

環境化学物質の「多世代にわたる後発影響」の
機序に関する研究
(所内公募型提案研究)

Studies on multigenerational late-onset effects of environmental chemicals

平成25～27年度
FY2013～2015

NIES



国立研究開発法人 国立環境研究所

NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

<http://www.nies.go.jp/>

国立環境研究所研究プロジェクト報告 第126号
NIES Research Project Report, No.126

SR - 126 - 2017

環境化学物質の「多世代にわたる後発影響」の
機序に関する研究
(所内公募型提案研究)

Studies on multigenerational late-onset effects of environmental chemicals

平成25～27年度
FY2013～2015

所内公募型提案研究「環境化学物質の「多世代にわたる後発影響」の機序に関する研究」
(期間：平成 25 ～ 27 年度)

課題代表者：野原恵子

執 筆 者：野原恵子、岡村和幸、鈴木武博、鑑迫典久、佐野友春

編 者：野原恵子

序

本報告書は、平成 25～27 年度の 3 年間にわたって実施した所内公募型提案研究「環境化学物質の「多世代にわたる後発影響」の機序に関する研究」（課題代表者：野原恵子）の成果をとりまとめたものです。

近年、化学物質曝露の生体影響として新たな懸念となっている課題に、妊娠期曝露の影響があります。胎児は多くの化学物質に感受性が高いことが明らかにされていますが、出生時には影響がみられないにも関わらず、成長後に曝露の影響が「後発」的に疾患として現れるという事例が疫学研究や動物実験による研究で数多く報告されるようになってきました。また動物実験の結果から、そのような影響が子世代にとどまらず、孫世代やそれ以降の世代に「多世代・継世代」的に伝わるという、新たな影響の様式があることを示す研究結果も増加しています。環境中の化学物質の、人あるいは生態系への悪影響を予防する上で、多世代・継世代影響を看過することはできません。

一方で、後発的に現れる健康影響がその後の世代でも繰り返しあらわれるという現象は理解が難しい点があります。この問題が注目され始めたのは 2000 年代前半ですが、時を同じくして「エピジェネティクス」という遺伝子機能の制御メカニズムが生命科学の分野で大きく注目されるようになりました。後発影響や多世代・継世代影響もまた、エピジェネティクスというメカニズムによって説明が可能となりました。しかしまだ、どのような化学物質のどのような曝露が多世代にわたる後発影響をひき起こすのか、そのメカニズムとしてエピジェネティクスは本当に関与するのか、関与するのであれば具体的にどのように関与するのか、など多くの点について、今後明らかにする必要があります。

遺伝子機能の制御メカニズムには、植物から動物まで共通する部分も多くあります。化学物質などの環境要因がエピジェネティック修飾を攪乱し、その結果として現れる影響が次の世代や数世代先まで伝わるという現象も、ミジンコやショウジョウバエからマウスまで多くの種にわたって報告されています。そこで本プロジェクトでは、ヒトの健康影響に関してマウスの実験系で、生態系影響に関してはミジンコの実験系において、それぞれこれまで国立環境研究所で行われてきた研究をさらに発展させる形で、化学物質の「多世代にわたる後発影響」のメカニズムに関する研究を行いました。遺伝子機能の解析手法は多くの生物で共通しています。本プロジェクトでは、それらの解析手法を共有しつつ、異なる研究分野の研究者が連携して新しい研究を進めました。

多世代影響を解析する研究は長い期間を必要とします。本研究のテーマは、平成 28 年度から開始された第 4 期中長期計画（平成 28 年度～32 年度）の安全確保研究プログラムなどで、現在もさらに研究が展開しています。環境化学物質による多世代・継世代にわたる後発影響のメカニズム解明に向けて、一層の努力をしていきたいと思えます。

最後に、本研究の遂行にあたりましては研究所の多くのスタッフや所外の研究者の方々に多大なご協力とご支援をいただきました。ここに深く感謝いたします。

平成 30 年 2 月

国立研究開発法人 国立環境研究所

理事長 渡 辺 知 保

目 次

1	研究の概要	1
1.1	研究全体の目的	1
1.2	研究の概要	3
2	研究の成果	4
2.1	妊娠期無機ヒ素曝露による多世代影響のメカニズムに関する研究	4
2.1.1	経緯と目的	4
2.1.2	方法	6
2.1.3	結果と考察	7
2.1.4	まとめ	12
2.2	ミジンコの DNA メチル化解析法と多世代影響検出法の検討	14
2.2.1	経緯と目的	14
2.2.2	方法	15
2.2.3	結果と考察	18
2.2.4	まとめ	20
[資 料]		
1	研究の組織と研究課題の構成	25
1.1	研究の組織	25
1.2	研究課題と担当者	25
2	研究成果発表一覧	26
2.1	誌上発表	26
2.2	口頭発表	27

1 研究の概要

1.1 研究全体の目的

後発影響、多世代・継世代影響

ここ 100 年余りの間に人類は 1 億種類を超える膨大な数の化学物質を合成しており、米国 Chemical Abstracts Service (CAS) の化学物質データベースに登録された化学物質は 2017 年 7 月時点で 1 億 3000 万種類を超えている。それらを利用した社会活動の結果、化学物質の環境中の存在量や種類は過去とは大きく異なる状況となっている。また人の活動の変化によって、もともと地球上に存在していた化学物質が生活環境中に増加する事例もある。したがって、これらの化学物質が生体に悪影響を及ぼす可能性に関しての注視が必要である。

近年、環境健康研究の分野で懸念され関心を集めている一連の課題がある。化学物質等に曝露された影響が時間を経てから顕在化する影響で、「後発影響」、「晩発影響」、「遅発影響」などと呼ばれるものがそのひとつである。特に胎児期は化学物質の影響を受けやすく、最近では曝露による健康への悪影響が子の成長後に後発的に現れることが多くの動物実験や疫学研究で報告されている。さらに、母親の妊娠期の化学物質曝露の影響は、子の世代に影響を及ぼすだけでなく、それ以降の世代に「多世代・継世代」的に伝わるという新たな知見が 2000 年代初頭から動物実験で報告され、懸念されている。

多くの化学物質は胎盤を通過し、胎児に到達する。妊娠期曝露の場合、母親 (F0) の体内で胎児 (F1) が化学物質に曝露されるが、F1 の体内には次の孫世代 (F2) を生み出す生殖細胞が存在し、この細胞も曝露を受ける (図 1)。すなわち F2 も曝露を受けることから妊娠期曝露は多世代曝露であり、F2 で現れる影響は「多世代影響」と呼ばれる。一方、F0 の曝露によって F1 生殖細胞に取り込まれて F2 に持ち込まれる化学物質はもともと存在したとしてもごく微量であることから、F2 の体内で作られる生殖細胞には化学物質曝露はないと考えられる。それに関わらず、F0 の曝露によって F2 生殖細胞から誕生する F3 以降の世代に影響が現れる場合、そのような影響を「継世代影響」という。例えば母ラット (F0) の妊娠期の農薬の曝露によって、4 世代先 (F4) の子孫まで成長後に各種の後発影響が現れるという継世代影響の例などが報告されている。

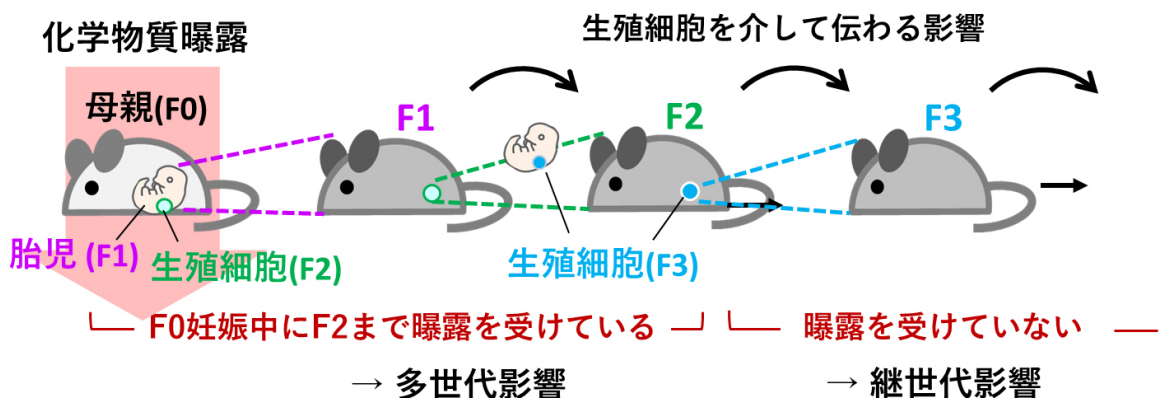


図 1 妊娠期曝露による多世代影響と継世代影響

多世代・継世代影響を引き起こすメカニズム

上述の「後発影響」と言われるような、環境因子の曝露の影響が後発的に現れるメカニズムとして、「エピジェネティクス」というゲノム機能の調節機構が注目されている。また 2.1. に述べるように、エピジェネティクスは「多世代影響」や「継世代影響」の有力なメカニズムと考えられている。

エピジェネティクスの具体的な作用の仕組みは、ゲノム中で遺伝情報をコードしている DNA へのメチル化をはじめとして、DNA が巻き付いて保持されているヒストンタンパクのメチル化やアセチル化修飾、遺伝子情報をコ

ードしていない遺伝子領域から発現する non-coding RNA 発現などを介した遺伝子発現の調節である（図 2）。DNA のメチル化やヒストン修飾、non-coding RNA 発現などをまとめてエピジェネティック修飾と呼ぶ。各種の化学物質曝露によって、細胞の種類や分化段階特異的に、また時間依存的に DNA やヒストンのエピジェネティック修飾が変化するという報告が増加しており、妊娠期の化学物質曝露が子の細胞のエピジェネティック修飾を変化させ後発影響の原因となることが報告されている。さらに、生殖細胞に生じたエピジェネティック修飾変化が次の世代においても生殖細胞で再現され、後の世代に継承されて継世代影響の原因になることも提唱されている。

メチル化を受けた DNA 中の塩基は「突然変異」を起こしやすいことなどから、エピジェネティクスは突然変異とも関連して影響を及ぼすことも報告されている。例えば、体細胞でおこった DNA メチル化変化が体細胞突然変異を増加させ、発がんリスクを高める可能性が考えられる。

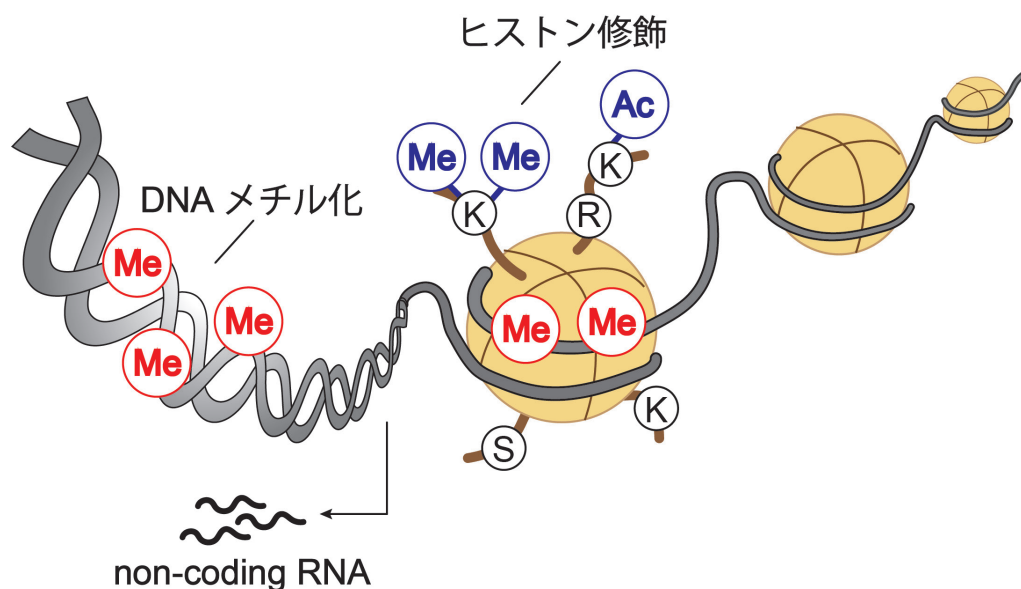


図 2 遺伝子発現調節に関するエピジェネティック修飾の模式図

エピジェネティック修飾（DNA メチル化、ヒストン修飾、non-coding RNA 発現等）は、塩基配列を変えずに、遺伝子発現を調節する。図中の記号は、Me：メチル基、Ac：アセチル基、K：リジン、R：アルギニン、S：セリンを示している。DNA の場合、プロモーター領域がメチル化されると、その遺伝子発現は抑制される。ヒストン修飾の場合、アセチル化は遺伝子発現の活性化に関与するが、メチル化はメチル基が入るリジンの位置とその個数により遺伝子発現の活性化と抑制それぞれに関与する。Non-coding RNA には、マイクロ RNA などが含まれる。

多世代・継世代影響研究の課題

環境化学物質曝露がその子や孫以降の世代に影響をおよぼすという実験結果が報告され、環境健康研究分野において多世代・継世代影響が世界的に懸念されている。上述のように、その影響発現にはエピジェネティクスが関与することが指摘されているが、主たる原因となるエピジェネティック変化や、それが実際にどのように影響にむすびつくかなど、現在まだ多くの点が明らかにされていない。そのために環境化学物質曝露による多世代・継世代影響に関する生物学的妥当性の評価が定まっていない面がある。

一方、科学研究の進展によって多世代・継世代影響のようにこれまで考慮されていなかった影響の存在が指摘されることによって、環境中に増大する化学物質曝露の将来的な影響に対して社会的な懸念が発生する。そのような懸念に答えるためには、いかなる影響がおよぶるかという影響評価と影響に応じた対策が必要である。影響評価の信頼性を高めるためには、影響を裏付けるための具体的な分子メカニズムを明らかにすることが重要である。

また化学物質の生態毒性に関しては、OECD のテストガイドライン化を目指してミジンコを用いた多世代試験法の開発を行っているところである。現在は、母体中で化学物質曝露を受けた次世代のミジンコの産仔能力をエンドポイントとして試験を行うための実験条件の至適化を検討している。次世代影響に関連する DNA メチル化変化を検出することが可能になれば、より検出感度の高いエンドポイントとなる可能性が考えられ、新たな試験法の構築が可能となることが期待される。

研究の目的

DNA メチル化をはじめとしたエピジェネティック修飾は、植物から動物まで生物界において広く存在している。化学物質等の環境因子がエピジェネティック修飾をかく乱し、その結果現れる生物学的または生理的影響が多世代・継世代的に伝わるという現象も、ミジンコや線虫、ショウジョウバエからマウスにおいてまで報告されている。エピジェネティクスを含むゲノム解析の手法は多くの生物で共通しており、生体影響や生物影響研究分野の研究者が連携して手法やリソースを共有することによって、異なる分野の研究をともに推進することが可能である。

そこで本研究では、国立環境研究所の健康影響および生物影響に関する研究者が連携し、「多世代にわたる後発影響」という新たな概念について、ヒトへの影響評価をめざしたメカニズム研究、および生物試験における新たな影響指標としての可能性検討のための多世代影響研究を、手法や知見を共有しつつ推進する。その成果によって、多世代・継世代影響を考慮した環境化学物質の影響評価法の確立に資することを目的とする。

1.2 研究の概要

サブテーマ1ではヒトの健康影響研究のモデル動物であるマウスの実験系を用いて、またサブテーマ2では生態系影響試験法の指標生物であるミジンコの実験系を用いて、以下の研究を実施した。

サブテーマ1：妊娠期無機ヒ素曝露による多世代影響のメカニズムに関する研究

雌 C3H マウスの妊娠期（妊娠 8-18 日）に無機ヒ素を投与すると、子世代（F1）雄の肝腫瘍発症率が増加することが報告されていたが、著者らはさらに孫世代（F2）雄でも肝腫瘍の発症率が増加することを見いだした。C3H マウスはもともと雄が壮年期以降に肝腫瘍を発症しやすい系統であり、その F1 の胎児期無機ヒ素曝露が F1 および F2 の雄の腫瘍増加の形質を増強する可能性が考えられた。F2 世代への影響は、雄を介して伝わるものと雌を介して伝わるものが報告されている。本サブテーマでは、F0 の妊娠期ヒ素曝露から F2 での肝腫瘍増加につながる一連のプロセスの解明を目指して、以下の検討を中心に行った（2.1、図 4）。1）妊娠期ヒ素曝露の影響を F2 に伝える F1 生殖細胞（雄または雌）の同定、2）F2 雄の肝腫瘍増加の原因候補の検索：妊娠期ヒ素曝露によって F1 生殖細胞に受け継がれたエピジェネティック変化が F2 肝臓で体細胞突然変異を増加させ肝腫瘍を増加させるという仮説をたて、肝腫瘍増加の原因となりうる体細胞突然変異の網羅的検索を行い基礎的なゲノム情報を得るとともに、他の研究プロジェクトで実施中のゲノムワイドな DNA メチル化解析の結果との関連を検討し、妊娠期ヒ素曝露から孫世代肝腫瘍増加につながる分子メカニズムの一端を明らかにする。

サブテーマ2：ミジンコの DNA メチル化解析法と多世代影響検出法の検討

ミジンコからの DNA 調製法や LC/MS-MS によるメチル化 DNA（5 メチルシトシン、5 ヒドロキシメチルシトシン、6 メチルアデニン）の精密定量法を確立する。この方法を用いて、ミジンコへの化学物質曝露の多世代影響を検討する。

2 研究の成果

2.1 妊娠期無機ヒ素曝露による多世代影響のメカニズムに関する研究

2.1.1 経緯と目的

妊娠期の化学物質曝露の影響として、近年関心が高まっている DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) の観点ともあいまって、子の成長後や成人後の後発的な疾患増加が懸念されている¹⁻⁵⁾。このような後発影響の有力なメカニズムとして、DNA メチル化をはじめとしたエピジェネティクスの関与が考えられる。受精卵から胎児が形成される過程では、DNA メチル化やヒストン修飾がダイナミックに変動するが、環境化学物質がこの過程でのエピジェネティック修飾を変化させることによってエピジェネティクスによる発生プログラムを書き換える可能性が考えられている^{2,4,5)}。

例えば C3H という系統のマウスでは、生後 1 年以上の中年期以降に雄の肝腫瘍の発症率が増加する。この系統の雌マウスの妊娠中 (妊娠 8-18 日) に無機ヒ素 (亜ヒ酸ナトリウム) を含む水を飲ませると、生まれた雄の子が成長後に肝腫瘍等を対照群と比べて高率に発症することが報告されている⁶⁻⁸⁾。疫学研究においても、母親の妊娠期の喫煙が子の中年期の 2 型糖尿病の発症率を増加させることなど³⁾、妊娠期曝露による子での後発影響が数多く報告されている。

一方、母親 (F0) の妊娠期の化学物質曝露は、子 (F1) ばかりでなく、さらに次の孫世代 (F2) にも影響をおよぼす可能性が考えられる。マウスでは、妊娠 7 日すぎに胎児 (F1) の体内に F2 を作る始原生殖細胞があらわれ、これが増殖・分化し、精子または卵子の前駆細胞となる^{9,10)}。始原生殖細胞が増殖・分化する時期もまた DNA メチル化をはじめとするエピジェネティック修飾がダイナミックに変化する時期である。妊娠中の母親に曝露された化学物質の多くは胎盤を通過して胎児にとりこまれることから、とりこまれた化学物質が生殖細胞のエピジェネティック修飾をかく乱し、F2 世代に影響をおよぼす可能性が考えられる (図 3)。上記の妊娠中の C3H マウスへのヒ素曝露の実験系は、まさに将来 F2 をつくる始原生殖細胞のエピジェネティック修飾が大きく変動する時期に曝露を行っている。そこで著者らのグループは、この雌 C3H マウスの妊娠期無機ヒ素曝露の実験系において孫世代 (F2) の肝腫瘍発症率を調べたところ、子世代 (F1) ばかりでなく、孫世代 (F2) 雄でも肝腫瘍の発症率が増加することを見いだした^{11,12)}。

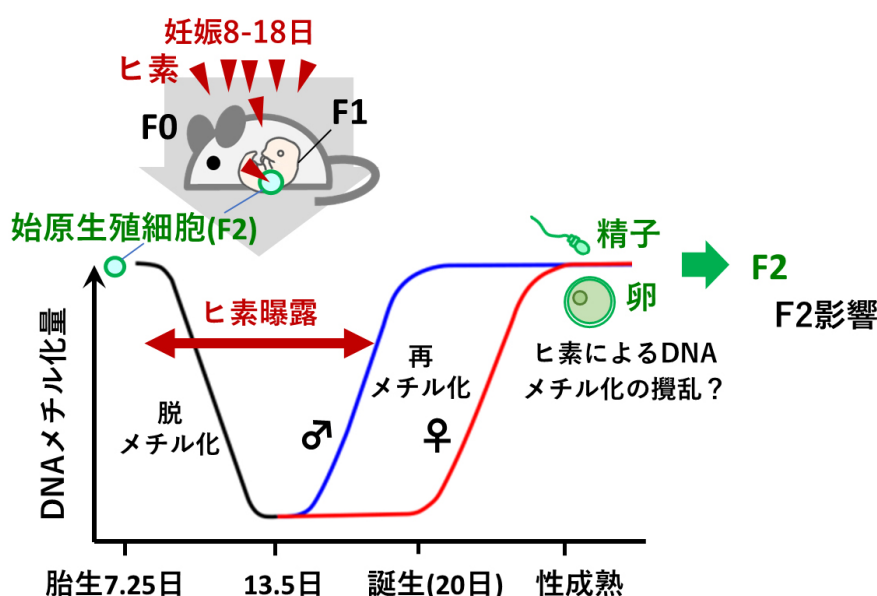


図 3 始原生殖細胞の分化に伴う DNA メチル化変化とヒ素曝露
妊娠期の化学物質曝露は、生殖細胞のエピジェネティック修飾の変動をかく乱する可能性がある。

無機ヒ素は地球の地殻に広く分布する元素である。現在世界各国で天然由来の無機ヒ素による慢性中毒が発生し、最も健康被害の大きい深刻な環境問題の一つとなっている^{13,14)}。例えばバングラデシュでは、1970年代からため池の水の利用に代わって井戸水が生活に利用されるようになり衛生状態が大きく改善されたが、地下水の無機ヒ素濃度が高いことから皮膚がん、皮膚疾患や各種臓器の発がんなど、ヒ素による重篤な健康被害が発生している。また無機ヒ素は、多くの化学物質の中でも早期に *in vitro* 実験で DNA メチル化を変化させることが報告された化学物質である。国際がん研究機関 (IARC) がグループ 1 に分類するヒトに対する発がん物質であるが変異原性が弱く、その発がん誘導にエピジェネティクスの関与が考えられている。一方筆者らは、*in vivo* で体細胞突然変異の解析が容易に行える C57/BL6 *gpt delta* マウスを用いた実験で、亜ヒ酸ナトリウムの投与によって肝臓で突然変異が弱いながら有意に増加し、特に酸化 DNA 損傷に起因する G:C から T:A への変異が増加することを見だしており¹⁵⁾、ヒ素発がんにおける体細胞突然変異の一定の関与も考えられる。

上述の C3H マウス F0 の妊娠期ヒ素曝露による F2 での肝腫瘍増加に関して、筆者らは F1 生殖細胞から F2 肝腫瘍につながる一連のプロセスを解明することを目指して研究を行っているが、本研究では主に F2 肝臓で腫瘍が増加するメカニズムに注目をした。C3H マウスは雄が成長後に肝腫瘍を発症しやすいという特徴の他に、その肝腫瘍の一部にはがん原遺伝子 *Ha-ras* のコドン 61 等に体細胞突然変異をもつものがあることが報告されている¹⁶⁾。これらの突然変異によってアミノ酸の置換がおり *Ha-ras* タンパクが活性型となる。活性化した *Ha-ras* はがんを促進する複数のシグナル伝達系を活性化し、がんを促進することが報告されており^{16,17)}、C3H マウスの肝臓では *Ha-ras* 突然変異をもった細胞がクローン増殖してがんを増加させると考えられる。体細胞突然変異の発生にはエピジェネティック変化も関与することが報告されているが、C3H マウスの肝腫瘍に関してはエピジェネティクスに関する知見がほとんど得られておらず、体細胞突然変異とエピジェネティック変化の関連も研究が行われていない。

著者らは、C3H マウス F0 の妊娠期ヒ素曝露から F2 での肝腫瘍増加につながる主要なプロセスとして、以下の経路を仮定した (図 4)：①ヒ素曝露によって F1 胎児期の始原生殖細胞にエピジェネティック変化がおり、始原生殖細胞から分化した F1 生殖細胞にエピジェネティックな変化が伝わる、② F1 生殖細胞のエピジェネティック変化が受精を経て F2 に持ち込まれ、F2 肝臓で遺伝子発現変化や体細胞突然変異を誘導し、それらの変化が腫瘍細胞の増殖を強化し、腫瘍を増加させる (図 4)。これらの一連のプロセスに関して、外部競争的資金等を含めて研究をすすめているが、特に本研究では以下の研究をすすめた：A) F2 に影響を伝える F1 生殖細胞 (精子および/または卵) の同定と、肝腫瘍増加が F3 まで伝わるかの確認、B) *Ha-ras* に加えてその他の体細胞突然変異の検索を中心とした、F2 雄肝腫瘍増加の原因候補に関する網羅的ゲノム解析。

