

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22510078

研究課題名（和文） 環境化学物質による継世代催奇形性に関する研究

研究課題名（英文） Transgenerational teratogenesis by prenatal exposure to environmental chemicals in mice

研究代表者

長尾 哲二（NAGAO TETSUJI）

近畿大学・理工学部・教授

研究者番号：30351563

研究成果の概要（和文）：合成エストロゲンの胎生期曝露による継世代影響の要因のひとつとして生殖細胞に生じたゲノムワイドな DNA メチル化状態の変化およびインプリンティング遺伝子の DNA メチル化パターンの変化を明らかにした。胎生期の生殖細胞は合成エストロゲン剤によるエピジェネティックな変化を受けやすい時期にあると考えられるが、環境化学物質がどのようなメカニズムで DNA メチル化の変化を誘発するのか、さらに誘発された DNA メチル化異常が継世代催奇形効果とどのように関連するかは次の課題である。

研究成果の概要（英文）： We demonstrated the increased incidence of congenital defects in the offspring of male mice exposed in utero to synthetic estrogens and that the induction of malformations by the estrogens showed a clear threshold effect. Since estrogens have been reported to be non-genotoxic, epigenetic mechanisms may be involved in the transgenerational teratogenesis by estrogen. The expression patterns of Dnmts mRNA, global DNA methylation levels in testicular cells of embryos exposed to estrogen drugs or in sperm of mature male mice exposed prenatally to estrogen drugs were different from those in the controls. These results support that, when evaluating the toxicities of environmental chemicals, epigenetic effects such as DNA methylation should be taken into account.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	1,600,000	480,000	2,080,000

研究分野：発生毒性学・生殖生物学

科研費の分科・細目：環境学

放射線・化学物質影響科学

キーワード：合成エストロゲン、催奇形性、継世代影響、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

交配前の雄マウスあるいはラットに放射線あるいはエチルニトロソ尿素等の強力な化学変異原を曝露すると、曝露された生殖細胞由来の次世代で奇形胎児の出現頻度が高

くなることが知られている。国内的には放射線のマウス生殖細胞曝露による次世代奇形の誘発が 1976 年に始めて報告されて以来、我々は環境変異原物質の曝露で同様の現象を報告し、現在までに次の 4 点を明らかにし

てきた (Nagao 他, 1988, 1989, 1990, 2003)。

(1) 生殖細胞の傷害に起因する次世代奇形 (F₁ 奇形) は、始原生殖細胞から成熟精子までの雄性生殖細胞系列のいずれの発生段階を化学変異原で処理しても誘発される。(2) 精原細胞に突然変異を誘発する物質は、例外なく F₁ 奇形を誘発する。(3) F₁ 奇形の誘発頻度は、遺伝子突然変異の誘発頻度よりも桁違いに高い。(4) F₁ 奇形のタイプは、化学変異原の種類、曝露した生殖細胞の発生段階に関わらず、それぞれのマウス系統に特異的な自然発生奇形のタイプと一致する。

近年我々は、子宮内で非変異原の合成エストロゲンなどに曝露された雄マウスは、成熟後に精巣の部分的雌化や精細管萎縮などの生殖器発生障害を示し、これら雄マウスの次世代では先天異常誘発率が上昇するという継世代影響を報告した (Nagao 他, 2003, Nagao, 2003)。また Newbold ら (1998) は合成エストロゲンのジエチルスチルベストール (DES) がマウスで継世代発癌性 (子宮腺癌や悪性生殖腺腫瘍) を示したことを報告している。胎生期の環境化学物質曝露におけるエピジェネティックな変異は、次世代への不可逆的影響に関与するのではないかと考えられるが、近年、米国の Skinner らのグループを中心に驚くべき報告がなされた (Anway 他, 2007)。彼らは抗菌剤ビクロゾリン (VCZ) のラット胎生期曝露により生まれた雄産児のさらに後世代で VCZ の直接曝露をすでに受けていないにもかかわらず、対照群に比べて精子数が少なく、精巣内の生殖細胞にアポトーシスが高率に誘発することを報告した。さらに、精子 DNA の全ゲノムレベルのメチル化解析により、曝露個体から後世代に特定のゲノム DNA 領域にメチル化パターンの変異が継承されていることが示された。

