

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12254

研究課題名（和文）フタル酸エステルによるエピゲノム変化誘導と世代間継承機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of epigenetic change induction and intergenerational inheritance by phthalate esters.

研究代表者

丹藤 由希子（Tando, Yukiko）

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：70596212

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：マウスを用いた研究により、プラスチック可塑剤として用いられるフタル酸エステル（DEHP）の妊娠期における曝露は、生まれた仔の精子形成に及ぼす。本研究では、その原因となる仔の生殖細胞における精子形成に必須な遺伝子の高メチル化が誘導されるメカニズムを検証した。その結果、DEHP母体曝露によって仔の生殖細胞で増加する活性酸素種が遺伝子の高メチル化に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般的に、親が高齢になるほど妊娠率の低下や出生後の児の先天的なリスクが増大することが知られている。近年の出産年齢の高齢化に伴い先天的なリスクが増加する中、化学物質の影響による精子の異常は、さらなる妊娠率の低下と次世代の精子の異常および数の減少につながる。この状況下で、化学物質による精子形成異常の科学的裏付けによる立証が社会に与えるインパクトは大きい。本研究の成果は、DEHPの類似物質の影響の解明やヒトにおける検証を通して、安全な代替因子の開発と生殖細胞に影響を与える危険因子を軽減した環境づくりに貢献する。これは化学物質による精子数減少の予防、そして精子数減少に起因する不妊の予防につながる。

研究成果の概要（英文）：Studies in mice have shown that exposure during pregnancy to phthalates (DEHP), which are used as plasticisers, has an effect on spermatogenesis of the offspring. The study examined the mechanisms by which the cause of induction of hypermethylation of genes essential for spermatogenesis in the pups' germ cells. The results suggest that reactive oxygen species, which are increased in the offspring germ cells by maternal exposure to DEHP, may be involved in gene hypermethylation.

研究分野：発生生物学

キーワード：生殖細胞 マウス エピジェネティクス フタル酸エステル

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

社会の工業化による人為的な化学物質の増加に伴い、化学物質が生殖細胞に影響を与えることが次々と明らかになってきた (Semin Cell Dev Biol 2015; 43: 66-75)。生殖細胞異常の誘発は、機能的な生殖細胞の減少につながり稔性に影響を与える。生殖細胞は環境因子への感受性が強い胎児期の初期から形成されるため、成体には問題のない濃度の化学物質への暴露でも次世代に継承されるような生殖細胞への影響が起こる可能性がある。フタル酸ビス(2-エチルヘキシル) (以下 DEHP) は、ポリ塩化ビニルの可塑剤としてプラスチック雑貨、食品包装材、壁材など広範囲に用いられてきた。しかし、ヒトで妊娠期の体内 DEHP 代謝物濃度と流産、および男性の体内 DEHP 代謝物濃度と精子の異常率との関連が示され、また動物実験において、妊娠マウスへの暴露が 4 世代にわたる精子形成異常や精子の運動性異常を起こすことが報告された (Biol Reproduction 2013; 1-15)。一方で、これらの異常を引き起こす分子メカニズムは未解明である。DEHP 母体暴露マウスから生まれた雄マウスの精子を用いた先行研究では、精子の運動性に関わる DNA メチル化に異常が生じて運動性の異常につながることを示唆されるにとどまり (PLoS ONE 2015; 10: e0132136)、精子形成異常に関連するメチル化の異常は見出されていない。

2. 研究の目的

申請者は、DEHP の精子形成に対する影響をモデルとして、世代間継承される表現型異常の分子機構の解明を目指した研究を進めてきた。これまでに DNA メチル化に焦点を当てた研究を行い、母体が DEHP 暴露された仔 (F1) の生殖細胞で、プロモーター領域の DNA メチル化が亢進した遺伝子の大半が精子形成関連遺伝子であることを見出した。一方で、DNA が精子形成関連遺伝子に特異的にメチル化亢進を引き起こすメカニズムや、精子形成異常の世代間継承のメカニズムは未解決である。そこで本研究では、「DEHP の遺伝子特異的なメチル化亢進による精子形成異常の誘導機構と、精子形成異常の世代間継承に関わるエピゲノムの解明」を目的とする。

