

令和元年6月14日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19245

研究課題名(和文) 妊娠中の環境要因がエピゲノムを介して小児の脂質代謝と肥満・やせ型に与える影響

研究課題名(英文) Effect of environmental factors during pregnancy on lipid metabolism and growth among of children through epigenetic modification

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：重回帰分析で妊婦の母体血中パルミトレイン酸が増えると共に、その児の小学校5、6年生の肥満度が有意に低下した。臍帯血中IGF-2、H19、LINE-1のDNAメチル化率と小学校1年生から6年生の肥満度との間に有意な関連はなかった。血中脂肪酸は臍帯血中DNAメチル化率と有意に相関したが、DNAメチル化率と小学校1年生から6年生の肥満度の間に有意な関連はなかった。本研究の結果から胎児期の環境要因が学童期の肥満度に影響する作用機序に関して、出生時のIGF-2、H19、LINE-1のDNAメチル化が関与する程度は僅かである可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は母の妊娠中の栄養や環境と、その児の小学生の肥満度との関係に、臍帯血中DNAメチル化率がどのように関与するか国内で初めて検討した。胎児期や生後の早期の栄養および環境が成長後の児の発育や疾病発生に影響を及ぼす生体機序に関して、後天的遺伝子修飾であるDNAメチル化はその生体機序の一つであると示唆されている。しかしヒト集団を用いて疫学データとDNAメチル化率との関連を検討した報告はわずかであり、本研究はヒトのDNAメチル化と生体影響について貴重な知見を提供した。

研究成果の概要(英文)：Associations between concentrations of fatty acids in maternal blood during pregnancy (log2) and the obesity index of elementary school children were evaluated in the regression analysis adjusted by maternal BMI, smoking and alcohol drinking during pregnancy, and inshore fish intake. The obesity index of 5th and 6th grade elementary school children were significantly decreased with increased concentration of maternal palmitoleic acid. Associations between DNA methylations of IGF-2, H19 and LINE-1 in cord blood (log2) and the obesity index of elementary school children were evaluated in the regression analysis. No obesity index of children was associated with DNA methylations. This study suggests that DNA modification of IGF-2, H19 and LINE-1 at birth may slightly affect on associations between maternal fatty acid during pregnancy on growth of elementary school children.

研究分野：疫学、分子遺伝学

キーワード：疫学 エピゲノム 肥満度

様式 C-19, F-19-1, Z-19, CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国では、出生体重 2.5kg 未満の低出生体重児の割合が 9.6%と上昇傾向にある(平成 24 年人口動態統計)。出生体重の減少の背景としては、早産や多胎の増加、母親の栄養状態が胎児発育に影響を与えることが報告されている。その一方で、母親の環境要因がどのような作用機序を介して胎児発育と出生後の成長に影響するか、十分な検討がされていない。我が国の幼児期以降の成長については、標準体重を基準とする「普通体型」割合の低下、すなわち、子供の肥満が増加する一方で、やせている子供も増えている傾向があることがわかった(平成 23 年国民健康栄養調査)。この背景としては、食生活、運動、および睡眠などの生活習慣の変化が関与すると共に、近年、胎児期の環境要因(栄養、喫煙、飲酒など)が、児の脂質代謝に関与するペルオキシソーム増殖因子活性化受容体(PPAR)やコレステロール代謝制御遺伝子(SREBP)のエピゲノムに影響することより、出生後の成長・発育に影響する可能性が報告されている(Rao et al., 2012)。

