

B. 研究方法

<マウス海馬からのゲノム DNA 精製>

C57BL/6NCrSlc マウスに交配時から離乳期までビスフェノール A を飲水投与した。飲水中のビスフェノール A の用量は、ビスフェノール A の TDI である 50ug/kg/日を踏まえ、その前後を挟むように、0.1, 1, 10ppm とした。15 週齢時に雄から海馬を採取後、ゲノム DNA をキアゲン社 All prep DNA/RNA mini kit により精製した。

<メチル化 DNA の分離精製>

海馬から抽出精製したゲノム DNA を超音波処理にて破碎し、100~500bp の断片とし、メチル化 DNA 結合蛋白質 MBD2 を用いたメチル化 DNA の分離精製を行った。詳細は本操作をキット化している EpiXplor Methylated DNA Enrichment Kit (タカラバイオ社) のプロトコールに従った。

<次世代シーケンサーによる解析>

NEB 社のライブラリー調製キット (NEBNext ChIP-Seq Library Prep Master Mix Set for Illumina) にて、次世代シーケンサー用ライブラリー DNA を調製し、イルミナ社 Miseq によってシーケンスデータを取得した。

<データ解析>

イルミナ社 Miseq から排出されるシーケンスデータファイル (fastq 形式) を、CLC bio 社のソフトウェア (CLC Genomics Workbench) を用いてマウスリファレンスゲノム配列 (mm9) にマッピングし、結果を bam 形式のファイルとして出力させ、アジレント社のソフトウェア (Avadis NGS) によって解析した。

(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、下記、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、

指針を遵守した。「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程 (平成 19 年 4 月版)」

C. 研究結果

ビスフェノール A 曝露に伴う成体海馬の DNA メチル化状況を、メチル化シトシン DNA 断片を濃縮する方法によって得た DNA 断片を、遺伝子のプロモーター領域に特化したタイリングアレイにハイブリシ検出する方法によってある程度網羅的に調べた結果、Olfactory receptor cluster の DNA メチル化が BPA 曝露によって亢進している可能性が示唆された。そこで、このタイリングアレイで得られた結果の検証も含め、より精度の高い手法を用いた解析を実現すべく、次世代シーケンサーによる解析を実施した。プラットフォームは、イルミナ社の次世代シーケンサーを用いた。

本技術の導入には最適なシーケンス条件の設定に予想以上の試行錯誤を要したが、現在は自身のラボでシーケンスを行い、データ解析可能な状況となっている。

DNA メチル化状況の網羅的な解析にあたっては、MBD2 のメチル化シトシン結合領域を用いてメチル化シトシン DNA 断片を濃縮し、次世代シーケンサーによってシーケンスを取得する方法を用いた。得られたシーケンスデータをマウスゲノム配列 (mm9) にマッピングし、不良リードを除去した。

次に、ビスフェノール A サンプルの方がコントロールサンプルよりもマッピングされたリードが多い領域の検索を行った。Enriched Region Detection という解析アルゴリズムを用い、Enrichment factor を 20 に設定 (数値が高いほど差が大きい) して検索した結果、1384 ヶ所の領域が抽出された。これらの領域の中には昨年度タイリングアレイを用いた解析で得られた Olfactory receptor 遺伝子がクラスターを形成している領域も含まれていた。それ以外の領域も含め、それらの領域の近傍 (5kb 以内) に存在する遺伝子を検出し (748

遺伝子)、Ingenuity Pathway Analysis にか
けた結果、Canonical Pathway として、
Neuropathic Pain Signaling in Dorsal Horn
Neurons, Axonal Guidance Signaling, CREB
Signaling in Neurons が、Bio Function とし
て、Neurological Disease, Cellular
Assembly and Organization, Nervous System
Development and Function, Cellular
Function and Maintenance, Molecular
Transport が抽出された。これらは神経機能
に関連する機能カテゴリーであり、海馬の機
能変調に関わる可能性が考えられる。

D. 考察

タイリングアレイを用いた検討により、ビスフェノール A の発生-発達期暴露によって海馬ゲノムの DNA メチル化が変化することが示唆された。しかし、手法の限界もあり、より測定精度が高く、網羅性にも優れた手法を用いた検討が必須であると考えられた。そこで、DNA 配列レベルで測定が可能な次世代シーケンサーによる DNA メチル化状況の網羅的測定を行った結果、タイリングアレイでの結果と同様に、DNA メチル化変化が示唆される結果が得られた。

IPA 解析によって客観的に抽出された遺伝子リストから神経機能に関連する機能カテゴリーが選出されたことから、ビスフェノール A によるエピジェネティック影響が実在することを示唆する結果として注目される。

E. 結論

発生 - 発達期のマウスへのビスフェノール A 飲水投与により、成長後の海馬の DNA メチル化状況に変化が生じることが示唆された。今後、その生理的意義の解明を進めることが重要となる。また、DNA メチル化影響の持続性を踏まえ、成長後更に時間が経過した際の行動影響の検討も考慮する必要があると考えられる。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Kondoh S, Inoue K, Igarashi K, Sugizaki H, Shiode-Fukuda Y, Inoue E, Yu T, Takeuchi JK, Kanno J, Bonewald LF, Imai Y. Estrogen receptor α in osteocytes regulates trabecular bone formation in female mice. *Bone*. 2013 Dec 10;60C:68-77.
2. Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima S, Matsuda N, Morita K, Tsuji M, Moriyama N, Furukawa Y, Otsuka M, Tachihara E, Nakatsu N, Kodama Y. Oral administration of pentachlorophenol induces interferon signaling mRNAs in C57BL/6 male mouse liver. *J Toxicol Sci*. 2013;38(4):643-54.
3. Si Y, Inoue K, Igarashi K, Kanno J, Imai Y. Autoimmune regulator, Aire, is a novel regulator of chondrocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 9;437(4):579-584.

学会発表

2. Tanemura K, Igarashi K, Furukawa Y, Otsuka M, Aisaki K, Kitajima S, Sato E, Kanno J Delayed Effects on CNS Induced by Disturbance of Neural Activity during Development - Behavioral Impairment in Male Adult Mice Induced by Postnatal Oral Intake of Acephate- *The XIII International Congress of Toxicology* 2013.7 (Korea, Seoul)
3. 種村 健太郎、五十嵐 勝秀、古川 佑介、大塚 まき、白形 芳樹、相崎 健一、北

嶋 聡、佐藤 英明、菅野 純
発生～発達期マウスへの低用量ビスフ
ェノール A 暴露による遅発中枢影響解析
第 40 回日本毒性学会 2013.6 (千葉)

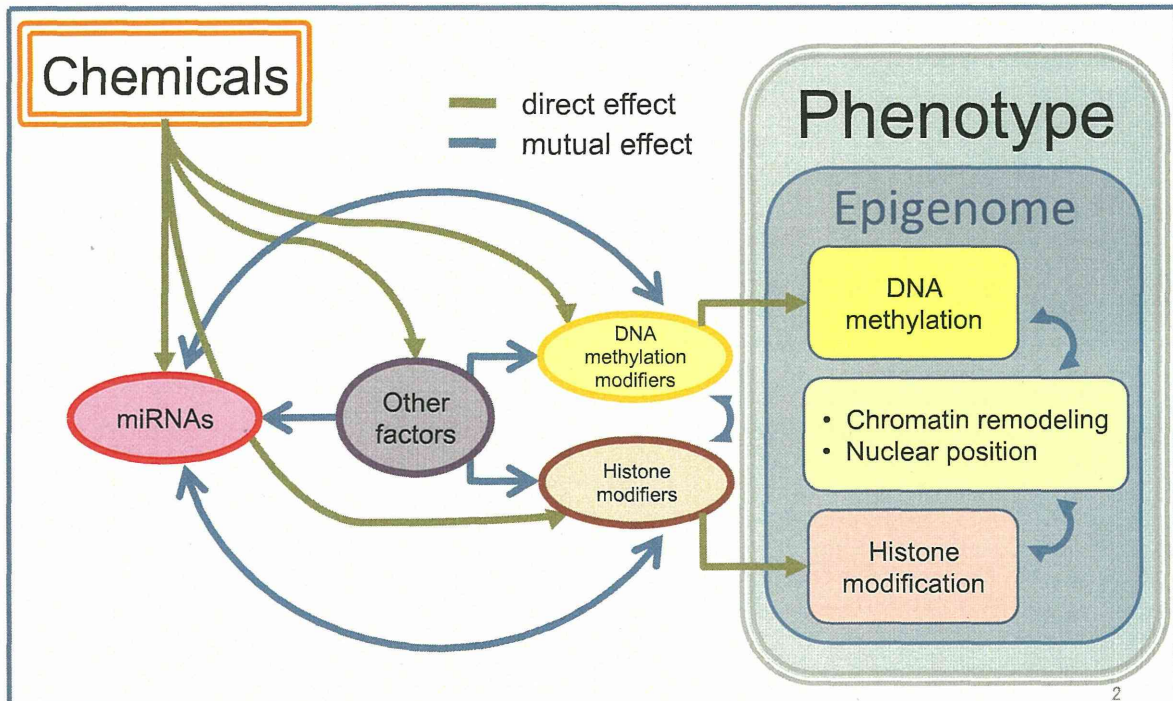
4. 五十嵐 勝秀、種村 健太郎、古川 佑介、
大塚 まき、森山 紀子、相崎 健一、北
嶋 聡、菅野 純
脳発達期における GABA シグナルの一過
性活性化による遅発中枢神経系影響の
解析
第 40 回日本毒性学会 2013.6 (千葉)
5. 五十嵐 勝秀、富永 貴志、古川 佑介、
大塚 まき、森山 紀子、菅野 純、種村 健
太郎
化学物質と神経回路再編成 (行動からエ
ピジェネティクスまで)
Neuro2013 (シンポジウム S3-4-2 見て調
べる神経回路機能のダイナミクス: 再編
成と変調) 2013.6 (京都)
6. 五十嵐勝秀、大塚まき、古川佑介、森山
紀子、中島欽一、種村健太郎、菅野純
発生-発達期ビスフェノール A 曝露に伴
う成長後のマウス脳 DNA メチル化変化の
網羅的解析 第 7 回エピジェネティクス
研究会 2013.5 (奈良)

H. 知的財産所有権の出願、登録状況
特になし

発生-発達期ビスフェノールA暴露による エピジェネティック影響解析

五十嵐 勝秀
(大塚まき、古川佑介)
国立医薬品食品衛生研究所・
安全性生物試験研究センター・毒性部

Epigenetic toxicity



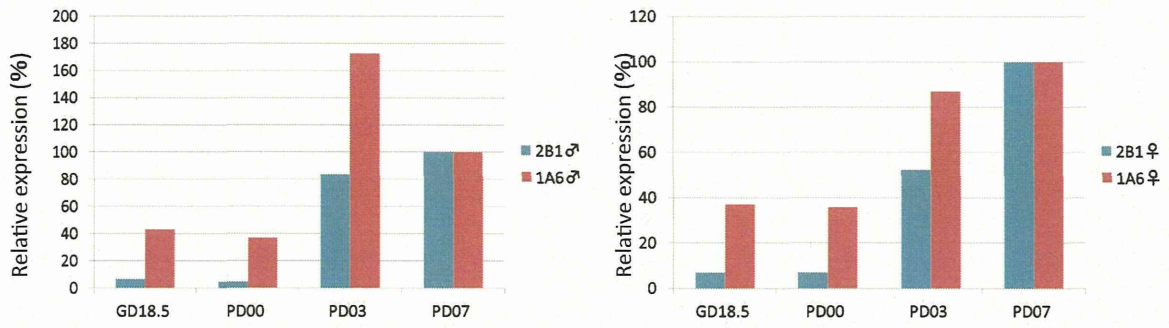


図1 新生仔におけるUGT発現の変動比較
 妊娠18.5日、出生0日、3日、7日でのUGT2B1の発現量は、7日と比較すると約5%前後である。
 一方、UGT1A6では、40%前後の発現がみられた。

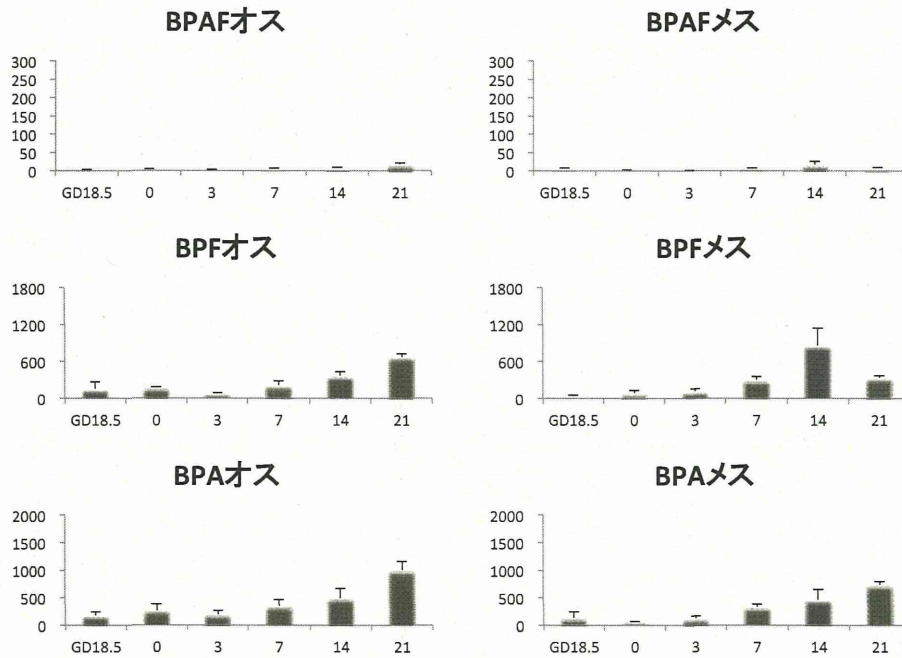


図2 発生一発達期における代謝動態
 • 妊娠18.5日、出生0日、3日、7日、14日、21日の肝臓におけるBPAF、BPA、BPFに対するグルクロン酸抱合活性を調べた。
 • BPAFの活性が特に低い。BPF、BPAの1/30~1/50くらい
 • 雌雄差はあまりない
 • 7日目くらいまで活性が低い

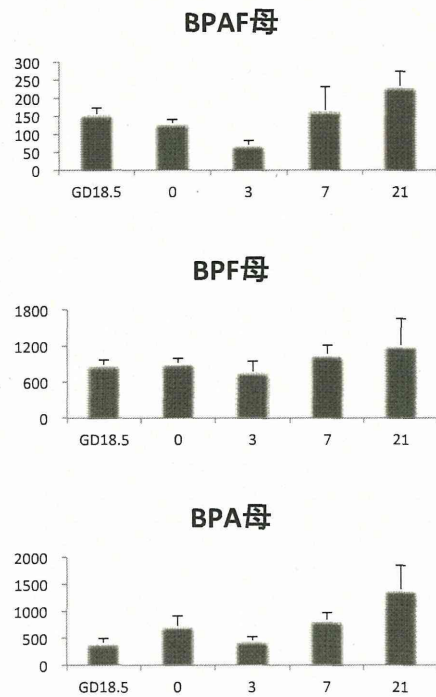


図3 母親の肝臓におけるグルクロン酸抱合活性
 ・ BPAFの活性が低い(1/5くらい)
 ・ BPAは妊娠、出産前後で若干活性が低くなるが、大きな活性の変動はない。

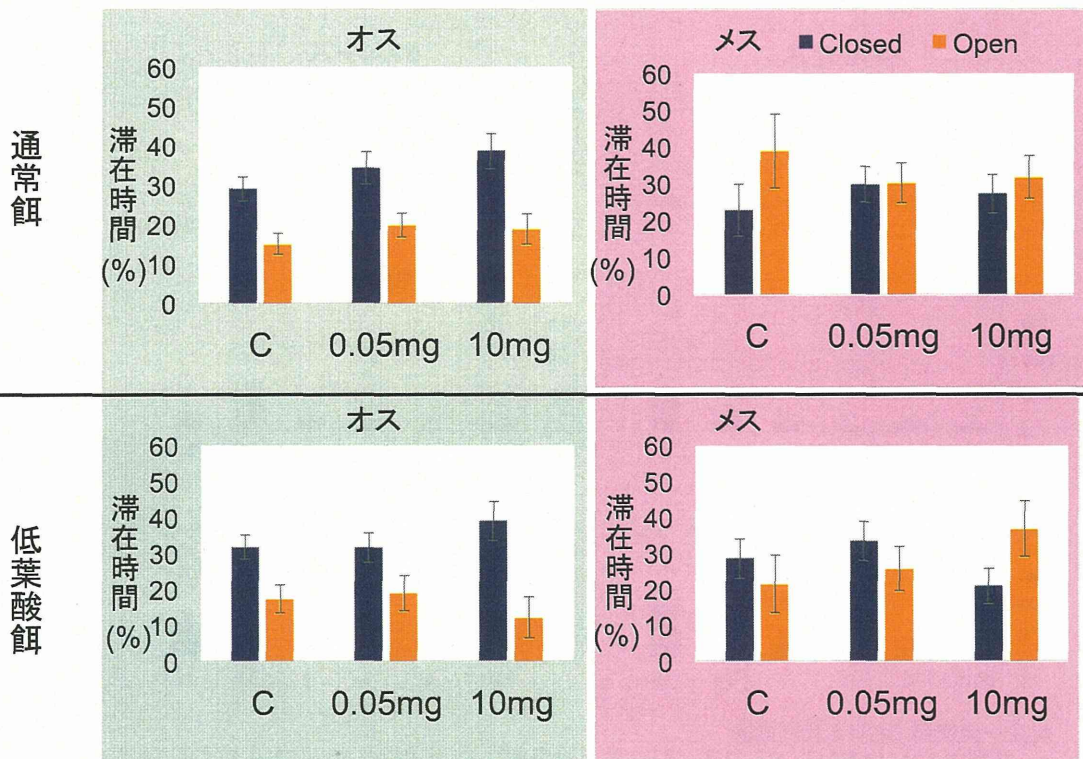


図4 BPAの前期投与による遅発性行動影響
 高架式十字迷路により行動影響を調べた結果である。
 全投与群において、BPA投与の影響に有意差はなかった。

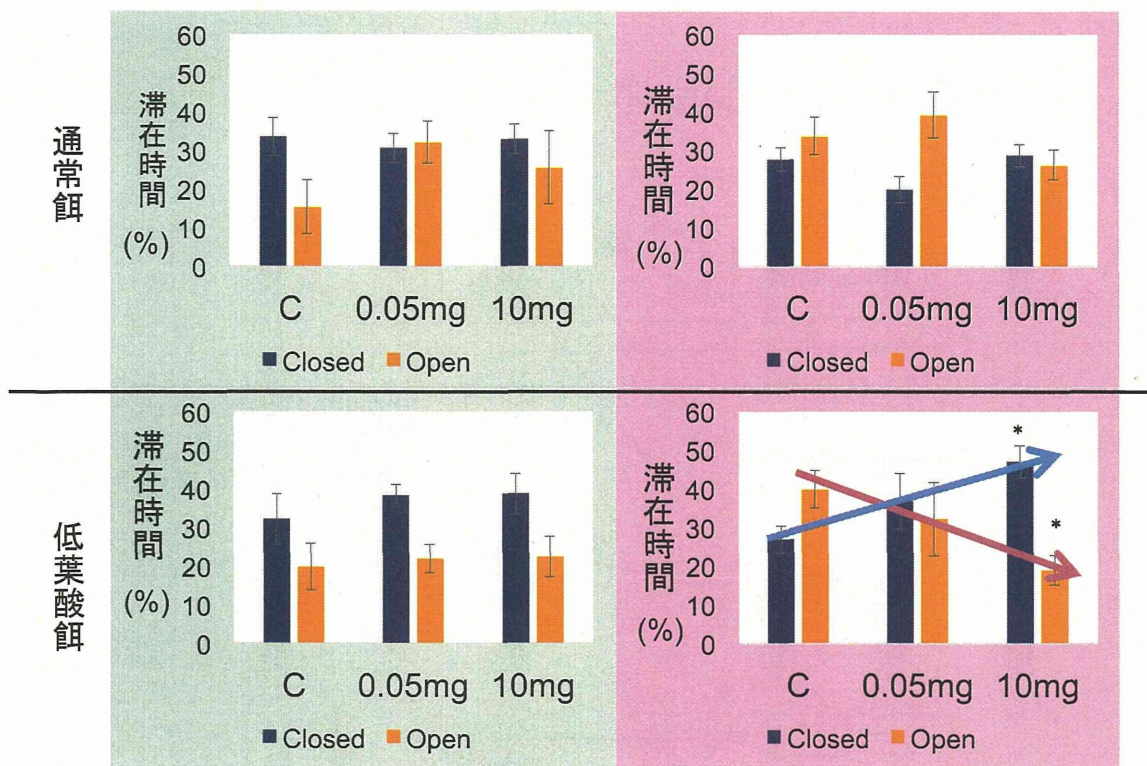
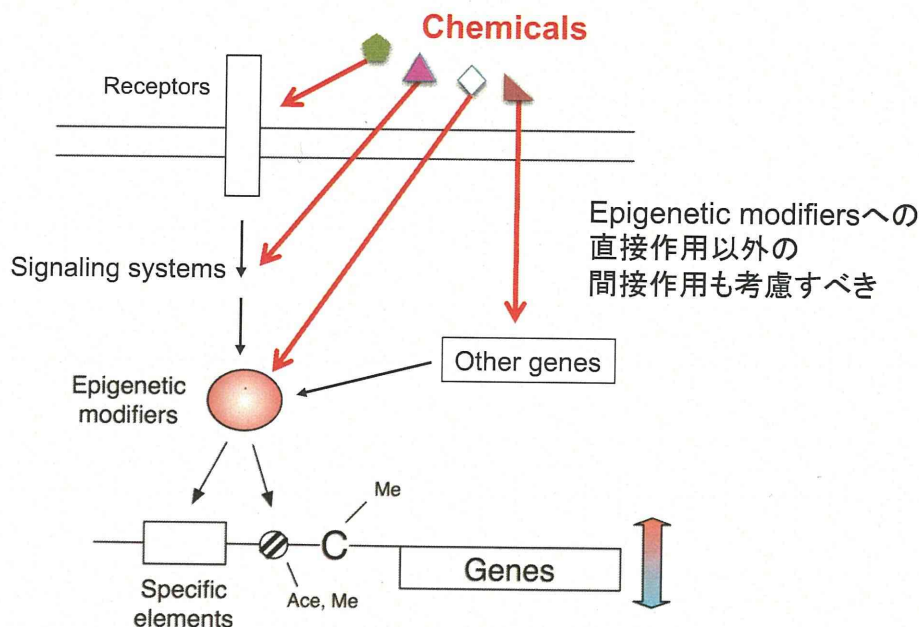


図5 BPAの後期投与による遅発性行動影響
 高架式十字迷路により行動影響を調べた結果である。
 低葉酸餌のメスにてBPAの影響が大きく、クローズドアームへの滞在時間が増えていた。

エピジェネティック毒性

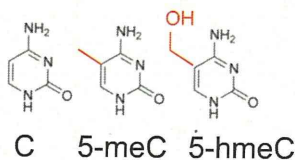


3

エピジェネティック制御の化学的実体

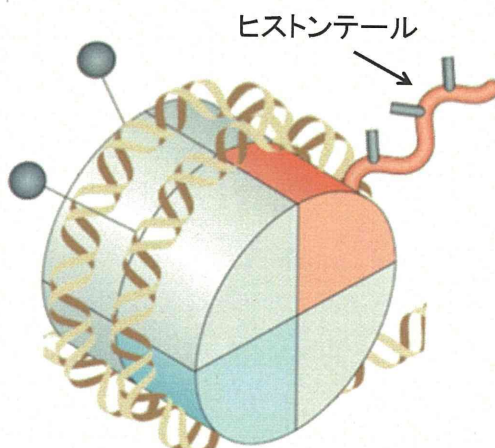
- 実体はDNAメチル化とヒストン修飾 -

DNAメチル化



5-meC, 5-hmeC

転写抑制

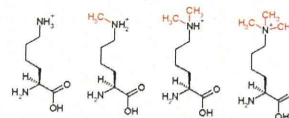


ヌクレオソーム

コアヒストン
(H2A, H2B, H3, H4)
リンカーヒストン (H1)

ヒストン修飾

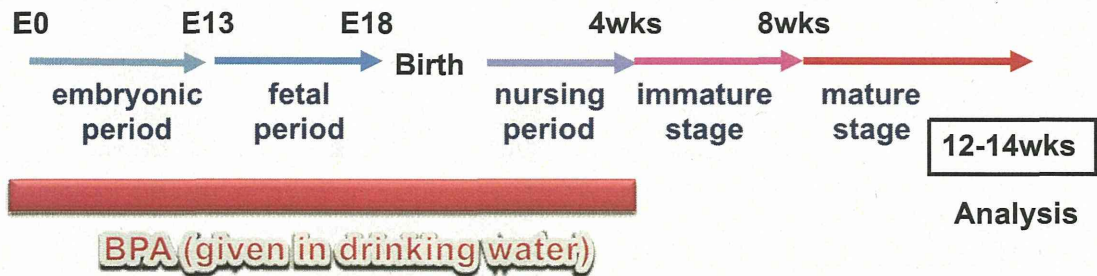
アセチル化
メチル化
リン酸化
ユビキチン化



例: リジンメチル化

転写調節は
一方向ではない

BPA曝露スケジュール



飲水投与濃度

- 0 ppm → 0.00 mg/kg/day
- 0.1 ppm → 0.01 mg/kg/day
- 1 ppm → 0.1 mg/kg/day
- 10 ppm → 1.0 mg/kg/day

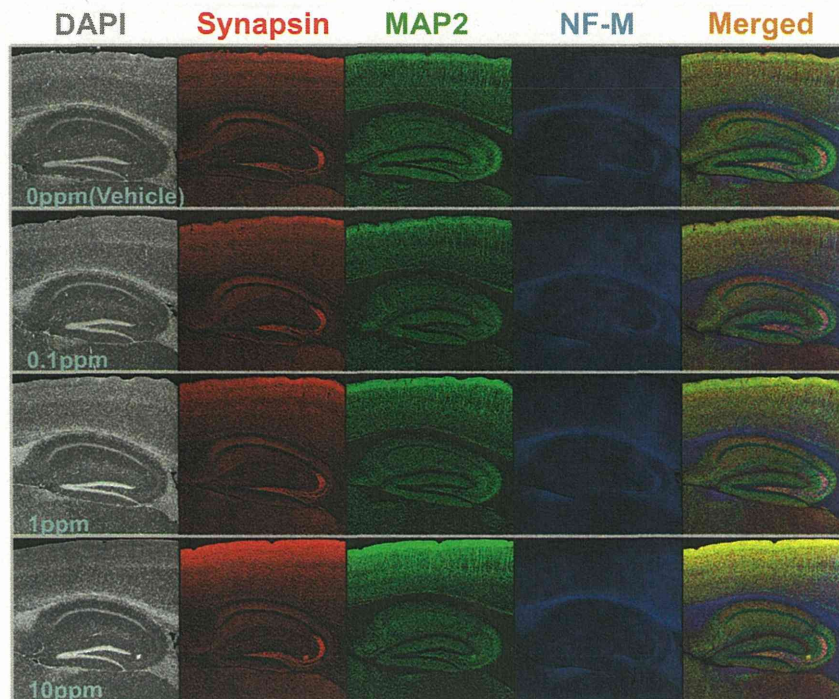
曝露期間

→ 交配前から離乳まで（4週齢）

行動解析

→ 雄成体（11週齢-12週齢）で実施

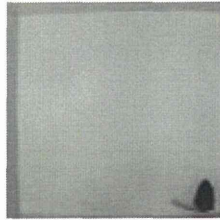
BPA曝露によるタンパク発現上昇



BPA0,0.1,1,10ppm #1 HP&CX x6

- Mice behavioral test battery -

OF



Open Field test
10min.

Measurement
Total distance
Center-time
Number of movements

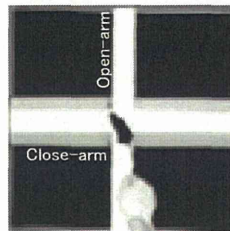
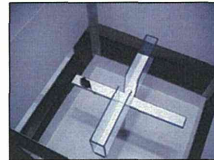
LD



Light and dark test
5min.

Measurement
Light time
Number of transition
Latency to enter light

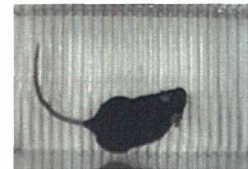
EP



Elevated plus maze
10min.

Measurement
Total distance
Number of selection
Open arm time

F



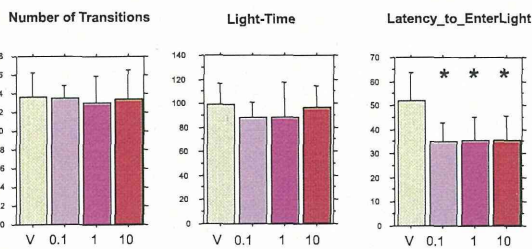
Fear conditioning
6min. & 3days

Measurement
Conditioning (1st day)
Context (2nd day)
Cued (3rd day)

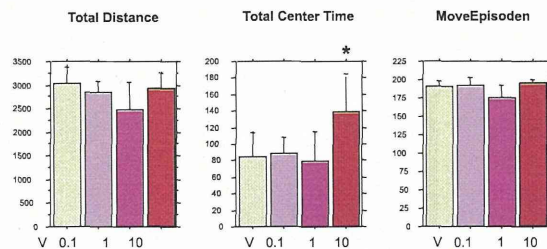
O'HARA & CO., LTD.

7

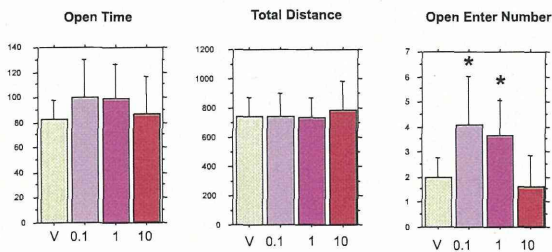
明暗往來試験



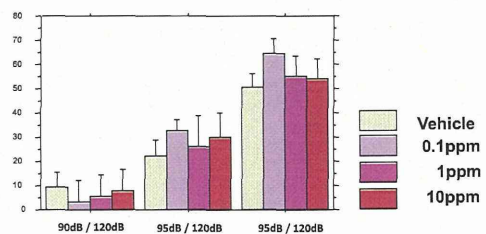
オープンフィールド試験



高架式十字迷路試験

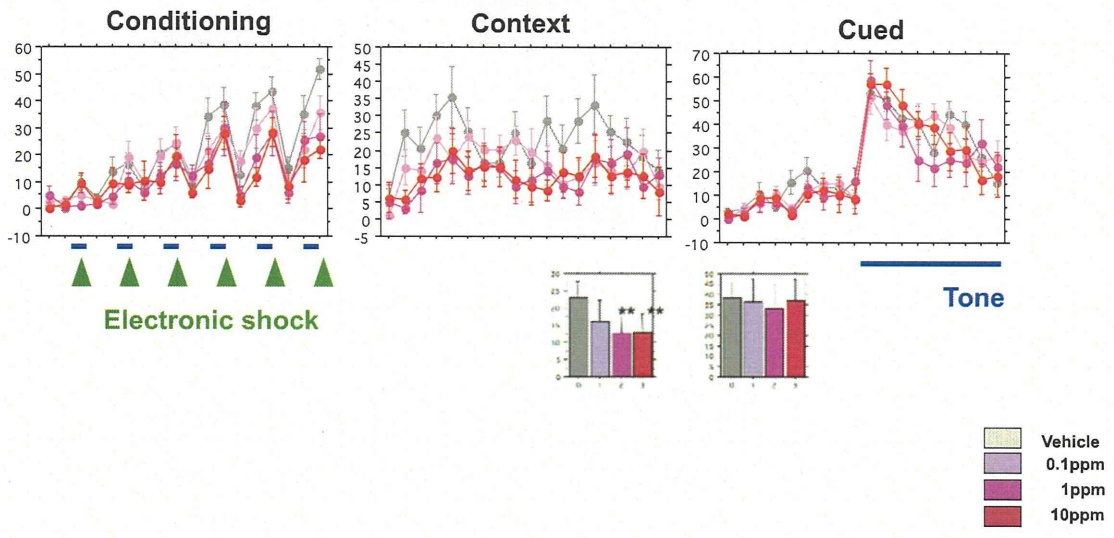


プレパレス驚愕反応抑制試験

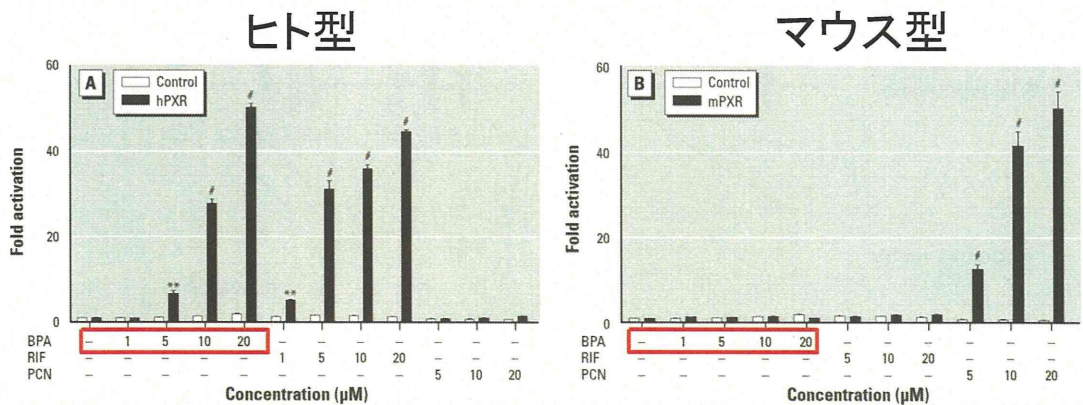


BPA曝露により空間記憶能が低下する

条件付け学習記憶試験



BPAのSXR活性化には種差がある

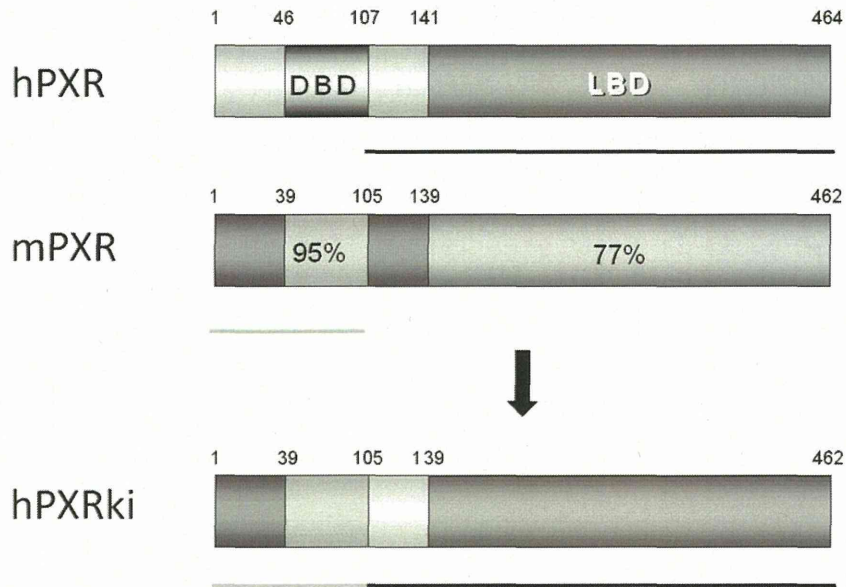


HepG2 (CYP3A4-luc)

EHP 120:399-405 (2012).

*In vitro*においてBPAはヒト型SXRを活性化するが、マウス型SXRは活性化しない

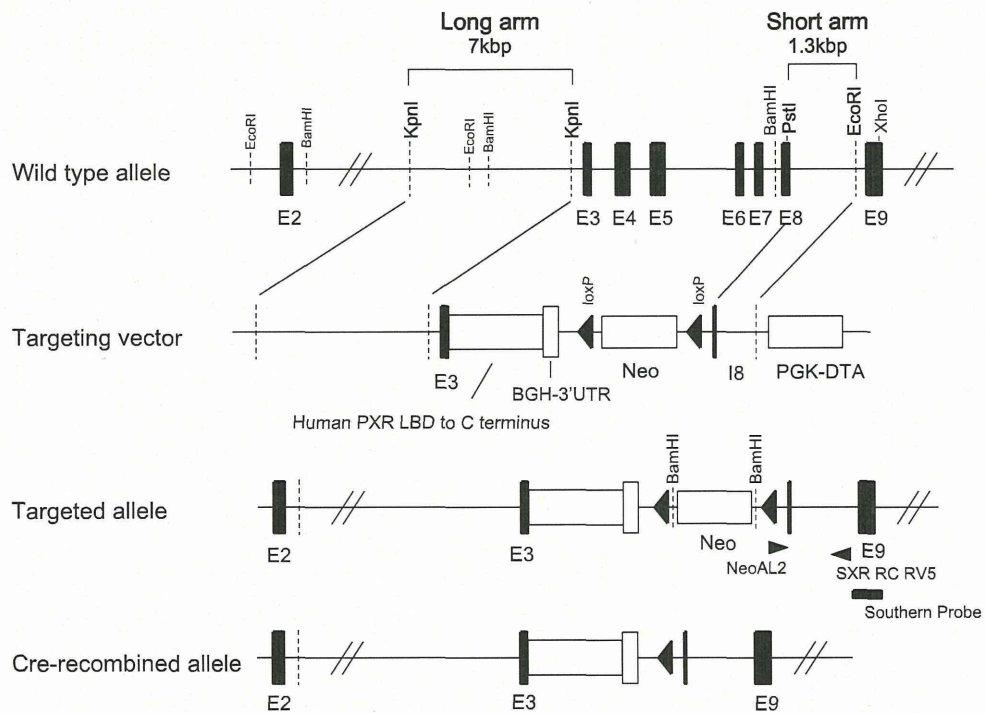
hPXRノックインマウスの作製 - LBDのみヒト型化 -



J Toxicol Sci. 2012;37(2):373-80.

11

ノックインマウス作製方針

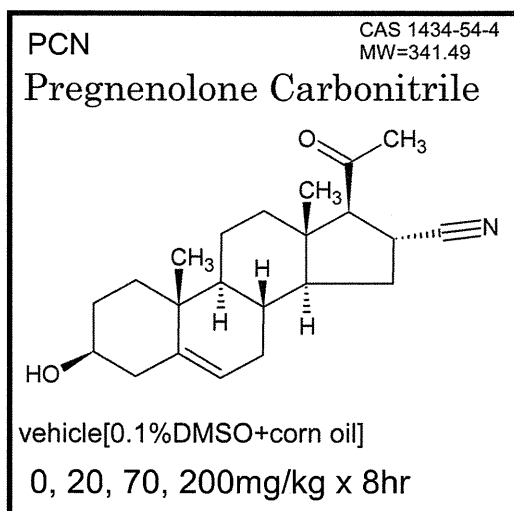


J Toxicol Sci. 2012;37(2):373-80.

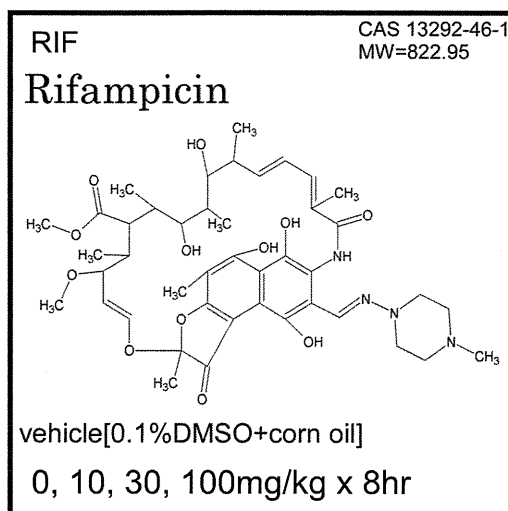
12

PXRリガンド投与に伴う遺伝子発現変動の解析 (Percellome法)

マウス選択的ナリガンド



ヒト選択的ナリガンド

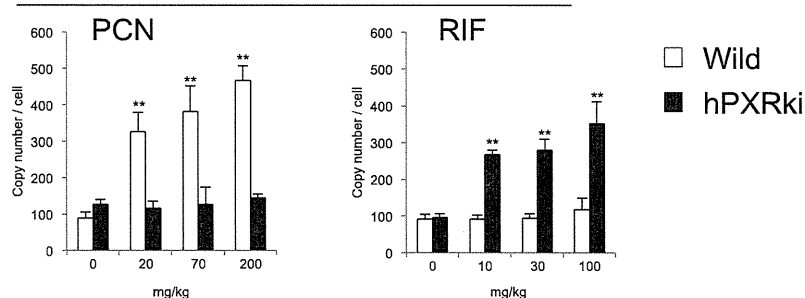


13

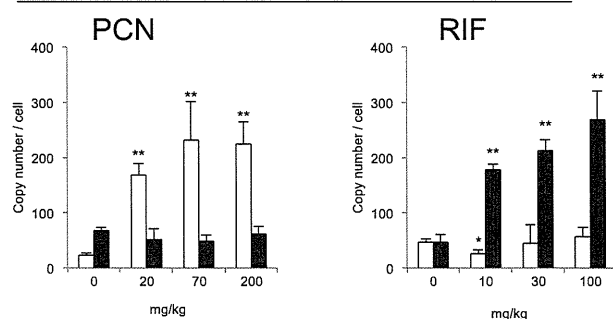
hSXRkiマウスはヒト型反応を示す

Ces6
(SXR標的遺伝子)
定量RT-PCR

Liver

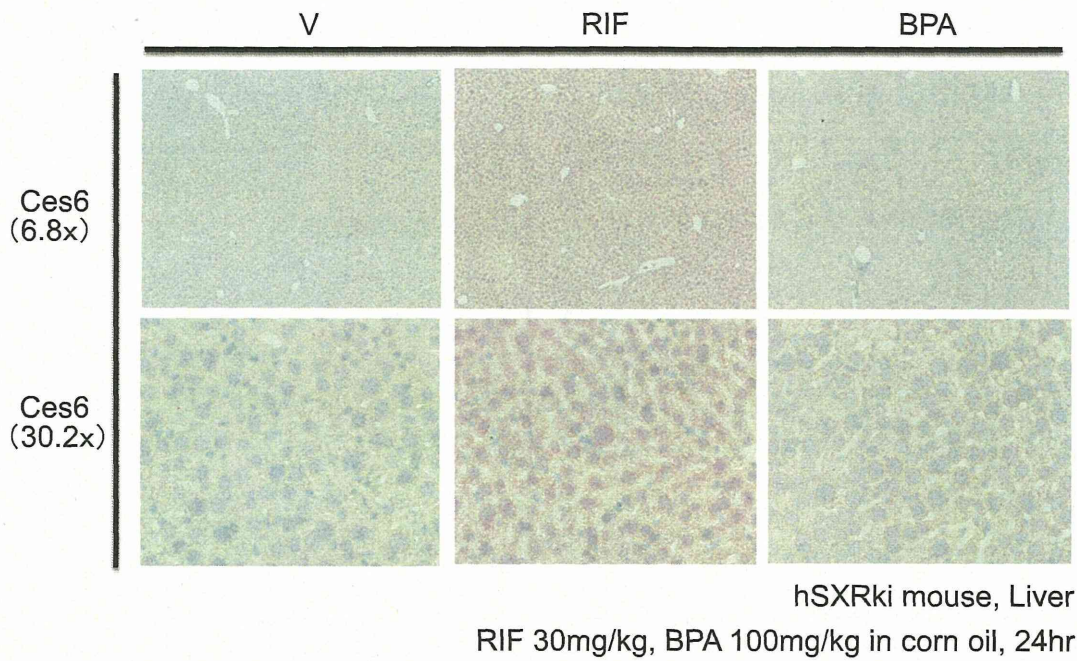


Small Intestine



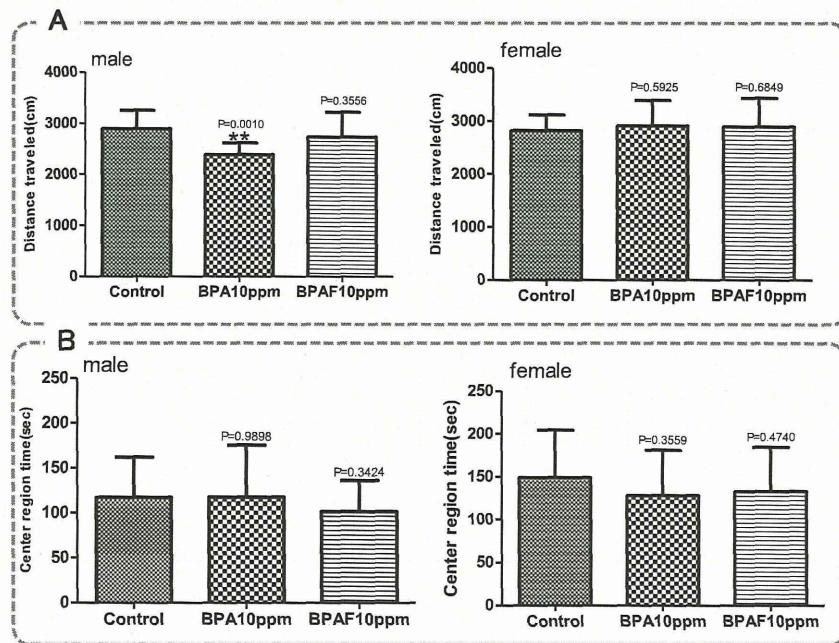
14

BPAは*in vivo*でヒト型SXRを弱く活性化する



BPA or BPAF 10ppm

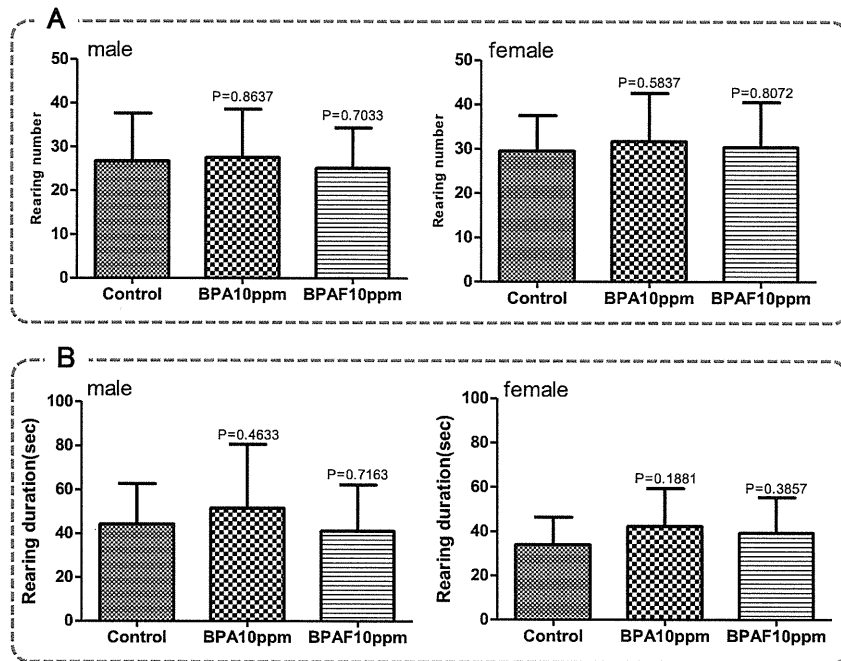
Open field test



A: Total distance
B: Total Center Time

BPA or BPAF 10ppm

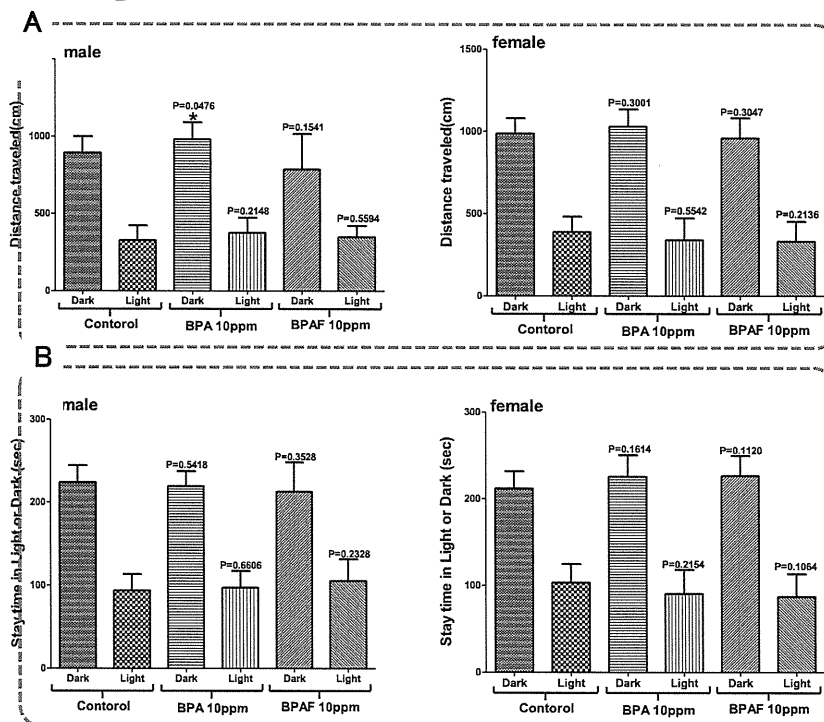
Hole board test



A: Total rearing number
B: Total rearing time

17

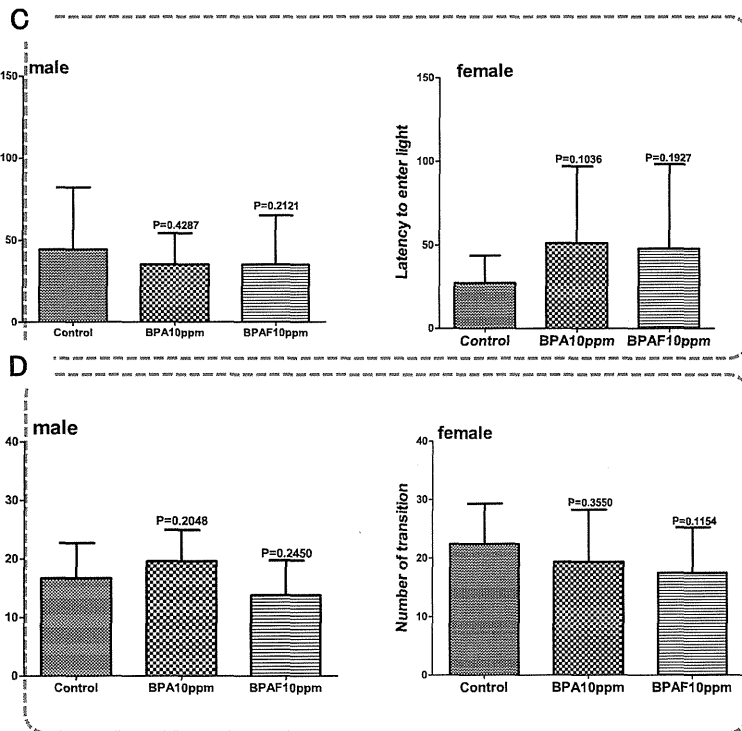
Light & dark transition test



A: Light & Dark distance
B: Light & Dark Time

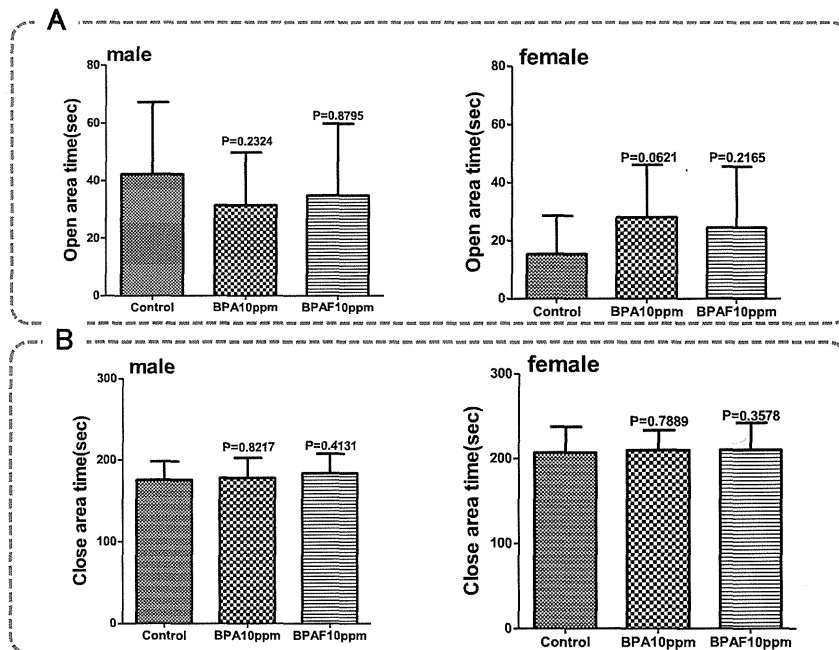
18

Light & dark transition test



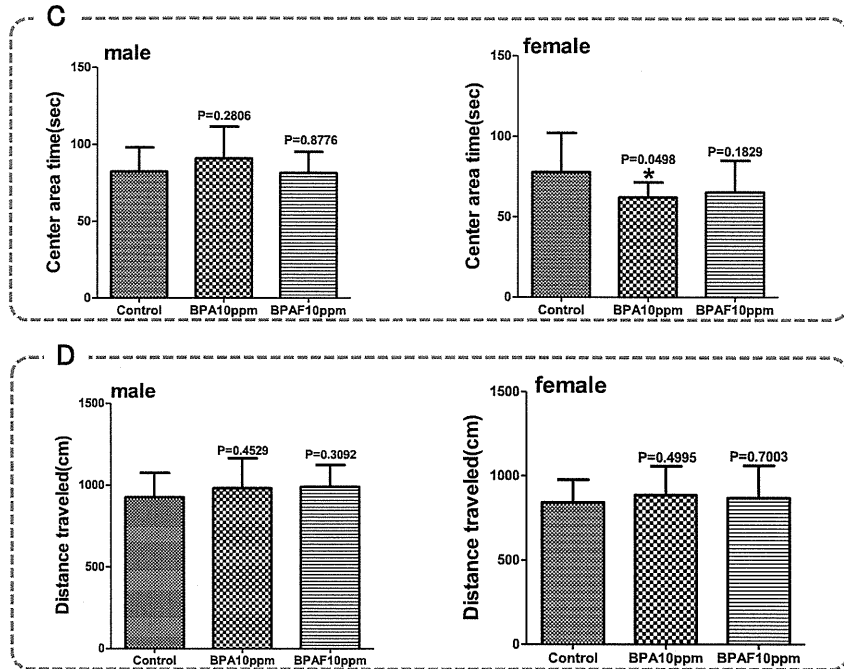
C: Latency to enter light
D: Number of transition

