

国立環境研究所特別研究報告

Report of Special Research from the National Institute for Environmental Studies, Japan

SR - 94 - 2011

エピジェネティクス作用を包括したトキシコゲノミクスによる  
環境化学物質の影響評価法開発のための研究  
(特別研究)

Studies to evaluate toxicities of environmental chemicals focusing on their epigenetic effects

平成 19 ~ 22 年度

FY2007 ~ 2010

NIES



独立行政法人 国立環境研究所

NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

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

エピジェネティクス作用を包括したトキシコゲノミクスによる  
環境化学物質の影響評価法開発のための研究  
(特別研究)

Studies to evaluate toxicities of environmental chemicals focusing on their epigenetic effects

平成 19 ~ 22 年度

FY2007 ~ 2010

特別研究「エピジェネティクス作用を包括したトキシコゲノミクスによる  
環境化学物質の影響評価法開発のための研究」

(期間 平成 19 ～ 22 年度)

課題代表者：野原恵子

執 筆 者：野原恵子、鈴木武博、前川文彦、内匠正太、塚原伸治

編 者：野原恵子

## 序

本報告書は、平成19～22年度の4年間にわたって実施した特別研究「エピジェネティクス作用を包括したトキシコゲノミクスによる環境化学物質の影響評価法開発のための研究」の研究成果を取りまとめたものです。

人類はこれまでに数千万種類以上の化学物質を発見または合成し、それらを利用して大きな恩恵を受けています。その一方で、環境中に放出されたり存在する化学物質、すなわち環境化学物質をヒトが非意図的にとりこむことによって、健康を損ねることが懸念されています。環境化学物質からの悪影響を減らし、予防する方法を考えるためには、それらの化学物質が健康にどのような影響をどのように及ぼすかという、影響とその機序に関する科学的知見をもつことが不可欠です。

環境化学物質の生体影響の機序として、多くの化学物質が「遺伝子発現」を変化させることによって生体に悪影響を及ぼすことが近年明らかにされてきました。そのような遺伝子発現の変化を効率よく網羅的に検出する技術がトキシコゲノミクスです。国立環境研究所では、平成16～18年度に特別研究「トキシコゲノミクスを利用した環境汚染物質の健康・生物影響評価法の開発に関する研究」を実施し、環境汚染物質の生体および生物影響評価におけるトキシコゲノミクスの有用性を示しました。以前のこの特別研究が行われた時点では、環境化学物質による遺伝子発現変化の機序はほとんどが分子遺伝学に基づく「ジェネティクス」によって考えられていました。しかし最近、遺伝子発現を制御する仕組みとして、ジェネティクスと並んで、「エピジェネティクス」の重要性が急速に注目されるようになりました。

エピジェネティクスは、本報告書にも述べられているように、環境からの生体影響の機序と密接に関連すると考えられます。さらに、胎児期の曝露の影響が成人後に現れるような後発影響や、経世代影響などの重要な課題の機序として注目されています。そこで本特別研究では、環境化学物質のエピジェネティック作用を実験動物において検索し、生体影響との関連や機序を明らかにするための研究を行いました。現在世界各国で地質由来の無機ヒ素による皮膚疾患や癌などが発生し、患者数は数千万人とも言われる大きな健康被害をもたらしていますが、その作用にエピジェネティクスの関与が示唆されています。本研究では主にこの無機ヒ素を対象化学物質としました。その結果、エピジェネティクス研究を行う上で重要な手法の開発や、種々の曝露形態（長期曝露、胎児期曝露等）における化学物質のエピジェネティック作用やその機序に関して多くの知見を得ることができました。この研究で得られた成果は、今後環境化学物質の生体影響を評価する上での科学的基盤として役立てられていくものです。

本研究の遂行にあたっては、研究所の多くのスタッフや所外の方々に多大なご協力・ご支援やご助言をいただきました。ここに深く感謝いたします。

平成23年9月

独立行政法人 国立環境研究所  
理事長 大垣 眞一郎

## 目 次

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | 研究の目的と経緯   | 1  |
| 1.1   | 研究の背景  | 1  |
| 1.2   | 研究の目的  | 2  |
| 1.3   | 研究の構成  | 2  |
| 2     | 研究の成果  |    |
| 2.1   | 環境化学物質によるグローバル DNA メチル化変化とその機序                           | 3  |
| 2.1.1 | 低メチル食および飲水中無機ヒ素長期曝露によるグローバル DNA メチル化変化                   | 3  |
| 2.1.2 | 無機ヒ素によるグローバル DNA メチル化変化とメチル基供与体、<br>DNA メチル基転移酵素遺伝子発現の変動 | 4  |
| 2.1.3 | メチオニン・コリン欠乏食および無機ヒ素による酸化的 DNA 損傷と<br>グローバル DNA メチル化変化の関連 | 6  |
| 2.2   | 飲水中無機ヒ素長期曝露による癌関連遺伝子の発現変化とエピジェネティック作用                    | 9  |
| 2.3   | 胎児期無機ヒ素曝露の影響とエピジェネティック作用                                 | 12 |
| 2.3.1 | 肝癌増加への影響とエストロゲン受容体 $\alpha$ (ER $\alpha$ ) 遺伝子の発現変動への影響  | 13 |
| 2.3.2 | 肝臓における後発的遺伝子発現変化とエピジェネティクスの関与                            | 13 |
| 2.3.3 | 代謝に及ぼす影響   | 16 |
| 2.3.4 | 脳における性ホルモン受容体の発現に対する影響                                   | 18 |
| 2.3.5 | 高次認知機能測定系の確立   | 21 |
| 2.3.6 | 無機ヒ素による肝癌に特異的な DNA メチル化変化領域の検索                           | 22 |
| 2.4   | ダイオキシン感受性の臓器特異性とエピジェネティック作用                              | 25 |
| [資料]  |  |    |
| I     | 研究の組織と研究課題の構成  | 31 |
| 1     | 研究の組織  | 31 |
| 2     | 研究課題と担当者   | 31 |
| II    | 研究成果発表一覧   | 32 |
| 1     | 誌上发表   | 32 |
| 2     | 口頭発表   | 34 |

# 1 研究の目的と経緯

## 1.1 研究の背景

1965年にChemical Abstracts Service (CAS)の化学物質データベースが稼働開始して以来、2009年には登録された化学物質の数が5000万種類を突破した。特に4000万番から5000万番目の化学物質が登録されるのに要した期間はわずかに9カ月であり、人類が発見または合成した化学物質は急速に増加している。日本のような先進国は、これらの化学物質を利用することによって多大な恩恵を受けている。一方で、医薬品や化粧品、食品などに利用され人に摂取される化学物質も増加を続け、安全性の確保が欠かせない課題となり、実際に副作用などに関する安全性評価が実施されている。

しかし新たな科学技術の開発や化学物質の利用の増大に伴って、未規制の化学物質や非意図的に生成された化学物質を含む多種多様な化学物質の環境中への放出が継続し、ヒトの健康に悪影響を及ぼすことが懸念されている。化学物質による健康への悪影響を減らす、または予防する方法を考える上では、各化学物質が健康にどのような影響をどのように及ぼすかという、影響とその機序に関する科学的知見が不可欠である。

近年、各種の化学物質が遺伝子発現を変化させることにより生体に悪影響を及ぼすことが明らかにされている。これらの知見に基づいて、遺伝子発現の網羅的解析法であるトキシコゲノミクスが悪影響の検出に有効であることが示されてきた。従来これらの研究は、遺伝子の機能はDNAの塩基配列に基づいて決定されるというジェネティクスの考え方を基盤として進められてきた。しかし最近、もう一つの遺伝子発現調節機構である「エピジェネティクス」の重要性が注目されている(図1)。エピ(epi)は「外」や「追加」といった意味を持つ接

頭語である。エピジェネティクスは塩基配列に依存しない遺伝子機能の調節機構で、具体的には主としてDNA塩基へのメチル化修飾、DNAが巻きついているヒストンタンパクへのメチル化、アセチル化修飾などの、いわゆる「エピジェネティック修飾」による遺伝子発現制御の仕組みである(図2)。

エピジェネティックな修飾は環境の影響を受けて変動しやすく、また後発的な影響や経世代影響とも関係することが報告され、環境化学物質の生体影響を考える上で極めて重要と考えられる。実際に、最近では多くの化学物質のエピジェネティック作用が報告されつつある。しかしながら、例えばゲノム全体のメチル化DNA量の測定法のように、高精度な方法が未確立の状態に測定された結果に基づいてエピジェネティック変化に関する仮説が提案されている例が見受けられる。また化学物質曝露によって検出されたエピジェネティック変化と生体影響との因果関係については未解明な場合がほとんどである。今後化学物質の生体影響の機序を理解し、悪影響を防ぐ方策を構築するためには、まず化学物質によって誘導されるエピジェネティックな変化を正確に測定し、それらがどの程度生体や生理機能に影響を及ぼすかについて検討を進めていくことが不可欠と考えられる。

また最近では、日本で環境省が開始した大規模疫学調査「子どもの健康と環境に関する全国調査」(エコチル調査)を含めて、子どもの健康と環境との関連に関する疫学研究の推進が世界的な動向となっている。このような疫学研究において活用可能なエピジェネティックマーカーの開発にも期待が寄せられており、生体機能とエピジェネティック変化の関連の解明が環境保健分野において必要とされている。

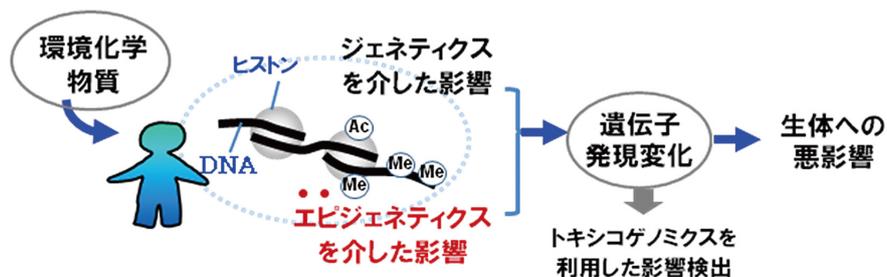
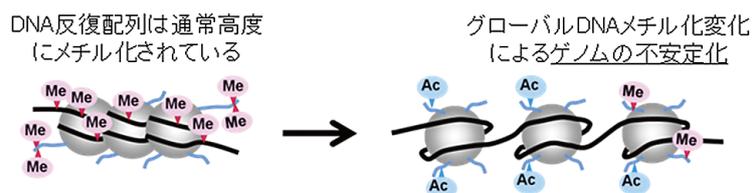


図1 環境化学物質の遺伝子機能への影響を介した作用機序  
近年、各種の環境化学物質が遺伝子発現を変化させることによって生体の機能に影響を及ぼすことが明らかにされている

グローバルDNAメチル化変化(主にDNA反復配列のメチル化変化)によるゲノム不安定化



特定の遺伝子(プロモーター)領域でのDNAメチル化変化、ヒストンメチル化・アセチル化変化による遺伝子発現制御

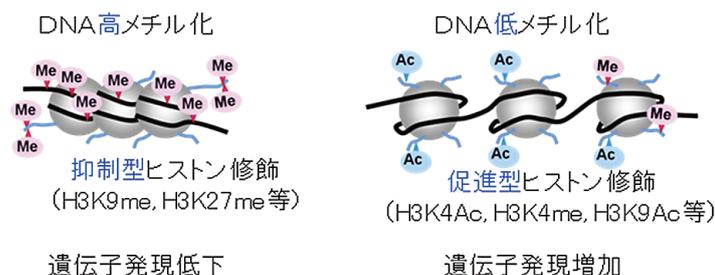


図2 エピジェネティクスの代表的な作用機序

## 1.2 研究の目的

近年、地質由来の無機ヒ素が混入した井戸水の利用による慢性無機ヒ素中毒が世界各国で発生し、患者数は数千万人にのぼるともいわれ、深刻な環境問題となっている。主な症状としては、色素沈着・脱失、角化症などの皮膚症状や、また皮膚癌をはじめとする癌の発症が報告されている。無機ヒ素は従来変異原性が低いと考えられていたが、最近無機ヒ素による発癌の機序にエピジェネティクスが関与することが示唆されている。また無機ヒ素汚染地域での疫学研究では、2型糖尿病との関連も報告されている。

本研究では、無機ヒ素を主たる対象物質として、実験動物において高感受性期や標的遺伝子、後発・経世代影響等に注目してそのエピジェネティック作用を検索し、生体影響との関連や機序を明らかにすることを目的とした。

## 1.3 研究の構成

本研究では、サブテーマ1. 環境化学物質のエピジェネティック作用における高感受性期、臓器特異性および後発影響、経世代影響、サブテーマ2. 環境化学物質の

エピジェネティック作用のメカニズム、の2つのサブテーマのもと研究を行った。サブテーマ1では、実験動物としてマウスを用いて、無機ヒ素の胎児期曝露、長期曝露、低メチル食との同時投与の3つの実験系で、高感受性期、臓器特異性、後発影響、経世代影響に関して検討を行った。また環境研で生体影響・機序に関して研究成果を蓄積してきたダイオキシンについてもエピジェネティック作用に関して検討を加えた。サブテーマ2では、エピジェネティック作用の中で特にグローバルDNAメチル化変化に着目し、高精度測定法の確立と、無機ヒ素によるグローバルDNAメチル化変化の機序に関して検討した。

本報告書では、これらの結果を以下の4つの項目にまとめ、次の章に記した。1. 環境化学物質によるグローバルDNAメチル化変化とその機序、2. 飲水中無機ヒ素長期曝露による癌関連遺伝子の発現変化とエピジェネティック作用、3. 胎児期無機ヒ素曝露の影響とエピジェネティック作用、4. ダイオキシンのエピジェネティック作用。

## 2 研究の成果

### 2.1 環境化学物質によるグローバル DNA メチル化変化とその機序

代表的なエピジェネティック修飾の一つが、DNA メチル化修飾である。哺乳類の DNA メチル化修飾のほとんどがシトシン-グアニン (CpG) 配列の C (シトシン) の 5 位がメチル化される 5 メチルシトシン (5 meC) 修飾である (図 3)。

ゲノム上には CpG 配列が集積した CpG アイランドと呼ばれる領域が点在する。この領域は一般的には低メチル化状態である。また、細胞・組織特異的に低~中密度に DNA メチル化を受けるゲノム領域が存在し、T-DMR (tissue-dependent and differentially methylated region) と呼ばれる。遺伝子のプロモーター領域における CpG アイランドや T-DMR が高メチル化状態になると転写の抑制がおこる。この領域特異的な DNA メチル化変化がエピジェネティックな遺伝子発現調節機構として良く知られている。

また哺乳類ゲノムにはトランスポゾンに由来する大量の散在型反復配列や、染色体動原体近傍にはサテライト配列が連続した反復配列が存在し、これらの反復配列は高度にメチル化されている。ゲノム全体の 5 meC 量の変化、すなわちグローバル DNA メチル化変化量は主にこれらの反復配列における 5 meC 量の変化を反映していると考えられる。そして特に動原体近傍領域の高メチル化状態は、染色体の安定性に寄与していることが報告されており、グローバル DNA 低メチル化は染色体の不安定化につながると考えられる。

本研究では、無機ヒ素によるグローバル DNA メチル

化変化とその機序に関して検討を行った。

#### 2.1.1 低メチル食および飲水中無機ヒ素長期曝露によるグローバル DNA メチル化変化

米国のグループの研究 (Okoji RS et al. *Carcinogenesis* 23, 777, 2002) において、C57BL/6 マウスを低メチル食または低メチル食 + 50 ppm 無機ヒ素を含む飲水で 5 カ月間飼育すると、メチル補充食群と比べて低メチル食群で DNA メチル化が約 25 %、低メチル食 + ヒ素群で約 60-95 % 低下することが報告されている。このことは、低メチル食および無機ヒ素投与が肝臓のゲノム不安定化を招く可能性を示しており、これが無機ヒ素の発癌増加作用と関連する可能性も考えられる。なお、ここで使われた低メチル食は、DNA メチル化の際のメチル基供与体である S-adenosylmethionine (SAM) の合成やメチル基代謝に必要な、メチオニン、葉酸、コリンの 3 種類の成分を除いた合成飼料である。人間生活の中では栄養状態の悪い地域での低たんぱく食などで低メチル状態がおこる可能性がある。

一方、上述の Okoji らによる先行研究では、DNA メチル化量の測定は、メチル化酵素存在下でのメチル基の取り込み量として測定された。この方法では、ゲノム中のメチル化 DNA の絶対量は求められず、メチル基取り込み量の変化が実際のゲノム中 5 メチルシトシンのどの程度の変化を表しているかが明らかでなかった。

そこで本研究では、まずゲノム中の 5 メチルシトシン量を精密に分析する方法の検討を行った。DNA をヌクレオシドに水解し、deoxycytidine (dC) と

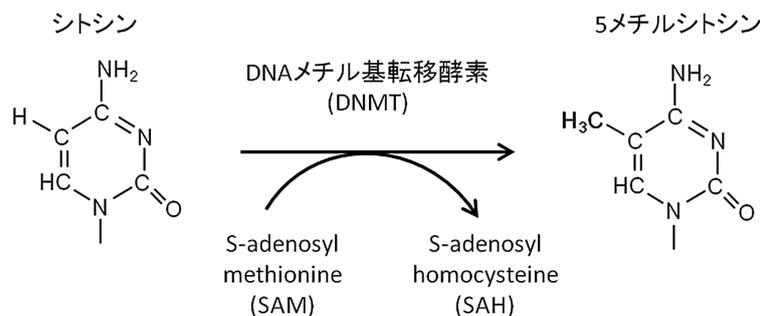


図 3 DNA メチル化修飾

DNA 中シトシン-グアニン (CpG) と続く配列のシトシン塩基は、DNA メチル基転移酵素の作用によって、各種生体分子に対してメチル基供与体として働く S-adenosyl methionine (SAM) よりメチル基が供与され、5 位がメチル化される。

5-methyldeoxycytidine (5 medC) の比を液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化マスマスペクトロメトリー (LC/ESI-MS) によって測定する条件を確立した。さらにイオン化効率補正用に 5 medC の安定同位体標識化合物を合成し、市販の dC の安定同位体標識化合物とともに用いることによって、5 メチルシトシンの絶対量を精密に測定することが可能となった (図 4)。

雌雄 C57BL/6 マウスを表 1 に示す組成のメチル補充食、低メチル食または低メチル食 + 50 ppm 無機ヒ素を含む飲水で 5 カ月間飼育し、上記の方法を用いて肝臓の 5 メチルシトシン量の測定を行った。その結果、全シトシン中の 5 メチルシトシン量の割合は図 5 A に示す通りで、雌雄あわせて 4.8 % - 5.3 % の間で変動するのみで、従来報告されているような大きな変動はないことが明らかとなった。さらに雄では 5 メチルシトシン量はメチル補充食 > 低メチル食 > 低メチル食 + ヒ素投与の順に低下傾向を示し、雌では反対にメチル補充食 < 低メチル食 < 低メチル食 + ヒ素投与の順に増加することが明らかとなり、ヒ素や低メチル食による DNA メチル化変化に性差があることが明らかとなった。

### 2.1.2 無機ヒ素によるグローバル DNA メチル化変化とメチル基供与体、DNA メチル基転移酵素遺伝子発現の変動

無機ヒ素は生体内でメチル化されるが、その際に DNA メチル化におけるメチル基供与体でもある Sadenosylmethionine (SAM) からメチル基を供与される。

