

令和元年6月3日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02830

研究課題名(和文) 環境化学物質曝露レベルに着目したエピゲノム刻印探索のためのMSD-AFLP法応用

研究課題名(英文) Application of MSD-AFLP method to explore epigenetic imprints focusing on exposure levels of environmental chemicals

研究代表者

大迫 誠一郎 (OHSAKO, Seiichiroh)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・准教授

研究者番号：00274837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：内分泌かく乱物質化学物質など環境因子に胎児期新生児期に曝露されると、DNAメチル化等のエピゲノムに変化が生じ、成熟も残るとされる。前世紀後半から先進国で増加傾向にあるとされる尿道下裂も環境因子の影響が示唆されているが結論が着いていない。本研究では、ゲノムワイドDNAメチル化プロファイル解析法であるMSD-AFLPを応用し、尿道下裂および包茎患者の臨床サンプルを解析した。その結果、尿道下裂患者と包茎患者の間でメチル化レベルの異なる変化が検出された。またその頻度は血液DNAの方が包皮サンプルより顕著であった。MSD-AFLP法は疾患特異的メチル化CpG探索に有用なツールとなると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、胎児期の化学物質曝露により発症が増加することが指摘されている尿道下裂の臨床サンプルを用いて、血液サンプルから病態に特異的なDNAメチル化と思われる変化を検出した。化学物質の曝露が如何にヒトの病態に影響を与えるかを調査する際、従来法では解らなかつた曝露の痕跡を見いだせる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The prenatal and neonatal exposure to environmental factors such as endocrine disrupting chemicals has been considered to occur epigenetic alterations such as DNA methylation and the changes are persisted in adulthood. Hypospadias, which is reported to be increased in developed countries since the latter half of the last century, has also been suggested to be caused by environmental factors. However, it is still unclear. In this study, we applied the MSD-AFLP, a method for genome-wide DNA methylation profile analysis, to analyze clinical samples of patients with hypospadias and phimosis. As a result, different changes in methylation levels were detected between the hypospadias and the phimosis. The frequency was more pronounced in blood DNA than foreskin DNA. The MSD-AFLP method could be a useful tool to search for disease-specific methylated-CpGs.

研究分野：環境毒性学

キーワード：DNAメチル化 尿道下裂 環境汚染物質 MSD-AFLP 血液

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

DNA メチル化を中心とする DNA 配列以外の核内情報としてのエピゲノムは、環境因子により多様に变化する。エピゲノムの变化は成熟後も記憶されるため、エピゲノム刻印とも呼ばれ、病態の感受性など目に見えない表現型に影響する。環境適応現象と考えられるこのようなプロテオミクス変異は、個体発生過程のエピゲノムがナイーブな時期の環境因子曝露で生じると考えられる。社会医学的には DOHaD 仮説とも呼ばれ、子どもを取り巻く環境因子の重要性の根拠ともなっている。低線量放射線問題も特に子どもへの目に見えない影響が問題視されており、環境因子によるエピゲノム刻印の分子機構の解明は喫緊の課題でもある。

一方、実験動物レベルでは、環境化学物質や生育環境、栄養などの影響で特定の組織における DNA メチル化に不可逆的变化が起き、遺伝子発現や動物の表現型を変化させる事が、実際に数多く報告されている。胎児性水俣病の原因物質であるメチル水銀 (MeHg) に関しては、脳高次機能との関連から DNA メチル化に影響があることが報告されている[1]。またダイオキシン (2,3,7,8-TCDD) も脳下垂体のエピゲノムに刷り込みをかけることが、九州大学の山田英之博士らのグループにより報告されている[2]。申請者らも、TCDD を胎児期曝露された動物では、成熟後に肝臓 Cyp1a1 遺伝子誘導率が増加し、プロモーター領域の DNA 低メチル化とヒストン高アセチル化が原因であること、さらに成熟後の変異原物質投与で、Ahr の Cyp1a1 プロモーター領域への結合が延長し、発ガン感受性が亢進すること認めている[3]。

