

## 内分泌攪乱化学物質が引き起こすエピジェネティックな変化による次世代への影響

西川美宇<sup>1</sup>, 岩野英知<sup>1</sup>, 井上博紀<sup>2</sup>, 山舗直子<sup>3</sup>, 横田博<sup>1</sup>

### Epigenetic transgenerational effects of an endocrine disruptor

Miyu NISHIKAWA<sup>1</sup>, Hidetomo IWANO<sup>1</sup>, Hiroki INOUE<sup>2</sup>, Naoko YAMASHIKI<sup>3</sup> and Hiroshi YOKOTA<sup>1</sup>  
(Accepted 22 July 2008)

#### 緒 論

エピジェネティクスとは、DNAの塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現調節機構のことであり、DNAのメチル化修飾や、ヒストン修飾によるクロマチン構造変換を伴った発現制御機構を指す。DNAのメチル化修飾は、CpG配列のシトシンがメチル化修飾されることであり、特にエピジェネティクス制御の中心を担うものである。遺伝子上流にあるCpG配列(CpGアイランド)は、メチル化修飾を受けるとヒストン修飾を介してクロマチン構造を変換し、遺伝子発現が抑制される。DNAのメチル化修飾の異常は、遺伝子発現を乱し、発生異常や発ガンの原因となることが分かっている。

内分泌攪乱化学物質(endocrine disrupting chemicals, EDC)は、ホルモンレセプターに結合し、内因性のホルモン作用を乱すことによって生体に影響を及ぼす<sup>14)</sup>。これまで、EDCが生体に及ぼす影響について多くの研究が行われ、生殖系、神経系、免疫系への異常、発ガンなど、様々な影響を及ぼすことが明らかとなった<sup>9,18,24,25,28)</sup>。しかしその一方で、成体では外因性の化学物質を解毒・代謝する機構が備わっており、健康な成体であれば、大量摂取しない限り大きな影響を及ぼさないということが分かってきた。当研究室では、ビスフェノールAを始めとするエストロゲン様物質が、経口摂取により肝臓や消化管においてグルクロン酸抱合体となって解毒され、速やかに尿中や糞中に排泄されることを報告した<sup>34)</sup>。その他に、EDCは高濃度の暴露量でなければ

生体に深刻な影響を及ぼさないという報告も数多くある<sup>31,33)</sup>。

しかしその一方で、妊娠期のEDCの暴露は、低用量であっても、胎子の発生や、成体になってからの生殖能力や疾病発生に影響を及ぼすことが報告されている<sup>8,17)</sup>。その理由として、当研究室では妊娠期中において、解毒代謝産物を体外へ排泄するトランスポーターの発現量が減少しており、母体静脈中に代謝産物が蓄積しやすいこと<sup>12)</sup>や、胎子において薬物代謝能がほとんどないこと<sup>21)</sup>を報告した。EDCの重要な問題点は、成体での影響ではなく、妊娠期暴露によって胎子へ移行し、影響が次世代にまで及ぶことである。EDCの次世代への影響を防ぐには、胎子移行のメカニズムおよび胎子移行後の毒性発現のメカニズムを解明することが先決であるが、この課題は未だ解決されていない。

Skinnerらによって、EDCが次世代へ及ぼす影響について、新たな機序の関与が報告された。代表的な抗アンドロゲン作用をもつEDCであるVinclozolin (VCZ)<sup>15,16,22)</sup>を妊娠期母体(F0)に投与すると、VCZの直接暴露を受けていないF2、F3の子孫にも生殖能力低下や発病率増加等のtransgenerationalな影響が伝わった。その際、遺伝子発現調節に関与する遺伝子上流のDNAメチル化パターンが世代を超えて変化した<sup>1,2,6,29)</sup>。高率な表現型の変化の伝達は低頻度なDNA塩基配列の変異<sup>4,11)</sup>では説明がつかず、これは、遺伝情報を次世代へ伝える唯一の細胞である生殖細胞に、エピジェネティックな変化が起きている可能性を示している。ほ乳類では、

酪農学園大学 <sup>1</sup>獣医学部獣医学科獣生化学教室, <sup>2</sup>環境システム学部生命環境学科環境生化学研究室, <sup>3</sup>環境システム学部生命環境学科発生生物学研究室  
069-8501 北海道江別市文京台緑町 582

<sup>1</sup>Department of Veterinary Biochemistry, School of Veterinary Medicine, <sup>2</sup>Laboratory of Environmental Biochemistry, Department of Biosphere and Environmental Science, School of Environmental System, <sup>3</sup>Laboratory of Developmental Biology, Department of Biosphere and Environmental Science, School of Environmental System  
Rakuno Gakuen University  
582 Bunkyo-dai midorimachi, Ebetsu, Hokkaido, 069-8501, Japan

受精後、ゲノムの大半が脱メチル化され、細胞分化と共に新たなメチル化パターンが書き込まれる初期化(リプログラミング)がおこる<sup>13,30)</sup>。このリプログラミングがおこる時期である胎生期の化学物質暴露が、次世代へ遺伝情報を伝える生殖細胞にどのような変化をもたらした結果なのか興味深い。それまで、EDCの直接暴露を受けていない世代の影響に関する報告はなく、この報告は、当時まで論じられなかったEDCの新たな作用機序や、従来の毒性評価について新たな課題を提示するものとなった。

