

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 実験環境中に存在するフタル酸類の混入排除、 個体発生能のある体外受精由来の胚の安定作出、 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 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

A . 研究目的

体外受精操作中に用いる培養液に混入したフタル酸類 (DEHP及びMEHP) が、受精卵及び出生児に及ぼす影響の安全性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と共に、それらの方法を基に初期胚の化学物質暴露に対する短期間且つ高感受性の安全性評価手法を開発する。本分担研究では、必要に応じて基本的なプロトコルやデータ解析アルゴリズムの開発を行い、以てデータ解析を行う。

B . 研究方法

本研究班に於いては、一般的な病理検査に加え、高感度系として情動認知行動試験を行うが、これらに相対し、フタル酸類が結合する核内受容体の存在が知られていることを踏まえた Percellome トキシコゲノミクス技術による網羅的遺伝子発現解析やエピゲノム解析を行うために、以下の研究開発を行う。

i) マウス胚盤胞からの DNA、RNA 採取

体外受精卵から培養作製・プールした胚盤胞サンプルから、Allprep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN) 或いは ZR-Duet DNA/RNA MiniPrep Kit (Epigenetics) を用いて DNA 及び RNA を同時に採取した。得られた DNA、RNA は BioAnalyzer (Agilent Technology)、Qubit Fluorometer (Life Technologies)、Nanodrop (Thermo Scientific) を用いて収量および品質 (分解の程度や夾雑物の有無) を評価した。

ii) 微量サンプルへの Percellome 法適用

Percellome 法とは mRNA 発現量を細胞 1 個当たりのコピー数として絶対定量する技術 (特許第 4415079 号) であり、遺伝子発現を網羅的且つ高精度に解析するために必須の技術であるが、本研究への適用に際しては、細胞数にして 10^3 個オーダーの微量サンプルへの最適化が必要である。特にサンプルに含まれる細胞数を推測するためのプロトコルの作成を中心に、胚盤胞を 50~100 個プールしたサンプルへの最適化を行った。

iii) 微量サンプルからの GeneChip Expression Array 解析

標準的な Percellome 法を適用して調整したサンプル由来の微量 total RNA (Affymetrix 社 GeneChip 標準プロトコルで指定の 1000 分の 1 量である 5ng、若しくは 250 分の 1 量である 20ng) を元に、微量 RNA 増幅キットの 1 つである Ovation RNA Amplification System V2 (NuGEN) を利用して逆転写及び cDNA 増幅を行い、GeneChip MouseGenome 430 2 (Affymetrix) による網羅的遺伝子発現解析を行った。得られたデータは Percellome 法により絶対量化し、既存のデータとの品質比較を実施した。

iv) Post-bisulfite adaptor-tagging(PBAT) 法の導入

DNA メチル化状態を厳密に評価するためには bisulfite 法による解析が必要だが、オリジナルプロトコルでは大量のゲノム DNA を必要とするため、受精卵や胚盤胞のような微量サンプルへの適

用が難しかった。そこで近年、国際ヒトエピゲノムコンソーシアムで開発された改良法 Post-bisulfite adaptor-tagging(PBAT)法を導入し、Percellome法と同時実施するためのプロトコル最適化を行った。

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の配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する指針のある場合は、その指針を遵守している。(国立医薬品食品衛生研究所は国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の制定になる国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程(平成19年4月版)及び国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子組換え実験安全管理規則の承認を受けて行う。)

C . 研究結果

i) マウス胚盤胞からの DNA、RNA 採取

受精後 72 時間の胚盤胞、約 60 個のプールサンプルから、最大 15ng の DNA を採取することができたが破砕液中の DNA 濃度は薄く、Percellome 標準法で細胞数を推定するための、Picogreen による DNA 含量測定プロトコルの定量限界以下であった。また RNA 収量も Nanodrop、Qbit といった計測機器の検出限界以下であった。ただし BioAnalyzer による電気泳動では、DNA、RNA とも分解像は確認されず品質は良好であったため、大量の胚盤胞を用意すれば Percellome 遺伝子発現解析と DNA メチル化解析を同時に進めら

れるものと考えられた。

ii) 微量サンプルへの Percellome 法適用

実際には高品質を保ったまま胚盤胞を大量生産することは難しいため、Percellome 法プロトコルを一部調整し、微量サンプルに最適化する必要がある。とりわけ 50~100 個の胚盤胞プールの破砕液は、既存の Picogreen 試薬を用いた DNA 含量測定プロトコルで処理するには薄すぎるため、サンプルに含まれる細胞数を示す新たな指標が必要であった。受精後 72 時間の胚盤胞はほぼ一定数の細胞から構成されると予想されたため、プールした胚盤胞数をサンプル破砕液中の細胞数の指標とすべく、胚盤胞を DAPI にて核染色し、蛍光顕微鏡下にて構成細胞数を計測したところ、平均 20 個(標準偏差 1)であることが判明した(安彦分担研究者の解析による)。

この計測結果を Percellome 用の外部 RNA スパイクの添加量を計算する際の指標とすべく、Percellome 標準法で ES 細胞や全胚サンプルに対して設定している添加量係数と、細胞 1 個当たりのゲノム DNA 量の推定値を元に、胚盤胞 1 個(細胞 20 個から構成)当たりに添加すべき量、 1×10^{-4} μL を算出した(詳細な展開式は別添参照)。実際に GeneChip で胚盤胞サンプルを解析して、外部 RNA スパイク添加量が適切であることを確認した。

iii) 微量サンプルからの GeneChip Expression Array 解析

GeneChip の標準プロトコルに比べ

1000分の1量のtotal RNAで網羅的な遺伝子発現解析を行うべく、増幅効率性の高いOvation RNA Amplification System V2 (NuGEN)を利用してサンプル調製を行い、GeneChip Mouse Genome 430 2 (Affymetrix)にてトランスクリプトームデータを取得した。同一サンプルを用いGeneChip標準プロトコルにて取得したトランスクリプトームデータと比較したところ、両者の間には発現レベルに応じて増幅効率にかなりの差があったが、順位変動のような非線型の大きな差異は中～高発現域には少なく、適切な情報処理を行えば、ある程度の精度で相互比較が可能と考えられた。

実際に胚盤胞を約50個プールしたサンプルに対して、C - ii)の胚盤胞数を基準とした計算式により外部RNAスパイクを適量添加してtotal RNAを抽出、以後、上記と同じプロトコルにてGeneChip解析を行い、正常にデータを取得できることを確認した。

iv) Post-bisulfite adaptor-tagging(PBAT)

法の導入

DNAメチル化状態の精密評価に関しては、約60個の胚盤胞からPBAT法で処理可能な量のゲノムDNAを取得できているため、本年度はPercellome法に最適化したDNA、RNA抽出操作がPBAT法に問題を起こさないかどうかの検証を中心に、試験測定を実施した。

具体的にはマウス肝および全脳サンプルを用いて、PBAT法による次世代シーケンサ用ライブラリを作成し、

MiSeq (Illumina)にて解析した結果、ライブラリ作成手技的にもデータ品質的にも特に問題なくデータを取得可能であることが確認された。

D . 考察

一部プロトコルの新規開発と既存のプロトコルの改良により、本研究体制で生産することの出来る胚盤胞プールサンプルに相当する 10^3 個オーダーの細胞から定量的で網羅的な遺伝子発現解析およびDNAメチル化解析の実施を可能とした。一般的なsingle cell analysisと異なり、十分量のRNAサンプルを元に生成したトキシコゲノミクスデータと比較可能な高精度データを得るプロトコルを整えたことは、我々が構築した世界有数規模のトキシコゲノミクスデータベース(Percellomeデータベース)を本研究で活用可能とするものであり、解析の精度、効率を高める。

これらの成果により、来年度からの本実験を厳密且つ効率的に実施する準備が整ったと考えられる。

E . 結論

本年度は、微量の混入化学物質による暴露影響を厳密に実施するための解析プロトコル開発、改良を進め、条件設定を完了した。今後、計画を実施し、分子機序の解析に基づく安全性評価研究を行う。

F . 研究発表

1 . 論文発表

Tanaka M, Aisaki K, Kitajima S, Igarashi K,

Kanno J and Nakamura T, Gene expression response to EWS-FLI1 in mouse embryonic cartilage. Genomics Data (2014); 2: 296-298.

Tanaka M, Yamazaki Y, Kanno Y, Igarashi K, Aisaki K, Kanno J, Nakamura T. Ewing's sarcoma precursors are highly enriched in embryonic osteochondrogenic progenitors. J Clin Invest. (2014);124(7):3061-74.

Janesick A, Nguyen TT, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima S, Chandraratna RA, Kanno J, Blumberg B. Active repression by RAR γ signaling is required for vertebrate axial elongation. Development. (2014);141(11):2260-70.

2 . 学会発表

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Percellome Toxicogenomics, 50th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2014) (2014.9.9)Edinburgh, UK, poster

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Percellome toxicogenomics project as the 3R-toxicology and the foundation of in vitro- and in

silico-toxicology, the 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC9) (2014.8.27), Prague, Czech Republic, Oral

相崎健一、北嶋 聡、菅野 純、遺伝子発現から見た毒性学 Percellome トキシコゲノミクスの進捗、第 36 回日本中毒学会総会・学術集会(2014.7.25) 東京、シンポジウム

北嶋 聡、小川幸男、大西 誠、相磯成敏、相崎健一、五十嵐勝秀、高橋祐次、菅野 純、シックハウス症候群レベルの極低濃度吸入暴露時の海馬 Percellome トキシコゲノミクス - 化学構造が異なる 3 物質の比較 -、第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014.7.3) 神戸、口演

菅野 純、相崎健一、北嶋 聡、Percellome Project の進捗 新型反復暴露による慢性毒性の予測に向けての分子背景の解析、第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014.7.2)神戸、シンポジウム

G . 知的所有権の取得状況

1 . 特許取得

なし

2 . 実用新案登録

なし

3 . その他

なし