

平成30年6月12日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15352

研究課題名(和文) 前向き出生コホート研究によるADHDの病態関連バイオマーカーの解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of ADHD based on a prospective birth cohort study

研究代表者

岸 玲子 (Reiko, Kishi)

北海道大学・環境健康科学研究教育センター・センター特別招へい教授

研究者番号：80112449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、胎児期の環境化学物質曝露が注意欠陥/多動性障害(ADHD)発症に至る機序の1つとして、DNAメチル化変化に注目し、臍帯血DNAの45万ヶ所メチル化部位(CpG部位)の網羅的解析を行った。有機フッ素化合物、フタル酸エステル類、ビスフェノールAの胎児期曝露について、多重比較補正後も統計学的に有意に関連するメチル変化部位を特定した。

6歳のADHD-RS調査票で見いだされたADHD疑い群(n=245)とコントロール群(n=317)の臍帯血DNAを用いて、網羅的解析で明らかとなった曝露に起因するCpG部位を次世代シーケンサーにより解析し、メチル変化とADHDとの関連を検討している。

研究成果の概要(英文)：We targeted DNA methylation as a mediator between prenatal exposure to environmental chemicals and attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). We assessed methylation levels at 450K cytosine-guanine dinucleotide sites (CpGs) in cord blood DNA using an Illumina HumanMethylation 450 BeadChip, and examined association between methylation and prenatal exposure to perfluoroalkyl substances, phthalates, and bisphenol A. The epigenome-wide analyses (EWAS) showed significant differences in methylation associated with prenatal exposure.

To investigate prospective association between DNA methylation at birth and ADHD-related behavior at 6 years, we extracted DNA from cord blood of ADHD groups (n=245) identified with ADHD rating scale (ADHD-RS) and control groups (n=317). Using a next-generation sequencer, we have quantified methylation levels at CpGs that showed significant association with prenatal exposure in the EWAS.

研究分野：公衆衛生学

キーワード：環境疫学 ADHD エピジェネティクス DNAメチル化 胎児期曝露

1. 研究開始当初の背景

注意欠陥/多動性障害 (ADHD) は、小児では最も有病率の高い神経発達障害である。世界的な有病率は 7.2% と報告され (Thomas ら, 2015)、その増加傾向が懸念されている。わが国では小規模な疫学調査で有病率 10.5% とされたが (Sugawara ら, 1999)、これに続く疫学研究として、申請者グループでは、北海道全域の 20,929 母児ペアを対象とした大規模出生コホートを立ち上げ、その中で ADHD 関連症状を標準化された調査票 (SDQ および ADHD-RS 日本語版) で検討し、その有病率は 5% であった。

ADHD の診断は行動観察評価と問診に基づいて行われるため、診断者による差が生じやすい。また、症状は多様で病態定義は確立されていない。現在までに、認知機能検査、脳波検査、ニューロイメージング検査等が病態把握や薬効評価に役立っているが、早期発見への応用は難しく、発症機序に基づいたマーカー分子の研究が客観的病態評価、診断確定、および、早期発見のため喫緊に必要とされている。

ADHD の約 70% は遺伝によるといわれ (Faranone ら, 2005)、数多くの ADHD リスク遺伝子が報告された (Hawi ら, 2015)。しかし、発症メカニズムはそれら遺伝的素因のみで説明することはできず、多くの環境要因が関与していることが明らかとなった (Banerjee ら, 2011)。一方、環境要因に起因する後天的遺伝子制御機構・エピジェネティクスの関与も示唆され (Abdolmaleky ら, 2014)、エピジェネティクスの 1 つである DNA メチル化変化が成長後の ADHD 症状に関連することが報告されている (van Mil ら, 2014)。しかし、メチル化変化を引き起こす環境要因については解明できておらず、また、DNA メチル化変化が実際にどのような生体機能の変化をもたらす ADHD の症状に影響を与えるのかを明らかにした研究はない。

2. 研究の目的

本研究は、胎児期の環境化学物質曝露が ADHD 発症に至る機序の 1 つとして、DNA メチル化変化に注目し、既に立ち上げた前向き出生コホート研究で、曝露に誘引されたメチル化変化と ADHD 発症との関連を明らかにする。本研究で明らかにされる臍帯血中の DNA メチル化マークは ADHD 発症機序に基づいた胎児期のバイオマーカーとして、早期発見・客観的病態評価に貢献することが期待される。

3. 研究の方法

(1) 北海道スタディ札幌コホート参加者 292 名の臍帯血 DNA について、Infinium Human Methylation 450 BeadChip (450K, イルミナ社) により網羅的メチル化解析を行い、45 万メチル化部位 (CpG 部位) のメチル化データを取得した。得られたメチル化値を標準化後、バッチ間の補正を行った。臍帯血中の

細胞組成をメチル化値から推定した (Bakulski ら, 2016)。有機フッ素化合物 (PFOS, PFOA; n=190)、フタル酸エステル類 (MEHP; n=203)、および、ビスフェノール A (BPA; n=287)、それぞれの曝露濃度と補正後のメチル化値との関連を Robust linear regression (Fox and Weisberg 2011)、経験ベイズ法 (Smyth 2004) を用いて解析した。BPA との関連では母の年齢、教育歴、妊娠前 BMI、妊娠中喫煙、児の性別、在胎週数、臍帯血細胞組成推定値で調整した。MEHP との関連では母体血採血時期、有機フッ素化合物との関連では、出産歴と母体血採血時期を上記因子に加え調整した。有機フッ素化合物とメチル化との関連については、台湾の出生コホート (TMICS, n=37) の 450K データを用いて結果の検証を行った。

