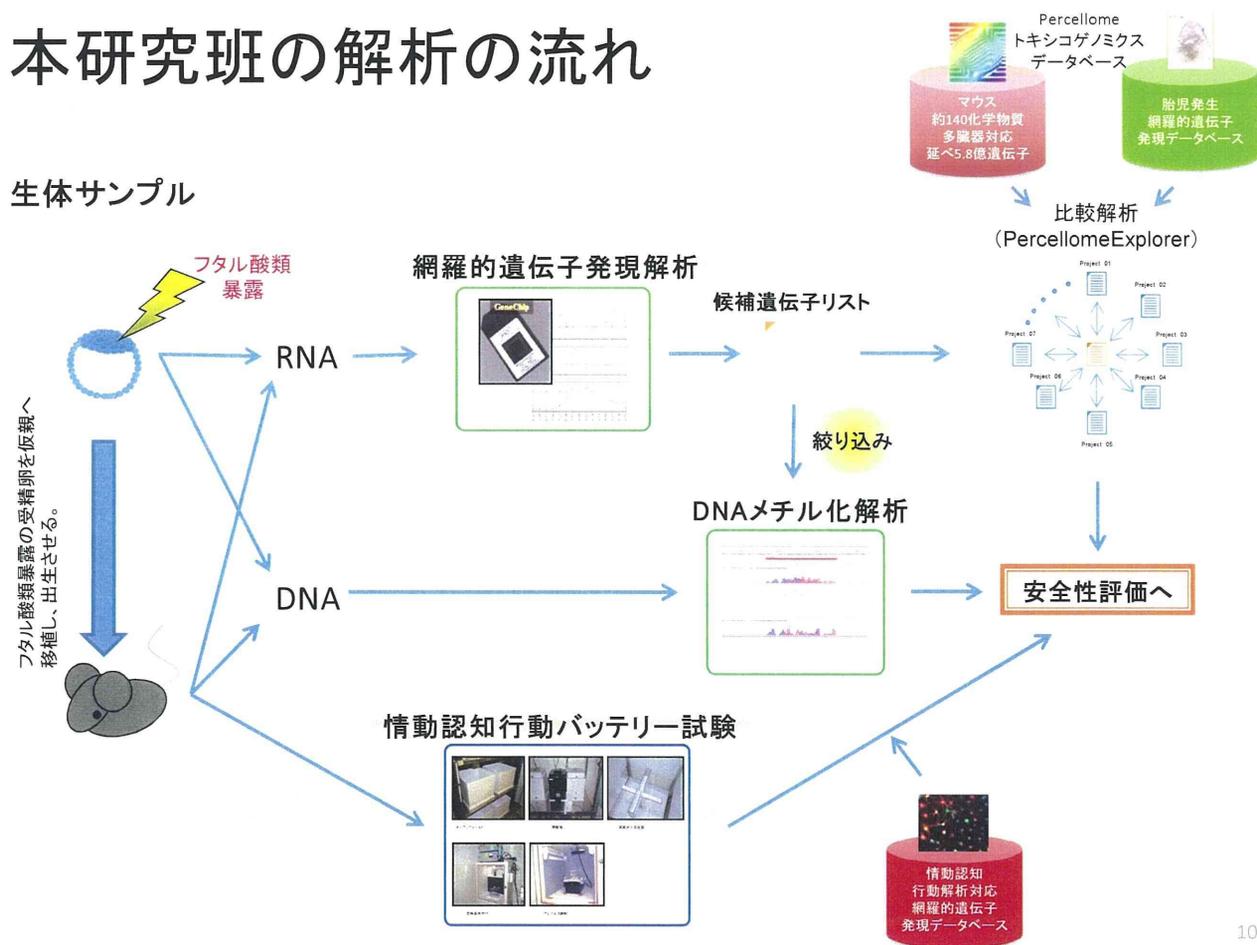


# 初期胚解析のための 網羅的定量的遺伝子発現解析手法 (Percellome法)の最適化

## 本研究班の解析の流れ

生体サンプル



## 基盤技術

# Percellomeトキシコゲノミクス



遺伝子発現量を細胞1個あたりのmRNAコピー数で表し、大量のトランスクリプトームデータを高精度で取り扱うことを可能とする。

11

## Percellome法

**BMC Genomics**



Methodology article

**Open Access**

**"Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays**

Jun Kanno<sup>\*†1</sup>, Ken-ichi Aisaki<sup>†1</sup>, Katsuhide Igarashi<sup>1</sup>, Noriyuki Nakatsu<sup>1</sup>, Atsushi Ono<sup>1</sup>, Yukio Kodama<sup>1</sup> and Taku Nagao<sup>2</sup>

Address: <sup>1</sup>Division of Cellular and Molecular Toxicology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan and <sup>2</sup>President, National Institute of Health Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Email Jun Kanno<sup>\*</sup> - kanno@nihs.go.jp; Ken-ichi Aisaki - aisaki@nihs.go.jp; Katsuhide Igarashi - igarashi@nihs.go.jp; Noriyuki Nakatsu - nakatsu@nihs.go.jp; Atsushi Ono - atsushi@nibio.go.jp; Yukio Kodama - kodama@nihs.go.jp; Taku Nagao - nagao@nihs.go.jp