これまで、EDCの研究において、暴露を直接受けた世代の影響は数多く報告されているが<sup>7,23,26)</sup>、直接暴露を受けていない世代の影響に関する報告はほとんどない。また、Skinnerらの報告においても、transgenerationalな影響を引き起こすメカニズムを完全に解明するには至っていない。EDCのこのような数世代にわたる影響のメカニズムを解明することは、EDCの新たな生体影響機序を解明することになり、化学物質の毒性評価の新たなパラメータを提示する。よって本研究では、EDCによって引き起こされるtransgenerationalな影響のメカニズムを、エピジェネティックな遺伝子発現調節機構であるDNAのメチル化をターゲットとして解明することを目的とした。

## 材料および方法

### 1. 供試動物

8週齢のマウス(C57BL/6)を三協ラボサービスより購入し、自由採食(飼料:CE-2, 日本クレア)、自由飲水で温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ 、12時間明(7時~19時)・12時間暗(19時~7時)の条件化で飼育した。

### 2. 使用試薬

VCZ(和光純薬工業株)はオリーブオイルに溶解して用いた。

### 3. 妊娠期VCZ投与およびVCZ世代の作出

マウス(F0)は1週間馴化させた後、交配を行った。雌の膈内プラグ陽性をもって妊娠0日とし、オリーブオイルに溶解したVCZ(100 mg/kg/day)を、妊娠8日~15日まで連日腹腔内投与した。Control群には同量のオリーブオイルを投与した。次世代マウスをF1とし、VCZ投与群同士とControl群同士でそれぞれ交配を行い、VCZ群、Control群ともにF3までのマウスを作出した。同腹仔間の交配は行わなかった。

### 4. VCZ投与による生殖能力への影響調査

F1のマウスはVCZ群同士、Control群同士でそれぞれ交配を行い、交配初日から出産までの日数を調査し、それぞれの交配の産子数および雌雄比を調査した。F2についても同様に交配を行い、生殖能力を調査した。また、生殖能力への影響の雌雄差を調べるために、F1でVCZ群雄とControl群雌の交配(Vinclozolin outcross control, VOC)、F1のControl群雄とF1のVCZ群雌の交配(Reverse VOC, RVOC)を行い、同様の調査を行った。

### 5. 精巢の採材

VCZ群、Control群、VOC群、RVOC群について、F1、F2両世代の60日齢から100日齢の雄をエーテル麻酔後、頸椎脱臼によって安楽死させ、精巢を採取した。片方の精巢は液体窒素で急速冷凍の後、 $-80^\circ\text{C}$ で保存してゲノムDNA抽出に供した。もう片方は4%PFAにて固定し、パラフィン切片作成に用いた。

### 6. 組織学的解析

#### 1) パラフィン切片作成

4%バラホルムアルデヒドで固定した精巢は常法に従い、 $4^\circ\text{C}$ 条件下でエタノール置換とキシレン置換を行い、 $70^\circ\text{C}$ のパラフィン液に十分浸漬した後パラフィン包埋を行った。包埋した標本はMICROM(カールツァイス株)で $7\mu\text{m}$ 厚に剥切して $45^\circ\text{C}$ の温水で伸展し、スライドガラスに取り $50^\circ\text{C}$ で乾燥し、これをパラフィン切片とした。

#### 2) Hematoxylin & Eosin 染色(HE染色)

パラフィン切片はキシレンに浸漬して脱パラフィン処理を行った。その後100%エタノール2回、90%エタノール、70%エタノール、50%エタノール、25%エタノールにそれぞれ浸漬して再水酸化処理を行い、distilled water(DW)でリンスした。次に、Mayer's Hematoxylin(武藤化学株)液で1分間染色し、DWで軽くリンスした後、水道の流水で30分洗浄した。さらにDWでリンスし、別容器のDWで1分間洗浄した。これをEosin液(1%Eosin Y Solution(武藤化学株))で2分間染色した。その後90%エタノールに2回、100%エタノールに2回浸漬し、さらに3回のキシレン置換を行い、DIATEX(松浪硝子工業株)で封入した。この標本を風乾した後、光学顕微鏡下で観察した。

### 3) Terminal dUTP nick end labeling 染色 (TUNEL 染色)

HE 染色と同様、パラフィン切片の脱パラフィンと再水酸化を行った後、In Situ Cell Death Detection Kit, AP (ロシュ・ダイアグノスティクス株)を用いて TUNEL 染色を行い、VECTASHIELD (Vector Laboratories, Inc.)を用いて封入した後、共焦点レーザー顕微鏡 (OLYMPUS FLUOVIEW) 下でアポトーシス陽性細胞の検出を行った。

### 7. ゲノム DNA 抽出

-80°C で凍結保存した精巣は粉碎して 0.1 g を計量した後 proteinase K 800 µg/ SNET (2.5%SDS, 1M NaCl, 125 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl/2 ml) に入れ、穏やかに振盪しながら 55°C で一晩インキュベートし、組織を溶解した。フェノール・クロロホルム抽出を 3 回行い、抽出液を 1 ml ずつ分取した。ただし、混和は 30 分間緩やかに行った。分取した抽出溶液を、それぞれイソプロパノールを沈殿で精製し、超純水 (Milli-Q, Millipore) 50 µl に溶解したものをゲノム DNA 溶液した。

### 8. Methylation-sensitive-representational difference analysis (MS-RDA) によるゲノム DNA 異メチル化部位検出

DNA のゲノムワイドなメチル化状態を調べるため、F1~F3 世代の VCZ 群および Control 群ゲノム DNA メチル化状態を、MS-RDA で解析した。MS-RDA は、牛島らの方法<sup>32)</sup>と同様に行った。プライマーは RHpa24, RHpa11, JHpa24, JHpa11, NHpa24, NHpa11 を用いた (Table 1)。アダプターは、RHpa24 と RHpa11, JHpa24 と JHpa11, NHpa24 と NHpa11 をそれぞれライゲーションして RHpa アダプター, JHpa アダプター, NHpa ア