このことから、無機ヒ素による SAM の消費がグローバルな DNA メチル化低下につながるという仮説が提案されている。そこでこの仮説を検証するために、上述のメチル補充食、低メチル食、低メチル食 + 無機ヒ素を投与したマウスの肝臓について、さらに SAM を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって測定した。その結果、図 5 B に示すように SAM 量の変動は DNA メチル化レベルと相関せず、上記の仮説は必ずしも成り立たないことから、未解明の機序があることが示唆された。さらに、メチル欠乏食や無機ヒ素による SAM 量の変動にも顕著な性差があることが明らかとなった。

また低メチル食および無機ヒ素投与でメチル化 DNA

表 1 メチル補充食および低メチル食の組成

|           | メチル補充食 (%) | 低メチル食 (%) |
|-----------|------------|-----------|
| カゼイン      | 12.00      | 12.00     |
| コーンスターチ   | 47.32      | 48.12     |
| グラニュー糖    | 15.00      | 15.00     |
| 精製大豆油     | 15.00      | 15.00     |
| 結晶セルロース   | 5.00       | 5.00      |
| L-シスチン    | 0.20       | 0.20      |
| L-トレオニン   | 0.15       | 0.15      |
| L-トリプトファン | 0.03       | 0.03      |
| L-メチオニン   | 0.40       | 0         |
| ビタミンミックス  |            |           |
| 葉酸含有      | 1.00       | 0         |
| 葉酸非含有     | 0          | 1.00      |
| ミネラルミックス  | 3.50       | 3.50      |
| 重酒石酸コリン   | 0.40       | 0         |
|           | 428        | 428 kcal  |

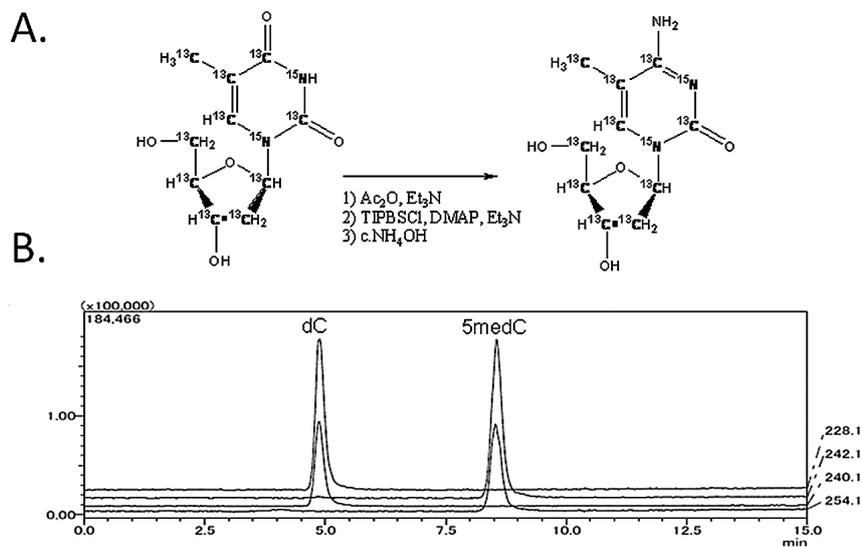


図 4 グローバル DNA メチル化量の精密測定法の確立  
A. 安定同位体標識チミンからの 5 medC の合成。 B. dC および 5 medC の LC-MS チャート

(5メチルシトシン)量に変動がみられたことから、DNAメチル基転移酵素(DNMT)の発現量の変化を検討した。哺乳類ではDNAメチル化を担当するDNMTが3種類あり、新規のメチル化はDNMT3aとDNMT3bによって行われる。メチル化パターンの維持、すなわちメチル化されたDNA鎖のメチル化パターンをもとに、対をなすDNA鎖へメチル基を導入するのはDNMT1によって行われる。

図6に示す通り、オスの肝臓ではDNMT1遺伝子(DNMT1)の発現が低メチル食、低メチル食+無機ヒ素の順に低下し、5メチルシトシン量の変化(図5)と対応した。すなわち、低メチル食や無機ヒ素投与によってオスの肝臓でDNAメチル化が低下する原因として、DNMT1の発現阻害がある可能性が示唆された。メスでは低メチル食、低メチル食+無機ヒ素投与によるDNMT1の発現阻害は認められず、DNAメチル化低下がおこらないことと対応した。

また本研究によって、DNMT遺伝子の発現に午前が高く、午後に低い日内周期があることが明らかとなった(図6)。特にメスではDNMT3b発現の日内周期が顕著であり、DNMT1でも日内周期が見つかった。また、オ

スでもDNMT3bに日内周期が見られた。DNMT発現の日内周期に関してはこれまで報告がなく、本研究で得られた新規な知見である。

以上の検討の結果、低メチル食や無機ヒ素投与によるDNAメチル化変化やDNMT遺伝子の発現変化に性差が見つかった。無機ヒ素による発癌やその他の生体影響に性差があることが報告されているが、これらの性差にDNAメチル化感受性の性差が関与する可能性が考えられた。またエピジェネティック変化を誘導する主要な酵素であるDNMTの遺伝子発現に日内周期があることがみいだされたことも重要である。今後はDNMT遺伝子が時計遺伝子のいずれかと共通の因子によって制御されている可能性や、食事等の外的要因との関連についての検討を行うことによって、DNMT遺伝子発現の制御メカニズムの一端や、環境因子の作用機序が明らかとなること、さらには環境因子のエピジェネティック変化を介した生体影響とその機序の解明の糸口となることが期待される。

#### A. 肝臓ゲノムDNA全シトシン中の5メチルシトシン含量(%)

|    | メチル補充食             | 低メチル食                | 低メチル食+ヒ素群                          |
|----|--------------------|----------------------|------------------------------------|
| オス | 5.26±0.13<br>(100) | 5.07±0.16<br>(96.4)  | 5.01±0.23<br>(95.2)                |
| メス | 4.89±0.09<br>(100) | 4.91±0.13<br>(100.4) | 5.20±0.10 <sup>a*</sup><br>(106.3) |

#### B. 肝臓のSAM含量

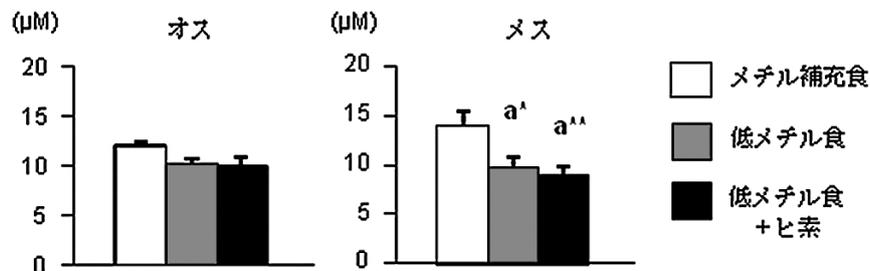


図5 低メチル食または低メチル食+無機ヒ素のグローバルDNAメチル化(A)および肝臓SAM量(B)への影響。C57 BL/6マウスに合成メチル補充食、低メチル食、または低メチル食+50ppm無機ヒ素を含む水を5カ月間投与し、肝臓について検討した。(A)カッコ内の数字は、メチル補充食群を100とした時の比率。(B)SAM量は20%肝臓ホモジネート上清中の濃度で示した。a,メチル補充食群に対して有意差あり(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )。

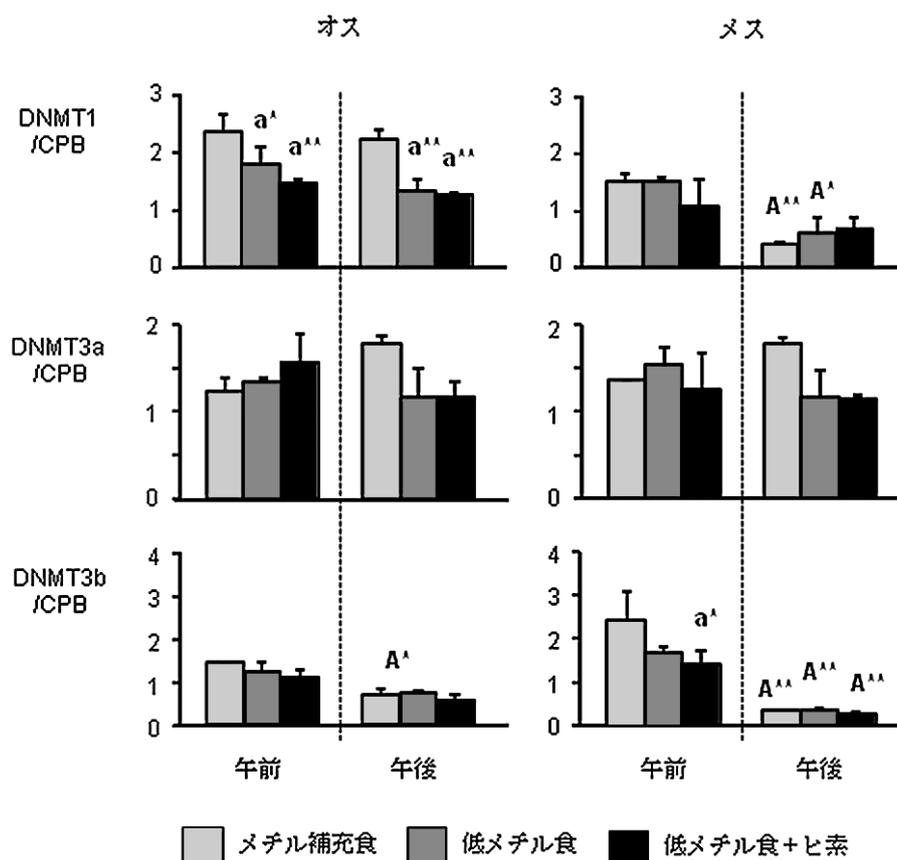


図6 肝臓における DNA メチル基転移酵素 DNMT1, DNMT3a, DNMT3b の遺伝子発現量変化。各遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で測定し、CPB 遺伝子の発現量に対する比で表した。a, メチル補充食群に対して、A, 午前に対して、有意差あり (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )。

### 2.1.3 メチオニン・コリン欠乏食および無機ヒ素による酸化 DNA 損傷とグローバル DNA メチル化変化の関連

活性酸素によって生ずる酸化 DNA 損傷は 100 種類以上が知られており、これまで遺伝子変異に対する影響を中心に研究が進められてきた。最も研究が行われている酸化 DNA 損傷の一つが 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OHdG) (図 7) であるが、近年、遺伝子変異だけでなく、遺伝子の発現制御において重要な役割を担う DNA のメチル化に対しても影響し得ることが *in vitro* における DNA のメチル化試験において報告されている。こうした中、8OHdG と DNA メチル化の詳細な解析が求められている。

そこで本研究では、DNA のメチル化変化を誘発すると考えられる、メチオニンとコリンを完全に欠乏させたメチオニン・コリン欠乏食 (MCD 食) と無機ヒ素を 3 週間投与したマウスの肝臓 DNA 中の 8OHdG と 5medC を厳密に測定することにより、酸化 DNA 損傷とグローバル DNA メチル化変化の関連性を明らかにす

ることを目的とした。

#### (1) 8OHdG の測定

これまで 8OHdG に関する研究は数多くなされており、その解析方法も様々である。本研究では、定量性が高く、安定した測定値を算出する方法として広く利用されている高速液体クロマトグラフィーと電気化学検出器を使用した HPLC-ECD 法を採用した。

また、8OHdG の測定では、サンプル抽出時の DNA の酸化に対して注意が必要であり、DNA 抽出時に一般的に使用されるフェノールを使用した場合、抽出時の 8OHdG の増加が指摘されている。そこで、本研究では DNA の酸化を防ぐために改良された DNA エキストラクター TIS Kit (Wako) を用いた抽出方法を採用し DNA の抽出を行った。

解析の結果、コントロール食投与群の雄肝臓 DNA で  $10^6$  個の正常な deoxyguanosine (dG) に対し  $1.06 \pm 0.16$  個の 8OHdG が検出され、雌雄共に MCD 食、MCD 食 + ヒ素投与群で 8OHdG が増加することが明

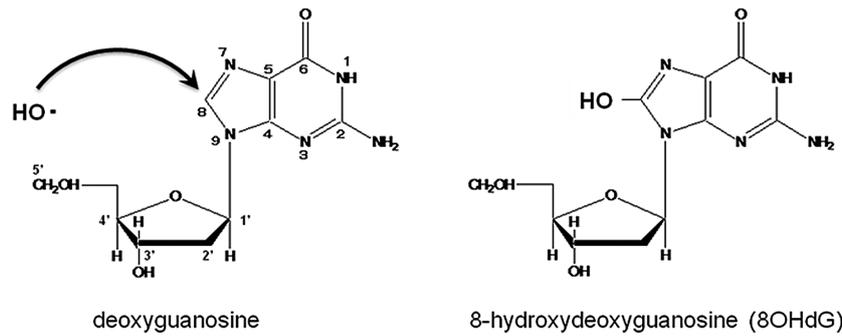


図7 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine の構造式  
Deoxyguanosine の8位の炭素がヒドロキシラジカル（活性酸素種）により酸化されることにより8 OHdGが生じる。

らかになった（図8a）。現在、正常なヒトDNA中の8OHdGは $10^6$ 個のdGに対し1個程度とされており、今回採用した測定方法により厳密な測定ができたことが確認された。

8 OHdGの蓄積が検出されたことから、酸化ストレス等のストレス因子に対して感受性の高いヘムオキシゲナーゼ1 (HO-1) 遺伝子の発現解析をリアルタイムPCRにより行った。その結果、8 OHdGと同様に雌雄共にMCD食、MCD食+ヒ素投与群で増加することが明らかになった（図8b）。なお、ヒ素投与によりHO-1の発現が増加する報告があるが、今回の投与条件では確認されなかった。

以上のことから、マウス肝臓DNAにおいてMCD食、MCD食+ヒ素投与により生成した酸化ストレスが8 OHdGの生成を誘発することが示唆された。

### (2) 8OHdG 関連修復酵素の遺伝子発現解析

MCD食、MCD食+ヒ素投与マウス肝臓DNA中において8OHdGの蓄積が検出されたことから、活性酸素によって誘発された8 OHdGの塩基除去修復機構（図9）に着目し、修復酵素の遺伝子発現解析をリアルタイムPCRにより行った（図10）。

DNAの合成に必要なヌクレオチドもDNAと同じように活性酸素により酸化され8-OHdGTPを生成する。MCD食、MCD食+ヒ素投与群では、8-OHdGTPを分解するMth1の発現抑制が検出された。一方、DNA中にできた8OHdGを直接除去する活性を持つOgg1や8OHdGと誤対合したアデニンを除去するMutyhの発現誘導は検出されなかった。MCD食、MCD食+ヒ素投与群で8OHdGの蓄積が検出されたことから、Mth1遺伝子の発現抑制が8OHdG蓄積の一因であることが示唆

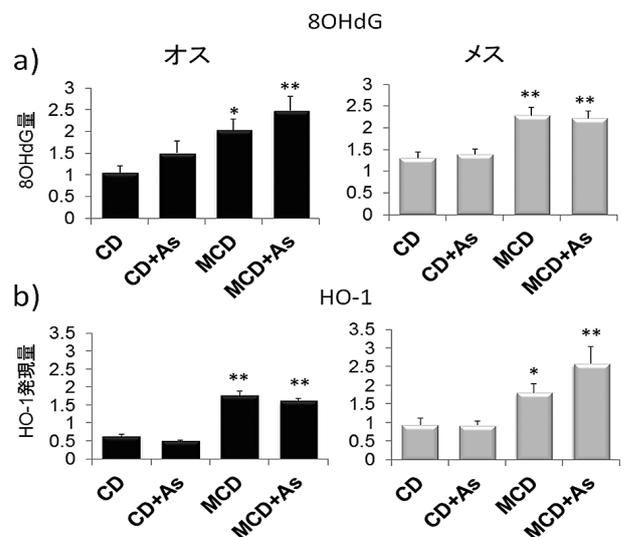


図8 酸化ストレスの影響  
a) マウス肝臓からDNAを抽出し、HPLC-ECD法により8OHdGを測定した。b) マウス肝臓からRNAを抽出し、HO-1と内部標準遺伝子であるcyclophilin B (CPB)の遺伝子発現量をリアルタイムPCRで測定し、CPBで補正した値を発現量として示した。CD: コントロール食  
MCD: メチオニン・コリン欠乏食  
As: ヒ素投与

された。

### (3) DNAメチル化解析

DNAメチル化量の測定に関しても8OHdG同様多数の解析法があるが、制限酵素やDNAメチル基転移酵素を用いた標識メチル基の取り込み等による間接的な方法が一般的に広く使用されている。しかし、これらの酵素が酸化的DNA損傷である8OHdGの影響を受けることが報告されており、5medC量の測定値に影響を与えている可能性が懸念される。そこで本研究では、酵素を使用した間接的な5medCの測定法ではなく、最近我々が



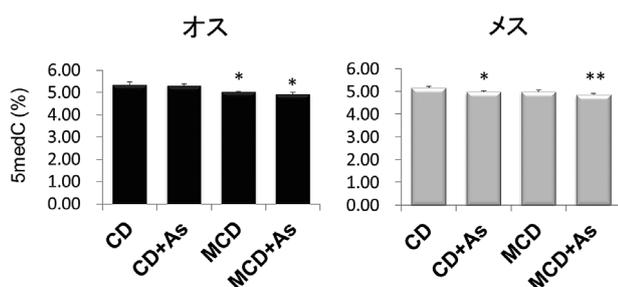


図 11 マウス肝臓 DNA における 5medC 量

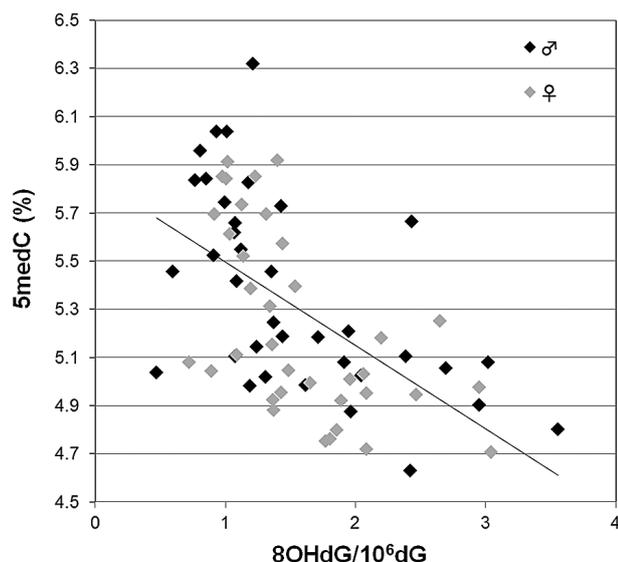


図 12 8OHdG と 5medC の相関図

明らかになった。

#### (5) DNA メチル基転移酵素遺伝子の発現解析

雄の MCD 食、MCD 食 + ヒ素投与群や雌のヒ素、MCD 食 + ヒ素投与群で有意な 5medC 量の減少が検出されたことから、DNA メチル基転移酵素 (DNMTs) の遺伝子発現解析をリアルタイム PCR で行った。その結果、雌雄共に MCD 食、MCD 食 + ヒ素投与群で Dnmt3a の発現が増加傾向にあることが明らかになった (図 13 a)。更に、Dnmt3a に特異的な抗体を用いたウエスタンブロットを行ったところ、MCD 食、MCD 食 + ヒ素投与群でタンパクレベルでの発現増加も確認された (図 13 b)。

