

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

神経系発生-発達期の化学物質暴露による遅発中枢影響解析に基づく統合的な行動認知行動毒性評価系確立に資する研究  
分担研究報告書

発生-発達期ビスフェノール A 曝露によるエピジェネティック影響解析

分担研究者 五十嵐勝秀 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・室長

研究要旨

発生 - 発達期におけるビスフェノール A 曝露により、成長後に行動変化が生じることが明らかになってきている。これまで、一時的なビスフェノール A 曝露が持続的な脳機能変化をもたらす分子基盤の候補として、ゲノム DNA のメチル化変化を網羅的な観点から解析してきた。タイリングアレイを用いた解析により、ビスフェノール A 曝露に伴い変化が認められる領域を複数見出した。より測定精度が高い次世代シーケンサーを用いた検討により、結果が再現されると共に、タイリングアレイでは検出出来なかった変化も捉えられた。変化が認められたゲノム領域近傍に存在する遺伝子リストを IPA (Ingenuity Pathway Analysis) 解析した結果、Neuropathic Pain Signaling in Dorsal Horn Neurons, Axonal Guidance Signaling, CREB Signaling in Neurons など神経機能に関連する pathway が抽出された。これらの結果は BPA による DNA メチル化変化が成長後の行動変化に関与する可能性を示唆するものである。

A. 研究目的

中枢神経系が正常に発達する過程に DNA メチル化を始めとするエピジェネティック制御が関わっていることが報告されている。DNA メチル化は主に発達期に確立されることが明らかになっており、その後は細胞の性質を維持する、いわば「細胞記憶」を支える仕組みの一つとして働くと考えられている。よって、DNA メチル化パターンの確立過程に影響を与える化学物質は、細胞の性質を恒久的に変え、その影響が記憶され長く残る深刻な作用を有すると考えられる。

一方で、アグーチイエローマウスを用いた解析により、ビスフェノール A が DNA メチル化に影響を与えうることが報告されている。アグーチイエローマウスは毛色に関わる *agouti* 遺伝子上流にトランスポゾンの挿入があり、野生型より *agouti* 遺伝子の発現が高く、黄色い毛色を示す。そのトランスポゾン配列がメチル化され、*agouti* 遺伝子の発現が

低下すると野生型同様の毛色になる。よって、*agouti* 遺伝子上流のトランスポゾン配列の DNA メチル化状態を毛色で推測することが可能であり、ビスフェノール A 等の作用が調べられた。その結果、交配前から離乳までの投与により、ビスフェノール A や Genistein が DNA メチル化を変化させるという報告がなされている (PNAS. 2007 :104:p. 13056-13061.)。しかし、これが *agouti* 遺伝子上流のトランスポゾン配列に限った作用であるか、ゲノムの他の領域にも生じる影響であるかは不明であり、生理的意義の解明も進んでおらず、更にはこの結果を否定する論文も発表されている (PNAS. 2013 :110(2):p. 537-542.)。一方、研究手法の進展により、今やゲノム DNA のメチル化状況を網羅的に調べる手法が開発され利用可能になっている。

本研究ではこの手法を活用し、ビスフェノール A 曝露に伴う中枢神経系の DNA メチル化変化について解析を行う。

## 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, Shirode-Fukuda Y, Inoue E,  
Yu T, Takeuchi JK, Kanno J, Bonewald  
LF, Imai Y. Estrogen receptor  $\alpha$  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

1. 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)
2. 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)

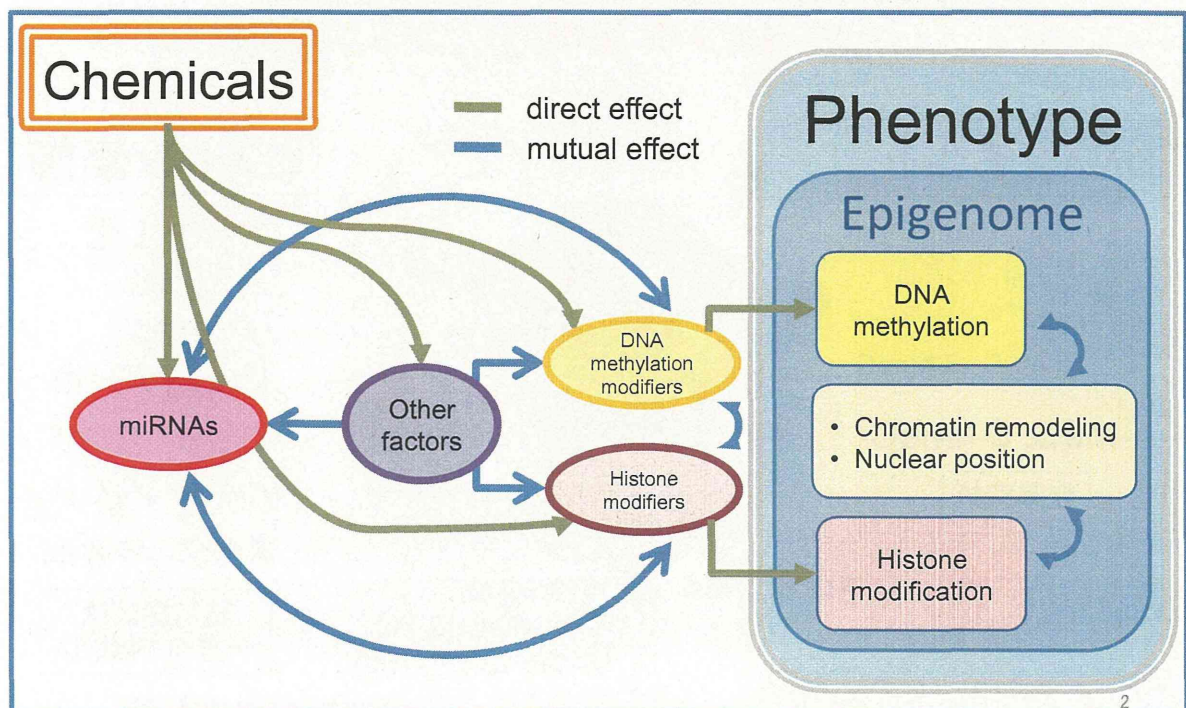
3. 五十嵐 勝秀, 種村 健太郎, 古川 佑介, 大塚 まき, 森山 紀子, 相崎 健一, 北嶋 聡, 菅野 純  
脳発達期における GABA シグナルの一過性活性化による遅発中枢神経系影響の解析  
第 40 回日本毒性学会 2013. 6 (千葉)
4. 五十嵐 勝秀, 富永 貴志, 古川 佑介, 大塚 まき, 森山 紀子, 菅野 純, 種村 健太郎  
化学物質と神経回路再編成 (行動からエピジェネティクスまで)  
Neuro2013 (シンポジウム S3-4-2 見て調べる神経回路機能のダイナミクス: 再編成と変調) 2013. 6 (京都)
5. 五十嵐勝秀, 大塚まき, 古川佑介, 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

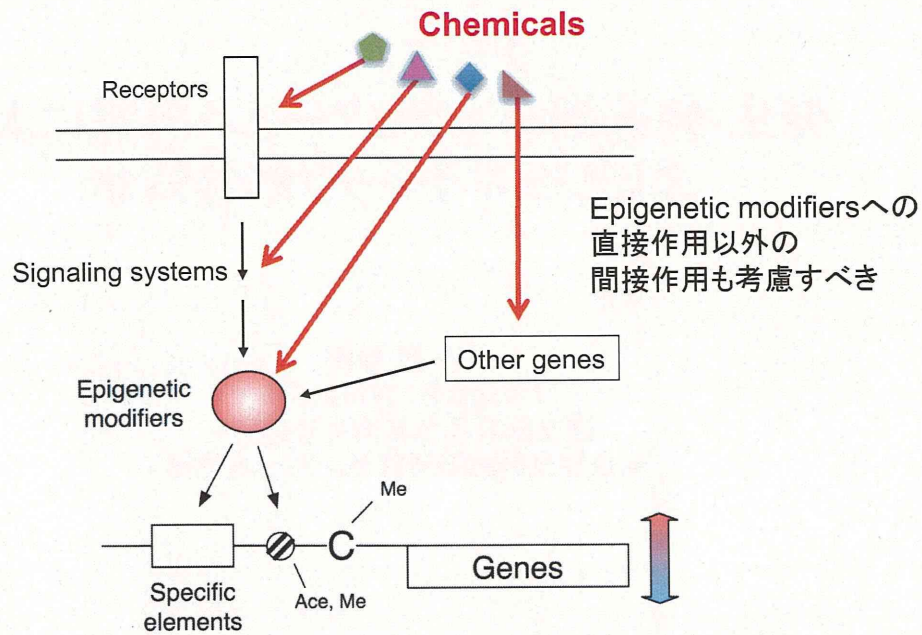
五十嵐 勝秀  
(大塚まき、古川佑介)  
国立医薬品食品衛生研究所・  
安全性生物試験研究センター・毒性部

### Epigenetic toxicity





# エピジェネティック毒性

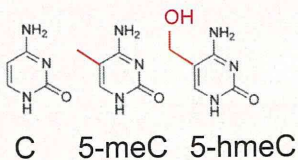


3

## エピジェネティック制御の化学的実体

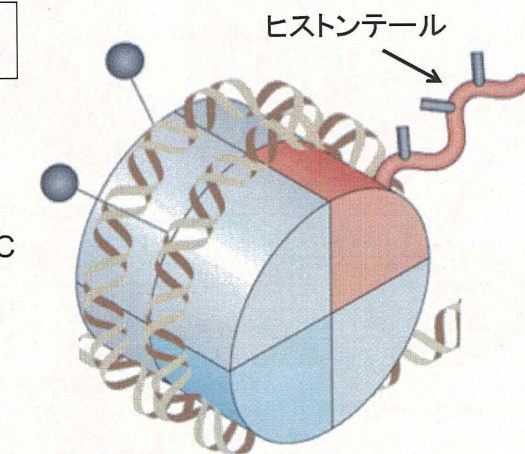
- 実体はDNAメチル化とヒストン修飾 -

### DNAメチル化



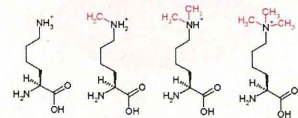
5-meC, 5-hmeC

転写抑制



### 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

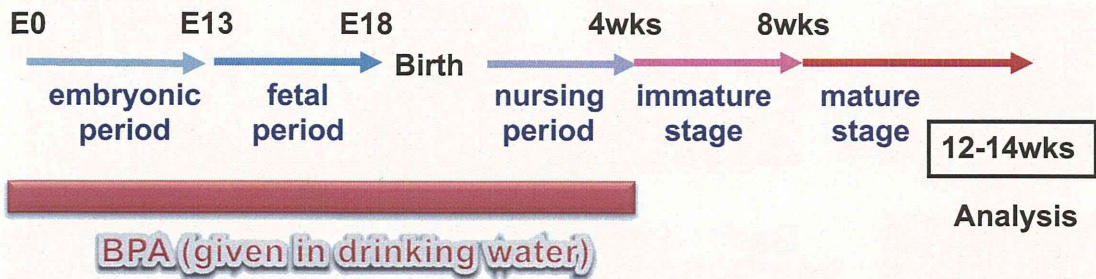


例: リジンメチル化

転写調節は一方方向ではない



# BPA曝露スケジュール



## 飲水投与濃度

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

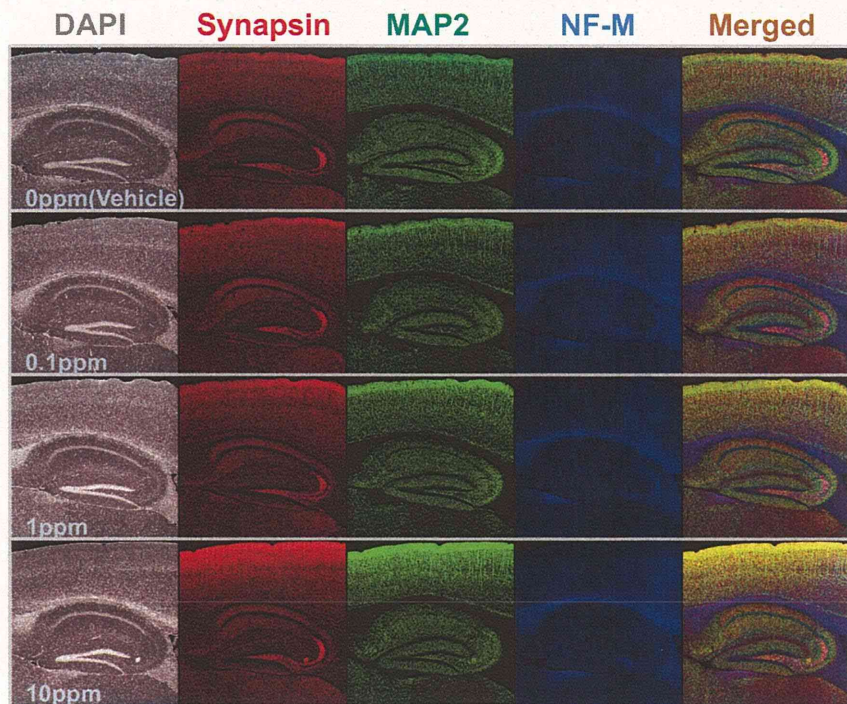
## 曝露期間

→ 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

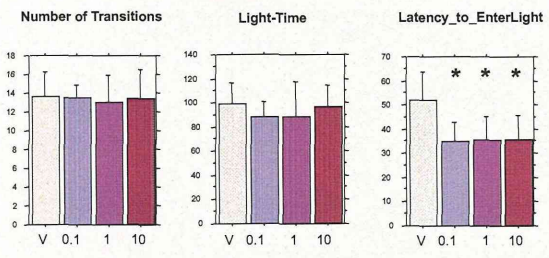


# - Mice behavioral test battery -

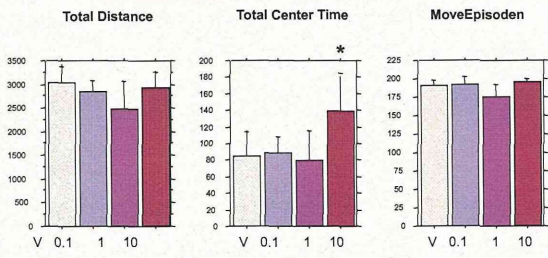
<u>OF</u>	<u>LD</u>	<u>EP</u>	<u>F</u>
			
			
<p><b>Open Field test</b> 10min.</p> <p><u>Measurement</u> Total distance Center-time Number of movements</p>	<p><b>Light and dark test</b> 5min.</p> <p><u>Measurement</u> Light time Number of transition Latency to enter light</p>	<p><b>Elevated plus maze</b> 10min.</p> <p><u>Measurement</u> Total distance Number of selection Open arm time</p>	<p><b>Fear conditioning</b> 6min. &amp; 3days</p> <p><u>Measurement</u> Conditioning (1<sup>st</sup> day) Context (2<sup>nd</sup> day) Cued (3<sup>rd</sup> day)</p>

O'HARA & CO., LTD.

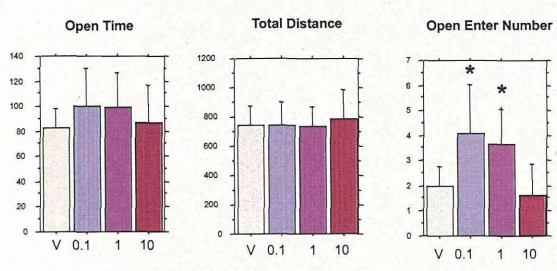
## 明暗往来試験



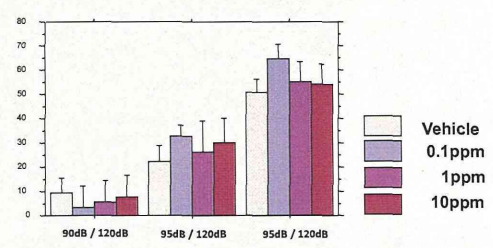
## オープンフィールド試験



## 高架式十字迷路試験



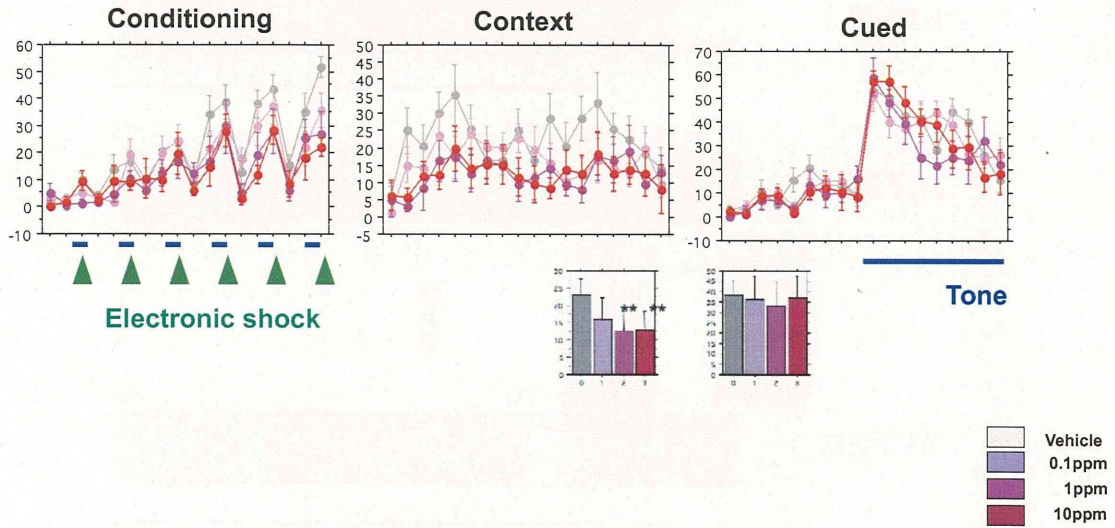
## プレパレス驚愕反応抑制試験



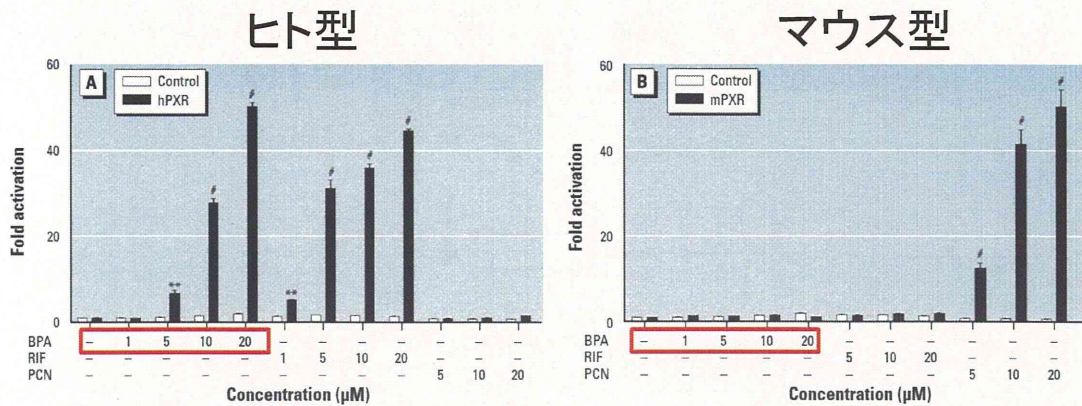


# BPA曝露により空間記憶能が低下する

## 条件付け学習記憶試験



# BPAのSXR活性化には種差がある

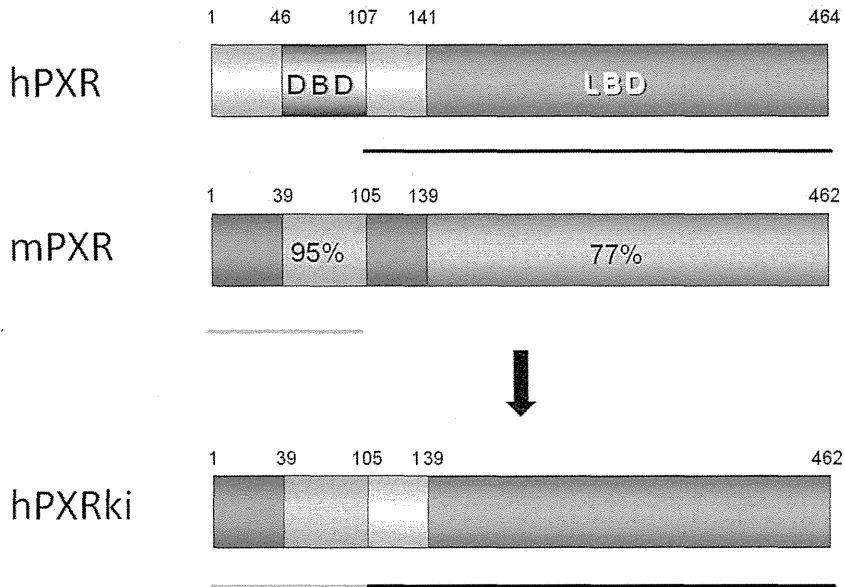


HepG2 (CYP3A4-luc)

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

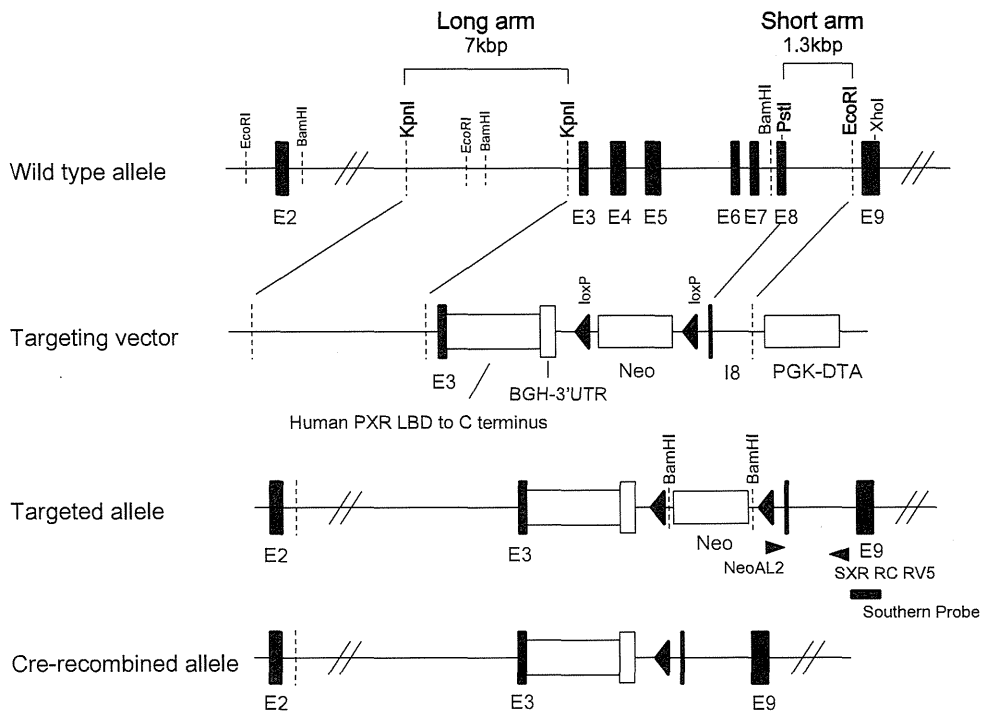
# hPXRノックインマウスの作製 - LBDのみヒト型化 -



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

11

## ノックインマウス作製方針



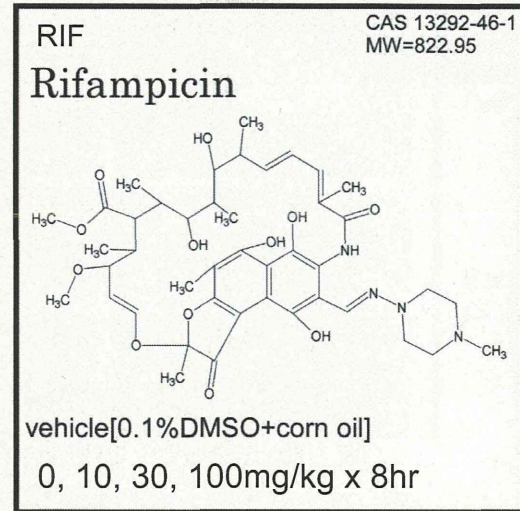
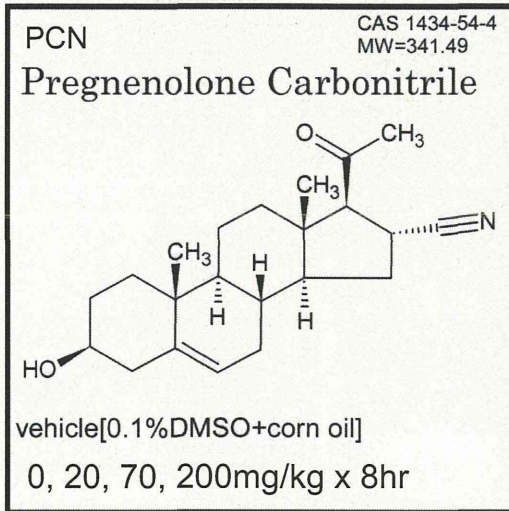
J Toxicol Sci. 2012;37(2):373-80.

12

# PXRリガンド投与に伴う遺伝子発現変動の解析 (Percellome法)

マウス選択的なりリガンド

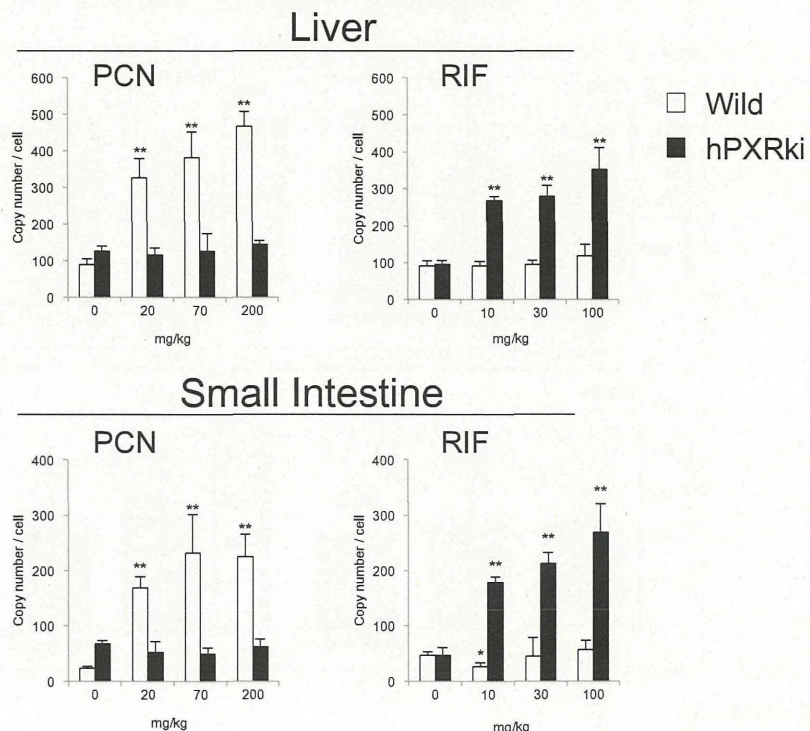
ヒト選択的なりリガンド



13

## hSXRkiマウスはヒト型反応を示す

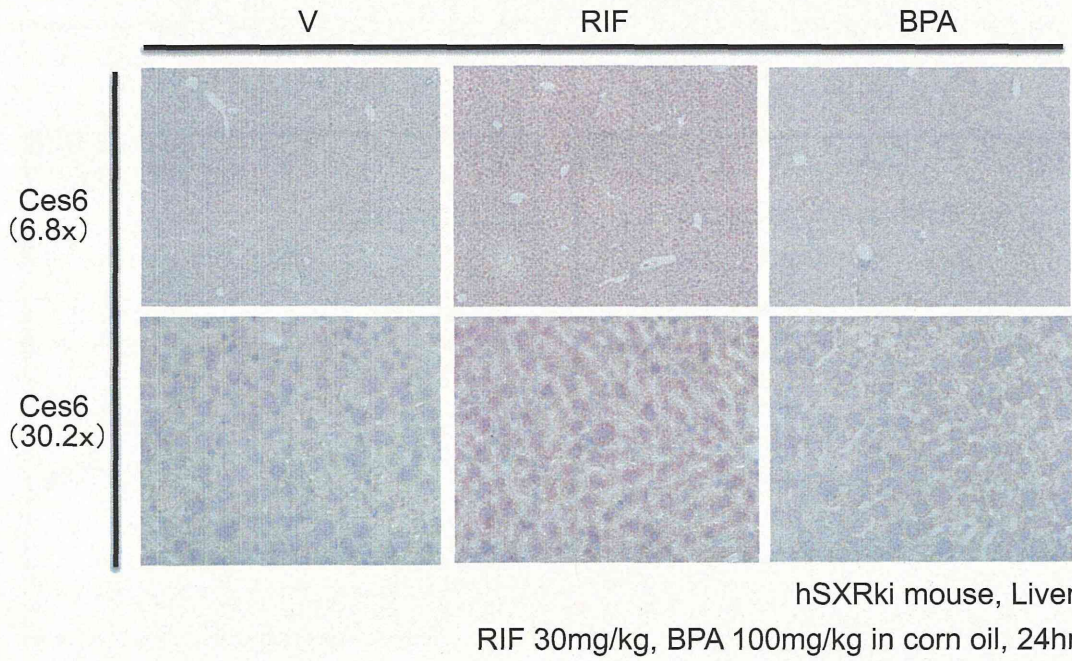
Ces6  
(SXR標的遺伝子)  
定量RT-PCR



14

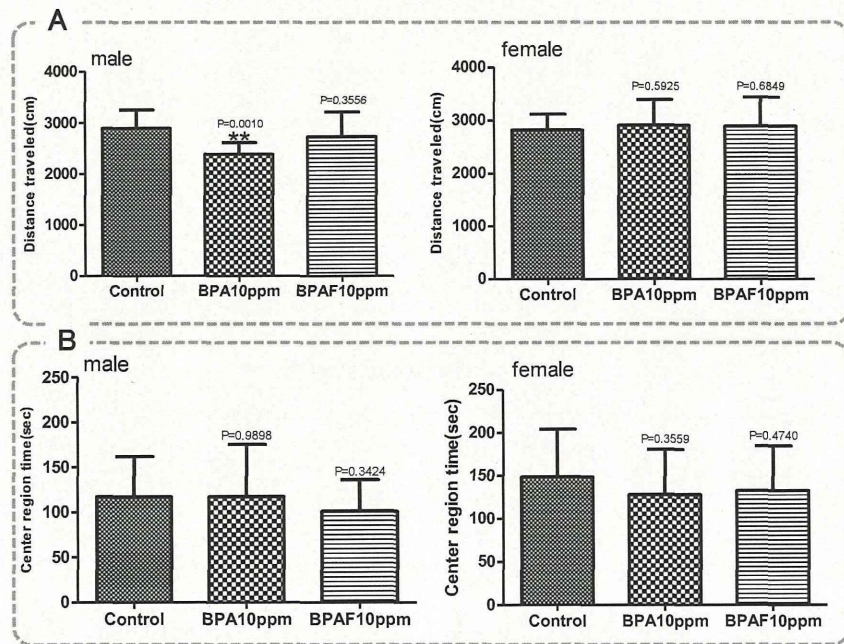


# BPAは*in vivo*でヒト型SXRを弱く活性化する



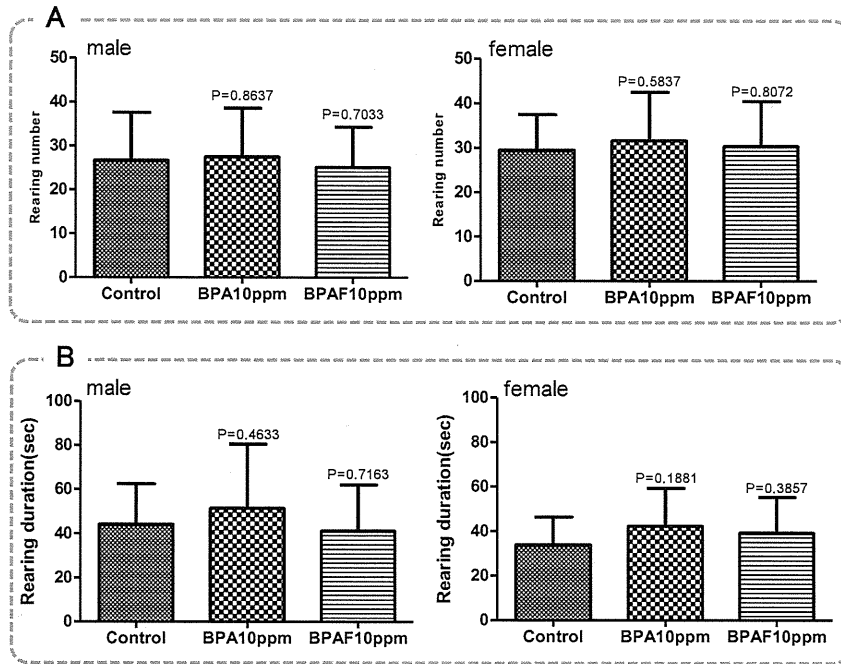
BPA or BPAF 10ppm

## Open field test



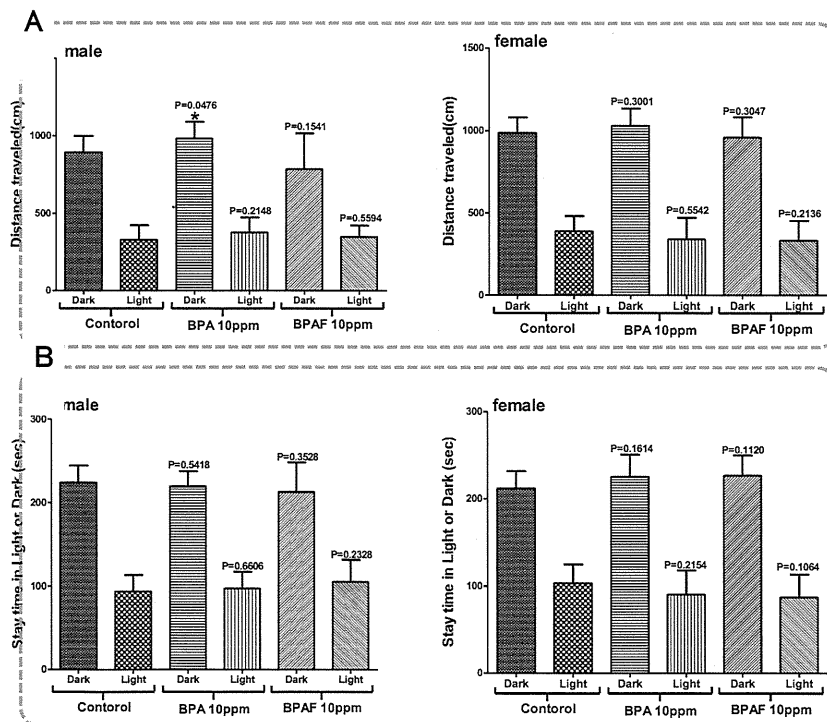
A: Total distance  
B: Total Center Time

# Hole board test



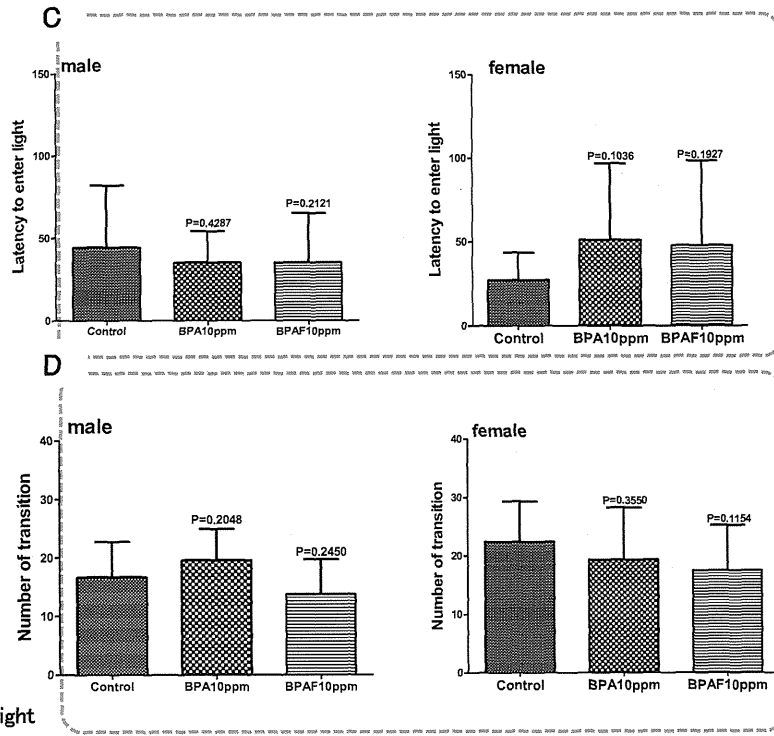
A: Total rearing number  
B: Total rearing time