発達障害・学習機能障害・慢性免疫疾患・生殖機能障害も胎児期の環境因子や化学物質曝露によって引き起こされ、病態として目に見えない形で記憶されると考えられているが、ヒトの集団内でこのような仮説を検証することは極めて困難である。対象となる組織は中枢神経組織、造血組織、生殖器官などを構成する細胞であり、サンプリングが出来ないからである。したがって、ヒトの集団における化学物質曝露が、特定の病態を引き起こす機構として DNA メチル化異常を介しているか、まず標的を絞って臨床サンプルを用いた詳細な検証が必要である。

## 2. 研究の目的

本研究では、近年独自開発した高感度なメチル化プロファイリング法である MSD-AFLP を用いて[4]、尿道下裂 (HS) 患者と包皮 (PM) 患者の臨床サンプルとして、この手法のヒト検体におけるエピゲノム解析の有効性を検討した。包皮と血液サンプルを用い、尿道下裂に特異的なメチル化 CpG の探索を行った。また、尿中元素分析を ICP-MS で実施した。

## 3. 研究の方法

研究開始に際しては事前に名古屋市立大学、福島県立医科大学および解析する東京大学において倫理審査委員会の審査を受けた。名古屋市立大学および福島県立医科大学において、被験者両親の同意に基づきインフォームドコンセントを取った。のち、HS 患者および PM 患者各 3 名 (1~2 歳齢) の外科手術時に採取した包皮を RNAlater にて浸漬保存した。また、同一患者の血液をヘパリン採血した。さらに同一患者から採尿も行った。尿道下裂及び埋没陰茎患者の尿サンプルを ICP-MS を用いた尿中の元素解析を行った。解析はエイキット株式会社 (大垣市、岐阜、日本) に委託した。包皮および血液から回収した DNA を一次制限酵素 *Sbf* I および非メチル化感受性制限酵素 *Msp* I で消化し、続いて DNA 断片の末端にアダプター A でライゲーションした。連結した DNA 断片を *Hpa* II で処理、アダプター B のライゲーション反応を行い、アダプター A および B 特異的プライマーを用いた Pre-PCR によって、メチル化 CpG 含有 DNA 断片のみを増幅した。この Pre-PCR アンプリコン (MSD ライブラリー) を 6-FAM ラベルプライマーによる、総数 256 組の選択的 PCR によって増幅した。選択的 PCR 産物をシーケンサーで分離し AFLP 分析した。AFLP ピークチャートからのゲノム位置の予測は、GFDB システムを用いて行った。また、MSD-AFLP 解析結果に影響を与える制限酵素配列及び選択塩基上における SNP の頻度を dbSNP ver142 の情報をもとに調べた。グループ間のメチル化レベルの差は、Microsoft Office Excel で、Student'-t 検定によって解析した。メチル化パターンの階層的クラスタリング分析は、Cluster3.0 と javaTreeView を用いて、ユークリッド距離、群平均法で行った。

