

201428004B

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

H24 - 化学 - 一般 - 004

「ヒトへの外挿を目指したナノマテリアルの健康影響評価手法の開発」
に関する研究

平成 24 年度～26 年度 総合研究報告書

研究代表者 武田 健

平成 27 年 5 月

目次

I. 総合研究報告	
研究成果の概要	1
別紙1 - 論文発表、学会発表、招待講演	4
別紙2 - 書籍	11
II. 研究成果の刊行物・別刷	12

「ヒトへの外挿を目指したナノマテリアルの健康影響評価手法の開発」に関する研究
(H24-化学一般-004)

研究代表者 武田 健 東京理科大学 総合研究機構 教授

研究要旨

本プロジェクトではげっ歯類ならびに霊長類モデルを用いて、ナノマテリアルの妊娠期曝露による次世代の免疫系、中枢神経系、雄性生殖系に生じる影響の詳細を検証した。これにより、ナノマテリアル(低用量曝露を含む)の次世代影響に焦点を当てたリスク評価法を確立することを目指した。具体的には、①低用量のナノマテリアルによる次世代雄性生殖系への影響評価、②ナノマテリアルの妊娠期曝露による次世代免疫系・中枢神経系への影響評価指標探索、③ナノマテリアルによる霊長類リンパ節・中枢神経系への影響評価指標探索を目的として研究を進めた。最終年度に二年度目までの結果を総括しながら、In vivo だけでなく ex vivo のナノマテリアル健康影響評価系の構築を目指した。

研究分担者

グループ 1

梅澤雅和 東京理科大学 講師
新海雄介 東京理科大学 研究員
立花 研 日本薬科大学 講師
菅又昌雄 栃木臨床病理研究所 所長
井原智美 栃木臨床病理研究所 部長
グループ 2
光永総子 NPO プライマイトアコラ 部長

A. 研究目的

本研究課題は、ナノマテリアルの健康影響について特に、1) 低用量曝露による次世代雄性生殖系への影響、2) 次世代の免疫系・中枢神経系への影響、3) 霊長類免疫系・中枢神経系に対する影響を明らかにしようとしたものである。1) では妊娠期におけるナノマテリアルの低用量曝露が次世代に及ぼす影響について、次世代の雄性生殖系機能をマーカーとしたげっ歯類の影響評価系の確立を目指した。2) 3) を通じて、ナノマテリアルが免疫系に及ぼす影響について、ヒトに外挿できる霊長類及びげっ歯類の評価系を確立することを目指した。

B. 研究方法

げっ歯類:

妊娠マウス(ICR系、C57BL/6系)にナノマテリアルを投与した。材料は、生産量が多く汎用されているもののうち、カーボンブラックおよび酸化チタンを用いた。とくに酸化チタンは、アルミナコーティングにより表面性状の異なるものの影響を比較検討した。酸化チタンナノ粒子は懸濁液を皮下、炭素(カーボンブラック)ナノ粒子は懸濁液を気道(点鼻)に投与した。なお、懸濁液中でのナノ粒子の存在状態は透過及び走査型電子顕微鏡、ならびに動的分散法(DLS)により解析した。その結果、とくに低濃度(低用量

投与)のナノ粒子懸濁液については、マテリアルが二次粒子径も100nm未満というスケールに収まっていることを確認した。投与したナノ粒子の動態については、とくに胎仔への移行を透過型電子顕微鏡ならびに走査型電子顕微鏡-エネルギー分散型X線スペクトロ測定装置(FE-SEM/EDS)により解析した。

解析対象は、とくに次世代中枢神経系、免疫系、雄性生殖系とした。

霊長類:

胎仔の脳・神経系への影響: 妊娠アカゲザルに、ナノマテリアルとしてディーゼル排気ナノ粒子(DEP)、非金属ナノ粒子(カーボンブラック: CB)および金属ナノ粒子(酸化チタン: TiO₂)を、7~10日間隔で投与し、経胎盤的に胎仔に達したナノマテリアルの脳・神経系への影響を解析した。胎仔脳での遺伝子発現変動を網羅的に解析すると共に、生化学・免疫組織化学的解析も加え、脳神経機能への影響を評価した。

免疫系への影響: アカゲザル新生仔及び成獣に対して、背部皮内に各種ナノマテリアルを7~10日間隔で投与し、投与部位、リンパ節、主要組織での遺伝子発現変動を網羅的に解析した。併せて組織化学的観察も実施し、免疫機能への影響を検討した。また、投与3年後の解析・観察を行い長期影響についても検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験に伴う倫理・福祉については、機関の動物委員会の承認を得た上で行った。

C. 研究結果

ナノマテリアルの妊娠期曝露が次世代中枢神経系に及ぼす影響は、出生後個体の脳のPAS-GFAP(IHC) 二重染色により、最も鋭敏かつ定量的に検出できることが見出された。また、大脳皮質

前頭野の GFAP や AQP4 のタンパク質発現定量解析により、発達毒性検出の定量性が確認できた。また、ナノマテリアルの妊娠期経気道投与により次世代中枢神経系に及ぶ影響を、遺伝子発現を制御するDNAメチル化プロファイルから検証した。その結果、Pcdh9などの複数の遺伝子を標的として、プロモーター領域のDNA脱メチル化に伴う遺伝子発現亢進が認められた。ナノマテリアルの妊娠期曝露が次世代免疫系・ならびに次世代雄性生殖系に及ぼす影響についても、それぞれ胸腺リンパ球新生に関わる遺伝子群の発現定量解析、ならびに精子産生量により各々定量的に、低濃度ナノマテリアルによる影響を検出できることを見出し報告した。新たなリスク・コミュニケーション手法も見出し、web上に公開した。

さらに、サル類とげっ歯類との比較発現解析から、リンパ節/免疫系ならびに中枢神経系への影響の分子機序を検討した。さらに、霊長類(ヒトを含む)でのex vivoあるいはsemi-in vitroでのナノマテリアル影響評価系についても予備検討した。その結果、ナノマテリアル投与が免疫系において2型マクロファージ(M2マクロファージ)のマーカー遺伝子であるキチナーゼ(Chitinase 1, CHIT1) あるいはCCL18(霊長類特異的ケモカイン)の遺伝子発現亢進が確認された。それらの遺伝子発現亢進は少なくとも3年間継続していた。また、サル・ラット双方において、ナノマテリアルがDendritic cell /MacrophageのT-cell活性化制御因子であるDC-Hil/GPNMBを顕著に発現亢進することを新たに見出した。ナノマテリアルがT-Cellレベルの免疫応答にも影響することが明らかになった。

前述のげっ歯類のデータを踏まえ、ナノマテリアル投与がリンパ節だけでなく中枢神経系(大脳皮質前頭野、小脳、海馬)に及ぼす影響を遺伝子発現変動プロファイリングにより検証した。その結果、胎仔期にナノマテリアルに曝露された新生仔の中枢神経系において複数のナノマテリアル・複数の脳領域に共通する変動パスウェイとして、ヘモグロビン代謝経路が見出された。

さらに、上記霊長類免疫系で得られたデータに基づき、ヒト細胞株を用いたナノマテリアルの影響評価系の確立を目指している。免疫系に及ぶ影響評価については、単球ならびにリンパ球の単培養では in vivoで認められるCHIT1 あるいはCCL18の発現変動が生じなかった。これはM2マクロファージ分化誘導について調べるためには、食食能をある程度高めたマクロファージを用いて実験する必要性を示唆している。

生体では、食食能を持つDendritic cell等マクロファージ系細胞がナノマテリアルを取り込み、多種類の細胞が相互作用しながら応答していると考えられる。ナノマテリアルの免疫系への影響

を検討する際には、in vivoの状態を部分的にでも模倣するモデル系を作製する必要がある。そのため、サイトカイン或いはフォルボールエステルのような化学物質で刺激した単球系細胞を用いたナノマテリアル影響評価系の検討しているが、課題が残った。

D. 考察

次世代雄性生殖系への影響についての結果は、投与時期(出生前=妊娠期/出生後)により銀ナノ粒子の影響する細胞種が異なる可能性を示唆している。また、銀ナノ粒子の毒性発現(とくに発達毒性)は二次粒子径に依存しなかった。ナノマテリアルの体内動態は、凝集状態が変わり二次粒子径が異なれば体内動態が異なるが、少なくとも溶解性のあるナノマテリアルについては、毒性発現プロファイルに対する体内動態の寄与がそれほど大きくない可能性がある。ナノマテリアルの毒性を考える上で、細胞への取り込みを介した直接的な細胞毒性以外によらない間接的なメカニズムの考慮が、ナノマテリアルの曝露によるヒト健康影響評価において重要であると考えられる。次世代免疫系・中枢神経系への影響についての結果は、ナノマテリアルの妊娠前期により次世代免疫系に生じる影響は、一般急性毒性の認められる用量に限られることから、ヒト健康影響防止を考える上で考慮に入れなくていいものと考えられる。ただし、ナノマテリアル曝露により次世代に生じ得る健康影響は、妊娠中の曝露時期により大きく異なる可能性があることには注意が必要である。