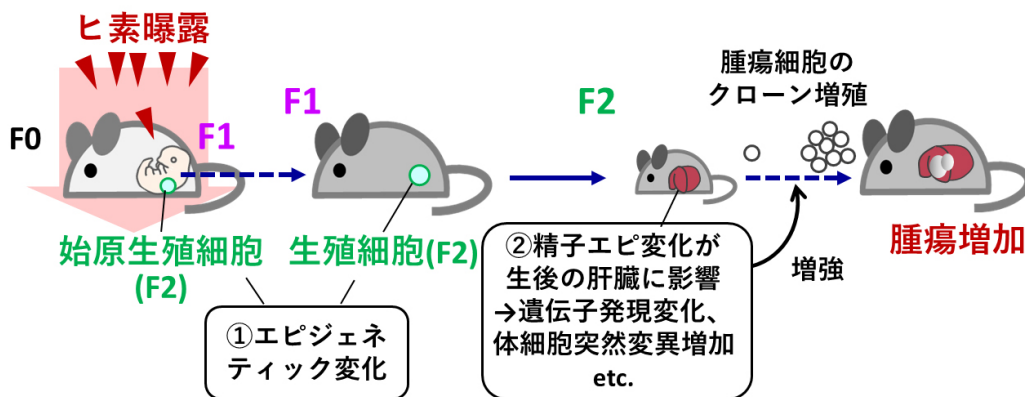


図 4 妊娠期ヒ素曝露による F2 肝腫瘍増加経路に関する仮説 ver. 1

2.1.2 方法

A) 妊娠期ヒ素曝露の影響を F2 に伝える F1 生殖細胞の同定と F3 影響の有無

妊娠マウス (C3H/HeN、日本クレア) を購入し、妊娠 8 日から 18 日目に無機ヒ素 (亜ヒ酸ナトリウム 85 ppm) を含む水を自由摂取させたヒ素曝露群 (ヒ素群) F0 (29 匹)、および無機ヒ素を含まない水を自由摂取させた対照群 F0 (22 匹) よりそれぞれ子 (F1) を得た。各群の F1 雌雄を 10 週令で組み合わせ交配して F2 を得、F2 雄を 75-82 週令まで飼育し、肝臓の腫瘍発生を観察した。

また対照群 F0 から生まれた F1 雌雄の交配によって得られた CC 群雌雄、ヒ素群 F0 から生まれた F1 雌雄の交配によって得られた AA 群雌雄をそれぞれ交配して F3 を得、74 週令付近肝腫瘍の発生率を調べることによって、F0 妊娠期曝露によって F3 で腫瘍が増加するかどうかを調べた。すべての動物実験は国立環境研究所動物実験等実施規程に従って行った。

腫瘍の病理観察は、パラフィン切片を HE 染色して行った。

B) F2 雄肝腫瘍増加の原因候補に関する網羅的ゲノム解析

エクソーム解析

ヒ素群 (A 群) F1 雄 x 対照群 (C 群) F1 雌の子である F2 AC 群雄と、対照群 F1 雌雄の子である F2 CC 群雄の腫瘍のない肝臓から正常組織 (ACN, CCN) を、腫瘍のある肝臓から腫瘍部 (ACTt, CCTt) と非腫瘍部 (ACTn, CCTn) を、各 4 サンプル採取し、DNA を調製した。SureSelect XT または SureSelect QXT キット (Agilent Technologies) を用いて、キットのプロトコールに従って以下の処理を行った: DNA の断片化、末端修復、3' エンドへの A オーバーハング付加、インデックス用アダプターライゲーション、増幅を行い、その後 SureSelect Biotinylated とハイブリダイズしキャプチャされた DNA を回収し、インデックスバーコードタグの付加と増幅を同時に行った。得られたライブラリーを次世代シーケンサー (HiSeq2000, Illumina) で解析した。

エクソームデータは北海道システムサイエンス社のパイプラインで以下の手順で解析した: エクソームデータ (FASTAQ 形式) からアダプター配列を含むリードおよび低 QV (Quality Value) 領域を含むリードを除くトリミングを行った。トリミング後のリードデータについて、ショートリード用マッピングプログラムである BWA (Burrows-Wheeler Aligner) (version 0.7.10) を使用し、マウス *M. musculus* ゲノムリファレンス配列 (GRCm37(mm9)) にマッピングした。SAMtools (version 1.2) を用いた FLAG 情報の修正、GATK (The Genome Analysis Toolkit) (Lite version 2.3.0) を用いたリアライメント、Picard (version 1.133) を用いた PCR Duplicates の除去、GATK を用いた再リアライメントを行い、アライメントを確定した。マッピングが完了後、SAMtools/BCFtools を用いて変異候補箇所の抽出を行い、得られた変異候補箇所に対して SnpEff を用いてアノテーション情報の付加を行った。

C3H マウスと C57BL6 マウスのゲノムの比較

今回エクソーム解析で得られた C3H マウスの塩基配列と、C57BL6 マウスのゲノム配列である上記マウスリファレンス配列 (GRCm37(mm9)) を比較することによって、両系統の塩基配列の差を検出した。変異の候補正確性を上げるため、coverage 40 以上、Phred 20 以上、QUAL999 のみを抽出した。

パイロシーケンシング

F2 AC 群雄と、F2 CC 群雄の腫瘍のない肝臓から正常組織 (ACN, CCN) を、腫瘍がある肝臓から腫瘍部 (ACTt, CCTt) と非腫瘍部 (ACTn, CCTn) を採取し、DNA を調製した。Ha-*ras* 遺伝子の 61 番目のコドン領域を含む DNA 領域を、フォワードプライマー、5' 側をピオチン修飾したリバースプライマー及び PyroMark PCR kit (Qiagen) を使用して PCR 増幅した。得られたピオチン修飾 PCR 産物をストレプトアビジンビーズに結合させ、変性、洗浄後、シーケンシングプライマーをアニールさせた。PyroMark Q96 ID system (Qiagen) 及び PyroMark Q96 ID Software 2.5 (Qiagen) により、Ha-*ras* 遺伝子の 61 番目のコドン領域の変異率を解析した。

リアルタイム PCR

組織から total RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を得た。LightCycler 480 を使用してリアルタイム PCR を行い遺伝子発現量を測定した。

網羅的遺伝子発現解析

対照群およびヒ素群 F2 の正常肝臓または腫瘍肝の非腫瘍組織、腫瘍組織、各群それぞれ 4 サンプルから ISOGEN (Nippon Gene) を用いて RNA を調製し、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて精製した。Agilent Technologies 社のプロトコールに従ってラベル化 cRNA を調製し、SurePrint G3 Mouse GE マイクロアレイ 8x60K (Agilent Technologies) を用いて発現量のデータを得た。得られたデータについて、Ingenuity Pathway Analysis ソフトウェアを用いてパスウェイ解析を行った。

DNA メチル化解析

ゲノムワイドな DNA メチル化は Reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) 法¹⁸⁾によって解析した。DNA を制限酵素で水解して断片化し、アダプター付加、精製後 bisulfite 処理を行い、RRBS ライブラリーを作製した。PCR によりテンプレートライブラリーを増幅し、Illumina HiSeq2500 で次世代シーケンス解析を行った。

次世代シーケンスデータを、マウスのリファレンス配列 (NCBI/mm10) に対してマッピングし、2 群間で DNA メチル化が増加または低下したシトシン (hyper-DMC/hypo-DMC)、および DMC を一つ以上含み DNA メチル化の程度に有意差があると判定される領域 (hyper-DMR/hypo-DMR) を、統計ソフト R 上で methylkit および edmr を用いて検出した。さらに遺伝子発現の制御に重要な転写開始点 ±2000 bp に位置する DMR (promoter DMR) を bed tools の closest で検出した。

2.1.3 結果と考察

A) 妊娠期ヒ素曝露の影響を F2 に伝える F1 生殖細胞の同定と F3 影響の有無

F0 妊娠期曝露による F2 雄での肝腫瘍増加の原因が、F1 雄雌どちらにあるのか、または両方にあるのかを明らかにするために、対照群 (C) とヒ素群 (A) の F1 雌雄を組み合わせ交配し、以下の 4 群の F2 を得た：C 雄 x C 雌の子 (CC)、C 雄 x A 雌の子 (CA)、A 雄 x C 雌の子 (AC)、A 雄 x A 雌の子 (AA)。得られた F2 雄について 80 週令前後で肝腫瘍の発症率を観察した。

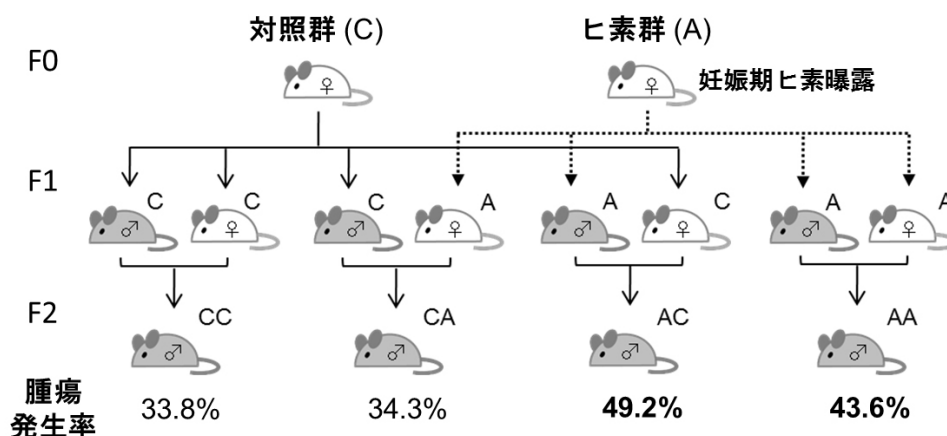
その結果、腫瘍の発症率は CC 群 34%、CA 群 34%、AC 群 49%、AA 群 44% であった (図 5)。各群の腫瘍発生率の差は大きくはなかったが、ヒ素群 F1 雄の子 (AC および AA 群) と対照群 F1 雄の子 (CC および CA 群) を比較すると統計的に有意にヒ素群 F1 雄の子の腫瘍発症率が高かった。ヒ素群 F1 雌の子 (CA および AA 群) と対照群 F1 雌の子 (CC および AC 群) の間では腫瘍発症率に差はなかった。この結果は、妊娠期ヒ素曝露の影響は F1 雄を介して F2 に伝わることを示した¹²⁾。

CC 群と AA 群の肝腫瘍の病理学的観察では、どちらの群でも腺腫が主であった⁹⁾ (図 6)。

ヒト肝細胞がんにおいては発がんに伴って発現量が増加する遺伝子が見つかっており、それらの遺伝子が発がんの初期診断のための遺伝子マーカーとして利用されている¹⁹⁾。その中の Il-1m、Ctnnb1、Afp の発現をリアルタイム PCR で測定したところ、C3H マウスの肝腫瘍においても正常組織に対して腫瘍組織で発現が高く、さらにヒ素群 F1 雄の子 (AC および AA 群) で対照群 F1 雄の子 (CC および CA 群) より高かった (図 7)。この結果は、ヒ素群 F1 雄の子である F2 では発がんの形質が増強されていることを示唆した。なお、腫瘍を Ha-ras 変異があるものとなないものに分けて解析すると、Il-1m は Ha-ras 変異のある腫瘍で発現が高く、Il-1m が変異によって活性化した Ha-ras の下流で制御を受けているものと考えられた。

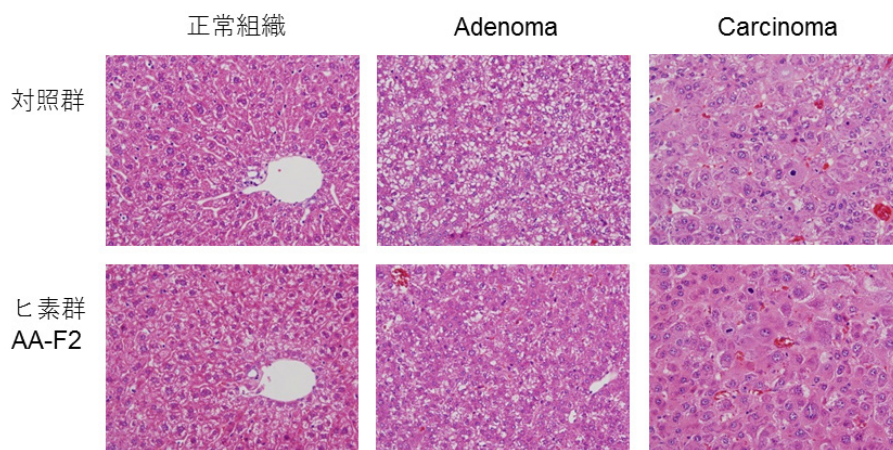
さらに F2 CC 群雌雄を交配して得られた対照群 F3 と、F2 AA 群雌雄を交配して得られたヒ素群 F3 を 74 週令付近まで飼育して肝腫瘍の発症率を調べたところ、両群に差はなかった。このことから、妊娠期ヒ素曝露による F2