<sup>\*</sup> Corresponding author <sup>†</sup>Equal contributors

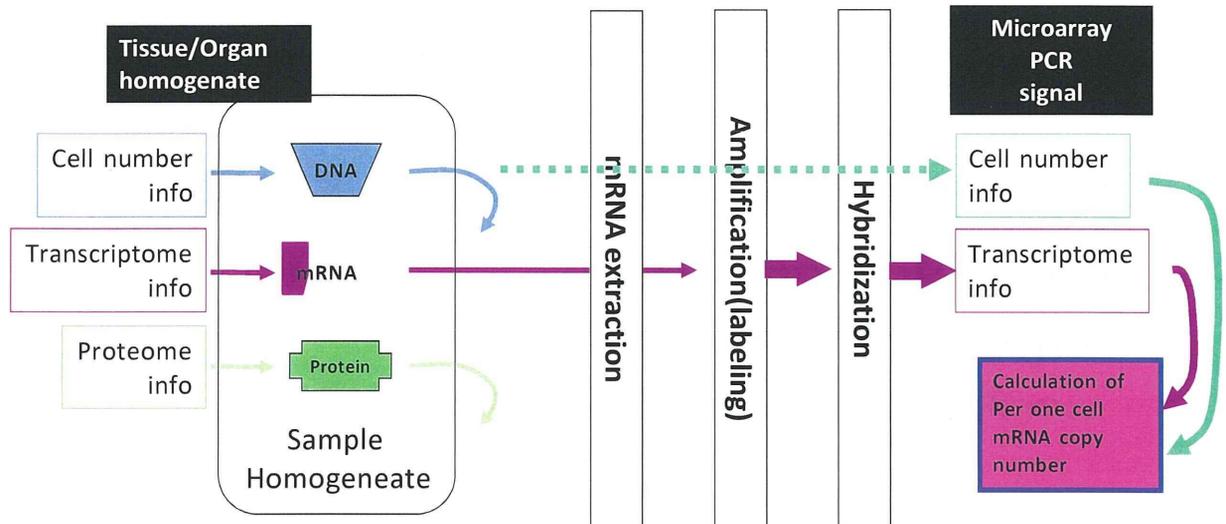
**Open Access**

**on line journal: *BMC Genomics*. 2006 Mar 29;7(1):64**

**PMID: 16571132**

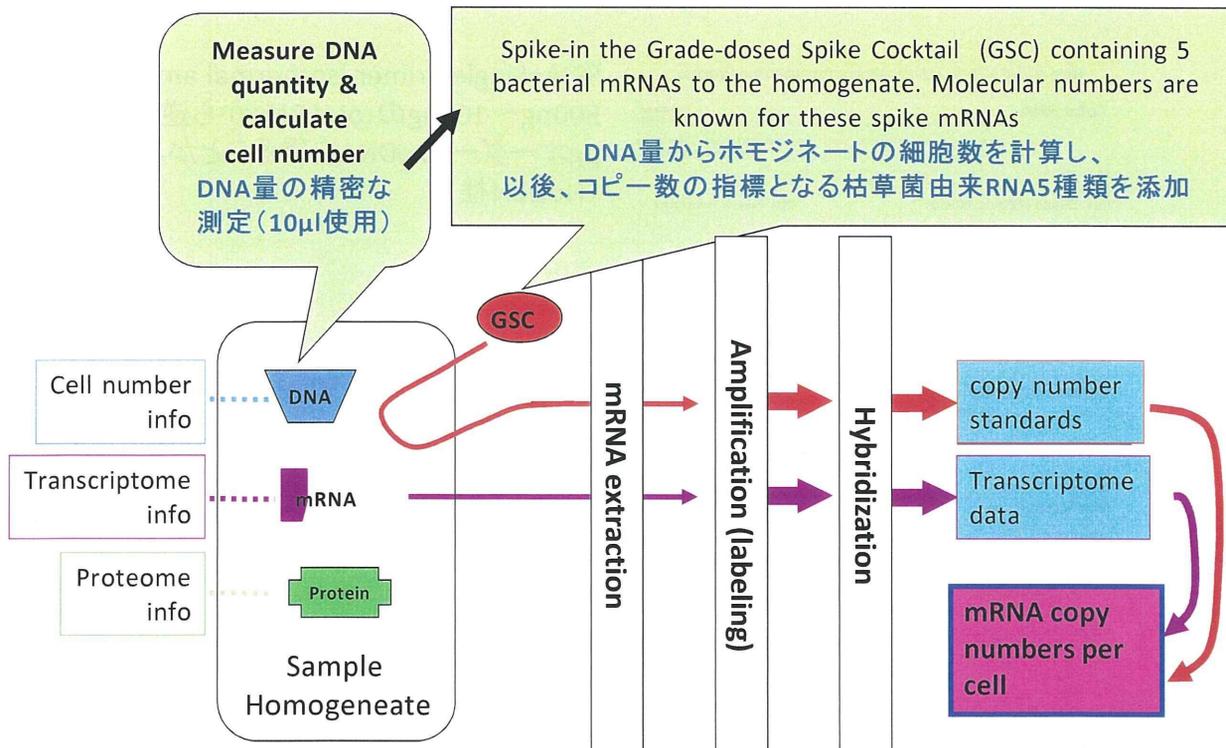
12

# Percellome法の原理



13

# Percellome法の原理



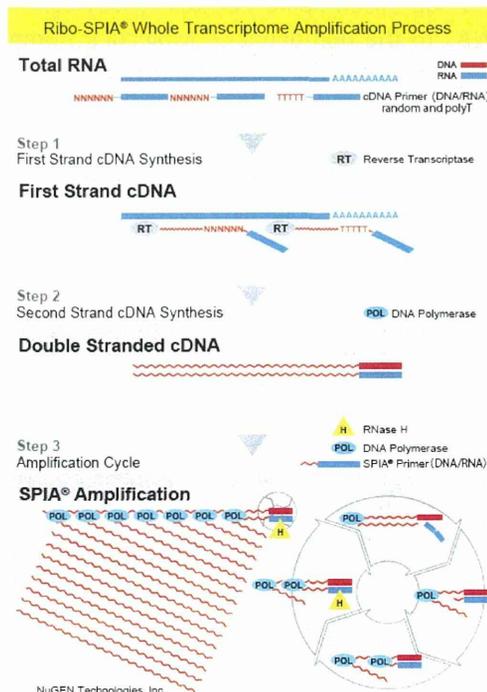
14

# 技術的問題点

- サンプル量が極く微量
  - 増幅効率
  - 外部RNA Spike添加のための指標変更
- DNAメチル化解析と網羅的遺伝子発現解析を同一サンプルで実施
  - ホモジナイズバッファの変更
  - 外部RNA Spike添加のための指標変更

15

## 微量RNAの高増幅プロトコル

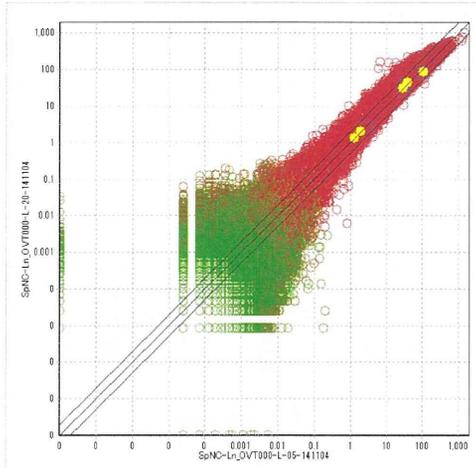


SPIA=Single Primer Isothermal amplification  
500pg~100ngのtotal RNAから逆転写・増幅し、  
μgオーダーのcDNAを得ることが出来る  
(NuGEN社)。