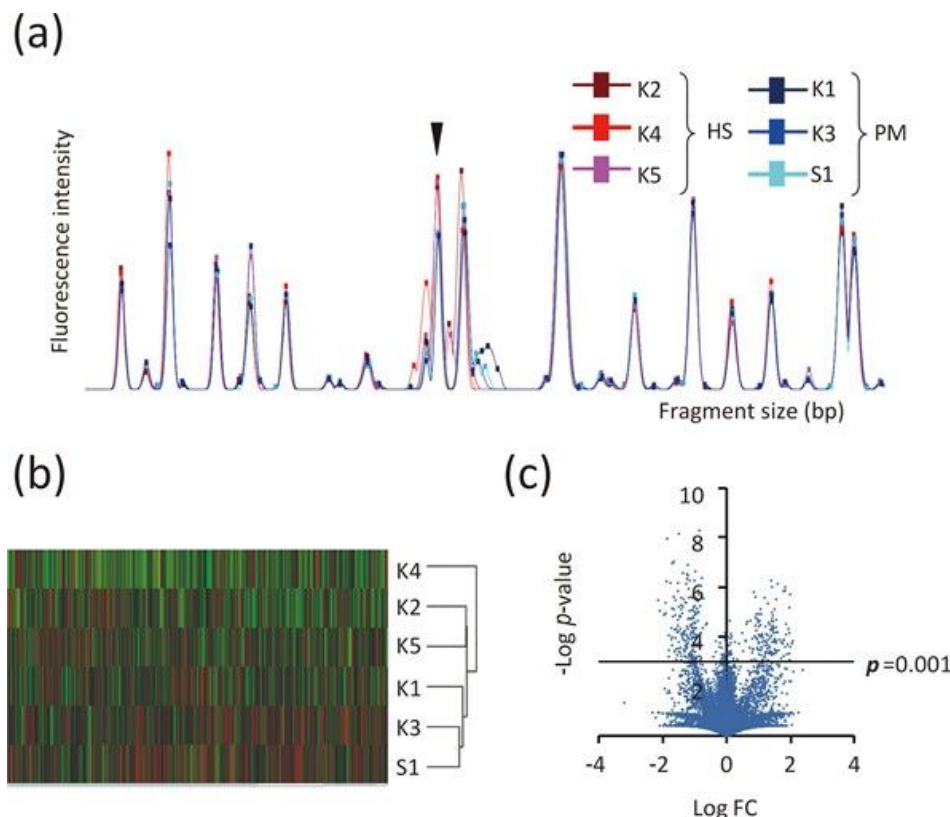
## 4. 研究成果

解析した 61 元素において 47 元素は検出限界以下であった。インドでの疫学調査では、カドミウムと鉛の血中濃度が高い場合、尿道下裂のリスクが高くなることが報告されているが、本研究では両元素とも検出限界以下であった。その他検出された元素では、症例間で尿中濃度に統計学的有意差はなかった。しかし、HS 患者 2 検体でルビジウムとカリウムが高く、ナトリウムが低い傾向にあった。HS 患者では高カリウム低ナトリウム血症が併発することがあることが報告されており、因果関係を含め更なる検討が必要と思われる。

包皮サンプル DNA で、HS 患者と PM 患者間でピークの高さが異なる CpG を MSD-AFLP により検出した。包皮サンプル DNA で検出された全 47,750 CpG にて階層的クラスタリングを行ったが、HS 患者と PM 患者間でクラスターは形成されなかった。さらに t 検定 ( $p < 0.001$ ) を行ったところ、HS 患者の方が有意に高いピークを示す CpG は 14 で、一方低い CpG は 13 で、計 27 CpG で HS 患者と PM 患者の違いを検出できた。有意にピークの高さが異なる CpG に関して GFDB システムを用いて検索し 5 CpG を同定した。*MYH11* 遺伝子のプロモーター領域と推定される CpG と *PLA2G15* 遺伝子上の CpG が含まれていた。*MYH11* はエストロゲン様物質曝露で陰茎に

においてダウンレギュレーションされる平滑筋細胞分化のバイオマーカーとして報告されている[5]。尿道下裂患者の包皮における分化異常の痕跡を捕らえられたと考えられる。

次に、血液サンプルDNAでも、全ピーク 47,889 の CpG が検出された(図 a, ピークチャート事例)。HS 患者と PM 患者で階層的クラスタリングを行ったところ、包茎患者間でクラスターが形成された(図 b)。さらに t 検定 ( $p < 0.001$ ) を行ったところ、HS 患者の方が有意に高いピークを示す CpG は 168、有意に低い CpG は 228 で計 396 CpG で HS と PM の違いを検出できた。図 c でその Volcano plot を示す。次に有意にピークの高さが異なる CpG に関して GFDB システムを用いて検索し、38 CpG を同定した。さらに、dbSNP で制限酵素配列及び選択塩基上における既報の SNP の頻度を調べ、SNP 影響の少ないと思われる CpG を表に示した。血液 DNA における HS 患者特異的なメチル化 CpG である可能性がある。