後天的な遺伝子発現制御機構であるエピゲノムの一つである DNA メチル化は、個体の発生から成長や加齢の経過を通じて変化して、環境に応じて遺伝子発現を変化させる。特に、個体の発生・分化の段階で DNA メチル化の状態はダイナミックに変化しており、環境要因から最も強く影響を受けやすい(Smallwood and Kelsey, 2012)。母体の環境要因が児のエピゲノムに影響することにより、世代を超えて受け継がれるなら、世代を経た健康や疾病リスク増加の原因となる可能性があり、エピゲノムを介した作用機序を解明することは健康増進や疾病予防対策に重要である(Blewitt et al., 2006; Whitelaw and Whitelaw, 2006)。児の成長に関係するエピゲノム変化として、児の成長促進に関わるインスリン様成長因子(IGF)-2/H19、および転移因子の一つである Long interspersed nuclear element-1 (LINE-1)の DNA メチル化変化が出生体重に影響することが報告されている(Kappil et al., 2015; Michels et al., 2011; Xiao et al., 2016)。先行研究で、LINE-1 メチル化率が 7-9%増加するごとに在胎週数が 3.3 日短くなる(Burris et al., 2014)、また H19 メチル化率が約 1.4 倍増えるごとに妊娠中期から出産までの胎児の体重増加が 0.51g 減少したことが報告されている(Bouwland-Both et al., 2013)。しかし、妊娠中の環境要因がこれらのメチル化変化を介して学童期の児の成長や肥満に関係するか検討した報告はない。

2. 研究の目的

本研究は、妊娠中の環境要因がエピゲノムの作用機序を介して出生時から学童期までの脂質代謝や小児肥満・やせ型に与える影響を明らかにすると共に、出生低体重や小児肥満・やせ型傾向のリスクとなる環境要因を明らかにすることにより予防的な知見を提供することを目的とした。

3. 研究の方法

2003 年からリクルートを開始した出生前向きコーホート「環境と子どもの健康に関する北海道スタディ」の参加者で、2016 年から 2018 年 11 月までに 9-13 歳に到達する児 5060 名に小学校 6 年間の学校健診記録の転記を依頼した。1 年に 1~3 回の学校健診から体重と身長を記録を収集した。学校健診記録が自宅にない学校に保管されている場合は、新年度(4-5 月)の学校健診が終わった後、一時的に自宅へ返却されるタイミングに合わせて、再度、学校健診記録の転記を依頼した。学校健診記録の 1 年に 1-2 回の身長・体重の測定値を用いて発育曲線を作成した。身長と体重、および体格の推移を評価した。肥満の評価では、児の性別と年齢と身長別の 2000 年日本人小児の体格標準値(厚生労働省/文部科学省)を標準体重として、標準体重を 20%以上超えるものを肥満傾向と定義した(小児内分泌学会)。

既に得られた臍帯血から 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 領域について Applied Biosystems 社製パイロシーケンサーを用いて DNA メチル化率を定量した。

多変量解析において、曝露(独立変数)を妊婦の環境要因、アウトカム(従属変数)を出生時体格および学童期までの肥満とやせ型、さらに、媒介作用を臍帯血中 DNA の IGF-2, H19, および LINE-1 メチル化率データとして解析した。統計解析には SPSS 22.0J を使用した。

(倫理面への配慮)

本研究は、北海道大学環境健康科学研究教育センターおよび大学院医学研究科・医の倫理委員会の倫理規定に従って実施した。インフォームド・コンセントはヘルシンキ宣言に基づいて行った。本研究によって得られた個人名及び個人データの漏えいが一切生じないように、研究者によりデータ保管を厳重に行った。採血の方法は日常の一般診療で行われている血液生化学検査の際の採血と同様であり、格段の危険性は伴わなかった。

4. 研究成果

2018 年 11 月時点で学校健診記録転記調査票を 5060 件に発送して 2068 件(回収率 40.9%)を収集した。学年と性別の肥満傾向(標準体重を 20%超える)の児の割合は、小学校 1 年生では男児: 5.1%, 女児: 4.2%, 小学校 2 年生では男児: 7.3%, 女児: 6.5%, 小学校 3 年生は男児: 10.1%, 女児: 7.7%, 小学校 4 年生は男児: 11.5%, 女児: 7.8%, 小学校 5 年生は男児: 13.1%, 女児: 9.1%, 小学校 6 年生は男児: 12.6%, 女児: 9.0%であった。全ての学年で肥満傾向の割合は女児よりも男児のほうが高く、小学校 1 年生から 5 年生まで学年が上がるにつれて肥満傾向の割合は増加し、小学校 6 年生で若干低下した。平成 29 年度学校保健統計によると 11 歳(小

