

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11679

研究課題名(和文) エピジェネティック情報に基づく化学物質による自閉症発症のリスク評価

研究課題名(英文) A risk assessment of autism caused by environmental chemicals using epigenetic information

研究代表者

新井 良和 (ARAI, YOSHIKAZU)

宮崎大学・農学部・助教

研究者番号：90614769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症スペクトラム障害(自閉症)は近年増加する神経疾患であり、大きな社会問題となっている。本研究では環境中の有害な化学物質の影響に着目し、エピジェネティクスにもとづく自閉症発症機序の解明を行った。ヒトiPS細胞の神経細胞分化誘導系による解析の結果、母体環境中から検出される化学物質の一部が、生体暴露範囲の濃度で神経分化を乱した。さらに、化学物質暴露は遺伝子の発現調節機構であるエピジェネティクスを乱し、ゲノムの広範囲に渡って化学物質の影響が確認された。以上の結果は、環境中の化学物質が神経細胞分化、およびエピジェネティック状況に悪影響を与えること示すものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに自閉症の原因遺伝子が多数報告されているが、遺伝子変異のみでは疾患の発症機序を説明できないのが現状である。本研究は自閉症発症について、環境要因として母体環境に含まれる有害な化学物質の影響に着目し、遺伝子の発現記憶装置であるエピジェネティクスをもとに、自閉症の発症機序解明に向けた新たな試みである。本研究結果は、従来の遺伝子変異の特定とともに、環境要因による遺伝子発現制御への影響を検証することの重要性を示すものである。今後、化学物質の影響を受けた遺伝子の詳細な解析によって、遺伝子変異のみでは説明が困難であった自閉症の新たな原因究明に繋がること期待される。

研究成果の概要(英文)：Autism spectrum disorder is a neurological disease that has been increasing in recent years and has become a major social problem. In this study, we focused on the effects of harmful chemicals in the environment and elucidated the pathogenic mechanism of autism based on epigenetic regulation. As a result of analysis using neural differentiation system of human iPS cells, some of the chemicals detected in the maternal environment disturbed the neural differentiation at the concentration in the biological exposure range. In addition, chemical exposure disrupted epigenetics, the regulatory mechanism of gene expression, confirming the effects of chemicals over a wide range of genome. The results indicate that environmental chemicals adversely affect the epigenetic regulation and neural differentiation in vitro.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピジェネティクス iPS細胞 自閉症 神経分化

1. 研究開始当初の背景

自閉症は脳神経回路やシナプス形成異常など、神経細胞の分化異常によって生じる神経疾患である。先進国ではその有病率が1%とも言われているが、有効な治療法は未だ確立されていない。自閉症は遺伝子変異による先天性の遺伝子疾患と考えられており、原因候補遺伝子として神経分化関連を中心に数百個が報告されている。一方で、一卵性双生児であっても発症に個人差が認められ、疾患症状や重篤度も多様である。このことは、遺伝子変異のみでは自閉症の発症機序を説明することは困難であり、発症リスクを高める別の要因の存在を示唆する。自閉症が比較的早期から発症すること、神経細胞の増殖・分化は胎児期が最も盛んであることから、近年、妊娠期の母体環境中に存在する有害な化学物質の影響が懸念されている。事実、疫学調査より、妊娠中に高濃度の農薬や重金属に晒された妊婦や、妊娠中に喫煙歴のある妊婦から生まれた子供は、自閉症の発症リスクが増加する。つまり、母体環境中の化学物質が自閉症発症の一因になる危険性は高いが、どのような化学物質が何に作用して神経細胞の分化異常に関与し、将来の自閉症発症リスクの増加を引き起こすのか、その分子メカニズムは不明である。

2. 研究の目的

本研究では、環境中の化学物質が胎児期の神経分化過程におけるエピジェネティック制御を乱し、このことが神経分化異常の引き金となり、将来の自閉症発症リスクの増加を引き起こす、という仮説のもと、化学物質による神経分化への影響をエピジェネティクスで解明する。

