

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06912

研究課題名(和文)ヒ素の胎児期暴露がエピゲノムに与える影響の疫学的及び実験的解析

研究課題名(英文)Epidemiological and experimental analyses of arsenic exposure to epigenome of human embryos and child

研究代表者

三瀬 名丹 (Mise, Nathan)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：00360644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：無機ヒ素は体内に取り込まれると、遺伝子発現制御に関わるDNAメチル化などに影響を与え、健康被害を及ぼすが、小児や妊婦などへの影響は明らかではない。我々は、パキスタンのヒ素汚染地帯から採取された食品サンプルと母子由来末梢血ゲノムDNAサンプルを用いて、子供と母親の無機ヒ素摂取量とDNAメチル化への影響の関連を調べた。無機ヒ素摂取量の高いグループにおいては、肺がんに関連している遺伝子(HOXB5, HOXB9, POLD4など)のプロモーター領域のメチル化が低下していることが見出された。化学物質等に敏感な小児や妊婦では、無機ヒ素によりDNAメチル化が変化することで健康影響が出る可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Intake of inorganic arsenic causes various adverse effects through alteration of methylation of genomic DNA. We collected food duplicate samples and genomic DNA samples of children and pregnant women from inorganic arsenic contaminated areas of Pakistan to determine the levels of inorganic arsenic intake and effects on DNA methylation. We have found that the methylation of the promoter regions of lung cancer-related genes, HOXB5, HOXB9, POLD4, and MSX1 were lower in higher arsenic exposed group than in lower exposed group. These results indicate that exposure to inorganic arsenic affects to health of children and pregnant women through aberrant DNA methylation due to competition of general methyl-donor.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：無機ヒ素暴露 DNAメチル化 エピジェネティクス 胚発生

1. 研究開始当初の背景

ヒ素曝露は様々な健康被害を引き起こし、低濃度の慢性曝露は肺がんや皮膚がんの原因となるが、ヒ素の胎児期曝露が胎児のエピゲノムに与える影響についての詳細な解析はまだない。ヒ素は体内でメチル化を受けて無毒化されるが、この過程でメチル基供与体が利用されるために、DNA やヒストンのメチル基供与体 SAM の量的枯渇や SAM/SAH 比のバランス崩壊などにより、エピゲノムの変化が起こり、様々な疾患の原因となると考えられている。先進国でのヒ素曝露は減少しているが、発展途上国などの汚染地域で井戸水を使用している場合には、今も深刻な被害をもたらしている。我々は、パキスタンの Aga Khan 大学 Zafar Fatmi 博士のグループと、ヒ素、鉛の胎児期曝露の影響についての共同研究を行っている。

2. 研究の目的

先行研究により、慢性的ヒ素曝露が原因の成人肺がん組織では、複数の遺伝子 (*HOXB9*, *HOXB5*, *POLD4* など; Smeester et al. 2011) のプロモーター領域のメチル化が上昇していることが明らかになっている。これらの領域についてパキスタンで入手したサンプルのパイロシークエンサーによる DNA メチル化解析を行ったところ、母体末梢血や胎盤組織においては明瞭な個体差はなかったが、臍帯血由来 DNA 検体においては、一部の個体で DNA メチル化が高くなっていった。また、同様の結果は、がん抑制遺伝子として知られている *P53* のプロモーター領域でも得られた。現在、これら各個体の母親から回収した爪に含まれるヒ素の量を測定することで、メチル化の変化とヒ素への曝露量との相関の解析を行う。

厚生労働科学研究費補助金「鉛及びヒ素などの食品汚染物質の実態調査ならびにその健康影響に関する研究」(課題番号 H25-食品一般-006) (平成 25 年~平成 27 年)によって、日本、パキスタン両国において臍帯血由来の CD34 陽性細胞の分離が行われている。ここで得られる臍帯血由来の CD34 陽性細胞を用い、より均一な細胞集団を用いたエピゲノム解析を行う。CD34 陽性細胞は未分化な血球幹細胞であり、より環境の影響を受けやすい未分化な細胞集団での精度の高いエピゲノム解析を行うことができる。

3. 研究の方法

パキスタンで得られたサンプルのうち、母子の末梢血と臍帯血から得られたゲノム DNA に関して、パイロシークエンサー法により、ヒ素曝露によりメチル化が変化していることがすでに報告されている遺伝子群とメチル化解析を行い、ヒ素曝露量と遺伝子レベルおよびゲノムレベルでのメチル化の相関を明らかにする。

さらに、上記ヒトサンプルを用いた解析か

らその標的となる遺伝子あるいはゲノム領域を特定し、マウス及びヒト由来 ES 細胞を用いた試験管内分化系を用いて、ヒ素によるエピジェネティック変異を再現できるかについて評価する。こうした実験的解析により、ヒト検体では解析が困難なヒストン修飾や遺伝子発現の詳細なデータを得ることで、胎児期ヒ素曝露がエピゲノムに与える影響の分子メカニズムについても明らかにする。

