

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01882

研究課題名(和文)新規開発レポーターマウスを用いた実践的エピジェネティック毒性評価システムの確立

研究課題名(英文) Establishment of practical epigenetic toxicity evaluation system using newly developed reporter mice

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) 11,200,000円

研究成果の概要(和文)：分子細胞生物学の隆盛により、毒性学分野でも化学物質のエピジェネティック作用が問題視され始めています。我々はそのような毒性をエピジェネティック毒性と命名し、化学物質のエピジェネティック作用を簡便に検出可能なレポーターアッセイ系を開発しました。2種類のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子やtdTomato遺伝子をレポーターとして接続しました。陽性化学物質としてアザシチジンを選び本システムを検討し、アザシチジンによりレポーター活性が上昇すること、その際、DNAメチル化が実際に減少していることを確認しました。本システムは今後様々な化学物質のスクリーニング系として活用されることが期待されます。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エピジェネティック毒性は潜在的リスクとして認識されていますが、実際にエピジェネティック毒性を有することが報告されている化学物質は多くありません。その理由として、エピジェネティクスには高度な分子細胞生物学的手法が必要なためと考えられます。そのような手法は毒性試験を主とする研究現場には馴染みが薄く、その結果エピジェネティック毒性が検討されないままになっています。本研究で開発したアッセイ系は培養細胞に化学物質を処理し、溶解液中の酵素活性を測定するだけで済みます。これなら毒性試験の現場でも導入可能であり、今後エピジェネティック毒性検出に活用されることが期待されます。

研究成果の概要(英文)：With the rise of molecular and cellular biology, the epigenetic effects of chemicals have begun to be recognized as a problem in the field of toxicology. We named such toxicity epigenetic toxicity and developed a reporter assay system that can easily detect epigenetic effects of chemicals by connecting luciferase gene and tdTomato gene as reporters downstream of two promoters. We selected azacytidine as a positive chemical and examined this system, and confirmed that azacytidine increased the reporter activity and actually decreased DNA methylation. It is expected that this system will be used as a screening system for various chemicals in the future.

研究分野：分子細胞毒性学

キーワード：エピジェネティクス DNAメチル化 化学物質 エピジェネティック毒性

## 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。

一方で、エピジェネティック毒性を有する化学物質はほとんど増えていない印象に留まっている。その理由は、エピジェネティックな状態を解析するためには高度な分子細胞生物学的手法が必要であり、毒性試験となじまず、化学物質のエピジェネティック作用が見逃されてしまっているためであると考えられる。そこで我々は、化学物質のエピジェネティック作用を簡便かつ正確に定量可能な手法を開発することが必要であると考えた。

## 2. 研究の目的

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もしくは定量測定が可能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 *in vitro* 実験系を開発することとした。そしてその結果を受けて、同じ原理により全ての細胞でエピジェネティック作用の有無を検出するレポーターマウス作製を試みる。以上により、通常毒性試験時に高度な技術を必要とせず、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システム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用いた有用性検証、(4) その結果を反映させた各種化学物質のエピジェネティック作用判定、の4つのステップに分けて実施した。

## 4. 研究成果

### (1) ベクター構築

本研究では、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-IAP または Daz1 の promoter 配列を連結し、レポータータンパク質として luciferase (NanoLuc)、tdTomato を採用し、各ベクターを設計・構築した。Agouti-IAP 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 (Fig.1)。

### (2) 培養細胞を用いた検討

培養細胞へのベクター導入には、PiggyBac トランスポゾンシステムを用いた。これによりレポーターコンストラクトがゲノムに組み込まれる。まずヒト胎児腎臓由来細胞の細胞株である HEK293T にベクターを導入し、ルシフェラーゼ活性、tdTomato の発現を確認し、DNA 脱

メチル化作用が既知であるアザシチジンを用いた検討を行ったところ、後述するように、HEK293T 細胞ではアザシチジンの脱メチル化作用が検出出来なかった。その理由として、HEK293T ではベクターがゲノム上の「開いた」領域に優先的に組み込まれ、基本レベルのメチル化程度が低く、アザシチジンでさらに脱メチル化が生じてもしレポーター遺伝子の発現に違いが出るほどの DNA メチル化変化は得られなかったのではないかと推察した。実際、パイロシーケンスによって Agouti-IAP、Daz1 promoter の DNA メチル化を定量したところ、10%未満という低い値であることが確認された。

HEK293T 細胞での基本レベルの DNA メチル化が低いことを踏まえ、細胞をマウス神経芽細胞腫由来の Neuro-2a に変えて検証した。各ベクターを導入し、アザシチジンの DNA 脱メチル化作用を検出出来るか検討したところ、アザシチジンの濃度依存的なルシフェラーゼ活性の上昇が認められた(Fig. 2)。そこで以降の検討では Neuro-2a 細胞を用いることとした。

### (3) アザシチジンを用いた有用性検証

Neuro-2a を用いればアザシチジンの作用を検出可能であることが判明したので、陽性対象物質として DNA 脱メチル化作用検出用にアザシチジン(5-azaC (Sigma-Aldrich Co.LLC., St.Louis, MO) 5-azadC (Abcam, CB, UK)) DNA メチル化亢進として DNA 脱メチル化を促進する酵素 TET の阻害剤(2-HG (Cayman Chemical)) を選び検討した。その結果、Fig.2 に示すように、アザシチジンの濃度依存的なルシフェラーゼ活性の上昇を認めた。次に、2-HG の DNA メチル化亢進作用を検出出来るか試したが、ルシフェラーゼ活性の変化は認められなかった。その理由として、TET はゲノム全体の DNA メチル化量を制御するのではなく、特定の転写因子を始め様々な因子により特定された限られたゲノム領域の DNA メチル化亢進を担うと考えたと説明がつく。すなわち、Agouti-IAP、Daz1 プロモーターともに TET の標的 DNA ではなく、TET 活性を阻害してもその DNA メチル化には影響を及ぼさなかったものと考えられた。

次に、アザシチジン処理により Agouti-IAP に実際に DNA の脱メチル化が生じているかをパイロシーケンス法によって検討した。その結果、Fig.3 に示したように、Agouti-IAP の 8 ケの CpG のうち、5 番目までの CpG に DNA メチル化の低下が認められた。6 番目から 8 番目までの CpG については逆に若干 DNA メチル化が上昇したが、その理由は不明である。

以上から、本システムは少なくとも化学物質の DNA 脱メチル化作用を検出可能なアッセイ系として確立出来たと判断した。

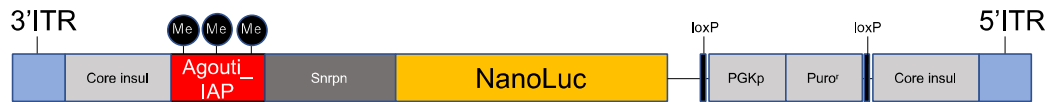
### (4) 各種化学物質のエピジェネティック作用判定

次に、確立した本システムを用いて各種化学物質、BPA (Bisphenol A: FUJIFILM Wako Pure Chemical) とパラベン (Sigma-Aldrich Co.LLC) のエピジェネティック作用を検討した。その結果、Fig.4 に示したように、両物質とも DNA メチル化影響は示さなかった。

以上、本研究により *in vitro* 細胞培養系にて化学物質の DNA メチル化影響を定量測定可能な手法として確立した。一方で *in vivo* マウス個体システムについては開発が難航している。その理由として、当初予定していた蛍光タンパク質のみをレポーター遺伝子とする方法では定量性に難があることが判明したことがあげられる。よって、DNA メチル化レポーターマウス開発を継続するにあたっては、レポーターとしてルシフェラーゼも用いるなど、レポーターの定量性の観点から設計を見直す必要があると考えている。

A

## Agouti IAP



B

## Daz1 promoter



Fig.1 . 本研究におけるDNAメチル化レポーターユニットの模式図。

(A) Agouti IAP プロモーターユニット (B) Daz1 プロモーターユニットを示す。レポーターユニットを細胞ゲノムに組み込ませるために Piggy Bac トランスポゾンシステムを用いる。そのため両末端に Core Insulator 及び、5',3' -ITR を付加した。

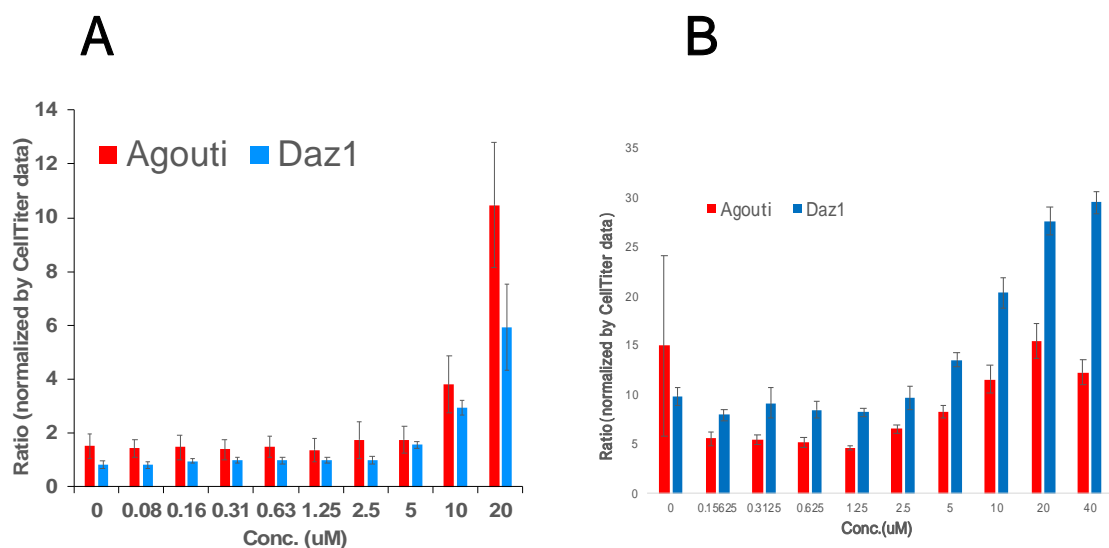


Fig. 2. Neuro-2a 細胞株における Agouti IAP と Daz1 promoter の 5-azaC (A) と 5-azadC (B) の活性検出結果。5-azaC 10uM からルシフェラーゼ活性上昇が見られ DNA 脱メチル化活性の検出が確認できた。

**A** TGATTGCTGCAGCCCATGGC<sup>C<sup>1</sup></sup>GAGCTGA<sup>C<sup>2</sup></sup>GTTCA<sup>C<sup>3</sup></sup>G  
 GGAAAAACAGGTACAAGTGGT<sup>C<sup>4</sup></sup>GTAAATACCCTTGGCT  
 CATG<sup>C<sup>5</sup></sup>GCAGTTATTTGTTTACCAACTTAGAACACAGGA  
 TGTCAG<sup>C<sup>6</sup></sup>GCCATCTTGTGA<sup>C<sup>7</sup></sup>GG<sup>C<sup>8</sup></sup>GAATGTGGGGG<sup>C<sup>G</sup></sup>  
 GCTTCCCAC

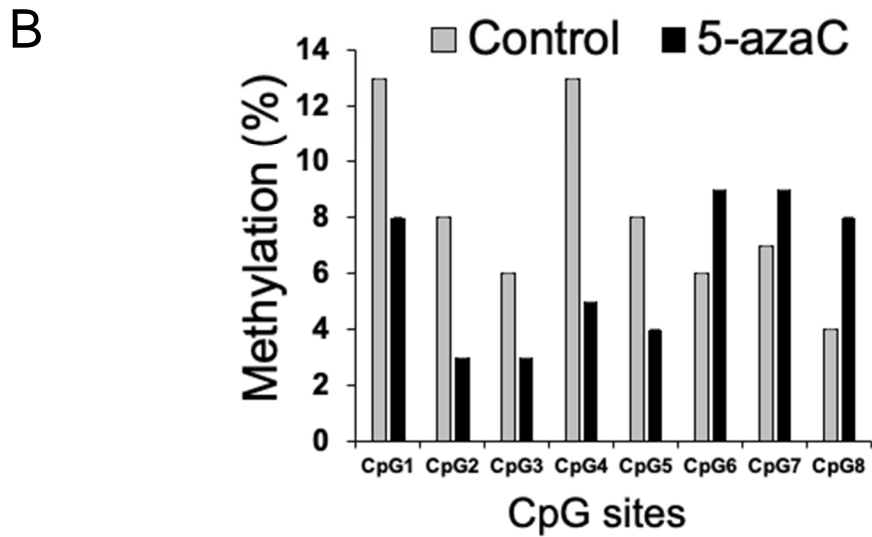


Fig.3 Agouti IAP におけるパイロシーケンス解析の対象 CpG 部位(A)と Agouti IAP プロモーターの CpG メチル化レベル(B)の測定。5-azaC 処理により CpG1～CpG5 まで DNA メチル化低下傾向が確認できた。

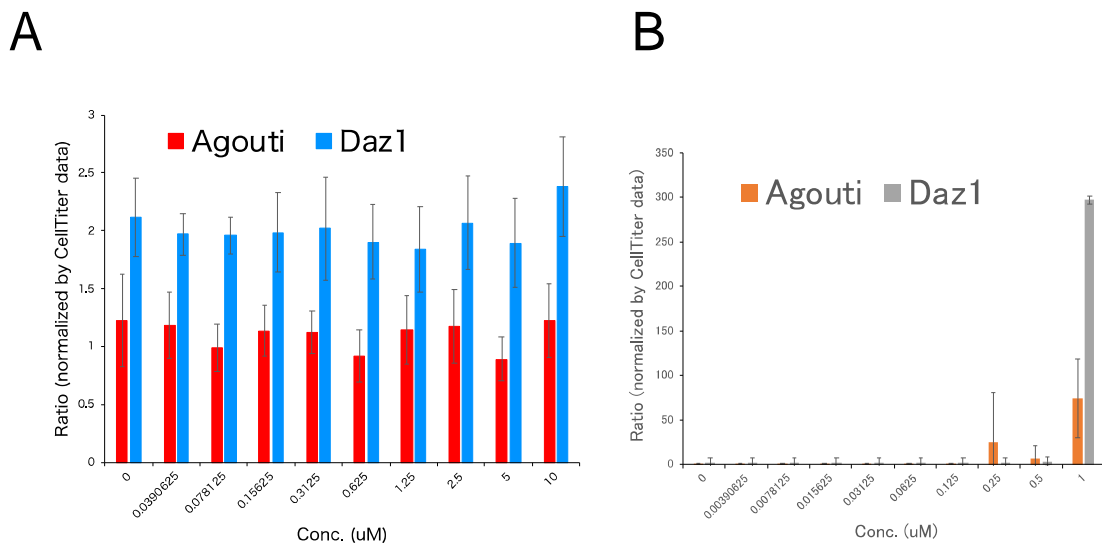


Fig. 4 Neuro-2a 細胞株における Agouti IAP と Daz1promoter の Bisphenol A (A)と Paraben (B)の活性結果。両物質ともに活性は認められなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Ideta-Otsuka M, Miyai M, Yamamoto N, Tsuchimoto A, Tamura H, Tanemura K, Shibutani M, Igarashi K.	4. 巻 46
2. 論文標題 Development of a new in vitro assay system for evaluating the effects of chemicals on DNA methylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Toxicol Sci.	6. 最初と最後の頁 83-90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2131/jts.46.83.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka T, Nakajima K, Masubuchi Y, Ito Y, Kikuchi S, Ideta-Otsuka M, Woo GH, Yoshida T, Igarashi K, Shibutani M.	4. 巻 44
2. 論文標題 Aberrant epigenetic gene regulation in hippocampal neurogenesis of mouse offspring following maternal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Toxicol Sci.	6. 最初と最後の頁 93-105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2131/jts.44.93.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi K, Kuze J, Abe S, Takehara S, Minegishi G, Igarashi K, Kitajima S, Kanno J, Yamamoto T, Oshimura M, Kazuki Y.	4. 巻 96
2. 論文標題 CYP3A4 Induction in the Liver and Intestine of Pregnane X Receptor/CYP3A-Humanized Mice: Approaches by Mass Spectrometry Imaging and Portal Blood Analysis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 600-608
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/mol.119.117333.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe Y, Abe H, Nakajima K, Ideta-Otsuka M, Igarashi K, Woo GH, Yoshida T, Shibutani M.	4. 巻 163
2. 論文標題 Aberrant Epigenetic Gene Regulation in GABAergic Interneuron Subpopulations in the Hippocampal Dentate Gyrus of Mouse Offspring Following Developmental Exposure to Hexachlorophene.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Toxicol Sci.	6. 最初と最後の頁 13-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/toxsci/kfx291.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sakai K, Ideta-Otsuka M, Saito H, Hiradate Y, Hara K, Igarashi K, Tanemura K.	4. 巻 498
2. 論文標題 Effects of doxorubicin on sperm DNA methylation in mouse models of testicular toxicity.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 674-679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.03.044.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamashita M, Inoue K, Saeki N, Ideta-Otsuka M, Yanagihara Y, Sawada Y, Sakakibara I, Lee J, Ichikawa K, Kamei Y, Imura T, Igarashi K, Takada Y, Imai Y.	4. 巻 145
2. 論文標題 Uhrf1 is indispensable for normal limb growth by regulating chondrocyte differentiation through specific gene expression.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev157412
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.157412.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ideta-Otsuka Maky, Igarashi Katsuhide, Narita Minoru, Hirabayashi Yoko	4. 巻 109
2. 論文標題 Epigenetic toxicity of environmental chemicals upon exposure during development - Bisphenol A and valproic acid may have epigenetic effects	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Food and Chemical Toxicology	6. 最初と最後の頁 812 ~ 816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fct.2017.09.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 五十嵐 勝秀、大塚(出田) まき、成田 年	4. 巻 137
2. 論文標題 エピジェネティック毒性研究の現状と今後の展開	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 265 ~ 271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.16-00230-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Yasuko, Aizawa Akira, Takizawa Takumi, Igarashi Katsuhide, Hatada Izuho, Arakawa Hirokazu	4. 巻 10
2. 論文標題 Changes in DNA methylation in naive T helper cells regulate the pathophysiological state in minimal-change nephrotic syndrome	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13104-017-2719-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sanosaka Tsukasa, Imamura Takuya, Hamazaki Nobuhiko, Chai MuhChyi, Igarashi Katsuhide, Ideta-Otsuka Maky, Miura Fumihito, Ito Takashi, Fujii Nobuyuki, Ikeo Kazuho, Nakashima Kinichi	4. 巻 20
2. 論文標題 DNA Methylome Analysis Identifies Transcription Factor-Based Epigenomic Signatures of Multilineage Competence in Neural Stem/Progenitor Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2992 ~ 3003
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2017.08.086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sagara A, Karasawa T, Igarashi K, Otsuka M, Sugiura R, Kodama A, Yamashita M, Narita M, Kato Y.	4. 巻 40
2. 論文標題 11.Controlled Secretion of the Anticancer Protein MDA-7 from Engineered Mesenchymal Stem Cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 113-117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b16-00658.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大塚まき、五十嵐勝秀
2. 発表標題 疾患におけるエピゲノム変化の解析とエピゲノム調節をターゲットにした治療法の開発
3. 学会等名 第25回日本未病システム学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 五十嵐 勝秀, 大塚 まき
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第44回日本毒性学会学術年会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第44回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 五十嵐 勝秀, 山本 直樹, 大塚 まき
2. 発表標題 内分泌かく乱化学物質とエピジェネティクス
3. 学会等名 環境ホルモン学会第20回研究発表会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	大塚 まき  (Otsuka Maky)  (40734372)	星薬科大学・先端生命科学研究所・特任助教   (32676)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	山本 直樹  (Yamamoto Naoki)  (50757432)	星葉科大学・先端生命科学研究所・特任助教     (32676)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関