

博士論文

メチル化頻度プロファイリング法「MSD-AFLP法」の開発

相場 俊樹

メチル化頻度プロファイリング法「MSD-AFLP 法」の開発

東京大学大学院 医学系研究科

社会医学専攻 健康環境医工学部門

指導教員 遠山 千春 教授

相場 俊樹

目次

略語一覧.....	5
要旨.....	7
第1章 序論.....	8
1.1 エピジェネティックスと DNA メチル化.....	8
1.2 developmental origins of health and disease (DOHaD)	8
1.3 化学物質誘発性 DOHaD の事例.....	9
1.4 実験動物における環境汚染物質の胎生期曝露によるエピゲノム変化.....	9
1.5 学位論文研究の目的.....	11
1.6 第1章の図表.....	13
第2章 methylated site display-AFLP (MSD-AFLP) 法の開発.....	14
2.1 研究背景と目的.....	14
2.2 方法.....	18
2.2.1 試薬.....	18
2.2.2 動物.....	18
2.2.3 ゲノム DNA の調製および全メチル化 DNA の作成.....	19
2.2.4 MSD-AFLP 鋳型ライブラリー作製.....	19
2.2.5 選択的 PCR と電気泳動.....	20

2.2.6 DNA フラグメントの配列決定.....	21
2.2.7 MSRE-PCR.....	21
2.2.8 bisulfite genomic sequencing (BSGS)	22
2.2.9 AFLP 断片候補の検索システム	22
2.2.10 統計解析.....	23
2.3 結果	24
2.3.1 適切な第一次制限酵素の検討.....	24
2.3.2 MSD-AFLP の再現性	25
2.3.3 組織間でメチル化頻度の異なる部位の検出と AFLP 断片候補検索システム による同定率.....	26
2.3.4 MSRE-PCR 法との相関.....	26
2.3.5 MSD-AFLP チャートからの MF 値算出.....	27
2.3.7 BSGS データとの比較.....	27
2.3.8 組織間のメチル化パターン検出.....	28
2.3.9 MSD-AFLP 法の検出感度	28
2.4 考察	29
2.4.1 メチル化部位提示 (MSD:methylated site display) 手法の設計	29
2.4.2 MSD-AFLP 法の評価ならびに他の網羅解析法との比較.....	32
2.4.3 MSD-AFLP 法の応用可能性.....	35
2.5 結論	37
2.6 第 2 章の図表	38
第 3 章 MSD-AFLP 法を用いた胎生期 BPA 曝露マウスの CpG メチル化変動解析..	59

3.1 研究背景と目的	59
3.1.1 BPA の衛生学的研究の意義.....	59
3.1.1.1 BPA のヒトへの曝露と体内動態.....	59
3.1.1.2 低用量 BPA の生殖発生毒性に関するリスク評価について	59
3.1.1.3 低用量 BPA の脳発達への影響.....	60
3.1.1.4 BPA のリスク管理の観点からの国際的動向.....	61
3.1.2 胎生期 BPA 曝露によるエピゲノム影響の解析.....	62
3.2.1 試薬.....	64
3.2.2 動物および投与.....	64
3.2.3 飼育および解剖.....	64
3.2.4 核酸抽出.....	65
3.2.5 逆転写 PCR.....	65
3.2.6 MSD-AFLP 解析	65
3.2.7 統計解析.....	65
3.3 結果	67
3.3.1 産仔数、生存率.....	67
3.3.2 体重、AGD および臓器重量.....	67
3.3.3 海馬における <i>Tceb2</i> 遺伝子の発現変動.....	67
3.3.4 BPA によるメチル化変動の網羅解析.....	68
3.4 考察	69
3.5 結論	71

3.6 第3章の図表	72
総括.....	83
引用文献.....	85
謝辞.....	103

略語一覧

(アルファベット順)

AFLP	amplified fragment length polymorphism
AGD	anogenital distance
BL	body length
BPA	bisphenol-A
DOHaD	developmental origins of health and disease (DOHaD)
FDR	false discovery rate
HELP	<i>Hpa</i> II tiny fragment enrichment by ligation-mediated PCR
KEGG	kyoto encyclopedia of genes and genomes
MBP	methyl-CpG-binding protein
MCAM	methylated CpG island amplification and microarray
MeDIP	methylated DNA immunoprecipitation
MF	methylation frequency
MIAMI	microarray-based integrated analysis of methylation by isoschizomers
MIRA	methylated-CpG island recovery assay
MSAP-PCR	methylation-sensitive arbitrarily primed -PCR

MSD	methylated site display
MSRE-PCR	methylation sensitive restriction enzyme-dependent-PCR
NGS	next generation sequencer
PCA	principal component analysis
PDE4D4	phosphodiesterase type4 variant4
RLGS	restriction landmark genomic scanning
RRBS	reduced representation bisulfite sequencing
SNP	single nucleotide polymorphism
tDMRs	tissue-specific differentially methylated regions
WGBS	whole genome bisulfite sequencing

要旨

胎生期に環境汚染化学物質に曝露することによって生じるような微弱なエピゲノム変化を検出するゲノムワイド DNA メチル化解析法がない。本研究では、メチル化 CpG のみを提示する methylated site display (MSD) 法を考案し、これを amplified fragment length polymorphism (AFLP) と組み合わせることでメチル化頻度を高精度・高感度かつゲノムワイドに検出できる解析法 MSD-AFLP 法を開発した。次にこの手法をエピゲノム変化が生じるとの報告がある bisphenol-A 曝露組織の解析に適用した。その結果、今回の実験条件では CpG メチル化への影響はほとんど無いことが判明した。

第1章 序論

1.1 エピジェネティックスと DNA メチル化

エピジェネティック修飾の一つである DNA メチル化の状態は子孫や娘細胞に伝達されることが示されている¹。脊椎動物のメチル化 CpG は、methyl-CpG-binding protein (MBP) と結合し、co-repressor やヒストン脱アセチル化酵素をリクルートすることでクロマチンリモデリングを誘導することにより遺伝子発現を抑制する²⁻⁵。したがって、その異常はがん発生⁶や胎生致死^{7,8}の原因になることが知られている。

1.2 developmental origins of health and disease (DOHaD)

イギリスの疫学者 David Barker は 1980 年代半ばに英国国内で行った疫学調査において、胎生期の低栄養状態のため低体重で出生した子供は、成人期において冠動脈心疾患^{9,10}や本態性高血圧症¹¹、2型糖尿病¹²といった生活習慣病の発症リスクが有意に高まることを明らかにした。この現象をもとに提示された「胎生期の低栄養状態は成人期における心血管障害や代謝機能障害のリスク因子である」という見解は、今日 Barker 説^{13,14}として知られる。この説は、その後、胎生期・新生児期の栄養状態や環境要因が、生活習慣病のみならずその他の疾患の感受性を決める重要なファクターとなりうるという「developmental origins of health and disease (DOHaD)」と呼ばれる概念へと拡張された¹⁵⁻¹⁷。その発生機序は未だ解明されてはいないが、胎児への環境因子曝露がエピジェネティックな変化を引き起こし、それが生後まで残ることが原因と推測されている^{18,19} (Fig. 1.1)。

1.3 化学物質誘発性 DOHaD の事例

1990 年代後半に行われたアメリカ国内の疫学断面調査によって、胎生期におけるたばこの煙への曝露と、出生後の注意欠陥多動性障害（ADHD）発症との相関が示されている²⁰。また、たばこの煙や TCDD をはじめとした多環芳香族炭化水素を含むディーゼル排出微粒子の胎生期と幼児期における曝露によって、喘息の主な危険因子であるアトピーが発症しやすくなるという報告もある²¹。さらに胎生期のメチル水銀曝露は幼少期の血圧を上昇させ、高血圧の危険因子になることがデンマークにおけるコホート研究の結果示唆されている²²。これらの報告は、胎生期・新生児期の化学物質曝露という環境要因がその後の疾患を誘導したという点で、ヒト集団における化学物質誘発性 DOHaD の典型例である。ヒト集団における化学物質誘発性 DOHaD に関する報告²³⁻²⁵は他にも多数あるが、実際に胎生期に曝露をうけたこどもが成育後に、健康状態に影響が起ころうかどうかという決定的な証拠がない。そのため米国、韓国、ヨーロッパをはじめとした各国で大規模コホートが実施されている²⁶⁻²⁸。我が国においても、環境保健行政上、胎生期から小児期にかけての化学物質曝露が、妊娠・生殖、先天奇形、精神神経発達、免疫・アレルギー、代謝・内分泌系等の子どもの健康に大きな影響を与えているとの懸念から、環境省を中心に母子 10 万組を対象に、2027 年までの前向きコホート調査「子どもの健康と環境に関する全国調査（エコチル調査）」が 2011 年から行われている。

1.4 実験動物における環境汚染物質の胎生期曝露によるエピゲノム変化

実験動物では、化学物質によるエピジェネティックな変化が引き起こされることが、メチル水銀、diethylstilbestrol, vinclozolin, bisphenol-A（BPA）で報告されている。メチ

ル水銀を胎生期に曝露されたマウスでは、成熟後の9週齢において海馬で *brain-derived neurotrophic factor (BDNF)* 遺伝子のDNAメチル化が数%亢進し、そのmRNA発現レベルが20%ほど低下するとともに不安行動が増強されるという報告がある²⁹。
diethylstilbestrol を生後5日間曝露された雌マウスでは、成熟後に子宮の *lactoferrin* 遺伝子のプロモーターCpGで対照群の9倍もの低メチル化が起き、子宮がんが多発したと報告された³⁰。

Michael K. Skinnerらは、*vinclozolin* を妊娠ラットに投与して生まれた仔ラットでは、精細胞のアポトーシスが増加し精子数が減少し、この影響が、直接 *vinclozolin* の投与をされていない第4世代のマウスの精巣にも観察されたと報告した³¹。この報告ではメチル化変化の定性的な解析が行われ、高メチル化なのか低メチル化なのか詳細なデータ提示がなされていないが、精子の *lysophospholipase (LPLase)* 遺伝子のメチル化が世代を超えて伝搬されたことを示すデータが提示され、獲得形質が遺伝するという本論文³¹は注目を集めた。しかし、同様の曝露条件による追試において精子数ならびにメチル化が変動しなかったことがその後 Inawaka らによって報告された³²。

BPA を胎生期に曝露されたラットでは *phosphodiesterase type 4 variant 4* 遺伝子のDNA低メチル化が生じ、前立腺がんの発症率が有意に増加したという報告がなされた³³。*agouti yellow* マウスは *agouti* 遺伝子に挿入された *intracisternal A particle* のトランスポゾン配列により毛色が左右されるが、胎生期BPA曝露によりこの配列が10%程低メチル化されることで体毛色が黄色に変化することが示された³⁴。また、マウス妊娠初期から低用量のBPA (20 µg/kg 母体重) を曝露し、妊娠12.5日目あるいは14.5日目の胎仔終脳のDNAメチル化を *restriction landmark genomic scanning (RLGS)* 法で

調べたところ、BPAにより低メチル化を起こした遺伝子として *Vsp25* が検出された³⁵。

このように多くの動物実験データが報告されており、ヒトの細胞を用いた報告も含めると実験的にエピゲノム変化を引き起こすことが報告されている化学物質としては主要なものだけでも15種類以上その報告数も150以上ある³⁶ものの、Inawakaらの vinclozolin の再現実験結果³²に代表されるように、他の研究室において再現性が確認できない事例が多いのが現状である。

1.5 学位論文研究の目的

DNAメチル化は、ヒストンのメチル化やアセチル化に比べて化学的に安定であることから、長期保管や輸送が必要な疫学試料でも適用することができるという利点を有する。網羅的DNAメチル化解析において、restriction landmark genomic scanning (RLGS)³⁷⁻⁴²や *Hpa* II tiny fragment enrichment by ligation-mediated PCR (HELP) 法⁴³、⁴⁴、methylated DNA immunoprecipitation (Medip) 法⁴⁵⁻⁴⁸あるいは whole genome bisulfite sequence (WGBS) 法⁴⁹などが使用されてきた。しかし、いずれの手法もメチル化の有無の判断には有効だが、サンプル間で微弱に変動する特定の CpGメチル化頻度を定量するには、精度や感度面において改良が必要であった。また、毒性学研究を含む様々な分野の研究において、通常行われているメチル化解析では、多様に分化した細胞集団により構成されており器官および組織を対象としており、ヘテロ細胞集団をひとまとまりの試料とするメチル化解析である。一方、したがって、割合として数パーセントしか含まれない細胞種のDNAメチル化が変化した場合に解析した試料のメチル化変化としては微細でも、当該細胞種の遺伝子発現には、この数値よりも大きな変

化が生じている場合もあり得る²⁹。ゆえに、エピゲノム変化を解析するに当たり、小さな変動を検出でき、かつ精度面で信頼性があり、ゲノム疫学等に適用できるよう多検体を同時処理できる比較的廉価なゲノムワイドな手法が必要とされている。

そこで私の学位論文の研究課題においては、微弱なエピゲノム変化を検出できるような精度と感度を有した CpG メチル化頻度プロファイリング法を新たに開発し、本手法を環境化学物質曝露によるエピゲノム変化解析に応用することを目的とした。化学物質としては、胎生期曝露で DNA メチル化の変化を起こすことが疑われている BPA を検討対象とした。

1.6 第1章の図表

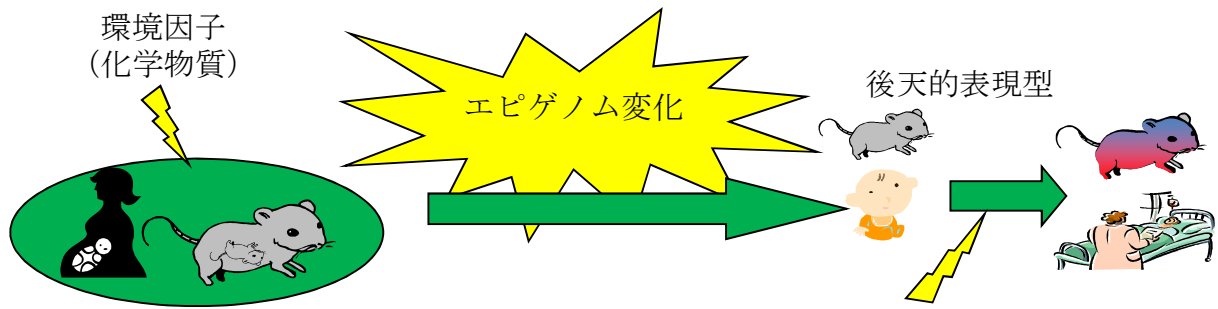


Fig. 1.1. 化学物質誘発性 DOHaD モデル

胎児への環境因子（化学物質）曝露がエピゲノム変化を引き起こし、それが生後まで残ることにより直接または間接的に病気を発症させる。

第2章 methylated site display-AFLP (MSD-AFLP) 法の開発

2.1 研究背景と目的

ゲノムワイドに DNA メチル化状態を検索する手法は数多く存在する (Table 2.1)。これらの方法の主なものについて、その長所と短所を以下にのべる。メチル化感受性制限酵素断片を放射性ラベルして2次元ゲル展開する restriction landmark genomic scanning (RLGS)³⁷⁻⁴² や、GC リッチな領域を優先的に増幅するためにデザインされた任意のプライマーを用いる methylation-sensitive arbitrarily primed-PCR (MSAP-PCR) 法^{50,51} はこの分野の創生期の技術である。しかし、これらの手法は放射性物質を取り扱うということ、遺伝子座位同定までに労力がかかる点、定量性が不十分である点から近年の使用例は少ない。

一方、DNA マイクロアレイ解析技術の発展に依拠して、6塩基認識酵素の *Sma* I と *Xba* I を利用して CpG アイランドにおけるメチル CpG 領域をアレイ解析する methylated CpG island amplification-microarray (MCAM)^{52, 53} やメチル化感受性の異なる isoschizomers による消化産物対に対し、それぞれアダプターライゲーションを介した2回の PCR 増幅を行い比較する microarray-based integrated analysis of methylation by isoschizomers (MAIAM)⁵⁴、*Hpa* II や *Msp* I 消化断片に対しアダプターライゲーションを介した PCR 増幅を行う *Hpa* II tiny fragment enrichment by ligation-mediated PCR (HELP) 法^{43, 44} などが開発されてきた。しかし、これらの手法は検出箇所が制限酵素認識配列に限定されるのが特徴である。

一方、配列に依存しない手法として、メチル化 DNA を抗メチル化シトシン抗体やメチル化 DNA 結合蛋白質 (MBP) と結合させて回収し、アレイ解析する Medip-chip⁴⁵⁻

⁴⁸ や methylated-CpG island recovery assay (MIRA) ⁵⁵ が使用されてきた。しかし同法で回収されるメチル化 DNA からは個々の CpG 部位についての定量的情報を得ることは出来ない。また、領域内にある個々の CpG メチル化頻度はさらに別手法での評価が必要である。加えて非特異的な分子吸着による擬陽性も生ずる欠点がある。

近年開発され比較的報告の多い Illumina Infinium は特定の CpG を検出するという single CpG レベルの解像度を目指し、重亜硫酸 (バイサルファイト) 処理によるシトシン-ウラシル変換後の 1 塩基伸張反応を利用するアレイ解析法である ^{56, 57}。しかしながらこのプラットフォームは次の 3 つの問題がある。第一に現状ではヒト組織由来の試料に特化している。第二にバイサルファイト処理自体が、化学的に激しい反応のため DNA 鎖分断を引き起こす作用もある。加えて、未変換のまま残る非メチル化シトシンが 1 - 5 %程度との報告もある ⁵⁸。さらに、バイサルファイト処理後の PCR は、変換塩基の有無による配列の違いから標的鋳型間で増幅効率が異なってしまうことが報告されている ⁵⁹。第三に、これらアレイを用いる手法では、試料内で起こるクロスハイブリダイゼーションの影響を受けやすく精度の確保が困難である ⁶⁰。

次世代シーケンサーを用いた網羅性の極めて高い whole genome bisulfite sequence (WGBS) 法 ⁴⁹ も近年実施されつつあるが、高額な経費が必要なため、多検体の調査を要する疫学的研究では利用が困難である。そのため、制限酵素処理により次世代シーケンサーで読み取る配列 tag 数を減らすことで経費を削減する reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) 法 ^{61, 62} が開発された。しかし、バイサルファイト処理を用いる網羅解析では、非メチル化シトシンがウラシルへ変換されて塩基配列の多様性が減少するため、取得した配列データを reference genome 配列上にマッ

ピングする際に反復配列領域へのミスマッピングを生じやすく精度の確保が困難である⁶³。実際、MiSeq 2000 (Illumina) で食中毒原因病原性大腸菌 O104:H4 strain 280 のゲノムシーケンシングを行った時のマッピング率が 95%であったのに対し⁶⁴、上位機種である HiSeq 2000 でマウスの WGBS 解析を行った際のマッピング率は 66%であった⁴⁹。したがって、WGBS 解析において冗長度 (同一配列を読む回数) を確保することにより精度を担保するためには SNP 解析などのような塩基変換を行わない場合よりも遙かに多くのリード数が必要で、解析経費ならびにコンピューター解析の負荷も高い。

そこで、経費をさらに削減する観点から Medip 法や MIRA 法を次世代シーケンサー利用と組み合わせた Medip-seq 法⁶⁵ 及び Methyl cap-seq 法⁶⁶、そして HELP 法と組み合わせた HELP-tagging 法^{67, 68} なども利用されている。しかし、次世代シーケンサーを用いる場合、解析経費は依然高額で、限られた経費で解析するためには多くの冗長度を確保できず、定量性を犠牲にして解析しているのが現状である⁶⁹。

序章で述べたように、比較的廉価に多検体を解析することができ、僅かなメチル化変動を高精度・高感度で検出できる手法の開発が必要とされている。これまでに、スループットは低い但し単一の CpG 部位のメチル化を高感度かつ高精度に検出する手法として、メチル化感受性制限酵素を用いる methylation sensitive restriction enzyme-dependent-PCR (MSRE-PCR) 法がある⁷⁰。すなわち CpG 部位のメチル化部位を高感度かつ高精度に検出するために制限酵素を用いるのが適切であると考えられた。しかしながら、既存のメチル化感受性制限酵素を用いる網羅解析法には、以下の 2つの問題点があった。1) メチル化 CpG 量の試料間変動を非メチル化 CpG 量の変動から推

定する手法を採用していることが多いことから、高メチル化状態にあるメチル化 CpG の微細な変動を見逃す可能性が否めない。2) 検出される DNA 断片中には、制限酵素認識配列中に複数の CpG 部位を含む場合があるため、単一 CpG レベルの解像度を有する手法ではない。そのため、検出したメチル化変化がどの CpG 部位のメチル化変化を反映したものであるかの判断ができない。

そこで本研究では、メチル化感受性制限酵素を用い、高い処理能力と高精度・高感度を両立させ、メチル化部位のみを直接提示する独自の新手法 methylated site display (MSD) 法を開発した。この MSD 法に、amplified fragment length polymorphism (AFLP)⁷¹ を組み合わせ、メチル化部位のゲノムワイドなプロファイルを取得する測定技術体系 (MSD-AFLP 法) を設計した。

2.2 方法

2.2.1 試薬

以下の各試薬を括弧内に記載する各社より購入し使用した。CpG methyltransferase (M.Sss I)、T4 DNA ligase 及び制限酵素 *Hpa* II, *Msp* I, *Sbf* I, *Stu* I (New England Biolabs, MA, USA)。EpiTect Bisulfite Kits および AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)。各種オリゴヌクレオチド (Operon, Alameda, CA, USA)。アビジン結合磁気ビーズ (Dynabeads® M-280 Streptavidin) (Dyna, Oslo, Norway)。Titanium® Taq DNA Polymerase 及び Loading Buffer (6×) (Takara Bio, Otsu, Japan)。GenElute™ Agarose Spin Columns (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)。Ligation Convenience kit (Nippon Gene, Tokyo, Japan)。pGEM®-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA)。Competent High DH5α および InsertCheck -Ready- (Toyobo, Osaka, Japan)。LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)。POP-7™ Polymer, GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard および BigDye® Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)。

2.2.2 動物

日本クレア (CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan) より購入した 13 週齢の雄 C57BL/6J マウスを搬入 1 日後に頸椎脱臼により屠殺し、肝臓、腎臓、海馬を氷上にて剖出し、RNA ならびに DNA 解析用に凍結保存した。なお、動物の取り扱い及び動物実験は、東京大学動物実験実施規則に準拠し実験動物委員会の承認を得て行った。

2.2.3 ゲノム DNA の調製および全メチル化 DNA の作成

ゲノム DNA は、雄の C57BL/6J マウス 3 匹それぞれから剖出した 3 種類の組織（肝臓、腎臓、海馬）より AllPrep DNA/RNA Mini Kit にて精製した。

また MSD-AFLP 法の再現性の確認用ならびに ALFP ピークチャートからメチル化頻度（methylation frequency: MF）値を算出する際に使用する目的ですべての CpG がメチル化された DNA（全メチル化 DNA）を以下の処理で調製した。雄の C57BL/6J マウスの腎臓ゲノム DNA 2 μg を CpG methyltransferase（M.Sss I）で 37°C 1 時間インキュベーション、引き続いて 65°C 20 分間インキュベーションした後に AllPrep DNA/RNA Mini Kit で精製、これを全メチル化 DNA とした。

2.2.4 MSD-AFLP 鋳型ライブラリー作製

MSD-AFLP 法のフローチャートを Fig. 2.1 に示した。MSD は、CpG を含む同一塩基配列を認識する制限酵素（isoschizomer）でメチル化感受性の異なる 2 種類を対で利用し、メチル化部位のみを提示する手法である。その原理は次のとおりである。まずメチル化非感受性制限酵素により切断して生成した DNA 断端にアダプターによる tag 付けを行い、次に isoschizomer 関係にあるメチル化感受性制限酵素で消化する。これにより非メチル化断端に連結したアダプターのみが除去されるため、メチル化 CpG を末端にもつ断片のみが温存される。本論文で採用した isoschizomer 対は *Hpa* II と *Msp* I の 2 制限酵素である。手順の詳細に関しては、以下の通りである。ゲノム DNA をまず任意のメチル化非感受性制限酵素で消化するが、本論文では後段の 2.3.1 に詳述するように制限酵素 *Sbf* I を採用した。ゲノム DNA を *Sbf* I 消化後、T4 DNA ligase を用

いてビオチン修飾化 *Sbf*I アダプター (アダプターA) と連結した。次にメチル化非感受性制限酵素の *Msp*I で消化した。この産物をアビジン付き磁気ビーズ (Dynabeads® M-280 Streptavidin) で捕捉し、洗浄バッファー (5 mM Tris HCl, 0.5 mM EDTA, 1 M NaCl, pH7.5) と 0.1×TE (1 mM Tris HCl, 0.1 mM EDTA, pH8.0) で洗浄した。その後、T4 DNA ligase を用い、*Msp*I アダプター (アダプターB) を連結し、この産物を再び洗浄後にビーズ上でメチル化感受性制限酵素の *Hpa* II で消化した。*Hpa* II 消化された DNA をさらに洗浄後、ビーズ上で pre-PCR-プライマーを用いて PCR を行った。この反応液を選択的 PCR の鋳型ライブラリーとした。上記行程に使用したアダプターとプライマー配列は Table 2.2 に示した。

