

化学物質の安全管理に関するシンポジウム

2021年2月4日（木）

化学物質の後発影響・多世代影響

—無機ヒ素による発がんを中心に—

国立環境研究所 環境リスク・健康研究センター
鈴木武博

今日の内容

- ① 後発影響・多世代影響の概念
- ② エピジェネティクスとは？
- ③ 無機ヒ素による多世代影響の研究紹介

後発影響・多世代影響の研究（例）

オランダ飢饉の研究

第2次世界大戦中のナチスドイツの侵略



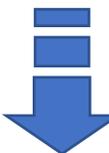
1944～1945年 オランダで食糧難・飢饉

1日の摂取カロリーは、
11月末で1000キロカロリーまで低下。

12月から4月に、一部の地域では、
400-800キロカロリーにまで低下。

（必要カロリーの1/3程度）

妊娠中に、この飢饉を経験
した母親から生まれた子供
は、出生時の体重が小さ
かった。



追跡調査

その後の肥満傾向

Ravelli et al., *N Engl J Med*. 1976.

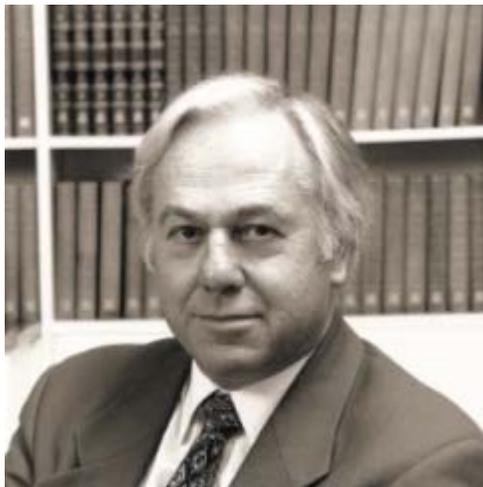
Roseboom et al., *Mol Cell Endocrinol*. 2001.

Tobi et al., *Nat Commun*. 2014.

Barker仮説

デビッド・バーカー (David Barker) 博士

胎児の栄養環境が、生涯における健康状態に影響するのではないか。



Cooper, *Nature* 2013.

イギリスの低出生体重児の追跡調査

低体重で生まれた人



成人後

虚血性心疾患（心筋梗塞など）で死亡しやすい。

高血圧、2型糖尿病、肥満などの生活習慣病を発症しやすい。

「低出生体重児が、のちに生活習慣病になるリスクが高い」という説

Barker et al., *Lancet* 1989.

Barker, *BMJ* 1990.

Barker, *J. Intern. Med.* 2007.

Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) 学説

現在では栄養と生活習慣病の関係に限らず、
「胎生期から出生後の発達期における種々の環境因子が、成長後の健康や種々の疾病発症リスクに影響を及ぼすという概念」
というように、環境因子の関与を含めたより広い考え方となっている。

(日本DOHaD学会ホームページより)



すぐには影響があらわれず、時間を経てから顕在化する影響

➡ 「後発影響」などとよばれる。

親世代で受けた影響が、子世代以降でも顕在化する影響

➡ 「多世代影響」、「継世代影響」などとよばれる。

化学物質の管理においては、このような影響も存在することに注意することが重要と考えられる。

化学物質の影響（日本での事例）

〈カネミ油症〉

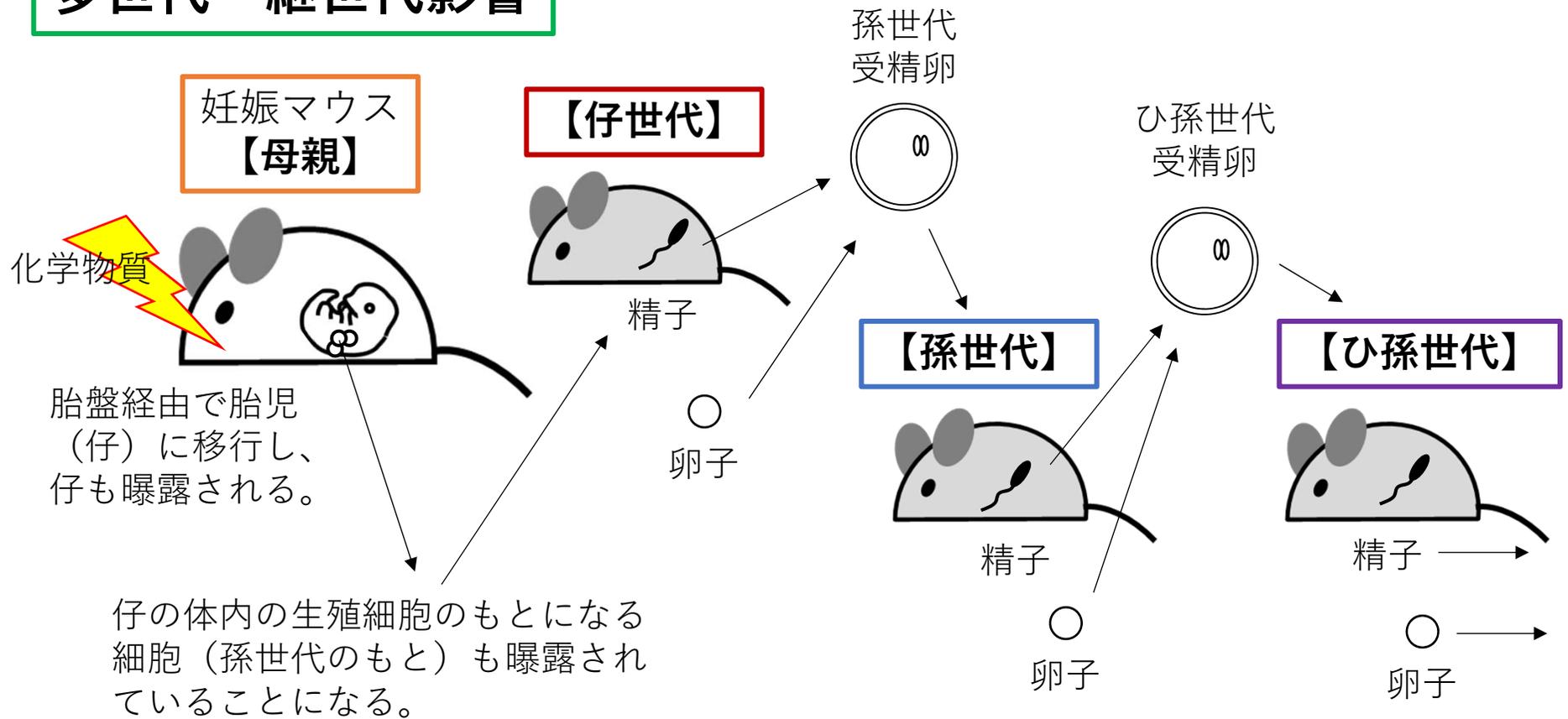
カネミ倉庫（北九州市）の米ぬか油に製造過程でポリ塩化ビフェニール（PCB）やそれが加熱されてできるダイオキシン類が混入し、西日本一帯で発生した大規模な食中毒事件。皮膚症状や内臓疾患、倦怠（けんたい）感など症状は多岐にわたる。1968年に発覚した。

毒と命～カネミ油症 母と子の記録～
(2013年5月25日（土）NHKスペシャル)

カネミ油を食べた女性

- ・死産。
- ・肌が黒い赤ちゃんが産まれる。

多世代・継世代影響



多世代影響
(仔世代、孫世代)

継世代影響
(ひ孫世代以降)

体の中に、なんらかの「記憶」をさせるメカニズムが存在する。

エピジェネティクス

NHKスペシャル シリーズ人体Ⅱ「遺伝子」第2集 "DNAスイッチ"が運命を変える

更新日 2019年5月12日

人体 (NHKスペシャル)

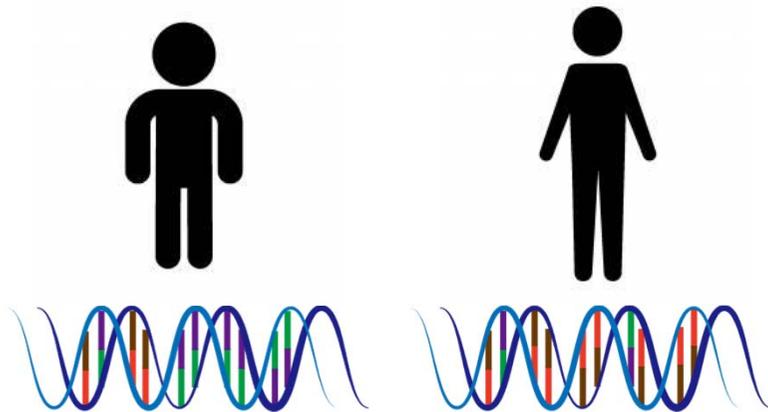
今、遺伝子の研究で最もホットな分野の一つが"DNAのスイッチ"、専門的には「エピジェネティクス（後成遺伝学）」と呼ばれるものです。なんとDNAにはまるで「スイッチ」のような仕組みがあり、その切り替えによって遺伝子の働きががらりと変化。さまざまな体質や能力、病気のなりやすさなどが変わり、私たちの運命や人生までも左右するということです。その神秘の世界にお連れするのは、W司会のタモリさん・山中伸弥さん、さらに、遺伝子に興味津々の俳優の石原さとみさん・阿部サダヲさん。さあ、あなたの体の中にもある「運命を変える仕組み」を探検しましょう！

2019年5月12日放送

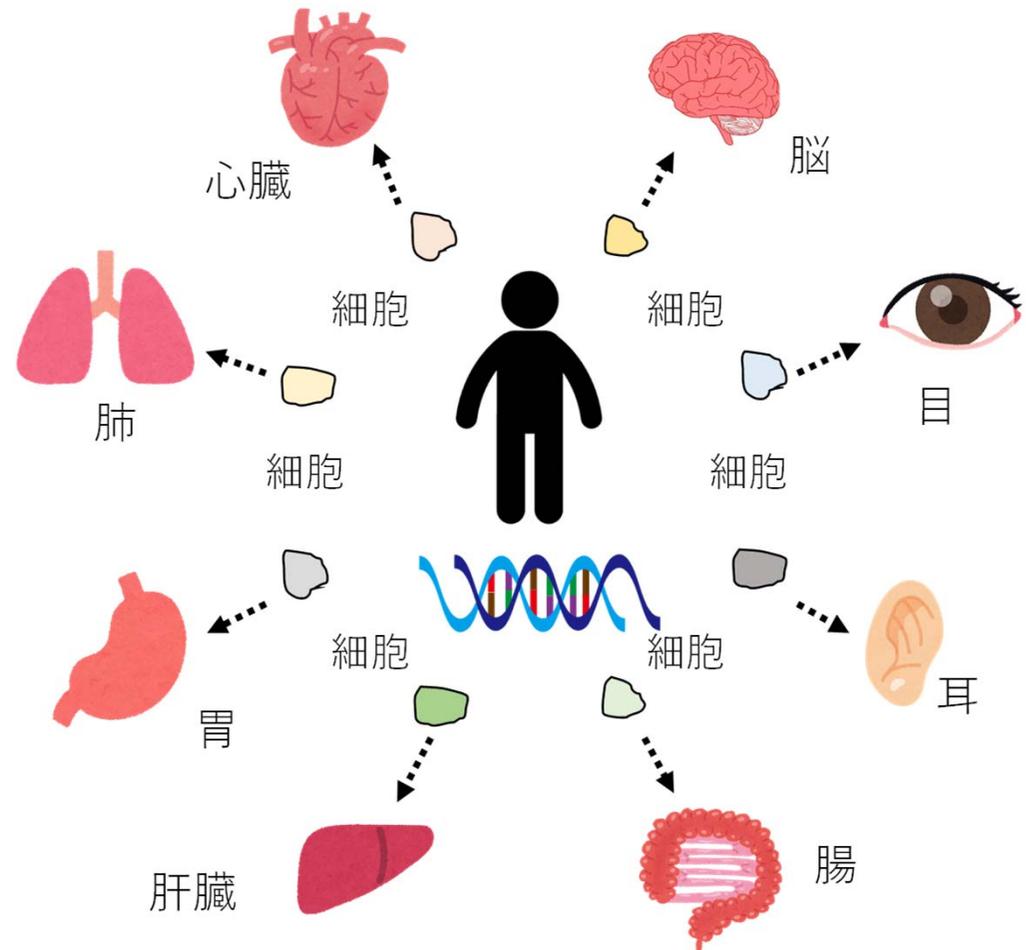
エピジェネティクス

DNAの塩基配列によらない遺伝子発現調節の仕組み

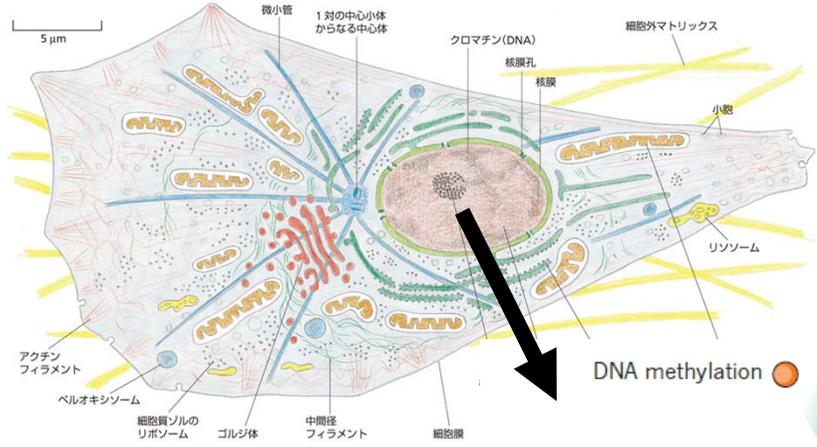
塩基配列（ATGC）の並びが変化すると、その細胞の性質は変化するが、そうではなく、塩基配列の並び方が変化しないにもかかわらず、細胞の性質が変化し、受け継がれる。



1つの細胞の中のDNAは、一度に全部の情報を使っていない。DNA上のそれぞれの情報には**特定の目印のようなもの**がついていて、その目印で使う情報と使わない情報を分けている。



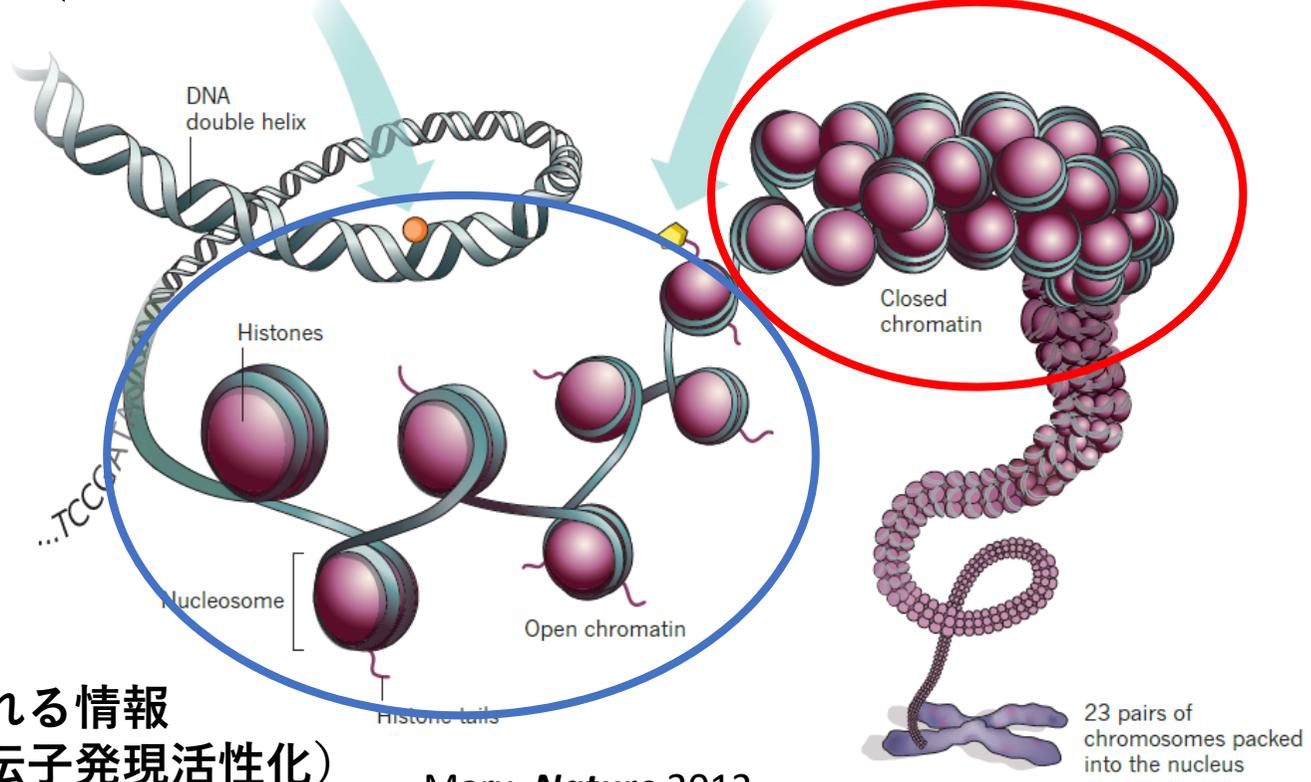
エピジェネティクスのメカニズム



- DNAメチル化
- ヒストン修飾
- non-coding RNA

細胞の分子生物学第5版

使われない情報
(遺伝子発現抑制)

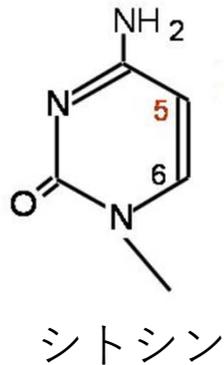


使われる情報
(遺伝子発現活性化)

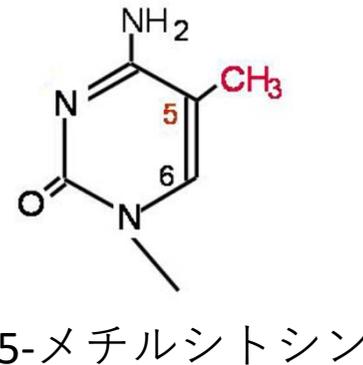
Marx, *Nature* 2012.

