

平成 30 年 7 月 11 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25281028

研究課題名(和文) エピジェネティック毒性の通常毒性試験での検出を可能とするレポーターマウスの開発

研究課題名(英文) Development of reporter mice enabling detection of epigenetic toxicity in the conventional toxicity tests

研究代表者

五十嵐 勝秀 (Igarashi, Katsuhide)

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30342885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：エピジェネティック毒性はその重要性にも関わらず、リスク対応が進んでいない。検出の難易度が高いことが理由の一つであり、本研究では簡便な検出を可能とするレポーターマウスの開発を行った。レポーターベクターの構築が難航したが、imprint遺伝子由来のSnrpn promoterを採用し、上流にAgouti, Daz1のpromoter配列を連結し解決を図った。培養細胞に導入し、両者ともに予想されるレポーター応答を示すことを確認した。DNA脱メチル化物質に対する応答を検討し、ともにレポーター応答増強を確認した。この結果を受け、レポーターマウス作製(外部委託)に移り、作製されたマウスの詳細解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Regardless of its importance, risk management for epigenetic toxicity has not been advanced. One of the reasons is the high degree of difficulty of its detection. In this study, we developed a reporter mouse that enables simple detection of epigenetic toxicity. Construction of the reporter vector was the most difficult, but adopting the Snrpn promoter derived from the imprint gene, we could construct the vectors joining the promoter sequence of Agouti or Daz1 to the upstream of Snrpn promoter. We introduced both reporter vectors to culture cell and confirmed that both show the expected reporter response. We next examined the response to DNA demethylating substances and confirmed the enhancement of both reporter response. Following this result, we moved to the production of the reporter mice (outsourcing) and carried out detailed analysis of the produced mice.

研究分野：分子毒性学

キーワード：ゲノム エピジェネティクス 毒性試験 レポーター 有害化学物質

1. 研究開始当初の背景

(1) エピジェネティック毒性研究の必要性

DNA 配列の変化無しに DNA やヒストンへの化学修飾を介して形質を変化させる「エピジェネティクス」は、その分子機構が詳細に解明されつつある。新たなエピゲノム化学修飾が追加され、エピゲノム化学修飾を受けるゲノム領域を決定する転写因子、化学修飾を実行する酵素群、化学修飾を認識する特異タンパク質など、実行分子の実体が明らかになってきている。これらの知見を背景に、エピジェネティック毒性が現実味を帯び、米国毒性学会・生涯教育講習会での企画や、日本毒性学会での申請者を始めとするシンポジウムなど、関連学会で研究の必要性が取り上げられ始めていた。

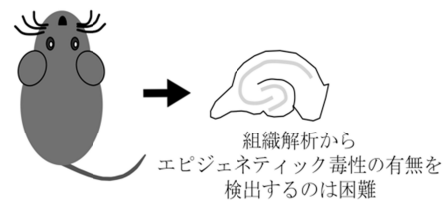
(2) 研究の遅れ

一方で、エピジェネティック毒性作用が確認されている化学物質は分子機構から予想される数より遙かに少なく、バルプロ酸やアザシチジンなど、ごく限られたものしか知られていない。その原因として、エピジェネティック毒性検出手法が、クロマチン免疫沈降法やバイサルファイト処理法など高度な生化学解析技術を必要とするために毒性試験となじまず、毒性試験データからエピジェネティック毒性を検出することが困難で、当該作用を有する化学物質の同定が進まないことがあげられる。よって、通常毒性試験時にエピジェネティック毒性の可能性を判定できる個体レベル評価システムの開発が急務である。

(3) レポーターマウス開発によるブレイクスルー

申請者は挑戦的萌芽研究費での研究をヒントに、遺伝子組換え技術を駆使した、観察が容易なマーカーによってエピジェネティック毒性（本研究では DNA メチル化影響）の有無を検出するレポーターマウスを考案した (Fig.1)。このマウスは、通常の飼育条件で実験可能であること、作用の検出は各臓器の GFP 発現を顕微鏡で観察するだけでよいことを特徴とする。しかも、同じ原理で他のエピジェネティック化学修飾への作用を検出するレポーターマウスを容易に開発可能となるよう、システムとしての発展性を持たせてある。これにより、エピジェネティック毒性の毒性試験への導入が促進されると期待できる。