**Table** CpGs showing significant differences in methylation levels between hypospadias and phimosis in the blood DNAs

Chr.	Position <sup>a</sup>	Gene name <sup>b</sup>	LogFC <sup>c</sup>	p-value <sup>d</sup>
5	156091371	<i>SGCD1</i>	0.42	0.0001
14	62709877	14.7 kbp up-stream of <i>AL390816.1</i>	0.26	0.0006
9	27184052	<i>TEK</i>	-0.2	0.0005
19	35160325	7.8 kb up-stream of <i>ZNK302</i>	-0.29	0.0007
5	64505996	<i>ADAMTS6</i>	-0.32	0.0005
12	247895	<i>IQSEC3</i>	-0.33	0.0005

<sup>a</sup> Chromosomal position determined by GFDB.

<sup>b</sup> Name of gene nearest to the target CpG.

<sup>c</sup> FC; Fold change, (ratio of signal level in hypospadias to that in phimosis).

<sup>d</sup> Student's t-test.

前世後半から米国、オーストラリア、ヨーロッパなどの先進国では、男性の生殖器系異常、特に尿道下裂が増加傾向にある[6]。この増加の原因に関してフタル酸エステル、重金属、polychlorinated biphenyl (PCB)などの環境中の内分泌かく乱物質化学物質への曝露が注目されてきた[7]。しかしながら、環境要因については結論がついていない。原因遺伝子として遺伝子多型が *SRD5A* 遺伝子や *MAMLD1* 遺伝子に認められている[8,9]。環境因子の観点からエピゲノム研究もなされており、HS 患者の包皮 DNA で *AR* 遺伝子のメチル化が健常人より上昇し、mRNA 発現が減少していることが報告されている[10]。我々も彼らと同様に尿道下裂および包茎の包皮 DNA と RNA を解析し比較したところ、*AR* の発現が尿道下裂で有意に低いという一致した所見を得たものの、Bisulfite genomic sequencing で解析した CpG island ではメチル化は検出できなかった[11]。しかしながら、他の男性ホルモン合成遺伝子である *SRD5A2* では、尿道下裂と包茎でメチル化レベルに有意差は無かったものの、*SRD5A2* ミニマムプロモーターの SP1 サイトのメチ

ル化レベルと CYP1 ファミリーの mRNA 発現レベルに負の相関関係があり、化学物質曝露と尿道下裂発症に何らかの関連性があることが初めて示された[11]。他のグループの研究では、Illumina Infinium® HumanMethylation450 BeadChip を用いて、尿道下裂と健常人包皮 DNA の CpG island のメチル化レベルを比較し、男性ホルモン関連遺伝子にメチル化の差は認められず、SCARBI や MYBPH 等の遺伝子が有意に変化しているとの報告がある[12]。本研究で検出された MYH11 遺伝子も候補かもしれない。

サンプル数を増やすなど更に詳細な解析は必要であるが、今回の研究から独自に開発した MSD-AFLP 法は、疫学研究における疾患特異的メチル化 CpG 探索への有用なツールとなると思われる。