3. 研究の方法

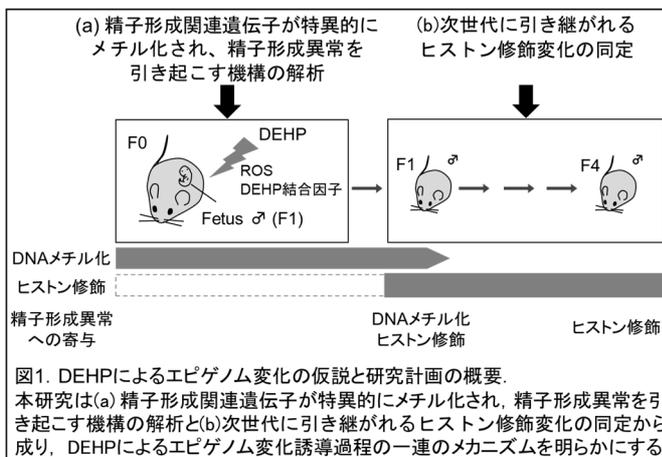
本研究では、DEHP 母体暴露後の生殖細胞で (a) 精子形成関連遺伝子が特異的にメチル化され、精子形成異常を引き起こす機構の解析と、(b) 次世代に引き継がれるヒストン修飾変化の同定を行う (図 1)。計画の詳細を以下に記載する。

(a) DEHP による ROS の増加が精子形成関連遺伝子のメチル化に関わる可能性の検証

DEHP は体内で活性酸素種 (ROS: reactive oxygen species) を発生させ (Biochem J 2002; 365: 849-856) また ROS は直接的に DNA メチル化作用を持つ (Aging Dis 2013; 5(1): 52-62)。胎齢後期の生殖細胞では、精子形成関連遺伝子などの生殖細胞系列に特異的な遺伝子領域がオープンクロマチン化しているため (Cell Res 2018; 28: 1077-1089)、ROS の発生によってそのような領域の遺伝子が優先的にメチル化されると考えられる。そこで、まず妊娠 18 日目のマウスに DEHP またはコーンオイルを毎日経口投与して DEHP 母体暴露マウスを作成し、暴露直後の胎仔生殖細胞内での ROS の増加を、ROS 検出試薬である DCFDA の蛍光強度を Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) で検出することにより調べる。また胎生後期のオスより生殖細胞と体細胞を単離し、DEHP または DEHP 代謝物の MEHP を添加して短時間培養した後にバイサルファイトシーケンスを行い、生殖細胞のみで精子形成関連遺伝子のメチル化が亢進することを確認する。なお、生殖細胞を単離するため、生殖細胞で特異的に発現する Vasa のプロモーター下に RFP 遺伝子を導入した遺伝子改変マウス (Mol Reprod Dev 2010; 77:802-811) を用いる。

(b) 次世代に引き継がれるヒストン修飾変化の同定

DEHP 母体暴露によって F1 の精原細胞で亢進した精子形成関連遺伝子のメチル化率は、F2 では元に戻っていることが明らかになった。よって、DEHP 母体暴露による世代を越えた精子形成異常の原因は精子形成遺伝子の DNA メチル化ではなく、他にあるものと考えられた。そこで、DEHP が F1 生殖細胞のヒストン修飾変化に影響を与え、それが次世代に継承される可能性を考えた。DEHP によりヒストン修飾が変化する遺伝子を調べるため、F1 と F2 の精子でヒストン修飾の ChIP-seq を行い、コントロール群と DEHP 群の間で差があるヒストン修飾変化について、



F1 と F2 で共通または異なる修飾状態の精子形成関連遺伝子を選択する。ROS は DNA メチル化に加えてヒストン修飾変化にも関与することから (Aging Dis 2013; 5(1): 52-62) (a) で DEHP 暴露後の胎仔生殖細胞における ROS の増加が確認された場合は、ROS により変化することが報告されているアセチル化ヒストン H3、H4 を優先的に調べる。もし精子形成関連遺伝子についてコントロール群と DEHP 群の間でヒストン修飾に差がなければ、細胞の増殖や生存に必要な遺伝子等、精子形成関連遺伝子以外の遺伝子にも対象を広げる。F1 で検出されたヒストン修飾が F2 にも見られれば、その修飾は F1 と F2 の間で継承されたといえる。F1 と F2 で共通のヒストン修飾が見られない場合は、DEHP による DNA メチル化変化を介して精原細胞から精子が形成されるまでの間にヒストン修飾変化が生じ、F2 とそれ以降の世代に引き継がれる可能性が考えられる。よって、F2 のみで変化しているヒストン修飾も以降の解析対象とする。

さらに、F2 と通常飼育のメスを交配して F3 および同様に F4 を作出し、精巢の組織学的解析にて精子形成異常の継承を確認する。次に上記の解析で選出したヒストン修飾の ChIP-qPCR にて精原細胞における精子形成関連遺伝子のヒストン修飾状態を検証し、継承される修飾および世代固有の修飾を同定する。また、差が見られたヒストン修飾のある遺伝子について各世代の生殖細胞サンプルで定量 PCR を行い、ヒストン修飾と遺伝子発現との関連性を検証する。

