

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

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ゲノム安全科学部

研究要旨

既に確立したナノポアシーケンサーを用いたDNAグローバルメチル化レベルの簡便迅速な解析手法を応用し、神経系細胞でのメチル化の解析を行った。老齢／若齢間のDNAグローバルメチル化レベルでは神経細胞、ミクログリアとも大きな差がなかった。神経細胞／ミクログリア間では老齢、若齢ともにミクログリアでの低メチル化傾向を見いだした。さらに、肝臓と腎臓においても加齢によるメチル化の変化を調べたが、大きな変化は見られなかった。今後は、リストアップしたMouse epigenetic clock 遺伝子を含めた部位特異的なメチル化解析を行う予定である。

A. 研究目的

化学物質への曝露により引き起こされる、ゲノム不安定性などのゲノム異常を、DNA メチル化というエピジェネティックな観点から評価するため、ゲノムワイドに DNA グローバルメチル化を解析可能な新規開発手法を用いて、ナノポアシーケンサーによる *in vivo* 組織での定量的評価を行う。また、細胞老化とゲノム不安定性の関連性を評価するため、若齢及び老齢マウスにおける各組織細胞のメチル化レベルの変化を解析する。

B. 研究方法

ゲノムのエピジェネティクス異常検出法の開発

グローバルメチル化の評価に関しては、ナノポアシーケンサーを用いたメチル化解析法を用いた。本解析法は研究分担者が確立した手法であり簡便迅速という利点がある。本研究班では、5週令及び84週令のC57BL/6マウスの脳、肝臓、腎臓におけるDNAメチル化について検討した。

部位特異的なメチル化の検討に向けて、老化によりメチル化レベルの変化することが知られているEpigenetic clock遺伝子のマウスにおける報告を調べ、ゲノム上の位置をリストアップした。

C. 研究結果

ゲノムのエピジェネティクス異常検出法の開発

老齢および若齢マウスの神経細胞とミクログリアのDNAメチル化（5-methyl C及び5-hydroxymethyl C）レベルを調べた結果、CpGサイトのメチル化は50-60%であり、両者に大きな差は見られなかった（図4）。CpGサイトに限定しない場合にも同様の傾向が見られたが、

そのレベルは10%以下と低く、DNAのメチル化は主にCpGサイトで起きることが確認できた。また、神経細胞—ミクログリアの比較では、若齢、老齢ともに神経細胞に比べてミクログリアのメチル化レベルが低い傾向が見られた。考察のため、5週令及び84週令のC57BL/6マウスの脳、肝臓、腎臓におけるDNAメチル化も検討した。これらの臓器においても、週齢による明らかな差は認められなかった（図5）。従って、DNAメチル化に関しては特定部位について解析する必要があることがわかった。今後は、その有力な候補として、LINE-1配列やepigenetic clock遺伝子のメチル化レベルの解析を行う予定である。

この解析に向けて、マウスにおけるエピジェネティッククロック遺伝子に関する情報を調べ、それらをゲノム上の位置情報と共にリストアップしたのが表Xである。

D. 考察

ゲノムのエピジェネティクス異常検出法の開発

一般的に、老化によりゲノムDNAのメチル化レベルの変化が起きることが知られており、特定遺伝子のメチル化レベルは、epigenetic clockとして、細胞年齢の推定に利用できる。今後の解析に向けて、マウスにて報告されているepigenetic clock遺伝子を調べ、それらのマウスゲノム上での位置情報を取得した。

今回の検討では特定の遺伝子ではなくゲノム全体のグローバルなメチル化の変化を解析したため、大きな変化は検出できなかったと考えられる。ただし、神経細胞とミクログリアの間でメチル化レベルの差が見られたことは重要な新知見である。神経細胞とミクログリアの細胞起源が大きく異なる点や、各細胞の生理学的機能との関連が示唆される。特にミクログリアは脳神経系において、外部影響を最初に受ける細胞であるため、*in vitro*評価系に最適な細胞選択において考慮する

