

課題名 RFc-1151 体外培養環境における化学物質曝露におけるエピゲノミクス評価法の開発と検証

課題代表者名 樋浦 仁 (国立大学法人東北大学大学院医学系研究科)

研究実施期間 平成23年度

累計予算額 11,555千円
予算額は、間接経費を含む。

研究体制

(1) 体外培養環境における化学物質曝露のエピゲノミクス評価法の開発 (東北大学大学院医学系研究科)

研究概要

1. はじめに(研究背景等)

生殖医療の発展に伴い、我が国では年間10万人以上の夫婦が、体外受精などの生殖補助医療(ART)を受けている。しかし、受精卵培養器材や培養液には、多種多様な環境由来化学物質(以降、化学物質)が含まれ、極めて脆弱なヒト胚培養自体にその影響が、強く懸念されている。この初期胚(受精卵)培養環境における化学物質曝露は、その評価法が十分確立されていないため、受精卵あるいは胎児の発生、発育にどのような影響や障害を与えているのかは、明らかではない。また、その影響が軽微であるため、即座に症状として現れにくく、ゆっくりと進行し、遅発性に症状として出現する場合も存在する。一般に、ARTを受けた場合、その流産率や奇形率は、自然妊娠の約10倍である。これには、不妊症という遺伝的背景によるという考えよりも、体外培養等のART操作を加えた両面の影響が指摘されている。

近年の毒性試験では動物実験評価系の代替案として、胚性幹細胞(ES細胞)が用いられるようになり、その有用性が報告されている。Embryonic Stem Cell Test (EST法)は、ES細胞の分化障害を指標としたin vitro発生毒性試験法(Spielmann)で、既にヨーロッパ各国の研究機関(ECVAM)にてバリデーションテストが終了し、その有用性が証明されている。さらに、胎盤幹細胞(TS細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)の樹立や臨床への応用も期待されている。

一方、細胞や組織に対し、有害な化学物質は、遺伝子のプロモーター等の後成的(エピジェネティックな)修飾による遺伝子発現に影響を及ぼすという仮説が検証されようとしている。エピジェネティクス(エピゲノム情報)とは、DNAの塩基配列の変化を伴わない、遺伝子発現制御に関わる後付けの修飾である。主たる現象として、DNAのメチル化が知られている。この修飾は、生殖細胞では、『細胞の記憶』として遺伝子刷り込み機構(ゲノムインプリンティング)として知られている。インプリンティングとは、特定の親由来の遺伝子が選択的に発現する現象で、哺乳類の正常な発生、分化に必須な現象で、この機構の破綻は、先天性疾患に限らず、乳幼児の行動、性格異常(自閉症、多動児、アレルギー等)、成人疾患(癌、生活習慣病、うつ病等)にも影響を与えることも報告されている。

ヒト未分化幹細胞(ES、TS細胞)は、環境汚染(内分泌かく乱物質、重金属、残留農薬、等)による胚や胎児への影響を判断する薬物毒性評価に有用な細胞である。環境由来化学物質のヒト受精卵培養の影響が十分予想されるが、これまで評価技術の問題から、世界中で報告例はない。これら細胞にみられるエピジェネティックな修飾の異常は、低用量でも残留性、遅発性の有害事象の指標として国際的に通用しうる毒性評価法の開発が必要である。

2. 研究開発目的

ヒト生殖医療で汎用する受精卵培養液や医療器材から溶出する化学物質の曝露は、ヒト受精卵に対して深刻な影響を及ぼす危険性をはらんでいる。中でもビスフェノールA (BPA)、フタル酸エステル (PAE) やノエルフェノール (NP) は、いずれも酸や加熱により器材より溶出するエストロゲン様物質として知られている。これらの化学物質においては、胎児、乳児および小児の神経系及び行動、前立腺や乳腺、女性思春期への影響が報告され、日本食品安全委員会の健康影響評価だけでなく、海外でも警鐘を促されている。しかしながら、現状では、ヒト受精卵への影響に関する研究は世界的にも極めて少なく、ダイオキシン類やPCBでの報告に限定されている。また複数の化学物質の低用量域における曝露の評価においては、未解決のままである。

本研究では、ヒト未分化幹細胞を用い、卵培養器材から溶出される化学物質曝露による細胞のエピジェネティックな修飾の異常に基づく、評価法を確立することを目的とする。

3. 研究開発の方法

(1) 化学物質濃度とエピゲノム解析に基づく細胞毒性試験法の確立：

ヒト未分化幹細胞 (ES、TS細胞) を用い、BPA、PAEおよびNP濃度を血液濃度の100倍まで添加し、培養する。新規開発のメチル化解析法を用い、8種類のインプリント遺伝子を標的としたエピゲノム (DNAメチル化) 解析を行い、異常の頻度・程度・影響を受けやすい遺伝子を明確にする。解析には、既に性能評価を行っている東北大発のPCR-Limunex法を用いる。両者の関係を指標に毒性評価法を確立する。

① 急性毒性評価：BPA、PAE および NP 濃度と未分化細胞へのエピゲノムへの影響を解析する。

● 化学物質の調整：

標準品：BPA、PAE (DEHP, MEHP)、およびNP (和光純薬工業社製) を用いた。

標準溶液：各標準品20mgを精秤し、メタノールまたはアセトニトリル溶液に溶解し、標準原液を調整。また、メタノールまたはアセトニトリル溶液は、内部標準液として用いた。

● 未分化幹細胞：

使用する細胞株：ヒト胎児性幹細胞 (ES細胞)、胎盤幹細胞 (TS細胞)。

● 細胞への曝露濃度：

母体血液濃度を参考に、100倍濃度までの5段階希釈法を用い、化学物質を添加した。5段階濃度希釈法を用い、細胞に添加し、3日間培養した。

● 培養細胞からDNA抽出：

DNA抽出の際は、Feeder cellより回収したコンディショナル培地を用い、細胞の混入を避け、未分化細胞のみ回収した。細胞は、SDSとProteinase Kを用い、DNAを抽出。また、超低温液体窒素フリーザーで凍結保存した。

● インプリント遺伝子のDNAメチル化の解析：解析するインプリント遺伝子は卵子型インプリント (LIT1, ZAC, PEG1, PEG3) と精子型インプリント (H19, RASGRF1, GTL2, ZDBF2) の8種類で、DNAメチル化について定量解析した。

② 遅発性毒性評価：(1) で得られた結果を基に、長期間 (14日間) 細胞培養し、エピゲノム解析にて変異を解析する。

4. 結果及び考察

(1) 急性毒性評価：

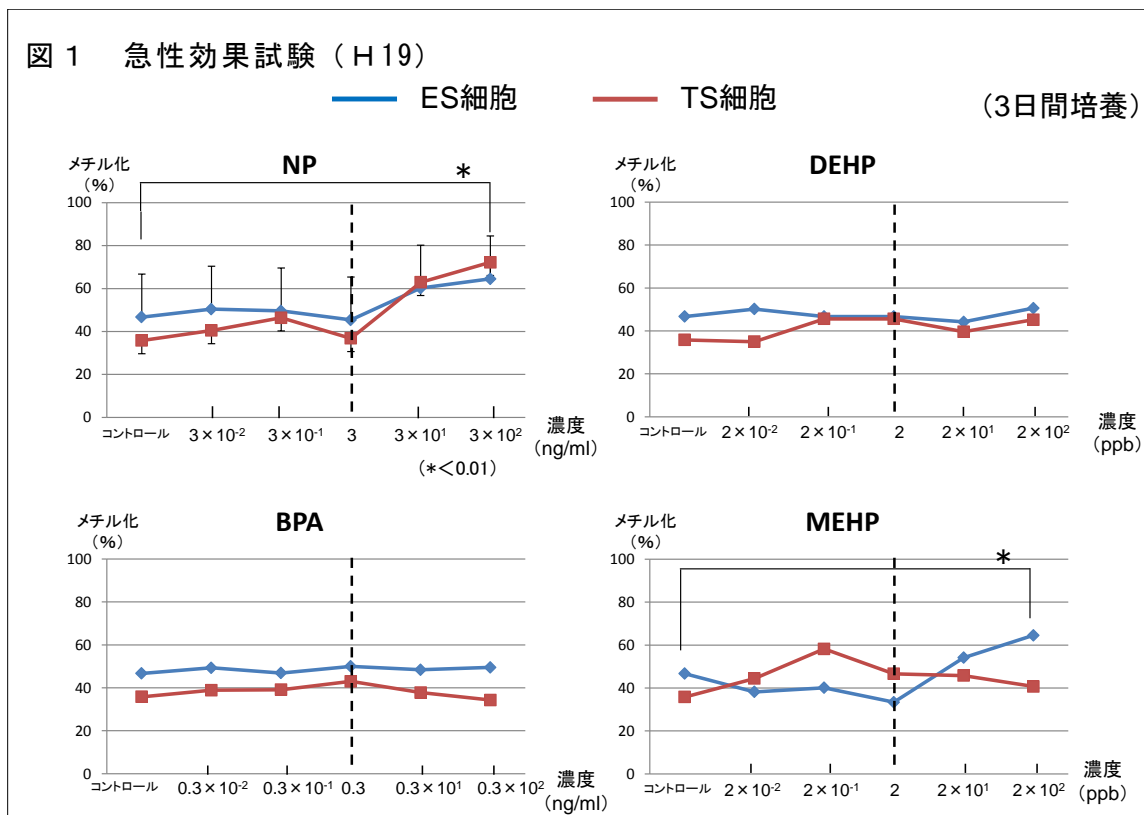
急性試験の結果、ノニルフェノールに特に変化が表れた。H19遺伝子の場合、ES細胞では、血中濃度以下においてメチル化の値に有為な変化がないため、細胞培養による影響やメチル化解析法が、正確、安定である事が確認された。また、血中濃度の10倍濃度では、メチル化の変化が確認された。さらに、100倍濃度では、このメチル化の変化が増強されることがわかった。TS細胞においても、程度は低いものの、同様の結果が確認された。また、これらの細胞では、顕微鏡学的に細胞形態の変化や増殖能に著しい変化は見られなかった（図1）。

同様の方法で、ES,TS細胞に、4種類の化学物質の濃度を変えて添加し、8種類のインプリント遺伝子のメチル化の解析結果のまとめを示す。ノニルフェノールに加え、フタル酸エステル（MEHP）では、複数の領域で、また、ES、TS細胞両方で、低濃度の場合において有意なメチル化の変化が見られた（表1）。

(2) 遅発性毒性評価：

遅発性試験の結果、それぞれ、血中濃度の化学物質を培養液に添加し、14日間培養を行なった。また、細胞は、3日目、5日目、7日目、10日目、14日目に回収し、メチル化の解析を行った。フタル酸エステルMEHPの場合、無添加の場合と比較し、ES細胞で一部のインプリント遺伝子領域に、有意なメチル化の変化が確認された（図2）。

これらの結果、NPやMEHPは比較的低濃度でもメチル化に影響を与え、特にES細胞において変化がみられた。また、MEHPでは、晩発性効果も予想された。また、培養期間中、顕微鏡学的解析では、細胞形態、細胞増殖能に著しい変化は認められなかった（表2）。



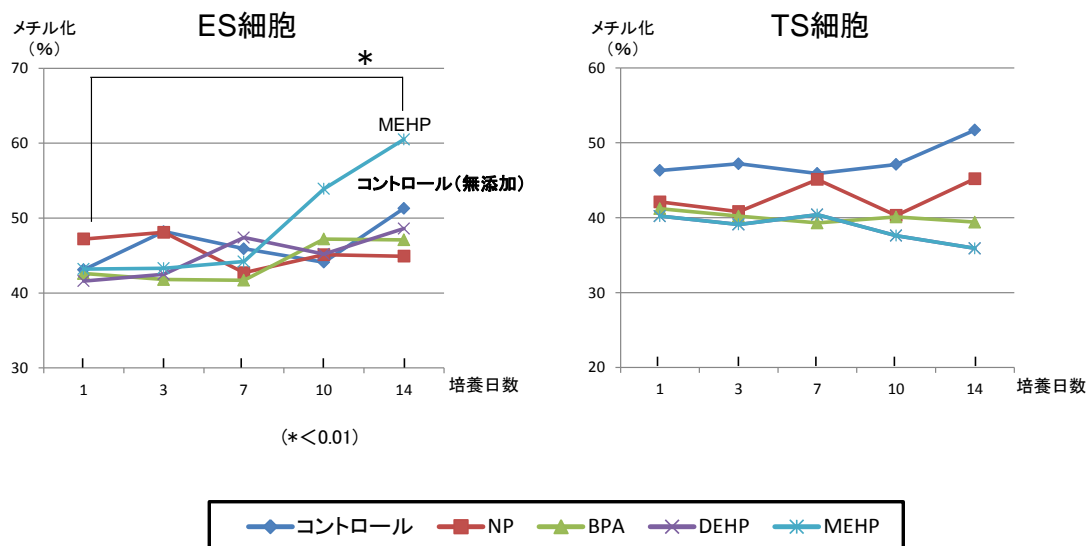
ES	NP			BPA			DEHP			MEHP		
	1	10 ¹	10 ²	1	10 ¹	10 ²	1	10 ¹	10 ²	1	10 ¹	10 ²
H19	-	▲	▲	-	-	-	-	-	-	-	-	▲
GTL2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEG1	-	-	▲	-	-	-	-	-	-	-	-	▲
LIT1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ZAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEG3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SNRPN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	▲
ZDBF2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TS	NP			BPA			DEHP			MEHP		
	1	10 ¹	10 ²	1	10 ¹	10 ²	1	10 ¹	10 ²	1	10 ¹	10 ²
H19	-	▲	▲	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GTL2	-	-	▲	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEG1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LIT1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ZAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEG3	-	-	-	-	-	-	-	-	▲	-	-	-
SNRPN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ZDBF2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表1 急性効果試験のまとめ

1: 血中濃度とする

図2 遅発性効果試験 (PEG1)



ES	NP			BPA			DEHP			MEHP		
培養日数	7	10	14	7	10	14	7	10	14	7	10	14
H19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GTL2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEG1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	▲	▲
LIT1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ZAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEG3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SNRPN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ZDBF2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TS	NP			BPA			DEHP			MEHP		
培養日数	7	10	14	7	10	14	7	10	14	7	10	14
H19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GTL2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEG1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LIT1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ZAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEG3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SNRPN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ZDBF2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表2 遅発性効果試験のまとめ

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

ヒト未分化幹細胞を用いた薬物毒性評価法の確立について:

ヒト未分化幹細胞は、新たな薬物毒性評価法の細胞源を提供し、また卵培養中に低用量で曝露された有害物質の影響を検出し、同時にヒト疾患との関連性を解明していくことが可能であると考えられる。さらに、エピゲノム変異は、先天性疾患に限らず、乳幼児の行動、性格異常（自閉症、多動児、アレルギー等）、成人疾患（癌、生活習慣病、うつ病等）にも影響を与えるため、今後疾患予防のための国際基準に通用する重要な解析法となりうる。

卵培養器材から溶出する化学物質の測定とエピゲノム変異解析の関連について:

不妊症治療として体外培養、特に培養中に受精卵に影響を与える環境由来化学物質の関与について実証的なデータを提出する。関連する化学物質が明らかになった場合、そのリスク情報を提出する。このことにより、行政はリスク管理が可能となる。また、特定の化学物質について、曝露回避に必要な行政的な基礎資料として、国民に提示できる。これらの結果は、少子化対策、不妊症治療の技術向上と医療行政に貢献できる。

(2) 環境政策への貢献

体外培養中に放出された化学物質は、少量であっても短期間であっても、受精卵は最も脆弱で、影響を受けやすい細胞であるため、その影響は計り知れない。従って、化学物質のヒト生殖細胞への影響は、少子化問題を抱え、確実に体外授精の拡大が予想される我が国においては、重要な課題である。いかなる化学物質が、受精卵に影響を及ぼすのか、明らかにし、回避する方法を考案し、リスクコミュニケーションとして、国民に伝える事が、求められている。特に強調したい点は、リスクを回避する方法とその効果はどのくらいあるのかを、実証的なデータを併せて提示することにある。本研究成果では、そのリスクコミュニケーションに必須の実証的なデータを、体外培養の安全性と有効性を含め、報告した。今後、本研究計画から導き出された結果を出生コホートにおいて検証し、環境由来化学物質曝露と児の身体的発育と精神的発育との関連性について、研究を継続する必要性を認識した。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

< 査読付き論文 >

- 1) Watanabe T, Tomizawa S, Mitsuya K, Totoki Y, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Iida N, Hoki Y, Murphy P.J, Toyoda A, Gotoh K, Hiura H, Arima T, Fujiyama A, Sado T, Shibata T, Nakano T, Lin H, Ichiyanagi K, Soloway P.D. and Sasaki H: Science, 332, 848-852 (2011)
“Role for piRNAs and non-coding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse Rasgrf1 locus.”
- 2) Sato A, Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Abe Y, Utsunomiya T, Yaegashi N, and Arima T: Fertility and Sterility, 95, 129-34 (2011)
“Assessing loss of imprint methylation in sperm from subfertile men using novel methylation PCR-Luminex analysis”
- 3) Okae H, Hiura H, Nishida Y, Funayama R, Tanaka S, Chiba H, Yaegashi N, Nakayama K, Sasaki H and Arima T: Human Molecular Genetics, 21, 548-52 (2011)
“Re-investigation and RNA sequencing-based identification of genes with placenta-specific imprinted expression”
- 4) Hiura H, Okae H, Kobayashi H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Suzuki F, Nagase S, Junichi Sugawara J, Nakai K, Yaegashi N and Arima T: BMC Medical Genomics, 5, 8-17 (2012)
“High-throughput detection of imprint methylation errors in the ovarian cancer by the bisulphite PCR-Luminex method”
- 5) Arima T, Okae H, Hiura H, Miyauchi N, Sato F, Sato A and Hayashi C: INTECH, 29, 183-92 (2012)
“Aberrant DNA methylation of imprinted loci in male and female germ cells of infertile couples”
- 6) Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Van De Pette M, John R M, Kagami M, Nakai K, Soejima H, Ogata T, Arima T: Human Reproduction (in press)
“Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproductive technologies”
- 7) 有馬隆博, 樋浦仁, 岡江寛明, 佐藤晶子, 宮内尚子, 阿部千鶴, 林千賀: 産婦人科の実際, 金原出版株式会社, 741-750 (2011)
「ARTにおけるエピジェティクス異常」
- 8) 有馬隆博, 樋浦仁, 岡江寛明, 佐藤晶子, 宮内尚子: 卵子学, 京都大学学術出版会, 122-131 (2011)
「ヒト卵子・精子・胚のエピジェティクス」
- 9) 有馬隆博, 樋浦仁, 岡江寛明, 佐藤晶子, 宮内尚子: 助産雑誌, 医学書院, 62, 11 (2011)
「母子健康と環境影響」

(2) 主な口頭発表(学会等)

特に記載すべき事項はない

7. 研究者略歴

課題代表者：樋浦 仁

東京農業大学農学部卒業、農学博士、現在東北大学大学院医学系研究科助教

研究参画者

(1) : 樋浦 仁 (同上)

(2) 1) : 黒川 修行

1974生まれ、宮城教育大学教育学部卒業、現在、宮城教育大学大学教育学部講師

2) : 目時 弘仁

1976生まれ、東北大学医学部卒業、現在、東北メディカルバンク講師

RFc-1151 体外培養環境における化学物質曝露におけるエピゲノミクス評価法の開発と検証**(1)体外培養環境における化学物質曝露のエピゲノミクス評価法の開発**

東北大学大学院医学系研究科 樋浦 仁
宮城教育大学教育学部 黒川 修行
東北大学大学院医学系研究科 目時 弘仁

平成23年度累計予算額：11,555千円

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

「体外培養環境における化学物質曝露のエピゲノミクス評価法の開発と検証」については、ヒト細胞のエピゲノムに基づく化学物質曝露の評価法を開発することを目的として、ヒト未分化細胞（ES、TS細胞）を用いて、ビスフェノールA（BPA）、ノニルフェノール（NP）およびフタル酸エステル（PAE）の化学物質を8段階希釈法により添加し、培養した。8種類のインプリント遺伝子を標的としたメチル化解析を行い、急性毒性及び遅発性毒性評価法を確立した。

その結果、急性毒性試験では血中1/100濃度のNPで、顕著な変化がES、TS細胞両方でみられた。また、遅発性試験では、PAEがES細胞で異常を示した。いずれの場合も細胞特性に変化を認めなかった。エピゲノムを標的とする評価法は、低濃度、遅発性の有害事象の解析に有用であるが、問題点も明らかとなった。

[キーワード] 化学物質曝露、エピゲノミクス評価、ヒト未分化幹細胞、DNAメチル化

1. はじめに

生殖医療の発展に伴い、我が国では年間10万人以上の夫婦が、体外授精などの生殖補助医療（ART）を受けている。しかし、受精卵培養器材や培養液には、多種多様な環境由来化学物質（以降、化学物質）が含まれ、極めて脆弱なヒト胚培養自体にその影響が、強く懸念されている^{1)・2)}。この初期胚（受精卵）培養環境における化学物質曝露は、その評価法が十分確立されていないため、受精卵あるいは胎児の発生、発育にどのような影響や障害を与えているのかは、明らかではない。また、その影響が軽微であるため、即座に症状として現れにくく、ゆっくりと進行し、遅発性に症状として出現する場合も存在する。一般に、ARTを受けた場合、その流産率や奇形率は、自然妊娠の約10倍である。これには、不妊症という遺伝的背景によるという考えよりも、体外培養等のART操作を加えた両面の影響が指摘されている。

近年の毒性試験では動物実験評価系の代替案として、胚性幹細胞（ES細胞）が用いられるようになり、その有用性が報告されている^{3)・4)}。Embryonic Stem Cell Test (EST法)は、ES細胞の分化障害を指標としたin vitro発生毒性試験法（Spielmann）で、既にヨーロッパ各国の研究機関（ECVAM）にてバリデーションテストが終了し、その有用性が証明されている。さらに、胎盤幹細胞（TS細胞）⁵⁾や人工多能性幹細胞（iPS細胞）⁶⁾の樹立や臨床への応用も期待されている。

背景：本研究が必要な理由

環境由来化学物質が人の健康に及ぼす影響については、科学的に未解決な点が多いものの、世代を越えた影響をもたらすおそれがある重要な課題である（EXTEND 2010）

