

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390157

研究課題名(和文) 環境化学物質によるエピジェネティクス変化と次世代影響の解明

研究課題名(英文) Elucidating the epigenetic effects of environmental chemicals and their impacts on next generation

研究代表者

安住 薫 (Kaoru, Azumi)

北海道大学・環境健康科学研究教育センター・客員研究員

研究者番号：90221720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円、(間接経費) 4,410,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、胎児期の環境化学物質曝露が臍帯血のIGF2/H19領域、LINE1のDNAメチル化に及ぼす影響について検討した。札幌の一産科病院で2002年-2005年にリクルートし同意を得た妊婦514名のうち、臍帯血の得られた267名を対象とし、パイロシーケンス法を用いてIGF2/H19、LINE1領域の臍帯血DNAメチル化について定量を行い、環境化学物質との関連について重回帰分析にて検討を行った。交絡因子で調整後、PFOA曝露によるIGF2メチル化の有意な低下、MEHP曝露によるH19メチル化の有意な低下、水銀曝露によるLINE1メチル化の有意な増加が認められた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of prenatal exposure to environmental chemicals on IGF2/H19 and LINE1 methylation. Among 514 pregnant women recruited at Toho Hospital (Sapporo, Japan) during 2002-2005, 267 mother-infant pairs with cord blood samples were subjected to this study. DNA methylation was quantified by bisulfite pyrosequencing. Concentrations of PFOS, PFOA, MEHP, Dioxins, PCBs in maternal blood and methylmercury in maternal hair were analyzed into their association with DNA methylation in multiple linear regression models. After adjustment for potential confounders, we observed hypomethylation at IGF2 by PFOA exposure (beta = -1.60, 95% CI: -2.98 to -0.22), hypomethylation at H19 by MEHP exposure (beta = -0.84, 95% CI: -1.68 to -0.00) and hypermethylation at LINE1 by methylmercury exposure (beta = 0.71, 95% CI: 0.07 to 1.36).

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：環境化学物質 環境疫学 前向きコホート エピジェネティクス DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

近年の疫学的な調査により PCB やダイオキシンなどの環境化学物質の胎児期曝露が児の成長発達や疾病発症に影響を及ぼすことが明らかにされつつある。その一方、疾患の原因遺伝子の探索がゲノムワイドな一塩基多型(SNPs)解析法で精力的になされているが、単一、あるいは数個の遺伝子の異常のみで説明のつく疾患はごくわずかであることが示され、遺伝子の後天的な制御(DNAメチル化・ヒストン修飾などのエピジェネティクス)が異常なために発症する疾患がわかってきた。本研究では、PCB・ダイオキシン類、ビスフェノールA、有機フッ素系化合物等の母体血中濃度と出生児体格、神経発達、アレルギー疾患などのアウトカムが詳細に解析されている「前向き出生コホート(母子500組)」の保存サンプルDNAを用いて網羅的なDNAメチル化解析を行い、遺伝子の後天的修飾(エピジェネティクス)に着目して環境化学物質の「次世代健康影響の発生メカニズム」の解明を試みた。

近年、胎児期の化学物質曝露等の外的環境が、児のDNAメチル化を始めとするエピジェネティック制御機構に及ぼす影響が懸念されている。DNAメチル化は遺伝子発現・細胞分化に関わっており、細胞独自のメチル化パターンは細胞分裂後も維持されることから、胎児期の環境と生後の表現型を結ぶ重要な因子だと考えられている。なかでもInsulin-like growth factor 2 (IGF2)は胎児発育に重要な成長因子で、これまでにこの領域のメチル化異常と出生体重のほか、乳幼児期の肥満、また成人後の大腸がんなどの発症リスクとの関連も報告されており早期の曝露影響を測る「バイオセンサー」としての役割も提唱されている(Cui et al. 2002; Hoyo et al. 2012)。これまでにDNAメチル化は胎児期の飢餓曝露のほか(Dominguez-Salas et al. 2012; Heijmans et al. 2008)、喫煙曝露(Knopik et al. 2012)などの外的要因やメチル基の基質となる妊娠中の葉酸摂取の影響(Dominguez-Salas et al. 2012)を受けることが示唆されている。また、動物実験等の報告によると内分泌攪乱物質曝露の影響も示唆されているが(Baccarelli and Bollati. 2009)、現在のところ疫学研究での報告、特に胎児期曝露の影響を評価した報告は少ない。そこで本研究では、胎児期の内分泌攪乱物質曝露が臍帯血のIGF2/H19領域、およびゲノム全体のメチル化の指標となるLINE1のDNAメチル化に及ぼす影響について出生コホートのサンプルを用いて検討した。