#### 〔引用論文〕

1. Bose, R.; Onishchenko, N.; Edoff, K.; Janson Lang, A.M.; Ceccatelli, S. Inherited effects of low-dose exposure to methylmercury in neural stem cells. *Toxicol. Sci.* **2012**, *130*, 383–90.
2. Takeda, T.; Fujii, M.; Taura, J.; Ishii, Y.; Yamada, H. Dioxin silences gonadotropin expression in perinatal pups by inducing histone deacetylases: a new insight into the mechanism for the imprinting of sexual immaturity by dioxin. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 18440–50.
3. Ohsako, S. Perinatal Exposure to Environmental Chemicals Induces Epigenomic Changes in Offspring. *Genes Environ.* **2011**, *33*, 43–49.
4. Aiba, T.; Saito, T.; Hayashi, A.; Sato, S.; Yunokawa, H.; Maruyama, T.; Fujibuchi, W.; Kurita, H.; Tohyama, C.; Ohsako, S. Methylated site display (MSD)-AFLP, a sensitive and affordable method for analysis of CpG methylation profiles. *BMC Mol. Biol.* **2017**, *18*, 7.
5. Okumu, L.A.; Bruinton, S.; Braden, T.D.; Simon, L.; Goyal, H.O. Estrogen-Induced Maldevelopment of the Penis Involves Down-Regulation of Myosin Heavy Chain 11 (MYH11) Expression, a Biomarker for Smooth Muscle Cell Differentiation1. *Biol. Reprod.* **2012**.
6. Skakkebaek, N.E.; Rajpert-De Meyts, E.; Buck Louis, G.M.; Toppari, J.; Andersson, A.-M.; Eisenberg, M.L.; Jensen, T.K.; Jørgensen, N.; Swan, S.H.; Sapra, K.J.; et al. Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. *Physiol. Rev.* **2016**, *96*, 55–97.
7. Botta, S.; Cunha, G.R.; Baskin, L.S. Do endocrine disruptors cause hypospadias?. *Transl. Androl. Urol.* **2014**.
8. Thai, H.T.T.; Kalbasi, M.; Lagerstedt, K.; Frisén, L.; Kockum, I.; Nordenskjöld, A. The valine allele of the V89L polymorphism in the 5-alpha-reductase gene confers a reduced risk for hypospadias. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2005**, *90*, 6695–8.
9. Fukami, M.; Wada, Y.; Miyabayashi, K.; Nishino, I.; Hasegawa, T.; Nordenskjöld, A.; Camerino, G.; Kretz, C.; Buj-Bello, A.; Laporte, J.; et al. CXorf6 is a causative gene for hypospadias. *Nat. Genet.* **2006**, *38*, 1369–1371.
10. Vottero, A.; Minari, R.; Viani, I.; Tassi, F.; Bonatti, F.; Neri, T.M.; Bertolini, L.; Bernasconi, S.; Ghizzoni, L. Evidence for epigenetic abnormalities of the androgen receptor gene in foreskin from children with hypospadias. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**.
11. Ohsako, S.; Aiba, T.; Miyado, M.; Fukami, M.; Ogata, T.; Hayashi, Y.; Mizuno, K.; Kojima, Y. Expression of Xenobiotic Biomarkers CYP1 Family in Preputial Tissue of Patients with Hypospadias and Phimosi and Its Association with DNA Methylation Level of SRD5A2 Minimal Promoter. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2018**.
12. Choudhry, S.; Deshpande, A.; Qiao, L.; Beckman, K.; Sen, S.; Baskin, L.S. Genome-wide DNA Methylation Profiling of CpG Islands in Hypospadias. *J. Urol.* **2012**.

#### 5 . 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Aiba T, Saito T, Hayashi A, Sato S, Yunokawa H, Maruyama R, Fujibuchi W, and Ohsako S. Does the prenatal bisphenol A exposure alter DNA methylation levels in the mouse hippocampus? : Analysis using a high-sensitivity methylome technique. *Genes Environ* 4;40:12, (2018)(査読有)
2. Kurita H, Aiba T, Saito T, Ohsako S. Detection of dioxin-induced demethylation of mouse Cyp1a1 gene promoter by a new labeling method for short DNA fragments possessing 5'-methylcytosine at the end. *Genes Environ* 10;40:1, (2018)(査読有)
3. Ohsako S, Aiba T, Miyado M, Fukami M, Ogata T, Hayashi Y, Mizuno K, Kojima Y. Expression of xenobiotic biomarkers CYP1-Family in preputial tissue of patients with hypospadias and phimosi and its association with DNA methylation level of SRD5A2 minimal promoter. *Arch Environ Contam Toxicol* 74(2), 240-247, (2018)(査読有)
4. Aiba T, Saito T, Hayashi A, Sato S, Yunokawa H, Maruyama T, Fujibuchi W, Kurita H, Tohyama C, Ohsako S. Methylated site display (MSD)-AFLP, a sensitive and affordable method for analysis of CpG methylation profiles. *BMC Mol Biol* 18(1):7, (2017)(査読有)