ナノマテリアル経気道投与により次世代中枢神経系に生じる影響については、前述のとおり感受性高くかつ定量性のある影響評価指標の存在を明らかにすることができた。また、脳に生じる遺伝子発現変動が、げっ歯類と霊長類との間で保存性の高いプロモーター領域のDNAメチル化変動により制御されることが明らかになり、げっ歯類を用いた試験系によりヒトへの外挿性も高く評価できる健康影響評価系と言える。

本研究の大きな特色は、ヒトに外挿可能なリスク評価系を確立するために、霊長類モデルを活用した点である。実験(3)では、ナノマテリアル投与により免疫系でM2マクロファージマーカー遺伝子発現が亢進することが示された。更に、投与から3年を経てもなおナノマテリアルがリンパ節に蓄積したままであり、これらの遺伝子発現が継続的に亢進しているが明らかとなった。M2マクロファージはアレルギー応答に関与していることが知られている。このため、ナノマテリアルに曝露されたヒトが、長期的にアレルギー疾患発症或いは増悪のリスクを負う危険性が示唆された。リンパ節において変動した遺伝子は、霊長類特異的であるものが多かったが、中枢神経系においてはげっ歯類と共通する点が見出される傾向がある。霊長類の妊娠期ナノマテリアル曝露による産仔中枢神経系におけるヘモグロビン遺伝子発現亢進は、胎仔脳が酸化ストレス或いは低酸素状態に反応していることを示すものである。ヘモグロビン亢進は細胞障害を起こすことが知られているため、ナノマテリアルによる胎仔中枢神経系発達障害、高次脳機能障害の危険性を示唆している。

霊長類胎盤透過性はげっ歯類のそれよりも高く、母子間の物質交換は密であり、妊娠期間も長い。よって霊長類におけるナノマテリアル暴露影響はより重篤であることも推察されるが、げっ歯類モデルにおいても胎仔期ナノマテリアル暴露による中枢神経系のアポトーシスが報告されている。これらのことから、霊長類モデル及びげっ歯類モデルのそれぞれの特長を踏まえ、双方よりヒトへの外挿性を検討することが重要である。中枢神経系への着目は、本プロジェクトの後半からであったためトランスクリプトームデータを検証し切れていないが、このデータの検証を完了させることにより、マウスとサルにおいて妊娠期ナノマテリアル投与により変動した遺伝子群の相同性を検証することにより、げっ歯類の脳のデータのヒト外挿性についての結論が得られると期待している。

E. 結論

本研究により、ナノマテリアルの次世代影響（発達毒性）について中枢神経系、免疫系、雄性生殖系を対象に、**鋭敏かつ定量的な影響評価指標とその検出方法**を見出した。ヒト細胞株を用いた実験では、in vivo（サル）で認められるナノマテリアル曝露の影響が検出できなかった。免疫系影響評価のためには**食食能を高めたマクロファージ系細胞を用いた評価系の有用性**が示唆された。

一方で、発達精巣毒性をはじめとするナノマテリアルの次世代影響は、細胞への取り込みを介した直接的な細胞毒性以外によらない間接的なメカニズムが大きいようである。次には例えば、ナノマテリアルにより生じるタンパク質の高次構造変化と、それに起因する間接的生体影響評価系の構築を指向した研究などが、培養細胞系もしくはcell-free systemでのナノマテリアル健康影響評価系の構築に力を発揮するであろうと期待される。

本プロジェクトの成果を考慮に入れた、ナノマテリアルのヒト健康影響評価（胎児や新生児という高感受性集団への影響評価を含む）法は、国民の健康・安全を守ることとナノテクノロジー産業の健全な発展との両立に貢献できると期待している。

F. 研究発表（別紙1参照）

1. 論文発表
2. 学会発表

G. 知的財産権の出願・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

F. 研究発表 (2012~2014 年度)

1. 論文発表

1. Tachibana K, Takayanagi K, Akimoto A, Ueda K, Shinkai Y, Umezawa M, Takeda K. (2015) Prenatal diesel exhaust exposure disrupts the DNA methylation profile in the brain of mouse offspring. *J, Toxicol, Sci.* 40(1)1 – 11. (査読有)
2. El-Sayed YS, Shimizu R, Onoda A, Takeda K, Umezawa M. (2015) Carbon black nanoparticle exposure during middle and late fetal development induces immune activation in male offspring mice. *Toxicology.* 327.53 – 61. (査読有)
3. 梅澤雅和、武田健、(2014) トキシコロジーからナノ規制ガバナンスへの提言 - 予防原則の最適化、日本リスク研究学会年次大会講演論文集、27巻A-2-5頁 (査読有)
4. Shimizu R, Umezawa M, Okamoto S, Onoda A, Uchiyama M, Tachibana K, Watanabe S, Ogawa S, Abe R, Takeda K. (2014) Effect of maternal exposure to carbon black nanoparticle during early gestation on the splenic phenotype of neonatal mouse. *J, Toxicol, Sci.* 39(4) 571-578. (査読有)
5. Kojima S, Negishi Y, Tsukimoto M, Takenouchi T, Kitani H, Takeda K. (2014) Purinergic signaling via P2X7 receptor mediates IL-1 β production in Kupffer cells exposed to silica nanoparticle. *Toxicology.* 321,13-20. (査読有)
6. Nagakura C, Negishi Y, Tsukimoto M, Itou S, Kondo T, Takeda K, Kojima S. (2014) Involvement of P2Y11 receptor in silica nanoparticles 30-induced IL-6 production by human keratinocytes. *Toxicology.* 322, 61-68. (査読有)
7. 梅澤雅和、大気中の小さな粒子 (PM2.5) による健康影響を防ぐために、日本幼少児健康教育学会第32回大会 (春季：千葉大会) 発表抄録集, 14-15, 2014 (査読無)
8. 梅澤雅和、難波美帆、石村源生、リスクコミュニケーション手法の改善の取り組みと教育プロセス、日本幼少児健康教育学会第32回大会 (春季：千葉大会) 発表抄録集, 72-73, 2014 (査読有)
9. Onoda A, Umezawa M, Takeda K, Ihara T, Sugamata M. (2014) Effects of maternal exposure to ultrafine carbon black on brain perivascular macrophages and surrounding astrocytes in offspring mice. *PLoS One*, 9(4): e94336 (査読有)
10. Kubo-Irie, M., Uchida, H., Mastuzawa, S., Yoshida, Y., Shinkai, Y., Suzuki, K., Yokota, S., Oshio, S., Takeda, K. (2014) Dose-dependent biodistribution of prenatal exposure to rutile-type titanium dioxide nanoparticles on mouse testis. *J. Nanoparticle Res.* 16 : 2284
11. Suzuki, K., Adigüzel, D., Shinotsuka, T., Ishibashi, R., Eguchi, I., Oshima, H., Taniguchi, R., Thalhammer, S., Takeda, K. (2014) Tunable plasma lipoprotein uptake/transport across the blood-brain barrier. *Colloids and Surfaces A.* 442:157-163
12. Umezawa M, Sekita K, Suzuki K, Kubo-Irie M, Niki R, Ihara T, Sugamata M, takeda K. (2013) Effect of aerosol particles generated by ultrasonic humidifiers on the lung in mouse. *Part Fibre Toxicol* 10: 64
13. Yokota, S., Hori, H., Umezawa, M, Kubota, N., Niki, R., Yanagita, S., Takeda, K. (2013) Gene expression changes in the olfactory bulb of mice induced by exposure to diesel exhaust are dependent on animal rearing environment. *PLOS ONE.* 8(8):e70145.
14. Okada .Y, Tachibana, K, Yanagita, S, Takeda, K. (2013) Prenatal exposure to zinc oxide particles alters monoaminergic neurotransmitter levels in the brain of mouse offspring. *Journal of Toxicological Sciences*, 38(3):363-370.

15. 梅澤雅和 (2013) ナノ粒子の健康リスク (2) 私たちはいかにリスクを回避できるのか 市民研通信 (市民科学研究室・上田昌文ら編)、第17号=通巻145号
16. 梅澤雅和 (2013) 薬学・情報学・社会学をつないで切り拓く次世代健康科学、東京理科大学 科学フォーラム2013(6)14-17
17. 立花研 (2013) 小さなRNAから環境化学物質と次世代の健康を考える、東京理科大学 科学フォーラム2013(6)18-21
18. 梅澤雅和、武田 健 (2013) PM2.5の健康影響について 私たちが注意したいこと (科学2013年4月号) 岩波書店、Vol.83.NO.4. 424-427.
19. Yokota S, Moriya N, Iwata M, Umezawa M, Oshio S, Takeda K. (2013) Exposure to diesel exhaust during fetal period affects behavior and neurotransmitters in male offspring mice. Journal of Toxicological Sciences, 38(1): 13-23.
20. Umezawa M, Tainaka H, Kawashima N, Shimizu M, Takeda K. (2012) Effect of fetal exposure to titanium dioxide nanoparticle on brain development – Brain region information. Journal of Toxicological Sciences, 37(6): 1247-1252.
21. 梅澤雅和、難波美帆、武田 健 (2012) ナノ粒子の次世代健康影響ーリスクコミュニケーション課題の事例として、日本科学教育学会年会論文集 36: 221-222.
22. 難波美帆、梅澤雅和、石村源生 (2012) 情報提供者の懸念に応える「リスクコミュニケーション・パターン集」の開発、日本リスク研究学会年次大会講演論文集 25: 175-178.
23. 梅澤雅和、難波美帆、石村源生、武田 健 (2012) ナノ材料のリスクの情報提供に際する問題と対処法の抽出、日本リスク研究学会年次大会講演論文集 25: 257-259.
24. 武田 健 (2012) 母子伝達されるナノ粒子：次世代健康影響を考える (科学2012年10月号)、岩波書店、1093-1098.
25. 梅澤雅和 (2012) ナノ材料による次世代健康影響とリスク管理への課題 (科学2012年10月号)、岩波書店、1098-1103.