2. 研究の目的

出生コホートのサンプルを用い、胎児期の有機フッ素化合物(PFOS, PFOA)、ダイオキシン・PCBs、フタル酸エステル(MEHP)等の内分泌攪乱物質曝露が臍帯血のIGF2/H19領域、およびゲノム全体のメチル化の指標とな

るLINE1のDNAメチル化に及ぼす影響について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 対象

札幌の一産科病院で2002年7月から2005年10月までにリクルートし、同意を得た妊婦514名のうち、初期調査票・出産時カルテ情報がそろった母児から、臍帯血の得られた267名を対象とした。

(2) 方法

臍帯血 400 μL から Maxwell® 16 DNA Purification Kit (Promega 社)を用いてDNA抽出を行った。抽出したDNAをEpitect Plus Bisulfite Kit (Qiagen 社)にてバイサルファイト処理を行い、IGF2 DMR0 (chr11p15.5, site 1: 2,109,519; site 2: 2,109,516; NCBI Human Genome Build 37.1), H19 DMR

(表1) 母児属性 N=267

	N (%)	Mean (±SD)
Maternal characteristics		
Maternal age (year)	267	30.0 (±4.9)
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)	267	20.9 (±2.9)
Maternal weight gain (kg)	254	10.6 (±3.9)
Parity (times)		
0	94 (35.2)	
≥ 1	173 (64.8)	
Educational level (year)		
≤ 12	120 (44.9)	
> 12	147 (55.1)	
Annual household income		
< 3	48 (18.1)	
3-5	136 (51.3)	
5-7	60 (22.6)	
> 7	21 (7.9)	
missing	2	
Smoking during pregnancy		
No	220 (82.4)	
Yes	47 (17.6)	
Alcohol consumption		
No	176 (65.9)	
Yes	91 (34.1)	
Fish consumption	247	47.0 (±32.1)
Blood sampling period		
Before delivery	193 (72.6)	
After delivery	73 (27.4)	
missing	1	
Blood sampling (days)		
All	266	246.7 (±29.5)
Before delivery	193	234.5 (±25.3)
After delivery	73	278.9 (±6.7)
Hair permanent		
No	174 (70.4)	
Yes	73 (29.6)	
missing	20	
Infant characteristics		
Gestational age (week)	267	39.4 (±1.0)
Sex		
Male	125 (46.8)	
Female	142 (53.2)	
Birth weight (g)	267	3133 (±334)

(表2) 母児属性と環境化学物質濃度との関連

	PFOS (ng/ml)		PFOA (ng/ml)		MEHP (nmol/ml)		ΣDioxin-TEQ (pg/g lipid)		ΣPCBs (ng/g lipid)		Hg (ng/g)	
	N	Mean	N	Mean	N	Mean	N	Mean	N	Mean	N	Mean
Maternal characteristics												
Maternal age (year)	234	r=-0.12	234	r=-0.06	257	r=0.05	238	r=0.29**	239	r=0.46**	246	r=0.04
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²) ^a	234	r=-0.06	234	r=-0.11	257	r=0.03	238	r=0.02	239	r=-0.05	246	r=-0.04
Maternal weight gain (kg) ^b	223	r=-0.01	223	r=0.09	244	r=-0.03	229	r=-0.20**	230	r=-0.19**	240	r=0.04
Parity (times) ^c												
0	83	6.26**	83	1.89**	90	0.05	85	16.5*	86	111.1	87	1.5
≥1	151	5.02	151	1.29	167	0.05	153	14.6	153	106.6	159	1.5
Educational level (year) ^d												
≤12	108	5.4	108	1.4*	115	0.04	101	14.4	102	104.3	108	1.5
>12	126	5.5	126	1.6	142	0.05	137	15.9	137	111.1	138	1.5
Annual household income ^e												
<3	45	6.0	45	1.6	47	0.04	37	13.8**	37	87.9**	46	1.5
3-5	119	5.3	119	1.4	133	0.05	123	14.6	124	102.8	123	1.5
5-7	50	5.2	50	1.5	56	0.05	57	16.8	57	125.9	56	1.6
>7	18	5.9	18	1.9	19	0.03	21	17.4	21	127.9	20	1.6
Smoking during pregnancy ^f												
No	196	5.5	196	1.5	212	0.05	203	15.4	203	107.9	203	1.5
Yes	38	5.1	38	1.3	45	0.04	35	14.2	36	109.7	43	1.4
Alcohol consumption during pregnancy ^g												
No	159	5.5	159	1.5	171	0.05	158	15.0	158	104.7	168	1.5
Yes	76	5.3	76	1.5	87	0.05	81	15.7	81	115	79	1.5
Fish consumption	220	r=-0.08	220	r=-0.08	237	r=-0.11	221	r=0.15*	222	r=0.22**	246	r=0.23**
Blood sampling period ^h												
Before delivery	176	5.7**	176	1.6	184	0.05**	169	15.6	170	109.9	176	1.5
After delivery	58	4.6	58	1.3	73	0.04	68	14.4	68	104.4	69	1.5
Blood sampling (days) ⁱ												
All	234	r=-0.26**	234	r=-0.19**	257	r=-0.25**	237	r=-0.09	238	r=-0.06	-	-
Before delivery	176	r=-0.21**	176	r=-0.22**	184	r=-0.22**	169	r=-0.06	170	r=-0.06	-	-
After delivery	58	r=-0.08	58	r=-0.07	73	r=-0.03	68	r=0.03	68	r=0.02	-	-
Hair permanent ^j												
No	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	173	1.5
Yes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	73	1.4
Infant characteristics												
Gestational age (week) ^k	234	r=0.031	234	r=0.05	257	r=-0.01	238	r=0.06	239	r=0.09	246	r=0.01
Sex ^l												
Male	105	5.62	105	1.6	120	0.04	111	15.2	112	106.1	115	1.4
Female	129	5.34	129	1.4	137	0.05	127	15.3	127	110	131	1.6

^a Spearman's correlation, ^b Mann-Whitney U-test, ^c Kruskal-Wallis
^d *p<0.05, **p<0.01

(chr11p15.5, site 1: 1,964,261; site 2: 1,964,259; site 3: 1,964,257; site 4: 1,964,254), LINE1の3遺伝子領域について、Pyromark Q24 system (Qiagen社)にてDNAメチル化の定量を行った。

母体血中PFOS・PFOA濃度はLC-MS/MS、MEHP濃度はGC-MS、ダイオキシン・PCBs濃度はHRGC/HRMSにより測定された。母毛髪中の総水銀濃度は酸化燃焼金アマルガム法(AAS法)により測定された。ダイオキシン総量は毒性等量(TEQ)に従い算出した(Van den Berg et al. 2005)。ΣDioxin-TEQはPCDDs 7異性体、PCDFs 10異性体、Non-ortho PCBs 4異性体、Mono-ortho PCBs 10異性体の総量、ΣPCBsは58種類のPCB異性体の総量から計算した。

(3) 統計解析

母児の属性と化学物質濃度との関連について、スピアマンの相関係数、Mann-Whitney U検定、Kruskal-Wallis検定を使用した。曝露影響評価の統計解析には重回帰分析を用いた。曝露濃度はlog₁₀変換した値を用い、また濃度が検出下限値以下の場合はその半値を代入した。

(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北海道大学大学院医学研究科・医の倫理委員会の承認を得た。本研究によって得られた個人名及び個人データの漏洩については、データの管理保管に適切な保管場所を確保するなどの方法により行うとともに、研究者の道義的責任に基づいて個人データをいかなる形でも本研究の研究者以外の外部の者に触れられないように厳重に保管し、取り扱った。