2.2.5 選択的 PCR と電気泳動

MSD-AFLP の選択的 PCR は、先に報告されている AFLP 法⁷¹に従った。選択的 PCR 用プライマーとして、それぞれのアダプター配列に加えて更に 3'側 2 塩基を延長した 16 種類の *Msp*I-NN プライマーと 16 種類の *Sbf*I-NN プライマーを用意した。なお、*Msp*I-NN プライマーの 5'端は 6-carboxy fluorescein (FAM) で蛍光標識した。10 pmol の *Msp*I-NN プライマー、10 pmol の *Sbf*I-NN プライマー、各塩基 40 nmol の dNTPs, Titanium Taq DNA polymerase buffer, Titanium Taq DNA polymerase を用い、10 µL の反応液量で 95.0°C 1分反応後、95.0°C 20 秒、66.0°C 30 秒、72.0°C 2 分で 28 サイクルの PCR を行った。使用したプライマーは Table 2.3 に示した。

蛍光標識された PCR 産物を Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer (Life Technologies) で電気泳動した。分離用ポリマーには POP7 を用い、泳動条件は 2.0 kV

10秒の電気注入と10kVで50分間の泳動とした。エレクトロフェログラムデータは、GeneMapper® ID Software v3.7 (Life Technologies) と HiAL version 5.1⁷² で解析した。

2.2.6 DNA フラグメントの配列決定

フラグメントの配列確認は以下の手順で行った。1 µL の MSD-AFLP 解析産物、3.1 µL のホルムアミド、0.3 µL の GeneScan 500 LIZ Size Standard、および 1 µL の Loading Buffer (6×) を混合後、95.0°C 処理 2 分間を行い、変性ゲル (7.0 M 尿素を含む 4%, 6%, あるいは 10%ポリアクリルアミドゲル) 上で電気泳動を行った。泳動終了後のゲルを Typhoon 9210 蛍光イメージャ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) にてスキャンし、目的とする蛍光シグナルを含むゲル領域を特定して切り出した。回収したゲル片を 50 µL TE buffer に浸漬して DNA 断片を溶出し、溶出液 1 µL を鋳型 DNA 溶液として *Msp* I-universal プライマーと *Sbf* I-universal プライマーで PCR を行った。得られた増幅産物の塩基配列は *Msp* I-universal プライマーを用いて決定した。

2.2.7 MSRE-PCR

メチル化感受性制限酵素依存性 PCR (methylation-sensitive restriction enzyme-dependent-PCR : MSRE-PCR) は以下の手順で実施した。精製した 100 ng ゲノム DNA を *Hpa* II、または *Stu* I で消化した。これらの消化産物を各々 qPCR 解析し、(*Hpa* II 消化 DNA のコピー数/*Stu* I 消化 DNA のコピー数) の百分率を MF 値とした。なお、*Stu* II は、解析標的の PCR 増幅領域内に認識部位を有さないことから、ゲノム中の解析標的部位の総コピー数を算出するために用いた。使用したプライマーの一覧を Table 2.3 に示す。全てのプライマーは、Primer 3 plus (<http://primer3plus.com/>) を用いて設計し、qPCR に

は LightCycler® 480 SYBR Green I Master と LightCycler® 480 (Roche Molecular Biochemicals) を使用した。

2.2.8 bisulfite genomic sequencing (BSGS)

バイサルファイト変換および精製は、EpiTect Bisulfite Kitsを用いて行った。バイサルファイト反応後のDNAはTitanium Taq DNA polymeraseを用いたPCR反応で増幅した。使用したプライマー配列はTable 2.4に示した。増幅産物をSigma GenEluteで精製した後、Ligation Convenience kitを用いてpGEM®-T Easy Vectorにライゲーションし、DH5αにトランスフォームした。その後InsertCheck -Ready-を用いてコロニーPCRを行い、陽性クローンを同定した。PCR産物を鋳型としてBigDye® Terminator v3.1 Cycle sequencing kitとM13 Reverseプライマーを用いたシーケンス反応を行い、Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer (Life Technologies) で塩基配列を決定した。使用したプライマーは Table 2.4 に示した。解析は、QUMA ソフトウェア (http://quma.cdb.riken.jp/top/quma_main_j.html) を用いて行った。

2.2.9 AFLP 断片候補の検索システム

MSD-AFLP 法により得られるメチル化 CpG のゲノム塩基配列上の位置を予測あるいは確認する目的で、genome DNA fragment database (GFDB) システム (<http://122.219.139.50/>) を開発した。なおこの開発は独立行政法人放射線医学総合研究所の齋藤俊行博士ならびに株式会社メイズによりすべて実施された。

GFDB システムは、ゲノム塩基配列情報の整備が良好なヒトおよびマウスについて、リファレンスゲノム配列に基づく AFLP 仮想データ生成システムおよび AFLP 実デー

タのゲノム位置マッピングシステムにより構成される。そして本システムは、両構成システムから得られる情報をデータベース化してウェブサーバに格納し、ブラウザ画面のグラフィカルインタフェースから検索する。このシステム上で制限酵素の組み合わせと認識配列直近の内部配列である選択塩基を指定することにより、ゲノム DNA 切断と選択的 PCR をシミュレーションし、生成する DNA 断片数を鎖長ごとに検索表示できる (Fig. 2.2a-2.2c)。さらにそれぞれの DNA 断片が由来したゲノム領域の位置情報と、それに加えて断片内部の配列と内部に存在する他の制限酵素部位の位置も提供できる (Fig. 2.2d)。そしてこれらの情報はゲノムビューア上に諸々のゲノム情報と共に示される (Fig. 2.2e)。本研究で、得られた AFLP データならびに配列データの解析をこの GFDB システムで行った。

2.2.10 統計解析

統計解析には、統計解析ソフトウェア R (<http://cran.r-project.org/>) を使用した。各組織間の MF 値の差の有意性の検定は、一元配置分散分析 (ANOVA) 後、多重比較検定として Tukey 法を用いて行った。さらに、false discovery rate (FDR) の計算は Benjamini & Hochberg (BH 法)⁷³ を用いた。そして有意水準 $p \leq 0.05$, $q \leq 0.05$ のとき、統計的な有意差があるとした。また、メチル化パターンの階層型クラスタリング解析は CpG ごとに標準化 Z 変換後に行い、クラスタ間の距離はユークリッド距離で求め、平均連結法で階層化した。近似関数の検討には GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を使用した。

2.3 結果

2.3.1 適切な第一次制限酵素の検討

MSD-AFLP法においては、MSD-AFLP鋳型ライブラリーからプライマーセットごとに選択的PCRによって増幅される256の亜集団を作成し、これを電気泳動で展開しながら検出を行う。検出時には亜集団内のDNA断片どうして鎖長の重なりが最少となることが望ましい。選択的PCRプライマーが機能する断片両端の塩基組成がランダムに分布すると仮定すれば、鋳型ライブラリーは1塩基長あたり256断片以内で構成されることが独立した1断片として電気泳動分画する上で理想的である。さらに電気泳動測定ではキャピラリー型DNAシーケンサーを使用するので、測定可能分子は4塩基から最長およそ1,000塩基までのDNA断片となり、各亜集団が1,000断片以内で構成されると好都合である。つまり、MSD-AFLP法の測定対象は各々が1,000断片以内となる256の亜集団で構成されるのが望ましい。それは、鋳型ライブラリー化される断片の総数が256,000以下となるような条件とほぼ言い換えることができる。

そこでこの条件に合致する制限酵素を検討すべく、様々な制限酵素の組み合わせで生成するマウスゲノムDNA断片の鎖長分布を計算し、望ましい制限酵素の組み合わせを検索した。まず、マウスゲノムDNA塩基配列データ（golden path mm9 NCBI build37 : Jul.2007 assembly of the mouse genome）上に各制限酵素認識配列を特定して位置情報をリスト化した。認識配列部位数は多様であるものの、当然ながら認識塩基数が増えるに従い該当する部位数は減少する傾向が認められた（Table 2.5）。

MSD-AFLP法では、最初に使用する任意の第一次制限酵素（メチル化非感受性制限酵素）断端と直近の*Hpa* II/*Msp* I断端で挟まれるDNA断片が検出対象となる。*Hpa*

II/*Msp* Iは4塩基認識制限酵素であるためゲノムDNA中には極めて多数の切断部位が存在する(マウスレファレンスゲノムDNA中には3,188,296ヶ所見いだされる)ので、第一次制限酵素の選択が実質的なMSD-AFLP検出断片数を規定することになる。そこで、望ましい最大測定数 256,000 以下の認識配列数(考察2.4.1「概念設計」参照)を有するメチル化非感受性制限酵素と*Hpa* II/*Msp* Iとの組み合わせにより生じるDNA断片の鎖長分布を調べた。その結果*Sbf* I、*Pac* I、*Swa* Iの3種類の制限酵素(いずれも8塩基認識配列)が上述の条件に合致することが判った(Fig. 2.3)。さらに、GFDBシステムを用いてマウスゲノムから生成する*Hpa* II-*Sbf* I断片集団の鎖長分布を選択塩基ごとに調べ2次元表記にまとめた(Fig. 2.4)。この鎖長分布をもとに、40,386断片(測定範囲に入るDNA断片の85.4%)が独立した1断片として電気泳動分画できることが判明した。さらに、2断片が同一鎖長となる場合も含めると、全DNA断片の実に97.6%が測定可能であった。残る2.4%は3断片以上が同一鎖長として生成し得るため、測定結果解釈の難しさが大きくなると考えられた。また、MSD-AFLP法で解析可能となるCpGを集計すると55,181部位であった。これは、マウスゲノム中の21,342,779 CpG部位の約0.3%、CCGG配列(*Hpa* II/*Msp* I認識配列)の約1.7%に相当することが判った。

2.3.2 MSD-AFLP の再現性

考案した MSD-AFLP 法を実際に使用して、同一個体のマウス腎臓由来のゲノム DNA 試料から、独立して鋳型ライブラリーを2度作成し、MSD-AFLP 解析の再現性を確認した(Fig. 2.5)。選択的 PCR のプライマーセットは任意の16種類選んだ。2つの独立した実験のピークシグナル強度比は、全2003ピーク中、1.1倍以内が1,552

(75.5%)、1.2 倍以内が 1,881 (93.9%)、1.3 倍以内が 1,972 (98.5%)、 $R^2=0.992$ であり、再現性の高さを示唆していると考えられた。

2.3.3 組織間でメチル化頻度の異なる部位の検出と AFLP 断片候補検索システムによる同定率

MSD-AFLP 法を用いマウス 3 個体からの各 3 種類の組織、計 9 試料の DNA メチル化を比較した。本来可能な 256 通りの選択的 PCR から任意の 16 通りを選んで実施した結果、2,449 の AFLP シグナルを極めて高い再現性で検出し、その中に組織間でメチル化頻度が異なる部位を複数同定することに成功した。各組織のメチル化パターンとメチル化レベルは、個体が異なってもほぼ一致していることがわかった (Fig. 2.6)。さらに、3 種類の組織間でメチル化頻度が同程度であった AFLP シグナル 3、差があった AFLP シグナル 8 の計 11 を選び、それぞれが提示する CpG 部位の染色体位置を GFDB で検索するとともに、当該 DNA 断片の塩基配列を決定した。その結果 11 の DNA 断片のうち 8 断片 (72.7%) は、AFLP シミュレーション予想と一致し、残りの 3 断片もシミュレーションから予想した 2 つの候補のうちの 1 つと一致した。(Table 2.6)。

2.3.4 MSRE-PCR 法との相関

当該部位の MF 値を MSRE-PCR 法でも測定し、MSD-AFLP 法との整合性を検討した (Fig. 2.7)。組織間のメチル化頻度比は、11 部位全てにおいて MSD-AFLP 法で得た蛍光強度比と極めて近く、新手法と MSRE-PCR 法とで整合性のあるメチル化測定データを得られることが判った。さらに、MSRE-PCR 法の相対的メチル化頻度と MSD-AFLP

法の相対的蛍光強度の相関を定量的に評価したところ、両者には強い相関 ($R^2=0.979$) が認められた。

2.3.5 MSD-AFLP チャートからの MF 値算出

MSD-AFLP法で取得されるピークチャートからのMF値算出を以下の方法で行った。まず、人為的にCpGメチル化処理を施した全メチル化DNAと各組織DNAを用いたMSD-AFLP法による蛍光強度比の百分率を2.3.3で同定した11個の部位について求めた。これとMSRE-PCRのメチル化頻度との近似式を求めた (Fig. 2.8)。

全メチル化DNAにおけるシグナル飽和の影響を除外するため、ヒルの方程式で近似を行ったところ、下記の式1で近似されることが分かった ($R^2=0.906$)。

$$\text{MF値(\%)} = \left(\frac{100}{1+10^{68.19-0.01804\text{PSR}}} \right) \text{ (式1)}$$

ただし、シグナル強度百分率 (percent signal ratio:PSR) = (試料のシグナル値/全メチル化試料のシグナル値) ×100とする。

上記の式を用いてMSD-AFLP法で取得されるすべてのピークからMF値算定を行った。

2.3.7 BSGS データとの比較

2.3.3で同定したCpGのうち2つ (isolation ID 44と59) に関して、BSGS法で3種類の組織のDNAのCpGメチル化状態を解析した (Fig. 2.9)。検出したHpa II部位のMF値は、技術基盤を異にするBSGS法とMSRE-PCR法そしてMSD-AFLP法の3手法間でほぼ一致しており、測定結果を相互に補強する関係であった。

2.3.8 組織間のメチル化パターン検出

組織間で比較した 2,449CpG のヒストグラムを Fig. 2.10 に示す。平均 MF 値はそれぞれ、海馬 $54.1 \pm 0.5\%$ 、腎臓 $48.2 \pm 0.5\%$ 、肝臓 $51.5 \pm 0.5\%$ であった。階層型クラスタリング解析の距離は、ユークリッド距離で求め、平均連結法で階層化した。その結果組織ごとにクラスタを形成することが判り、各組織独自のメチル化パターンが確認できた。また、主成分分析でも固有ベクトルは組織ごとに類似していた (Fig. 2.10)。

2.3.9 MSD-AFLP 法の検出感度

各 CpG の MF 値の組織間の有意差検討を行った結果、解析した 2,449CpG のうち 805 の CpG で組織間に有意な差が認められた。さらに検出感度と検出能力を検討するため、Tukey 検定により有意性が認められた 2 組織間で MF 値の差 (difference of MF, DMF) と MF 値の比 (ratio of MF, RMF) に関して、DMF の絶対値と \log_2 RMF の絶対値を算出した (Fig. 2.11)。その結果、MF 値の比が 1.1 倍以内かつ MF 値の差が 5% 以下を示す 24 個の有意な違いを検出できた。このうちの 1 つを MSRE-PCR 法で確認を行ったところ、本手法で検出された微細変化は MSRE-PCR 法結果と相関していた (データは示さない)。また、DMF=0.29%という微細変化も検出できることが判った (Table 2.7)。

2.4 考察

私の学位論文研究では MSD 法というメチル化 CpG をもつ DNA のみをライブラリー内に温存させる試料調製法を新規に考案し (Fig. 2.1)、さらに AFLP 法との組合せで高精度かつ高感度の DNA メチル化網羅的解析法 (MSD-AFLP) を開発した。

2.4.1 メチル化部位提示 (MSD:methylated site display) 手法の設計

現在最も高感度かつ高精度なメチル化解析手法はメチル化感受性制限酵素依存性 PCR (MSRE-PCR) である⁷⁰。しかしながら MSRE-PCR 法は1測定あたり1カ所の CpG 部位しか解析できず、大きな処理能力が求められるゲノムワイドメチル化解析には用いることは困難である。本研究では、MSRE-PCR と同等の感度と精度を有し、なおかつ大規模解析スループットを併せ持つメチル化解析手法を開発することで、衛生学・環境毒性学研究への寄与を目指した。具体的には新手法の備えるべき要件を以下のとおり定めて開発を進めた。1) 検出すべき分子状態は「非メチル化」ではなく「メチル化」であること。2) ナノグラム規模の微量検体からでも測定可能であること (高感度)。3) 10 パーセント程度のメチル化変化をも確実に捕捉できること (高精度)。4) 反復実験間のばらつきは MSRE-PCR と同等かそれ以下であること (高再現性)。5) ゲノム DNA 上の CpG 集団ではなく独立した CpG 部位ごとのメチル化情報を取得できること (高解像度)。

非メチル化ではなくメチル化を捉えるために、同じ認識配列を有しメチル化感受性を異にする isoschizomers の関係にある制限酵素 *Hpa* II (感受性) と *Msp* I (非感受性) を組み合わせて活用することを考案した。まず *Msp* I によるゲノム DNA 完全消化後、

断端の認識配列を再生するアダプターを連結し、続いて *Hpa II* で消化する。その結果、メチル化されていない CpG 含有断端に連結されたアダプターは再切断されて除かれてしまうが、メチル化 CpG 含有断端はアダプター連結状態のまま残ることになる。このアダプター連結 DNA 断片を検出すれば、メチル化量を測定できる。

Fig. 2.1 に示したように、この考えに基づき具体化した手順を考案した。まず、認識配列に CpG 配列を含まずメチル化の影響を受けない任意の制限酵素でゲノム DNA を完全消化し、断端にビオチン修飾アダプターA を連結する。次に制限酵素 *Msp I* による消化を行なった上でストレプトアビジン連結担体との複合体としてビオチン化 DNA 断片を回収する。回収された DNA 断片には *Msp I* 消化断端が露出しており、そこにアダプターB を連結して *Hpa II/Msp I* 認識配列である CCGG パリンドローム構造を復元させる。この段階で DNA 断片中には *Hpa II/Msp I* 認識配列が一つだけ存在することになる。CCGG 配列中の CpG にメチル基がなければ次段の *Hpa II* 消化で切断されてアダプターB が外れてしまい、引き続き PCR で増幅されない。他方メチル基のある断端に連結したアダプターB は *Hpa II* では切断されず、この DNA 断片は後段の PCR で増幅されて検出されることになる。PCR による検出過程において、すべての DNA 断片はアダプターA とアダプターB という共通配列に PCR プライマーがアニーリングするため、同じプライミング効率で PCR の伸長合成が開始される。こうして調製されるマルチプレックス PCR 増幅産物は、*Hpa II* 切断後に残存する有効鋳型量を反映する。個々の鋳型分子中には唯一の *Hpa II/Msp I* 認識配列が保証されており、残存有効鋳型検出量は各認識配列中 CpG の正にメチル化量を反映するものである (methylated site display: MSD と命名)。

MSD 分子集団は多様な鎖長の DNA 断片集団である。したがってこの集団を鋳型ライブラリーとするマルチプレックス増幅産物は amplified fragment length polymorphisms (AFLP) 集団として扱うことができる。蛍光標識プライマーによる PCR 増幅で DNA 断片集団に適切な蛍光を導入すれば、キャピラリー型蛍光 DNA シークエンサーを測定装置として効率よく弁別検出が可能である。また、上記 MSD-AFLP 鋳型ライブラリーをキャピラリー型 DNA シークエンサーの分画能力に適する複雑度に調整すべく、増幅過程に選択的 PCR 法を適用して複雑度を減じた亜集団を調製し、電気泳動で展開する方針を採ることにした。実際にはアダプタープライマー配列に続く DNA 断片の両端 2 塩基ずつをプライミング時の選択塩基として活用することで、4 の 4 乗 (256) 通りの亜集団を調製し、亜集団ごとにエレクトロフェログラムを取得した。キャピラリー型 DNA シークエンサーの実用的測定範囲を 1,000 塩基長までとすると、最大で電気泳動 1 レーンあたり約 1,000 断片を測定可能であり、総計で $1000 \times 256 = 256,000$ 断片が本法 MSD-AFLP 法の現時点における最大測定能力となる。これは概念設計における理想的条件での技術的評価数であり、この点を補完するため、第一次制限酵素の選別を詳細に検討、本論文では *Sbf* I を使用した。その他の第一次制限酵素候補はどれも過剰数の DNA 断片を生成してしまうため MSD-AFLP 法には不適切であった。しかしながら AFLP 法以外の検出法 (次世代型ハイスループット DNA シークエンサーの援用等) を採用すれば、より多くの MSD 断片を解析することも可能である。

2.4.2 MSD-AFLP 法の評価ならびに他の網羅解析法との比較

DNA のメチル化レベルは遺伝子の転写レベルに関与し、組織特異的遺伝子発現調節のために組織特有の遺伝子のメチル化パターン tissue-specific differentially methylated region (tDMR) があることが知られている^{74,75}。本研究では、考案した MSD-AFLP 法の精度確認の目的、ならびに AFLP チャートデータから MF 値を直接換算する際の補正方法確立のために、3 種類の組織（海馬、腎臓、肝臓）を解析した。その結果、MSD-AFLP 法は真の MF 値を測定できる現在最も有効な MSRE-PCR 法で測定した時の組織間の変化率に極めて近いことが判った (Fig. 2.7)。さらに、MSRE-PCR の平均変動係数が 6.2%であるのに対し、MSD-AFLP の平均変動係数は 4.8%であり、その測定のばらつきの程度は MSRE-PCR 法とほぼ同等に小さいことが判った (Fig. 2.8)。また、バイサルファイト法でも、測定結果と相関していることが確認できた (Fig2.9)。これらのことから、本手法は多検体比較が容易にできるだけでなく、少なくとも現在最も高感度かつ定量的とされる MSRE-PCR と同等の感度と定量性を有し、なおかつ一度に数万の CpG を定量する処理能力を有するという点で優れている方法であることが判った。さらに動物実験という個体差が存在し、個体差に埋没してしまった微細変化が存在する可能性が否定できない条件であるにも関わらず、メチル化相対量の差が 1.1 倍以下の変化でかつメチル化頻度の絶対値差が 5%以下の微細変化の検出に成功しており (Fig2. 11)、微細な変化を検出できるという点で優れていることも判った。

一般的に網羅的 DNA メチル化解析において、RLGS 法^{37, 38}や HELP 法^{43, 44}、あるいは MIRA-array 法⁶⁵や WGBS 法⁴⁹などが使用されている。しかし、いずれの手法も

試料間で微弱に変動する特定の CpG メチル化頻度を定量するには、精度面や感度面において改良の余地がある解析法である。

また現在、費用対効果の観点からヒトの試料に汎用されているプラットフォームがイルミナ社の **Infinium HumanMethylation450 Beadchip** である^{56, 57}。この解析法はヒトゲノムのみを対象としているため他の生物種への応用が困難であり⁷⁶、しかも CpG アイランドに特化した約 450,000CpG を対象にしたバイアスのかかったものである⁷⁷。しかしながら、次世代シーケンサーを用いた研究から、分化レベルの違いによって生じるメチル化頻度の異なる塩基 (**differentially methylated bases (DMBs)**) のほとんどは、イントロンや遺伝子間に存在していることが報告されており⁷⁸、CpG アイランドに特化しない解析法も求められている。また、その精度に関しても **Infinium HumanMethylation450 Beadchip** において MF 値の差として 20%以下の違いを定量的に検出することは困難である^{56, 57}。

ヒト以外への応用やバイアスを避ける目的で現在でも使用されているのが **MIRA-seq** 法である⁷⁹⁻⁸¹。しかしこの手法は、大量試料の定性的な解析やグローバルなメチル化変化を捉えるのには有効であるが^{79, 81}、**MSD-AFLP** 法で捉えられたような個々の CpG の微細なメチル化変化 (**Fig. 2.9**) を捉えることは困難である。

網羅性を重視した解析で使用されている方法が次世代シーケンサーとバイサルファイト法を利用した次世代メチル化解析である。運用経費が高いために、1 ランあたりのリード数が多いライフテクノロジー社の **SOLiD** やイルミナの **Hiseq2000** を用いた解析でさえ、いまだに平均冗長度を 30 から 100 リード程度に抑えて解析しているのが現状である^{78, 82}。しかし、本研究で考案した **MSD-AFLP** 法で検出された 5%の

有意な差 (Fig. 2.11) を検出するためには、リード長が長くマッピング率が高いとされる Roche454 次世代シーケンサーを用いても⁸³、定性的検出で 1,000 リード、定量的には 10,000 リードの冗長度で読む必要性があることが知られている⁸⁴。したがって、個体間の差が大きい試料で真の変化を捉らえるために多くの検体数を処理する必要がある研究にとっては、現存の次世代シーケンサーをプラットフォームとする網羅的解析法を用いることは経費の観点から極めて困難である。

MSD-AFLP 法は費用対効果の点でも次世代メチル化解析に比べ優れており、1 回の解析で全 CpG (約 20,000,000) の約 0.3% (55,181-CpG) をカバーできることから、十分なプロファイリング能を持つと考えられる。本論文では *Hpa* II と組み合わせるメチル化非感受性の低頻度切断酵素として最も認識部位数の少ない *Sbf* I を用いて解析を行った。しかし、本研究にて 8 塩基認識の *Pac* I や *Swa* I も適切であることが分かっており (Fig. 2.3)、これらの制限酵素を用いることで今回検出されなかった CpG も検出できる。また、今回は PCR プライマー末端 2 塩基 (選択塩基) による選択的 PCR を行ったが、技術的には PCR プライマー末端 3 塩基による選択的 PCR も可能である⁸⁵。GFDB システムは 3 塩基の選択塩基シミュレーションにも対応済みであり、さらに CpG アイランドやプロモーター領域近傍に位置する制限酵素ペアの組み合わせを選択し、これら領域を含む断片を増幅する選択塩基のみを選ぶことが可能である。したがって、制限酵素ペアの組み合わせを変更し、特定の PCR プライマー末端 3 塩基による選択的 PCR を行うことで網羅度を向上させるとともに着目するゲノム領域に絞り込んだ解析も実施可能である。鋳型ライブラリーの網羅度を高めた解析が必要な

