

平成 29 年 5 月 13 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293154

研究課題名(和文) 妊娠期の化学物質曝露による孫世代での体細胞突然変異の増加を誘導するエピ変異の探索

研究課題名(英文) Studies on epimutations that are involved in multigenerational effects of environmental chemicals in mice

研究代表者

野原 恵子 (Nohara, Keiko)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・フェロー

研究者番号：50160271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：C3Hマウス雌(F0)の妊娠期に無機ヒ素を投与すると、F1雄を介してF2雄の成長後に肝腫瘍が増加する。その原因として、ヒ素によるF1雄生殖系細胞のエピ変異がF2肝臓に伝えられ体細胞突然変異を増加させて後発的に腫瘍を増加させるという仮説を設定し、エピ変異の解析を行った。対照群とヒ素群F2の正常肝臓および腫瘍組織のゲノムワイドなDNAメチル化状態を次世代シーケンシングを用いたRRBS法によって一塩基単位で明らかにし、腫瘍増加に関連する領域やヒ素曝露特異的に変化する領域を同定した。またヒ素曝露特異的に変化した腫瘍と関連するmicroRNAを同定した。

研究成果の概要(英文)：The F2 pups of C3H mice born to F1 males which are gestationally exposed to arsenic develop liver tumors at higher rates compared to the control mice. We hypothesized that arsenic exposure induces heritable epimutations in the F1 male germ cells and these epimutations cause somatic mutations and tumor increase in the F2 livers. Thus, we analyzed genome-wide DNA methylation status and microRNA composition of the normal and tumor tissues of control and gestationally arsenic-exposed F2 mice by a next generation sequencing-based method and by using microarrays, respectively. We clarified DNA methylation status of normal livers and tumor tissues of C3H mice and identified tumor-associated changes and arsenic exposure-specific changes which correspond to changes in gene expressions. We also identified arsenic exposure-specific expression changes of miRNA whose targets are involved in tumorigenesis. These results shortlisted the candidate genes involved in the F2 effects by arsenic exposure.

研究分野：分子毒性学

キーワード：無機ヒ素 妊娠期曝露 肝腫瘍 F2影響 DNAメチル化 miRNA

1. 研究開始当初の背景

近年、妊娠中の母親F0への環境因子の曝露が多世代影響(子F1および孫F2への影響)や継世代影響(F3以降への影響)を及ぼすという実験的研究結果が報告され、懸念されている(Guerrero-Bosagna & Skinner, 2012)。このような妊娠期曝露の世代を越えた影響の主要なメカニズムとして、エピジェネティクスの関与が考えられる(Perera & Herbstman, 2011)。F1の胎児期の化学物質曝露は、胎児体内の生殖細胞で起こるDNAメチル化などのエピジェネティック修飾のリプログラミングを変化させ、F2以降の世代に影響を及ぼすことが予想されている。

現在世界各国で発癌をはじめとする深刻な健康被害をもたらしている無機ヒ素(ヒ素)は、変異原性の弱い発癌物質であり、その発癌にエピジェネティクスの関与が考えられている。ヒ素の妊娠期曝露の多世代影響に関しては、雄が成長後に肝癌を発症しやすいC3Hマウスで、母マウスの妊娠8日(GD8)からGD18までの10日間ヒ素を含む水を飲ませると、ヒ素は速やかに代謝・排出されてなくなるにもかかわらず、その子(F1)が成長後に肝腫瘍を高率に発症するという実験結果が報告されている(Waalkes et al. 2003)。

筆者野原らはこの実験系において、ヒ素群で増加した肝腫瘍が、体細胞突然変異によって活性化した癌遺伝子 *Ha-ras* を高率に含むことを観察した(Nohara et al., 2012)。さらに驚くべきことに、胎児期ヒ素曝露を受けた子F1雌雄を交配して得られた孫F2においても、成長後に肝腫瘍が増加することをみいだした(Nohara et al. 2016)。この実験系でヒ素曝露を開始するGD8はF1胎児体内に生殖前駆細胞である始原生殖細胞が出現する時期であり、その後この細胞から分化・成熟する生殖細胞内ではDNAメチル化のリプログラミングがおこる。ヒ素はエピジェネティック修飾を変化させることが報告されていることから、GD8からGD18のヒ素曝露がF1生殖細胞のエピジェネティック修飾のリプログラミングに影響を及ぼし、その結果F1生殖細胞のエピジェネティック変化がF2に伝わり、それがF2肝臓での体細胞突然変異を増加させ肝腫瘍の発症率を高める、という可能性が想定される。

2. 研究の目的

C3HマウスF0雌の妊娠期ヒ素曝露によるF2雄の肝腫瘍増加という現象の未知のメカニズムに関して、分子レベルで解明するための手掛かりを得る。そのために、F0

妊娠期ヒ素曝露によってF2の肝臓に伝わったエピジェネティック変化(エピ変異)が、*Ha-ras* 体細胞突然変異を増加させ腫瘍を増加させるという仮説を設定し、以下の検討を行う。

1) DNAメチル化およびmiRNAに着目し、ヒ素群F2肝臓に特異的に伝わるエピ変異を明らかにする。2) 1)で同定されたエピ変異について、遺伝子発現との関係や*Ha-ras* 突然変異との関係を検討し、腫瘍増加につながる分子経路の手掛かりを示す。

3. 研究の方法

1) 正常肝臓および肝腫瘍組織のDNAおよびRNA調製

GD8からGD18にヒ素(亜ヒ酸ナトリウム85ppm)を含む水を自由摂取したC3Hマウス雌F0または対照群雌F0から生まれたF1雌雄をそれぞれ交配し、ヒ素群F2または対照群F2を得た。約75週令で解剖し、腫瘍のない肝臓の正常組織および腫瘍のある肝臓の腫瘍部を採取した。DNAはフェノール・クロロホルム抽出により、RNAはQiazolを用いて調製した。

2) Reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) 解析

ゲノムワイドなDNAメチル化はRRBS法によって解析した(Boyle et al., 2012)。DNAを制限酵素で水解して断片化し、アダプター付加、精製後 bisulfite 処理を行い、RRBSライブラリーを作製した。PCRによりテンプレートライブラリーを増幅し、Illumina HiSeq2500で次世代シーケンス解析を行った。

3) Differentially methylated cytosine (DMC) および Differentially methylated region (DMR) の同定

RRBSライブラリーの次世代シーケンスデータを、マウスのリファレンス配列(NCBI/mm10)に対してマッピングした。対照群に対してヒ素群F2肝臓でDNAメチル化が増加または低下したシトシン(hyper-DMC/hypo-DMC)、およびDMCを一つ以上含みDNAメチル化の程度に有意差があると判定される領域(hyper-DMR/hypo-DMR)を、統計ソフトR上でmethylkitおよびedmrを用いて検出した。さらに遺伝子発現の制御に重要な転写開始点±2000bpに位置するDMR(promoter DMR)をbed toolsのclosestで検出した。

4) Bisulfite sequencing

C3H マウス肝臓組織と細胞株の DNA メチル化変化を bisulfite sequencing 法によって検証した。

5) miRNA 発現解析

miRNA 発現の網羅的解析は SurePrint Mouse miRNA microarray (Agilent)を用いてプロトコールに従って行った。個別の miRNA 発現量は TaqMan プローブを用いた qPCR によって測定した。

6) 遺伝子発現解析

グローバルな遺伝子発現解析は SurePrint G3 Mouse Gene Expression microarray (Agilent)を用いて行った。個別の発現量は real-time PCR で測定した。

7) 細胞株での実験

マウス肝癌細胞 Hepal1c7 と Hepal-6 を DNA メチル化阻害剤である 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) 存在下 72 時間培養し、遺伝子発現変化を real-time PCR で、DNA メチル化変化を bisulfite sequencing 法で調べた。遺伝子の過剰発現実験には、*Mst1r* と *Slpi* の ORF クローン、およびエンベクターを ORIGENE 社から購入して使用した。

8) Ha-ras 変異解析

Ha-ras コドン 61 の突然変異率は、Pyrosequencing 法で測定した(Nohara et al. 2016)。

4. 研究成果

1) DNA メチル化解析

CpG rich なプロモーター領域を中心にゲノムワイドなシトシンのメチル化を 1 塩基の解像度で効率的に調べる方法である RRBS 法によって、対照群およびヒ素群 F2 のそれぞれ肝腫瘍のない個体 3 匹の正常肝組織、および肝腫瘍のある個体 3 匹の肝腫瘍組織を採取し、

対照群の正常肝組織と対照群の肝腫瘍組織間、対照群の正常肝組織とヒ素群 F2 の正常肝組織間、対象群の肝腫瘍組織とヒ素群 F2 の肝腫瘍組織間の DNA メチル化解析を行った。各サンプルについて約 2200 万から 5500 万リードを読み取り、そのうちの約 60-70% がマウスリファレンス配列にマッピングされた。

1-1) C3H マウス肝腫瘍の DNA メチル化変化

C3H マウスは雄が壮年期に肝腫瘍を発症しやすい系統であり、自然発症した肝細胞癌や diethylnitrosamine などの化学物質によって発症を促進した肝細胞癌の動物モデルとして多用されている。

そこでまず、C3H マウスの肝腫瘍に關与す

る DNA メチル化変化を明らかにするために、対照群の正常肝組織と肝腫瘍組織の DNA メチル化状態を比較した。その結果、正常肝組織に対して肝腫瘍組織で DNA メチル化が低い hypo-DMC が hyper-DMC よりも高率に存在することがわかった。

さらに遺伝子発現の制御に重要と考えられる遺伝子の転写開始点 ± 2000 bp に位置する promoter DMR について、正常肝組織と肝腫瘍組織でメチル化の程度が 30% 以上異なる、 ± 2000 bp にある遺伝子が一定以上の発現量を示し、正常肝組織に対して肝腫瘍組織で 2 倍以上増加または減少している、promoter DNA メチル化量と遺伝子発現量が負の相関を示すことからメチル化が遺伝子発現の制御に關与する可能性が考えられる、

PubMed で遺伝子と癌との關連が報告されている、の 4 点を検討したところ、すべての条件を満たすものが 28 個みつかった。

この中で特に遺伝子発現量の差が大きい遺伝子として *Mst1r* と *Slpi* について、マウス肝癌細胞株 Hepal1c7 および Hepal-6 細胞で DNA メチル化と遺伝子発現変化との対応を 5-aza-dC を用いて調べた。細胞を 5-aza-dC 存在下で培養したところ promoter DMR のメチル化低下と遺伝子発現の上昇が觀察され、これらの promoter DMR が遺伝子発現の制御に關与していることが示唆された。また *Mst1r* を Hepal1c7 細胞に過剰発現させることによって発現が増加し、腫瘍形成への關与が報告されている遺伝子を見いだした。それらは C3H マウスの肝腫瘍でも発現が増加しており、*Mst1r* の下流で腫瘍増加に關与する可能性が示された。

1-2) 妊娠期ヒ素曝露群 F2 肝臓の DNA メチル化変化

次に対照群とヒ素群 F2 において、DNA メチル化程度が 20% 以上異なる DMR を検出した。正常肝組織について、対照群とヒ素群 F2 を比較すると、promoter DMR が複数検出されたが、いずれも遺伝子発現量は変化していなかった。

一方、対照群とヒ素群 F2 の肝腫瘍組織の比較では、promoter DMR が 137 個検出された。このうち、メチル化の低下が觀察され、かつヒ素群において対照群と比較して 2 倍以上発現が増加した遺伝子、すなわち DNA メチル化変化と遺伝子発現変化が負の相関関係にある遺伝子は 6 個検出された。6 遺伝子のうち、*Tmem54* は正常肝組織と比較して肝腫瘍組織で発現が増加し、さらにヒ素群において対照群と比較して有意に発現が増加していた。また、*Cd74* はヒ素群の肝腫瘍組織において対照群と比較して有意に発現が増加していた。

Tmem54, Cd74 は、Hepalclc7 細胞を 5-aza-dC 存在下培養したところ遺伝子発現の増加が観察され、DNA メチル化が遺伝子発現の制御に関与する可能性が示唆された。

2) miRNA 解析

対照群とヒ素群 F2 の正常肝組織および肝腫瘍組織の miRNA 発現量をマイクロアレイによって解析した。その結果、正常肝組織に対して肝腫瘍組織で発現が大きく増加する miRNA が多数存在した。また対照群とヒ素群で差があるものについて TaqMan qPCR で確認をおこなったところ、対照群正常肝組織と比較してヒ素群 F2 正常肝組織で let-7b, miR-29a, miR-122 の増加が確認された。

miR-29a の標的を microRNA.org で検索した結果、ヒトとマウスで *G6pc* が予想された。*G6pc* の減少が肝がん発症に関与することが報告されていることから、Control miRNA と miR-29a を A549 細胞に導入し *G6pc* の発現を qPCR で定量した。その結果、miR-29a の導入により有意な *G6pc* の発現の低下を認め、*G6pc* は miR-29a の標的となると結論された。

3) Ha-ras 突然変異

対照群とヒ素群 F2 の肝腫瘍組織の Ha-ras コドン 61 の突然変異率を Pyrosequencing 法で測定した。その結果、対照群肝腫瘍組織では野生型(CAA) 31%、変異型(AAA/CTA/CGA) 69%に対してヒ素群 F2 肝腫瘍組織では野生型 39%、変異型 61%で、ヒ素群での変異の増加は認められなかった。

4) まとめ

以上の研究によって、肝細胞癌の動物モデルとして多用されている C3H マウスの肝腫瘍に特異的な DMR を明らかにし、さらに腫瘍の増加に関与する遺伝子の発現を DNA メチル化によって制御すると考えられる promoter DMR を明らかにすることができた。

さらに対照群の肝腫瘍組織と比較して、妊娠期ヒ素曝露を受けた F0 の孫世代である F2 の肝腫瘍組織で DNA メチル化の程度が異なり、遺伝子発現の制御に関与する可能性のある promoter DMR を同定した。正常肝組織に対する肝腫瘍組織の promoter DMR と、対照群腫瘍組織に対するヒ素群 F2 肝腫瘍組織の promoter DMR の中で、それぞれ遺伝子発現制御に関与する可能性のあるものを選抜して比較すると共通するものは見つからず、それぞれ別の経路で DNA メチル化変化が誘導されると考えられた。

肝臓の miRNA については C3H マウスの肝腫瘍で大きく発現が増加する miRNA を多数見いだした。またヒ素群 F2 の正常肝組織で肝腫瘍組織との関連が報告されている代謝

系の遺伝子を標的とする miRNA を同定した。さらに代謝変化等を検討することによって発癌への寄与を明らかにしたい。

筆者らの先の研究では、ヒ素群 F1 肝腫瘍組織において対照群腫瘍組織と比較して Ha-ras 体細胞突然変異の増加を認めたが(Nohara et al. 2012)、ヒ素群 F2 肝腫瘍組織では Ha-ras 突然変異の増加は認められなかった。したがって上述のヒ素群 F2 肝腫瘍組織での DNA メチル化変化や miRNA の変化は、Ha-ras の体細胞突然変異増加ではなく、他の経路を介して肝腫瘍増加に結び付くと考えられた。

以上の研究から、妊娠期ヒ素曝露による F2 肝腫瘍増加に関与するエピ変異に関して、分子レベルでのメカニズム解明の一端となる手がかりを得た。また本実験系では、F1 雄を介して F2 に肝腫瘍増加という影響を伝わると考えられることから、F1 が獲得した形質を精子が F2 に伝えるという経路が予想される。その伝達を可能とするメカニズムとして、精子の DNA メチル化変化やヒストン修飾、および miRNA をはじめとする小分子 RNA の寄与が報告されている。今回明らかにした F2 肝臓での DNA メチル化変化や miRNA の変化は、F1 精子でのエピジェネティクス修飾との関連についても分子レベルで検討する手がかりとなる。

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 3 件)

Nohara K, Suzuki T, Okamura K, Matsushita J, Takumi S. Tumor-augmenting effects of gestational arsenic exposure on F1 and F2 in mice. *Genes and Environment* 39(3), 2017. doi: 10.1186/s41021-016-0069-1 査読有

Nohara, K, Okamura, K, Suzuki, T, Murai, H, Ito, T, Shinjo, K, Takumi, S, Michikawa, T, Kondo, Y, Hata, K. Augmenting effects of gestational arsenite exposure of C3H mice on the hepatic tumors of the F2 male offspring via the F1 male offspring. *J Appl. Toxicol.* 36, 105-12, 2016. doi: 10.1002/jat.3149. 査読有

野原恵子、鈴木武博、内匠正太、岡村和幸：妊娠期無機ヒ素曝露による子での癌遺伝子体細胞突然変異を介した発癌増加と多世代・継世代影響 日本衛生学雑誌 69, 92-96, 2014. 査読有

[学会発表](計 15 件)

松下隼也、岡村和幸、宇田川理、鈴木武博、櫻井敏博、市原学、野原恵子、C3H マウスの

妊娠期ヒ素曝露による多世代影響への miRNA の関与、第 87 回日本衛生学会学術総会、シーガイアコンベンションセンター（宮崎）2017 年 3 月 27 日

岡村和幸、野原恵子、妊娠期ヒ素曝露による F2 マウス肝臓の正常組織、腫瘍組織における DNA メチル化変化、第 75 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜（神奈川）2016 年 10 月 6 日

鈴木武博、野原恵子、胎児期ヒ素曝露による CH3 マウス F2 世代の肝細胞フェノタイプの検討、第 43 回日本毒性学会学術年会、ウインク愛知（愛知、名古屋）2016 年 7 月 1 日

野原恵子、岡村和幸、鈴木武博、妊娠マウスへの無機ヒ素曝露による多世代影響、第 86 回日本衛生学会学術総会、旭川市民文化会館（北海道）2016 年 5 月 12 日

野原恵子、鈴木武博、岡村和幸、内匠正太、無機ヒ素のエピジェネティック作用、変異原性、多世代・継世代影響、日本環境変異原学会 第 44 回大会、福岡市、2015 年 11 月 27 日

Nohara, K., Okamura, K., Suzuki, T., Hatada, I., Hata, K.: The Effects of Gestational Arsenite Exposure on the F2 Generation: Role of Epigenetics, Society of Toxicology 54th Annual Meeting, San Diego,平成 27 年 3 月 26 日

他 9 件

6. 研究組織

(1)研究代表者

野原 恵子 (Nohara Keiko)
国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・フェロー
研究者番号：50160271

(2)研究分担者

秦 健一郎 (Hata Kenichiro)
国立研究開発法人国立成育医療研究センター・周産期病態研究部・部長
研究者番号：60360335

畑田 出穂 (Hatada Izuho)
群馬大学・生体調節研究所・教授
研究者番号：50212147

(3)連携研究者

中林 一彦 (Nakabayashi Kazuhiko)
国立研究開発法人国立成育医療研究センター・周産期病態研究部・室長
研究者番号：10415557

鈴木 武博 (Suzuki Takehiro)
国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・主任研究員
研究者番号：60425494

岡村 和幸 (Okamura Kazuyuki)
国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・研究員
研究者番号：50736064

堀居 拓郎 (Horie Takuro)
群馬大学・生体調節研究所・助教
研究者番号：00361387

森田 純代 (Morita Sumiyo)
群馬大学・生体調節研究所・研究員
研究者番号：40589264

(4)研究協力者

松下 隼也 (Matsushita Junya)
東京理科大学大学院薬学研究科・大学院生