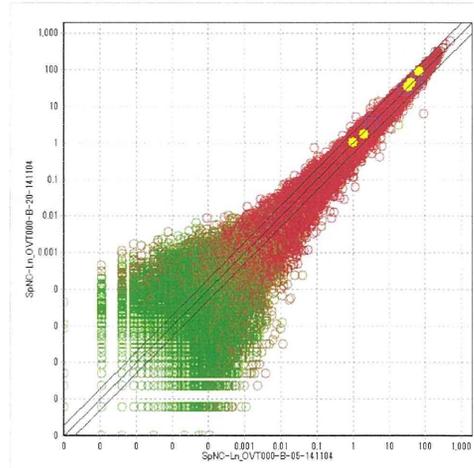
16

# 高増幅プロトコルの利用例

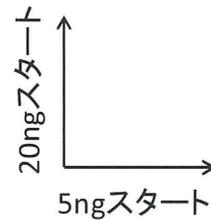
Liver



Brain



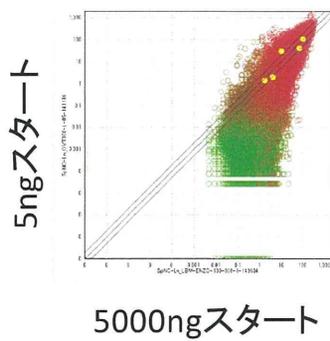
- □ Percollome用Spike
- 発現確度の高い(Presence)データ
- 発現確度の低い(Absence)データ



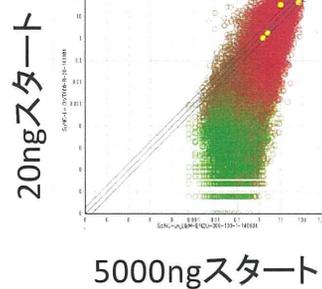
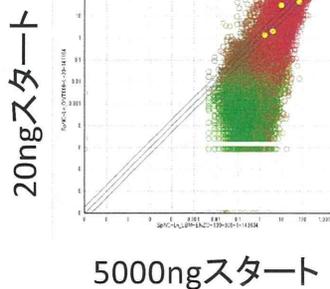
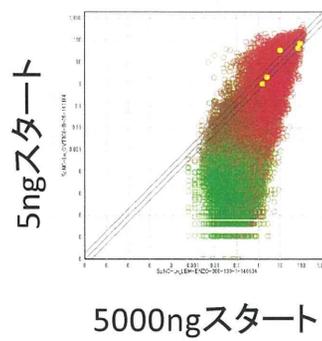
17

# 低増幅データと高増幅データの比較

Liver

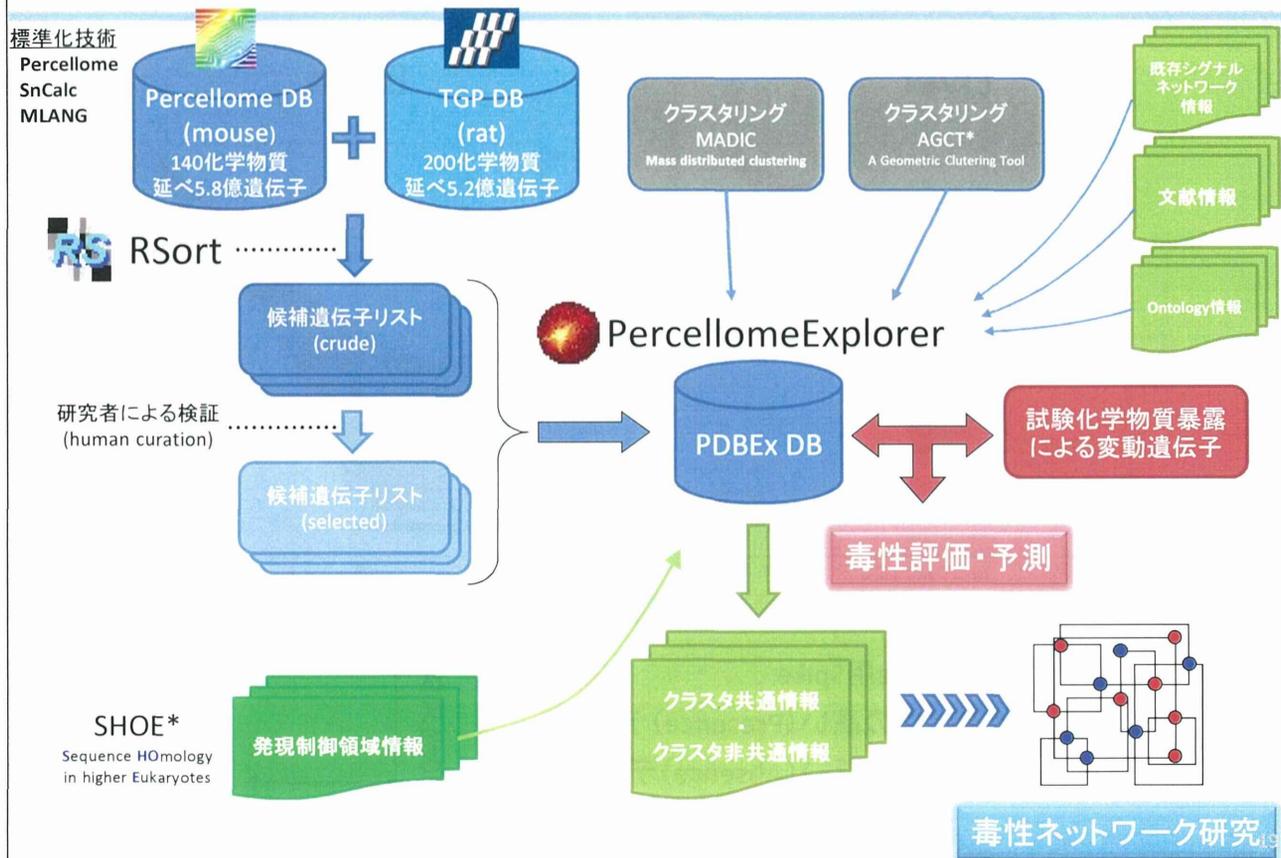


Brain



18

# Percellome技術による解析システム



## 次世代シーケンサーデータ 解析計算サーバーの整備

### ● Hardware

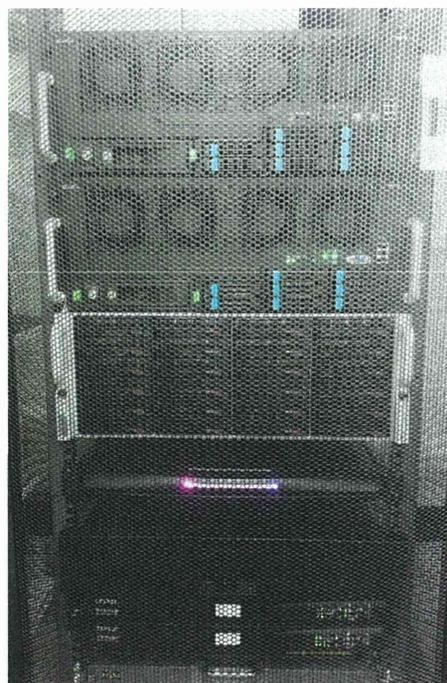
Takeru Large Memory Servreベース  
(ナベインターナショナル製)