一方、雌雄共に MCD 食、MCD 食 + ヒ素投与群で Dnmt3b の有意な発現抑制が確認されたが (図 13 a)、Dnmt3b に特異的な抗体を用いたウエスタンブロットではタンパクの発現量が低いため発現変動は検出されなかった。Dnmt1 の発現は群間で顕著な変動は見られなかった。

MCD 食、MCD 食 + ヒ素投与群では DNA のメチル化に関与する Dnmt3a の発現増加が検出されたにも関わらず、DNA の低メチル化が誘発されており、その一因として 8OHdG 等の酸化的 DNA 損傷の蓄積による Dnmt3a の活性阻害が示唆された。さらにこの Dnmt3a の活性阻害がグローバルな DNA 低メチル化の原因となることが示唆された。

今後、酸化的 DNA 損傷を誘発することが明らかにされている化学物質等を用い、酸化的 DNA 損傷が誘発される条件で DNA の低メチル化が誘発されるか、また、DNMTs の遺伝子発現が変動するか否か解析を行い、グローバル DNA メチル化変化における酸化的 DNA 損傷の関与を明らかにしていきたい。

なお図 8、10、11、13 は未発表データで、投稿準備中である。

#### 2.2 飲水中無機ヒ素長期曝露による癌関連遺伝子の発現変化とエピジェネティック作用

天然由来の無機ヒ素が世界中で人々の健康を脅かしている。とくに、中国、インド、バングラディッシュでは、長期の無機ヒ素曝露により皮膚癌をはじめ、肺癌、膀胱癌、肝臓癌の発症リスクが増加することが疫学的に明らかになっている。ヒ素は発癌物質として知られているが、変異源性は比較的弱いため、ヒ素が誘導した発癌メカニズムはいまだ不明な点が多い。最近になり、ヒ素によるエピジェネティック作用を介した癌関連遺伝子の発現変化が、ヒ素による発癌に関連があることが報告された。たとえば、AJ マウスの雄に 18 ヶ月間ヒ素を飲水曝露すると肺癌の発症が増加し、正常肺と比較して肺癌組織において癌抑制遺伝子である p16<sup>INK4a</sup> と RASSF1A の発現が減少することが報告された。このとき、プロモーター領域の DNA メチル化レベルの増加が観測されたことから、ヒ素が誘導した DNA メチル化が p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子と RASSF1A 遺伝子の原因であると考えられている。しかしながら、この研究では癌組織で DNA メチル化状態を調べているため、ヒ素が直接 DNA メチル化を誘導したのか、あるいは、ヒ素で発症した癌の結果として DNA メチル化が変化したのかについては、明らかにされていない。

DNA メチル化に加えて、ヒストンのアセチル化、メチル化といったヒストン修飾も遺伝子発現を調節するエピジェネティック作用の重要な因子である。遺伝子発現のエピジェネティックな抑制は、主にヒストン H3 リ

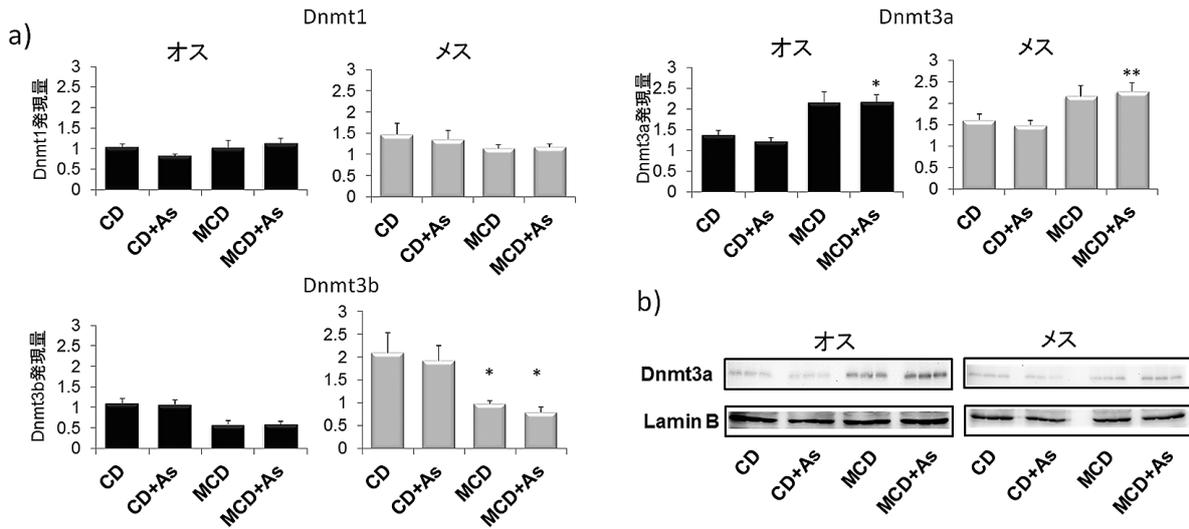


図13 DNMTsの発現量

a) 各投与群のマウス肝臓からRNAを抽出し、DNMTsとCPBをリアルタイムPCRで測定し、CPBで補正した値を発現量として示した。b) 各投与群のマウス肝臓からタンパク抽出し、Dnmt3a特異的な抗体によりタンパク質の発現量を解析した。

シン 27 (H3K27) のトリメチル化、ヒストン H3 リシン 9 (H3K9) のジメチル化及びトリメチル化により調節されることが知られている。H3K9 ジメチル化は、主にヒストンメチル化酵素 G9a により、また、H3K9 トリメチル化は、ヒストンメチル化酵素 SUV39 H1 により触媒されることが明らかになっている。

ヒ素曝露による部位特異的なヒストン修飾変化に関する研究は、細胞株で報告されている。ヒト膀胱癌細胞株 UROtsa を長期間ヒ素曝露すると、悪性形質転換を起こし、癌遺伝子 WNT5A の活性化を誘導し、WNT5A 遺伝子のプロモーター領域では、活性化型ヒストン修飾の増加と、抑制型ヒストン修飾の減少が観測されている。しかしながら、部位特異的なヒストン修飾に関しても、WNT5A 遺伝子プロモーターのヒストン修飾が、悪性形質転換の結果なのか、ヒ素による悪性形質転換の直接的な原因なのか明らかにされていない。

$\beta$ -catenin タンパク質と TCF4(TCF7L2) タンパク質は、Wnt シグナル経路において重要な役割をもつ転写因子である。最近になり、 $\beta$ -catenin タンパク質と TCF4 タンパク質のターゲット遺伝子として、p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子が報告された。 $\beta$ -catenin 遺伝子は、ヒ素を飲水曝露したラット肝臓において発現が低下することが報告されている。しかしながら、ヒ素飲水曝露したマウスにおいては、 $\beta$ -catenin 遺伝子と TCF4 遺伝子の発現及び、p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子との関連は不明であった。

本研究では、6ヶ月間 50 ppm の無機ヒ素を飲水曝露

した C57BL/6 マウス雌雄の肝臓と肺で、p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子と RASSF1A 遺伝子の発現と、関連する転写因子の発現およびエピジェネティック変化を調べた。また、妊娠期に 85 ppm の無機ヒ素を飲水曝露した C3H マウスから産まれたマウスでは、74 週令で肝臓における ER $\alpha$  遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化レベルの低下、及び発現増加が報告されている。したがって、ER $\alpha$  遺伝子もヒ素の影響を受ける遺伝子であるため、ER $\alpha$  遺伝子の発現についても検討した。C57BL/6 マウスは癌に対する感受性が低いため、ヒ素の直接のエピジェネティック作用の影響を調べるために、適した系統であると考えられる。実際に、6ヶ月無機ヒ素飲水曝露後の C57BL/6 マウス雌雄の肝臓と肺には、目に見える腫瘍は観測されなかった。

#### (1) ヒ素曝露による癌関連遺伝子の発現変化

まず、ヒ素によりエピジェネティック作用を介して発現が変化すると報告されている p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子、RASSF1A 遺伝子、ER $\alpha$  遺伝子の発現を RT-PCR で調べた。その結果、ヒ素曝露により雄の肝臓で p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子の発現が低下することが明らかになった。雄の肺、雌の肝臓と肺では、ヒ素曝露により p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子の発現は変化しなかった。リアルタイム PCR においても p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子の発現が雄の肝臓でのみ有意に減少することが確認できた (図 14)。一方で、RASSF1A 遺伝子と ER $\alpha$  遺伝子の発現は、マウス雌雄の肝臓と肺でヒ素

曝露により変化しなかった。マウス肝臓における前癌状態マーカーと報告がある *cytokeratin 8* 遺伝子の発現は、C57BL/6 マウス雄の肝臓においてヒ素曝露で変化しなかった。これらの結果から、ヒ素曝露による C57BL/6 マウスにおける  $p16^{INK4a}$  遺伝子の発現変化には性差が存在し、C57BL/6 マウス雄の肝臓においては、発癌していなくとも、ヒ素曝露により癌抑制遺伝子  $p16^{INK4a}$  の発現が有意に低下することが明らかになった。

(2)  $\beta$ -catenin 及び TCF4 は、ヒ素曝露による  $p16^{INK4a}$  遺伝子の発現低下に関連する

最近になり、 $p16^{INK4a}$  遺伝子は、Wnt シグナル経路の重要な転写因子である  $\beta$ -catenin タンパク質及び TCF4 タンパク質のターゲット遺伝子であることが報告された。そこで、6ヶ月ヒ素曝露した C57 マウス雌雄の肝

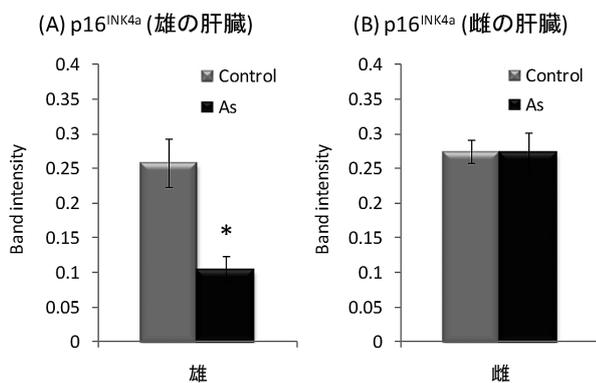


図 14 ヒ素曝露による  $p16^{INK4a}$  遺伝子の発現変化  
50 ppm の無機ヒ素を 6ヶ月間飲水投与した C57BL/6 マウス雌雄の肝臓から Total RNA を抽出し、逆転写後、RT-PCR で  $p16^{INK4a}$  遺伝子の発現を測定した。 $p16^{INK4a}$  遺伝子の発現量はハウスキーピング遺伝子量 (雄:  $\beta$ -actin、雌: CPB) で補正した。グラフは、バンド強度で示している。

臓と肺で、 $\beta$ -catenin 遺伝子及び TCF4 遺伝子の発現をリアルタイム PCR で調べた。その結果、 $\beta$ -catenin 遺伝子の発現はヒ素曝露により、雄の肝臓、雌の肝臓、雌の肺で有意に低下し、TCF4 遺伝子の発現は、ヒ素曝露で雄の肝臓でのみ有意に低下した。これらの結果から、 $\beta$ -catenin 遺伝子及び TCF4 遺伝子が、ヒ素曝露によるマウス雄の肝臓における  $p16^{INK4a}$  遺伝子の発現低下に関連していることが示唆された。

(3) ヒ素曝露により  $p16^{INK4a}$  遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化状態は変化しない

$p16^{INK4a}$  遺伝子は、プロモーター領域の DNA メチル化により発現が調節されることが知られている。そこで、C57BL/6 マウス雄の肝臓における  $p16^{INK4a}$  遺伝子の発現低下に DNA メチル化が関与しているかどうかを調べた。ヒ素曝露した AJ マウスの肺癌組織において DNA メチル化が変化した領域に着目し、バイサルファイトシークエンシングをおこなった。その結果、 $p16^{INK4a}$  遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化はヒ素曝露で変化しなかった (図 15)。したがって、6ヶ月ヒ素曝露した C57BL/6 マウス雄の肝臓においては、 $p16^{INK4a}$  遺伝子の発現低下に DNA メチル化は関与しないことが明らかになった。

(4) ヒ素曝露により  $p16^{INK4a}$  遺伝子プロモーター領域の H3K9 ジメチル化レベルは増加する

DNA メチル化と同様に、ヒストン修飾も遺伝子発現を調節することが知られている。そこで、ヒ素曝露した C57BL/6 マウス雄の肝臓において、 $p16^{INK4a}$  遺伝子プロモーター領域における抑制型ヒストン修飾である H3K9

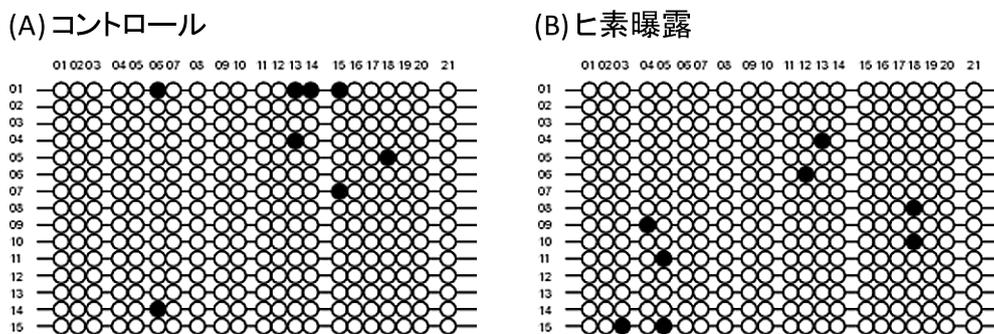


図 15 ヒ素曝露による  $p16^{INK4a}$  遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化解析  
50 ppm の無機ヒ素を 6ヶ月間飲水投与した C57 BL/6 マウス雄の肝臓からゲノム DNA を抽出し、バイサルファイトシークエンシングをおこなった。代表的な結果を、メチル化シトシンを●、シトシンを○で表す。

ジメチル化、H3K9 トリメチル化、H3K27 トリメチル化のレベルを、クロマチン免疫沈降法で調べた。その結果、H3K9 ジメチル化レベルが無機ヒ素により有意に増加した (図 16 A)。一方で、H3K9 トリメチル化レベル (図 16 B) 及び H3K27 トリメチル化レベルは無機ヒ素で変化しなかった。これらの結果から、ヒ素曝露による H3K9 ジメチル化レベルの増加が p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子の発現低下に関与することが考えられた。

#### (5) ヒ素曝露による p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子プロモーター領域への G9a のリクルート

次に、ヒ素曝露による p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子プロモーター領域へのヒストンメチル化酵素のリクルートについて検討した。G9a タンパク質は、主に H3K9 ジメチル化に関連するヒストンメチル化酵素である。クロマチン免疫沈降の結果、p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子プロモーター領域への G9a タンパク質のリクルートがヒ素曝露により有意に増加した (図 17 A)。ヒストン H3K9 トリメチル化に関する SUV39H1 タンパク質の p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子プロモーター領域へのリクルートはヒ素曝露で変化しなかった (図 17 B)。これらの結果は、ヒ素曝露による p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子プロモーター領域のヒストン修飾変化とよく対応した (図 16)。したがって、C57BL/6 マウス雄の肝臓においては、ヒ素曝露により G9a タンパク質が p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子プロモーター領域にリクルートされ、その結果、p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子

プロモーター領域のヒストン H3 K9 ジメチル化のレベルが増加した可能性が示唆された。

以上の結果から、ヒ素による p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子の発現変化には性差があり、オスの肝臓においては、 $\beta$ -catenin タンパク質と TCF4 タンパク質の作用と、p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子プロモーター領域への G9a タンパク質のリクルートによる H3K9 ジメチル化レベルの増加が、p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子の発現低下に関与していることが示唆された (図 18)。また、これらの現象は、癌が発症していない組織で観測されているため、ヒ素が、直接的あるいは間接的にエピジェネティック作用を変化させ、癌関連遺伝子の発現を調節している可能性が示唆された。

なお、図 14～18 は未発表データで、投稿準備中である。

### 2.3 胎児期無機ヒ素曝露の影響とエピジェネティック作用

近年疫学研究において、胎生期から乳幼児期の栄養環境が、後年、成人期や老年期の生活習慣病発症リスクに影響を及ぼすという「DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) 仮説」が注目されている。発生・発達段階は可塑性が高い時期であるが、化学物質に対する感受性も高いことが知られており、この時期の化学物質曝露が生後すぐに現れる影響の他、DOHaD 仮説で指摘するような後発的な影響をもたらす可能性が考えられ

(A) H3K9ジメチル化レベル (B) H3K9トリメチル化レベル

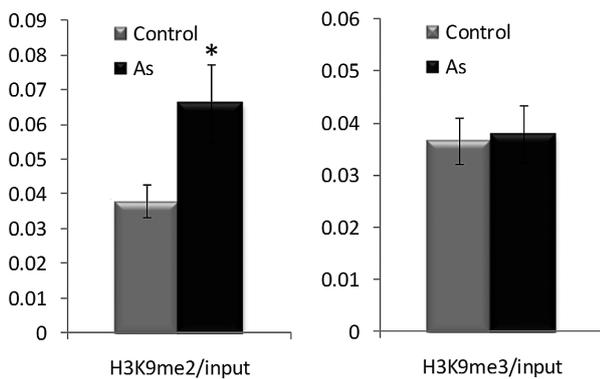


図 16 ヒ素曝露による p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子プロモーター領域のヒストンメチル化変化  
50 ppm の無機ヒ素を 6 ヶ月間飲水投与した C57BL/6 マウス雄の肝臓を採取し、ジメチル化 H3 K9 及びトリメチル化 H3K9 の抗体を用いて、クロマチン免疫沈降をおこなった。クロマチン免疫沈降のサンプルをリアルタイム PCR で評価した。

(A) G9aのリクルート (B) SUV39H1のリクルート

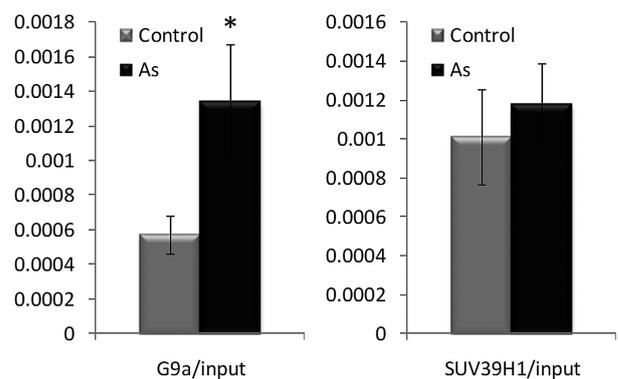


図 17 ヒ素曝露による p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子プロモーター領域へのヒストンメチル化酵素のリクルート  
50 ppm の無機ヒ素を 6 ヶ月間飲水投与した C57BL/6 マウス雄の肝臓を採取し、G9a タンパク質及び SUV39H1 タンパク質の抗体を用いて、クロマチン免疫沈降をおこなった。クロマチン免疫沈降のサンプルをリアルタイム PCR で評価した。

