

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）

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行動認知行動毒性評価系確立に資する研究
分担研究報告書

発生-発達期ビスフェノール A 暴露によるエピジェネティック影響解析

分担研究者 五十嵐勝秀 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・室長

研究要旨

発生 - 発達期における ビスフェノール A 暴露により、成長後に行動変化が生じることが明らかになってきている。昨年度、一時的なビスフェノール A 暴露が持続的な脳機能変化をもたらす分子基盤の候補として、ゲノム DNA のメチル化変化を網羅的な観点から解析した。プロモーター領域に特化し、測定精度も十分とはいえないタイリングアレイを用いての解析であったが、ビスフェノール A 暴露に伴い変化が認められる領域が複数見出された。今年度は、配列レベルの解析が可能で、より測定精度が高い次世代シーケンサーを用いた検討を加えたところ、概ね結果が再現されると共に、タイリングアレイでは検出出来なかった変化も捉えられた。そこで、変化が認められたゲノム領域近傍 (5kb 以内) に存在する遺伝子リストを抽出し、IPA (Ingenuity Pathway Analysis) 解析を行ったところ、Neuropathic Pain Signaling in Dorsal Horn Neurons, Axonal Guidance Signaling, CREB Signaling in Neurons など神経機能に関連する pathway が抽出され、成長後の行動変化への関与が示唆された。

A. 研究目的

中枢神経系が正常に発達する過程に DNA メチル化を始めとするエピジェネティック制御が関わっていることが報告されている。DNA メチル化は主に発達期に確立されることが明らかになっており、その後は細胞の性質を維持する、いわば「細胞記憶」を支える仕組みの一つとして働くと考えられている。よって、DNA メチル化パターンの確立過程に影響を与える化学物質は、細胞の性質を恒久的に変え、その影響が記憶され長く残る深刻な作用を有すると考えられる。

一方で、アグーチイエローマウスを用いた解析により、ビスフェノール A が DNA メチル化

に影響を与えうることが報告されている。アグーチイエローマウスは毛色に関わる agouti 遺伝子上流にトランスポゾンの挿入があり、野生型より agouti 遺伝子の発現が高く、黄色い毛色を示す。そのトランスポゾン配列がメチル化され、agouti 遺伝子の発現が低下すると野生型同様の毛色になる。よって、agouti 遺伝子上流のトランスポゾン配列の DNA メチル化状態を毛色で推測することが可能であり、ビスフェノール A 等の作用が調べられた。その結果、交配前から離乳までの投与により、ビスフェノール A や Genistein が DNA メチル化を変化させるという報告がなされている (PNAS. 2007 :104:p. 13056-13061.)。しかし、これが

agouti 遺伝子上流のトランスポゾン配列に限った作用であるか、ゲノムの他の領域にも生じる影響であるかは不明であり、生理的意義の解明も進んでいない。一方、研究手法の進展により、今やゲノム DNA のメチル化状況を網羅的に調べる手法が開発され利用可能になっている。

本研究ではこの手法を活用し、ビスフェノール A 暴露に伴う中枢神経系の DNA メチル化変化について解析を行う。

B. 研究方法

<マウス海馬からのゲノム DNA 精製>

C57BL/6NCrSlc マウスに交配時から離乳期までビスフェノール A を飲水投与した。飲水中のビスフェノール A の用量は、ビスフェノール A の TDI である 50ug/kg/日を踏まえ、その前後を挟むように、0.1, 1, 10ppm とした。15 週齢時に雄から海馬を採取後、ゲノム DNA をキアゲン社 All prep DNA/RNA mini kit により精製した。

<メチル化 DNA の分離精製>

海馬から抽出精製したゲノム DNA を超音波処理にて破砕し、100~500bp の断片とし、メチル化 DNA 結合蛋白質 MBD2 を用いたメチル化 DNA の分離精製を行った。詳細は本操作をキット化している EpiXplor Methylated DNA Enrichment Kit (タカラバイオ社) のプロトコールに従った。

<次世代シーケンサーによる解析>

NEB 社のライブラリー調製キット (NEBNext ChIP-Seq Library Prep Master Mix Set for Illumina) にて、次世代シーケンサー用ライブラリー DNA を調製し、イルミナ社 Miseq によってシーケンスデータを取得した。

<データ解析>

イルミナ社 Miseq から排出されるシーケンスデータファイル (fastq 形式) を、CLC bio 社のソフトウェア (CLC Genomics Workbench)

を用いてマウスリファレンスゲノム配列 (mm9) にマッピングし、結果を bam 形式のファイルとして出力させ、アジレント社のソフトウェア (Avadis NGS) によって解析した。

(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、下記、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。「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)」

C. 研究結果

昨年度、ビスフェノール A 曝露に伴う成体海馬の DNA メチル化状況を網羅的に調べた。その際に用いたのは、メチル化シトシン DNA 断片を濃縮する方法によって得た DNA 断片を、遺伝子のプロモーター領域に特化したタイリングアレイにハイブリシ検出する方法であった。この方法は当時実施可能な DNA メチル化状況の網羅的解析法として最適な選択ではあったが、RNA 解析用のアレイと異なり、パーフェクトマッチ、ミスマッチの区別によるハイブリ特異性を考慮した解析が出来ないなど、課題が残る手法であった。

そこで本年度は、タイリングアレイで得られた結果の検証も含め、より精度の高い手法を用いた解析を実現すべく、次世代シーケンサーによる解析を可能とすべく技術導入を図った。プラットフォームとしては、イルミナ社の次世代シーケンサーを選んだ。