化学物質	主なヒトへの影響
ビスフェノールA (BPA)	<ul style="list-style-type: none"> ・膵β細胞の機能低下 ・性同一性障害に関与（脳内ERの機能低下）
ノニルフェノール (NP)	<ul style="list-style-type: none"> ・体重増加、肥満 ・骨石灰化促進、成長障害
フタル酸エステル (PAE)	<ul style="list-style-type: none"> ・ライディツヒ細胞機能低下（精子数の減少） ・早期思春期発来

これらの化学物質は
医療用機器に用いられる
(チューブ、シャーレ等)

体外培養液中に医療器材から溶出する
NP,PAEが母体血中濃度の数十倍検出
(平成21年度厚生科研報告、牧野班)

体外培養で出生した児の先天性イン
プリント異常症は2-10倍に増加
(平成21年度厚生科研報告、有馬班)

化学物質に感受性の高いリスク評価法の開発と管理は世界共通の課題

一方、細胞や組織に対し、有害な化学物質は、遺伝子のプロモーター等の後成的（エピジェネティックな）修飾による遺伝子発現に影響を及ぼすという仮説が検証されようとしている⁷⁾。エピジェネティクス（エピゲノム情報）とは、DNAの塩基配列の変化を伴わない、遺伝子発現制御に関わる後付けの修飾である（図1）。主たる現象として、DNAのメチル化が知られている。この修飾は、生殖細胞では、『細胞の記憶』として遺伝子刷り込み機構（ゲノムインプリンティング）として知られている。インプリンティングとは、特定の親由来の遺伝子が選択的に発現する現象で、哺乳類の正常な発生、分化に必須な現象で、この機構の破綻は、先天性疾患に限らず、乳幼児の行動、性格異常（自閉症、多動児、アレルギー等）、成人疾患（癌、生活習慣病、うつ病等）にも影響を与えることも報告されている^{8)・9)・10)}。ZDBF2は癌に、H19は先天性疾患（SRS, BWS）および癌に、GTL2は癌に、PEG1（MEST）は癌および行動に、LIT1（KCNQ1OT1）は先天性疾患（BWS）および癌に、ZAC（PLAGL1）は先天性疾患（TNDM）および癌に、PEG3は癌および行動にSNRPNは先天性疾患（AS, PWS）および癌に関与していることが示唆されている。

精子由来と卵子由来のゲノムが異なる発現様式を示す現象
ヒトを含め、哺乳類の（胚）発生・分化、恒常性の維持に必須である

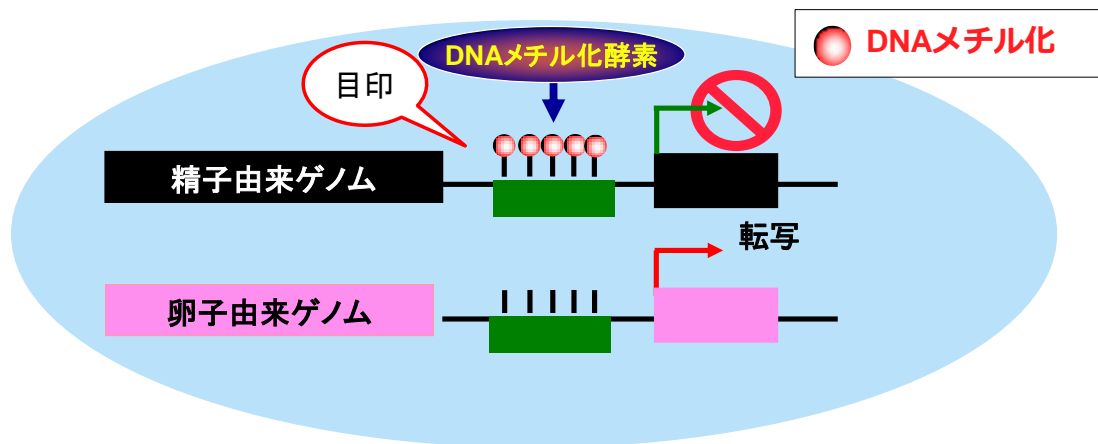
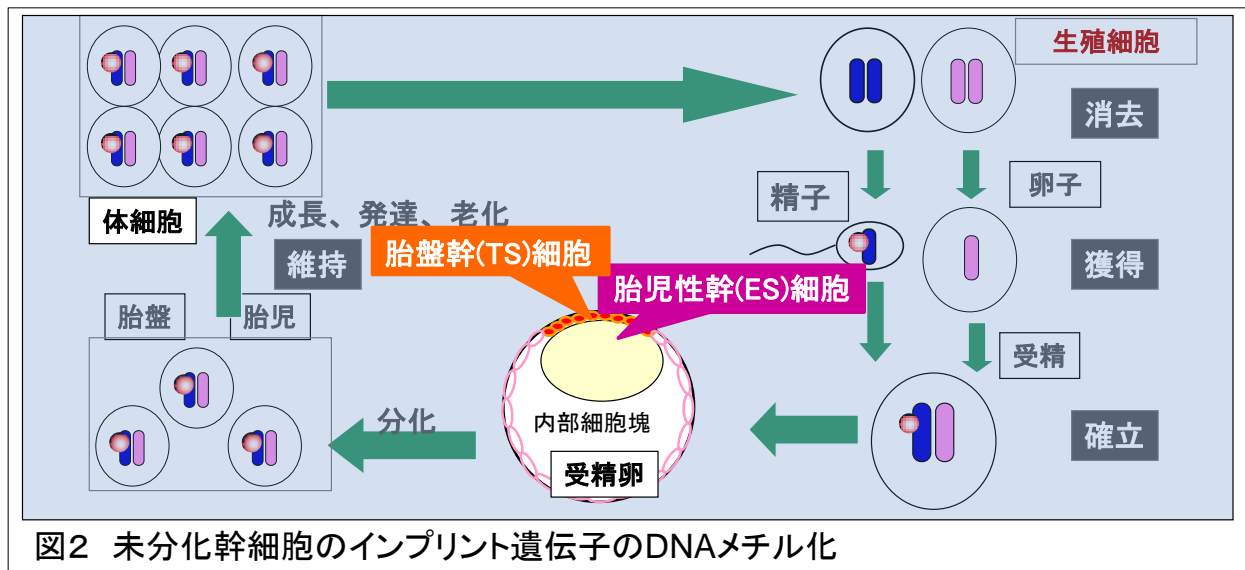


図1 遺伝子刷り込み(ゲノムインプリンティング)とは

- 分子機構の本体はDNAメチル化で、細胞の「目印」として遺伝子発現を調節する
- エピジェネティクス(エピゲノム)**とはDNA塩基配列（ゲノム情報）の変化を伴わない、遺伝子発現調節に関わる後付けの修飾
- いずれか一方の親由来のゲノムはメチル化され、遺伝子の発現は抑制され、もう一方の親由来ゲノムはメチル化されず機能する(**片親性発現**)
- インプリンティングの破綻は、先天性疾患に限らず、乳幼児の行動、性格異常(自閉症、多動児、アレルギー等)、**成人疾患(癌、生活習慣病、不妊症等)**にも影響を与える

ヒト未分化幹細胞（ES、TS細胞）は、環境汚染（内分泌かく乱物質、重金属、残留農薬、等）による胚や胎児への影響を判断する薬物毒性評価に有用な細胞である。環境由来化学物質のヒト受精卵培養の影響が十分予想されるが、これまで評価技術の問題から、世界中で報告例はない。これら細胞にみられるエピジェネティックな修飾の異常は、低用量でも残留性、遅発性の有害事象の指標として国際的に通用しうる毒性評価法の開発が必要である（図2）。



未分化幹細胞におけるDNAメチル化の変異は、
 (1) 変異原性を有さない、
 (2) 長期影響(晩発効果)が見られる

低用量の化学物質ばく露
 の影響の検出が可能

- インプリント遺伝子のDNAメチル化は、生殖細胞形成過程で開始し、確立後、体細胞に至るまで安定に維持される。また、次世代となる始原生殖細胞で消去され、リプログラミングされる
- インプリント遺伝子の場合、DNAメチル化は一旦確立すると、「細胞の記憶」として安定に維持される（年齢や組織により変化することはない）
- 未分化幹細胞は、化学物質ばく露などの環境要因の影響を受けやすい

2. 研究開発目的

ヒト生殖医療で汎用する受精卵培養液や医療器材から溶出する化学物質の曝露は、ヒト受精卵に対して深刻な影響を及ぼす危険性をはらんでいる。中でもビスフェノールA (BPA)、フタル酸エステル (PAE) やノニルフェノール (NP) は、いずれも酸や加熱により器材より溶出するエストロゲン様物質として知られている^{11)・12)・13)}。これらの化学物質においては、胎児、乳児および小児の神経系及び行動、前立腺や乳腺、女性思春期への影響が報告され、日本食品安全委員会の健康影響評価だけでなく、海外でも警鐘を促されている。しかしながら、現状では、ヒト受精卵への影響に関する研究は世界的にも極めて少なく、ダイオキシン類やPCBでの報告に限定されている¹⁴⁾。また複数の化学物質の低用量域における曝露の評価においては、未解決のままである。本研究では、ヒト未分化幹細胞を用い、卵培養器材から溶出される化学物質曝露による細胞のエピジェネティックな修飾の異常に基づく、評価法を確立することを目的とする。

研究目的

未分化幹細胞を用い、化学物質ばく露による エピゲノミクス評価法の開発

- ・ 未分化幹細胞 (ES、TS細胞) は非常に脆弱な細胞であり、化学物質による影響の評価に有用である
- ・ エピジェネティックな修飾の異常は、低用量でも残留性、遅発性の有害事象の指標として国際的に通用するリスク評価法になりうる

● 化学物質:

- ・ビスフェノールA (BPA)
- ・フタル酸エステル (PAE)
- ・ノニルフェノール (NP)

● 未分化幹細胞:

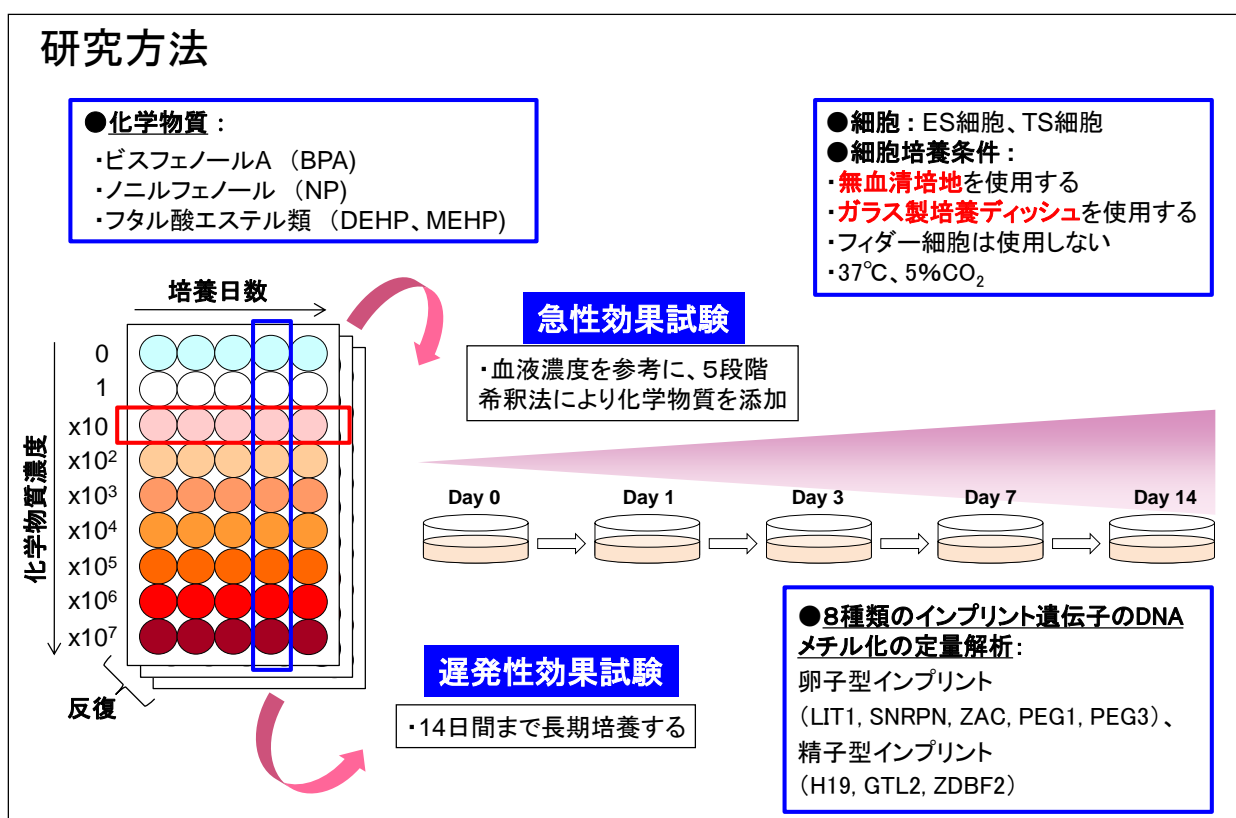
- ・胎児性幹細胞 (ES細胞)
- ・胎盤幹細胞 (TS細胞)

これらの細胞の培養法や培養条件の検討は、既に確立している

3. 研究開発方法

(1) 化学物質濃度とエピゲノム解析に基づく細胞毒性試験法の確立：

ヒト未分化幹細胞（ES、TS細胞）を用い、BPA、PAEおよびNP濃度を血液濃度の100倍まで添加し、培養する。先天性疾患、癌および行動に関与していることが示唆されている8種類のインプリント遺伝子を標的としたDNAメチル化解析を行い、異常の頻度・程度・影響を受けやすい遺伝子を明確にした。



① 急性毒性評価：

BPA、PAE および NP 濃度を 5 段階に調節し、未分化細胞を用いてエピゲノムへの影響を解析した。

● 化学物質の調整：

標準品：BPA、PAE (DEHP,MEHP)、およびNP (全て和光純薬工業社製) を用いた。

標準溶液：各標準品20mgを精秤し、メタノールまたはアセトニトリル溶液に溶解し、標準原液を調整。また、メタノールまたはアセトニトリル溶液は、内部標準液として用いた。

● 未分化幹細胞：

使用する細胞株：ヒト胎児性幹細胞 (ES細胞)、胎盤幹細胞 (TS細胞)。

● 細胞への曝露濃度：

母体血液濃度を参考に、100倍濃度までの5段階希釈法を用い、化学物質を添加し、3日培養した。

● 培養細胞から DNA 抽出：

DNA抽出の際は、Feeder cellより回収したコンディショナル培地を用い、細胞の混入を避け、未分化細胞のみ回収した。細胞は、SDSとProteinase Kを用い、DNAを抽出した。抽出後は直ちに超低温液体窒素フリーザーで凍結保存した。

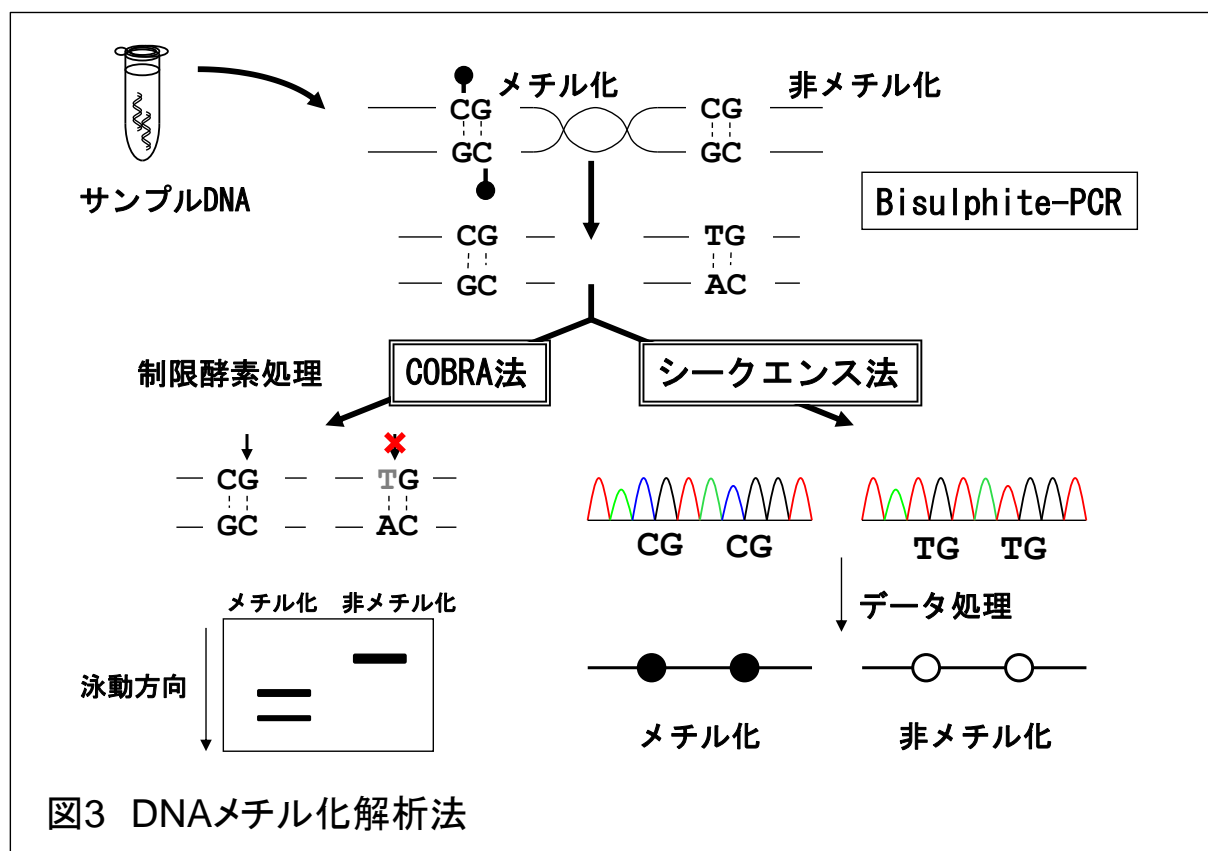
● インプリント遺伝子の DNA メチル化の解析：

解析するインプリント遺伝子は卵子型インプリント (LIT1, SNRPN, ZAC, PEG1, PEG3) と精子型インプリント (H19, GTL2, ZDBF2) の8種類で、DNAメチル化について定量解析した。DNAメチル化の解析は、COBRA法とシーケンス法を用いて、8つのヒトインプリント遺伝子 (ZDBF2, H19, GTL2, PEG1 (MEST)、LIT1 (KCNQ1OT1)、ZAC (PLAGL1)、PEG3とSNRPN) のアレル特異的メチル化領域 (DMRs) で行われた。各細胞DNAサンプルは、EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research) によりバイサルファイト処理され、PCRが行われた。PCR反応液は、各0.5 μ Mプライマー、200 μ M dNTPs、1x PCRバッファーが、1.25Uの EX Taq Hot Start DNA Polymerase (TaKaRa Bio) を含む、20マイクロリットルの用量に調整された。PCRプログラムは、表1に示す^{15), 16)}。

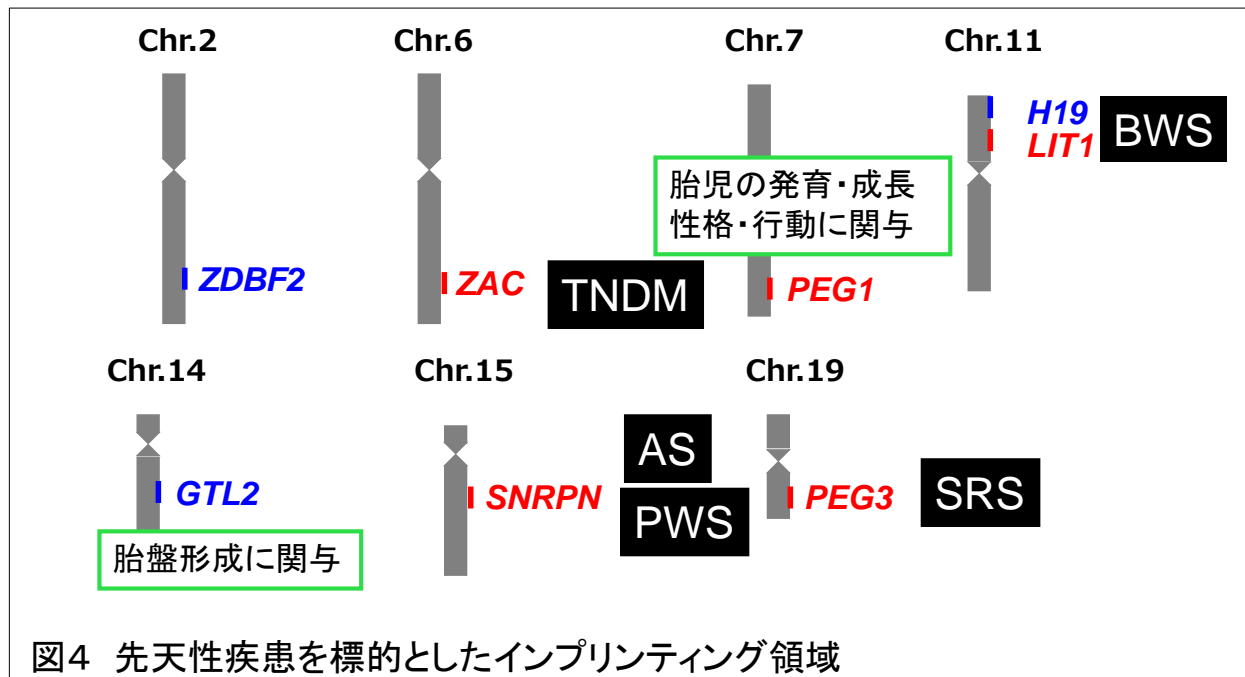
これらの遺伝子で解析された領域は、DMR内のCpGアイランドであった。我々は、H19の220bp PCR断片で18個のCpG部位 (AF125183 : 7877-8096)、GTL2の459bp PCR断片で15個のCpG部位 (AL117190 : 51004-51262)、PEG1の275bp PCR断片で22個のCpG部位 (AB045582 : 4486-4760)、LIT1の307bp PCR断片で26個のCpG部位 (U90095 : 67252-67558)、ZACの152bp PCR断片で19個のCpG部位 (AL109755 : 52735-52886)、PEG3の227bp PCR断片で33個のCpG部位 (AC006115 : 163614-163388)、SNRPNの383bp PCR断片で21個のCpG部位はU41384 : 14726-14344)、ZDBF2の210bp PCR断片で12個のCpG部位 (AC007383 : 195223-195433) をそれぞれ調べた。これらプライマー情報を表にまとめた。(CpG部位のCはメチル化を受ける部位)

