

IV. 平成22年度終了特別研究

2. 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

研究目的・目標の達成度

[研究目的]

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、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、塩基配列の変化によらず、DNAメチル化やヒストン修飾などの、いわゆるエピジェネティックな修飾による遺伝子発現の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。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、後発的な影響や経世代影響と密接に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。

本研究では、現在世界各国で発癌などの健康被害をもたらしているヒ素を中心に、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する。また環境研で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る。

[研究内容]

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・経世代影響

サブ1-1. 無機ヒ素のエピジェネティクス

代表的なエピジェネティック作用の機序は、DNAメチル化修飾（5メチルシトシン修飾）およびヒストンのメチル化/アセチル化修飾変化による遺伝子発現調節である。複数のグループの先行研究で、マウスへのヒ素の長期曝露または胎児期曝露による発癌増加とDNAメチル化変化の関連が報告されている。本研究ではこれらの実験系において、詳細なエピジェネティック作用の解析と生体影響との関連について検討した。

1-1-1. ヒ素の胎児期曝露

胎児期は一般的に化学物質に感受性が高い時期である。妊娠中にヒ素曝露を受けたC3Hマウスの仔(雄)が74週(1年5カ月)令に達した時に肝癌を高率に発症することがWaalkesら(2004)によって報告され、エストロゲン受容体 α (ER α)プロモーター領域のDNAメチル化低下を介したER α の発現上昇が原因であることが示唆されている。この実験系において、ヒ素の発癌への影響および各種後発影響とエピジェネティック作用の関連を検討する研究を行った。

方法: 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85ppm亜ヒ酸を含む水を投与し、生まれた仔について約74週令まで経時的に検討を行った。遺伝子発現はリアルタイムPCRで、DNAメチル化はBisulfiteシーケンシング法で、ヒストン修飾変化はクロマチン免疫沈降(ChIP)法で、タンパク発現はWestern blottingで検討した。血漿インスリン値はELISA法、血糖値はグルテストNeoスーパーにより測定した。74週令雌雄の肝臓の腫瘍(腺腫・癌)の有無について、熊本大学・伊藤隆明教授の協力を得て病理組織観察を行った。遺伝子発現の網羅的測定はGeneChip(Affymetrix社)を用いて行った。ゲノムワイドな領域特異的DNAメチル化変化の測定は、国立がんセンター・牛島俊和博士、山下聡博士の協力を得て、タイリングアレイの一種であるCpG islandアレイ(Agilent社)を用いたMeDIP-アレイ(Methylated

DNA-Immunoprecipitation (Array) 法で行った。

1-1-2. 飲水中ヒ素の長期曝露

Cui ら (2006) の先行研究で、A/J マウスにヒ素を長期投与すると肺癌が増加すること、その癌組織では癌抑制遺伝子の DNA メチル化増加と発現抑制が起こることが報告され、DNA メチル化変化の発癌への寄与が示唆されている。しかしこの報告では、癌抑制遺伝子の発現低下が癌の原因か結果かは不明である。そこで癌を発症しにくい C57BL/6 マウスにおいて、ヒ素曝露による癌抑制遺伝子の発現変化や DNA メチル化、ヒストン修飾変化を検索し、因果関係の検討を試みた。

方法：雌雄 C57BL/6 マウスに 50 ppm 亜ヒ酸を 6 カ月飲水投与し、肝臓および肺における癌関連遺伝子 (p16INK4a, Rassf1a, ER α , Cyclin D1) の発現をリアルタイム PCR 法で、プロモーター領域の DNA メチル化を Bisulfite シークエンス法で、ヒストン修飾を ChIP 法で調べた。

1-1-3. 低メチル食および飲水中ヒ素の長期曝露

Okoji ら (2002) の先行研究で、C57BL/6 マウス (雄) を低メチル食、または低メチル食+亜ヒ酸飲水投与で飼育することによって、肝臓の 5 メチルシトシン量がそれぞれ約 25%、または 60-90% と大幅に低下することが報告されている。本研究では 5 メチルシトシン量の精密分析法を確立し、Okoji らと同一の実験系において 5 メチルシトシン量を測定し、ヒ素によるグローバル DNA メチル化変化量を明らかにした。