4. 研究成果

本集団における母児の属性は以下の通りであった(表1)。母の年齢の平均は30.0才(±4.9)、出生体重の平均は3133g(±334)であった。また、臍帯血DNAメチル化率の平均値(±SD)は、IGF2が48.7%(±2.9)、H19が52.3%(±2.0)、LINE1が75.8%(±1.1)であった。また、母体血中化学物質濃度の中央値(最小値、最大値)は、PFOS 5.00 ng/mL (1.40 to 16.20)、PFOA 1.40 ng/mL (0.25 to 5.30)、MEHP 0.033 nmol/mL (0.012 to 0.365)、ΣDioxins-TEQ 14.2 pg/g lipid (3.2 to 42.9)、ΣPCBs 100.4 ng/g lipid (16.0 to 326.8)、22'44'55'-HxCB (#153) 22.7 ng/g lipid (2.9 to 77.2)、母毛髪中のメチル水銀は1.43 ppm (0.30 to 7.55)であった。

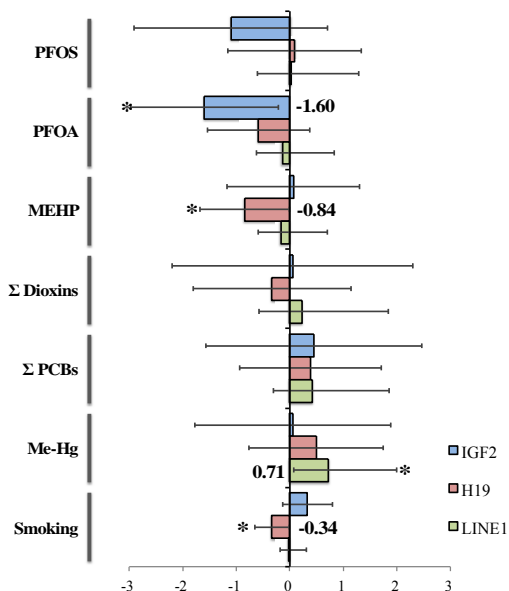
次に母体血中化学物質濃度および母毛髪中メチル水銀濃度と、母児の属性との関連について解析を行った(表2)。ΣDioxin-TEQとΣPCBsで母の年齢との間に有意な関連が見られた(r=0.29, p<0.001; r=0.46, p<0.001)。また有意ではなかったが、PFOS・PFOAでは母の年齢との間に負の関連が認められた。母の学歴・世帯収入といった社会経済要因と、PFOA(母の学歴)、ΣDioxin-TEQ・ΣPCBs(世帯収入)との間に有意な関連が認められた。魚摂取量はΣDioxin-TEQ(r=0.15, p=0.03)・ΣPCBs(r=0.22, p<0.001)・メチル水銀(r=0.23, p<0.001)との間にそれぞれ有意な関連がみられた。母体血の採血時期はPFOS、MEHPの値を有意に低下させた(p<0.001)。

表3・図1にそれぞれの曝露によるDNAメチル化への影響を重回帰分析で検討した結果を示した。それぞれの化学物質濃度が10倍になったときのメチル化率の変化を棒グラフで、95%信頼区間をエラーバーで表した。母年齢、母の学歴、児の性別、妊娠中喫煙、母体血採血時期、魚摂取量(ΣDioxin-TEQ・ΣPCBs・メチル水銀)で調整した結果、母体血中PFOA濃度(log₁₀変換)と臍帯血IGF2メチル化率との間に有意な負の相関が認められた(β=-1.60, 95% CI: -2.98 to -0.22)。また、有意ではなかったが、PFOSでも同様の傾向が認められた(β=-1.10, 95% CI: -2.91 to 0.71)。母体血中MEHP濃度(log₁₀変換)とH19メチル化率との間には有意な負の相関が認められた(β=-0.84, 95% CI: -1.68 to -0.00)。母毛髪中メチル水銀量(log₁₀

(表3) 重回帰分析による環境化学物質のDNAメチル化への影響

	N	IGF2 (%)		H19 (%)		LINE1 (%)	
		β	p	β	p	β	p
PFOS	235	-1.10	0.23	0.09	0.89	0.02	0.94
PFOA	235	-1.60	0.02*	-0.59	0.23	-0.14	0.57
MEHP	258	0.06	0.92	-0.84	<.05*	-0.16	0.46
ΣDioxins	221	0.05	0.97	-0.33	0.66	0.23	0.58
ΣPCBs	221	0.45	0.66	0.39	0.56	0.41	0.26
Me-Hg	247	0.06	0.88	0.49	0.46	0.71	0.02*
Smoking	267	0.33	0.15	-0.34	0.04*	-0.02	0.83

