

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 5月30日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710067

研究課題名（和文） ディーゼル排ガス胎仔期曝露による脳機能障害に関わる DNA メチル化異常の網羅的解析

研究課題名（英文） Analysis of genome-wide DNA methylation profiles of the brain in mice exposed to diesel exhaust during fetal period.

研究代表者

立花 研 (TACHIBANA KEN)

東京理科大学・薬学部・助教

研究者番号：10400540

研究成果の概要（和文）：妊娠マウスにディーゼル排ガス（DE）の曝露を行い、生まれた仔マウスの脳について、遺伝子発現の制御に関連する DNA メチル化状態の変化を、全ゲノムを対象として解析した。その結果、出産直後の脳においても、3 週齢まで成長した段階でも DNA メチル化状態が大きく変化していることが明らかになった。このことから、胎仔期に曝露された DE の影響が成長後まで持続することが示唆された。本研究の結果は、DE 胎仔期曝露が仔の脳機能に及ぼす影響とそのメカニズムを解明する上で重要な知見と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Diesel exhaust (DE) was exposed to pregnant mice and genomic DNA was obtained from offspring. Subsequently, genome-wide DNA methylation analysis was performed. The results indicated that prenatal DE exposure disrupts the construction of DNA methylation pattern in the brain of offspring. It is also suggested that disrupted DNA methylation pattern is sustained during growth. Our findings provide the important information to clarify the effects and mechanisms of functional impairment of the brain induced by prenatal DE exposure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：衛生化学、分子生物学

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：トキシコロジー、DNAメチル化、環境、衛生、エピジェネティクス、ディーゼル排ガス

1. 研究開始当初の背景

遺伝子のプロモーター領域に生じる DNA メチル化は遺伝子の発現を制御しており、ほ乳類の発生・分化に重要な役割を果たしている。最近注目を浴びている iPS 細胞の効率的な作製や iPS 細胞からの特異的な臓器への分

化の制御に、DNA メチル化をはじめとした (DNA の塩基配列には変化を生じない) エピジェネティックな遺伝子発現の制御が鍵を握ると考えられていることからその重要性がうかがえる。

細胞が持つ DNA メチル化パターンの情報は受精後に一度消去された後、発生の過程で再び構築されることが明らかとなっている。したがって、この期間に様々な化学物質に晒された場合、正常な DNA メチル化パターンの構築に異常が生じる可能性が高い。また、一度確立された DNA メチル化の情報は細胞分裂後も維持されるため、その異常は生体にとって極めて深刻な影響を及ぼす。

我々はディーゼル排ガス (DE) の生体影響について、マウスを用いて胎仔期曝露の影響を検討した。その過程で、脳内の脳血管周囲顆粒細胞の細胞内に異常な顆粒が蓄積すること、血管内皮やアストロサイトなど周辺の細胞に影響を及ぼすことなどを世界に先駆けて明らかにした。また、予備的な研究を通じて脳内モノアミン濃度の変動、協調運動性の低下、記憶学習能力の低下などが認められたことから、脳神経疾患との関連について注目した。

器官形成段階である胎児期に受けた影響が不可逆的な変化として表れる場合、一度受けた影響が出生後も残り、疾病の発症につながる恐れがある。脳神経系の発達に DNA メチル化が重要な役割を果たしていることが数多く報告され、その異常と統合失調症・アルツハイマーといった脳神経疾患との関連が示されている。したがって、DE の胎仔期曝露により DNA メチル化の異常が生じ、その異常が細胞分裂後も維持されることによって脳神経系の組織形成・機能に影響が表れる可能性は高いと考えられる。特に、ナノ粒子が産仔の脳に移行・蓄積していることから排ガス中の微粒子成分の及ぼす影響が注目される。

2. 研究の目的

(1) ディーゼル排ガス胎仔期曝露の実験系において、DNA メチル化状態の変化を網羅的に解析する。得られた結果から影響を受けやすい遺伝子 (群)・DNA 領域・塩基配列を明らかにする。