学校6年生)の全国平均肥満傾向は男児で9.69%,女児で8.72%と報告されており、北海道に居住する本研究の対象者の肥満傾向の割合は全国平均よりも高い傾向が示された。

児童の体格と妊娠中の栄養や喫煙などの環境との関連を検討するため、妊娠中の脂肪酸(パルミチン酸,パルミトレイン酸,ステアリン酸,オレイン酸,リノール酸,リノレン酸,アラキドン酸,EPA,DHA)濃度,母の妊娠中の喫煙や飲酒,社会経済要因として母の教育歴や世帯年収と児の体格を解析した。母の属性,血中脂肪酸,臍帯血中DNAメチル化率,児の小学校体格の全てのデータが揃った124名を解析対象とした。単変量解析で,小学校6年生の体重と母の妊娠中の飲酒が正の相関,妊娠中の母の喫煙が負の関連を示した。小学校1年から6年の肥満度について,母の喫煙や飲酒による差は認められなかった。一方で,妊娠中の近海魚の摂取が週1回以上の母から生まれた児は,週1回未満の母から生まれた児よりも肥満度が低かった。

母の属性,血中脂肪酸濃度と臍帯血中DNAメチル化率の単変量解析では,母の年齢とIGF-2,LINE-1の臍帯血中DNAメチル化率は正の相関があった(表1)。血中脂肪酸濃度とIGF-2,H19,LINE-1の臍帯血中DNAメチル化率と有意な相関があった(表1)。

表1 母の年齢,血中脂肪酸と臍帯血中DNAメチル化率の相関

	IGF2 (%)	H19 (%)	LINE1 (%)	
母の年齢	r	0.130	0.074	0.131
	p	0.027	0.205	0.025
TG	r	0.152	0.099	-0.016
	p	0.010	0.093	0.790
パルミチン酸	r	0.059	0.105	0.129
	p	0.319	0.077	0.029
パルミトレイン酸	r	0.048	0.121	0.124
	p	0.422	0.041	0.036
ステアリン酸	r	0.038	0.082	0.118
	p	0.525	0.168	0.046
オレイン酸	r	0.071	0.096	0.140
	p	0.233	0.105	0.018
リノール酸	r	0.075	0.022	0.166
	p	0.208	0.716	0.005
リノレン酸	r	0.116	-0.025	0.118
	p	0.050	0.671	0.045
アラキドン酸	r	0.045	-0.019	0.122
	p	0.452	0.745	0.039
EPA	r	-0.052	0.111	0.003
	p	0.384	0.061	0.963
DHA	r	0.062	0.005	0.085
	p	0.292	0.933	0.153

r: spearman 有意水準 p<0.05

血中脂肪酸濃度をlog2に対数変換し,母のBMI,妊娠中の喫煙,飲酒,近海魚摂取で調整した重回帰分析を実施した。血中パルミトレイン酸が増えると共に小学校5年生6年生の肥満度が低下する関連が認められた(表2)。他の血中脂肪酸と小学校1年生から6年生までの肥満度間に有意な関連は認められなかった。

表2 血中パルミトレイン酸と小学校1年生から6年生の肥満度

	パルミトレイン酸
	肥満度 B 95%CI
小学校1年1回目	-1.556 (-3.388, 0.275)
小学校1年2回目	-0.588 (-2.817, 1.640)
小学校2年1回目	-1.726 (-3.792, 0.341)
小学校2年2回目	-0.558 (-3.085, 1.969)
小学校3年1回目	-4.832 (-13.897, 4.233)
小学校3年2回目	-0.942 (-3.785, 1.901)
小学校4年1回目	-1.855 (-4.372, 0.662)
小学校4年2回目	-0.674 (-3.679, 2.331)

小学校5年1回目	-2.946 (-5.744, -0.148)*
小学校5年2回目	-2.044 (-5.210, 1.122)
小学校6年1回目	-3.592 (-6.681, -0.503)*
小学校6年2回目	-0.812 (-4.271, 2.646)

