

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 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21510072

研究課題名（和文）

神経細胞分化のモデル培養系へのビスフェノールA曝露とエピジェネティック変異

研究課題名（英文）

Changes of Transcriptome and DNA methylation in P19 neurons exposed to Bisphenol A

研究代表者

矢追 毅 (YAOI TAKESHI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：40311914

研究成果の概要（和文）：マウス P19 細胞の神経細胞分化に際して、従来生物毒性が不明であった BPA 代謝物のひとつがエピゲノム変異原性を持つこと、トランスクリプトーム異常を惹起することを明らかにした。トランスクリプトーム異常の標的遺伝子群は BPA と非常に高い類似性をもち、それらの大半が BPA 曝露胎仔終脳においても変動していたことから、この BPA 代謝物は胎仔終脳における BPA 曝露影響の活性分子型のひとつであることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：It was revealed that the exposure to one of the “non-toxic” BPA metabolites could elicit both epigenetic mutations and perturbation of transcriptome in mouse P19 neurons. The differentially expressed genes were highly significantly enriched for the BPA-responsive gene set. mRNA expression of most of them was also altered in the fetal forebrain maternally exposed to BPA. These data suggested that the metabolite was one of the potent bioactive forms of BPA molecule in the BPA-exposed fetal brain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：分子生物学・分子神経生物学

科研費の分科・細目：放射線・化学物質影響学

キーワード：内分泌かく乱物、エピジェネティクス、発生・分化、脳・神経、環境化学物質、環境エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

① 内分泌攪乱化学物質は生体に内在するホルモン作用に干渉し得る化学物質として定義されている。弱いエストロゲン活性を持つ内分泌攪乱化学物質の一つであるビスフェノール A (BPA) は、ポリカーボネートやエポキシ樹脂製品中に含まれており、ヒトが曝露される機会が多い。BPA は妊娠女性や胎児

の血清中で検出されているだけでなく、これまでの多くの研究から、生殖や胎児発生に様々な影響を引き起こし得る危険性が指摘されてきた。2008 年 9 月には、現時点における様々な研究知見から、ヒト胎児・子供の脳や行動に BPA が悪影響を与えるリスクを否定できないとする報告書を米国 National Toxicology Program が公表している

(NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Bisphenol A)。

我々はこれまでに、妊娠マウスの母体が低用量 BPA に曝露された際の胎仔脳に与える影響を調べ、報告してきた。妊娠マウスに胎齢 0 日から連日、皮下注射によってビスフェノール A(BPA)を投与し、胎齢 12.5 日、14.5 日、16.5 日の胎仔終脳において解析を行った。その結果、胎仔への BPA 曝露は、形成期にある終脳に対して、胎齢早期の終脳神経細胞の分化/移動の促進、神経発生に関わる重要遺伝子の発現変動 (胎齢早期~中期) といった影響を及ぼし、成熟個体に生育したのちも視床皮質路の形成異常が残存するということが明らかとなった。しかし、このような影響をもたらす分子機構は明らかでない。

ところで、脳の形成過程等の発生・分化にかかわる遺伝子の発現は一般に、細胞の分化段階や脳の領域ごとに緻密な制御を受けており、エピジェネティックな遺伝情報が重要な役割を果たすことが近年明らかになってきた。ゲノム中に散在し、とりわけ遺伝子転写開始点周辺に存在する CpG 配列が集中する領域 (CpG island: CGI) でのシトシン残基のメチル化修飾、これと連関するヒストン修飾を介したクロマチン構造変換が、遺伝子発現の on/off 決定を制御するエピジェネティックな機構の分子基盤になっている。とりわけ DNA メチル化状態の異常は、遺伝子発現制御の攪乱を介して、細胞や個体の発生・分化、ヒトの遺伝性疾患や発ガンのメカニズムに深く関わることも明らかになってきた。