4. 研究成果

(a) DEHP による ROS の増加が精子形成関連遺伝子のメチル化に関わる可能性の検証

妊娠 18 日目のマウスに DEHP またはコーンオイルを毎日経口投与して DEHP 母体暴露マウスを作出し、DCFDA を用いて暴露から 12 時間後の胎仔生殖細胞内での ROS の変化を FACS により調べた。その結果、DEHP 群において有意な ROS の増加を認めた (図 2)。次に、胎齢 18 日目のオス胎仔より精巢の細胞を単離して単細胞化し、DEHP または DEHP 代謝物である MEHP を添加して 30 分間短時間培養した後に ROS の変化を調べたところ、DEHP 添加では ROS 量に変化が見られなかった一方、MEHP 添加により ROS の有意な増加を認めた (図 3)。これらの結果から、母体投与された DEHP は体内で MEHP に変換され、胎仔生殖細胞内における ROS の発生源となったことが示唆された。

MEHP の添加が胎仔生殖細胞の ROS を増加させることが分かったため、次にその時の精子形成関連遺伝子のプロモーターのメチル化状態を検証した。

先行研究では DEHP の母体暴露後に胎仔期生殖細胞でプロモーターのメチル化が亢進し、かつ成体期の生殖細胞で発現が低下した 3 遺伝子 (*Hist1h2ba*, *Sycp1*, *Taf7l*) が同定された (Elife 2021; 10:e70322)。そこで、これらの 3 遺伝子のメチル化変化を調べることにした。胎齢 18 日目のオス胎仔より生殖細胞と体細胞を単離し、MEHP を添加して 30 分間短時間培養した後に生殖細胞をフローサイトメトリーで分離し、*Hist1h2ba*, *Sycp1*, *Taf7l* のバイサルファイトシーケンスを行った。その結果、*Sycp1* は MEHP の添加によってメチル化率が増加する傾向が見られた一方、*Hist1h2ba*, *Taf7l* はメチル化率の低下傾向を認め、MEHP 添加による精子形成関連遺伝子のメチル化変化は一律に増加するものではなく、遺伝子により異なることが示唆された (図 4)。今後はサンプル数を追加して結果の再現性を確認し、さらに MEHP 添加と同時に ROS 阻害剤を添加した時のメチル化率を検証することにより、検出されたメチル化変化が ROS によるものであるかを明らかにする。

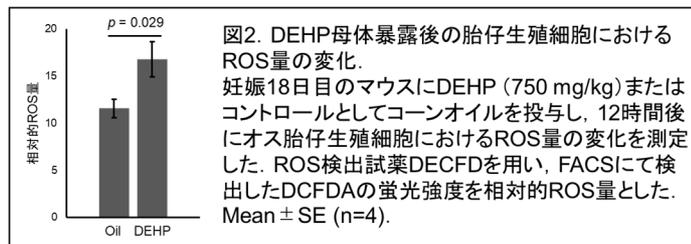


図2. DEHP母体暴露後の胎仔生殖細胞における ROS 量の変化。
妊娠18日目のマウスにDEHP (750 mg/kg)またはコーンオイルを投与し、12時間後にオス胎仔生殖細胞におけるROS量の変化を測定した。ROS検出試薬DCFDAを用い、FACSにて検出したDCFDAの蛍光強度を相対的ROS量とした。Mean ± SE (n=4)。

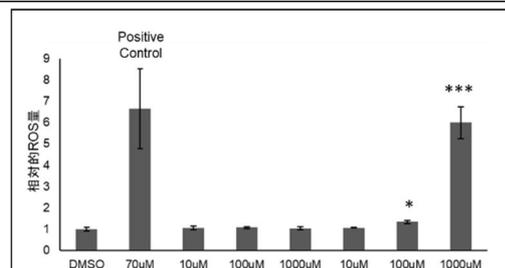


図3. DEHPまたはMEHP添加後の胎仔生殖細胞におけるROS量の変化。
妊娠18日目のオス胎仔から単離した精巢の細胞にDEHPまたはMEHPを添加して30分間培養し、生殖細胞におけるROS量の変化を測定した。Mean ± SE (n=3)。* $p < 0.05$, *** $p < 0.005$ 。