場合は、MSD 法を次世代シーケンサープラットフォームと組み合わせることで網羅度を 10 数倍高くして解析することができる。

MSD 法と次世代シーケンサーの組み合わせでは、バイサルファイト処理後の DNA 試料を次世代シーケンサーで配列解析する手法^{49, 61, 62}とは異なり、塩基変換を行っていないためゲノムマッピングの困難が生じないと考えられる。したがって、少ないリード数で精度が確保できるため経費削減が期待できる。

2.4.3 MSD-AFLP 法の応用可能性

臨床試料を用いた研究でメチル化変動を正確に検出することが必要となる場合がある。その際に特定の分化細胞を FACS 等で高純度に分取する必要があり、このことが解析上のハードルとなっている⁸⁶。しかしながら、MSD-AFLP 法は MF 値の差 5% を有意に検出できる精度を有し、かつ比較的廉価に多検体の未知メチル化 CpG をスクリーニングできるため、エピゲノムの均一性の異なる臨床試料へ直接適用し、そのメチル化変動を正確に検出することが可能と思われる。エピジェネティック解析の臨床試料への主な適用例として、がん細胞のエピジェネティックマーカーの探索⁸⁷⁻⁹⁰がある。この探索はがん細胞ではがん抑制遺伝子のメチル化による発現抑制を含めたメチル化変動が認められる⁹¹ことを利用したものである。またがん幹細胞の存在ががんの根治を難しくしていることが近年になって分かってきた⁹²。そのためがん完治の観点からがん幹細胞を標的とした治療法の研究やバイオマーカーの探索が行われている⁹³⁻⁹⁵。がん幹細胞はがん組織の大多数を占めるがん細胞とエピゲノム状態が異なっており、そのことが自己複製能や分化能といった「stemness」維持に役立っていることが示唆されている^{91, 96}。しかしながら、がん幹細胞は試料中に数パーセント程度し

か存在していないため^{96,97}、このような不均一エピゲノム状態にあるがん組織を WGBS 法で解析することは困難である⁹⁸。一方メチル化量のわずかな差異を鋭敏に検出できる MSD-AFLP 法は、費用対効果が高いことから多数の臨床試料解析によるがん幹細胞の新規エピジェネティックマーカーの探索への貢献も期待できる。

2.5 結論

本研究で開発した MSD-AFLP 法は、高い精度と感度で未知の CpG 部位の DNA メチル化頻度の差を捉えるのに有用であると結論付けられた。また、低経費で複数の試料を比較的簡単に処理でき、費用対効果の点においても優れていることが示唆された。したがって、環境毒性学や衛生学の分野における環境因子による微細なエピジェネティック変化検出や発がんにおけるエピジェネティックマーカー探索の有用なツールとして活用されることが期待される。

2.6 第2章の図表

Table 2.1. 既存の DNA メチル化ゲノムワイド解析法の特徴及び経費のまとめ

Method name	Sample preparation	Readout Method	Resolution (CpG)	Actual coverage	Cost	Reference
RLGS	MSRE	Electrophoresis	4	0.01%	low	Hayashizaki et al., 1994; Ando et al., 2006
MSAP-PCR	MSRE	Electrophoresis	Several tens	0.0005%	low	Gonzalzo et al., 1997; Liang et al., 1998
MCAM	MSRE	Array	2	0.03%	low	Estecio et al., 2008; Hatada et al., 2002
MIAM	MSRE	Array	2	0.03%	low	Hatada et al., 2006
HELP	MSRE	Array	2	0.01%	low	Khulan et al., 2006; Figueroa et al., 2009
Medip-Chip, MIRA	Anti-5mC or MBP	Array	Several hundreds	0.10%	low	Tomazou et al., 2008; Vucic et al., 2009; Weber et al., 2005; Wilson et al., 2006; Rauch, Li et al. 2006
Illumina Infinium	Bisulfite coversion	Array	1	2%	low	Bibikova et al., 2009; Bibikova et al., 2011
WGBS	Bisulfite coversion	NGS	1	76%	very high	Miura et al., 2012
RRBS	Bisulfite coversion	NGS	1	9%	high	Meissner et al., 2005; Gu et al., 2011
Medip-seq, Methylcap-seq	Anti-5mC or MBP	NGS	Several hundreds	9-14%	high	Pomraning et al., 2009; Brinkman et al., 2010
HELP-tagging	MSRE	NGS	1	8.50%	mediam	Brunner et al., 2009; Suzuki et al., 2010
MSD-AFLP	MSRE	Electrophoresis	1	0.27%	low	

NGS, next generation sequencer; MSRE, methyl-sensitive restriction enzyme dependent digestion; MIRA, methylated-CpG island recovery assay; HELP, *Hpa* II tiny fragment enrichment by ligation-mediated PCR; MCAM, methylated CpG island amplification and microarray; MSAP, methylation-sensitive arbitrarily priming; RLGS, restriction landmark genomic scanning; MIAMI, microarray-based integrated analysis of methylation by isoschizomers; RRBS, reduced representation bisulfite sequencing; WGBS, whole genome bisulfite sequencing; MBP, methyl binding protein; Anti-5mC, Anti-5-methyl cytidine

Table 2.2. MSD-AFLP に用いたオリゴヌクレオチド

Oligo-name		Sequence (5' to 3')
Oligos for adaptors		
<i>Sbf</i> I-adapter(adapter1)	Upper	TCCGACTGGTATCAACGCAGAGTACTAGAGTTGCA
	Lower	p-ACTCTAGTACTCTGCGTTGATACCAGTCGGA
<i>Msp</i> I-adapter(adapter2)	Upper	b-AATGGCTACACGAACTCGGTTTCATGACC
	Lower	p-CGTGTCATGAACCGAGTTCGTGTAGCCATT
Primers for MSD-AFLP		
Preamp-primer	Forward	AATGGCTACACGAACTCGGTTTCATGACACGG
	Reverse	TCCGACTGGTATCAACGCAGA
Selective primer	Forward	f-AATGGCTACACGAACTCGGTTTCATGACAIHNN
	Reverse	AGAGTACTAGAGTTGCAGGNN
<i>Msp</i> I-universal primer		AATGGCTACACGAACTCGGTTTCATGACA
<i>Sbf</i> I-universal primer		AGAGTACTAGAGTTGCAGG

p, 5'-phosphorylation; b, 5'-Biotination; f, 5'-6-carboxy fluorescently

Table 2.3. MSRE-PCR に用いたオリゴヌクレオチド

Oligo-name		Sequence (5' to 3')
Isolation ID 7	Forward	AAGAGGATCGGTCCTAAAAA
	Reverse	GGGCTTTCAGGTTCTCC
Isolation ID 10	Forward	TGCTATAACAACAACCTCGGTCAA
	Reverse	AGGGTTTGGCTGAACAAAAAT
Isolation ID 12	Forward	TGTGAGGGACAGAGAAACGAT
	Reverse	AACATTAGCAGGCAAACCTGGA
Isolation ID 26	Forward	ACCAGCTACACGGCTCGTAAT
	Reverse	TAAAACGGGTGGAAGGAGATT
Isolation ID 27	Forward	ACAGTGTCACATTCCCTCCAG
	Reverse	ACCCCTGTCCTTCAGAACTGT
Isolation ID 41	Forward	TGAGAATGCAGATACCCAAGG
	Reverse	CAGGTGACCCAAAAAGACAAA
Isolation ID 44	Forward	GCTTCCAAACAGTAGAGCTTCC
	Reverse	CTCAGGACAAACCATGCAGA
Isolation ID 53	Forward	ACAAAAGCTGGCTGCATTCT
	Reverse	AGGAAGCTCGGAAATGACAAT
Isolation ID 55	Forward	GGCCCTTTTGAAATCAAGGT
	Reverse	GTTCTTCCAGTCCGACTTTCC
Isolation ID 59	Forward	TTTTGGGAACCTGAACCAGTG
	Reverse	TCTTCTGGAAGGTTTGCTGTG
Isolation ID 63	Forward	GCTAGAAAGCCAGGAGTACGAA
	Reverse	GGACTCTGAAAACACCTCATCC

Table 2.4. Bisulfite genomic sequencing に用いたオリゴヌクレオチド

Oligo-name		Sequence (5' to 3')
M13 Reverse primer		GCGGATAACAATTCACACAG
Isolation ID 44	Forward	GTTTTAGAGGAAGGAATGTTGTGAGG
	Reverse	ACAACCCAATATACCACTTCCACCT
Isolation ID 59	Forward	GAAGGTTTGTGTGTGGAGTTGTAG
	Reverse	ACTTTTAAAACCTTAAATTACAATCTTACCTCA

Table 2.5. 制限酵素認識部位数とメチル化感受性

Enzyme	site number	Sequence	CpG methylation
<i>Mlu</i> CI	31148654	/AATT	Not Sensitive
<i>Tsp</i> 509I	31148654	/AATT	Not Sensitive
<i>Mse</i> I	29918534	T/TAA	Not Sensitive
<i>Fat</i> I	24913420	/CATG	Not Sensitive
<i>Nla</i> III	24913420	CATG/	Not Sensitive
<i>Alu</i> I	24571664	AG/CT	Not Sensitive
<i>Hpy</i> CH4V	23195826	TG/CA	Not Sensitive
<i>Bfa</i> I	16152378	C/TAG	Not Sensitive
<i>Hae</i> III	13390558	GG/CC	Not Sensitive
<i>Pho</i> I	13390558	GG/CC	Impaired by Some Combinations of Overlapping
<i>Bfu</i> CI	12830398	/GATC	Blocked by Overlapping
<i>Dpn</i> I	12830398	GA/TC	Blocked by Overlapping
<i>Dpn</i> II	12830398	/GATC	Not Sensitive
<i>Mbo</i> I	12830398	/GATC	Impaired by Overlapping
<i>Sau</i> 3AI	12830398	/GATC	Blocked by Overlapping
<i>Cvi</i> QI	10872874	G/TAC	Not Sensitive
<i>Rsa</i> I	10872874	GT/AC	Blocked by Some Combinations of Overlapping
<i>Dra</i> I	4915038	TTT/AAA	Not Sensitive
<i>Hpy</i> CH4IV	3512718	A/CGT	Blocked
<i>Hpa</i> II	3188296	C/CGG	Blocked
<i>Msp</i> I	3188296	C/CGG	Not Sensitive
<i>Ssp</i> I	3111426	AAT/ATT	Not Sensitive
<i>Taq</i> αI	2783656	T/CGA	Not Sensitive
<i>Psi</i> I	2388910	TTA/TAA	Not Sensitive
<i>Hha</i> I	2205178	GCG/C	Blocked
<i>HinP</i> II	2205178	G/CGC	Blocked
<i>Ase</i> I	2165812	AT/TAAT	Not Sensitive
<i>Pvu</i> II	2022332	CAG/CTG	Not Sensitive
<i>Pst</i> I	1982172	CTGCA/G	Not Sensitive
<i>Pci</i> I	1976204	A/CATGT	Not Sensitive
<i>Nsi</i> I	1851656	ATGCA/T	Not Sensitive
<i>Bgl</i> II	1820000	A/GATCT	Not Sensitive
<i>Nde</i> I	1756734	CA/TATG	Not Sensitive
<i>Bsp</i> HI	1718232	T/CATGA	Not Sensitive
<i>Bsr</i> GI	1690328	T/GTACA	Not Sensitive
<i>Nco</i> I	1663798	C/CATGG	Not Sensitive
<i>Hind</i> III	1646710	A/AGCTT	Not Sensitive
<i>Xba</i> I	1590450	T/CTAGA	Not Sensitive
<i>Msc</i> I	1538110	TGG/CCA	Not Sensitive
<i>Eco</i> RI	1477692	G/AATTC	Blocked by Some Combinations of Overlapping
<i>Stu</i> I	1372810	AGG/CCT	Not Sensitive
<i>Bcl</i> I	1309374	T/GATCA	Not Sensitive
<i>Eco</i> 53kI	1296788	GAG/CTC	Blocked by Some Combinations of Overlapping
<i>Sac</i> I	1296788	GAGCT/C	Not Sensitive
<i>Sca</i> I	1277742	AGT/ACT	Not Sensitive
<i>Sph</i> I	1175604	GCATG/C	Not Sensitive
<i>Afl</i> II	1163104	C/TTAAG	Not Sensitive
<i>Avr</i> II	1129802	C/CTAGG	Not Sensitive
<i>Bam</i> HI	1047924	G/GATCC	Not Sensitive
<i>Apa</i> LI	988016	G/TGCAC	Blocked by Overlapping
<i>Mfe</i> I	985370	C/AATTG	Not Sensitive
<i>Bst</i> UI	867042	CG/CG	Blocked
<i>Eco</i> RV	856960	GAT/ATC	Impaired by Some Combinations of Overlapping
<i>Bst</i> Z17I	729290	GTA/TAC	Blocked by Some Combinations of Overlapping
<i>Apa</i> I	698910	GGGCC/C	Blocked by Overlapping

Table 2.5 Continued

<i>Psp</i> OMI	698910	G/GGCCC	Blocked by Overlapping
<i>Bmt</i> I	694294	GCTAG/C	Not Sensitive
<i>Nhe</i> I	694294	G/CTAGC	Blocked by Some Combinations of Overlapping
<i>Spe</i> I	692474	A/CTAGT	Not Sensitive
<i>Hpa</i> I	648962	GTT/AAC	Blocked by Some Combinations of Overlapping
<i>Acc</i> 65I	622932	G/GTACC	Blocked by Some Combinations of Overlapping
<i>Kpn</i> I	622932	GGTAC/C	Not Sensitive
<i>Pml</i> I	525672	CAC/GTG	Blocked
<i>Sma</i> I	346902	CCC/GGG	Blocked
<i>Tsp</i> MI	346902	C/CCGGG	Blocked
<i>Xma</i> I	346902	C/CCGGG	Impaired
<i>Swa</i> I	312362	ATTT/AAAT	Not Sensitive
<i>Pac</i> I	278858	TTAAT/TAA	Not Sensitive
<i>Acl</i> I	260818	AA/CGTT	Blocked
<i>Pae</i> R7I	246404	C/TCGAG	Blocked
<i>Tli</i> I	246404	C/TCGAG	Impaired
<i>Xho</i> I	246404	C/TCGAG	Impaired
<i>Bsp</i> DI	220240	AT/CGAT	Blocked
<i>Cla</i> I	220240	AT/CGAT	Blocked
<i>Afe</i> I	219934	AGC/GCT	Blocked
<i>Fsp</i> I	217512	TGC/GCA	Blocked
<i>Bsp</i> EI	199344	T/CCGGA	Impaired
<i>Bst</i> BI	190990	TT/CGAA	Blocked
<i>Sna</i> BI	184722	TAC/GTA	Blocked
<i>Nae</i> I	173916	GCC/GGC	Blocked
<i>Ngo</i> MIV	173916	G/CCGGC	Blocked
<i>Bss</i> HII	172588	G/CGCGC	Blocked
<i>Kas</i> I	153418	G/GCGCC	Blocked
<i>Nar</i> I	153418	GG/CGCC	Blocked
<i>Plu</i> TI	153418	GGCGC/C	Blocked
<i>Sfo</i> I	153418	GGC/GCC	Blocked
<i>Aat</i> II	138488	GACGT/C	Blocked
<i>Zra</i> I	138488	GAC/GTC	Blocked
<i>Sbf</i> I	119370	CCTGCA/GG	Not Sensitive
<i>Sac</i> II	79498	CCGC/GG	Blocked
<i>Eag</i> I	78928	C/GGCCG	Blocked
<i>Sal</i> I	68574	G/TCGAC	Blocked
<i>Pme</i> I	68028	GTTT/AAAC	Blocked by Some Combinations of Overlapping
<i>Mlu</i> I	48294	A/CGCGT	Blocked
<i>Bsi</i> WI	28300	C/GTACG	Blocked
<i>Pvu</i> I	22502	CGAT/CG	Blocked
<i>Nru</i> I	20530	TCG/CGA	Blocked
<i>Fse</i> I	20032	GGCCGG/CC	Blocked
<i>Not</i> I	12322	GC/GGCCGC	Blocked
<i>Asc</i> I	5126	GG/CGCGCC	Blocked
<i>Asi</i> SI	2146	GCGAT/CGC	Blocked

Table 2.6. AFLP シミュレーションデータベース及びシーケンスによる遺伝子同定

Isolation ID	Chromosome	Position ^a	Gene name ^b
7	3	83588206	<i>AC141473.2</i> *
10	9	53410271	<i>Acat1</i> *
12	4	138720271	down stream both of <i>Hspe1</i> and <i>RP23-2411.9</i> *
26	13	110215936	<i>Pde4d</i> *
27	2	30409726	9k bp up stream of <i>RP23-3990.3</i> *
41	7	31402396	<i>Cox6b1</i> *
	4	141150829	<i>Eblim1</i>
44	7	29587740	3kbp down stream of <i>Rin1</i> *
53	5	52443251	100kbp down stream of <i>Dxh15</i> *
	19	56431868	<i>Nrap</i>
55	11	76224631	<i>Timm22</i> *
59	10	67595674	<i>Arid5b</i> *
	7	144033409	50kb up stream of <i>Mgmt</i>
63	17	44272079	25k bp up stream of <i>Enpp4</i> *

a, Predicted chromosomal nucleotide position of methylated cytosine by simulation database.

b, Gene name identified by sequencing.

*, Matched between the two methods.

Table 2.7. MF 値の差の検出感度：統計的有意な MF 値の差の小さい順トップ 10

Peak ID	MF(%)			MF difference (%)	Tukey p-val	ANOVA p-val	FDR q-val
	Hippocampus	Kidney	Liver				
CGGC79.8	6.93 ± 0.04	6.64 ± 0.08	6.55 ± 0.01	0.29	0.019	0.005	0.021
CGGC79.8	6.93 ± 0.04	6.64 ± 0.08	6.55 ± 0.01	0.38	0.005	0.005	0.021
CGAG253.2	6.74 ± 0.06	6.20 ± 0.10	6.98 ± 0.07	0.53	0.008	0.001	0.007
CGAG57.4	7.68 ± 0.07	7.08 ± 0.04	7.40 ± 0.12	0.60	0.006	0.007	0.027
CGAG253.2	6.74 ± 0.06	6.20 ± 0.10	6.98 ± 0.07	0.78	0.001	0.001	0.007
CGAG60.8	10.52 ± 0.13	9.08 ± 0.09	9.53 ± 0.24	0.98	0.013	0.002	0.011
CGGC124.2	8.04 ± 0.26	6.68 ± 0.05	6.89 ± 0.12	1.14	0.007	0.003	0.013
CGGC124.2	8.04 ± 0.26	6.68 ± 0.05	6.89 ± 0.12	1.35	0.003	0.003	0.013
CCAG105.0	99.42 ± 0.20	97.57 ± 0.33	97.99 ± 0.39	1.43	0.042	0.014	0.045
CGAG60.8	10.52 ± 0.13	9.08 ± 0.09	9.53 ± 0.24	1.43	0.002	0.002	0.011

Note. Analysis by ANOVA and FDR reported 805 CpG sites with statistically-significant difference of MF value among the three tissues. MF value pairs (shaded) responsible for the difference were identified from the triplet by Tukey test. The percentage of their differences were calculated. Differences even less than 1.00 % were detected. MF: methylation frequency. MF values are described as a mean ± SE (n = 3).

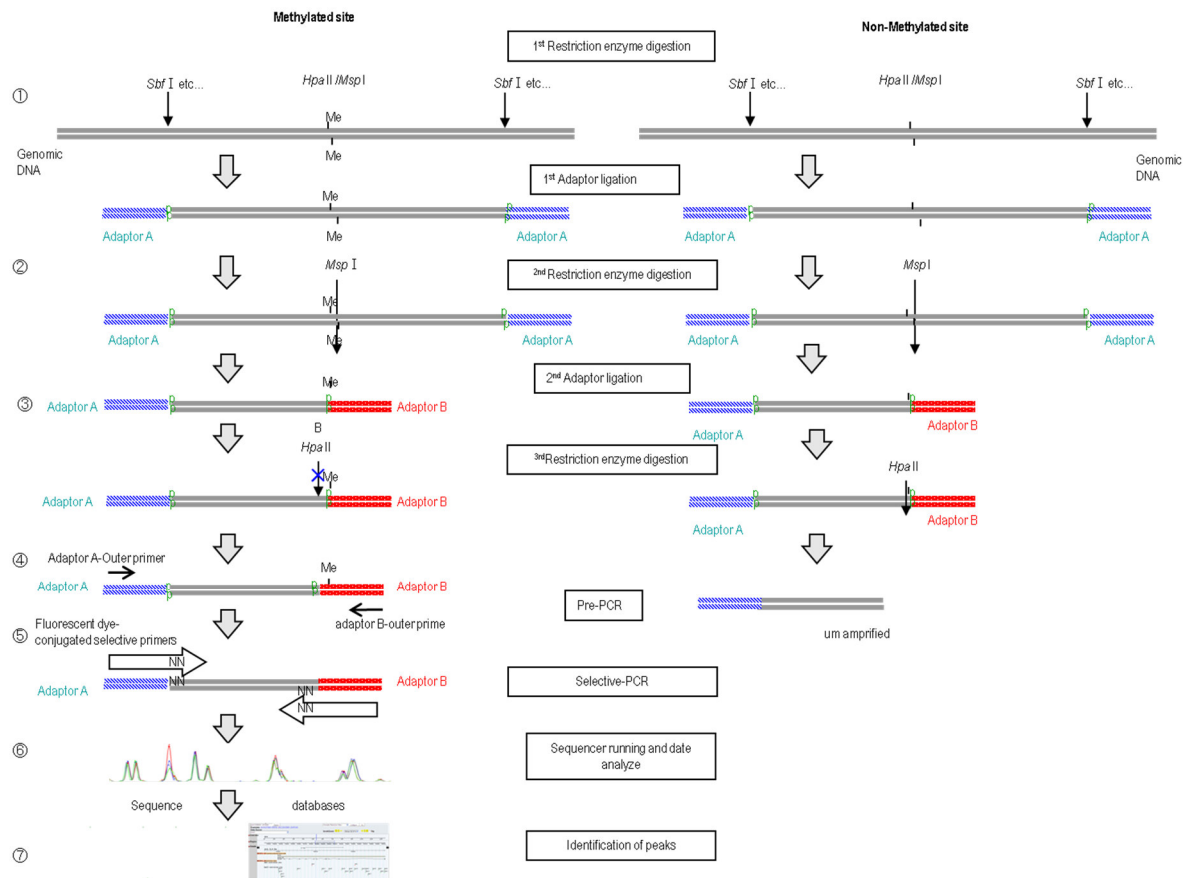


Fig. 2.1. MSD-AFLP 法のフローチャート

①ゲノム DNA を *Sbf I* などの任意のメチル化非感受性制限酵素(1st Restriction enzyme)で消化後、Adaptor A をライゲートする。②メチル化非感受性酵素 *Msp I* (2nd Restriction enzyme)で消化後、Adaptor B をライゲートする。③アダプターライゲート後の産物を *Hpa II* (3rd Restriction enzyme)で消化する。④Adaptor A と Adaptor B のプライマーで pre-PCR 反応を行う。図の左側フローは目的の CpG (*Hpa II*/*Msp I* サイト) がメチル化されている場合、右側はメチル化されていない場合を示す。したがって、*Hpa II*/*Msp I* サイトがメチル化されている場合のみ、この pre-PCR で増幅されることになる。⑤ pre-PCR 増幅産物を鋳型に末端 2 塩基 (選択塩基) を異にする PCR プライマーを用いて選択的 PCR を行う。この過程により 256 の亜集団に分離することで分解能を高める。⑥出来上がった産物をキャピラリーシーケンサーで泳動し、鎖長の違いにより分離する。⑦シーケンスやデータベースを基にメチル化変化ピークを同定する。

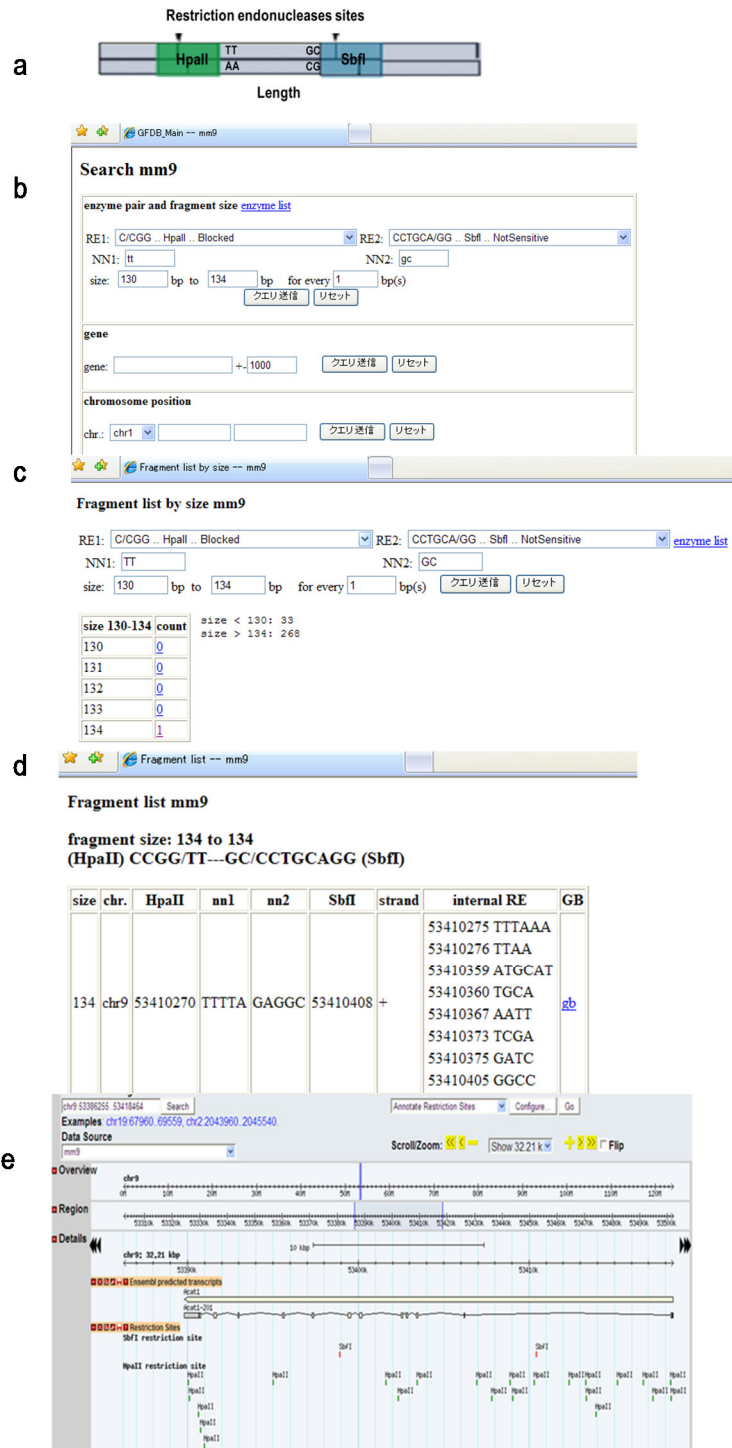


Fig. 2.2. AFLP 断片検索システム

a. 検索するフラグメントの一例。 b. 制限酵素と選択塩基と長さの選択 c. 候補遺伝子数の表示 d. メチル化 *Hpa* II サイトの位置情報及びさらに内部の選択塩基情報と内部にある制限酵素サイト情報。 e. ゲノムビューア上への諸々のゲノム情報を伴った表示。