さて、先述した胎仔終脳における *in vivo* 実験系において、我々は約 3 万種の遺伝子を対象に胎仔終脳における発現変動を cDNA マイクロアレイ法により検索した結果、BPA 曝露により約 2% の遺伝子種で 2 倍以上の発現変動を認めた (未発表データ)。さらに、マウスにおける BPA 胎生期曝露が、体毛色遺伝子の DNA メチル化状態の変化を介してエピジェネティック変異を誘起したという最近の報告がある。そこで我々は、胎仔終脳で見いだされた BPA 曝露の影響を惹起する分子機構の一つに、BPA 曝露が誘起する遺伝子発現変動があり、それら変動の一部は、遺伝子発現調節を担う DNA メチル化パターンの制御不全によるものではないかと考えた。そこで先述の *in vivo* 実験系において、ゲノム中の CpG 配列が集中する領域 (CpG island: CGI) のメチル化状態を RLGS 法 (ランドマークとしてメチル化感受性制限酵素 Not I を用いて、切断した DNA 断片を 2 次元ゲル電気泳動法でサイズ分画・スポット化する手法) を用いて解析した。約 2,500 箇所についてメチル化状態の差異を比較した結果、1) BPA 曝露が胎仔の脳・肝臓で惹起する異

常 DNA メチル化は、特定遺伝子群を臓器特異的に標的とし、なかでも、発生段階特異的にメチル化が変動する遺伝子群を高率に標的とすること、2) 従来報告されていた低メチル化のみならず高メチル化をも惹起するという新知見を得た。さらに、3) 終脳での変動個所の 9 割が転写開始点周囲に位置し、メチル化変動が発現と対応している遺伝子も見いだした。以上の結果から、胎生期の BPA 曝露は DNA メチル化状態の攪乱を通じて、トランスクリプトームに変動をもたらすことが示唆された。グリア細胞がまだ出現していない胎齢 14.5 日までの終脳との比較において、既にグリア細胞が出現している胎齢 16.5 日の終脳で特異的なメチル化変動を示す遺伝子座も多く存在したことから、終脳を構成する細胞種ごとにメチル化特異性が異なるかもしれないことが予想された [Yaoi T et al, *Biochem Biophys Res Commun*, 2008., Yaoi T et al.(manuscript in preparation)]。

2. 研究の目的

特定の細胞種を対象に、その分化過程に留意して、メチル化変動と遺伝子発現を関連付けながら解析を行うことは、組織を材料とする場合、極めて困難である。また、先述のごとく、これまでに我々が報告してきた BPA 曝露の影響は、神経前駆細胞から神経細胞への分化・成熟の時期に強く現われた。そこで、神経前駆細胞が神経細胞へと分化・成熟していく際に内分泌攪乱化学物質 BPA が及ぼす影響を、培養細胞系を用いてエピジェネティックスの視点から明らかにする本研究を企図した。

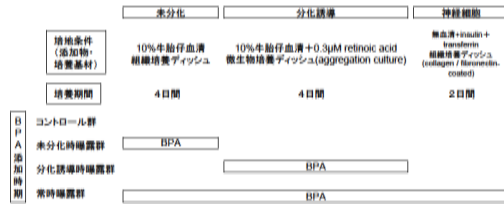
具体的には、P19 細胞をモデルとする実験系において、内分泌攪乱化学物質 BPA が及ぼす影響を、神経前駆細胞が神経細胞へと分化する過程のどの時期に BPA へ曝露されることが最も高い感受性を示すかを以下の 4 つの点に着目して明らかにする: ① BPA が惹起する遺伝子プロモーターの異常 (脱) メチル化、② 遺伝子プロモーターの異常 (脱) メチル化によって遺伝子発現状態が攪乱される分子ネットワーク・分子相互作用、③ それらパスウェイの変化をもたらす最終分化した神経細胞の機能、④ 最終分化した神経細胞における異常 (脱) メチル化パターンの確立時期とその安定性。

P19 細胞をモデルとした本研究を通じて、神経前駆細胞が神経細胞へと分化・成熟していく際に内分泌攪乱化学物質 BPA が及ぼす影響を、エピジェネティックスの視点からみた分子レベルの問題に還元し神経系への BPA の作用メカニズム解明に貢献することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞

動物組織より単離した神経幹細胞に比べ、未分化細胞の大部分を神経細胞へと容易に分化させることができる P19 細胞を用いた。以降の全ての実験を、相異なる 4 つの条件下で P19 細胞を培養・分化させて得た神経細胞群を対象に実施する (下図)。



すなわち、i) BPA を含まない溶媒のみに曝露した細胞 (コントロール群)、ii) 未分化時にのみ BPA 曝露を受けた細胞 (未分化時曝露群)、iii) レチノイン酸による分化誘導時 (aggregation culture) にのみ BPA 曝露を受けた細胞 (分化誘導時曝露群)、iv) 未分化時期から神経細胞への分化後まで BPA に常時曝露された細胞 (常時曝露群)。