での肝腫瘍増加の形質は F3 には受け継がれないと結論された。



F2の肝腫瘍発生率に関するχ ² 乗検定	対照群F1雄の子 (CC, CA)	ヒ素群F1雄の子 (AC, AA)	P値
		34.1%	45.9%
	対照群F1雌の子 (CC, AC)	ヒ素群F1雌の子 (CA, AA)	
	41.1%	39.9%	0.83

図5 対照群とヒ素群F1の組み合わせ交配から得られたF2雄の肝腫瘍発症率
ヒ素群F1雄の子であるF2雄（AC群およびAA群）では、対照群F1雄の子であるF2雄（CC群およびCA群）と比較して有意に肝腫瘍の発症率が高かった。



腫瘍の種類	腫瘍の種類		
	Adenoma	Carcinoma	
対照群とヒ素群F2各10個の腫瘍を観察した	対照群 (n=10)	8	2
	ヒ素群F2 (n=10)	7	3

図6 C3H マウス肝臓の病理組織像と腫瘍の種類
対照群およびヒ素群F2の肝腫瘍はいずれも腺腫（adenoma）が主である。組織の染色はヘマトキシリン・エオジンで行った。

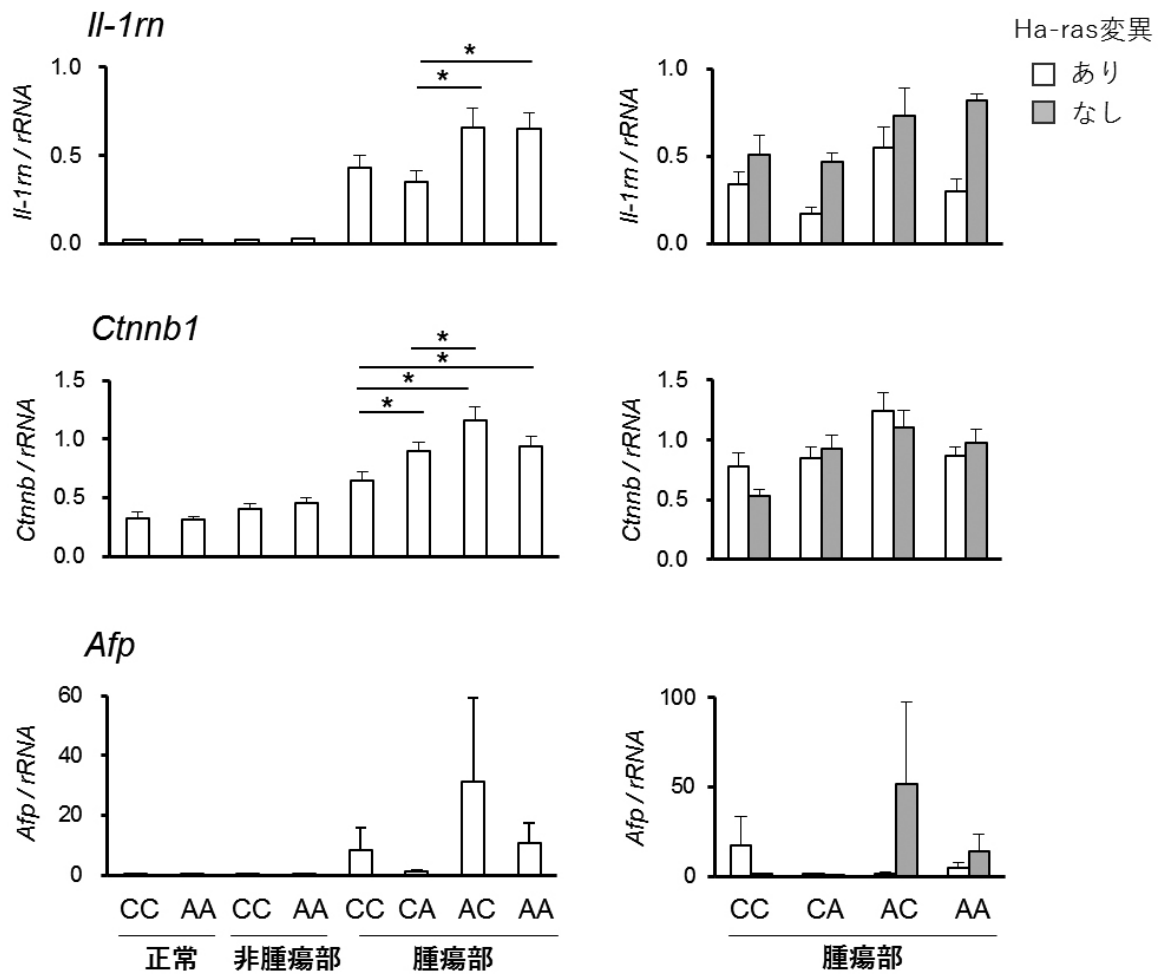


図7 腫瘍関連遺伝子のF2対照群(CC)およびヒ素群(AA)肝臓組織における発現

B) F2雄肝腫瘍増加の原因候補に関する網羅的ゲノム解析

B-1. 体細胞突然変異の検索

F0妊娠期ヒ素曝露によるF2雄での肝腫瘍増加の原因として、体細胞突然変異が増加することによって腫瘍が増加するという可能性について検討した。肝腫瘍の増加がヒ素群F1雄からF2雄に伝わることから、ヒ素群F1雄x対照群F1雌の子であるF2AC群雄と、対照群F1雌雄の子であるF2CC群雄各3匹から、腫瘍のない肝臓から正常組織(ACN, CCN)を、腫瘍のある肝臓から腫瘍部(ACTt, CCTt)と非腫瘍部(ACTn, CCTn)を採取し、DNAを調製して突然変異をエクソーム法で解析し比較した。各サンプルについて約10Gb以上の読み取りを行い、2.1.2の項に記した方法でトリミング後マウスM. musculusゲノムリファレンス配列(GRCm37(mm9))にマッピングした。

今回のエクソーム解析では、ゲノム上の267,823箇所が検出された。そのうち、全サンプルでcoverage 10以上の読み取りができた箇所が141,438個あり、その中でAllele Frequency Classによるフィルタリングによっていずれかのサンプルに突然変異が含まれると判定された箇所が44,554個検出された。

さらに変異候補の正確性を上げるためにQUAL999のみの箇所を抽出し、同一箇所の重複を削除すると、10,602箇所に絞られた。この10,602箇所に関して変異パターンの特徴を解析した結果を図8に示した。これまでの報告¹⁾と同様にプリン塩基(A, G)同士、ピリミジン塩基(C, T)同士の置換であるトランジション変異の割合が、プリン塩基とピリミジン塩基の置換であるトランスバージョン変異よりも多かった。

なお、マウスゲノムのリファレンス配列として用いられている C57BL/6 マウスのゲノム配列と C3H マウスのゲノム配列を比較して、すべての C3H マウスで変異が見つかった箇所の変異パターンは図 9 の通りであった。トランジション変異 (C:G to T:A および T:A to C:G) の割合が他の変異より圧倒的に多く、自然界においてトランジションのおこる頻度がトランスバージョンよりも高いこと²⁰⁾や、上述の C3H マウス肝臓の体細胞突然変異の変異パターンとも一致していた。

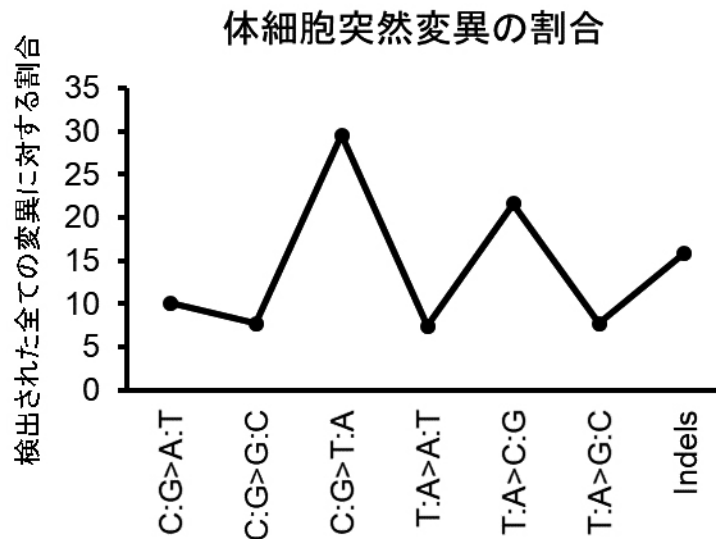


図 8 エクソーム解析による変異パターンの特徴

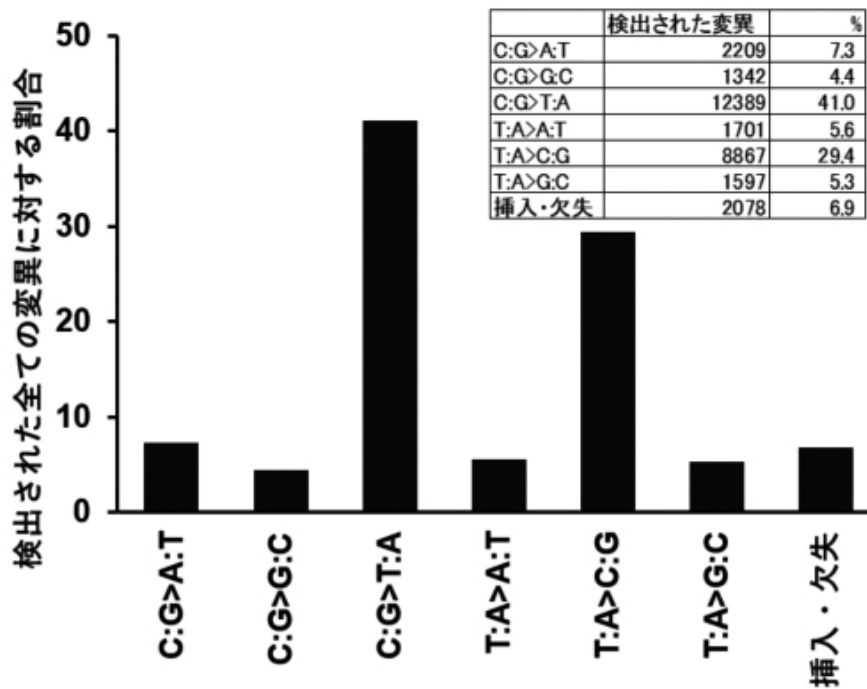


図 9 C3H マウスと C57/BL6 マウス系統間で見つかった変異の種類と割合

C57BL/6 マウスはがんになりにくい系統であることから、両系統の塩基置換の位置を詳しく調べることによって、C3H マウスの発がん易発性に関与する遺伝子を検出できる可能性が考えられた。

次に各種の条件で体細胞突然変異の候補を抽出した。体細胞突然変異であることは、同じ個体の非腫瘍部では変異がなく、腫瘍部で変異があることから判定した。今回解析に用いた腫瘍サンプル (CCTt, ACTt) は、パイロシーケンス解析で *Ha-ras* 変異をもつものを選んでいくことから、エクソーム解析でも腫瘍サンプルに *Ha-ras* の変異が検出され、非腫瘍部や正常組織では変異がないことが確認された (図 10)。また対照群の腫瘍とヒ素群の腫瘍の *Ha-ras* の変異率を、サンプル数を増やしてパイロシーケンサーで解析した結果、両群で有意な差はなかった。

その他に、C3H マウスの一部の個体に存在する SNP が検出され、その変異率はエクソーム解析とパイロシーケンス解析の結果がよく一致した。一方、その他の変異候補については、*Ha-ras* 変異ほど顕著に腫瘍部のみで増加しているものではなく、またパイロシーケンスによって結果が支持されない、またはリピート配列などと重なりシーケンスプライマーが設計できないなどの理由から、検証ができなかった。

以上より、今回のエクソーム解析では *Ha-ras* 以外に顕著な体細胞突然変異は見つからず、F0 妊娠期ヒ素曝露によって F2 で特異的に増加する体細胞突然変異は検出されなかった。

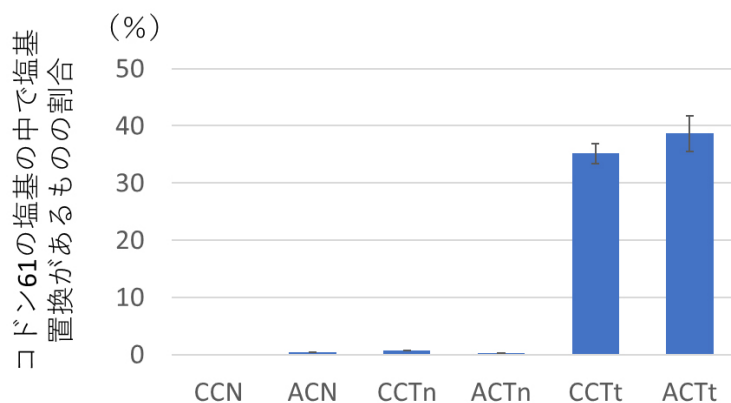


図 10 エクソーム解析で検出された *Ha-ras* コドン 61 の塩基置換の割合

B-2. 遺伝子発現変化と DNA メチル化解析

C3H マウスへの妊娠期ヒ素曝露による F2 への影響に関しては、これまでに遺伝子発現変化および DNA メチル化変化に関しての知見も得ている。遺伝子発現については、対照群 CC F2 の腫瘍組織と比較してヒ素群 AA F2 の腫瘍組織では、酸化的リン酸化やミトコンドリア機能障害に関連する経路の変化が示され、また NF- κ B 経路の活性化が示唆された (未発表データ)。

DNA メチル化に関しては、RRBS 法による網羅的解析を行った。その結果、C3H マウスの正常肝組織と比較して肝腫瘍で特異的に変化する腫瘍関連遺伝子である *Mst1r*, *Slpi* などについて、その制御に TSS \pm 2000 bp にあるメチル化変化領域 (Differentially methylated regions, DMR) が関与する可能性があることを、細胞株での検証実験を含めて明らかにした (Matsushita et al. submitted)。一方、対照群腫瘍 CCTt とヒ素群腫瘍 AATt の比較から、AATt で特異的にメチル化が変化する DMR が *Tmem54* および *Cd74* の転写開始点付近で見つかり、これらが AATt での腫瘍増加に関与する可能性が示唆された (未発表データ)。

今回上述したように、ヒ素群の F2 肝臓で *Ha-ras* 以外に特異的に増加する体細胞突然変異が見つからなかったため、遺伝子発現や DNA メチル化との関連は検討できなかった。

2.1.4 まとめ

本研究では、F0 妊娠期無機ヒ素曝露によって F2 孫世代雄の成長後に肝腫瘍が増加するという、以前の研究で得られた結果を追試・確認することができた。さらに組み合わせ交配実験の結果から、F2 雄に肝腫瘍増加の影響を伝えるのは F1 雄であることが示され、すなわち F1 雄の生殖細胞が責任細胞であると考えられた。これらの結果から、図 4 に示した仮説 ver.1 を図 11 に示すように更新した。この結果は、F0 の曝露から F2 に影響が伝わる経路を解析する上で重要な知見である。一方、ヒ素群 F2 の雌雄を交配して得た F3 雄の肝腫瘍発症率は対照群 F3 雄と差はなく、F0 妊娠期無機ヒ素曝露による肝腫瘍増加の影響は F3 までは伝わらないと結論された。

また今回は、F2 の肝腫瘍における体細胞突然変異をエクソーム法で解析したが、Ha-ras 以外の体細胞突然変異は検出できなかった。ゲノム中でたんぱく質をコードするエクソン領域は 1-2% 程度であり、エクソーム法はその領域の塩基を濃縮して高効率に解析できるように開発された方法である。今回行った C3H マウス肝組織のエクソーム解析では、coverage 10 以上の読み取りができた箇所が約 14 万か所程度であったため検出感度が十分でなかった可能性は否定できない。しかし今回 Ha-ras のような発生率の大きな体細胞突然変異が Ha-ras 以外には検出されなかったことから、今後はエピジェネティック変化を起点として肝腫瘍増加につながる遺伝子発現変化の解析に力点をおく予定である。また F2 を作る F1 精子から F2 肝臓に影響が伝わるメカニズムに関しての分子レベルでの解析を進行中である。

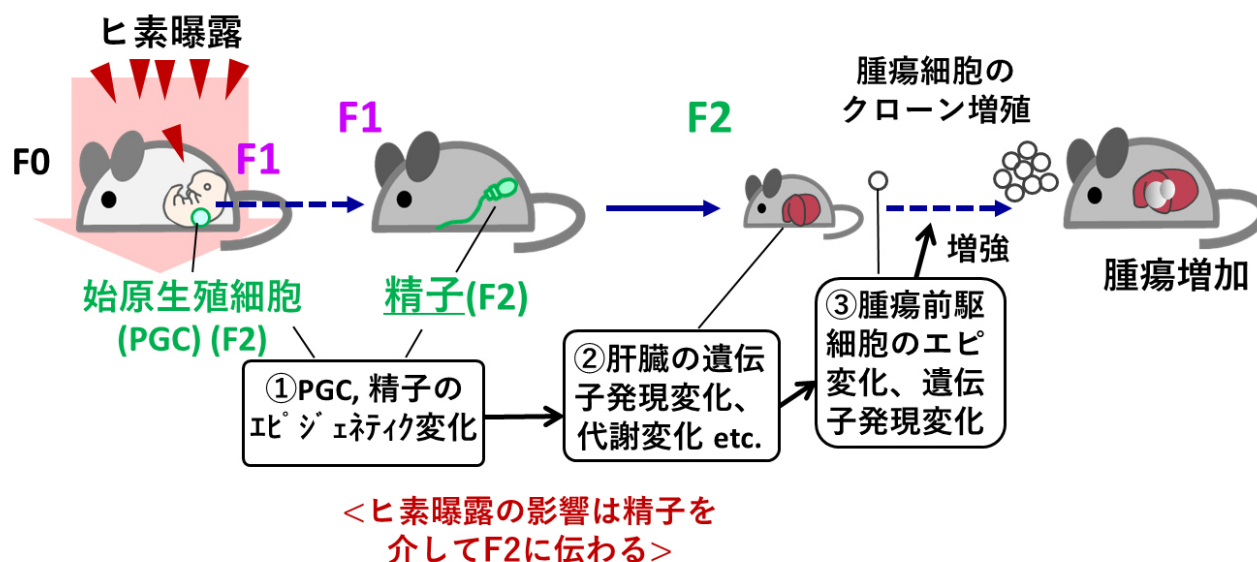


図 11 妊娠期ヒ素曝露による F2 肝腫瘍増加経路に関する仮説 ver. 2

引用文献

- 1) Perera F., Herbstman J. (2011) Prenatal environmental exposures, epigenetics, and disease. *Reprod. Toxicol.*, 31, 363–373.
- 2) Gluckman P.D., Hanson M.A., Beedle A.S. (2007) Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. *Am. J. Hum. Biol.*, 19, 1-19.
- 3) Barouki R., Gluckman P.D., Grandjean P., et al. (2012) Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. *Env. Health*, 11, 42.
- 4) 野原恵子 (2013) 環境分野における DOHaD 研究, *公衆衛生*, 77, 1019.
- 5) 野原恵子 (2013) DOHaD とエピジェネティクス, *産科と婦人科* 5, 575.
- 6) Waalkes M.P., Ward J.M., Liu, J. and Diwan B.A. (2003) Transplacental carcinogenicity of inorganic arsenic in the drinking water: induction of hepatic, ovarian, pulmonary, and adrenal tumors in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 186, 7-17.

- 7) Waalkes M.P., Liu J., Chen H., et al. (2004) Estrogen signaling in livers of male mice with hepatocellular carcinoma induced by exposure to arsenic in utero. *J. Natl. Cancer Inst.*, 96, 466-74.
- 8) Nohara K., Tateishi Y., Suzuki T., et al. (2012) Late-onset increases in oxidative stress and other tumorigenic activities and tumors with a Ha-ras mutation in the liver of adult male C3H mice gestationally exposed to arsenic. *Toxicol. Sci.*, 129, 293-304.
- 9) Kundacovic M., Champagne F.A. (2011) Epigenetic perspective on the developmental effects of bisphenol A *Brain Behav. Immun.*, 25, 1084.
- 10) Sasaki H., Matsui Y. (2008) Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nature Rev.*, 9, 129-40.
- 11) Nohara K., Okamura K., Suzuki T., et al. (2016) Augmenting effects of gestational arsenite exposure of C3H mice on the hepatic tumors of the F2 male offspring via the F1 male offspring. *J. Appl. Toxicol.*, 36, 105–12.
- 12) Nohara K., Suzuki T., Okamura K., et al. (2017) Tumor-augmenting effects of gestational arsenic exposure on F1 and F2 in mice. *Gene Env.*, 39, 3.
- 13) Hughes M.F., Beck B.D., Chen Y., et al. (2011) Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. *Toxicol. Sci.*, 123, 305–332.
- 14) 姫野誠一郎 (2017) 地球環境, 22, 81.
- 15) Takumi S., Aoki Y., Sano T., et al. (2014) In vivo mutagenicity of arsenite in the livers of gpt delta transgenic mice. *Mutation Res.*, 760, 42-7.
- 16) Maronpot R.R., Fox T., Malarkey D.E., and Goldsworthy T.L. (1995) Mutations in the ras proto-oncogene: clues to etiology and molecular pathogenesis of mouse liver tumors. *Toxicology.*, 101, 125-156.
- 17) Pylayeva-Gupta Y., Grabocka E., Bar-Sagi D. (2011) RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat. Rev. Cancer.*, 11, 761-774.
- 18) Boyle P., Clement K., Gu H., et al. (2012) Gel-free multiplexed reduced representation bisulfite sequencing for large-scale DNA methylation profiling. *Genome Biol.*, 13, R92
- 19) Sun H., Chua M.S., Yang D., et al. (2008) Antibody Arrays Identify Potential Diagnostic Markers of Hepatocellular Carcinoma *Biomark Insights.*, 3, 1-18.
- 20) Alan F. Rubin and Phil Green (2009) Mutation patterns in cancer genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 106, 21766-70.

2.2 ミジンコの DNA メチル化解析法と多世代影響検出法の検討

2.2.1 経緯と目的

化審法や農取法の生物試験の中で、水生生態毒性試験に最も汎用されている試験生物の一つにミジンコがある。ミジンコは鰓脚綱枝角目（ミジンコ目）ミジンコ科に分類される水中動物プランクトンの一種であり、通常は単為生殖を行って増殖するため、遺伝的にクローンな集団を入手できる点が興味深い。ヒトのゲノムサイズは 3.0×10^9 bp で約 2 万 3000 個の遺伝子推定領域を持つと言われているのに対し、ミジンコのゲノムサイズは 2.0×10^8 bp で約 3 万 1000 個の遺伝子推定領域を持つことが明らかとなりミジンコの方がヒトよりゲノムサイズは小さいが遺伝子数は多いことが明らかになっている¹⁾。突然変異-蓄積（MA）は、塩基置換突然変異率が他の多細胞真核生物と同等の割合の時に、大規模（ > 100 kb）な新規のコピー数変種異（CNVs）率が上がって、また自然に下がる²⁾ことが判明している。しかしコピー数の制御機構については分かっていない。

ミジンコは環境刺激によって雄を発生させたり、雌が耐久卵を生んだりすることが知られているが、例えばオスの発生率は刺激の種類、系統差や種差によっても異なるが、数%から10%未満と言われている。メスの耐久卵を持つ割合はもっと少ない。もともとクローンのミジンコになぜそのような個体差が生まれるのかは分かっておらずそれらの研究事例も少ない。ミジンコの個性発現の要因として、遺伝子のメチル化による後天的発現修飾が関係している可能性がある。

Daphnia magna のシトシン・メチル化度の割合が、コントロールでは0.49-0.52%程度の狭い範囲なのに、捕食者が居ると遺伝子型で0.21%～1.02%とコントロールの5倍程度にバリエーションが広がった。また捕食者、アオコ、クリプトモナスと塩化ナトリウムなどの環境ストレスと関係しているがヒ素、カドミウム、魚、鉛、pH5.5、pH8、温度、低酸素、白色脂肪細胞病とは関係ない、という報告³⁾がある。捕食者の存在など環境ストレスによって、ミジンコは形態を変化させたり、オス誘導のトリガーになることが知られているので、環境ストレス、メチル化、仔虫の発生などが関連している可能性を示している。また、*Daphnia magna* の代謝率とエピジェネティクスが関係している⁴⁾、5-メチル-1H-ベンゾトリアゾールがエピジェネティックな作用で脱皮かく乱（増加）を起こすという論文⁵⁾、低酸素のミジンコに対するトランス世代の効果がヒストンの後成的発現修飾を通して調整されるという論文⁶⁾など、環境ストレスとメチル化の関連を示唆する論文は近年多数報告され始めている。さらに *D. pulex* の 5mC と 5hmC の存在量を、3つの遺伝子（Cox4、Cand2 と Ephx1）で調べて、5hmC がイントロンよりエクソンでは2倍位多く、アデニル酸シクラーゼ活性化 G タンパク質結合レセプター・シグナリング経路、脱皮周期、形態発生と細胞運命決定に関与している遺伝子では 5hmC が多く、TGF ベータ・レセプター・シグナリング経路関連では少ないことからおそらくエピジェネティックな反応がミジンコの遺伝子形質発現に関与しているとする論文⁷⁾、ミジンコの性分化（オス化）とメチルファルネソエート（本来の幼若ホルモン）とエピジェネティックな反応について論じている論文⁸⁾など、より強固にエピジェネティックと脱皮やオス化と関連付ける報告も出ている。しかしどれも仮説の域をでていない。

