

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670327

研究課題名(和文) 男児外陰部異常症における化学物質曝露バイオマーカーとDNAメチル化レベルの関連性

研究課題名(英文) Relationship between chemical exposure biomarkers and DNA methylation levels in the malformations of external reproductive system of young males

研究代表者

大迫 誠一郎(Ohsako, Seiichiroh)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・准教授

研究者番号：00274837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：尿道下裂は胎児期の環境汚染物質曝露が原因で増加しているとされているが、ヒト集団における因果関係は定かでない。本研究では尿道下裂と埋没陰茎患者の包皮組織を用い、化学物質曝露バイオマーカーのCYP1ファミリーとアンドロゲン関連遺伝子の解析を行った。尿道下裂群では埋没陰茎群に比べ、CYP1B1が高くARが低かった。尿道下裂患者群内ではCYP1ファミリーとSRD5A2 mRNA発現に正の相関が見出された。また、SRD5A2のメチル化とCYP1ファミリー発現との間に負の相関が見られた。この知見は尿道下裂症患者に対する化学的曝露を示唆しているかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Incidence of hypospadias has been reported to increase owing to fetal stage exposure to environmental pollutants. However, association of chemical exposure with hypospadias is still controversial. In this study, using preputial tissues from patients with hypospadias and phimosis, we analyzed CYP1-family, chemical exposure biomarkers, and SRD5A2 and AR as androgen related genes. Higher expression of CYP1B1, in contrast, lower AR level were observed in the hypospadias groups compared to the phimosis group. Positive correlations between CYP1 family and SRD5A2 expression were found among hypospadias patients. Moreover, negative correlations were also found between the SRD5A2 promoter methylation and the CYP1 family mRNA levels in hypospadias. These results seems to indicate the chemical exposure to patients with hypospadias.

研究分野：環境毒性学

キーワード：尿道下裂 CYP1 SRD5A2 バイオマーカー エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

本研究の最終目標は、ヒト集団における男児外陰部異常症と化学物質曝露の関連性を明らかにすることである。尿道下裂患者手術時に微量採取される貴重な「新鮮包皮サンプル」を利用する。回収できるトータル RNA とゲノム DNA を用い、1) まず、曝露指標となるバイオマーカー遺伝子群の mRNA 発現レベルと発症に関与すると考えられる性ホルモン関連遺伝子群の発現レベルを比較し、発症重篤度との関連性を検討する。2) さらに DOHaD の観点から胎児期曝露による刷り込みの可能性を検討するため関連遺伝子の DNA メチル化を測定し、曝露バイオマーカーとの関連性を検討することで、環境因子によるエピジェネティックな変化が先天奇形症に関与するか明らかにする。

2. 研究の目的

尿道下裂はアメリカ、オーストラリア、ヨーロッパで増加しているとの報告がある (Skakkebaek et al. 2016)。また、農業を高濃度で使用する集団に発症率が高いとする結果から、この増加には内分泌かく乱化学物質等の環境化学物質の曝露が原因でないかとの指摘がある。実験動物では抗アンドロゲン作用を持つ内分泌かく乱物質で生殖器器官の異常が認められるが、ヒト集団における尿道下裂発症と環境汚染物質の関与は定かでない。また、化学物質の胎仔期曝露は器官を構成する細胞のエピゲノムを変化させ、遺伝子の発現レベルを変化させることでホルモン感受性と変化させる可能性があるが、ゲノムメチル化変化に関しては報告がない。本研究では尿道下裂患者皮膚サンプルを用いて、多環芳香族炭化水素 (PAHs) や難分解性有機汚染物質 (POPs) 等の環境汚染化学物質の曝露指標として用いられるシトクローム P450 (CYP) ファミリーの発現レベルと、動物実験でダイオキシンにより変動の報告されたステロイド 5 α 還元酵素 2 型 (SRD5A2) の発現レベルならびに各遺伝子プロモーター領域の CpG メチル化頻度を測定した。これにより曝露レベルと男児生殖器異常との関連性をヒト集団において検討した。