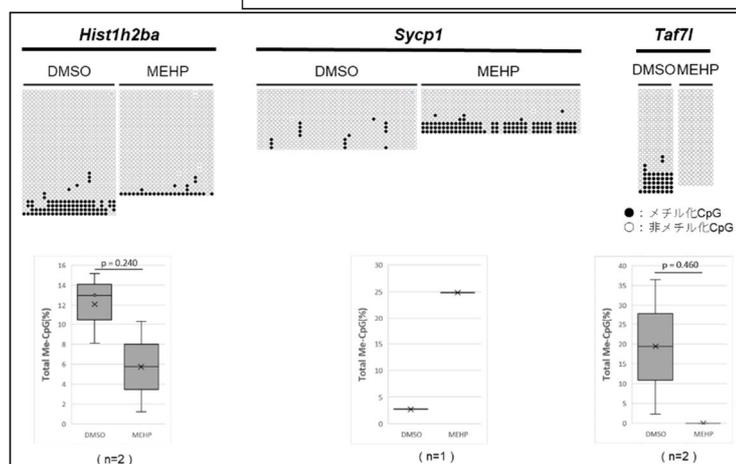


図4. DEHPまたはMEHP添加後の胎仔生殖細胞におけるプロモーターメチル化率の変化。
妊娠18日目のオス胎仔から単離した精巢の細胞にDEHPまたはMEHPを添加して30分間培養した後の生殖細胞における遺伝子プロモーターのメチル化率をバイサルファイトシーケンスにて検証した。

(b) 次世代に引き継がれるヒストン修飾変化の同定

まず母体 DEHP 暴露後の F1 の精子で変化しているヒストン修飾を絞り込むため、F1 の精巣組織切片を用いてヒストン修飾抗体に対する免疫染色を行い、精子における蛍光強度の定量を行った。その結果、H3K9me3 の蛍光強度が有意に増加していた (図 5)。そこで、



図5. DEHP母体暴露後のF1精子におけるヒストン修飾の変化。妊娠8日目から18日目にかけてDEHP (150 mg/kg) またはコーンオイルを投与した母から生まれた仔 (F1) の精子においてヒストン修飾の免疫染色を行い、蛍光強度を定量した。Mean±SE (n=100 for Oil, n=150 for DEHP)。

DEHP 母体暴露によって H3K9me3 が変化した遺伝子領域を検出するために、精子を用いた H3K9me3 の ChIP-seq を行うことにした。

哺乳類の精子ではヒストンの大部分はプロタミンに置き換わるが、少量のヒストンも残存している。多くの研究では精巣上体尾部に含まれる精子の中から一定時間放置後に液面に泳ぎ上がったものを ChIP サンプルとしているが、そこには受精への寄与率が低いとされているヒストンからプロタミンへの置換が完了していない未成熟な精子が含まれる (Nat Comm 2018; 9: 3885)。本研究では次世代に伝達されるヒストン修飾の検出を目指しているため、未成熟な精子を除去した成熟精子の画分 (HRCS, Histone Replacement-Completed Sperm) を精製して用いることとした。HRCS を用いた ChIP-seq の報告がなかったため、サンプル調整および ChIP 条件の最適化を行ってきたが、最適な条件を見出すまでには至らなかった。原因として、大部分がプロタミンに置換されている HRCS に残されたヒストンは極微量であるため、検出が容易ではないことが考えられる。今後は主に HRCS の ChIP 用の調整に焦点を当ててさらなる最適化を行い、H3K9me3 の ChIP-seq を実施する。また、変化した領域が F2 以降に継承されているかを F2 以降のサンプルを用いて検証する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yukiko Tando, Yasuhisa Matsui	4. 巻 4
2. 論文標題 Identification of spermatogenesis-associated changes in DNA methylation induced by maternal exposure to chemicals in male germ cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Star Protocols	6. 最初と最後の頁 101912
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2022.101912	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yukiko Tando, Hitoshi Hiura, Asuka Takehara, Yumi Ito-Matsuoka, Takahiro Arima, Yasuhisa Matsui	4. 巻 10
2. 論文標題 Epi-mutations for spermatogenic defects by maternal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalateEpi-mutations for spermatogenic defects by maternal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e70322
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.7032210.7554/eLife.70322	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yukiko Tando, Yasuhisa Matsui	4. 巻 9
2. 論文標題 Inheritance of environment-induced phenotypic changes through epigenetic mechanisms	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Environmental Eppigenetics	6. 最初と最後の頁 dvad008
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/eep/dvad008.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丹藤 由希子
2. 発表標題 精子形成過程におけるLARP7 の機能解析
3. 学会等名 第3回有性生殖研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丹藤由希子1, 樋浦仁2, 竹原雅子花1, 伊藤-松岡由美1, 有馬隆博3, 松居靖久1丹藤由希子, 樋浦仁, 竹原雅子花, 伊藤-松岡由美, 有馬隆博, 松居靖久
2. 発表標題 妊娠期のフタル酸エステル暴露が仔の精子形成異常を引き起こすエピゲノム変異の同定
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関