

令和元年5月27日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H01781

研究課題名(和文) マルチオミクス指標を用いた児の健康影響評価法と胎児期からの新しい予防医学の確立

研究課題名(英文) Establishment of new preventive medicine focusing on fetal period with children's health effect evaluation method by using multi-omics analysis

研究代表者

森 千里 (Mori, Chisato)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：90174375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、出生コホートにおいて複数のオミックス解析(エピゲノム、メタボローム、マイクロバイオーム)を組み合わせることにより、環境化学物質曝露を含む母体環境因子が胎児に与える影響の一端を明らかにすることができた。特に、ポリ塩化ビフェニル(PCB)の曝露が母児のメタボロームに与える影響は環境化学物質の生体影響メカニズムの解明にも寄与するものと考えられる。また、本研究で得られたデータはコホートの継続により、さらに発展的な成果につながる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題は、妊娠中の母親の状態が子供にどのような影響を与えるのかという疑問に近年可能となった複数の方法を用いて答えることを試みた。その結果、環境中の汚染物質であるPCBが子供と母親の代謝状態に与える影響が明らかとなった。この結果は、現在においても環境中のPCBを減らす必要があることを示すとともにその悪影響を減らすための方法の端緒を示唆するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed multi-omics analysis in the birth cohort study, C-MACH. Our data showed that polychlorinated biphenyls (PCB) exposure affected maternal and fetal metabolomic profiles. The effects of maternal factors including environmental chemical exposure during pregnancy. These results contribute to clarify the mechanism of environmental pollutants on human health.

研究分野：環境医学

キーワード：DOHaD オミックス解析 出生コホート 環境汚染物質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ポリ塩化ビフェニル ( polychlorinated biphenyls, PCB ) などの残留性環境汚染物質によるヒト健康影響が報告されている。我々はこれまで、様々な環境汚染物質が妊婦母体血や妊娠中胎児血である臍帯血、ヒト胎児由来組織である臍帯で検出されること、このような環境汚染物質をマウスに投与した場合、エピゲノムや生体内代謝産物に変化が生じることを明らかにしてきた。これらの結果は、現代日本人胎児は発生過程の母体環境中において PCB を含む種々の環境化学物質に曝露されていること、それによって児に様々な健康被害が生じる可能性を示唆しており、ヒトにおける評価が急がれる。

PCB を含む環境汚染物質によるヒトへの影響は、エピゲノムや代謝パスウェイのみならず、腸内細菌叢にも及ぶ可能性が示されている。このようにヒトへの影響は多面的な経路に渡るため包括的な影響評価が必要である。

環境汚染物質に加えて、近年、ヒト発生過程 ( 妊娠中 ) における様々な環境因子が、個体の健康に関連することがわかってきた。喫煙、飲酒、栄養状態などの妊娠中の母体環境因子が、児のアレルギー、肥満、精神発達障害などと関連することが報告されている。これらの環境因子はエピゲノム、代謝パスウェイ、腸内細菌叢などの変化を引き起こし、結果として児に健康リスクを生じる可能性が示唆されている。このような疾病発症メカニズムは Developmental Origins of Health and Disease ( DOHaD ) 説と呼ばれ、世界中でこのメカニズムを明らかにするべく様々なコホート研究が進行中である。

### 2. 研究の目的

本研究は、ヒト妊婦血液、尿、臍帯、臍帯血、便など、母児の生体試料や母子・父親のアンケート調査を用いて、母体における PCB など環境汚染物質の蓄積量、その他児に影響を与える様々な妊娠中母体因子 ( マクロ環境要因 ) を評価、母児のエピゲノムや腸内細菌叢、メタボロームへの影響を複合的に解析、生後の児の発育状態を評価した上で、胎児期からの次世代の健康予防医学モデルの構築および児の健康リスクを出生前または直後に検出するバイオマーカーを同定することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 対象

本研究は千葉大学予防医学センターが主催する出生コホート「胎児期に始まる子どもの健康と発達に関する調査 ( C-MACH )」の参加者を対象とする。C-MACH は妊娠中女性を対象に2014年から2015年にまでリクルートを行った。

#### 方法

児健康リスクに関する中間アウトカム ( 児の健康リスク候補因子 ) の同定

#### (1) マクロ ( 生体外周囲 ) 環境要因の解析

妊娠中母体因子としての、母体中 PCB やその他環境汚染物質蓄積量の測定を行う。C-MACH で得られた母体血、臍帯血中に残留する PCB や残留性汚染物質を、質量分析計を用いて測定する。

母体環境要因、社会要因、栄養状態は、質問票により妊娠初期 ( 妊娠 12 週 )、後期 ( 妊娠 32 週 )、入院中 ( 分娩前 )、産後の各調査時期に評価する。母体環境要因として喫煙の有無、生活習慣、運動習慣、持病の有無、居住地域環境など、社会経済状況 ( SES: Socio Economic Status ) として、世帯等価所得、教育歴などを評価する。栄養状態については妊娠初期、後期、産後 1 ヶ月、産後 4 ヶ月時点について、簡易型自記式食事歴法質問票 ( brief-type self-administered diet history questionnaire, BDHQ ) によって評価する。

#### (2) 生体内因子の解析

臍帯 DNA メチル化: 臍帯より抽出した DNA を用い、DNA メチル化チップ ( イルミナ社 )、あるいは Reduced Representation Bisulfite Sequencing ( RRBS ) 法によって、網羅的メチル化解析を行う。また、特定領域の DNA メチル化についてはメチル化感受性高解像度融解曲線解析 ( High Resolution Melting analysis, HRM 解析 )、あるいはパイロシークエンスにより解析を行う。

腸内細菌叢解析: 妊娠初期と後期の妊婦の糞便、児の出産後初めての糞便、1 ヶ月、4 ヶ月、10 ヶ月を採取する。糞便より DNA を抽出した後、16s rRNA 遺伝子配列解析により腸内細菌叢解析を実施する。この結果を用い母体腸内細菌叢の変化が児におよぼす影響を解析する。本研究では、糞便における腸内細菌叢の変化を解析するとともに、便のメタボローム解析を行い、細菌叢の変化が引き起こす代謝物の変化と児の健康影響の関係を明らかにする。

#### メタボローム解析:

妊娠中の母体血清・尿および臍帯血血清中のメタボロームを質量分析計により測定し、化学物質濃度との関係を解析することで曝露を反映するバイオマーカーを探索する。

### 4. 研究成果

#### (1) 出生コホートの遂行

出生コホート C-MACH は継続中であり、質問票によるデータ収集も継続している。2018 年度には 3.5 歳の調査を行い、児の体格、アレルギー歴などの情報が得られた。また、3.5 歳調査では児の食事についても調査を行なった。

## (2) DNA メチル化解析

臍帯を用いた網羅的な DNA メチル化解析については、RRBS 法及びメチル化アレイを用いて行なった。DNA メチル化解析に供される胎児由来組織としては臍帯血球が用いられることが多いため、臍帯血球と臍帯の DNA メチル化プロファイル RRBS 法を用いて比較した。この結果、臍帯の DNA メチル化は臍帯血球と異なることが明らかとなり(図 1)、臍帯の DNA メチル化解析により臍帯血球の解析では得られない情報が取得できることが明らかとなった。また、臍帯の DNA メチル化が母体血中葉酸値の影響を反映することも明らかとなった。RRBS 法以外にもメチル化アレイを用いた解析も行なっており、臍帯血 PCB と相関する部位が存在する可能性が得られている。

臍帯 DNA の特定部位におけるメチル化解析として H19 遺伝子領域に着目し、妊娠中の母体栄養及び児の出生時体格との関連を検討したところ、H19 遺伝子のメチル化が低い群で出生時頭囲が小さくなる結果が得られた。臍帯における H19 遺伝子のメチル化には母親の年齢、妊娠中の摂取カロリー、母体血中葉酸値及びホモシス테인値が関与することが明らかとなった。

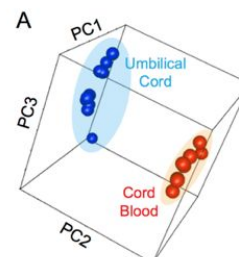


図 1 臍帯と臍帯血の DNA メチル化プロファイル

## (3) メタボローム解析

母体妊娠中血清及び臍帯血清のメタボローム解析を hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry (HILIC-MS/MS) を用いて行なった。この結果を母体血及び臍帯血 PCB 濃度との関連についてランダムフォレストを用いて解析したところ、いくつかの代謝産物が PCB 曝露のバイオマーカーとなる可能性が示された。また、これらの代謝産物のパスウェイを検討したところ、母体血ではグルタチオン及びアミノ酸代謝のパスウェイが、臍帯血ではアミノ酸代謝及びユビキノン代謝に関連するパスウェイが示された。これらのパスウェイは PCB による影響を受けている可能性があり、PCB の毒性発現機序の解明にも寄与するものと考えられる。

## (4) 腸内細菌叢解析

妊娠中の母体腸内細菌叢解析を行い出生時の体格及び臍帯 DNA メチル化との関連を検討した。母体腸内細菌叢の多様性が低下すると男児において頭囲が小さくなることが示唆された(図 2)。この関連は女児では認められず、母体腸内細菌叢の影響には性差が存在する可能性が示された。母体腸内細菌叢が児にエピジェネティックな影響を与える可能性を検討するために、臍帯 DNA メチル化との関連を検討した。妊娠中の母体腸内細菌叢のうち、Firmicutes 門の構成比が糖尿病関連遺伝子である *Kcnq1* と *Ube2e2* のメチル化とそれぞれ負の、あるいは正の相関があることが示された。この検討は少数例によるパイロット研究のため今後さらに例数を増やした検討が必要と考えられた。

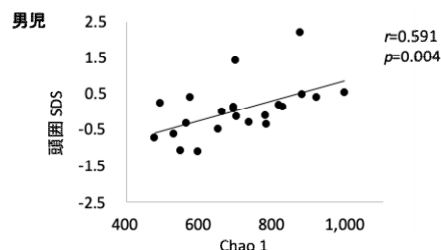


図 2 母体腸内細菌叢の多様性と男児出生時頭囲

本研究では、複数のオミックス解析を出生コホート研究に組み合わせることにより環境化学物質を含む妊娠中(胎児期)要因の胎児への影響を明らかにすることができた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

1. Eguchi A, Yanase K, Yamamoto M, Sakurai K, Watanabe M, Todaka E, Mori C. The relationship of maternal PCB, toxic and essential trace element exposure levels with birth weight and head circumference in Chiba, Japan. *Environ Sci Pollut Res* 査読有、(in press)
2. Sato Y, Sakurai K, Tanabe H, Kato T, Nakanishi Y, Ohno H, Mori C. Maternal gut microbiota is associated with newborn head circumference in males but not in females. *J Dev Orig Health Dis* 査読有、(in press)

3. Sakurai K, Shioda K, Eguchi A, Watanabe M, Miyaso H, Mori C, Shioda T. DNA methylome of human neonatal umbilical cord: Enrichment of differentially methylated regions compared to umbilical cord blood DNA at transcription factor genes involved in body patterning and effects of maternal folate deficiency or children's sex. PLoS One 査読有、 2019. 14: e0214307. doi: 10.1371/journal.pone.0214307
4. Dissanayake E, Inoue Y, Ochiai S, Eguchi A, Nakano T, Yamaide F, Hasegawa S, Kojima H, Suzuki H, Mori C, Kohno Y, Taniguchi M, Shimojo N. Hsa-mir-144-3p expression is increased in umbilical cord serum of infants with atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 査読有、 2019. 143(1):447-450.e11. doi: 10.1016/j.jaci.2018.09.024.
5. Jin W, Otake M, Eguchi A, Sakurai K, Nakaoka H, Watanabe M, Todaka E, Mori C. Dietary Habits and Cooking Methods Could Reduce Avoidable Exposure to PCBs in Maternal and Cord Sera. Sci Rep 査読有、 2017. 7:17357. doi: 10.1038/s41598-017-17656-9
6. Miyaso H, Sakurai K, Takase S, Eguchi A, Watanabe M, Fukuoka H, Mori C. The methylation levels of the H19 differentially methylated region in human umbilical cords reflect newborn parameters and changes by maternal environmental factors during early pregnancy. Environ Res 査読有、 157:1-8, 2017
7. Eguchi A, Sakurai K, Watanabe M, Mori C. Exploration of potential biomarkers and related biological pathways for PCB exposure in maternal and cord serum: A pilot birth cohort study in Chiba, Japan. Environ Int 査読有、 2017. 102:157-164
8. Tachibana K, Sakurai K, Watanabe M, Miyaso H, Mori C. Associations between changes in the maternal gut microbiome and differentially methylated regions of diabetes-associated genes in fetuses: A pilot study from a birth cohort study. J Diabetes Investig 査読有、 2017. 8:550-553; doi: 10.1111/jdi.12598

〔学会発表〕(計 9 件)

1. Eguchi A, Sakurai K, Kato T, Nakanishi Y, Tanabe H, Sato Y, Yamamoto M, Watanabe M, Ohno H, Mori C. Alterations in profiles of metabolome and gut-microbiome due to lead exposure PCBs and p, p'-DDE in C-MACH cohort. Society of Toxicology 58th Annual Meeting and ToxExpo. 2019 年、 (Baltimore, USA)
2. Mori C, Eguchi A, Nishizawa-Jotaki S, Tanabe H, Watanabe M, Todaka E, Sakurai K. Relationship between DNA methylation status in cord tissue and residue levels of PCBs in paired cord serum. PPTOX VI. 2018 年、 (Torshavn, Faroe Islands)
3. Sakurai K, Sato Y, Watanabe M, Mori C. Effects of maternal factors on fetal adipokine levels. ISEE/ES AC 2018. 2018 年、 (Taipei, Taiwan)
4. Sato Y, Sakurai K, Tanabe H, Kato T, Ohno H, Mori C. Association between maternal gut microbiota and neonatal growth. ISEE/ES AC 2018. 2018 年、 (Taipei, Taiwan)
5. Eguchi A, Sakurai K, Yamamoto M, Watanabe M, Todaka E, Mori C. Relationship

between residue levels of PCBs, p, p'-DDE, PBDEs and trace elements in maternal and umbilical cord serum from Chiba, Japan. ISEE/ES AC 2018. 2018 年、(Taipei, Taiwan)

6. Otake M, Kawanami A, Watanabe M, Sakurai K, Mori C. Effects of dietary patterns and other factors on reports of maternal low energy among pregnant women in Chiba. ISEE/ES AC 2018. 2018 年、(Taipei, Taiwan)
7. 田邊裕美、櫻井健一、中野泰至、渡邊応宏、落合伸伍、下条直樹、森千里(2018)乳児湿疹と臍帯血 TARC 値及びアレルギー疾患との関連性 第 67 回日本アレルギー学会学術大会(千葉)
8. 杉田明穂、櫻井健一、田邊裕美、西澤紫乃、森千里(2018)母体の妊娠中体重増加量と臍帯における肥満関連遺伝子の DNA メチル化 第 7 回日本 DOHaD 学会学術集会(東京)
9. 佐藤 由美、櫻井 健一、田邊 裕美、加藤 完、大野 博司、森 千里(2018)妊娠期の食事摂取と腸内細菌叢の関連性 第 72 回 日本栄養・食糧学会大会(岡山)

〔図書〕(計 1 件)

1. Sakurai K & Mori C. (2019) Current Findings in a Birth Cohort Study with Omics Analysis: Chiba Study of Mother and Child Health (C-MACH): in *Pre-emptive Medicine: Public Health Aspects of Developmental Origins of Health and Disease* (eds Fumio Sata, Hideoki Fukuoka, & Mark Hanson) Ch. 10, 165-174 (Springer Nature Singapore Pte Ltd.)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：花里 真道

ローマ字氏名：Hanasato Masamichi

所属研究機関名：千葉大学

部局名：予防医学センター

職名：准教授  
研究者番号（8桁）：00608656

研究分担者氏名：戸高 恵美子  
ローマ字氏名：Todaka Emiko

所属研究機関名：千葉大学  
部局名：予防医学センター

職名：教授  
研究者番号（8桁）：30334212

研究分担者氏名：櫻井 健一  
ローマ字氏名：Sakurai Kenichi

所属研究機関名：千葉大学  
部局名：予防医学センター

職名：准教授  
研究者番号（8桁）：80323434

研究分担者氏名：江口 哲史  
ローマ字氏名：Eguchi Akifumu

所属研究機関名：千葉大学  
部局名：予防医学センター

職名：助教  
研究者番号（8桁）：70595826

研究分担者氏名：鈴木 規道  
ローマ字氏名：Suzuki Norimichi

所属研究機関名：千葉大学  
部局名：予防医学センター

職名：特任准教授  
研究者番号（8桁）：90724849

## (2)研究協力者

研究協力者氏名：松野 義晴  
ローマ字氏名：Matsuno Yoshiharu

研究協力者氏名：宮宗 秀伸  
ローマ字氏名：Miyaso Hidenobu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。