3. 研究の方法

尿道下裂の包皮試料は、名古屋市立大学医学部で採取され、国立生育医療センター研究所でトータル RNA ならびに DNA に調整したものを使用した。尿道下裂 (n=23)、埋没陰茎 (n=16)、いずれも年齢 1 歳~14 歳。手術時に採取した約 1mm³ の表皮から Trizol で処理した。RNA は逆転写後 CYP1A1、CYP1B1、SRD5A2、アンドロゲン受容体 (AR)、サイクロフィリン (CP) の mRNA コピー数をリアルタイム RT-PCR 法で測定した。また、DNA

は定法に従いバイサルファイトゲノミックシークエンス法で SRD5A2、AR ならびに CYP1A1 遺伝子プロモーター領域の CpG アイランドを標的に DNA メチル化頻度解析を行った。

(倫理面への配慮) 使用した包皮サンプルは、名古屋市立大学倫理委員会(委員会番号 65)ならびに国立成育医療センター研究所の医学研究倫理審査委員会(委員会番号 512)で承認を得た研究課題において、被験者(保護者)の同意を得、手術時に採取されたものである。また研究代表者の東京大学でもヒトゲノム使用の倫理審査を得て解析を実施した(委員会番号 G10027)。

4. 研究成果

多環芳香族炭化水素 (PAHs) や難分解性有機汚染物質 (POPs) 等の環境汚染化学物質の曝露指標である CYP1A1 と CYP1B1、ならびに雄性ホルモン関連の SRD5A2 と AR の mRNA の発現を 2 群で測定して比較した (図 1)。その結果、CYP1A1 では尿道下裂、埋没陰茎間で有意差はないものの、CYP1B1 が尿道下裂患者群で埋没陰茎群より有意に高かった (図 1B)。また、SRD5A2 の mRNA レベルに差はなかったが、AR の発現が埋没陰茎患者群で高かった (図 1D)。疾患群内の各遺伝子の発現レベルの関連性を解析したところ、CYP1A1 と CYP1B1 には尿道下裂群、埋没陰茎群ともに有意な相関が認められた。また尿道下裂患者群でのみ CYP1B1 と SRD5A2 間に相関が認められた。AR 発現には尿道下裂群、埋没陰茎群内で CYP1B1 との相関は認められなかった。

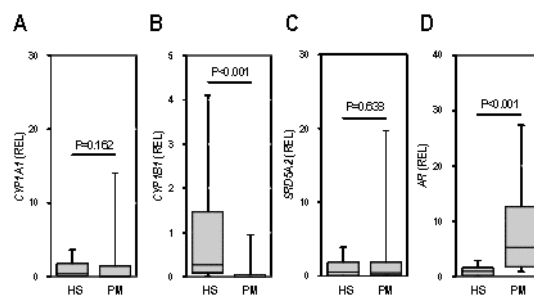


図 1. 尿道下裂、埋没陰茎皮膚サンプルにおける遺伝子発現の違い。

SRD5A2 の転写開始点上流-500~-150 には Sp1 サイトや AP4 サイトなどのエレメントが存在し、その転写の活性化に関与していることが知られている。今回調べた CpG アイランドにも Sp1 サイトが存在している。この領域内にある 19 個の CpG について解析したところ、尿道下裂群と埋没陰茎群間で有意な差は認められなかった。各患者の SRD5A2 遺伝子のメチル化頻度と SRD5A2 mRNA の発現レベルとの相関関係をみたところ、有意に逆相

関 ($P < 0.001$) することがわかった (図 2A)。この逆相関傾向は CYP1A1 と CYP1B1 mRNA の発現レベルに対しても認められたが (図 2B,C)、AR mRNA の発現レベルに対しては認められなかった (図 2D)。一方埋没陰莖ではいずれの遺伝子も相関性が認められなかった。同一サンプルの CYP1A1、CYP1B1、AR のプロモーター領域も調べたがほぼ非メチルであった。