3. 研究の方法

(1) ヒト iPS 細胞から神経幹細胞への分化誘導と化学物質暴露

これまでの研究において、妊娠期の母体血清中から検出される化学物質のうち、生体暴露範囲でヒト iPS 細胞のエピジェネティック状況を乱す 5 種類の化学物質 (DEP, コチニン, S-421, Hg, Se) が同定されている。本研究では、これら 5 種類の化学物質による神経細胞分化への影響を解析するために、ヒト iPS 細胞から神経幹細胞への分化誘導法であるニューロスフィア法を用いた。先行研究で明らかにした 5 種類の化学物質を母体血清中濃度を基準に、それぞれ 14 日間、ニューロスフィアに暴露し、スフィアの大きさ (直径) を指標に化学物質によるニューロスフィア形成への影響を検討した。

(2) RT-PCR を用いた遺伝子発現解析

ニューロスフィアに化学物質を血清中濃度を基準に 14 日間暴露し、神経幹細胞マーカー (3 遺伝子) および神経分化マーカー (4 遺伝子) の発現を RT-PCR で検証した。サンプルとして、5 種類の化学物質の複合暴露群 (5-all) 化学物質の溶媒暴露群 (Solvents) および無処置群 (Non-treat) の計 3 群を使用した。各遺伝子の特異的プライマーで PCR を行い、GAPDH の発現量をともに相対的な遺伝子発現量を算出した。

(3) 神経幹細胞から神経細胞への分化誘導

5 種類の化学物質を 14 日間、母体血清中濃度を基準にニューロスフィアに複合暴露して、その後接着培養によって神経細胞へ分化誘導させた。分化 10 日目に細胞を固定し、抗 TUBB3 抗体を用いた免疫染色で神経細胞を可視化させた。得られた蛍光画像より神経細胞の神経突起長を測定し、化学物質による神経分化への影響を評価した。

(4) ゲノムワイド DNA メチル化解析

Infinium MethylationEPIC BeadChip を用いて、ニューロスフィアにおけるゲノムワイド DNA メチル化解析を行い、5 種類の化学物質の複合暴露群 (5-all) その溶媒暴露 (Solvents) および無処置群 (Non-treat) のデータを取得した。なお、DNA メチル化レベルを 0-1 (低-高メチル化) で示し、解析には主に、無処置群を基準とする複合暴露群、および溶媒暴露群とのメチル化レベルの差を使用した。

4. 研究成果

(1) 環境化学物質は神経幹細胞の発生・分化に影響する

ヒト iPS 細胞から分化誘導させたニューロスフィアに 14 日間、5 種類の化学物質を母体血清中濃度を基準に暴露した結果、それぞれの化学物質の単独暴露はスフィアの大きさ (スフィア径) に影響を与えなかった。一方、5 種類の化学物質の複合暴露 (5-all) は、対照群の溶媒暴露 (Solvents) および無処置 (Non-treat) に比べて、スフィア径の有意な低下を引き起こした (図 1)。このことは、ヒト iPS 細胞のエピジェネティック状況を乱す化学物質の複合暴露は、生体暴

露範囲で神経幹細胞の発生にも悪影響を及ぼすことを示すものである。

(2) 化学物質の複合暴露は神経幹細胞の遺伝子発現を乱す

化学物質暴露がニューロスフィアの発生に影響を与えたことから、次に、化学物質が神経幹細胞の性質に影響を与えるか否か、幹細胞、および神経分化マーカーの遺伝子発現をもとに検証した。ニューロスフィアに 5 種類の化学物質を血清中濃度を基準に複合暴露した結果、神経幹細胞マーカー遺伝子 (*PAX6*, *NES*, *SOX2*) の発現量に化学物質暴露は影響しなかった (図 2)。一方、神経細胞マーカーの遺伝子発現を解析した結果、*MAP2*, *NeuN*, *TUBB3*, *DCX* の発現量が対照群に比べて化学物質暴露群で有意に増加した (図 2)。このことは、使用した化学物質の複合暴露は神経幹細胞の性質を変化させ、一部の細胞では幹細胞としての性質の破綻が生じ始めていることを示すものである。