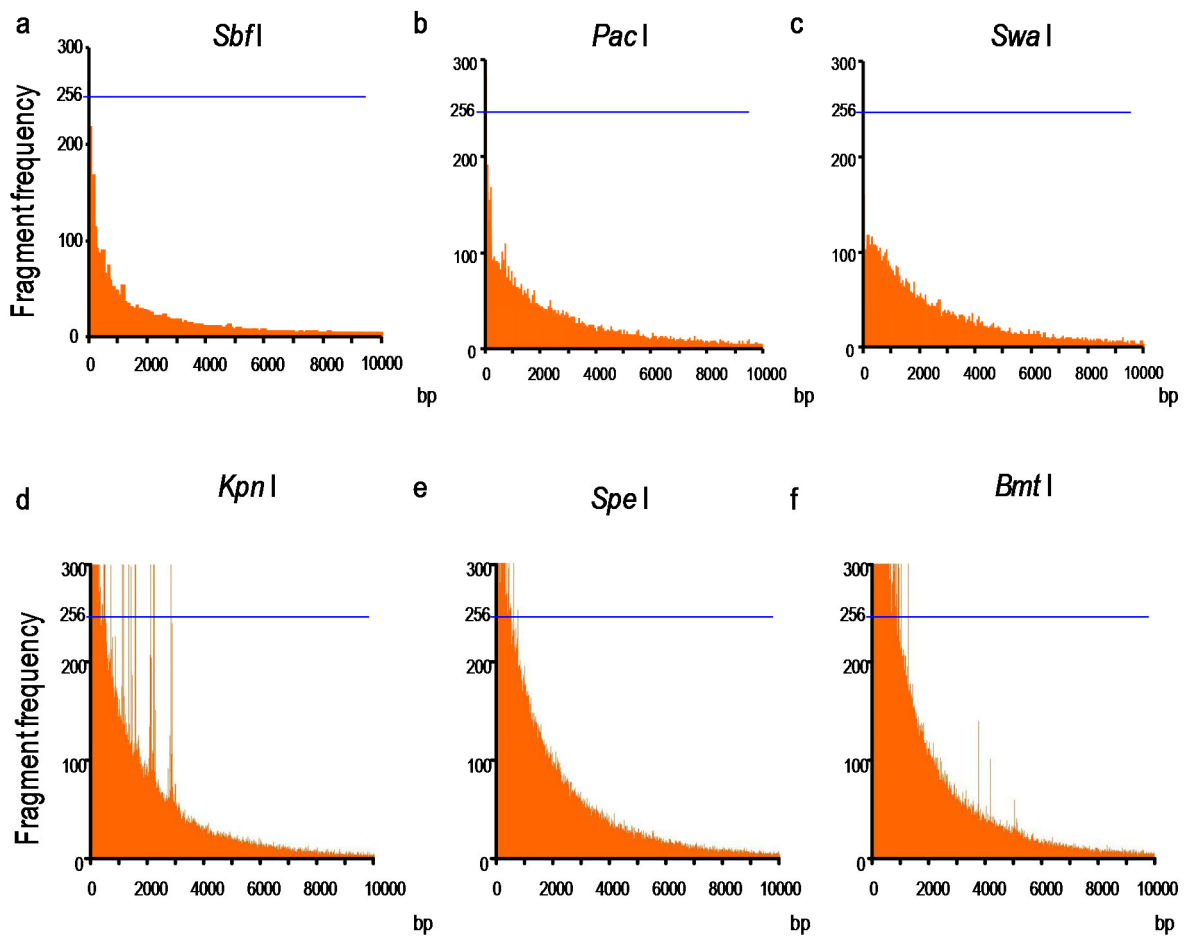


Fig. 2.3. MSD-AFLP 断片の鎖長分布

メチル化非感受性制限酵素と *Hpa* II/*Msp* I との組み合わせにより生じる DNA 断片の鎖長分布を示している。Table 2.5 に示した制限酵素サイト数のランキングにおいてメチル化非感受性の酵素のうち下位 6 位までを示した。8 塩基認識制限酵素とし *Sbf* I (a)、*Pac* I (c)、*Swa* I (d)、6 塩基認識制限酵素として *Kpn* I (d)、*Spe* I (e)、*Bmt* I (f) を用いた際の断片数の分布を示した。

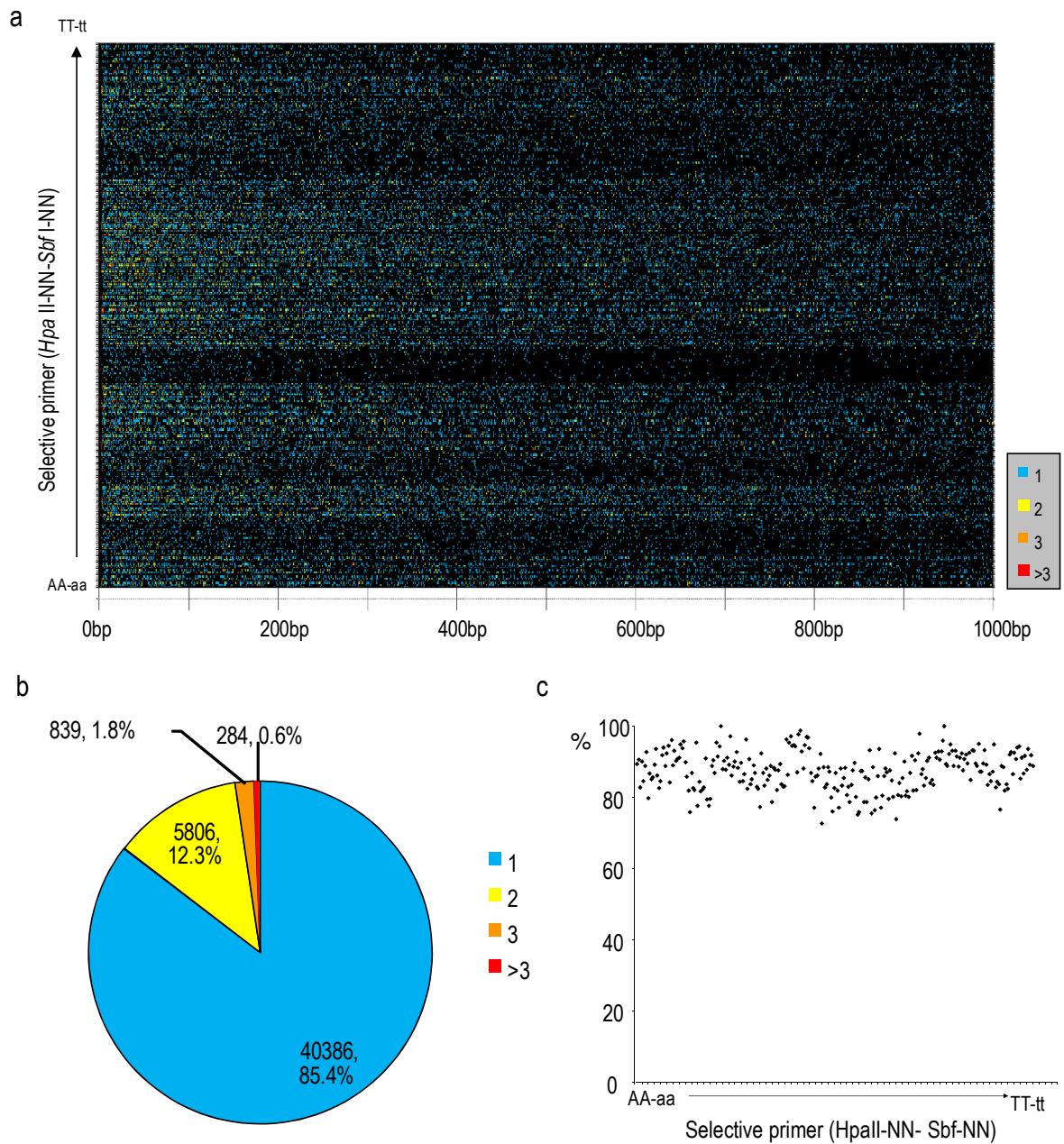


Fig. 2.4. 各ピークの候補断片数の分布

a.断片の長さや選択塩基による候補断片数の分布。縦軸を256セットの選択塩基AA-aaからTT-ttまでアルファベット順に示す。横軸は断片の長さを示す。青いドットは1 bp当たり1断片、黄色いドットは1 bp当たり2断片、オレンジのドットは1 bp当たり3断片、赤いドットは1 bp当たり3断片よりも多いことを示す。b.候補断片数の割合。c.選択塩基ごとに示す独立した1断片として検出できる断片数の割合。縦軸は独立した1断片として検出できる断片数の割合を示す。横軸は選択塩基AA-aaからTT-ttまで全256セットをアルファベット順に示す。

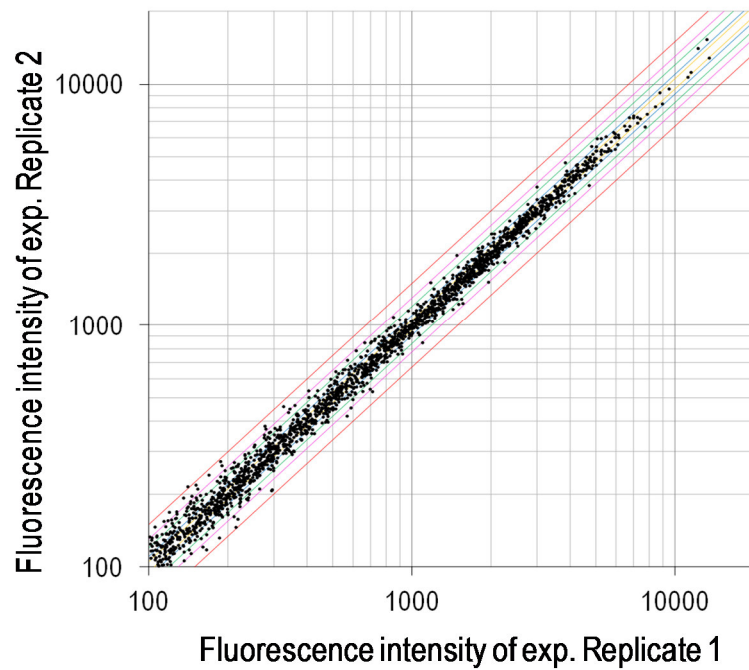


Fig. 2.5. MSD-AFLP の再現性

同一個体のマウス腎臓由来のゲノム DNA 試料から、独立して作成した鋳型ライブラリーの MSD-AFLP 解析における蛍光強度の比較。選択的 PCR のプライマーセットはランダムに 16 種類選んだ。赤、ピンク、緑、青、黄色のラインは、それぞれ、1.5、1.3、1.2、1.1、1.05 倍のシグナル強度の違いを示す。

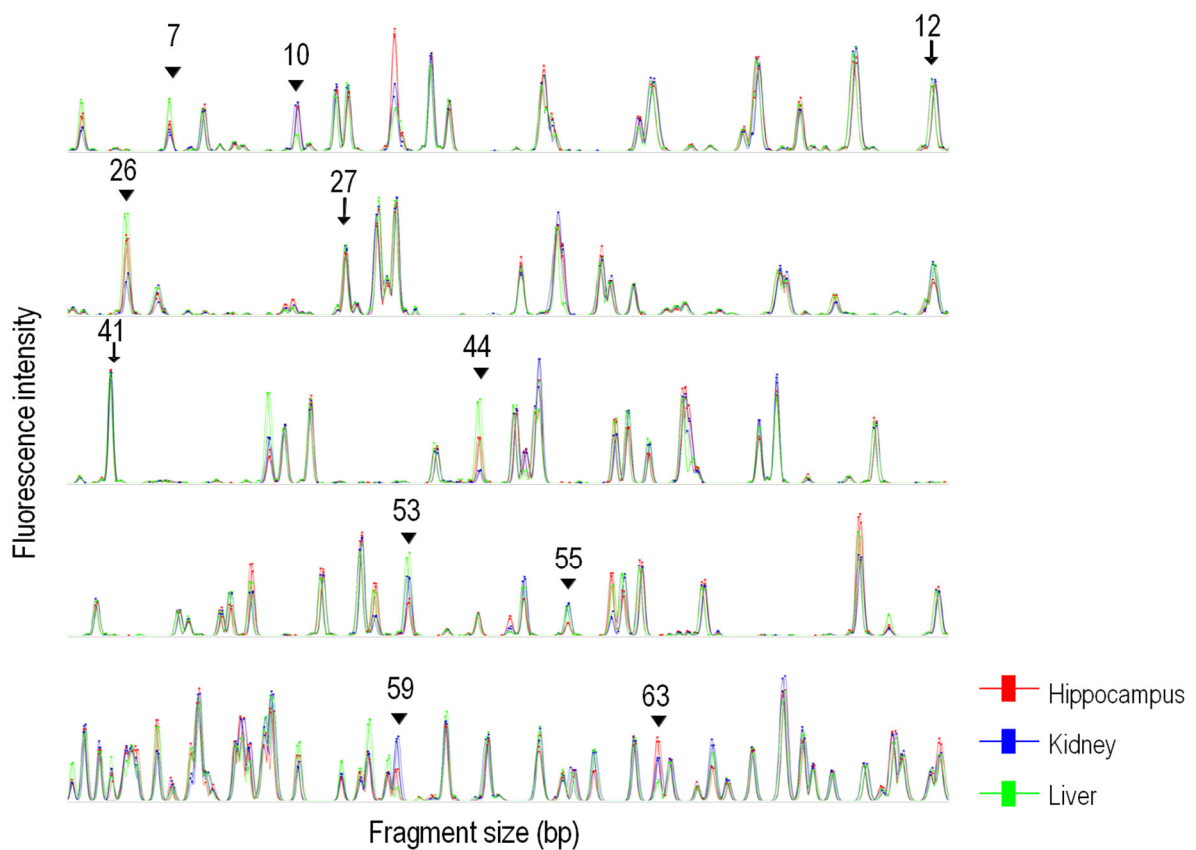


Fig. 2.6. マウス 3 個体各 3 組織の DNA メチル化を比較した MSD-AFLP のピークチャート
 縦軸は蛍光強度、横軸はフラグメントの長さを表している。それぞれのピークは、ゲノム DNA 試料中でメチル化されていたサイトを含むフラグメントを、その高さはフラグメントの量を示す。また数字は、ゲル抽出で配列を同定し、MSRE-PCR (Fig. 2.7)で確認を行ったピークの Isolation ID を示す。矢印は、3 種類の組織でメチル化頻度が同じであったピークを、矢頭は、3 種類の組織でメチル化頻度に差があったピークを示す。

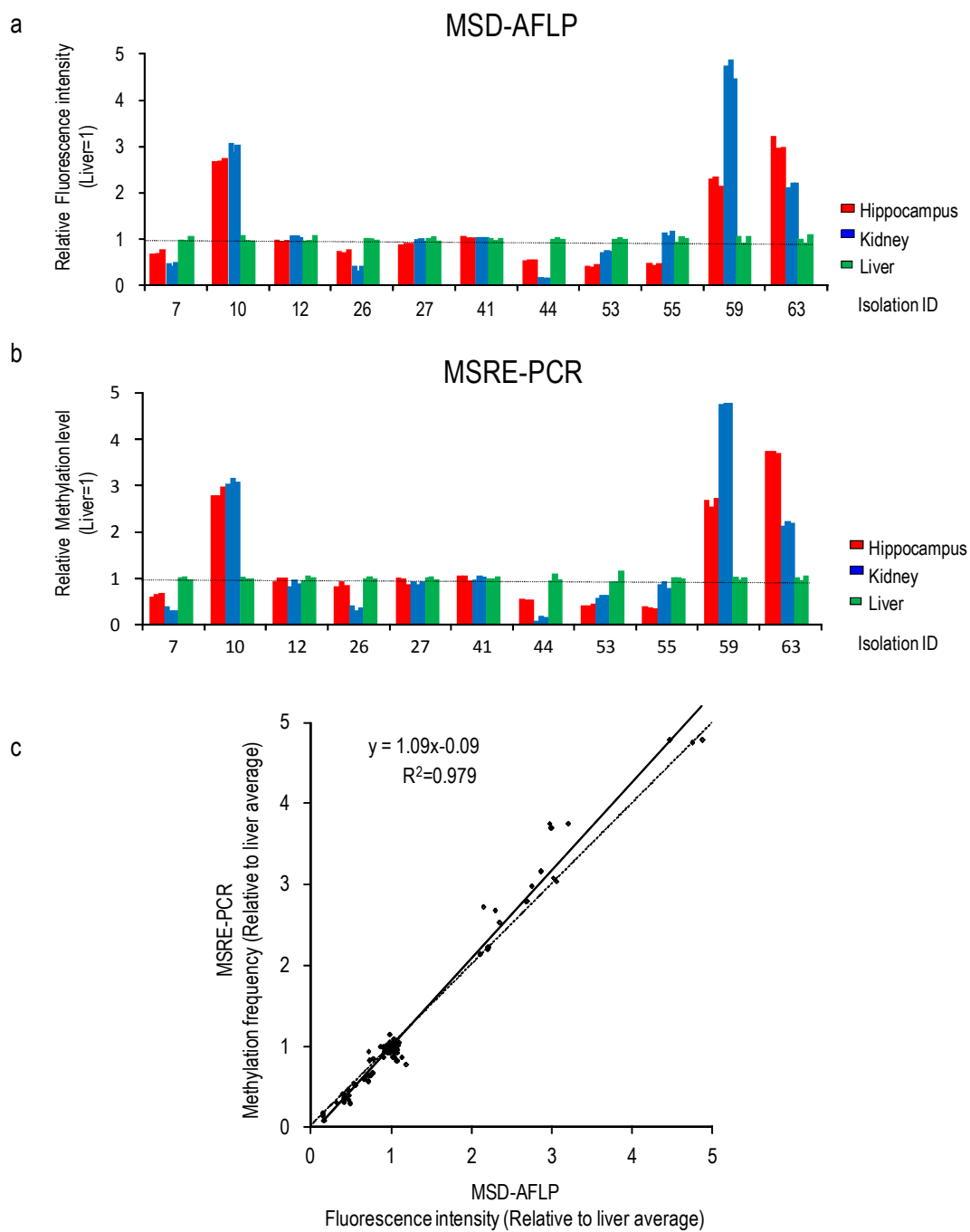


Fig. 2.7. MSRE-PCR による MSD-AFLP 解析の相関性

a. MSD-AFLP の相対的蛍光強度データ。b. MSRE-PCR の相対的メチル化頻度データ。各 Isolation ID は、Fig. 2.6 中に記載の数字と対応している。c. MSD-AFLP の相対的蛍光強度と MSRE-PCR の相対的メチル化頻度の線形近似。実線は線形近似直線、破線は、 $y=x$ を示す。

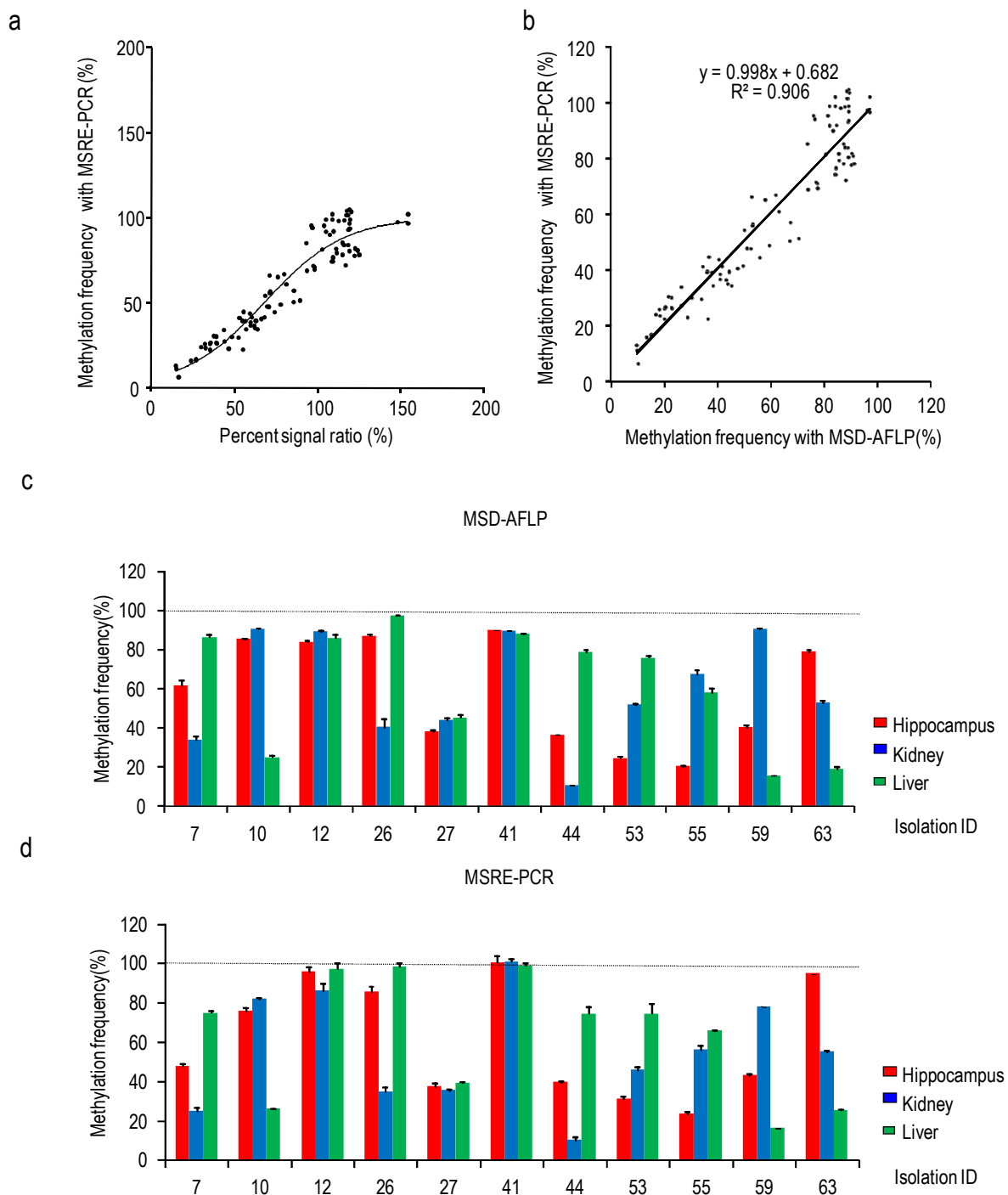
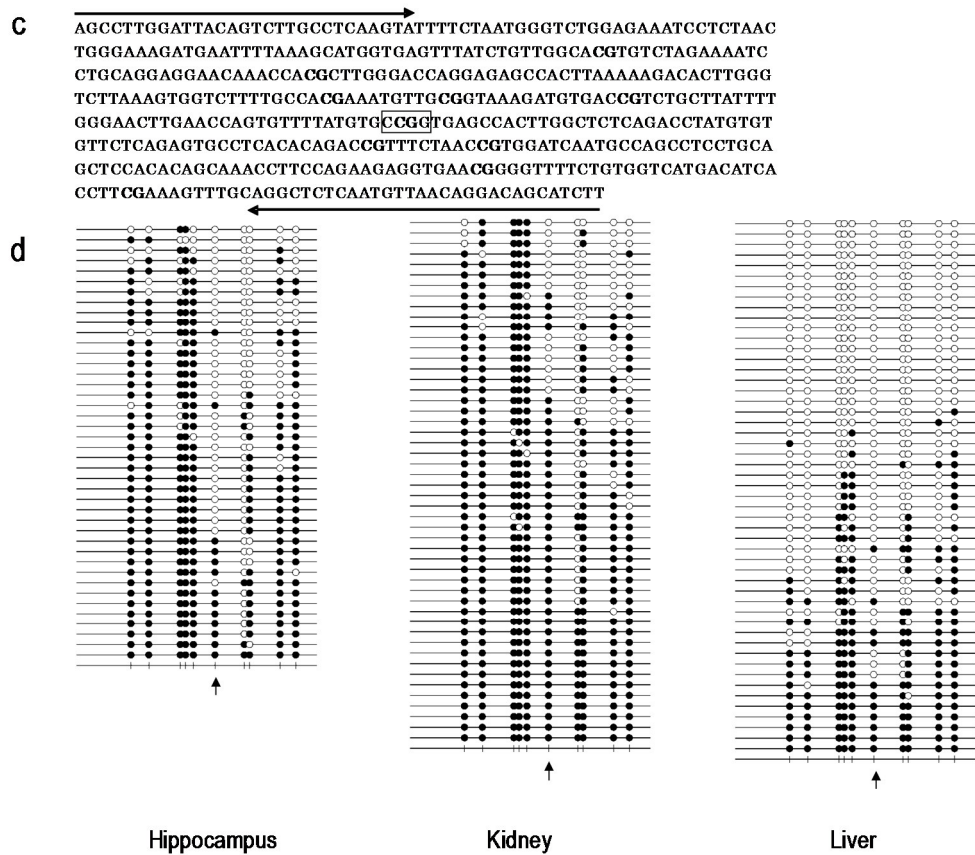
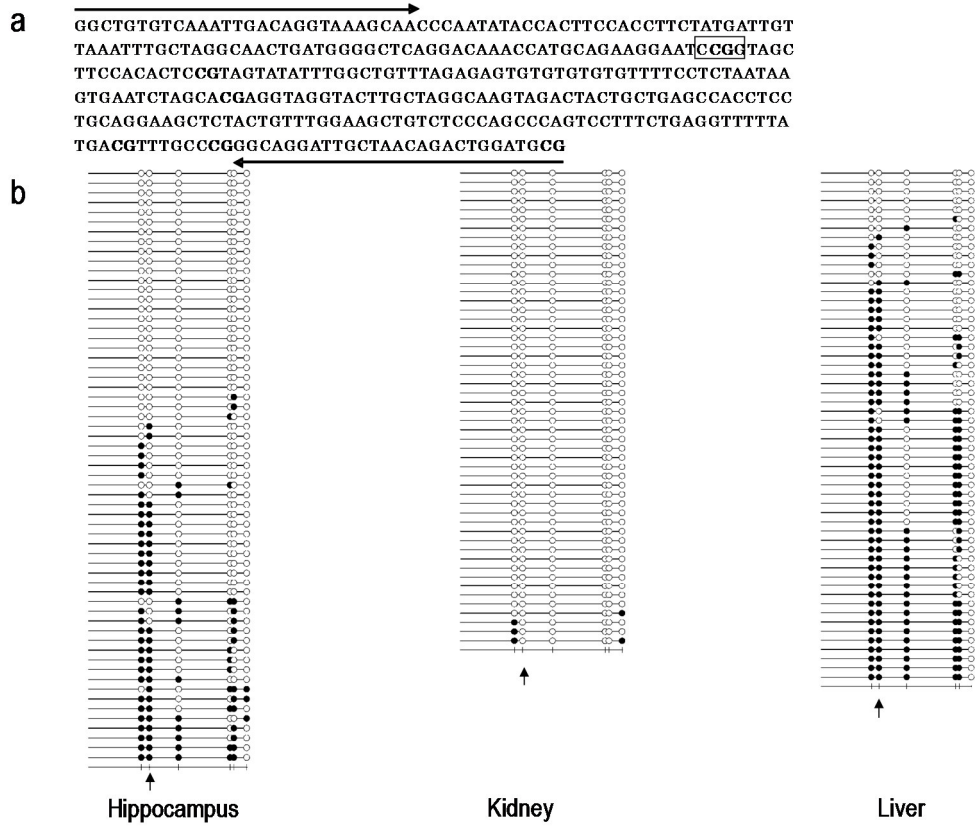


Fig. 2.8. MSD-AFLP の *Sss* I ゲノム DNA 補正

a. MSD-AFLP データのヒル方程式による近似。 b. ヒル方程式後の線形近似。 c. *Sss* I ゲノム DNA 補正後の MSD-AFLP の MF 値 d. MSRE-PCR の MF 値。各 Isolation ID は、Fig. 2.6 中に記載している数字と対応している。



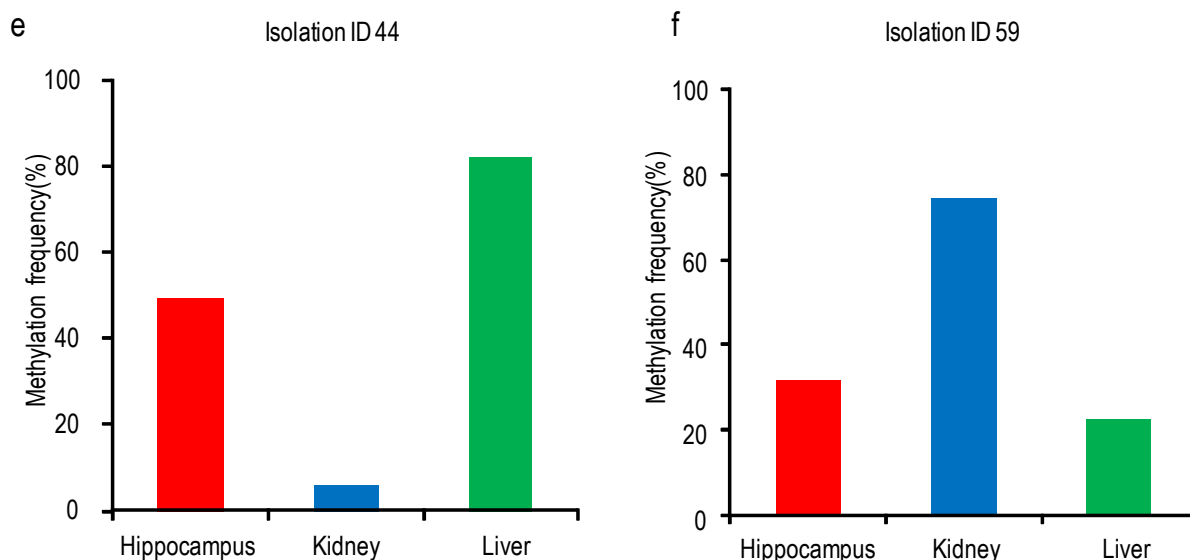
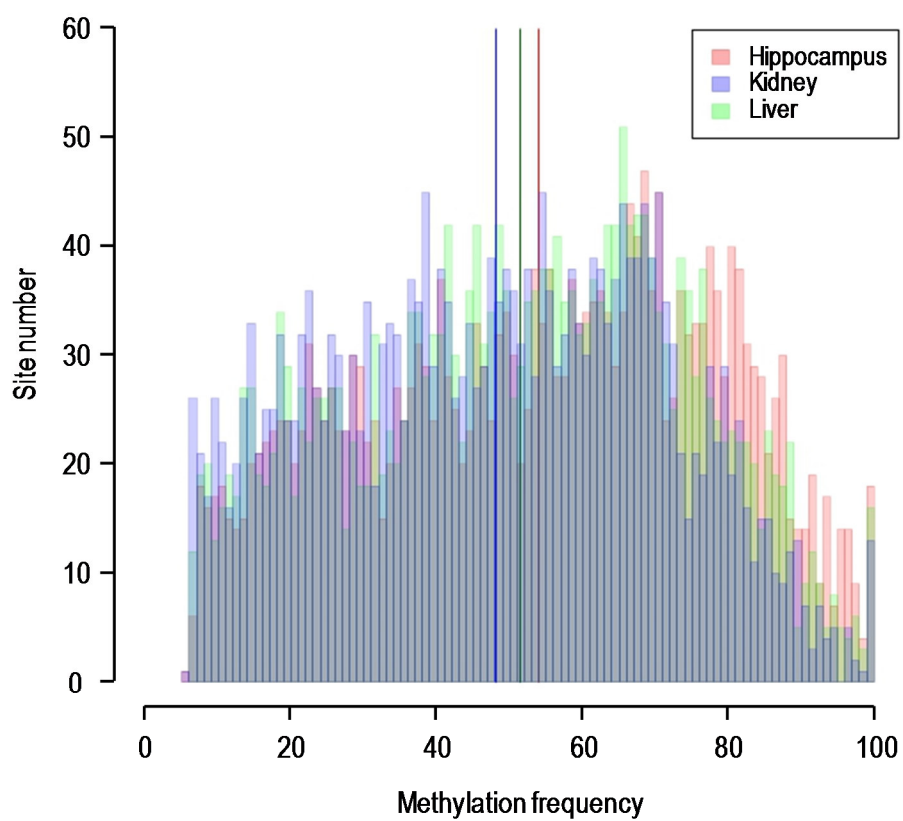


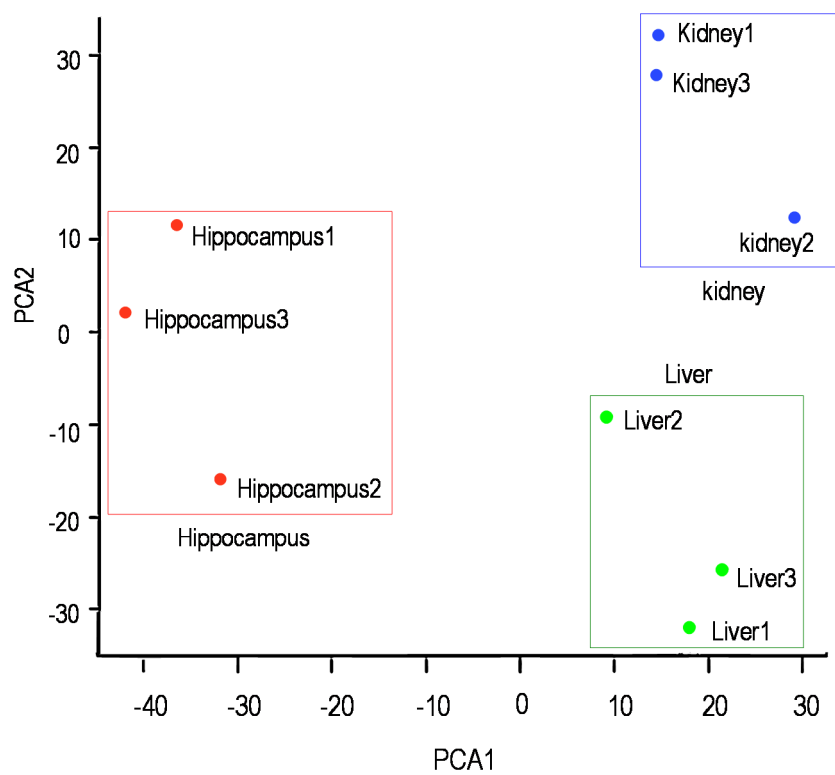
Fig. 2.9. BSGS によるメチル化状態の検討

a,c, Isolation ID 44 及び 59 (*Hpa* II サイト) 周辺配列。太字は CpG 配列を、枠で囲まれた配列は *Hpa* II サイトを示す。b,d, Isolation ID 44 及び 59 周辺の CpG メチル化ステータスならびにメチル化頻度。矢印は *Hpa* II サイトを示す。サークルは、それぞれ●,メチル化 CpG;と○,非メチル化 CpG を表している。e, f は、それぞれ Isolation ID 44 及び 59 に含まれる *Hpa* II サイトのメチル化頻度を示す。

a



b



次ページへ続く

C

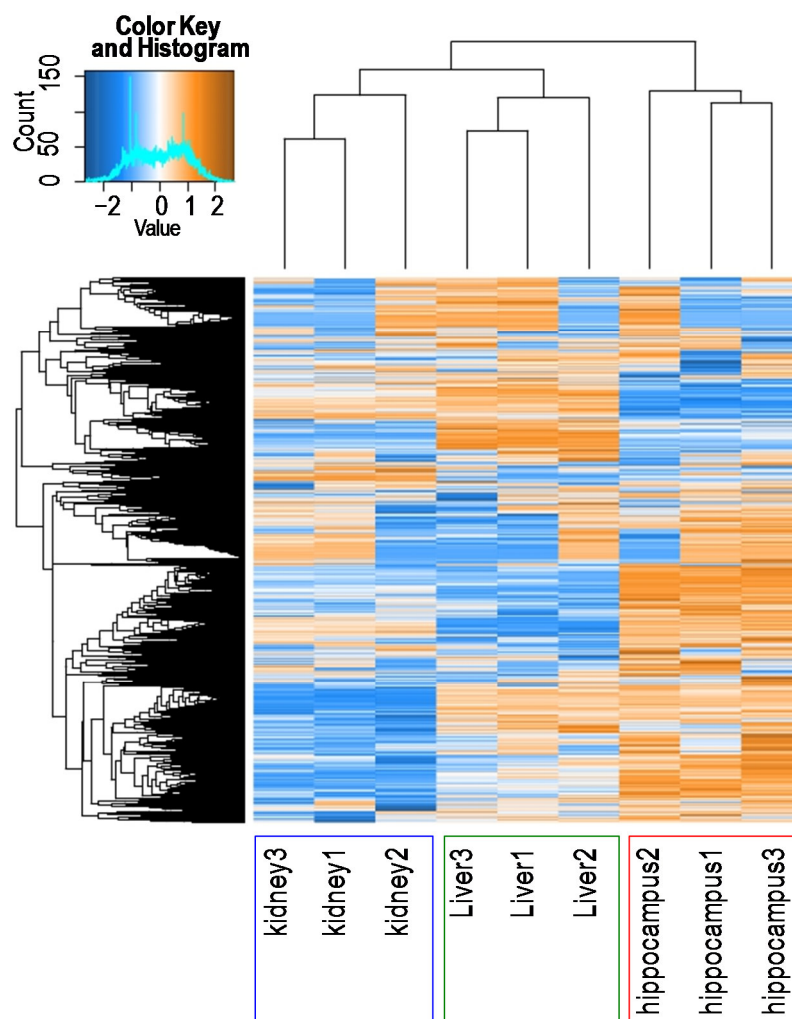


Fig. 2.10.組織間のメチル化パターン検出

a.各組織のメチル化頻度のヒストグラム。赤、青、緑のラインは各組織の平均メチル化頻度を示す。赤は海馬、青は腎臓、緑は肝臓を示す。b.主成分分析。赤は海馬、青は腎臓、緑は肝臓を示す。c.階層クラスタリング。赤枠は海馬、青枠は腎臓、緑枠は肝臓を示す。

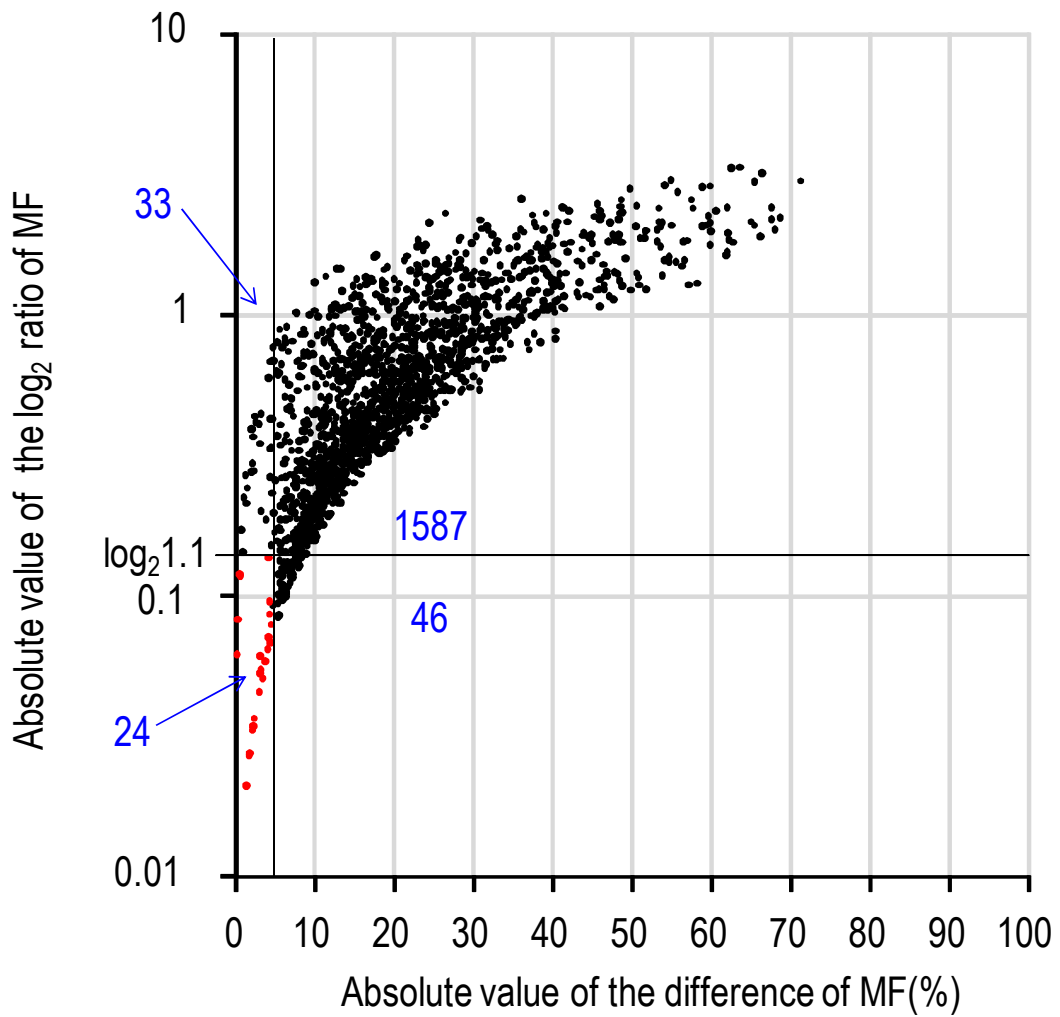


Fig. 2.11. MSD-AFLP の変動検出感度

Tukey-test で有意差のあった組織間のメチル化頻度の比とメチル化頻度の差をプロットしたものである。縦軸はメチル化頻度の比を、横軸はメチル化頻度の差を示す。左下の四角は、他の網羅解析で検出困難なメチル化頻度の比が 1.1 倍以内かつメチル化頻度の差が 5% の範囲のものを示す。青色の数字は各エリア内のスポット数を表している。

第3章 MSD-AFLP法を用いた胎生期BPA曝露マウスのCpGメチル化変動解析

3.1 研究背景と目的

3.1.1 BPAの衛生学的研究の意義

3.1.1.1 BPAのヒトへの曝露と体内動態

BPAは、Fig. 3.1に示す分子構造を有する化学物質である。主にポリカーボネート、エポキシ樹脂などプラスチックの原料として使用されている。2012年度日本国内生産量は456,366トン、消費量は83,573トンである⁹⁹。ポリカーボネート樹脂は食品の容器などに、エポキシ樹脂は缶詰容器内面のコーティングなどに使用されている。したがって、BPAは主にこれらの製品から溶出し、飲食物中に移行するためヒトへの曝露が起きている¹⁰⁰⁻¹⁰³。しかしながらBPAは極めて迅速に体外に排泄される。BPAの経口曝露後、ラット、サル、ヒトではその大部分が消化管から速やかに吸収され、肝臓においてBPA-グルクロニド(BPAG)に代謝される¹⁰⁴⁻¹⁰⁶。さらに、雌雄のF344ラット(8-9週齢)に¹⁴Cで標識したBPAを10, 100 mg/kgで経口投与した試験でも、血中BPAは18時間以内に検出限界未満になり、その排泄速度は極めて早い¹⁰⁷。

3.1.1.2 低用量BPAの生殖発生毒性に関するリスク評価について

BPAが内分泌かく乱化学物質として問題提起がなされたのは約20年ほど前である。出芽酵母を培養した培地中にエストロゲン様作用を示す物質が現れてくることが知られていたが、この物質は、ポリカーボネート製のフラスコから溶出する単体のBPAであった^{108,109}。vom Saalらは、マウスの胎仔が従来の無毒性量よりも低用量(2 µg/kg体重)のBPAに曝露された場合、産仔の精巣上体重量低下などの生殖毒性を有する

こと¹¹⁰、20 µg/kg 体重の胎仔期曝露で前立腺重量が増加すること¹¹¹を報告した。これらの用量は、乳幼児等の推定最大曝露量に相当する¹¹²。さらに Sakaue らは SD 系雄ラットを用いた解析により、13 週齢の成熟ラットにおいても、20 µg/kg 体重という低用量域から精巣内精子数が減少することを報告した¹¹³。

一方、Cagen や Ashby らは上記の低用量影響について再現実験を実施し、報告されたような影響は出ないという全く逆の結果を提示した¹¹⁴⁻¹¹⁶。さらに Tyl らも、vom Saal らの報告を追試して、CD-1 マウスならびに SD ラットで2世代ならびに3世代にわたる曝露実験を行ったが、前立腺の形態学的異常や性周期異常などの生殖毒性はないと報告した¹¹⁷。Ema らによる SD ラット2世代にわたる曝露実験結果でも、BPA の生殖毒性は小さいと発表された¹¹⁸。低用量影響を見出さなかった報告者らは、先行研究が報告した低用量影響とされるものが、研究におけるサンプリングデザインの違いや対照群数値のばらつきに起因すると主張している^{119, 120}。しかし、生殖毒性は少ないとする毒性試験報告以後も、胎生期曝露マウスにおいて雄の前立腺肥大や尿道奇形が見られたとする報告がなされた¹²¹、vom Saal らはこれら多くの BPA による生殖毒性の報告群を根拠に、BPA には毒性影響があると主張している¹²²。

3.1.1.3 低用量 BPA の脳発達への影響

その後、生殖発生学的視点ではなく、周産期における BPA 低濃度曝露が脳発達に影響を及ぼすことで、各種の行動指標に対照群と異なる変化が生じるという知見が数多く報告されるようになった¹²³⁻¹²⁷。また、脳の中でも海馬における BPA 低用量曝露影響が曝露時期に関わらず報告された^{123, 128, 129}。特に、Csaba Leranth らの報告は霊長類における海馬シナプス形成への影響であったため、注目を集めることとなった¹²⁷。

3.1.1.4 BPA のリスク管理の観点からの国際的動向

カナダ政府は 2008 年、上記のような研究報告をもとに、低用量での BPA の乳幼児（主に 18 ヶ月未満）への影響を考慮し、ポリカーボネート製のほ乳びんの輸入及び販売等を禁止するとともに乳児用の調製乳に使用されている缶の内面塗装から BPA の溶出を可能な限り減らす指針とリスクの再評価を行うことを公表した¹³⁰。そして、2012 年には、乳幼児の推定曝露量は 1 日体重 1kg 当たり 0.02-0.12 μ g であり、健康リスクは予想されないと結論付けた¹⁰²。

米国食品医薬品局（FDA）は、さらに調査や研究が必要としながらも、BPA 曝露量を減らすことを提言するとともに胎児への BPA の移行性が低いため、NOAEL(5 mg/kg)以下の低用量での BPA の周産期曝露影響は認められないという報告をまとめている¹⁰¹。

欧州食品安全機関（EFSA）は、2012 年に「食品接触材料、酵素、香料及び加工助剤に関する科学パネル」（CEF パネル）にて BPA のリスク評価の再評価に着手した。その結果、食事が BPA の主な曝露源であること及び幼児の推定曝露量は 1 日体重 1 kg 当たり 375-857 ng と過去の推定曝露量もより低いと結論づけた¹⁰⁰。

一方、フランス食品環境労働衛生安全庁は、ラットにおける胎生期 BPA 曝露で成熟後の仔の腸炎のリスク上昇が認められることや¹³¹、げっ歯類における胎生期 BPA 曝露で成熟後の仔でエストロゲン感受性増加により乳腺腫瘍形成が増加すること¹³²が報告されたのを受け、これら報告を含め過去の論文報告を参考に BPA 曝露による

胎児への影響が認められるという報告をまとめた¹⁰³。そしてフランス政府は、2012年に食品容器へBPAの使用を禁止する法案を可決した。

このようにBPA曝露影響は、現在の推定曝露量では少ないものの予防的な考えから曝露量を減らすべきという考えが主流になってきている。

3.1.2 胎生期BPA曝露によるエピゲノム影響の解析

第1章で述べたように、BPAは環境化学物質として胎生期曝露により、DOHaD仮説で示唆されるようなエピゲノム変化を起こすことが、いくつかの動物実験で報告され^{33-35, 80, 133}、DOHaD研究の対象として近年急速に注目されるようになった¹³⁴。そのため、BPAでDOHaDが生じるかは論争の最中であり、他の手法よりも精度と感度が高い本手法を用い、DOHaD仮説で示唆されるようなエピゲノム変化を起こすかを検証することとした。

使用した用量に関しては、一般的にヒトへの安全影響を考える上で動物実験結果から種差や個体差などを踏まえ、安全面から考えて動物実験での投与量に安全係数として最大無毒性量（NOAEL）の場合1/100若しくは最小毒性量（LOAEL）の場合1/1000を乗じた値を基準値とする。そこでヒトでの推定曝露量が1日当たり0.02-0.86 µg/kgであり、ヒトでの曝露量の約100倍～1000倍の低用量BPAをマウスに曝露することとした。また、毒性学では原則毒性の強さは投与量に比例し、閾値（NOAEL）以下の用量では毒性が現れないという毒性影響の用量依存性という概念がある。しかし、3.1.1.2及び3.1.1.3で述べたようにBPAでは現在のNOAEL（5 mg/kg）以下での毒性影響（低用量影響）も報告されている。さらに、予備実験で実施した胎生期BPA曝露

の用量依存的が曝露試験（2 μg/kg、20 μg/kg、200 μg/kg）では、Tceb2（elongin B）の有意な発現上昇がマイクロアレイ解析を基に検出された。そこで本章では、用量依存性という概念に則り NOAEL の再評価という観点から BPA 毒性影響の報告例の多い 20 μg/kg の 10 倍の 200 μg/kg の胎生期曝露試験を行った。

3.2 方法

3.2.1 試薬

以下の各試薬を括弧内に記載する各社より購入し使用した。bisphenol-A (BPA) 及びコーンオイル (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)。PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) 及び SYBR® *Premix Ex Taq II*™ (Tli RNaseH Plus) (Takara Bio)。

3.2.2 動物および投与

妊娠 2 日目 (E2.5, プラグ確認日を E0.5) の C57BL/6J マウスを日本クレア (CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan) より購入し、ヘパフィルター付きアイソフードラック内で飼育した。また、固形試料 (ラボ MR ストック, NOSAN, Yokohama, Japan) 及び水 (逆浸透水) は自由に摂取させ、明暗周期 12 時間、室温 23°C の飼育環境に保った。なおこの動物を用いた動物実験は、東京大学動物実験実施規則に従った。妊娠マウスに対し BPA を妊娠 6 日目より妊娠 18 日目までの 12 日間連日経口投与した (Fig. 3.2)。投与用量は BPA (0 µg/kg、200 µg/kg) を用いた。BPA は vehicle (コーンオイル) に添加しソニケーターを用いて溶解させた。妊娠動物には胃ゾンデ (Fuchigami, Kyoto, Japan) を用いて経口投与した。

3.2.3 飼育および解剖

生まれた仔は、母獣のもとで飼育した。生まれた個体を PND9 まで約 3 日ごとに PND14 から PND49 までは 7 日ごとに体重測定をすると同時に、雌雄ともに肛門生殖突起間距離 (AGD) をノギスで測定した。雄：生後 84 日齢 (PND84)、雌：PND87 において頸椎脱臼により屠殺し、肝臓、心臓、腎臓、尿生殖器複合体 (UGC)、精巣、

子宮を採取し重量を測定し、-80°C 保存した。さらに、海馬を氷上で剖出し、-80°C デイープフリーザーで RNA ならびに DNA 解析用に保存した。

3.2.4 核酸抽出

組織 DNA 及び RNA は AllPrep DNA/RNA Mini Kit のプロトコールに従い抽出した。

3.2.5 逆転写 PCR

逆転写は PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) のプロトコールに従って行った。リアルタイム PCR 解析には SYBR® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) を用い、LightCycler (Roche) を使用して実施した。使用したプライマーについては Table 3.1 に示した。

3.2.6 MSD-AFLP 解析

雄産仔の海馬の DNA に関して vehicle 投与群 (n=6) と BPA 200 µg/kg 投与群 (n=6) の延べ 12 サンプルを用い、選択的プライマーは全セット (256) を使用して解析した。

3.2.7 統計解析

統計解析は第 2 章と同じく R を用いた。胎生期 vehicle 投与群 (対照群) と胎生期 BPA 投与群間でスチューデントの *t* 検定により行った。FDR は第 2 章と同じく BH 法⁷³にて求めた。そして有意水準 $p \leq 0.05$, $q \leq 0.05$ のとき統計的な有意差があるとした。また階層型クラスタリング解析は、CpG ごとに標準化 Z 変換後に行い、その距離はユークリッド距離で求め、平均連結法で階層化した。病態関連性遺伝子群に対して gene set enrichment analysis (GSEA) ソフトウェア (<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>)

を用いてエンリッチメント解析を行った。なおこのエンリッチメント解析は京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) の丸山徹氏が実施した。

3.3 結果

3.3.1 産仔数、生存率

低用量 BPA 投与群と対象群のマウスの産仔数を Table 3.2 に示す。BPA 投与による産仔数の変動は認められなかった。解剖時までの群間の生育状態を均一化するため、PND9 で1腹あたり雄5匹ともに雌3匹になるよう調整した。その後の生存率に差は認められなかった (Table 3.2)。

3.3.2 体重、AGD および臓器重量

PND9 まで約3日ごとに PND14 から PND49 までは7日ごとに体重、AGD を測定した。雌雄ともに PND49 にて体重の若干の減少が認められたが、AGD は、雌雄ともに影響は認められなかった (Fig. 3.3) また、雄 (PND84) および雌 (PND87) の各臓器重量データを Table 3.3 に示す。UGC 重量に有意な減少傾向が認められた。

3.3.3 海馬における *Tceb2* 遺伝子の発現変動

予備実験で妊娠6日目より妊娠18日目までの12日間、BPA (2 µg/kg、20 µg/kg、200 µg/kg) を連日経口投与したところ、PND35 のオスの海馬で *Tceb2* (elargin B) の有意な上昇が観察された。そこで、今回は成熟後の PND84 のオスの海馬において、vehicle 投与群 (n=6) と BPA 200 µg/kg 投与群 (n=6) のトータル RNA 延べ12サンプルを用いて定量 RT-PCR で発現を確認した。しかし、変化は検出できなかった (Fig. 3.4)。

3.3.4 BPA によるメチル化変動の網羅解析

MSD-AFLP 法を応用し、BPA 処理マウスの網羅的解析を実施した。妊娠マウス (C57BL/6J) に BPA を妊娠 6 日から 18 日まで連日経口投与し、その雄産仔の海馬の DNA に関して vehicle 投与群 (n=6) と BPA 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群 (n=6) の延べ 12 サンプルを用いて選択プライマーの全セットで解析した (Fig. 3.5)。選択プライマーセット 256 種で検出できた有効な総メチル化 CpG (ピーク数) は 43,840 であった。これらすべての CpG のコントロール群における平均 MF 値は $59.5 \pm 0.1\%$ であったのに対し、BPA 投与群の平均 MF 値は $59.0 \pm 0.1\%$ であり、BPA 投与による影響は観察されなかった。さらに、個々の CpG について *t* 検定及び FDR 法で検定を行った。FDR 法は、他の検定で検出された陽性変化に関して偽陽性か否か否かを判定し、真の変化を検出する多重検定法であり、マイクロアレイや次世代シーケンスなどの網羅解析データにおいて使用されている^{135, 136}。

$p \leq 0.05$ かつ $q \leq 0.05$ を満たす有意な変動を示すピークは全く検出できなかった。またこれら 12 サンプルを用いて、ユークリッド距離群平均法によるサンプルとメチル化部位間の階層クラスタリングを行ったが、投与による差は全く見られなかった (Fig. 3.5)。また、主成分分析でも対照群と BPA 群で変化は認められなかった。さらに遺伝子上とプロモーター上 (TSS から上流 5 kb) に存在する CpG サイトの MF 値データを用い、病態関連性遺伝子群に対してエンリッチメント解析を行ったが有意な遺伝子群は検出されなかった (Table 3.4)。

3.4 考察

本論文では上記の胎生期 BPA 曝露によるエピゲノムへの後発影響に関して、近交系である C57BL/6J マウスを用い、標的組織を海馬にすることで、本論文で開発した MSD-AFLP 法による網羅的解析で BPA による変動を示す CpG の探索を試みた。

MSD-AFLP 法は精度と感度において高い検出力を有し、組織間の微細なメチル化変化を検出できれば、微細なメチル化変化という点では同じなので、化学物質による微細なメチル化変化も存在していれば同様に検出できるはずであるにも関わらず、海馬 DNA で BPA により統計学的に有意に変動する CpG は検出できなかった。

他方、第 1 章で記載したように、近年 BPA の胎生期曝露によるゲノム DNA の CpG メチル化への影響の報告がなされている。すなわち、Avy マウスは *agouti* 遺伝子内に挿入されたトランスポゾン (IAP) のメチル化により、発現抑制がかかるため体毛が黄色となる。Avy マウスに BPA 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を曝露するとこの IAP が低メチル化するために毛色が変わるという報告がある³⁴。また、胎生期 BPA 曝露を受けた sprague-dawley (SD) ラットでは前立腺の *phosphodiesterase type 4 variant 4* の遺伝子 DNA 低メチル化により 7,12-dimethylbenz[a]-anthracene (DMBA) 投与による前立腺がん発生に対して高感受性になったとする報告がある¹³⁷。さらに中枢神経系では、ICR/Jcl マウスに BPA 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を曝露すると胎仔前脳の遺伝子 (Vsp52、LOC72325) のメチル化頻度が変わったという報告がなされている³⁵。

上記 3 つの報告の問題点を以下に記載する。まず Dolinoy らの Avy マウスを用いた報告は³⁴、トランスポゾン DNA を対象としており、生体機能に必須な他の遺伝子へ

の影響があったかは定かでない。次の Ho らの報告³³や Yaoi らの報告³⁵では、近交系を用いていない。近交系を用いることが望ましい理由は、エピゲノム変化の網羅的解析にコロニー内に遺伝的バリエーションの多いアウトブリード（CF-1 マウス、ICR マウス、SD ラット等）は適していないためである。また、Yaoi らの報告³⁵では、海馬の DNA メチル化網羅的解析において、BPA がまだ体内にある時期のサンプルで解析されている。胎生期におけるエピジェネティックな変化が成熟後までエピゲノムの記憶として残る影響であったかの検討はなされていない。

さらに Ho らの報告³³に対し、Ichihara らは、胎生期 BPA 曝露した fischer 344 ラットで成熟後に DMBA を投与しても、副生殖腺（前立腺と精嚢腺）で DMBA により誘発される過形成はじめ発がんに対する BPA の胎生期曝露による影響は認められなかったと報告している¹³⁸。再現性が得られなかった理由として、使用する実験動物の系統差が考えられる。例えば fischer344 ラット及び SD ラットの雌に、¹⁴C 標識 BPA を経口投与すると、fischer344 ラットと SD ラットの間で尿中移行が 42%と 21%、糞中移行が 50%と 70%、体内残留 1.1%と 1.4%と系統の違いによる差が観察されている¹³⁹。このように BPA の体内動態には実験動物で系統差があるため、それが体内 BPA 濃度に反映され、実験結果にも影響したのかも知れない。したがって、今後化学物質のエピゲノムへの影響解析を目的とした研究には、統一した試験系が望ましいと考えられる。

また、BPA 研究では動物種や系統差以外にも実験条件によって結果が異なるということが報告されている。例えば Yaoi らは、GD14.5 で BPA によりメチル化変動が認められた 2 遺伝子において、GD16.5 では BPA 曝露影響が消失すること、Ho らは胎

生期の BPA 曝露による *PDE4D4* 遺伝子へのメチル化影響に関して、PND10 では認められないが、成熟後になって現れてくると報告している。さらに、Tang ら胎生期の BPA 曝露による *Hpcall* 遺伝子へのメチル化影響に関して性成熟や加齢、ホルモン投与などにより鋭敏に影響されることを報告している¹⁴⁰。したがって、これらの報告を踏まえると今回は限られた動物種、曝露時期、曝露量、曝露方法、解析時期条件での解析結果であり、他条件下での更なる調査が必要であると考えられる。

さらに、今回検討した 43,840CpG は全 20,000,000-CpG の約 0.3%であることからさらに網羅度を高めて解析することも必要である。しかしながら、仮に今回の結果をゲノム中の全 CpG へと外挿して議論するとすれば、胎生期の BPA 曝露が海馬の DNA のメチル化に対し、仮に影響を与えとしても全 20,000,000-CpG 中 500 CpG 以下であり、今回の条件下では影響は少なかったと考えられる。

3.5 結論

本研究は、胎生期低用量 BPA 曝露影響でエピジェネティックな遺伝子変化に伴う生理的な影響が残りうるか検討した。新しく開発した MSD-AFLP 法で解析を行ったが、低用量 BPA 胎生期曝露によるメチル化変化は認められなかった。

3.6 第3章の図表

Table 3.1. RT-qPCR に用いたオリゴヌクレオチド

Gene		Sequence (5' to 3')
<i>Tceb2</i>	Forward	AGCCCTCCAGAGCTTCCAGA
	Reverse	CAGAAAAGTCAATCAGGTAGACAGC

Table 3.2. 産仔数への BPA の影響

	dam	male	female	total
vehicle	5	24	22	47
200 μ g BPA/kg	6	29	31	60

Note. Pregnant C57BL/6J mice were orally administered BPA at a dose 200 μ g/kg from GD 6 to GD 18.

Table 3.3. 胎生期 BPA 曝露マウスの解剖時臓器重量

	vehicle		200 µgBPA/kg	
	male	female	male	female
body weight (BW) (g)	23.8 ± 0.2	19.9 ± 0.4	23.4 ± 0.2	18.7 ± 0.3*
Liver (g)	1.03 ± 0.02	1.14 ± 0.07	0.98 ± 0.02	0.97 ± 0.03*
UGC (g)	1.03 ± 0.02	-	0.22 ± 0.01*	-
Testis (g)	0.182 ± 0.003	-	0.174 ± 0.003	-
Uterus (g)	-	0.12 ± 0.01	-	0.11 ± 0.02
Heart (g)	0.137 ± 0.003	0.102 ± 0.003	0.137 ± 0.005	0.093 ± 0.002*
kidney(g)	0.271 ± 0.005	0.230 ± 0.005	0.268 ± 0.004	0.214 ± 0.003*
Liver/bw (%)	4.3 ± 0.1	5.7 ± 0.3	4.2 ± 0.1	5.2 ± 0.2
UGC/bw (%)	1.03 ± 0.02	-	0.94 ± 0.03*	-
Testis/bw (%)	0.76 ± 0.01	-	0.74 ± 0.01	-
Uterus/bw (%)	-	0.69 ± 0.04	-	0.57 ± 0.08
Heart/bw (%)	0.58 ± 0.01	0.51 ± 0.01	0.57 ± 0.01	0.50 ± 0.01
kidney/bw (%)	1.14 ± 0.02	1.16 ± 0.02	1.14 ± 0.01	1.15 ± 0.02

Note. Pregnant C57BL/6J mice were orally administered BPA at a dose 200 µg/kg from GD 6 to GD 18. Male and female mice were sacrificed on PND 84 and PND 87, respectively. Data were expressed as means ± SE (n = 12~24). Statistically significant difference between means from control group was analyzed by t-test. (*: p < 0.05)

Table 3.4. BPA 曝露による DNA メチル化影響の KEGG エンリッチメント解析

BPAexposed group > control exposed group								
NAME	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val	RANK AT MAX	
N-Glycan Biosynthesis	12	0.680	1.600	0.018	0.776	0.528		282
Fc Epsilon Ri Signaling Pathway	22	0.506	1.450	0.033	1.000	0.932		688
T Cell Receptor Signaling Pathway	28	0.509	1.443	0.060	1.000	0.952		564
Aminoacyl Trna Biosynthesis	8	0.634	1.397	0.066	1.000	0.981		380
Mtor Signaling Pathway	14	0.573	1.376	0.029	1.000	0.992		481
B Cell Receptor Signaling Pathway	24	0.479	1.336	0.100	1.000	0.998		469
Ubiquitin Mediated Proteolysis	25	0.473	1.317	0.137	1.000	0.998		944
Purine Metabolism	49	0.334	1.253	0.162	1.000	1		850
Viral Myocarditis	17	0.458	1.247	0.220	1.000	1		559
Tight Junction	45	0.365	1.235	0.156	1.000	1		834
Vasopressin Regulated Water Reabsorption	15	0.378	1.233	0.130	1.000	1		986
Type I Diabetes Mellitus	5	0.648	1.226	0.251	1.000	1		384
Glycerophospholipid Metabolism	20	0.434	1.221	0.194	1.000	1		676
O-Glycan Biosynthesis	11	0.503	1.221	0.249	0.966	1		921
Spliceosome	13	0.397	1.218	0.161	0.916	1		405
Circadian Rhythm Mammal	5	0.583	1.216	0.251	0.866	1		48
Ether Lipid Metabolism	9	0.528	1.193	0.266	0.908	1		676
Alanine Aspartate And Glutamate Metabolism	7	0.485	1.184	0.253	0.895	1		384
Leukocyte Transendothelial Migration	31	0.364	1.180	0.231	0.862	1		702
Snare Interactions In Vesicular Transport	10	0.521	1.170	0.298	0.860	1		269
Leishmania Infection	7	0.488	1.160	0.318	0.850	1		1001
Type II Diabetes Mellitus	16	0.392	1.158	0.272	0.820	1		1079
Glycerolipid Metabolism	14	0.421	1.137	0.293	0.852	1		666
Inositol Phosphate Metabolism	21	0.360	1.132	0.291	0.835	1		835
Taste Transduction	15	0.449	1.122	0.340	0.832	1		510
Fc Gamma R Mediated Phagocytosis	32	0.382	1.117	0.263	0.815	1		435
Dorso Ventral Axis Formation	9	0.484	1.113	0.293	0.797	1		180
Regulation Of Autophagy	7	0.484	1.101	0.358	0.806	1		474
Phosphatidylinositol Signaling System	30	0.350	1.099	0.284	0.783	1		781
Nicotinate And Nicotinamide Metabolism	6	0.467	1.090	0.377	0.781	1		620
Small Cell Lung Cancer	32	0.312	1.087	0.326	0.763	1		598
Calcium Signaling Pathway	64	0.261	1.083	0.268	0.752	1		510
Sphingolipid Metabolism	9	0.434	1.077	0.384	0.745	1		16
Acute Myeloid Leukemia	19	0.377	1.023	0.426	0.869	1		576
Progesterone Mediated Oocyte Maturation	24	0.349	1.017	0.452	0.861	1		758
Glycosphingolipid Biosynthesis Lacto And Neolacto Series	6	0.496	1.014	0.402	0.846	1		640
Rig I Like Receptor Signaling Pathway	10	0.408	1.008	0.464	0.839	1		1001
Peroxisome	16	0.390	0.964	0.511	0.933	1		530
Prostate Cancer	33	0.290	0.956	0.514	0.929	1		600
ErbB Signaling Pathway	31	0.311	0.952	0.514	0.915	1		631
Ppar Signaling Pathway	14	0.306	0.951	0.508	0.896	1		1089
Vibrio Cholerae Infection	14	0.376	0.936	0.558	0.910	1		510
Butanoate Metabolism	8	0.434	0.930	0.554	0.905	1		1097
Axon Guidance	56	0.239	0.925	0.589	0.896	1		616
Non Small Cell Lung Cancer	18	0.328	0.890	0.623	0.957	1		598
Chemokine Signaling Pathway	59	0.222	0.874	0.777	0.975	1		683
Thyroid Cancer	10	0.349	0.853	0.657	1.000	1		469
Complement And Coagulation Cascades	11	0.313	0.850	0.731	0.986	1		192
Cysteine And Methionine Metabolism	6	0.366	0.848	0.676	0.970	1		1244
Endometrial Cancer	18	0.306	0.846	0.675	0.956	1		469
Toll Like Receptor Signaling Pathway	19	0.277	0.835	0.708	0.960	1		469
Lysosome	41	0.243	0.829	0.788	0.955	1		449

Table 3.4 Continued

Vegf Signaling Pathway	26	0.293	0.826	0.712	0.941	1	688
Endocytosis	60	0.227	0.806	0.780	0.960	1	445
Jak Stat Signaling Pathway	26	0.249	0.791	0.870	0.970	1	435
Glioma	25	0.270	0.778	0.786	0.974	1	631
Long Term Potentiation	28	0.252	0.767	0.808	0.976	1	469
Citrate Cycle Tca Cycle	5	0.415	0.766	0.816	0.960	1	561
Homologous Recombination	7	0.341	0.749	0.803	0.969	1	84
Galactose Metabolism	7	0.314	0.736	0.774	0.972	1	1051
Insulin Signaling Pathway	38	0.218	0.735	0.920	0.957	1	755
Selenoamino Acid Metabolism	5	0.373	0.713	0.795	0.970	1	1232
Glycosphingolipid Biosynthesis Ganglio Series	6	0.356	0.712	0.807	0.956	1	2328
Glycosaminoglycan Degradation	8	0.302	0.671	0.889	0.981	1	351
Propanoate Metabolism	10	0.241	0.659	0.903	0.978	1	1060
Apoptosis	24	0.199	0.584	0.953	1.000	1	610
Primary Immunodeficiency	5	0.280	0.583	0.949	0.995	1	2600
Metabolism Of Xenobiotics By Cytochrome P450	8	0.283	0.572	0.895	0.985	1	512
Melanogenesis	41	0.170	0.564	0.992	0.974	1	790
Metabolism Of Xenobiotics By Cytochrome P450	8	0.261	0.539	0.945	0.983	1	552
<hr/>							
Control exposed group> BPA exposed group							
Histidine Metabolism	7	-0.758	-1.602	0.006	0.917	0.514	200
Alzheimers Disease	36	-0.436	-1.533	0.000	0.953	0.776	488
Dna Replication	6	-0.691	-1.433	0.088	1.000	0.956	707
Ecm Receptor Interaction	36	-0.445	-1.419	0.073	1.000	0.967	575
Fatty Acid Metabolism	5	-0.638	-1.415	0.067	1.000	0.968	211
Pancreatic Cancer	22	-0.471	-1.411	0.057	0.870	0.974	353
Nucleotide Excision Repair	8	-0.695	-1.372	0.078	0.957	0.989	821
Parkinsons Disease	14	-0.541	-1.340	0.109	1.000	0.997	537
Pathways In Cancer	112	-0.293	-1.291	0.088	1.000	1	353
Maturity Onset Diabetes Of The Young	6	-0.602	-1.282	0.106	1.000	1	55
Antigen Processing And Presentation	5	-0.557	-1.275	0.211	1.000	1	682
Arginine And Proline Metabolism	10	-0.645	-1.268	0.198	1.000	1	239
Porphyrin And Chlorophyll Metabolism	7	-0.531	-1.224	0.246	1.000	1	462
Arrhythmogenic Right Ventricular							
Cardiomyopathy Arvc	39	-0.352	-1.201	0.228	1.000	1	632
Bladder Cancer	12	-0.570	-1.198	0.278	1.000	1	353
Tyrosine Metabolism	5	-0.654	-1.198	0.236	1.000	1	537
Valine Leucine And Isoleucine Degradation	11	-0.401	-1.194	0.233	1.000	1	434
Wnt Signaling Pathway	53	-0.321	-1.169	0.186	1.000	1	891
Amyotrophic Lateral Sclerosis Als	19	-0.377	-1.162	0.230	1.000	1	324
Tgf Beta Signaling Pathway	15	-0.485	-1.159	0.281	1.000	1	867
Gap Junction	37	-0.358	-1.148	0.244	1.000	1	418
Basal Transcription Factors	7	-0.551	-1.147	0.289	0.977	1	701
Drug Metabolism Other Enzymes	7	-0.551	-1.147	0.306	0.936	1	667
Colorectal Cancer	21	-0.356	-1.141	0.271	0.914	1	1107
Prion Diseases	8	-0.509	-1.132	0.278	0.910	1	605
Oxidative Phosphorylation	11	-0.463	-1.131	0.286	0.879	1	759
Cell Cycle	23	-0.401	-1.111	0.318	0.915	1	271
P53 Signaling Pathway	17	-0.441	-1.109	0.340	0.889	1	152
Tryptophan Metabolism	7	-0.627	-1.102	0.386	0.876	1	311
Adipocytokine Signaling Pathway	19	-0.317	-1.101	0.305	0.850	1	211
Regulation Of Actin Cytoskeleton	75	-0.266	-1.100	0.252	0.824	1	353
Amino Sugar And Nucleotide Sugar Metabolism	9	-0.502	-1.096	0.353	0.812	1	381
Focal Adhesion	78	-0.272	-1.082	0.334	0.829	1	778
Mismatch Repair	5	-0.551	-1.076	0.410	0.822	1	707
Glutathione Metabolism	9	-0.470	-1.072	0.386	0.812	1	746
Cytokine Cytokine Receptor Interaction	44	-0.292	-1.048	0.365	0.856	1	1123

Table 3.4 Continued

Melanoma	23	-0.325	-1.031	0.416	0.885	1	353
Dilated Cardiomyopathy	45	-0.273	-1.028	0.419	0.869	1	219
Chronic Myeloid Leukemia	22	-0.348	-1.012	0.436	0.896	1	657
Vascular Smooth Muscle Contraction	43	-0.291	-0.995	0.455	0.921	1	605
Olfactory Transduction	8	-0.375	-0.994	0.482	0.901	1	1025
Notch Signaling Pathway	18	-0.338	-0.993	0.468	0.881	1	292
Basal Cell Carcinoma	20	-0.313	-0.991	0.472	0.867	1	692
Arachidonic Acid Metabolism	11	-0.406	-0.991	0.487	0.848	1	206
Hypertrophic Cardiomyopathy Hcm	39	-0.287	-0.984	0.531	0.845	1	219
Intestinal Immune Network For Iga Production	8	-0.398	-0.970	0.551	0.864	1	1115
Pathogenic Escherichia Coli Infection	9	-0.428	-0.960	0.519	0.869	1	196
Lysine Degradation	10	-0.381	-0.960	0.525	0.853	1	326
Hedgehog Signaling Pathway	19	-0.317	-0.957	0.568	0.841	1	800
Mapk Signaling Pathway	94	-0.215	-0.932	0.702	0.883	1	605
Natural Killer Cell Mediated Cytotoxicity	27	-0.304	-0.926	0.606	0.879	1	633
Long Term Depression	29	-0.281	-0.922	0.653	0.873	1	761
Pyrimidine Metabolism	21	-0.251	-0.905	0.588	0.896	1	511
Cardiac Muscle Contraction	18	-0.301	-0.894	0.638	0.905	1	962
Fructose And Mannose Metabolism	6	-0.412	-0.875	0.626	0.929	1	381
Oocyte Meiosis	28	-0.238	-0.844	0.674	0.981	1	433
Neurotrophin Signaling Pathway	42	-0.235	-0.842	0.705	0.967	1	771
Nod Like Receptor Signaling Pathway	5	-0.394	-0.841	0.651	0.953	1	910
Rna Degradation	15	-0.298	-0.833	0.773	0.951	1	634
Adherens Junction	39	-0.243	-0.832	0.695	0.937	1	632
Ribosome	5	-0.426	-0.826	0.697	0.934	1	194
Cytosolic Dna Sensing Pathway	5	-0.370	-0.822	0.688	0.926	1	847
Pyruvate Metabolism	11	-0.368	-0.818	0.701	0.919	1	809
Renal Cell Carcinoma	23	-0.242	-0.805	0.813	0.927	1	416
Cell Adhesion Molecules Cams	37	-0.208	-0.772	0.811	0.968	1	525
Gnrh Signaling Pathway	40	-0.236	-0.748	0.808	0.991	1	605
Huntingtons Disease	30	-0.248	-0.734	0.939	0.997	1	476
Systemic Lupus Erythematosus	10	-0.309	-0.732	0.776	0.985	1	636
Glycosaminoglycan Biosynthesis Heparan Sulfate	8	-0.336	-0.724	0.786	0.981	1	645
Beta Alanine Metabolism	7	-0.316	-0.708	0.793	0.987	1	200
Drug Metabolism Cytochrome P450	6	-0.370	-0.705	0.809	0.976	1	746
Abc Transporters	17	-0.203	-0.695	0.920	0.972	1	2884
Glycolysis Gluconeogenesis	14	-0.248	-0.694	0.886	0.960	1	612
Neuroactive Ligand Receptor Interaction	51	-0.171	-0.655	0.968	0.984	1	78
Hematopoietic Cell Lineage	16	-0.232	-0.646	0.910	0.977	1	44
Epithelial Cell Signaling In Helicobacter Pylori Infection	16	-0.235	-0.640	0.865	0.970	1	813
Aldosterone Regulated Sodium Reabsorption	10	-0.263	-0.632	0.920	0.963	1	353
One Carbon Pool By Folate	5	-0.342	-0.612	0.926	0.963	1	1086
Other Glycan Degradation	6	-0.237	-0.486	0.984	0.993	1	365

ES, enrichment score; NES, normalized enrichment score; NOM p-val, Nominal p value; FWER p-val, familywise-error rate

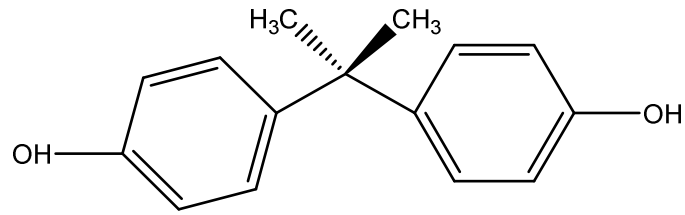


Fig. 3.1. BPA 化学構造

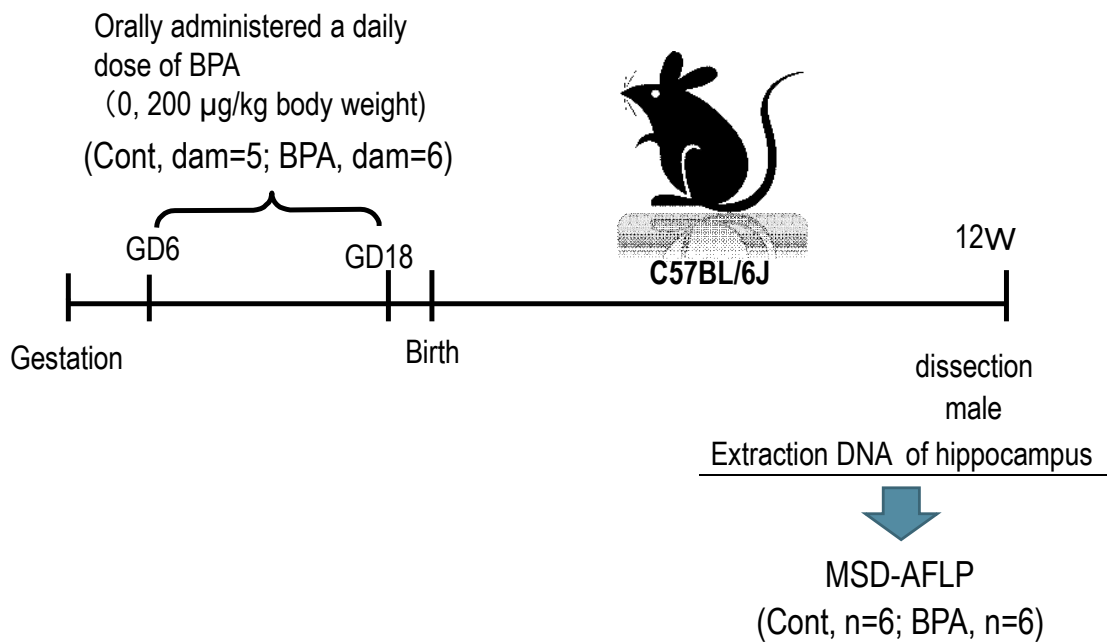


Fig. 3.2. BPA の胎生期曝露投与実験スケジュール

妊娠マウスに対し BPA を妊娠 6 日目より妊娠 18 日目までの 12 日間連日経口投与した。投与用量は BPA (0 µg/kg、200 µg/kg) を用いた。生後 84 日齢 (PND84) において雄産仔より海馬を剖出し、その DNA を MSD-AFLP 法により解析した。

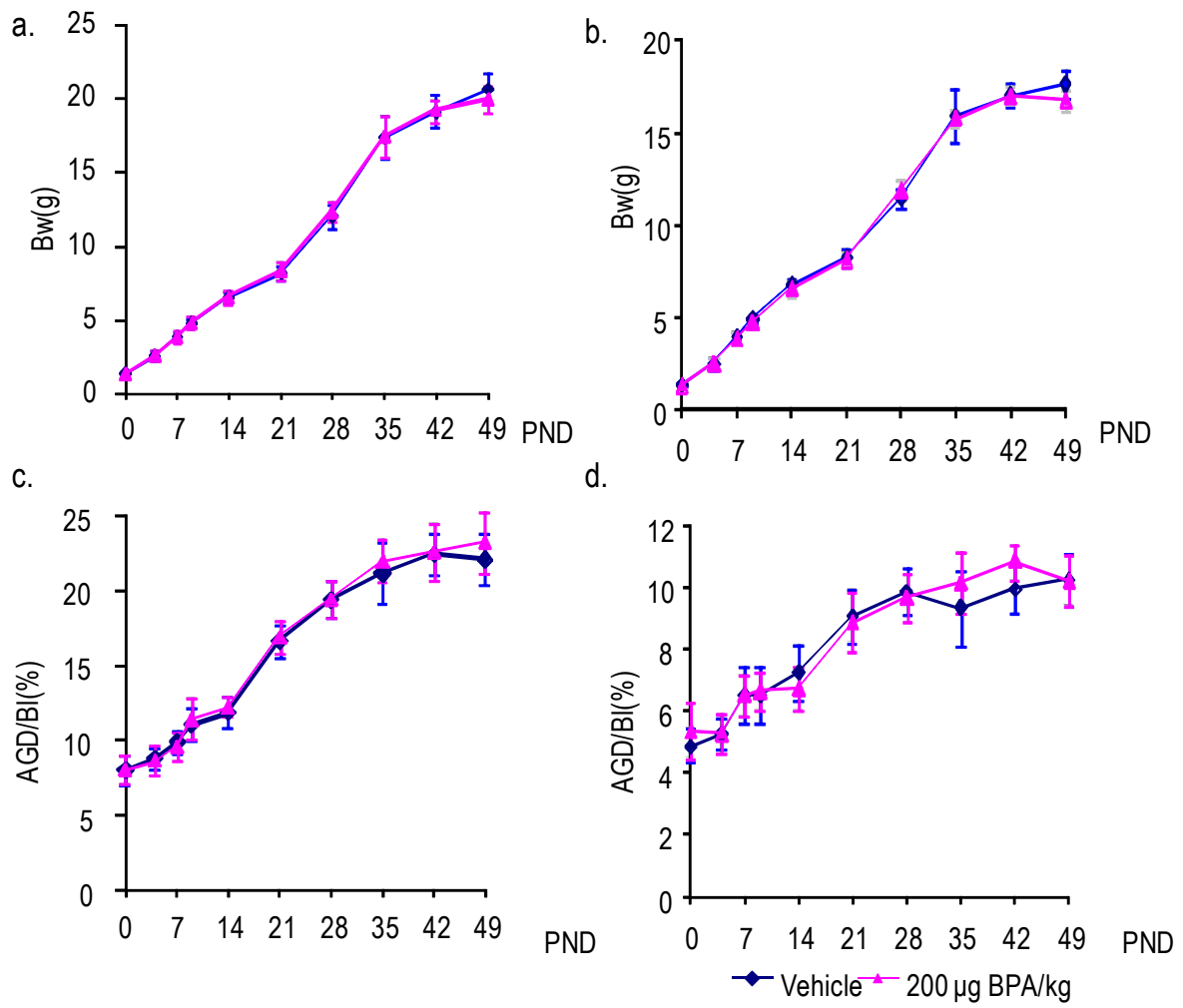


Fig. 3.3. 出生後の体重および肛門生殖突起間距離（AGD）の変化
a.雄の体重。b.雌の体重。c.雄の AGD/体長。d.雌の AGD/体長。

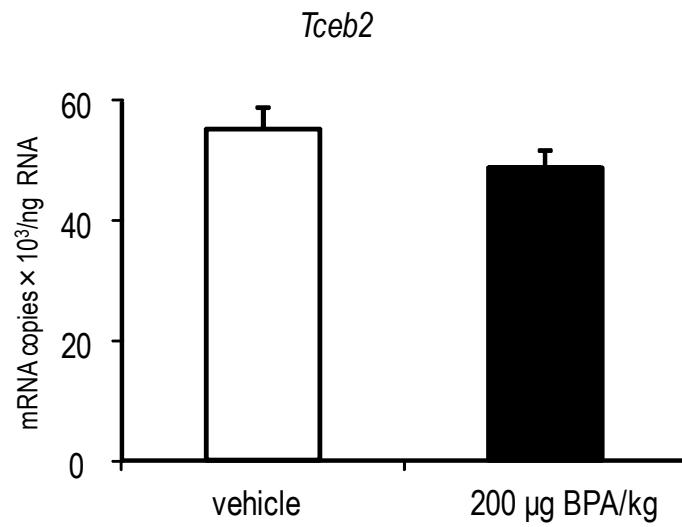
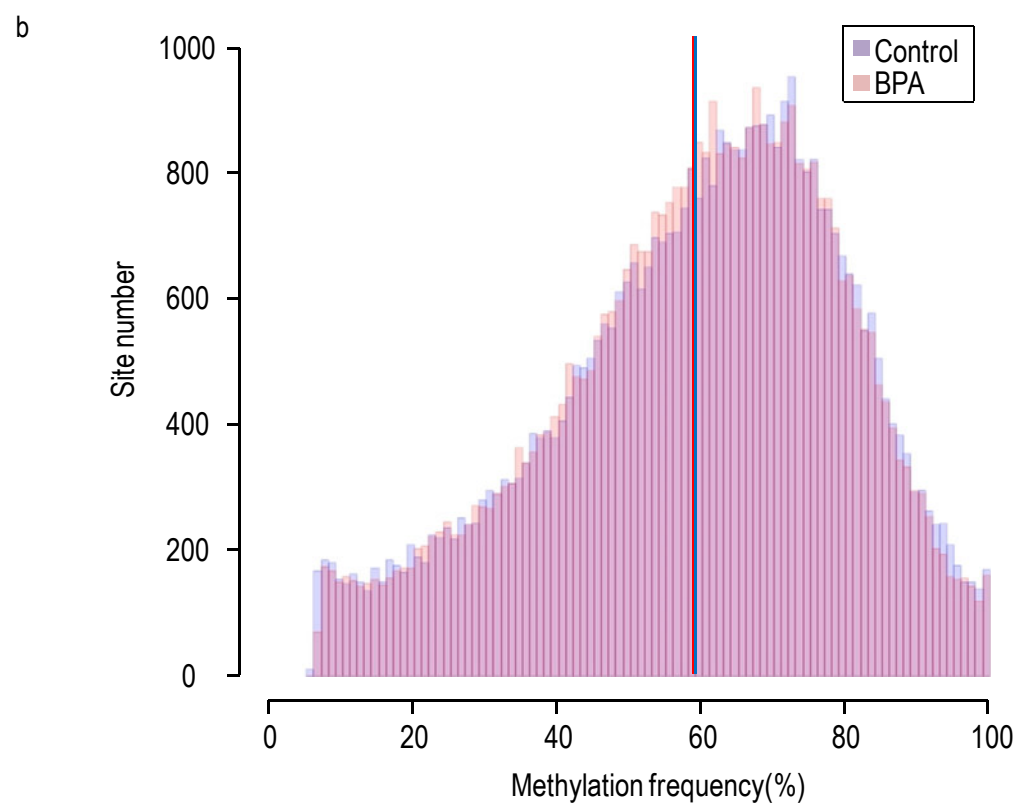
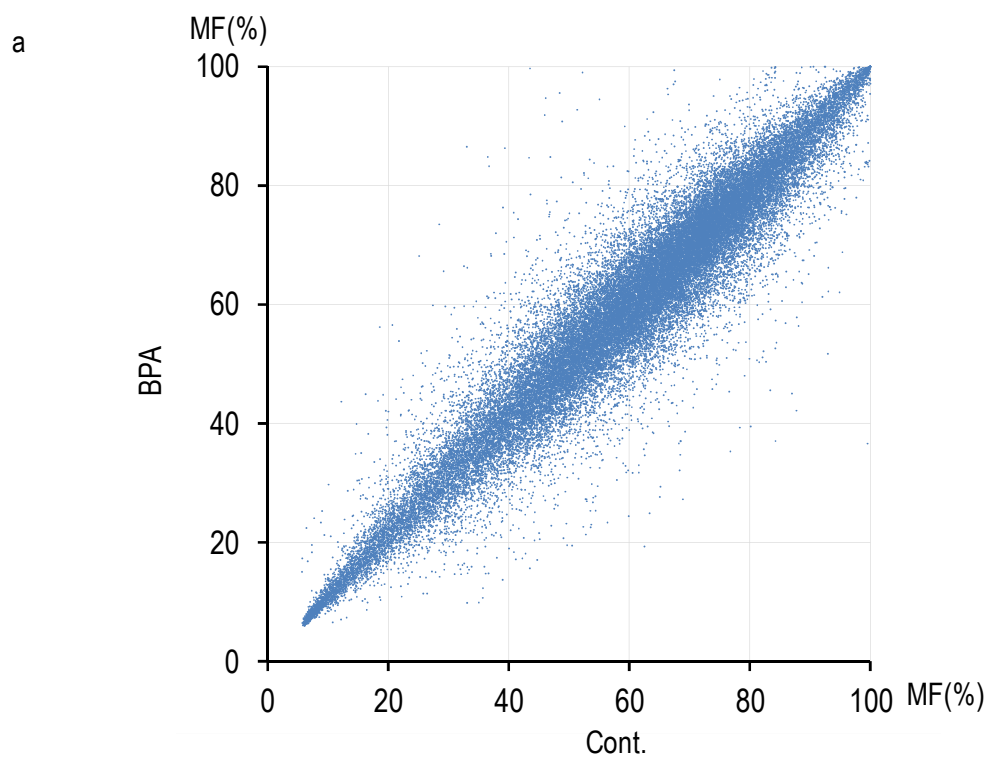


Fig. 3.4. BPA の胎生期曝露による海馬における *Tceb2* mRNA 発現レベル
PND84 のオスの海馬において、vehicle 投与群 (n=6) と BPA 200 μ g/kg 投与群 (n=6) の *Tceb2* mRNA 発現レベルを定量 RT-PCR で確認した。しかし、変化は検出できなかった。



次ページへ続く

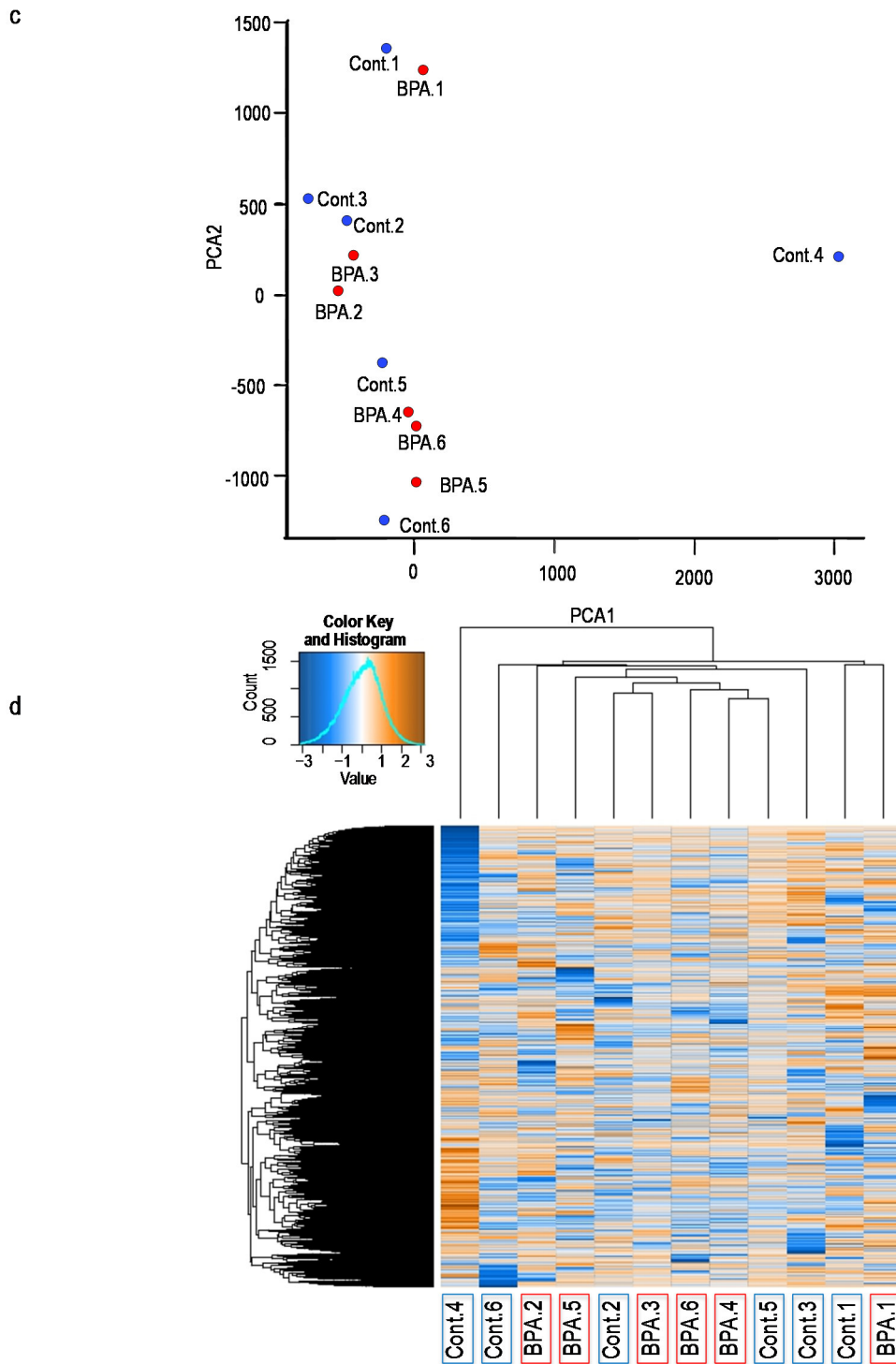


Fig. 3.5. MSD-AFLP 法によるメチル化解析

a. 対照群 (n=6) と BPA 処理群 (n=6) の MF 値の平均の散布図。b. 対照群と BPA 処理群のメチル化頻度のヒストグラム。青、赤のラインはそれぞれ青が対照群、赤が BPA 処理群の平均を示す。c. 対照群と BPA 処理群の主成分分析。青い点は対照群を、赤い点は BPA 処理群を示す。d. 対照群と BPA 処理群の階層クラスタリング。青枠は対照群を、赤枠は BPA 処理群を示す(n=12)。

総括

環境汚染化学物質などの胎生期曝露によって引き起こされるエピゲノム変化は、成熟後の疾患発症リスクにつながることを示唆されている。しかし、環境汚染化学物質曝露によって生じるようなエピゲノム変化は、微弱で個体間のバラツキも大きいと予想される。したがって、メチル化の小さな変動を検出できるような精度と感度が高く、多検体を同時処理できる比較的廉価なゲノムワイドな手法が必要とされている。

そこで、本研究では、メチル化 CpG のみを提示する methylated site display (MSD) 法を考案し、これを amplified fragment length polymorphism (AFLP) と組み合わせることで多検体を用いても比較的廉価に高感度かつゲノムワイドにメチル化頻度を検出できる解析法「MSD-AFLP 法」を開発した。さらに考案した MSD-AFLP 法の精度確認のため 3 種類の組織（海馬、腎臓、肝臓）を解析し、MSD-AFLP 法は CpG メチル化変動を高精度かつ高感度に検出できることが示された。

実際に、低用量でメチル化 CpG を変化させることがすでに多く報告されている環境化学物質である BPA にこの手法を適用した。しかし BPA 曝露マウスの海馬で有意な変動は確認できなかった。高精度かつ高感度な解析方法である MSD-AFLP 法で解析を行ったにも関わらず低用量 BPA 胎生期曝露によるメチル化変化は認められなかったことから、BPA による海馬エピゲノム変化は今回の条件では極めて少ないか、ほとんどないものと推定された。

今後、衛生学・環境毒性学上化学物質によるエピジェネティック変化を検討する上でも、本論文で開発した MSD-AFLP 法は有効となると考えられる。また、がん幹

細胞の DNA メチル化変化など発がんにおけるエピジェネティックマーカーの探索などに応用できると思われる。

引用文献

1. Wu C, Morris JR. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science* 2001;293:1103-5.
2. Walsh CP, Chaillet JR, Bestor TH. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet* 1998;20:116-7.
3. Prendergast GC, Ziff EB. Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region. *Science* 1991;251:186-9.
4. Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998;393:386-9.
5. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 1998;19:187-91.
6. Oka D, Yamashita S, Tomioka T, Nakanishi Y, Kato H, Kaminishi M, Ushijima T. The presence of aberrant DNA methylation in noncancerous esophageal mucosae in association with smoking history: a target for risk diagnosis and prevention of esophageal cancers. *Cancer* 2009;115:3412-26.
7. Lei H, Oh SP, Okano M, Juttermann R, Goss KA, Jaenisch R, Li E. De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development* 1996;122:3195-205.
8. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999;99:247-57.

9. Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1986;1:1077-81.
10. Barker DJ, Osmond C, Law CM. The intrauterine and early postnatal origins of cardiovascular disease and chronic bronchitis. *J Epidemiol Community Health* 1989;43:237-40.
11. Osmond C, Barker DJ, Slattery JM. Risk of death from cardiovascular disease and chronic bronchitis determined by place of birth in England and Wales. *J Epidemiol Community Health* 1990;44:139-41.
12. Barker DJ, Eriksson JG, Forsen T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol* 2002;31:1235-9.
13. Barker DJ, Martyn CN, Osmond C, Hales CN, Fall CH. Growth in utero and serum cholesterol concentrations in adult life. *Bmj* 1993;307:1524-7.
14. Barker DJ. The fetal and infant origins of disease. *Eur J Clin Invest* 1995;25:457-63.
15. Gluckman PD, Hanson MA. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science* 2004;305:1733-6.
16. Sinclair KD, Lea RG, Rees WD, Young LE. The developmental origins of health and disease: current theories and epigenetic mechanisms. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007;64:425-43.
17. Gillman MW, Barker D, Bier D, Cagampang F, Challis J, Fall C, Godfrey K, Gluckman P, Hanson M, Kuh D, Nathanielsz P, Nestel P, Thornburg KL. Meeting report on the 3rd International Congress on Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD). *Pediatr Res* 2007;61:625-9.

18. Waterland RA, Michels KB. Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. *Annu Rev Nutr* 2007;27:363-88.
19. Poirier LA. The effects of diet, genetics and chemicals on toxicity and aberrant DNA methylation: an introduction. *J Nutr* 2002;132:2336S-2339S.
20. Braun JM, Kahn RS, Froehlich T, Auinger P, Lanphear BP. Exposures to environmental toxicants and attention deficit hyperactivity disorder in U.S. children. *Environ Health Perspect* 2006;114:1904-9.
21. Peden DB. Development of atopy and asthma: candidate environmental influences and important periods of exposure. *Environ Health Perspect* 2000;108 Suppl 3:475-82.
22. Sorensen N, Murata K, Budtz-Jorgensen E, Weihe P, Grandjean P. Prenatal methylmercury exposure as a cardiovascular risk factor at seven years of age. *Epidemiology* 1999;10:370-5.
23. Bouchard MF, Bellinger DC, Wright RO, Weisskopf MG. Attention-deficit/hyperactivity disorder and urinary metabolites of organophosphate pesticides. *Pediatrics* 2010;125:e1270-7.
24. Li YF, Langholz B, Salam MT, Gilliland FD. Maternal and grandmaternal smoking patterns are associated with early childhood asthma. *Chest* 2005;127:1232-41.
25. Bandiera FC, Richardson AK, Lee DJ, He JP, Merikangas KR. Secondhand smoke exposure and mental health among children and adolescents. *Archives of pediatrics & adolescent medicine* 2011;165:332-8.
26. (NIH) NIOH. National Children's Study
27. Kim BM, Ha M, Park HS, Lee BE, Kim YJ, Hong YC, Kim Y, Chang N, Roh YM, Kim BN, Oh SY, Ha EH. The Mothers and Children's Environmental Health (MOCEH) study. *European journal of epidemiology* 2009;24:573-83.

28. Commission E. OBELIX (OBesogenic Endocrine disrupting chemicals: LInking prenatal eXposure to the development of obesity later in life) .
29. Onishchenko N, Karpova N, Sabri F, Castren E, Ceccatelli S. Long-lasting depression-like behavior and epigenetic changes of BDNF gene expression induced by perinatal exposure to methylmercury. *J Neurochem* 2008;106:1378-87.
30. Li S, Washburn KA, Moore R, Uno T, Teng C, Newbold RR, McLachlan JA, Negishi M. Developmental exposure to diethylstilbestrol elicits demethylation of estrogen-responsive lactoferrin gene in mouse uterus. *Cancer Res* 1997;57:4356-9.
31. Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 2005;308:1466-9.
32. Inawaka K, Kawabe M, Takahashi S, Doi Y, Tomigahara Y, Tarui H, Abe J, Kawamura S, Shirai T. Maternal exposure to anti-androgenic compounds, vinclozolin, flutamide and procymidone, has no effects on spermatogenesis and DNA methylation in male rats of subsequent generations. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;237:178-87.
33. Ho SM, Tang WY, Belmonte de Frausto J, Prins GS. Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Res* 2006;66:5624-32.
34. Dolinoy DC, Huang D, Jirtle RL. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:13056-61.
35. Yaoi T, Itoh K, Nakamura K, Ogi H, Fujiwara Y, Fushiki S. Genome-wide analysis of epigenomic alterations in fetal mouse forebrain after exposure to low doses of bisphenol A. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;376:563-7.

36. Hou L, Zhang X, Wang D, Baccarelli A. Environmental chemical exposures and human epigenetics. *International journal of epidemiology* 2012;41:79-105.
37. Y. Hayashizaki HS, S. Hirotsune, H. Sugino, Y. Okazaki, N. Sasaki, K. Hirose, H. Imoto, H. Okuizumi, M. Muramatsu, H. Komatsubara, T. Shiroishi, K. Moriwaki, M. Katsuki, N. Hatano, H. Sasaki, T. Ueda, N. Mise, N. Takagi, C. Plass & V.M. Chapman. Identification of an imprinted U2af binding protein related sequence on mouse chromosome 11 using the RLGS method. *Nat Genet* 1994;6:33-40.
38. Ando Y, Hayashizaki Y. Restriction landmark genomic scanning. *Nat Protoc* 2006;1:2774-83.
39. Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, Feramisco JD, Peltomaki P, Lang JC, Schuller DE, Yu L, Bloomfield CD, Caligiuri MA, Yates A, Nishikawa R, Su Huang H, Petrelli NJ, Zhang X, O'Dorisio MS, Held WA, Cavenee WK, Plass C. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nature genetics* 2000;24:132-8.
40. Kawai J, Hirotsune S, Hirose K, Fushiki S, Watanabe S, Hayashizaki Y. Methylation profiles of genomic DNA of mouse developmental brain detected by restriction landmark genomic scanning (RLGS) method. *Nucleic acids research* 1993;21:5604-8.
41. Song F, Smith JF, Kimura MT, Morrow AD, Matsuyama T, Nagase H, Held WA. Association of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) with differential gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102:3336-41.
42. Allegrucci C, Wu YZ, Thurston A, Denning CN, Priddle H, Mummery CL, Ward-van Oostwaard D, Andrews PW, Stojkovic M, Smith N, Parkin T, Jones ME, Warren G, Yu L, Brena RM, Plass C, Young LE. Restriction landmark genome scanning identifies

- culture-induced DNA methylation instability in the human embryonic stem cell epigenome. *Human molecular genetics* 2007;16:1253-68.
43. Khulan B, Thompson RF, Ye K, Fazzari MJ, Suzuki M, Stasiak E, Figueroa ME, Glass JL, Chen Q, Montagna C, Hatchwell E, Selzer RR, Richmond TA, Green RD, Melnick A, Grealley JM. Comparative isoschizomer profiling of cytosine methylation: the HELP assay. *Genome Res* 2006;16:1046-55.
 44. Figueroa ME, Melnick A, Grealley JM. Genome-wide determination of DNA methylation by Hpa II tiny fragment enrichment by ligation-mediated PCR (HELP) for the study of acute leukemias. *Methods Mol Biol* 2009;538:395-407.
 45. Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL, Schubeler D. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet* 2005;37:853-62.
 46. Wilson IM, Davies JJ, Weber M, Brown CJ, Alvarez CE, MacAulay C, Schubeler D, Lam WL. Epigenomics: mapping the methylome. *Cell Cycle* 2006;5:155-8.
 47. Tomazou EM, Rakyan VK, Lefebvre G, Andrews R, Ellis P, Jackson DK, Langford C, Francis MD, Backdahl L, Miretti M, Coghill P, Ottaviani D, Sheer D, Murrell A, Beck S. Generation of a genomic tiling array of the human major histocompatibility complex (MHC) and its application for DNA methylation analysis. *BMC Med Genomics* 2008;1:19.
 48. Vucic EA, Wilson IM, Campbell JM, Lam WL. Methylation analysis by DNA immunoprecipitation (MeDIP). *Methods Mol Biol* 2009;556:141-53.
 49. Miura F, Enomoto Y, Dairiki R, Ito T. Amplification-free whole-genome bisulfite sequencing by post-bisulfite adaptor tagging. *Nucleic Acids Res* 2012.

50. Gonzalgo ML, Liang G, Spruck CH, 3rd, Zingg JM, Rideout WM, 3rd, Jones PA. Identification and characterization of differentially methylated regions of genomic DNA by methylation-sensitive arbitrarily primed PCR. *Cancer Res* 1997;57:594-9.
51. Liang G, Salem CE, Yu MC, Nguyen HD, Gonzales FA, Nguyen TT, Nichols PW, Jones PA. DNA methylation differences associated with tumor tissues identified by genome scanning analysis. *Genomics* 1998;53:260-8.
52. Hatada I, Kato A, Morita S, Obata Y, Nagaoka K, Sakurada A, Sato M, Horii A, Tsujimoto A, Matsubara K. A microarray-based method for detecting methylated loci. *J Hum Genet* 2002;47:448-51.
53. Estecio MR, Yan PS, Huang TH, Issa JP. Methylated CpG Island Amplification and Microarray (MCAM) for High-Throughput Analysis of DNA Methylation. *CSH Protoc* 2008;2008:pdb prot4974.
54. Hatada I, Fukasawa M, Kimura M, Morita S, Yamada K, Yoshikawa T, Yamanaka S, Endo C, Sakurada A, Sato M, Kondo T, Horii A, Ushijima T, Sasaki H. Genome-wide profiling of promoter methylation in human. *Oncogene* 2006;25:3059-64.
55. Rauch T, Li H, Wu X, Pfeifer GP. MIRA-assisted microarray analysis, a new technology for the determination of DNA methylation patterns, identifies frequent methylation of homeodomain-containing genes in lung cancer cells. *Cancer research* 2006;66:7939-47.
56. Bibikova M, Le J, Barnes B, Saedinia-Melnyk S, Zhou L, Shen R, Gunderson KL. Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium(R) assay. *Epigenomics* 2009;1:177-200.

57. Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, Delano D, Zhang L, Schroth GP, Gunderson KL, Fan JB, Shen R. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics* 2011;98:288-95.
58. Harris EY, Ponts N, Levchuk A, Roch KL, Lonardi S. BRAT: bisulfite-treated reads analysis tool. *Bioinformatics* 2010;26:572-3.
59. Warnecke PM, Stirzaker C, Melki JR, Millar DS, Paul CL, Clark SJ. Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA. *Nucleic Acids Res* 1997;25:4422-6.
60. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 2009;10:57-63.
61. Meissner A, Gnirke A, Bell GW, Ramsahoye B, Lander ES, Jaenisch R. Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res* 2005;33:5868-77.
62. Gu H, Smith ZD, Bock C, Boyle P, Gnirke A, Meissner A. Preparation of reduced representation bisulfite sequencing libraries for genome-scale DNA methylation profiling. *Nat Protoc* 2011;6:468-81.
63. Zeschnigk M, Martin M, Betzl G, Kalbe A, Sirsch C, Buiting K, Gross S, Fritzilas E, Frey B, Rahmann S, Horsthemke B. Massive parallel bisulfite sequencing of CG-rich DNA fragments reveals that methylation of many X-chromosomal CpG islands in female blood DNA is incomplete. *Hum Mol Genet* 2009;18:1439-48.
64. Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, Constantinidou C, Gharbia SE, Wain J, Pallen MJ. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol* 2012;30:434-9.

65. Pomraning KR, Smith KM, Freitag M. Genome-wide high throughput analysis of DNA methylation in eukaryotes. *Methods* 2009;47:142-50.
66. Brinkman AB, Simmer F, Ma K, Kaan A, Zhu J, Stunnenberg HG. Whole-genome DNA methylation profiling using MethylCap-seq. *Methods* 2010;52:232-6.
67. Brunner AL, Johnson DS, Kim SW, Valouev A, Reddy TE, Neff NF, Anton E, Medina C, Nguyen L, Chiao E, Oyolu CB, Schroth GP, Absher DM, Baker JC, Myers RM. Distinct DNA methylation patterns characterize differentiated human embryonic stem cells and developing human fetal liver. *Genome Res* 2009;19:1044-56.
68. Suzuki M, Jing Q, Lia D, Pascual M, McLellan A, Grealley JM. Optimized design and data analysis of tag-based cytosine methylation assays. *Genome Biol* 2010;11:R36.
69. Wang L, Sun J, Wu H, Liu S, Wang J, Wu B, Huang S, Li N, Wang J, Zhang X. Systematic assessment of reduced representation bisulfite sequencing to human blood samples: A promising method for large-sample-scale epigenomic studies. *J Biotechnol* 2011;157:1-6.
70. Melnikov AA, Gartenhaus RB, Levenson AS, Motchoulskaia NA, Levenson Chernokhvostov VV. MSRE-PCR for analysis of gene-specific DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2005;33:e93.
71. McClelland M, Mathieu-Daude F, Welsh J. RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR. *Trends Genet* 1995;11:242-6.
72. Y. Kasama KK, R Araki,M.Abe. HiCEP ho detakaishekinokohdoka • kouritukanotamenokaiseiki sofutoea HiAL no kaihatu(inJapanese). *NIRS Technolog* 2012;6:100-106.

73. Benjamini YaH, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. Volume 57: Journal of The Royal Statistical Society Series B-statistical Methodology 1995: 289-300.
74. Song F, Smith JF, Kimura MT, Morrow AD, Matsuyama T, Nagase H, Held WA. Association of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) with differential gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:3336-41.
75. Kitamura E, Igarashi J, Morohashi A, Hida N, Oinuma T, Nemoto N, Song F, Ghosh S, Held WA, Yoshida-Noro C, Nagase H. Analysis of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) in humans. Genomics 2007;89:326-37.
76. Wong NC, Ng J, Hall NE, Lunke S, Salmanidis M, Brumatti G, Ekert PG, Craig JM, Saffery R. Exploring the utility of human DNA methylation arrays for profiling mouse genomic DNA. Genomics 2013;102:38-46.
77. Schroeder DI, Blair JD, Lott P, Yu HO, Hong D, Crary F, Ashwood P, Walker C, Korf I, Robinson WP, LaSalle JM. The human placenta methylome. Proc Natl Acad Sci U S A 2013;110:6037-42.
78. Powell C, Grant AR, Cornblath E, Goldman D. Analysis of DNA methylation reveals a partial reprogramming of the Muller glia genome during retina regeneration. Proc Natl Acad Sci U S A 2013;110:19814-9.
79. Trimarchi MP, Murphy M, Frankhouser D, Rodriguez BA, Curfman J, Marcucci G, Yan P, Bundschuh R. Enrichment-based DNA methylation analysis using next-generation sequencing: sample exclusion, estimating changes in global methylation, and the contribution of replicate lanes. BMC Genomics 2012;13 Suppl 8:S6.

80. Jang YJ, Park HR, Kim TH, Yang WJ, Lee JJ, Choi SY, Oh SB, Lee E, Park JH, Kim HP, Kim HS, Lee J. High dose bisphenol A impairs hippocampal neurogenesis in female mice across generations. *Toxicology* 2012;296:73-82.
81. Diaz A, Park K, Lim DA, Song JS. Normalization, bias correction, and peak calling for ChIP-seq. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2012;11:Article 9.
82. Harony-Nicolas H, Mamrut S, Brodsky L, Shahar-Gold H, Barki-Harrington L, Wagner S. Brain region-specific methylation in the promoter of the murine oxytocin receptor gene is involved in its expression regulation. *Psychoneuroendocrinology* 2014;39:121-31.
83. Gupta R, Nagarajan A, Wajapeyee N. Advances in genome-wide DNA methylation analysis. *Biotechniques* 2010;49:iii-xi.
84. Thomas RK, Nickerson E, Simons JF, Janne PA, Tengs T, Yuza Y, Garraway LA, LaFramboise T, Lee JC, Shah K, O'Neill K, Sasaki H, Lindeman N, Wong KK, Borras AM, Gutmann EJ, Dragnev KH, DeBiasi R, Chen TH, Glatt KA, Greulich H, Desany B, Lubeski CK, Brockman W, Alvarez P, Hutchison SK, Leamon JH, Ronan MT, Turenchalk GS, Egholm M, Sellers WR, Rothberg JM, Meyerson M. Sensitive mutation detection in heterogeneous cancer specimens by massively parallel picoliter reactor sequencing. *Nat Med* 2006;12:852-5.
85. Reijans M, Lascaris R, Groeneger AO, Wittenberg A, Wesselink E, van Oeveren J, de Wit E, Boorsma A, Voetdijk B, van der Spek H, Grivell LA, Simons G. Quantitative comparison of cDNA-AFLP, microarrays, and GeneChip expression data in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genomics* 2003;82:606-18.

86. Iwamoto K, Bundo M, Ueda J, Oldham MC, Ukai W, Hashimoto E, Saito T, Geschwind DH, Kato T. Neurons show distinctive DNA methylation profile and higher interindividual variations compared with non-neurons. *Genome Res* 2011;21:688-96.
87. Farkas SA, Milutin-Gasperov N, Grce M, Nilsson TK. Genome-wide DNA methylation assay reveals novel candidate biomarker genes in cervical cancer. *Epigenetics* 2013;8.
88. Sato T, Arai E, Kohno T, Tsuta K, Watanabe S, Soejima K, Betsuyaku T, Kanai Y. DNA methylation profiles at precancerous stages associated with recurrence of lung adenocarcinoma. *PLoS One* 2013;8:e59444.
89. Ueno H, Okita H, Akimoto S, Kobayashi K, Nakabayashi K, Hata K, Fujimoto J, Hata J, Fukuzawa M, Kiyokawa N. DNA methylation profile distinguishes clear cell sarcoma of the kidney from other pediatric renal tumors. *PLoS One* 2013;8:e62233.
90. Xu E, Gu J, Hawk ET, Wang KK, Lai M, Huang M, Ajani J, Wu X. Genome-wide methylation analysis shows similar patterns in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 2013;34:2750-6.
91. Ehrlich M. DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics* 2009;1:239-59.
92. Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature medicine* 2011;17:313-9.
93. Takeishi S, Matsumoto A, Onoyama I, Naka K, Hirao A, Nakayama KI. Ablation of Fbxw7 eliminates leukemia-initiating cells by preventing quiescence. *Cancer cell* 2013;23:347-61.
94. Nagano O, Okazaki S, Saya H. Redox regulation in stem-like cancer cells by CD44 variant isoforms. *Oncogene* 2013;32:5191-8.
95. Nakanishi Y, Seno H, Fukuoka A, Ueo T, Yamaga Y, Maruno T, Nakanishi N, Kanda K, Komekado H, Kawada M, Isomura A, Kawada K, Sakai Y, Yanagita M, Kageyama

- R, Kawaguchi Y, Taketo MM, Yonehara S, Chiba T. Dclk1 distinguishes between tumor and normal stem cells in the intestine. *Nature genetics* 2013;45:98-103.
96. Balic M, Schwarzenbacher D, Stanzer S, Heitzer E, Auer M, Geigl JB, Cote RJ, Datar RH, Dandachi N. Genetic and epigenetic analysis of putative breast cancer stem cell models. *BMC Cancer* 2013;13:358.
97. Cho RW, Clarke MF. Recent advances in cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 2008;18:48-53.
98. Lee EJ, Luo J, Wilson JM, Shi H. Analyzing the cancer methylome through targeted bisulfite sequencing. *Cancer Lett* 2013;340:171-8.
99. Ministry of Economy TI. Results of the Regional Economic and Industrial Research 2013.
100. (EFSA) Efsa. ENDORSED FOR PUBLIC CONSULTATION DRAFT SCIENTIFIC OPINION. DRAFT Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs – Part: exposure assessment EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF), 2013.
101. (FDA) TUSFaDA. Update on Bisphenol A (BPA) for Use in Food Contact Applications. 2013.
102. Canada H. Health Canada,s Updated Assessment of Bisphenol A(BPA) Exposure from Food sources, 2012.
103. ANSES. Health effects report. 2011.
104. Yokota H, Iwano H, Endo M, Kobayashi T, Inoue H, Ikushiro S, Yuasa A. Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem J* 1999;340 (Pt 2):405-9.

105. Volkel W, Colnot T, Csanady GA, Filser JG, Dekant W. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* 2002;15:1281-7.
106. Kurebayashi H, Harada R, Stewart RK, Numata H, Ohno Y. Disposition of a low dose of bisphenol a in male and female cynomolgus monkeys. *Toxicol Sci* 2002;68:32-42.
107. Pottenger LH, Domoradzki JY, Markham DA, Hansen SC, Cagen SZ, Waechter JM, Jr. The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicol Sci* 2000;54:3-18.
108. Feldman D, Stathis PA, Hirst MA, Stover EP, Do YS. *Saccharomyces cerevisiae* produces a yeast substance that exhibits estrogenic activity in mammalian systems. *Science* 1984;224:1109-11.
109. Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, Tokes L, Feldman D. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 1993;132:2279-86.
110. vom Saal FS, Cooke PS, Buchanan DL, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, Parmigiani S, Welshons WV. A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol Ind Health* 1998;14:239-60.
111. Nagel SC, vom Saal FS, Thayer KA, Dhar MG, Boechler M, Welshons WV. Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ Health Perspect* 1997;105:70-6.

112. National Toxicology Program UDoHaHS. NTP-CHRHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Bisphenol-A. Volume No.08-5994, 2008.
113. Sakaue M, Ohsako, S, Ishimura, R, Kurosawa, S, Kurohmaru, M, Hayashi, Y, Aoki, Y, Yonemoto, J, and Tohyama C. Bisphenol-A affects spermatogenesis in the adult rat even at a low dose. *J , Occupational Health* 2001;43:185-190.
114. Ashby J, Tinwell H, Haseman J. Lack of effects for low dose levels of bisphenol A and diethylstilbestrol on the prostate gland of CF1 mice exposed in utero. *Regul Toxicol Pharmacol* 1999;30:156-66.
115. Cagen SZ, Waechter JM, Jr., Dimond SS, Breslin WJ, Butala JH, Jekat FW, Joiner RL, Shiotsuka RN, Veenstra GE, Harris LR. Normal reproductive organ development in CF-1 mice following prenatal exposure to bisphenol A. *Toxicol Sci* 1999;50:36-44.
116. Ashby J, Tinwell H, Lefevre PA, Joiner R, Haseman J. The effect on sperm production in adult Sprague-Dawley rats exposed by gavage to bisphenol A between postnatal days 91-97. *Toxicol Sci* 2003;74:129-38.
117. Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Thomas BF, Keimowitz AR, Brine DR, Veselica MM, Fail PA, Chang TY, Seely JC, Joiner RL, Butala JH, Dimond SS, Cagen SZ, Shiotsuka RN, Stropp GD, Waechter JM. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* 2002;68:121-46.
118. Ema M, Fujii S, Furukawa M, Kiguchi M, Ikka T, Harazono A. Rat two-generation reproductive toxicity study of bisphenol A. *Reprod Toxicol* 2001;15:505-23.
119. Ashby J, Tinwell H, Odum J, Lefevre P. Natural variability and the influence of concurrent control values on the detection and interpretation of low-dose or weak endocrine toxicities. *Environ Health Perspect* 2004;112:847-53.

120. Elswick BA, Miller FJ, Welsch F. Comments to the editor concerning the paper entitled "Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals" by C. Gupta. *Exp Biol Med* (Maywood) 2001;226:74-5; discussion 76-7.
121. Times ML, Reickert CA. Functional anorectal disorders. *Clin Colon Rectal Surg* 2005;18:109-15.
122. vom Saal FS, Welshons WV. Large effects from small exposures. II. The importance of positive controls in low-dose research on bisphenol A. *Environ Res* 2006;100:50-76.
123. Miyagawa K, Narita M, Narita M, Akama H, Suzuki T. Memory impairment associated with a dysfunction of the hippocampal cholinergic system induced by prenatal and neonatal exposures to bisphenol-A. *Neuroscience Letters* 2007;418:236-241.
124. Suzuki T, Mizuo K, Nakazawa H, Funae Y, Fushiki S, Fukushima S, Shirai T, Narita M. Prenatal and neonatal exposure to bisphenol-a enhances the central dopamine d1 receptor-mediated action in mice: enhancement of the methamphetamine-induced abuse state. *Neuroscience* 2003;117:639-644.
125. Fujimoto T, Kubo K, Aou S. Prenatal exposure to bisphenol A impairs sexual differentiation of exploratory behavior and increases depression-like behavior in rats. *Brain Res* 2006;1068:49-55.
126. Rubin BS, Lenkowski JR, Schaeberle CM, Vandenberg LN, Ronsheim PM, Soto AM. Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. *Endocrinology* 2006;147:3681-91.
127. Ishido M, Yonemoto J, Morita M. Mesencephalic neurodegeneration in the orally administered bisphenol A-caused hyperactive rats. *Toxicol Lett* 2007;173:66-72.

128. Leranath C, Hajszan T, Szigeti-Buck K, Bober J, MacLusky NJ. Bisphenol A prevents the synaptogenic response to estradiol in hippocampus and prefrontal cortex of ovariectomized nonhuman primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105:14187-91.
129. Leranath C, Szigeti-Buck K, Maclusky NJ, Hajszan T. Bisphenol A prevents the synaptogenic response to testosterone in the brain of adult male rats. *Endocrinology* 2008;149:988-94.
130. Canada E. PROPOSED RISK MANAGEMENT APPROACH: Phenol, 4,4'-(1-Methylethylidene)bis- (Bisphenol A). 2008.
131. Braniste V, Jouault A, Gaultier E, Polizzi A, Buisson-Brenac C, Leveque M, Martin PG, Theodorou V, Fioramonti J, Houdeau E. Impact of oral bisphenol A at reference doses on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:448-53.
132. (Inserm) Indlsedlrm. Reproduction et environnement. : Expertise collective. Inserm,, 2011.
133. Kim JH, Rozek LS, Soliman AS, Sartor MA, Hablas A, Seifeldin IA, Colacino JA, Weinhouse C, Nahar MS, Dolinoy DC. Bisphenol A-associated epigenomic changes in prepubescent girls: a cross-sectional study in Gharbiah, Egypt. *Environ Health* 2013;12:33.
134. Haugen AC, Schug TT, Collman G, Heindel JJ. Evolution of DOHaD: the impact of environmental health sciences. *Journal of developmental origins of health and disease* 2014:1-10.
135. Jung SH, Jang W. How accurately can we control the FDR in analyzing microarray data? *Bioinformatics* 2006;22:1730-6.

136. Huang W, Umbach DM, Vincent Jordan N, Abell AN, Johnson GL, Li L. Efficiently identifying genome-wide changes with next-generation sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2011;39:e130.
137. Ho SM, Tang WY. Techniques used in studies of epigenome dysregulation due to aberrant DNA methylation: an emphasis on fetal-based adult diseases. *Reprod Toxicol* 2007;23:267-82.
138. Ichihara T, Yoshino H, Imai N, Tsutsumi T, Kawabe M, Tamano S, Inaguma S, Suzuki S, Shirai T. Lack of carcinogenic risk in the prostate with transplacental and lactational exposure to bisphenol A in rats. *J Toxicol Sci* 2003;28:165-71.
139. Snyder RW, Maness SC, Gaido KW, Welsch F, Sumner SC, Fennell TR. Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000;168:225-34.
140. Tang WY, Morey LM, Cheung YY, Birch L, Prins GS, Ho SM. Neonatal exposure to estradiol/bisphenol A alters promoter methylation and expression of *Nsbp1* and *Hpcal1* genes and transcriptional programs of *Dnmt3a/b* and *Mbd2/4* in the rat prostate gland throughout life. *Endocrinology* 2012;153:42-55.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、親身にご指導頂きました大迫誠一郎准教授そして放射線医学総合研究所齋藤俊行先生に心から感謝を申し上げます。また、本研究のエンリッチメント解析に際し、京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) の丸山徹氏に解析のご支援頂きましたことを感謝いたします。そして本研究の遂行に際し、東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター健康環境医工学部門及び放射線医学総合研究所の皆様、ご協力を承りましたことを感謝いたします。最後に、多大なご指導、ご鞭撻を賜りました遠山千春教授に感謝申し上げます。