シーケンスの結果が、クローニングによるバイアスの影響がないことを確認するた

めに、DNAで制限酵素処理解析（COBRA）が行われた。制限酵素処理によりメチル化しているテンプレートDNA（バイサルファイト処理済み）のみが切断された。各DMRのPCR産物を制限酵素処理した。TaqIでH19、GTL2、ZAC、HpyCH4IVでPEG1、PEG3、ZDBF2、RsaIでLIT1、HhaIでSNRPNをそれぞれ切断した。制限酵素反応後、2.5-3%アガロースゲルで電気泳動した。制限酵素で切断された断片はメチル化、切断されなかった断片はメチル化していないテンプレートであることを示す。各遺伝子でのメチル化の割合はLumiimager analyzerとLumianalystソフトウェアパッケージ（Roche Diagnostics）で定量化された。そして、制限酵素認識部位における各々のゲノムサンプルのメチル化のパーセンテージは、酵素で切断されたPCR産物量とPCR産物総量との比率から計算された。確認のために一部サンプルは、PCR産物をpGEM-Tベクター（Promega）によりクローニングされた。そして各クローンはM13 Reverseプライマーとオートメーション化したABI Prism 3130xl Genetic Analyser（Applied Biosystems）を用いてシーケンスされた。約20クローンずつがシーケンスされた。これらの実験は2つ以上の異なるDNAサンプル（バイサルファイト処理）を用いて行われ、そして3回以上の独立したPCR実験により解析された（図3-5、表1）¹⁷⁾。



卵子型インプリント(LIT1, SNRPN, ZAC, PEG1, PEG3)と精子型インプリント(H19, GTL2, ZDBF2)の8種類で、DNAメチル化について定量解析した。DNAメチル化の解析は、COBRA法とシーケンス法を用いて行われた。



TNDM; 新生児一過性糖尿病, BWS; Beckwith -Wiedemann症候群,
 AS; Angelman症候群, PWS; Prader-Willi症候群,
 SRS; Silver-Russell症候群

赤; 卵子型メチル化インプリンティング 青; 精子型メチル化インプリンティング

- ・新生児一過性糖尿病 (TNDM) は、生直後1ヶ月に現れるインスリン治療を必要とする高血糖症。
- ・ Beckwith-Widemann 症候群 (BWS) は、臍帯脱出、巨舌、巨体を主徴とする症候群。
- ・ Angleman症候群 (AS) は、重度の精神遅滞・てんかん・失調歩行などを主徴とする奇形症候群。
- ・ Prader-Willi症候群 (PWS) は、筋緊張低下、性腺発育不全、知的障害、肥満を四徴とする症候群。
- ・ Silver-Russell症候群 (SRS) は、重度の子宮内発育遅延、出生後の重度の成長障害、三角の顔や広い額などのような頭蓋および顔面特徴、身体非対称とほかの様々な小奇形によって特徴づけられる臨床的に多彩な症状を呈する症候群。

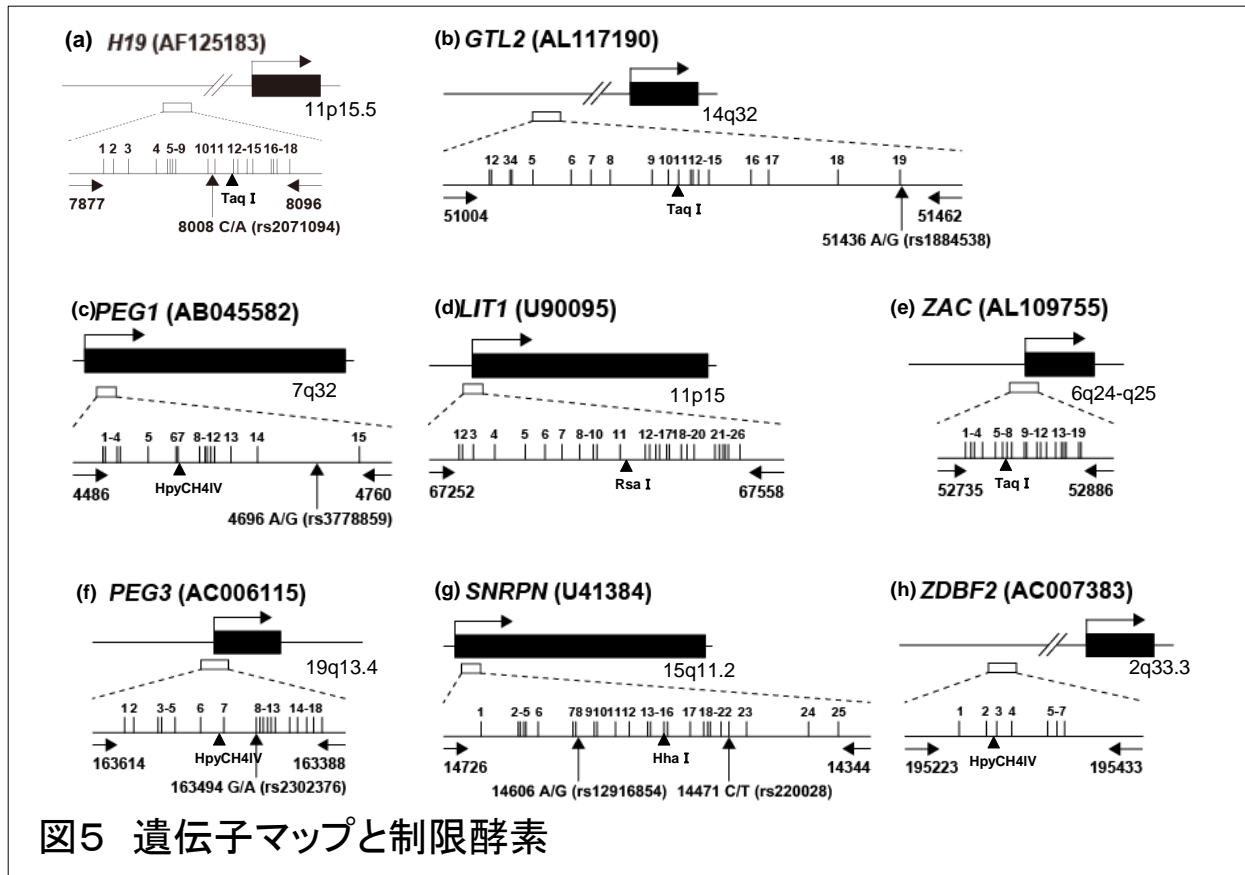


図5 遺伝子マップと制限酵素
 H19の220bp PCR断片は18個のCpG部位 (AF125183: 7877-8096)、GTL2の459bp PCR断片は15個のCpG部位 (AL117190: 51004-51262)、PEG1の275bp PCR断片は22個のCpG部位 (AB045582: 4486-4760)、LIT1の307bp PCR断片は26個のCpG部位 (U90095: 67252-67558)、ZACの152bp PCR断片は19個のCpG部位 (AL109755: 52735-52886)、PEG3の227bp PCR断片は33個のCpG部位 (AC006115: 163614-163388)、SNRPNの383bp PCR断片は21個のCpG部位はU41384: 14726-14344)、ZDBF2の210bp PCR断片は12個のCpG部位 (AC007383: 195223-195433)をそれぞれ調べた。これらプライマー情報を表にまとめた。TaqIでH19、GTL2、ZAC、HpyCH4IVでPEG1、PEG3、ZDBF2、RsaIでLIT1、HhaIでSNRPNを制限酵素処理をした。

表1 PCRプライマー条件

Gene	Target	Primer sequence (5'-3')	Amplicon (bp)	Annealing	Accession No.	chromosomal location	
H19	BS	H19 F2	TATATGGGTATTTTTGGAGGTTTTT	220	57	AF125183	11p15.5
		H19 R1	ATAAATATCCTATTCCCAAATAACCCC				
GTL2	BS	GTL2 BSF1	GGGTTGGGTTTTGTTAGTTGTTTTGT	459	57	AL117190	14q32
		GTL2 BSR1	ACAATTTAACAACAACCTTCTCCAAA				
PEG1	BS	hPEG1 BSF1	AATTTTAATTATTTGATGAGTTATGAG	275	57	AB045582	7q32
		hPEG1 BSR1	ATATTTTTCAAATTTCAATAACAAC				
LIT1	BS	LIT1 F	TTTTGGTAGGATTTTTGTTGAGGAGT	307	57	U90095	11p15
		LIT1 R	CCTCACACCCAACCAATACCTC				
ZAC	BS	ZAC F	GGGGTAGTYGTTTTATAGTTTAGTA	152	57	AL109755	6q24-q25
		ZAC R	CRAACACCCAACACCTACCCTA				
PEG3	BS	PEG3 BS2F3	GGTTGTTGATTGGTTAGTATAGAAGTT	227	55	AC006115	19q13.4
		PEG3 BS2R0	CTCACCTCACCTCAATACTACRCAAC				
SNRPN	BS	hSNRPN BSF1	AGGAGGTTATGGTAGTGGATTAGG	383	59	U41384	15q11.2
		hSNRPN BSR1	CACCACAATAAACAACCAATAAC				
ZDBF2	BS	ZDBF2 BSF1	GTTTTGTTAGTTAGATTGGAAAATA	210	57	AC007383	2q33.3
		ZDBF2 BSR1	AAAATAATAATTACCTAAAAATAAAAA				

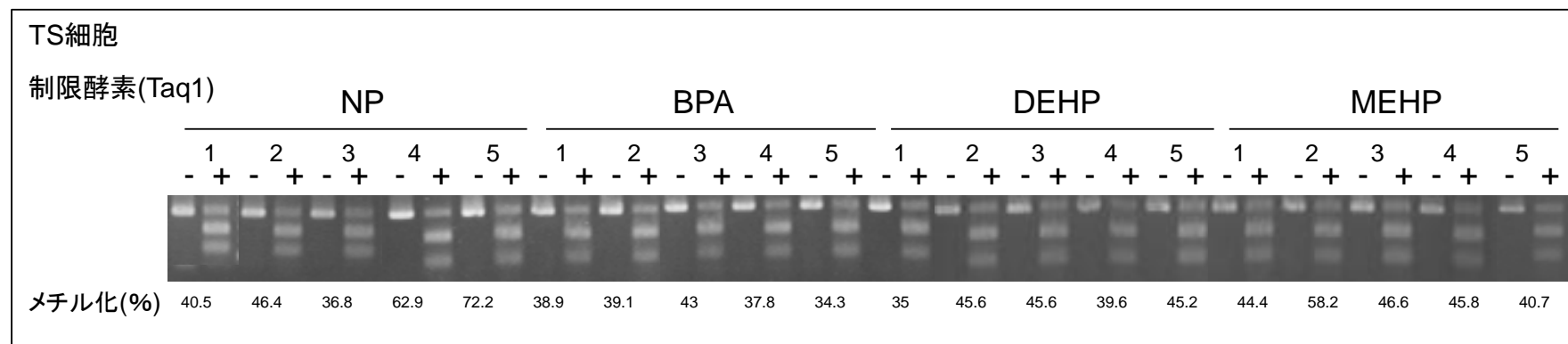
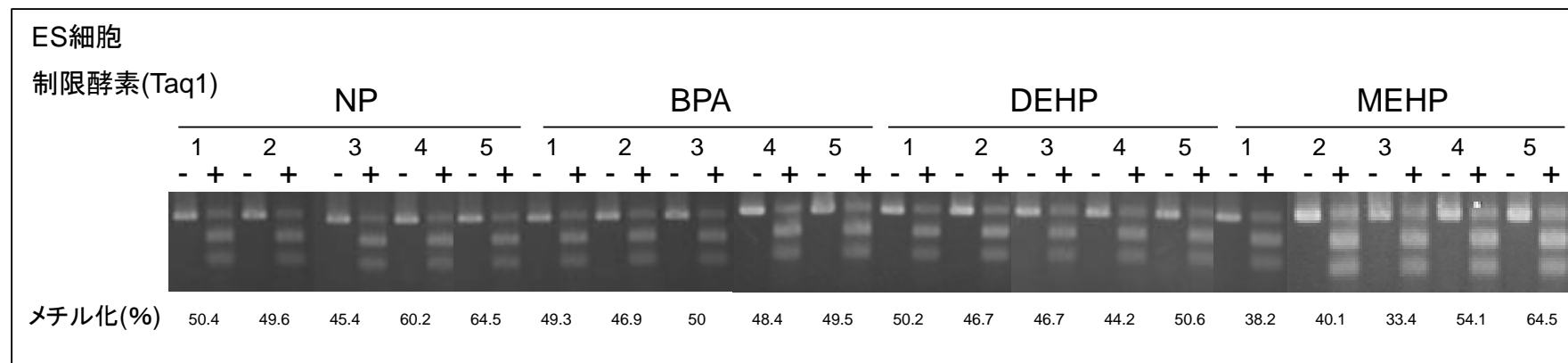
- ② 遅発性毒性評価：1) で得られた結果を基に、長期間（14日間）細胞培養し、エピゲノム解析にて変異を解析。

4. 結果及び考察

(1) 急性毒性評価：

急性試験の結果、ノニルフェノールに特に変化が表れた。H19遺伝子の場合、ES細胞では、血中濃度以下においてメチル化の値に有為な変化がないため、細胞培養による影響やメチル化解析法が、正確、安定である事が確認された。また、血中濃度の10倍濃度では、メチル化の変化が確認された。さらに、100倍濃度では、このメチル化の変化が増強されることがわかった。TS細胞においても、程度は低いものの、同様の結果が確認された。また、これらの細胞では、顕微鏡学的に細胞形態の変化や増殖能に著しい変化は見られなかった（図6、7）。

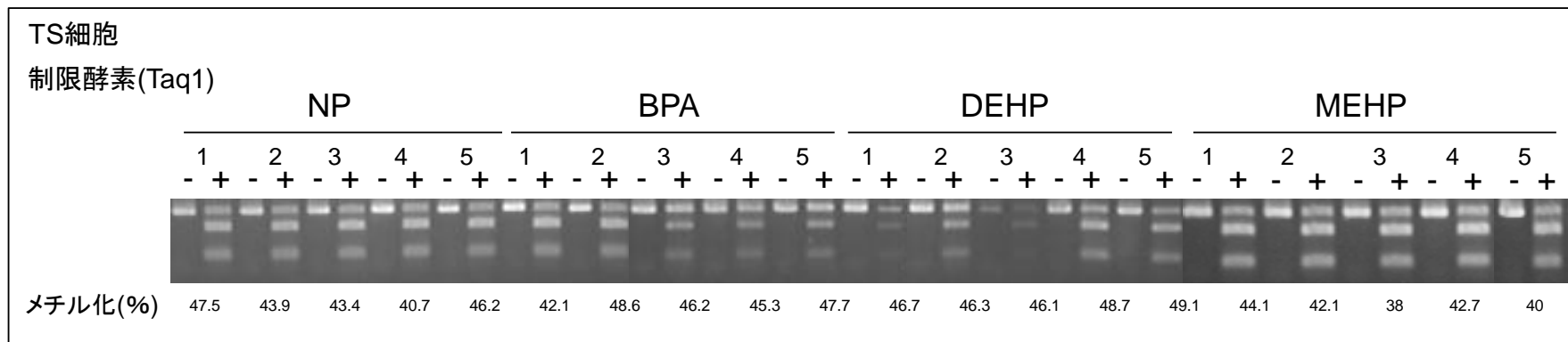
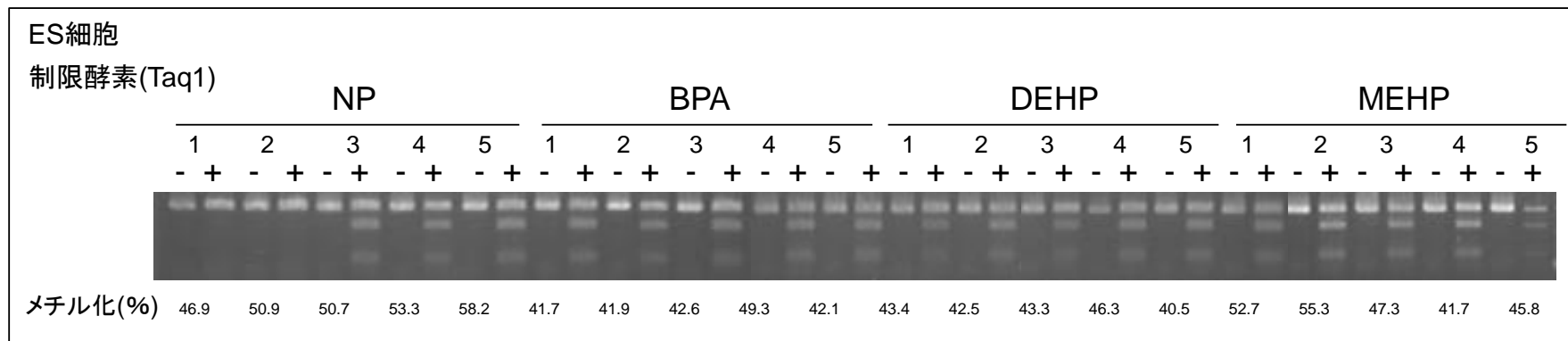
同様の方法で、ES,TS細胞に、4種類の化学物質の濃度を変えて添加し、8種類のインプリント遺伝子のメチル化の解析結果のまとめを示す。ノニルフェノールに加え、フタル酸エステル（MEHP）では、複数の領域で、また、ES、TS細胞両方で、低濃度の場合において有意なメチル化の変化が見られた（表2）。



各細胞DNAサンプルは、EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research)によりバイサルファイト処理され、PCRが行われた。シーケンスの結果が、クローニングによるバイアスの影響がないことを確認するために、DNAで制限酵素処理解析(COBRA)が行われた。制限酵素処理によりメチル化しているテンプレートDNA(バイサルファイト処理済み)のみが切断された。制限酵素反応後、2.5-3%アガロースゲルで電気泳動した。制限酵素で切断された断片はメチル化、切断されなかった断片はメチル化していないテンプレートであることを示す。

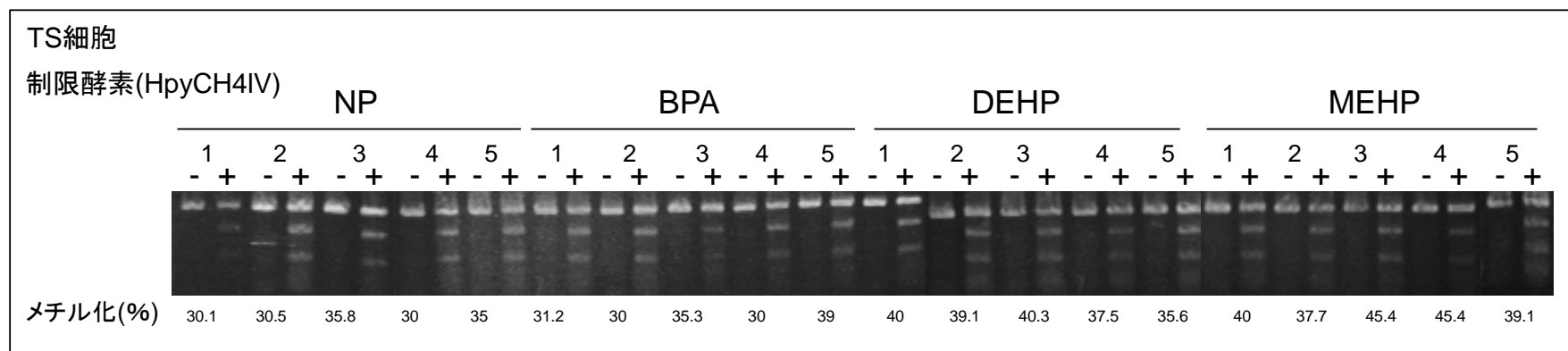
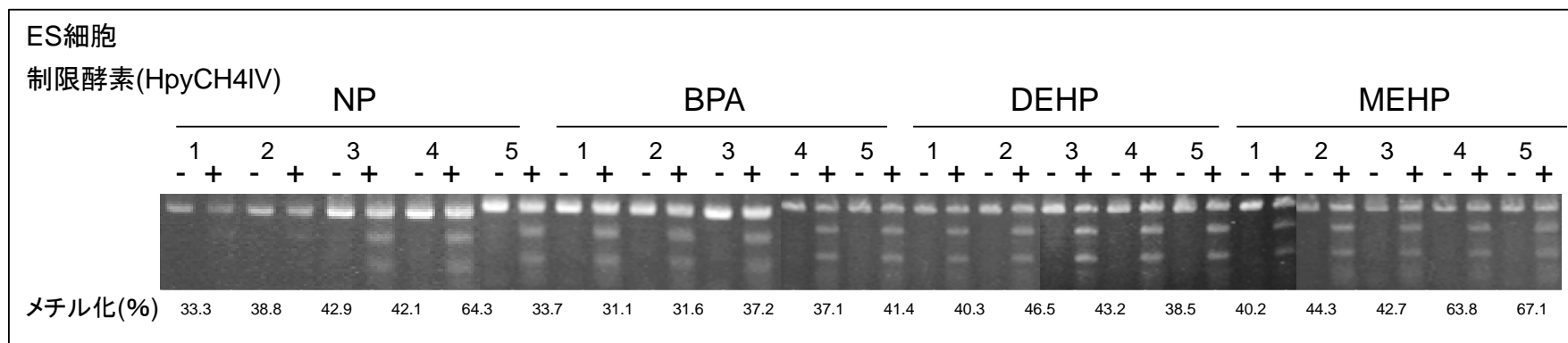
1 : $\times 10^{-2}$
 2 : $\times 10^{-1}$
 3 : $\times 1$ (血中濃度)
 4 : $\times 10^1$
 5 : $\times 10^2$

図6-1 H19遺伝子 (3日間培養)