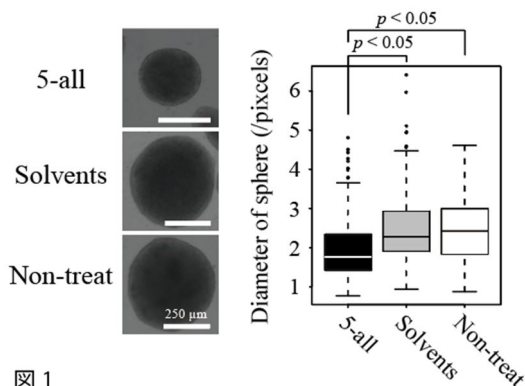


図 1 化学物質の複合暴露はスフィアサイズを低下させる

(3) 化学物質の複合暴露は神経細胞分化を乱す

神経幹細胞(ニューロスフィア)への化学物質暴露により、神経分化マーカー発現に乱れが生じた。この幹細胞の性質の変化が、その後の神経分化に影響するか否かを検討するために、5 種類の化学物質を複合暴露させたニューロスフィアを接着培養させて、神経細胞への分化誘導を行った。解析の結果、化学物質暴露群では対照群に比べて、神経突起が有意に伸長していた (図 3)。このことは、化学物質暴露が神経細胞への分化を促進させることを示すものである。さらに、化学物質を分化前の神経幹細胞のみに暴露した場合でも同様に、その後の神経細胞分化における神経突起の伸長が認められた。このことは、幹細胞の段階で受けた化学物質の影響が、分化後の長期にわたることを示すものである。

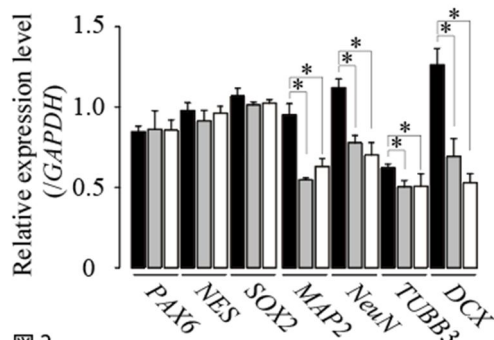


図 2 化学物質暴露は神経分化マーカー遺伝子発現を乱す
黒, 5-all、灰色, Solvents、白, Non-treat、*, p < 0.05

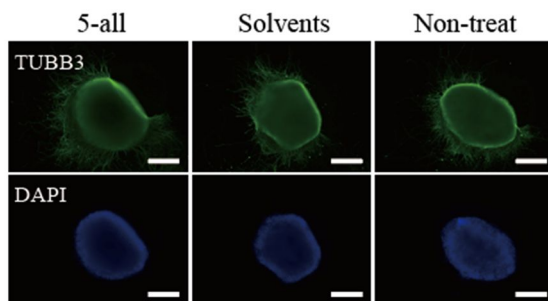
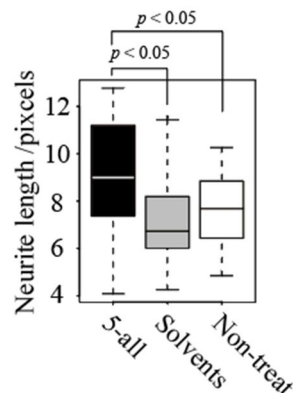