Elevated plus maze test



A: Total Open Time
B: Total Close Time

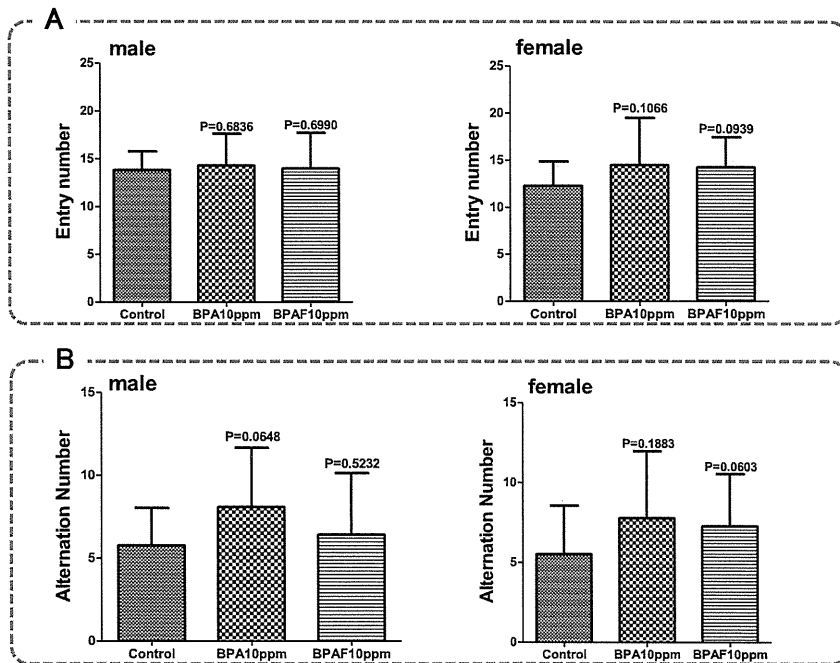
Elevated plus maze test



C: Total Center Time
D: Total Distance

21

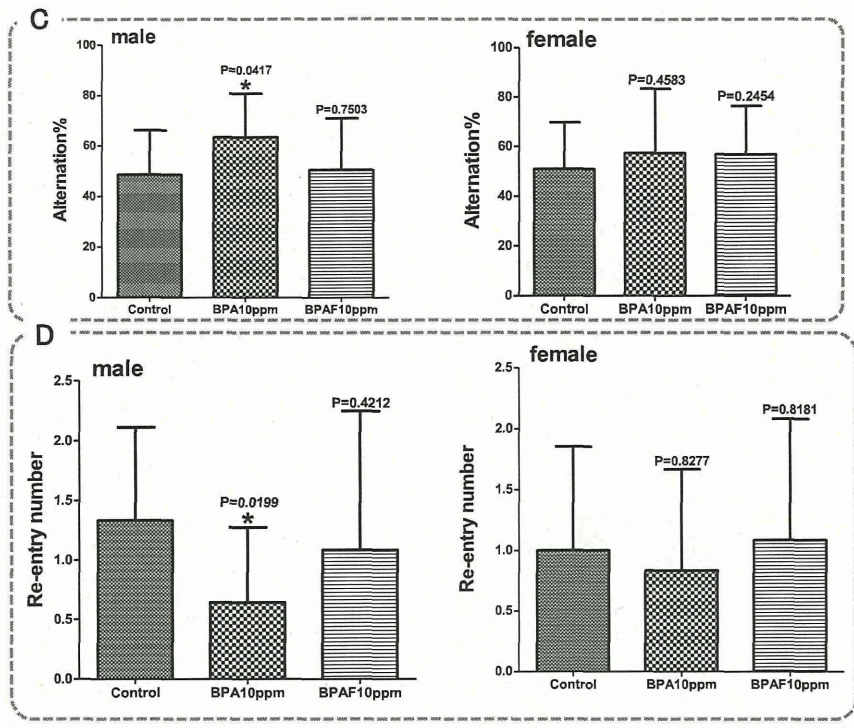
Y-maze test



A: Total entry number
B: Total alternation number

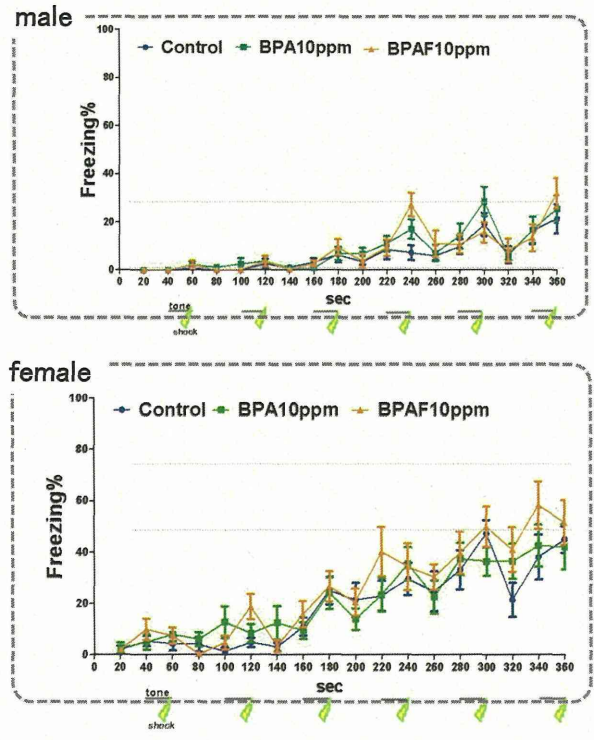
22

Y-maze test



C: Alternation %
D: Total Re-entry number

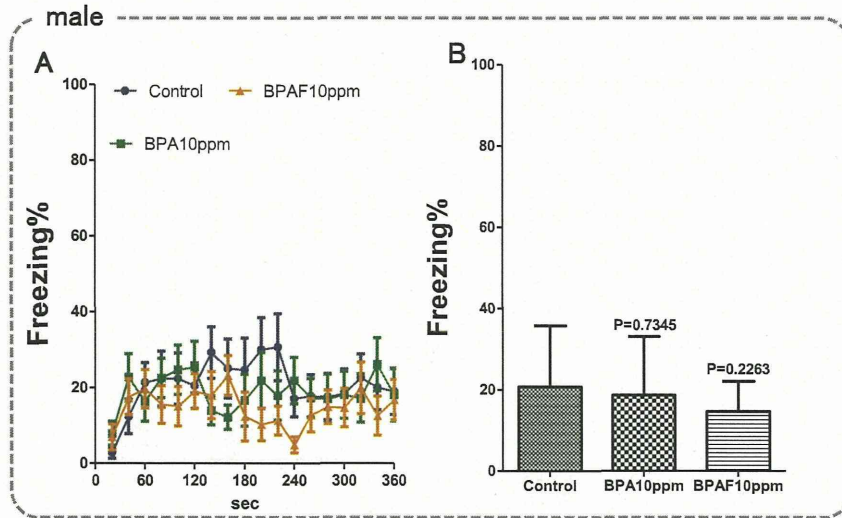
Fear conditioning test: Conditioning



Tone : 20sec, white noise
Foot shock : 2sec, 0.05mA *6
Total duration : 360sec

Fear conditioning test: Context

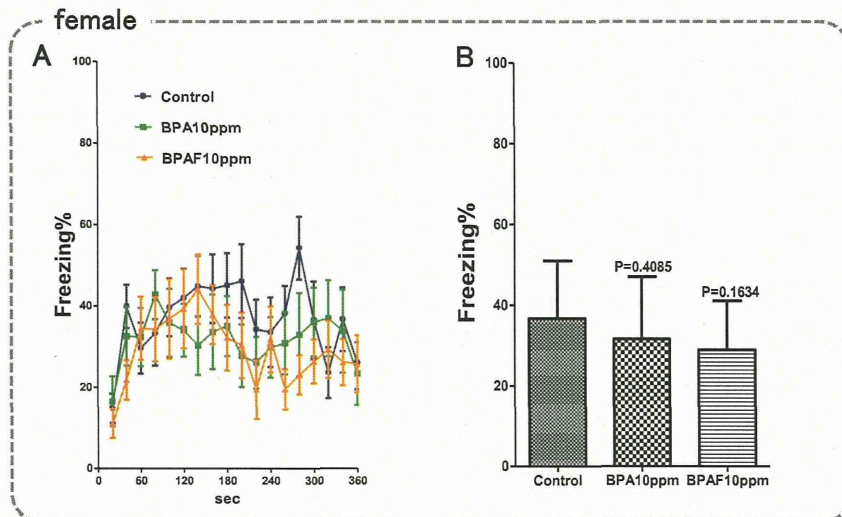
- Male -



25

Fear conditioning test: Context

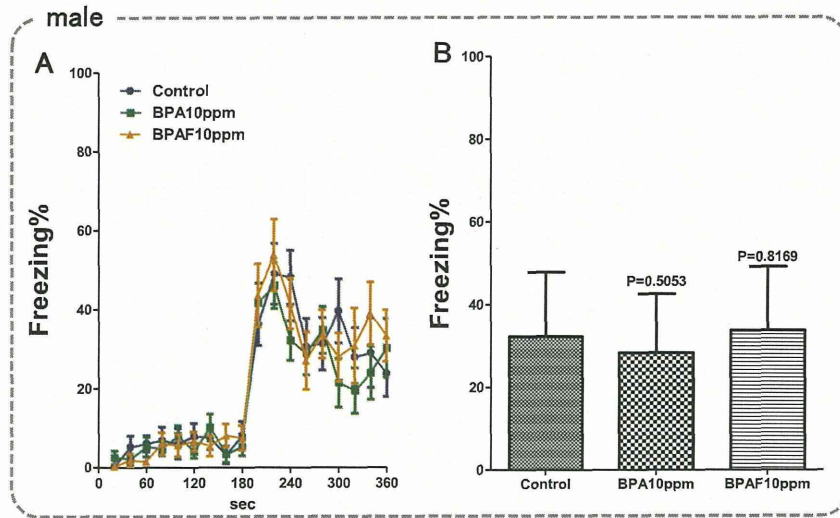
- Female -



26

Fear conditioning test: Cued

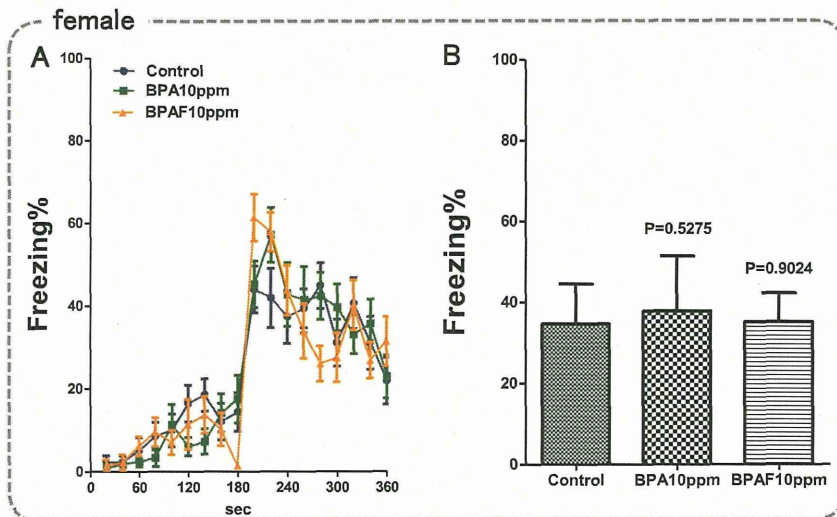
- Male -



27

Fear conditioning test: Cued

- Female -



28