点となり得る。一方で、ゲノム不安定性のバイオマーカーとして、特定遺伝子のメチル化状態に注目するべきかもしれない。シーケンスデータのマッピングを行いゲノム上の位置情報を得たのちに、LINE-1やepigenetic clock遺伝子などの特定部位のメチル化の変化を検出したいと考えている。

E. 結論

ナノポアシーケンサーを用いたメチル化解析法を用いて、老齢、若齢マウス神経細胞、ミクログリアのグローバルメチル化レベルを簡便迅速に解析することができた。老齢／若齢間のグローバルメチル化レベルでは神経細胞、ミクログリアとも大きな差がなかった。しかし、神経細胞／ミクログリア間では老齢、若齢、ともにミクログリアのメチル化が低い傾向を見いだした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Matsumura, S., Hosoi, S., Hirose, T., Otsubo, Y., Saito, K., Miyazawa, M., Kawade, A., Hakura, A., Kakiuchi, D., Asakura, S., Koyama, N., Okada, Y., Chikura, S., Kimoto, T., Masumura, K., Suzuki, T. and Sugiyama, K.: Whole genome mutagenicity evaluation using Hawk-Seq™ demonstrates high interlaboratory reproducibility and concordance with the transgenic rodent gene mutation assay, *Genes and Environ.* **47**, 13 (2025). <https://doi.org/10.1186/s41021-025-00336-w>
- 2 Yauk CL, Lynch AM, Dobrovolsky VN, Schuler M, Smith-Roe SL, Fitzgerald D, Higgins J, Honarvar N, Le Curieux F, Matsumura S, Minocherhomji S, Recio L, Salk JJ, Sugiyama KI, Suzuki T, Wills JW, Marchetti F. Application of error-corrected sequencing technologies for *in vivo* regulatory mutagenicity assessment. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2026, 164:105985.
- 3 Honda H, Suzuki T, Kitajima M, Kondo NI, Miyata K, Utsumi S, Yamada M. The new era shaped by environmental genome monitoring - symposium of the Japanese environmental mutagen and genome society (JEMS), 2024. *Genes Environ.* 2025, 47: 6.
- 4 鈴木孝昌. Error-corrected next generation sequencing (ecNGS) の現状. 毒性質問箱. 2025;27:50-55

2. 学会発表

- 1 鈴木孝昌, 杉山圭一, 降旗千恵 Robustness of the four maker genes (Bax, Btg2, Ccng1, and Cdkn1a) for predicting genotoxic hepatocarcinogens. 第84回日本癌学会学術総会 (2025 9 26, 金沢)
- 2 鈴木孝昌, 三島雅之, 笠原杏奈, 最上由香里, 高橋華奈子, 佐藤 薫, 杉山圭一: ナノポアシーケンサーを用いた簡便迅速なDNAメチル化解析. 第53回日本環境変異原ゲノム学会年次大会 (2025.11.22,

静岡)

- 3 降旗千恵, 杉山圭一, 鈴木孝昌. 遺伝毒性肝発がん物質の予測に有用な4マーカー遺伝子 (Bax, Btg2, Ccng1, and Cdkn1a) 第84回日本癌学会学術総会 (2025.9)

G. 知的所有権の取得状況

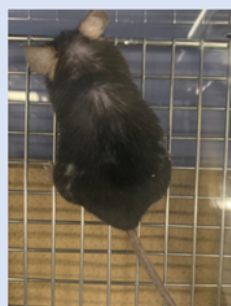
該当なし

若齢・老齢マウスを納入

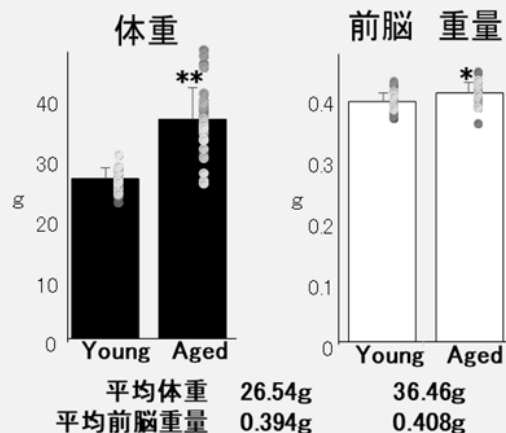
東京都健康長寿医療センター研究所 柳井先生より



C57BL/6J mice
3 months, ♂ (n = 37)