野生型マウス



エピジェネティック毒性
レポーターマウス



Fig.1 エピジェネティック毒性レポーターマウス
本研究で開発するマウスを用いることで、通常毒性試験における組織解析時にマーカーによって容易にエピジェネティック毒性の有無を検出可能となる。図は脳海馬領域を例とした模式図

2. 研究の目的

化学物質影響がゲノムに記憶されるエピジェネティック毒性の重要性が指摘されているが、そのリスクへの対応はほとんど進んでいない。その原因として、エピジェネティック毒性検出手法が高度な生化学解析技術を要するために毒性試験となじまず、毒性試験データからエピジェネティック毒性を検出することが容易ではないことがあげられる。本研究では、遺伝子組換え技術を駆使し、観察が容易なマーカーによってエピジェネティック毒性の有無を検出するレポーターマウスを開発する。それにより、通常毒性試験時に高度な技術を必要とせずにエピジェネティック毒性の有無を判定できる「個体レベル評価システムの構築」を目指す。

3. 研究の方法

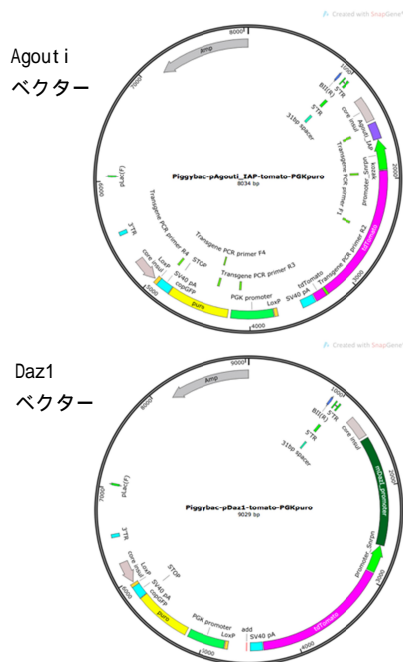
すべての動物実験は、星薬科大学動物実験規程に則り動物実験委員会の承認を経て実施した。またすべての遺伝子組換え実験は星薬科大学組換え DNA 安全委員会の承認を経て実施した。

本研究は、1) 提案するレポーターマウス作製に必要なベクターの構築、2) 培養細胞を用いた検討、3) 既知の DNA 脱メチル化物質アザシチジンをを用いた有用性検証、4) その結果を反映させたレポーターマウス作製の4つのステップに分けて実施した。

(1) ベクター構築

Imprint 遺伝子由来の minimal promoter である Snrpn promoter の上流に標的配列と

して Agouti, Daz1 の promoter 配列を連結し、レポータータンパク質として tdTomato を採用し、薬剤耐性マーカーとして puromycin 耐性遺伝子を導入した下図のベクターを設計・構築した。



(2) 培養細胞を用いた検討

PiggyBac system により、HEK293T 細胞に構築したレポーターベクターを導入した。各ベクターと transposase 発現ベクターを同時に transfection し、レポーターがゲノムに組み込まれた細胞を puromycin で選択圧をかけることにより選択した。

(3) アザシチジンを用いた検証

Puromycin で選択した HEK293T 細胞に対し、既知 DNA 脱メチル化物質である 5-azacytidine (2 μM) を添加し 6 日後にレポーター応答を検討した。

(4) レポーターマウス作製

構築したベクターを受精卵に注入し、PiggyBac system により transgenic マウスを作製した (CYAGEN 社に委託)。

4 . 研究成果 (結果と考察)

(1) ベクター構築

研究開始当初、レポーターマウス作製に必要なベクターの構築に際し、人工的に設計した標的配列に能動的に DNA メチル基を導入し続けることによりレポーター応答を抑える方針を採用した。しかしそれでは DNA のメチル化亢進を検出しにくいこと、生体を反映しない特殊な DNA メチル化変化を捉えること

になりかねないことから、生体を反映した標的配列を選択し直すこととした。そこで、imprint 遺伝子由来の minimal promoter である Snrpn promoter を検討したところ、近傍のメチル化状態と連動してメチル化変動し、レポーター応答に反映可能である結果が得られた。この Snrpn promoter の上流に標的配列として Agouti, Daz1 の promoter 配列を連結し、レポータータンパク質として tdTomato を採用し、薬剤耐性マーカーとして puromycin 耐性遺伝子を導入した各ベクターを設計・構築した。Agouti は中程度の DNA メチル化を示し、Daz1 は生殖細胞系列以外では高 DNA メチル化を示すレポーターとして採用した。