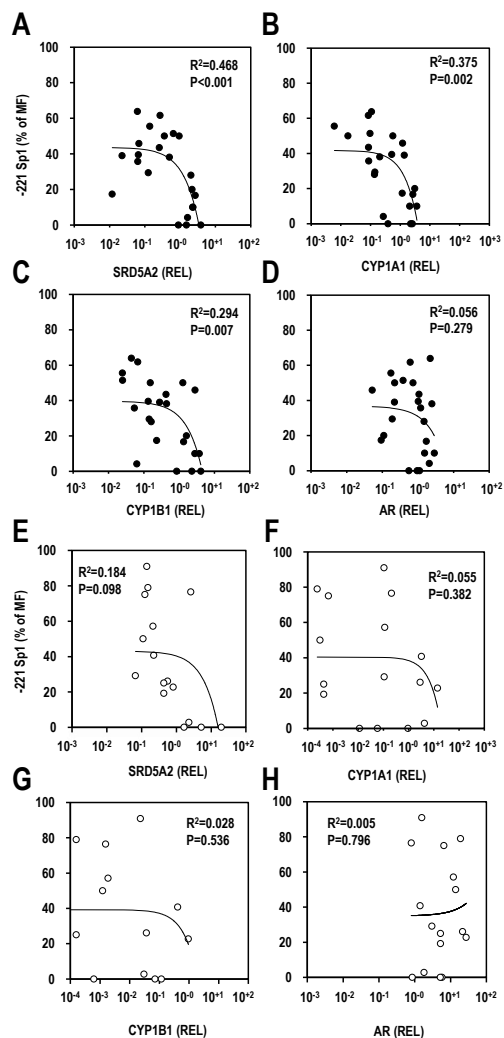


図 2. SRD5A2 プロモーター DNA メチル化レベルと 4 遺伝子発現レベルの相関 (上段：尿道下裂、下段：埋没陰莖)

SRD5A2 は外陰部の雄性化に関与し、その遺伝子変異は雄性化の異常、マイクロペニスや尿道下裂を引き起こし、尿道下裂とも関連性が示唆されている (Thai *et al.*, 2005)。SRD5A2 はテストステロンによって誘導されるため、1 歳から 8 歳まで血中テストステロンレベルに呼応する形でヒトの包皮皮膚では徐々に活性が下がっていく (Theintz *et al.*, 1989)。今回確かに 1-2yr のほうが 2 歳児以上より SRD5A2 レベルは高かった。一方、ダイオキシンの胎児期曝露で見られる外陰部発育異常では前立腺内 SRD5A2 が発現上昇することは報告されている (Theobald *et al.*, 2000;

Ohsako *et al.*, 2001)。これらの動物では前立腺内の CYP1A1 レベルも高く、胎児期に曝露されたダイオキシンの量と SRD5A2 ならびに CYP1A1 発現レベルの間には正の相関関係が成立する。したがってヒトにおける研究でも前立腺を標的とした調査が妥当と思われるが、男児外陰部奇形で成体サンプルが利用可能なのは、血液以外ほとんどなく、手術時に微量採取できる今回のサンプルは極めて貴重な解析対象である。上述のように、胎児期にダイオキシン曝露された実験動物では生後の前立腺内 SRD5A2 が対照群より高くなるが、これはテストステロンの上昇によるものではなく、なんらかの他の機構で発現基底レベルが上昇したことによるものと考えられる。Ahr の活性化は前立腺やペニスなどの男性生殖器の発達を阻害するため、この SRD5A2 の基底レベル上昇は代償的応答と推測される。

このような変化はエピジェネティック記憶の変化によることが予想される。今回の我々の解析結果は SRD5A2 遺伝子の変化と尿道下裂発症との関連性についてヒトの皮膚でも化学物質によるエピジェネティックな変化を受けるかもしれないことを示唆している。

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 7 件)

1. Aiba T, Saito T, Hayashi A, Sato S, Yunokawa H, Maruyama T, Fujibuchi W, Kurita H, Tohyama C, Ohsako S. Methylated site display (MSD)-AFLP, a sensitive and affordable method for analysis of CpG methylation profiles. *BMC Mol Biol* (査読有) 18(1):7, (2017)
2. Amenyha HZ, Tohyama C, Ohsako S. Dioxin induces Ahr-dependent robust DNA demethylation of the Cyp1a1 promoter via Tdg in the mouse liver. *Sci Rep* (査読有) 6:34989, (2016)
3. Yamane J, Aburatani S, Imanishi S, Akanuma H, Nagano R, Kato T, Sone H, Ohsako S, Fujibuchi W. Prediction of developmental chemical toxicity based on gene networks of human embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* (査読有) 44(12), 5515-5528, (2016)
4. 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(2), 465-474, (2014)
5. 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(2), 279-289, (2014)
6. Alam MS, Ohsako S, Kanai Y, and Kurohmaru M. Single administration of butylparaben induces spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rats. *Acta Histochem* (査読有) 116(3), 474-480, (2014)
7. 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(3), 296-230, (2014)

[学会発表] (計 9 件)

1. 大迫誠一郎. Ahr シグナルを介した遺伝子の脱メチル化。シンポジウム「DNA 修復-DNA 損傷とエピジェネティクス」。第 16 回分子予防環境医学研究会. 2017 年 2 月 3 日、熊本市国際会館、熊本
2. Seiichiroh Ohsako, Hesbon Amanya, Chiharu Tohyama. Perinatal exposure to dioxins alters the epigenomic program that influences the susceptibility to carcinogens exposed in adulthood. The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology, (2015) June 25th, Jeju International Convention Center, Jeju, Korea
3. 相場俊樹, 齋藤俊行, 林昭子, 佐藤信治, 湯ノ川春信, 大迫誠一郎. MSD-AFLP 法の臨床サンプル解析への応用. 第 16 回分子予防環境医学研究会. 2017 年 2 月 3 日、熊本市国際会館、熊本
4. Hesbon Amanya, Chiharu Tohyama, Seiichiroh Ohsako. Aryl hydrocarbon receptor drives a robust, dioxin-induced epigenetic modulation of the Cyp1a1 promoter. 第 15 回分子予防環境医学研究会. 2016 年 1 月 29 日、自治医科大学、栃木
5. Hesbon Amanya, Chiharu Tohyama, Seiichiroh Ohsako. DNA Hypomethylation of the Cyp1a1 Promoter Region by Short Term Dioxin Exposure. 第 42 回日本毒性学会、2015 年 6 月 29 日、ホテル日航金沢、金沢
6. 佐藤菜乃初, 青木札恵, 遠山千春, 大迫誠一郎. マウス ES 細胞のダイオキシン曝露における in vitro 分化モデルへの影響. 第 42 回日本毒性学会、2015 年 6 月 29 日、ホテル日航金沢、金沢
7. Hesbon Amanya, Chiharu Tohyama, Seiichiroh Ohsako. Dioxin induces rapid-onset yet durable epigenetic modulation of the Cyp1a1 promoter. BMB2015. Kobe 12 月 3 日、神戸国際会議場、神戸
8. Sailendra Nath SARMA, Masanobu KOHDA, Seiichiroh Ohsako. Dopaminergic neuronal differentiation visualized by human embryonic stem cell-line carrying rat tyrosine hydroxylase-EGFP transgene. 第 41 回日本毒性学会、2014 年 7 月 4 日、神戸国際会議場、神戸
9. Toshiki Aiba, Toshiyuki Saito, Akiko Hayashi, Shinji Sato, Harunobu Yunokawa, Hisaka Kurita, Toru Maruyama, Wataru Fujibuchi, Chiharu Tohyama, Seiichiroh Ohsako. Establishment of a unique profiling method for DNA methylation frequency and its application to toxicology. SOT2014. 2014 年 3 月 25 日 Phoenix, Arizona, USA.

6. 研究組織

(1)研究代表者

大迫誠一郎 (OHSAKO SEIICHIROH)
 東京大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号：00274837

(2)連携研究者

深見真紀 (FUKAMI MAKI)
 国立生育医療センター研究所・分子内分泌研究室・室長
 研究者番号：40265872

宮戸真美 (MIYADO MAMI)
 国立生育医療センター研究所・分子内分泌研究室・研究員
 研究者番号：00386252