図 3 化学物質暴露は神経分化誘導後の神経突起長を促進させる



(4) 化学物質による神経幹細胞の DNA メチル化への影響

化学物質による神経細胞分化への持続的な影響を解析するために、遺伝子の発現記憶装置であるエピジェネティクスに着目し、Infinium MethylationEPIC BeadChip による神経幹細胞 (ニューロスフィア) でのゲノムワイド DNA メチル化解析を行った。化学物質の複合暴露群 (5-all) と溶媒暴露群 (Solvents) の DNA メチル化データを、それぞれ無処置群 (Non-treat) のデータと比較した結果、いずれにおいても、解析した約 80 万ヶ所のプローブにおける DNA メチル化レベルは無処置群と同等であり、99.97% のプローブではメチル化レベルの違いは 0.05 以下であった (図 4A)。このことは、各解析領域での化学物質による DNA メチル化への影響は非常に小さいことを示す。しかしながら、全解析プローブについて無処置群とのメチル化レベルの差を算出し、その絶対値の総和をプロットした結果、メチル化変動量は溶媒暴露群に比べて複合暴露群で大きくなった (図 4B 左)。さらに、ランダムに 10,000 ヶ所のプローブを抽出して解析した場合でも同様に、化学物質暴露によるメチル化状況の変化は溶媒暴露群に比べて有意に大きくなった (図 4B 右)。このことは、化学物質による小さなメチル化の変化、いわば“傷跡”がゲノム全体にわたって蓄積していることを示すものである。

現在、自閉症研究は国内外で精力的に進められており、疾患発症には遺伝的要因とともに環境要因との相互作用が関与すると考えられている。本研究より、母体環境中から検出される一部の化学物質が、複合暴露によって、生体暴露範囲でヒト iPS 細胞から分化誘導させた神経幹細胞の発生を乱し、さらにその後の神経分化に悪影響を与えることが示された。このことは、母体環境中の有害な化学物質が環境要因として、胎児の神経発生・分化に悪影響を与える可能性を示すものである。さらに、これまでの自閉症研究は遺伝子変異の同定に重きが置かれてきたが、本研究では遺伝子の発現調節機構であるエピジェネティクスに着目し、環境化学物質が神経幹細胞の DNA メチル化状況の変化を引き起こし、その変化がゲノム全体にわたって蓄積していることが示された。このことは、従来の遺伝子変異の探索とともに、エピジェネティクスが神経細胞の分化異常を解き明かす鍵となることを示すものである。今後、本研究で認められたメチル化状況の変化が、どのように神経細胞分化に影響するのかなど、詳細な解析を進めていくことで、従来の遺伝学とともに、環境学とエピジェネティクスを合わせた新たな学問領域として、自閉症発症のメカニズム解明に繋がることが期待される。また、現在、我が国において、環境省が「子どもの健康と環境に関する全国調査(エコチル調査)」として、大規模な化学物質暴露の実態調査を進めている。エピジェネティクスを乱す化学物質は世界的な関心事であり、本研究で見出したエピジェネティクスを基盤とする化学物質の新たなリスク評価は、今後、自閉症を含めた様々な疾患の原因究明や予防法の確立に貢献していくものと考えられる。

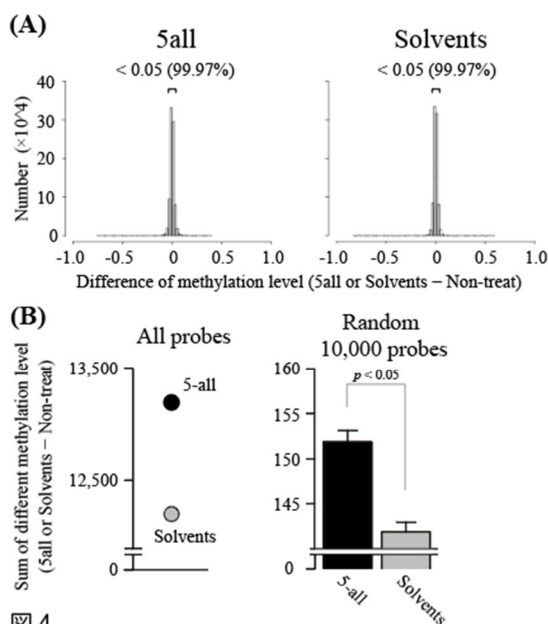


図4 神経幹細胞におけるゲノムワイド DNA メチル化解析 (A) 解析した約 80 万プローブでのメチル化変化の分布図 (B) Non-treat と比較した際のメチル化変動量の絶対値の総和

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Arai Y, Umeyama K, Okazaki N, Nakano K, Nishino K, Nagashima H, and Ohgane J	4. 巻 10
2. 論文標題 DNA methylation ambiguity in the Fibrillin-1 (FBN1) CpG island shore possibly involved in Marfan syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 5287
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-62127-3	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------