令和6年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
化学物質による体細胞ゲノム毒性の検出手法および in vitro リスク評価法開発のための研究
分担研究報告書

**分担研究課題名：** DNAメチル化異常を介した化学物質によるゲノム毒性の検出

研究分担者　鈴木孝昌、杉山圭一

**研究要旨**

DNA メチル化等のエピジェネティックな変化は、細胞老化やがんをはじめとする様々な疾患の原因として注目されている。化学物質の遺伝毒性評価に関しては、これまで突然変異や染色体異常といった DNA の直接的な損傷を対象としてきたが、ゲノム全体への影響としてのゲノム毒性という観点からは、DNA メチル化等のいわゆるエピジェネティックな変化も、ゲノムの不安定性誘発の原因として無視できない。簡便な試験法がなかったこともあり、これまでこうしたがエピジェネティックな作用はあまり注目されてこなかったが、化学物質等のゲノム影響を評価するにあたり重要である。我々は、これまでにナノポアシークエンサーを用いて直接メチル化塩基を検出することによる簡便迅速な解析手法の開発を行ってきており、今後は、比較的簡便な手法で DNA のメチル化状態を調べることにより、DNA メチル化異常を介したゲノム不安定性誘発作用を検討できる予定である。

こうした解析に向け、本年度はまず神経細胞、ミクログリアにおいてメチル化等エピジェネティクス異常を呈するターゲット遺伝子群等を文献調査した。その結果、グルココルチコイド受容体遺伝子（NR3C1）．オキシトシン受容体（OXTR）、TAR DNA-binding protein 43（TDP-43）など、多くの疾患において特定遺伝子のメチル化の異常が関わっていることがわかった。この結果は、一般的には増殖しない細胞においてもエピジェネティックな変化は誘発しうることを示唆している。また、DNA メチル化異常を引き起こす側の化学物質、いわゆる“epi-mutagen”の存在に関しても調査を行った。

さらに本研究班においては、error-corrected NGS (ecNGS)法を用いた遺伝毒性の検出が行われているが、神経細胞等の非分裂細胞においてはその感度が低いことも予想されるため、最近報告された片側鎖の変異、すなわち mismatch 変異も検出できるという ecNGS 法である HiDEF-Seq 法についても、その応用の可能性を調査した。

## A. 研究目的

近年、DNAメチル化等のエピジェネティックな変化は、細胞老化やがんをはじめとする様々な疾患の原因として注目されている。DNAメチル化異常は、細胞内のエピジェネティックな制御機構の破綻を示す指標となり得る。こうした背景から、DNAメチル化異常の検出系開発は、ゲノムの不安定性のスクリーニングと化学物質の安全性評価の両面で極めて重要な意義を持つ。

DNAメチル化の解析にはこれまで様々な手法が用いられてきたが、何れも操作が複雑で会ったり、高額な機器を必要としたりして、一般に普及していなかった。しかし、最近になって第三世代の一分子シークエンサーとされるナノポア型のシークエ

ンサーを用いることにより、煩雑な前処理なく直接 DNA メチルを検出できることが報告された。我々は別途、このナノポアシークエンサーを用いて、簡便迅速に DNA メチル化の検出を行う手法の開発を検討してきたが、その確率に目途が立ち、本研究においても、DNA メチル化解析を比較的簡便に行える見通しがたった。

これまで遺伝毒性の分野においては、主に突然変異や染色体異常を指標に安全性の評価を行ってきたが、DNA メチル即ちエピジェネティックな異常を誘発するという観点からは、被験物質の安全性の評価は行われていなかった。しかし、化学物質の安全性評価において、遺伝子突然変異のみならず、エピジェネティックな変化を指標として組み込むことで、より包括的なリスク評価が可能となる。特に本研究班の標的となる神経細胞等の増殖を伴わない細胞群においては、従来の遺伝毒性学的指標による評価が難しいことも予想され、エピジェネティックな変化も含めた広い意味でのゲノム安定性を評価する必要がある。そこでまず、神経疾患等において、その原因として DNA メチル化異常が関わっている疾患とその原因遺伝子に関して、文献調査を行った。また、その原因物質として、エピジェネティックな異常を誘発する物質、いわゆる”epi-mutagen”の存在に関しても、これまでわかっていることを調査した。

**B. 研究方法**

以下の項目に関して PubMed 等を用いた文献検索を行い、リストした論文がヒットしたため、これらの内容に関して検討を行った。

1. 神経系疾患におけるメチル化異常と原因遺伝子

- Lossi L, et al., An Overview of the Epigenetic Modifications in the Brain under Normal and Pathological Conditions. Int J Mol Sci. 2024, 30, 25, 3881.
- Iwamoto K. et al., Neurons show distinctive DNA methylation profile and higher interindividual variations compared with non-neurons. Genome Res. 2011, 21, 688-96.
- Wilker S, et al., Epigenetics of traumatic stress: The association of NR3C1 methylation and posttraumatic stress disorder symptom changes in response to narrative exposure therapy. Transl Psychiatry. 2023, 13, 14.
- Fujisawa TK, et al., Oxytocin receptor DNA methylation and alterations of brain volumes in maltreated children Neuropsychopharmacology 2019, 44, 2045-2053.
- Koike Y., et al., Age-related demethylation of the TDP-43 autoregulatory region in the human motor cortex. Commun Biol, 2021, 21, 1107.
- Fujisawa TK, et al., Alterations in Chromatin Structure and Function in the Microglia. Front Cell Dev Biol, 2021, 8, 626541

- Mathilde Cheray M, et al., Epigenetics Control Microglia Plasticity. Front Cell Neurosci, 2018, 12, 243.

２．DNA メチル化異常を起こす化合物

- Arai Y, et al., Epigenetic assessment of environmental chemicals detected in maternal peripheral and cord blood samples, J Reprod Develop. 2011, 57, 507-551.
- Blanc M, et al., Environmental chemicals differentially affect epigenetic-related mechanisms in the zebrafish liver (ZF-L) cell line and in zebrafish embryos. Aquatic Toxicology, 2019, 215, 105272.
- Sharma N, et al., Mitochondrial DNA: Epigenetics and environment. Environ Mol Mutagen, 2019, 60, 668-682.
- Tabish AM, et al., Epigenetic factors in cancer risk: effect of chemical carcinogens on global DNA methylation pattern in human TK6 cells. PLoS One, 2012, 7, e34674.

３．HiDEF-Seq 法

- Liu MH, et al., DNA mismatch and damage patterns revealed by single-molecule sequencing. Nature, 2024, 630, 752-761.


## C. 結果

1. 神経系疾患におけるメチル化異常と原因遺伝子

脳神経系組織は一般に分裂せず、再生が難しいため、傷害が直接組織障害や病態へと結びつく危険性がある。エピジェネティックな変化もゲノム不安定性等の異常として細胞に障害を与え、様々な疾患の原因となることが考えられる。これまでに得られている情報から、神経系疾患におけるメチル化異常と原因遺伝子について検索した。エピジェネティックな変化としては、DNA メチル化に加えて、ヒストン修飾、miRNA の発現などの要因が考えられるが、後述するように簡便なスクリーニング系の応用という観点から、DNA のメチル化に焦点を絞って検討を行った。

論文検索から、メチル化の異常とその関連遺伝子が明らかになっている神経系疾患として以下のような事例が見つかった。

- うつ病や心的外傷後ストレス障害(PTSD)等のトラウマとグルココルチコイド受容体遺伝子（**NR3C1**）メチル化
- 虐待などのマルトリートメント（不適切な養育）とオキシトシン受容体（**OXTR**）のメチル化
- 筋萎縮性側索硬化症（ALS）と TAR DNA-binding protein 43（**TDP-43**）のメチル化

NR3C1 遺伝子に関しては最も研究が進んでおり、大うつ病 においては、NR3C1 のプロモーター領域のメチル化増加が、この遺伝子の転写サイレンシングと関連しています。また、PTSD 患者で、NR3C1 CpG サイトのメチル化が報告されている。NR3C1 遺伝子は、グルココルチコイド受容体をコードする遺伝子としてストレス応答システムの重要

な構成要素となっており、この遺伝子のメチル化の異常が精神的なストレスに対する応答の障害となって現れることが知られている。

OXTR 遺伝子については、虐待などのマルトリートメントを受けた子供で通常の同年代の子供に比べてメチル化が増加していることが報告されている。メチル化率の大きさは、他者との愛着形成に重要とされる「左前頭眼窩皮質の容積」と関連しており、その容積の小ささは子供が他者に示す「愛着不安の高さ」とも関連していることが明らかとなった。

TDP-43 は、正常では核内で生体に重要な様々な機能を担うタンパク質であるが ALS 患者の運動神経細胞では TDP-43 が核から消失し、細胞質に凝集する。TDO-43 はその mRNA のスプライシングをコントロールすることにより自らの存在量を調節しているが、そこには DNA メチル化が関わっており、ALS 患者では、運動機能を司る運動野において TDP-43 の自己調節領域の脱メチル化が進行し TDP-43 量が増加することが報告された。ミクログリアにおける DNA メチレーションに関する検討は少ない。アルツハイマー病（AD）の脳において、グローバルメチレーションレベルの増加（hypermethylation）が報告されているが、ミクログリアにおいては変化しない。DNA メイル化に関しては、外傷性脳損傷（TBI）のラットモデルにおいて、ミクログリアにおけるグローバルなメチル化の変化が観察されている。このモデルでは、免疫組織化学と二重染色法を用いて、反応性ミクログリアのサブ集団が同定され、この集団が低メチル化細胞の主要な供給源であることが明らかにされた。

特定の遺伝子のメチル化に注目すると、老化したミクログリアでは IL1β遺伝子の発現が DNA メチル化によって制御されていることが示されている。IL1β遺伝子の低メチル化は、老化モデルにおいてサイトカイン産生のアップレギュレーションと関連している。

また、パルミチン酸がミクログリア細胞において PGC-1αプロモーターのメチル化を誘導し、この遺伝子の発現を低下させ、ミトコンドリア含量を減少させることを観察された。また、DNMT3L は、LPS 処理等によってミクログリアが活性化された後に発現が上昇することが判明している。

AD とミクログリアの関連については、アミロイド沈着マウスモデルにインターロイキン（IL）-33 を注射すると、ミクログリアのエピジェネティックおよびトランスクリプトーム・プロファイルが再プログラムされ、貪食活性が増強されたミクログリア亜集団が誘導されることによって、Aβ病態が改善されることが報告されている。

このように、特定遺伝子のメチル化状態が、その遺伝子の関連する脳神経系疾患に結び着くことが知られており、病因としてのエピジェネティック異常の重要性が浮き彫りとなってきている。またエピジェネティックな変化は、脳の発達過程においてより重要な役割を担っていることが知られているとともに、老化においても特定遺伝子のメチル化レベルがその指標となる（Epigenetic Clock）ことがわかってきている。エピジェネティック異常は、酸化ストレスや炎症、ミトコンドリア機能の喪失などを介して各種疾患や老化へ結び着くと考えられ、化学物質によりもたらされるエピジェ

ネティックな異常の評価は、今後重要な課題となる。

２．DNA メチル化異常を起こす化合物

DNA のメチル化異常が、老化や様々な疾患に結び付くことがわかってきているが、Hazard としてこうした異常を引き起こす化合物、いわゆる“epi-mutagen”は存在するであろうか？突然変異を引き起こす”mutagen”に関しては既に多くの研究がなされ、多くの mutagen とそのメカニズムが明らかになっている、一方で、エピジェネティック異常を引き起こす epi-mutagen については、これまであまり調べられてこなかった。そこでこの epi-mutagen に関して文献調査を行った。

Arai らはヒト胎児環境から見つかっている 25 種類の化学物質について、そのepigenetic mutagenic な作用を検討するため、マウス ES 細胞（ESC）におけるヘテロクロマチンの形態学的変化と DNA メチル化状態に対する影響を臍帯血の血清濃度で調べた。その結果、diethylphosphate, cotinine, octachlorodipropyl ether, mercury, serenium の５化合物がヘテロクロマチンの状態に変化を与え、Hg と Se は DNA メチル化異常をを引き起こした。これら 5 化合物に対して iPS 細胞からニューロスフェアーへの誘導に与える影響試験した結果、各化合物共に血清中濃度では影響を与えなかったが、混合処理した場合には、ニューロスフェアーのサイズと遺伝子発現及び神経系への分化に影響を与えた。

Tabish らは、遺伝毒性試験で良く用いられるヒト TK6 細胞を用いて、5 つの直接変異原及び 10 の代謝活性化を必要とする変異原物質について DNA メチル化に与える影響を調べている。グローバルメチレーションの検出には LC-MS/MS を用い、代謝活性化にはヒト肝 S9 を使っている。調べた化合物のうち、benzene, hydroquinone, styrene, carbon tetrachloride, trichloroethylene がグローバルメチレーションの低下を誘発した。 遺伝毒性を持つ化合物が同時にエピジェネティックな作用を示すという結果は注目され、今後エピジェネティックな作用から mutagen を再検討する必要性が示唆された。

さらに、ゼブラフィッシュでの検討ではあるが Blanc らは環境化学物質（ビスフェノール類、パーフルオロ化学物質（PFAS）、メトキシクロル、ペルメトリン、ビンクロゾリン、クマリン 47）のエピジェネティック関連メカニズムに及ぼす影響を、ゼブラフィッシュ胚および肝細胞（ZFL）を用いて測定した。その結果、ゼブラフィッシュ胚では、ビスフェノール A、クマリン 47、メトキシクロル、ペルメトリンへの暴露により、エピジェネティック因子の転写が著しく変化した。ZFL 細胞では、クマリン 47 を除くすべての化学物質への暴露で有意な転写変化が観察されたが、パーフルオロオクタンスルホン酸（PFOS）だけがグローバルな DNA メチル化に有意な影響を与えた。

3. HiDEF-Seq 法に関する検討

最近 Liu らにより、PacBio 社のロングリードシークエンサーを用いた新規 ecNGS 法である Hairpin Duplex Enhanced Fidelity sequencing （HiDEF-Seq)法が開発された。PacBio 社のシークエンサーを用いた ecNGS 法は、Circular Consensus Sequencing によ

る高精度な読み取り(HIFI リード)を原理として以前から用いられているが、HiDEF-Seq 法では､ライブラリーをより短くすることによりシークエンスの冗長度を上げることにより精度を高め、二本鎖のみならず一本鎖における変異、すなわちミスマッチ変異をも検出可能だとされている。本研究班で用いる神経系の細胞では、分裂頻度が高いため二本鎖間の変異として固定される確率が低く、通常の ecNGS 法では検出が難しいことが懸念されるが､HiDEF-Seq 法を用いることにより、一本鎖状態での変異も検出することによりその問題を解決できると期待できるため、この手法の適応の可能性を検討した。

オリジナル論文では､PacBio 社のシークエンサーとして一世代前の sequel II が使われており、Raw data にあたる Subreads BAM ファイルをインプットとして解析が行われている。解析のワークフローは GitHub 上に公開されているが、解析環境の要求度が高く、クラスターPC システムの構築が必要なため、障壁が高い。一方、PacBio 社の新規シークエンサーとして Revio がリリースされたが、この機種においては Subreads BAM を出力できず、HIFI リードデータのみが利用可能となっている。これにより､将来的には Revio の HIFI リードデータをインプットとして､HiDEF-Seq 法と同じ解析環境を構築する必要があることがわかった。その解析のために必要な付加情報に関しては、Revio シークエンサーの設定により取得可能なことがメーカーへの調査により判明したため、来年度はその実現に向けた検討を開始することとした。

4. ナノポア型シークエンサーを用いた簡便迅速な DNA メチル化解析系の利用

本研究にて必要となる簡便迅速な DNA メチルの検出法の開発を行った。DNA のグローバルメチレーション（５mC,5hmC）を比較的簡便に測定できる系を開発できており、来年度はその手法を用いて本研究課題におけるサンプルのメチル化レベルの検討に応用が可能となっている。また､現在はグローバルメチル化レベルの解析のみであるが、来年度には個別遺伝子のメチル化レベルの解析も可能となる予定であり、本研究班へもその技術を導入できることを想定して検討を進める。

## D. 考察

神経細胞、ミクログリアにおける DNA メチル化等のエピジェネティックな異常と疾患及び関連遺伝子に関する調査を行ったが、特定遺伝子のメチル化異常が脳神経系疾患の原因となっていることがわかった。これか疾患に関連する遺伝子は、今後部位特異的メチル化の解析における対象遺伝子として利用する予定である。また､物質側としても、エピジェネティクスを撹乱するいわゆる epi-mutagen の存在が報告されているが、まだ研究の歴史が浅いため mutagen のように確立した地位が築かれていない。近年、老化や様々な疾患にエピジェネティックな異常が関与していることが報告されており、化学物質のハザードとしての epi-mutagen 的な作用の評価は重要な課題となっている。解析手法の煩雑さがその研究の振興を遅らせていたが、完全迅速な DNA メチル化スクリーニング法を適応することにより、その

評価に迫りたい。特に現在問題となっているPFAS関連化合物に関しては、epi-mutagen的な作用が指摘されており、我々の系においても最終年度までには再評価を行いたい。

神経系細胞等の増殖能の低い細胞でのゲノム毒性の評価はこれまであまり行われて来なかったが、エピジェネティックな作用を含めてゲノム不安定性という観点からの安全性評価が重要となっている。我々が開発したecNGS法であるPECC-Seqもその評価に役立つことが期待されるが、ミスマッチ変異を含んだ非増殖細胞における遺伝毒性を確実に評価するために、新規ecNGS法であるHiDEF-Seq法の活用についても検討をした。現状の課題を把握するとともに、実用に向けた可能性に目途が立ったため、来年度はその応用に向けた具体的な検討を開始する予定である。