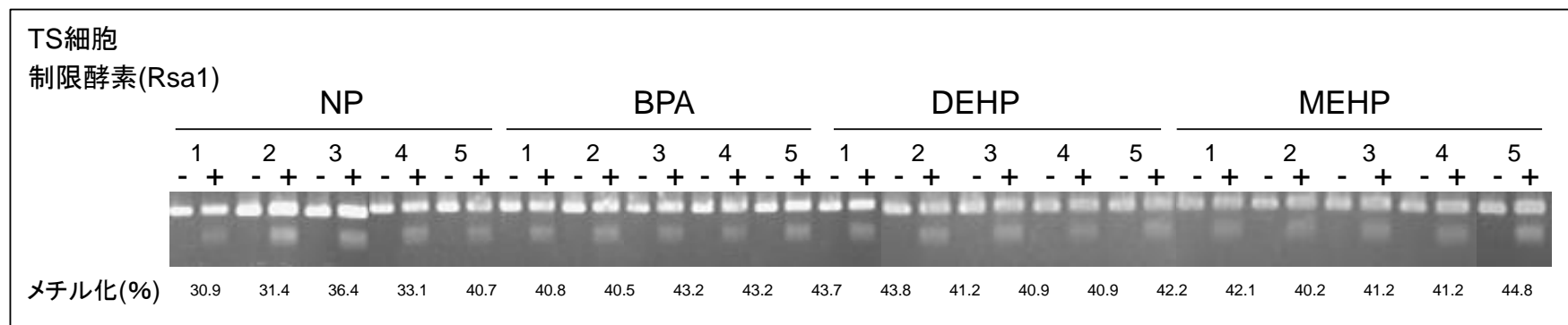
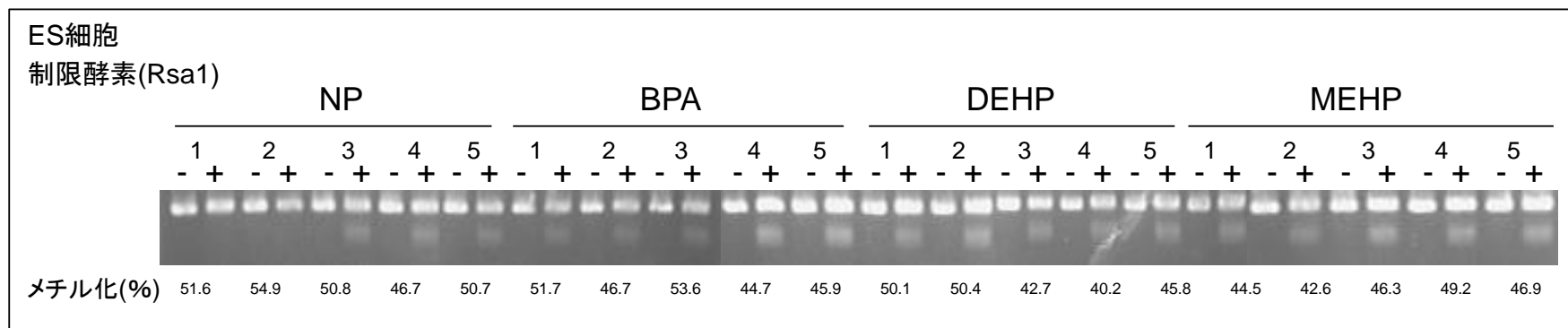
1 : $\times 10^{-2}$
 2 : $\times 10^{-1}$
 3 : $\times 1$ (血中濃度)
 4 : $\times 10^1$
 5 : $\times 10^2$

図6-2 GTL2遺伝子(3日間培養)



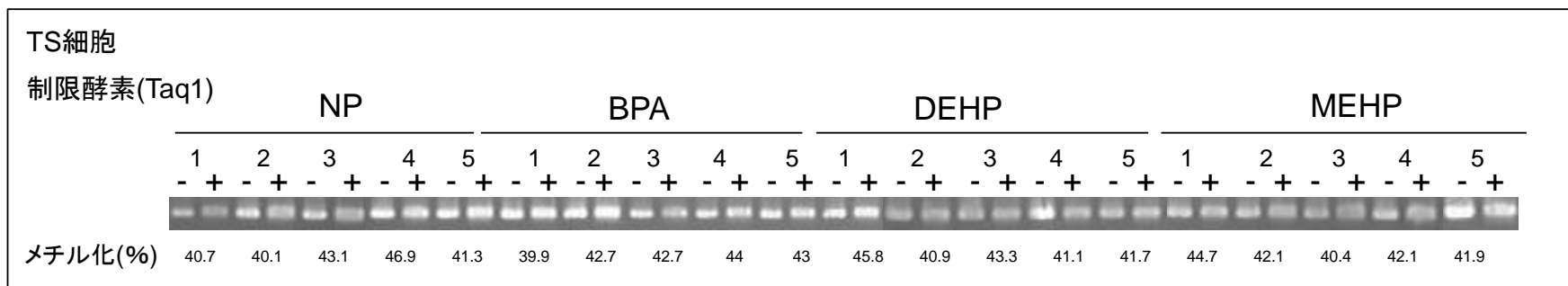
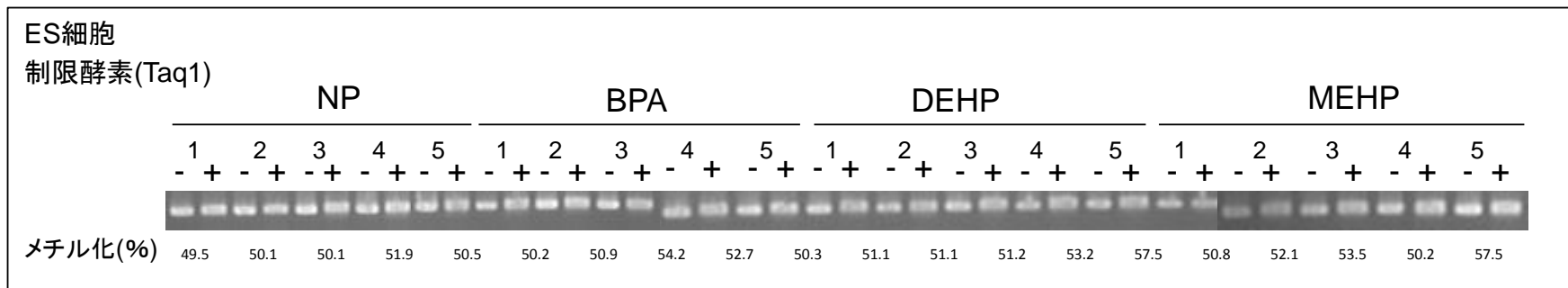
1 : $\times 10^{-2}$
 2 : $\times 10^{-1}$
 3 : $\times 1$ (血中濃度)
 4 : $\times 10^1$
 5 : $\times 10^2$

図6-3 PEG1遺伝子 (3日間培養)



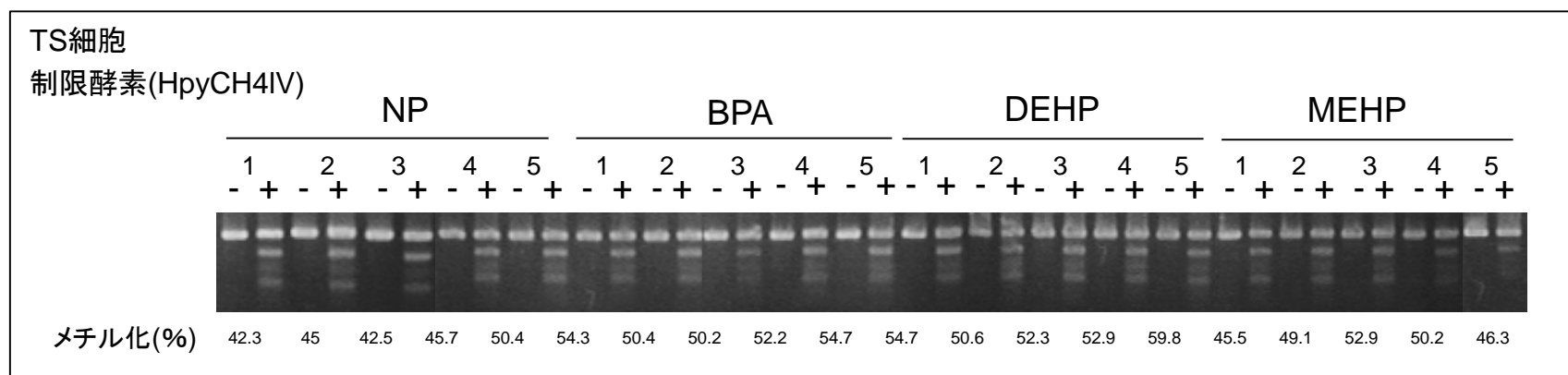
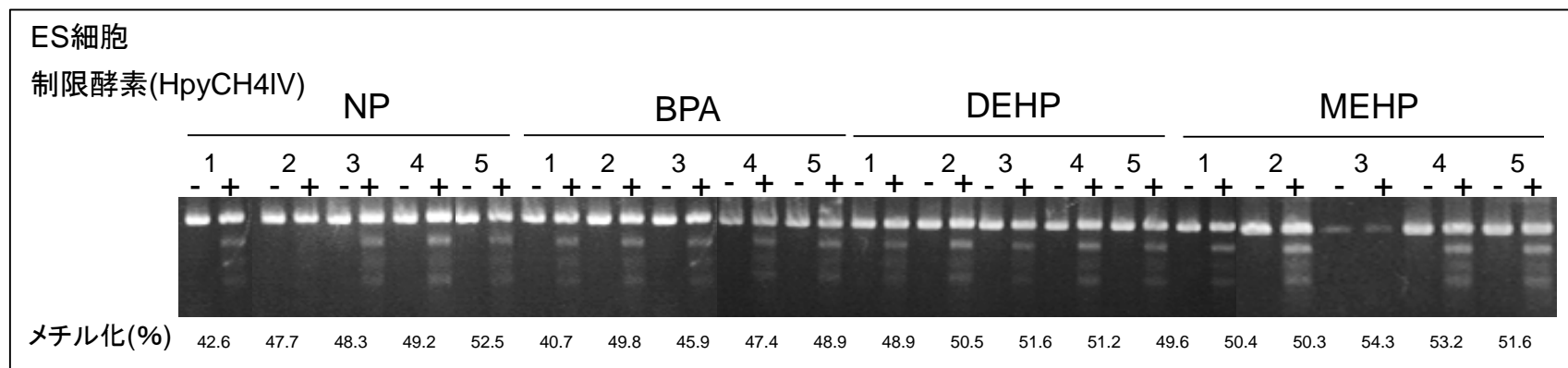
1 : $\times 10^{-2}$
 2 : $\times 10^{-1}$
 3 : $\times 1$ (血中濃度)
 4 : $\times 10^1$
 5 : $\times 10^2$

図6-4 LIT1遺伝子 (3日間培養)



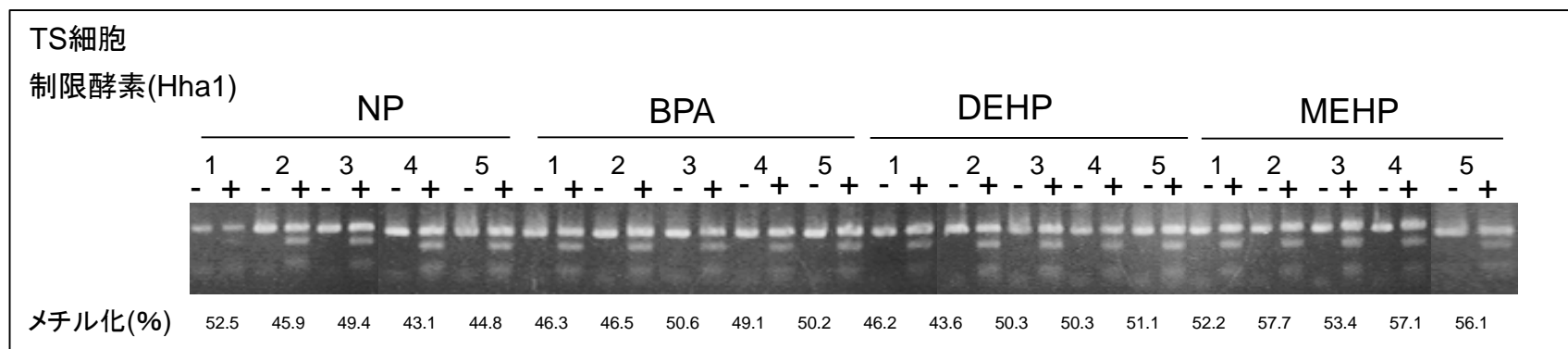
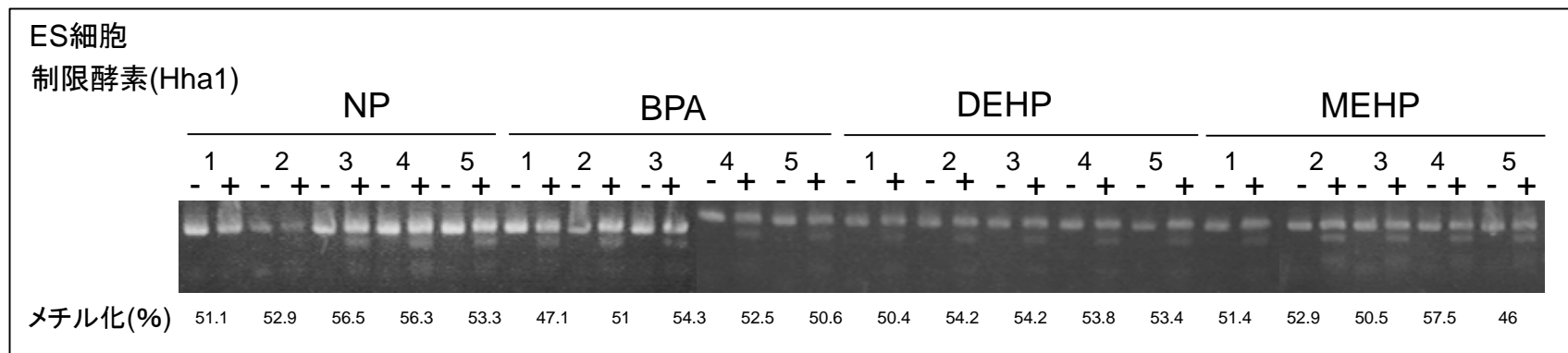
1 : $\times 10^{-2}$
 2 : $\times 10^{-1}$
 3 : $\times 1$ (血中濃度)
 4 : $\times 10^1$
 5 : $\times 10^2$

図6-5 ZAC遺伝子 (3日間培養)



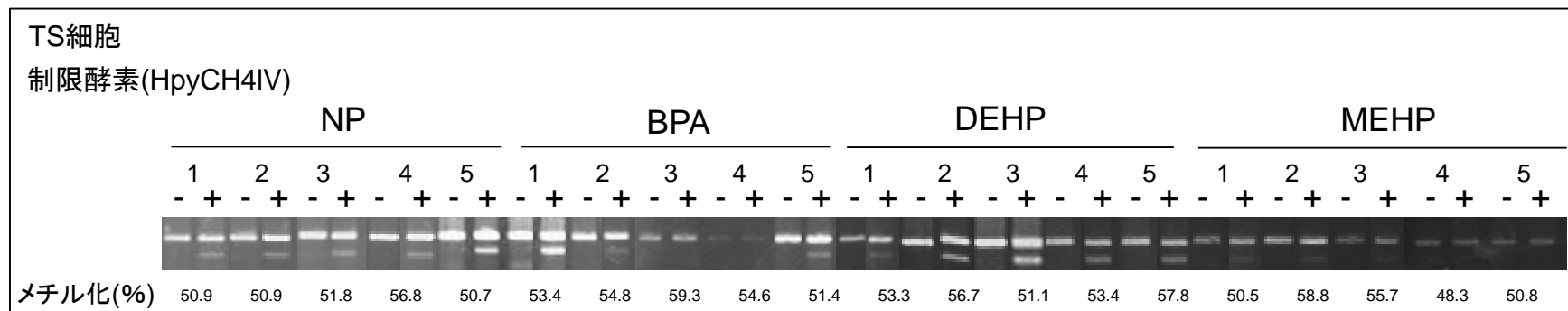
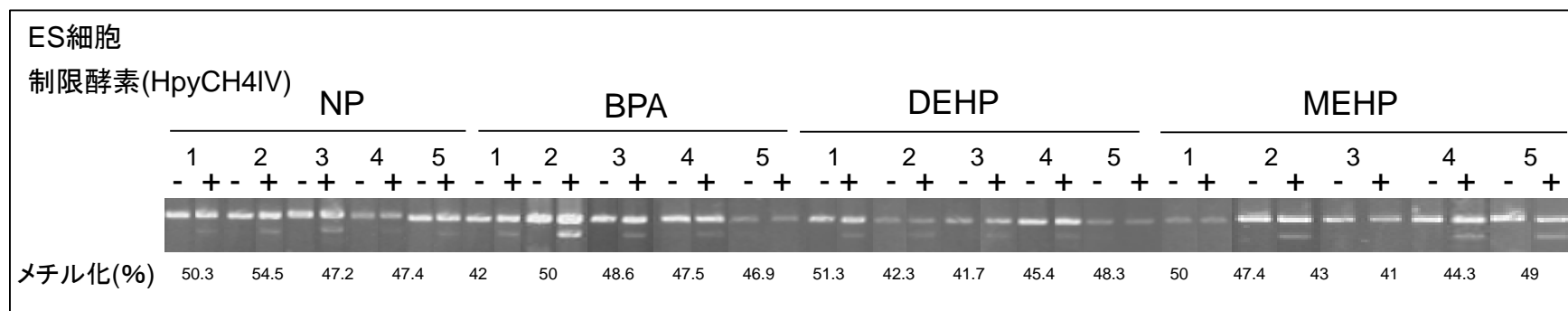
1 : $\times 10^{-2}$
 2 : $\times 10^{-1}$
 3 : $\times 1$ (血中濃度)
 4 : $\times 10^1$
 5 : $\times 10^2$

図6-6 PEG3遺伝子 (3日間培養)



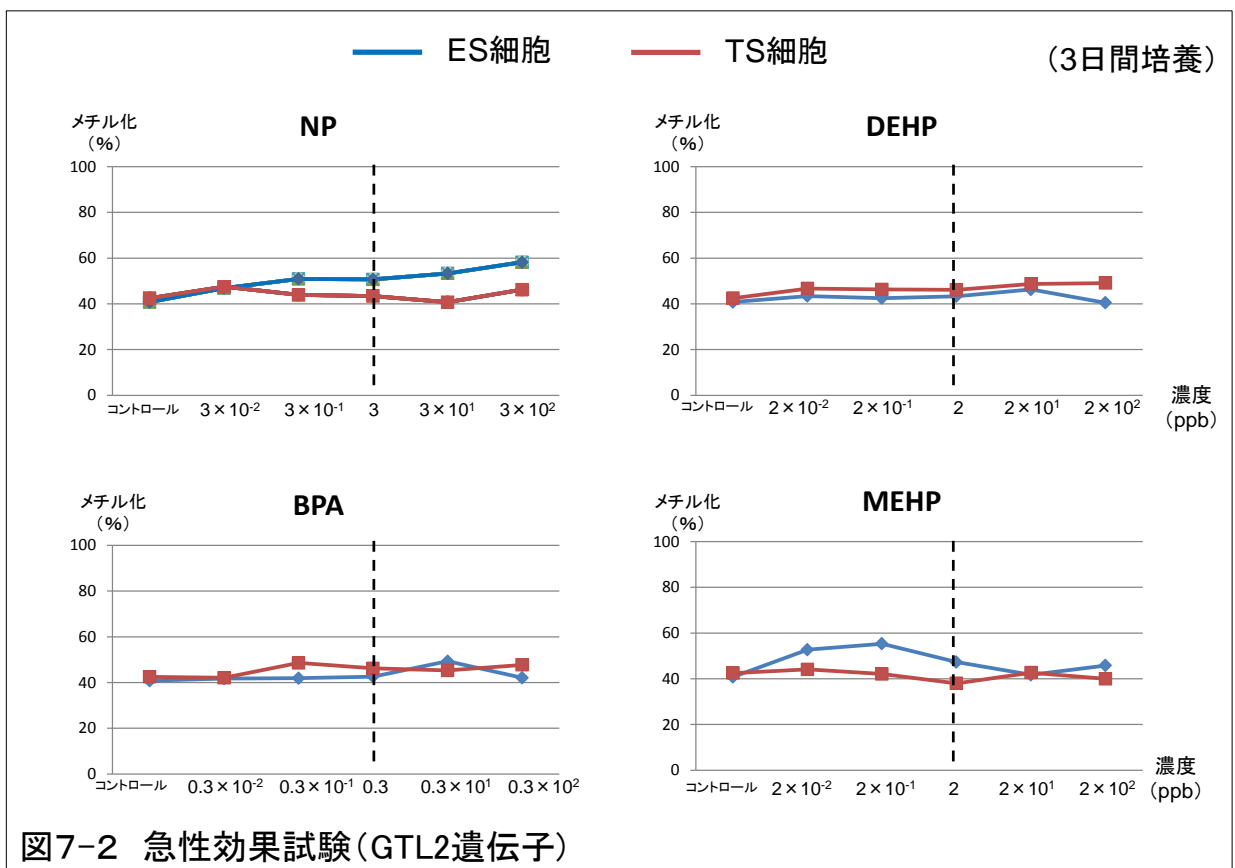
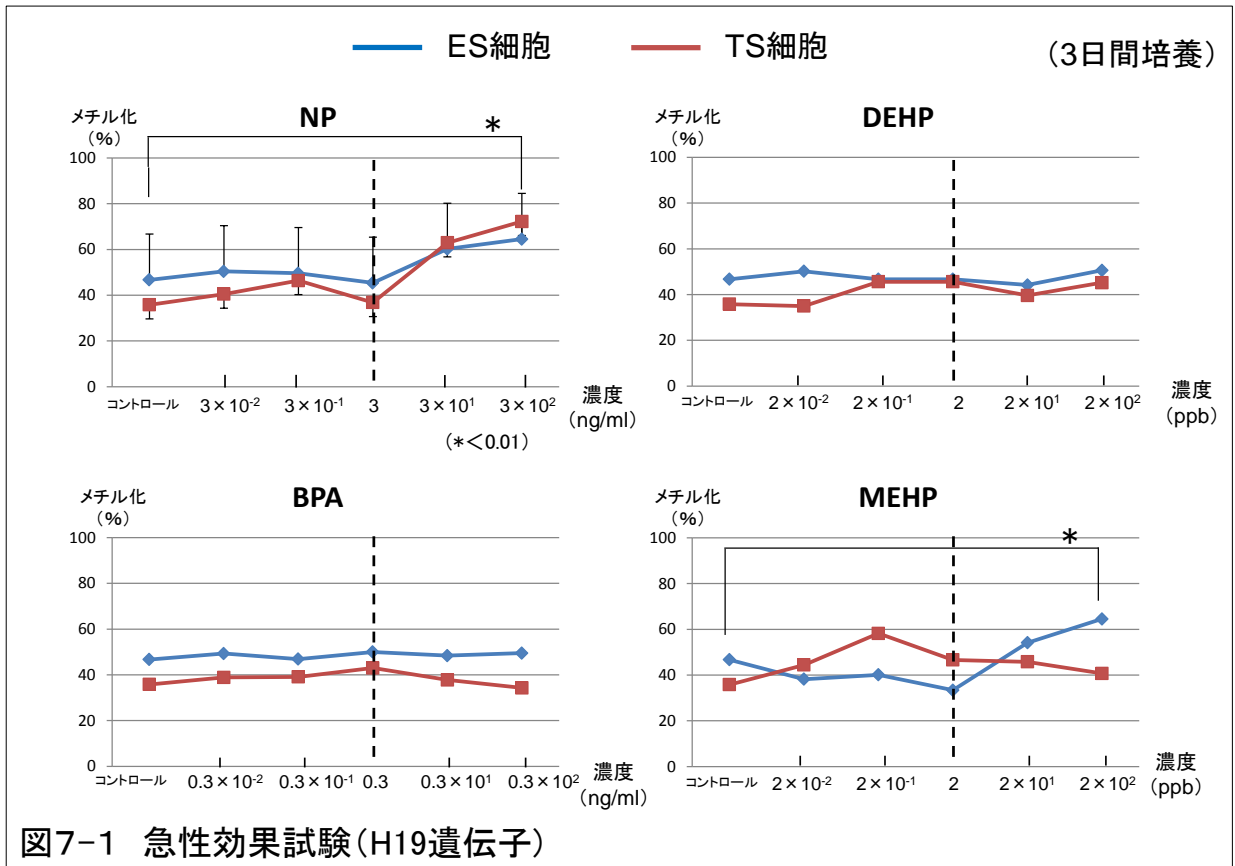
1 : $\times 10^{-2}$
 2 : $\times 10^{-1}$
 3 : $\times 1$ (血中濃度)
 4 : $\times 10^1$
 5 : $\times 10^2$