重回帰分析は母のBMI, 妊娠中の喫煙, 飲酒, 近海魚の摂取, メチル化解析時期の変数で調整した。

*:有意水準 $p < 0.05$

IGF-2, H19, LINE-1 の臍帯血中 DNA メチル化率を log2 で対数変換した後, メチル化解析時期の違い, 妊娠中の喫煙, 飲酒, 近海魚摂取で調整した重回帰分析を行った。臍帯血中 DNA メチル化率と小学校1年生から6年生の肥満度との間に有意な関連は認められなかった(表3)。

表3 小学生の肥満度と臍帯血中 DNA メチル化率の関係(重回帰分析)

	IGF2 (%)	H19 (%)	LINE1 (%)
	肥満度 B 95%CI	肥満度 B 95%CI	肥満度 B 95%CI
小学校1年1回目	13.916 (-9.490, 37.323)	11.303 (-32.336, 54.942)	-64.906 (-165.633, 35.821)
小学校1年2回目	-14.055 (-45.874, 17.764)	20.137 (-35.123, 75.397)	-72.432 (-206.073, 61.210)
小学校2年1回目	10.283 (-15.312, 35.879)	23.810 (-22.792, 70.412)	-69.938 (-179.627, 39.751)
小学校2年2回目	-7.179 (-42.557, 28.199)	27.334 (-35.087, 89.756)	-89.609 (-241.254, 62.037)
小学校3年1回目	-32.816 (-162.618, 96.985)	88.630 (-150.802, 328.062)	-230.058 (-792.793, 332.678)
小学校3年2回目	-21.662 (-56.973, 13.650)	20.298 (-41.914, 82.510)	-97.638 (-252.289, 57.014)
小学校4年1回目	-5.635 (-37.976, 26.706)	19.269 (-37.950, 76.488)	-117.513 (-251.889, 16.864)
小学校4年2回目	-9.324 (-46.593, 27.945)	23.992 (-41.182, 89.166)	-110.877 (-276.426, 54.671)
小学校5年1回目	-2.995 (-32.740, 26.749)	-4.524 (-62.521, 53.474)	-112.931 (-242.679, 16.818)
小学校5年2回目	-16.732 (-59.298, 25.835)	-5.586 (-82.547, 71.375)	-130.956 (-358.053, 96.141)
小学校6年1回目	0.351 (-43.560, 44.262)	-18.316 (-92.311, 55.679)	-75.066 (-263.398, 113.265)
小学校6年2回目	14.826 (-43.324, 72.977)	-49.396 (-143.018, 44.227)	-128.474 (-403.261, 146.313)

重回帰分析は母の妊娠中の喫煙, 飲酒, 近海魚の摂取, メチル化解析時期の変数で調整した。

血中脂肪酸のうち, パルミトレイン酸が増えるほど小学校5年生6年生の肥満度が低下する有意な関連がみとめられた。血中脂肪酸は臍帯血中 DNA メチル化率と有意に相関したが, DNA メチル化率と小学校1年生から6年生の肥満度との間に有意な関連は認められなかった(表3)。臍帯血中の IGF-2, H19, LINE-1 の DNA メチル化は出生体重との関連が報告されており(Kappil et al., 2015; Michels et al., 2011; Xiao et al., 2016), 児の成長発育に関与することが示唆されている。しかし本研究では学童期(小学生)の肥満度と, 出生時の DNA メチル化率とは有意な関連が認められなかった。本研究の結果から胎児期の環境要因が学童期の肥満度に影響する作用機序に関して, 出生時の IGF-2, H19, LINE-1 の DNA メチル化が関与する程度は僅かである可能性が考えられた。