方法：5-methyldeoxycytidine (5medC) のイオン化効率補正用安定同位体標識化合物を合成し、5 メチルシトシン量を 5medC として LC/ESI-MS 法で精密測定する方法を確立した。雌雄 C57BL/6 マウスを Okoji らの実験系にならって普通食 (MSD)、低メチル食 (MDD) または低メチル食+飲水中 50 ppm 亜ヒ酸投与 (MDD+As) で 5 ヶ月間飼育し、肝臓の 5 メチルシトシンを定量した。

サブ 1-2. ダイオキシンのエピジェネティクス

ダイオキシンは転写因子 AhR と結合し、AhR を活性化して遺伝子発現を誘導することによって毒性を発揮する。ダイオキシンに対する感受性には臓器特異性があり、その感受性は活性化した AhR によって誘導される CYP1A1 などの遺伝子の発現の強さと相関すると考えられている。マウスの肝臓はダイオキシンによって CYP1A1 発現が強く誘導され、脾臓では弱い。このようなダイオキシン感受性の差にエピジェネティック作用が関与するかどうかを検討した。

方法：C57BL/6 マウス雌にダイオキシンを投与し、肝臓と脾臓の CYP1A1 の発現はリアルタイム PCR で、各種ヒストン修飾は ChIP 法で調べた。

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

2-1. ヒ素による DNA メチル化変化と S-adenosylmethionine (SAM)、DNA メチル基転移酵素 (DNMT) の関連の検討

DNA は SAM よりメチル基を供与され、DNMT の作用によってメチル化される。ヒ素も体内では SAM からメチル基を供与されてメチル化されることから、ヒ素による SAM の消費を原因とする DNMT の発現抑制がグローバル DNA 低メチル化を誘導することが示唆されている。ヒ素によるグローバル DNA メチル化変化の機序を探るため、上記の 1-3. 低メチル食および飲水中ヒ素の長期曝露の実験系において、SAM や DNMT 発現量の関係を検討した。

方法：SAM と脱メチル化物である SAH の量は HPLC で測定した。DNMT 3 種類 (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b) の発現量はリアルタイム PCR で測定した。

2-2. メチル欠乏食およびヒ素による酸化的 DNA 損傷と DNA メチル化変化の関連

ヒ素による DNA メチル化変化の機序を探ることを目的として、ヒ素の酸化ストレスによる DNA 損傷に着目して DNA メチル化変化との関連を解析した。具体的には、DNA のメチル化に関与するメチオニン、コリンを除去した methionine choline deficient diet (MCD 食) 及び DNA の低メチル化を引き起こすことが報告されているヒ素を投与することにより、酸化ストレスと DNA メチル化変化との関連について性差を含め検討を行った。

方法：雌雄 C57BL/6 マウスを普通食、MCD 食、普通食+ヒ素 (50 ppm 亜ヒ酸) 飲水投与、MCD 食+ヒ素飲水投与で 1 または 3 週間飼育し、肝臓について、酸化的 DNA 損傷の一種である 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) を HPLC-EGD 法で測定し、DNA メチル化量は 5-medC を LC/ESI-MS 法により精密測定した。更に、酸化ストレス関連遺伝子、及び DNA メチル基転移酵素 (DNMT) の発現をリアルタイム PCR により解析した。

研究予算

(予算額、単位：千円)

	H19	H20	H21	H22	累計
サブテーマ 1	18,000	18,000	16,000	14,000	66,000
サブテーマ 2	2,000	2,000	4,000	6,000	14,000
合計	20,000	20,000	20,000	20,000	80,000

研究成果の概要

[本研究で得られた成果]

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・経世代影響

サブ 1-1. 無機ヒ素のエピジェネティクス

代表的なエピジェネティック作用の機序は、DNA メチル化修飾 (5 メチルシトシン修飾) およびヒストンのメチル化/アセチル化修飾変化による遺伝子発現調節である。複数のグループの先行研究で、マウスへのヒ素の長期曝露または胎児期曝露による発癌増加と DNA メチル化変化の関連が報告されている。本研究ではこれらの実験系において、詳細なエピジェネティック作用の解析と生体影響との関連について検討した。