2. 学会発表

1. 中村仁幸、El-Ghoneimy Ashraf A、新海雄介、Shaheen Hazem ME、小野田淳人、武田健、梅澤雅和、N-3系多価不飽和脂肪酸欠乏食を摂取したマウスに対するディーゼル排ガス曝露の影響、日本薬学会第135年会、神戸、2015年3月26日～3月28日
2. 福田紗希、田畑真佐子、萩原伸、吉川洋一郎、二木力夫、武田健、梅澤雅和、銀ナノ粒子経口曝露による高脂肪食摂取マウス肝臓への影響、日本薬学会第135年会、神戸、2015年3月26日～3月28日
3. 梅澤雅和、El-Sayed Yasser S、小野田淳人、清水隆平、武田健、妊娠中期及び後期におけるカーボンブラックナノ粒子の経気道曝露が次世代免疫系に及ぼす影響、日本薬学会第135年会、神戸、2015年3月26日～3月28日
4. 小野田淳人、Shaheen Hazem ME、中村仁幸、新海雄介、El-Ghoneimy Ashraf A、武田健、梅澤雅和、ディーゼル排ガスの低用量曝露が呼吸器系の酸化ストレス応答とセラミド代謝に及ぼす影響、日本薬学会第135年会、神戸、2015年3月26日～3月28日
5. Sugamata M, Ihara T, Umezawa M, Takeda K. Maternal exposure to diesel exhaust nanoparticles enhances the risk of Alzheimer's disease by promote beta-amyloid fibrillation in offspring. 12th International

Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases. 12th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases. Nice, France. 2015年3月18日～3月22日

6. 吉川洋一郎、入江美代子、萩原伸、福田紗希、武田健、梅澤雅和、胎児期及び思春期の銀ナノ粒子投与によるマウス雄性生殖器への影響、第17回環境ホルモン学会研究発表会、東京、2014年12月9日～12月10日
7. Yanagita S, Kubota N, Takano Y, Matsuzawa T, Ishiwata T, Takeda K. Monoamine precursor injections influence individual difference of spontaneous physical activity in rats. Society for Neuroscience, 44th Annual Meeting. Washington DC (USA). 2014年11月15日～11月19日
8. Takano Y, Yanagita S, Kubota N, Matsuzawa T, Takeda K. Effects of prenatal music on the emotional behavior and neuronal activity in offspring. Society for Neuroscience, 44th Annual Meeting. Washington DC (USA). 2014年11月15日～11月19日
9. Umezawa M, Onoda A, Shimizu R, Okamoto S, Yoshida A, Takeda K. Effect of maternal exposure to carbon black nanoparticle on the thymus and spleen of neonatal mouse. PPTOXIV – the 4th International Conference on Fetal Programming and Developmental Toxicity, Endocrine Society. Boston. 2014年10月28日～10月31日
10. Kawazoe S, Tachibana K, Takeda K, Umezawa M. Effects of prenatal exposure to titanium dioxide nanoparticle on DNA methylation and gene expression profile in the brain of mouse. PPTOXIV – the 4th International Conference on Fetal Programming and Developmental Toxicity, Endocrine Society. Boston. 2014年10月28日～10月31日
11. 梅澤雅和、立花研、岡本沙紀、武田健、幼児期マウスの脾臓mRNAならびにmiRNA発現プロファイルに認められる性差の機能的特徴、第87回日本生化学会大会、京都、2014年10月15日～10月18日
12. 小番美鈴、立花研、川副翔太郎、上田剛司、新海雄介、梅澤雅和、武田健、二酸化チタンナノ粒子の胎仔期曝露により神経幹細胞に生じる遺伝子発現変動、フォーラム2014 衛生薬学・環境トキシコロジー、つくば、2014年9月19日～9月20日
13. 中村仁幸、堀寛、田畑真佐子、久保田夏子、武田健、梅澤雅和、カーボンブラックナノ粒子曝露がN-3系多価不飽和脂肪酸欠乏食を摂取したマウスに及ぼす影響、フォーラム2014 衛生薬学・環境トキシコロジー、つくば、2014年9月19日～9月20日
14. 吉田英美果、小野田淳人、吉川洋一郎、武田健、梅澤雅和、妊娠期カーボンブラックナノ粒子曝露による母体の肺と出生仔脾臓への影響、第21回日本免疫毒性学会学術年会、徳島、2014年9月11日～9月12日
15. 中村仁幸、堀寛、二木力夫、武田健、梅澤雅和、n-3系多価不飽和脂肪酸欠乏食を摂取したマウスに対するナノ粒子曝露の影響、第41回日本毒性学会学術年会、神戸、2014年7月2日～7月4日
16. 梅澤雅和、菅又昌雄、武田健、微小粒子の次世代影響とヒト健康影響評価への課題、第41回日本毒性学会学術年会、神戸、2014年7月2日～7月4日
17. 梅澤雅和、横田理、森家望、岩田麻里、押尾茂、武田健、胎仔期ディーゼル排ガス曝露が次世代マウスの行動及び神経伝達物質に及ぼす影響、第41回日本毒性学会学術年会、神戸、2014年7月2日～7月4日
18. 小野田淳人、梅澤雅和、井原智美、菅又昌雄、武田健、ナノ粒子の胎仔期曝露が出生仔の脳血管周辺細胞へ及ぼす影響、第41回日本毒性学会学術年会、神戸、2014年7月2日～7月4日
19. El-Said YS, Umezawa M, Shimizu R, Onoda A, Takeda K. Carbon black nanoparticle exposure during middle and late fetal development induces immune activation in male offspring mice. The 7th International Conference on Nanotoxicology, Nanotoxicology 2014. Antalya, Apr 23-26.2014

20. Umezawa M, Ishinabe T, Okamoto S, Shimizu R, Onoda A, Takeda K. Effects of prenatal exposure to carbon black and titanium dioxide nanoparticle on thymic and splenic phenotypes of neonatal mouse. The 7th International Conference on Nanotoxicology, Nanotoxicology 2014. Antalya, Apr 23-26.2014
21. Onoda A, Umezawa M, Ihara T, Sugamata M, Takeda K. Effects of maternal exposure to carbon black and titanium dioxide nanoparticle on perivascular macrophages and surrounding astrocytes in the brain of offspring mouse. The 7th International Conference on Nanotoxicology, Nanotoxicology 2014. Antalya, Apr 23-26.2014
22. 小野田淳人、梅澤雅和、武田健、井原智美、菅又昌雄、炭素ナノ粒子の胎仔期曝露が脳血管周囲マクロファージ及びアストロサイトに及ぼす影響、日本薬学会第134年会、熊本、2014年3月27日～30日
23. 立花研、高柳皓平、秋本純芽、上田剛司、新海雄介、梅澤雅和、武田健、ディーゼル排ガス胎仔期曝露により脳に生じるDNAメチル化異常の解析、日本薬学会第134年会、熊本、2014年3月27日～30日
24. 梅澤雅和、岡本沙紀、小野田淳人、清水隆平、小川修平、渡辺志帆、安部良、武田健、カーボンブラックナノ粒子が次世代免疫系に及ぼす影響の投与時期による違い、日本薬学会第134年会、熊本、2014年3月27日～30日
25. Umezawa M, Shimizu M, Tainaka H, Takeda K. Maternal exposure to titanium dioxide nanoparticle affects gene expression in the brain development 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (NanOEH) (Nagoya, Japan), October29-31,2013
26. Okamoto S, Umezawa M, Shimizu R, Onoda A, Uchiyama M, Watanabe S, Ogawa S, Abe R, Takeda K. Effect of treatment of pregnant mice with carbon black nanoparticle on the neonatal immune system. 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (NanOEH) (Nagoya, Japan), October29-31,2013
27. Onoda A, Umezawa M, Takeda K, Ihara T, Sugamata M. Maternal exposure to carbon black nanoparticle affects perivascular cells in the brain of offspring. 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (NanOEH) (Nagoya, Japan), October29-31,2013
28. Tachibana K, Kojima T, Kuroiwa N, Yuasa T, Umezawa M, Takeda K. Effect of prenatal exposure to titanium dioxide nanoparticle on miRNA expression in mouse embryo 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (NanOEH), Session “Health effects and toxicity - in vivo” (Nagoya, Japan), October29-31,2013
29. 梅澤雅和、ナノ材料の次世代健康影響－疾病予防を目指した研究と取り組み、知の市場、ナノ材料総合管理、東京、2013年10月24日
30. Sugamata M, Ihara T, Sugamata M, Ying Ji Li, Yamamoto M, Takeda K. Nrf2 Lowers Risk for Neurodegenerative Diseases Caused by Oxidative Stresses Induced by Diesel Exhaust. American Neurological Association. New Orleans, October13-15,2013
31. 梅澤雅和、鈴木智晴、押尾茂、武田健、ディーゼル排ガスの妊娠期曝露が次世代マウスの自発運動量及びドーパミン系神経伝達に及ぼす影響、第54回大気環境学会年会、新潟、2013年9月18～20日
32. 梅澤雅和、岡本沙紀、清水隆平、武田健、カーボンブラックナノ粒子の妊娠期曝露が次世代リンパ組織に及ぼす影響、フォーラム2013衛生薬学・環境トキシコロジー、福岡、2013年9月13日～14日
33. 上田剛司、立花研、高柳皓平、秋本純芽、新海雄介、武田健、ディーゼル排ガス胎仔期曝露によるDNAメチル化状態の網羅的解析、フォーラム2013衛生薬学・環境トキシコロジー、福岡、2013年9月13日～14日

