

平成 27 年 4 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23310044

研究課題名(和文)環境因子誘起性のエピジェネティック変異機序(DOHaD発生の分子機構解明)

研究課題名(英文)Epigenetic mutation induced by environmental factors: a molecular mechanism elucidation of the DOHaD

研究代表者

大迫 誠一郎(Ohsako, Seiichiroh)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00274837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円

研究成果の概要(和文)：胎児期の環境要因がエピゲノム変化を引き起こし、成熟後も記憶されるというDOHaDの分子機構解明を、網羅的メチル化解析法(MSD-AFLP法)開発とともに実施した。妊娠マウスにTCDDを投与すると肝臓のCyp1a1プロモーターが生後3日目から低メチル化し、成熟後まで維持される。ChIPアッセイによるDnmt3b解離という所見を捉えたため受動的脱メチル化を想定した。一方、この記憶が成熟個体でも起きるか検討したところ、10週齢個体肝臓においてもTCDD投与後24時間という早い時点から低メチル化が起きることが判明し、能動的脱メチル化である可能性が出てきた。

研究成果の概要(英文)：An attempt of elucidation of molecular mechanism of the DOHaD in which fetal environmental factors are hypothesized to cause an epigenomic alteration and memory persisted in adulthood. Additionally we developed a new genome-wide methylation analysis (MSD-AFLP method). The Cyp1a1 promoter of the liver is hypomethylated from day 3 after birth when given TCDD to pregnant mice and the altered methylation level is maintained until after maturity. Because the Dnmt3b dissociation was found by ChIP assay, we assumed mechanistic possibility of passive demethylation. Whereas we tested whether this memory could happen in the adulthood. In the mouse liver of 10 weeks of age, it was found that hypomethylation was caused by the early point in time such as 24 hours after TCDD administration, suggesting that active demethylation should be considered.

研究分野：環境毒性学

キーワード：エピジェネティクス 化学物質 DOHaD

## 1. 研究開始当初の背景

Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) 仮説においては、胎児や新生児の成育環境がそのナイーブなエピゲノムに作用し、成熟後までプログラム異常として残ることが疾患への罹りやすさを決めているとされる (Wadhwa, *et al.*, *Semin Reprod Med* 27, 358-368, 2009)。DOHaD 研究は、保健衛生学上の重要性により、現在世界各国で精力的に進められているが、疫学的・実験動物学的現象としての報告は多いものの、発生原因に関する分子機構の報告は極めて少ない。

ダイオキシン類 (TCDD や PCB126) を胎児期曝露された動物の成熟後に、変異原である DMBA を投与すると対照群より高い頻度で乳癌が発生する (Brown *et al.*, *Carcinogenesis* 19, 1623-1629, 1998; Muto *et al.*, *J Toxicol Pathol* 14, 213-224, 2001; Wakui *et al.*, *Toxicol Appl Pharmacol* 210, 200-211, 2006)。この個体では肝臓 Cyp1a1 誘導率が増加するが、DMBA 投与段階ですでに胎児期に曝露されたダイオキシンは残留していないため、なんらかの未知の機構で Cyp1a1 転写誘導機構に変化が生じ、かつ化学発癌感受性の高い個体になってしまうものと考えられる。その発生学的メカニズムは全く不明であったが、申請者の行ったマウスの胎児期 TCDD 曝露実験により、肝臓 DNA の Cyp1a1 遺伝子の CpG 低メチル化、ヒストンの高アセチル化が生後初期に起き、成熟後まで維持されることがわかった。観察された本現象は、胎児期に化学物質曝露で生じたエピゲノム変化が、その後成長してからの病態感受性につながる事例の一つであり、DOHaD 動物モデルと見なすことができる (大迫誠一郎, *科学* 79, 984-988, 2009; Ohsako, *Genes Environ* 33, 43-49, 2011)。また申請者らのグループは、妊娠中に低亜鉛飼料で飼育されて生まれたマウスでは、成熟後のカドミウム投与による肝臓メタロチオネイン 2 遺伝子 (MT2) の誘導率が増加し、さらに肝臓における MT2 遺伝子のヒストン高アセチル化と、DNA 高メチル化が Cd 投与前から起きていることを発見した (Kurita *et al.*, *J Nutr Biochem* 24, 256-266, 2013)。妊娠期低亜鉛産仔の病態感受性が如

何なるものか現在不明だが、この現象もエピゲノムのプログラム変化として DOHaD モデルになりうると考えられる。DOHaD の分子機構を明らかにするためには、再現性のある実験動物モデルが必要である。しかしこれまで、特に遺伝子配列の均質な近交系モデル動物を使った報告が少なく、申請者はこの問題を解決することを目的に近交系マウス (C57BL/6J) を用いた研究を展開し、上記のようにモデル実験系を確立してきた。

また、申請者は微弱なエピゲノム変動を個体間で探索する方法を開発中である。一般に網羅的 DNA メチル化解析には RLGS 法 (Hayashizaki *et al.*, *Nat Genet* 6, 33-40, 1994) や HELP 法 (Khulan *et al.*, *Genome Res* 16, 1046-1055, 2006)、抗メチル化 CpG 抗体を用いた MeDIP 法 (Weber *et al.*, *Nat Genet* 37, 853-862, 2005)、あるいはバイサルファイト処理 DNA サンプルを次世代シーケンサーで解析する方法 (Meissner *et al.*, *Nature* 454, 766-770, 2008) などが報告されている。しかし、いずれの手法もメチル化の有無を定性的に判断するには有効だが、サンプル間で微弱に変動する特定の CpG メチル化頻度を定量的に比較するには難点の多い解析法である。

## 2. 研究の目的

本研究では、周産期の環境因子・生育環境がどのようにして成熟後のエピジェネティックメモリーを変化させるのか、上記のダイオキシン曝露系等を用いたマウス実験により実施した。(当初、ALB-Cre マウスを用いた肝臓特異的遺伝子 KO マウス実験を計画していたが、受動的脱メチル化を想定した候補遺伝子の研究から、能動的脱メチル化を考慮に入れる必要性が初年度に発生したため中止した。) かわって、マウス ES 細胞を用いた *in vitro* 試験系、成熟個体を用いた試験等を実施することとした。これらにより、近年注目されるいくつかのエピゲノム修飾核内因子によるエピジェネティック変異の分子機構を明らかにし、DOHaD の発生機構を解明することを目的とした。また、ゲノムワイドの網羅的 CpG メチル化変動解析法の新規発想に基づき開発した。

### 3. 研究の方法

当初、遺伝子改変マウスを用いたエピゲノム変動実験（胎児期 TCDD 曝露と妊娠期低亜鉛モデル）を Dnmts-コンディショナル KO マウスによる胎児期曝露実験で行うことを予定していたが、下記の3のデータが出たために、急遽研究計画を変更することとした。理由は、それまで想定していた「受動的脱メチル化」から「能動的脱メチル化」の可能性が出てきたからである。また、遺伝子低メチル化現象の分子機構解明（遺伝子導入ヘパトマおよび胎児期マウスヘパトサイトを用いた解析）は ES 細胞使用に変更した。

#### (1) 胎児期 TCDD 曝露した C57BL/6J マウス新生児における Dnmts の結合変化

近交系マウス C57BL/6J の妊娠 12.5 日齢 (E12.5) に TCDD (3 µg/kg) を単回経口投与した。E16.5 および E18.5 の胎仔、生後 1 日 (PND1) および PND3 の新生仔、PND14 の未成熟仔の肝臓を摘出、RNA と DNA を調整、さらに ChIP アッセイ用にホルマリン固定を行った。mRNA 発現解析には qRT-PCR、メチル化 CpG 解析には標的 CpG である HinPII サイトに対するメチレーション特異的制限酵素 PCR (MSRE-PCR) を LightCycler 480 (ロッシュ社製) を用いて行った。ChIP アッセイには Dnmt1 mAb、Dnmt3a mAb、Dnmt3b mAb (Abnova 社)、メチル H3K9 抗体 (CST 社) を用いた。

