

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：82101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15246

研究課題名(和文) 妊娠期ヒ素曝露によるF2肝腫瘍増加機序解明のための精子の網羅的DNAメチル化解析

研究課題名(英文) Genome-wide DNA methylation analysis of sperm to explore the mechanism of hepatic tumor augmentation in the F2 by gestational arsenite exposure of F0 pregnant 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) 2,800,000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雄で肝腫瘍が増加する。その原因としてF1精子のDNAメチル化変化の関与を仮定し、妊娠期ヒ素曝露によるF1精子のDNAメチル化変化を次世代シーケンスを用いたRRBS法によって解析した。その結果、対照群と比較してヒ素群F1精子でDNAメチル化が増加または低下したシトシン(DMC)および領域(DMR)、および遺伝子発現の制御に重要な転写開始点付近のDMR (promoter DMR)の検出に成功し、ヒ素群F1精子がF2に影響を伝える経路のさらなる検討のための重要な手がかりを得た。

研究成果の概要(英文)：The F2 pups born to F1 males which are gestationally exposed to inorganic arsenic develop hepatic tumors at higher rates compared to the control mice. In order to seek the mechanism of how the effects of developmental exposure of F1 male are transmitted to F2 and cause tumor increases in F2, we investigated DNA methylation changes in F1 sperm by the reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) method. We succeeded in identifying differentially methylated cytosines (DMCs) and regions (DMRs) by comparing the control and arsenite-F1 sperm DNA. We also identified DMRs around transcription start sites (promoter-DMRs), which closely associate with gene expression regulation. These data enable us to further analyze DNA methylation and gene expression changes involved in the transmission of parentally acquired epigenetic effects.

研究分野：分子毒性学

キーワード：無機ヒ素 妊娠期曝露 F2影響 DNAメチル化 精子

1. 研究開始当初の背景

胎児期は環境化学物質等の環境因子の影響を受けやすいことが知られているが、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)。

無機ヒ素は広く地球上に分布し、東南アジアや南米諸国をはじめとした各地で深刻な健康被害をもたらしている環境化学物質である。筆者らは雄が成長後に肝腫瘍を発症しやすい系統である C3H マウスにおいて、母親の妊娠 8 日から 18 日の間のみ無機ヒ素を投与すると、驚くべきことに F2 雄の成長後の肝腫瘍の発生率がさらに増加するという実験結果を得た。また対照群の雌雄と妊娠期ヒ素曝露を受けた F1 (ヒ素群 F1) 雌雄の組み合わせ交配から、F1 雌が対照群またはヒ素群 F1 であるかに関わらず、ヒ素群 F1 雄から生まれた F2 雄で腫瘍が増加していることを明らかにした(Nohara et al., 2016)。このことから、ヒ素群 F1 の雄の生殖細胞を通して腫瘍増加の形質が F2 に伝えられることが考えられた。

上述の実験系では妊娠 8 日から 18 日目までヒ素を投与しているが、この時期は雄では始原生殖細胞の増殖と前精原細胞への分化がおこり、同時に DNA メチル化の消去と再メチル化などのエピジェネティック修飾の大きな変動がおこる時期である。この時期の化学物質曝露が生殖細胞のエピジェネティック修飾を変化させることによって子の発生をリプログラミングすることが提唱されているが、具体的に成長後の変化につながるエピジェネティック修飾変化についてはほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、C3H マウス F0 雌の妊娠期無機ヒ素(ヒ素)曝露による F1 雄の生殖細胞での DNA メチル化変化が F2 での後発的な肝腫瘍増加に関与するという仮説を設定し、これまで全く情報が得られていないヒ素群 F1 精子の DNA メチル化変化に着目する。次世代シーケンシングを用いた最新の方法でゲノムワイドな DNA メチル化解析を行い、ヒ素群 F1 の精子で特異的に DNA メチル化が変化する領域を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 精子 DNA の調製:

妊娠 8 日から 18 日に無機ヒ素(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 から生まれたヒ素群 F1 雄 5 匹、およびヒ素を含まない水を摂取した対照群の F1 雄 5 匹の精巢上体尾部より精子を採取した。2-メルカプトエタノールを含む溶解バッファー中で精子を溶解し、フェノール-クロロホルム法で DNA を抽出した。

2) RRBS 解析

CpG rich なプロモーター領域を中心にシトシンのメチル化を 1 塩基の解像度でゲノムワイドに効率的に調べる方法である Reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) 法によって DNA メチル化解析を行った(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 F1 精子で 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)の検出を、統計ソフト R 上で methylkit および edmr を用いて行った。さらに遺伝子発現の制御に重要な転写開始点 ± 2000 bp に位置する DMR (promoter DMR)を bed tools closest を用いて検出した。

4. 研究成果

1) C3H マウス精子ゲノムおよび F0 妊娠期ヒ素曝露群 F1 精子ゲノムの DNA メチル化パターン

C3H マウスの対照群およびヒ素群 F1 精子各 5 サンプルの RRBS ライブラリーの次世代シーケンスを行い、全サンプルについて高品質の塩基(Q>30) 4.5 Gb 以上の読み取りデータを得、リファレンス配列(NCBI/mm10)に対してマッピングを行った。

C3H マウスは雄が壮年期以降に肝腫瘍を発症しやすいという形質をもち、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。本研究ではC3Hマウス精子のゲノムワイドなDNAメチル化状態に関する基本的な情報を得ることができた。このデータを他の系統のマウスの精子DNAメチル化状態と比較することによって、精子DNAメチル化と形質との対応の検討などが今後可能となる。

またヒ素群F1精子のゲノムワイドなDNAメチル化状態についてもデータを得ることができた。

2) DMC, DMR および promoter DMR の検出

上記で次世代シーケンスしゲノムにマッピングしたデータから、Methylkit によって対照群に対してヒ素群 F1 精子で DNA メチル化の程度が異なるシトシンである DMC を検出した。その結果、ヒ素群 F1 精子では hypo-DMC が増加するという特徴が明らかになった。また hypo-DMC、hyper-DMC の位置はともに intergenic>intron>exon>promoter の順に多かった。

また edmr を用いて、メチル化の程度が異なる領域である DMR を明らかにした。さらにメチル化の程度が 10%以上異なり、特に遺伝子発現の制御に重要な転写開始点 ±2000 bp に位置する promoter DMR を検出した。その結果、タンパクをコードする遺伝子のプロモーター領域に存在する DMR が 28 見つかった。これらの遺伝子には、精子の運動能に関与するタンパクや精巣上体の構造に関与して精子形成に影響を及ぼすタンパクをコードするものなどが含まれていた。

3) ヒ素群 F2 肝腫瘍 DMR との比較

ヒ素群 F1 精子の受精によって生まれたヒ素群 F2 雄で肝腫瘍が増加する現象に関して、F1 精子の DNA メチル化変化が F2 の体細胞に伝わり肝腫瘍の増加に関与することが、一つの可能性として考えられる。そこで他の研究においてヒ素群 F2 雄の肝腫瘍で対照群 F2 雄の肝腫瘍と比較して DNA メチル化が変化した promoter DMR と、今回 F1 精子で見出した promoter DMR を比較した。

その結果、両者で共通の遺伝子で promoter DMR、すなわち転写開始点 ±2000 bp の領域内に DMR をもつものが存在した。さらに両者の DMR が重なり、メチル化変化の方向 (hyper-または hypo-) が同一である遺伝子が複数見つかり、その中で正常肝臓および肝腫瘍組織で顕著な遺伝子発現がある遺伝子が 2 つ存在した。

今後はこの 2 つの遺伝子の DNA メチル化

変化の肝腫瘍での遺伝子発現制御への関与や 2 つの遺伝子の肝腫瘍増加への寄与などを細胞株を用いた実験等各種方法で調べることによって、F1 精子 DNA メチル化変化が F2 肝腫瘍増加に及ぼす影響を見いだせる可能性がある。

DNA メチル化修飾は発癌と密接な関係をもっている。以上の研究によって、肝腫瘍を発症しやすい形質をもち肝細胞癌の動物モデルとして多用されている C3H マウスの精子について、筆者らの知る限り初めてゲノムワイドな DNA メチル化状態を明らかにした。

さらに母マウスの妊娠中に、すなわち胎児期にヒ素曝露を受けることによって変化した DNA メチル化を検出した。その中に F2 の肝腫瘍に伝わる可能性のある promoter DMR を検出した。この研究によって、胎児が環境から影響を受け、その結果が次世代の末梢臓器において後発的に現れるという現象のメカニズムについて、精子 DNA が獲得した DNA メチル化変化が末梢臓器で再現され影響を現すという仮説を検討するための重要な手がかりを得ることができた。

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 1 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

[学会発表](計 1 件)

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、予稿集 71:119

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

(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

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

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

宇田川 理 (Udagawa Osamu)
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：50738466

(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