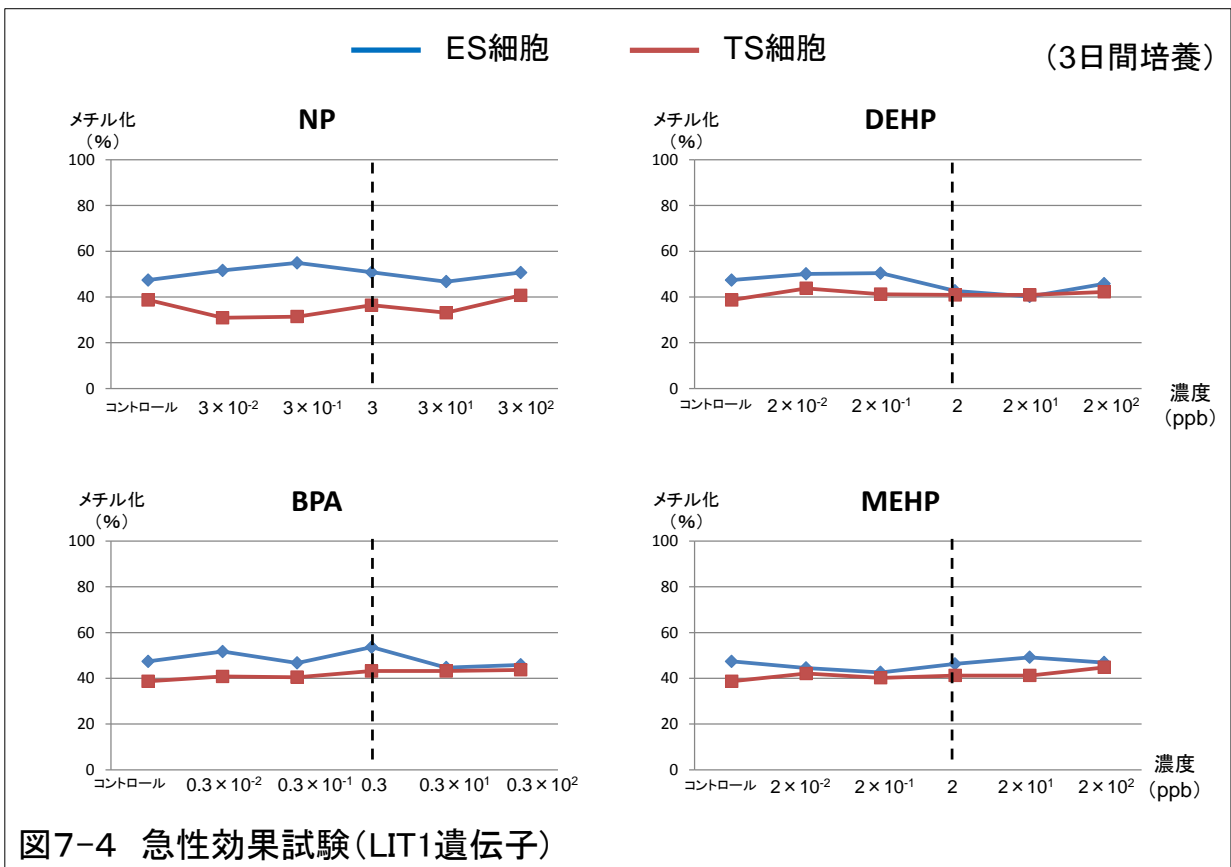
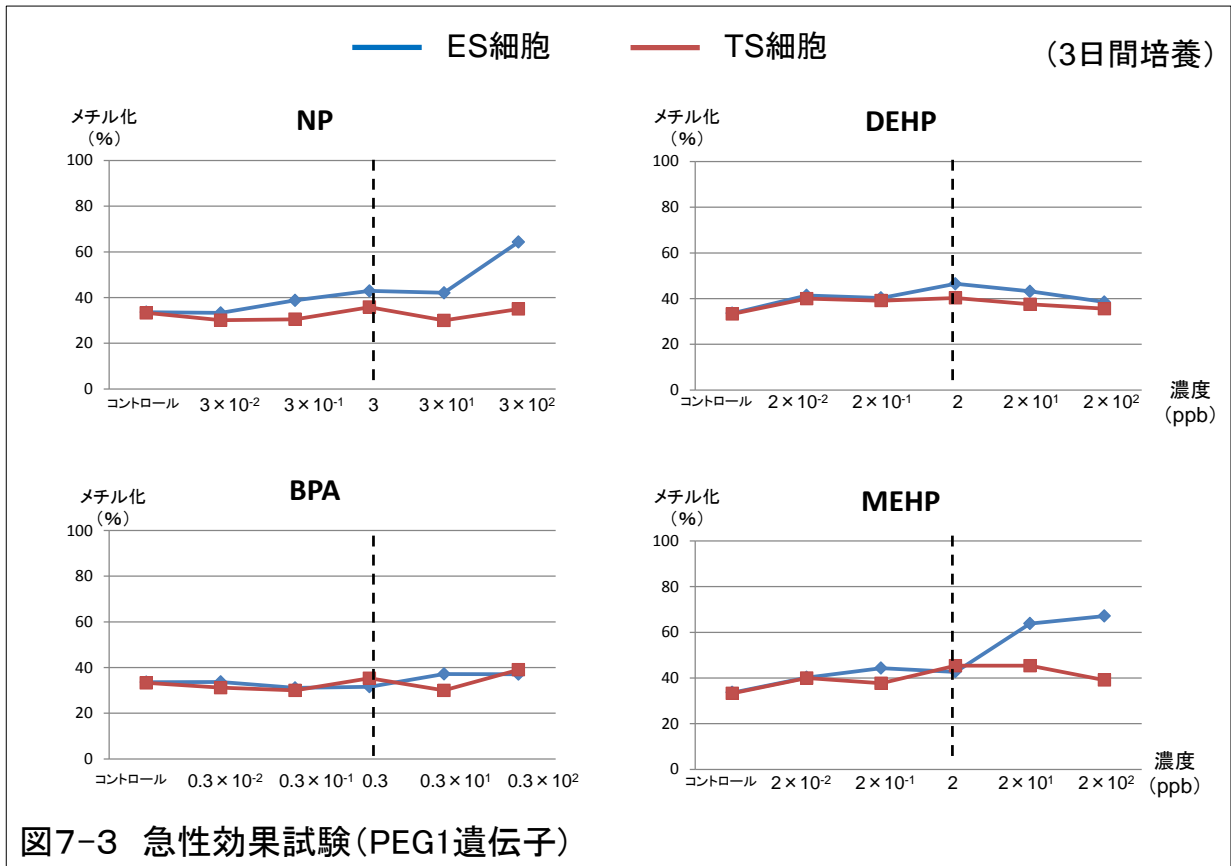
図6-7 SNRPN遺伝子 (3日間培養)

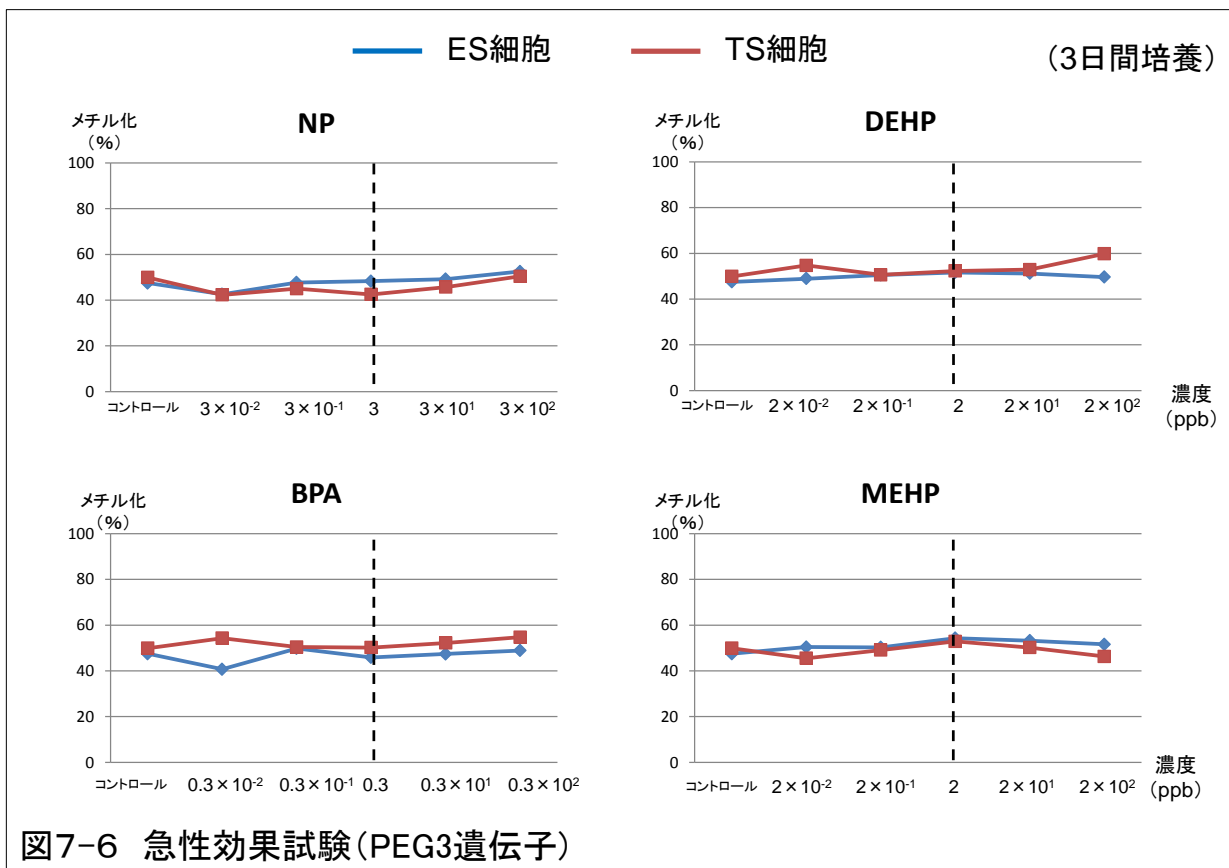
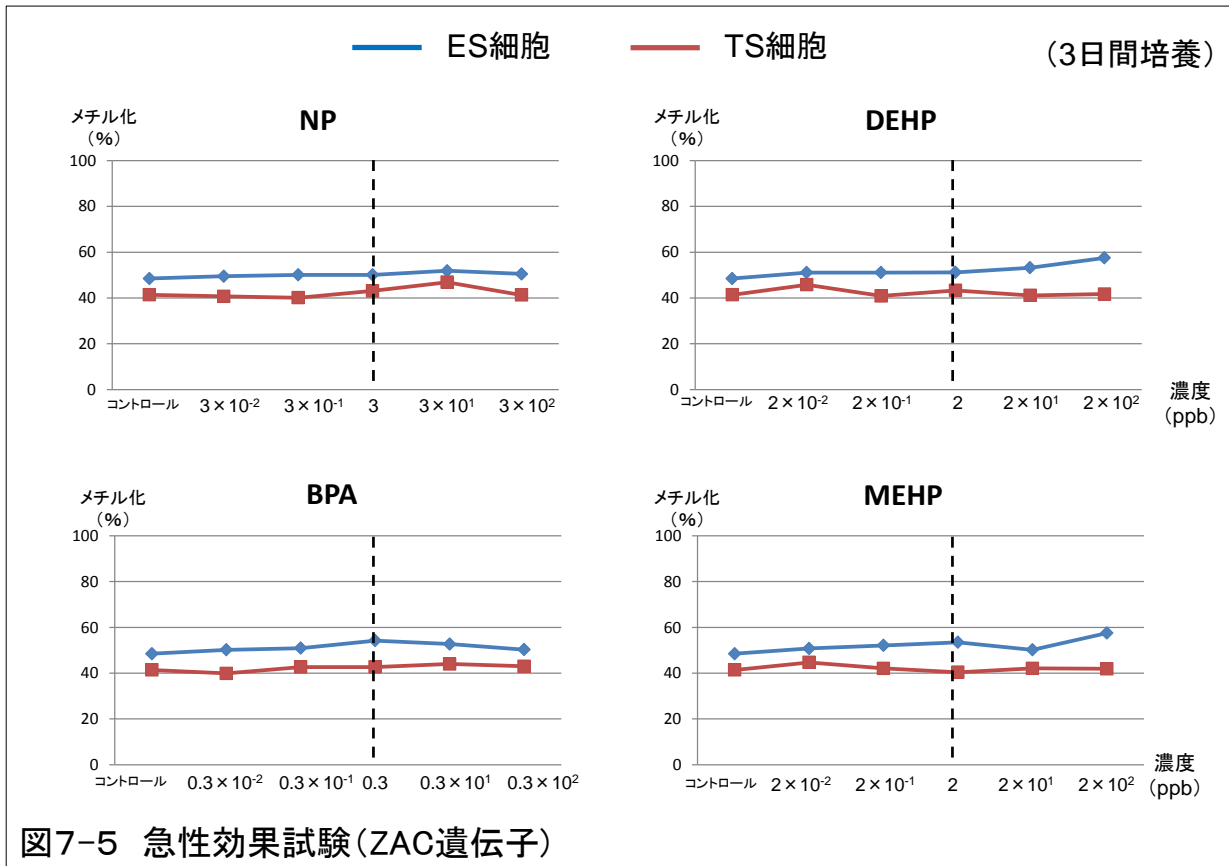


1 : $\times 10^{-2}$
 2 : $\times 10^{-1}$
 3 : $\times 1$ (血中濃度)
 4 : $\times 10^1$
 5 : $\times 10^2$

図6-8 ZDBF2遺伝子 (3日間培養)







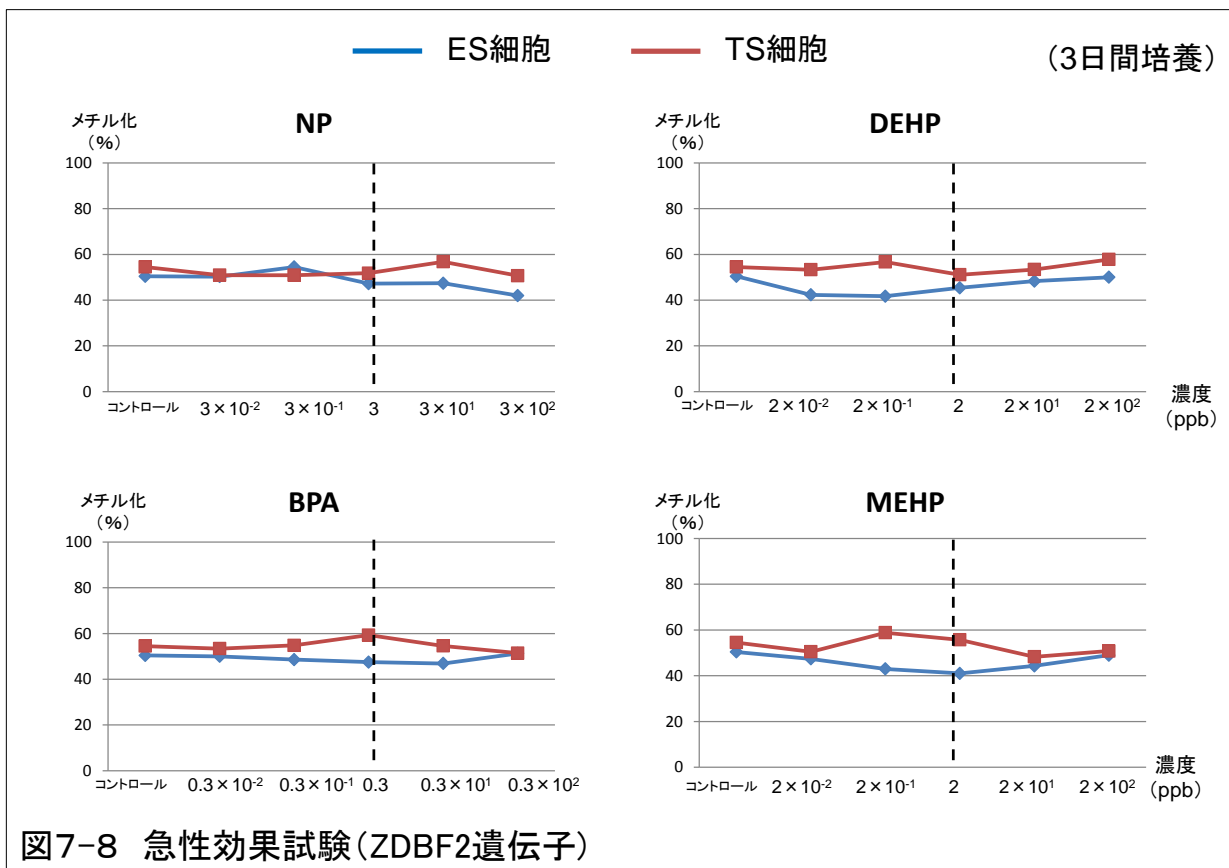
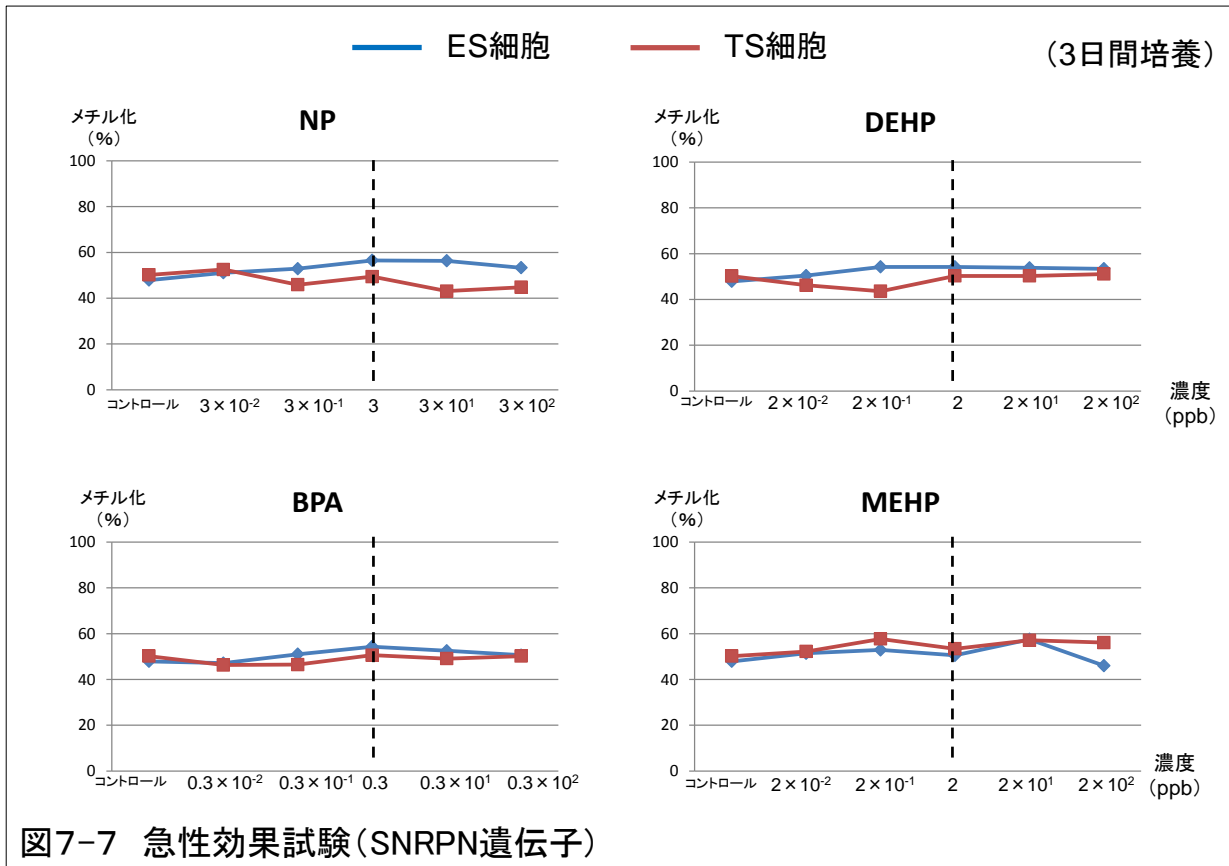


表2 急性効果試験のまとめ

ES	NP			BPA			DEHP			MEHP			
	1	10 ¹	10 ²	1	10 ¹	10 ²	1	10 ¹	10 ²	1	10 ¹	10 ²	
H19	-	▲	▲	-	-	-	-	-	-	-	-	-	▲
GTL2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEG1	-	-	▲	-	-	-	-	-	-	-	-	-	▲
LIT1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ZAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEG3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SNRPN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	▲
ZDBF2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TS	NP			BPA			DEHP			MEHP			
	1	10 ¹	10 ²	1	10 ¹	10 ²	1	10 ¹	10 ²	1	10 ¹	10 ²	
H19	-	▲	▲	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GTL2	-	-	▲	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEG1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LIT1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ZAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEG3	-	-	-	-	-	-	-	-	▲	-	-	-	-
SNRPN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ZDBF2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