## E. 結論

特定遺伝子のメチル化異常が、神経疾患の発生に直接かかわっていることが明らかとなっている。ミクログリアにおいても、その機能がエピジェネティックに制御されている可能性があり、epi-mutagenによりその調節機能が障害される危険性がある。DNAメチル化異常の誘発という観点から化学物質の安全性を評価し、epi-mutagenに関する理解を深めることが重要である。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### G-1. 論文発表


1．Furihata C., Suzuki T. Four functional genotoxic marker genes (Bax, Btg2, Ccng1, and Cdkn1a) discriminate genotoxic hepatocarcinogens from non-genotoxic hepatocarcinogens and non-genotoxic non-hepatocarcinogens in rat public toxicogenomics data, Open TG-GATEs. Genes Environ. 2024; 46: 28.

2．Hosoi S, Hirose T, Matsumura S, Otsubo Y, Saito K, Miyazawa M, Suzuki T, Masumura K, Sugiyama KI Effect of sequencing platforms on the sensitivity of chemical mutation detection using Hawk-Seq™. Genes Environ. 2024;46:20.

3．Corton JC, Auerbach SS, Koyama N., Mezencev R., Yauk CL., Suzuki T. Review and meta-analysis of gene expression biomarkers predictive of chemical-induced genotoxicity in vivo. Environ. Mol. Mutagen. 2025: doi: 10.1002/em.22646.

4．Froetschl R., Corton JC., Li H., Aubrecht J., Scott S. Auerbach SS., Caiment F., Doktorova TY., Fujita Y., Jennen D., Koyama N., Meier MJ., Mezencev R., Recio L., Suzuki T., Yauk CL. Consensus findings of an IWGT Workshop on using Transcriptomic Biomarkers to Predict Genotoxicity. Environ. Mol. Mutagen. 2025: doi: 10.1002/em.22645

5．築茂由則，吉田徳幸，大岡伸通，内田恵理子，鈴木孝昌，米満研三，上間匡，

本間正充, 合田幸広, 井上貴雄: 共通ウイルスゲノム RNA を用いた COVID-19 診断用核酸増幅検査薬の一斉性能評価試験. 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 2024:55:295-310.

6. Ikeuchi S, Hirose S, Shimada K, Koyama A, Ishida S, Katayama N, Suzuki T, Tokairin A, Tsukamoto M, Tsue Y, Yamaguchi K, Osako H, Hiwatashi S, Chiba Y, Akiyama H, Hayashidani H, Hara-Kudo Y. Isolation of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli from the Surfaces of Beef Carcasses in Slaughterhouses in Japan. J Food Prot. 2024: 87:100263.

G-2. 学会発表

1. 鈴木孝昌　様々な EC-NGS 法の特徴　日本環境変異原ゲノム学会第 84 回 MMS 研究会, 東京都　(2024. 6)
2. 鈴木孝昌　Error-corrected next generation sequencing (ecNGS)の現状　第 51 回日本毒性学会学術年会　福岡市（2024.7）
3. 鈴木孝昌, 尤馨悦, 伊澤和輝, 津田雅貴, 本間正充, 欒洋, 杉山圭一. PECC-Seq 法の開発から学ぶエラー修正 NGS(ecNGS)法の残存エラーの要因 第 83 回日本癌学会学術総会, 福岡市（2024.9）
4. 鈴木孝昌, 西川可穂子. 河川水のメタゲノム解析による細菌叢と薬剤耐性遺伝子の探索 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会, 岡山市 (2024.12)
5. 鈴木孝昌, 杉山圭一. ナノポアシークエンサーを用いた簡便迅速な DNA メチル化解析手法の開発 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会, 岡山市 (2024.12)
6. 降旗千惠, 鈴木孝昌. In vivo トキシコゲノミクス試験に有用な４つの遺伝毒性マーカー遺伝子（Bax, Btg2, Ccng1, Cdkn1a）日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会, 岡山市 (2024.12)
7. 東航平, 鈴木孝昌, 青木康展, 山田雅巳. 魚類腸内細菌叢解析を用いた水環境中の界面活性剤のモニタリングに関する研究 日本環境変異原ゲノム学会第 53 回大会, 岡山市 (2024.12)
8. “Error-corrected next-generation sequencing (NGS)” as an ultimate tool for genetic toxicology　第 47 回インド環境変異原学会年会　アンナマライ/インド（2025.1）

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 特許取得

なし

J. 実用新案登録

なし