しかし、申請後、生物毒性の報告が無い BPA 代謝物のひとつ (以下、代謝物 X) が生物活性を持つ可能性に気づいたことから、曝露化合物を代謝物 X に変更し、研究方針・計画の概略を維持して研究を実施した。

(2) 化合物の曝露用量の検討

マウス胎仔終脳における BPA 曝露影響の知見に基づき、未分化 P19 細胞の細胞増殖能に影響せず、細胞死も引き起こさない最大の培地添加濃度を曝露用量とするために、細胞増殖リアルタイムモニタリング装置を用いて種々の代謝物 X 濃度下における細胞増殖曲線を取得し、ED50 値を算出した。細胞死は、TUNEL 染色による FACS 解析により評価した。

(3) 発現変動遺伝子の解析

① 網羅的解析

最終分化した神経細胞のトランスクリプトームに代謝物 X 曝露が与える影響を異なる曝露条件間で比較する。コントロール群に対する比較において、各代謝物 X 曝露条件群の発現変動遺伝子をオリゴヌクレオチド・アレイにより解析する。取得データをもとに、Gene set enrichment 解析、パスウェイ解析、文献マイニング解析等のインフォマティック解析を実施し、変動遺伝子群を特徴づけるネットワーク・分子相互作用を抽出する。抽出されたパスウェイにおいて「鍵となる遺伝子」群を主とする変動遺伝子群の発現を定量 RT-PCR 法によって確認する。なお、ここで言う「鍵となる遺伝子」とは、パスウェイ全体の中で小さなパスウェイ同士をつなぐ、あるいは多くの遺伝子と相互作用をもつような「ハブ」として位置づけられる遺伝子、パ

スウェイ全体を構成する個々の小さなパスウェイ中の重要遺伝子を指す。

② 個別遺伝子の発現定量

定量 RT-PCR 法により曝露による発現変動を定量する。

(4) DNA メチル化状態の解析

転写開始点近傍 (± 4 kb) に CpG islands を持つ遺伝子を対象に、曝露条件の異なる各群の最終分化した神経細胞における CpG islands 中の CpG メチル化状態を比較解析する。ゲノム DNA を bisulfite 処理後、対象配列領域を PCR により増幅した産物を MS-PCR 法、HRM 法や Bisulfite sequencing 法により解析する。

なお、Bisulfite sequencing 法で得た結果は、オンライン・ソフトウェア QUMA により統計学的に評価する。

4. 研究成果

① 低用量 BPA 代謝物 X の曝露による細胞増殖抑制作用

培地添加濃度を 1 nM~10 μ M の範囲内で 10 倍おきに設定し、各濃度での BPA もしくはその代謝物 X 存在下における未分化 P19 細胞増殖曲線を得た。両化合物ともに用量依存性にダブリングタイムの増加を示す一方、明らかな増殖阻害には至らなかった。ダブリングタイムの変化を指標に ED50 を算出したところ、代謝物 X では BPA よりも約 1/10 の値 (0.8 μ M) を示した。さらに、TUNEL 染色陽性細胞の FACS 解析の結果からは、何れの濃度においても細胞死を認めなかった。そこで、今回調べた濃度で、倍加時間の延長を惹起しない最大濃度 (100 nM ; ED50 の 1/8) の代謝物 X を以後の実験での添加濃度とした。未分化な細胞を神経細胞へと分化させる培養系では、代謝物 X の添加時期が異なる 3 群 (未分化時のみ、分化誘導時のみ、全培養期間) と無添加群 (対照群) を設定した。

② 代謝物 X 曝露が神経系細胞の分化に与える影響

本モデル系では無血清培養期間をグリア細胞 (アスロサイト) が出現してこない 2 日間終了している。定量 RT-PCR 法または免疫細胞化学によるアスロサイトマーカーの発現はいずれの群においても認められなかったため、恐らく代謝物 X 曝露はグリア細胞分化開始期を早める効果はないと考えられる。

また、神経細胞サブタイプマーカーの変化を調べたところ曝露時期による影響の違いが認められた。まず「全培養期間」群のみコリン作動性神経細胞マーカーの発現を認めた。「分化誘導時のみ」、「全培養期間」両群においてドーパミン作動性神経細胞マーカーの減少とセロトニン作動性マーカーの増加を認めた。グルタミン酸作動性マーカーは「分化誘導時のみ」群において増加していた。