34. 曾我勇介、新海雄介、荒船亮、入江美代子、武田健、妊娠マウスへの銀ナノ粒子経口投与が産仔精子形態に及ぼす影響、フォーラム2013衛生薬学・環境トキシコロジー、福岡、2013年9月13日～14日
35. Umezawa M, Shimizu M, Tainaka H, Takeda K. Estimation of brain regions targeted by nanoparticle based on transcriptomics data. FENS Featured Regional Meeting, Prague, Czech Republic (2013年9月11日～14日)
36. Yoshida A, Yoshikawa Y, Umezawa M, Suzuki K, Takeda K. GLI2-activation by apolipoprotein B regulates gliogenesis in the postnatal cerebral cortex. FENS Featured Regional Meeting, Prague, Czech Republic (2013年9月11日～14日)
37. Yoshikawa Y, Yoshida A, Umezawa M, Suzuki K, Takeda K. Methodological development of isolation and culture of protoplasmic astrocytes. FENS Featured Regional Meeting, Prague, Czech Republic (2013年9月11日～14日)
38. Yanagita S, Kubota N, Ochiai H, Takano Y, Takeda K. Differential regulation between spontaneous wheel running and locomotor activity on brain monoamine levels in rats. 45th meeting of the European Brain and Behaviour Society Meeting, Munich, Germany. September 7-9, 2013.
39. Taniguchi R, Suzuki K, Yoshida A, Yoshikawa Y, Umezawa M, Takeda K. Novel fabrication method of biocompatible nanoparticles for theranostic applications. 27th Conference of ECIS (European Colloid and Interface Society), Sofia, Bulgaria (2013年9月1日～6日)
40. 湯浅珠恵、立花研、小島稔郁、武田健、妊娠期の酸化チタンナノ粒子曝露による羊水中マイクロRNA 発現変動の解析、第5回日本RNAi研究会、広島、2013年8月29日～31日
41. 小島稔郁、立花研、黒岩法子、新海雄介、武田健、妊娠期の酸化チタンナノ粒子曝露による胎盤のマイクロ RNA 発現量の変動の解析、第5回日本RNAi研究会、広島、2013年8月29日～31日
42. 落合紘子、柳田信也、久保田夏子、高野由莉香、武田健、ディーゼル排ガス胎仔期曝露が大脳皮質発達過程に影響を及ぼす。Neuro2013(第36回日本神経科学大会、第56回日本神経化学会大会、第23回日本神経回路学会大会、合同大会)、京都、2013年6月20日～23日
43. Umezawa M, Shimizu R, Okamoto S, Takeda K. Effect of prenatal exposure to carbon black nanoparticle on gene expression in the thymus of offspring mouse during neonatal period. 10th International Particle Toxicology Conference (IPTC2013), Düsseldorf, Germany (2013年6月4日～7日)
44. Tachibana K, Kawazoe S, Umezawa M, Takeda K. Effect of prenatal exposure to titanium dioxide nanoparticle on the gene expression in the brain of mouse offspring. 10th International Particle Toxicology Conference (IPTC2013), Düsseldorf, Germany (2013年6月4日～7日)
45. 吉川洋一郎、鈴木健一郎、武田健、リン脂質被覆ナノ粒子表面に結合する血漿中タンパク質の同定、第73回分析化学討論会、函館、2013年5月18～19日
46. 梅澤雅和、難波美帆、石村源生、武田健、現代のリスクに対処するためのリスクコミュニケーション、日本薬学会第133年会、横浜、2013年3月28～31日
47. 清水隆平、梅澤雅和、岡本沙紀、小野田淳人、二木力夫、小川修平、渡辺志帆、安部良、武田健、カーボンブラックナノ粒子の胎仔期曝露が新生児期の免疫系に及ぼす影響、日本薬学会第133年会、横浜、2013年3月28～31日
48. 梅澤雅和、ナノ粒子の健康リスク 私たちはいかにリスクを回避できるのか、市民科学研究室、特別シンポジウム「ナノ粒子の健康リスク ～母子伝達と次世代影響、リスク管理を軸に～」東京、2013年2月23日
49. Irie, M. Kosuge, K. Shida, K. Kubo-Irie, M. Takeda, K. Monitoring technique for the acute effect of TiO₂ nanoparticles from the behaviour of rice fish orizias latipes in vivo. NANOSAFE MINATEC Grenoble.

November 13-15,2012.

50. 梅澤雅和、難波美帆、石村源生、武田健、ナノ材料のリスクの情報提供に際する問題の対処法の抽出、第25回日本リスク研究学会年次大会、彦根、2012年11月9～11日
51. 関田啓佑、梅澤雅和、鈴木健一郎、武田健、超音波式加湿器から放出される微粒子のキャラクターリゼーション、フォーラム2012 衛生薬学・環境トキシコロジー、名古屋、2012年10月25～26日
52. 小野田淳人、梅澤雅和、二木力夫、武田健、井原智美、菅又昌雄、炭素ナノ粒子の胎仔期曝露が脳血管周囲マクロファージに与える影響、フォーラム2012 衛生薬学・環境トキシコロジー、名古屋、2012年10月25～26日
53. 梅澤雅和、清水隆平、岡本沙紀、渡辺志帆、小川修平、安部良、武田健、カーボンブラックナノ粒子の胎仔期曝露が新生児期の脾臓遺伝子発現に及ぼす影響、第19回日本免疫毒性学会学術大会、東京、2012年9月15～16日
54. 清水隆平、梅澤雅和、岡本沙紀、二木力夫、小川修平、渡辺志帆、安部良、武田健、カーボンブラックナノ粒子の胎仔期曝露が免疫の発達に及ぼす影響、第19回日本免疫毒性学会学術大会、東京、2012年9月15～16日
55. Umezawa, M., Suzuki, K. Kubo-Irie, M. Shimizu, M. Oyabu, T. Tainaka, H. Yanagita, S. Takeda, K. Effect of titanium dioxide nanoparticle transferred from pregnant mice to their offspring on urinary and cranial nerve systems. The 6th International Conference on Nanotoxicology (Nanotoxicology 2012) Beijing, China. September 4-7,2012.
56. Tachibana, K., Takahashi, Y. Kuroiwa, N. Oba, T. Umezawa, M., Takeda, K. Effects of prenatal exposure to titanium dioxide nanoparticles on dopaminergic systems in mice. The 6th International Conference on Nanotoxicology (Nanotoxicology 2012) Beijing, China. September 4-7,2012.
57. 小平伊織、立花研、卯月諒、黒岩法子、新海雄介、武田健、血中マイクロRNA をバイオマーカーとする化学物質の新規安全性評価手法開発の試み、第4回日本RNAi研究会、広島、2012年8月30～9月1日
58. 小島稔郁、立花研、黒岩法子、新海雄介、武田健、妊娠期の酸化チタンナノ粒子曝露による胎仔、胎盤のマイクロRNA発現量の変動の解析、第4回日本RNAi研究会、広島、2012年8月30～9月1日
59. 梅澤雅和、難波美帆、武田健、ナノ粒子の次世代健康影響 —リスクコミュニケーション課題の事例として（課題研究“情報提供者の懸念に応えるリスク・コミュニケーションの開発とそのプロセス”）日本科学教育学会第36回年会 東京大会、東京、2012年8月27～29日
60. Umezawa M., Oyabu T, Suzuki K, Kubo-Irie M, Kudo S, Uchiyama M, Niki R, Tachibana K., Takeda K. Effect of prenatal exposure to titanium dioxide nanoparticle on collagen expression in the kidney of offspring. The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology (AsiaTox VI). Sendai, Japan. July 17-20,2012.
61. Umezawa M., Oyabu T, Kudo S, Yanagita S, Niki R, Ihara T, Sugamata M, Takeda K. Effect of prenatal exposure to carbon and titanium dioxide nanoparticle on gene expression in the kidney of offspring. 23rd European Congress on Perinatal Medicine (XXIII ECPM) .Paris, France. Jun13-16,2012.
62. Hori H, Umezawa M., Uchiyama M, Niki R, Yanagita S, Takeda K. Effect of pre-pregnancy diet on hepatic gene expression related to maternal high-fat diet feeding. 23rd European Congress on Perinatal Medicine (XXIII ECPM).Paris, France. Jun13-16,2012.
63. Umezawa M., Tainaka H, Kawashima N, Shimizu M, Takeda K. Effect of fetal exposure to titanium dioxide nanoparticle on brain development -- Brain region information. PPTOXIII (the 3rd International Conference on Prenatal Programming and Toxicology), CCT (Contemporary Concepts in Toxicology) Meeting, SOT (Society of Toxicology) .Paris, France. May14-16,2012.

64. Shimizu R, Umezawa M, Uchiyama M, Okamoto S, Niki R, Ogawa S, Watanabe S, Abe R, Takeda K. Fetal exposure to carbon nanoparticle altered development of the neonatal immune system. PPTOXIII (the 3rd International Conference on Fetal Programming and Developmental Toxicity), CCT (Contemporary Concepts in Toxicology) Meeting, SOT (Society of Toxicology). Paris, France. May14-16,2012.

3. 招待講演

1. 梅澤雅和、武田健、トキシコロジーからナノ規制ガバナンスへの提言 - 予防原則の最適化、第27回日本リスク研究学会年次大会、企画セッションA-2「規制ガバナンスの核心—根拠に基づく意思決定プロセスの事例と潮流」、京都、2014年11月28日～11月29日
2. 梅澤雅和、武田健、井原智美、萱又昌雄、ディーゼル排ガス微粒子及びナノ材料の次世代健康影響、日本学術会議トキシコロジー分科会シンポジウム「PM2.5とナノ粒子—微小粒子の健康影響とその対策を考える—」、2014年9月6日
3. 梅澤雅和、萱又昌雄、武田健、微小粒子の次世代影響とヒト健康影響評価への課題、第41回日本毒性学会学術年会、神戸、2014年7月2日～7月4日
4. 梅澤雅和、ナノ材料の次世代健康影響—疾病予防を目指した研究と取り組み、知の市場、ナノ材料総合管理、東京、2013年10月24日
5. 梅澤雅和、ディーゼル排ガス・大気中の微小な粒子と子どもの健康、大気汚染測定運動東京連絡会 第72回報告集会、東京、2013年10月5日
6. Umezawa M, Takeda K. From toxicology to sociology – effects of nanoparticles on children’s health and the next generation 2nd International Postgraduate Conference on Pharmaceutical Sciences (iPoPS 2013), Session "Pharmaceutical Chemistry" (Universiti Teknologi MARA (UiTM), Puncak Alam, Selangor, Malaysia), September 2013.
7. 梅澤雅和、網羅的遺伝子発現データの機能的解析によるカーボンブラックナノ粒子の次世代免疫系への影響評価、フォーラム2013衛生薬学・環境トキシコロジー、福岡、2013年9月13日～14
8. Umezawa M, Takeda K. From toxicology to sociology -- Effects of nanoparticles on children’s health and the next generation. iPoPS 2013 (2nd International Postgraduate Conference on Pharmaceutical Sciences), Puncak Alam Campus, UiTM, Malaysia (2013年9月4日～5日)
9. 武田健、早稲田大学夏期集中ワークショップ「リスク評価」、平成24年8月11日、早稲田大学「ナノ粒子の次世代健康影響」
10. 武田健、知の市場～アスベストとナノ材料のリスク管理の比較研究、平成24年12月6日、早稲田大学「ナノ材料の次世代健康影響—評価とその対策」
11. 武田健、第51回 市民科学講座 <特別シンポジウム> ナノ粒子の健康リスク ～母子伝達と次世代影響、リスク管理を軸に～、平成25年2月23日、東京「ナノ粒子の健康リスク～母子伝達と次世代影響」
12. Tachibana K, Takayanagi K, Akimoto A, Ueda K, Shinkai Y, Takeda K. Prenatal exposure to diesel exhaust affects central nervous system of offspring in mice. 1st International Postgraduate Conference 2012, Malaysia, Jun. 2012.
13. 梅澤雅和、ナノ粒子の健康リスク 私たちはいかにリスクを回避できるのか、市民科学研究室：特別シンポジウム「ナノ粒子の健康リスク ～母子伝達と次世代影響、リスク管理を軸に～」、東京、2013

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	総頁数
Umezawa M, Onoda A, Takeda K	Chapter 13: Findings Regarding the Hazard Assessment of Nanoparticles and Their Effects on the Next Generation.	Ying-li Li ,Masakazu Umezawa,Hajime Takizawa, Ken Takeda, Tomoyuki Kawada	PM2.5 - Role of Oxidative Stress in Health Effects & Prevention Strategy	Nova Science Pub Inc	NY (USA)	2015	264
Kojima S, Tsukimoto M, Takeda K	Chapter 14: Silica Nanoparticles Induce Production of Inflammatory Cytokines through ATP Signaling via Purine Receptors.	Ying-li Li ,Masakazu Umezawa,Hajime Takizawa, Ken Takeda, Tomoyuki Kawada	PM2.5 - Role of Oxidative Stress in Health Effects & Prevention Strategy	Nova Science Pub Inc	NY (USA)	2015	264
Onoda A, Umezawa M, Takeda K	Chapter 15: The Potential Protective Effect of Antioxidants on Nanoparticle Toxicity	Ying-li Li ,Masakazu Umezawa,Hajime Takizawa, Ken Takeda, Tomoyuki Kawada	PM2.5 - Role of Oxidative Stress in Health Effects & Prevention Strategy	Nova Science Pub Inc	NY (USA)	2015	264
Umezawa M, Namba M	Chapter 17: Fine and Ultrafine Particle Risk Management: Problems to be Solved.	Ying-li Li ,Masakazu Umezawa,Hajime Takizawa, Ken Takeda, Tomoyuki Kawada	PM2.5 - Role of Oxidative Stress in Health Effects & Prevention Strategy	Nova Science Pub Inc	NY (USA)	2015	264

Original Article

Prenatal diesel exhaust exposure disrupts the DNA methylation profile in the brain of mouse offspring

Ken Tachibana^{1,2}, Kohei Takayanagi¹, Ayame Akimoto¹, Kouji Ueda¹, Yusuke Shinkai¹,
Masakazu Umezawa^{1,2} and Ken Takeda^{1,2}

¹Department of Hygienic Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science,
2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510, Japan

²The Center for Environmental Health Science for the Next Generation, Research Institute for Science and
Technology, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510, Japan

(Received September 8, 2014; Accepted November 4, 2014)

ABSTRACT — Prenatal diesel exhaust (DE) exposure is associated with detrimental health effects in offspring. Although previous reports suggest that DE exposure affects the brain of offspring in the developmental period, the molecular events associated with the health effects have largely remained unclear. We hypothesized that the DNA methylation state would be disrupted by prenatal DE exposure. In the present study, the authors examined the genome-wide DNA methylation state of the gene promoter and bioinformatically analyzed the obtained data to identify the molecular events related to disrupted DNA methylation. Pregnant C57BL/6J mice were exposed to DE (DEP; 0.1 mg/m³) in an inhalation chamber on gestational days 0-16. Brains were collected from 1-day-old and 21-day-old offspring. The genome-wide DNA methylation state of the brain genome was analyzed by methylation-specific DNA immunoprecipitation and subsequent promoter tiling array analysis. The genes in which the DNA methylation level was affected by prenatal DE exposure were bioinformatically categorized using Gene Ontology (GO). Differentially methylated DNA regions were detected in all chromosomes in brains collected from both 1-day-old and 21-day-old offspring. Altered DNA methylation was observed independently of the presence of CpG island. Bioinformatic interpretation using GO terms showed that differentially methylated genes with CpG islands in their promoter were commonly enriched in neuronal differentiation and neurogenesis. The results suggest that prenatal DE exposure causes genome-wide disruption of DNA methylation in the brain. Disrupted DNA methylation would disturb neuronal development in the developmental period and may be associated with health and disease in later life.

Key words: Brain, DNA methylation, Diesel exhaust, Prenatal exposure

INTRODUCTION

Epidemiological and experimental studies have shown that exposure to fine ambient particulate matter (PM) is related to respiratory and cardiovascular disorders (Pope *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2008; Ostro *et al.*, 2006). Diesel exhaust (DE) is one of the main types of air pollution and is a major source of fine ambient PM in urban environments (Donaldson *et al.*, 2005). For this reason, DE exposure models have been used to investigate the health effects of ambient PM. Several studies have indicated that DE exposure may affect the central nervous system. For instance, railroad workers exposed to DE have shown neurobehavioral impairment (Kilburn,

2000), and human volunteers exposed to DE have shown altered electrical signals in the frontal cortex (Crüts *et al.*, 2008). Previously, we reported that prenatal DE exposure affects the brain of offspring with regard to neurotransmitter levels and spontaneous locomotor activity (Suzuki *et al.*, 2010). Other studies have shown that prenatal DE exposure induces neuroinflammation and affects behavior in mouse offspring (Bolton *et al.*, 2012; Thirtamara Rajamani *et al.*, 2013). Peters *et al.* (2013) indicated that prenatal DE exposure increases the risk of childhood brain tumors. Although these reports suggest that DE exposure affects the brain of offspring in the developmental period, the molecular event involved in these health effects has largely remained unclear.