る。このように後発的に影響があらわれる機序として、エピジェネティクスの関与が示唆されている。

これまでに米国のグループが、自然発癌がみられる系統である C3H マウスにおいて、母親の妊娠 8 日から 18 日の間のみ無機ヒ素を含む水を飲ませると、生まれた雄の仔が 1 年 5 カ月令において肝癌を高率に発症することを報告している (Waalkes MP et al., J Natl Cancer Inst 96: 466-474, 2004)。さらに胎児期ヒ素曝露を受けて肝癌を発症した雄の肝臓の正常部分で、細胞増殖に関与するエストロゲン受容体  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) mRNA の増加と、ER $\alpha$  遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化低下が観察されることを報告している。これらの結果は、胎児期ヒ素曝露がいずれかの時期に ER $\alpha$  プロモーター領域の DNA メチル化を低下させ、その結果 ER $\alpha$  遺伝子を高発現させ、それが癌の増加につながった可能性を示唆する重要な報告である。

そこで本研究では、この実験系において癌の増加に関する追試を行うとともに、さらに肝臓における後発的な遺伝子発現変化やエピジェネティック変化に関して研究を行った。さらに胎児期ヒ素曝露の脳での ER $\alpha$  の発現に対する影響や、代謝系への影響について検討を行った。

### 2.3.1 肝癌増加への影響とエストロゲン受容体 $\alpha$ (ER $\alpha$ ) 遺伝子の発現変動への影響

Waalkes らの実験にならって、妊娠した C3H マウスに妊娠 8 日から 18 日の間のみ 85 ppm 亜ヒ素を含む水を投与し、その後生まれた仔 (F1) を通常通り飼育した。

74 週令雌雄 F1 の肝臓の腫瘍 (腺腫・癌) の有無について病理組織観察を行った。その結果、対照群 (ヒ素非

曝露群) とヒ素曝露群の雄にのみ腫瘍をもつ個体が見つかり、腫瘍の種類としては腺腫が多かった。腫瘍をもつ個体の割合はヒ素曝露群の方が多く、また同数のマウス (各群 12 匹) の肝臓で見つかった腫瘍の数の合計もヒ素曝露群の方が多く、胎児期ヒ素曝露群の雄の肝臓で腫瘍が増えるという Waalkes らの先行研究の結果と一致した。

一方、先行研究で報告されたヒ素曝露による ER $\alpha$  遺伝子の発現上昇に関しては、対照群とヒ素曝露群マウスのそれぞれ正常肝、腫瘍肝正常部分および腫瘍部分の ER $\alpha$  遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で測定したが、ヒ素曝露群での発現上昇は認められなかった (図 19)。また Waalkes らが報告した ER $\alpha$  プロモーター領域の DNA メチル化に関して bisulfite シークエンス法で検討を行った結果、ヒ素曝露群での DNA メチル化の顕著な低下も認められなかった (図 20)。

以上の結果は、胎児期ヒ素曝露による腫瘍の増加に ER $\alpha$  遺伝子の DNA メチル化変化と発現変化は必須でないことを示すと考えられた。

なお図 19、20 は未発表データで、投稿準備中である。

### 2.3.2 肝臓における後発的な遺伝子発現変化とエピジェネティクスの関与

2.3.1 において、胎児期無機ヒ素曝露によって 74 週令の雄の仔の肝臓で腫瘍が増加することが確認されたことから、その原因を探るために、ヒ素曝露群によって誘導される遺伝子発現変化やエピジェネティック修飾の関与について検討した。

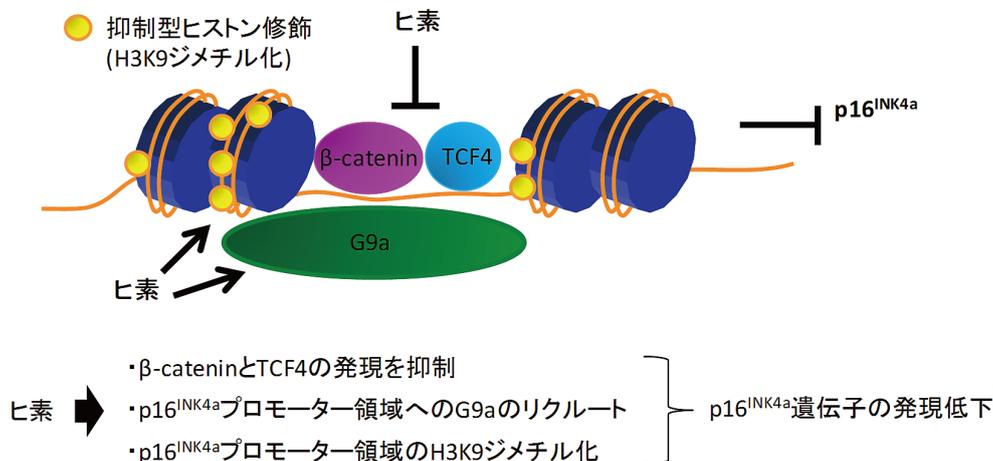


図 18 ヒ素曝露による p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子発現調節の模式図

(1) 74 週令雄マウス肝臓で発現変動する遺伝子の検索

癌の増加に関与する遺伝子発現変化を検索する目的で、74 週令の癌を発症していない雄マウスの肝臓組織について、Affymetrix 社のマイクロアレイ GeneChip (Mouse Genome 430 2.0 アレイ) を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。各群 3 匹からの肝臓の RNA を合わせて 1 サンプルとして、対照群とヒ素曝露群の遺伝子発現の比較を行った。独立の 2 回の実験で、対照群に対してヒ素曝露群で発現が繰り返し 2 倍以上増加、または

1/2 以下に減少した遺伝子を発現が変動した遺伝子として選択した。この結果、発現が増加した遺伝子が 10 種類、減少した遺伝子が 9 種類と、比較的少数の遺伝子の変化が検出された。この中から、発現量がごく少ない遺伝子 (シグナル強度 200 未満) を除いた 11 種類の遺伝子発現量を、各群 8 サンプルに関してリアルタイム PCR で定量した。その結果、対照群に対してヒ素曝露群で、Crel2、Slc25a30 遺伝子の 2 種類の発現が有意に増加し、Fabp4、Eil3 遺伝子の 2 種類の発現が有意に低下することが明らかとなった (表 2)。雌の肝臓ではこれら 4 種類の遺伝子の発現量は対照群とヒ素曝露群で差がなかった。

上記の 74 週令雄の肝臓でヒ素曝露によって発現変動することが見つかった遺伝子に関して、さらに経時的な発現変化を検討した。対照群と胎児期無機ヒ素曝露群の雄マウスについて、胎児期 (胎生 18 日令)、生後 6 週令、49 週令に肝臓組織を採取し、Crel2、Slc25a30、Fabp4、Eil3 の 4 種類の遺伝子の発現をリアルタイム PCR で測定した。その結果、Crel2 の増加と Eil3 の減少は 49 週令から観察され、また Slc25a30 の増加と Fabp4 の減少は 74 週令になって観察されることが明らかになった。すなわちこれらの変動は、いずれも後発的な変化である

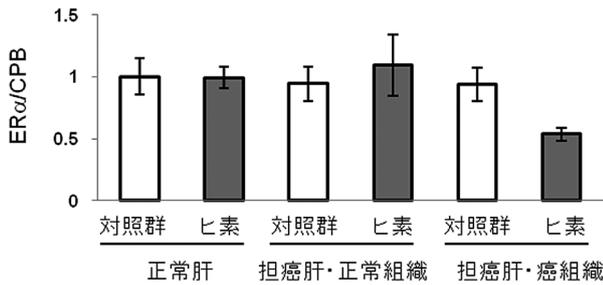


図 19 肝臓の ERα 遺伝子の発現量。  
癌のない肝臓、または癌のある肝臓の非癌部と癌部組織を採取し、ERα 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で定量した。値は CPB の発現量で補正した。

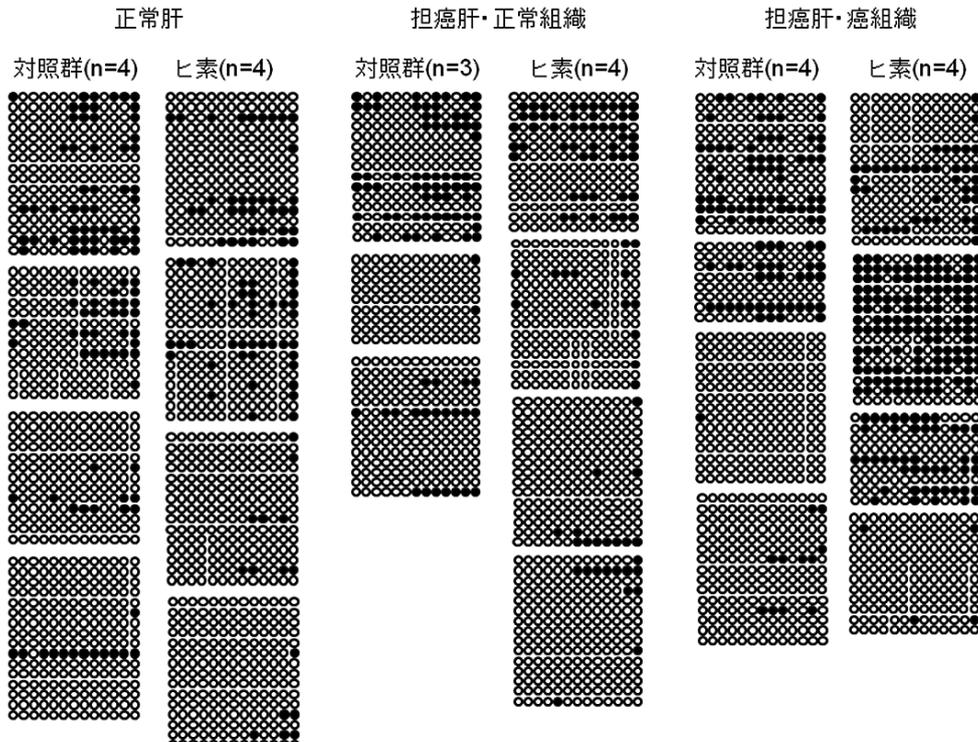


図 20 ERα プロモーター領域の DNA メチル化状態。  
図 19 と同様に組織を採取し、ERα プロモーター領域の連続する 13 か所の CpG 配列のシトシンメチル化について、bisulfite シークエンス法で調べた。●メチル化シトシン、○非メチル化シトシン

ことが明らかとなった。

## (2) 後発的な遺伝子発現へのエピジェネティック修飾への関与

上記4種類の後発的な遺伝子発現変化の機序として、エピジェネティック修飾が関与するかどうかを検討を行った。転写活性型ヒストン修飾である H3アセチル化、H3K4 トリメチル化、転写抑制型ヒストン修飾である H3K9 ジメチル化の量をクロマチン免疫沈降 (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP) 法で測定した。その結果、ヒ素曝露群で Slc25a30 遺伝子のプロモーター領域の H3K4 トリメチル化の有意な増加と、Fabp4 遺伝子プロモーター領域の H3K9 ジメチル化の有意な低下が観察され、それぞれ発現増加と低下に関与していることが示唆された (図 21)。

表 2 胎児期ヒ素曝露によって、74 週令雄マウス肝臓で有意に発現が変動した遺伝子

| 略号        | 遺伝子名                                       | 対照群に対する発現比 |
|-----------|--|------------|
| 発現増加      |  |            |
| Crel2     | Cysteine-rich with EGF-like domains 2      | 2.1        |
| Slc25 a30 | Solute carrier family 25, member 30        | 2.3        |
| 発現減少      |  |            |
| Fabp4     | Fatty acid binding protein 4               | 0.34       |
| Ell3      | Elongation factor RNA polymerase II-like 3 | 0.35       |

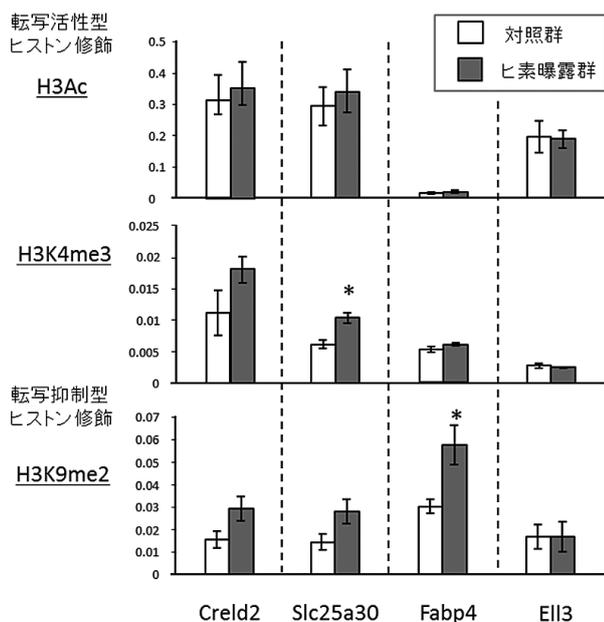


図 21 胎児期ヒ素曝露による各遺伝子プロモーター領域のヒストン修飾変化  
値は免疫沈降に用いたサンプル中の各修飾ヒストンに対する比で表した

また DNA メチル化については、Crel2 と Slc25a30 遺伝子のプロモーター領域 CpG アイランドのシトシンメチル化を bisulfite シークエンス法で検討した結果、両遺伝子とも対照群とヒ素曝露群の肝臓でともに 99 % 以上のシトシンが非メチル化状態であった。Fabp4 遺伝子は、プロモーター付近に CpG アイランドが存在しなかった。Ell3 プロモーター領域も CpG アイランドはなかったが、転写開始地点から 1000 塩基以内に CpG が比較的密度高く分布する領域が存在したため、その領域の 24 個の CpG のシトシンメチル化を bisulfite シークエンス法で検討した。その結果、メチル化シトシンが対照群で 3.2 %、ヒ素曝露群で 4.5 % とわずかに増加していたが、顕著な差ではなかった。

以上の結果から、Slc25a30 と Fabp4 遺伝子の発現変化にヒストンメチル化修飾が関与することが示唆された。しかし、DNA メチル化変化の関与は検出されなかった。また上述したように Fabp4 遺伝子の発現は、49 週令では対照群とヒ素曝露群肝臓で差がなく、74 週令ではヒ素曝露群で低下していた。この発現変化と対応して、Fabp4 プロモーター領域の H3K9 ジメチル化の増加も 49 週令では検出されず、74 週令でのみ検出された。このことから、H3K9 ジメチル化は遺伝子発現変化の誘導と近い時期に起こり、Fabp4 遺伝子の発現抑制の維持に関与する可能性が考えられた。

上述したように Waalkes らによる先行研究では、胎児期ヒ素曝露を受けて肝癌を発症した雄の肝臓の正常部分で ER $\alpha$  遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化が報告され、これが癌の増加に関与することが示唆されていた。しかし本研究では、胎児期ヒ素曝露による癌の増加傾向は観察されたが、ER $\alpha$  遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化低下は検出されなかった。また、胎児期ヒ素曝露によって後発的に遺伝子発現変化を受けた遺伝子の発現調節にもヒストン修飾の関与は観察されたものの DNA メチル化の関与は検出されなかった。2.2 で述べた長期無機ヒ素曝露の実験においても、p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子の発現調節にヒストン修飾の関与が示唆され、DNA メチル化変化は検出されなかった。動物実験や細胞株を用いた先行研究において、ヒ素曝露による DNA メチル変化を報告する研究があるが、DNA メチル化変化が実際に遺伝子発現変化に結びついているかという点や、さらには生体影響との因果関係について、今後さらに検討し、無機ヒ素のエピジェネティック作用の特徴を明らか

にする必要があると考えられた。

なお表 2、図 21 は未発表データで、投稿準備中である。

### (3) 遺伝子発現変化と癌との関連

上述したように、胎児期ヒ素曝露を受けた雄の仔では、74 週令の肝臓で *Crel2* と *Slc25a30* 遺伝子の発現増加と、*Fabp4*、*Eil3* 遺伝子の発現減少が観察された。*Fabp4* は脂質代謝に関与する分子である。このことから胎児期ヒ素曝露が後発的に肝臓の脂質代謝を変化させる可能性を検討するために、肝臓のトリグリセリドと総コレステロール量を測定した。Folch 法で脂質を抽出し、コレステロル TG またはコレステロル CHO (積水メディカル) を用いてトリグリセリドと総コレステロール量を定量した。その結果、トリグリセリド量は対照群 (2.4 mg/g 組織) に対してヒ素曝露群 (2.8 mg/g 組織) で増加の傾向がみられた。総コレステロール量は対照群とヒ素曝露群でほとんど差がなかった。

葉酸欠乏食の投与などで、肝臓へのトリグリセリドの蓄積とミトコンドリアでの過酸化脂質の産生増加が報告されている。過酸化脂質の増加による酸化ストレスの増加は、DNA 損傷や、癌の誘導に関与するシグナル伝達系の活性化を介して発癌を誘導する要因となる。胎児期ヒ素曝露を受けた雄の仔の肝臓でトリグリセリドの蓄積傾向がみられたことから、さらに酸化ストレスによって誘導される代表的な遺伝子であるヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) 遺伝子の発現を検討した。その結果、74 週令の雄では対照群に対してヒ素曝露群で有意な HO-1 遺伝子の発現増加が観察された。すなわち、胎児期の無機ヒ素曝露が成長後の仔の肝臓で酸化ストレスを増加させることが考えられた。胎児期ヒ素曝露による癌の増加に対する酸化ストレスの関与や、胎児期ヒ素曝露が成長後の仔の肝臓で酸化ストレスを増加させる機序を明らかにすることが、胎児期ヒ素曝露による発癌増加の機序の解明の糸口として重要と考えられる。

この他に、胎児期ヒ素曝露によって発現が増加した *Slc25a30* 遺伝子はミトコンドリアトランスポーターファミリーに属する分子であり、また *Crel2* 遺伝子は小胞体ストレスによって発現誘導されることが報告されている。これらの遺伝子の発現増加が検出されたことから、胎児期ヒ素曝露が後発的にミトコンドリア機能を変化させることや、小胞体ストレスを誘導することが示唆された。また胎児期ヒ素曝露によって発現が低下した *Eil3*

は RNA ポリメラーゼ II の転写因子であるが、細胞周期抑制やアポトーシスをおこすことが報告されている。ヒ素曝露群肝臓での *Eil3* 遺伝子の発現低下は細胞増殖促進に働く可能性が考えられ、上述の酸化ストレスの増加に関する検討に加え、さらに癌の増加との関連について検討が必要と考えられた。

### 2.3.3 代謝に及ぼす影響

有害物質に脆弱性が高いと考えられる胎児期～小児期の環境化学物質曝露が後発的に全身代謝異常を誘導することが懸念されている。環境省“子どもの健康と環境に関する全国調査”(エコチル調査)においても、環境化学物質の発達期曝露による“代謝・内分泌系への影響”が重要項目として採り上げられている。環境化学物質の中でも特に、バングラデシュや米国における疫学調査の先行研究から無機ヒ素曝露は 2 型糖尿病発症と関連することも指摘されている。そこで、動物実験における無機ヒ素の全身代謝への影響機構の解明を目指して、胎児期に無機ヒ素を曝露されたマウスで後発的な全身代謝異常の検出を試みた。