# Light & dark transition test



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

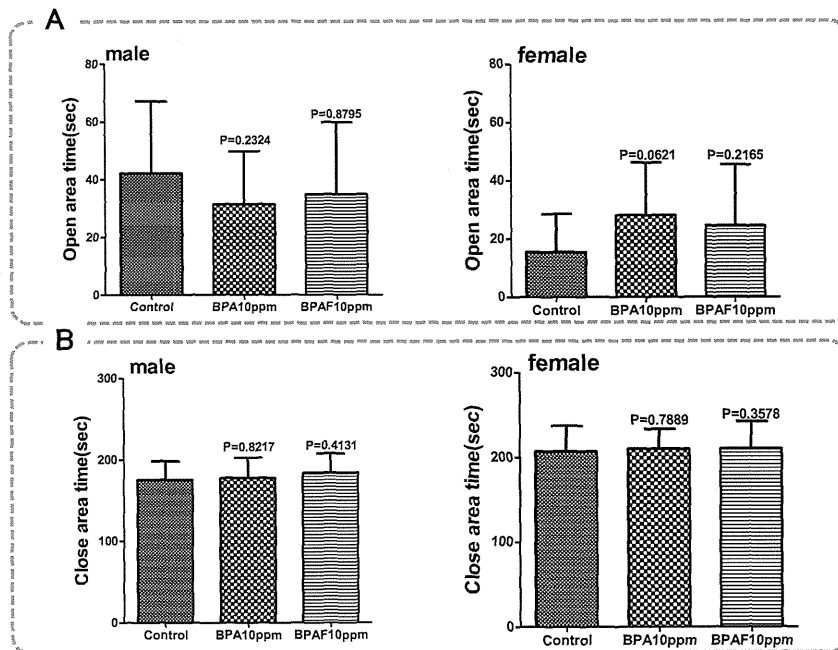
# Light & dark transition test



C: Latency to enter light  
D: Number of transition

19

# Elevated plus maze test

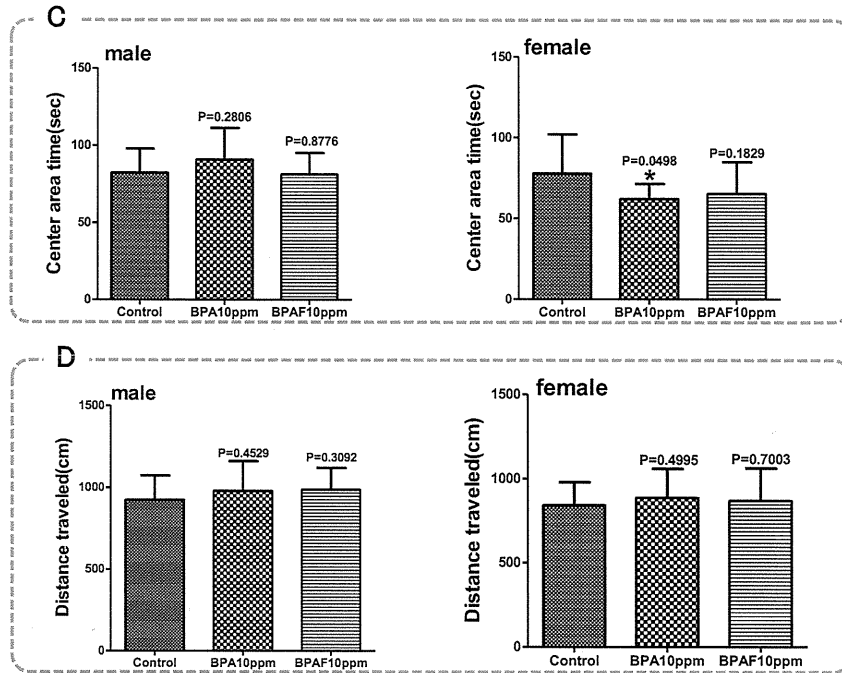


A: Total Open Time  
B: Total Close Time

20



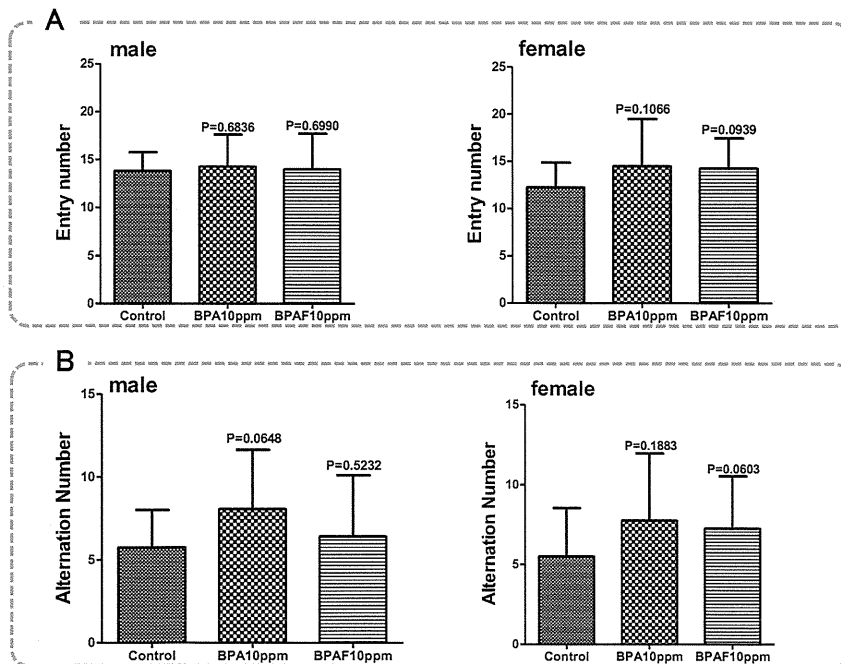
# Elevated plus maze test



C:Total Center Time  
D:Total Distance

21

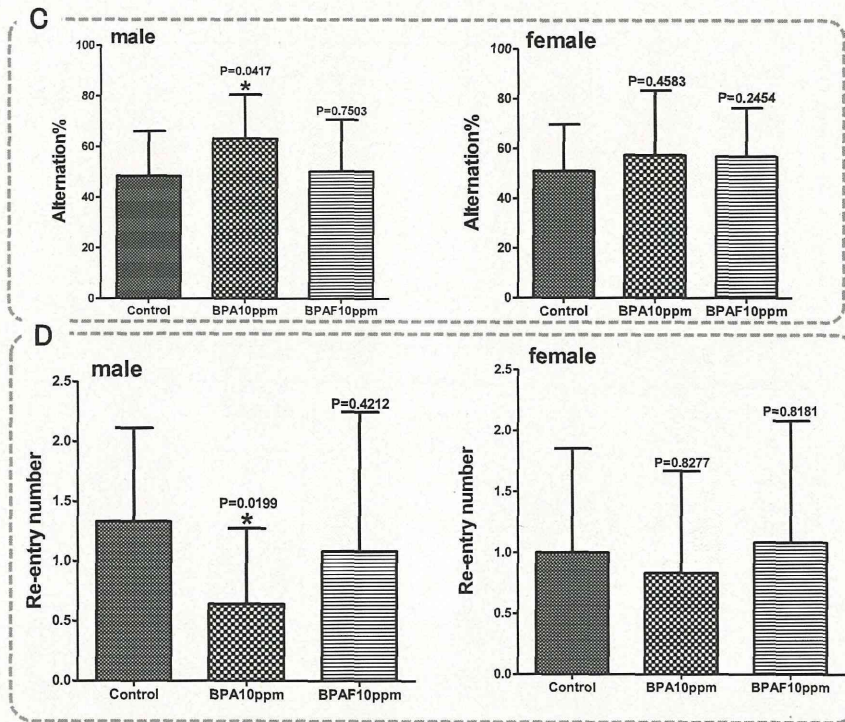
# Y-maze test



A:Total entry number  
B:Total alternation number

22

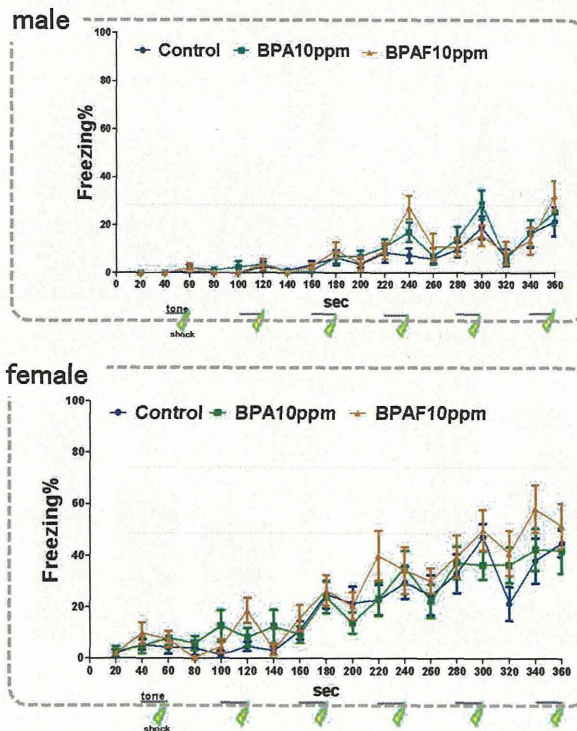
# Y-maze test



C: Alternation %  
D: Total Re-entry number

23

# Fear conditioning test: Conditioning

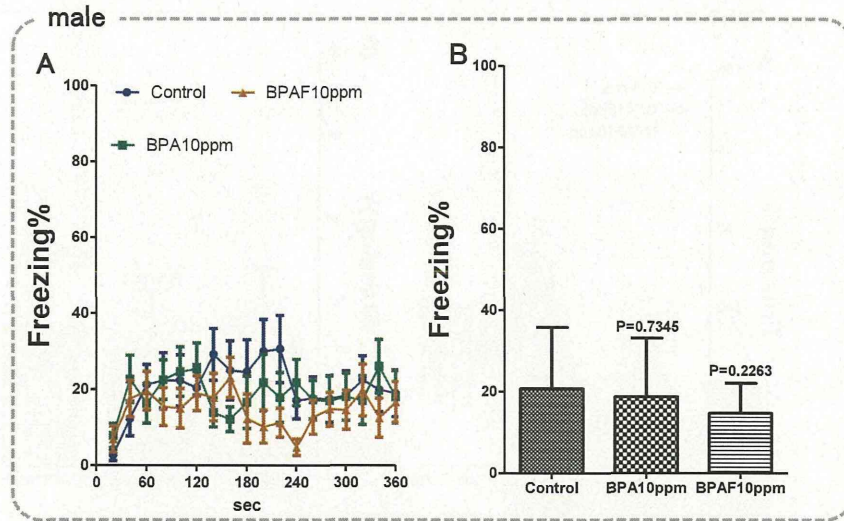


Tone : 20sec, white noise  
Foot shock : 2sec, 0.05mA \*6  
Total duration : 360sec