Correspondence: Ken Tachibana (E-mail: tachibana@nichiyaku.ac.jp)

DNA methylation is a critical mechanism of epigenetic gene regulation (Deaton and Bird, 2011). In mammals, methylation almost exclusively occurs on the cytosine residue of CpG dinucleotide. CpG islands are GC-rich DNA regions that possess relatively high densities of CpG dinucleotide. They are found in many genes, positioned mainly at the 5' ends. Their methylation state is closely associated with gene transcription activity. DNA methylation results in transcriptional silencing, either by interfering with a transcription factor binding or by inducing heterochromatin structure. DNA methyltransferases, DNMT1, DNMT3a and DNMT3b, are responsible for the methylation of cytosine residue in CpG sites (Bergman and Cedar, 2013). DNMT3a and DNMT3b play crucial roles in *de novo* cytosine methylation, while DNMT1 works by maintaining the DNA methylation pattern in the newly synthesized DNA during cell division. Knockout studies of DNA methyltransferases have shown that DNA methylation is essential for complete embryonic development (Li *et al.*, 1992; Okano *et al.*, 1999).

In the developmental period, the DNA methylation pattern derived from germ cells disappears when the fertilized egg develops into a blastocyst. The *de novo* methylation pattern is then reestablished at around the stage of implantation (Kafri *et al.*, 1992). The global DNA methylation level also changes in the early postnatal stages (Tawa *et al.*, 1990). This dynamic regulation of the DNA methylation state during the developmental period would provide a mechanism for the removal of errors in gene methylation patterns derived from germ lines; thus allowing normal development. These DNA methylation processes during development are associated with long-lasting phenotypic changes, including genomic imprinting, cell differentiation, and X-chromosome inactivation (Roth *et al.*, 2009). Previous studies indicated that dysregulation of DNA methylation contributes to neuronal disorders such as Rett syndrome, fragile X mental retardation and immunodeficiency, centromeric region instability, and facial anomalies syndrome (ICF) (Amir *et al.*, 1999; Sutcliffe *et al.*, 1992; Tucker, 2001). These phenomena led the authors to suspect that prenatal DE exposure disrupts the DNA methylation pattern and subsequently induces neuronal defects in the brain of offspring.

In the present study, we analyzed the effect of prenatal DE exposure on the DNA methylation state in the brain of offspring mice. The methylation state of the promoter DNA region throughout the entire genome was analyzed with a combination of methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP) and promoter tiling array analysis. The differentially methylated genes were then categorized bioinformatically using Gene Ontology (GO)

to identify the molecular events associated with altered DNA methylation induced by prenatal DE exposure. Furthermore, Medical Subject Headings (MeSH) analysis was used to identify the brain regions preferentially affected by DE exposure.

MATERIALS AND METHODS

Animals and exposure

C57BL/6J mice were purchased from SLC (Shizuoka, Japan) and housed under controlled conditions (temperature: $22 \pm 1^\circ\text{C}$, humidity: $50 \pm 5\%$) with a 12 hr light/12 hr dark cycle and *ad libitum* access to food and water. Pregnant mice were exposed to DE in an inhalation chamber for 8 hr per day (10:00-18:00) from gestational day 0-16 (DE exposed-group). Pregnant mice of the control group were housed in a clean air chamber. After delivery, offspring were housed in clean air. All experiments were handled in accordance with the institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals.

Diesel exhaust

A four-cylinder 2,179 cc diesel engine (Isuzu Motors, Tokyo, Japan) was operated at a speed of 1,500 rpm and 80% load with diesel fuel. The exhaust was introduced into a stainless steel dilution tunnel (216.3 mm diameter \times 5250 mm) where the exhaust was mixed with clean air. The mass and number concentrations of DEP were measured by a Piezobalance Dust Monitor (model 3521, Kanomax Japan, Osaka, Japan) and a condensation particle counter (model 3007, TSI Inc., Shoreview, MN, USA), respectively. Concentrations of gas components, (nitric oxide [NO_x], SO_2 , and CO) in the chambers were measured by a NO- NO_2 - NO_x analyzer (model 42i; Thermo Fisher Scientific, Franklin, MA, USA), an Enhanced Trace Level SO_2 Analyzer (model 43i-TLE; Thermo Fisher Scientific), and a CO Analyzer (model 48i; Thermo Fisher Scientific), respectively.

DNA extraction

Brain tissues were removed from 1d and 21d offspring of each dam (1d: 6 dams/group, 21d: 5 dams/group). The whole brain tissues obtained were homogenized in extraction buffer (10 mM Tris-HCl [pH8.0], 0.1 M EDTA, 0.5% SDS, 0.3 mg/mL Proteinase K) and incubated at 55°C overnight. After RNase A treatment, genomic DNA was extracted by phenol/chloroform extraction, followed by ethanol precipitation. Extracted DNA of 1 male and 1 female from each dam was pooled for use in DNA methylation analysis. PCR amplification of genomic sequence of sex determining region (*Sry*) gene, which

is located on the Y chromosome, was performed to discriminate the sex of offspring.

Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP)

MeDIP was performed as previously described (Weber *et al.*, 2005), with slight modifications. Before MeDIP assay, genomic DNA was sonicated to produce a random fragment, which mainly ranged from 500-1,000 bp. The fragmented DNA was denatured for 10 min at 95°C and subsequently incubated with anti-5-methyl cytosine antibody (Diagenode Inc., NJ, USA) in immunoprecipitation (IP) buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100) overnight at 4°C. Then, the mixture was incubated with Dynabeads M-280 Sheep anti-mouse IgG for 2 hr at 4°C. After washing with IP buffer, the beads were incubated with elution buffer (25 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM EDTA, 0.5% SDS, 0.25 mM DTT) for 15 min at 65°C. Eluted DNA was recovered by phenol-chloroform extraction followed by ethanol precipitation.

In vitro transcription

T7 based amplification of methylated DNA obtained by MeDIP assay was performed as previously described (Liu *et al.*, 2003), with slight modifications. DNA samples were treated with 5 units of Antarctic phosphatase (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA). Poly T tails were generated using terminal transferase (New England BioLabs) with 100 μ M dTTP and 10 μ M ddCTP. The reaction was cleaned up with a MinElute Reaction Cleanup kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to manufacturer's instructions. The tailing reaction product was mixed with T7-polyA primer (5'-GCATTAGCGCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAG(A)₁₈C-3') in the reaction buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.9], 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.2 mM dNTP mix) and incubated at 95°C for 2 min to denature. After incubation, the reaction was held at 37°C for 2 min to anneal, ramped down to 25°C and held while Klenow enzyme (New England BioLabs) was added. The sample was then incubated at 37°C for 90 min for extension. The reaction was terminated by adding 0.5 M EDTA (pH 8.0), then cleaned up with MinElute Reaction Cleanup kit (Qiagen). After the samples were condensed with a centrifugal vacuum evaporator, *in vitro* transcription was performed using a Megascript T7 kit (Ambion, Foster, CA, USA) according to manufacturer's instructions, with the exception that the incubation was increased to 16 hr. The resultant samples were purified with NucleoSpin RNA Clean-up kit (Machery-Nagel, Düren, Germany).

Biotin-labeled double-stranded cDNA synthesis and promoter tiling array analysis

To obtain double-stranded cDNA, amplified RNA was reverse transcribed, nick-translated and subsequently biotin-labeled with GeneChip WT Double-Stranded DNA Terminal Labeling Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) according to manufacturer's instructions. Labeled double-stranded cDNA was used for promoter array analysis.

GeneChip mouse promoter 1.0R array (Affymetrix) was hybridized with biotin-labeled double-stranded cDNA using a GeneChip Hybridization, Wash and Stain kit (Affymetrix). The array was then scanned by Affymetrix GeneChip Command Console software. Labeling, hybridization and scanning were performed by Bio Matrix Research, Inc. (Chiba, Japan) using the standard protocol. Tiling Analysis Software (TAS, Affymetrix), was used to calculate signal intensities, normalize the signals, and generate p-values. The threshold setting for the analysis was set at $p < 0.01$. The detected DNA regions were annotated to genes using the probe information provided by Affymetrix. To analyze whether these genes have CpG islands, the genomic location of CpG islands in the entire mouse genome was obtained from the UCSC genome browser (Center for Biomolecular Science and Engineering, Santa Cruz, CA, USA).

