

学位論文題名

Development of an evaluation system for chemical
contaminant toxic risks and protective health effects of
natural food components using epigenetic factors
(エピゲネチック因子を用いた化学物質毒性リスクおよび食品組成の
健康影響に関する評価システムの開発)

学位論文内容の要旨

環境汚染化学物質および食品組成等の生体への影響評価は古くから線量効果等を調べることで行なわれてきたが、多くの手間と実験動物を用いることから忌避される傾向にある。また、Rachel Carson著の「沈黙の春」が刊行されて以来、化学物質が受容体と反応し生体へ影響を及ぼす場合、必ずしもその影響が線量効果関係に無いことが知られている。これらのことから、申請者の所属する研究室では、2000年以降、細胞死の一つであるアポトーシスとその因子変動を化学物質リスク評価に用いる系を開発しており、すでにトリブチルスズが1 pptで薬物由来のアポトーシスを抑制すること、及びノニルフェノールがアポトーシスを増強すること等、多くの成果を挙げて来ている。申請者もこの方法を踏襲し、内分泌攪乱化学物質の一種であるフタル酸ジエチルが栄養因子欠乏によって誘導されるアポトーシスを増強すること、及びその増強経路がBaxの増加によりミトコンドリア膜透過性増加が起り、シトクロムC放出が増えること、及びCaspase 3活性の有意な上昇によるものであること等を新たに見出した。しかし、現在、化学物質のより直接的な遺伝子への影響及び発生段階等への影響に関する新たな評価系の確立が求められつつある。言い換えるとDNAからはじまり最終的な生物を形づくるすべての制御された過程における化学物質の影響を知ることが求められている。そこで、DNAメチレーション等に関わるエピゲネチックな因子および寿命等に関わるサーチュイン因子の変動が新しい化学物質の影響評価系として用いることが可能か否か明らかにすることを本研究の目的とした。

本論文は6章から構成され、第1章では研究の背景として化学物質の影響評価の歴史のあらまし、及びエピゲネチックな因子と寿命等に関わるサーチュイン因子の機能等を序論として述べた。

第2章では、すでに上述したように、申請者の所属する研究室でこれまでに開発された方法を用いてフタル酸ジエチルとアポトーシスとの関係を検討し、フタル酸ジエチルがPC12細胞においてアポトーシスを増強する機構に関して述べ、さらに新しい影響評価系の必要性を述べた。

第3章では、化学物質の影響を評価することに、エピゲネティックな因子と寿命等に関わるサーチュイン因子の発現を調べることを用いることが可能か否かを調べるために、まずそれら因子のリアルタイムPCR用のプライマーを設計した。第一に設計したプライマーのうちそれぞれの因子に対して予想通りのPCR産物を得られるプライマーの組み合わせを選択した。次に第2章で行なったフタル酸ジエチルがアポトーシスを増強する条件において、設計選択したプライマーを用いてエピゲネティック因子等の発現量を検討したところ、フタル酸ジエチルがアポトーシスを増強する際に、p53因子および新規生成開始シグナルであるDNMT3aが関与していること、および長寿因子であるSIRT1発現が有意に増加することが確かめられ、これら因子が化学物質投与（この場合はフタル酸ジエチル投与）により変動することが証明された。

第4章では、エピゲネティック因子等が*in vivo*の系でも有効に化学物質投与で変動するか否かを確かめた。本章では、妊娠期低栄養母親の授乳期に茶カテキンを投与して育った新生仔およびカテキンを投与していない新生仔の腎臓中の脂肪代謝系とエピゲネティックな因子等の変動を普通食を与えた母親の新生仔をコントロールとして比較した。これまでの研究で妊娠期低栄養授乳期高栄養で新生仔が肥満になることが良く知られている。ポリフェノール類であるカテキンがその肥満化を抑制できるか否かを検討することも本章の大きな目的である。その結果、脂肪代謝に関与しているAMP活性化プロテインキナーゼのリン酸化および血管内皮型一酸化窒素合成酵素のリン酸化がカテキン投与群で有意に増加し、肥満を抑制する動きがあることが確かめられた。またその動きに合わせてエピゲネティックな因子（DNMT1、DNMT3a、SIRT1およびSIRT2）は恒常性の維持を果たすような動きつまり、カテキン投与でコントロール群に近い値に戻るような傾向が認められた。以上の結果から*in vivo*の系でも、化学物質投与による影響を評価することが可能であると考えられた。

第5章では、すでに3章でも確かめているが*in vitro*の系でエピゲネティック因子等が化学物質投与で変動するか否かを、PC12細胞に銅と過酸化水素を投与することで再確認した。その結果、銅投与によってPC12細胞にアポトーシスが誘導され、そのアポトーシスは過酸化水素によって増大した。その際にエピゲネティック因子等（DNMT1、DNMT3a、SIRT1およびSIRT2）は銅および過酸化水素投与で全て増加する傾向を示した。以上の結果から、これらDNMT1、DNMT3a、SIRT1およびSIRT2の4つの因子は*in vivo*及び*in vitro*の双方の系で化学物質の生体影響を評価する上で有効であることが確かめられた。

第6章では、2章から5章まで得られた結果を整理し、それぞれの意義を述べ、本エピゲネティック因子（DNMT1、DNMT3a、SIRT1およびSIRT2）の発現定量法が新たに化学物質の後生的な影響を評価する上で有効な方法であることを示した。

以上の研究結果から、本研究で提示されたエピゲネティック因子（DNMT1、DNMT3a、SIRT1およびSIRT2）の発現定量法は化学物質の生体影響を評価するのみに留まらず、遺伝子表現型を形作る際にどのような化学物質がどのような影響を与えるのかを明らかにする研究への将来的な貢献も期待されるものであることが示された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	田中俊逸	
副査	教授	古月文志	
副査	准教授	鈴木光次	
副査	助教	藏崎正明	
副査	教授	斎藤健	(大学院保健科学研究所)
副査	教授	佐藤伸	(青森県立保健大学大学院健康科学研究科)

学位論文題名

Development of an evaluation system for chemical contaminant toxic risks and protective health effects of natural food components using epigenetic factors

(エピゲネチック因子を用いた化学物質毒性リスクおよび食品組成の健康影響に関する評価システムの開発)

環境汚染化学物質および食品組成等の生体への影響評価は古くから線量効果等を調べることで行なわれてきたが、多くの手間と実験動物を用いることから忌避される傾向にある。また、Rachel Carson著の「沈黙の春」が刊行されて以来、化学物質が受容体と反応し生体へ影響を及ぼす場合、その影響が必ずしも線量効果関係に無いことが知られている。申請者の所属する研究室では、2000年以降、細胞死の一つであるアポトーシスとその因子変動を化学物質リスク評価に用いる系を開発しており、すでにトリブチルスズが1 pptで薬物由来のアポトーシスを抑制すること、およびノニルフェノールがアポトーシスを増強すること等、多くの成果を挙げて来ている。申請者もこの方法を踏襲し、内分泌攪乱化学物質の一種であるフタル酸ジエチルが栄養因子欠乏によって誘導されるアポトーシスを増強すること、およびその増強経路がBaxの増加によりミトコンドリア膜透過性増加が起こり、シトクロムC放出が増えること、およびCaspase 3活性の有意な上昇によるものであること等を新たに見出した。しかし、現在、化学物質のより直接的な遺伝子への影響および発生段階等への影響に関する新たな評価系の確立が求められつつある。言い換えるとDNAを制御する機構における化学物質の影響を知ることが求められている。以上のことから本研究において、DNAメチレーション等に関わるエピゲネチックな因子および寿命等に関わるサーチュイン因子の変動が新しい化学物質の影響評価系として用いることが可能か否か明らかにすることを目的としている。

まず、化学物質の影響を評価することに、エピゲネチックな因子および寿命等に関わるサーチュイン因子の発現を用いることが可能か否かを確かめるために、まずそれら因子のリアルタイムPCR用のプライマーを設計し、発現を反映できるプライマーを選択した。次に本研究の最初に明らかにしたフタル酸ジエチルがアポトーシスを増強するという条件において、

設計選択したプライマーを用いてエピゲネチック因子等の発現量を検討したところ、フタル酸ジエチルがアポトーシスを増強する際に、p53因子および新規生合成開始シグナルであるDNMT3aが関与していること、および長寿因子であるSirt1発現が有意に増加することが確かめられ、これら因子が化学物質投与（この場合はフタル酸ジエチル投与）により変動することを証明した。

次に、エピゲネチック因子等が*in vivo*の系でも化学物質投与で変動するか否かを確かめた。妊娠期低栄養母ラットの授乳期に茶カテキンを投与して育った新生仔および緑茶抽出カテキンを投与していない新生仔の腎臓中の脂肪代謝系酵素の変動とエピゲネチックな因子等の変動を普通食を与えた母親の新生仔をコントロールとして比較した。これまでの研究において妊娠期低栄養授乳期高栄養で新生仔が肥満になることが良く知られている。その結果、脂肪代謝に関与しているAMP活性化プロテインキナーゼのリン酸化および血管内皮型一酸化窒素合成酵素のリン酸化が緑茶抽出カテキン投与群で有意に増加し、肥満を抑制する動きがあることが確かめられた。またその動きに合わせてエピゲネチックな因子(DNMT1、DNMT3a、Sirt1およびSirt2)は恒常性の維持を果たすような動き、つまり、緑茶抽出カテキン投与でコントロール群に近い値にフィードバックするような動きを示した。以上の結果から*in vivo*の系でも、エピゲネチック因子を用いた化学物質投与による影響を評価することが可能であると考えられた。

さらに、*in vitro*系によるアポトーシスの際のエピゲネチックな因子の挙動を再確認するために、生体必須重金属である銅と酸化剤をPC12細胞に投与する実験を行った。その結果、銅投与によってPC12細胞にアポトーシスが誘導され、そのアポトーシスは過酸化水素によって増大した。その際にエピゲネチック因子等(DNMT1、DNMT3a、Sirt1およびSirt2)は、予想された通り、銅および過酸化水素投与で全て増加する傾向を示した。

以上の結果により、エピゲネチック因子(DNMT1、DNMT3a、Sirt1およびSirt2)の発現定量法が化学物質の後生的な影響を評価する上で有効な方法であることが示された。この方法は化学物質の生体影響を評価するのみに留まらず、遺伝子表現型を形作る際にどのような化学物質がどのような影響を与えるのかを明らかにする研究への貢献もかなり期待されると判断された。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士(環境科学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。