総じて、メチル化はミジンコにとって何らかの遺伝子及び形質発現に関与しているかもしれないが、メチル化と生理的な現象の関連についてはまだ仮説の域を出ず、証明している論文は無い。

ある種の化学物質やストレスによって、メチル化度が変化するのは事実であるようなので、今回はまず化学物質ストレスによる継代的なメチル化度の変化を確認することを目的とした。

Vandegheuchte ら⁹⁾により、塩化亜鉛の単回曝露によって、多世代にわたるメチル化度の変化（次世代ではなく、次々世代でメチル化度が増加する）が報告されている。一般的な化学物質（ホルモン剤などといった特殊な作用を有しているわけではないという意味）で継世代の影響が示されるということは、非常に興味深い知見であるため、まずその現象の再確認を行い、その上で他の化学物質でも同様の現象が派生するかどうかを確認することにした。

2.2.2 方法

A) ミジンコからの DNA 調製法および LC/MS-MS による 6 メチルデオキシアデノシン (6mdA) の精密定量法の確立

サンプル調製

ミジンコ成体 10 匹程度に Lysis buffer (50 mM Tris-HCL (pH8.0), 100 mM NaCl, 20 mM EDTA, 1% SDS) を 595 μ l 添加し、Tomy 社ビーズ式細胞破碎装置を用いて、ミジンコを粉碎した (条件は 3000 rpm 90 秒)。溶液に Protease K (10 mg/ml) を 105 μ l 加え、55 $^{\circ}$ C で overnight インキュベートした。その後水中に移し、RNAase (100 mg/ml) を 0.5 μ l 添加し、さらに 37 $^{\circ}$ C で 30 分 インキュベートした。インキュベート後、溶液を別のチューブに移し、フェノールクロロホルム法およびエタノール沈殿によって DNA を精製した。精製した総量 20 μ l の DNA 1 μ g を 98 $^{\circ}$ C で 3 分間 インキュベート後、水中に移した。その後 2.4 μ l の 100 mM 酢酸アンモニウム (pH = 5.3) と 2 μ l (2 units) の Nuclease P1 を加え、45 $^{\circ}$ C で 2 時間 インキュベートした。インキュベート後、6.4 μ l の 500 mM 炭酸水素アンモニウムと 1 μ l (0.002 units) の Phosphodiesterase 1 を加え 37 $^{\circ}$ C で 2 時間 インキュベートした。次に 2 μ l の Alkaline Phosphatase (0.5 units) を加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間 インキュベートした。さらに 100 mM 炭酸水素アンモニウムを加えて、Total 100 μ l にした。

6mdA の精密定量法

1) 6mdA の安定同位体標識化合物 ($^{15}\text{N}_5$ -6mdA) の調製

6mdA の精密定量には安定同位体で標識された化合物が必須であるが、市販されていなかったため、合成することとした。図 12 に示すように Jones らの報告¹⁰⁾ に従い、 ^{15}N 標識デオキシアデノシン ($^{15}\text{N}_5$ -dA, 2.2 mg) をジメチルホルムアミド (5 μ l) に溶解し、ヨウ化メチル (3 μ l) を加え、室温で一晩放置した。反応液を真空ポンプで減圧乾固したのち、0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液 (100 μ l) を加えて 80 $^{\circ}$ C で 1 時間加熱した。室温まで放冷後、5% 酢酸水溶液 (50 μ l) を反応液に加え、ミリ Q 水で 1 ml に希釈した。セミマイクロ分取 HPLC (カラム: Waters XBridge C18, 10 x 250 mm, 5 μ m; solvent: 14.5% メタノール水溶液; 流速: 4 ml/min) で精製を行い、 $^{15}\text{N}_5$ -6mdA を 1.4 mg (収率 60%) 得た。

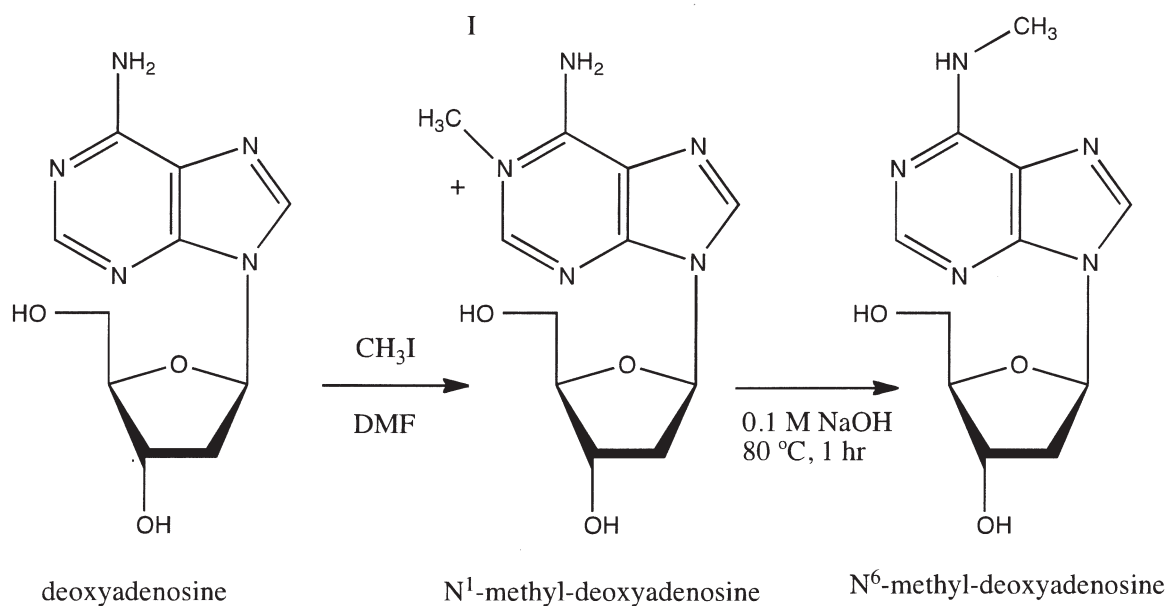


図 12 6mdA の合成スキーム

2) 6mdA の精密分析手法

1) で合成した $^{15}\text{N}_5$ -6mdA を内部標準物質 (サロゲート) として用いて、表 1 の条件で LC-MS/MS を用いて分析

を行った。

分析用カラム :Atlantis dC18 2.1×150mm, 5µm,Waters; Solvent A:10mM AcONH4 aq. ; Solvent B: MeOH; Gradient: 4%(0 min), 4-7% B over 0.1min,7-35% B (0.1 -6min), 35-40 % B (6.0-6.1 min), 40 % hold to 8.5 min; Flow rate: 0.2ml/min; Oven Temp.:40℃。

表 1 ヌクレオシド分析条件

HPLC 条件		MS/MS 条件	
分析用カラム	Atlantis dC18 2.1 x 150 mm, 5 µm	イオン化	ESI ポジティブ
Retention Gap 用カラム	T3 2.1 x 100 mm, 3 µm	化合物	MRM 条件 (m/z)
Solvent A	10 mM NH ₄ OAc	dC	228.00 > 112.05
Solvent B	MeOH	¹³ C ¹⁵ N-dC	241.00 > 120.05
流速	0.2 ml/min	5hmdC	258.00 > 142.10
オープン温度	40℃	5hmdC-d ₃	261.00 > 145.10
グラジエント	0 – 0.1 min B: 4 – 7 %	5mdC	242.00 > 126.10
	0.1 – 6 min B: 7 – 35 %	¹³ C ¹⁵ N-5mdC	254.00 > 133.10
	6 – 6.1 min B: 35 – 40 %	dA	252.00 > 136.05
	6.1 – 8 min B: 40 %	¹³ C ¹⁵ N-dA	267.00 > 146.05
		6mdA	266.00 > 150.10
		¹³ C ¹⁵ N-6mdA	281.00 > 160.10

B) 亜鉛曝露による多世代影響

試験物質

ZnCl₂ (和光純薬工業株式会社製、試薬特級) で行い、曝露濃度は Vandeghechuchte ら⁹⁾の研究と同様の 388 µg Zn/L に設定した。

試験生物

オオミジンコ (*Daphnia magna*) は大型の枝角目甲殻類で、親個体は 5 mm 程度にまで成長する。本試験には、国立環境研究所で M4 培地を用いて継代飼育している遺伝系統 (NIES 系統) を用いた。

飼育方法

継代飼育は OECD TG211 に基づき、1 L ビーカーにおいて、Elenet M4 培地 1 L に約 35 個体 (成体時) の密度のマスカルチャーで行った。換水は月・水・金の週 3 回行い、このとき新たに産まれた仔虫は取り除くが、生後 2 週齢目の成熟個体から産まれた仔虫を選別して、毎週新しいマスカルチャーにして継代を行った。餌は YCT (Yeast, Cerophyll, and Trout chow、(株)リーセンテック社より購入) を容器あたり 1 ml、単細胞緑藻クロレラ (*Chlorella vulgaris*、クロレラ工業株式会社より購入) を容器あたり 1 ml (約 5×10⁶ cells/ml の濃度に維持される) を毎日与えた。金曜日には週末分を含めて 2 倍量を与えた。以上の飼育培養は、光条件および温度が一定に保たれている甲殻類・水生昆虫試験室において、水温 22±1℃、pH7.5±0.5、明期 16 時間・暗期 8 時間の室内光の日長条件で行った。

試験個体

生後 13 ~ 17 日齢 (2 週齢目) のマスカルチャーから産仔された生後 24 時間以内の仔虫を試験に供した。

試験条件

表 2 に本試験の試験条件をまとめた。試験は各試験 13 匹 ×3 連で行った。試験終了のサンプリング時には、腸管内に残っている餌のクロレラを完全に排出するためにカオリン溶液 (2 g/L) に 6 時間浸漬させた。ミジンコは

カオリンを取り込み、クロレラを排出する。浸漬後は余分なカオリンを MilliQ にて洗浄し、液体窒素によって凍結処理を行った。継代とサンプリング時期は表 3 に従って行った。すべての DNA は 3 週齢目に相当するミジンコから抽出しているため、年齢によるメチル化度の差の影響は無いと考えられる。試験の模式図を図 13 に示した。

試験装置および水質測定機器

試験は全て当施設の甲殻類・水生昆虫試験室に設置した日本フリーザー株式会社製クロマトチェンバー MC-8EF3 内で行った。

換水時には、新しく調整した試験溶液とばく露後の試験溶液の水質測定を行った。測定項目は水温、pH、DO で以下の測定機器を用いた。

水温計： CUSTUM 社製 デジタル温度計 CT-430WP

pH 計： HORIBA 社製 pH/DO メーター D-55

DO 計： HACH 社製 蛍光式ポータブル DO メーター HQ30d

表 2 試験条件

項目	
供試個体	生後 24 時間以内の仔虫
試験培地	M4 培地 (OECD TG211 に準拠)
繰り返し数	各試験区につき n=3
試験期間	FO 世代から F2 世代まで 7 週間 (各世代 21 日間)
試験容量	500 ml/13 個体 / 容器
給餌量	クロレラ (5 × 10 ⁸ cells/ml) 50 μl, YCT 50 μl / 個体 / 日 (TG211 に準拠)
光条件	16L : 8D (<15-20 μE/m ² /s) (TG211 に準拠)
温度	18-22℃ で変動は 2℃ 以内 (TG211 に準拠)
濃度の設定	388 μg Zn/L (Vandeghechuchte らと同様)
換水	週 3 回 (月・水・金)
継代個体	生後 13 ~ 15 日が産仔した仔虫

表 3 継代とサンプリングのスケジュール

	F0-C	F1-C	F2-C	F0-Zn	F1-Zn-1	F2-Zn-1	F1-Zn-2	F2-Zn-2
	Control	C-C	C-C-C	Zn Exposed	Zn-C	Zn-C-C	Zn-Zn	Zn-Zn-Zn
Week 0	開始			開始				
Week 1	↓			↓				
Week 2	仔虫回収	→開始		仔虫回収	→開始		→開始	
Week 3	Sampling	↓		Sampling	↓		↓	
Week 4		仔虫回収	→開始		仔虫回収	→開始	仔虫回収	→開始
Week 5		Sampling	↓		Sampling	↓	Sampling	↓
Week 6			↓			↓		↓
Week 7			Sampling			Sampling		Sampling