ダプターとした。VCZ 群の DNA をドライバー、Control 群の DNA をテスターとして RDA を行い、VCZ 群での高メチル化部位を検出する系と、Control 群の DNA をドライバー、VCZ 群の DNA をテスターとして、VCZ 群での低メチル化部位を検出する系を設定した。3 サイクルの RDA 終了後、RDA 産物を 2% アガロースで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した後、紫外線照射下で泳動像を確認した。得られたバンドをゲルから切り出して DNA を抽出し、RDA 産物のサブクローニングを行った。シークエンスを行った後、National Center for Biotechnology Information の BLAST システムを利用して候補遺伝子を検索した。

### 9. bisulfite sequencing

MS-RDA で同定された異メチル化候補遺伝子の一つである Ral-gds について、その上流のメチル化レベルを解析するために、bisulfite sequencing を行った。Ral-gds の転写開始部位上流 419~191 bp の領域を増幅するようプライマーを設計した (Table 1)。方法は、Rein ら<sup>27)</sup>の方法を参考にした。ただし、アルカリ処理には 2 N の NaOH を用い、bisulfite 処理には 4 M の bisulfite 溶液を用いて 50°C で 4 時間反応させた。反応液はイソプロパノール沈殿を行い精製し、乾燥させた DNA に 0.2 N の NaOH を 200 µl 加えて混和し、37°C で 30 分間反応させた。この DNA 溶液は 5 M NH<sub>4</sub>OAc を用いてエタノール沈殿を行い精製した後、30 µl の超純水で溶解した。bisulfite 処理した DNA を鋳型にして PCR を行った。反応時間は、94°C、2 分間の後、94°C 30 秒→60°C 30 秒→72°C 30 秒のステップを 35 サイクル行った。アガロース電気泳動で確認された PCR 産物は、DNA を抽出してサブクローニングを行った。その後、シークエンスを行って得られた塩基配列から、候補遺伝子上流域のメチル化状態を解析、比較した。

## 結 果

### 1. 生殖能力への影響調査

VCZ 群と Control 群の各世代において、交配開始から出産までの日数を比較した (Fig. 1-A)。F1, F2 とも VCZ 群の交配で出産までの日数が延長傾向にあった。これは、VCZ が世代を超えてマウスの生殖能力に影響を及ぼすことを示している。

また、雌雄どちらの生殖能力により大きな影響を及ぼすのかを調べるために、VOC (VF1 雄×CF1 雌)、RVOC (CF1 雄×VF1 雌) の交配を行い、交配

**Table 1** Primers for MS-RDA and bisulfite sequencing. RHpa24, RHpa11, JHpa24, JHpa11, NHpa24, and NHpa11 were used for MS-RDA. Ral-B-F1 and Ral-B-F2 were used for bisulfite sequencing.

Primers	Sequence
RHpa24	5'AGC ACT CTC CAG CCT CTC ACC GAC 3'
RHpa11	5'CGG TCG GTG AG 3'
JHpa24	5'ACC GAC GTC GAC TAT CCA TGA AAC 3'
JHpa11	5'CGG TTT CAT GG 3'
NHpa24	5'AGG CAA CTG TGC TAT CCG AGG GAC 3'
NHpa11	5'CGG TCC CTC GG 3'
Ral-B-F1	5'CCC CAT ATC CAC CTA TAC TC 3'
Ral-B-R1	5'GAT TTG GGA IGT IGG TTT GGT G 3'

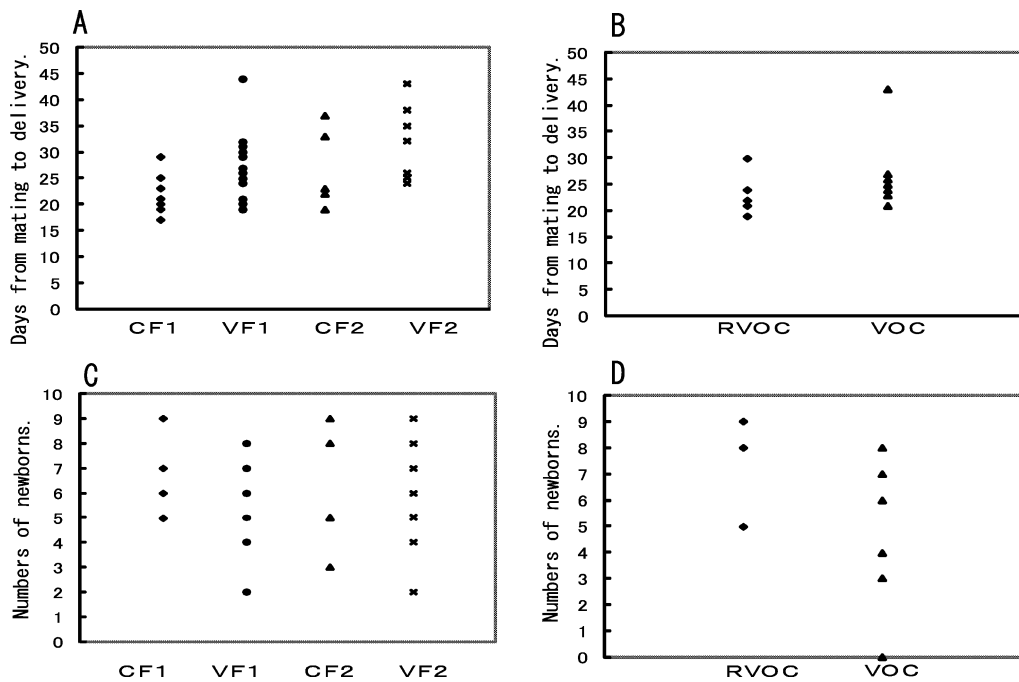


Fig. 1 Transgenerational effects of VCZ on fertility.

Days from mating to delivery (A and B) and numbers of newborn (C and D) were examined. CF1 and CF2 show control generations, and VF1 and VF2 show VCZ generations. VOC shows outcross between VCZ F1 generation males and control F1 generation females. RVOC shows outcross between control F1 generation males and VCZ F1 generation females.

開始から出産までの日数を比較した (Fig. 1-B)。VOCはRVOCと比較して、わずかに出産までの日数延長が認められた。産子数では、F1、F2両世代においてVCZ群で極端に産子数の少ない、もしくは妊娠が成立しない(産子数=0)交配が認められた (Fig. 1-C)。VOCは、RVOCと比較して産子数が少ない交配が多かった (Fig. 1-D)。産子の雌雄比はVCZ群とControl群での明らかな差は認められなかった (図には示していない)。よって妊娠8~15日齢のVCZ投与は生殖能力に影響を及ぼし、その影響は雌よりも雄で大きいことが明らかとなった。

## 2. 組織学的解析

前項において、VCZ投与は、雌よりも雄に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。よって雄の精巣に局限して解析を行った。VCZ投与による形態学的変化を観察するため、100日齢の雄の精巣パラフィン切片 (7 $\mu$ m厚) を用いてHE染色を行った。F1、F2世代ともに、Control群とVCZ群間で大きな形態学的変化は認められなかった。Control群、VCZ群ともに精細管内での精子形成が確認された (Fig. 2)。

精細管細胞でのアポトーシスに対する影響を確認するため、精巣パラフィン切片 (7 $\mu$ m厚) を用いて

TUNEL染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。VCZ群の精巣ではControl群に比べて、多くのアポトーシス陽性細胞が検出された (Fig. 3 and Table 2)。これらのアポトーシス陽性細胞の多くは精細管基底部に存在した。

このように、妊娠8~15日齢のVCZ暴露は、世代

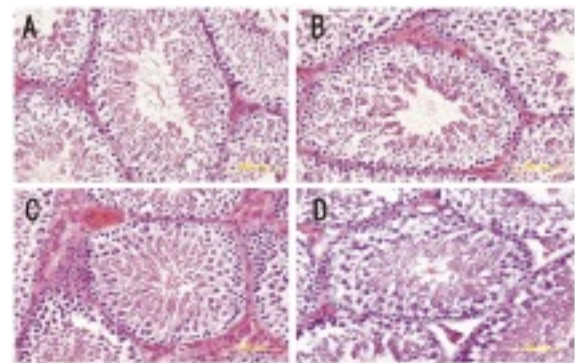
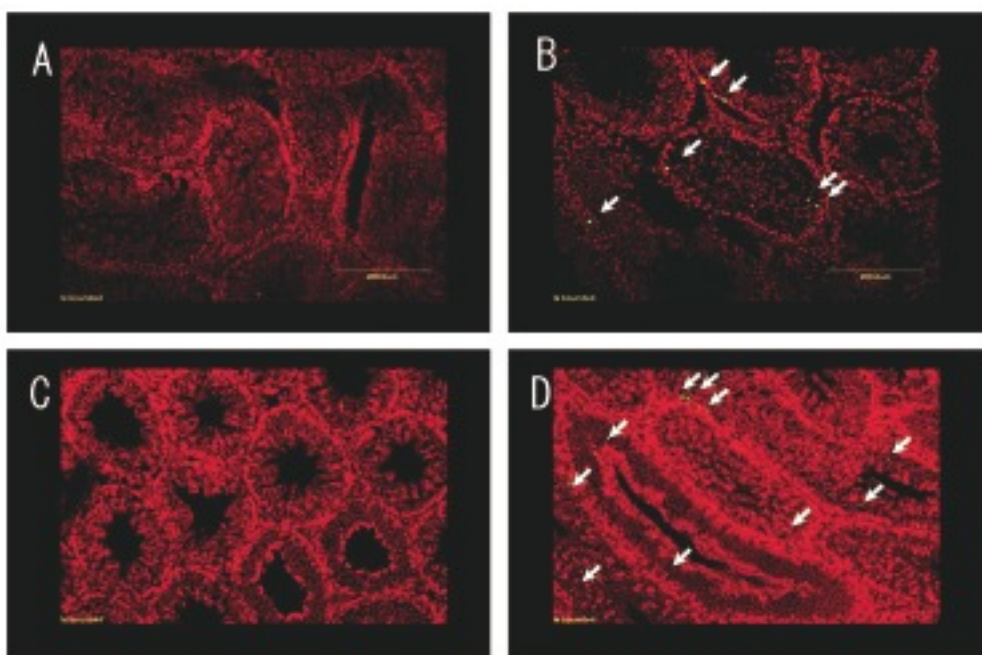


Fig. 2 Testis histology from control and VCZ generations.

A and C show control generations (A; CF1 and C; CF2). B and D show VCZ generations (B; F1 and D; F2). 100-day-old postnatal testes were used. Paraffin sections (7 $\mu$ m thick) were stained with hematoxylin and eosin. Scale bars represent 100  $\mu$ m.



**Fig. 3** VCZ treatment induced spermatogenic cell apoptosis in the posterity testis. The images show TUNEL assay from control (A; F1 and C; F2) and VCZ (B; F1 and D; F2) generations of 100-day-old posterity testes. TUNEL assay was performed to detect apoptotic cells. Arrows indicate TUNEL positive cells. A lot of TUNEL positive cells were detected in VCZ male compared with control male. Scale bars represent 200  $\mu$ m.

**Table 2** Numbers of apoptotic cells from control and VCZ male testis. In VCZ generatinos, increased numbers of TUNEL positive cells were observed.

Generation	Numbers of seminiferous tubules	Numbers of TUNEL positive cells	The ratio of TUNEL positive cells to seminiferous tubule
CF1	171	18	0.105
CF1	158	44	0.27
CF2	268	26	0.097
CF2	214	16	0.075
VF1	232	165	0.711
VF1	196	81	0.413
VF2	186	138	0.741
VF2	206	157	0.762

を超えて雄の生殖能力に影響を及ぼし、精細管におけるアポトーシスを誘発した。しかし、アポトーシスを起こしたのは基底部付近の一部の細胞であり、組織の形態学的な異常を引き起こす程の影響は認められなかった。また、精子の形成は Control 群と同程度確認された。

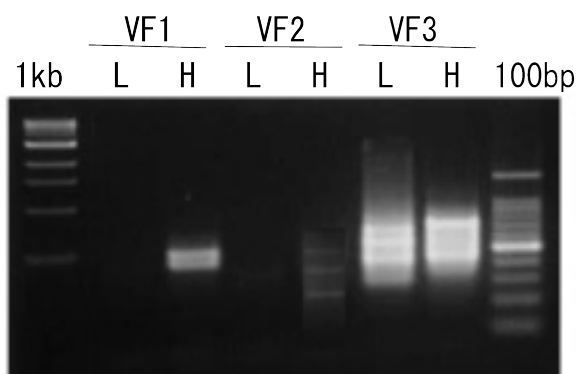
### 3. MS-RDA による異メチル化部位の検出

VCZ 投与による transgenerational な表現型の伝達に、DNA メチル化の変化が関与しているかど

うかを調べるために、MS-RDA を行い VCZ 群での DNA 異メチル化部位を濃縮、検出した。解析には F1 ~ F3 成熟雄の精巣ゲノム DNA を用いた。Control 群と VCZ 群のゲノム DNA メチル化状態に差が見られ、F1 と F2 では、Control 群と比較して VCZ 群で高メチル化されている部位のみが検出されたが、F3 では、VCZ 群の高メチル化部位と低メチル化部位の両方が検出された (Fig. 4)。また、検出された DNA 断片についてシークエンスを行い、BLAST システムで検索したところ、VCZ 群で異メチル化状態にあると思われる候補遺伝子が複数同定された (Table 3 and 4)。

### 4. bisulfite sequencing による候補遺伝子上流域のメチル化状態確認

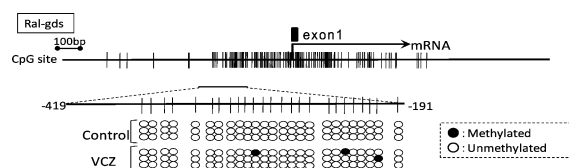
MS-RDA により同定された異メチル化候補遺伝子のうち、VCZ 群で高メチル化状態が示唆された *Ral-gds* 遺伝子上流域について、bisulfite sequencing を行い、メチル化状態を解析した。転写開始部位の上流 419~191 bp の解析では、Control 群では非メチル化状態だが VCZ 群でメチル化状態にある CpG 配列が確認された (Fig. 5)。しかし、Control 群と比較してメチル化状態に変化がみられない CpG 配列がほとんどであった。今回解析を行った領域で



**Fig. 4** Aberrant methylated regions of genomic DNA were amplified by MS-RDA.

75-day-old VCZ posterity testes were used. L; Hypomethylated regions of genomic DNA. H; Hypermethylated regions of genomic DNA. 1 kb; 1 kb DNA ladder marker. 100 bp; 100 bp DNA ladder marker.

は、VCZ 群でのメチル化状態に大きな変化は認められなかったが、妊娠期における VCZ 投与は、ゲノムの本来のメチル化状態に影響を与え、異メチル化状態が生殖細胞によって次世代へ伝わることで、数世代にわたる transgenerational な影響を引き起こす可能性が示唆された。



**Fig. 5** Methylation states of upstream of Ral-gds gene with bisulfite sequencing.

Vertical lines show CpG sites of genomic DNA. Open circles (○) show unmethylated cytosine and closed circles (●) show methylated cytosine. In the genomic DNA of VCZ male testis, a few CpG sites were methylated.

## 考 察

本研究により、抗アンドロゲン作用による影響が報告されてきた VCZ による、マウスでの transgenerational な影響が明らかとなった。妊娠 8~15 日における VCZ の投与では、交配初日から出産までの日数が延長し、産子数は減少した。また、VOC と RVOC の比較によって、生殖能力への影響は雌よりも雄で顕著に現れる可能性が示唆された。これは、VCZ 投与時期が雄の生殖細胞の分化・リプログラミング時期<sup>19)</sup>に相当することにも一致する。

また精巣パラフィン切片の TUNEL 染色により、

**Table 3** Hypermethylated candidate genes in VCZ generation analyzed by MS-RDA.

Hypermethylated regions were detected by MS-RDA. RDA products were cloned and sequenced. Then, candidates were determined using the National Center for Biotechnology Information databank BLAST system.

Sample No.	Generation	Candidate gene	CpG island	Relevant diseases
1, 2, 3, 4	F1	reticulon 2 isoform B	Yes	Amyotrophic lateral sclerosis, Fatal degenerative disorder muscle
5	F1	cytoplasmic nuclear factor of activated T-sells 3	Yes	Leydig cell apoptosis
7	F2	TSPY-like 1	Yes	Sudden infant death syndrome, Hereditary persistenseof fetal hemoglobin, Deltabeta-thalassemia
8	F2	RAB2, member RAS oncogene family-like	Yes	Dysferlinopathy
9	F2	Ral-gds	Yes	cardiac hypertrophy
11	F3	dopa decarboxylase	Yes	Parlkinson's disease
13	F3	neurofilament 3, medium	Yes	Alzheimer's disease
14	F3	transcription factor CP2-like 3	Yes	Alzheimer's disease

**Table 4** Hypomethylated candidate genes in VCZ generation analyzed by MS-RDA.

Candidates were determined by similar manner of the determination of hypermethylated candidates.

Sample No.	Generation	Candidate gene	CpG island	Relevant diseases
1, 3	F3	basal cell adhesin molecule	Yes	Epithelial skin tumors, Sickle cell disease, Vaso-occlusive episodes
2	F3	latent transforming growth factor beta binding protein 4	Yes	Human mammary ademocarcinomas, Abnormal lung development (mouse), Colorectal cancer (mouse)

VCZ群の精細管ではControl群に比べて多くのアポトーシス陽性細胞が検出された(Fig. 3)。Skinnerらの報告では形態学的な変化や造精能にも影響が認められた<sup>1)</sup>が、今回の研究では精巣で大きな形態学的変化は見られなかった。また造精能が阻害されることもなかった(Fig. 2)。Skinnerらの研究ではラットを使用していたが、本研究では、我々はマウスを使用した。よってこのような影響の違いは、マウスとラットの種差により、同じ投与量のVCZに対する感受性が異なることによるのかもしれない。いずれにせよ、VCZ投与により、精子は形成されるが精子機能に何らかの障害を受けており、これには精細管内のアポトーシス細胞増加が関与している可能性が高い。

このようなtransgenerationalな影響にDNAのメチル化状態の変化が関与しているのかを確認することを目的として、MS-RDAを行って雄精巣でのゲノムDNAの異メチル化部位を検出した。VCZ群での高メチル化部位はF1~F3で検出された。一方、VCZ群での低メチル化部位はF3のみで検出され、F1とF2では検出されなかった。この結果より、VCZ投与によりDNAのメチル化パターンが乱れ、F3では低メチル化部位も検出されたが全体的にはゲノムワイドなメチル化亢進が誘導される可能性が示唆された。MS-RDAで濃縮、検出された異メチル化DNA断片をシーケンスして候補遺伝子の検索を行った結果、複数の候補遺伝子が同定され、多くは遺伝子上流にCpGアイランドを持つ遺伝子であった。異メチル化候補遺伝子の一つに、ライディッヒ細胞のアポトーシス誘導に関与する遺伝子であるcytoplasmic nuclear factor of activated T-cells 3が同定された。しかし今回アポトーシスは精巣の間質には認められなかったため、この遺伝子と精細管におけるアポトーシスとの直接の関連は不明である。その他の候補遺伝子で直接生殖能力への影響やアポトーシス誘導に結びつくような遺伝子は認められなかった。しかし、アルツハイマー病やパーキンソン病など、脳疾患に関連する遺伝子が重複して同定された(Table 3 and 4)。

VCZ群での高メチル化状態が示唆された候補遺伝子のうち、Ral-gdsの上流419~191 bp領域についてbisulfite sequencingを行いメチル化状態を解析した結果、Control群では非メチル化状態だがVCZ群でサブクローニングした一部のクローンでメチル化亢進が認められた(Fig. 5)。しかし、メチル化亢進が見られたクローンでも、領域内の25のCpG配列のうち、1つもしくは2つのCpG配列が

メチル化しているに過ぎなかった。EDCによるメチル化への影響は、非メチル化領域の全体的なメチル化を亢進するというよりは、低メチル化状態、および中等度メチル化領域のメチル化が亢進する<sup>6)</sup>。このように、1つの遺伝子におけるわずかなメチル化の変化は表現型の変化には不十分な要因であるかもしれない<sup>7)</sup>。しかし、他の多くの遺伝子のプロモーター領域においてもわずかながらメチル化の変化が起これば、相互作用によって将来的に多くの疾病リスクを抱えることになるだろう。bisulfite sequencingで解析可能なDNA断片は200~300 bpであるので、今回解析を行った周辺の上流域についても現在解析を進めている。また、他の候補遺伝子の上流域についても解析を行う必要がある。

今回の研究で、妊娠期のEDC暴露により、数世代にわたってtransgenerationalな影響が残った。transgenerationalな影響は、VCZが胎子のリプログラミング時期にメチル化パターンの書き換えに影響し、生殖細胞によって異メチル化パターンが次世代へ伝えられたことが原因と考えられる。表現型の変化は高率に現れたため、この影響が、発生頻度の低いDNA塩基配列変異のようなジェネティックな変化が原因である可能性は考えにくい。また、Skinnerらの報告で、VCZ群の血清テストステロンレベルは正常値を示したことにより<sup>8)</sup>、今回の影響はVCZの抗アンドロゲン作用が主要因である可能性は低い。また、今回のVCZ投与期間である妊娠8~15日は、胎子での雄性生殖細胞の分化が活発な時期であり、メチル化パターンの書き換えであるリプログラミングもこの時期に行なわれる<sup>19)</sup>。したがってVCZはこのリプログラミングに影響を与え、メチル化パターンを本来とは異なったものに書き換えてしまった可能性が考えられる。

さらに生殖細胞においては、インプリント遺伝子のメチル化パターンが書き換えられる時期であり、VCZが、インプリント遺伝子の発現を乱している可能性もある。最近のSkinnerらの報告によると、インプリンティングに関わり、生殖細胞特異的なDNAメチル基転移酵素のアイソフォームであるDnmt3L<sup>5)</sup>の発現量減少が報告されており<sup>3)</sup>、今後Dnmt3Lをターゲットとした解析も興味深い。

今回は雄の生殖能力に局限して解析を行ったが、MS-RDAで検出された異メチル化候補遺伝子の多くは、遺伝子発現の異常が何らかの疾患と関与するものであった。これまで、妊娠中の母親の喫煙や栄養状態<sup>20,26)</sup>、化学物質暴露など多くの環境因子が成人後の疾病発生率を上昇させるという報告は数多く

あるが、その詳細なメカニズムは不明な部分が多い。今回の研究は、胎子期の外因性の化学物質の暴露がDNAのメチル化などのエピジェネティックな調節を乱すことにより、その影響が数世代後まで伝達される可能性を示唆している。

F1～F3において、60日～100日齢で重篤な疾患を発病した個体はなかった。このように、異メチル化パターンを持った個体が性成熟しても即座に重篤な疾患等で死亡することなく、生殖能力の低下は認められるものの、次世代を作出することが可能であるという事実は、生殖細胞の誤ったメチル化パターンが規定値として次世代へ伝わり続ける可能性をさらに増大させている。

内分泌攪乱化学物質による、生殖細胞の永続的なエピジェネティクス規定値の変化の可能性は、成体での影響はほとんどないとされている内分泌攪乱化学物質の毒性評価について、新たなパラメーターを提示するものである。このような環境因子がエピジェネティックな変化を引き起こすメカニズムについて、今後さらに検討していく必要がある。

#### 謝 辞

本研究は、2004年度酪農学園大学・酪農学園大学短期大学部共同研究の助成(採択No.5)を受けたものである。

#### References

- Anway, M.D., Cupp, A.S., Uzumcu, M. and Skinner, M.K. 2005. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* **308**: 1466-9.
- Anway, M.D., Leathers, C. and Skinner, M.K. 2006. Endocrine disruptor vinclozolin induced epigenetic transgenerational adult-onset disease. *Endocrinology*. **147**: 5515-23.
- Anway, M.D., Rekow, S.S. and Skinner, M.K. 2008. Transgenerational epigenetic programming of the embryonic testis transcriptome. *Genomics* **91**: 30-40.
- Barber, R., Plumb, M.A., Boulton, E., Roux I. and Dubrova, Y, E. 2002. Elevated mutation rates in the germ line of first- and second-generation offspring of irradiated male mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 6877-82.
- Bourc'his, D., Xu, G.L., Lin, C.S., Bollman, B. and Bestor, T.H. 2001. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* **294**: 2536-9.
- Chang, H.S., Anway, M.D., Rekow, S.S. and Skinner, M.K. 2006. Transgenerational epigenetic imprinting of the male germline by endocrine disruptor exposure during gonadal sex determination. *Endocrinology* **147**: 5524-41.
- Cupp, A.S., Uzumcu, M., Suzuki, H., Dirks, K., Phillips, B. and Skinner, M.K. 2003. Effect of transient embryonic in vivo exposure to the endocrine disruptor methoxychlor on embryonic and postnatal testis development. *J. Androl.* **24**: 736-45.
- Domoradzki, J.Y., Pottenger, L.H., Thornton, C.M., Hansen, S.C., Card, T.L., Markham, D. A., Dryzga, M.D., Shiotsuka, R.N. and Waechter, J.M. Jr. 2003. Metabolism and pharmacokinetics of bisphenol A (BPA) and the embryo-fetal distribution of BPA and BPA-mono-glucuronide in CD Sprague-Dawley rats at three gestational stages. *Toxicol. Sci.* **76**: 21-34.
- Dong, H., Bonala, R.R., Suzuki, N., Johnson, F., Grollman, A.P. and Shibutani, S. 2004. Mutagenic potential of benzo[a]pyrene-derived DNA adducts positioned in codon 273 of the human P53 gene. *Biochemistry* **43**: 15922-8.
- Hoyer, P.B. Reproductive toxicology: current and future directions. 2001. *Biochem. Pharmacol.* **62**: 1557-64.
- Hrelia, P., Fimognari, C., Maffei, F., Vigagni, F., Mesirca, R., Pozzetti, L., Paolini, M. and Cantelli, F.G. 1996. The genetic and non-genetic toxicity of the fungicide Vinclozolin. *Mutagenesis* **11**: 445-53.
- Inoue, H., Tsuruta, A., Kudo, S., Ishii, T., Fukushima, Y., Iwano, H., Yokota, H. and Kato, S. 2005. Bisphenol a glucuronidation and excretion in liver of pregnant and non-pregnant female rats. *Drug. Metab. Dispos.* **33**: 55-9.
- Jaenisch, R. 1997. DNA methylation and imprinting: why bother? *Trends. Genet.* **13**: 323-9.
- Kaneda, M., Okano, M., Hata, K., Sado, T., Tsujimoto, N., Li, E. and Sasaki H. 2004.



- Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* **429**: 900-3.
15. Katsiadaki, I., Morris, S., Squires, C., Hurst, M.R., James, J.D. and Scott, A.P. 2006. Use of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) as a sensitive in vivo test for detection of environmental antiandrogens. *Environ. Health. Perspect.* **114**: 115-21.
  16. Kelce, W.R., Monosson, E., Gamcsik, M.P., Laws, S.C. and Gray, L.E. Jr. 1994. Environmental hormone disruptors: evidence that vinclozolin developmental toxicity is mediated by antiandrogenic metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **126**: 276-85.
  17. Kubo, K., Arai, O., Omura, M., Watanabe, R., Ogata, R. and Aou, S. 2003. Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats. *Neurosci. Res.* **45**: 345-56.
  18. Lee, M.H., Chung, S.W., Kang, B.Y., Park, J., Lee, C.H., Hwang, S.Y., and Kim, T.,S. 2003. Enhanced interleukin-4 production in CD4+ T cells and elevated immunoglobulin E levels in antigen-primed mice by bisphenol A and nonylphenol, endocrine disruptors: involvement of nuclear factor-AT and Ca<sup>2+</sup>. *Immunology* **109**: 76-86.
  19. Li, J.Y., Lees-Murdock, D.J., Xu, G.L. and Walsh, C.P. 2004. Timing of establishment of paternal methylation imprints in the mouse. *Genomics* **84**: 952-960.
  20. Lillycrop, K.A., Phillips, E.S., Jackson, A.A., Hanson, M.A. and Burdge, G.C. 2005. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J. Nutr.* **135**: 1382-6.
  21. Matsumoto, J., Yokota, H., and Yuasa, A. 2002. Developmental increases in rat hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities toward xenoestrogens and decreases during pregnancy. *Environ. Health. Perspect.* **110**: 193-6.
  22. Molina-Molina, J.M., Hillenweck, A., Jouanin, I., Zalko, D., Cravedi, J.P., Fernández, M.F., Pillon, A., Nicolas, J.C., Olea, N. and Balaguer, P. 2006. Steroid receptor profiling of vinclozolin and its primary metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **216**: 44-54.
  23. Monosson, E., Kelce, W.R., Lambright, C., Ostby, J. and Gray, L.E. Jr. 1999. Peripubertal exposure to the antiandrogenic fungicide, vinclozolin, delays puberty, inhibits the development of androgen-dependent tissues, and alters androgen receptor function in the male rat. *Toxicol. Ind. Health.* **15**: 65-79.
  24. Palanza, P., Morellini, F., Parmigiani, S. and vom Saal, F.S. 1999. Prenatal exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on behavioral development. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **23**: 1011-27.
  25. Patisaul, H.B. and Polston, E.K. 2008. Influence of endocrine active compounds on the developing rodent brain. *Brain. Res. Rev.* **57**: 352-62.
  26. Pembrey, M.E., Bygren, L.O., Kaati, G., Edvinsson, S., Northstone, K., Sjöström, M. and Golding, J. 2006. Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. *Eur. J. Hum. Genet.* **14**: 131-2.
  27. Rein, T., Zorbas, H. and DePamphilis, M.L. 1997. Active mammalian replication origins are associated with a high-density cluster of mCpG dinucleotides. *Mol Cell Biol.* **17**: 416-26.
  28. Shinomiya, N. and Shinomiya, M. Toxicol Lett. 2003. Dichlorodiphenyltrichloroethane suppresses neurite outgrowth and induces apoptosis in PC12 pheochromocytoma cells. *Toxicol. Lett.* **137**: 175-83.
  29. Skinner, M.K. and Anway, M.D. 2005. Seminiferous cord formation and germ-cell programming: epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1061**: 18-32.
  30. Tilghman, S.M. 1999. The sins of the fathers and mothers: genomic imprinting in mammalian development. *Cell* **96**: 185-93.
  31. Tyl, R.W., Myers, C.B., Marr, M.C., Thomas, B.F., Keimowitz, A.R., Brine, D.R., Veselica, M.M., Fail, P.A., Chang, T.Y., Seely, J.C.,

- Joiner, R.L., Butala, J.H., Dimond, S.S., Cagen, S.Z., Shiotsuka, R.N., Stropp, G.D. and Waechter, J.M. 2002. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Sci.* **68**: 121-46.
32. Ushijima, T., Morimura, K., Hosoya, Y., Okonogi, H., Tatematsu, M., Sugimura, T. and Nagao, M. 1997. Establishment of methylation-sensitive-representational difference analysis and isolation of hypo- and hypermethylated genomic fragments in mouse liver tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 2284-9.
33. Völkel, W., Colnot, T., Csanády, G.A., Filser, J.G. and Dekant, W. 2002. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem. Res Toxicol.* **15**: 1281-7.
34. Yokota, H., Iwano, H., Endo, M., Kobayashi, T., Inoue, H., Ikushiro, S. and Yuasa, A. 1999. Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem. J.* **340**: 405-9.

#### Abstract

Previous studies have revealed various adverse effects for endocrine disruptors. However, these chemicals may have actions in addition to their endocrine-disrupting effects. In a previous report, exposure of female mice to the antiandrogenic endocrine disruptor vinclozolin (VCZ) showed effects on transgenerational male fertility and carcinogenicity. Although these transgenerational effects appear to be due to changes in DNA methylation patterns, which is part of epigenetic regulation, the mechanisms of this phenomenon are unclear. In this study, we confirmed that VCZ caused transgenerational effects on male fertility and investigated whether VCZ was involved in DNA methylation.

Transient exposure of gestating female mice (F0) to VCZ (100 mg/kg/day) during gestating days 8-15 induced adverse effects on adult male fertility in the F1 and F2 generation. In both F1 and F2 males, increased numbers of apoptotic cells were observed in the testes. An aberrant methylation state in genomic DNA between VCZ and control generations was detected by methylation-sensitive representational difference analysis (MS-RDA). Bisulfite sequencing then revealed candidate genes showing aberrant DNA methylation patterns.

Transient embryonic exposure to VCZ thus causes aberrant DNA methylation patterns, and these epigenetic alterations may be associated with subsequent adult phenotypes.