#### (2) マウス ES 細胞を用いた分化培養系におけるメチル化変動解析

マウス ES 細胞 (B6N22<sup>UTR</sup>) を ES 細胞維持培養液 (DMEM, 10%FBS, P/S, LIF) で培養し、 $1 \times 10^4$ /well 個で、SUMILON PrimeSurface 96U (住友ベークライト社製) に播種した。播種後 EB 形成培地 (DMEM, 10%KSR, P/S) で培養を継続、胚様体 (EB) 形成を 8 日間 (Day8) 行った。その後 Day9 からオルニチンラミニン (O/L) コートプレートに播種し Day11 まで培養した。また、マウス *Cyp1a1* プロモーター-1500bp を EGFP に連結させたコンストラクト (*Cyp1a1*-EGFP) をマウス ES 細胞 (B6N22<sup>UTR</sup>) に安定導入させた細胞株 E1a1 を樹立した。フィーダー細胞 M15 を用いた共培養系で E1a1 の肝細胞分化培養系を行った。培養には Activin-B, bFGF を Day0 ~ Day5 まで、Day6 ~ Day30 まで Dexamethasone,

Human recombinant HGF, KSR を用いた。上記二つの培養系ともに、培養しているすべてのステージで 10 nM の TCDD を添加し曝露を続けた。遺伝子発現解析には qRT-PCR、CpG メチル化解析には MSRE-PCR、免疫染色にはアルブミン抗体 (Sigma 社) と Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Invitrogen 社) を用いた。

#### (3) 成熟個体 TCDD 曝露による CYP1A1 プロモーターのメチル化変動

本研究の主題は、胎児期 TCDD 曝露で生じる *Cyp1a1* プロモーターの低メチル化とそして成熟後までの記憶であるが、この現象すなわち TCDD 曝露による *Cyp1a1* プロモーターの低メチル化が成熟個体でも起きえないのか検討する必要が出てきた。なぜなら、先行研究により成熟個体への TCDD 曝露実験は行っていたが、その用量は 100 ng/kg であり、胎児期曝露実験で、用量を 10 ng/kg, 30 ng/kg, 100 ng/kg, 300 ng/kg, 1 µg/kg, 3 µg/kg で設定したところ、その EC50 の測定実験では 382 ng/kg という結論を得たからである。したがって、3 µg/kg での確認実験を行うことになった。10 週齢の C57BL/6J (雌) マウスに 3 µg/kg を単回経口投与して、6 時間、12 時間、24 時間、7 日、20 日、40 日まで飼育し各ステージで肝臓・腎臓・前脳の DNA および RNA サンプルを回収した。遺伝子発現解析には qRT-PCR を、CpG メチル化解析には MSRE-PCR を用いた。

#### (4) 網羅的メチル化 CpG レベル解析法 (MSD-AFLP 法) の確立

環境要因によるエピゲノム変化は、個体の後天的表現型にとって重要であるが、個体間のバラツキが大きく変動率も微弱であると予想される。CpG メチル化に対する既存のゲノムワイド解析では、コスト面において有効な解析手法がないため、環境毒性学にも応用可能な新規の DNA メチル化ゲノムワイド解析法 (Methylated site display (MSD)-AFLP) を開発した。マウスの 3 組織 (肝臓・腎臓・海馬) の DNA メチル化を比較、検出された CpG サイトの周辺領域の塩基配列を決定し、確認のため MSRE-PCR を行った。さらに、低用量ビスフェノール A (BPA) の胎児期曝露マウスをこの手法で解析した。

### 4. 研究成果

### (1) 胎児期 TCDD 曝露した C57BL/6J マウス 新生児における Dnmts の結合変化

出生直後の肝臓において TCDD を曝露した場合の低メチル化を観察したところ出生 3 日目から差が生じ始めることがわかった。このサンプルを用い DNA メチル化転移酵素 3 種について結合レベルを ChIP アッセイで調べたところ、Dnmt1 とならびに Dnmt3b の結合が TCDD により有意に低下することがわかった。また、H3K9 メチル化レベルの低下から histone methyltransferase (HMT) の作用低下も TCDD により引き起こされていることが示唆され、現状報告のある Dnmts と HMT が相互作用していることを裏付ける結果を得た。