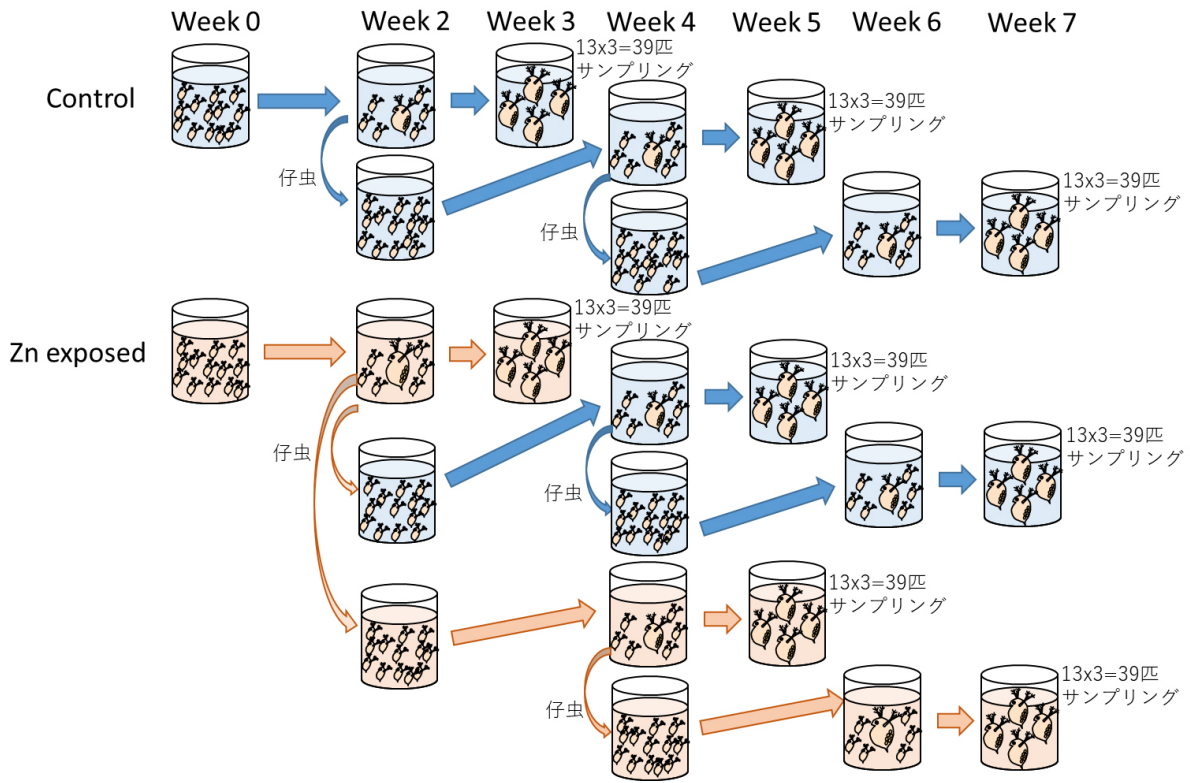


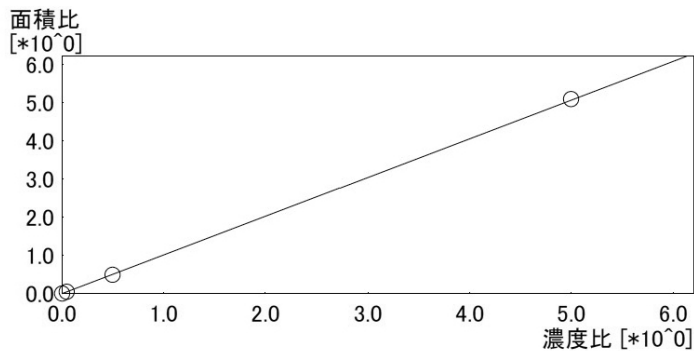
図 13 試験の模式図

2.2.3 結果と考察

分析条件の確認

6mdA を 0.005~5 ng/ml、¹⁵N₅-6mdA を 1 ng/ml となるように溶液を調製し、分析用カラム :Atlantis dC18 2.1×150mm, 5μm,Waters; Solvent A:10mM AcONH₄ aq. ; Solvent B: MeOH; Gradient: 4%(0 min), 4-7% B over 0.1min,7-35% B (0.1 -6min), 35-40 % B (6.0-6.1 min), 40 % hold to 8.5 min; Flow rate: 0.2ml/min; Oven Temp.:40 ℃ の条件で分析を行ったところ、0.01 ~ 5 ng/ml の濃度範囲で良好な直線の検量線を得ることができた (図 14)。

ID# : 9 m/z : 266.00>150.10
 化合物名 : 6mdA
 検量線式 : $f(x)=1.01032*x+0.00169516$
 相関係数(R)=0.9998106 寄与率(R²)=0.9996213
 平均 RF: 1.104968e+000 RF標準偏差: 1.581700e-001 RF相対標準偏差: 14.314436
 検量線の種類 : 直線
 原点通過 : 通さない
 重み付け : 1/A²
 定量計算法 : 内部標準法



#	濃度(比)	平均面積比	面積
1	0.005	0.00673125	7164
			6323
3	0.05	0.0533154	53204
			53696
5	0.5	0.495171	490326
			495208
7	5	5.08487	5108980
			4992061

図 14 6mdA の検量線

また、図 15 に dC、5mdC、dA、6mdA の LC-MS/MS クロマトグラムを示す。5hmdC と dC との分離は不完全であったが、その他の化合物については良好な分離を示した。

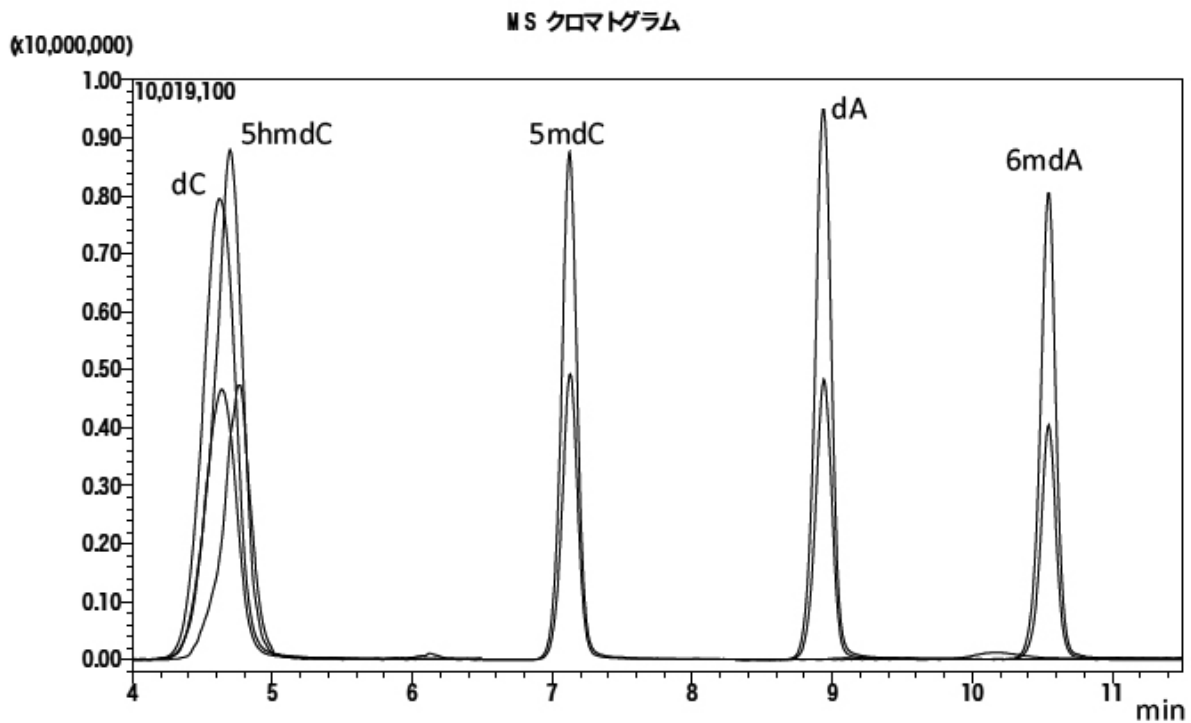


図 15 dC、5mdC、dA、6mdA の LC-MS/MS クロマトグラム

亜鉛曝露による多世代影響

亜鉛を *D.magna* に 3 世代にわたり曝露し、それぞれ図 16 に 5 メチルシトシン、図 17 に 6 メチルアデニンのメチル化 DNA を測定した結果を示す。5 メチルシトシン (図 16) について、F0C；3 週目のコントロール、F0Z；3 週目の Zn 曝露区、F1CC；5 週目のコントロール、F1ZC；親を曝露して生まれた仔虫を水で 3 週飼育したもの、F1ZZ；親を Zn 曝露して生まれた仔虫をさらに 3 週飼育 Zn 曝露したもの (2 世代曝露)、F2CCC；3 世代目の 3 週目のコントロール、F2ZCC；親を曝露して生まれた仔虫を水で 2 週飼育したものから生まれた仔虫をさらに 3 週間水で飼育したもの、F2ZZZ；親を Zn 曝露して生まれた仔虫をさらに 2 週飼育 Zn 曝露したものから生まれた仔虫をさらに Zn で 3 週間曝露したもの (3 世代曝露)、の 8 パターンが示されている。F0 の亜鉛曝露区とコントロールとの間には有意な違いが認められたが、その他についてはそれぞれのコントロール (CC および CCC) とその他の群との間に有意な違いは認められなかった。

6 メチルアデニンについて (図 17)、図 16 と同様に F0C；3 週目のコントロール、F0Z；3 週目の Zn 曝露区、F1CC；5 週目のコントロール、F1ZC；親を曝露して生まれた仔虫を水で 3 週飼育したもの、F1ZZ；親を Zn 曝露して生まれた仔虫をさらに 3 週飼育 Zn 曝露したもの (2 世代曝露)、F2CCC；3 世代目の 3 週目のコントロール、F2ZCC；親を曝露して生まれた仔虫を水で 2 週飼育したものから生まれた仔虫をさらに 3 週間水で飼育したもの、F2ZZZ；親を Zn 曝露して生まれた仔虫をさらに 2 週飼育 Zn 曝露したものから生まれた仔虫をさらに Zn で 3 週間曝露したもの (3 世代曝露)、の 8 パターンが示されている。F0 のコントロールと曝露区、F1 のコントロール区、F2 の 3 世代曝露区の平均値は他の区に比べて 2 倍程度高い値を示したが、F0 コントロールと (F1 コントロール、F2 コントロール) の間に 6 倍程度の差があるため上記の 2 倍程度の差は起こりうる変動の範囲内と想定される。

