厚生労働科学研究（H26-化学-指定-002）

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

分担研究報告書

Percellome トキシコゲノミクス技術を用いた分子機構解析研究

研究代表者　相﨑 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不足している科学的情報を、マウスを用いて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。

平成 26 年度に実施した基盤研究、(a) サンプルや実験環境中の DEHP、MEHP の高感度測定系の確立、(b) マウス体外受精から胚盤胞までの培養条件の最適化、(c) 胚移植による個体の安定作出、(d) 微量サンプルの網羅的遺伝子発現のための定量プロトコル開発（Percellome 法*の改良）を基に、平成 27 年度、本分担研究では(e) 微量の胚盤胞サンプルから高品質の DNA、RNA を抽出する方法の最適化、(f) 微量 DNA サンプルにおける DNA メチル化解析技術の比較検討、を実施した。さらに安定した微量曝露が可能であった MEHP については曝露受精卵の遺伝子発現解析を実施し、現在、DNA メチル化解析を進めている。

（*） 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

体外受精に用いる培養液中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おいて不足している科学的情報を、マウスを用いて取得すると共に、初期胚の化学物質曝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。

B．研究方法

本研究に於いては、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や、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。

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)を用いてDNAを、また RNAeasy RNA Mini Kit (QIAEN)を用いてRNAを採取した。得られたDNA、RNAはBioAnalyzer (Agilent Technology)、Qubit Fluorometer （ Life Technologies ）、 Nanodrop (Thermo Scientific)を用いて収量及び分解の程度を確認した。

ii）微量サンプルへのPercellome法適用

Percellome 法とは 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、サンプルDNA濃度測定によるサンプル中の細胞数推定が困難であるため、本研究では、プールした胚盤胞数からサンプル中の細胞数を推測する最適化プロトコルを開発(H26 年度成果）して利用した。

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

上記i)、ii)に則り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標準プロトコルの1000分の１程度の量である 5ng、20ng）を元に、Ovation RNA Amplification System V2 (NuGEN)を利用して 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法に準じて絶対量を推測し、既存のPercellomeデータベースとの比較を実施した。

iv) 微量サンプルにおける DNA メチル化解析技術の比較検討

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い。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)法に加え、最近Swift社からリリースされた Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を導入し、比較検討を行った。

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的配慮を十分行い、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・動物実験等の適正な実施に関する規程（平成27年4月版））

C．研究結果

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

MEHP を添加（最終濃度 0μM,0.5μM,5.0μM）した培地中で受精卵を3日間培養し、得られた胚盤胞を50個ずつプールして3群（各n=3）のサンプルを得

て B-i), ii), iii)に則り GeneChip による網羅的遺伝子発現データを得た。

MEHP 曝露により有意差(t-test $p<0.05$)を呈する 2518 遺伝子を対象に、群内分散が%CV<100 となる発現域にある 199 遺伝子(図 1)について詳細な検討を行った。用量相関のある遺伝子として、MEHP 曝露により発現誘導される傾向のある 15 遺伝子(Exoc6, Ptgr2, Vamp4, Ttc37, Zfp639, Slc25a19, Zfp322a, Sgpl1, Mll1, Zfp42, Vps37a, Mcmbp, Nup54, Nus1, Evl)、及び発現抑制される傾向のある 10 遺伝子(Htatsf1, Retsat, Senp2, Csnk2a2, Smndc1, Gcnt2, Zfp212, Eras, Runx1, Nkx6-2)を最終的に抽出した。これらの中には、DNA メチル化や、形態形成、精子形成、神経系発達に関わる遺伝子が存在し、潜在的な標的として興味深いが、発現変動量はいずれも極僅かであった。

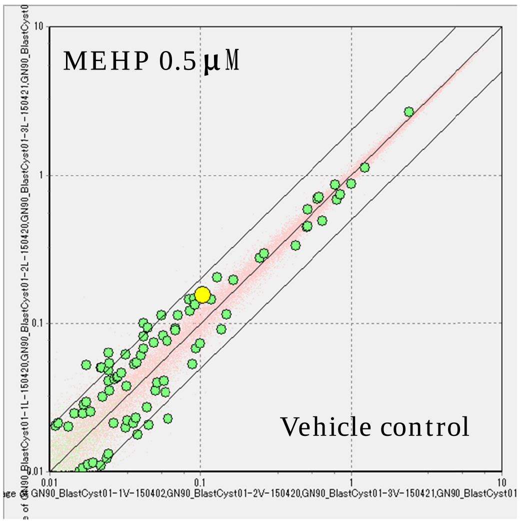

図 1 MEHP 曝露による遺伝子発現変動(緑点、黄点は $p<0.05$)。薄赤点は有意差のない遺伝子。黄点は一例として DNA メチル化に関与する Mll1 遺伝子を示す。対角線上下の 2 倍変動線を越えるものはほとんど無かった。

iv) 微量サンプルにおける DNA メチル化解析技術の比較検討

DNA メチル化状態の精密評価に関しては、H26 年度に約 60 個の胚盤胞から抽出可能な量に相当するマウス DNA を用いて PBAT 法を試行しており、解析可能なデータを得られることを確認済みであるが、本研究で用意できる胚盤胞サンプルはさらに少量となる可能性がある(フタル酸曝露による受精卵発育不全の可能性があった)ため、より微量 DNA サンプルにも対応可能な Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit(Swift 社)についても同様の検討を行った。その結果、PBAT 法よりも多いリード数(シーケンスした DNA 断片の数)を獲得可能であり、より信頼性の高いデータが得られることが確認できた。

現在、Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library Kit を用い、iii)と同等の MEHP 曝露サンプルについて網羅的 DNA メチルか解析を実施中である。

D. 考察

MEHP に関しては計画通り曝露実験を進めているが、網羅的な遺伝子発現解析の結果、発現変動は極僅かであった。ただし発現変動のあった遺伝子の中には神経系発達や DNA メチル化に関与するものもあり、実施中の情動認知行動解析や DNA メチル化解析の結果を加味して総合的に評価する必要がある。

E. 結論

MEHP については平成 27 年度計画通り

曝露実験を進め、胚盤胞レベルでの網羅的遺伝子発現やDNAメチル化解析から、個体レベルでの情動認知行動解析まで実施して分子機序の解析に基づく安全性評価研究を行った。

F．健康危険情報

なし

G．研究発表

１．論文発表

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 RARγ signaling is required for vertebrate axial elongation., Development. (2014);141(11):2260-70.

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. (2013) Oral administration of pentachlorophenol induces interferon signaling mRNAs in C57BL/6 male mouse liver. J Toxicol Sci. 38(4):643-54.

２．学会発表

Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki and Jun Kanno, Dynamic biomarkers translatable to clinical outcomes generated by Percellome Toxicogenomics, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology(ASIATOX2015) (2015.6.24), Jeju, Korea

北嶋 聡、種村健太郎、古川佑介、小川幸男、高橋祐次、大西 誠、相磯成敏、相﨑健一、菅野 純
シックハウス症候群レベルの極低濃度曝露の際の海馬における Percellome 法による吸入トキシコゲノミクスと遅発性中枢影響解析
第42回日本毒性学会学術年会(2015.6.30)

菅野 純、相崎 健一、北嶋 聡
Percellome Toxicogenomics における動的バイオマーカー(Dynamic Biomarker)のカタログ化とその毒性予測利用
第42回日本毒性学会学術年会(2015.7.1)

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics for Mechanistic Analysis Towards Chronic Toxicity by a Newly Designed Repeated Dose Study, 51st Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX2015) (2015.9.15), Porto, Portugal

H．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