Bioinformatic analysis of methylated genes with GO and MeSH

Differentially methylated genes were categorized with GO and MeSH terms. All promoter DNA regions analyzed by promoter tiling array were annotated with GO using an annotation file (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/gene/DATA/gene2go.gz>) provided by the NCBI. All of the genes were annotated to MeSH terms using the Gene2MeSH programmatic interface provided by National Center for Integrative Biomedical Informatics (Ann Arbor, MI, USA). The annotations were updated in October 2013. The genes in which the DNA methylation level was affected by prenatal DE exposure were categorized using GO terms. Gene promoters with CpG islands were analyzed because the presence of a CpG island is crucial for transcriptional regulation. The enrichment factor for each category was defined as $(nf/n)/(Nf/N)$, where nf is the number of differentially methylated genes within the category; Nf is the total number of genes within that same category; n is the number of differentially methylated genes within the entire tiling array; and N is the total number of genes on the tiling array. Statistical analysis was performed using Fisher's exact test based on a hypergeometric distribution. Then the GO categories with enrichment

factors ≥ 2 , $\eta f > 5$ and $p < 0.05$ were extracted.

RESULTS

Diesel exhaust characteristics

The average number and mass concentration of the diesel exhaust particles (DEP) were approximately 7.1×10^4 number/cm³ and 0.1 mg/m³, respectively. The average concentration of exhaust gases was maintained at 1.84 ppm for carbon monoxide (CO), 0.456 ppm for nitrogen monoxide (NO), 0.247 ppm for nitrogen dioxide (NO₂), and 3.52 ppb for sulfur dioxide (SO₂) (Table 1).

Genome-wide analysis of the promoter DNA methylation state

Probes on the promoter tiling array were annotated to 14,246 genes. The methylated promoter DNA regions specific to the control group and the DE-exposed group were defined as follows. The regions specific to the control group were those in which DNA methylation level in the DE-exposed group was decreased in comparison to the control group. The regions specific to the DE-exposed group were those in which DNA methylation level in the DE-exposed group was increased in comparison to the control group. These methylated promoter DNA regions were detected in all chromosomes (Figs. 1, 2; Supplementary Tables 1-4). We detected 3197, 3010, 3340 and 2820 genes with differentially methylated DNA regions in their promoter in 1-day-old (1d) male, 1d female, 21d male and 21d female offspring, respectively (Figs. 1, 2). Among these genes, 1689, 1905, 1760 and 1522 genes, respectively, have CpG islands (Fig. 1). These results showed that the differential methylation of the gene promoters occurred independently of the presence of CpG islands. Furthermore, altered DNA methylation was detected in both the 1d and 21d offspring. These results indicated that prenatal DE exposure disrupted the genome-wide DNA methylation state in the brain of offspring mice throughout the 1-21-day postpartum period.

Categorization of differentially methylated genes with GO and MeSH

Of the genes mapped to the promoters that were

differentially methylated in the DE-exposed and control groups, 57, 74, 98 and 52 GO categories were enriched in 1d male, 1d female, 21d male and 21d female offspring, respectively (Supplementary Tables 5-8). To obtain information about the biological function affected by altered DNA methylation in each time point, GO terms that were common between male and female offspring were extracted (Tables 2, 3). The GO terms related to neuronal differentiation (“positive regulation of neuron differentiation”) and neurogenesis (“positive regulation of neurogenesis” and “neurogenesis”) were found in both 1d and 21d offspring, respectively.

We also attempted to find the brain regions that were susceptible to prenatal DE exposure from the MeSH results. Although some MeSH terms indicate the brain regions that were enriched in each experimental group, we were not able to find MeSH terms common to each experimental point (Supplementary Tables 9-12).

DISCUSSION

Human epidemiologic and animal studies indicate that nutrition and environmental stimuli during prenatal and postnatal mammalian development influence developmental pathways and thereby induce permanent changes in metabolism and chronic disease susceptibility (McMillen and Robinson, 2005). Epigenetic mechanisms are likely to play an important role in this “developmental origins of health and diseases (DOHaD)” hypothesis (Waterland and Michels, 2007). DNA methylation is one of the pivotal mechanisms for the epigenetic regulation of gene transcription. The disruption of the DNA methylation pattern by prenatal chemical exposure is suspected to affect the development of offspring because the correct construction of this pattern is crucial for normal development. Several reports have suggested a relationship between developmental defects and the disruption of DNA methylation. Vinclozolin, an endocrine disruptor, which has antiandrogenic activity, transgenerationally alters the DNA methylation pattern in the male germ line (Anway *et al.*, 2005). It has been indicated that the alteration of DNA methylation induced by maternal ethanol consumption is capable of inducing changes in gene

Table 1. Characteristics of diesel exhaust exposure.

	CO (ppm)	SO ₂ (ppb)	NO (ppm)	NO ₂ (ppm)	NO _x (ppm)	DEP (μg/m ³)	DEP (number/cm ³)
Control air	0.504 ± 0.159	1.22 ± 0.83	0.003 ± 0.003	0.019 ± 0.008	0.022 ± 0.010	5 ± 4	4 ± 2
DE	1.84 ± 0.42	3.52 ± 1.20	0.456 ± 0.136	0.247 ± 0.070	0.703 ± 0.203	98 ± 29	70920 ± 24247

Values are the average concentration of each component in diesel exhaust and control air expressed as mean ± S.D.

Prenatal diesel exhaust exposure disrupts the DNA methylation profile

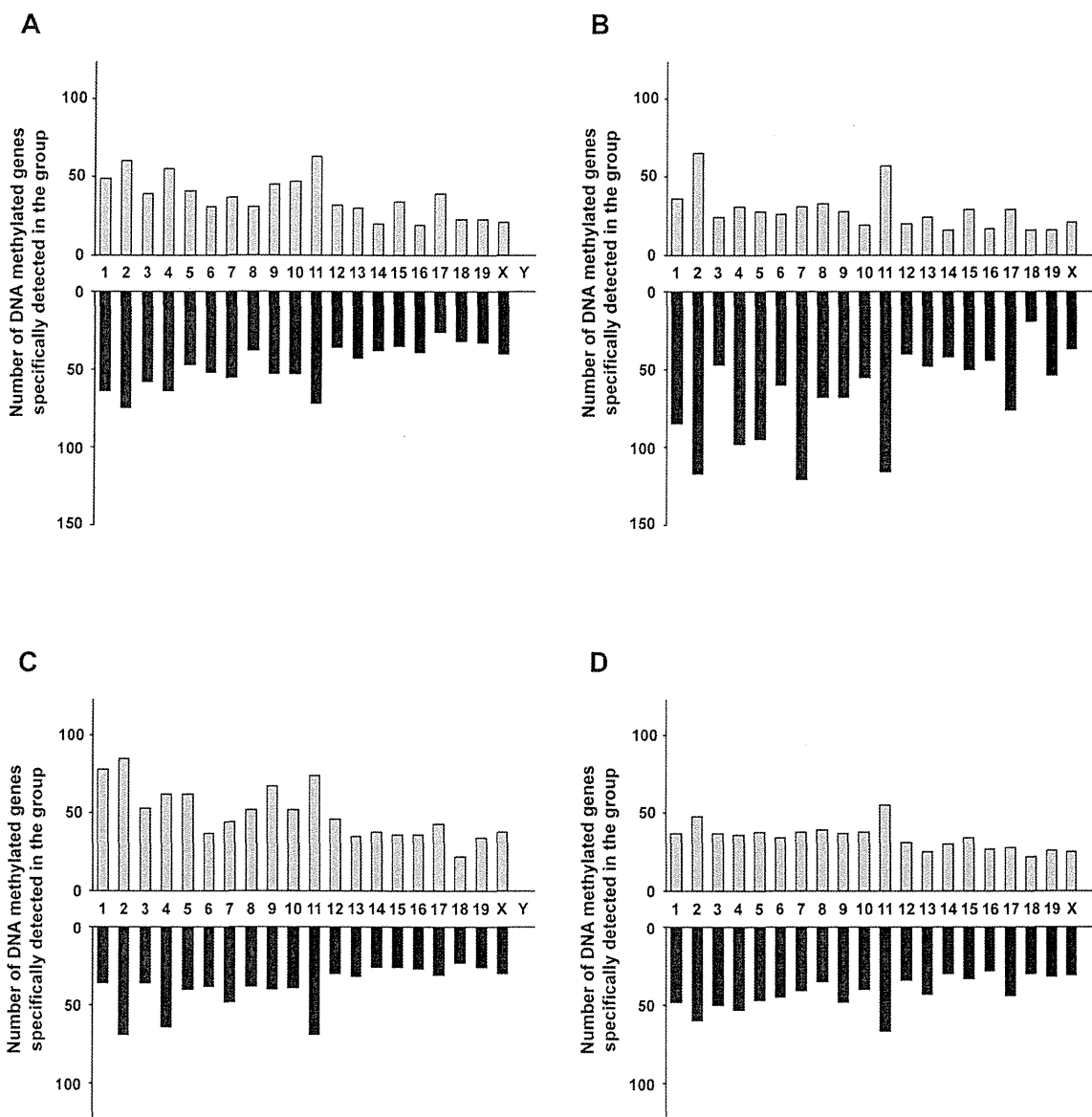


Fig. 1. Effects of prenatal diesel exhaust (DE) exposure on the DNA methylation state of gene promoters with CpG islands. The number of DNA methylated genes specifically detected in control and DE groups in 1-day-old (1d) male (A), 1d female (B), 21d male (C) and 21d female (D) offspring. The x-axis shows chromosome numbers. Black bars indicate the genes specifically methylated in control (meaning that DNA methylation was decreased by DE exposure). Gray bars indicate the genes specifically methylated in DE (meaning that DNA methylation was increased by DE exposure).

expression (Kaminen-Ahola *et al.*, 2010). At the time of writing, however, it remains unclear whether prenatal DE exposure affects the genome-wide DNA methylation pattern in the brain of offspring.