妊娠 C3H/HeN マウスの飲水中に無機ヒ素  $\text{NaAsO}_2$  (85 ppm) を妊娠 8～18 日目まで加え、その母体から出生した仔 (F1) を胎児期ヒ素曝露群とした。飲水中に無機ヒ素を加えない母体から出生した仔 (F1) を対照群として用いた。本研究のマウス血糖値は、尾静脈からの採血時にマウスに極力ストレスをかけないように、全血 0.6  $\mu\text{l}$  で高感度に血糖値を測定できるグルテスト Neo センサーとグルテスト Neo スーパー (共に、三和化学研究所) の組み合わせを用いて測定した。

F1 が生後 60 週になった時点で随時血糖値を測定し群間で比較したところ、対照群と比較して雄の胎児期ヒ素曝露群において有意な血糖値の上昇が確認された (図 22)。F1 雌では対照群と胎児期ヒ素曝露群間で違いが確認できなかった (図 23)。また、随時血漿インスリン値に関しても F1 雄の胎児期ヒ素曝露群において対照群と比較して有意に上昇を認めたが (図 24)、雌では影響が観察されなかった (図 25)。加えて、雌雄の胎児期ヒ素曝露群同士をかけ合わせて得られた仔 (胎児期ヒ素曝露群 F2) と対照群同士とかけ合わせた仔 (対照群 F2) の随時血糖値を比較した場合にも血糖異常は確認できず、F1 で見られた胎児期ヒ素曝露群の随時血糖上昇が次世代に継承されるといった現象は確認できなかった。

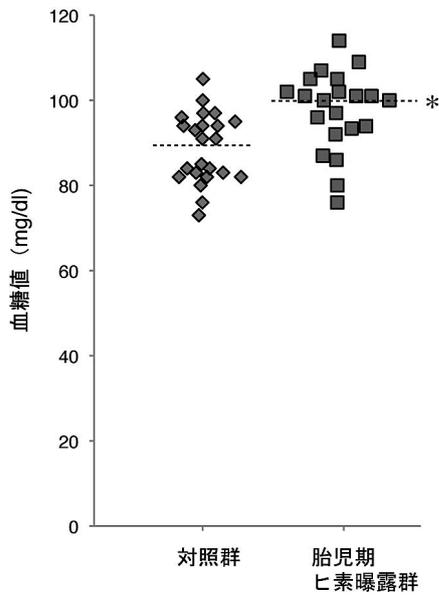


図 22 胎児期ヒ素曝露が F1 雄マウスの随時血糖値に及ぼす影響 全個体のプロットと平均値 (点線)

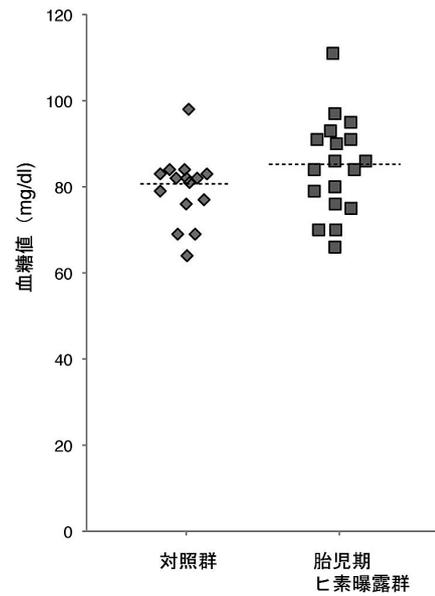


図 23 胎児期ヒ素曝露が F1 雌マウスの随時血糖値に及ぼす影響 全個体のプロットと平均値 (点線)

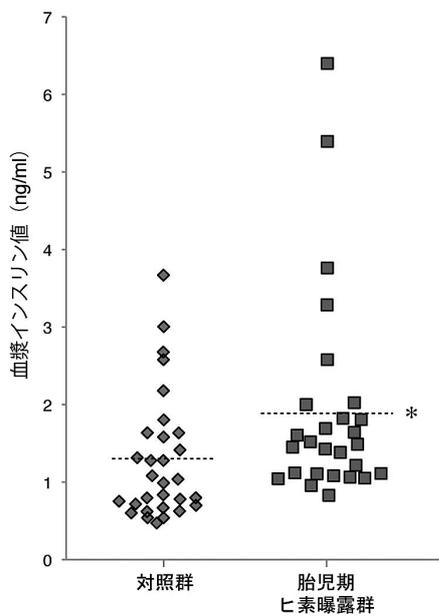


図 24 胎児期ヒ素曝露が F1 雄マウスの血漿インスリン値に及ぼす影響 全個体のプロットと平均値 (点線)

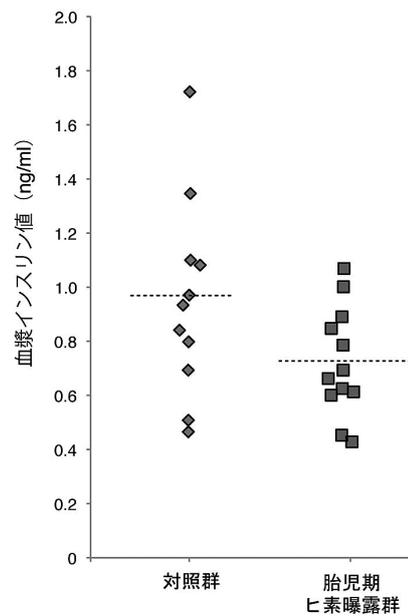


図 25 胎児期ヒ素曝露が F1 雌マウスの血漿インスリン値に及ぼす影響 全個体のプロットと平均値 (点線)

次に胎児期ヒ素曝露群 F1 の雄で確認された随時血糖上昇の原因をさらに詳しく探るため、雄マウスを用いて腹腔内糖負荷試験 (体重 kg 当たり 2 g) を行った。その結果、対照群と比較して胎児期ヒ素曝露群で 1) 糖負荷前の絶食時における高血糖と 2) 糖負荷後のより大きな血糖上昇が確認された (図 26)。さらに、糖負荷 0、15、30 分時点で尾静脈から血漿 10  $\mu$ l を採取し、インスリン値を超高感度マウス・インスリン測定キット (森永生科学研究所製) により測定したところ、胎児期ヒ素曝

露群の糖負荷後のインスリン値の上昇は対照群と遜色なく、0 分、30 分時点では寧ろ胎児期ヒ素曝露群の方が有意に増加していることが確認できた。糖負荷後十分にインスリン分泌がなされているのに関わらず、血糖値が増加しているという糖負荷試験の結果から、インスリン抵抗性の存在が疑われた為、胎児期ヒ素曝露群のインスリン感受性を検討する為にさらにインスリン負荷試験を行った。インスリン (体重 kg 当たり 0.75 U、シグマ=アルドリッチ社製) を腹腔内投与するタイプのインスリ

ン負荷を行い、負荷後経時的に血糖値を測定したところ、対照群と比較して90～180分時点の血糖値が有意に上昇しており（図27）、インスリン感受性が低下していることが判明した。胎児期ヒ素曝露群の雄ではインスリン分泌が正常な一方、インスリン作用の異常がみられたという今回の結果は、胎児期ヒ素曝露による血糖上昇はインスリン抵抗性を介して誘導される可能性が高いことを示している。

インスリン抵抗性が発現する臓器として肝臓、骨格筋、脂肪細胞、脳などが知られているが、胎児期の無機ヒ素がどの臓器にどのような機構で後発的にインスリン抵抗性を誘導するのかは現段階では明らかでない。また、60週令までのどの段階で血糖上昇が起こってくるのか未だ不明である。胎児期ヒ素曝露が後発的にインスリン抵抗性を惹起する機構が分かれば、ヒト疫学計画策定に反映できる仮説の構築やヒ素曝露で影響が出やすい代謝関連

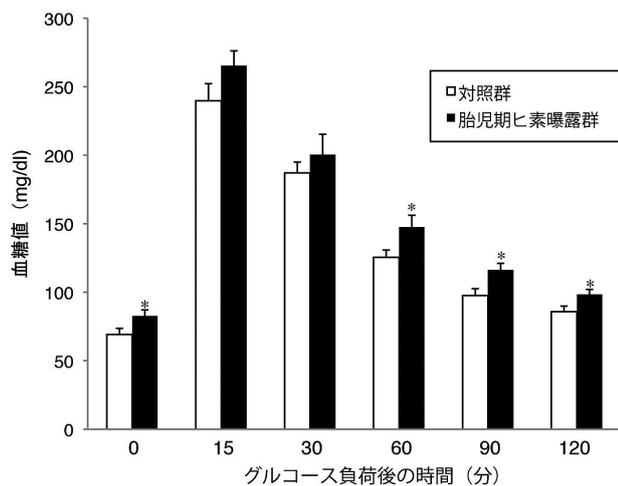


図26 胎児期ヒ素曝露がF1雄マウスの耐糖能に及ぼす影響 平均値と標準誤差

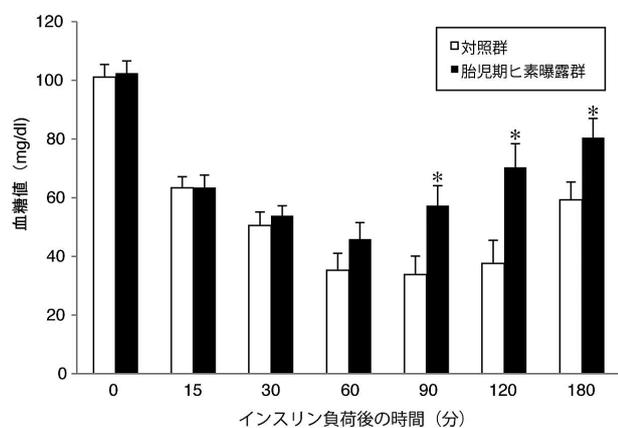


図27 胎児期ヒ素曝露がF1雄マウスのインスリン感受性に及ぼす影響 平均値と標準誤差

バイオマーカーの開発に役立つため、更に研究を進展させる必要がある。

なお図22～27は未発表データで、投稿準備中である。

### 2.3.4 脳における性ホルモン受容体の発現に対する影響

代表的な性ホルモンには、女性ホルモンであるエストロゲンと男性ホルモンであるアンドロゲンがあり、これらの性ホルモンは受容体に結合して作用する。エストロゲン受容体 (ER: estrogen receptor) には ER $\alpha$  と ER $\beta$  の二つのサブタイプが同定されている。ER $\alpha$ 、ER $\beta$  およびアンドロゲン受容体 (AR: androgen receptor) は核内受容体であり、リガンドが結合した核内受容体の2量体は転写調節因子として標的遺伝子の発現を調節する。このような性ホルモンによる遺伝子発現調節は、成熟期の生殖機能における中枢制御に極めて重要である。加えて、性ホルモン作用は脳発達にも関与している。発達途上にある個体の脳は性ホルモンの働きにより性分化する。げっ歯動物 (マウスやラット) では、周生期の精巣から分泌されるアンドロゲンが脳内の芳香化酵素によりエストロゲンに転化して作用し、これにより脳が雄性化すると考えられている。芳香化アンドロゲン (エストロゲン) は ER に結合し、脳を雄性化するように働く。

生殖機能制御に重要な働きを持つげっ歯動物の内側視索前野 (mPOA: medial preoptic area) の性分化には、ER $\alpha$  を介した周生期の芳香化アンドロゲンの作用が必要不可欠である。性分化した mPOA には ER $\alpha$  の発現量に性差があることが知られている。mPOA における ER $\alpha$  の発現量は、雌において雄よりも高く、成熟期まで性差がみとめられる。最近になって、この性差が ER $\alpha$  プロモーターの CpG 配列におけるメチル化修飾に起因することが分かってきた。さらに、ER $\alpha$  プロモーターの CpG 配列におけるメチル化修飾は、発達期の性ホルモンによって影響を受けており、性分化の一過程として進行することが示唆されている。また、発達期における無機ヒ素の曝露は成熟雄マウスの肝臓における ER $\alpha$  の発現を増加させることがすでに報告されている。そして、この ER $\alpha$  発現量の増加は ER $\alpha$  プロモーターの脱メチル化に起因し、ER $\alpha$  の発現増加がヒ素曝露による肝臓ガン発症の原因であると推測されている。以上のことから、無機ヒ素曝露が発達期の脳内に影響を及ぼし、mPOA における ER $\alpha$  発現パターンを変容させる可

能性があるのではないかと考えた。そこで、本研究では、マウス脳の mPOA における性ステロイド受容体発現に対する発達期の無機ヒ素曝露による影響を検証した。

マウス脳内の ER $\alpha$  免疫陽性反応は細胞核にみられた。視索前野における ER $\alpha$  免疫陽性細胞は mPOA に多数存在しており、外側視索前野では mPOA に比べて少なかった (図 28 A および 図 29 A)。このような視索前野における ER $\alpha$  免疫陽性細胞の分布については、明確な性差および亜ヒ酸ナトリウム曝露の影響はみとめられなかった。しかし、mPOA に存在する ER $\alpha$  免疫陽性細胞は雌マウスにおいて雄マウスよりも多かった。さら

に、mPOA における ER $\alpha$  免疫陽性領域を解析した結果、亜ヒ酸ナトリウムを曝露した雄マウスの ER $\alpha$  免疫陽性領域は対照群に比べて有意 ( $P < 0.05$ ) に増加した (図 28 B)。一方、雌マウス mPOA における ER $\alpha$  免疫陽性領域は亜ヒ酸ナトリウム曝露の影響を受けなかった (図 29 B)。

マウス脳内における AR 免疫陽性反応も、ER $\alpha$  の免疫陽性反応と同じく、すべて細胞核にみられた。視索前野における AR 免疫陽性細胞は雄マウスの mPOA に多数存在しており、外側視索前野では mPOA に比べて少なかった (図 30 A)。また、外側視索前野の背側に位置

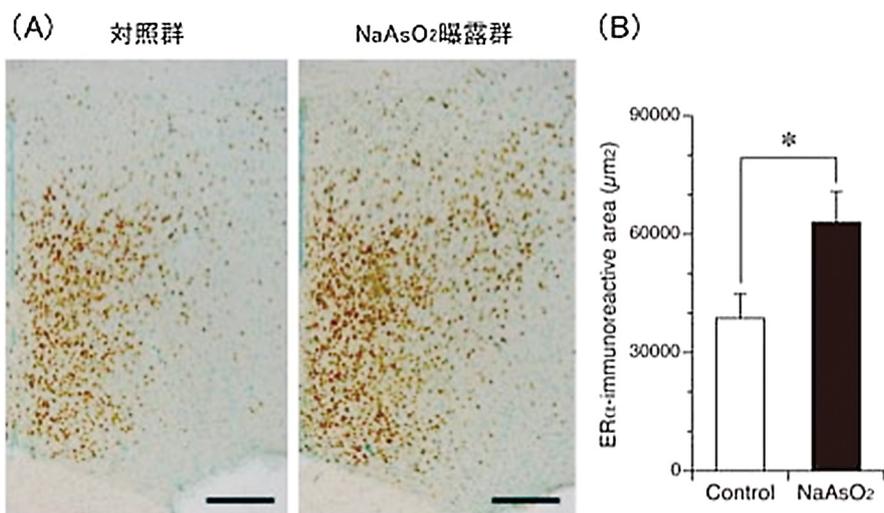


図 28 雄マウスの内側視索前野における ER $\alpha$  発現  
(A) 内側視索前野の ER $\alpha$  免疫陽性細胞、スケールバーは 200  $\mu\text{m}$ ；(B) 内側視索前野の ER $\alpha$  免疫陽性領域、\* :  $p < 0.05$

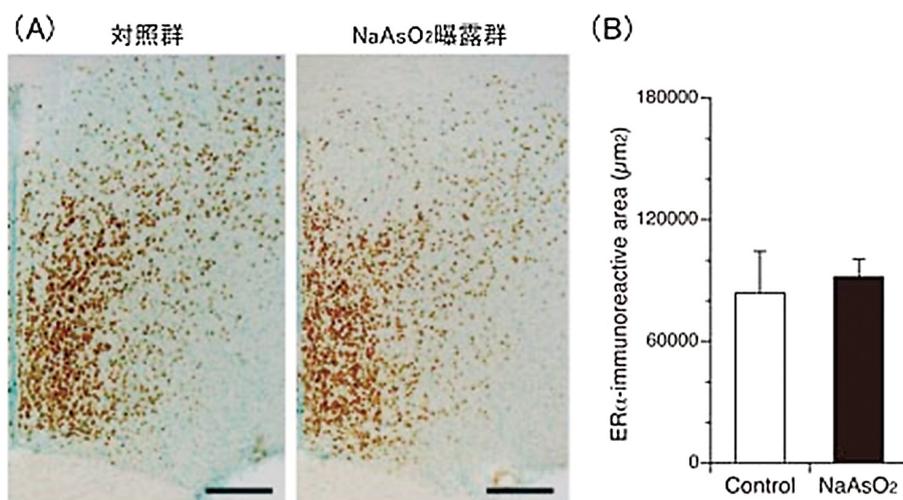


図 29 雌マウスの内側視索前野における ER $\alpha$  発現  
(A) 内側視索前野の ER $\alpha$  免疫陽性細胞、スケールバーは 200  $\mu\text{m}$ ；(B) 内側視索前野の ER $\alpha$  免疫陽性領域

する分界条床核には、多数の AR 免疫陽性細胞が観察された。一方、雌マウスの視索前野に観察される AR 免疫陽性細胞は、雄マウスに比べて少なく、対照群の雌マウスでは極少数であった (図 31 A)。mPOA における AR 免疫陽性領域を解析した結果、雄マウスの AR 免疫陽性領域は対照群と亜ヒ酸ナトリウム曝露群との間に有意な差はみられなかった (図 30 B)。一方、亜ヒ酸ナトリウムを曝露した雌マウスの mPOA における AR 免疫陽性領域は、対照群に比べて有意に ( $p < 0.05$ ) 増加した (図 31 B)。

発達期の無機ヒ素曝露は、成熟マウス脳の前野における性ホルモン受容体発現に影響を及ぼすことが明らか

になった。雄マウスの mPOA では ER $\alpha$  発現量が無機ヒ素曝露により増加した。他方、雌マウスの mPOA では AR 発現量が無機ヒ素曝露により増加した。以上の結果から、発達期に曝露した無機ヒ素は、性ステロイド受容体発現に対する影響を及ぼすことで、成熟期での性ステロイドの中枢作用を変容させる可能性があると考えられた。加えて、無機ヒ素の発達期曝露の影響には性差があることが示された。

mPOA は生殖機能制御に関与しており、脳発達の過程において性的に分化する。げっ歯動物の脳の性分化では、周生期の精巣に由来する芳香化アンドロゲン (エストロゲン) の作用が必要不可欠である。性分化した mPOA

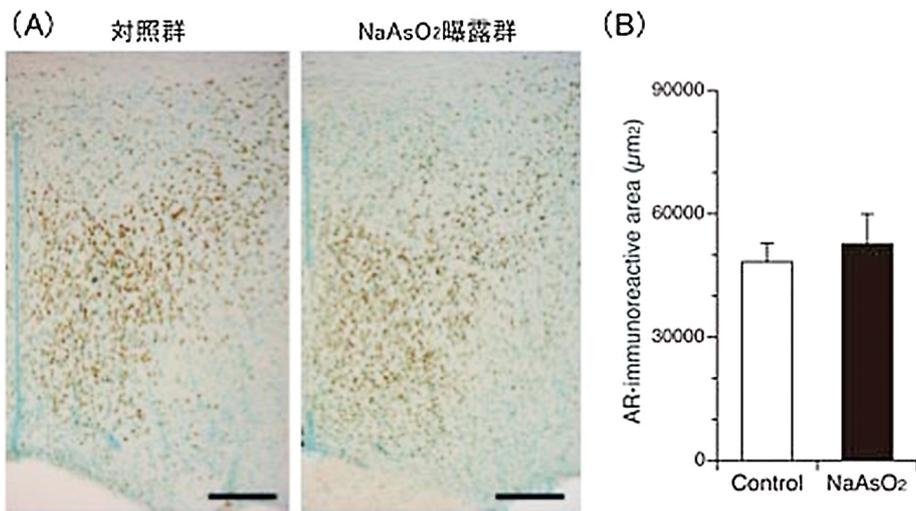


図 30 雄マウスの内側視索前野における AR 発現  
(A) 内側視索前野の AR 免疫陽性細胞、スケールバーは 200  $\mu\text{m}$  ; (B) 内側視索前野の AR 免疫陽性領域