### (2) マウス ES 細胞を用いた分化培養系におけるメチル化変動解析

マウス ES 細胞 (B6N22<sup>UTR</sup>) から形成させた EB では、Oct3/4 の発現が Day5 から消失し、神経系細胞マーカーである Map2 の発現が著しくなった。TCDD の処理で *Cyp1a1* の誘導が ES 細胞および Day8 で有意に高い傾向が認められたが、Oct3/4 と Map2 には曝露による変動は認められなかった。一方、*Cyp1a1* プロモーターのメチル化は ES 細胞の段階で約 20% のレベルであり、それが Day9 で約 80% に上昇したものの、TCDD の曝露のどの時点でも低メチル化は観察されなかった。

一方、マウス ES 細胞由来の E1a1 をフィーダー細胞として M15 を用いた培養系で肝細胞分化培養系を行った。E1a1 は *Cyp1a1*-EGFP が導入されている。Day30 まで培養したところ、EGFP を発現する細胞が多数現れ、TCDD による蛍光強度の増強 (約 2 倍) が観察され、TCDD 反応性を示すことがわかった。また、これらの細胞は ALB 陽性であった。しかしながら、この分化細胞におけるレポーター遺伝子 *Cyp1a1*-EGFP のメチル化は、約 60% で ES 細胞と同程度であり、分化後ならびに TCDD 曝露で低メチル化することはなかった。

これらの結果より、目的であった ES 細胞を用いた *Cyp1a1* プロモーターの低メチル化を再現する *in vitro* の培養系は確立するに至らず、TCDD による低メチル化に関連する分子の機能解析は行えなかった。

### (3) 成熟個体 TCDD 曝露による CYP1A1 プロモーターのメチル化変動

10 週齢の C57BL/6J マウスに TCDD (3  $\mu$ g/kg)

を投与して、投与後 6 時間から 40 日まで経時的にサンプリングし、*Cyp1a1* の mRNA 誘導を qRT-PCR で測定したところ、12 時間をピークに徐々に減弱し、40 日目では極めて低い値を示した。*Cyp1a1* プロモーター CpG メチル化解析を MSRE-PCR で行ったところ、投与後 12 時間目まで約 35% で対照群と同じ値で維持されていたメチル化レベルが 24 時間で低下し、その後 40 日まで低値を示すことがわかった (図 1)。

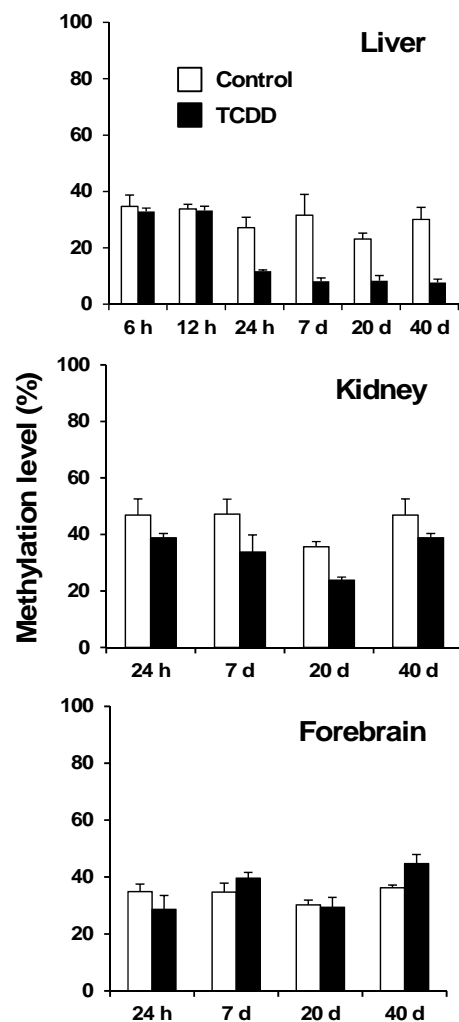


図 2. 成熟マウスに対する TCDD 曝露後の *Cyp1a1*-プロモーター内 CpG (-500) のメチル化レベル。

腎臓および脳では *Cyp1a1* の mRNA 誘導は肝臓ほど著しくはなかった。また *Cyp1a1* プロモーター CpG メチル化も TCDD による変動は肝臓のような有意な変動は認められなかった。これらの結果より、肝臓における TCDD による *Cyp1a1* プロモーターの低メチル化は、