We produced a mass concentration of DEP at about

100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, which is environmentally relevant. Previous report suggested that the effects of suspended PM in air pollutants are mainly derived from DEP (Donaldson *et al.*, 2005). Numerous megacities in the world demonstrate PM concentrations of 30-600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ in annual average

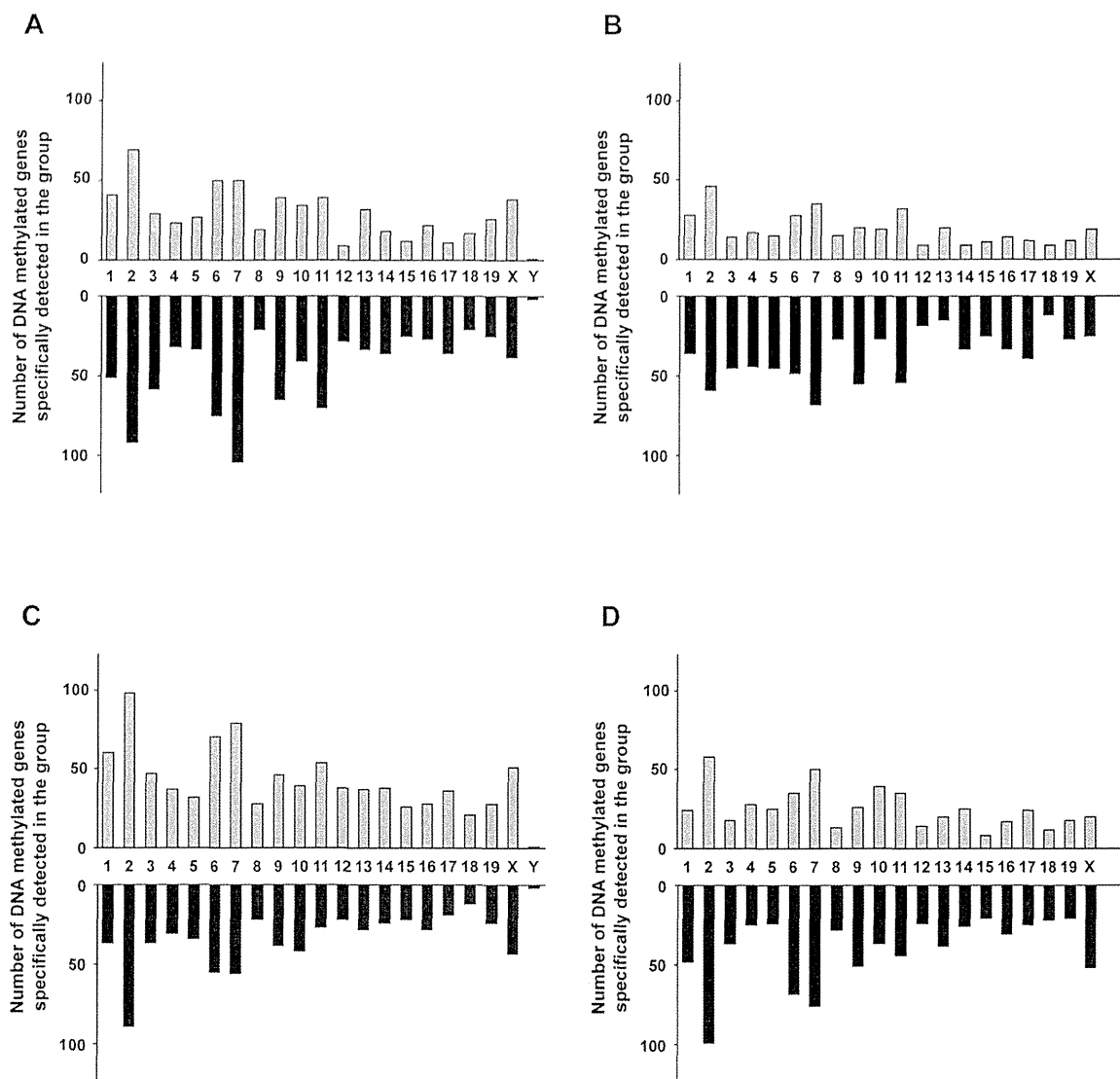


Fig. 2. Effects of prenatal diesel exhaust (DE) exposure on the DNA methylation state of gene promoters without CpG islands. The number of genes DNA methylated which were specifically detected in control and DE groups in 1-day-old (1d) male (A), 1d female (B), 21d male (C) and 21d female (D) offspring. The x-axis shows chromosome numbers. Black bars indicate the genes specifically methylated in control (meaning that DNA methylation was decreased by DE exposure). Gray bars indicate the genes specifically methylated in DE (meaning that DNA methylation was increased by DE exposure).

es (Gurjar *et al.*, 2008). For example, under the condition in the Mexico City ($201 \mu\text{g}/\text{m}^3$) and assuming a ventilation rate of $6.4 \text{ L}/\text{min}$ ($9.2 \text{ m}^3/\text{day}$) for a healthy adult at rest (Crosfill and Widdicombe, 1961), the total amount of PM exposure would be approximately $1,800 \mu\text{g}/\text{m}^3$. This would correspond to $6 \mu\text{g}/\text{day}$ of PM exposure for a mouse with an average ventilation rate of $0.021 \text{ L}/\text{min}$

(Crosfill and Widdicombe, 1961). The DE exposure under the condition of present study was approximately $1 \mu\text{g}/\text{day}$. In the present study, the DE exposure condition for DEP mass concentration and exposure time was designed to be lower than recent studies on the effects of DE exposure on the central nervous system (Levesque *et al.*, 2011a, 2011b; Win-Shwe *et al.*, 2012; Yamagishi *et*

Prenatal diesel exhaust exposure disrupts the DNA methylation profile

Table 2. GO terms commonly enriched in male (M) and female (F) in 1-day-old offspring.

GO term	Gender	Enrichment factor	p-value
Positive regulation of neuron differentiation	M	2.01	0.007
	F	2.23	< 0.001
Ventricular septum morphogenesis	M	4.20	< 0.001
	F	3.39	< 0.001
Outflow tract morphogenesis	M	2.80	0.001
	F	2.69	< 0.001
RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific DNA binding	M	2.17	0.025
	F	2.80	< 0.001
Embryonic cranial skeleton morphogenesis	M	2.56	0.015
	F	2.92	0.002
Histone deacetylase binding	M	2.10	0.008
	F	2.01	0.004
Cardiac muscle cell differentiation	M	2.19	0.048
	F	2.59	0.008
tRNA binding	M	2.47	0.032
	F	2.49	0.016

The enrichment factor for each category was defined as described in MATERIALS AND METHODS. Statistical analysis was performed using Fisher's exact test with hypergeometric distribution and the level of statistical significance was set at $p < 0.05$

Table 3. GO terms commonly enriched in male (M) and female (F) in 21-day-old offspring.

GO categories	Gender	Enrichment factor	p-value
Neurogenesis (positive regulation of neurogenesis)	M	2.83	0.008
	F	2.54	0.025
Hindbrain development	M	2.85	0.013
	F	4.93	< 0.001
mRNA transport	M	2.06	0.012
	F	2.77	< 0.001
Dorsal/ventral pattern formation	M	2.08	0.033
	F	2.66	0.003
Spermatid development	M	2.20	0.009
	F	2.33	0.006
Centriole	M	2.51	0.001
	F	2.28	0.007
Transcription cofactor activity	M	2.69	0.006
	F	2.72	0.011
Epithelial to mesenchymal transition	M	2.69	0.011
	F	2.66	0.020
Odontogenesis of dentin-containing tooth	M	2.02	0.026
	F	2.10	0.034
Protein targeting	M	2.26	0.028
	F	2.24	0.045

The enrichment factor for each category was defined as described in MATERIALS AND METHODS. Statistical analysis was performed using Fisher's exact test with hypergeometric distribution and the level of statistical significance was set at $p < 0.05$.

al., 2012).

In the present study, we used the combination of MeDIP and subsequent promoter tiling array analysis to examine the effects of prenatal DE exposure on the

genome-wide promoter DNA methylation state in the brain of offspring mice. Our results revealed that prenatal DE exposure disrupted the DNA methylation state of offspring in all chromosomes rather than a particular