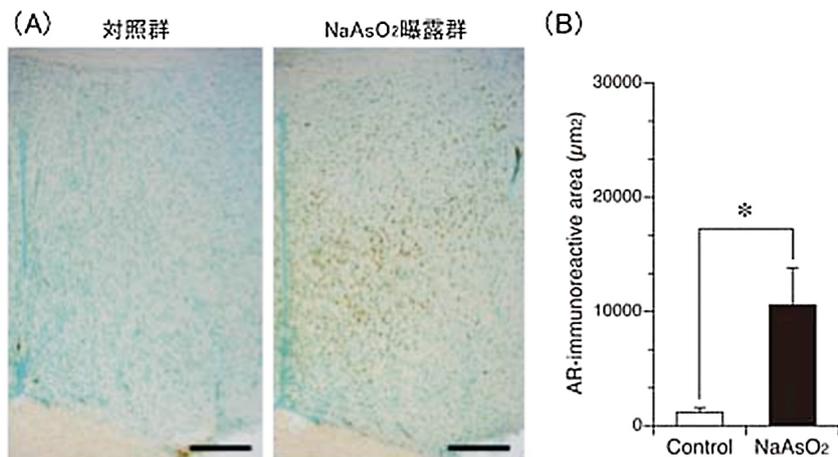


図 31 雌マウスの内側視索前野における AR 発現  
(A) 内側視索前野の AR 免疫陽性細胞、スケールバーは 200  $\mu\text{m}$  ; (B) 内側視索前野の AR 免疫陽性領域、\* :  $p < 0.05$

にはER $\alpha$ の発現量に性差があり、その発現量は、雌において雄よりも高い。本研究の結果においても、雌マウスmPOAのER $\alpha$ 発現量は、雄マウスに比べて、およそ2-3倍程度高くなっていた。mPOAのER $\alpha$ 発現量の性差は新生仔期より顕在であり、周生期のエストロゲンの作用によってその発現量は雄型のパターンになる。さらに、最近になって、mPOAにおけるER $\alpha$ 発現量の性差がER $\alpha$ プロモーターのCpG配列におけるメチル化修飾に起因することが報告された。周生期にエストロゲンが作用したmPOAでは、ER $\alpha$ プロモーターのメチル化が誘導されるため、ER $\alpha$ の発現が低下するのである。本研究から、無機ヒ素の発達期曝露は雄マウスmPOAのER $\alpha$ 発現量を増加させることが明らかになった。無機ヒ素の発達期曝露は成熟雄マウスの肝臓におけるER $\alpha$ の発現を増加させることが報告されており、このER $\alpha$ 発現量の増加はER $\alpha$ プロモーターの脱メチル化に起因することが示唆されている。以上のことから、無機ヒ素曝露によるmPOAのER $\alpha$ 発現量増加は、(1)周生期における精巣由来の芳香化アンドロゲン（エストロゲン）の作用あるいは産生量の低下、(2)ER $\alpha$ プロモーターの脱メチル化誘導、等に起因することが推測される。このような可能性を今後検証する必要があると思われる。

雌マウスのmPOAでは、無機ヒ素の発達期曝露によりAR発現量が増加した。成熟期におけるmPOAのAR発現量には性差があり、雄の方が雌よりも高い。ARの発現はリガンドであるアンドロゲンの存在下で増強されることが知られており、AR発現の性差はアンドロゲンレベルの性差に依存すると考えられる。このことから、無機ヒ素曝露の影響として、雌マウス脳内のアンドロゲン量増加が想定される。加えて、ER $\alpha$ プロモーターと同様に、曝露した無機ヒ素がARプロモーターに対するメチル化修飾作用を有している可能性も考えられる。ER $\alpha$ 発現に対する無機ヒ素の影響とともにAR発現に対する影響のメカニズムについても今後詳細な解析が必要である。

なお図28～31は未発表データで、投稿準備中である。

### 2.3.5 高次認知機能測定系の確立

胎児期～新生児期の環境化学物質曝露が高次脳機能へ悪影響を及ぼし、知能や学習能力に影響を与える可能性が懸念されている。そこで、実験動物を用いて環境化学物質の高次脳機能への影響を迅速かつ精緻にスクリーニングするための学習行動試験法の確立が望まれている。

また、環境化学物質の脳への影響を検討する際に頻繁に用いられる実験動物であるマウスでは、系統間で環境化学物質に対する感受性が異なることが知られており、曝露する環境化学物質によって系統を使い分けることが多い為、どの系統においても再現性が担保できる学習試験法を構築することも重要な課題となっている。

我々は、スイス・チューリッヒ大学 Hans-Peter Lipp 教授らにより開発された、マウスを集団で飼育しつつ個体毎の行動パターンを解析できる装置、集団型全自動・記憶学習測定システム IntelliCage (図32) に着目し、チューリッヒ大学、東京大学、自治医科大学と共同で IntelliCage を用いて様々なマウス系統で空間学習能力をハイスループットに検出できる測定系の確立を試みた。IntelliCage システムを利用する際は、まずマウスを個体識別するため RFID タグをマウス背側皮下に植え込む必要がある (図33)。この RFID タグと「プレゼンス・ディテクター」の働きにより、ケージの4隅にある「コーナー」と呼ばれる小部屋にマウスが「いつ」「どのくらいの時間」訪れたか、実験期間中常時記録することができる (図34)。コーナー内部には給水ボトルにアクセスできる穴(「ゲート」)が空いており飲水時刻・量が常時記録される。また、マウスが鼻で押すことができるスイッチの役割を果たす「ノーズポーク・センサー」(図34D)がコーナー内部に設置されており、このスイッチと連動させて「ゲート」の開閉状態を制御することができる (図34E、F)。このような設計により、どの「コーナー」で「ノーズ

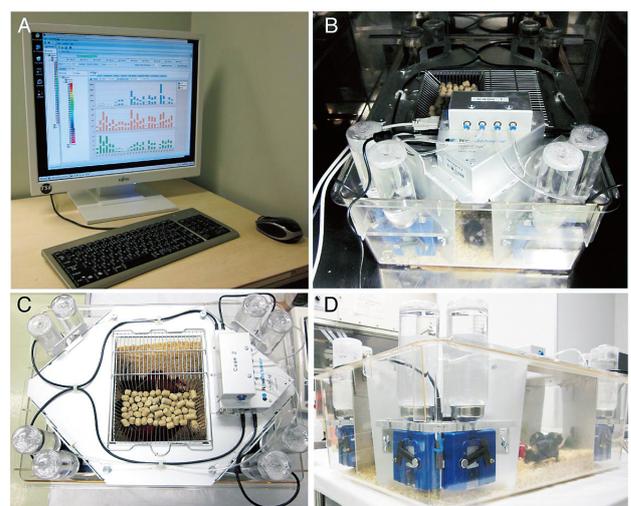


図32 IntelliCage システムの概要

A: IntelliCage を制御するコンピューターと制御ソフトウェア、B、C: IntelliCage 本体の斜上 (B)、上方 (C) からの全体像、D: 4 隅にあるコーナーのうち 1 つの拡大像

ポーク」すれば「ゲート」が開いて飲水できるようになるかを個体毎に割り当てることが可能になるため、特定のコーナーのみを飲水可能とすることで各マウスに「報酬」を得られるコーナーを記憶させる「空間学習」を施すことができる。

我々は4つのコーナーのうちの対角にある2つのコーナーを正解に割り当て、それらのコーナーが交互に飲水可能となる学習試験 (Behavioral sequencing task、図 35) を構築し、その学習試験プロトコルが C57BL/6、DBA/2、ICR 系統で鋭敏に学習能力を測定できることを明らかにした。次に、エピジェネティック作用を持つ無機ヒ素の胎児期曝露研究への応用を視野に置いて、無機ヒ素曝露実験によく用いられる系統である C3H/HeN マウスにおいてこの学習試験法が適用できるか、国立環境

研究所の動物飼育施設内で検討を行った。実験には生後 60 週令以降の比較的高齢の雄 C3H/HeN マウスを用いて、夜間 19 ~ 22 時の 3 時間のみ学習試験を施し、その試験を 10 日間繰り返した。正解に割り当てられたコーナー以外のコーナー (エラー・コーナー) に訪れた回数を、全コーナーを訪れた回数で割った値に 100 を掛けた値 (訪問エラー (%)) を各個体、1 日毎に算出し、さらに平均値と標準誤差を算出した。その結果、学習試験 1 日目には 40 % 以上であった訪問エラー (%) の平均値が 10 日目には約 7 % にまで減少していた (図 36)。この結果から、他系統のマウス同様、C3H/HeN マウスでも我々の試験法 Behavioral sequencing task により鋭敏に学習能力を評価できることが判明した。この試験法を今後、胎児期無機ヒ素曝露を施した C3H/HeN マウスにも適用し、高次脳機能発達への影響評価に応用する予定である。

なお、図 36 は未発表データで、投稿準備中である。



タグをマウスの背側皮下に移植するための装置

図 33 RFID タグとタグを背側皮下に移植する為の装置 (この装置は迷子防止の目的で獣医師がペットに ID タグを移植する際にも使われる、動物愛護の観点にも十分配慮された製品である)

### 2.3.6 無機ヒ素による肝癌に特異的な DNA メチル化変化領域の検索

DNA メチル化、ヒストン修飾やクロマチン構造などのエピジェネティック作用の異常は、発癌のリスク及び癌の進行に非常に深く関与している。最近では、エピジェネティック異常を癌の診断に応用することが可能となってきた。エピジェネティック異常の中でも、DNA メチル化の異常は、DNA メチル化が細胞の環境に関わらず安定であることと、RNA やタンパク質と比較して化学的に安定な DNA を用いて検出できることなどから、

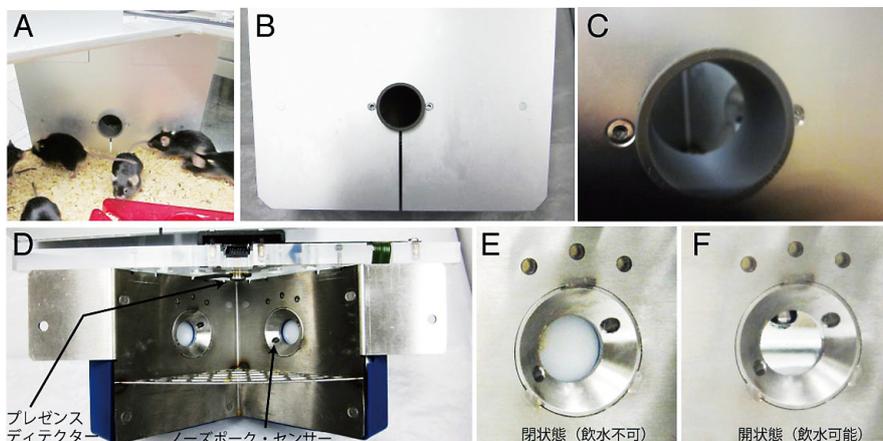


図 34 コーナーの詳細

A: IntelliCage 内部から見たコーナーの入り口、B、C: コーナーを分解して取り出し、入口とその入り口からの内部を覗いた画像、D: コーナーを分解して内部のみを示した画像、E、F: ゲートの開閉時の画像 (F では給水瓶の飲口が見えている)

癌診断のマーカーとしての有用性が高いと考えられる。実際に、すでに多くの癌で、優れた DNA メチル化マーカーが同定されている。

ヒ素は長期曝露によって癌を発症させるが、ヒ素の変異原性は低いため、ヒ素による発癌にはエピジェネティック作用が関連していると考えられている。これまでの動物実験から、ヒ素曝露により発症または増加した癌で、癌関連遺伝子3種類のプロモーター領域の DNA メチル化変化が報告されている。具体的には、肝臓癌では ER $\alpha$  遺伝子、肺癌では p16<sup>INK4a</sup> 遺伝子と RASSF1A 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化変化が報告されている。これらの領域の DNA メチル化変化が遺伝子発現を変化させ、その結果、癌の発症または増加につな

がると考えられている。

一方、ヒ素によって発症した癌と、その他の原因で発症した癌を区別することが可能なマーカーを確立することができれば、疫学研究等において極めて有用である。そこで本研究では、ヒ素による肝臓癌特異的な DNA メチル化マーカーを探索することを目的として、胎児期無機ヒ素曝露で増加した肝臓癌で特異的に変化する DNA メチル化変化を MeDIP (methylated DNA immunoprecipitation) -CpG island array によって網羅的に解析した。

#### (1) MeDIP CpG island array による網羅的解析

胎児期に 85 ppm のヒ素を飲水投与した C3H マウスか

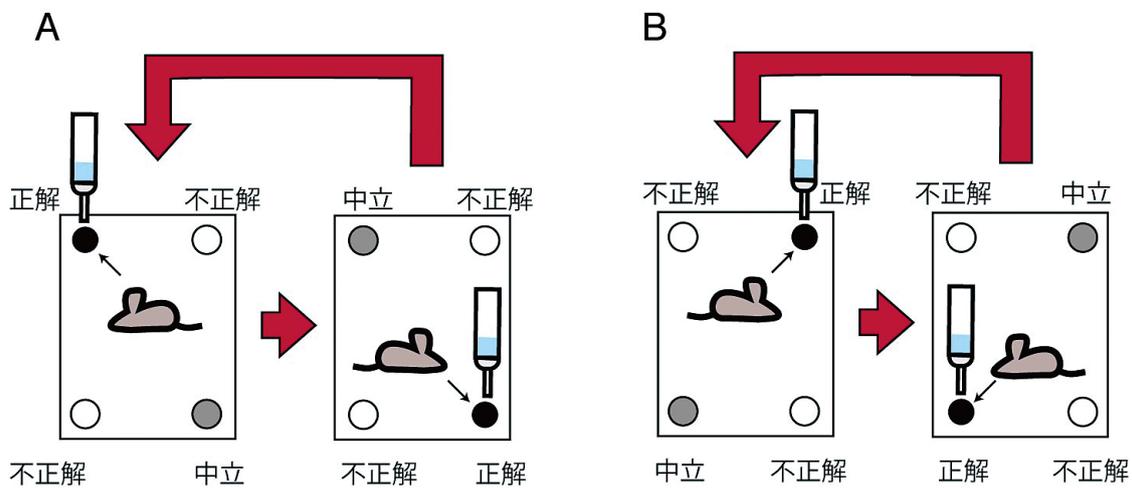


図 35 学習試験法 Behavioral sequencing task の概要  
マウスに A あるいは B のどちらかのプロトコルを割り当て試験中常時繰り返す

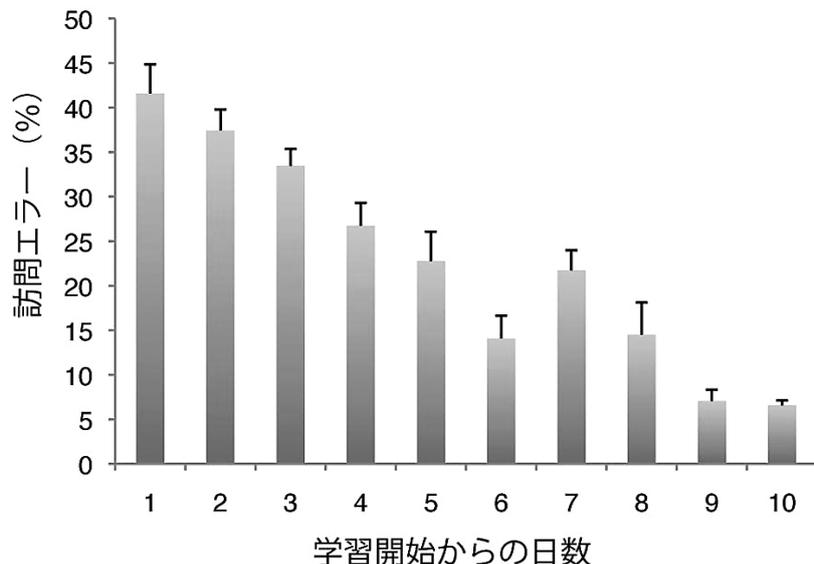


図 36 学習試験法 Behavioral sequencing task を C3H/HeN マウスに適用した結果 (平均値と標準誤差)

ら産まれた74週令の雄マウス（ヒ素曝露群）及びコントロール群の雄マウスから、正常肝臓組織、癌が存在する肝臓の癌部を採取した。それら組織からゲノム DNA を抽出し、コントロールの正常肝臓3匹分のプールと、ヒ素曝露群の癌が存在する肝臓の癌部3匹分のプールで、MeDIPをおこない、Agilent社のマウス CpG island array を用いて、メチル化が変化する領域の網羅的解析をおこなった。国立がん研究センター研究所エピゲノム解析分野の独自の指標によりメチル化レベルを決定し、その値に基づきヒ素曝露したマウスに発症した肝臓癌で高メチル化状態になったと考えられる領域を候補とした。具体的には、Fosb (FBJ osteosarcoma oncogene B)、Btd (Biotinidase)、Mab2112 (Mab-21-like2)、Hspa2 (Heat shock protein 70 2) の遺伝子内に存在する CpG island 領域を候補とした。

## (2) メチル化特異的 PCR (Methylation-specific PCR, MSP)

MSP は、ほぼすべての対象領域のメチル化の状態を迅速・簡便に解析可能な手法である。しかしながら、正確なメチル化状態を検出するためには MSP のプライマー設計、条件検討を十分におこない、特異性に優れたプライマーを決定する必要がある。

## (3) コントロール DNA とサンプル DNA の調製

MSP プライマーの特異性を検討するために、コント

ロール DNA として、すべての CpG がメチル化されている DNA (完全メチル化 DNA) と、すべての CpG がメチル化されていない DNA (完全非メチル化 DNA) をバイサルファイト反応したものが必要である。完全メチル化 DNA は、市販の NIH3T3 細胞株由来のものを用いた。完全非メチル化 DNA は、NIH3T3 細胞由来のゲノム DNA を Genomiphi V2 DNA amplification Kit で2回増幅したものを用いた。これらの DNA を制限酵素で処理し、バイサルファイト反応をした。一方、サンプルとして使用する C3H マウス肝臓組織のゲノム DNA も、コントロール DNA と同様に制限酵素処理し、バイサルファイト反応をした。

## (4) プライマーの特異性の確認

メチル化特異的 PCR では、完全メチル化 DNA 配列に対応した M プライマーと、完全非メチル化 DNA 配列に対応した U プライマーを用いる。これらのプライマーを用いた PCR で増幅が認められることは必須であるが、M プライマーでは完全メチル化 DNA 配列のみが増幅され、U プライマーでは完全非メチル化 DNA 配列のみが増幅されることが重要である。そこで、各領域に設計した M プライマーと U プライマーが特異性をもつかどうかを完全メチル化 DNA と完全非メチル化 DNA を用いて検討した。その結果、すべての領域で特異性があるプライマーを設計できていることを確認した (図 37)。各プライマーで最もバンド強度が強いアニーリング温度で