我々が示した、子宮内で合成エストロゲンなどに曝露された雄マウスの次世代では先天異常誘発率が上昇するという継世代影響 (Nagao 他, 2003, Nagao, 2003) は、明瞭な閾値効果が認められたこと、合成エストロゲンには強い変異原性が報告されていないことなどから、この継世代催奇形作用は、「生殖細胞に生じた遺伝子のエピジェネティックな修飾により遺伝子発現が恒久的に変わったことに起因したのではないかと考えた。そこで本研究では非変異原物質を子宮内曝露し胎児あるいは新生児精巣ならびに成熟個体の精巣上体の生殖細胞 (成熟精子) における DNA メチル化状態の変化について解析し、この仮説の当否を明らかにすることを目的とした。

現在、このようなエピジェネティックな修飾が環境化学物質への曝露によって起こり得るのか否かは議論のあるところであり、どのような分子メカニズムで起きるのかは未

知である。しかし、Skinner らの一連の報告 (Anway 他, 2007) は環境化学物質による目に見えない影響が、生物集団の進化の道筋を変えてしまう由々しい生体影響であることを示唆している。

2. 研究の目的

環境化学物質がエピジェネティックな変化のプログラムを書き換えるようなことがあれば、長期的に悪影響を及ぼすことが懸念される。特に、個体の発生時期の環境 (環境栄養、環境化学物質、物理的な要因など) からの影響がエピジェネティックな変化を誘起し、遺伝子発現を変化させる可能性が考えられる。本研究では、非変異原性の化学物質である合成エストロゲンの胎生期曝露により認められた継世代影響としての催奇形効果がどのようなメカニズムで誘発されるのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

非変異原とされる合成エストロゲンに子宮内曝露された雄マウスの性成熟後に同系統の無処置雌マウスと交配させると次世代児に、そのマウス系統において自然発生奇形でみられる型の先天奇形が高率に誘発されたことから、我々はこれらの影響は、生殖細胞に生じた遺伝子 DNA のメチル化などの変化により遺伝子発現が恒久的に変化したことに起因したためではないかと考えた。そこでこの仮説の当否を明らかにするために、精巣生殖細胞に生じた遺伝子のエピジェネティックな修飾変化について、DNA メチル化状態の変化を中心に以下の 6 点を調べた。

- 性腺の病理組織学的検索及び超微形態観察
- リアルタイム PCR 法による DNA メチル基転移酵素遺伝子 Dnmt mRNA の発現解析
- メチル化シトシン特異的抗体を用いたゲノムワイドな DNA メチル化レベルの測定
- リアルタイム PCR 法を用いた H19・Igf2 遺伝子 mRNA の発現解析
- バイサルファイトシーケンス法を用いた H19 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化パターン解析
- 合成エストロゲンに対するマウス感受性差異の検索

4. 研究成果

非変異原とされる合成エストロゲンに胎生期曝露した雄マウスの次世代に先天奇形が対照レベル以上に誘発される継世代催奇形作用の原因を探るため、胎生期曝露マウスの性腺の電子顕微鏡による超微形態変化の有無を観察した。その結果、妊娠 8~11 日に

DES 曝露した胎齢 13~18 日の胎児では、いずれの時期の精巣においても精細管内にアポトーシスあるいは変性した生殖細胞及び暗調なセルトリ細胞が多く認められた。さらに間質細胞ではミトコンドリアの小型化および滑面小胞体の減少がみられた。またこれらの胎児の生後 10 週における H・E 染色による精巣組織観察では精巣の部分的雌化と精細管の萎縮などが認められ、軽度の精巣毒性が確認された。次いで、エピジェネティックな遺伝子発現の制御ならびにゲノムの安定な維持に寄与していると考えられる DNA メチル化について明らかにするため、合成エストロゲンを曝露した胎齢 13 日、18 日の胎児の精巣及び生後 70 日の生殖細胞について DNA メチル化酵素 (Dnmt 1, 3a, 3a2, 3b, 3L) タンパクおよび遺伝子 mRNA に関する検討を免疫組織化学あるいは real-time PCR により行った。その結果、タンパク局在については対照群と曝露群との間で著明な差は認められず、mRNA の発現にも明らかな変化はみられなかった。