(2) メチル化状態の変化が見出された DNA 領域について、対象となる遺伝子の発現制御への関与を明らかにする。特に、ディーゼル排ガス胎仔期曝露により脳組織に生じる病変と DNA メチル化・遺伝子発現異常の相関から、脳機能障害への関与を明らかにする。

(3) 微粒子成分 (特にナノサイズの粒子) とガス成分が及ぼす脳組織及び機能への影響を明らかにするとともに、(1) で見出された DNA メチル化状態・遺伝子発現異常の

脳機能障害への関与を明らかにする。

3. 研究の方法

妊娠マウスにディーゼル排ガスを曝露し、産仔の DNA メチル化状態を網羅的に解析した。曝露濃度は、環境基準値に近い、都市部重汚染地区の大気汚染粒子濃度を参考として設定し、実際に起こりうる汚染状況の条件で実験を行った。

(1) 実験動物及びディーゼル排ガス曝露法
実験動物として、C57BL/6Jマウスを用いた。曝露時期は、最も反応性が高いと推定される妊娠期に実施し、出産直後 (1日齢)、3週齢で試料を採取した。曝露装置は本学、ナノ粒子健康科学研究センター内に設置した装置を用いた。曝露濃度はディーゼル排気微粒子の濃度として、 0.1 mg/m^3 となるように設定した。

(2) マイクロアレイを用いた DNA メチル化状態の解析

(1) の曝露により得られた試料からゲノム DNA を抽出・精製した。1日齢の仔マウスは目視での雌雄判別が困難であるため、ゲノム DNA を用いて Y 染色体上に存在する Sry 遺伝子に対する PCR を行うことで性別を判定した。雌雄それぞれのマウスについて、Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP) 法を用いて、ゲノム DNA 中からメチル化 DNA を特異的に回収した。MeDIP 法によって回収されたメチル化 DNA が少量であったことから、現在確立されている手法のうち、最もバイアスの少ない *in vitro* transcription を用いた DNA 増幅法によって DNA を増幅した。得られた DNA をプロモーター解析用マイクロアレイによって解析を行った。得られた結果から、コントロール群、曝露群の各々においてメチル化された DNA 領域を特定し、雌雄・染色体ごとにまとめ、比較を行った。また、クラスター解析、当研究室で開発されたメッシュターム法等により、影響を受けやすい遺伝子群・染色体の特定を試みた。

4. 研究成果

(1) DNA メチル化の網羅的解析の過程では、MeDIP 法を用いてメチル化 DNA を得ているが、得られる DNA 量は少なく、網羅的な解析を行うためには DNA の増幅が必要である。従来は PCR 等によって DNA 増幅を行っているが、解析対象となる CpG アイランドは、PCR による増幅の際に増幅に偏りが生じやすく、増幅前の DNA の存在比が反映されにくい点が問題で

あった。このことから、MeDIP 法で得られた DNA を、現在確立されている手法のうち最もバイアスの少ない *in vitro* transcription を利用した DNA 増幅法 (IVT 増幅法) を用いた増幅し、マイクロアレイ解析に十分な量まで増幅が可能な実験系を構築した。構築した実験系を用いて、マイクロアレイによる DNA メチル化状態の網羅的解析を行った。

(2) 妊娠期のマウスに DE の曝露を実施し、出産直後 (1 日齢) および 3 週齢の時点で試料の採取を行った。産仔の脳からゲノム DNA を抽出・精製し、得られた DNA を用いて Y 染色体上に存在する Sry 遺伝子に対する PCR を行うことで、マウスの雌雄を判別した。それぞれのサンプルから MeDIP 法を用いて、ゲノム DNA から特異的にメチル化 DNA を回収した。MeDIP 法によって回収された DNA を、IVT 増幅法を利用して増幅し、プロモーター解析用マイクロアレイを用いて解析した。

1 日齢では、雄性産仔、雌性産仔のいずれにおいても、全ての染色体において DNA メチル化状態に大きな変化が認められた。特にメチル化頻度が低下する領域が多く検出された。DNA メチル化は遺伝子発現を負に制御していることから、この結果は、胎仔期の DE 曝露により、1 日齢の産仔において抑制されるべき遺伝子が高発現していることを示唆している。