(図1) 環境化学物質のメチル化への影響



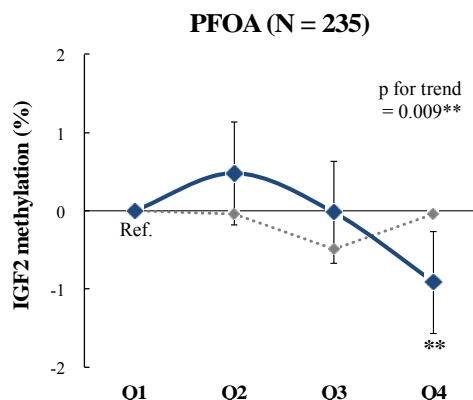
変換)と LINE1 メチル化との間には有意な正の相関がみられた ($\beta = 0.71$, 95% CI: 0.07 to 1.36)。その他、ダイオキシン(TEQ)、PCBの総量と3遺伝子領域のメチル化との間に有意な関連は認められなかった。

さらにPFOS・PFOA濃度を四分位にわけ、曝露によるIGF2メチル化変化の濃度依存的な関係について解析した結果を行った(図2)。交絡要因で調整後、PFOA曝露では第1四分位と比較第4四分位で0.91%メチル化率の低下が認められた。また、第2四分位から第4四分位にかけてIGF2メチル化の減少傾向が認められた (p for trend = 0.009)。PFOS曝露について、有意な関連は認められなかった(図2・破線部)。

本研究により、胎児期の内分泌攪乱物質曝露の臍帯血DNAメチル化への影響については、PFOA曝露によるIGF2低メチル化 ($\beta = -1.60$, 95% CI: -2.98 to -0.22)、MEHP曝露によるH19低メチル化 ($\beta = -0.84$, 95% CI: -1.68 to -0.00)、メチル水銀曝露によるLINE1高メチル化 ($\beta = 0.71$, 95% CI: 0.07 to 1.36)が認められ、PFOS・PFOA、MEHPの胎児期曝露によるIGF2/H19領域メチル化への影響、メチル水銀曝露によるゲノム全体のメチル化の亢進が示唆された。我々は日常的に無数の環境化学物質に曝露されており、それらは相互に相関しているため、個々の影響を切り離して評価を行うのは重回帰分析では難しい。今後は本研究で観察されたメチル化の変化が、それぞれの化学物質による独立の作用なのか、もしくは相加・相乗作用によるものなのかを、寄与度や方向性をグラフィカルモデリングなどの統計手法を用いて解析する必要がある。また、IGF2/H19領域のメチル化により調節されているIGF2タンパク質は胎児期の成長に重要であり、また、小児期の肥満との関連も報告されている(Perkins et al. 2012)。本研究で観察されたこ

れらの遺伝子のメチル化の変化が実際に児の健康にどのような影響を与えているからなる検討を行う必要がある。

(図2) PFOAのIGF2への濃度依存的影響



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)

Kishi R, Kobayashi S, Ikeno T, Araki A, Miyashita C, Itoh S, Sasaki S, Okada E, Kobayashi S, Kashino I et al: **Ten years of progress in the Hokkaido birth cohort study on environment and children's health: cohort profile updated 2013.**

Environmental health and preventive medicine (査読有) 2013, 18(6):429-450.

安住薫, 小林祥子, 岸玲子; 環境化学物質曝露の次世代影響の解明におけるエピジェネティクス研究. 北海道公衆衛生学雑誌. (査読有) 26(2):29-38, 2012.

〔学会発表〕(計 1 件)

小林祥子, 安住薫, 宮下ちひろ, 小林澄貴, 佐々木成子, 石塚真由美, 岸玲子; 環境化学物質の胎児期曝露が臍帯血IGF2DNAメチル化に及ぼす影響. 第83回日本衛生学会学術総会. 金沢. (2013.03.24-26)

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

安住 薫 (AZUMI, Kaoru)

北海道大学・環境健康科学研究教育センター・客員研究員

研究者番号: 90221720

(2)研究分担者

岸 玲子 (KISHI, Reiko)

北海道大学・環境健康科学研究教育センタ

一・特任教授

研究者番号：80112449

(3)連携研究者

佐々木 成子 (SASAKI, Seiko)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30448831

岩野 英知 (IWANO, Hidetomo)

酪農学園大学・獣医学部・准教授

研究者番号：60382488