C57BL/6J mice
24 months, ♂ (n = 36)



脳組織分散と細胞単離手法の確立



自動組織分散装置 MACSシステム



FACS

ミルテニー社のMACSシステムにより、若齢・老齢マウスの前脳領域より神経細胞・ミクログリアの回収方法を確立した。
回収した神経細胞濃縮液の約8割がNeuN陽性の成熟神経細胞であった。
回収したミクログリアのほぼ8割がTMEM119陽性ミクログリアであった。

☆神経細胞 C57BL/Ncrを用いた検討
Biotin-細胞 若齢マウス 細胞数: 8.9×10^4 細胞、純度: 95.14 %
老齢マウス 細胞数: 5.7×10^4 細胞、純度: 96.19 %
Biotin- NeuN+ 細胞
若齢マウス 純度: 84.30 %、
老齢マウス 純度: 75.14 %
☆ミクログリア
CD45+ CD11b+ 細胞
若齢マウス 細胞数: 4.12×10^4 細胞、純度: 92.15 %
老齢マウス 細胞数: 3.02×10^4 細胞、純度: 88.02 %
CD45+ CD11b+ TMEM119+ 細胞
若齢マウス 純度: 85.78 %
老齢マウス 純度: 77.34 %

ゲノム毒性検出法

① 開発グループに提供

若齢マウス 13 (神経8, ミクログリア5)
老齢マウス 13 (神経8, ミクログリア5)

単離細胞を用いた、体細胞突然変異や
エピジェネティクス異常等のゲノム毒性検出

② シングルセル トランスクリプトーム解析

若齢マウス 18 (神経9, ミクログリア9)
老齢マウス 18 (神経9, ミクログリア9)
細胞(プール)を回収後、FLEX固定化し-80℃
→受託解析へ

単離細胞のシングルセルレベルでの
細胞性状解析

③ 細胞培養

若齢マウス 3
老齢マウス 3
細胞回収後、細胞ごとに至適条件下にて、
37℃培養

単離した神経細胞とミクログリアの培養条件の
整備と細胞性状変化解析

④ 免疫組織化学検討

若齢マウス 5
老齢マウス 4
PFA心灌流固定後、凍結切片を作成し
特異的抗体を用いて染色

生体レベルの神経細胞とミクログリアの加齢に
伴う細胞性状変化解析と老化指標の明確化

図1. 老齢動物搬入、ゲノム毒性検出法確立、
細胞老化指標の明確化までの実験の流れ

Methylation in neuron and microglia of young and old mouse

sample	Y-13 neuron	Y-14 neuron	Y-15 neuron	O-8 neuron	O-13 neuron	O-14 neuron	Y-4 microglia	Y-5 microglia	Y-10 microglia	O-4 microglia	O-5 microglia	O-11 microglia
total_reads_used	7393	266	7916	7669	10921	22085	24124	21449	27304	17066	22852	19935
C_total_unmod_calls	93269	3128	106216	112253	146070	282362	279824	274934	343018	193687	317519	214303
C_total_mod_calls(5mC)	204204	5710	257126	287214	358943	549128	388997	489436	544226	276591	559443	354827
C_total_mod_calls(5hmC)	18628	472	25120	37180	41892	70908	26653	32866	36700	19167	37889	25217
C_pass_frac_unmodified	0.295	0.336	0.273	0.257	0.267	0.313	0.402	0.345	0.371	0.396	0.347	0.361
C_pass_frac_modified_m (5mC)	0.646	0.646	0.662	0.658	0.656	0.609	0.559	0.614	0.589	0.565	0.612	0.597
C_pass_frac_modified_m (5hmC)	0.059	0.051	0.065	0.085	0.077	0.079	0.038	0.041	0.040	0.039	0.041	0.042
Total modification %	0.705	0.697	0.727	0.743	0.733	0.687	0.598	0.655	0.629	0.604	0.653	0.639
mean	0.709			0.721			0.627			0.632		

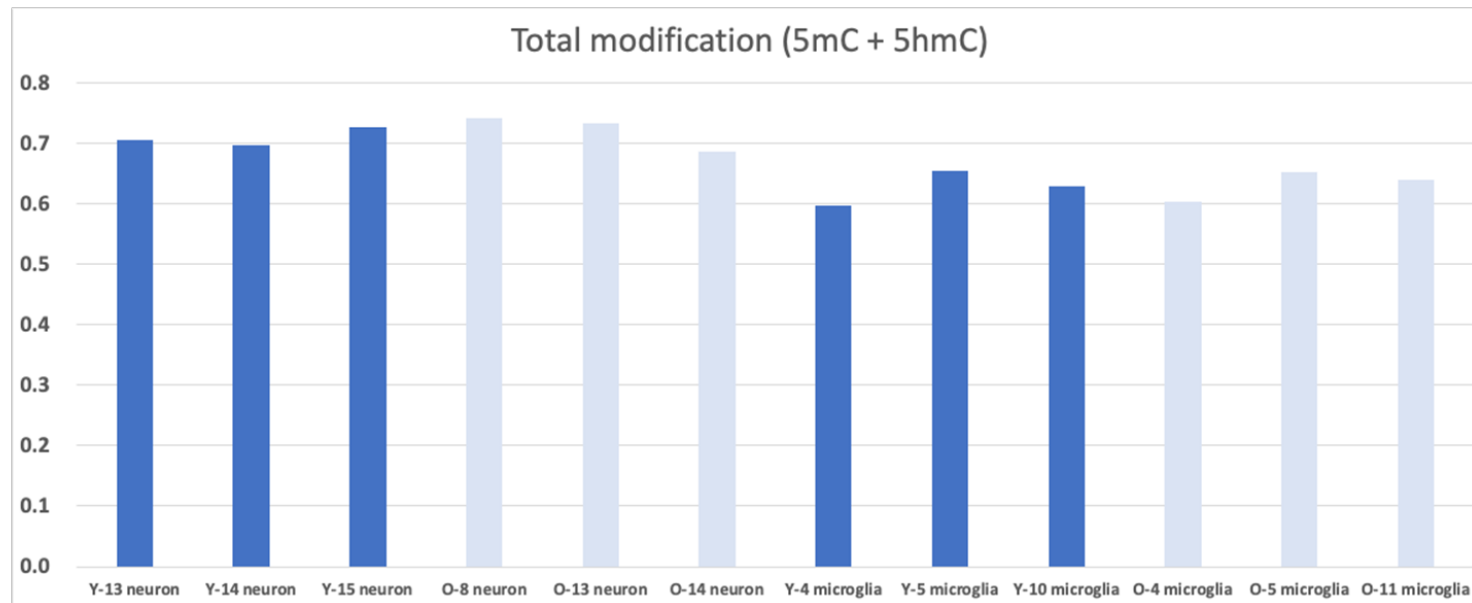


图4

Global methylation in brain, liver and kidney of young and old C57BL/6 mouse

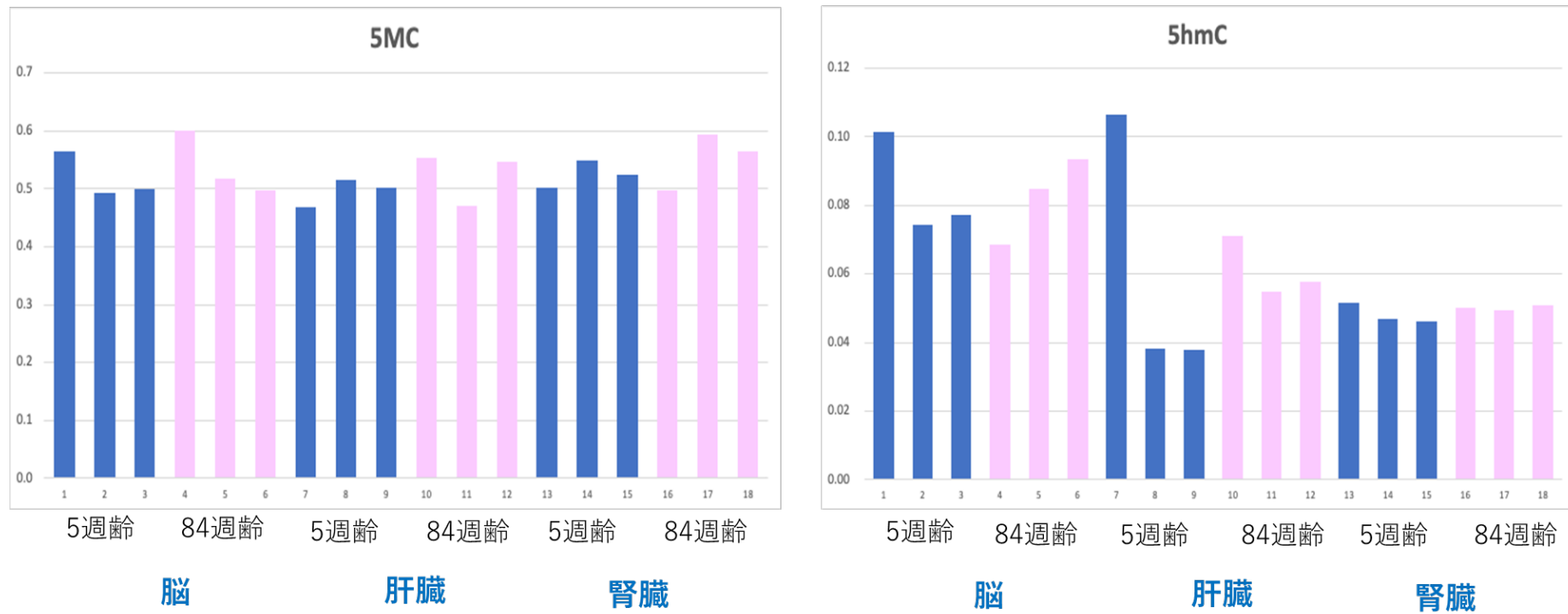


図5

表 マウスEpigenetic clock遺伝子とゲノム上の位置

ID	CpG Mouse Methylation Array	CHR	MAPINFO	Gene	R B6	R2 B6	R DBA	R2 DBA	Mean R2	Homologous location in human (GRCh37)	Homologous CpG location in human Methylation 450	R human	R2 human	p-value human	Significant (alpha = 0.01)	Category	Distance in bp	Intersection	Slope
1	cg42528232	5	105409216		-0.97	0.94	-0.98	0.96	0.95	-	-	-	-	-	-	-	-	1.08	-2.56
2	cg29748675	11	73324349	Aspa	-0.94	0.88	-0.99	0.97	0.93	17:3379534-3379655-1	cg02228185	-0.57	0.32	4.49E-57	Yes	HOM.	-	0.97	-1.17
3	cg30271979	11	119210883	Tbc1d16	-0.96	0.91	-0.96	0.93	0.92	-	-	-	-	-	-	-	-	1.56	-1.80
4	cg30271978	11	119210869	Tbc1d16	-0.96	0.92	-0.96	0.92	0.92	-	-	-	-	-	-	-	-	1.34	-1.72
5	cg36215530	19	20602346	Akh1a1	-0.97	0.94	-0.95	0.90	0.92	9:75567483-75567613-1	cg01812894	-0.56	0.32	1.60E-56	Yes	DIST.	958	1.56	-1.81
6	cg41908051	5	21373550	Fgl2	-0.95	0.90	-0.96	0.93	0.91	7:76828160-76828308-1	cg14752838	0.09	0.01	2.04E-02	No	DIST.	651	1.13	-1.48
7	cg47088623	9	92276475		-0.93	0.86	-0.98	0.97	0.91	-	-	-	-	-	-	-	-	1.56	-2.28
8	cg29601161	11	59283020	Wnt3a	-0.94	0.88	-0.97	0.94	0.91	1:228202533-228202658-1	cg21934230	-0.35	0.12	2.83E-20	Yes	HOM.	-	0.99	-1.55
9	cg31044702	12	103214639	Prima1	-0.93	0.87	-0.97	0.95	0.91	14:94215181-94215301-1	cg16244889	-0.04	0.00	2.58E-01	No	DIST.	3423	2.31	-2.53
10	cg29045777	10	118049337		-0.97	0.93	-0.93	0.87	0.90	12:68800166-68800280-1	cg11783364	-0.09	0.01	2.68E-02	No	DIST.	85	2.25	-2.40
11	cg31044701	12	103214578	Prima1	-0.94	0.88	-0.96	0.92	0.90	14:94215181-94215241-1	cg16244889	-0.04	0.00	2.58E-01	No	DIST.	3362	1.49	-1.85
12	cg46095458	8	105270995	Hsf4	0.94	0.89	0.95	0.90	0.89	16:67199792-67199917-1	cg04235075	0.25	0.06	1.43E-10	Yes	HOM.	-	-0.46	2.44
13	cg29372013	11	31713858		-0.95	0.89	-0.95	0.89	0.89	5:173098102-173098224-1	cg16488580	-0.18	0.03	2.83E-06	No	DIST.	593	1.47	-2.20
14	cg29601160	11	59283958	Wnt3a	-0.91	0.83	-0.98	0.96	0.89	1:228202592-228202736-1	cg21934230	-0.35	0.12	2.83E-20	Yes	HOM.	-	1.27	-1.37
15	cg29748676	11	73324412	Aspa	-0.91	0.83	-0.98	0.95	0.89	17:3379471-3379592-1	cg02228185	-0.57	0.32	4.49E-57	Yes	HOM.	-	1.21	-1.19
16	cg36153969	19	11050061	AW112010	-0.91	0.82	-0.98	0.96	0.89	-	-	-	-	-	-	-	-	1.07	-1.60
17	cg30147805	11	109587193	Wp1l	-0.95	0.90	-0.94	0.88	0.89	17:6643313-66433769-1	cg24073074	-0.09	0.01	1.55E-02	No	DIST.	783	1.65	-1.96
18	cg37485888	1	133871333		-0.91	0.83	-0.98	0.95	0.89	-	-	-	-	-	-	-	-	1.92	-2.21
19	cg46095446	8	105270822	Hsf4	0.93	0.87	0.95	0.91	0.89	16:67199615-67199736-1	cg04235075	0.25	0.06	1.43E-10	Yes	HOM.	154	-0.34	2.73
20	cg29045784	10	118049610		-0.93	0.86	-0.96	0.91	0.89	12:68799873-68799997-1	cg11783364	-0.09	0.01	2.68E-02	No	DIST.	203	1.15	-1.95
21	cg31653077	13	56597874		-0.93	0.87	-0.95	0.90	0.89	5:135352606-135352728-1	cg15831285	-0.05	0.00	1.59E-01	No	DIST.	6229	1.47	-1.71
22	cg30271977	11	119210851	Tbc1d16	-0.94	0.88	-0.94	0.89	0.88	17:77987452-77987465-1	cg26350921	-0.02	0.00	5.29E-01	No	DIST.	23	1.68	-2.18
23	cg41451397	4	129020517		-0.94	0.88	-0.94	0.89	0.88	13:3448643-34486499-1	cg19383974	-0.12	0.01	2.45E-03	No	DIST.	1279	1.86	-2.68