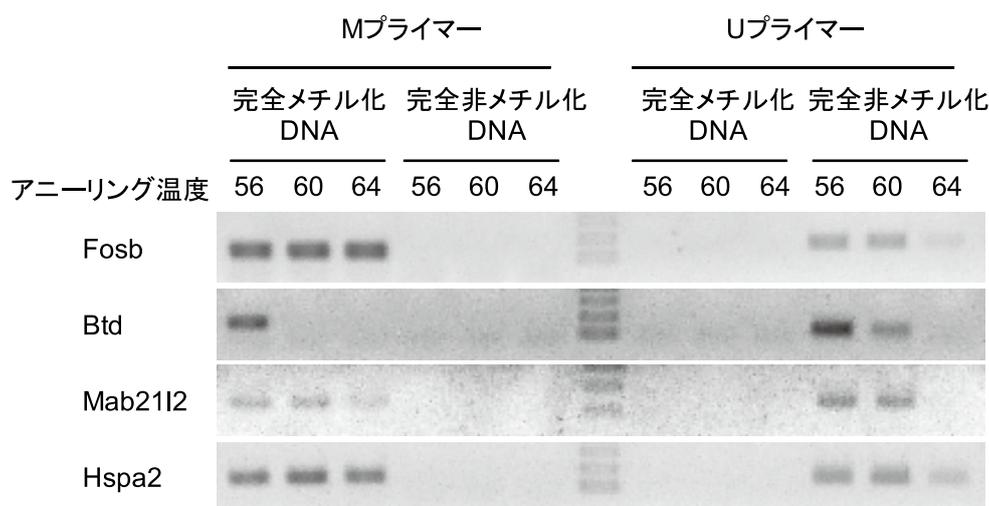


図 37 MSP プライマーの特異性の確認

完全メチル化 DNA と完全非メチル化 DNA をテンプレートにし、Fosb、Btd、Mab2112、Hspa2 の領域の M プライマーと U プライマーを用いて、MSP をおこなった。すべての領域において、M プライマーでは完全メチル化 DNA のみが増幅され、U プライマーでは完全非メチル化 DNA のみが増幅されていることがわかる。

リアルタイム MSP をおこない、リアルタイム MSP においてもこれらのプライマーの特異性を確認した。

#### (5) リアルタイム MSP によるメチル化率の決定

バイサルファイト反応した肝臓ゲノム DNA と、各領域に設計した M プライマーと U プライマーを用いてリアルタイム MSP をおこない、メチル化率を測定した。メチル化率は、(M プライマーによる増幅量) / (M プライマーによる増幅量 + U プライマーによる増幅量) で表した。その結果、今回測定した4つの領域すべてにおいて、コントロール群及びヒ素曝露群ともに、正常な肝臓と比較して、癌が存在する肝臓の癌部では有意にメチル化率が高かった。さらに、Fosb と Btd については、コントロール群のマウス肝臓の癌部と比較して、ヒ素曝露群の癌部でメチル化率が有意に高いことが明らかとなった。この結果は、Fosb 及び Btd 領域の DNA メチル化がヒ素曝露が関与する癌の指標となる可能性を示している。

以上の結果から、ヒ素による肝臓癌特異的な DNA メチル化マーカーの候補として、Fosb および Btd 領域を同定することができた。今後はさらにヒ素によって DNA メチル化量が増加する領域を検索し、それらを組み合わせることによってヒ素特有の癌を同定する方法を確立したいと考えている。またヒ素により発症することが明らかとなっている皮膚癌、肺癌、膀胱癌などの他の種類の癌への応用性の検討も行いたい。

#### 2.4 ダイオキシン感受性の臓器特異性とエピジェネティック作用

AhR (aryl hydrocarbon receptor) は、リガンド活性化型の転写因子であり、ダイオキシン (TCDD) による毒性発現を仲介する。TCDD による毒性の発現と、TCDD による AhR 依存的な標的遺伝子の発現は、よく対応しており、TCDD による AhR 依存的な遺伝子発現調節には以下のようなメカニズムが提案されている (図 38)。TCDD が AhR に結合すると、AhR が活性化されて核内に移行し、ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) とよばれる分子とヘテロダイマーを形成する。その後、AhR/ARNT ヘテロダイマーは、たとえば CYP1A1 のような AhR 依存的に発現が誘導される標的遺伝子の近位に存在する XRE (xenobiotic responsive

element) 配列に結合することで、標的遺伝子の発現を誘導または調節すると考えられている。ヒストン修飾やクロマチン構造のリモデリングも、AhR 依存的な遺伝子発現に関係することが報告されている。最近では、AhR は転写調節因子として働くのみならず、リガンド依存的なタンパク質分解酵素であることも示されている。

AhR 依存的な遺伝子発現調節は、動物種、臓器、細胞、細胞の状態、リガンドの種類に依存することが知られている。AhR 依存的な遺伝子発現調節の動物種特異性については、これまでの研究から動物種によって AhR の構造が異なるため、TCDD との親和性が異なることが主な原因とされている。しかし、同一の AhR 構造を持つ1個体中においても AhR 依存的な遺伝子発現調節には臓器特異性がみられることが最近の研究から示されている。しかし、各臓器においてどの因子がどのように AhR 依存的な遺伝子発現調節に関与しているのかについては、ほとんど明らかになっていない。これまでに私たちは、CYP1A1 遺伝子を指標にし、その発現調節の肝臓と脾臓における臓器特異性について検討してきた。その結果、TCDD 曝露 24 時間での CYP1A1 誘導量は、脾臓と比較し肝臓で約 700 倍大きいことを明らかにし、このときの TCDD 含有量は、脾臓と比較し肝臓で約 60 倍多いことから、等量の TCDD で誘導される CYP1A1 は、肝臓で脾臓よりも約 12 倍大きいことを明らかにした (表 3)。しかしながら、この現象の詳細なメカニズムは不明であった。

そこで本研究では、CYP1A1 遺伝子を指標にし、エピジェネティックな作用に着目して、臓器特異的な AhR 依存的な遺伝子発現調節メカニズムを検討した。TCDD を 2 µg/kg で経口投与した C57BL/6 雌マウスの肝臓と

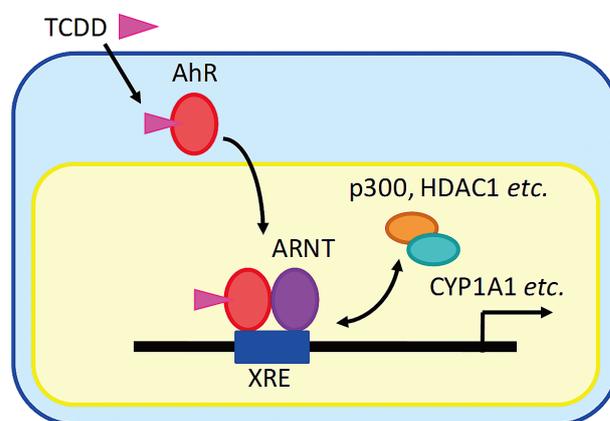


図 38 AhR 依存的な遺伝子発現の模式図

表3 TCDD 臓器分布と CYP1A1 誘導量

|                                | 脾臓                   | 肝臓                |
|--------------------------------|----------------------|-------------------|
| TCDD 量<br>(ng/g wet tissue)    | 0.269<br>1           | 16.5<br>61.5      |
| CYP1A1 誘導量<br>(相対値)            | 0.0023 ± 0.0013<br>1 | 1.6 ± 0.19<br>696 |
| 等量の TCDD で誘導される<br>CYP1A1 誘導量比 | 1                    | 11.5              |

脾臓で検討した。

#### (1) CYP1A1 誘導のタイムコース

まず、肝臓と脾臓において、TCDD 曝露 48 時間まで CYP1A1 誘導のタイムコースを RT-PCR で調べた。その結果、肝臓では曝露 6 時間で誘導され、48 時間まで誘導が続いた。しかし、脾臓では、曝露 6 時間で非常に弱い誘導がみられ、12 時間でピークに達することがわかった。

#### (2) AhR の CYP1A1 上流への結合

CYP1A1 の誘導は、CYP1A1 上流の XRE に AhR が結合することにより起こる。肝臓と脾臓において CYP1A1 誘導量が異なる原因として、XRE への AhR 結合量が異なる可能性が考えられたため、TCDD 曝露 48 時間まで経時的に CYP1A1 上流 - 1000 付近の XRE に結合する AhR 量をクロマチン免疫沈降法によって調べた。その結果、肝臓では、TCDD 曝露 6 時間で AhR が結合し、曝露 48 時間まで AhR が結合し続けた。一方、脾臓においては、曝露 6 時間から AhR の結合がみられたが、その結合量は、肝臓と比較すると、非常に低いことが明らかになった。したがって、肝臓と脾臓における CYP1A1 誘導量の違いには、CYP1A1 上流への AhR の結合量が関係することが示唆された。

#### (3) CYP1A1 上流の活性化型ヒストン修飾レベルの検討

転写因子の結合は、先に述べたように、ヒストン修飾の変化と密接に関連があることが知られている。そこで、まず、TCDD 曝露しない状態での肝臓と脾臓における

CYP1A1 上流 - 1000 付近の活性化型ヒストン修飾レベルをクロマチン免疫沈降法で検討した。その結果、肝臓のほうが脾臓よりも、もともとのヒストン H3 のアセチル化レベルが 13 倍、ヒストン H4 のアセチル化レベルが 8 倍大きいことが明らかになった。活性化型ヒストン修飾レベルが大きいことは、転写因子の結合を容易することに対応するため、肝臓における CYP1A1 上流の構造は、脾臓と比較して AhR の結合を容易にする構造であることが考えられた。

#### (4) TCDD 曝露による CYP1A1 上流の抑制型ヒストン修飾レベルの変化

次に、TCDD 曝露後の肝臓と脾臓における CYP1A1 上流 - 1000 付近の抑制型ヒストン修飾レベルについてクロマチン免疫沈降法により検討した。その結果、肝臓では、TCDD 曝露後に CYP1A1 遺伝子上流の H3K9 ジメチル化レベル及び H3K27 トリメチル化レベルが減少することが明らかになった。一方、脾臓においては、TCDD 曝露後に、CYP1A1 遺伝子上流の H3K27 トリメチル化レベルが増加する傾向にあり、ヘテロクロマチンプロテイン 1 (HP1) の結合が有意に増加することがわかった。したがって、脾臓においては、TCDD 曝露により CYP1A1 上流がヘテロクロマチン化される可能性が示唆され、その結果、等量の TCDD で誘導される CYP1A1 量が、肝臓と比較して低くなったと考えられた。

以上の結果から、肝臓と脾臓における等量の TCDD による CYP1A1 誘導量の違いには、CYP1A1 上流のもとのアセチル化ヒストン H3 および H4 レベルが肝臓で高いこと、TCDD 曝露後の肝臓で CYP1A1 上流の抑制型ヒストン修飾レベルが減少すること、また、TCDD 曝露後の脾臓で CYP1A1 上流がヘテロクロマチン化される可能性があることが関連することが考えられた (図 39)。

なお表 3、図 39 は未発表データで、投稿準備中である。

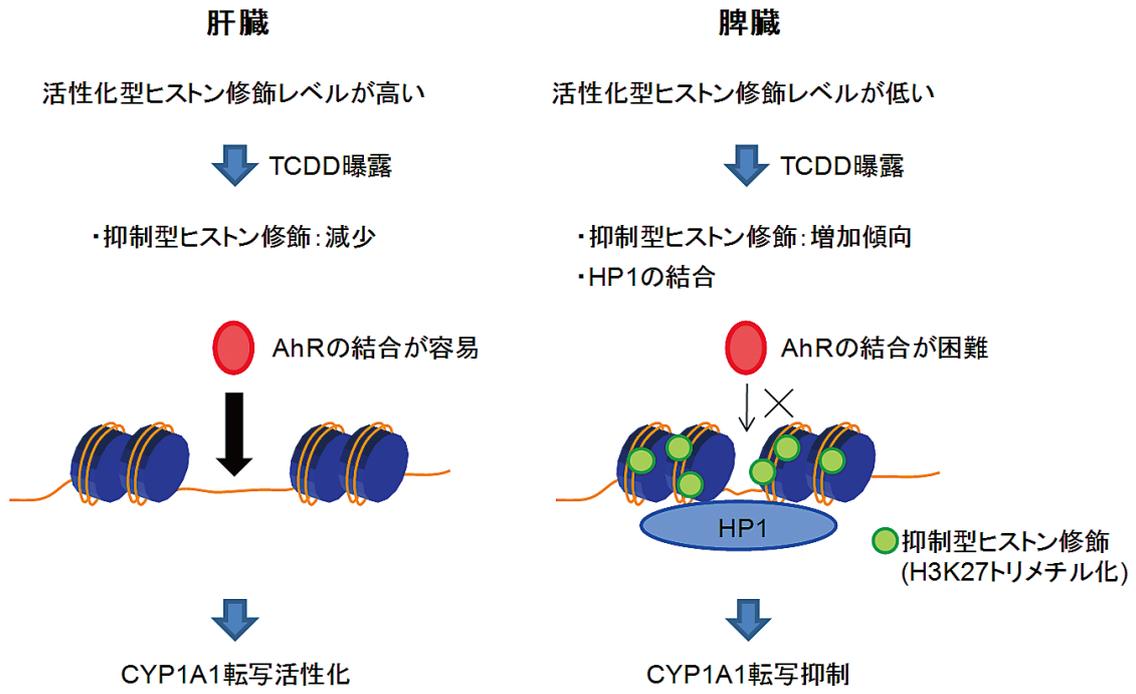


図 39 肝臓と脾臓における TCDD による CYP1A1 誘導メカニズムの模式図

[資 料]

## I 研究の組織と研究課題の構成

### 1 研究の組織

#### [A 研究担当者]

##### 環境健康研究領域

|               |                                      |
|---------------|--------------------------------------|
| 分子細胞毒性研究室     | 野原恵子<br>鈴木武博<br>小林弥生<br>前川文彦<br>馬場 崇 |
| NIES ポスドクフェロー | 内匠正太                                 |
| NIES ポスドクフェロー | 立石幸代                                 |
| アシスタントスタッフ    | 村井 景                                 |
| アシスタントスタッフ    | 松本みちよ                                |
| 生体影響評価研究室     | 柳澤利枝                                 |

##### 環境リスク研究センター

|            |      |
|------------|------|
| 健康リスク評価研究室 | 西村典子 |
| 高感受性影響研究室  | 塚原伸治 |

##### 環境研究基盤技術ラボラトリー

|           |      |
|-----------|------|
| 環境分析化学研究室 | 佐野友春 |
|-----------|------|

#### [B 客員研究員]

|      |           |                   |
|------|-----------|-------------------|
| 伊藤隆明 | (熊本大学大学院) | (平成 21 年度～ 22 年度) |
| 馬場 崇 | (九州大学大学院) | (平成 21 年度)        |

### 2 研究課題と担当者 (\*客員研究員)

- (1) 環境化学物質によるグローバル DNA メチル化変化とその機序  
野原恵子、佐野友春、馬場 崇、内匠正太、小林弥生、鈴木武博、立石幸代、西村典子、村井 景、松本みちよ
- (2) 飲水中無機ヒ素長期曝露による癌関連遺伝子の発現変化とエピジェネティック作用  
鈴木武博、西村典子、村井 景、野原恵子
- (3) 胎児期無機ヒ素曝露の影響とエピジェネティック作用  
野原恵子、立石幸代、鈴木武博、前川文彦、塚原伸治、村井 景、\*伊藤隆明、西村典子、馬場 崇、柳澤利枝、松本みちよ
- (4) ダイオキシンのエピジェネティック作用  
鈴木武博、野原恵子

## II 研究成果発表一覧

### 1 誌上発表

発表者・(刊年)・題目・掲載誌・巻(号)・頁

- Ao K, Suzuki T, Murai H, Matsumoto M, Nagai H, Miyamoto Y, Tohyama C, Nohara K (2009) Comparison of immunotoxicity among tetrachloro-, pentachloro-, tetrabromo- and pentabromo-dibenzo-p-dioxins in mice, *Toxicology*, 256, 25-31
- Cui X, Kobayashi Y, Akashi M, Okayasu R (2008) Metabolism and the paradoxical effects of arsenic: Carcinogenesis and anticancer, *Curr. Med. Chem.* 15, 2293-2304
- Funatake CJ, Ao K, Suzuki T, Murai H, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y, Kerkvliet NI, Nohara K (2009) Expression of constitutively-active aryl hydrocarbon receptor in T-cells enhances the down-regulation of CD62L, but does not alter expression of CD25 or suppress the allogeneic CTL response, *J. Immunotoxicol*, 6, 194-203
- Kimura A, Naka T, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y, Kishimoto T (2008) Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105, 9721-9726
- Kimura A, Naka T, Nakahama T, Chinen I, Masuda K, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y, Kishimoto T (2009) Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses, *J. Exp. Med.*, 206, 2027-2035
- Kobayashi Y, Negishi T, Mizumura A, Watanabe T, Hirano S (2008) Distribution and excretion of arsenic in cynomolgus monkey following repeated administration of diphenylarsinic acid, *Arch. Toxicol*, 82, 553-561
- Kobayashi Y, Hirano S (2008) Effects of endogenous hydrogen peroxide and glutathione on the stability of arsenic metabolites in rat bile, *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 232, 33-40
- Kobayashi Y (2010) Elucidation of the metabolic pathways of selenium and arsenic by analytical toxicology, *J. Health Sci.*, 56, 154-160
- Koike-Kuroda Y, Kakeyama M, Fujimaki H, Tsukahara S (2010) Use of live imaging analysis for evaluation of cytotoxic chemicals that induce apoptotic cell death, *Toxicology In Vitro*, 24, 2012-2020
- Maekawa F, Nakamori T, Uchimura M, Fujiwara K, Yada T, Tsukahara S, Kanamatsu T, Tanaka K, Ohki-Hamazaki H (2007) Activation of cholecystokinin neurons in the dorsal pallidum of the telencephalon is indispensable for the acquisition of chick imprinting behavior, *J. Neurochem*, 102, 1645-1657
- Mizumura A, Watanabe T, Kobayashi Y, Hirano S (2010) Identification of arsenite-and arsenic diglutathione-binding proteins in human hepatocarcinoma cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 242, 119-125
- Mori H, Matsuda KI, Tsukahara S, Kawata M (2010) Intrauterine position affects estrogen receptor alpha expression in the ventromedial nucleus of the hypothalamus via promoter DNA methylation, *Endocrinology*, 151, 5775-5781
- Nguyen NT, Kimura A, Nakahama T, Chinen I, Masuda K, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y, Kishimoto T (2010) Arylhydrocarbon receptor negatively regulated dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107, 19961-19966
- Nohara K, Ao K, Miyamoto Y, Suzuki T, Imaizumi S, Tateishi Y, Omura S, Tohyama C, Kobayashi T (2008) Arsenite-induced thymus atrophy is mediated by cell cycle arrest: A characteristic down-regulation of E2F-related genes revealed by a microarray approach, *Toxicol. Sci.* 101, 226-238
- Nohara K, Suzuki T, Ao K, Murai H, Miyamoto Y, Inouye K, Pan X, Motohashi H, Fujii-Kuriyama Y, Yamamoto M, Tohyama C (2009) Constitutively active aryl hydrocarbon receptor expressed in T cells increases immunization-induced IFN- $\gamma$  production in mice but does not suppress Th2-cytokine production or antibody production, *Int. Immunology*, 21, 769-777
- Nohara K, Baba T, Murai H, Kobayashi Y, Suzuki T, Tateishi Y, Matsumoto M, Nishimura N, Sano T (2011) Global DNA methylation in the mouse liver is affected by methy deficiency and arsenic in a sex-dependent manner, *Arch. Toxicol*, 85, 653-661
- 野原恵子 (2010) 無機ヒ素の胎児期曝露によるジェネティック／エピジェネティック変化, *臨床環境医学*, 19 (2), 66-71