胎仔期は様々な組織が形成される時期であることから、他の期間に比べ遺伝子発現の厳密な制御が必要と考えられる。また、一度生じた DNA メチル化は基本的に細胞分裂後も維持されることから、検出された DNA メチル化の異常が成長後も維持されると予想された。

(3) 1 日齢で認められた DNA メチル化状態の変化が、成長に伴ってどのように推移するのかを調べるため、産仔が 3 週齢になった時点でサンプルの採取を行い、DNA メチル化状態を網羅的に解析した。その結果、雄性産仔、雌性産仔ともに 3 週齢の時点でも DNA メチル化状態に変化が生じていることが明らかになった。このことから、胎仔期のディーゼル排ガス曝露によって仔に生じる DNA メチル化異常が、出生後少なくともある程度の期間にわたって持続し、生体影響に関与することが示唆された。

(4) 上記、(2) (3) の解析から、特に 1 日齢においてメチル化状態の変化が大きいことが示唆された。このことから、1 日齢の雄性産仔、雌性産仔に共通してメチル化状態に変化が認められた遺伝子に着目し、各々の遺伝子に付与された Gene Ontology をデータベースから抽出することで、どのような遺伝

子機能に変化が生じるか検討を行った。その結果、receptor activity や DNA binding といった機能 (用語) が抽出され、各種の受容体の活性や遺伝子の転写制御に異常が生じやすい可能性が示唆された。

本研究の結果は、ディーゼル排ガス胎仔期曝露によって仔の脳に生じる生体影響の背景に DNA メチル化異常を介した遺伝子発現の変化が存在することを示唆するものであり、生体影響のメカニズムを解明する上で極めて重要な知見である。網羅的な解析を行い、膨大な情報が得られたことから、DE の胎仔期曝露が仔の脳機能に与える影響について、これまでに明らかとなっていない障害やそのメカニズムの解明に向けて大きな情報になると考えられる。

今後、本研究の結果で得られた DNA メチル化の変化の情報を活用し、いずれの脳領域に影響が生じやすいのか、どのような細胞種に影響が生じやすいのかといった観点から、より詳細な解析を行う必要がある。また、DE 中の粒子状成分が DNA メチル化状態に及ぼす異常についての解析が十分にできていないことから、粒子状成分に注目した解析を行う予定である。

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 3 件)

- ① Sato A, Sunayama J, Matsuda K, Seino S, Suzuki K, Watanabe E, Tachibana K, Tomiyama A, Kayama T, Kitanaka C. MEK-ERK signaling dictates DNA-repair gene MGMT expression and temozolomide resistance of stem-like glioblastoma cells via the MDM2-p53 axis. *Stem Cells*, Vol. 29, 1942-1951. (2011) (査読有)
- ② Sunayama J, Sato A, Matsuda K, Tachibana K, Watanabe E, Seino S, Suzuki K, Narita Y, Shibui S, Sakurada K, Kayama T, Tomiyama A, Kitanaka C. FoxO3a functions as a key integrator of cellular signals that control glioblastoma stem-like cell differentiation and tumorigenicity. *Stem Cells*, Vol. 29, 1327-1337. (2011) (査読有)
- ③ 立花 研, DNA配列に無関係な遺伝子発現調節、科学フォーラム、第 28 巻第 1 号、42-46、2011 年 (査読無)

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① 立花 研、高柳皓平、秋本純芽、新海雄介、武田 健 ディーゼル排ガス胎仔期曝露によるDNAメチル化異常の網羅的解析 日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 31 日、札幌（北海道）
- ② 立花 研 環境化学物質により次世代に生じる健康影響 日本幼少児健康教育学会第 30 回記念大会、2012 年 2 月 19 日、野田（千葉）
- ③ 高柳皓平、立花 研、秋本純芽、新海雄介、武田 健 胎仔期にディーゼル排ガスに曝露されたマウスにおけるDNA メチル化状態の網羅的解析 日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 30 日、静岡（静岡）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立花 研 (TACHIBANA KEN)
東京理科大学・薬学部・助教
研究者番号：10450540

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：