5. Amenya HZ, Tohyama C, Ohsako S. Dioxin induces Ahr-dependent robust DNA demethylation of the Cyp1a1 promoter via Tdg in the mouse liver. *Sci Rep* 6:34989, (2016)(査読有)
6. Yamane J, Aburatani S, Imanishi S, Akanuma H, Nagano R, Kato T, Sone H, Ohsako S, Fujibuchi W. Prediction of developmental chemical toxicity based on gene networks of human embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 44(12), 5515-5528, (2016)(査読有)

[学会発表](計 27 件)

1. 相場俊樹、林昭子、齋藤俊行、佐藤伸司、湯野川春信、深見真紀、林祐太郎、水野健太郎、小島祥敬、大迫誠一郎. 尿道下裂発症とエピゲノム変化：MSD-AFLP 法を用いたパイロット研究. 第 89 回日本衛生学会、2019 年 2 月 2 日、名古屋大学東山キャンパス、名古屋
2. 大迫誠一郎、栗田尚佳、齋藤俊行、相場俊樹. 低用量ビスフェノール A の胎仔期曝露はマウス海馬のエピゲノムを変化させるかもしれない. 第 47 回日本環境変異原学会、2018 年 11 月 1 日、京都大学桂キャンパス、京都
3. 相場俊樹、齋藤俊行、林昭子、佐藤信治、湯ノ川春信、大迫誠一郎. MSD-AFLP 法の臨床サンプル解析への応用. 第 16 回分子予防環境医学研究会. 2017 年 2 月 3 日、熊本市国際会館、熊本
4. Hesbon Amanya, Chiharu Tohyama, Seiichiroh Ohsako. Dioxin induces rapid-onset yet durable epigenetic modulation of the Cyp1a1 promoter. *BMB2015*. Kobe 12 月 3 日、神戸国際会議場、神戸
5. Hesbon Amanya, Chiharu Tohyama, Seiichiroh Ohsako. DNA Hypomethylation of the Cyp1a1 Promoter Region by Short Term Dioxin Exposure. 第 42 回日本毒性学会、2015 年 6 月 29 日、ホテル日航金沢、金沢  
(その他 22 件)

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：齋藤 俊行  
ローマ字氏名：SAITO, Toshiyuki  
所属研究機関名：量子科学技術研究開発機構  
部局名：放射線医学総合研究所  
職名：上席研究員  
研究者番号(8桁)：90205667

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：相場 俊樹  
ローマ字氏名：AIBA, Toshiki  
研究協力者氏名：林 昭子  
ローマ字氏名：HAYASHI, Akiko  
研究協力者氏名：佐藤 伸司  
ローマ字氏名：SATO, Shinji  
研究協力者氏名：湯野川 春信  
ローマ字氏名：YUNOKAWA, Harunobu  
研究協力者氏名：深見 真紀  
ローマ字氏名：FUKAMI, Maki  
研究協力者氏名：水野 健太郎  
ローマ字氏名：MIZUNO, Kentaro  
研究協力者氏名：林 祐太郎  
ローマ字氏名：HAYASHI, Yutaro  
研究協力者氏名：小島 祥敬  
ローマ字氏名：KOJIMA, Yoshiyuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。