

鉛汚染地域のイヌにおける特異的 DNA メチル化の変化

～鉛中毒のメカニズム解明, バイオマーカー開発への光～

ポイント

- ・鉛汚染地域のイヌにおける DNA メチル化の網羅的解析。
- ・神経発生に重要な遺伝子を含むイヌゲノム上の数百カ所の DNA メチル化の変化を検出。
- ・鉛中毒における新規バイオマーカー樹立やメカニズム解明・治療開発に期待。

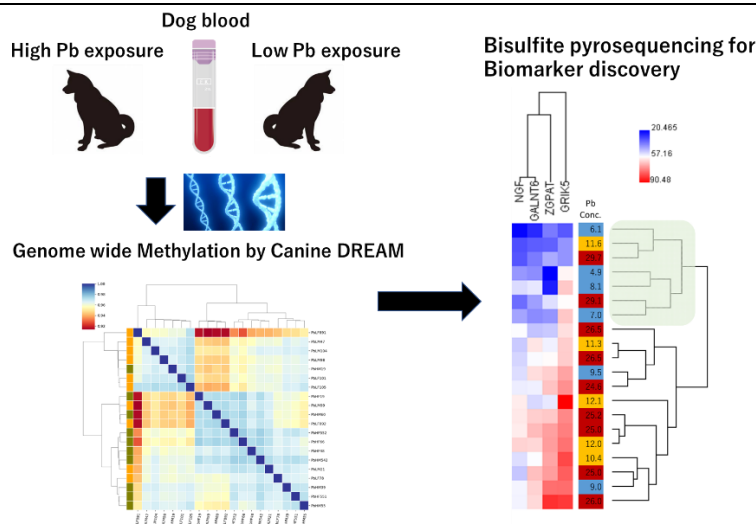
概要

北海道大学大学院獣医学研究院の山崎淳平特任准教授と中山翔太助教、石塚真由美教授、ザンビア大学獣医学部のジョン・ヤベ講師らの研究グループは、ザンビア共和国カブウェ鉱山地域のイヌの血液試料を収集し、鉛の高濃度暴露による DNA メチル化への変化を解析しました。

イヌの血中鉛濃度は、高暴露群の平均値が 43.6 $\mu\text{g/dL}$ 、低暴露群の平均値が 7.2 $\mu\text{g/dL}$ でした。20 サンプル全ての症例における DNA メチル化の相関性解析を検討したところ一部のサンプルを除き鉛への高暴露群と低暴露群で大きく 2 つのクラスターを形成することが判明しました。また、高暴露群と低暴露群の間で DNA メチル化レベルが異なるイヌゲノム上の位置が 827 箇所同定され、その多くは高暴露群において DNA メチル化レベルが高いことが判明しました。加えてこれらの部位の近くには、NGF 遺伝子など神経発生に重要な遺伝子が含まれていました。

これらの結果から、今回検出された DNA メチル化の変化が同遺伝子の発現にも関与し、神経毒性を示す鉛中毒のメカニズムにエピジェネティックな変化、特に DNA メチル化の変化が関与していることが示唆されました。イヌで認められた本研究の成果は、ヒトやそれ以外の動物でも同様の変化が起こっていることを示唆しており、将来的な鉛中毒におけるバイオマーカーの樹立や、エピジェネティックをターゲットとした鉛中毒治療への可能性を秘めています。

なお、本研究成果は、2021 年 5 月 3 日（月）公開の Environmental Pollution 誌にオンラインで掲載されました。



鉛汚染地域のイヌにおける特異的 DNA メチル化研究の概略図

【背景】

エピジェネティクス研究は、塩基配列以外により遺伝子・タンパク質の発現に影響をもたらす機構についての学問であり、この20年ほどで急速に活発になってきています。その代表的なメカニズムの1つであるDNAメチル化はATCGといった塩基配列を対象としたものではなく、DNAにメチル基が修飾されることによる変化です。この変化によりDNAとタンパク質の相互作用に影響を及ぼすことで遺伝子発現が変化することから、現在では、細胞の発生や疾患だけでなく、様々な環境因子、例えば栄養や肥満状態や環境物質の暴露による毒性への潜在的な関連性を説明し得る点から注目されています。

鉛中毒は世界各地で問題となっており、特に乳幼児や子供でリスクが高いことが知られています。石塚教授が代表を務める本研究グループは、ザンビア共和国カブウェ地域において住民の血中鉛濃度の上昇や、鉛中毒による健康被害をこれまでに報告してきました。今回研究グループは同エリアに生息する生態系に注目し環境における鉛汚染（水、土壌など）の影響を検討することとしました。その中でも特にイヌはヒトに比べ行動制限が少ないため、鉛汚染環境への接触機会、暴露量が多く、一部のイヌにおいては実際にヒトにおける鉛関連症状の血中発症濃度（20-30 $\mu\text{g}/\text{dL}$ ）に達している頻度が高いことが判明しています。よって本研究では、このヒトよりも顕著なイヌの鉛暴露といった特性を生かし、山崎淳平特任准教授がイヌにおいて樹立したDNAメチル化パターンの網羅探索的な解析法によるDNAメチル化の変化と関連付けることによって、ヒトにおいては困難である鉛暴露における特異的なDNAメチル化パターンを同定することを目的としました。

【研究手法】

本研究では、2017年4月～5月にカブウェ地域のKasandaエリアにおいて、飼い主の許可の下でイヌの血液試料を集めました。血液中鉛濃度はICP-MS^{*1}を用いて測定しました。血液からDNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いた大規模かつ網羅的なDNAメチル化解析法（本研究グループによってCanine DREAM法^{*2}と名付けられています）によって、鉛への高暴露群と低暴露群におけるDNAメチル化への影響を検討しました。また、DNAメチル化の変化が認められた部位に関してさらなる確証を得るために、同エリアにおける別のイヌ由来血液サンプルを用いて検証を行いました。

【研究成果】

本研究に用いたイヌの血中鉛濃度は、高暴露群の平均値が43.6 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 、低暴露群の平均値が7.2 $\mu\text{g}/\text{dL}$ でした。

これらサンプル由来DNAを用いて次にDNAメチル化解析に進めました。まず、20サンプル全ての症例における相関性を検討したところ、一部のサンプルを除き鉛への高暴露群と低暴露群とで大きく2つのクラスターを形成することが判明しました。

また、高暴露群と低暴露群の間でDNAメチル化レベルが異なるイヌゲノム上の位置が827箇所同定され、そのほとんどが高暴露群においてDNAメチル化レベルが高いことが判明しました。加えてこれらの部位の近くには、NGF遺伝子など神経発生に重要な遺伝子が含まれていました。

これら神経発生に関する遺伝子のDNAメチル化レベルについて同エリアの別のイヌ由来である20個体の血液サンプルを用いた検証を行ったところ、やはり高暴露群における高いDNAメチル化レベルが検出され、これらの部位が鉛による影響を最も受けていることが示唆されました。また、前述の通り、DNAメチル化は遺伝子発現抑制と関連することがよく知られており、今回検出されたDNAメチル化の変化が同遺伝子の発現に関与している可能性が示唆されました。

【今後への期待】

神経毒性を示す鉛中毒のメカニズムにエピジェネティックな変化、特に DNA メチル化の変化が関与していることが示唆されました。イヌで認められた本研究の成果は、ヒトやそれ以外の動物でも同様の変化が起こっていることを示唆しており、将来的な鉛中毒におけるバイオマーカーの樹立や、エピジェネティックをターゲットとした鉛中毒治療への可能性を秘めています。

【謝辞】

本研究は、科学研究費補助金・課題番号 18K05964, 21H02351 (研究代表者：山崎淳平)、科学研究費補助金・課題番号 16H01779, 18K19847, 18KK0287, 21H04919 (研究代表者：石塚真由美)、科学研究費補助金・課題番号 17KK0009, 20K20633 (研究代表者：中山翔太)、国立研究開発法人科学技術振興機構 (JST) と独立行政法人国際協力機構 (JICA) の連携事業である地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム (SATREPS) 「ザンビアにおける鉛汚染のメカニズムの解明と健康・経済リスク評価手法及び予防・修復技術の開発」(研究代表者：石塚真由美) の支援を受けて行われました。

論文情報

論文名 Genome-wide DNA methylation analysis of dogs with high lead exposure living near a lead mining area in Kabwe, Zambia (ザンビア共和国カブウェ鉱山地域の高濃度に鉛暴露されたイヌの DNA メチル化の網羅的解析)

著者名 山崎淳平^{1,2}, 豊巻治也³, 中山翔太³, ジョン・ヤベ^{4,5}, カンポウエ・ムザンド⁴, ヤロスラフ・イエリネク⁶, 横山晶子⁷, 池中良徳^{1,2,3,8}, 滝口満善⁷, 石塚真由美³ (1北海道大学大学院獣医学研究院トランスレーショナルリサーチ推進室, 2北海道大学ワンヘルスリサーチセンター, 3北海道大学大学院獣医学研究院毒性学教室, 4ザンビア大学獣医学部, 5ナミビア大学獣医学部, 6コリエル医学研究所, 7北海道大学動物医療センター, 8ノースウェスト大学)

雑誌名 Environmental Pollution (環境化学・環境毒性学の専門誌)

DOI 10.1016/j.envpol.2021.117229

公表日 2021年5月3日(月)(オンライン公開)

お問い合わせ先

北海道大学大学院獣医学研究院 特任准教授 山崎淳平 (やまざきじゅんぺい)

T E L 011-706-5319 メール j.yamazaki@vetmed.hokudai.ac.jp

北海道大学大学院獣医学研究院 助教 中山翔太 (なかやましようた)

T E L 011-706-5105 メール shouta-nakayama@vetmed.hokudai.ac.jp

北海道大学大学院獣医学研究院 教授 石塚真由美 (いしづかまゆみ)

T E L 011-706-6949 メール ishizum@vetmed.hokudai.ac.jp

プロジェクト URL <http://satreps-kampai.vetmed.hokudai.ac.jp/>

研究室 URL <http://tox.vetmed.hokudai.ac.jp/>

配信元

北海道大学総務企画部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目)

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

【用語解説】

- * 1 ICP-MS … Inductively coupled plasma mass spectrometry（誘導結合プラズマ質量分析）。高エネルギーのプラズマによって原子をイオン化させ、質量数と電荷の比から元素を識別し測定する方法。高感度かつ多元素を一斉に分析できる。
- * 2 Canine DREAM 法 … Digital Restriction Enzyme Analysis of Methylation（DREAM）法をイヌに応用したもの。制限酵素処理によりゲノム DNA を切断、その切断断片情報によるメチル化の有無の判定を次世代シーケンサーによって多量に行う方法。イヌゲノムにおける約 100,000 箇所のメチル化情報を一度に取得可能であり、疾患や環境因子による DNA メチル化の変化をスクリーニングする目的に適している。