24

# Fear conditioning test: Context

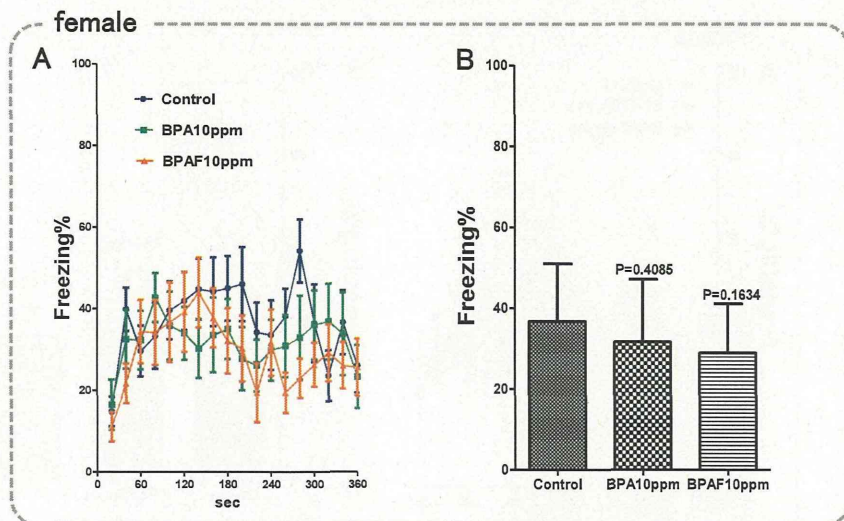
- Male -



25

# Fear conditioning test: Context

- Female -

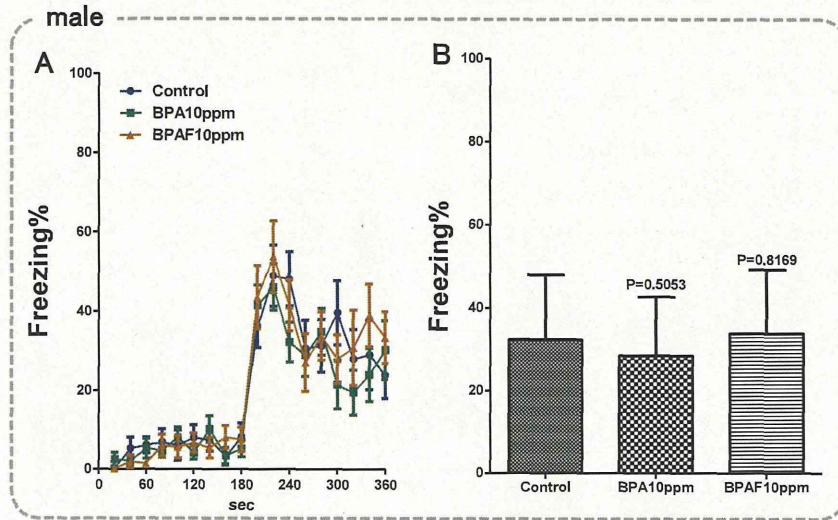


26



# Fear conditioning test: Cued

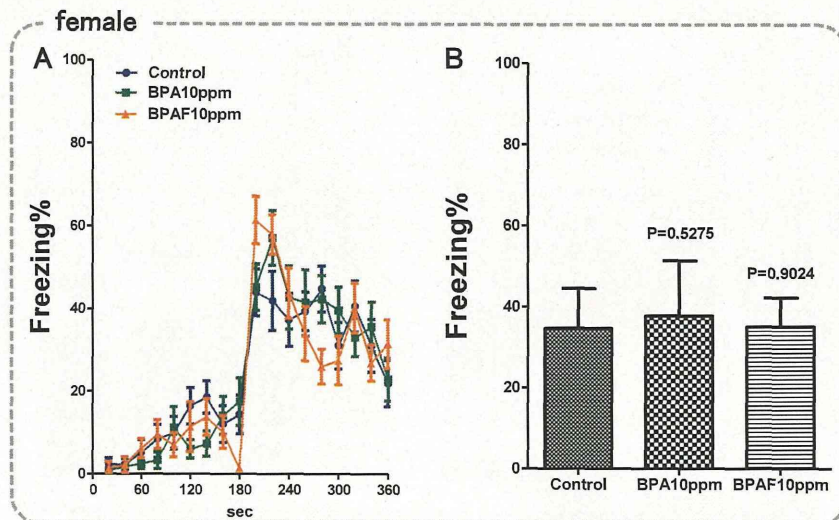
- Male -



27

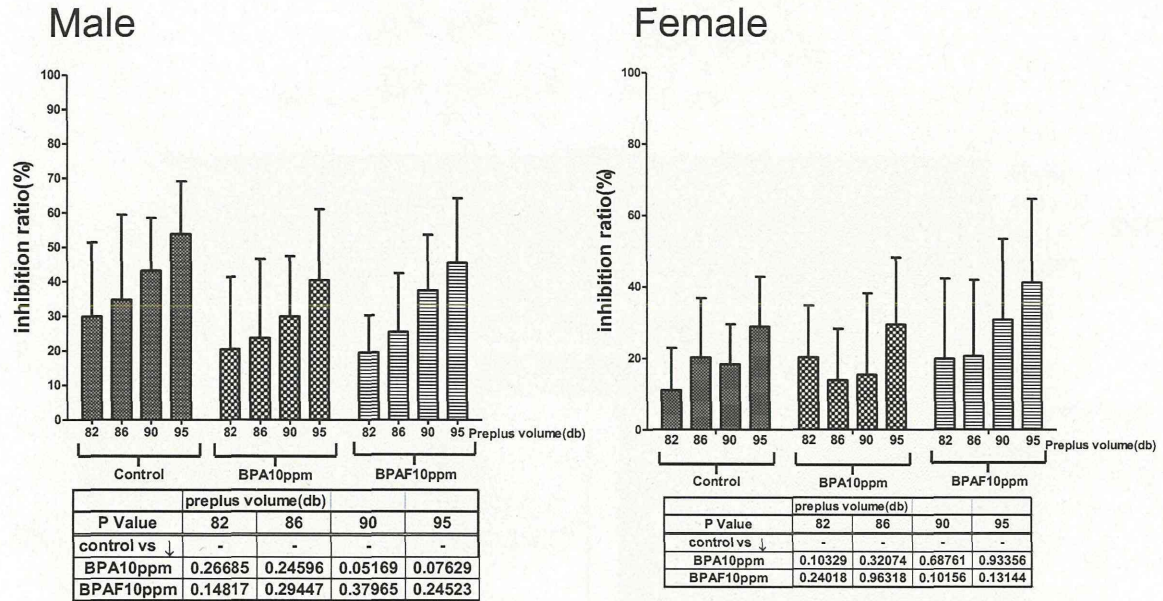
# Fear conditioning test: Cued

- Female -



28

## Prepulse inhibition test



29

## BPA曝露によるDNAメチル化変化の解析

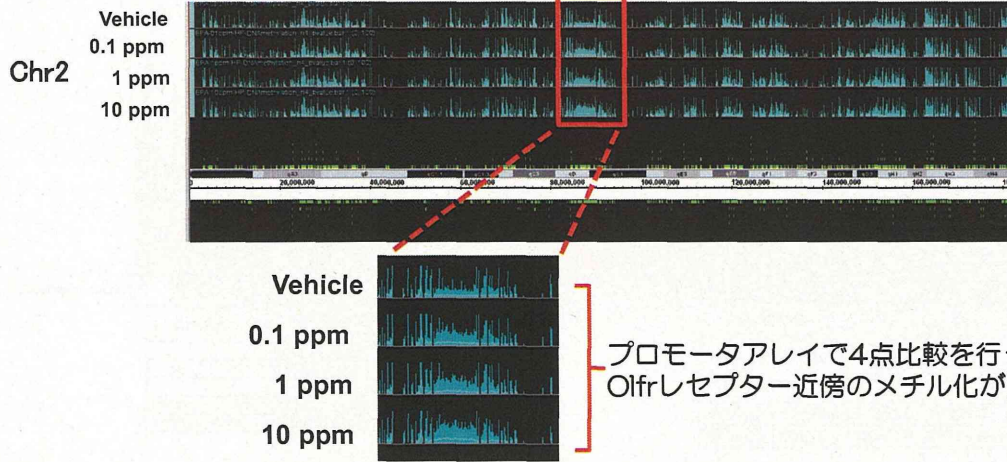
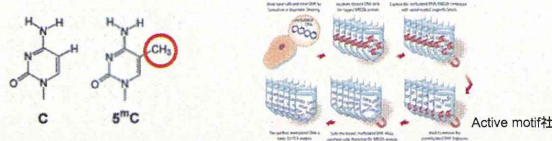
### <実験条件>

- BPA曝露: 0, 0.1, 1, 10ppm (飲水)
- 曝露期間: 交配前から離乳まで
- サンプル採取時期: 雄成体
- 採取部位: 海馬
- n数: 4
- 解析方法: **MeDIP-Chip法**  
(MBD2-IP and promoter array)
- データ解析: TAS (Tiling array analysis software), Bandwidth: 250, control: Genomeで計算し、各群のデータとする。  
合わせて、controlを0ppmにした計算も行い、0.1, 1, 10ppmでの変化領域同定に用いる。

30



- MBD2蛋白を用いたメチル化DNA断片の濃縮 -



OlfR