なお、Vandegheuchte ら⁹⁾ によって示された、曝露停止後、次々世代のメチル化度が上がるという現象は検証できなかった。

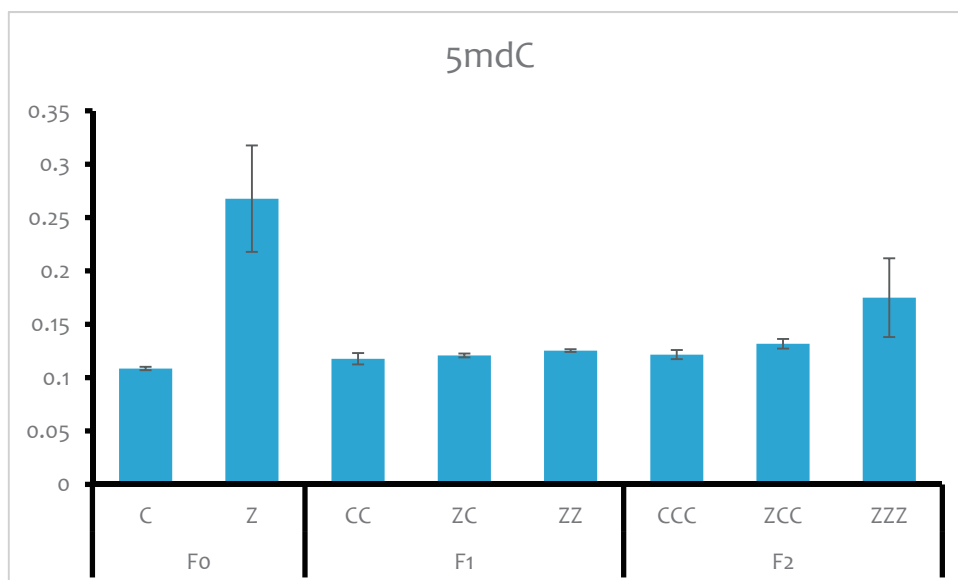


図 16 5 mdc の測定結果

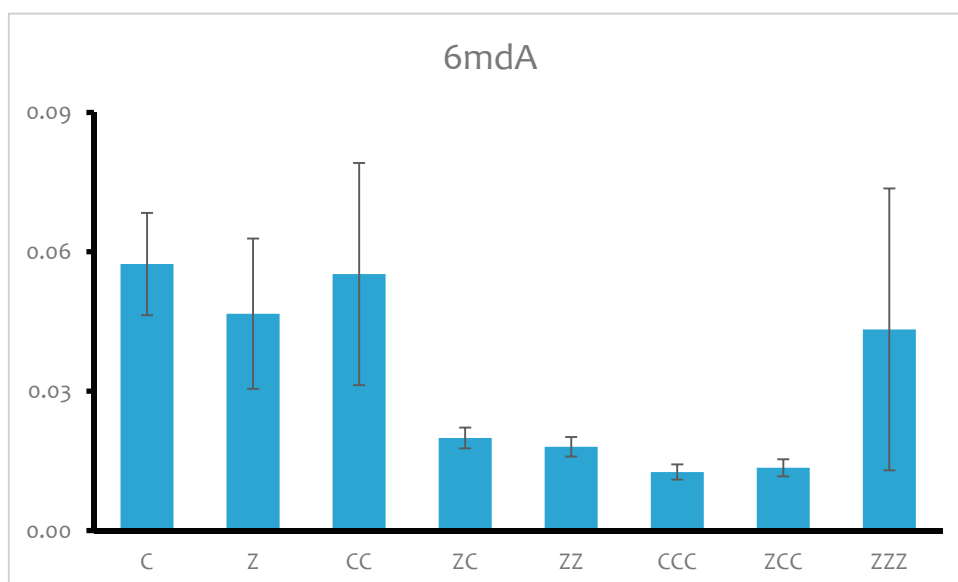


図 17 6 mdA の測定結果

2.2.4 まとめ

ミジンコのメチル化度を測定する手法を開発し、微量の DNA から 5mdC および 6mdA を定量できたことは成果に値する。ミジンコの 5mdC 量は、既報の値と比べてほぼ同じ³⁾であり、その値は信用できる。ミジンコの 6mdA を測定している事例は無く、6mdA が測れるようになったということは本研究の特徴的な点である。Vandegheuchte ら⁹⁾の報告では曝露を止めた 2 世代目（本研究の F2ZCC に相当）でメチル化度が増加していたが、本研究では再現できなかった。試験個体数は Vandegheuchte ら⁹⁾よりも多くの個体を用いて、より精度の高い曝露と測定を行っているため、なぜ結果が再現できなかったか不明である。Asselman J ら³⁾の論文にもあるように、環境ストレスによって必ずしもメチル化度が増えるわけではなく、個体によっては増える場合も減る場合も存在するようなので、複数回の確認試験が必要かもしれない。

いずれにしても、ミジンコのメチル化度に関する研究は緒についたばかりでまだまだ不明の点が多く存在する。今後も継続した研究を行っていくことが必要と思われる。

引用文献

- 1) Colbourne JK, Pfrender ME, Gilbert D, Thomas WK, Tucker A, Oakley TH et al., The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex*. *Science*. 2011 Feb 4;331(6017):555-61
- 2) Keith N, Tucker AE, Jackson CE, Sung W, Lucas Lledó JI, Schrider DR, Schaack S, Dudycha JL, Ackerman M, Younge AJ, Shaw JR, Lynch M. High mutational rates of large-scale duplication and deletion in *Daphnia pulex*. *Genome Res*. 2016 Jan;26(1):60-9
- 3) Asselman J, De Coninck DI, Vandegehuchte MB, Jansen M, Decaestecker E, De Meester L, Vanden Bussche J, Vanhaecke L, Janssen CR, De Schamphelaere KA. Global cytosine methylation in *Daphnia magna* depends on genotype, environment, and their interaction. *Environ Toxicol Chem*. 2015 May;34(5):1056-61.
- 4) Burggren WW. Epigenetics as a source of variation in comparative animal physiology - or - Lamarck is lookin' pretty good these days. *J Exp Biol*. 2014 Mar 1;217(Pt 5):682-9.
- 5) Giraud M, Douville M, Cottin G, Houde M. Transcriptomic, cellular and life-history responses of *Daphnia magna* chronically exposed to benzotriazoles:Endocrine-disrupting potential and molting effects. *PLoS One*. 2017 Feb14;12(2)
- 6) Lai KP, Li JW, Chan CY, Chan TF, Yuen KW, Chiu JM. Transcriptomic alterations in *Daphnia magna* embryos from mothers exposed to hypoxia. *Aquat Toxicol*. 2016 Aug;177:454-63.
- 7) Strepetskaitė D, Alzbutas G, Astromskas E, Lagunavičius A, Sabaliauskaitė R, Arbačiauskas K, Lazutka J. Analysis of DNA Methylation and Hydroxymethylation in the Genome of Crustacean *Daphnia pulex*. *Genes (Basel)*. 2015 Dec 31;7(1).
- 8) LeBlanc GA, Medlock EK. Males on demand: the environmental-neuro-endocrine control of male sex determination in daphnids. *FEBS J*. 2015 Nov;282(21):4080-93.
- 9) Vandegehuchte MB, Lemièrre F, Janssen CR. Quantitative DNA-methylation in *Daphnia magna* and effects of multigeneration Zn exposure. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2009 Sep;150(3):343-8.
- 10) Jones JW, Robins RK. Purine Nucleosides. III. Methylation studies of certain naturally occurring purine nucleosides. *J Am Chem Soc*. 1963, 85,193-201.

[資 料]

1 研究の組織と研究課題の構成

1.1 研究の組織

[A 研究担当者]

環境健康研究センター	野原恵子 鈴木武博 岡村和幸
------------	----------------------

環境リスク研究センター	鑑迫典久 古山昭子
-------------	--------------

環境計測研究センター	佐野友春
------------	------

[B 客員研究員]

内匠正太	(鹿児島女子短期大学)	(平成 25 ~ 27 年度)
------	-------------	-----------------

1.2 研究課題と担当者

サブテーマ1 妊娠期ヒ素曝露による孫世代の肝腫瘍増加のメカニズムの探索

野原恵子、鈴木武博、岡村和幸、古山昭子、内匠正太*

(注) *客員研究員

サブテーマ2 ミジンコのDNAメチル化解析法と多世代影響検出法の検討

鑑迫典久、佐野友春、岡村和幸

2 研究成果発表一覧

2.1 誌上発表

<雑誌>

発表者・(刊年)・題目・掲載誌・巻(号)・頁

野原恵子 (2013) 2.DOHaD とエピジェネティクス. 産科と婦人科, 80 (5), 575-579

野原恵子 (2013) 環境分野における DOHaD 研究. 公衆衛生, 77 (12), 1019-1021

野原恵子, 鈴木武博, 内匠正太, 岡村和幸 (2014) 妊娠期無機ヒ素曝露による子での癌遺伝子体細胞突然変異を介した発癌増加と多世代・継世代影響. 日本衛生学雑誌, 69, 92-96

野原恵子 (2015) DOHaD と環境化学物質. HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY, 22 (4), 53-57

Nohara K., Okamura K., Suzuki T., Murai H., Ito T., Shinjo K., Takumi S., Michikawa T., Kondo Y., Hata K. (2016) Augmenting effects of gestational arsenite exposure of C3H mice on the hepatic tumors of the F2 male offspring via the F1 male offspring. J Appl. Toxicol. 36, 105-112

Nohara K, Suzuki T, Okamura K, Matsushita J, Takumi S. (2017) Tumor-augmenting effects of gestational arsenic exposure on F1 and F2 in mice. Gene Env. 39

鈴木武博, 野原恵子 (2015) 無機ヒ素によるマウス肝がん増加に関連したエピジェネティック変化と DNA メチル化マーカーの探索. 日本衛生学雑誌, 70 (3), 181-185

鈴木武博, 岡村和幸, 内匠正太, 野原恵子 (2016) ヒ素の生体作用と疾患 - ヒ素による発がんメカニズムを中心に -. 日本臨床, 74, 1207-1213

Takumi S., Aoki Y., Sano T., Suzuki T., Nohmi T., Nohara K. (2014) *In vivo* mutagenicity of arsenite in the livers of gpt delta transgenic mice. Mutation Res. 760, 42-47

<書籍等 (分担執筆) >

発表者・(刊年)・題目・編著者名・書名・出版社・頁

野原恵子 (2014) 第3章 環境化学物質とエピジェネティクス. エピジェネティクスの産業応用, シーエムシー出版, 61-70

鈴木武博, 野原恵子 (2014) 2.6 環境因子によるエピジェネティック制御. 毒性の科学, 東京大学出版会, 49-52

2.2 口頭発表

発表者・(暦年)・題目・学会等名称・予稿集名・頁

Nohara K., Okamura K., Suzuki T., Murai H., Ito T., Shinjo K., Kondo Y. (2014) Maternal arsenic exposure of C3H mice increases hepatic tumor with an activating mutation in the oncogene Ha-ras in the F2 generation, Society of Toxicology Annual Meeting

野原恵子, 鈴木武博, 岡村和幸, 村井景, 上田佳代 (2014) C3H マウスへの無機ヒ素妊娠期曝露は F1 雄を介して F2 雄の肝癌を増加させる。日本毒性学会学術年会

野原恵子, 岡村和幸 (2014) 妊娠期にヒ素曝露を受けた C3H マウス雌の F2 子孫における肝癌の遺伝子発現変化。日本癌学会学術総会

野原恵子, 岡村和幸, 鈴木武博, 村井景, 小堀真珠子 (2014) 妊娠期無機ヒ素曝露による F2 雄マウスでの肝腫瘍増加の機序の探索。フォーラム 2014 衛生薬学・環境トキシコロジー

Nohara, K., Okamura, K., Suzuki, T., Hatada, I., Hata, K. (2015) The Effects of Gestational Arsenite Exposure on the F2 Generation: Role of Epigenetics, Society of Toxicology Annual Meeting

野原恵子, 岡村和幸, 鈴木武博 (2016) 妊娠マウスへの無機ヒ素曝露による多世代影響。第 86 回日本衛生学会学術総会

岡村和幸, 鈴木武博, 村井景, 野原恵子 (2014) 胎児期ヒ素曝露により後発的に増加する肝腫瘍における遺伝子発現変化の探索。分子予防環境医学研究会

岡村和幸, 中村一彦, 堀部悠, 河合智子, 鈴木武博, 秦健一郎, 野原恵子 (2015) 妊娠期ヒ素曝露による C3H マウス孫世代の肝腫瘍増加に関与する DNA メチル化変化の RRBS 法による探索。日本毒性学会学術年会

岡村和幸, 鈴木武博, 野原恵子 (2015) 妊娠期ヒ素曝露が F2 マウス肝腫瘍で誘導する DNA メチル化変化とその遺伝子発現制御。日本癌学会学術総会

岡村和幸, 野原恵子 (2015) 妊娠期ヒ素曝露による F2 マウス肝臓の正常組織、腫瘍組織における DNA メチル化変化。第 75 回日本癌学会学術総会

岡村和幸, 中林一彦, 堀部悠, 河合智子, 鈴木武博, 秦健一郎, 野原恵子 (2016) Novel DNA methylation changes induced by gestational arsenite exposure in hepatic tumors in F2 mice. 第 5 回日本 DOHaD 研究会学術集会

鈴木武博, 野原恵子 (2014) マウス肝癌細胞株における Fosb 発現と DNA メチル化の関連。分子予防環境医学研究会

Suzuki T., Yamashita S., Ushijima T., Takumi S., Sano T., Nohara K. (2014) Identification of DNA methylation changes in the liver tumors induced by gestational arsenic exposure using genome-wide analysis. Society of Toxicology Annual Meeting

鈴木武博, 山下聡, 牛島俊和, 内匠正太, 佐野友春, 野原恵子 (2014) 胎児期無機ヒ素曝露によるマウス肝腫瘍の DNA メチル化変化, 日本衛生学会学術総会

Takumi S., Aoki Y., Sano T., Suzuki T., Nohmi T., and Nohara K (2014) In vivo mutagenicity assay of arsenite using gpt delta transgenic mice, Society of Toxicology Annual Meeting

Takumi S., Okamura K., Suzuki T., Hano H., Nohara K., Yanagisawa H. (2015) Gestational Arsenic Exposure Affects Gene Expression in the Kidney and Lung in the F1 and F2 Mice, Society of Toxicology Annual Meeting

国立環境研究所研究プロジェクト報告 第126号
NIES Research Project Report, No.126

(SR - 126 - 2017)

環境化学物質の「多世代にわたる後発影響」の機序に関する研究
(所内公募型提案研究)

平成25～27年度

Studies on multigenerational late-onset effects of environmental chemicals
FY2013～2015

平成30年2月1日発行

編集 国立環境研究所 編集分科会

発行 国立研究開発法人 国立環境研究所

〒305-8506 茨城県つくば市小野川16番2

E-mail: pub@nies.go.jp

Published by the National Institute for Environmental Studies

16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506 Japan

February 2018

組版 朝日印刷株式会社つくば支社

〒305-0046 茨城県つくば市東2-11-15

無断転載を禁じます

国立環境研究所の刊行物は以下の URL からご覧いただけます。

<http://www.nies.go.jp/kanko/index.html>