小学生の身長や体重と母の妊娠中の喫煙や飲酒が関連したが, 一方で肥満度と母の妊娠中の喫煙や飲酒とは関係しなかった。単変量解析で, 近海魚の週1回以上の摂取, および栄養の指標である脂肪酸濃度が小学生の肥満度と関連した。今後はサンプルサイズを拡大して, どのような胎児期の環境要因が学童期の肥満度を関連するかさらに検討する必要がある。合わせて, 児の DNA メチル化率は生後の環境と共に変動することが報告されており, 成育環境と生後の DNA メチル化率を合わせて検討する必要がある。今後の研究として, 生後の生体試料を用いて DNA メチル化率を解析し臍帯血 DNA メチル化率からの変化や生後の環境との解析を行う。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- 1) [Miyashita C.](#), Araki A., Mitsui T., Itoh S., Goudarzi H., Sasaki S., Kajiwara J., Hori H., Cho K., Moriya K., Shinohara N., Nonomura K., Kishi R.; Sex-related differences in the associations between maternal dioxin-like compounds and reproductive and steroid hormones in cord blood: the Hokkaido Study. *Environment International*. 117 175-185, 2018. 査読有
- 2) Miyake K., Kawaguchi A., Miura R., Kobayashi S., Tran N. Q. V., Koybayashi S., [Miyashita C.](#),

- Araki A., Kubota T., Yamagata Z., Kishi R.; Association between DNA methylation in cord blood and maternal smoking: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. Scientific Report. 2018. 8:5654, DOI:10.1038/s41598-018-23772-x. 査読有
- 3) Kobayashi S., Azumi K., Goudarzi H., Araki A., Miyashita C., Kobayashi S., Itoh S., Sasaki S., Ishizuka M., Nakazawa H., Ikeno T., Kishi R.; Effects of prenatal perfluoroalkyl acid exposure on cord blood IGF2/H19 methylation and ponderal index: the Hokkaido study. Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology. 27 (3):251-259, 2017. 査読有
 - 4) Miyashita C., Ait Bamai Y., Araki A., Itoh S., Minatoya M., Kobayashi S., Kajiwara J., Hori T., Kishi R.; Prenatal exposure to dioxin-like compounds is associated with decreased cord blood IgE and increased risk of wheezing in children aged up to 7 years: The Hokkaido Study. Science of the Total Environment. 610-611 191-199, 2017. 査読有
 - 5) Yila T. A., Araki A., Sasaki S., Miyashita C., Itoh K., Ikeno T., Yoshioka E., Kobayashi S., Goudarzi H., Baba T., Braimoh T., Minakami H., Endo T., Sengoku K., Kishi R.; Predictors of folate status among pregnant Japanese women: the Hokkaido Study on Environment and Children's Health, 2002-2012. Br J Nutr. 115, 2227-35, 2016. 査読有

〔学会発表〕（計 4 件）

- 1) 宮下ちひろ, 荒木敦子, 三井貴彦, 伊藤佐智子, 梶原淳睦, 堀就英, 長和俊, 守屋仁彦, 篠原信雄, 岸玲子; 胎児期ダイオキシン類曝露による第二次性徴への影響: 環境と子供の健康北海道スタディ. 第 69 回北海道公衆衛生学会; 2017.11.18; 札幌.
- 2) 宮下ちひろ, 荒木敦子, 伊藤佐智子, 湊屋街子, 小林澄貴, アイツバマイゆふ, 梶原淳睦, 戸高尊, 岸玲子; ダイオキシン類の胎児期曝露による児のアレルギーへの影響: 北海道スタディ. 第 87 回日本衛生学会学術総会. 宮崎 (フェニクス・シーガイア・リゾート). (2017.3.26-28)
- 3) 宮下ちひろ, 荒木敦子, 三井貴彦, 伊藤佐智子, 佐々木成子, 戸高尊, 梶原淳睦, 長和俊, 野々村克也, 岸玲子, ダイオキシン類異性体の曝露が胎生期の性ホルモンに与える影響-北海道スタディ (The Hokkaido Study on Environment and Children's Health), 第 86 回日本衛生学会, 北海道, 旭川, (2016.5.11-13.)
- 4) Miyashita, C., R. Kishi, A. Araki, Hokkaido Study on Environment and Children's Health: Overview, and Findings of PCBs/dioxins Exposure and Birth Size, & Allergies and Infections, ISEE-ISES AC2016, Sapporo, Hokkaido, Japan, (2016.6.26-29)

〔図書〕

該当なし

〔産業財産権〕

○出願状況

該当なし

○取得状況

該当なし

〔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/>

環境と子どもの健康に関する研究・北海道スタディ

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

環境と健康ひろば

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

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし