

エストロゲン曝露によるゲノムDNAメチル化の変化に関する論文

Li S, Washburn KA, Moore R, Uno T, Teng C, Newbold RR, McLachlan JA, Negishi M.

Developmental exposure to diethylstilbestrol elicits demethylation of estrogen-responsive lactoferrin gene in mouse uterus.

Cancer Res. 1997 Oct 1;57(19):4356-9.

Li S, Hansman R, Newbold R, Davis B, McLachlan JA, Barrett JC.

Neonatal diethylstilbestrol exposure induces persistent elevation of c-fos expression and hypomethylation in its exon-4 in mouse uterus.

Mol Carcinog. 2003 Oct;38(2):78-84.

Li S, Ma L, Chiang T, Burow M, Newbold RR, Negishi M, Barrett JC, McLachlan JA.

Promoter CpG methylation of Hox-a10 and Hox-a11 in mouse uterus not altered upon neonatal diethylstilbestrol exposure.

Mol Carcinog. 2001 Dec;32(4):213-9.

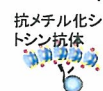
GFAP STAT3
E11:Me E14:deMe

今後の方針

新生仔期のエストロゲン曝露によるクロマチン状態の変化

- メチル化の解析: より網羅的な解析法の導入 (クロマチン免疫沈降法)

ChIP on Chipなど



- ヒストン修飾を含めたクロマチン状態の変化を解析 —エストロゲン依存的な修飾の変化

ヒストンH3 N末端の修飾



抗メチル化ヒストン抗体
抗アセチル化ヒストン抗体



子どもに対する化学物質曝露影響の内分泌的観点からの解明に関する研究

分担研究者 渡邊 肇 自然科学研究機構・基礎生物学研究所・助教授

研究要旨

性ホルモンなどに対する感受性は、子供と大人で大きく異なり、胎仔期を含む子どもへのホルモン様化学物質の曝露は標的器官において不可逆的な影響を及ぼす事が知られている。本研究では、マウスをモデルとして新生仔期にホルモン様作用を有する化学物質の曝露を行い、その内分泌学的影響についてエピジェネティックな変化からの解析を行った。

A. 研究目的

性ホルモンなどに対する感受性は、子供と大人で大きく異なることが知られており、胎仔期を含む子どもへの化学物質曝露は不可逆的な影響を及ぼす事が懸念されている。本研究では、マウスをモデルとして胎仔期、新生仔期にホルモンまたは化学物質曝露を行い、その内分泌学的影響について解析を行う。

マウス新生仔期のホルモン作用による悪影響は比較的多数の報告があるが、その作用機序はいまだ不明であり、的確なリスク評価ができていない。マウスを用いて胎仔期、新生仔期のホルモン影響解明し、その長期的な悪影響に至る過程を解明することにより、化学物質によるリスクに関して総合的な評価をするための知見を得る。

B. 研究方法

本研究では、周生期の化学物質曝露により通常ホルモン制御から逸脱する際の作用メカニズムについて、膈上皮への影響を中心に遺伝子レベルからの解析を行った。

マウス(C57BL/6J)を動物実験に関する指針に従い飼育し交配したのち、新生仔マウスを得た。これらを用いて新生仔期(出生直後から5日間)、または成熟期(生後10週間)に化学物質としてジエチルスチルベストール(DES)曝露を行った。DESは1g体重あたり3 μ g、5日間投与した。曝露による組織学的な変化について解析を進めると同時に、エストロゲンの主要な標的器官である子宮と膈からRNAを調製し遺伝子発現プロファイルの解析を進めた。これにより新生仔期の曝露により恒久的に発現が変化する遺伝子の探索を行った。またDES投与後、通常1-6時間で子宮および膈を摘出しRNAを調製し、その遺伝子発現状態を解析した。対照群にはごま油を用いた。生後70日のマウスの解析にあたっては、その2週間前に卵巣摘出を行った。

遺伝子発現プロファイルの解析結果をもとに、遺伝子の発現レベルが新生仔期のエストロゲン処理により異なっていた遺伝子について、ゲノムの状態を解析した。特に本年度では、遺伝子発現プロファイルをもとに選択した遺伝子の近傍に

ついて、Bisulfite法により DNA のメチル化状態を明らかにし、エピジェネティックな変化が恒常的に遺伝子発現に影響を及ぼす変化が生じている可能性について検討を加えた。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた実験においては、自然科学研究機構動物実験委員会の「自然科学研究機構における動物実験に関する指針」に準拠した。(使用する動物の屠殺にあたっては、頸椎脱臼法を用いた。)

C. 研究結果

前年度の遺伝子発現プロファイルの解析から、新生仔期のエストロゲン曝露により遺伝子発現が誘導、または抑制された遺伝子群を抽出した。さらにこの遺伝子群の中から、成熟期においても発現レベルが対照群と異なっている遺伝子を選択した。これらの遺伝子は、新生仔期のエストロゲン曝露により発現状態が変化し、その変化が成熟期においても継続していることになる。

これらの遺伝子の制御領域についてBisulfite法を用いてゲノムのメチル化状態を比較した。新生仔期のエストロゲン曝露によりゲノムDNAのメチル化の状態が変化し、その結果、恒久的に遺伝子の発現状態が変化した可能性について検討した。

遺伝子のアノテーションと遺伝子発現の変化量を参考に 10 遺伝子について解析した。これらは Jun dimerization protein 2 (JDB2), Myelin and lymphocyte protein (Mal), keratin 20 (Krt20), E74-like factor 3 (Elf3), amphiregulin (Areg), epiregulin (Ereg), forkhead box A1 (FoxA1), FBJ osteosarcoma oncogene (c-fos), lactoferrin (Ltf),

GATA-binding protein 2 (GATA2)の各遺伝子である。これらのうち Mal, JDP2, Ereg の各遺伝子についてはゲノムのメチル化は検出できなかった。その他の遺伝子については、部分的にメチル化されていたものの新生仔期のエストロゲン曝露と対照とで差異は見出されなかった。

さらに、遺伝子発現プロファイルに基づかないで、メチル化 DNA に感受性のある制限酵素を用いて新規にメチル化DNAを単離する方法を試みた。マウス臏においてメチル化されているゲノムDNAについて同定できたものの、新生仔期の曝露群と対照群の間でDNAのメチル化のパターンの差は見出されなかった。

D. 考察

雌性生殖器官はエストロゲンの標的器官であり、新生仔期のエストロゲン曝露により不可逆的な影響を受ける。臏の場合、通常エストロゲン依存的に増殖する基底細胞がエストロゲン非依存的な増殖を示す。これは細胞増殖を制御する遺伝子の発現が変調をきたしていることを示唆している。本年度は、新生仔期のエストロゲン曝露に特徴的なゲノムDNAのメチル化、あるいは脱メチル化が生じた可能性について検討した。

遺伝子発現パターンと遺伝子のアノテーションをもとに候補遺伝子を絞り込んだものの、ゲノムDNAのメチル化パターンの有意に差を見出せた遺伝子はなかった。原因としては3つの可能性が考えられる。(1) 遺伝子の絞込みが不十分である。(2) 特定の細胞においてのみメチル化パターンが変化しており、検出が困難である。(3) 単にメチル化では説明できない変化が生じている。

(1)については、様々な基準で候補遺伝子の

絞込みを行い、解析をすすめる必要があるが、Bisulfite法はハイスループット性に問題がある。メチル化特異的抗体を用いたChIPonChip法など新たな技術を導入しつつ解析を進める必要がある。

(2)については、臍をさらに間質と上皮に分離した後に解析を行うことを検討する。上皮の増殖において最も重要な機能を担っている上皮基底細胞においてのみゲノムDNAのメチル化パターンが異なっていた場合、臍全体からゲノムDNAを調整したのでは、検出が困難になる可能性がある。メチル化の差を可能な限り定量的に検出する手法を確立するか、組織を分離後解析を行うことにより、より詳細な解析が可能になる。

(3)については、ヒストン修飾の差異を対象として解析を進める。ゲノムDNAのメチル化とヒストン修飾は密接な関係にあり、メチル化されたDNAはMeCP2などメチル化DNA結合タンパク質を呼び寄せ、これがヒストン脱アセチル化酵素をリクルートする。さらにヒストンメチル化酵素(SUV39など)がリクルートされヒストンがメチル化されるとこれを認識し結合するHP1がリクルートされる。さらにHP1はDNAメチル化酵素を含む複合体を形成し、ゲノムDNAがメチル化されるというループを形成している。したがって、ヒストンのアセチル化状態、メチル化状態を並行して明らかにすることにより、新生仔期のエストロゲン曝露により生じた特徴的なエピジェネティックな変異を検出できる可能性がある。

ゲノムDNAのメチル化パターンが変化するいわゆるエピジェネティックな変異について急速に知見が蓄積されつつあるが、DNAのメチル化と遺伝子発現との関連性が明確にされていない報告も多い。本研究においても、メチル化にとどま

らず、クロマチン構造の解析を含めた包括的なアプローチを進めることにより、本質を明らかにしていくことができると思われる。

E. 結論

マウス雌性生殖器官のエストロゲン応答遺伝子は個体の発育につれ大きく変化することが明らかになった。新生仔期特異的にエストロゲンに応答する遺伝子は、エストロゲン曝露による不可逆的な影響の誘発に関与している可能性が高い。これら遺伝子をいくつか選択しゲノムDNAのメチル化パターンを解析したところ、曝露による特徴的な変化は検出できなかった。今後より広範な遺伝子について、ゲノムDNA、クロマチン構造の解析を進め不可逆的な変化を引き起こすメカニズムの解明を目指す。

F. 健康危惧情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

Kato Y, Kobayashi K, Oda S, Tatarazako N, Watanabe H and Iguchi T. (2007) Cloning and characterization of the ecdysone receptor and ultraspiracle protein from the water flea *Daphnia magna*. *Journal of Endocrinology* (in press)

Kabe Y., Ohmori M., Shinouchi K., Tsuboi Y., Hirao S., Azuma M., Watanabe H., Okura I. and Handa H. (2007) Porphyrins Accumulate in Mitochondria via 2-oxoglutarate Carrier *Journal of Biological Chemistry* (in press)

Watanabe H., Takahashi E., Nakamura Y., Oda

- S., Tatarazako N. and Iguchi T. (2007) Development of a *Daphnia magna* DNA microarray for evaluating the toxicity of environmental chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* (in press)
- Suzuki A., Urushitani H., Sato T., Watanabe H., Ohta Y. and Iguchi T. (2007) Gene expression change in the Müllerian duct of the mouse fetus exposed to diethylstilbestrol in utero. *Experimental Biology and Medicine* (in press).
- Grun F., Watanabe H., Zamanian Z., Maeda L., Arima K., Cubacha R., Gardiner D.M., Kanno J., Iguchi T. and Blumberg B. (2006) Endocrine disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Molecular Endocrinology* 20:2141-55
- Kobayashi M., Takahashi E., Miyagawa S., Watanabe H. and Iguchi T. (2006) Chromatin immunoprecipitation-mediated target identification proved aquaporin 5 is regulated directly by estrogen in the uterus. *Genes to Cells* 11:1133-43
- Kato H., Furuhashi T., Tanaka M., Katsu Y., Watanabe H., Ohta Y. and Iguchi T. (2006) Effects of bisphenol A given neonatally on reproductive functions of male rats. *Reproductive Toxicology* 22:20-29.
- Ogura Y., Azuma M., Tsuboi Y., Kabe Y., Yamaguchi Y., Wada T., Watanabe H. and Handa H. (2006) TFII-I down-regulates a subset of estrogen-responsive genes through its interaction with an initiator element and estrogen receptor alpha. *Genes to Cells*. 11:373-81.
- Suzuki A., Watanabe H., Mizutani T., Sato T., Ohta Y. and Iguchi T. (2006) Global gene expression in mouse vaginae exposed to diethylstilbestrol at different ages. *Experimental Biology and Medicine* 231:632-40.
- Oda S., Tatarazako N., Watanabe H., Morita M. and Iguchi T. (2006) Genetic differences in the production of male neonates in *Daphnia magna* exposed to juvenile hormone analogs. *Chemosphere*. :63:1477-84
- トキシコゲノミクスからエコトキシコゲノミクスへの展開 (2006) 日本比較内分泌学会ニュース 121: 21-26
- Watanabe H., Takahashi E., Kobayashi M., Goto M. and Iguchi T. (2006) The estrogen-responsive adrenomedullin gene identified by DNA microarray analysis is directly regulated by estrogen receptor *Journal of Molecular Endocrinology* 36:81-9
- Watanabe H., Iguchi T. (2006) Using ecotoxicogenomics to evaluate the impact of chemicals on aquatic organisms *Marine Biology* 149, 107-116
- Iguchi T., Watanabe H., and Katsu Y (2006) Application of Ecotoxicogenomics for Studying Endocrine Disruption in Vertebrates and Invertebrates. *Environmental Health Perspectives* 114 Suppl 1:101-5.

Oda S., Tatarazako N., Watanabe H., Morita M. and Iguchi T. (2005) Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. *Chemosphere*. 61:1168-74.

Watanabe H., Tatarazako N., Oda S., Nishide H., Uchiyama I., Morita M., and Iguchi T. (2005) Analysis of expressed sequence tags of the water flea *Daphnia magna*. *Genome*. 48:606-9.

Oda S., Tatarazako N., Watanabe H., Morita M. and Iguchi T. (2005) Production of male neonates in four cladoceran species exposed to a juvenile hormone analog, fenoxycarb. *Chemosphere*. 60:74-8

Shimizu N., Ouchida R., Yoshikawa N., Hisada T., Watanabe H., Okamoto K., Kusuhara M., Handa H., Morimoto C. and Tanaka H. (2005) HEXIM1 forms a transcriptionally abortive complex with glucocorticoid receptor without involving 7SK RNA and positive transcription elongation factor b. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:8555-60.

Sone K., Hinago M., Itamoto M., Katsu Y., Watanabe H., Urushitani H., Tooi O., Guillette L.J. Jr. and Iguchi T. (2005) Effects of an androgenic growth promoter 17beta-trenbolone on masculinization of Mosquitofish (*Gambusia affinis affinis*). *General and Comparative Endocrinology* 143:151-60.

Ohtsu Y., Ohba R., Imamura Y., Kobayashi M., Hatori H., Zenkoh T., Hatakeyama M.,

Manabe T., Hino M., Yamaguchi Y., Kataoka K., Kawaguchi H., Watanabe H. and Handa H. (2005)

Selective ligand purification using high-performance affinity beads *Analytical Biochemistry* 338:245-52

渡邊 肇・井口泰泉 (2005) トキシコゲノミクスのニューパラダイム. *医学のあゆみ*, 213: 237-241.

学会発表

加藤泰彦、小林かおる、勝義直、渡邊肇、井口泰泉:オオミジンコDMドメイン遺伝子ファミリーの解析. 環境ホルモン学会第9回研究発表会、東京 2006年11月11,12日

加藤泰彦、小林かおる、勝義直、渡邊肇、井口泰泉:オオミジンコ DM ドメイン遺伝子のcDNA単離と発現解析. 日本動物学会第77回大会 島根 2006年9月21-24日

中村武志、勝義直、渡邊肇、井口泰泉:新生仔期にDESを投与されたマウスの臍におけるWntファミリー遺伝子の発現変化. 日本動物学会第77回大会、島根 2006年9月21-24日

Iguchi, T., H. Watanabe and Y. Katsu: Application of Toxicogenomics for Studying Endocrine Disruption and Basic Biology in Vertebrates and Invertebrates. 23rd Congress of European Comparative Endocrinologist, Manchester, UK. 2006年9月1日

Watanabe, H., Tatarazako, N., Oda, S. and Iguchi, T.: Toxicogenomic approach on *Daphnia magna*. Gordon Research Conference 2006: Environmental Endocrine Disruptors, Il Ciocco, Italy, June 4-9, 2006.

Oda, S. N. Tatarazako, H. Watanabe, M. Morita, and T. Iguchi Genetic differences in production of male neonates in *Daphnia magna* exposed to juvenile hormone analogs. The SETAC North America 26th Annual Meeting Nov. 13-17, 2005. Baltimore Convention Center, Baltimore, Maryland, USA.

Watanabe, H.: Ecotoxicogenomics. Annual Meeting and International Conference on Toxicogenomics-2005. Promising Next Generation Technology of Toxicogenomics in Drug and Food Safety, and Environmental Health. Oct. 30-Nov. 1, 2005, KIST, Korea.

Watanabe, H.: Toxicogenomics approach on endocrine disruptor issue. Toxicogenomics. Nov. 2-5, 2005, Hotel Tirol, Muju, Korea.

Watanabe, H. and Iguchi, T.: Tissue dependent effects of estrogenic chemicals estimated by gene expression profile. 9th ICEM Satellite meeting on toxicogenomics. Aug. 30-Sep. 2, 2005, Kauai, Hawaii

Iguchi, T. and Watanabe, H. Focused array for evaluation of estrogenic effect of chemicals on mice. 9th ICEM Satellite meeting on toxicogenomics. Aug. 30-Sep. 2, 2005, Kauai,

Hawaii

Watanabe, H.: Evaluation of chemical contaminants by gene expression profiling of *Daphnia magna*. SETAC, May, 2005,

12. Watanabe, H. Evaluation of estrogenic chemicals by gene expression profile. The endocrine society's 87th annual meeting (ENDO2005), Jun. 4-7, 2005, San Diego Endocrine Society