4. 研究成果

パキスタン国の都市部カラチと、インダス川流域のガンバットの 2 地域から、小児約 100 名とその母親である妊婦約 100 名につて 3 日間の陰膳を収集し、食事に含まれる総ヒ素量と無機ヒ素料の測定を行った。また、小児、母親の末梢血、及び母親の出産時に胎盤の DNA 組織を収集し、DNA 抽出を行うことで DNA 検体を得た。この検体収集と測定は厚生労働省科 研 費 (H25-Food-General-006) による成果である。

この測定結果より、小児・母親の無機ヒ素摂取量に従って検体を 4 群に分け、高ヒ素摂取群 (n=25; 図 1 赤丸) と対照群として低摂取群 (n=25; 図 1 青丸) を選んだ。これらの検体を DNA のメチル化解析に用いた。

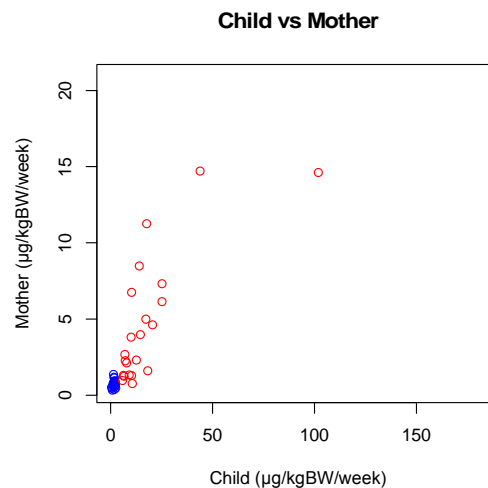


図 1 小児及び母親の無機ヒ素摂取量

パイロシークエンサー法により、以下の遺伝子のプロモーター領域のメチル化について調べた。

先行研究により、ヒ素曝露によって生じたがんではメチル化が変化していることが明らかなもの。HOXB9、HOXB5、POLD4

がん抑制遺伝子 TP53

繰り返し配列(ゲノム全体のメチル化レベルを反映する) LINE1

胎盤

胎盤組織における上記遺伝子群のメチル化解析を行った。胎盤においては、ヒ素摂取に

よるメチル化の有意な違いは HOXB5 遺伝子でのみ見出され、無機ヒ素高摂取群でメチル化が下がっていた(図2)。胎盤組織においては、ある程度無機ヒ素摂取の影響があったと考えられるが、その影響は限定的で、ゲノム残体のメチル化を表す LINE1 のメチル化には有意差はなかった。

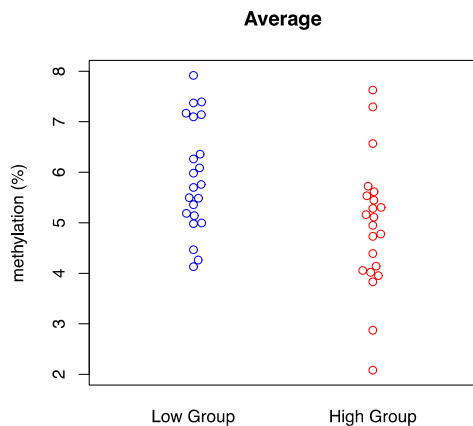


図2 胎盤での HOXB5 のメチル化

母親 末梢血

同様に、メチル化解析を行ったが、母親の末梢血においては、DNA のメチル化に優位な差は見出されていない。

小児 末梢血

一方で、小児の末梢血 DNA に関しては、調べたすべての遺伝子(HOXB5、HOXB9、POLD4、TP53、LINE1)で、メチル化に統計的有意差が見出された(代表的な例 図3 LINE1)。この結果は、小児において無機ヒ素の摂取がゲノム全体により大きな影響を与えていることを示唆する結果であった。

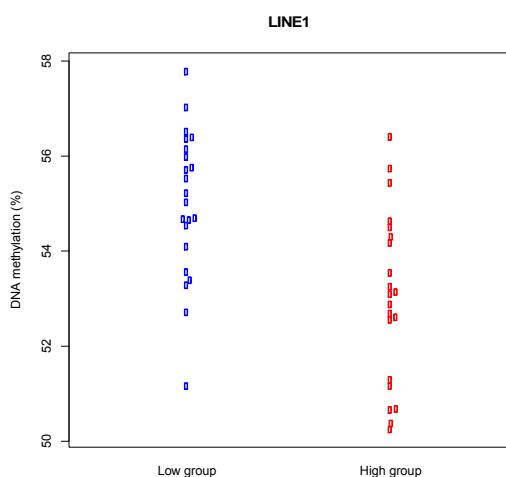


図3 小児末梢血での LINE1 のメチル化

更に、得られた結果をまとめ、階層的クラスタリングを行ったところ、ヒ素摂取量に大まかに従ってグループ分けすることが出来る

ことがわかった(図4)。メチル化パターンによる分類を更に精度を高めるためには、さらに多くの遺伝子領域の解析と、重要となる遺伝子の選定が必要であるが、末梢血におけるゲノム DNA のメチル化パターンは、ヒ素暴露に対する良いバイオマーカーとなる可能性があることが示唆され、今後のさらなる解析が期待される結果となった。

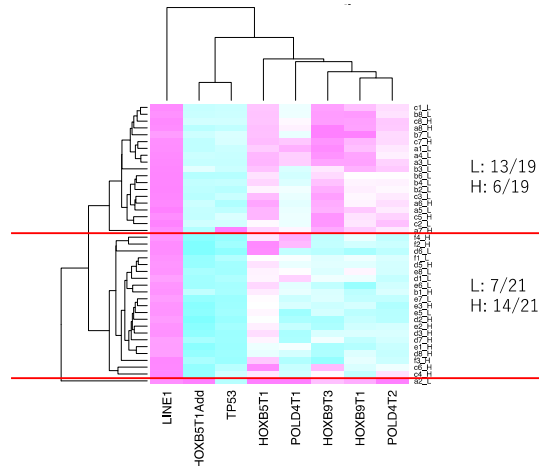


図4 階層的クラスタリングによる分類

以上の結果から、ヒ素の摂取量とゲノム DNA のメチル化との間には、特に小児において強い関連があることが示された。小児は、大人に比べると、同程度に汚染された食品を食べても、体重に対する食事が多くなり、その結果、ヒ素摂取量が増加する。また、小児は、大人に比べると化学物質に対する感受性が高く食事や飲用水からの慢性的なヒ素曝露が小児の健康に与える影響は大人に比べ大きいと考えられる。このことは他国でのことだけではなく、食品を介しての無機ヒ素曝露は我が国でもかなり高いことが我々の行っている研究からも明らかとなっている。我々は、国内での調査から、無機ヒ素曝露が小児の運動機能の発達に影響を与えることを見出しており、小児期の無機ヒ素曝露を低く抑える努力がさらに必要であることを示した(Mise et al. 論文投稿中)。

このように、我々の研究は、小児期の無機ヒ素曝露がエピゲノムへ影響を与えていることを示しており、国内にとどまらず、国際的にも重要な結果が得られた。

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6件)

Kobayashi, M., F. Usui-Kawanishi, T. Karasawa, H. Kimura, S. Watanabe, N. Mise, F. Kayama, T. Kasahara, N. Hasebe, and M. Takahashi. 2017. 'The cardiac glycoside ouabain activates NLRP3 inflammasomes and promotes cardiac inflammation and dysfunction', *PLoS One*, 12: e0176676.

DOI: 10.1371/journal.pone.0176676

Fatmi, Zafar, Ambreen Sahito, Akihiko Ikegami, Atsuko Mizuno, Xiaoyi Cui, Nathan Mise, Mai Takagi, Yayoi Kobayashi, and Fujio Kayama. 2017. 'Lead Exposure Assessment among Pregnant Women, Newborns, and Children: Case Study from Karachi, Pakistan', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14: 413.

DOI: 10.3390/ijerph14040413

Kayama, F., Z. Fatmi, A. Ikegami, A. Mizuno, M. Ohtsu, N. Mise, X. Cui, M. Ogawa, T. Sakamoto, Y. Nakagi, T. Yoshida, A. Sahito, S. Naeem, K. Ghias, H. Zuberi, K. Tariq, Y. Kobayashi, and K. Nohara. 2016. 'Exposure assessment of lead from food and airborne dusts and biomonitoring in pregnant mothers, their fetus and siblings in Karachi, Pakistan and Shimotsuke, Japan', *Rev Environ Health*, 31: 33-5.

DOI: 10.1515/reveh-2015-0046

Ikegami, A., M. Takagi, Z. Fatmi, Y. Kobayashi, M. Ohtsu, X. Cui, N. Mise, A. Mizuno, A. Sahito, A. Khoso, and F. Kayama. 2016. 'External lead contamination of women's nails by surma in Pakistan: Is the biomarker reliable?', *Environ Pollut*, 218: 723-27.

DOI: 10.1016/j.envpol.2016.07.068

Cui, X., M. Ohtsu, N. Mise, A. Ikegami, A. Mizuno, T. Sakamoto, M. Ogawa, M. Machida, and F. Kayama. 2016. 'Heavy metal exposure, in combination with physical activity and aging, is related with oxidative stress in Japanese women from a rural agricultural community', *Springerplus*, 5: 885.

DOI: 10.1186/s40064-016-2430-z

Kuroki, S., M. Akiyoshi, K. Ideguchi, S. Kitano, H. Miyachi, M. Hirose, N. Mise, K. Abe, A. Ogura, and M. Tachibana. 2015. 'Development of a general-purpose method for cell purification using Cre/loxP-mediated recombination', *Genesis*, 53: 387-93.

DOI: 10.1002/dvg.22863

〔学会発表〕(計1件)

第88回日本衛生学会学術総会
「無機ヒ素摂取が小児の運動機能の発達に与える影響」“Effects of inorganic arsenic intake on development of infant's gross motor development” 東京工科大学 2018年3月22日-24日(発表23日)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三瀬 名丹 (Mise, Nathan)

自治医科大学・医学部・環境予防医学講座・講師

研究者番号：00360644

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

Zafar Fatmi (Zafar Fatmi)

パキスタン国 Aga Khan 大学・教授