胎生期の合成エストロゲン曝露による精巣障害と継世代催奇形性との関連を明らかにするために、エチニルエストラジオール (EE) を妊娠 9~16 日に投与し、胎齢 18 日胎児における精巣について TEM により超微形態観察をした結果、生殖細胞に変化はみられなかったが、間質細胞にミトコンドリアの小型化と滑面小胞体の減少がみられた。生後 21 日では精細管萎縮および生殖細胞減少が確認された。Real-time PCR 法では胎齢 13 日、18 日、生後 70 日の生殖細胞には EE 曝露による Dnmt 遺伝子 mRNA 発現に明らかな変化はみられなかった。胎齢 13 日、18 日および生後 70 日生殖細胞におけるゲノムワイドな DNA メチル化状態について解析した結果、胎齢 13 日および生後 70 日ではゲノム DNA は対照群と比較して高メチル化状態であった (図 1)。正常マウス胎齢 13 日の生殖細胞ではゲノムワイドな DNA メチル化状態は低メチル化状態に保たれているが、EE の胎生期曝露は Dnmt mRNA 発現に変化を示さなかったものの、胎児の生殖細胞におけるゲノム DNA を高メチル化状態にし、成熟精子の DNA メチル化にまで影響を及ぼしたことから、合成エストロゲン曝露は雄性生殖細胞における発生段階特異的な DNA メチル化パターンを攪乱することが示唆された。

合成エストロゲンの EE に胎生期曝露された胎齢 13 日、18 日胎児の性腺あるいは生後 70 日児の成熟精子におけるインプリント遺伝子である H19、Igf2 遺伝子 mRNA の発現を real-time PCR 法で検討し、さらに特定遺伝子における CpG サイトにおいて DNA メチル化修飾の変化が生じているか否かを調べる目的で H19 遺伝子プロモーター領域におけるメ

チル化修飾状態について解析した。その結果、EE に胎生期曝露された胎齢 13 日および 18 日の生殖細胞における H19・Igf2 遺伝子 mRNA 発現は低下する傾向がみられた (図 2)。また H19 遺伝子プロモーター領域における 12 箇所の CpG 部位のメチル化率は、対照群で 18.9% であったが、EE 投与群では 60.2% ($p < 0.05$) であり、EE 胎生期曝露は、インプリント遺伝子の DNA メチル化パターンを変化させ、遺伝子発現に影響を及ぼすことが示唆された (図 3)。また、合成エストロゲンに対するマウス系統差を比較したところ、胎児期生殖細胞におけるゲノムワイドな DNA メチル化状態には、C57BL/6J と ICR では差はみられなかったが、DES 投与により C57BL/6J では Dnmts 遺伝子の mRNA 発現に上昇がみられ、C57BL/6J 系統のエストロゲン高感受性が確認された。

本研究により、環境化学物質の胎生期曝露が胎児、新生児あるいは成熟個体の生殖細胞における DNA メチル化状態を変化させることを明らかにした。しかし、環境化学物質曝露がどのようなメカニズムで DNA メチル化状態の変化に至るのかを明らかにした報告はない。さらに DNA メチル化と実際に報告されている悪影響との関連については、Agouti マウスの例を除いては、メチル化状態が変化している遺伝子によって実際の影響を説明できる報告は現在までのところない。また、DNA メチル化状態の変化によって実際に遺伝子の発現状態が変化していることを具体的に示している報告もない。したがって、DNA メチル化状態の変化が実際に観察される異常とどのように結びつくのかを明らかにすることは極めて重要である。本研究で示した変化が、世代を超えて子孫に伝わる可能性があるのか、曝露濃度との関連も含めて調べ、さらに環境化学物質の影響を受けやすい高感受性集団、例えば胎児や新生児の発生・発達時期 (臨界期) の特定が必要であり、エピジェネティックな変化を受けやすい時期として一義的に定義づけられるのかを今後明らかにする。