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

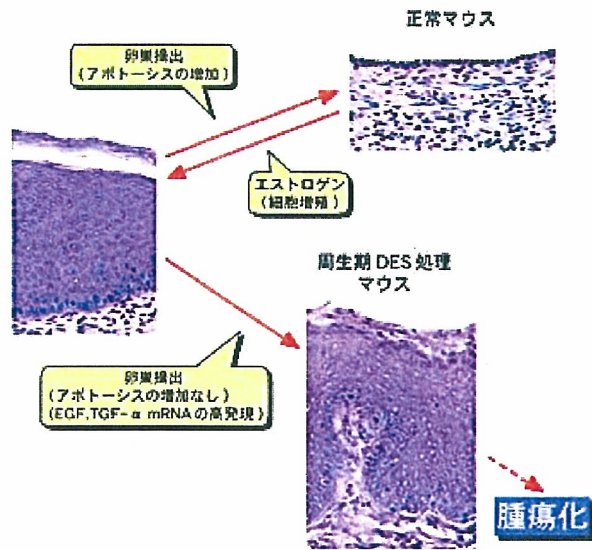
2. 実用新案登録

なし

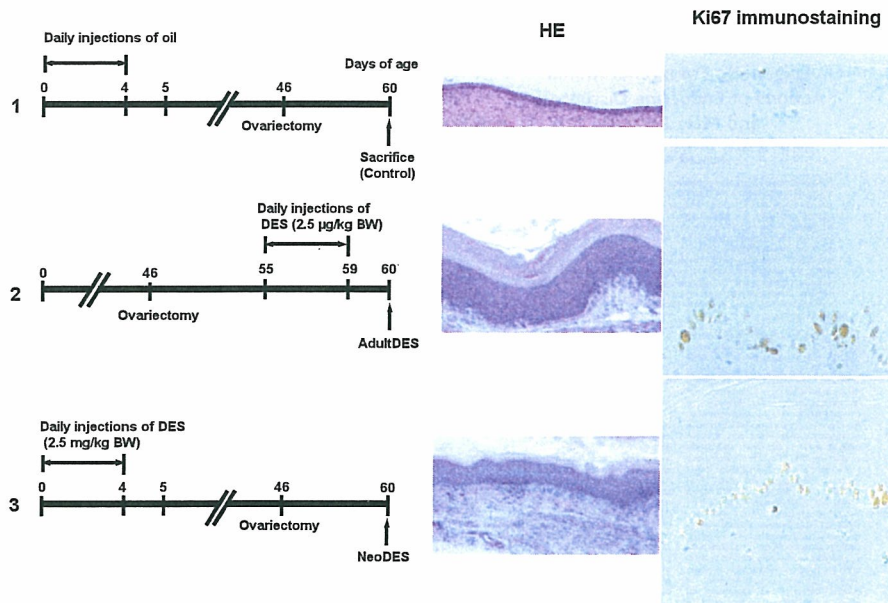
3. その他

なし

新生児期のエストロゲン様化学物質曝露の影響



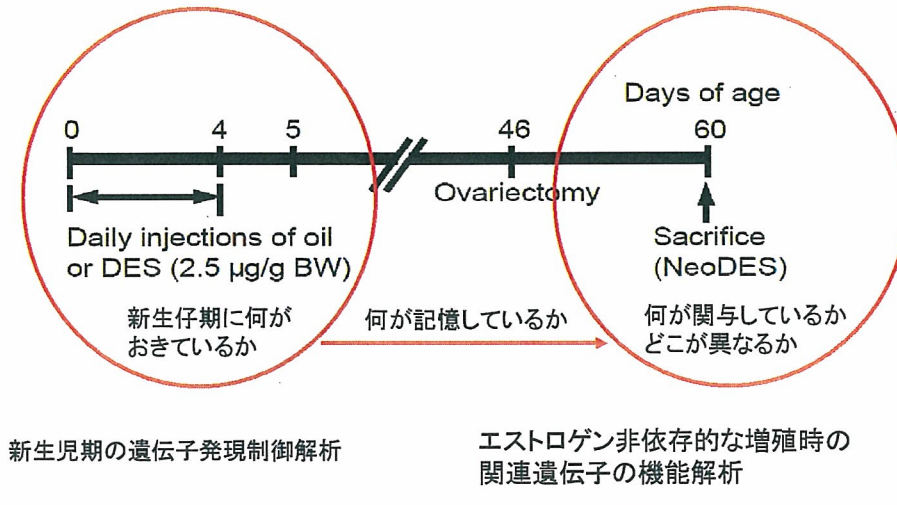
基本的な実験デザイン



雌性生殖器官への不可逆的な作用の問題点

新生児期のエストロゲン暴露

不可逆的な影響の発現



ゲノムDNAメチル化による遺伝子発現変化の可能性

REPORTS Science. 2005 Jun 3;308(5727):1466-9.

Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility

Matthew D. Anway, Andrea S. Cupo,* Mehmet Uzumcu,† Michael K. Skinner†

Transgenerational effects of environmental toxins require either a chromosomal or epigenetic alteration in the germ line. Transient exposure of a gestating female rat during the period of gonadal sex determination to the endocrine disruptor vinclozolin (an antiandrogenic compound) or methoxychlor (an estrogenic compound) induced an adult phenotype in the F₃ generation of decreased spermatogenic capacity (cell number and viability) and increased incidence of male infertility. These effects were transferred through the male germ line to nearly all males of all subsequent generations examined (that is, F₄ to F₆). The effects on reproduction correlate with altered DNA methylation patterns in the germ line. The ability of an environmental factor (for example, endocrine disruptor) to reprogram the germ line and to generate a transgenerational disease state has significant implications for evolutionary biology and disease etiology.

Toxicants, such as irradiation and chemotherapy, and compounds, such as environmental toxins, pose a threat to the integrity of the genome. Studies have shown that these agents can result in genetic or developmental defects in the offspring of F₁ generations from an exposed gestating mother. The ability of an external agent to induce a transgenerational effect requires stable chromosomal alterations or an epigenetic phenomenon such as DNA methylation (1). In the present study, transgenerational effects in a germline transmission to multiple generations, normally to the F₂ generation. Transgenerational effects of irradiation were the first to be identified through transmission of DNA mutations in the germ line to multiple generations (2), when associated with tumor formation. Chemotherapeutic treatments (3) and environmental toxins such as endocrine disruptors (4) can cause effects in the F₁ generation, but they have not been shown to affect the F₂ generation. Although no effects have been shown to be transgenerational, the potential impact of such transgenerational effects of endocrine disruptors has been discussed (5).

Epigenetic alterations that could lead to transgenerational transmission of specific

somatic traits requires a permanent reprogramming of the germ line. During mammalian germ cell development the methylation state of the genome is reprogrammed. As primordial germ cells (PGCs) migrate down the gonadal ridge, a demethylation starts and is complete on colonization in the embryonal gonad (7, 8). Germ cells in the gonad then undergo remethylation in a sex-specific manner during gonadal sex determination (9). Although demethylation may not require the gonadal somatic cells, remethylation of the germ line appears to be dependent on associations with the somatic cells in the gonads (7). Gonadal sex determination and testis development occur between embryonic days 12 and 15 (12 to E15) in the rat (after mid-gestation in the humans) and are initiated by the differentiation of precursor Sertoli cells in response to the testis-determining factor Sox9. Aggregation of the precursor Sertoli cells, PGCs, and migrating mesonephros cells (precursor peritubular myoid cells) promotes testis morphogenesis and cord formation (10, 11). During the period of gonadal sex determination, the fetal testis contains steroid receptors and is a target for endocrine agents. The androgen receptor (AR) and estrogen receptor (ERα)

Li S, Washburn KA, Moore R, Uno T, Teng C, Newbold RR, McLachlan JA, Negishi M.

Developmental exposure to diethylstilbestrol elicits demethylation of estrogen-responsive lactoferrin gene in mouse uterus.

Cancer Res. 1997 Oct 1;57(19):4356-9.

Li S, Ma L, Chiang T, Burrow M, Newbold RR, Negishi M, Barrett JC, McLachlan JA.

Promoter CpG methylation of Hox-a10 and Hox-a11 in mouse uterus not altered upon neonatal diethylstilbestrol exposure.

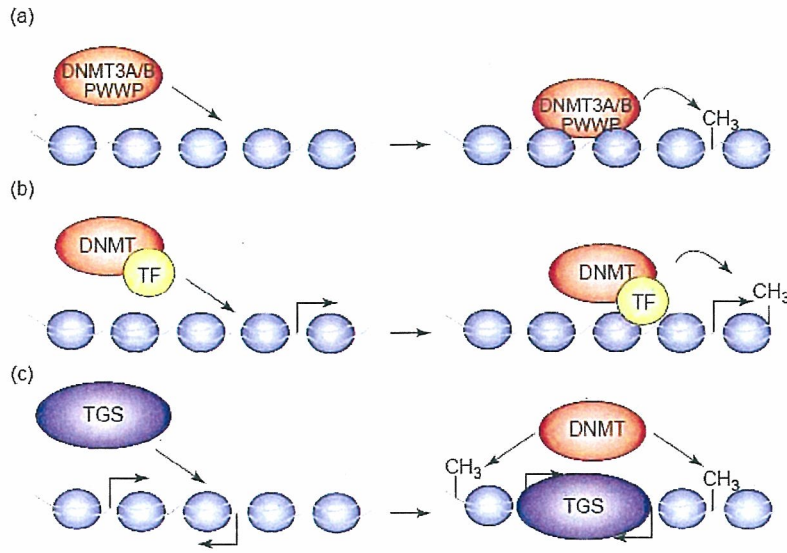
Mol Carcinog. 2001 Dec;32(4):213-9.

Li S, Hansman R, Newbold R, Davis B, McLachlan JA, Barrett JC.

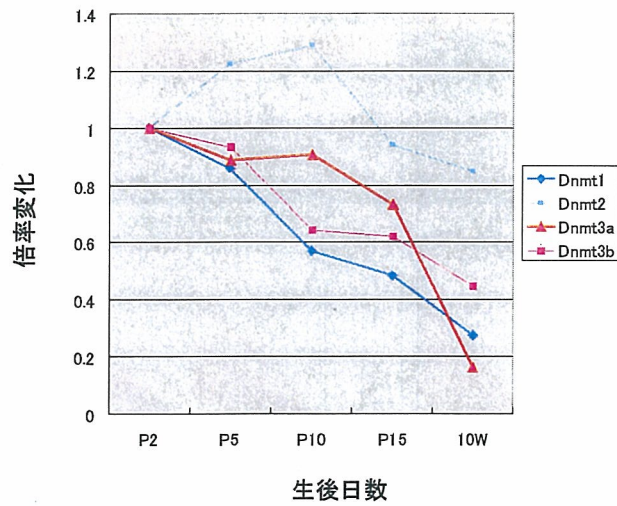
Neonatal diethylstilbestrol exposure induces persistent elevation of c-fos expression and hypomethylation in its exon-4 in mouse uterus.

Mol Carcinog. 2003 Oct;38(2):78-84.

ゲノムDNAのメチル化の様式

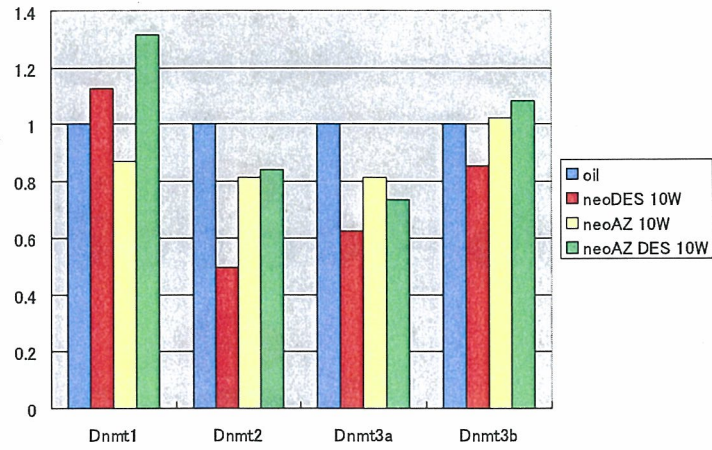


新生児期におけるDnmtの発現変化

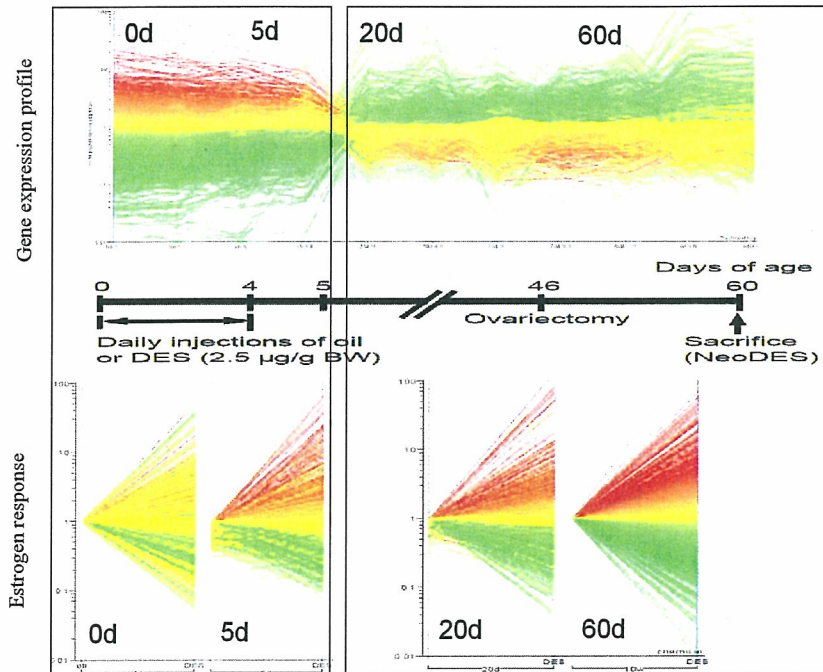


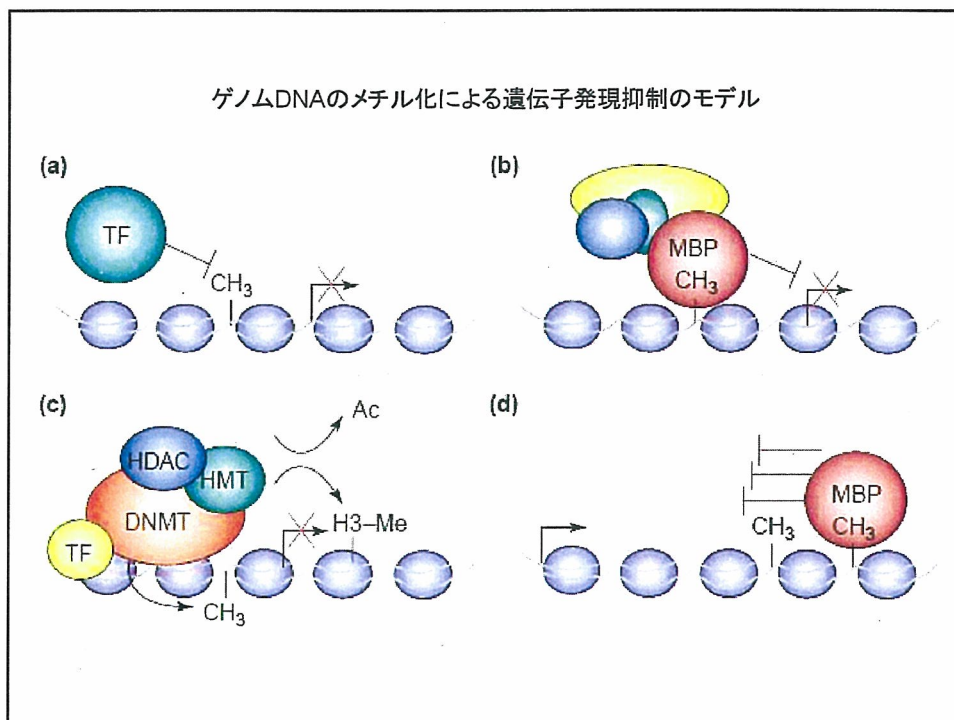
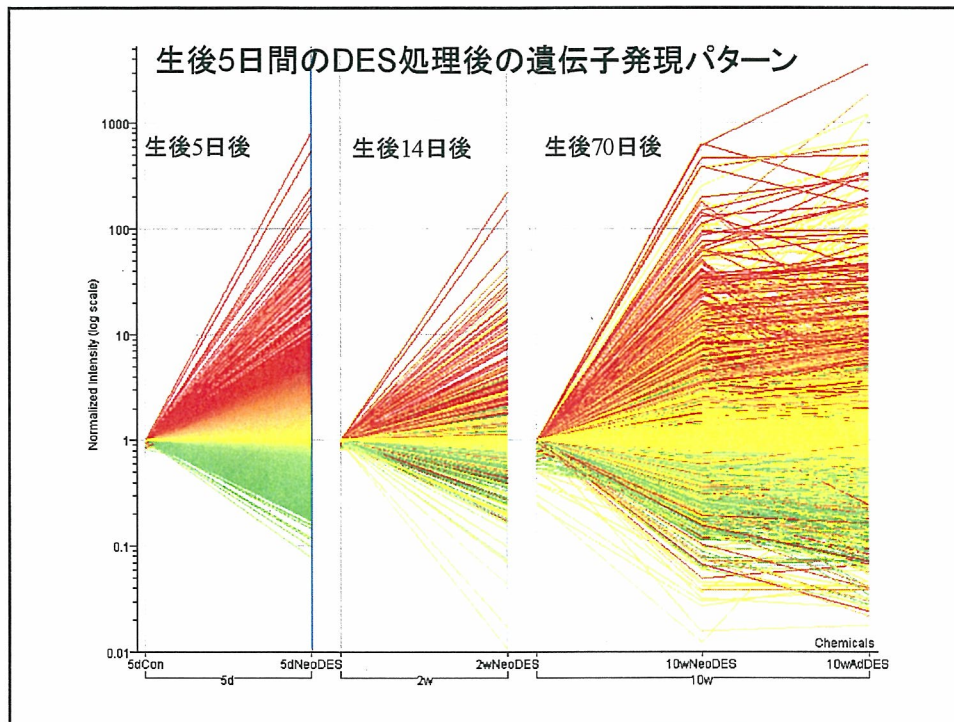
Dnmt2, Dnmt3bの発現は1/100

新生児期にエストロゲン曝露によるDnmt遺伝子発現への影響

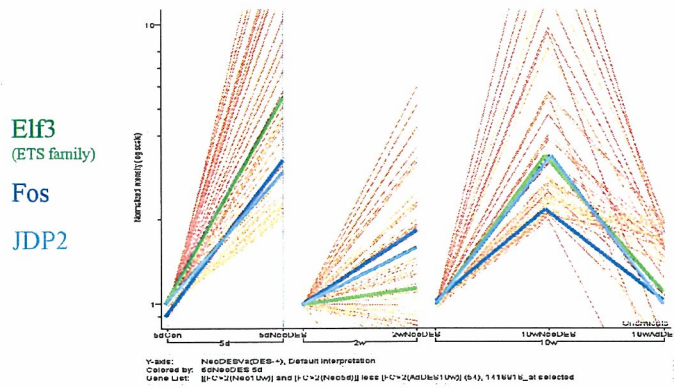


Transcriptional profiling during mouse maturation (vagina)





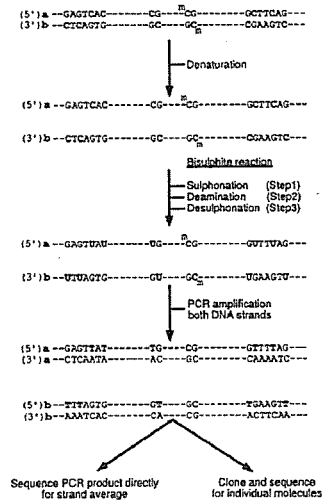
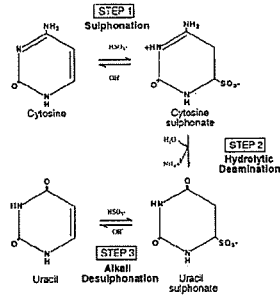
新生仔期エストロゲン処理により発現が上昇している遺伝子 (オンコジーン関連)



発現制御領域のゲノムDNAのメチル化状態を比較した遺伝子

- Jun dimerization protein 2 (JDB2)
- Myelin and lymphocyte protein (Mal)
- keratin 20 (Krt20)
- E74-like factor 3 (Elf3)
- amphiregulin (Areg)
- epiregulin (Ereg)
- forkhead box A1 (FoxA1)
- GATA-binding protein 2 (GATA2)
- FBJ osteosarcoma oncogene (c-fos)
- lactoferrin (Ltf)

Bisulfite法によるメチル化DNAの解析

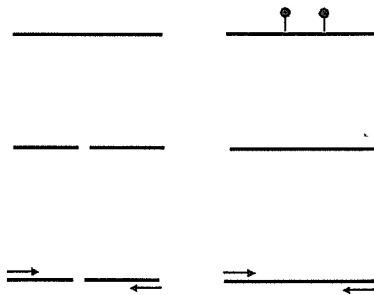


ゲノムがメチル化されている遺伝子の *de novo* の探索

Genome digestion

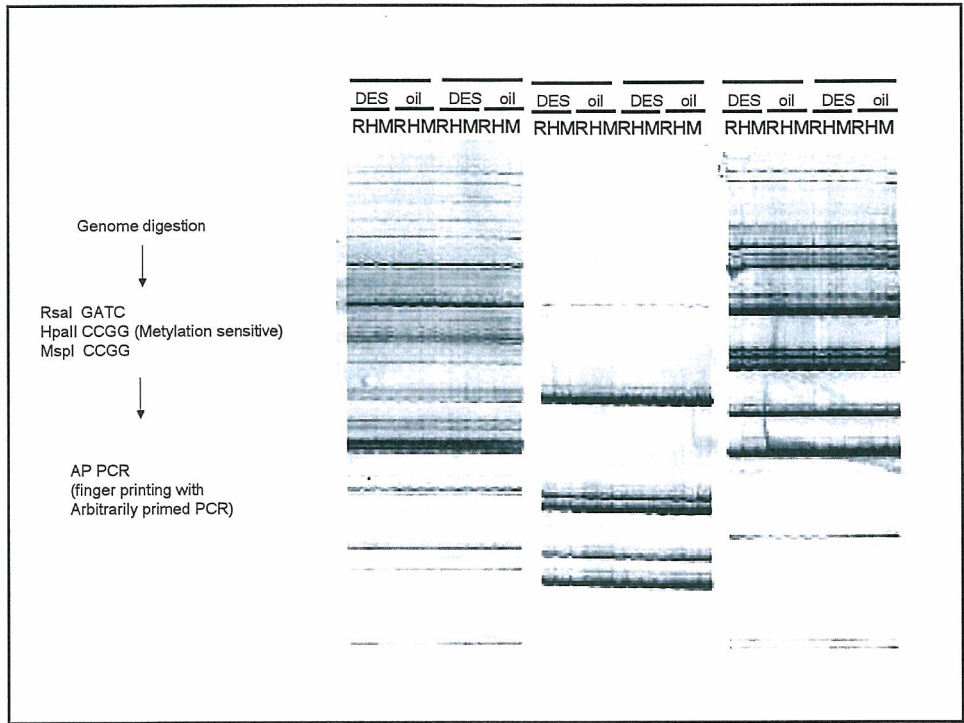
RsaI GATC
HpaII CCGG (Metylation sensitive)
MspI CCGG

AP PCR
(finger printing with
Arbitrarily primed PCR)



メチル化されたゲノムDNA断片を増幅できる

クローニング、配列を決定しゲノム上の位置を同定する



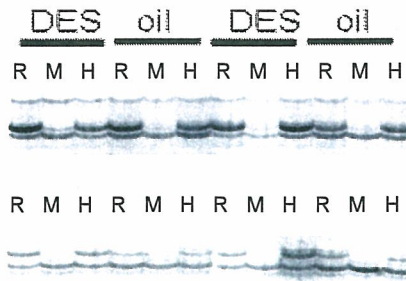
メチル化されているゲノムDNA断片の検出

10W mouse vagina

RsaI GATC
MspI CCGG
HpaII CCGG (Metylation sensitive)

Cloning
Sequencing
Identification

Ch6_87238912-87239080
Ch9_120467742-120468113
Ch13_34068350-34068604
ChX_54006581-54006742



P2におけるゲノムDNAのメチル化の検討

膣、肝臓、心臓、腎臓、筋肉、皮膚におけるメチル化パターンは10Wのマウス膣と同じ

エストロゲン曝露によるゲノムDNAメチル化の変化に関する論文

Li S, Washburn KA, Moore R, Uno T, Teng C, Newbold RR, McLachlan JA, Negishi M.

Developmental exposure to diethylstilbestrol elicits demethylation of estrogen-responsive lactoferrin gene in mouse uterus.
Cancer Res. 1997 Oct 1;57(19):4356-9.

Li S, Hansman R, Newbold R, Davis B, McLachlan JA, Barrett JC.

Neonatal diethylstilbestrol exposure induces persistent elevation of c-fos expression and hypomethylation in its exon-4 in mouse uterus.
Mol Carcinog. 2003 Oct;38(2):78-84.

Li S, Ma L, Chiang T, Burow M, Newbold RR, Negishi M, Barrett JC, McLachlan JA.

Promoter CpG methylation of Hox-a10 and Hox-a11 in mouse uterus not altered upon neonatal diethylstilbestrol exposure.
Mol Carcinog. 2001 Dec;32(4):213-9.

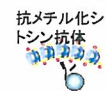
GFAP STAT3
E11.3Me E14:deMe

今後の方針

新生仔期のエストロゲン曝露によるクロマチン状態の変化

- メチル化の解析: より網羅的な解析法の導入 (クロマチン免疫沈降法)

ChIP on Chipなど



- ヒストン修飾を含めたクロマチン状態の変化を解析 —エストロゲン依存的な修飾の変化

ヒストンH3 N末端の修飾



抗メチル化ヒストン抗体
抗アセチル化ヒストン抗体



厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

分担研究報告書

成人・子ども間リスク評価結果の外挿に関する研究

分担研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 部長

研究要旨

化学物質の毒性評価を進める過程で、成熟個体(成人)と未成熟個体(子ども)で毒性の強さが異なる化学物質が見出されてきている。今年度はそのような化学物質の具体例として、記憶喪失性貝毒Domoic acid(DA)を例として取り上げた。マウスをモデル動物に用い、投与時期を、子ども期として2週齢、成人期として10週齢を選び、脳に対する影響を検討し、成人でのリスク評価結果を子どものリスク評価予測に外挿する際の有効性と限界を明らかにすることとした。

本研究班の種村班員による検討の結果、DAは子ども期投与の方が成人期投与より、認知障害の程度が激しくかつ多動を伴う行動変化を引き起こすことが明らかとなった。そこで、DAの脳に対する影響を網羅的遺伝子発現解析により検討し、投与時期による違いを検討した。その結果、グルタミン酸受容体下流に位置する遺伝子の中で、Junb, Fosが、子ども期投与(2週齢)を受けた10週齢の大脳皮質において発現上昇していることが分かった。10週齢投与での変化はごく小さかった。また、Arcの発現も2週投与10週齢大脳皮質で上昇していたが、これは10週齢投与でも上昇していた。

未成熟個体が成熟個体より影響を受けている背景に、DAによる一過性のグルタミン酸受容体過剰刺激により、未成熟個体ではグルタミン酸受容体下流シグナル伝達が持続的に亢進している可能性が示唆された。

A. 研究目的と背景

化学物質の毒性評価を進める過程で、成熟個体(成人)と未成熟個体(子ども)で毒性の強さが異なる化学物質が見出されてきている。本研究ではそのような化学物質の具体例として、子ども期投与の方が成人期投与より強い影響が生じることが明らかになった domoic acid (DA)を例として取り上げ、その背

景となる分子メカニズムを、網羅的遺伝子発現解析手法を用いて検討し、成人でのリスク評価結果を子どものリスク評価予測に外挿する際の有効性と限界を明らかにする。

Domoic acidは、1987年の11月から12月にかけて、カナダのプリンスエドワード島で発生した養殖のムラサキイガイによる食中毒の原因物質である。その事例では、被害者107

人中4人が死亡、12人が重度の記憶障害に陥った。中毒を起こしたムラサキイガイを調べたところ、貝 100g 当たり 31mg～128mg の domoic acid が検出され、中毒者の摂取量は 60mg～290mg と推定された(駆虫薬として用いられる量は 30mg 程度)。検死解剖などから、海馬に大量の domoic acid が取り込まれてグルタミン酸受容体と結合したために脳細胞が興奮・死滅し、中枢神経が侵されたと推定され、致死量は 300mg/60kg と算定された。Domoic acid は異常繁殖した珪藻が活動を停止する際に作り出される。生物濃縮によって貝類やカニ、アンチョビなどに取り込まれるため、現在では魚介類の輸出入において検査が行われるようになって来ている。カナダの domoic acid 規制値は 20ppm である。

B. 研究方法

Domoic acid 暴露

C57BL/6CrSlc(日本エスエルシー)に2週齢及び10週齢時に、生理食塩水を溶媒として domoic acid 0.3mg/kg を腹腔内投与した。採取時間は投与後 24 時間、または、2 週齢時投与については 11 週齢時、10 週齢時投与については 5 日後とし、分離した脳から海馬、大脳皮質を採取した。1 群 5 匹採取し、遺伝子発現解析には 3 匹ずつ用いた。

Total RNA の分離精製

組織は採取後すみやかに RNA later (Ambion 社)に4℃一晩浸漬し、RNase を不活化した。その後、RNA 抽出操作までは -80℃にて保存した。抽出に当たっては、RNA later を除いた後、RNeasy キット(キアゲ

ン社)に添付される RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破碎液を調製した。得られた破碎液の 10 μ L を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定した。DNA 含量に応じ、あらかじめ臓器毎に設定した割合で Spike cocktail (Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を変えて混合した溶液)を添加し、TRIZOL により水層を得、RNeasy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無を検討した。

GeneChip 解析

全 RNA 5 μ g を取り、アフィメトリクス社のプロトコールに従い、T7 プロモーターが付加したオリゴ dT プライマーを用いて逆転写し cDNA を合成し、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社キット)を用い、ビオチン化 UTP, CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA は Affymetrix 社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、GeneChip ターゲット液とした。GeneChip には Mouse Genome 430 2.0 (マウス)を用いた。ハイブリダイゼーションは 45℃にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。データは当方で開発したソフトウェアとマイクロソフト社エクセルを併用して解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、国

立医薬品食品衛生研究所が定める動物実験に関する指針を遵守している。(国立医薬品食品衛生研究所・動物実験倫理委員会の制定になる国立医薬品食品衛生研究所・動物実験に関する指針(平成9年7月版))

C. 研究結果

Domoic acid 投与に伴う遺伝子発現変化

網羅的遺伝子発現解析により、子ども期投与の方が成人期投与より強い影響が生じる分子背景を説明可能な遺伝子発現変化を捉えられるか検討した。解析には3種類の方法を用いた。

1) Scatter plot を用いた発現変化の解析

溶媒投与群に対し、DA 投与群のデータを scatter plot に描き、発現差のある遺伝子を選択しその妥当性を検討した。その結果、2 週齢投与 10 週齢群において、Junb, Fos, Arc, Dusp1, Npas4, Egr2 の6ヶの遺伝子の発現が上昇していることが分かった。他の群については、統計的に有意な変化を有する遺伝子は見いだせなかった。

2) t 検定による統計的解析

p 値 0.01 未満で CV が 20%未満の遺伝子を各群について抽出した。その結果、どの群に於いても 100 ヶを超える遺伝子が選択された。次に、2 週齢投与特異的(10 週齢投与では発現変化しない)に発現変化する遺伝子の抽出を試みたところ、逆に2 週齢投与、10 週齢投与で共通して発現変化した遺伝子がほとんど無いという結果になった。また、各投与時期に特異的に発現変化した遺

伝子を gene ontology 解析にかけたが、特定の機能カテゴリーに集中する傾向は得られなかった。

3) 既存知識を加味した発現変化の解析

文献情報等を加味し、遺伝子を指定して発現変化を検討した。まず、グルタミン酸受容体下流に位置すると言われている Jun, Fos family と arc の発現については、scatter plot を用いた解析時に見出されたように、Junb, Fos, Arc の発現が 2 週齢投与 10 週齢群において上昇していた。次に、グルタミン酸受容体自体の発現に対する影響を調べるため、グルタミン酸受容体ファミリー5 種類 (Grik, Gria, Grid, Gridelta, Grin) の発現を調べたところ、Gria4 の発現が 10 週齢投与後 24 時間の大の皮質で若干上昇していたが、他の受容体については DA 投与に伴う発現変化は見いだせなかった。また、微小管結合タンパク質の Tau の発現が 2 週齢時投与 24 時間後大脳皮質、10 週齢時投与 24 時間後大脳皮質で、程度は低いが上昇していた。さらに、JNK1 の発現が 2 週齢時投与 24 時間後大脳皮質、2 週齢時投与 11 週齢時大脳皮質で上昇していた。

D. 考察

DA 投与に伴う遺伝子発現変化は、全体的にはごく小さいものであった。その中で、Junb, Fos, Arc などのグルタミン酸受容体下流に位置する遺伝子の発現が、子ども期投与により成人期に上昇していた。これは、子ども期の一過性のグルタミン酸受容体過剰

刺激により、グルタミン酸受容体下流シグナル伝達が持続的に亢進している可能性を示唆するものと考えられ、これが、DA が子どもに対し、より強い影響を与える分子背景となっている可能性が考えられる。

E. 結論

成人・子ども間リスク評価結果の外挿に関する研究を進めるための題材として選んだ domoic acid が、未成熟個体に対しより強い作用を示すことが、神経行動学的観点及び、遺伝子発現変化の観点から示された。今後は、発達段階の脳がグルタミン酸受容体刺激に対し脆弱な背景、すなわち、子ども期の特性について検討を進め、成人・子ども間リスク評価結果の外挿に役立てたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Grun F, Watanabe H, Zamanian Z, Maeda L, Arima K, Chubacha R, Gardiner DM, Kanno J, Iguchi T, Blumberg B. Endocrine disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Mol Endocrinol.* 2006 20(9):2141-55 (2006)

Watanabe Y, Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Endo M, Igarashi K, Aisaki KI, Kanno J, Saga Y. Activation of Notch1 signaling in cardiogenic mesoderm induces abnormal

heart morphogenesis in mouse. *Development.* 2006 133(9):1625-34.

Yasuhiko Y, Haraguchi S, Kitajima S, Takahashi Y, Kanno J, Saga Y. Tbx6-mediated Notch signaling controls somite-specific Mesp2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 103(10):3651-6.

Nakamura Y, Suzuki T, Igarashi K, Kanno J, Furukawa T, Tazawa C, Fujishima F, Miura I, Ando T, Moriyama N, Moriya T, Saito H, Yamada S, Sasano H. PTOV1: a novel testosterone-induced atherogenic gene in human aorta. *Pathol.* 2006 209(4):522-31 (2006)

Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Nakatsu N, Ono A, Kodama Y, Nagao T. Per cell normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays. *BMC Genomics.* 2006 Mar 29;7:64.

Kitajima S, Miyagawa-Tomita S, Inoue T, Kanno J, Saga Y. Mesp1-nonexpressing cells contribute to the ventricular cardiac conduction system. *Dev Dyn.* 2006 235(2):395-402.

Shiina H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa S, Sakari M, Takada I, Nakamura T, Metzger D, Chambon P,