1-1-1. ヒ素の胎児期曝露

胎児期は一般的に化学物質に感受性が高い時期である。妊娠中にヒ素曝露を受けた C3H マウスの仔(雄)が 74 週 (1 年 5 カ月) 令に達した時に肝癌を高率に発症することが Waalkes ら (2004) によって報告され、エストロゲン受容体 α ($ER\alpha$) プロモーター領域の DNA メチル化低下を介した $ER\alpha$ の発現上昇が原因であることが示唆されている。この実験系において、ヒ素の発癌への影響および各種後発影響とエピジェネティック作用の関連を検討する研究を行った。

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 亜ヒ酸を含む水を投与し、生まれた仔について約 74 週令まで経時的に検討を行った。

その結果、①ヒ素曝露したマウスより生まれた仔(ヒ素曝露群、F1)の雄でのみ肝臓で腫瘍の増加を確認し、先行研究と同一の結果を得た。しかし、対照群 (ヒ素非曝露群) 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検討を行った結果、先行研究で報告されたヒ素曝露による $ER\alpha$ プロモーター領域の DNA メチル化低下も $ER\alpha$ の発現上昇も認められなかった。すなわち、ヒ素による腫瘍の増加には $ER\alpha$ の DNA メチル化変化と発現変化は必須でないことが示された。

さらに本研究では新たな結果として、②胎児期のみのヒ素曝露によって、雄の仔の肝臓で 6 週令までは変化がないが、49 週令以降または 74 週令で後発的に発現変化する遺伝子の存在をみいだした。これらの遺伝子の中にはプロモーター領域のヒストン修飾が変化しているものが含まれ、ヒストン修飾が遺伝子発現変化に関与することが示唆された。一方 DNA メチル化変化は検出されず、DNA メチル化の関与はないと考えられ

た。また F1 雌雄の仔 (F2) の肝臓では同様な遺伝子発現変化は観察されず、F2 への経世代影響は見られなかった。

さらに後発影響として、③60 週令の雌雄の仔の脳の内側視索前野でそれぞれアンドロゲン受容体 (AR α) と ER α のタンパク量が増加すること、これらの増加はリガンド非依存的であることが明らかとなった。

④代謝機能への後発影響の総合的解析を行い、胎児期ヒ素曝露が 60 週令雄マウスにおいて、体重増加や血糖値の上昇をはじめとする前糖尿病段階を導く可能性を明らかにした。これらの後発影響に対するエピジェネティック作用の関与に関して今後検討が必要である。

また、⑤集団型全自動行動学習装置 IntelliCage を用いて、空間学習や高次認知機能を測定する簡便かつ再現性の極めて高い試験法を確立し、ヒ素曝露による影響の検出を開始した。

⑥ヒ素による肝臓に特有な DNA メチル化変化を検索するために、74 週令雄の対照群の正常肝臓とヒ素曝露群の肝臓組織について、最新の手法の一つである MeDIP-アレイ法を用いてゲノムワイドな領域特異的 DNA メチル化状態の測定を行い、現在データ解析を行っている。今後ヒ素特有の肝臓増加に関するエピジェネティックマーカー開発の可能性を検討する計画である。

1-1-2. 飲水中ヒ素の長期曝露

Gui ら (2006) の先行研究で、A/J マウスにヒ素を長期投与すると肺癌が増加すること、その癌組織では癌抑制遺伝子の DNA メチル化増加と発現抑制が起こることが報告され、DNA メチル化変化の発癌への寄与が示唆されている。しかしこの報告では、癌抑制遺伝子の発現低下が癌の原因か結果かは不明である。そこで癌を発症しにくい C57BL/6 マウスにおいて、ヒ素曝露による癌抑制遺伝子の発現変化や DNA メチル化、ヒストン修飾変化を検索し、因果関係の検討を試みた。

雌雄 C57BL/6 マウスに 50 ppm 亜ヒ酸を 6 カ月飲水投与し、肝臓および肺における 癌関連遺伝子 (p16INK4a, Rassf1a, ER α , Cyclin D1) の発現や、プロモーター領域の DNA メチル化、ヒストン修飾を調べた。曝露後、対照群・ヒ素曝露群雌雄において肝臓と肺に腫瘍がないことを確認した。これらのマウスの肝臓と肺について検討した結果、ヒ素曝露群の雄の肝臓でのみ、癌抑制遺伝子 p16INK4a の発現が低下していることが明らかとなった。p16INK4a プロモーター領域において DNA メチル化変化は検出されなかったが、抑制型ヒストンメチル化 (H3K9me2) および H3K9 メチル化酵素 G9a の増加が検出された。以上より、ヒ素による p16INK4a 癌抑制遺伝子の発現低下に G9a のリクルートを介した抑制型ヒストン修飾の誘導が関与することが示唆された。同時にヒ素の作用に性差と臓器特異性があることが示された。

1-1-3. 低メチル食および飲水中ヒ素の長期曝露

Okoji ら (2002) の先行研究で、C57BL/6 マウス (雄) を低メチル食、または低メチル食+亜ヒ酸飲水投与で飼育することによって、肝臓の 5 メチルシトシン量がそれぞれ約 25%、または 60-90% と大幅に低下することが報告されている。本研究では 5 メチルシトシン量の精密分析法を確立し、Okoji らと同一の実験系において 5 メチルシトシン量を測定し、ヒ素によるグローバル DNA メチル化変化量を明らかにした。

これまでの研究では、グローバル DNA メチル化変化すなわち 5 メチルシトシン量は、ラジオアイソトープラベルしたメチル基を酵素存在下 DNA にとりこませる等の方法で行われていた。本研究では、5-methyldeoxycytidine (5medC) のイオン化効率補正用安定同位体標識化合物を合成し、5 メチルシトシン量を 5medC として LC/ESI-MS 法で精密測定する方法を確立した。雌雄 C57BL/6 マウスを Okoji らの実験にならって普通食 (MSD)、低メチル食 (MDD) または低メチル食+飲水中 50 ppm 亜ヒ酸投与 (MDD+As) で 5 ヶ月間飼育し、肝臓の 5 メチルシトシンを定量した。

その結果、全シトシン中の 5 メチルシトシン量の割合は、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普通食 (MSD) > 低メチル食 (MDD) > 低メチル食+ヒ素飲水投与 (MDD+As) の順に低下傾向を示し、雌では反

対に MSD<MDD<MDD+As の順に増加することが明らかとなり、ヒ素による DNA メチル化変化に性差があることがわかった。この性差がヒ素に対する感受性の性差に関与することが示唆された。

サブ1-2. ダイオキシンのエピジェネティクス

ダイオキシンは転写因子 AhR と結合し、AhR を活性化して遺伝子発現を誘導することによって毒性を発揮する。ダイオキシンに対する感受性には臓器特異性があり、その感受性は活性化した AhR によって誘導される CYP1A1 などの遺伝子の発現の強さと相関すると考えられている。マウスの肝臓はダイオキシンによって CYP1A1 発現が強く誘導され、脾臓では弱い。このようなダイオキシン感受性の差にエピジェネティック作用が関与するかどうかを検討した。

C57BL/6 マウス雌にダイオキシンを投与し、肝臓と脾臓の CYP1A1 の発現、および各種ヒストン修飾は ChIP 法で調べた。

ダイオキシンによって誘導される CYP1A1 遺伝子のエンハンサー領域のヒストン修飾を肝臓と脾臓で比較した結果、肝臓に比べて脾臓では、もともとの抑制型ヒストン修飾 (H3K27me3) レベルが高く、活性化型ヒストン修飾である H3Ac、H4Ac レベルが低いことが明らかとなった。また、ダイオキシン曝露によって肝臓では H3Ac、H4Ac レベルが大きく減少し、脾臓では H3K27me3 レベルの増加傾向とヘテロクロマチンプロテイン 1 の有意な結合増加が明らかになり、エピジェネティック修飾がその後のダイオキシン反応性に関与することが示唆された

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

2-1. ヒ素による DNA メチル化変化と S-adenosylmethionine (SAM)、DNA メチル基転移酵素 (DNMT) の関連の検討

DNA は SAM よりメチル基を供与され、DNMT の作用によってメチル化される。ヒ素も体内では SAM からメチル基を供与されてメチル化されることから、ヒ素による SAM の消費を原因とする DNMT の発現抑制がグローバル DNA 低メチル化を誘導することが示唆されている。ヒ素によるグローバル DNA メチル化変化の機序を探るため、上記の 1-3. 低メチル食および飲水中ヒ素の長期曝露の実験系において、SAM や DNMT 発現量の関係を検討した。

上記 1-1-3. で DNA メチル化を測定した実験系で、肝臓の SAM 量および DNMT 発現量を測定した。雄の SAM の量は普通食 (MSD)、低メチル食 (MDD)、低メチル食+ヒ素飲水投与 (MDD+As) 群で差がなかったが、雌では MDD 群、MDD+As 群で SAM 量が有意に低下した。1-1-3. の結果と考え合わせると、ヒ素が SAM を低下させてグローバルな DNA 低メチル化を誘導するという仮説が成り立たないことが示され、グローバル DNA メチル化変化を誘導する他の因子があることが示唆された。また DNMT1 の発現量は雄では MSD 群に比較して MDD 群、MDD+As 群で有意に低下し、低メチル食やヒ素が雄では DNMT1 の発現を抑制し、DNA メチル化を抑制した可能性が示唆された。

2-2. メチル欠乏食およびヒ素による酸化的 DNA 損傷と DNA メチル化変化の関連

ヒ素による DNA メチル化変化の機序を探ることを目的として、ヒ素の酸化ストレスによる DNA 損傷に着目して DNA メチル化変化との関連を解析した。具体的には、DNA のメチル化に関与するメチオニン、コリンを除去した methionine choline deficient diet (MCD 食) 及び DNA の低メチル化を引き起こすことが報告されているヒ素を投与することにより、酸化ストレスと DNA メチル化変化との関連について性差を含め検討を行った。

雌雄 C57BL/6 マウスを普通食、MCD 食、普通食+ヒ素 (50 ppm 亜ヒ酸) 飲水投与、MCD 食+ヒ素飲水投与で1または3週間飼育し、肝臓について検討を行った。

メチオニン・コリン欠乏食 (MCD 食) 投与群では1週間後、雄で各種酸化ストレス関連遺伝子の発現が有意

に増加し、3週間で雄雌共に酸化 DNA 損傷の一種である 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) が有意に増加した。また3週間で5メチルシトシンが有意に減少しており、8-OHdG と5メチルシトシンが負の相関を示すことが明らかになった。更に、1及び3週間でDNAメチル基転移酵素 (DNMT) 遺伝子の中に発現が有意に増加するものがみつかった。以上の結果から、MCD食投与により生じた酸化ストレスが酸化 DNA 損傷の誘発を介して、DNAの低メチル化及びそれに伴うDNMT遺伝子の発現誘導を引き起こしていることが示唆された。一方、1~3週間の50ppmヒ素投与では、雄で5メチルシトシンの有意な減少が観察されたがその程度はMCD食による減少より少なく、酸化ストレス関連遺伝子の発現や8-OHdG生成、DNMT発現には顕著な影響は確認されず、50ppm亜ヒ酸短期曝露の影響はメチル欠乏食の影響より弱いことが示された。

[研究目的・目標の達成度 (自己評価)]

本研究では、化学物質に対する感受性が高い胎児期における曝露や、また長期曝露の実験系において、性差・臓器特異性や後発・経世代影響に注目してエピジェネティクス変化を明らかにし、生体影響との関連に関する考察を行った。その結果、従来の仮説と異なる結論に至るデータを含め、ヒ素のエピジェネティック作用の性質に関して当初の予想を上回る多くの知見を得ることができた。本研究で得られた成果は、化学物質の生体影響評価に今後エピジェネティクスからの視点を加える上で重要な科学的知見を提供するものと考えられる。5メチルシトシンの精密分析法を確立し、エピジェネティクス研究に技術的にも貢献した。その他、化学物質のエピジェネティクスに関して、招待講演5件を含むシンポジウム講演や、世界最大の毒性学会である米国毒性学会大会、および日本エピゲノミクス研究会定例会でシンポジウムセッションを企画・進行し、新たな研究分野の重要性の普及に貢献した。

誌上発表及び口頭発表

誌上発表（査読あり）

1. Nohara K., Baba T., Murai H., Kobayashi Y., Suzuki T., Tateishi Y., Matsumoto M., Nishimura N. and Sano T.: Global DNA methylation in the mouse liver is affected by methyl deficiency and arsenic in a sex-dependent manner, *Arch. Toxicol.* in press
2. Nguyen NT., Kimura A., Nakahama T., Chinen I., Masuda K., Nohara K., Fujii-Kuriyama Y. and Kishimoto T.: Aryl hydrocarbon receptor negatively regulated dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 19961-19966, 2010
3. Koike-Kuroda Y., Kakeyama M., Fujimaki H. and Tsukahara S.: Use of live imaging analysis for evaluation of cytotoxic chemicals that induce apoptotic cell death, *Toxicology In Vitro* 24: 2012-2020, 2010
4. Mori H., Matsuda KI., Tsukahara S. and Kawata M.: Intrauterine position affects estrogen receptor alpha expression in the ventromedial nucleus of the hypothalamus via promoter DNA methylation, *Endocrinology* 151: 5775-5781, 2010
5. Mizumura A., Watanabe T., Kobayashi Y. and Hirano S.: Identification of arsenite- and arsenic diglutathione-binding proteins in human hepatocarcinoma cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 242: 119-125, 2010
6. Nohara K., Suzuki T., Ao K., Murai H., Miyamoto Y., Inouye K., Pan X., Motohashi H., Fujii-Kuriyama Y., Yamamoto M. and Tohyama C.: Constitutively active aryl hydrocarbon receptor expressed in T cells increases immunization-induced IFN- γ production in mice but does not suppress Th2-cytokine production or antibody production, *Int. Immunology* 21: 769-777, 2009
7. Funatake CJ., Ao K., Suzuki T., Murai H., Yamamoto M., Fujii-Kuriyama Y., Kerkvliet NI. and Nohara K.: 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, 2009
8. Kimura A., Naka T., Nakahama T., Chinen I., Masuda K., Nohara K., Fujii-Kuriyama Y. and Kishimoto T.: Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses, *J. Exp. Med.* 206: 2027-2035, 2009
9. Ao K., Suzuki T., Murai H., Matsumoto M., Nagai H., Miyamoto Y., Tohyama C. and Nohara K.: Comparison of immunotoxicity among tetrachloro-, pentachloro-, tetrabromo- and pentabromo-dibenzo-p-dioxins in mice, *Toxicology* 256: 25-31, 2009
10. Kimura A., Naka T., Nohara K., Fujii-Kuriyama Y. and Kishimoto T.: Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells, *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. U. S. A.* 105: 9721-9726, 2008
11. Nohara K., Ao K., Miyamoto Y., Suzuki T., Imaizumi S., Tateishi Y., Omura S., Tohyama C. and Kobayashi T.: 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, 2008
 12. Tsukahara S., Hojo R., Kuroda Y. and Fujimaki H.: Estrogen modulates Bcl-2 family protein expression in the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area of postnatal rats, *Neuroscience Letters* 432: 58-63, 2008.
 13. Cui X., Kobayashi Y., Akashi M. and Okayasu R.: Metabolism and the paradoxical effects of arsenic: Carcinogenesis and anticancer, *Curr. Med. Chem.* 15: 2293-2304, 2008
 14. Kobayashi Y. and Hirano S.: Effects of endogenous hydrogen peroxide and glutathione on the stability of arsenic metabolites in rat bile, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 232: 33-40, 2008
 15. Kobayashi Y., Negishi T., Mizumura A., Watanabe T. and Hirano S.: Distribution and excretion of arsenic in cynomolgus monkey following repeated administration of diphenylarsinic acid, *Arch. Toxicol.* 82: 553-561, 2008
 16. Suzuki T. and Nohara K.: Regulatory factors involved in species-specific modulation of arylhydrocarbon receptor (AhR)-dependent gene expression in humans and mice, *J. Biochem.* 142: 443-452, 2007
 17. Ohtake F., Baba A., Takada I., Okada M., Iwasaki K., Miki H., Takahashi S., Kouzmenko A., Nohara K., Chiba T., Fujii-Kuriyama Y. and Kato S.: Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase, *Nature* 446: 562-566, 2007
 18. Maekawa F., Nakamori T., Uchimura M., Fujiwara K., Yada T., Tsukahara S., Kanamatsu T., Tanaka K. and Ohki-Hamazaki H.: Activation of cholecystokinin neurons in the dorsal pallium of the telencephalon is indispensable for the acquisition of chick imprinting behavior, *J. Neurochem.* 102: 1645-1657, 2007

著書・総説等

1. 野原恵子：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（印刷中）
2. 野原恵子：環境化学物質の健康影響研究—エピジェネティクスへの導入によるの新展開，科学技術動向 2011年1月号
3. Kobayashi Y.: Elucidation of the metabolic pathways of selenium and arsenic by analytical toxicology, *J. Health Sci.* 56: 154-160, 2010
4. 塚原伸治：哺乳類の性分化(4章)「脳とホルモンの行動学—行動神経内分泌学への招待—(編集：近藤保彦、小川園子、菊水建史、山田一夫、富原一哉)」西村書店, 37-48, 2010
5. Tsukahara S.: Sex differences and roles of sex steroids in apoptosis of sexually dimorphic nuclei

of preoptic area in postnatal rats, *J. Neuroendocrinol.* 21: 370-376, 2009

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

口頭発表

1. 内匠正太、村井景、佐野友春、野原恵子：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, 第 81 回日本衛生学会学術総会, 2011.3
2. 野原恵子、塚原伸治、立石幸代、鈴木武博、前川文彦：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, 2011.2
3. 岡村和幸、三木大介、野原恵子：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, 2011.2
- 4 *. 野原恵子、前川文彦：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, 「食」による生活習慣病予防医学の展開, 2011.2
5. 前川文彦、包金花、野原恵子：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, 2010.12
- 6 *. 野原恵子、立石幸代、鈴木武博、内匠正太、前川文彦：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, 2010.12
7. 岡村和幸、三木大介、野原恵子：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, 2010.12
8. 包金花、前川文彦、野原恵子：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, 2010.11
9. 岡村和幸、三木大介、野原恵子：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, 2010.9
- 10 *. 野原恵子：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, 2010.7
- 11 *. 野原恵子：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, 2010.7
12. 西村典子、西村久雄、野原恵子：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, 2010.5
13. 鈴木武博、高本沙代子、野原恵子：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, 2010.5
14. Tsukahara S.: 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), 2010.9
15. 塚原伸治：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, 2010.9

16. Tsukahara S., Tsuda M., Kato Y., Kuroda Y., Nakata M., Xiao K., Nagata K., Nakanishi T., Toda K. and Ogawa S.: Elimination of the morphological sex difference in the BNSTp of mice lacking the aromatase, estrogen receptor α (ER α), or ER β gene, 7th International Congress of Neuroendocrinology, 2010.7
17. 小林弥生、山城彩花、平野靖史郎：ヒ素-グルタチオン抱合体の体外排泄に関する γ -GTP の影響, 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会, 2010.6
18. Nohara K., Sano T., Murai H., Kobayashi Y., Suzuki T., Tateishi Y., Matsumoto M., Nishimura N. and Baba T.: 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, 2010.1
19. 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：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, 2009.12
20. 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：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, 2009.12
21. 鈴木武博、高本沙代子、野原恵子：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, 2009.12
22. Nohara K., Murai H., Sano T., Kobayashi Y., Tateishi Y., Suzuki T., Matsumoto M., Nishimura N. and Baba T.: Sex-dependent effects of diet and arsenic on genomic DNA methylation, HORIBA International Conference CDBIM Symposium 21st Century Advances in the Molecular Toxicology of Environmental Chemicals and Pathogenesis of Disease, 2009.10
23. 西村典子、梅津豊司、西村久雄、野原恵子：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铁の増加, 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, 2009.10
24. 佐野友春、永野公代、村井景、野原恵子：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, 2009. 9
25. 鈴木武博、高本沙代子、野原恵子：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, 2009.5
26. Tsukahara S., Kuroda Y. and Fujimaki H.: Live imaging of sodium arsenite-induced apoptosis in PC12 cells, PPTOXII: Role of Environmental Stressors in the Developmental Origins of Disease, 2009.12
27. 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：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, 2009.9
28. 森浩子、松田賢一、塚原伸治、河田光博：子宮内環境による視床下部エストロゲン受容体 α の発現量の制御, 第 32 回日本神経科学大会, 2009.9

29. 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：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，2009.9
30. 塚原伸治、黒田淑子、藤巻秀和：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，2009.9
31. 小林弥生、山城彩花、平野靖史郎：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，2009.11
32. 小林弥生、山城彩花、平野靖史郎：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，2009.11
33. 山城彩花、小林弥生、平野靖史郎：ヒ素—グルタチオン抱合体排泄に及ぼす γ -GTP の影響，フォーラム 2009：衛生薬学・環境トキシコロジー，2009.11
34. 木村仁美、小林弥生、平野靖史郎：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，2009.11
35. Suzuki T., Takamoto K. and Nohara K.: The investigation of tissue-specific modulation of AhR-dependent gene expression, Society of Toxicology: 2009 annual meeting, 2009.3
36. Kerkvliet N. and Nohara K.: Transcriptional changes in immunotoxicology: Transcription factors, signal transduction, and epigenetics, Society of Toxicology: 2009 annual meeting, 2009.3
37. Nohara K: 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, 2009.3
- 38 *. 野原恵子：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，2009.3
39. 鈴木武博、村井景、西村典子、小林弥生、野原恵子：無機ヒ素による p16INK4 α 発現調節へのエピジェネテクス作用の関与，第 8 回分子予防環境医学研究会，2009.1
40. 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：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，2008.12
41. 立石幸代、馬場崇、野原恵子：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，2008.12
42. 大井航、粟生佳奈、鈴木武博、野原恵子：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，2008.12
43. 野原恵子：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，2008.9
44. 黒田淑子、塚原伸治、藤巻秀和：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，2008.12

45. Uchimura T., Fukushi A., Tsuda MC., Sano K., Kashimura M., Higo S., Hood KE., Tsukahara S., Vasudevan N. and Ogawa S.: Anxiety and exploratory behaviors and social interactions in mice selectively bred for aggressiveness, 38th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2008.11
46. Tsukahara S.: 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, 2008.10
47. Tsukahara S.: 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, 2008.9
48. 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：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 会大会，2008.9
49. 永田知代、津田夢芽子、田中麻衣、塚原伸治、中西剛、小川園子：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，2008.9
50. 塚原伸治：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，2008.8
51. 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：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，2008.7
52. 小林弥生、山城彩花、水村綾乃、平野靖史郎：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，2009.3
53. 山城彩花、小林弥生、平野靖史郎：ヒ素の体内動態と代謝における γ -GTP の役割，第 129 年会 日本薬学会，2009.3
54. 渡辺喬之、菅野さな枝、小林弥生、平野靖史郎：ヒト AS3MT 発現 CHO 細胞におけるヒ素代謝と毒性の相互作用，第 129 年会 日本薬学会，2009.3
55. 木村仁美、渡辺喬之、小林弥生、平野靖史郎：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，2009.3
56. 小林弥生、平野靖史郎：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，2008.11
57. 渡辺喬之、菅野さな枝、小林弥生、平野靖史郎：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，2008.10
58. Nohara K., Ao K., Miyamoto Y., Inouye K., Pan X., Motohashi H., Yamamoto M. and Tohyama C.: A constitutively active AhR expressed in T cells increases percentage of CD25⁺CD4⁺T

- cells but does not suppress antibody production upon OVA-immunization of mice, Society of Toxicology: 2008 annual meeting, Seattle, 2008.3
- 59 *. 野原恵子、鈴木武博：ダイオキシン類の免疫毒性, 日本薬学会第 128 年会, 2008.3
60. 小川園子、渡井浩太、塚原伸治：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, 2008.3
61. 塚原伸治：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, 2008.3
62. 鈴木武博、村井景、野原恵子：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, 2007.12
63. 立石幸代、村井景、松本みちよ、野原恵子：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, 2007.12
- 64 *. Nohara K. and Fujimaki H.: Dioxin and allergy, 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会, 2007.11
65. Nohara K.: Activation of the transcription factor AhR in T cells only is not sufficient to generate CD62L^{low}CD25⁺CD4⁺ 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, 2007.11
66. Ao K., Murai H., Suzuki T., Matsumoto M., Nagai H., Miyamoto Y., Tohyama C. and Nohara K.: Immunotoxicities of brominated dioxins in mice, Dioxin2007, 2007.9
67. Suzuki T. and Nohara K.: Histone deacetylases are involved in species-specific modulation of arylhydrocarbon receptor-dependent gene expression in humans and mice, Dioxin2007, 2007.9
68. 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：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ラ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, 2007.9
69. 小林弥生、根岸隆之、水村綾乃、平野靖史郎：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, 2007.11
70. 小林弥生、根岸隆之、水村綾乃、平野靖史郎：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, 2007.7

*招聘講演