DNAメチル化とその特徴

エピジェネティクスの主要なメカニズムの1つであり、DNAの塩基配列のシトシン (C) に-CH₃という分子 (メチル基) がつくこと。CG配列で起こる。

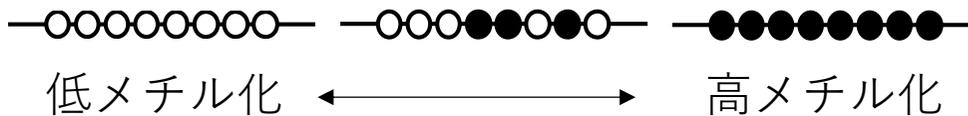


DNAメチル基
転移酵素
メチル化



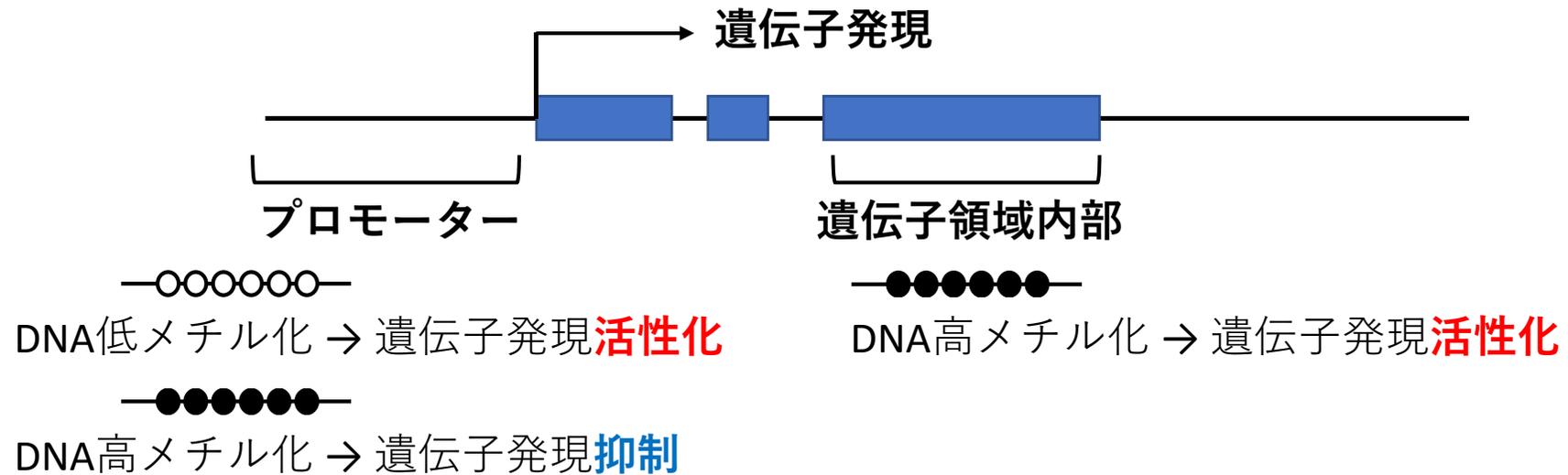
gggggtctCGgggggtcccCGaaggc
tgCGttctgaggggcttCGCGggag
gggatccCGcccCGccctcccCGga
ggt

CGが密になっている場所
を、CpG islandという。



1. 環境の影響を受けやすい。
2. 原因となる環境因子によって、特徴的なDNA領域に誘発される。
3. 蓄積性がある。

DNAメチル化と遺伝子発現



がんにおける代表的なDNAメチル化標的遺伝子

- ・細胞の増殖を抑制する、がん抑制遺伝子
- ・細胞の増殖を促進する、がん遺伝子
- ・DNA不安定化に関与する転移因子（動く遺伝子）など



がん抑制遺伝子がメチル化されると、がん抑制遺伝子の働きが抑制される。
 がん遺伝子が脱メチル化されると、がん遺伝子の働きが活性化される。
 転移因子が脱メチル化されると、DNA全体の不安定化を来たす。



がん化、細胞増殖につながる。

エピジェネティクスに関連する報告がある化学物質

	DNAメチル化	ヒストン修飾	microRNA	エピジェネティック変化	
ヒ素	◎	◎	○	特に報告が多い	◎
ニッケル	○	◎	—	報告あり	○
カドミウム	○	—	○	報告なし	—
クロム	○	○	—		
アルミニウム	—	—	○		
水銀	○	—	—		
鉛	○	—	—		
農薬	○	○	—		
大気汚染物質	○	○	○		
ベンゼン	○	—	—		
ビスフェノール A	○	—	○		
ダイオキシン	○	—	○		
RDX	—	—	○		
DES	—	—	○		

RDX: hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (爆薬)

DES: diethylstilbestrol (経口避妊薬としてかつて使用されていた)

ヒ素による健康被害

バングラデシュなど東南アジアをはじめ世界各国で、無機ヒ素に汚染された地下水の飲用等によって発がんをはじめとする疾患が発生し、深刻な環境問題となっている。

Photographs were taken by our collaborator in Bangladesh



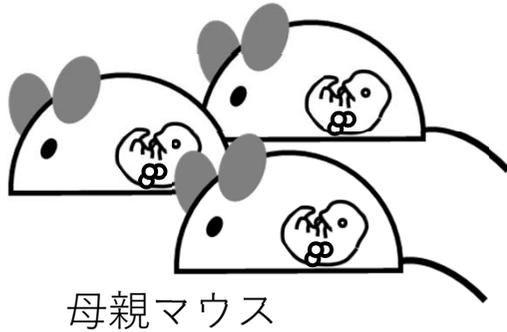
近年の疫学調査では、妊娠期や乳幼児期の無機ヒ素曝露によって成人後に膀胱、肺、肝臓などのがんが増加することが報告されている。

メカニズムは不明

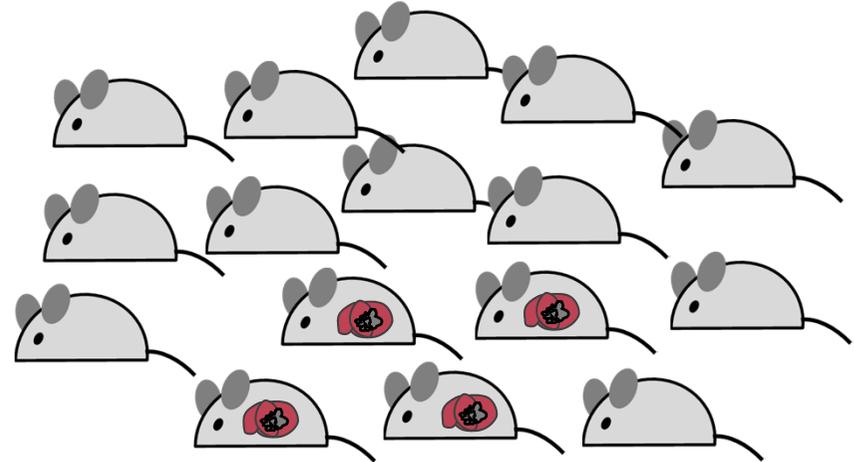
Smith et al., *Environ. Health. Perspect.* 2012.