次世代シーケンサーは発展中の技術であることもあり、メーカーが推奨するキット、プロトコール通りに実施しても理想的な結果が得られないことがあった。実際、クラスター密度 (最終的に得られるリード数に反映) が低くとどまる現象が続いた。メーカーの技術担当者とは頻繁にやり取りを行い、その主因が調製したライブラリーをアルカリ変性させる際の NaOH 濃度が高いためであることをつきとめられたの

で、実データの取得に移った。本技術の導入に予想以上の試行錯誤を要したが、現在は自身のラボでシーケンスを行い、データ解析可能な状況となっている。

DNA メチル化状況の網羅的な解析にあたっては、MBD2 のメチル化シトシン結合領域を用いてメチル化シトシン DNA 断片を濃縮し、次世代シーケンサーによってシーケンスを取得する方法を用いた。得られたシーケンスデータをマウスゲノム配列 (mm9) にマッピングし、不良リードを除去した。その結果、リード数は各々約 5000 万リードとなった。

次に、ビスフェノール A サンプルの方がコントロールサンプルよりもマッピングされたリードが多い領域の検索を行った。Enriched Region Detection という解析アルゴリズムを用い、Enrichment factor を 20 に設定 (数値が高いほど差が大きい) して検索したところ、1384 ヶ所の領域が抽出された。これらの領域の中には昨年度タイリングアレイを用いた解析で得られた Olfactory receptor 遺伝子がクラスターを形成している領域も含まれていたが、それ以外の領域も多く含まれていた。そこで、それらの領域の近傍 (5kb 以内) に存在する遺伝子を検出し (748 遺伝子)、Ingenuity Pathway Analysis にかけて (702 遺伝子がマップされた)、何らかの機能カテゴリーの傾向が見出せないか検討した。その結果、Canonical Pathway として、Neuropathic Pain Signaling in Dorsal Horn Neurons, Axonal Guidance Signaling, CREB Signaling in Neurons などが、Bio Function として、Neurological Disease, Cellular Assembly and Organization, Nervous System Development and Function, Cellular Function and Maintenance, Molecular Transportなどが抽出された (図1)。これらは神経機能に関連する機能カテゴリーであり、その意義が注目される。

D. 考察

昨年度実施したタイリングアレイを用いた

検討により、ビスフェノール A の発生-発達期暴露によって海馬ゲノムの DNA メチル化が変化することが示唆された。しかし、手法の限界もあり、より測定精度が高く、網羅性にも優れた手法を用いた検討が必須であると考えられた。そこで本年度は DNA 配列レベルで測定が可能な次世代シーケンサーによる DNA メチル化状況の網羅的測定を行った。その結果、タイリングアレイでの結果と同様に、DNA メチル化変化が示唆される結果が得られた。

特に注目されるのは、Pathway 解析によって、客観的に抽出された遺伝子リストから神経機能に関連する機能カテゴリーが選び出されたことである。遺伝子発現変化の網羅的解析からも神経細胞機能不全が推察される結果が得られており、ビスフェノール A によるエピジェネティック影響が実在することを示唆する結果として注目される。

E. 結論

発生 - 発達期のマウスへのビスフェノール A 飲水投与により、成長後の海馬の DNA メチル化状況に変化が生じることが示唆された。その結果の検証を進めるとともに、生理的意義の解明を進めることが肝要である。また、DNA メチル化影響の持続性を踏まえ、成長後更に時間が経過した際の行動影響の検討も視野に入れる必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

Okuno Y, Ohtake F, Igarashi K, Kanno J, Matsumoto T, Takada I, Kato S, Imai Y. Epigenetic Regulation of Adipogenesis by PHF2 Histone Demethylase. Diabetes. 2012 Dec 28. [Epub ahead of print]

Fujimoto H, Woo GH, Inoue K, Igarashi K, Kanno J, Hirose M, Nishikawa A, Shibutani M. Increased cellular distribution of vimentin and Ret in the cingulum induced by developmental hypothyroidism in rat offspring maternally exposed to anti-thyroid agents. Reprod Toxicol. 2012 Aug;34(1):93-100.

Igarashi K, Kitajima S, Aisaki K, Tanemura K, Taquahashi Y, Moriyama N, Ikeno E, Matsuda N, Saga Y, Blumberg B, Kanno J. Development of humanized steroid and xenobiotic receptor mouse by homologous knock-in of the human steroid and xenobiotic receptor ligand binding domain sequence. J Toxicol Sci. 2012; 37(2): 373-380.

学会発表

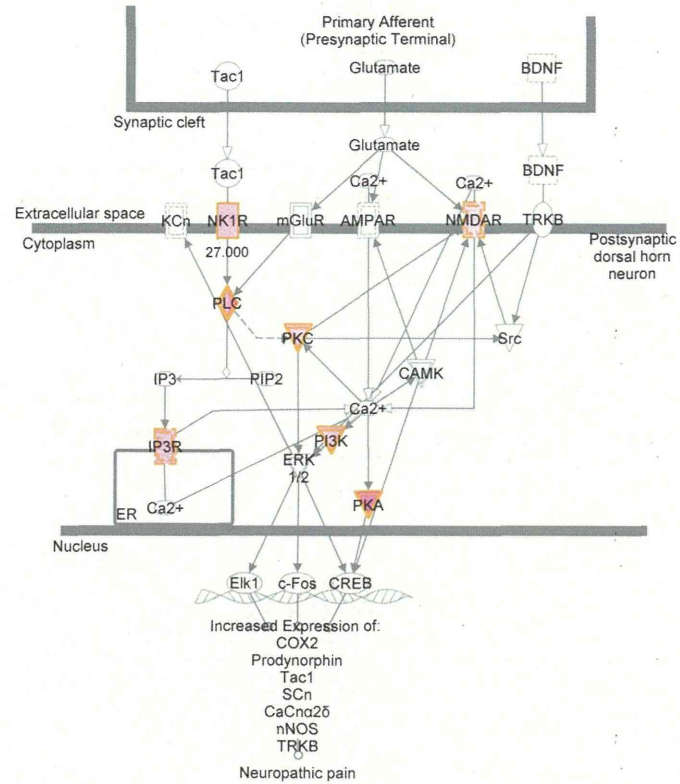
五十嵐勝秀「エピシエネティック毒性」第13回日本毒性学会生涯教育 講習会における招待講演
2012年7月, 仙台

五十嵐勝秀「エピゲノム変化か関与する毒作用発現」環境エヒケノミクス研究会 第7回定例会
における招待講演 2012年5月, 東京

H. 知的財産所有権の出願、登録状況
特になし

A)

Neuropathic Pain Signaling in Dorsal Horn Neurons



B)

CREB Signaling in Neurons

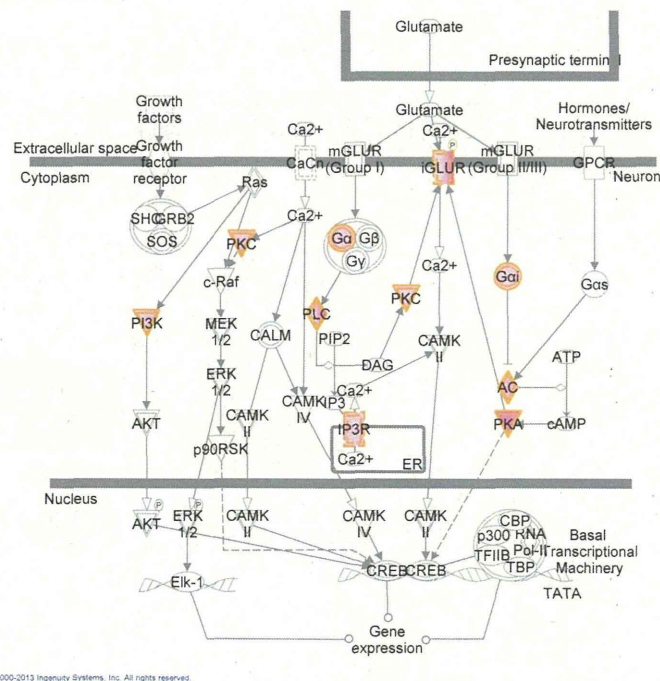


図 1. 網羅的 DNA メチル化解析によって抽出された遺伝子リストから選択された pathway の例。A) Neuropathic Pain Signaling in Dorsal Horn Neurons, B) CREB Signaling in Neurons

H24種村班班会議
2013.3.4

発生-発達期ビスフェノールA暴露による エピジェネティック影響解析

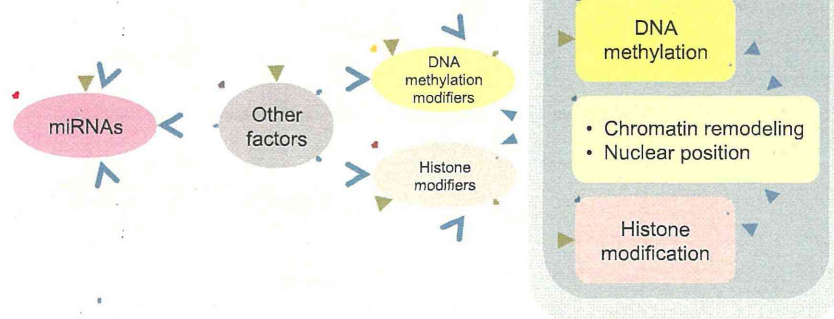
五十嵐 勝秀
国立医薬品食品衛生研究所・
安全性生物試験研究センター・毒性部

1

Epigenetic toxicity

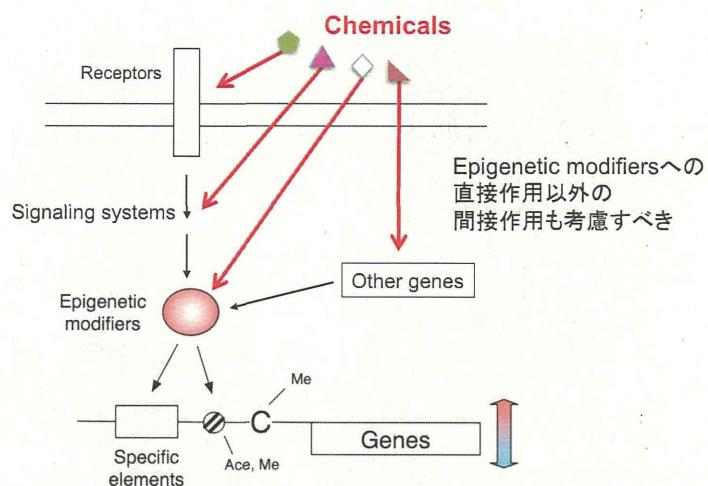
Chemicals

direct effect
mutual effect



2

エピジェネティック毒性

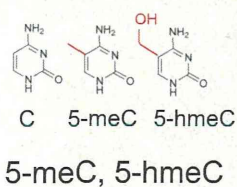


3

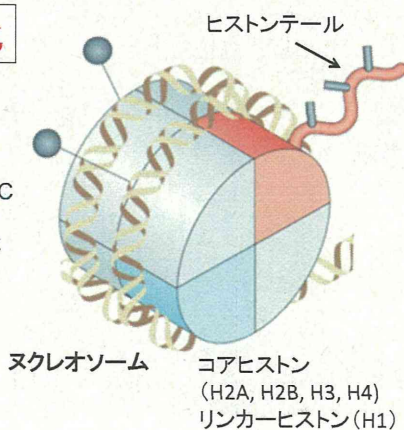
エピジェネティック制御の化学的実体

- 実体はDNAメチル化とヒストン修飾 -

DNAメチル化

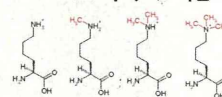


転写抑制



ヒストン修飾

アセチル化
メチル化
リン酸化
ユビキチン化



例: リジンメチル化

転写調節は
一方向ではない

Nature Reviews Geneticsより改変

4

BPAのDNAメチル化影響？

Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development

Dana C Dolinoy, Dale Huang, and Randy L Jirtle PNAS Dolinoy, D. C., Huang, D., & Jirtle, R. L. (2007), 104(32), 13056–13061.

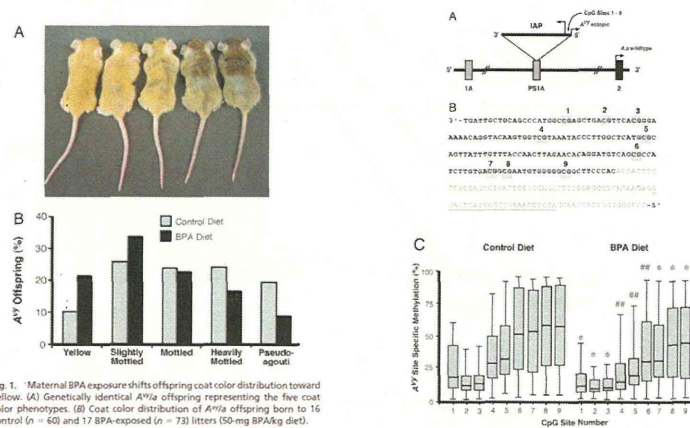


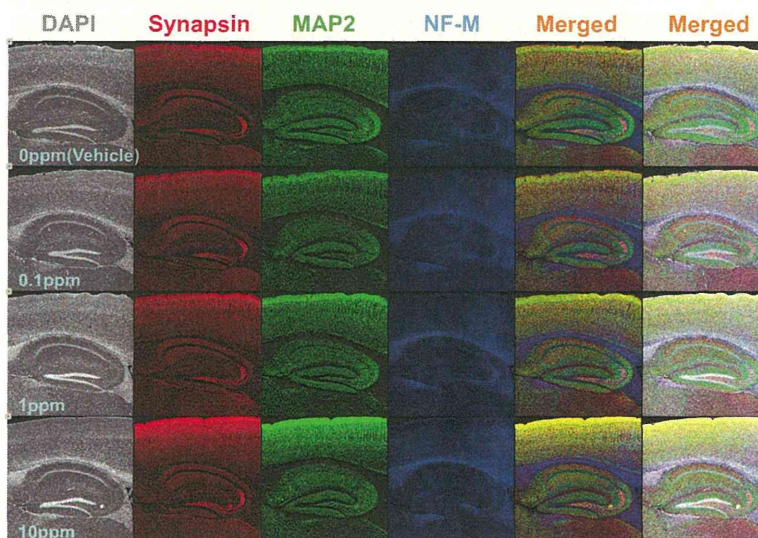
Fig. 1. Maternal BPA exposure shifts offspring coat color distribution toward yellow. (A) Genetically identical *Aya* offspring representing the five coat color phenotypes. (B) Coat color distribution of *Aya* offspring born to 16 control ($n = 60$) and 17 BPA-exposed ($n = 73$) litters (50-mg BPA/kg diet).

BPA: 5mg/kg飼料 交配2週間前～離乳まで

Bisulfite処理しPCR増幅後、ゲル泳動によるシーケンス

5

BPA曝露によるタンパク発現上昇



BPA0,0.1,1,10ppm #1 HP&CX x6

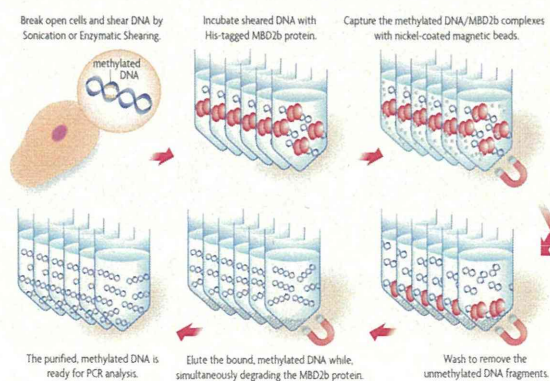
BPA暴露によるDNA methylation変化の解析

<実験条件>

BPA暴露:	0, 0.1, 1, 10ppm (飲水)
暴露期間:	交配前から離乳まで
サンプル採取時期:	雄成体
採取部位:	海馬
n数:	4
解析方法:	MBD2-IP and promoter array
データ解析:	TAS (Tilling array analysis software), Bandwidth: 250, control: Genomeで計算し、各群のデータとする。 合わせて、controlを0ppmにした計算も行い、0.1, 1, 10ppmでの変化領域同定に用いる。

7

- MBD2蛋白を用いたメチル化DNA断片の濃縮 -



Active motif社

8

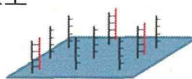
MeDIPを用いた網羅的DNAメチル化解析

手順:

1. メチル化DNA断片の回収
2. Genome tiling arrayにて濃縮領域を同定
3. 配列の特徴を解析

GeneChip Mouse **Promoter** 1.0R Array
(Affymetrix)

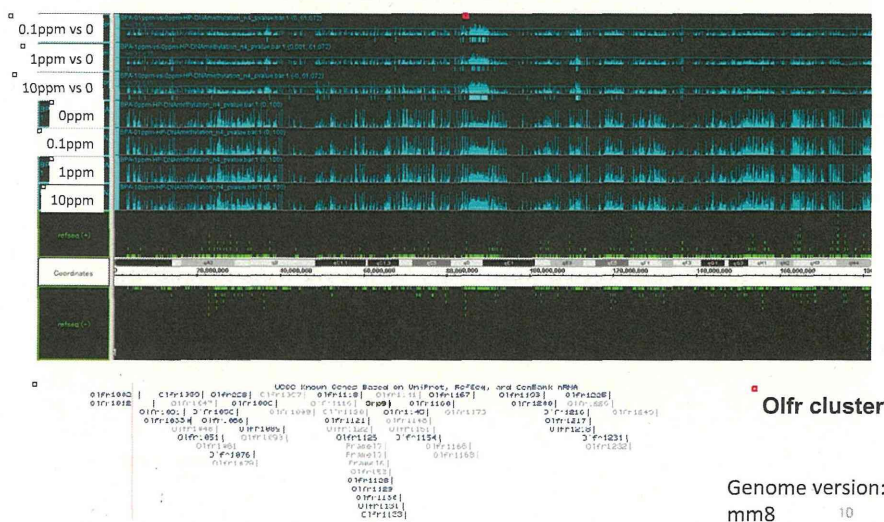
- Promoter: 25,500以上
- Perfect Match probes: 4,600,000以上
- Probe長さ: 25 bp
- Probe間隔: 35 bp



9

Chr2

変化が顕著な領域を赤枠で囲んだ。



次世代シーケンサー: Miseq (イルミナ)



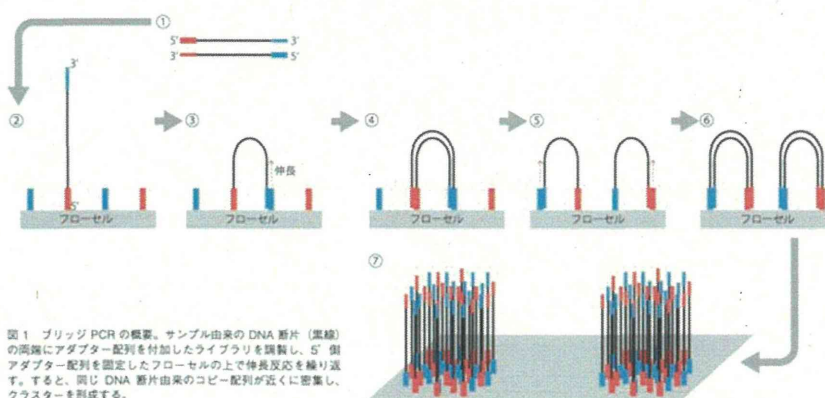
特長

- ・最速のランタイム: サンプルからデータまで最短8時間
- ・使いやすさを追求したデザイン: 圧倒的なスピードを誇るサンプル調製と、クラスター形成とデータ解析を一体化した自動化システム
- ・高いスループット: **1ランあたり約8Gbのデータ量と、最高で2000万-2500万リードを産出**
- ・実績のある次世代シーケンスミストリー: 最も高精度な変異検出と高品質データ
- ・幅広いアプリケーション: キャピラリーシーケンサーアプリケーションに加えて、強力な低コスト、スピーディな次世代シーケンサーアプリケーションもカバー

11

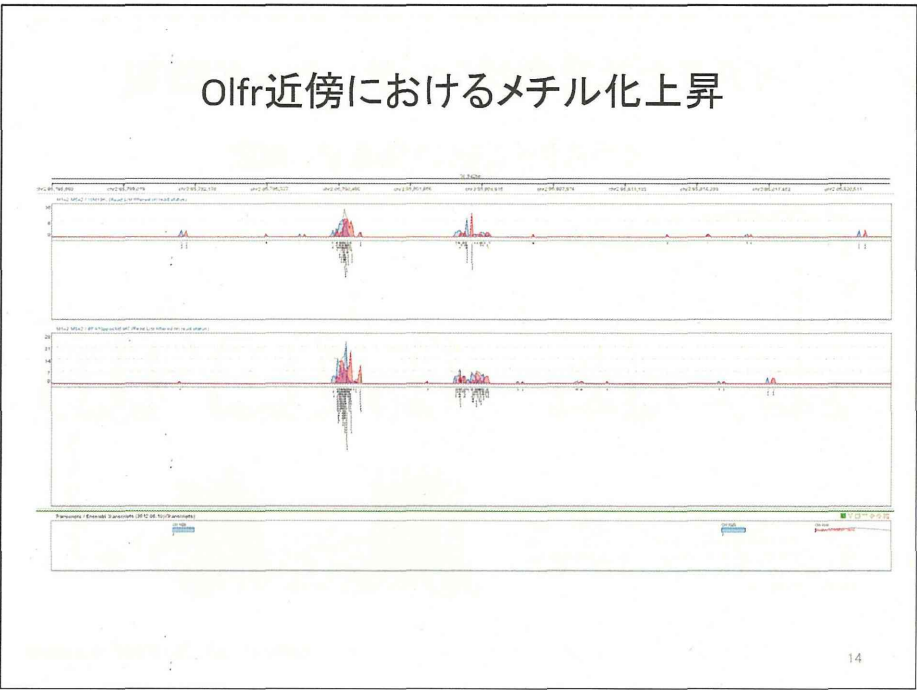
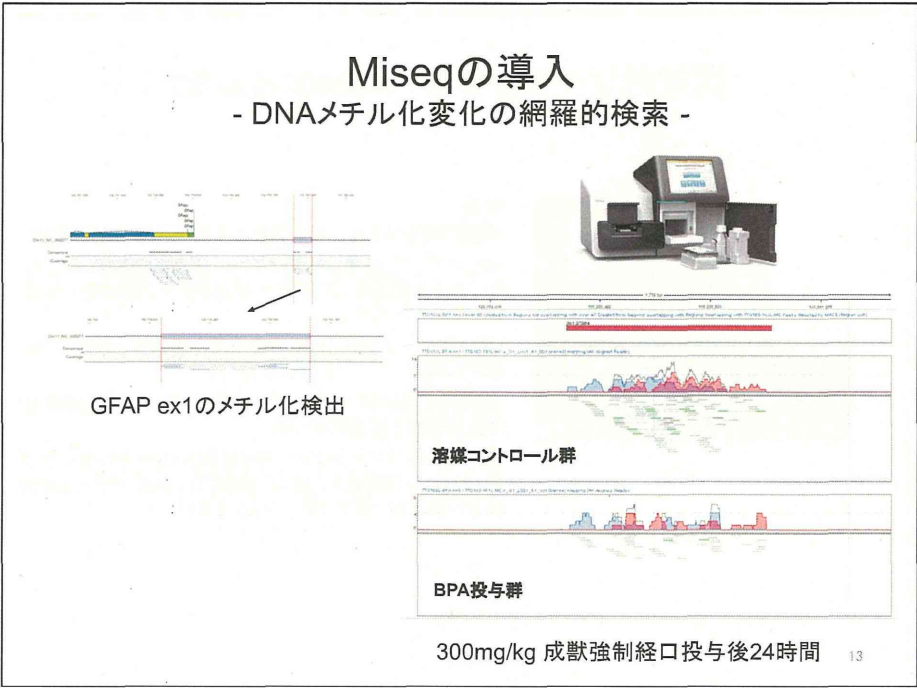
イルミナ社次世代シーケンサーの原理

クラスターごとに1塩基ずつ測定



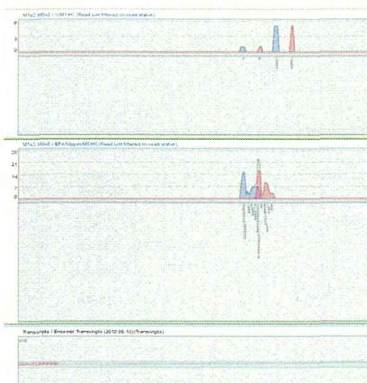
BioGARAGE 2012年12月号より抜粋

12

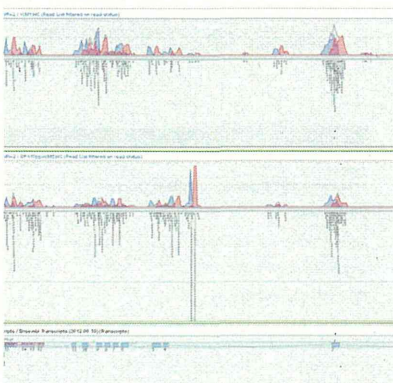


Olfr以外において見出された メチル化上昇領域候補

Grind2



Plcd1



15

高メチル化DNA領域の近傍遺伝子リスト

BPA / Vehicle > 20の条件でDNA領域を抽出

→ 1384領域



5000kb以内に存在する遺伝子を抽出

→ 748遺伝子



Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

16

IPA解析

Top Networks

ID	Associated Network Functions	Score
1	Cellular Assembly and Organization, Cellular Function and Maintenance, Cell Morphology	38
2	Embryonic Development, Organismal Development, Connective Tissue Development and Function	38
3	Cell Morphology, Cellular Function and Maintenance, Glomerular Injury	34
4	Drug Metabolism, Energy Production, Hereditary Disorder	28
5	Gene Expression, Cellular Development, Cancer	28

Top Canonical Pathways

Name	p-value	Ratio
Neuropathic Pain Signaling In Dorsal Horn Neurons	8.24E-05	12/108 (0.111)
tRNA Splicing	8.37E-05	7/45 (0.156)
Molecular Mechanisms of Cancer	9.3E-05	25/378 (0.066)
Axonal Guidance Signaling	1.06E-04	23/465 (0.062)
fMLP Signaling in Neutrophils	1.74E-04	12/129 (0.093)

17

IPA解析

Top Bio Functions

Diseases and Disorders

Name	p-value	# Molecule
Hereditary Disorder	7.03E-06 - 3.20E-02	100
Auditory Disease	7.26E-06 - 3.20E-02	16
Neurological Disease	7.26E-06 - 3.20E-02	118
Ophthalmic Disease	7.26E-06 - 3.20E-02	32
Cardiovascular Disease	3.26E-05 - 3.20E-02	70

Molecular and Cellular Functions

Name	p-value	# Molecule
Cellular Assembly and Organization	1.35E-05 - 3.20E-02	93
Cellular Function and Maintenance	1.35E-05 - 1.93E-02	75
Nucleic Acid Metabolism	2.16E-05 - 3.07E-02	30
Small Molecule Biochemistry	2.16E-05 - 3.20E-02	54
DNA Replication, Recombination, and Repair	3.36E-05 - 2.52E-02	11

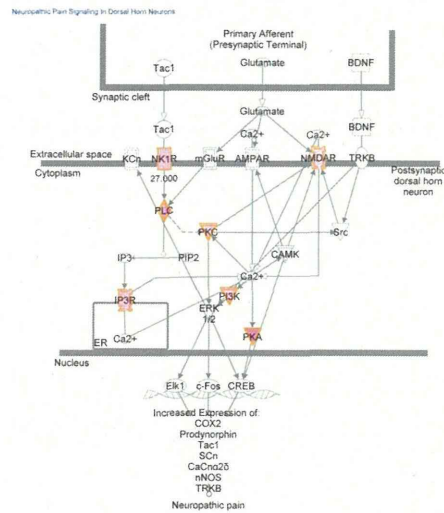
Physiological System Development and Function

Name	p-value	# Molecule
Behavior	2.18E-05 - 1.41E-02	22
Cardiovascular System Development and Function	1.27E-04 - 3.20E-02	80
Endocrine System Development and Function	1.27E-04 - 2.44E-02	6
Nervous System Development and Function	1.27E-04 - 3.17E-02	80
Tissue Development	1.27E-04 - 3.20E-02	96

18

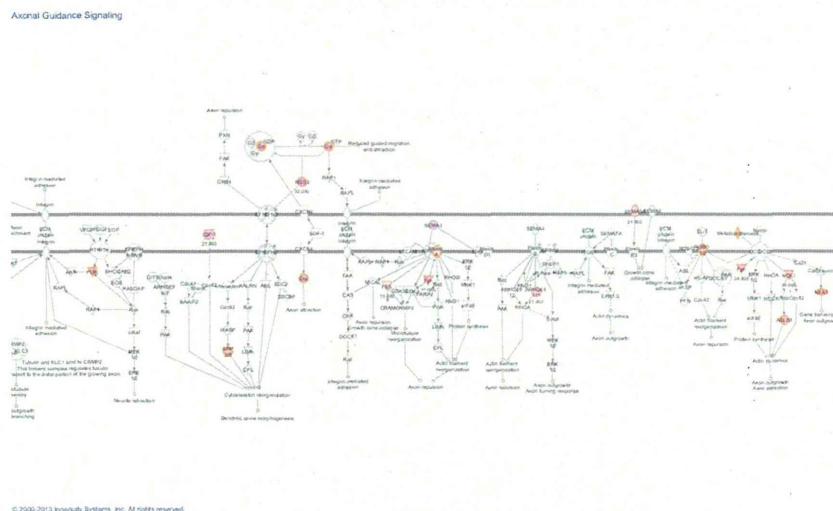
Canonical Pathways

Neuropathic Pain Signaling in Dorsal Horn Neurons



Canonical Pathways

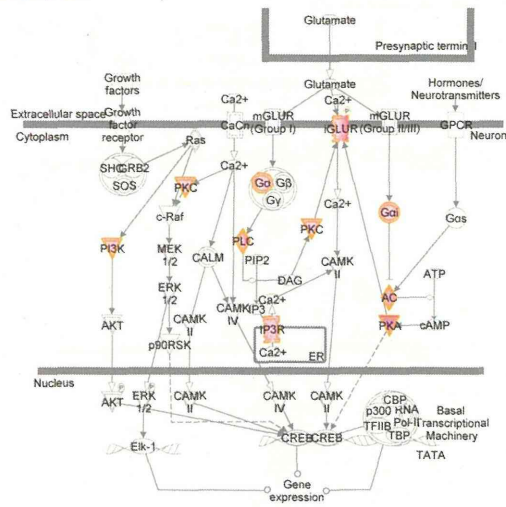
Axonal Guidance Signaling



Canonical Pathways

CREB Signaling in Neurons

CREB Signaling in Neurons



© 2000-2017 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Bio Functions



Cellular Assembly and Organization



Nervous System Development and Function



Cellular Function and Maintenance



Molecular Transport



BPA曝露マウス海馬: mRNA発現解析

神経系発生-発達期のBPA曝露により、
成長後のマウス海馬に遺伝子発現抑制傾向が生じる。

Percellome



遺伝子発現

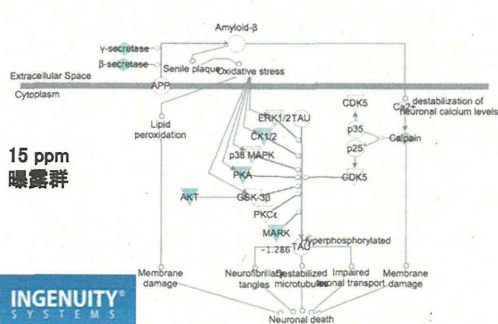
増加/抑制

($p < 0.01$, ratio > 1.2)

0.06 ppm
曝露群 46/116

1 ppm
曝露群 53/166

15 ppm
曝露群 28/507



神経軸索機能不全が疑われる。

23

遺伝子リストの重なり

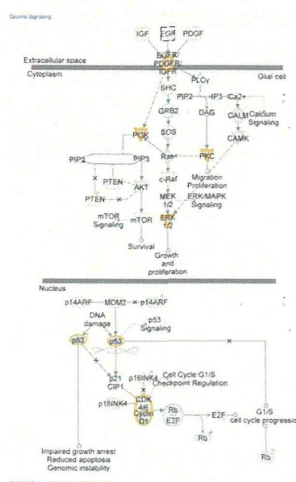
mRNA
: 277遺伝子

DNAmethylation
: 702遺伝子

29遺伝子

ADAM15	PRKCH
AUH	RELN
CCND1	SDC3
DNM2	SIN3B
EGFR	SOX17
ENPP3	SRF
FLT1	SYNJ2
FXR2	THOP1
FYN	TP53
GRIA1	UBE2G2
LMX1B	USP12
MAPK3	VIM
NTRK1	VIPR2
PARP14	YWHAB
PIK3R4	

Glioma Signaling



24

まとめと考察-1

- 昨年度(タイリングアレイ)よりも測定精度が高く、網羅性にも優れた手法(次世代シーケンサー)によるDNAメチル化状況の網羅的測定を行った。
- その結果、やはり、DNAメチル化変化が示唆される結果が得られた。
- IPA解析から、神経機能に関連する機能カテゴリーが抽出された。
- 遺伝子発現変化の網羅的解析からも神経細胞機能不全が推察される結果が得られている。
- ビスフェノールAによるエピジェネティック影響の存在を示唆する結果として注目される。

25

まとめと考察-2

- DNAメチル化影響の持続性を踏まえると、成長後、影響が重篤化する可能性が考えられる。
- 曝露終了後、更に時間が経過した際の行動影響の検討も視野に入れた検討を行う。

26

妊娠後期のビスフェノール A 暴露による遅発性行動影響に関する研究

研究分担者 岩野 英知

酪農学園大学 獣医学類 准教授

研究要旨

妊娠期のビスフェノール A (BPA) 暴露は胎仔に悪影響を及ぼし、その仔の成熟後の行動異常が報告されている。これまでに我々は、妊娠後期に BPA の代謝物である BPA-GA が胎盤通過により胎仔へ移行することや、さらに移行した BPA-GA が BPA に再活性化される可能性があることを報告してきた。またさらに妊娠期の BPA 暴露は、胎仔期の脳の葉酸代謝系を攪乱する可能性があることもみいだしてきた。そこで本研究では、妊娠後期のみの BPA 暴露が、出生成熟後の行動に影響を与えるのか、その場合葉酸の摂取量により行動影響に差が出るのかを検証した。

A. 研究目的

BPA はこれまでエストロゲン活性が注目され、BPA の研究の多くはエストロゲン活性に関連づけて報告されてきた。我々は、胎仔に BPA が移行・蓄積しても、その BPA 量はごく微量であることと BPA のエストロゲン活性は微弱であることから、これまで報告されているような悪影響がエストロゲン作用によるものだけとは考えられず、何か他の作用点があるのではないかと考えた。

BPA による次世代個体への影響として、近年はエピジェネティクス機序への影響が注目されている。特に、アグーチマウスを用いた研究では、妊娠期の BPA 暴露により、新生仔のメチル化レベルが低下し、その影響は、葉酸、メチル化供与体を与える事で、メチル化レベルが回復したとの報告がある。以上の点を踏まえ、本年度は、特に以下の 3 点に絞り、研究を行った。

1) 妊娠後期の暴露のみで行動に影響が現れるのか？

妊娠 11 日から 18 日のみに母親に経口投与し、子供が成長後、不安行動試験にて BPA の影響を評価した。

2) 葉酸量の違いによって、BPA 影響がかわるのか？

餌に含まれる葉酸量を変えた場合の影響を評価した。

3) 安全域の上限 (0.05mg/kg/day) で影響はでないのか？

餌や投与の違いにより、低容量の BPA でも影響がでるのか評価した。

B. 研究方法

交配 2 週間前から低葉酸餌 (11ug / kg) と高葉酸餌 (260ug / kg)、通常餌 (260ug / kg) を給餌し、妊娠 11~18 日齢の間、BPA を胃内強制投与した (高 BPA: 10mg / kg / day 低 BPA: 50ug / kg / day, BPA 無し: オリーブオイルのみ)。出生後、3 週齢までは、それぞれの群で同様の餌を給餌し、その後全ての群で通常餌にて 10 週齢まで飼育し、行動試験 (高架式十字迷路試験) を行った。

本実験は、酪農学園大学動物実験委員会にて審査、受理され、適切な実験計画のもとに行われた。

C. 研究結果

低葉酸餌においては、BPA 投与により、不安行動が増強されやすく、低容量の BPA 投与によっても不安行動が増強された。その不安行動は、葉酸添加だけでは回復せず、葉酸以外の栄養素も BPA の影響に関与していることが示唆された。