

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 8日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659357

研究課題名（和文） 有害化学物質の曝露評価としての遺伝子検査

研究課題名（英文） Genetic test as an exposure assessment of hazardous chemical

研究代表者

大場 謙一 (KEN-ICHI OHBA)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：60256477

研究成果の概要（和文）：

DNA メチル化は有害化学物質の曝露指標として有用であるか検討した。DNA メチル化を網羅的に調べるため、散在性反復配列を標的遺伝子とした。始めに有害化学物質によるゲノム DNA のメチル化を調べるために重金属カドミウムをラットに長期間経口投与し、肝臓ゲノム DNA の ID 配列のメチル化を検出した。メチル化感受性制限酵素を用いた方法で解析した結果、Cd により DNA メチル化の割合が高くなった。次に、被験者（女性、30代）の血液から抽出したゲノム DNA の Alu 配列のメチル化を検出した。メチル化配列特異的なプライマーを用い real-time PCR 法で解析し、DNA メチル化の割合と血中重金属濃度（Cd,Pb,Hg）と相関は認められなかったが、骨密度と相関が見られ、Alu 配列のメチル化は骨代謝の指標の 1 つとして検討される。

研究成果の概要（英文）：

DNA Methylation investigated utility as exposure indices of hazardous chemicals. We did a target gene with interspersed repeated sequence to examine global DNA methylation. Firstly we examine DNA methylation of genomic DNA by hazardous chemicals, we gave a rat heavy metal cadmium for a long term and examined DNA methylation of ID sequence of genomic DNA in rat liver. Using methylation sensibility restriction endonuclease, we analyzed it by real-time PCR method. As a result, a ratio of DNA methylation became high by Cd. Next we examined DNA methylation of Alu sequence of the genomic DNA which extracted it from blood of the subject (female). We used the primer which DNA methylation was specific for and analyzed it by real-time PCR method. The ratio of DNA methylation was not found in the heavy metal (Cd,Pb,Hg) and the correlation, but it is thought that it is in one of the osseous bone index as for the DNA methylation of Alu sequence because it revealed bone density and correlation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	400,000	120,000	520,000
総計	900,000	270,000	1,170,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・公衆衛生・健康科学

キーワード：カドミウム,エピジェネティクス,メチル化

1. 研究開始当初の背景

生活・労働環境において、ヒトは様々な有害物質に曝される危険性がある。その物質が高濃度の場合は急性毒性を示し、低濃度の場合、症状は現れないが、遺伝子にダメージを与える物質であれば、何らかの遺伝子レベルで変化を起こしている可能性がある。一般に、ヒトは低濃度の有害物質に曝露されている可能性が高いので、症状はないが遺伝子が損傷を受けている可能性がある。

最近、エピジェノミクスという DNA のメチル化研究が注目されている。この DNA のメチル化は、シトシン (C) - グアニン (G) という配列の C にメチル基が付き、更に維持メチラーゼにより 2 本鎖 DNA の両方の C がメチル化となる。従って、一度 DNA がメチル化されると脱メチル化されない限り、メチル化を維持した状態で DNA の複製が行われるため、メチル化された DNA は世代を超えて子孫につながると考えられている。更に、DNA メチル化は、CG 部位が多い領域のメチル化状態が重要であると考えられ、特に DNA のメチル化は遺伝子の発現調節領域にある場合、その発現の ON/OFF のスイッチとして働くことが知られている。がん細胞では、がん抑制遺伝子が DNA のメチル化により不活化される報告がある (Ushijima, T. *Cancer Sci.* 96:206.2005)。従って、メチル化 DNA を調べることは、化学物質による発がんや健康障害の評価に有用と考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、有害化学物質の曝露を評価する目的として、DNA の塩基配列の変異によらない遺伝情報 (エピジェネティクス) の 1 つである DNA のメチル化を測定した。また、網羅的にゲノム DNA のメチル化を解析するために散在性の反復配列を標的遺伝子とした。

ラットの実験では、化学物質によるゲノム DNA のメチル化を調べるため、有害物質として重金属のカドミウムをラットに長期間経口投与し、肝臓のゲノム DNA のメチル化を調べ、Cd による DNA メチル化を調べた。標的遺伝子はラットゲノムの反復配列である Identifier elements (ID 配列) を用いた。

次に、DNA メチル化の測定が化学物質曝露評価の遺伝子検査として有効かを調べるため、ヒトの反復配列である Alu 配列のメチル化を調べ、更に血液中の重金属 (Cd, Pb, Hg) を測定し、DNA メチル化と重金属との関係を比較・検討した。また、Cd は骨代謝に影響を与えるため、骨密度との関係も調べ、DNA メチル化が健康指標の 1 つとして有効かも検

討した。

3. 研究の方法

(1) ラット ID 配列の DNA メチル化解析
①雄ラット(6週齢)は週6日 CdCl₂ を 20 mg Cd /kg/day, 5週間 (5W), 10週間 (10W) または 15週間 (15W), 経口投与した。対象として蒸留水を Cd 投与群と同様に投与した。投与終了後、ソムノペンチルで麻酔をして屠殺し、肝臓を摘出した。

この動物実験は、北里大学医療衛生学部動物実験委員会の倫理審査の承認を受けて行った。

②肝臓のゲノム DNA は NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel 社) を用いて抽出した。

③DNA メチル化検出はメチル化感受性制限酵素による方法で行った。

ゲノム DNA は制限酵素 (EcoRI) で消化し、その一部を検量線の作成に用いた。

消化したゲノム DNA はさらにメチル化感受性制限酵素 HhaI (CGCG: 認識配列, メチル化された配列は消化できない) で消化した。

ID 配列を増幅するプライマーを用いて、HhaI で消化されなかった ID 配列を real-time PCR 法で測定し、メチル化された ID 配列の割合を調べた。検量線は EcoRI で消化した試料を希釈し、各試料それぞれの検量線を作成した。

④金属濃度測定は、摘出した肝臓を湿式灰化後、フレイムレス法により原子吸光光度計を用いて、Cd を測定した。

⑥各群間の比較は、分散分析を行った。統計解析は、統計解析ソフト StatView 5.0 を使用した。

(2) ヒト Alu 配列の DNA メチル化解析
①被験者 (34~39 歳, 女性 36 名) は、某企業の健康診断においてインフォームドコンセントを行い、骨強度、アンケートおよび血液サンプルの研究利用について承諾を得た。

本研究実施にあたり、北里大学医学部・病院倫理委員会の審査と承認を得た。

②血液のゲノム DNA は FlexiGene DNA (Qiagen 社) を用いて抽出した。

③DNA メチル化検出は、メチル化特異的プライマーを用いた方法で行った。

抽出したゲノム DNA は、バイサルファイト処理 (非メチル化シトシンをウラシルに変換) を行い、Alu 配列のメチル化配列特異的プライマーを用いて real-time PCR 法で測定し、メチル化された Alu 配列の割合を調べた。

④骨密度は、健康診断時に AOS-100 (ALOKA 製) を用いて、踵骨の音響的骨評価値 (ostero

sono-assessment index : OSI) を測定した。
 ⑤血液中の重金属 (Cd,Pb,Hg) 濃度は原子吸光度法で測定した。
 ⑥相関係数, 回帰グラフは回帰分析を行った。統計解析は, 統計解析ソフト StatView 5.0 を使用した。

4. 研究成果

(1) ラット ID 配列のメチル化

ラット 11 週齢の ID 配列は約 10%メチル化され,16 週齢においても同程度であった。また,21 週齢では有意ではないが他の週齢と比べ増加傾向を示したため,DNA メチル化は週齢の影響を示唆した。

ラット ID 配列のメチル化は,5 週間及び 10 週間の Cd 曝露により対象と比べメチル化の割合が高くなった。この結果は Cd によってゲノム DNA がメチル化される可能性が示された (図 1)。

Cd 経口投与の期間が長くなると肝臓の Cd 濃度は増加するが,投与期間の違いによって, DNA メチル化の割合に変化が認められないため,5 週間の Cd 投与において,メチル化される割合は最大となったと考えられる。

Cd によるゲノム DNA のメチル化についての研究は細胞レベルで行われ, 個体レベルで行われた研究がほとんどない。培養細胞を用いた研究において, 急性曝露ではメチル化酵素の活性やゲノム DNA のメチル化が減少し, 長期間曝露ではその酵素の活性や DNA のメチル化が増加する報告がある (Takiguchi M, Exp.Cell Res 2003;286:355)。また他の研究グループでは, Cd によるゲノム DNA のメチル化の減少 (Huang D, Toxicology letters 2008;179:43) の報告があり, Cd による DNA メチル化は様々な結果が報告されている。本研究は Cd の長期曝露, 個体レベルの実験であり, 培養細胞を用いた長期間曝露の実験結果と同様の結果が得られた。

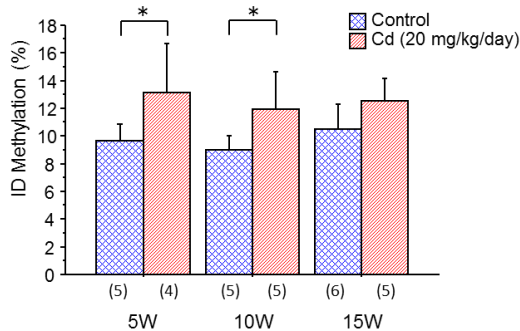


図 1. Cd 経口投与によるラット ID element のメチル化

5W,10W,15W: 投与期間, 平均±標準偏差, * : p<0.05, (): 例数

(2) ヒト Alu 配列のメチル化

被験者 (30 代,女性,36 名) の Alu 配列のメチル化は,平均 85.4%であった。

Alu 配列のメチル化の割合と重金属との相関を調べた結果,Cd との相関係数は -0.009,Pb は-0.173,Hg は-0.131 であり,有意な相関は認められなかった。今回の対象者は女性であり(主婦)、重金属を扱う労働者ではないため,重金属との相関が認められなかったと考えられ,今後は,重金属等を扱う労働者について検討していきたい。

健康診断時に測定した音響的骨評価値 OSI と Alu 配列のメチル化との相関を調べた結果,その相関係数は,-0.376 (p<0.05) であり,高い逆相関が見られ,メチル化の割合が高いほど骨密度が低いことが示唆された (図 2)。また,骨密度が異常なし (32 名) と要注意 (3 名) + 要治療 (1 名) の DNA メチル化は,異常なしは平均 84 %, 要注意+要治療は 94 %となり,有意な差が認められた。これら結果はメチル化が骨密度との関連性を持つことを示唆し, DNA メチル化は骨評価指標の 1 つとして検討される価値がある。

DNA メチル化と年齢との相関係数は -0.356 (p<0.05) であり,高い相関が見られ,ラットの実験と同様の傾向が見られたことからメチル化は年齢の影響を受けることが示唆された。DNA メチル化を骨評価指標として利用する場合は年齢もその評価に加える必要がある。

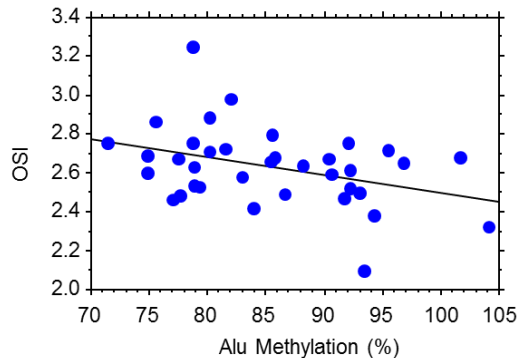


図 2. ヒト ALU 配列のメチル化と OSI (音響的骨評価値) の関係

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)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 大場謙一, 中村康宏, 太田久吉 カドミウム長期経口投与によるラットゲノム DNA のメチル化についての研究 第 85 回日本産業衛生学会 平成 24 年 6 月 2 日 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大場謙一 (KEN-ICHI OHBA)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：60256477