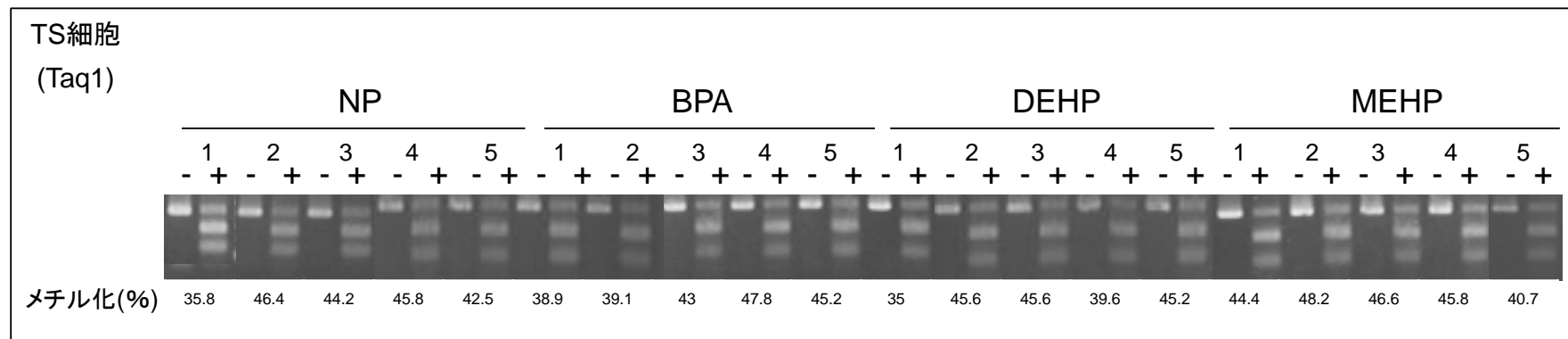
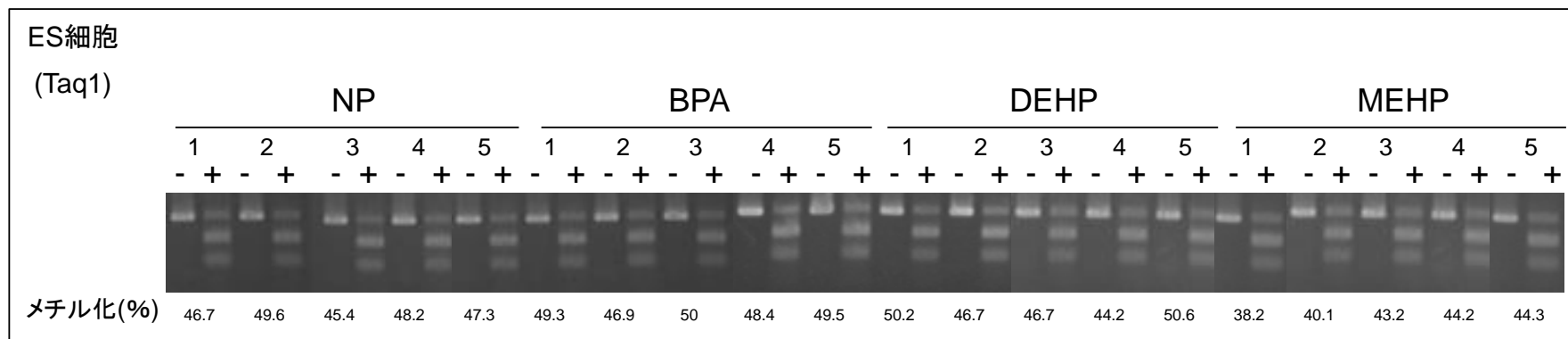
1: 血中濃度とする

ピンクの三角は、メチル化の変化を示す。赤の三角は、大きなメチル化の変化を示す。

(2) 遅発性毒性評価：

遅発性試験の結果、それぞれ、血中濃度の化学物質を培養液に添加し、14日間培養を行なった。また、細胞は、3日目、5日目、7日目、10日目、14日目に回収し、メチル化の解析を行った。フタル酸エステルMEHPの場合、無添加の場合と比較し、ES細胞で一部のインプリント遺伝子領域に、有意なメチル化の変化が確認された（図8、9）。

これらの結果、NPやMEHPは比較的低濃度でもメチル化に影響を与え、特にES細胞において変化がみられた。また、MEHPでは、晩発性効果も予想された。また、培養期間中、顕微鏡学的解析では、細胞形態、細胞増殖能に著しい変化は認められなかった（表3）。

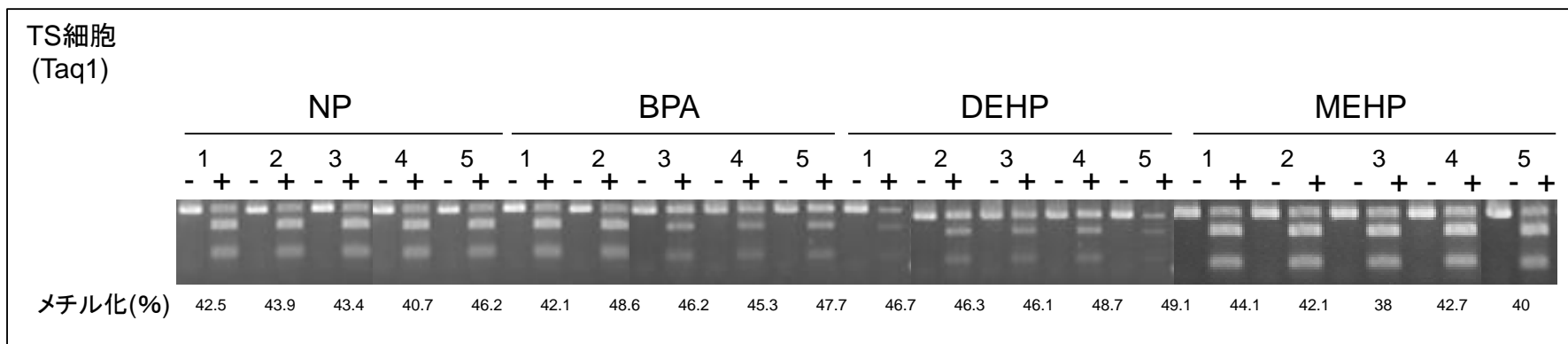
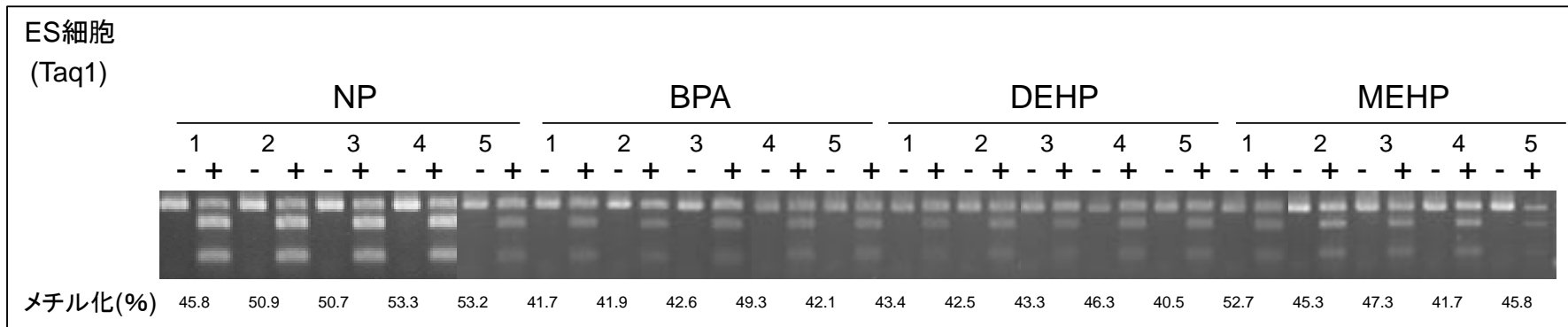


同様に各細胞DNAサンプルは、EZ DNA Methylation Kit(Zymo Research)によりバイサルファイト処理され、PCRが行われた。シークエンスの結果が、クローニングによるバイアスの影響がないことを確認するために、DNAで制限酵素処理解析(COBRA)が行われた。制限酵素処理によりメチル化しているテンプレートDNA(バイサルファイト処理済み)のみが切断された。制限酵素反応後、2.5-3%アガロースゲルで電気泳動した。制限酵素で切断された断片はメチル化、切断されなかった断片はメチル化していないテンプレートであることを示す。

- 1 1日目
- 2 3日目
- 3 7日目
- 4 10日目
- 5 14日目

H19では有意な差はない

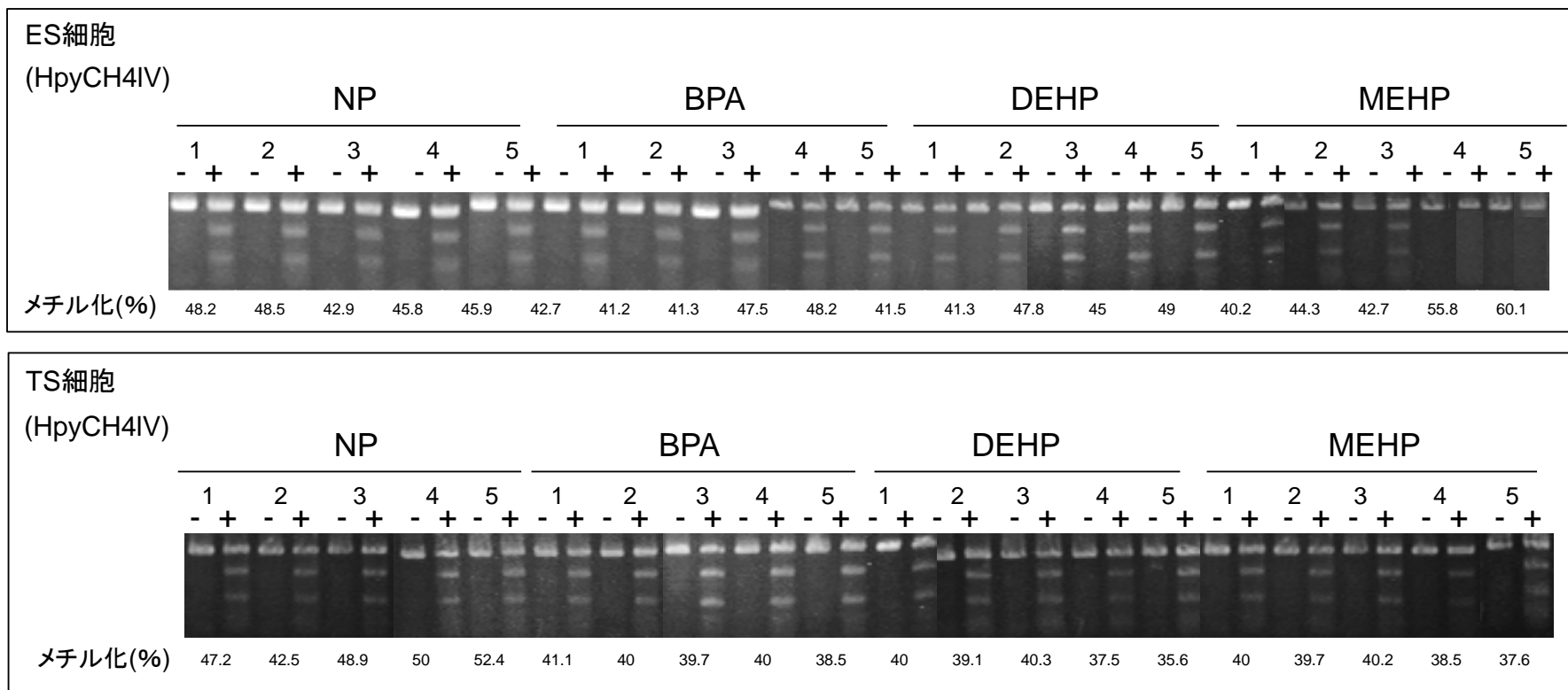
図8-1 H19遺伝子



GTL2では有意な差はない

- 1 1日目
- 2 3日目
- 3 7日目
- 4 10日目
- 5 14日目

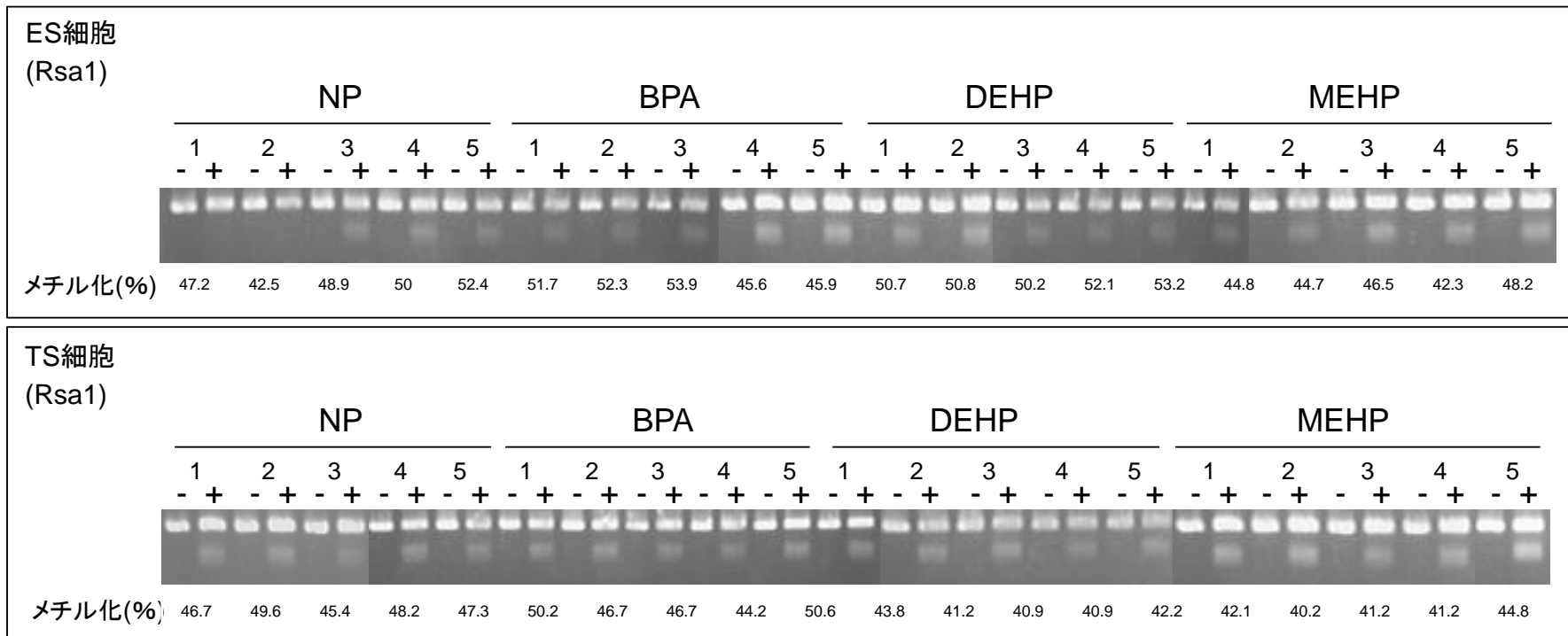
図8-2 GTL2遺伝子



- 1 1日目
- 2 3日目
- 3 7日目
- 4 10日目
- 5 14日目

PEG1ではES細胞、MEHPで異常を示した

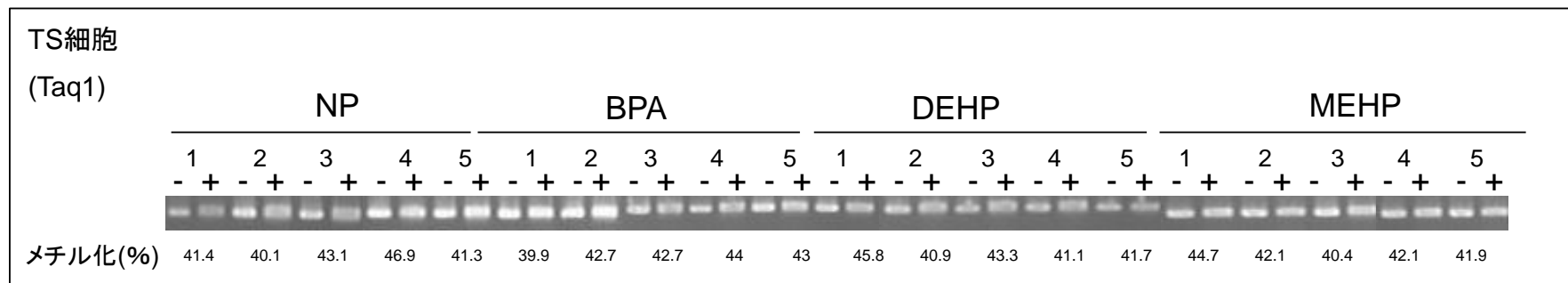
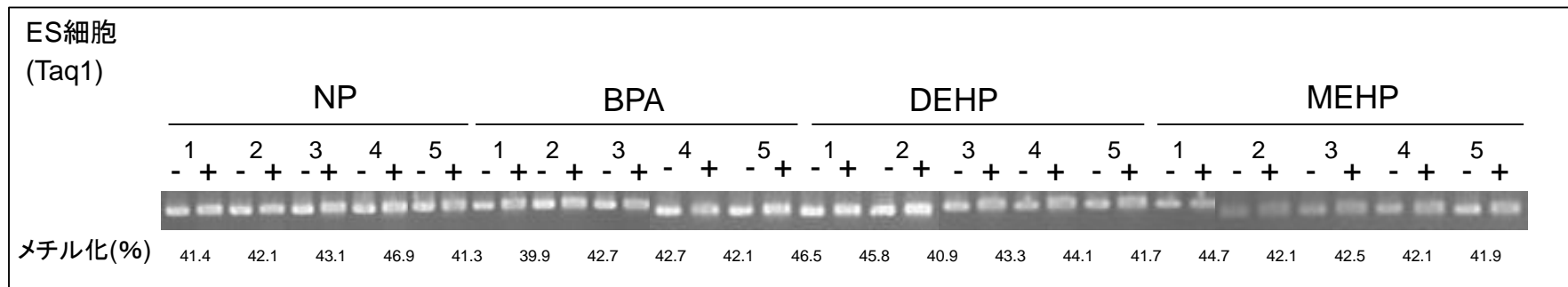
図8-3 PEG1遺伝子



LIT1では有意な差はない

- 1 1日目
- 2 3日目
- 3 7日目
- 4 10日目
- 5 14日目

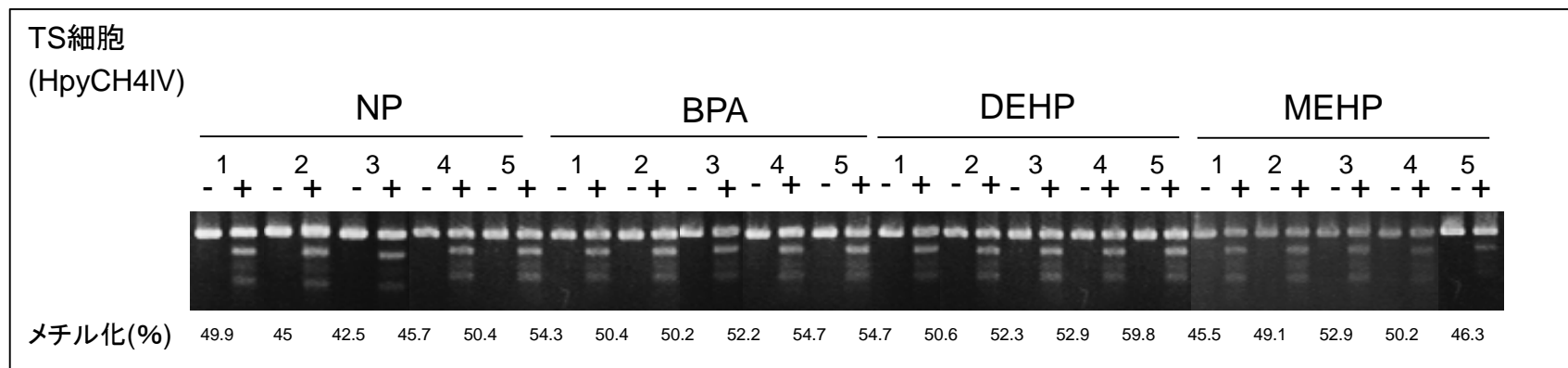
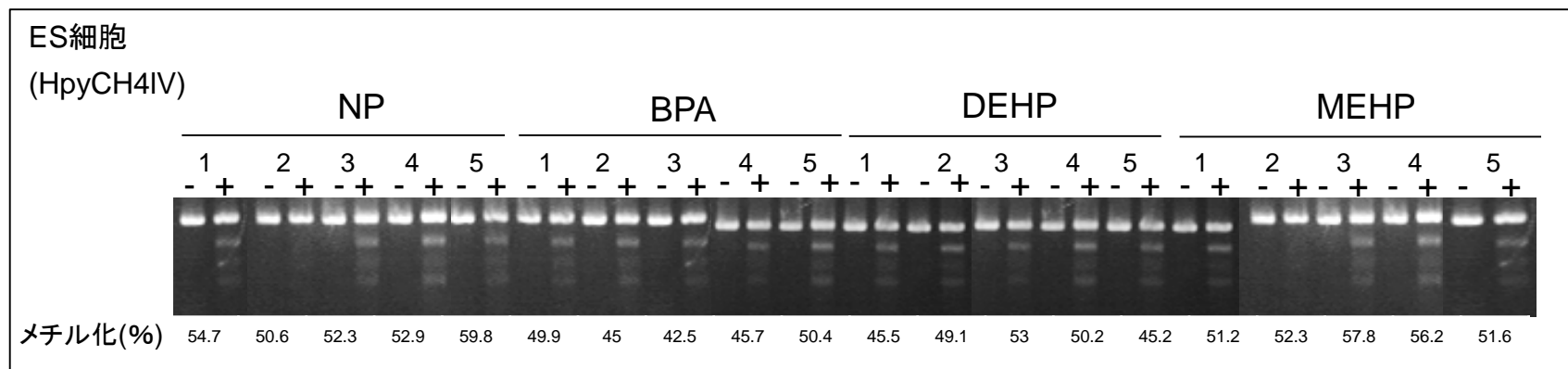
図8-4 LIT1遺伝子