野原恵子 (2011) 環境化学物質の健康影響研究－エピジェネティクスの導入による新展開, 科学技術動向, (118), 21-28

Ohtake F, Baba A, Takada I, Okada M, Iwasaki K, Miki H, Takahashi S, Kouzmenko A, Nohara K, Chiba T, Fujii-Kuriyama Y, Kato S (2007) Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase, *Nature*, 446, 562-566

Suzuki T, Nohara K (2007) Regulatory factors involved in species-specific modulation of arylhydrocarbon receptor (AhR)-dependent gene expression in humans and mice, *J. Biochem*, 142, 443-452

内匠正太, 村井景, 佐野友春, 野原恵子 (2011) メチル欠乏食及びヒ素投与マウス肝臓における酸化的 DNA 損傷と DNA メチル化解析, 日本衛生学雑誌, 66 (2), 438

Tsukahara S, Hojo R, Kuroda Y, Fujimaki H (2008) Estrogen modulates Bcl-2 family protein expression in the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area of postnatal rats, *Neuroscience Letters*, 432, 58-63

Tsukahara S (2009) Sex differences and roles of sex steroids in apoptosis of sexually dimorphic nuclei of preoptic area in postnatal rats, *J. Neuroendocrinol.*, 21, 370-376

山内兄人, 塚原伸治 (2009) ロードーシス神経制御機構の性差, *Clinical Neuroscience*, 27, 1120-1123

[著書・総説等]

塚原伸治 (2010) 哺乳類の性分化 (4章), 近藤保彦, 小川園子, 菊水建史, 山田一夫, 富原一哉, 脳とホルモンの行動学－行動神経内分泌学への招待－, 西村書店, 37-48

---

Ao K, Murai H, Suzuki T, Matsumoto M, Nagai H, Miyamoto Y, Tohyama C, Nohara K (2007) Immunotoxicities of brominated dioxins in mice, *Dioxin2007, Organohalogen Compounds*, 69, 1792

包金花, 前川文彦, 野原恵子 (2010) マウス肝臓における DNA メチル化酵素 Dnmt mRNA の概日周期とその制御, 第 17 回日本時間生物学会学術大会, 同要旨集, 84

岩倉聖, 加藤智啓, 塚原伸治, 津田夢芽子, 渡井浩太, 内村太一, 黒田淑子, 小川園子, 志賀隆, 大谷-金子律子 (2008) ラット性的二型核での臨界期における発現タンパク質の雌雄差—プロテオミクス法を用いた解析, 第 31 回日本神経科学大会, 同プログラム, 171

岩倉聖, 塚原伸治, 津田夢芽子, 佐野一広, 内村太一, 小川園子, 志賀隆, 加藤智啓, 大谷-金子律子 (2009) 臨界期におけるラット視床下部性的二型核でのタンパク質発現変化のプロテオミクス解析, 第 32 回日本神経科学大会, 同プログラム, 252

Kerkvliet N, Nohara K (2009) Transcriptional changes in immunotoxicology: Transcription factors, signal transduction, and epigenetics, *Society of Toxicology, 2009 annual meeting, The Toxicologist 108 suppliment, Program Number 1324*

木村仁美, 渡辺喬之, 小林弥生, 平野靖史郎 (2009) ペルオキシレドキシンのヒ素毒性発現修飾機構, 第 129 年会 日本薬学会, 同要旨集, 177

木村仁美, 小林弥生, 平野靖史郎 (2009) 細胞内チオール化合物への 3 価無機ヒ素の結合と細胞毒性, フォーラム 2009: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 同要旨集, 284

小林弥生, 根岸隆之, 水村綾乃, 平野靖史郎 (2007) ジフェニルアルシン酸を反復投与したカニクイザルにおけるヒ素の分布と排泄, 第 18 回日本微量元素学会, 同要旨集, 167

小林弥生, 根岸隆之, 水村綾乃, 平野靖史郎 (2007) ジフェニルアルシン酸を単回投与したカニクイザルにおけるヒ素の分布と排泄, フォーラム 2007: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 同要旨集, 92

小林弥生, 平野靖史郎 (2008) ラット胆汁中ヒ素代謝物におけるグルタチオンと過酸化水素の役割, 第 1 回メタロミクス研究フォーラム, 同要旨集, 68

小林弥生, 山城彩花, 水村綾乃, 平野靖史郎 (2009) ラット赤血球におけるヒ素蓄積に関する餌の影響 2, 第 129 年会 日本薬学会, 同要旨集

小林弥生, 山城彩花, 平野靖史郎 (2009) ラットにおけるジフェニルアルシン酸の胆汁排泄機構, 第 15 回ヒ素シンポジウム, 同要旨集, 66-67

小林弥生, 山城彩花, 平野靖史郎 (2009) 有機ヒ素化合物を経口投与したラットにおける胆汁および糞へのヒ素の排泄と化学形態別分析, フォーラム 2009: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 同要旨集, 283

小林弥生, 山城彩花, 平野靖史郎 (2010) ヒ素-グルタチオン抱合体の体外排泄に関する  $\gamma$ -GTP の影響, 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会, 同要旨集, S229

黒田淑子, 塚原伸治, 藤巻秀和 (2008) ライブイメージングと細胞の形態変化の定量的解析による新規神経毒性試験法の開発, 第 31 回日本分子生物学会年会

前川文彦, 包金花, 野原恵子 (2010) 環境応答に関わる DNA メチル基転移酵素 mRNA 発現の肝臓での概日周期, 環境ホルモン学会第 13 回研究発表会, 同要旨集, 141

森浩子, 松田賢一, 塚原伸治, 河田光博 (2009) 子宮内環境による視床下部エストロゲン受容体  $\alpha$  の発現量の制御, 第 32 回日本神経科学大会, 同プログラム, 102

永田知代, 津田夢芽子, 田中麻衣, 塚原伸治, 中西剛, 小川園子 (2008) 胎児期におけるエストロゲンの過剰産生が成体期の情動・社会行動に及ぼす影響, 日本動物心理学会第 68 会大会

西村典子, 梅津豊司, 西村久雄, 野原恵子 (2009) ヒ素長期曝露マウスの肝臓でみられた脂質代謝異常と肝組織中鉄の増加, メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会, 同要旨集, 69

西村典子, 西村久雄, 野原恵子 (2010) ヒ素曝露マウスでみられた脂質代謝異常と肝および腎における組織中微量元素含量の変動, 第 80 回日本衛生学会学術総会, 同要旨集, 353

Nohara K (2007) Activation of the transcription factor AhR in T cells only is not sufficient to generate CD62L<sup>low</sup>CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> putative regulatory T cells and suppress the allo-CTL response, 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会, 同記録, 64

- Nohara K, Fujimaki H (2007) Dioxin and allergy, 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会, アレルギー, 56, 973
- 野原恵子, 鈴木武博 (2008) ダイオキシン類の免疫毒性, 日本薬学会第 128 年会, 同要旨集, 114
- Nohara K, Ao K, Miyamoto Y, Inouye K, Pan X, Motohashi H, Yamamoto M, Tohyama C (2008) A constitutively active AhR expressed in T cells increases percentage of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells but does not suppress antibody production upon OVA-immunization of mice, Society of Toxicology: 2008 annual meeting, Seattle, The Toxicologist supplement, 102, 39-40
- 野原恵子 (2008) 環境化学物質のイムノトキシコゲノミクス, 第 15 回日本免疫毒性学会学術大会, 同要旨集, 24
- 野原恵子 (2009) ヒ素の毒性のゲノミクス・エピゲノミクス, 第 79 回日本衛生学会学術総会, 同要旨集, 205
- Nohara K (2009) The E2F family is a sensitive target of arsenite in the thymus: A characteristic down-regulation of E2F-related genes revealed by immunotoxicogenomics, Society of Toxicology, 2009 annual meeting, The Toxicologist 108 supplement, Program Number 1325
- Nohara K, Murai H, Sano T, Kobayashi Y, Tateishi Y, Suzuki T, Matsumoto M, Nishimura N, Baba T (2009) Sex-dependent effects of diet and arsenic on genomic DNA methylation, HORIBA International Conference CDBIM Symposium 21<sup>st</sup> Century Advances in the Molecular Toxicology of Environmental Chemicals and Pathogenesis of Disease, 同要旨集, 168
- 野原恵子, 佐野友春, 村井景, 小林弥生, 鈴木武博, 立石幸代, 松本みちよ, 西村典子, 馬場崇 (2009) Alteration of global DNA methylation induced by a methyl deficient diet and inorganic arsenic intake in mice, 第 32 回日本分子生物学会年会, 同要旨集, 149
- Nohara K, Sano T, Murai H, Kobayashi Y, Suzuki T, Tateishi Y, Matsumoto M, Nishimura N, Baba T (2010) Sex-dependent changes in genomic DNA methylation by methyl deficient diet and inorganic arsenic in the liver of mice, 第 9 回分子予防環境医学研究会, 同要旨集, 38
- 野原恵子 (2010) ヒ素の胎児期曝露によるジェネティクス/エピジェネティクス変化, 第 19 回日本臨床環境医学会学術集会, 同要旨集, 22
- 野原恵子 (2010) 環境化学物質のエピゲノミクス, 環境エピゲノミクス研究会第 3 回定例会, 同要旨集, 7-8
- 野原恵子, 立石幸代, 鈴木武博, 内匠正太, 前川文彦 (2010) 環境化学物質の生体影響とエピジェネティクス, 環境ホルモン学会第 13 回研究発表会, 同要旨集, 27
- 野原恵子, 前川文彦 (2011) 生活環境中の化学物質のエピジェネティック作用と後発的健康影響, 金沢大学政策課題対応推進シンポジウム,
- 野原恵子, 塚原伸治, 立石幸代, 鈴木武博, 前川文彦 (2011) C3H マウスにおける無機ヒ素胎児期曝露の性依存的後発影響, 第 16 回ヒ素シンポジウム, 同要旨集, 32-33
- 小川園子, 渡井浩太, 塚原伸治 (2008) 情動・社会行動の性差の神経内分泌基盤, 第 85 回日本生理学会大会
- 岡村和幸, 三木大介, 野原恵子 (2010) 無機ヒ素曝露によるリンパ球増殖抑制に関わる p130 増加のメカニズム, 第 17 回日本免疫毒性学会学術大会, 同要旨集, 110
- 岡村和幸, 三木大介, 野原恵子 (2010) 無機ヒ素曝露による p130 依存的なリンパ球増殖抑制のメカニズム, 第 33 回日本分子生物学会年会, 同要旨集, 260
- 岡村和幸, 三木大介, 野原恵子 (2011) 3 価の無機ヒ素曝露による p130 増加を介した細胞増殖抑制メカニズム, 第 16 回ヒ素シンポジウム, 同要旨集, 30-31
- 大井航, 粟生佳奈, 鈴木武博, 野原恵子 (2008) 有機スズは免疫細胞において E2F および p53 依存的に細胞増殖を抑制する, 第 31 回日本分子生物学会年会, 同要旨集, 835
- 佐野友春, 永野公代, 村井景, 野原恵子 (2009) 5-メチルデオキシシチジン (5mdC) サロゲートの合成と LC-MS 分析への応用, 日本分析化学会第 58 年会, 同要旨集, 355
- Suzuki T, Nohara K (2007) Histone deacetylases are involved in species-specific modulation of arylhydrocarbon receptor-dependent gene expression in humans and mice, Dioxin2007, Organohalogen Compounds, 69, 1858
- 鈴木武博, 村井景, 野原恵子 (2007) 無機ヒ素によって誘導されるグローバル DNA メチル化状態変化のマウス系統差における検討, BMB2007, 同講演要旨集, 643

- 鈴木武博, 村井景, 松本みちよ, 立石幸代, 西村典子, 小林弥生, 野原恵子 (2008) ヒ素の癌抑制遺伝子の発現調節への影響, 第 31 回日本分子生物学会年会, 同要旨集, 376
- 鈴木武博, 村井景, 西村典子, 小林弥生, 野原恵子 (2009) 無機ヒ素による p16INK4 $\alpha$  発現調節へのエピジェネテックス作用の関与, 第 8 回分子予防環境医学研究会, 同要旨集, 14
- Suzuki T, Takamoto K, Nohara K (2009) The investigation of tissue-specific modulation of AhR-dependent gene expression, Society of Toxicology, 2009 annual meeting, The Toxicologist 108 suppliment, Program Number 97
- 鈴木武博, 高本沙代子, 野原恵子 (2009) ダイオキシン毒性発現の臓器特異性とヒストン修飾との関連, 第 3 回日本エピジェネティクス研究年会, 同要旨集, 81
- 鈴木武博, 高本沙代子, 野原恵子 (2009) ダイオキシンによるエピジェネティック修飾持続性の臓器特異性の検討, 第 32 回日本分子生物学会年会, 同要旨集, 472
- 鈴木武博, 高本沙代子, 野原恵子 (2010) ダイオキシン再投与によるダイオキシン標的遺伝子発現調節の臓器特異性の検討, 第 80 回日本衛生学会学術総会, 同要旨集, 265
- 立石幸代, 村井景, 松本みちよ, 野原恵子 (2007) 無機ヒ素のマウスゲノム DNA メチル化状態に及ぼす影響の解析, BMB2007, 同講演要旨集, 643
- 立石幸代, 馬場崇, 野原恵子 (2008) DNA メチル化阻害剤による脱メチル化作用の解析, 第 31 回日本分子生物学会年会, 同要旨集, 791
- 立石幸代, 村井景, 伊藤隆明, 西村典子, 鈴木武博, 馬場崇, 松本みちよ, 野原恵子 (2009) 妊娠中の無機ヒ素摂取が仔の肝発癌に及ぼす影響の解析, 第 32 回日本分子生物学会年会, 同要旨集, 69
- 塚原伸治, 渡井浩太, 黒田淑子, 小澤貴明, 福士碧沙, 肖凱, 津田夢芽子, 戸田勝巳, 藤巻秀和, 小川園子 (2007) エストロゲン受容体ノックアウトマウスおよびアロマトーゼノックアウトマウスにおける分界条床核主核の形態学的性差の消失, 第 30 回日本神経科学大会, 同プログラム, 168
- 塚原伸治 (2008) 発達期の脳の性分化機構におよぼす化学物質の影響, 第 128 回日本薬学会年会, 同プログラム, 40
- 塚原伸治 (2008) 発達期の性的二型核におけるアポトーシスに関する研究 (日本神経内分泌学会川上賞受賞講演), 第 35 回日本神経内分泌学会・第 23 回日本下垂体研究会合同学術集会, 同抄録集, 39
- Tsukahara S (2008) Sex difference in apoptosis and role of estrogen in the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area (SDN-POA) in postnatal rats, US/Japan Neurosteroid Symposium 2008, 同要旨集, 39
- Tsukahara S (2008) Effects of developmental exposure to toluene on the sexual differentiation of the brain, Japan/China Symposium 2008 (KIZUNA2008), Strategies to Reduce Risks on the Brain Development Contingent to Urbanization, 同要旨集, 20
- 塚原伸治, 黒田淑子, 藤巻秀和 (2009) ライブイメージング手法を用いた神経毒性試験法による PC12 細胞のアポトーシスに対する亜ヒ酸ナトリウムを曝露の影響解析, 第 32 回日本神経科学大会, 同プログラム, 274
- 塚原伸治, 渡井浩太, 黒田淑子, 加藤行則, 仲田真理子, 肖凱, 津田夢芽子, 戸田勝巳, 小川園子 (2009) マウスの分界条床核の性差形成におけるエストロゲンの役割, 第 36 回日本神経内分泌学会, 同抄録集, 32
- Tsukahara S, Kuroda Y, Fujimaki H (2009) Live imaging of sodium arsenite-induced apoptosis in PC12 cells, PPTOXII, Role of Environmental Stressors in the Developmental Origins of Disease, 同要旨集, S42
- Tsukahara S, Tsuda M, Kato Y, Kuroda Y, Nakata M, Xiao K, Nagata K, Nakanishi T, Toda K, Ogawa S (2010) Elimination of the morphological sex difference in the BNSTp of mice lacking the aromatase, estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), or ER $\beta$  gene, 7th International Congress of Neuroendocrinology, 同要旨集, 216
- 塚原伸治 (2010) げっ歯類における性的二型核の形成と性ステロイドの役割, 日本動物学会第 81 回大会, 同要旨集, 52
- Tsukahara S (2010) Involvement of postnatal apoptosis and effects of developmental chemical exposure on SDN-POA formation in rats, Neuro2010 (第 33 回日本神経科学大会), 同プログラム, 69
- 内村太一, 渡井浩太, 津田夢芽子, 柏村実生, 肥後明花, 塚原伸治, Nandini Vasudevan, 小川園子 (2008) 攻撃行動の選択交配系マウスの扁桃体におけるタンパク質発現の解析, 日本動物心理学会第 68 回大会

Uchimura T, Fukushi A, Tsuda MC, Sano K, Kashimura M, Higo S, Hood KE, Tsukahara S, Vasudevan N, Ogawa S (2008) Anxiety and exploratory behaviors and social interactions in mice selectively bred for aggressiveness, 38th Annual Meeting of Society for Neuroscience

渡辺喬之, 菅野さな枝, 小林弥生, 平野靖史郎(2008)ヒトAS3MTを発現させたCHO細胞におけるヒ素代謝と毒性, フォーラム 2008: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 同要旨集, 101

山城彩花, 小林弥生, 平野靖史郎(2009)ヒ素の体内動態と代謝における $\gamma$ -GTPの役割, 第129年会 日本薬学会, 同要旨集, 177

山城彩花, 小林弥生, 平野靖史郎(2009)ヒ素-グルタチオン抱合体排泄に及ぼす $\gamma$ -GTPの影響, フォーラム 2009: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 同要旨集, 281

---

REPORT OF SPECIAL RESEARCH FROM  
THE NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES, JAPAN

国立環境研究所特別研究報告

SR - 94 - 2011

---

平成 23 年 9 月 30 日発行

編 集 国立環境研究所 編集委員会

発 行 独立行政法人 国立環境研究所

〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16 番 2

電話 029-850-2343 (ダイヤルイン)

---

印 刷 株式会社 イ セ ブ

〒305-0005 茨城県つくば市天久保 2 丁目 11-20

Published by the National Institute for Environmental Studies

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

September 2011

---

無断転載を禁じます

リサイクル適性の表示：紙へリサイクル可  
本冊子は、グリーン購入法に基づく基本方針における「印刷」に係る判断の基準にしたがい、印刷用の紙へのリサイクルに適した材料 [A ランク] のみを用いて作製しています。