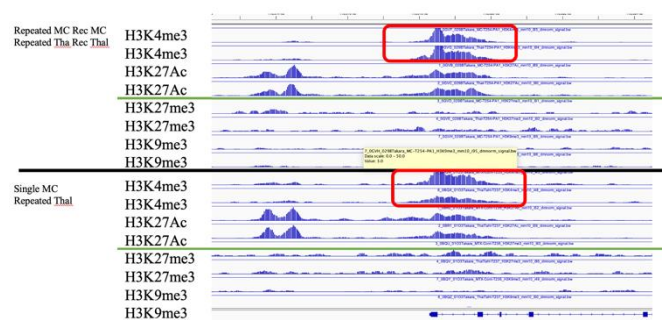


令和 5 年度は、サリドマイド影響の可逆性検討のため、サリドマイド 14 日間反復曝露、15 日目から 14 日間無処置、29 日目サリドマイド 4 用量単回曝露の実験を実施した。

その結果、下図の通り、サリドマイド反復で H3K4me3 が誘導されていた領域において、休薬することで元に戻る領域があることがわかった。



さらに、下図の通り、サリドマイド反復で H3K4me3 が抑制されていたが、休薬することで元に戻る領域があることも明らかになった。



得られ、今後の解析精度も向上すると期待される。

E. 結論

代表的な溶媒であるメチルセルロース水溶液の反復曝露によるヒストン修飾の詳細解析が進み、エピジェネティックな状態変化が遺伝子クラスターを形成し、大きな領域で制御されていることが示唆された。

さらに、サリドマイドの反復曝露影響によって生じたエピジェネティクス影響の一部が、休薬によって元に戻る領域があることが明らかになった。

また基盤データとなる肝以外の臓器のゲノム DNA メチル化解析については、EM-Seq 法により、より高精度なリファレンスデータを得られた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Takeshi Hase, Samik Ghosh, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Hiroaki Kitano, Ayako Yachie. DTox: A Deep neural network-based in visio lens for large scale Toxicogenomics data. *J. Toxicol. Sci.* 2024; 49(3): 105-115. [doi.org/10.2131/jts.49.105].
- (2) Yu Takahashi, Ryota Wakabayashi, Satoshi Kitajima, Hideho Uchiyama: Epichordal vertebral column formation in *Xenopus laevis*. *J Morphol.* 2023; 285: e21664. [doi.org/10.1002/jmor.21664]
- (3) 五十嵐智女、西村拓也、北嶋聡: 細胞培養食品に係る開発や諸外国の衛生規制に関する最近の動向, 月刊「食品衛生研究」, 2023; 通巻885号 (73巻12号), 公益社団法人日本食品衛生協会 (東京)
- (4) Satoshi Yokota, Tomohiko Wakayama, Hidenobu Miyaso, Kousuke Suga, Masakatsu Fujinoki, Satoru Kaneko, Satoshi Kitajima: Reactive Blue 2 Labels Protamine in Late-Haploid Spermatids and Spermatozoa and Can Be Used for Toxicity Evaluation. *Andrologia*, 2023; 2023: 7364862 [doi.org/10.1155/2023/7364862]
- (5) Jing Pu, Satoshi Kofuji, Yoshimi Okamoto-Uchida, Keiko Danzaki, Ruoxing Yu, Akira Suzuki, Satoshi Kitajima, Hiroshi Nishina: Lethal Phenotype-Based Database Screening Identifies Ceramide as a Negative Regulator of Primitive Streak Formation. *Stem Cells*, 2023; 41: 1142-1156. [doi.org/10.1093/stmcls/sxad071]
- (6) Hirokatsu Saito, Yusuke Furukawa, Takahiro Sasaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Kentaro Tanemura: Behavioral effects of adult male mice induced by low-level acetamiprid, imidacloprid, and nicotine exposure in early-life. *Front. Neurosci.* 2023; 17: 1239808. [doi.org/10.3389/fnins.2023.1239808]
- (7) Hirokatsu Saito, Satoshi Yokota, Satoshi Kitajima: Immunohistochemical analysis of the vimentin filaments in Sertoli cells is a powerful tool for the prediction of spermatogenic dysfunction. *Acta Histochem.* 2023; 125(5): 152046. [doi.org/10.1016/j.acthis.2023.152046]
- (8) Hirokatsu Saito*, Kentaro Tanemura*, Yusuke Furukawa, Takahiro Sasaki, Jun Kanno, Satoshi Kitajima (*co-first author): Behavioral effects induced by the oral administration of acetamiprid in male mice during the postnatal lactation period or adulthood. *J Toxicol Sci.* 2023; 48(4): 203-210. [doi.org/10.2131/jts.48.203]
- (9) Makiko Kuwagata, Masaru Tsuboi, Toshime Igarashi, Mariko Tsurumoto, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, Satoshi Kitajima: A 90-day repeated oral dose toxicity study of 2-Butylbenzo[d]isothiazol-3(2H)-one in rats *Fundam. Toxicol. Sci.* 2023; 10: 69-82. [doi.org/10.2131/fts.10.69]
- (10) Makiko Kuwagata, Masaru Tsuboi, Toshime Igarashi, Mariko Tsurumoto, Takuya Nishimura, Yuhji Taquahashi, Satoshi Kitajima: A 90-day dose toxicity study of 2-(2H-benzotriazol-2-yl)-6-dodecyl-4-methylphenol in rats *Fundam. Toxicol. Sci.* 2023; 10: 59-68. [doi.org/10.2131/fts.10.59]
- (11) Takahiro Sasaki*, Hirokatsu Saito*, Yusuke Furukawa, Takashi Tominaga, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Kentaro Tanemura (*co-first author): 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]
- (12) Satoshi Yokota, Hidenobu Miyaso, Toshinori Hirai, Kousuke Suga, Tomohiko Wakayama, Yuhji Taquahashi, 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]
- (13) 齊藤洋克、北嶋聡: 化学物質を発生-発達期に曝露した際の情動認知行動影響検出, 化学物質と環境:化学物質と環境との調和をめざす情報誌, 184, 3-6, 2024
- (14) Ryuichi Ono, Makiko Kuwagata, Mie Naruse,

Akihito Watanabe, Masao Takano, Takuro Hasegawa, Hiromasa Takashima, Yusuke Yoshioka, Takahiro Ochiya, Yoko Hirabayashi, Satoshi Kitajima: Extracellular vesicle small RNAs secreted from mouse amniotic fluid induced by repeated oral administration of VPA to pregnant mice. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2024; 11(1): 37-56. [doi.org/10.2131/fts.11.37]

- ⑮ 菅野純、相崎健一、北嶋 聡: 遺伝子発現を指標とした毒性評価・予測, 単行本「化学物質の複合影響と健康リスク評価」, 2024; 第2章 複合曝露による毒性の評価手法 第1節, 67p, 医歯薬出版(東京) [ISBN: 978-4-263-73220-5]

2. 学会発表

- ① 菅野 純、相崎 健一、小野 竜一、北嶋 聡: 新型反復曝露実験による PFOA の毒性発現分析 - Clofibrate の網羅的エピジェネティック情報を参照して-。第50回日本毒性学会学術年会、(2023.6.19)、パシフィコ横浜 会議センター、シンポジウム、口演
- (2) 夏目 やよい、相崎 健一、北嶋 聡、菅野純: PPAR alphaリガンドが惹起する遺伝子発現プロファイルの比較解析。第50回日本毒性学会学術年会、(2023.6.19)、パシフィコ横浜 会議センター、イーブンニングフォーラム、口演
- (3) Yayoi Natsume-Kitatani, Ken-Ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno : Comparative analysis of gene expression profiles induced by chemicals with the same target molecule, ISMB/ECCB 2023
- (4) 北嶋 聡: 生命科学のパラダイムシフトと毒性学の進展、第50回日本毒性学会学術年会、(2023.6.19)、パシフィコ横浜 会議センター、口演
- (5) Toshime Igarashi, Mari Matsumura, Izumi Ogawa Chiori Yakawa, Takahiko Hayakawa, Miyoko Ochi, Hirokatsu Saito, Takuya Nishimura, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima, Recent trends in regulatory systems in other countries regarding the safety assurance of new food products including so-called cultured meat 10th International Congress of Asian Society of Toxicology, (2023.7.17), Taiwan
- (6) 長谷川拓郎、白方渉太、高島 宏昌、山崎 浩史、北嶋 聡、桑形麻樹子: LC-MS/MS を用いたウサギ血漿、精液および子宮内容物中のサリドマイドとその代謝物の同時測定法のバリデーション。第50回日本毒性学会学術年会(2023.6.19-21) 横浜
- (7) 高島宏昌、田中加奈子、長谷川拓郎、羽田亮、山崎 浩史、北嶋 聡、桑形麻樹子: ウサギを用いたサリドマイド腔内投与による催奇形作用評価。第50回日本毒性学会学術年会(2023.6.19-21) 横浜

- (8) 桑形麻樹子、高島宏昌、長谷川拓郎、田中加奈子、羽田亮、山崎浩史、北嶋 聡: ウサギへのサリドマイド経口投与による精漿を介する発生毒性発現リスクの解明。第63回日本先天異常学会学術集会 (2023.7.28-30)
- (9) Makiko Kuwagata, Hiromasa Takashima, Ryo Haneda, Kanako Tanaka, Takuro Hasegawa, Hi-roshi Yamazaki, Satoshi Kitajima: Possible teratogenic effects mediated by seminal plasma exposed to thalidomide in rabbits. *EURO TOX2023*. (2023.9.10-13)リュブリャナ、スロベニア
- (10) 北嶋 聡: トキシコゲノミクスからみた付加体科学、第1回付加体科学部会研究会 2023、岡山、(2023.9.26)
- (11) 北嶋 聡: 分子メカニズムに依拠した、迅速、高精度、省動物に適った毒性予測法の開発~食品トキシコゲノミクスを例に~、第9回浜松毒性試験フォーラム 基調講演、浜松、2023年10月27日
- (12) 北嶋 聡: 職域における環境因子による健康影響 ~化学物質によるヒト健康への影響評価に関する試験・研究~、第38回日本健康科学学会学術大会、東京、2023年12月2日
- (13) 小野 竜一、cfDNAメチル化とエクソソームRNAを毒性指標としたリキッドバイオプシー、第50回日本毒性学会学術年会 2023.6.21 横浜
- (14) 小野 竜一、エクソソームを介した遺伝子水平伝搬、第50回日本毒性学会学術年会 2023.6.22 横浜
- (15) Ryuichi Ono, Liquid biopsy using cfDNA methylation and EV-associated miRNA as a toxicity biomarker, The 10th International Congress of Asian Society of Toxicology, 2023.7.19, Taipei (招待講演)
- (16) Ryuichi Ono, Extracellular Vesicles (EVs) as Novel Toxicity Biomarkers, The 10th 63RD ANNUAL MEETING of Society of Toxicology, 2024.3.14, Salt Lake City (招待講演)

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