Xenon E5-4650 (8core ,2.7GHz) x4  
memory 128GB  
HDD(data) 3TBx43(RAID60+HotSpare)

### ● Software

OS : Linux CentOS ver 6.5

galaxyを始め、オープンソースのバイオツールを  
多数インストール済み



# 研究計画

## 1) 体外受精培養液中のフタル酸類に暴露された胚から出生した個体における *in vivo* 影響解析研究

平成26年度

体外受精による受精卵を胚盤胞まで培養し、仮親マウスに移植して出生マウスを得る効率の向上と安定化を行った。

平成27年度

フタル酸類に暴露した受精卵を仮親マウスに移植して出生マウスを得て、情動認知行動解析や網羅的遺伝子発現解析を実施する。また出生率を評価する。

平成28年度

フタル酸類に暴露した受精卵を仮親マウスに移植した際の着床率を評価する。またフタル酸類に暴露した受精卵を仮親マウスに移植して出生マウスを得て、その生殖細胞におけるエピゲノム解析を行う。

## 2) 体外受精培養液中のフタル酸類の暴露によって生じる初期胚への *in vitro* 影響解析研究

平成26年度

マウスより採取した生殖細胞を用い、生殖補助医療で実施されている体外受精法を再現した動物実験系の確立、個体発生能を持つ胚盤胞の作出条件の検討と、微量サンプルにおける網羅的遺伝子発現解析及びDNAメチル化解析のプロトコル改良を行った。

平成27年度

体外受精培養中、受精卵をフタル酸類に暴露し、その網羅的遺伝子発現解析と、発現変動が検出された遺伝子を対象にゲノムDNAメチル化解析を行う。

平成28年度

代表的な初期発生ステージごとに、受精卵をフタル酸類に暴露し、その網羅的遺伝子発現解析を行い、Window効果の有無を検討する。

## 3) マウスES細胞とマウスEpiS細胞の分子毒性学的比較解析研究

平成26年度

マウスES細胞とマウスEpiS細胞の、一般性状を調査・観察し、次年度以降の実験に供するための、個体発生能或いは多分化能を維持した状態での凍結ストックを作成した。

平成27年度

マウスES細胞とマウスEpiS細胞の、一般状態及びフタル酸暴露下での遺伝子発現についての網羅的比較検討を行い、発現変動が検出された遺伝子を中心に、マウスES細胞とマウスEpiS細胞の、一般状態及びフタル酸暴露下でのゲノムDNAメチル化についての比較検討を行う。

平成28年度

遺伝子発現やエピゲノム解析で変化のあった遺伝子を中心に、マウスES細胞とマウスEpiS細胞の、一般状態及びフタル酸暴露下でのタンパク質発現影響についての比較検討を行う。

21

平成24年度化学物質に係る調査  
家庭用品等試験検査費

# ヒト受精卵培養液中のフタル酸類の 受精卵及び出生児に対する影響関連情報 及びそのリスク評価・管理に必要な要件の調査

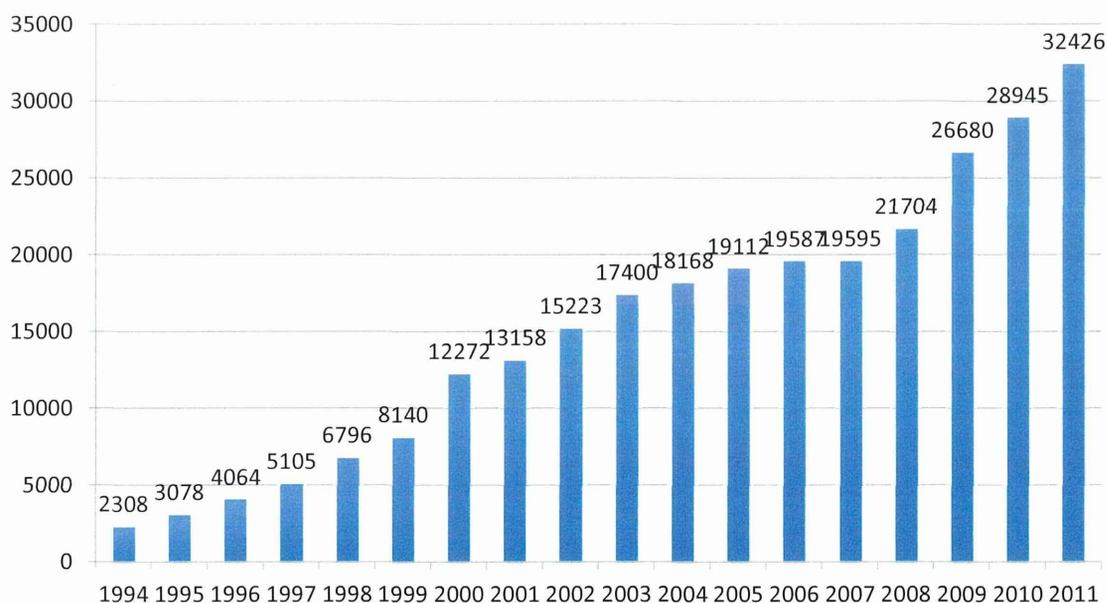
H26\_DEHP班会議\_4530

菅野 純

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 部長

1

## 体外授精による出生数

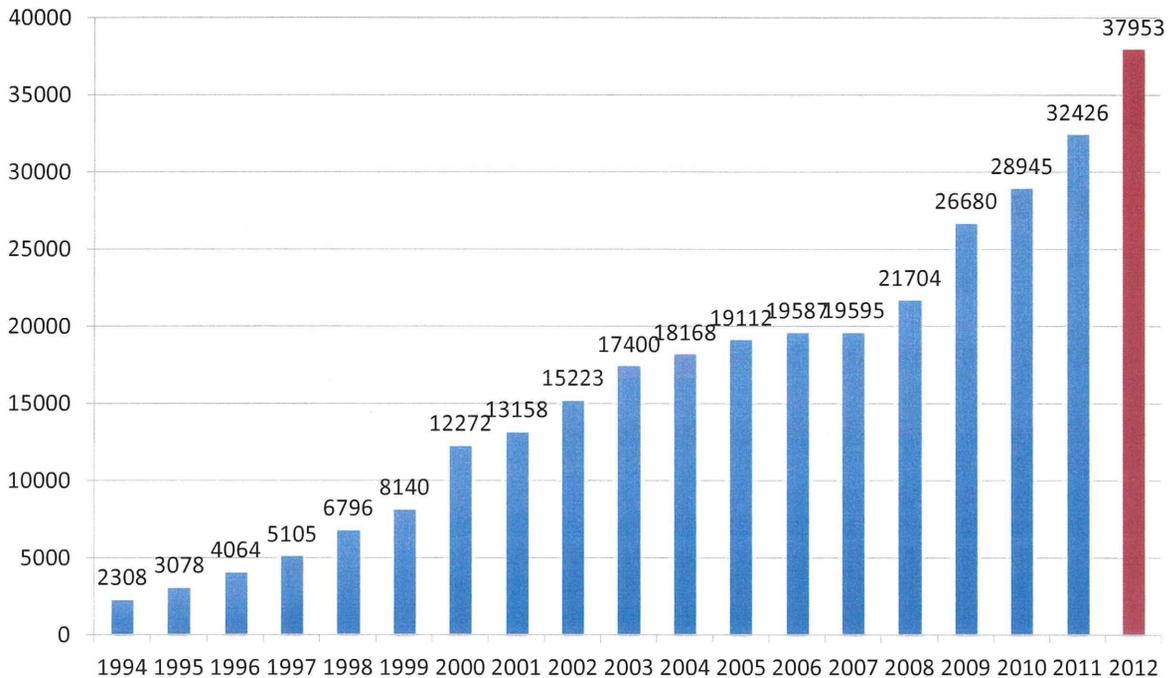


近代出版「胚培養の理論と実際」(2011)より(2008-11分データ加筆)

2011年の総出生数: 1,050,806  
うち、体外授精による出生児の割合: 3.1%

2

## 体外授精による出生数



近代出版「胚培養の理論と実際」(2011)より(2008-12分データ加筆)

2012年の総出生数: 1,037,231

体外授精による出生児の割合: 3.7%

3

## ヒト胚培養液中のフタル酸(DEHP, MEHP)

- 厚労科研費・牧野班※による調査(平成22年度)

最大検出濃度	DEHP	MEHP
受精卵培養液:	0.2 $\mu$ M	0.5 $\mu$ M
精子調製液:	0.3 $\mu$ M	1.0 $\mu$ M
添加用ヒト血清アルブミン	2.5 $\mu$ M	6.6 $\mu$ M
参考値:母体血清(中央値)	<0.03 $\mu$ M	<0.01 $\mu$ M

人体への影響の有無を推定するための知見が少ない。

動物を用いた安全性試験が必要

※化学物質リスク研究事業  
「化学物質の子供への健康影響に関するエピジェネティクス評価法の開発に関する研究」

4



HOME

ご挨拶

プロフィール  
アルバム

ビジョン  
政策

やまたにの  
活動報告

国会での  
活動報告

事務所

## 国会での活動報告

>>過去の活動報告はこちらから

### 国会での活動報告詳細

2012年8月3日

【質問主意書】体外受精培養液中に含まれる化学物質の安全性に関する質問主意書

●体外受精培養液中に含まれる化学物質の安全性に関する質問主意書

(内閣参質180第205号)

(平成24年7月26日提出、政府答弁書8月3日)

昨年、プラスチックを加工しやすくする化学物質「フタル酸エステル類」が人の体外受精で必要となる培養液に高い濃度で含まれていることが、厚生労働省研究班の調査で分かった。妊婦の血液から検出される濃度の最大で約百倍に相当する。動物の胎児の生殖機能に影響を与える濃度の千分の一ほどだが、マウスの細胞の遺伝子には異常が起きるレベルで、受精卵や胎児への影響が懸念されるとの内容であった。

日本産科婦人科学会の集計によれば、平成二十一年の新生児の四十人に一人は、体外受精や顕微授精などの高度医療生殖補助によって生まれている。

この現状を踏まえ、以下質問する。

一 前述の厚生労働省研究班による調査結果に関して、政府の見解を示されたい。

(政府答弁)

一について



※バックナンバー(はコチラから



やまたにブログ  
山あり谷あり日記



やまたにヒストリー



後援会員募集



ネット献金

た。妊婦の血液から検出される濃度の最大で約百倍に相当する。動物の胎児の生殖機能に影響を与える濃度の千分の一ほどだが、マウスの細胞の遺伝子には異常が起きるレベルで、受精卵や胎児への影響が懸念されるとの内容であった。

日本産科婦人科学会の集計によれば、平成二十一年の新生児の四十人に一人は、体外受精や顕微授精などの高度医療生殖補助によって生まれている。

この現状を踏まえ、以下質問する。

一 前述の厚生労働省研究班による調査結果に関して、政府の見解を示されたい。

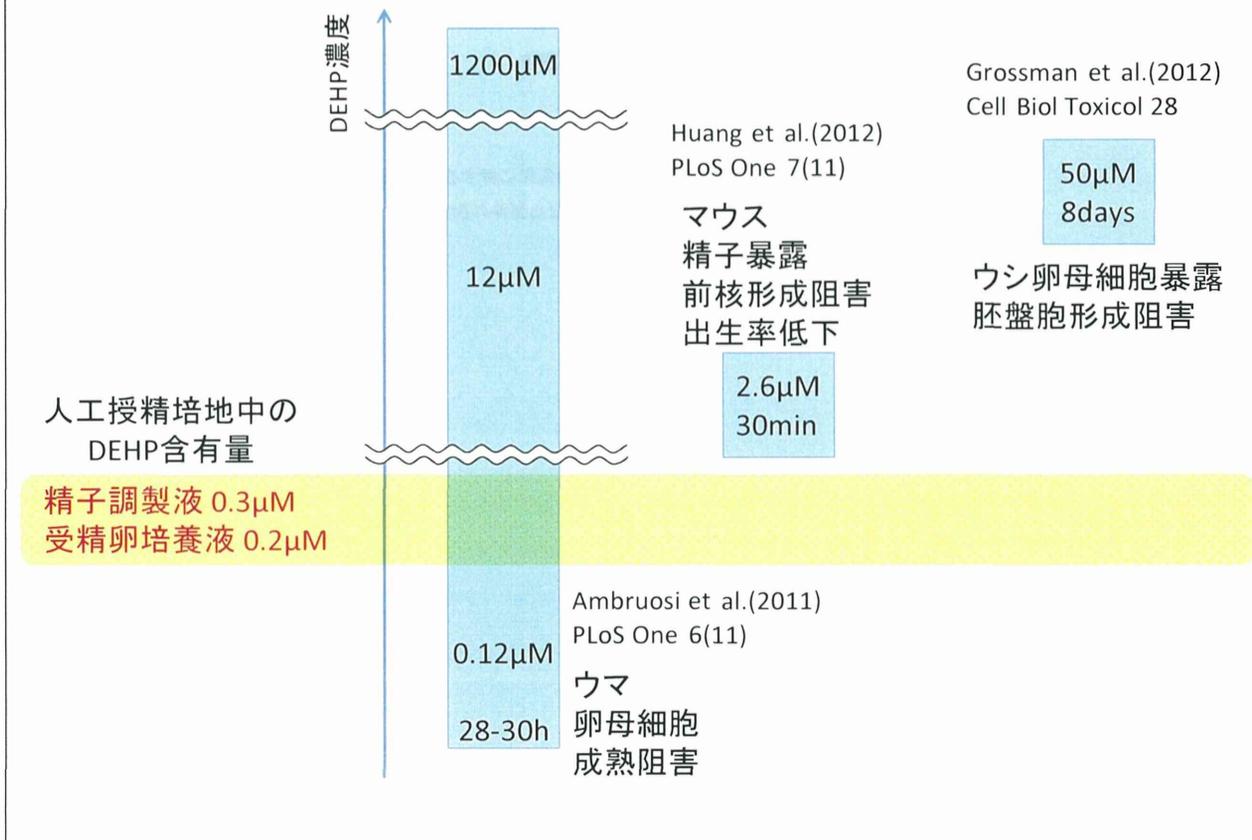
(政府答弁)

一について

御指摘の厚生労働省科学研究費補助金による「化学物質の子どもへの健康影響に関するエピジェネティクス評価法の開発に関する研究」(以下「評価法開発研究」という。)の平成二十年度から平成二十二年度までの総合研究報告書及び同年度の総括・分担研究報告書(以下「総合研究報告書等」という。)によると、一部の人工授精用の培養液から妊婦の血清中濃度の平均値と比較して数十倍の濃度のフタル酸エステル類が検出され、また、妊婦の血清中濃度の平均値と比較して十倍の濃度のフタル酸エステル類を、マウスの胚性幹細胞に暴露させたときには遺伝子の活性の変化が観察されたが、ヒト人工多能性幹細胞に暴露させたときには遺伝子の活性の変化は観察されなかった。これらのことを踏まえ、厚生労働省としては、引き続き、化学物質の子供への影響評価に関する研究を実施し、知見の集積に努めていきたい。

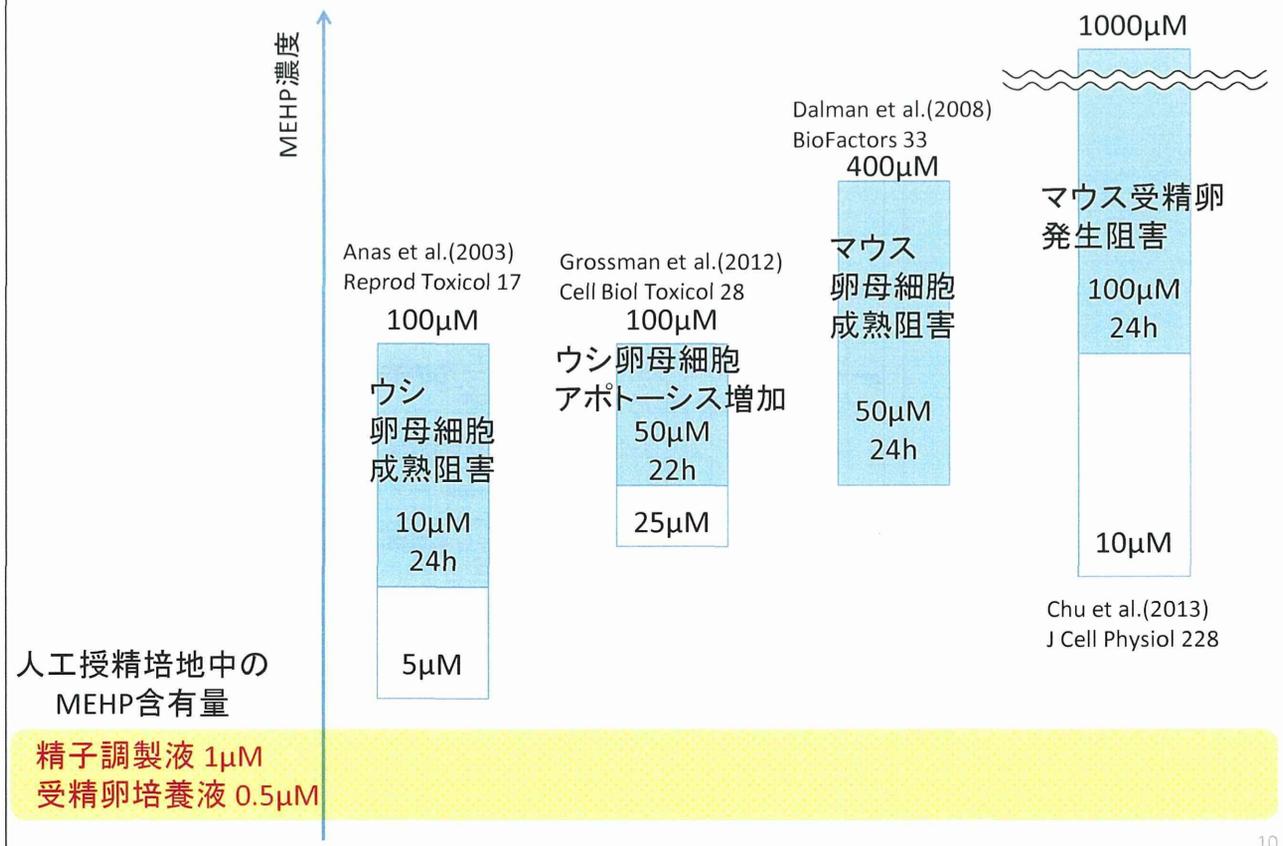


# DEHP暴露による発生への影響に関する文献報告



9

# MEHP暴露による発生への影響に関する文献報告



Chu et al. (2013) J Cell Physiol 228

10

# ヒト受精卵培養液中のフタル酸類の 受精卵及び出生児に対する影響を評価するために

- 人体への影響の有無を推定するための知見が少ない。
- 動物を用いた安全性試験が必要。
- 培養液中と同レベルの暴露濃度における試験の実施。
- 病理検査等、従来項目に加え、エピジェネティクスや情動認知行動\*への影響を検討すべき。

\*フタル酸類の生体内受容体の一つであるPPAR (peroxisome proliferator-activated receptor)が脳において重要な機能を有するため

11

『体外受精培養』厚生労働科学研究事業の検討

2013-04-18 jk

## 起案

### *In vitro* 研究

体外受精培養液中にDEHP、MEHPを、ヒト培養液で検出された濃度範囲で添加し、培養中に生じる変化を、前核胚、2細胞胚、8細胞胚、桑実胚、胚盤胞形成などの各ステージを追って評価する。

その際にフタル酸類の受容体がDNA結合機能を有する核内受容体等のリガンド依存的転写調節因子であることを踏まえ、遺伝子発現変化、エピメュータゲン性について網羅的に評価する。

### *In vivo*研究(厚生労働科研費: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情動認知行動毒性評価系確立に資する研究(H23-化学一般-004)準拠):含、施設複製増設)

胚移植段階における影響として、着床率、出生率を評価する。

出生児について詳細な病理検査を実施する。

成長過程及び成長後の情動認知行動試験等による高次中枢神経機能に対する影響評価。(バッテリー試験、マイクロアレイ解析等)

### マウスES細胞とヒトiPS細胞との発生学的・生物学的な関係について

マウスES細胞とマウスEpiS細胞の反応性の差異の検討

培養時の増殖分化能

数量的、形態的指標

タンパク発現指標

遺伝子発現指標

ESとEpiSの差を勘案しての、ES暴露後の発生期、発達期、胎児期、成熟期影響推測能力の確認実験

12

## 起案

*In vitro* 研究

体外受精培養液中にDEHP、MEHPを、ヒト培養液で検出された濃度範囲で添加し、培養中に生じる変化を、前核胚、2細胞胚、8細胞胚、桑実胚、胚盤胞形成などの各ステージを追って評価する。

その際にフタル酸類の受容体がDNA結合機能を有する核内受容体等のリガンド依存的転写調節因子であることを踏まえ、遺伝子発現変化、エピミュータゲン性について網羅的に評価する。

*In vivo*研究(厚生労働科研費: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情動認知行動毒性評価系確立に資する研究(H23-化学一般-004)準拠):含、施設複製増設)

胚移植段階における影響として、着床率、出生率を評価する。

出生児について詳細な病理検査を実施する。

成長過程及び成長後の情動認知行動試験等による高次中枢神経機能に対する影響評価。(バッテリー試験、マイクロアレイ解析等)

## マウスES細胞とヒトiPS細胞との発生学的・生物学的な関係について

マウスES細胞とマウスEpiS細胞の反応性の差異の検討

培養時の増殖分化能

数量的、形態的指標

タンパク発現指標

遺伝子発現指標

ESとEpiSの差を勘案しての、ES暴露後の発生期、発達期、胎児期、成熟期影響推測能力の確認実験

13

Cell

## ES細胞 と EpiS細胞 の 違い

## Resetting Transcription Factor Control Circuitry toward Ground-State Pluripotency in Human

Yasuhiro Takashima,<sup>1,2</sup> Ge Guo,<sup>1</sup> Remco Loos,<sup>1,3</sup> Jennifer Nichols,<sup>1,4</sup> Gabriella Ficz,<sup>5</sup> Felix Krueger,<sup>6</sup> David Oxley,<sup>6</sup> Fatima Santos,<sup>6</sup> James Clarke,<sup>1</sup> William Mansfield,<sup>1</sup> Wolf Reik,<sup>6,7,8</sup> Paul Bertone,<sup>1,3,9,4</sup> and Austin Smith<sup>1,10,\*</sup>

<sup>1</sup>Wellcome Trust-Medical Research Council Stem Cell Institute, University of Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge CB2 1QR, UK

<sup>2</sup>PRESTO, Japan Science and Technology Agency, 4-1-8 Honcho, Kawaguchi, Saitama, 332-0012, Japan

<sup>3</sup>European Molecular Biology Laboratory, European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton CB10 1SD, UK

<sup>4</sup>Department of Physiology, Development, and Neuroscience, University of Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge CB2 3EG, UK

<sup>5</sup>Centre for Haemato-Oncology, Barts Cancer Institute, University of London, Charterhouse Square, London EC1M 6BQ, UK

<sup>6</sup>Babraham Institute, Babraham, CB22 3AT, UK

<sup>7</sup>Centre for Trophoblast Research, University of Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge CB2 3EG, UK

<sup>8</sup>Wellcome Trust Sanger Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton CB10 1SA, UK

<sup>9</sup>Genome Biology and Developmental Biology Units, European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, 69117 Heidelberg, Germany

<sup>10</sup>Department of Biochemistry, University of Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge CB2 1GA, UK

\*Correspondence: bertone@ebi.ac.uk (P.B.), austin.smith@cscr.cam.ac.uk (A.S.)

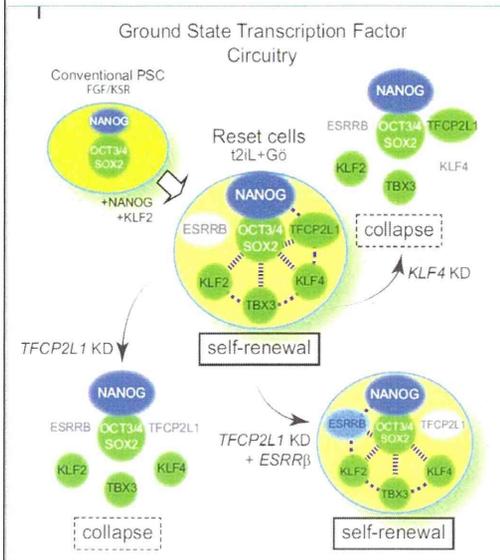
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.029>

This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

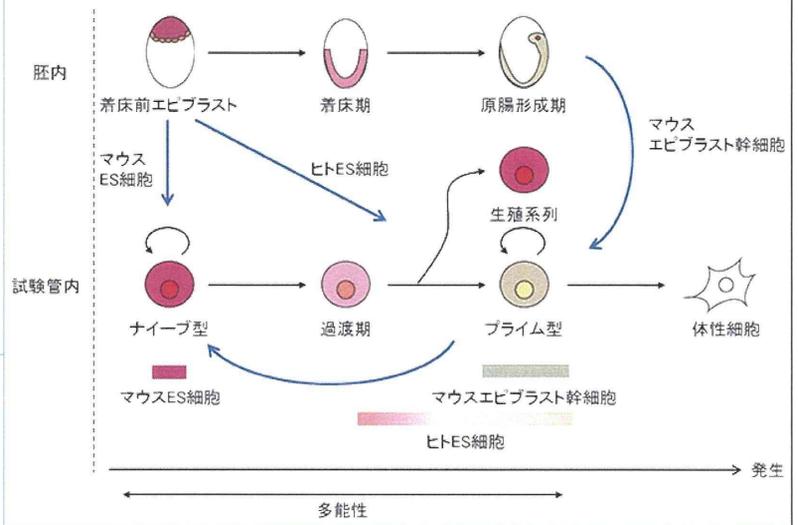
## SUMMARY

Current human pluripotent stem cells lack the transcription factor circuitry that governs the ground state of mouse embryonic stem cells (ESC). Here,

14



## 発生段階の異なる多能性幹細胞



平成 24 年度実施  
「DEHP 及び MEHP の受精卵に対する影響に関する文献調査」  
及び  
「DEHP 及び MEHP の出生児に対する影響に関する文献調査」  
追加調査  
(平成 27 年 1 月 9 日実施)

国立医薬品食品衛生研究所  
安全性試験研究センター  
毒性部 山本雅也

培養液中のフタル酸類の受精卵に対する影響について、平成 24 年度と同様、主に Medline を用い、「phthalate」「oocyte」「embryo」「stem」などの検索単語を用いて、以下の公開文献情報を収集したが、低用量のフタル酸類による受精卵への影響についての新規情報はなかった。

(「phthalate」「stem」: 72 ヒット)

・ Leaching of the plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) from plastic containers and the question of human exposure.

Erythropel HC, Maric M, Nicell JA, Leask RL, Yargeau V.

Appl Microbiol Biotechnol. 2014 Dec;98(24):9967-81. doi: 10.1007/s00253-014-6183-8. Epub 2014 Nov 7.

PMID: 25376446

・ Transgenerational effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate on testicular germ cell associations and spermatogonial stem cells in mice.

Doyle TJ, Bowman JL, Windell VL, McLean DJ, Kim KH.

Biol Reprod. 2013 May 2;88(5):112. doi: 10.1095/biolreprod.112.106104. Print 2013 May

PMID: 23536373

• The increased number of Leydig cells by di(2-ethylhexyl) phthalate comes from the differentiation of stem cells into Leydig cell lineage in the adult rat testis.

Guo J, Li XW, Liang Y, Ge Y, Chen X, Lian QQ, Ge RS.

Toxicology. 2013 Apr 5;306:9-15. doi: 10.1016/j.tox.2013.01.021. Epub 2013 Feb 4.

PMID: 23391632

(「phthalate」 「oocyte」 : 29 ヒット)

• Exposure to diethylhexyl phthalate (DEHP) results in a heritable modification of imprint genes DNA methylation in mouse oocytes.

Li L, Zhang T, Qin XS, Ge W, Ma HG, Sun LL, Hou ZM, Chen H, Chen P, Qin GQ, Shen W, Zhang XF.

Mol Biol Rep. 2014 Mar;41(3):1227-35. doi: 10.1007/s11033-013-2967-7. Epub 2014 Jan 4.

PMID: 24390239

• Diethylhexyl phthalate exposure impairs follicular development and affects oocyte maturation in the mouse.

Zhang XF, Zhang LJ, Li L, Feng YN, Chen B, Ma JM, Huynh E, Shi QH, De Felici M, Shen W.

Environ Mol Mutagen. 2013 Jun;54(5):354-61. doi: 10.1002/em.21776. Epub 2013 Apr 26.

PMID: 23625783

(「phthalate」 「sperm」 「vitro」 : 31 ヒット)

• Compounds from multilayer plastic bags cause reproductive failures in artificial insemination.

Nerin C, Ubeda JL, Alfaro P, Dahmani Y, Aznar M, Canellas E, Ausejo R.

Sci Rep. 2014 May 9;4:4913. doi: 10.1038/srep04913.

PMID: 24810330

(「phthalate」 「embryo」 : 276 ヒット)

• Effects of exposure to Di(2-ethylhexyl)phthalate during fetal period on next generation.

Hayashi Y, Ito Y, Nakajima T.

Nihon Eiseigaku Zasshi. 2014;69(2):86-91. Review.

PMID: 24858501

• Exposure to mono-n-butyl phthalate disrupts the development of preimplantation embryos.

Chu DP, Tian S, Sun DG, Hao CJ, Xia HF, Ma X.

Reprod Fertil Dev. 2013;25(8):1174-84. doi: 10.1071/RD12178. Erratum in: Reprod Fertil Dev. 2014;26(3):491.

PMID: 23231764

(「phthalate」 「sperm」 : 31 ヒット)

• The adverse effects of low-dose exposure to Di(2-ethylhexyl) phthalate during adolescence on sperm function in adult rats.

Hsu PC, Kuo YT, Leon Guo Y, Chen JR, Tsai SS, Chao HR, Teng YN, Pan MH.

Environ Toxicol. 2014 Nov 20. doi: 10.1002/tox.22083. [Epub ahead of print]

PMID: 25410017

• Effects of diethylhexyl phthalate (DEHP) given neonatally on spermatogenesis of mice.

Zhang XF, Zhang T, Wang L, Zhang HY, Chen YD, Qin XS, Feng YM, Feng YN, Shen W, Li L.

Mol Biol Rep. 2013 Nov;40(11):6509-17. doi: 10.1007/s11033-013-2769-y. Epub 2013 Oct 3.

PMID: 24057186

• Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations.

Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C, Skinner MK.

PLoS One. 2013;8(1):e55387. doi: 10.1371/journal.pone.0055387. Epub 2013 Jan 24.

PMID: 23359474

以上

## Ⅱ. 分担研究報告書

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

受精卵培養液中のフタル酸類の受精卵及び出生児に対する影響評価研究  
（H26・化学・指定・002）

分担研究課題 「Percellome トキシコゲノミクス技術を用いた分子機構解析研究」

相崎 健一

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 第一室長

研究要旨

ヒト体外受精で用いられる培養液中から、正常妊娠の妊婦の血清中平均濃度の10倍以上のフタル酸類（DEHP及びMEHP）が検出されたため、受精卵及び出生児に及ぼす影響の評価に資する科学的情報を、マウスを用いた各種の実験により取得するための研究開発を行う。厳密で見落としの無い安全性評価に必要な科学的情報を得るために、本研究では特に①実験環境中に存在するフタル酸類の混入排除、②個体発生能のある体外受精由来の胚の安定作出、③微量サンプルからの網羅的且つ高精度の遺伝子発現及びDNAメチル化の定量解析、の達成に留意し、平成26年度、本分担研究は③に関するプロトコル開発に注力した。

評価対象とする胚のステージは、実際のヒト生殖補助医療での普及状況と、DNA、RNAサンプルの収量に鑑み、受精後72時間の胚盤胞としたが、安彦分担研究者による解析により、この状態の胚盤胞の構成細胞数は平均20個であることが分かった。本研究班で一度に用意できる高品質胚盤胞の数とDEHP或いはMEHPの暴露実験の最小構成から勘案して、可能な胚盤胞プールサイズはサンプル1つ当たり、胚盤胞50～100個分、構成細胞数にして1000～2000個の微量である。この量は、今までの肝組織等に適用して来た標準的なPercellome法\*プロトコルでは処理出来ない（希薄すぎてホモジナイズ液中のDNA含量を定量出来ない）ため、新たに微量サンプル用プロトコルを開発した。

また、より高精度の網羅的な遺伝子発現解析と、ゲノムワイドのDNAメチル化解析（Post-bisulfite adaptor-tagging(PBAT)法）を同一サンプル由来のRNA、DNAで実施すべく、微量サンプルからの高品質DNA、RNAの同時抽出法を選定、最適化すると共に、実際にGeneChip解析やPBAT法+次世代シーケンサ解析を試行し、高品質のデータを取得することに成功した。

.....  
(\*) mRNA発現値を細胞1個当たりのコピー数として絶対定量する方法。特許第4415079号