妊娠期ヒ素曝露による後発的発がんの実験的研究

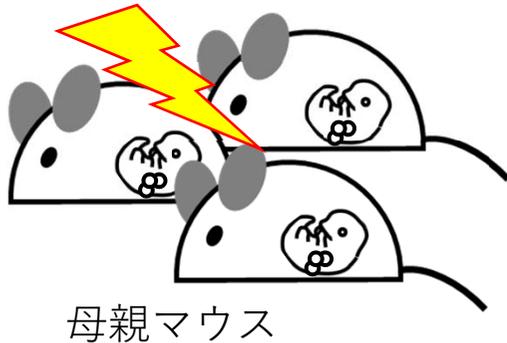
C3Hマウス



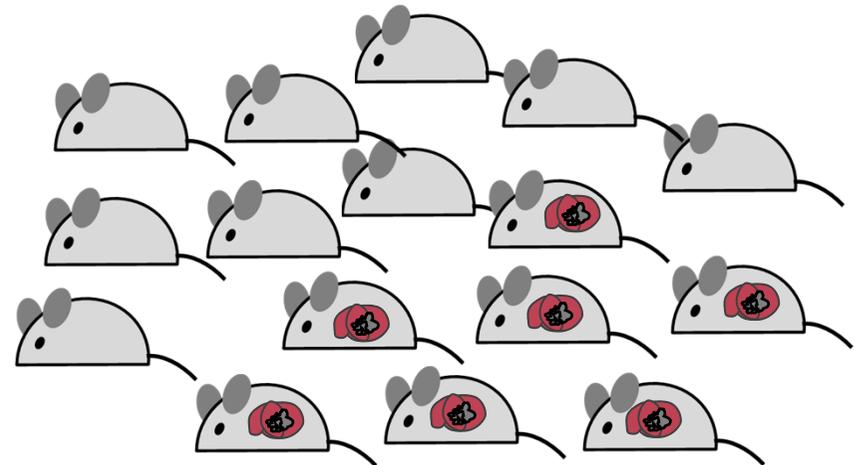
生まれたオス
74週（1年半）まで
ヒ素を含まない水で
飼育



妊娠8-18日目のみ85ppmの亜
ヒ酸ナトリウムを含んだ水を
自由に摂取させる。



生まれたオス
74週（1年半）まで
ヒ素を含まない水で
飼育



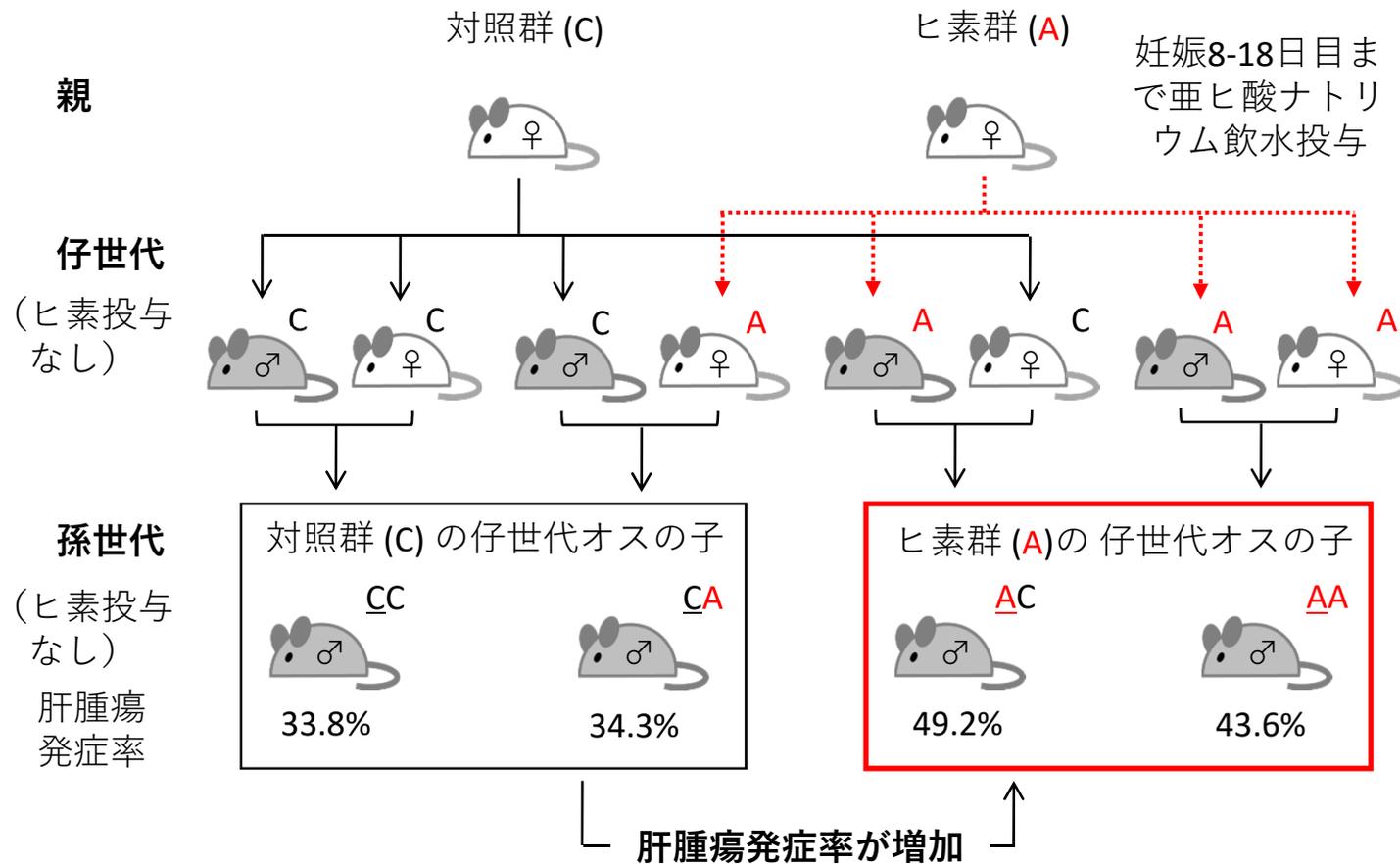
肝腫瘍を発症したマウスが増加

Waalkes. et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2003.

Nohara et al., *Toxicol. Sci.*, 2012.

妊娠期ヒ素曝露による多世代影響の実験的研究

妊娠期にヒ素曝露したC3Hマウスから産まれた孫世代においても、74週齢のオスで肝腫瘍の発症率が増加すること、さらに、組み合わせ交配より孫世代まで続く影響は仔世代のオス経由で起こることを明らかにした。

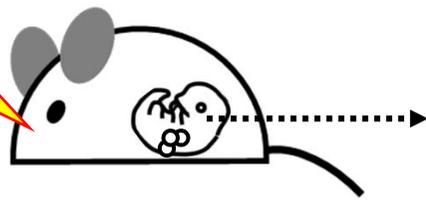


妊娠期ヒ素曝露による後発・多世代影響メカニズムの検討

妊娠期の無機ヒ素曝露による、生まれた仔世代、孫世代での後発的な発がんメカニズムを、エピジェネティクスのメカニズムであるDNAメチル化に着目して、検討する。

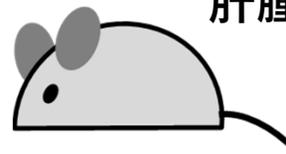
無機ヒ素
妊娠8~18日目
のみ飲水曝露

妊娠中の母親



仔世代
オス

肝腫瘍増加



肝臓

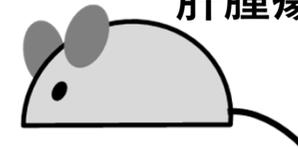


精子

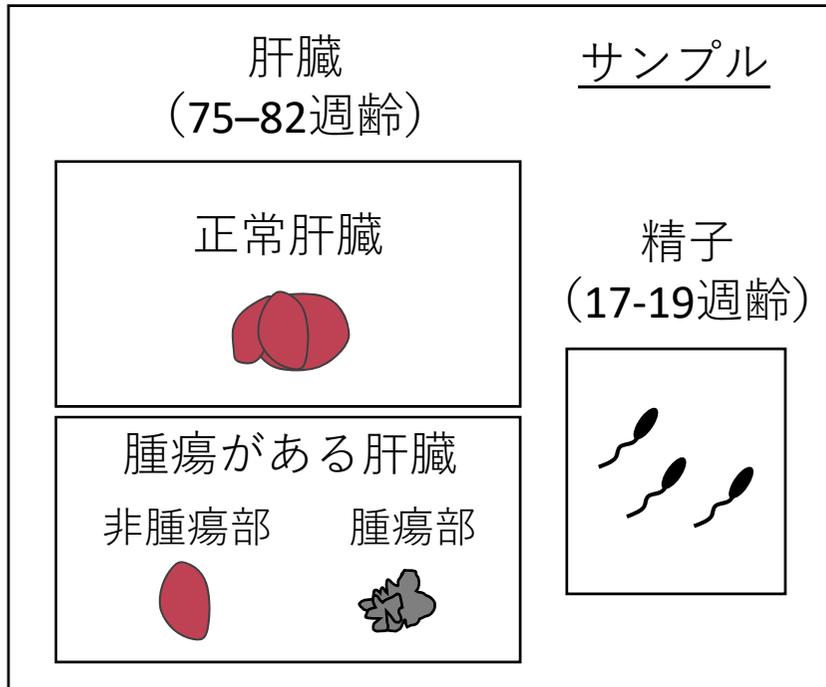


孫世代
オス

肝腫瘍増加



肝臓



それぞれからDNAを抽出して、DNA全体のメチル化解析をおこない、DNAメチル化が変化した遺伝子及び領域について詳細に解析した。

実験の手順とデータの見方

① DNA全体のメチル化解析でメチル化が大きく変化する領域や部位を抽出

- ・ マイクロアレイ
CpG Island マイクロアレイ
16030個のCpG islandsを検出可能
- ・ 次世代シーケンス



② 抽出した領域や部位について、
詳細なメチル化解析

Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS)
1塩基レベルでDNAメチル化データを得られる。

ヒ素群のこの領域全体のメチル化率
 ○●：メチル化可能な部位：40個
 ●：メチル化した部位：16個
 メチル化率=16/40×100=40%

gggggtctCGggggtcccCGaaggctgCGttctgaggggcttCGCGggaggggatccCGcccCGcctcccCGgagtt

対照群のメチル化率
1/5 × 100 = 20%

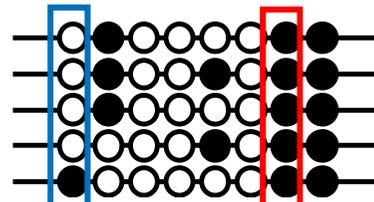
ヒ素群のメチル化率
80%



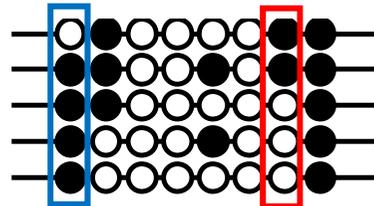
ヒ素群で
高メチル化した部位

●メチル化したシトシン
○メチル化していないシトシン

対照群



ヒ素群



対照群のメチル化率
100%

ヒ素群のメチル化率
40%

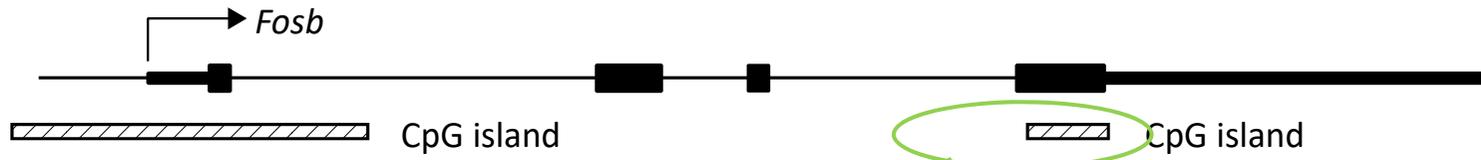


ヒ素群で
低メチル化した部位

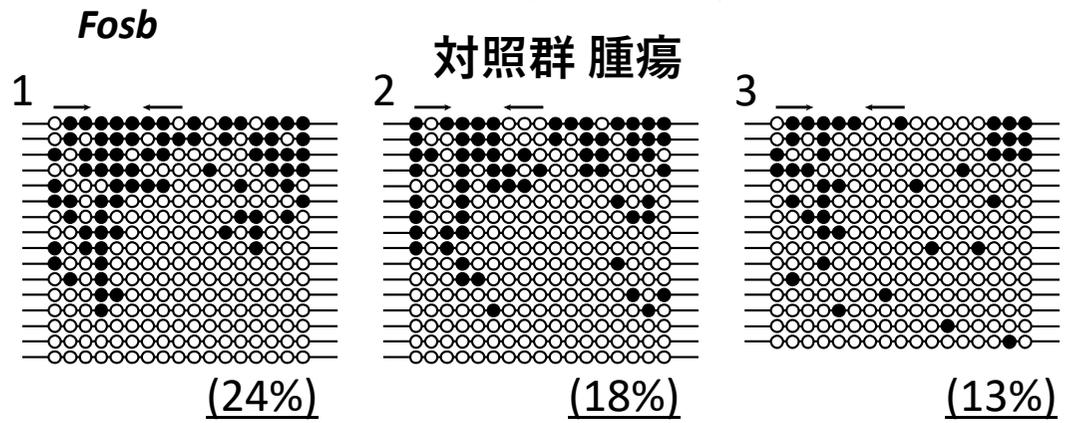
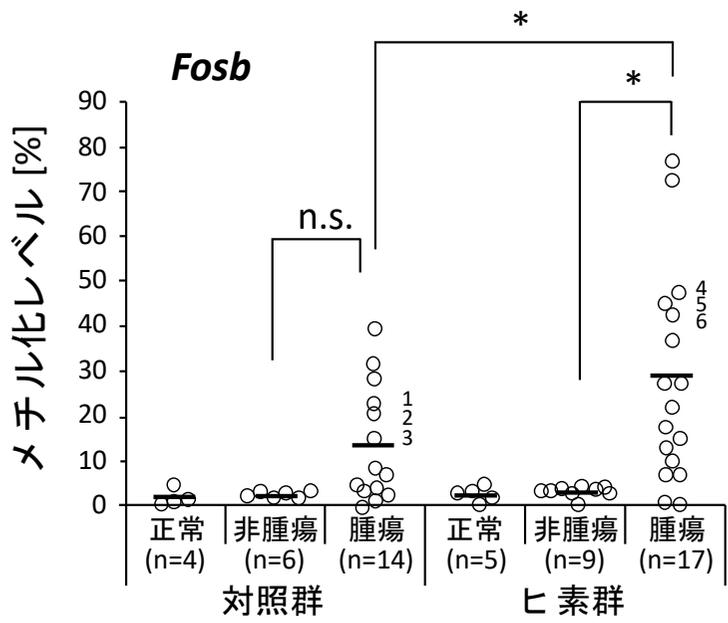
仔世代の肝臓における検討①



CpG Island マイクロアレイ

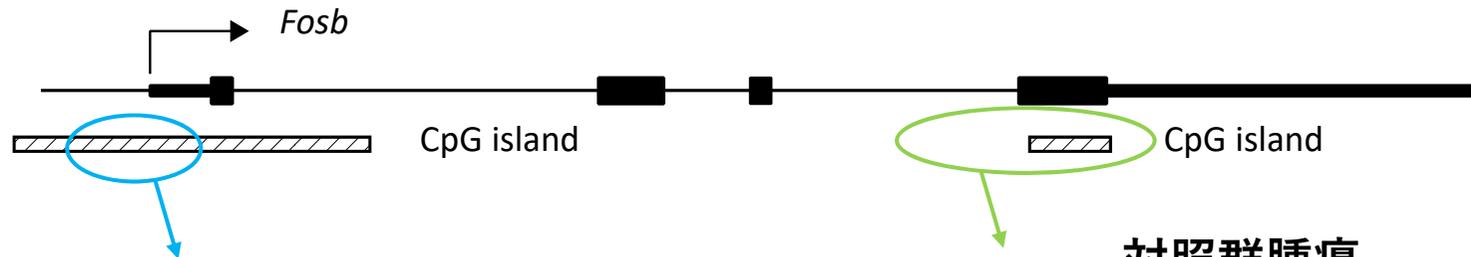


- MSPターゲット領域
- - - アレイによるメチル化変化領域
- バイサルファイトシーケンス

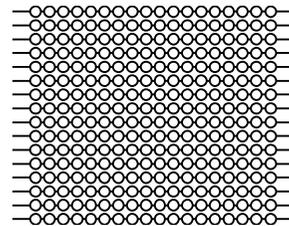


Fosb領域のDNAメチル化は対照群の腫瘍と比較して、ヒ素曝露群の腫瘍で有意に増加していることが明らかになった。

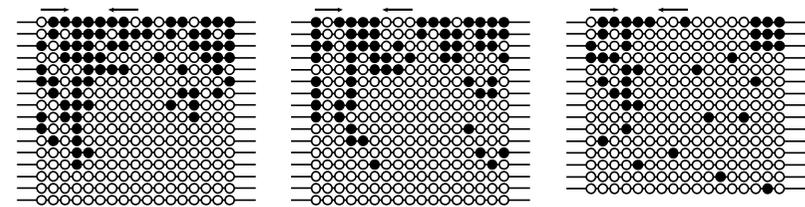
仔世代の肝臓における検討②



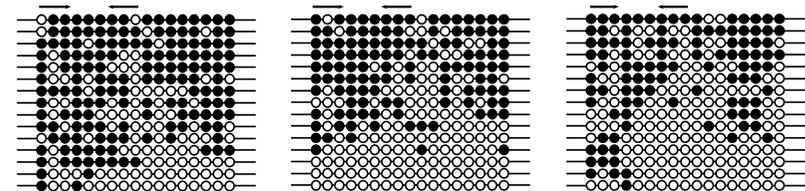
対照群腫瘍



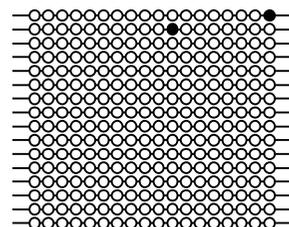
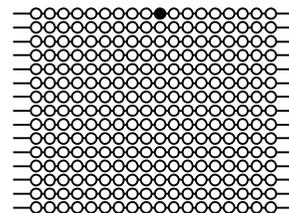
対照群腫瘍



ヒ素群腫瘍

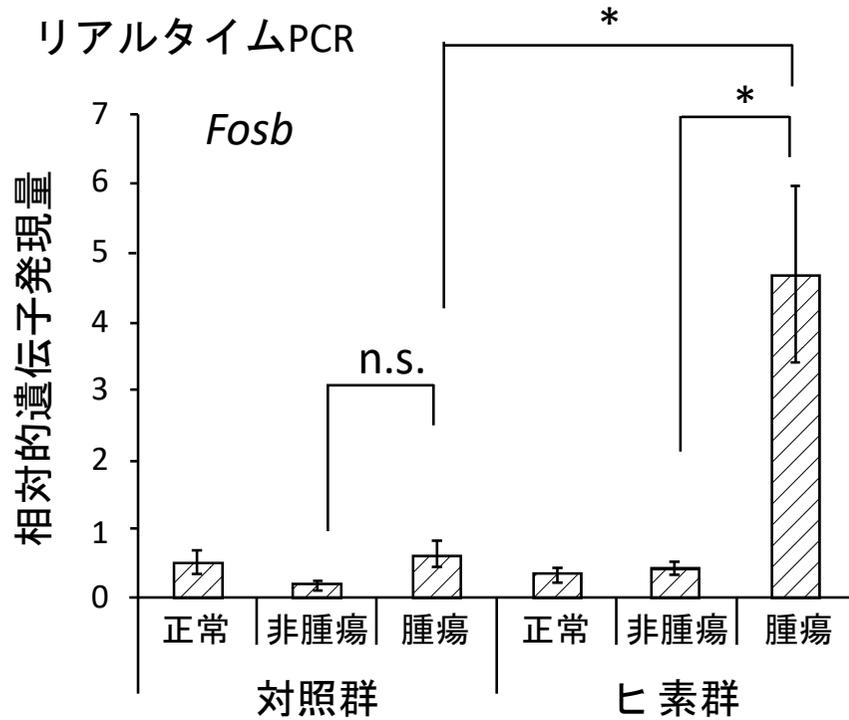


ヒ素群腫瘍

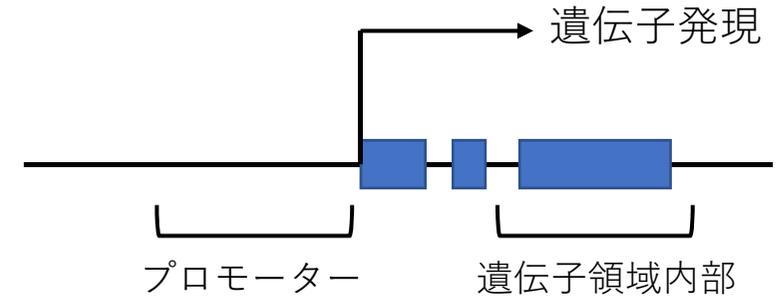


*Fosb*プロモーターは、ほぼ完全に非メチル化状態。
メチル化が変化したのは、遺伝子領域内部。

仔世代の肝臓における検討③



DNAメチル化と遺伝子発現



遺伝子領域内部：
DNA高メチル化 → 遺伝子発現の活性化

妊娠期ヒ素曝露群の仔世代の肝腫瘍部で*Fosb*の発現が大きく増加した。



DNAメチル化変化と対応したがん遺伝子*Fosb*の発現増加が、妊娠期ヒ素曝露を受けた仔世代で肝臓腫瘍が増加するメカニズムに関与する可能性が示唆された。

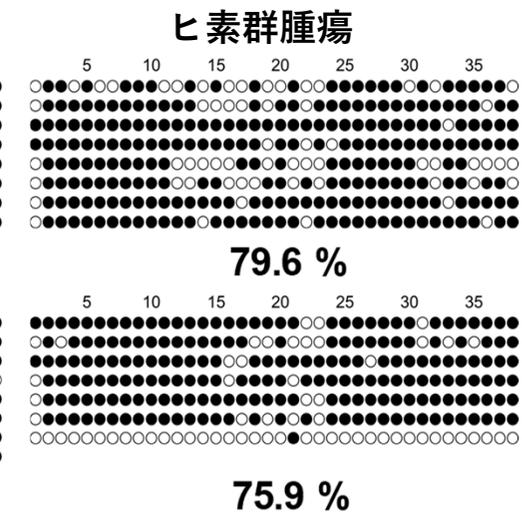
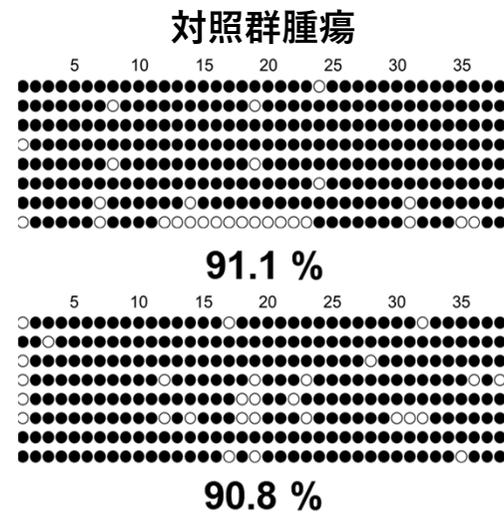
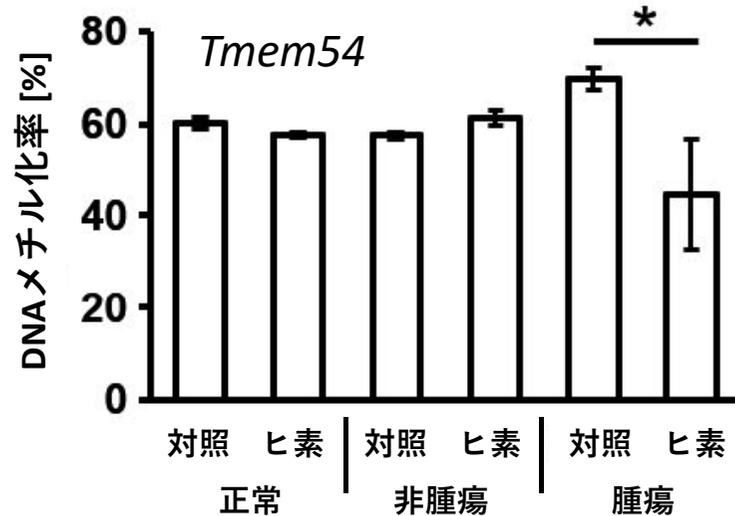
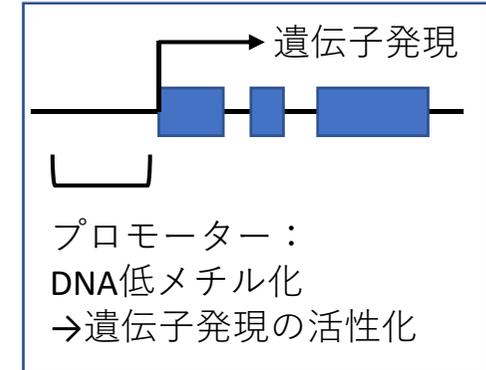
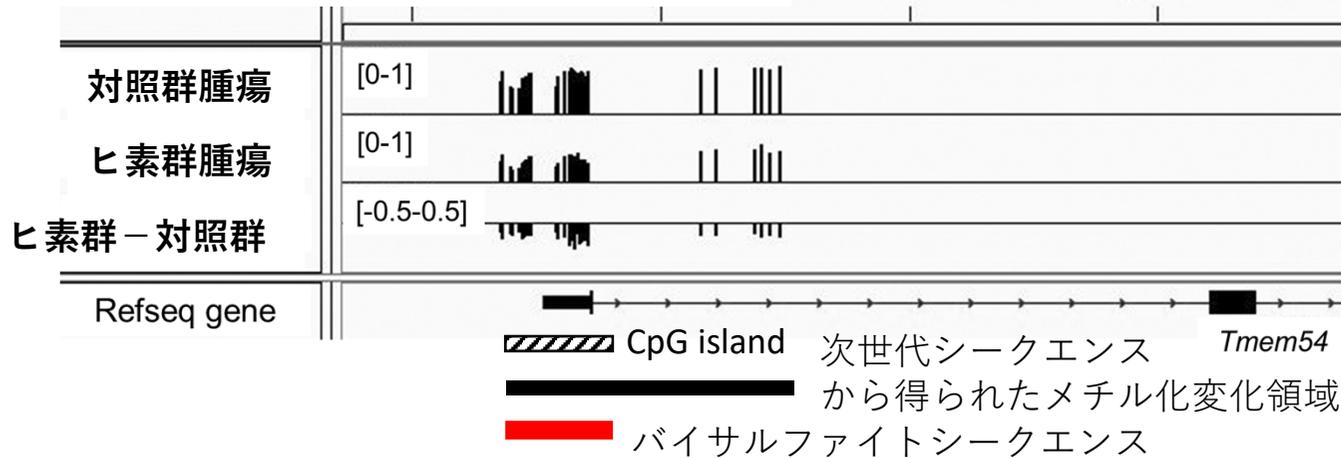
孫世代の肝臓における検討①



次世代シーケンス (RRBS)

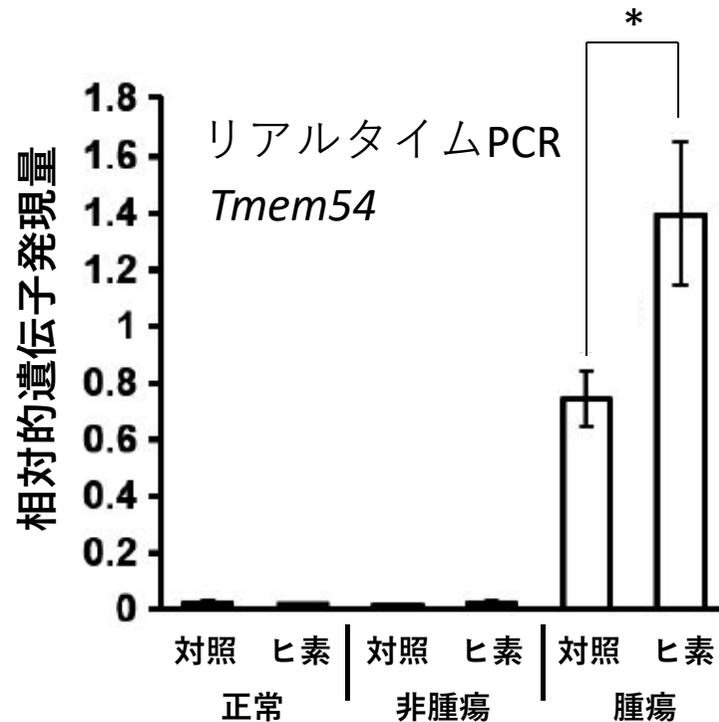
Transmembrane Protein 54 (Tmem54)

129,108 kb

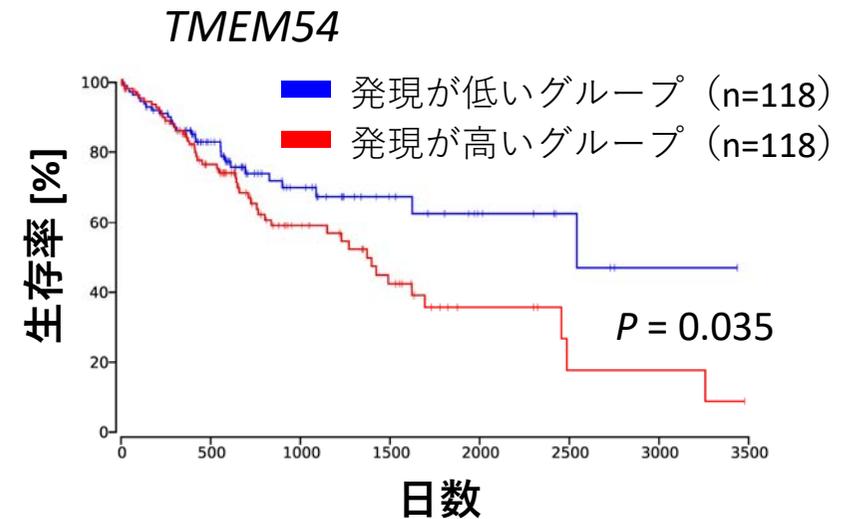


ヒ素群の孫世代の肝腫瘍部では、*Tmem54*遺伝子プロモーターを含む領域で、対照群の肝腫瘍部と比較して低メチル化状態であることがわかった。

孫世代の肝臓における検討②



Kaplan-Meier法による
生存曲線



*Tmem54*遺伝子の発現は、ヒ素群の肝腫瘍部で大きく増加した。

Kaplan-Meier法による生存曲線から、ヒトの場合、肝臓がんで
*TMEM54*遺伝子の発現が高いほうが、生存率が低いことがわかった。

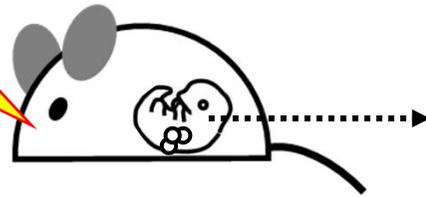


プロモーターのDNA低メチル化による*Tmem54*遺伝子の発現増加は、妊娠期ヒ素曝露による孫世代の肝腫瘍増加のメカニズムに関与する可能性が示された。

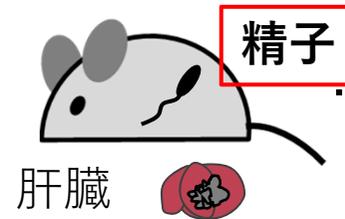
仔世代及び孫世代の肝臓における検討（まとめ）

無機ヒ素
妊娠8～18日目
のみ飲水曝露

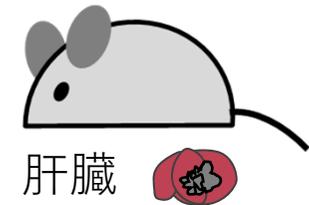
妊娠中の母親



仔世代オス
肝腫瘍増加



孫世代オス
肝腫瘍増加



仔世代

*Fosb*のメチル化変化、および
メチル化変化に対応した遺伝子
発現変化。

孫世代

*Tmem54*などのメチル化変化、
およびメチル化変化に対応し
た遺伝子発現変化。



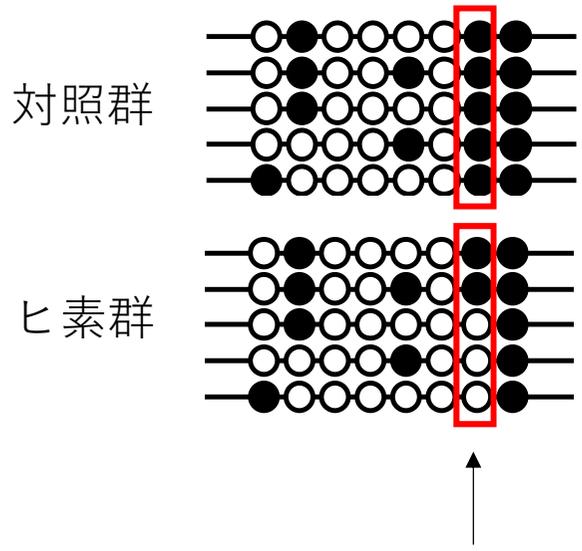
がんに関連するこれらの遺伝子のDNAメチル化変化及びその変化に対応する
遺伝子発現変化が、妊娠期ヒ素曝露による仔世代及び孫世代での後発的な肝
腫瘍増加に関与する可能性が示された。

精子における検討①

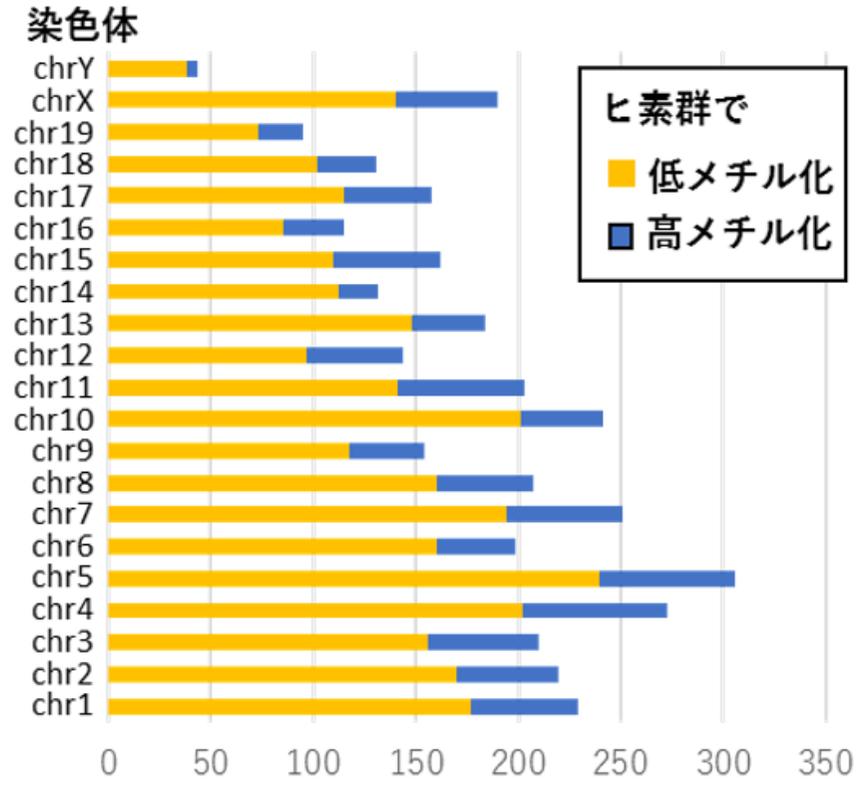


次世代シーケンス (RRBS)

gggggtctCGgggggtcccCGaaggctgCGt
 tctgaggggcttCGCGggaggggatccCGc
 ccCGccctcccCGgagtt



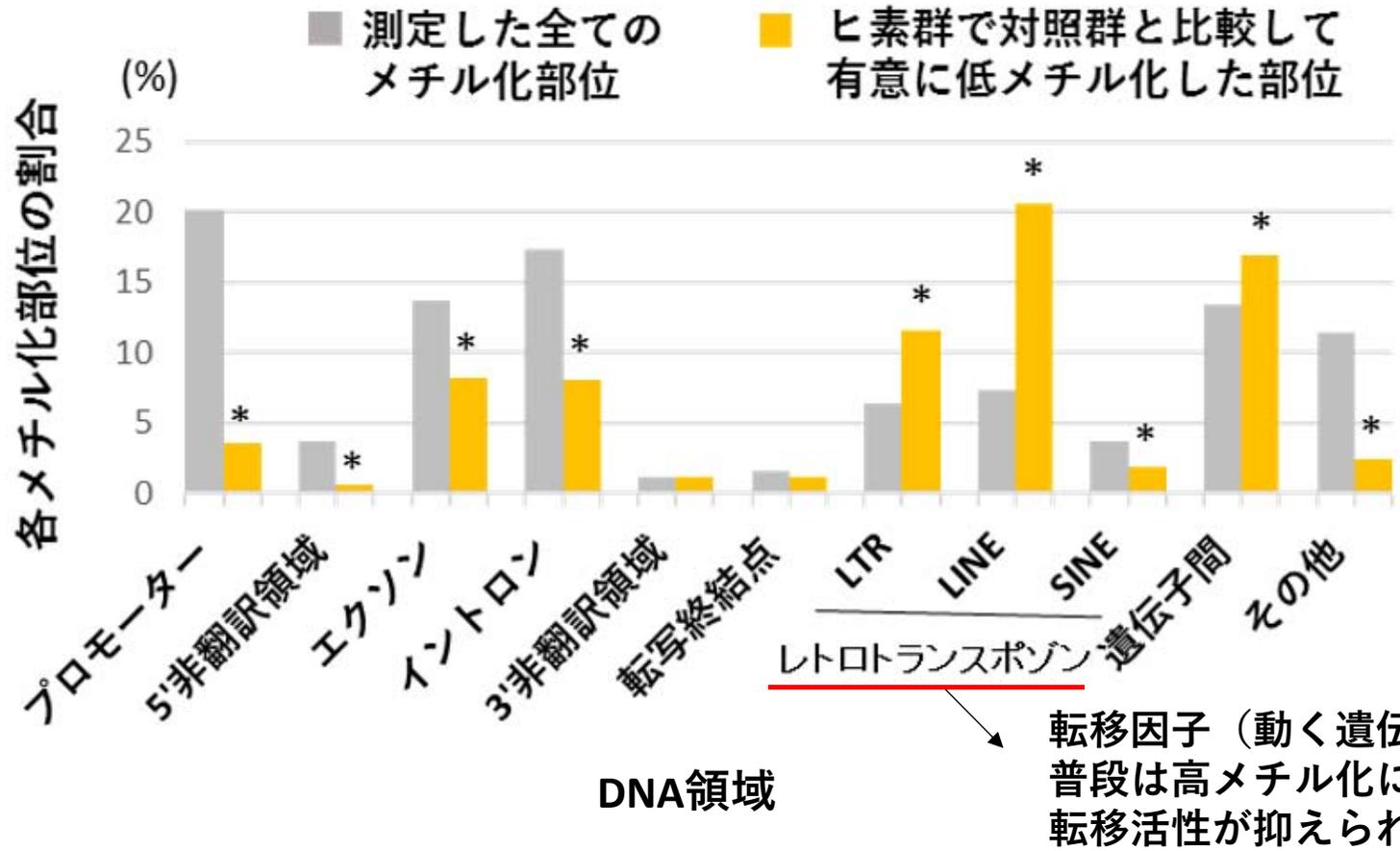
ヒ素群で低メチル化した部位



各染色体で対照群と比較してヒ素群で有意に低メチル化または高メチル化した部位の数

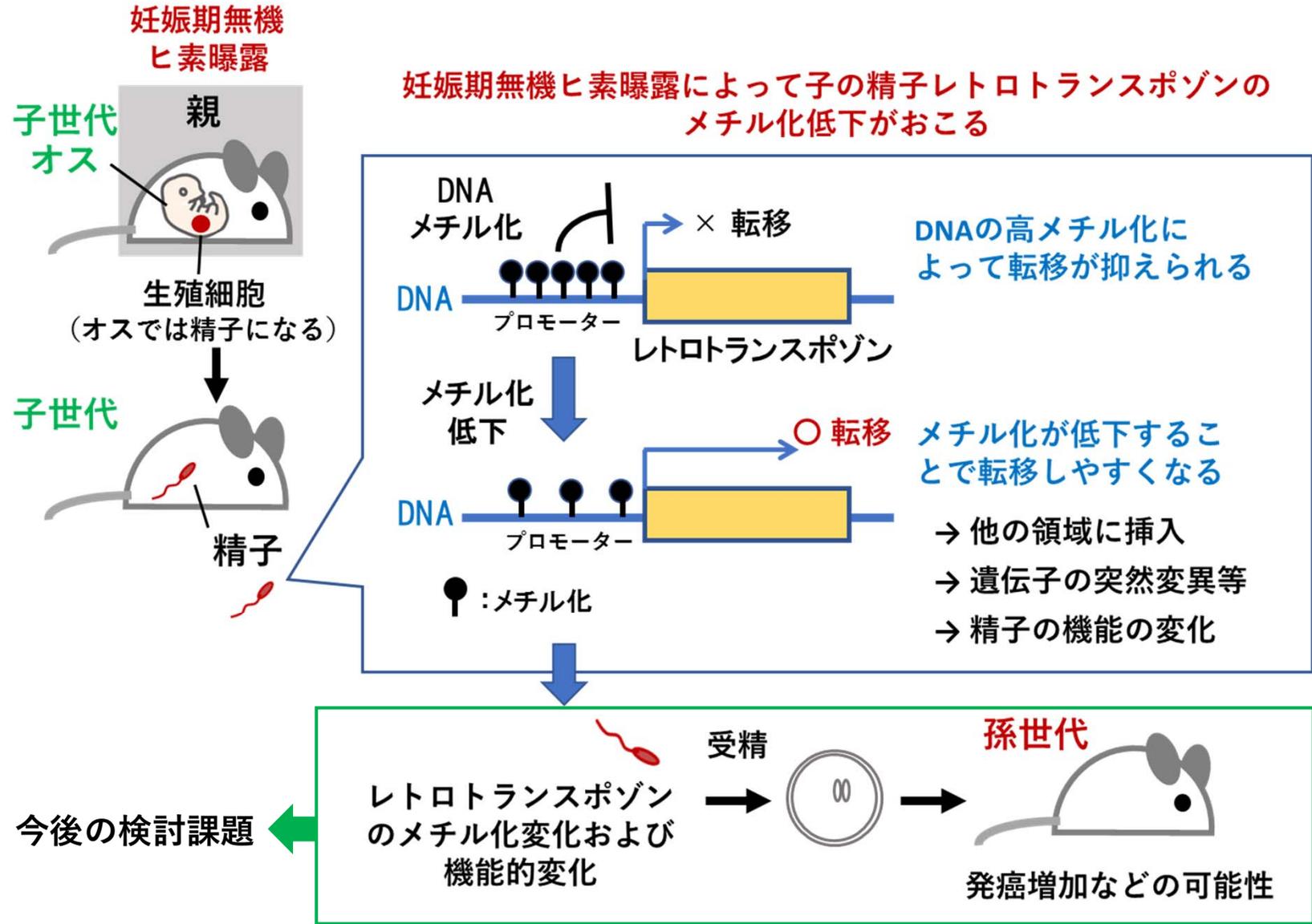
ヒ素群の仔世代の精子DNAでは、対照群と比較してすべての染色体において、低メチル化した部位が多いことが示された。

精子における検討②



ヒ素群の低メチル化は、特にレトロトランスポゾンのLTRとLINEというグループで起こりやすいことが示された。

妊娠期無機ヒ素曝露による多世代影響の仮説（まとめ）



国立環境研究所

野原恵子先生
岡村和幸先生
松下隼也さん
村井景さん
佐藤弥雪さん

国立がん研究センター研究所

牛島俊和先生
山下聡先生

国立成育医療研究センター研究所

秦健一郎先生
中林一彦先生

ご清聴ありがとうございました。