24	cg31999677	13	102652532		-0.94	0.89	-0.94	0.87	0.88	5:66532812-66532932-1	cg26096752	-0.10	0.01	7.15E-03	No	DIST.	2261	1.73	-2.18
25	cg40054396	3	95688305		-0.93	0.87	-0.95	0.90	0.88	1:150521140-150521261-1	cg04863713	0.01	0.00	7.41E-01	No	HOM.	-	1.45	-2.40
26	cg29838087	11	82139781		-0.92	0.84	-0.96	0.92	0.88	-	-	-	-	-	-	-	-	1.58	-2.40
27	cg34047092	16	28596352	Fgl12	-0.93	0.86	-0.95	0.89	0.88	3:192289143-192289267-1	cg14463292	-0.04	0.00	2.96E-01	No	HOM.	-	1.71	-2.12
28	cg38799160	2	110180245		0.93	0.86	0.94	0.89	0.88	11:27237674-27237797-1	cg04897044	-0.13	0.02	1.19E-03	No	DIST.	885	-0.13	1.70
29	cg31348426	13	30332850		-0.91	0.83	-0.95	0.91	0.87	-	-	-	-	-	-	-	-	1.14	-1.31
30	cg32016143	13	104398027	Adamts6	-0.92	0.85	-0.94	0.89	0.87	5:64558563-64558684-1	cg21878650	-0.36	0.13	1.21E-21	Yes	HOM.	-	2.33	-2.41
31	cg40893513	4	53263897		-0.93	0.86	-0.94	0.87	0.87	9:107826792-107826921-1	cg14085060	-0.14	0.02	1.95E-04	No	DIST.	363	1.98	-2.64
32	cg46214201	8	115704432		-0.89	0.79	-0.97	0.94	0.87	16:79631417-79631534-1	cg00509921	-0.24	0.06	3.92E-10	Yes	DIST.	855	2.22	-2.15
33	cg34675481	17	15378866		0.94	0.87	0.92	0.85	0.86	6:170602908-170603029-1	cg04050463	0.01	0.00	8.05E-01	No	DIST.	483	-0.68	1.54
34	cg42324007	5	76815820		-0.91	0.83	-0.95	0.89	0.86	4:571118501-571118610-1	cg20529129	-0.08	0.01	3.94E-02	No	DIST.	5986	1.55	-2.05
35	cg36213524	19	20601608	Akh1a1	-0.91	0.82	-0.95	0.90	0.86	9:75568271-75568385-1	cg01812894	-0.56	0.32	1.60E-56	Yes	DIST.	178	2.19	-2.20
36	cg45371288	8	11469288		0.93	0.87	0.92	0.85	0.86	-	-	-	-	-	-	-	-	-1.35	2.52
37	cg33511505	15	76462525	Bop1	-0.91	0.82	-0.95	0.89	0.86	8:145326468-145326590-1	cg22726273	0.09	0.01	2.25E-02	No	DIST.	58285	1.89	-2.09
38	cg40499707	3	151762892		-0.90	0.81	-0.95	0.91	0.86	1:79102668-79102735-1	cg00458211	-0.08	0.01	4.87E-02	No	DIST.	8599	1.59	-2.47
39	cg36017697	18	83077948		-0.92	0.85	-0.93	0.86	0.85	18:73966158-73966340-1	cg22063692	-0.09	0.01	2.81E-02	No	DIST.	378	1.53	-1.99
40	cg46488091	9	21135157		-0.88	0.77	-0.97	0.93	0.85	-	-	-	-	-	-	-	-	1.71	-1.88
41	cg31490151	13	41910458		-0.92	0.85	-0.92	0.85	0.85	6:118686881-11868802-1	cg07106625	0.03	0.00	4.98E-01	No	DIST.	1470	2.30	-2.53
42	cg47356576	9	119559604		-0.86	0.74	-0.98	0.96	0.85	3:38671014-38671153-1	cg27329908	0.03	0.00	4.29E-01	No	DIST.	782	1.18	-1.56
43	cg29852252	11	83354586		-0.88	0.78	-0.96	0.91	0.85	17:34216866-34217001-1	cg08542715	0.06	0.00	1.59E-01	No	DIST.	1026	1.45	-1.59
44	cg29825068	11	80613715	Myo1d	0.84	0.70	0.99	0.99	0.84	-	-	-	-	-	-	-	-	-0.21	1.52
45	cg39955278	3	84463739		-0.89	0.79	-0.94	0.89	0.84	4:153872273-153872416-1	cg13794807	0.00	0.00	9.75E-01	No	DIST.	593	1.32	-2.05
46	cg43021141	5	146461718	Wasf3	-0.86	0.74	-0.97	0.93	0.84	13:27251476-27251597-1	cg16579043	0.00	0.00	9.32E-01	No	DIST.	1940	1.00	-1.64
47	cg32173949	14	9606891	Fhit	-0.89	0.80	-0.93	0.87	0.84	3:59727185-59772308-1	cg20366397	0.04	0.00	3.50E-01	No	DIST.	12404	1.25	-1.55
48	cg35566435	18	32817719	Tslp	-0.87	0.76	-0.95	0.91	0.84	5:110409832-110409961-1	cg21145140	-0.03	0.00	4.97E-01	No	DIST.	447	1.64	-1.70
49	cg42423927	5	92856694	Shroom3	-0.95	0.91	-0.87	0.75	0.83	7:57606840-75609961-1	cg20254658	-0.03	0.00	3.78E-01	No	DIST.	5564	1.66	-2.13
50	cg43021142	5	146461730	Wasf3	-0.88	0.77	-0.94	0.89	0.83	13:27251488-27251597-1	cg16579043	0.00	0.00	9.32E-01	No	DIST.	1934	1.00	-1.94
51	cg35570411	18	33374105		-0.88	0.78	-0.94	0.88	0.83	5:111012892-111013017-1	cg18111924	-0.08	0.01	4.19E-02	No	DIST.	2584	1.48	-2.27
52	cg39792107	3	57512581		-0.85	0.72	-0.97	0.94	0.83	3:149302393-149302461-1	cg06728055	-0.16	0.03	2.73E-05	No	DIST.	8141	0.98	-1.17
53	cg33820666	15	103198533		-0.87	0.75	-0.95	0.91	0.83	-	-	-	-	-	-	-	-	1.20	-1.42
54	cg36073249	19	4046200	A0A494BAM8	-0.87	0.76	-0.95	0.90	0.83	-	-	-	-	-	-	-	-	1.04	-1.83
55	cg42582686	5	111201308		-0.87	0.76	-0.95	0.89	0.83	22:28542680-28542811-1	cg05838101	0.06	0.00	1.47E-01	No	DIST.	41188	1.27	-1.70
56	cg38749746	2	103284035		-0.90	0.81	-0.92	0.84	0.83	11:34663681-34663813-1	cg11715147	0.12	0.01	3.07E-03	No	DIST.	2313	1.95	-2.25
57	cg36221364	19	21440953	Gda	-0.88	0.77	-0.93	0.87	0.82	-	-	-	-	-	-	-	-	1.11	-1.69
58	cg40372598	3	13568958		-0.89	0.79	-0.92	0.85	0.82	4:103415165-103415301-1	cg06501333	0.03	0.00	4.72E-01	No	DIST.	3960	1.29	-2.21
59	cg38906534	2	124608648		-0.87	0.76	-0.94	0.88	0.82	15:48007990-48008113-1	cg14555697	-0.07	0.01	6.52E-02	No	DIST.	1104	1.45	-2.08
60	cg42208466	5	64045766		-0.86	0.73	-0.95	0.90	0.82	4:37769312-37769433-1	ch.4.37457342R	-0.02	0.00	6.44E-01	No	DIST.	11574	1.29	-2.23
61	cg28421573	10	44427617		-0.83	0.69	-0.97	0.95	0.82	6:106568110-106568240-1	cg16567330	-0.02	0.00	6.21E-01	No	DIST.	9383	0.75	-1.45
62	cg35566432	18	32817586	Tslp	-0.83	0.69	-0.96	0.93	0.81	5:110409665-110409815-1	cg21145140	-0.03	0.00	4.97E-01	No	DIST.	273	1.50	-1.60
63	cg3472950	6	57534096		-0.82	0.67	-0.9												