

別添 4

. 分担研究報告書

厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）
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）

分担研究報告書
Perce llome 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 室長

研究要旨

平成 20-22 年度に実施された厚生労働科学研究（H20-化学-一般-002）において^{*1}、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（フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP) 0.2 μM 及びフタル酸モノ-2-エチルヘキシル(MEHP) 0.5 μM)が検出されたことを受け、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取得するため、マウスを用いた研究開発を行うに際し、その分担研究として受精卵及び受精卵を母胎に移植して生まれたマウスの海馬における網羅的遺伝子発現解析や DNA メチル化解析を実施した。なお海馬の解析については別途行われた MEHP 曝露胚盤胞を母胎に移植して生まれたマウスにおける情動認知行動解析に対応するものである。

安定した微量曝露が可能であった MEHP については計画通り曝露胚盤胞及のマイクロアレイによる遺伝子発現解析及び次世代シーケンサーによる全ゲノム網羅的 DNA メチル化解析を行うこととした。一方、DEHP については、実際の不妊治療で一般的に採用されている流動パラフィン重層培養法では、培養開始時の添加濃度に依らず培養終了時(3 日後)には培養液中 DEHP 濃度が著減する^{*3}ことが判明したため、流動パラフィンを重層せずに受精卵の DEHP 曝露実験を行うこととした。

平成 28 年度は、MEHP 曝露受精卵を母胎に移植して生まれたマウスの海馬におけるマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析及び次世代シーケンサーを用いた全ゲノム網羅的 DNA メチル化解析、及び ES 細胞、EpiS 細胞におけるマイクロアレイによる遺伝子発現解析を実施した。海馬の遺伝子発現解析では顕著な変動を呈する遺伝子は無かったが、海馬に発現し、postsynaptic density、long-term potentiation に関与して、学習機能に影響を与える Camk2a が発現誘導される一方、内向き整流カリウムチャンネルの一種で、海馬の pyramidal 細胞層に高発現して神経細胞の情報伝達機能に必要な静止膜電位の維持に関与する Kcnj13 が発現抑制を受けるなど、別途観察された行動異常(音-連想記憶能の低下)との関連性が示唆される結果を得た。一方、DEHP は胚発生を阻害するためサンプリングした細胞の状態が悪いことから^{*4}、DEHP 0, 0.2, 2.0 μM の各サンプルでマイクロアレイによる

遺伝子発現の解析を実施したものの、細胞増殖、細胞死関連のシグナルが強く誘導され、その原因となる初期シグナルの検出が困難であった。

-
- (*1) 研究課題：化学物質へ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
 - (*2) 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
 - (*3) 2.0 μ M 以下の培養液中 DEHP は、ほぼ全量が重層した流動パラフィンに移行すると推測される。平成 28 年度にこれを間接的に証明した。
 - (*4) 死細胞が多く、またほとんどが胚盤胞に到達していなかった。

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、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 (QIAGEN)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。通常は、サンプルの DNA 濃度測定によるサンプル中の細胞数の推定を行い絶対定量を行うが、本研究に用いるサンプルは、微量であることから、この定量法の適用が困難であるため、本研究では平成 26 年度に、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し、以後利用した。

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

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。そこで平成 26~27 年度の評価結果より Accel-NEG Methyl-Seq DNA Library Kit を採用し、次世代シーケンサー NextSeq (Illumina) を使用して全ゲノム bisulfite シーケンス (WGBS) を実施した。得られたデータは bsc2fastq ソフトウェア (Illumina) により fastq ファイルに変換した後、BMap ソフトウェア ([code/google.com/archive/p/bmap](https://code.google.com/archive/p/bmap/)) によりマウスゲノム配列 (mm10) にマッピングし、同梱ソフトウェアの methyratio.py によりメチル化塩基を検出した。さらに R パッケージ methylKit (github.com/al2na/methylKit) を用いて Differential methylation analysis を実施した。

v) マウス海馬からの DNA, RNA 採取

RNA についてはマウス海馬組織を採取後すみやかに RNA later (Ambion 社) に浸し、そのまま 4℃ で一晩浸漬した RNase を不活化する。その後、RNA 抽出操作までは -80℃ にて保存した。抽出に当たっては、RNA later を除いた後、RN easy キット (キアゲ

ン社) に添付される RLT buffer を添加し、ジルコニアビーズを用いて破砕液を調製した。得られた破砕液の 10 μ L を取り、DNA 定量蛍光試薬 Picogreen を用いて DNA 含量を測定した。DNA 含量に応じ、臓器毎にあらかじめ設定した割合で Spike cocktail (Bacillus 由来 RNA 5 種類の濃度を変えて混合した溶液) を添加し、TRIZOL により水層を得、RN easy キットを用いて全 RNA を抽出した。100ng を電気泳動し RNA の純度及び分解の有無を検討した。

DNA については、同マウス海馬組織を採取後、Allprep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した。

vi) GeneChip による網羅的遺伝子発現解析

全 RNA 5 μ g を取り、アフィメトリクス社のプロトコルに従い、T7 プロモーターが付加したオリゴ dT プライマーを用いて逆転写し cDNA を合成し、得た cDNA をもとに第二鎖を合成し、二本鎖 DNA とした。次に T7 RNA ポリメラーゼ (ENZO 社キット) を用い、ビオチン化 UTP, CTP を共存させつつ cRNA を合成した。cRNA はアフィメトリクス社キットにて精製後、300-500bp となるよう断片化し、GeneChip ターゲット液とした。GeneChip には Mouse Genome 430 2.0 (マウス) を用いた。ハイブリダイゼーションは 45℃ にて 18 時間行い、バッファーによる洗浄後、phycoerythrin (PE) ラベルストレプトアビジンにて染色し、専用スキャナーでスキャンしてデータを得た。得られたデータについて、我々が開発した Percellome 手法 (遺伝子発現値の絶対化手法) を適用した網羅的遺伝子発現解析を行った。

vii) マウス ES 細胞、EpiS 細胞の比較

ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞と性質が近いと考えられるマウス由来の EpiS 細胞と、胚盤胞の内部細胞塊由来で EpiS 細胞より多能性が高いと考えられているマウス ES 細胞との間で、DEHP や MEHP を含む化学物質に対する、主としてエピジェネティックな反応の差異を検討するため、同系統マウス由来の EpiS 細胞及び ES 細胞を用いた曝露実験系の確立を行ったうえで、i, ii に準じて RNA を抽出し、GeneChip により網羅的遺伝子発現解析を実施した。

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、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)及び国立大学法人 東北大学環境・安全委員会動物実験専門委員会内規の承認を受けて行う。)

C . 研究結果

マイクロアレイによる遺伝子発現解析

MEHP 曝露(0 μ M, 0.5 μ M, 5.0 μ M)受精卵を母胎に移植して生まれたマウスを 14 週齢まで飼育し、その海馬における網羅的遺伝子発現解析を行い、0.5 μ M 曝露群及び 5.0 μ M 曝露群で共通して有

意に発現量が増加していた 24 遺伝子、及び発現量が低下していた 7 遺伝子を抽出した。顕著な変動を呈する遺伝子は無かったが、海馬に発現し、postsynaptic density、long-term potentiation に関与して、学習機能に影響を与える Camk2a が発現誘導される一方、内向き整流カリウムチャンネルの一種で、海馬の pyramidal 細胞層に高発現して神経細胞の情報伝達機能に必要な静止膜電位の維持に関与する Kcnj13 が発現抑制を受けるなど、別途観察された行動異常(音-連想記憶能の低下)との関連性が示唆される結果を得た。

DNA メチル化状態の精密解析

Accel-NGS Methyl -Seq DNA Library Kit を採用し、MEHP 曝露(V 群 0 μ M、L 群 0.5 μ M 及び H 群 5.0 μ M)の受精卵を 3 日間培養した胚盤胞、及びそれを母胎に移植して生まれたマウスの 14 週齢時の海馬をサンプルとして、全ゲノム網羅的 DNA メチル化解析を実施した。

まず胚盤胞については、各群間におけるゲノム DNA のメチル化状況に相関性が低く(0.4 以下)、個々の CpG サイトについてもメチル化率が様々であることが分かった(図 2a)。一方、MEHP 曝露胚盤胞を母胎に移植して生まれたマウスの 14 週齢時の海馬では、各群間におけるゲノム DNA メチル化状況の相関性は高く(>0.75)、多くの CpG サイトがメチル化修飾を受けていることが分かった(図 2b)。

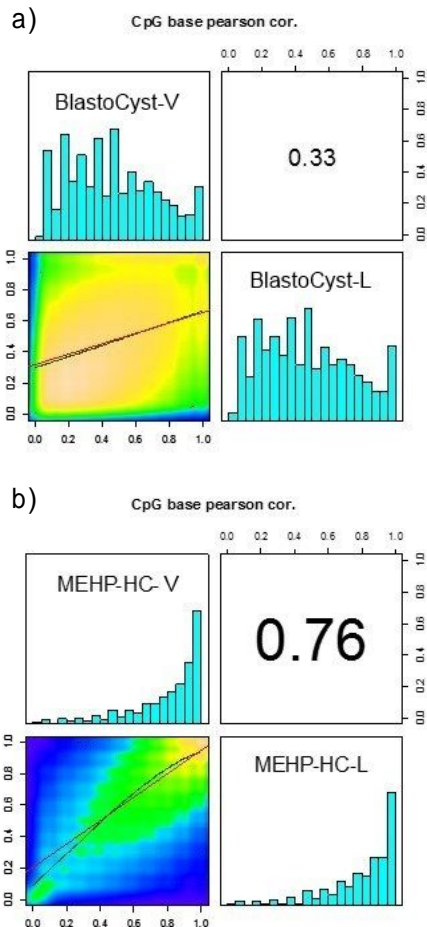


図 2 MEHP 曝露胚盤胞及び、それを母胎に移植し生まれ、成熟したマウスの海馬（14 週齢時）における CpG サイトのメチル化状況。

MEHP 曝露は左上横軸及び左下縦軸が V 群 0 μ M、右下横軸及び左下横軸が L 群 0.5 μ M（受精卵培養液中濃度相当）、a は胚盤胞、b が海馬での解析結果を示す。右上が相関係数、左上、右下のヒストグラムは横軸をメチル化率とする CpG サイトのメチル化率分布を、左下は CpG サイト毎の 2 サンプルでのメチル化率を座標としてプロットしたヒートカラーマップで、青→緑→黄の順に少数→多数を示す。

さらに全ゲノムを塩基単位でメチル化状況を探したが、広範囲に及ぶメチル化状況異常は観察されなかった。

DEHP 曝露実験（流動パラフィン重層なし）

流動パラフィン重層を行わずに体外受精培養を行った場合は DEHP が培養液中に

残留するため、平成 28 年度には、流動パラフィン重層無し状態で DEHP による曝露実験（0 μ M, 0.2 μ M, 2.0 μ M）を実施した。DEHP が胚発生を阻害するため細胞状態が悪く、多くは死細胞でほとんど胚盤胞に到達していなかった。DEHP 0, 0.2, 2.0 μ M の各サンプルでマイクロアレイによる遺伝子発現の解析を実施したものの、細胞増殖、細胞死関連のシグナルが強く誘導され、その原因となる初期シグナルの検出は困難な状態であった。

マウス ES 細胞と EpiS 細胞の比較

ES 細胞、EpiS 細胞の比較では、溶媒群、DEHP 曝露（0.2 μ M）、MEHP 曝露（0.5 μ M）群のそれぞれで、誘導・抑制された遺伝子が 4000~5000ps となり、元となった受精卵の分化段階の差異により、ES 細胞と EpiS 細胞とはトランスクリプトームレベルで比較的大きな差異があることが示された。

D. 考察

MEHP に関しては計画通り、受精卵への曝露実験を進め、マイクロアレイによる遺伝子発現解析及び次世代シーケンサーによる全ゲノム網羅的 DNA メチル化解析を実施した。また出生前のフタル酸類曝露が子の情動認知行動に影響を及ぼす報告（Stephanie M.E. *et. al.* "Prenatal Phthalate Exposure Is Associated with Childhood Behavior and Executive Functioning" *Environ Health Perspect* 118:565-571 (2010)）があることから実施した MEHP 曝露受精卵を母胎に移植して生まれたマウス（14 週齢）におけるマ

イクロアレイによる遺伝子発現解析及び次世代シーケンサーによる全ゲノム網羅的 DNA メチル化解析を実施した。

網羅的な遺伝子発現解析においては、発現変動幅は微弱であるものの、神経系発達や DNA メチル化に関する遺伝子の発現変動が確認された。また全ゲノム網羅的 DNA メチル化解析の結果、14 週時のマウスの海馬には広範囲の DNA メチル化異常は残っており、仮説としては、小規模だが遅発性の発達異常を誘発する原因となる DNA 配列部位の異常なメチル化が誘発されていて、生育後の機能異常を起こしているか、或いは初期胚での DNA メチル化異常が発達過程で何らかの二次的な異常を起こして成育後の機能異常を残した可能性がある。これを明らかにするためには塩基単位の詳細なメチル化解析に加え、発生、発達の各段階での網羅的遺伝子発現解析及び DNA メチル化解析が必要と考える。

E . 結論

MEHP については研究計画通り曝露実験を進め、胚盤胞レベル及び生体マウスの海馬組織での網羅的遺伝子発現や全ゲノム網羅的 DNA メチル化解析を実施し、いくつかの候補遺伝子を抽出した。これらはフタル酸類による受精卵曝露の毒性分子機序に関わると考えられる。

F . 研究発表

1 . 論文発表

なし

2 . 学会発表

Jun Kanno, Satoshi Kitajima, Ken-Ichi Aisaki, Percellome Toxicogenomics of Newly Designed Repeated Dose Study., The 52nd Congress of EUROTOX (第52回欧州毒性学会、EUROTOX2016) (2016.9.6)、Seville, Spain, poster

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

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

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

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