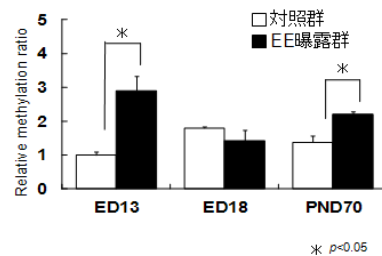


図 1. ゲノムワイドな DNA メチル化状態

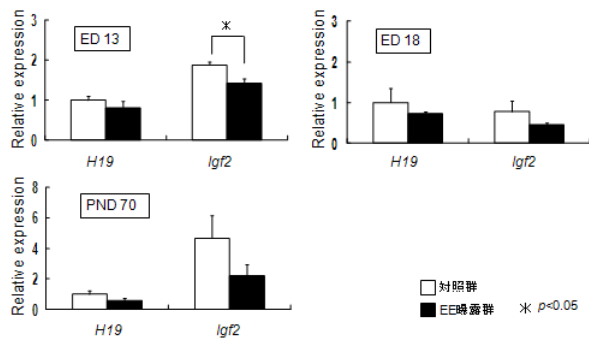


図 2. H19、Igf2 遺伝子 mRNA 発現

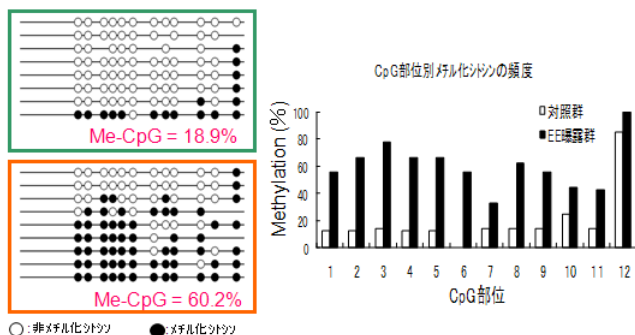


図 3. H19 遺伝子プロモーター領域における DNA メチル化パターン

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 Nagao T, Komada M, Kagawa N. Newly developed mouse newborn behavioral testing method for evaluating the risk of neurotoxicity of environmental toxicants. *J Appl Toxicol.* (2012) doi:10.1002/jat.2802. 査読有
- ② Nagao T, Kagawa N, Saito Y, Komada M. Developmental effects of oral exposure to diethylstilbestrol on mouse placenta. *J Appl Toxicol.* (2012) doi:10.1002/jat.2766. 査読有
- ③ Komada M, Asai Y, Morii M, Matsuki M, Sato M, Nagao T. Maternal bisphenol A oral dosing relates to the acceleration of neurogenesis in the developing neocortex of mouse fetuses. *Toxicology* (2012) **295** (1-3):31-38 doi: 10.1016/j.tox.2012.02.013. 査読有
- ④ Nagao T, Takada N, Onoda N. Transgenerational teratogenesis by prenatal exposure to endocrine disrupting chemicals.

Genes and Environ. (2011) **33**:50-60
<http://dx.doi.org/10.3123/jemsge.33.50> 査読有

- ⑤ Komada M, Fujiyama F, Yamada S, Shiota K, Nagao T. Methylnitrosourea induces neural progenitor cell apoptosis and microcephaly in mouse embryos. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* (2010) **89**(3):213-222 doi: 10.1002/bdrb.20245. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 長尾哲二、井藤早紀、正見寛子、駒田致和
 低用量ビスフェノール A のマウス子宮内曝露は新生児の出生直後の活動量に影響を及ぼす 環境ホルモン学会第 15 回研究発表会 東京、12 月 18~19 日、2012 年
- ② 溝端 彩、森佳奈美、駒田致和、長尾哲二
 胎児期 4-ヒドロキシタモキシフェン曝露はマウス大脳皮質形成を障害する 環境ホルモン学会第 15 回研究発表会 東京、12 月 18~19 日、2012 年
- ③ 駒田致和、浅井泰子、守井見奈、松木美知枝、佐藤 真、長尾哲二
 胎児期低用量ビスフェノール A 曝露は大脳皮質形成において神経新生を促進する 日本先天異常学会第 52 回学術集会 東京、7 月 6~8 日、2012 年
- ④ 長尾哲二、加川 尚、齋藤義明、駒田致和
 合成エストロゲン剤のマウス胎盤傷害性と胚致死作用 日本先天異常学会第 52 回学術集会 東京、7 月 6~8 日、2012 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長尾 哲二 (NAGAO TETSUJI)
 近畿大学・理工学部・教授
 研究者番号：30351563

(2) 研究分担者

加川 尚 (KAGAWA NAO)
 近畿大学・理工学部・講師
 研究者番号：80351568