ZACでは有意な差はない

- 1 1日目
- 2 3日目
- 3 7日目
- 4 10日目
- 5 14日目

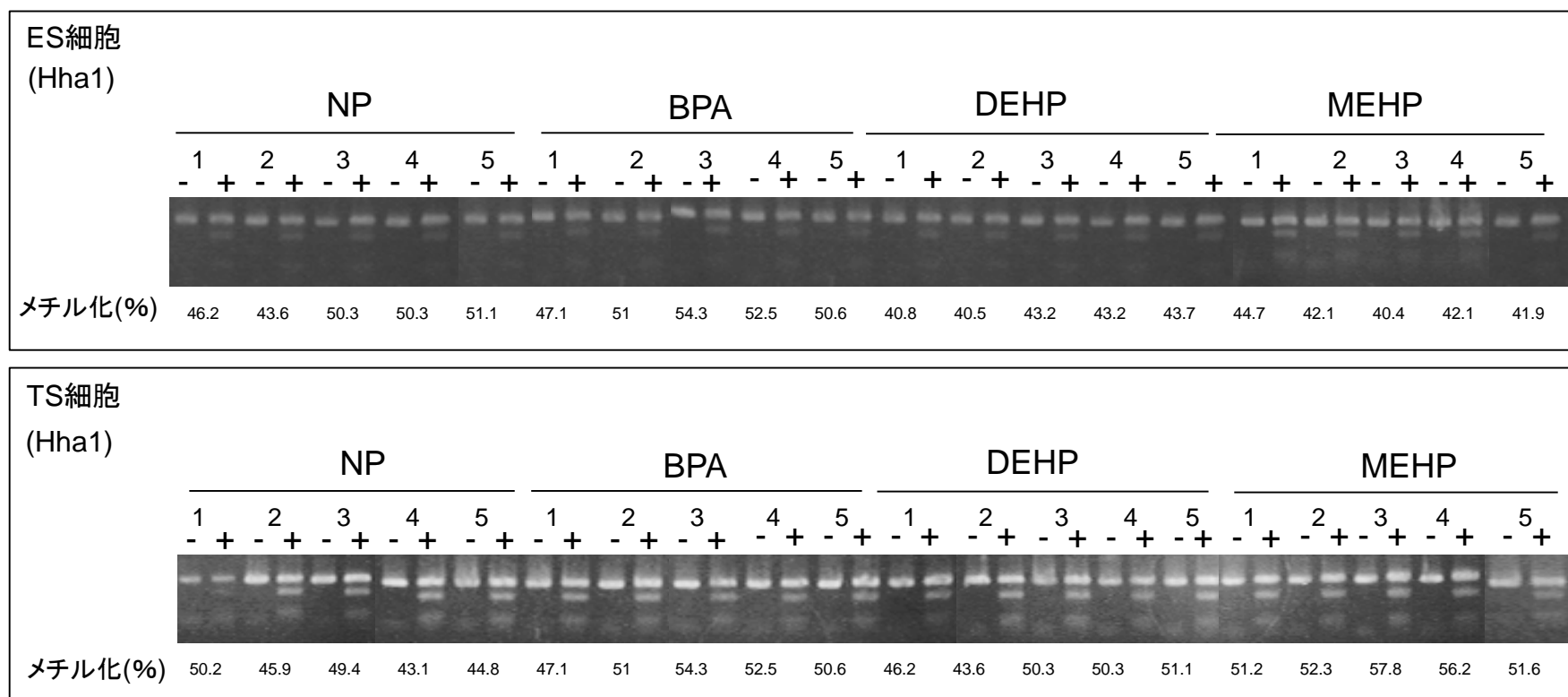
図8-5 ZAC遺伝子



PEG3では有意な差はない

- 1 1日目
- 2 3日目
- 3 7日目
- 4 10日目
- 5 14日目

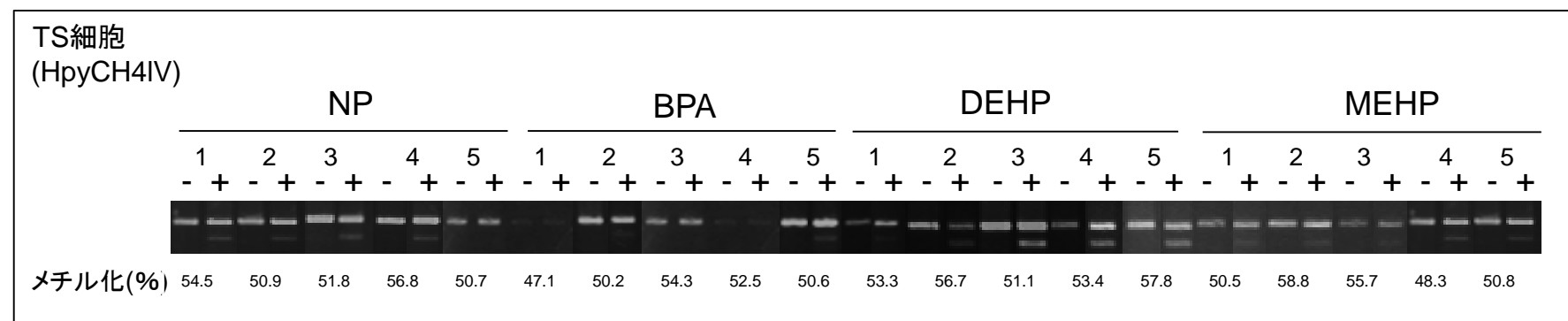
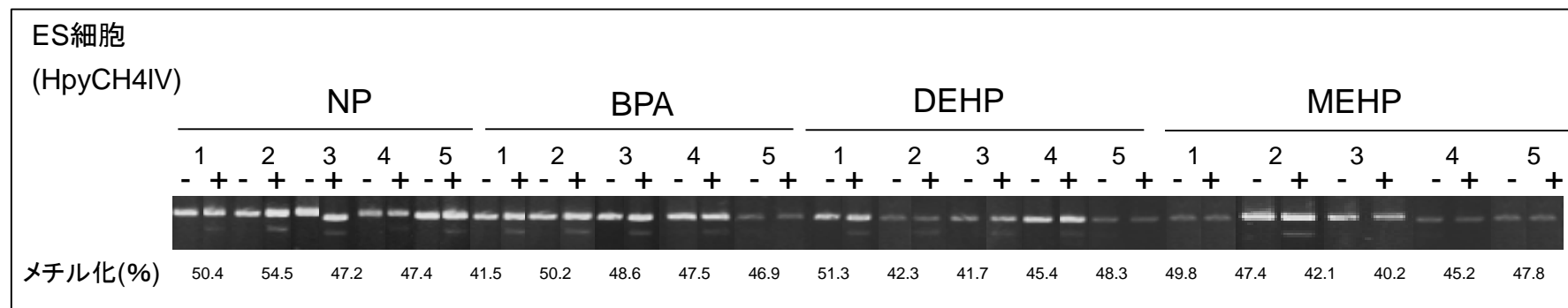
図8-6 PEG3遺伝子



- 1 1日目
- 2 3日目
- 3 7日目
- 4 10日目
- 5 14日目

SNRPNでは有意な差はない

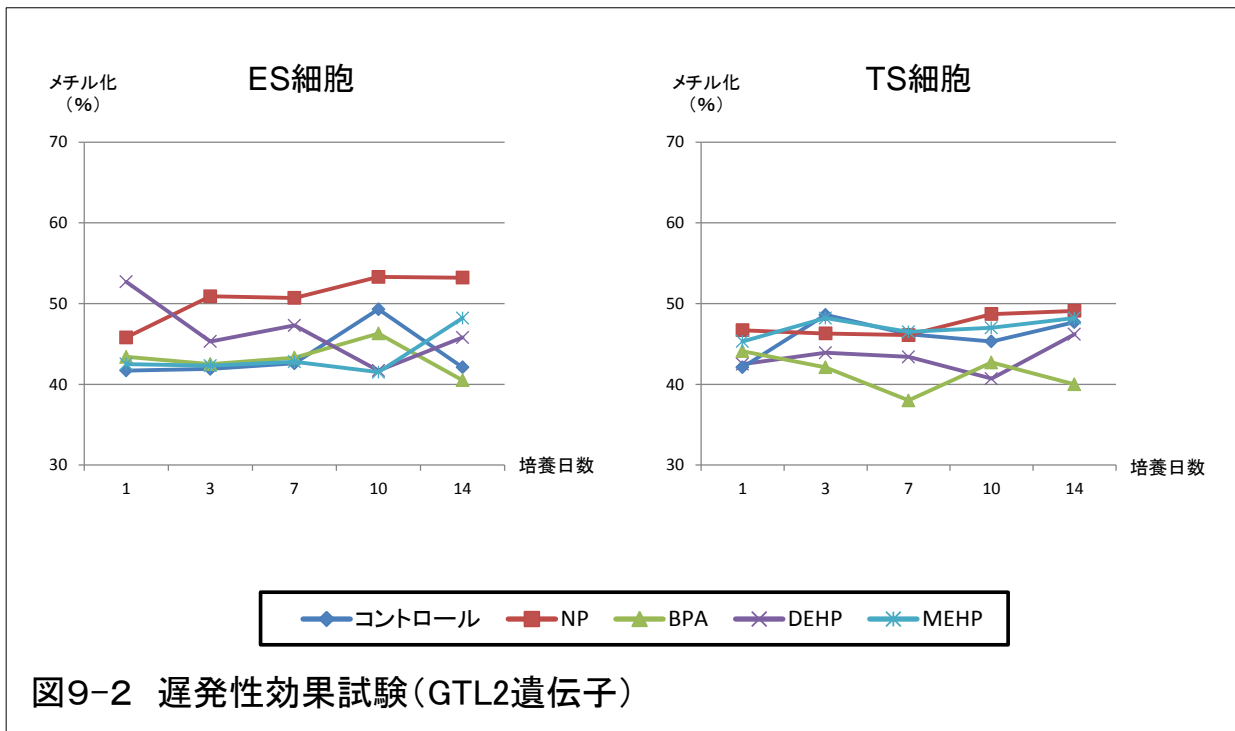
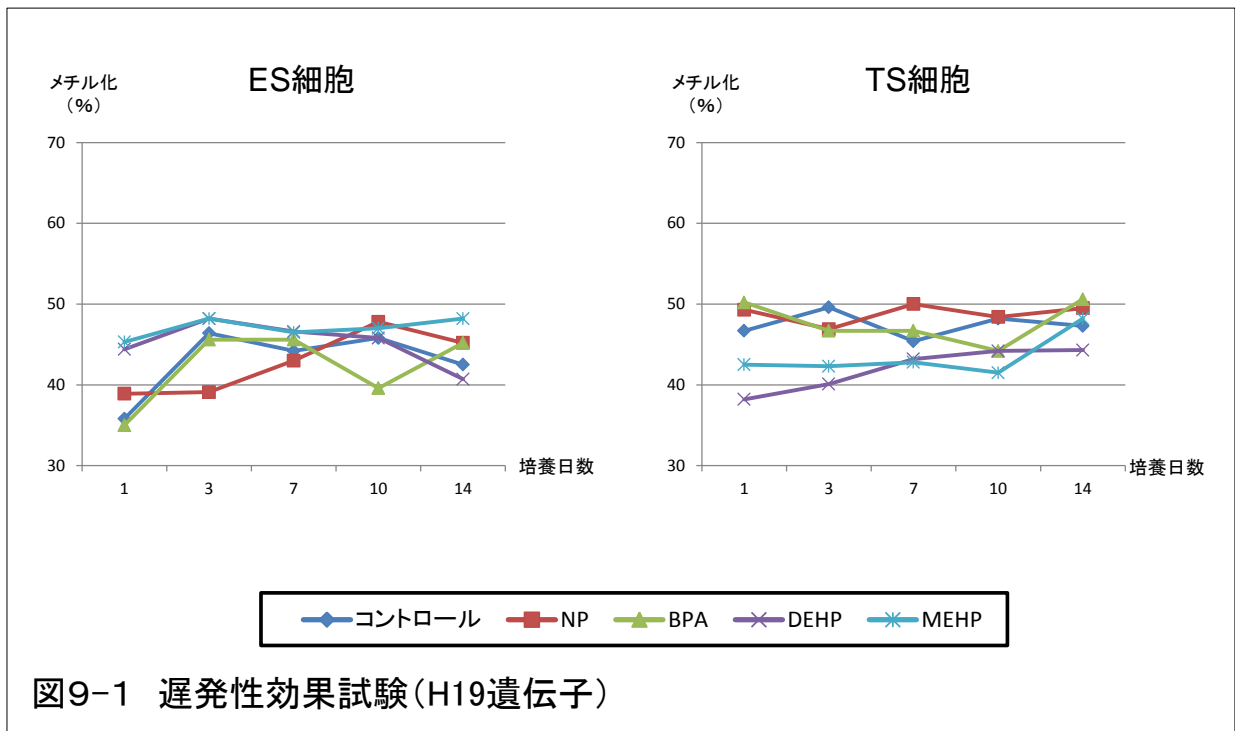
図8-7 SNRPN遺伝子

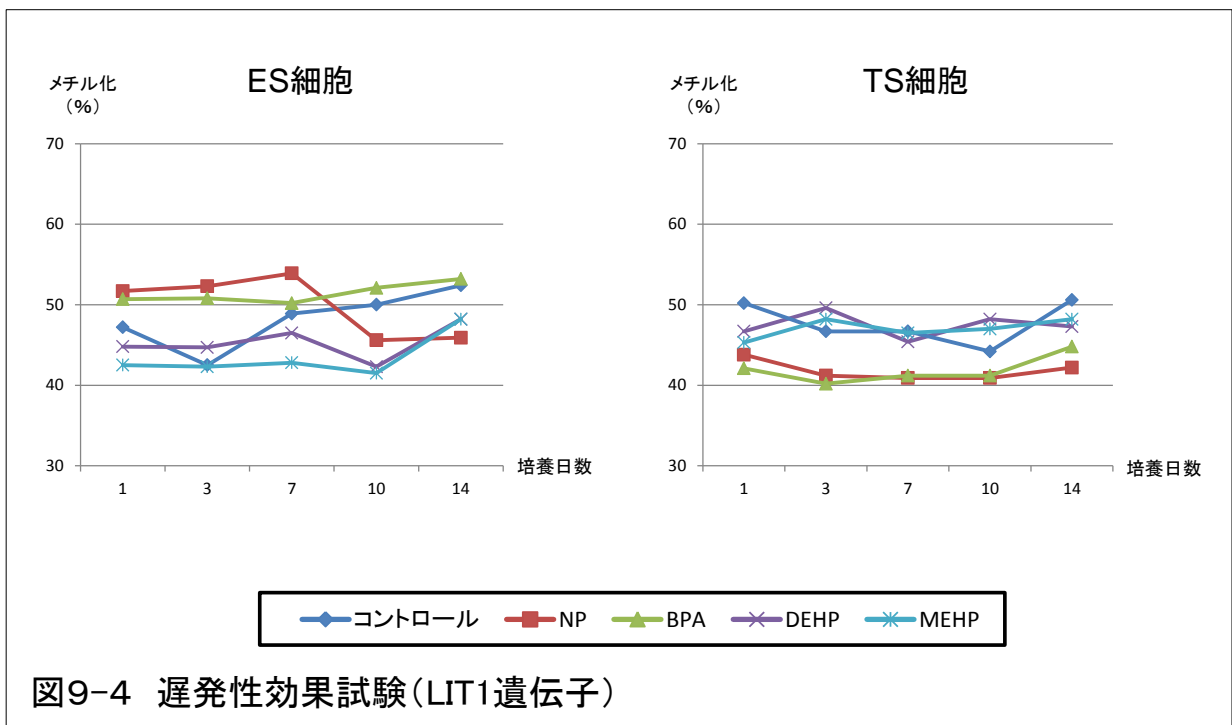
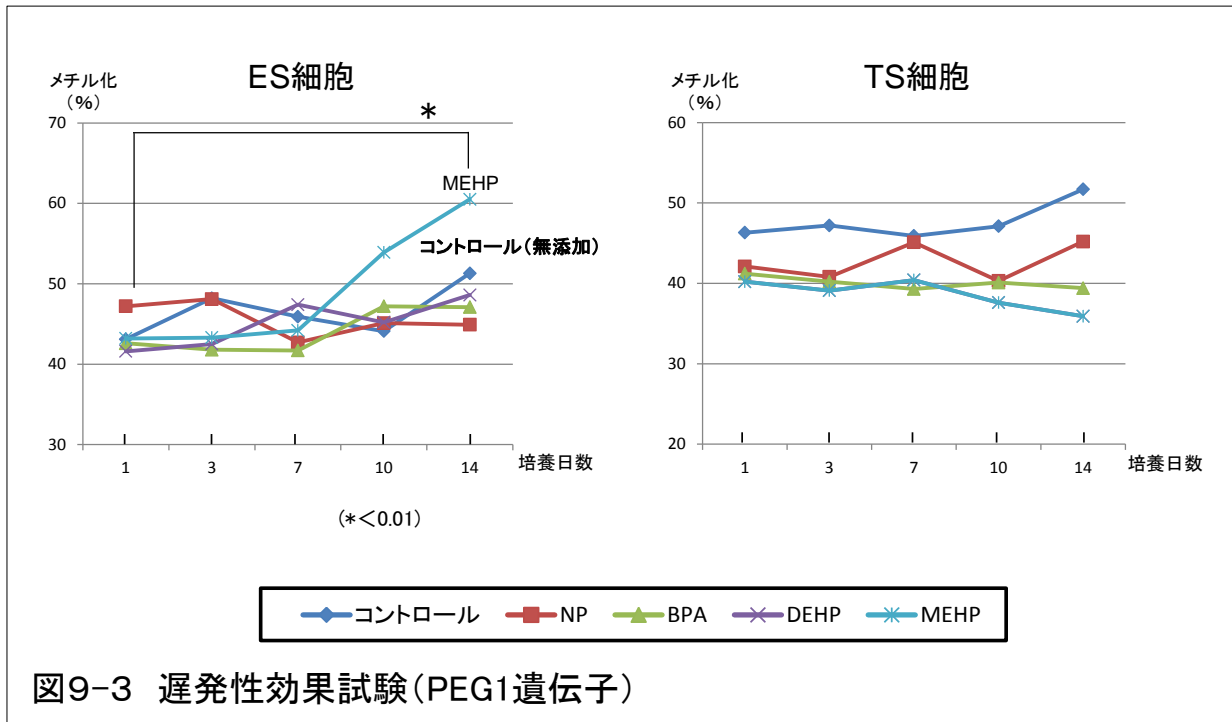


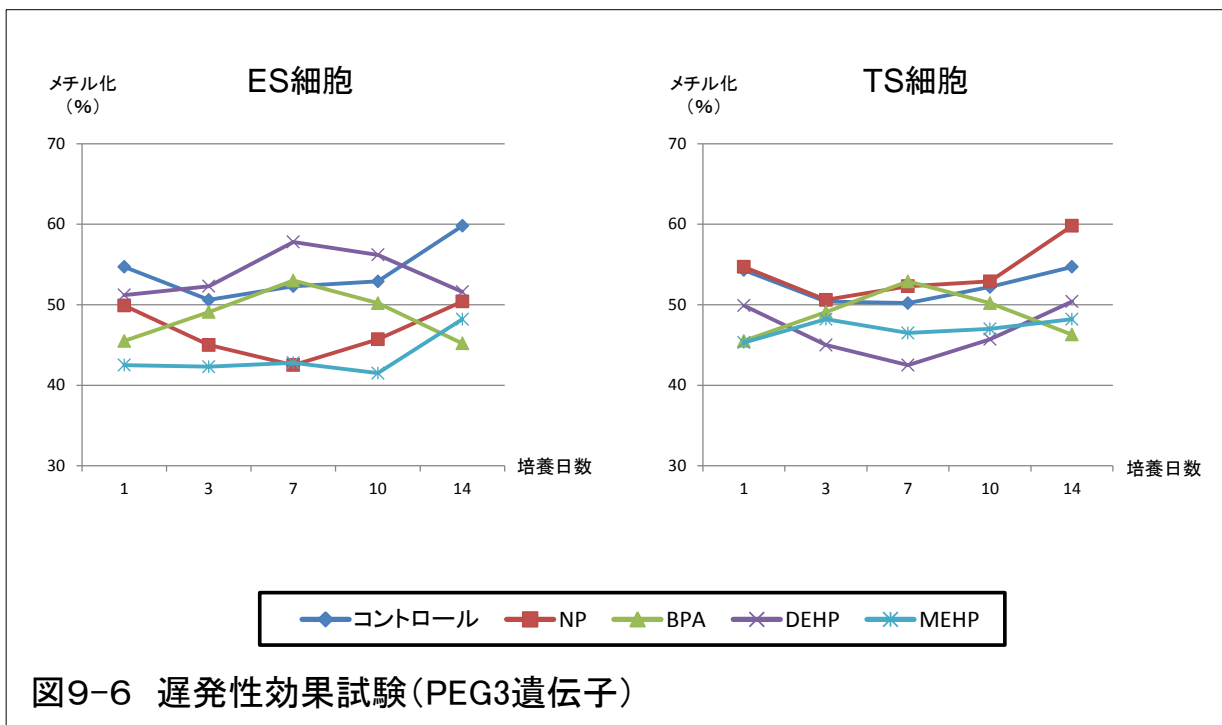
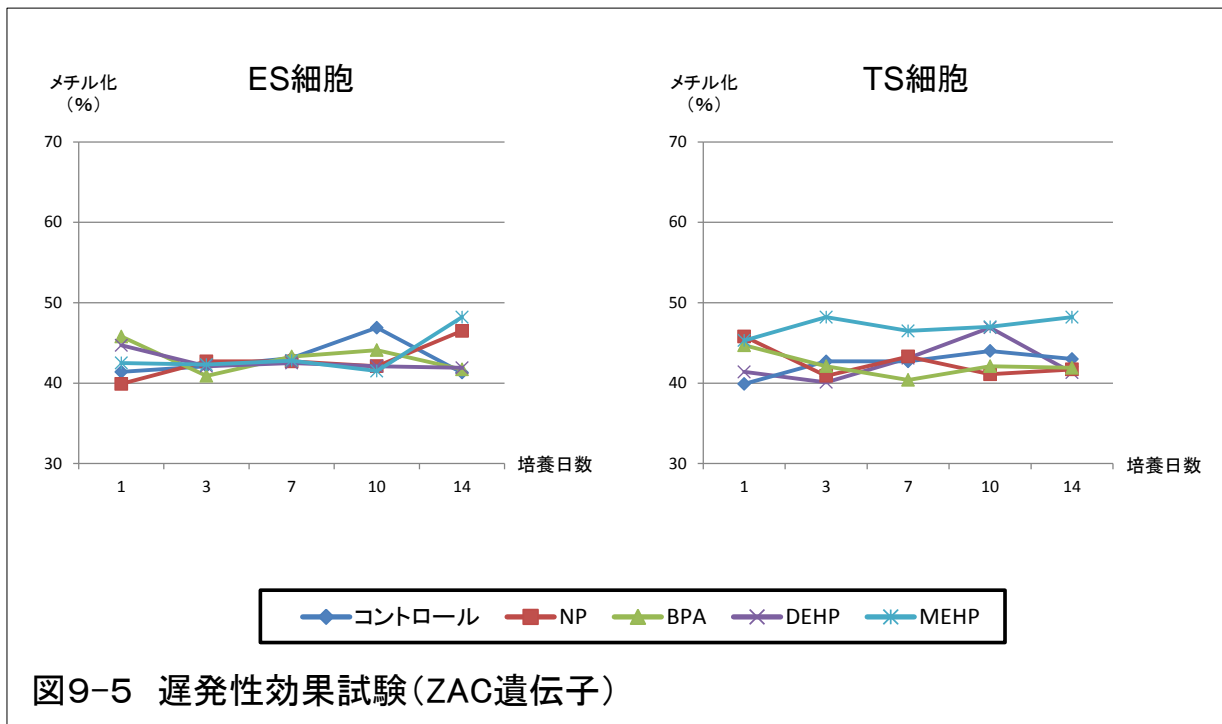
ZDBF2では有意な差はない

- 1 1日目
- 2 3日目
- 3 7日目
- 4 10日目
- 5 14日目

図8-8 ZDBF2遺伝子







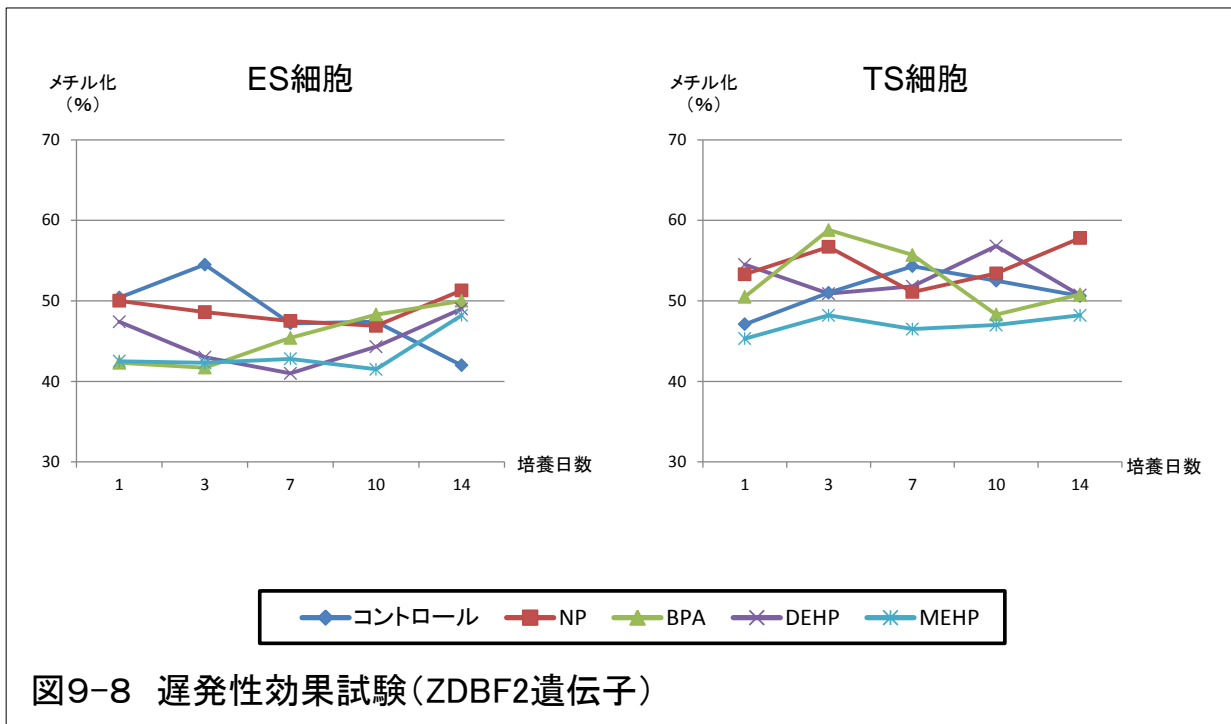
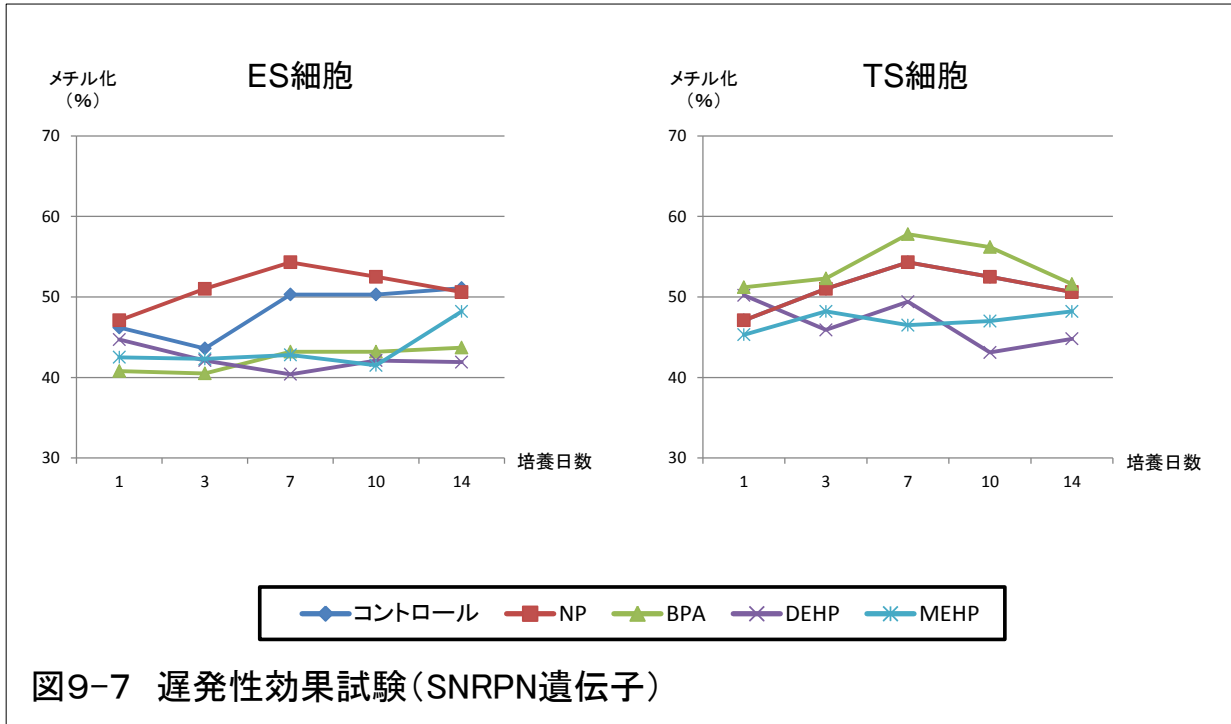


表3 遅発性効果試験のまとめ

ES	NP			BPA			DEHP			MEHP		
培養日数	7	10	14	7	10	14	7	10	14	7	10	14
H19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GTL2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEG1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	▲	▲
LIT1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ZAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEG3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SNRPN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ZDBF2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TS	NP			BPA			DEHP			MEHP		
培養日数	7	10	14	7	10	14	7	10	14	7	10	14
H19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GTL2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEG1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LIT1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ZAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEG3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SNRPN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ZDBF2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ピンクの三角は、メチル化の変化を示す。赤の三角は、大きなメチル化の変化を示す。

(3) 成果と問題点

急性、遅発性効果試験の結果のまとめを以下に示す(表4)。用量の化学物質暴露における急性、遅発性効果について、インプリント遺伝子のメチル化に変化が見られたことから、本法の有用性が確認された。しかし、複数の細胞での確認の必要性や、遅発性効果に関しては、細胞培養によるメチル化の変化や細胞特性の変化も考慮する必要があると考えられた。また、コントロールの細胞においても、低用量の暴露は否定できないため、培養液中の化学物質濃度の測定が必要と同時に、複合暴露に関しても考慮しなければならないと考えられた。

表4 化学物質によるDNAメチル化への影響

血中濃度			急性効果試験			遅発性効果試験		
			×1	×10	×10 ²	7	10	14
NP(ノニルフェノール)	2.9ng/ml	ES	→	▲	▲	→	→	→
		TS	→	▲	▲	→	→	→
BPA(ビスフェノールA)	0.29ng/ml	ES	→	→	→	→	→	→
		TS	→	→	→	→	→	→
DEHP(フタル酸エステル類)	1.9ppb	ES	→	→	→	→	→	→
		TS	→	→	▲	→	→	→
MEHP(フタル酸エステル類)	1.9ppb	ES	→	→	▲	→	▲	▲
		TS	→	→	→	→	→	→

ピンクの三角は、メチル化の変化を示す。赤の三角は、大きなメチル化の変化を示す。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

ヒト未分化幹細胞を用いた薬物毒性評価法の確立について:

ヒト未分化幹細胞は、新たな薬物毒性評価法の細胞源を提供し、また卵培養中に低用量で曝露された有害物質の影響を検出し、同時にヒト疾患との関連性を解明していくことが可能であると考えられる。さらに、エピゲノム変異は、先天性疾患に限らず、乳幼児の行動、性格異常（自閉症、多動児、アレルギー等）、成人疾患（癌、生活習慣病、うつ病等）にも影響を与えるため、今後疾患予防のための国際基準に通用する重要な解析法となりうる。

卵培養器材から溶出する化学物質の測定とエピゲノム変異解析の関連について:

不妊症治療として体外培養，特に培養中に受精卵に影響を与える環境由来化学物質の関与について実証的なデータを提出する。関連する化学物質が明らかになった場合、そのリスク情報を提出する。このことにより、行政はリスク管理が可能となる。また、特定の化学物質について、曝露回避に必要な行政的な基礎資料として、国民に提示できる。これらの結果は、少子化対策、不妊症治療の技術向上と医療行政に貢献できる。

(2) 環境政策への貢献

体外培養中に放出された化学物質は、少量であっても短期間であっても、受精卵は最も脆弱で、影響を受けやすい細胞であるため、その影響は計り知れない。従って、化学物質のヒト生殖細胞への影響は、少子化問題を抱え、確実に体外授精の拡大が予想される我が国においては、重要な課題である。いかなる化学物質が、受精卵に影響を及ぼすのか、明らかにし、回避する方法を考案し、リスクコミュニケーションとして、国民に伝える事が、求められている。特に強調したい点は、リスクを回避する方法とその効果はどのくらいあるのかを、実証的なデータを併せて提示することにある。本研究成果では、そのリスクコミュニケーションに必須の実証的なデータを、体外培養の安全性と有効性を含め、報告した。今後、本研究計画から導き出された結果を出生コホートにおいて検証し、環境由来化学物質曝露と児の身体的発育と精神的発育との関連性について、研究を継続する必要性を認識した。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

< 論文 (査読あり) >

- 1) Watanabe T, Tomizawa S, Mitsuya K, Totoki Y, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Iida N, Hoki Y, Murphy P.J, Toyoda A, Gotoh K, Hiura H, Arima T, Fujiyama A, Sado T, Shibata T, Nakano T, Lin H, Ichiyanagi K, Soloway P.D. and Sasaki H: Science, 332, 848-852 (2011)
“Role for piRNAs and non-coding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse Rasgrf1 locus.”
- 2) Sato A, Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Abe Y, Utsunomiya T, Yaegashi N, and Arima T: Fertility and Sterility, 95, 129-34 (2011)
“Assessing loss of imprint methylation in sperm from subfertile men using novel methylation PCR-Luminex analysis”
- 3) Okae H, Hiura H, Nishida Y, Funayama R, Tanaka S, Chiba H, Yaegashi N, Nakayama K, Sasaki H and Arima T: Human Molecular Genetics, 21, 548-52 (2011)
“Re-investigation and RNA sequencing-based identification of genes with placenta-specific imprinted expression”
- 4) Hiura H, Okae H, Kobayashi H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Suzuki F, Nagase S, Junichi Sugawara J, Nakai K, Yaegashi N and Arima T: BMC Medical Genomics, 5, 8-17 (2012)
“High-throughput detection of imprint methylation errors in the ovarian cancer by the bisulphite PCR-Luminex method”
- 5) Arima T, Okae H, Hiura H, Miyauchi N, Sato F, Sato A and Hayashi C: INTECH, 9, 183-92 (2012)
“Aberrant DNA methylation of imprinted loci in male and female germ cells of infertile couples”

< 査読付論文に準ずる成果発表 >

特に記載すべき事項はない

< その他誌上発表 (査読なし) >

- 6) 有馬隆博, 樋浦仁, 岡江寛明, 佐藤晶子, 宮内尚子, 阿部千鶴, 林千賀: 産婦人科の実際, 金原出版株式会社, 741-750 (2011)
「ARTにおけるエピジェティクス異常」
- 7) 有馬隆博, 樋浦仁, 岡江寛明, 佐藤晶子, 宮内尚子: 卵子学, 京都大学学術出版会, 122-131 (2011)
「ヒト卵子・精子・胚のエピジェティクス」
- 8) 有馬隆博, 樋浦仁, 岡江寛明, 佐藤晶子, 宮内尚子: 助産雑誌, 医学書院, 62, 11 (2011)
「母子の健康と環境影響」

(2) 口頭発表 (学会等)

特に記載すべき事項はない

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) シンポジウム、セミナーの開催 (主催のもの)

- 1) 樋浦仁：第1回統合産婦人科学研究合同シンポジウム (2011)
「新規インプリントドメインの同定と調節機構」

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- 1) Niemitz, E.L. and Feinberg, A.P.: Epigenetics and assisted reproductive technology: a call for investigation. *Am J Hum Genet*, 74, 599-609. 2004
- 2) Schieve, L.A., Meikle, S.F., Ferre, C., Peterson, H.B., Jeng, G. and Wilcox, L.S. : Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology. *N Engl J Med*, 346, 731-7. 2002
- 3) Buesen R, Visan A, Genschow E, Slawik B, Spielmann H, Seiler A.: Trends in improving the embryonic stem cell test (EST): an overview. *ALTEX*, 21, 15-22. 2004
- 4) Genschow E, Spielmann H, Scholz G, Pohl I, Seiler A, Clemann N, Bremer S, Becker K.: Validation of the embryonic stem cell test in the international ECVAM validation study on three in vitro embryotoxicity tests. *Altern Lab Anim*, 32, 209-244. 2004
- 5) Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, Strumpf D, Takahashi K, Yagi R, Rossant J.: Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. , 123, 917-929. 2005
- 6) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S.: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. , 131, 861-872. 2007
- 7) Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK.: Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*, 308, 1466-1469. 2005
- 8) Hansen M, Kurinczuk JJ, Bower C, Webb S.: The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *N Engl J Med*, 346, 725-730. 2002
- 9) Sasaki H, Matsui Y.: Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nat Rev Genet*, 9, 129-140. 2008
- 10) Hiura H, Okae H, Kobayashi H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Suzuki F, Nagase S, Junichi Sugawara J, Nakai K, Yaegashi N, Arima T. : High-throughput detection of imprint methylation errors in the ovarian cancer by the bisulphite PCR-Luminex method. *BMC Medical Genomics*, 5, 8-17. 2012.
- 11) Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C.: p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ Health Perspect*, 92, 167-173. 1991
- 12) Ito T, Inoue K, Nishimura N, Takano H.: Phthalate esters modulate the differentiation and maturation of mouse peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells. *J Appl Toxicol*, 32, 142-148. 2012
- 13) Fang YX, Ying GG, Zhao JL, Chen F, Liu S, Zhang LJ, Yang B. Assessment of hormonal activities and genotoxicity of industrial effluents using in vitro bioassays combined with chemical analysis. *Environ Toxicol Chem*, 2012 (in press)
- 14) Pauwels A, Cenijn PH, Schepens PJ, Brouwer A.: Comparison of chemical-activated luciferase gene expression bioassay and gas chromatography for PCB determination in human serum and follicular fluid. *Environ Health Perspect*, 108, 553-557. 2000
- 15) Hutz RJ, Carvan MJ, Baldrige MG, Conley LK, Heiden TK.: Environmental toxicants and effects on female reproductive function. *Tren Reprod Bio*, 2, 1-11. 2006

- 16) Kobayashi H, Sato A, Otsu E, Hiura H, Tomatsu C, Utsunomiya T, Sasaki H, Yaegashi N, Arima T.: Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Hum Mol Genet*, 16, 2542-2551. 2007
- 17) Hiura H, Sugawara A, Ogawa H, John RM, Miyauchi N, Miyanari Y, Horiike T, Li Y, Yaegashi N, Sasaki H, Kono T, Arima T.: A tripartite paternally methylated region within the *Gpr1-Zdbf2* imprinted domain on mouse chromosome 1 identified by meDIP-on-chip. *Nucleic Acids Research*, 38, 4929-4945. 2010

Development of the epigenetic evaluation system against the chemical toxic substance during in vitro culture environment.

Principal Investigator: Hitoshi HIURA

Institution: Tohoku University School of medicine
2-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai, Miyagi, 980-8575, Japan
Tel: +81-29-717-7844 / Fax: +81-29-717-7063
E-mail: h_hiura@med.tohoku.ac.jp

[Abstract]

Key Words: Toxic examination, Epigenetics, DNA methylation, Human undifferentiated cells (ES, TS cells).

Human assisted reproductive technologies (ART) are important treatments for infertile people of reproductive age in which the eggs and/or sperm are manipulated in the laboratory. However, major epigenetic events take place during this time and the process of ART may expose the genome to external influences preventing the proper establishment and maintenance of genomic imprints. One of the issues with ART concerns the culture conditions.

Genomic imprinting, that is, the allele-specific expression of certain genes, accounts for the requirement for both maternal and paternal genomes in normal development and play important roles in regulating embryonic growth, placental function and neurobehavioral processes. The imprints of gametes are maintained stably in the early embryo despite overall epigenetic reprogramming. The aberrant expression of several imprinted genes has been linked to a number of diseases, developmental abnormalities and malignant tumors in humans.

To develop epigenetic toxic examination of chemical substances in vitro culture we used human undifferentiated cells (ES, TS cells). We cultured during several days added bisphenol A (BSA), nonylphenol (NP) and the phthalate ester (PE) as chemical substances by five serial dilution methods and evaluated DNA methylation status of eight imprinted genes.

The methylation assay was performed using the combined bisulphite PCR restriction analysis (COBRA) and the bisulphite sequencing technique. We carried out COBRA on the DNA from the cells, cutting the DNA with enzymes that could cleave only the methylated templates of the same bisulphite-treated PCR samples and electrophoresed the digests on 3% agarose gels. Band density was quantified with a VersaDoc 5000. The percentage of methylated restriction enzyme sites in each genomic sample was calculated from the ratio between the enzyme-cleaved PCR product and the total amount of PCR product.

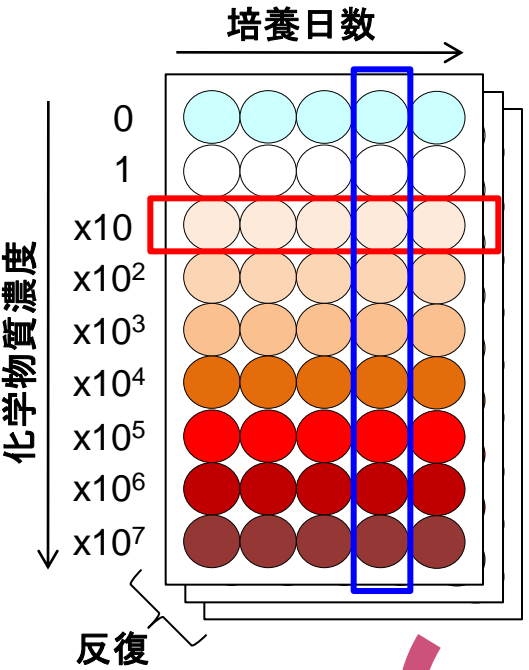
On the acute examination, NP showed great epigenetic change of both TS and ES cells. NP and MEHP relatively affected the DNA methylation with the low concentration and late responded in only ES cell. These cells were not demonstrated the remarkable changes in cell morphology, cell growth and proliferation ability. However, some cells showed the different results. In addition, normal control cells were shown few epigenetic changes.

This method was useful on the acute and delayed-action toxicological examination. We need to evaluate any more chemical substance and culture cells.

体外培養環境における化学物質曝露におけるエピゲノミクス評価法

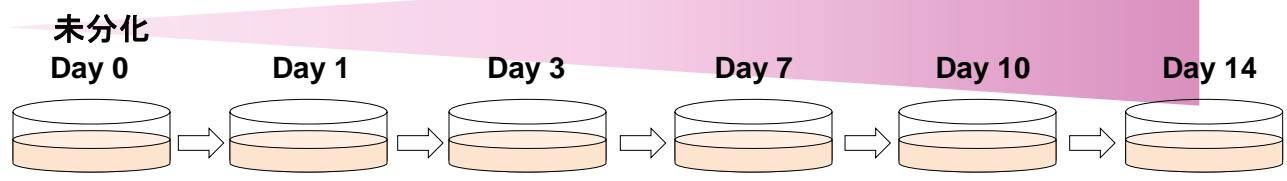
- **化学物質：**
 - ・ビスフェノールA (BPA)
 - ・ノニルフェノール (NP)
 - ・フタル酸エステル類 (DEHP、MEHP)

- **細胞：** ES細胞、TS細胞
- **細胞培養条件：**
 - ・無血清培地を使用する
 - ・ガラス製培養ディッシュを使用する
 - ・フィダー細胞は使用しない
 - ・37°C、5%CO₂



急性効果試験

・血液濃度を参考に、5段階希釈法により化学物質を添加



遅発性効果試験

・14日間まで長期培養する

- **8種類のインプリント遺伝子のDNAメチル化の定量解析：**
 - 卵子型インプリント (LIT1, ZAC, PEG1, PEG3)、
 - 精子型インプリント (H19, RASGRF1, GTL2, ZDBF2)