(2) 培養細胞を用いた検討

PiggyBac system により、HEK293T 細胞に構築したレポーターベクターを導入した。各ベクターと transposase 発現ベクターを同時に transfection し、レポーターがゲノムに組み込まれた細胞を puromycin で選択圧をかけることにより選択した。Fig.2 に Agouti レポーターを導入した場合の細胞コロニーの蛍光画像を示す。上段の - の画像から分かるように、Agouti レポーターを導入しただけの細胞では、細胞が弱く蛍光を発することが確認された。Agouti のプロモーター配列 (Agouti_IAP) は生体内で中程度の DNA メチル化を受けることが知られており、この結果は、Agouti レポーターが予想通りの特性を持つ DNA メチル化レポーターとして機能することを反映するものと考えられた。また、Daz1 レポーターの場合は、Agouti レポーターと異なり、導入しただけではほとんど蛍光を発しないことが確認されている。以上から、構築したレポーターが培養細胞内で、予想される DNA メチル化特性を示すことが示されたと判断した。

AzaC

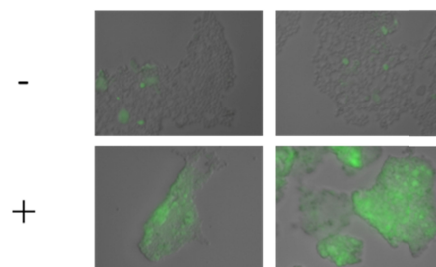


Fig.2 培養細胞を用いたレポーター応答の検討
HEK293T 細胞に Agouti レポーターを導入し、Puromycin で選択した後、AzaC (2 μM) を添加し 6 日後のレポーター応答を検討した。

(3) アザシチジンを用いた検証

Puromycin で選択した HEK293T 細胞に対し、既知 DNA 脱メチル化物質である 5-azacytidine (AzaC: 2 μ M) を添加し 6 日後にレポーター応答を検討した。その結果、Fi.2 下段の + の画像の様に、Agouti レポーター導入細胞において、AzaC を作用させることで蛍光が顕著に強まることが確認された。すなわち、細胞に導入され中程度の DNA メチル化を受けた Agouti_IAP が、AzaC によって DNA 脱メチル化を受け、レポータータンパク質の発現が上昇したことにより蛍光強度が上昇したものと考えられた。この結果から、構築したレポーターは、培養細胞内で DNA 脱メチル化物質の作用を検出可能な性能を有することが確認されたと判断した。

(4) レポーターマウスの作製と検討

構築したベクターを受精卵に注入し、PiggyBac system により transgenic マウス (Tg マウス) を作製した。本工程は CYAGEN 社に委託した。Agouti, Daz1 とともにジェノタイプ陽性の Tg マウスが得られた。納入された Tg マウスにおける蛍光レポーターの発現を Agouti マウスについて多数臓器 (脳、心臓、胸腺、甲状腺、肺、肝臓、胃、腸、腎臓、脾臓、膀胱、精巣、前立腺、子宮、卵巣等を対象とした) においてパラフィン切片を作製し検討したところ、腸において弱い蛍光が認められた。今後、これらの Tg マウスの特性を、AzaC 等の DNA メチル化変化作用を持つ物質を活用しながら検討し、通常毒性試験に適用可能な Tg マウスとして用いることが出来るか検証を進めていく必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

1. Ideta-Otsuka M, Igarashi K, Narita M, Hirabayashi Y. Epigenetic toxicity of environmental chemicals upon exposure during development - Bisphenol A and valproic acid may have epigenetic effects. *Food Chem Toxicol.* 2017;109. (査読あり)
doi:10.1016/j.fct.2017.09.014
2. Furukawa Y, Tanemura K, Igarashi K, Ideta-Otsuka, M, Aisaki, K, Kitajima, S, Kitagawa, M, Kanno, J. Learning and memory deficits in

male adult mice treated with a benzodiazepine sleep-inducing drug during the juvenile period. *Front Neurosci.* 2016;10(JUL). (査読あり)

doi:10.3389/fnins.2016.00339

3. Juliandi B, Tanemura K, Igarashi K, Tominaga, T, Furukawa, Y, Otsuka, M, Moriyama, N, Ikegami, D, Abematsu, M, Sanosaka, T, Tsujimura, K, Narita, M, Kanno, J, Nakashima, K. Reduced Adult Hippocampal Neurogenesis and Cognitive Impairments following Prenatal Treatment of the Antiepileptic Drug Valproic Acid. *Stem Cell Reports.* 2015;5(6):996-1009. (査読あり)
doi:10.1016/j.stemcr.2015.10.012
4. Guo W, Tsujimura K, Otsuka I M, Irie, K, Igarashi, K, Nakashima, K, Zhao, X. VPA alleviates neurological deficits and restores gene expression in a mouse model of rett syndrome. *PLoS One.* 2014;9(6). (査読あり)
doi:10.1371/journal.pone.0100215
5. 五十嵐勝秀, 大塚まき 胎内環境・出生後の環境とエピジェネティクス アレルギー・免疫(医薬ジャーナル) 2014 21巻12号p.46-54 (査読無し)
<https://webview.isho.jp/journal/detail/abs/10.20837/3201412046>

[学会発表](計 10 件)

1. 五十嵐 勝秀, 大塚 まき クリニカルエピゲノム研究に学ぶエピジェネティック毒性 第 44 回日本毒性学会学術年会シンポジウム(招待講演) 2017 年
2. 長谷川 也須子, 水上 さやか, 大塚 (出田)まき, 五十嵐 勝秀, 吉田 敏則, 渋谷 淳 ラットへのオクラトキシン A 反復投与による腎臓における DNA 修復遺伝子 Rad51 及び RNA 翻訳制御遺伝子 Rbm38 のエピゲノム遺伝子発現制御の変化 第 44 回日本毒性学会学術年会 2017 年
3. 五十嵐 勝秀, 大塚 まき エピジェネティック毒性評価の実用化に向けたバイオマーカー探索研究の動向 第 43 回日本毒性学会学術年会 6 ノボ

- ジウム(招待講演) 2016 年
4. 五十嵐 勝秀, 大塚 まき, 成田 年 エピジェネティック毒性研究の現状と今後の展開 日本薬学会第 136 年会, シンポジウム(招待講演) 2016 年
 5. 五十嵐 勝秀, 大塚 まき エピジェネティック毒性研究の現状 第 42 回日本毒性学会学術年会、シンポジウム(招待講演) 2015 年
 6. 五十嵐 勝秀, 大塚 まき, 中島 欽一, 成田 年 DNMT3L 部分配列を用いた人為的 DNA メチル化亢進技術開発の試み 第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会 2014 年
 7. 大塚 まき, 中島 欽一, 加藤 忠史, 成田 年, 五十嵐 勝秀 マウスセロトニントランスポーターの背側縫線核特異的発現に関わる低 DNA メチル化領域の探索 第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会 2014 年
 8. 五十嵐 勝秀, 大塚 まき, 中島 欽一 今後のエピジェネティック毒性研究への提言 第 41 回日本毒性学会学術年会(招待講演) 2014 年
 9. 木村 文香, 野口 浩史, 大塚 まき, 五十嵐 勝秀, 今村 拓也, 波平 昌一, 中島 欽一 神経細胞特異的 DNMT1 欠損マウスにおける不安様行動誘発メカニズムの解明 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年
 10. 大塚 まき, 中島 欽一, 加藤 忠史, 成田 年, 五十嵐 勝秀 マウスセロトニントランスポーター発現の DNA メチル化依存的制御領域の探索 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年

〔図書〕(計 1 件)

五十嵐 勝秀 他、エピジェネティクスと病気、2013、総ページ数 280 (p.142-147)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五十嵐 勝秀 (IGARASHI Katsuhide)
 星薬科大学・薬学部・創薬科学科・教授
 研究者番号：30342885

(2) 研究分担者

大塚 まき (OTSUKA Maky)
 星薬科大学・先端生命科学研究所・先端生命科学
 科学研究センター・特任助教
 研究者番号：40734372

山本 直樹 (YAMAMOTO Naoki)
 星薬科大学・先端生命科学研究所・先端生命科学
 科学研究センター・特任助教
 研究者番号：50757432

大久保 佑亮 (OKUBO Yusuke)
 国立医薬品食品衛生研究所・主任研究官
 研究者番号：80596247

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()