代謝物X曝露はP19細胞の神経細胞サブタイプの分化方向の決定に影響を与え得ることが示唆された。

③散在型反復配列 IAP に与える代謝物Xの曝露影響

Dolinoy DC らがBPA曝露マウスで体毛色遺伝子近傍に位置する散在型反復配列 IAP の5' UTRにおいてCpG配列の低DNAメチル化異常を惹起することを既に報告している。そこで本培養系において、散在型反復配列 IAP 全コピーを対象に5' UTRにおけるCpG配列のメチル化状態をバイサルファイトシーケンシング法で調べた。「未分化時のみ」「分化誘導時のみ」両群で5' UTR領域の低メチル化傾向が有意に認められ、とりわけ、「分化誘導時のみ」群においては個々のCpG単位で有為な低下を示す部位が存在した。また、曝露全群においてIAP mRNAの発現が低下していたが、プロモーターである5' UTR領域の低メチル化傾向との有意な相関は見られなかった。

また、Dolinoy DC らは先述のBPA曝露マウスにおいて5' UTRのアンチセンスプロモーター活性が5' UTR領域の低メチル化傾向と相関することを報告した。そこで、マウスの異なる strain 間でゲノム上の位置が保存されているIAPアンチセンスプロモーター由来転写物28種の発現を本培養系において定量した。その半数で発現変動を検出した。各々、異なる曝露時期応答性を示した。MS-PCR法による5' UTRのメチル化度と発現変動の相関は必ずしも全てにおいて認められなかった。最近、IAP mRNAの発現制御にSetdb1というクロマチン関連因子が関与することが報告されており、DNAメチル化のみならず複雑なエピジェネティック制御系に代謝物Xが作用している可能性がある。また、28種のうち7種が、胎生期BPA曝露によりDNAメチル化異常が惹起されると先に報告した胎仔終脳においても[Yaoi T., 2008]、発現変動していたことから、BPA代謝物Xが個体レベルのBPA曝露影響に関与する可能性が示された。

④P19細胞由来神経細胞における低用量BPA代謝物X曝露のトランスクリプトームへ与える影響

最終分化した神経細胞において代謝物X曝露が惹起した発現変動遺伝子群をDNAマイクロアレイ法により検出し、変動遺伝子群を特徴づけるネットワーク・分子相互作用をインフォマティク解析により抽出した。さらに“鍵”となる遺伝子群を含む発現変動遺伝子候補約200個について定量RT-PCR法で変動を評価し、DNAマイクロアレイ法の結果が全般に妥当なものであることが確認された。

添加時期の異なる各群と対照群間での比較から発現変動遺伝子を抽出した。変動遺伝

子の統計解析から曝露時期の違いでトランスクリプトームへの影響の大きさが異なることが明らかとなった。その大きさは、「分化誘導時のみ」、「全培養期間」、「未分化時のみ」の順に小さくなった。この結果は、細胞分化過程の一時的な曝露であっても、その影響は最終分化した神経細胞のトランスクリプトーム異常として残ることを示している。また、未分化時のみの曝露群では変動遺伝子数がとりわけ少ないことに鑑みると、神経細胞分化過程が曝露影響のcritical time widowであることが推察された。

変動遺伝子とその発現変動幅を処理群間で比較したところ、興味深い特徴があった。すなわち「全培養期間」群の変動遺伝子の多くは「分化誘導時のみ」群のそれと共通しており、その多くが変動の増減方向は一致するものの変動幅は「全培養期間」群において、より小さくなるかわ変わらないという傾向があった。このことは、神経細胞分化誘導過程が曝露影響のcritical time widowであるとともに、その影響が最終分化した細胞のトランスクリプトーム異常として残るかどうかは、個々の標的遺伝子や曝露の様式によって異なることを示唆している。

Gene set enrichment 解析等のインフォマティク解析から変動遺伝子群には顕著な特徴を見出した。「分化誘導時のみ」群、「全培養期間」群共に、発現上昇する遺伝子群はエネルギー代謝系・核酸代謝系などの代謝とそれらの制御に関わるパスウェイが主たるものであった。一方、発現減少・抑制された遺伝子群には、脳神経系を含む細胞分化・組織形成に関わる遺伝子群が主たるものとして見出され、そこには転写調節因子やクロマチン制御等のエピジェネティックな遺伝子発現制御を担うものやそれらの標的遺伝子が多く含まれていた。そして、これらの中に、先述の神経細胞サブタイプの分化に関与するパスウェイも含まれていた。これらの発現変動遺伝子群の大半は、胎生期BPA曝露によりDNAメチル化異常が惹起されると先に報告した胎仔終脳においても[Yaoi T., 2008]発現変動していることを見出した。

「分化誘導時のみ」、「全培養期間」両群の発現変動遺伝子において、転写開始点周囲にCpGアイランドを持つ遺伝子が占める比率は、遺伝子総数における同様の比率よりも高いことが判った。そして、先のIAPのみならず、メチル化変動が惹起されている単一遺伝子が存在することが判明した。現在もこれら遺伝子のCpGアイランドのメチル化変動の確認を個別のCpGのレベルで進めており、発現変動との相関の全貌を明らかにしていくことは今後の課題として残った。

見出された発現変動遺伝子セットと類似する応答遺伝子セットを持つ化合物群をイ

ンフォマティック解析の手法により検索した。その結果、非常に顕著な統計的有意性を持って BPA が第 1 位でヒットし、ついで genistein 等、これまでも BPA 類似の作用を持つとされ比較対照されることの多かった環境化学物質が有意性を持ってヒットした。

以上の解析で得られた知見に鑑みると、これまでに生物活性もしくは毒性の報告が無い BPA 代謝物 X は、BPA 曝露胎仔終脳における活性分子型のひとつである可能性があり、非常に興味深い。

本研究では、当初計画した BPA からその代謝物 X に対象化合物を変更することによって、神経前駆細胞が神経細胞へと分化・成熟していく際に BPA が及ぼす影響の分子メカニズムを、エピジェネティクスの視座から解明するための、新たな手がかりを得ることができたと考える。

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 6 件)

① Tozawa T, Itoh K, Yaoi T, Tando S, Umekage M, Dai H, Hosoi H, Fushiki S. The shortest isoform of dystrophin (Dp40) interacts with a group of presynaptic proteins to form a presumptive novel complex in the mouse brain. *Mol Neurobiol*. 査読有, 2012;45(2):287-97. doi: 10.1007/s12035-012-8233-5

② Itoh K, Yaoi T, Fushiki S. Bisphenol A, an endocrine-disrupting chemical, and brain development. *Neuropathology*. 査読有, 2012 Jan 12. doi: 10.1111/j.1440-1789.2011.01287.x.

③ Shimomura M, Yaoi T, Itoh K, Kato D, Terauchi K, Shimada J, Fushiki S. Drug resistance to paclitaxel is not only associated with ABCB1 mRNA expression but also with drug accumulation in intracellular compartments in human lung cancer cell lines. *Int J Oncol*. 査読有, 2012 Apr;40(4):995-1004. doi: 10.3892/ijo.2011.1297.

④ Han L, Itoh K, Yaoi T, Moriwaki S, Kato S, Nakamura K, Fushiki S. Prenatal and Lactational Exposure to Bisphenol A in Mice Alters Expression of Genes Involved in Cortical Barrel Development without

Morphological Changes. *Acta Histochem Cytochem*. 査読有, 2011 Feb 26;44(1):25-33. https://www.jstage.jst.go.jp/article/ahc/44/1/44_10042/_article

⑤ Kato S, Itoh K, Yaoi T, Tozawa T, Yoshikawa Y, Yasui H, Kanamura N, Hoshino A, Manabe N, Yamamoto K, Fushiki S. Organ distribution of quantum dots after intraperitoneal administration, with special reference to area-specific distribution in the brain. *Nanotechnology*. 査読有, 2010 Aug 20;21(33):335103. doi:10.1088/0957-4484/21/33/335103

⑥ 矢追 毅: エピジェネティクスの研究方法. 京府医大誌, 査読有, 118 : 533-541, 2009. <http://www.kpu-m.ac.jp/k/jkpum/pdf/118-8/08yaoi.pdf>

[学会発表] (計 1 件)

① 矢追 毅, 伊東恭子, 中村恵子, 伏木信次. 胎生期に Bisphenol A 曝露されたマウス終脳における DNA メチル化変動. 第 3 回日本エピジェネティクス研究会年会. 2009 年 5 月 22 日~23 日; 学術総合センター(東京都).

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/neurpath/top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢追 毅 (YAOI TAKESHI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号 : 40311914

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :