

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19243

研究課題名(和文) 児のエピゲノム変化に影響する母のダイオキシン類曝露と遺伝子との交互作用の解明

研究課題名(英文) Association between maternal dioxin levels during pregnancy and genetic polymorphisms on infant epigenetic effects

研究代表者

小林 澄貴 (KOBAYASHI, Sumitaka)

北海道大学・環境健康科学研究教育センター・特任講師

研究者番号：10733371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：出生前向きコホートを用いて、ダイオキシン類代謝・解毒酵素関連(AHR、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、GSTM1)遺伝子型による胎児期ダイオキシン類曝露と児の発育に関わる3つの遺伝子領域(インスリン様成長因子[IGF-2、H19]および転移因子[LINE-1])のエピゲノム変化との関連への影響を検討した。いずれの遺伝子型においても胎児期の母のダイオキシン類曝露と児のIGF-2、H19、およびLINE-1メチル化率との関連に有意な違いは見られなかった。胎児期の母のダイオキシン類濃度と児のメチル化率との関連に母のダイオキシン類代謝関連受容体や酵素の遺伝子型の違いが影響しないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Using prospective birth cohort, I examined an association between maternal dioxin levels in blood during pregnancy and genetic polymorphisms of genes encoded dioxin-metabolizing receptor and enzymes (aromatic hydrocarbon receptor [AHR], cytochrome P450 [CYP] 1A1, CYP1A2, CYP1B1, and glutathione S-transferase mu1 [GSTM1]) on levels of infant DNA methylation (insulin-like growth factor-2 [IGF-2], H19, and long interspersed nuclear element-1 [LINE-1]). None of maternal genotypes showed the effects of infant IGF-2, H19, and LINE-1 methylation levels for maternal dioxin levels during pregnancy. In conclusion, maternal genetic polymorphisms of genes encoded dioxin-metabolizing receptor and enzymes did not modify the association between maternal dioxin levels in blood during pregnancy and levels of infant IGF-2, H19, and LINE-1 methylation.

研究分野：疫学(環境疫学・分子遺伝疫学)・予防医学、衛生学・公衆衛生学

キーワード：妊婦 胎児 ダイオキシン類 DNAメチル化 エピゲノム 遺伝環境交互作用 環境化学物質 公衆衛生学

### 1. 研究開始当初の背景

ダイオキシン類は薬品合成の際に非意図的に生成される物質である。食品や母乳からの摂取は減っているものの、現在でも毎日平均して体重 1kg あたり 0.85pg-毒性等価量 (Toxicity Equivalency Quantity; TEQ) を摂取している (環境省, 2012)。摂取量全体の 98% は魚介類や肉類などの食品由来であり (環境省, 2008)、母から児へ移行している (Leino ら, 2013 他)。ダイオキシン類で最も毒性が強い 2,3,7,8-TetraCDD はヒトの生殖、免疫、内分泌系に影響することが明らかになっている (White ら, 2009)。ダイオキシン類の生物学的半減期は 7-40 年といわれ (Matsumoto ら, 2013 他)、この物質が母の体内に蓄積され、刺激として感受しやすい胎児に負の発育影響を及ぼすことが懸念される。

ダイオキシン類は芳香族炭化水素受容体 (Aromatic hydrocarbon receptor; AHR) と結合し核内に移行する。そして AHR 核転写因子 (AHR nuclear translocator; ARNT) と結合してシトクロム P450 (cytochrome P450; CYP) 1 系によって代謝され、さらにグルタチオン S- 転移酵素 (glutathione S-transferases; GSTs) によって代謝中間体は解毒され体外に排泄される (Harper ら, 2002 他)。研究代表者は、母の特定の AHR および *CYP1A1* の一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms; SNPs) をもつと母体血中ダイオキシン類濃度が 1.1 倍有意に高く (Kobayashi ら, 2013)、さらに AHR、*CYP1A1* および *GSTM1* 遺伝子多型 (SNPs) の特定の組合せをもった妊婦の児は、ダイオキシン類曝露によって児の出生体重がより大きな減少を示したことを明らかにした (Kobayashi ら, 2017)。研究代表者の結果は、母のダイオキシン類曝露と SNPs との相互作用による児の発育に及ぼす可能性を示唆するものであり、児の発育へのリスク増加要因となるエピゲノム変化への影響も懸念される。

エピゲノムは、塩基配列に依存しない後天的な遺伝情報の発現制御であり、細胞分化の制御のためにはなくてはならない機構である。メチル化修飾は生理的な DNA 修飾機構の一つであり (Bird ら, 2002)、この機構の異常は、児における遺伝情報の破綻につながる。児のエピゲノム変化が遺伝子転写の変化につながる場合、細胞にある遺伝子発現に変化が起こった後、児の発育の低下に至ることは十分に予想される。着床前期から胚盤胞期まで 2,3,7,8-TetraCDD をマウスに曝露させると、2,3,7,8-TetraCDD 非曝露群と比較して胎生期 14 日目の胎児重量は小さかった (Wu ら, 2004)。この原因はインスリン様成長因子 2 型 (Insulin-like growth factor 2; IGF-2) とその近傍にある *H19* 遺伝子の発現レベルの減少によるものであった (Wu ら, 2004)。2,3,7,8-TetraCDD を妊娠中に低用量曝露したラットでは、児ラットの腹側前立腺にある

アンドロゲン受容体 (androgen receptor; AR) の mRNA 発現レベルが量反応依存的に減少した (Ohsako ら, 2001)。マウスの子宮内に 2,3,7,8-TetraCDD を投与すると、児マウスの肝や腎の AHR や *CYP1A1* 遺伝子の発現の低下に影響を及ぼした (Choi ら, 2006)。このように胎児期の母のダイオキシン曝露が児のエピゲノム変化に及ぼす影響は、動物実験では明らかになっているもののヒトの報告ではまだない。肥満や体重増加の制御に関わるレプチン受容体 (leptin receptor; LEPR) の母の SNPs と胎児期喫煙との交互作用が児の LEPR メチル化に影響を及ぼし、さらにこのメチル化と児の LEPR の SNPs との交互作用が 18 歳児のレプチン値に関連を示した報告がある (Yousefi ら, 2013)。このように児のエピゲノム変化は生後の発育に大きく関わるため、児のエピゲノム変化に及ぼす影響を明らかにする必要がある。

### 2. 研究の目的

母の SNPs の違いは同じ曝露量であったとしても児のエピゲノム変化の大きさの違い、さらに児の発育に影響を及ぼすことになるのでリスク因子となり、特定の SNPs をもつ母らは遺伝的なハイリスク群となる。

(1) 胎児期ダイオキシン類曝露は胎盤を介して直接的に児の発育関連の遺伝子領域にエピゲノム変化の違いを引き起こすか、そして、(2) ダイオキシン類曝露はこの代謝・解毒酵素関連の SNPs によって母の体内蓄積量に違いをもたらし、さらに胎盤を介して、児の発育関連の遺伝子領域にエピゲノム変化の違いを引き起こすかを明らかにすることを本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

2001 年に出生前向きコホート研究「環境と子どもの健康に関する北海道スタディ (以下、北海道スタディ) (研究代表者: 岸玲子 北海道大学特別招へい教授)」を用いて、収集された質問票への回答や、母体血の生体試料に基づきダイオキシン類の曝露評価を行い、アウトカムとの関連を検討した。また、遺伝環境相互作用の影響を評価するため、母体血 DNA の SNPs を解析し、妊娠中ダイオキシン類曝露と DNA メチル化率との関連を検討した。

(1) 母体血中ダイオキシン類の曝露評価: 胎児期の母のダイオキシン類濃度として、既に高分解能ガススペクトロメトリー・高分解能マススペクトロメーター (High resolution gas spectrometry/high resolution mass spectrometer [HRGC/HRMS]) 法で測定した妊娠後期の母体血中ダイオキシン類濃度を使った。

(2) SNPs 解析: Fludigm 社製マイクロフリューディック遺伝子解析 EP1 システムおよび Applied Biosystems 社製の TaqMan 法でダイオキシン類代謝関連の AHR (dbSNP

ID: rs2066853)、CYP1A1 (rs1048943)、CYP1A2 (rs762551)、CYP1B1 (rs1056836)、および GSTM1 (Non-null/null) の SNPs を解析した。

(3) DNA メチル化率の評価: 出生時に臍帯血を採取し、DNA を抽出した。バイサルファイト処理した上で、IGF-2 DMR0 (chr11p15.5, site 1: 2109519; site 2: 2109516), H19 DMR (chr11p15.5, site 1: 1964257; site 2: 1964259; site 3: 1964257; site 4: 1964254), LINE-1 の 3 領域を Pyromark Q24 system (Qiagen) を使って、DNA メチル化率を定量した。

#### 4. 研究成果

本研究の成果として、以下の曝露とアウトカムに関する新たな関連を明らかにすることができた。加えて、環境遺伝交互作用の影響を示すことができた。

(1) 胎児期の母のダイオキシン類濃度:

妊娠後期の母のダイオキシン類濃度を毒性等価係数 (TEF) で換算した TEQ の中央値 (25 パーセンタイル値-75 パーセンタイル値) は 13.89 (10.14-18.35) TEQ-pg/g lipid だった。

(2) 母のダイオキシン類代謝関連の遺伝子頻度:

AHR (rs2066853) 遺伝子の G アレル頻度は 56.9%、CYP1A1 (rs1048943) 遺伝子の T アレル頻度は 65.7%、CYP1A2 (rs762551) 遺伝子の A アレル頻度は 62.8%、および CYP1B1 (rs1056836) 遺伝子の C アレル頻度は 86.6% だった。また GSTM1 (Non-null) 遺伝子型の頻度は 49.6% だった。

(3) 児の IGF-2、H19、および LINE-1 のメチル化率:

臍帯血 DNA の IGF-2 メチル化率の中央値 (25 パーセンタイル値-75 パーセンタイル値) は 49.0 (46.4-50.4)%, H19 メチル化率の中央値 (25 パーセンタイル値-75 パーセンタイル値) は 52.2 (51.1-53.5)%, および LINE-1 メチル化率の中央値 (25 パーセンタイル値-75 パーセンタイル値) は 75.9 (75.1-76.5)% だった。

(4) 胎児期の母のダイオキシン類 TEQ と児の IGF-2、H19、および LINE-1 メチル化率との関連:

胎児期のダイオキシン類 TEQ が 10 倍増えると、児の IGF-2 メチル化率は 1.24% (95% 信頼区間 [CI]: -4.05, 1.27) 減少し、H19 メチル化率は 0.47% (95% CI: -1.25, 2.20) 増加し、そして LINE-1 メチル化率は 0.30% (95% CI: -0.73, 1.33) 増加した。

(5) 母のダイオキシン類代謝酵素遺伝子型による胎児期の母のダイオキシン類 TEQ と児の IGF-2、H19、および LINE-1 メチル化率との関連への影響:

AHR、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、および GSTM1 の各遺伝子型について検討したところ、いずれの遺伝子型においても胎児期

の母のダイオキシン類 TEQ と児の IGF-2、H19、および LINE-1 メチル化率との関連に有意な違いは見られなかった (表 1)。

表 1. 胎児期ダイオキシン類 TEQ と児の DNA メチル化との関連: 母のダイオキシン類代謝関連遺伝子型別による影響

母の遺伝子型	児の IGF-2 メチル化率 (%)	児の H19 メチル化率 (%)	児の LINE-1 メチル化率 (%)
<b>AHR</b> (rs2066853)			
GG	-2.95 (-7.67, 1.75)	1.78 (-2.26, 5.81)	-0.26 (-2.10, 1.59)
GA	-3.87 (-8.36, 0.62)	-1.07 (-3.40, 1.27)	-0.34 (-1.74, 1.06)
AA	0.48 (-6.69, 7.64)	3.08 (-1.50, 7.65)	3.17 (-0.63, 6.96)
<b>CYP1A1</b> (rs1048943)			
TT	0.71 (-4.19, 5.61)	0.73 (-2.52, 3.98)	-0.15 (-1.52, 1.23)
TC	-1.53 (-5.96, 2.89)	-1.21 (-3.49, 1.08)	-1.01 (-2.41, 0.39)
CC	-12.0 (-31.7, 7.71)	5.41 (-13.2, 24.0)	6.38 (-8.55, 21.3)
<b>CYP1A2</b> (rs762551)			
AA	-0.53 (-4.54, 3.49)	0.14 (-2.34, 2.62)	1.09 (-0.75, 2.91)
AC	-0.32 (-5.45, 4.82)	0.16 (-2.83, 3.14)	-0.48 (-1.95, 1.00)
CC	0.00 (-16.4, 16.4)	1.92 (-5.01, 8.85)	-1.85 (-5.87, 2.17)
<b>CYP1B1</b> (rs1056836)			
CC	-1.71 (-4.93, 1.51)	1.00 (-0.83, 2.83)	0.76 (-0.44, 1.95)
CG	3.00 (-4.65, 10.7)	-2.84 (-8.41, 2.73)	-1.71 (-4.20, 0.78)
GG	(-)	(-)	(-)
<b>GSTM1</b> (Non-null/null)			
Non-null	2.17 (-1.07, 5.42)	0.78 (-1.77, 3.32)	0.27 (-1.45, 1.99)
Null	-5.34 (-10.2, 0.48)	0.38 (-2.20, 2.97)	0.28 (-1.10, 1.65)

数値はダイオキシン類 TEQ (pg/g lipid) が 10 倍増えた時の児の DNA メチル化率変化 (95% 信頼区間) を表す。

母の年齢、身長、妊娠前体重、出産歴、妊娠中喫煙状況、妊娠中飲酒状況、教育歴、世帯収入、近海魚摂取、遠洋魚摂取、児の性別、DNA メチル化解析のバッチ差で調整した重回帰分析。

本研究は、胎児期の母のダイオキシン類 TEQ による児の IGF-2、H19、および LINE-1 メチル化率の影響について、母のダイオキシン類代謝関連受容体や酵素の遺伝子型を考慮した初めての研究である。本研究の結果、胎児期の母のダイオキシン類 TEQ による児の IGF-2、H19、および LINE-1 メチル化率

への影響はなかったと示唆された。またこの関連に母のダイオキシン類代謝関連受容体や酵素の遺伝子型が関与しないと考えられた。

本研究の限界点として、サンプルサイズが限られており、統計学的パワーが十分でなかった可能性が考えられる。今後より大きなサンプルサイズで検討することで、より明確な関連が得られる可能性がある。今後は、ダイオキシン類のみならず、ダイオキシン類の類似物質であるポリ塩化ビフェニル (polychlorinated biphenyl; PCB) 類についても検討していく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

1. Sumitaka Kobayashi, Fumihiko Sata, Chihiro Miyashita, Seiko Sasaki, Susumu Ban, Atsuko Araki, Houman Goudarzi, Jumboku Kajiwara, Takashi Todaka, Reiko Kishi. Dioxin-metabolizing genes in relation to effects of prenatal dioxin levels and reduced birth size: the Hokkaido Study. *Reproductive Toxicology*. 2017. 67: 111-116.(査読有)

2. Sumitaka Kobayashi, Fumihiko Sata, Chihiro Miyashita, Ryu Miura, Kaoru Azumi, Sachiko Kobayashi, Houman Goudarzi, Atsuko Araki, Mayumi Ishizuka, Takashi Todaka, Jumboku Kajiwara, Tsuguhide Hori, Reiko Kishi. Gender-specific association of exposure to non-dioxin-like polychlorinated biphenyls during pregnancy with methylation levels of H19 and long interspersed nuclear element-1 in cord blood in the Hokkaido study. *Toxicology*. 2017. 390: 135-145.(査読有)

[学会発表](計6件)

1. 小林澄貴, 佐田文宏, 宮下ちひろ, 三浦りゅう, ホウマヌ・ゴウダルジ, 荒木敦子, 梶原淳睦, 堀就英, 岸玲子. 胎児期の PCB 類曝露による児の H19・LINE-1 の DNA メチル化への影響:北海道スタディ. 第 88 回日本衛生学会学術総会. 東京工科大学蒲田キャンパス. 東京都大田区. 2018.3.22-3.24.

2. 小林澄貴, 岸玲子. 正期産における妊婦の受動・能動喫煙と SGA との関連:北海道スタディ. 第 76 回日本公衆衛生学会総会. 鹿児島県民交流センター. 鹿児島県鹿児島市. 2017.10.31.-11.2.

3. 小林澄貴, プライモー・チチローラ, 佐田文宏, 佐々木成子, ホウマヌ・ゴウダルジ, イーラタマ, 荒木敦子, 宮下ちひろ, 岸玲子. 妊娠中の母の受動喫煙と児の 3 歳までの発育との関連:北海道スタディ. 平成 29 年度日本

産業衛生学会北海道地方会 (第 97 回北海道医学大会産業衛生分科会). 札幌市立大学桑園キャンパス. 北海道札幌市. 2017.10.14.

4. Sumitaka Kobayashi, Fumihiko Sata, Seiko Sasaki, Titilola Serifat Braimoh, Atsuko Araki, Chihiro Miyashita, Houman Goudarzi, Sachiko Kobayashi, Reiko Kishi. Genetic modification of adverse health effects of prenatal active and passive smoking: dose-dependent association of plasma cotinine levels with infant birth weight in the Hokkaido Study. 29th Conference of the International Society for Environmental Epidemiology (ISEE2017). University of Sydney. Sydney, Australia. September 24-28, 2017.

5. 小林澄貴, 佐田文宏, 佐々木成子, Titilola Serifat Braimoh, 荒木敦子, 宮下ちひろ, Houman Goudarzi, 小林祥子, 岸玲子. 妊婦のコチニン値と出生体重との濃度依存的な関係に影響を及ぼす AHR と XRCC1 遺伝子:北海道スタディ. 第 27 回日本疫学会学術総会. ベルクラシック甲府. 山梨県甲府市. 2017.1.25-27.

6. 小林澄貴, 佐田文宏, 佐々木成子, Titilola Serifat Braimoh, 荒木敦子, 宮下ちひろ, Houman Goudarzi, 小林祥子, 岸玲子. 母の喫煙曝露と胎児発育との関連: 遺伝的なハイリスクについて—北海道スタディ. 第 86 回日本衛生学会学術総会. 旭川市民文化会館. 北海道旭川市. 2016.5.11.-13.

[図書]

なし

[産業財産権]

なし

[その他]

ホームページ等

北海道大学 環境健康科学研究教育センター

<http://www.cehs.hokudai.ac.jp/>

北海道スタディ

<http://www.cehs.hokudai.ac.jp/hokkaidostudy/>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 澄貴 (KOBAYASHI, Sumitaka)

北海道大学・環境健康科学研究教育センター・特任講師

研究者番号: 10733371

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

宮下 ちひろ (MIYASHITA, Chihiro)

北海道大学・環境健康科学研究教育センタ

ー・特任准教授

研究者番号：70632389

荒木 敦子 (ARAKI, Atsuko)

北海道大学・環境健康科学研究教育センタ

ー・准教授

研究者番号：00619885