曝露直後の 24 時間以内に発生することがわかった。TCDD による肝細胞の増殖が仮に誘発されているとしてもメチル化レベルの低下が 24 時間目で約 1/3 になっていることから、能動的脱メチル化である可能性が高いと考えられた。そこで、能動的脱メチル化に関連する因子群の Tet1, Tet2, Tet3, Tdg, Apex1, Apobec1 等の遺伝子発現を経時的に測定したが、TCDD による有意な変動は観察されなかった。

#### (4) 網羅的メチル化 CpG レベル解析法

(MSD-AFLP 法) の確立

本手法 MSD-AFLP 法を用いマウスの 3 組織 (肝臓・腎臓・海馬) の DNA メチル化を比較したところ、検出された数万の CpG サイトのうち、組織特異的にメチル化レベルの異なる CpG が多数検出された。これら CpG サイトの周辺領域の塩基配列を決定し、確認のため MSRE-PCR を行ったところ、組織間のメチル化頻度の差は両手法でほぼ一致していた。応用として BPA 曝露マウス海馬を対照群と比較し、約 45,000CpG を各群 6 個体用いて比較したが、有意な変動は確認できなかった。今回の結果から、本新手法は高精度で未知の CpG メチル化変動をスクリーニングできることが示され、微弱な DNA メチル化変化を捉えるアプリケーションとして有用となると思われたが、実際の化学物質曝露による変動検出には至らなかった。

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Aida-Yasuoka K, Yoshioka W, Kawaguchi T, Ohsako S, Tohyama C. A mouse strain less responsive to dioxin-induced prostaglandin E2 synthesis is resistant to the onset of neonatal hydronephrosis. *Toxicol Sci* (査読有) 141, 465-474, (2014)
2. Shiizaki K, Ohsako S, Kawanishi M, and Yagi T. Identification of amino acid residues in the ligand-binding domain of the aryl hydrocarbon receptor causing the species-specific response to omeprazole: possible determinants for binding putative endogenous ligands. *Mol Pharmacol* (査読有) 85, 279-289, (2014)
3. Alam MS, Ohsako S, Kanai Y, and Kurohmaru M. Single administration of butylparaben induces spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rats. *Acta Histochemical* (査読有) 116, 474-480, (2014)
4. Sugai E, Yoshioka W, Kakeyama M, Ohsako S, and Tohyama C. In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin modulates dysregulation of the lipid metabolism in mouse offspring fed a high-calorie diet. *J Applied Toxicol* (査読有) 34, 296-230, (2014)
5. Kurita H, Ohsako S, Yoshinaga J, Hashimoto S, and Tohyama C. Prenatal zinc deficiency-dependent epigenetic alterations of mouse metallothionein-2 gene. *J Nutr Biochem* (査読有) 24, 256-266, (2013)
6. Qin XY, Akanuma H, Wei F, Nagano R, Zeng Q, Imanishi S, Ohsako S, Yoshinaga J, Yonemoto J, Tanokura M, and Sone H. Effect of low-dose thalidomide on dopaminergic neuronal differentiation of human neural progenitor cells: A combined study of metabolomics and morphological analysis. *Neurotoxicology* (査読有) 33, 1375-1380, (2012)
7. Akanuma H, Qin XY, Nagano R, Win-Shwe TT, Imanishi S, Zaha H, Yoshinaga J, Fukuda T, Ohsako S, and Sone H. Identification of stage-specific gene expression signatures in response to retinoic acid during the neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *Front Genet* (査読有) 3:141. (2012)
8. He X, Imanishi S, Sone H, Nagano R, Qin X-Y, Yoshinaga J, Akanuma H, Yamane J, Fujibuchi W, and Ohsako S. Effects of methylmercury exposure on neuronal differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *Toxicol Lett* (査読有) 212, 1-10, (2012)
9. Yoshioka W, Aida-Yasuoka K, Fujisawa N, Kawaguchi T, Ohsako S, Hara S, Uematsu S, Akira S, and Tohyama C. Critical role of mPGES-1 in the pathogenesis of hydronephrosis caused by lactational exposure of mice to dioxin. *Toxicol Sci* (査読有) 127, 547-554, (2012)
10. Nagano R, Akanuma H, Qin X-Y, Imanishi S, Toyoshiba H, Yoshinaga J, Ohsako S, and

Sone H. Multi-parametric profiling network based on gene expression and phenotype data: A novel approach to developmental neurotoxicity testing. Int J Mol Sci (査読有) 13, 187-207, (2012)

11. Ohsako S. Perinatal exposure to environmental chemicals induces epigenomic changes in offspring. Genes Environ (査読有) 33, 43-49, (2011)

〔学会発表〕(計 9 件)

1. Sailendra Nath SARMA, Masanobu KOHDA, Seiichiroh OHSAKO, Dopaminergic neuronal differentiation visualized by human embryonic stem cell-line carrying rat tyrosine hydroxylase-EGFP transgene. 第 42 回日本毒性学会、2014 年 7 月 4 日、神戸国際会議場、神戸
2. 相場俊樹、齋藤俊行、佐藤信治、湯ノ川春信、栗田尚佳、丸山徹、藤淵航、遠山千春、大迫誠一郎. MSD-AFLP 法の開発とその応用. 第 13 回分子予防環境医学研究会. 2014) 1 月 31 日、和歌山県民文化会館、和歌山
3. Aiba Toshiki, Saito Toshiyuki, Hayashi Akiko, Sato Shinji, Yunokawa Harunobu, Kurita Hisaka, Maruyama Toru, Fujibuchi Wataru, Tohyama Chiharu, Ohsako Seiichiroh. Establishment of a unique profiling method for DNA methylation frequency and its application to toxicology. SOT2014, 2014 年 3 月 27 日、Phoenix, Arizona, USA.
4. Seiichiroh Ohsako. Generation of the human ES cell line driven by dioxin responsive reporter gene. The 11st Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. 2013 年 6 月 13 日、Boston, Massachusetts, USA.
5. 大迫誠一郎, 山根順子, 今西哲, 遠山千春. ヒト ES 細胞を用いた神経系誘導培養系における Ahr アゴニストの影響. 第 11 回日本再生医療学会総会, 2012 年 6 月 12 日、横浜
6. 大迫誠一郎, 永野麗子, 何小明, 今西哲, 赤沼宏美, 山根順子, 藤淵航, 曾根秀子. 胚性幹細胞試験を用いたメチル水銀の神経発生毒性の影響評価. 第 82 回日本衛生学会、京都 (2012) 3 月 28 日、京都

7. 大迫誠一郎. 環境汚染化学物質の周産期曝露による表現型変化—エピジェネティクスと環境毒性学—. 日本獣医学会、2012 年 3 月 28 日、大宮ソニックシティ、さいたま

8. 青木礼恵, 栗田尚佳, 遠山千春, 大迫誠一郎. 胎生期ダイオキシン曝露による仔のエピゲノム変化の解析. 第 11 回分子予防環境医学研究会, 2012 年 1 月 27 日、倉敷市民会館、岡山

9. 大迫誠一郎. 環境汚染物質の胎生期曝露による生後の化学発癌感受性亢進とエピゲノム変化. シンポジウム「環境に起因する疾患エピゲノム変化」第 56 回日本人類遺伝学会、2011 年 11 月 10 日、幕張メッセ、千葉

〔図書〕(計 0 件)

該当無し

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

該当無し

取得状況 (計 0 件)

該当無し

〔その他〕

該当無し

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大迫 誠一郎 (Seiichiroh Ohsako)  
東京大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 0 0 2 7 4 8 3 7

### (2) 研究分担者

齋藤 俊行 (Toshiyuki Saito)  
国立研究開発法人放射線医学総合研究所・重粒子医学センター・主任研究員  
研究者番号: 9 0 2 0 5 6 6 7

### (3) 連携研究者

武田 真記夫 (Makio Takeda)  
一般財団法人残留農薬研究所・毒性部・室長