(2) メチル変化と ADHD との関連を検討するため、大規模コホートの 6 歳 ADHD-RS 調査票で見いだされた ADHD 疑い群 (n=245) とコントロール群 (n=317) の臍帯血 DNA について、網羅的メチル化解析で特定したメチル化変化部位 (differentially methylated position, DMP) のメチル化率を Ion PGM 次世代シーケンサー (サーモフィッシュャー社) を用いたバイサルファイトシーケンス法により測定した。

4. 研究成果

(1) 環境化学物質曝露の DNA メチル化網羅的解析

図 1 に \log_{10} 変換後の PFOS (A)、PFOA (B) 曝露の網羅的解析結果を示す (Miura ら, 2018)。4 つの DMPs (cg0204432, *CXADRP3*; cg25705526, *SNAPIN*; cg11260715, *AC002480.3*; cg04461802, *GPR126*) が多重比較補正後も統計学的に有意だった (False-discovery rate (FDR) < 0.05)。最も有意な P 値を示した上位 20 の DMPs のうち、*ZBTB7A* (cg16242615)、*USP2-AS1* (cg21876869)、*TCP11L2* (cg00173435)、*NTN1* (cg18901140) に位置する 4 つの DMPs が TMICS の解析でも同じメチル化変化の方向を示し、P 値は 0.05 以下であった。

また、近隣の CpGs の連続した変化領域 (differentially methylated region, DMR) を Bumphunting 法 (Jaffe ら, 2012) により解析し、*ZFP57*, *CYP2E1*, *SMAD3*, *SLC17A9*, *GFPT2*, *DUSP22*, *TCERGIL* 遺伝子上の DMRs が TMICS の解析でもメチル化変化の方向が同じであることを見出した。*ZFP57* (*ZFP57* Zinc Finger Protein) はゲノム刷り込み制御領域におけるエピゲノム修飾維持に重要なタンパク質である (Riso ら, 2016)。また、出生時の *SMAD3* (*SMAD* Family Member 3) のメチル化変化は成長後の喘息 (DeVries ら, 2016)、*GFPT2* (*Glutamine-Fructose-6-Phosphate Transaminase 2*) のメチル化変化は肥満 (Kresovich ら, 2017) との関連が報告されている。*CYP2E1* (*Cytochrome P450* Family 2

Subfamily E Member 1)、*DUSP2* (Dual Specificity Phosphatase 2)、および、*TCERG1L* (transcription elongation regulator 1-like)のメチル化はリュウマチ (Mok ら, 2017)や大腸がん (Bae ら, 2014)との関連が報告されている。

BPAおよびMEHP曝露についても曝露濃度と有意に関連する DMPs を特定した (投稿準備中)。これらの結果より、一般環境レベルの化学物質胎児期曝露によって児のエピゲノムに変化が生じ、成長後の健康に影響を与える可能性が示唆された。

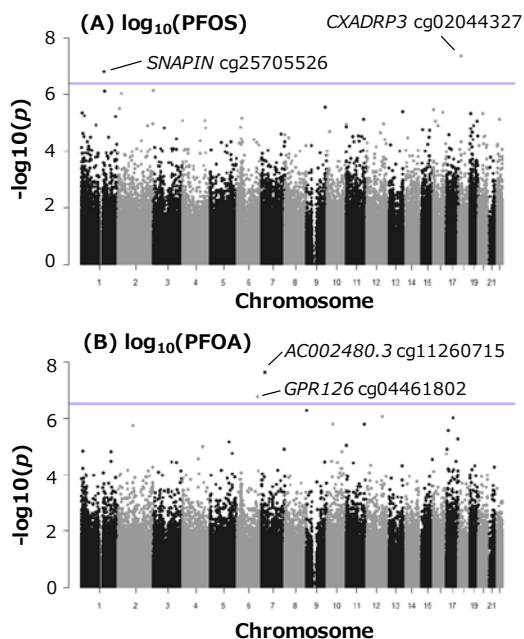


図1. PFOS曝露(A)、PFOA曝露(B)と45万CpGメチル化との関連 (マンハッタンプロット) 横線: FDRでの有意水準 (Miura ら, 2018)

(2)メチル化変化とADHDとの関連

環境化学物質曝露によるメチル化変化とADHDとの関連を調べるため、まず、神経行動発達への影響についての報告が多いBPA曝露 (Tran and Miyake, 2017) について検討することとし、網羅解析で特定したDMPs ($P < 0.01$)の中から、神経系に分類される8遺伝子、11CpG部位を選択した (表1)。ADHD疑い群とコントロール群の臍帯血DNAを抽出後、メチル化率を次世代シーケンサーにより測定した。しかし、得られたメチル化率とADHD疑いとなるオッズとの有意な関連は認められなかった。この理由として、今回の次世代シーケンサーを用いたメチル化解析において、一定の信頼度を保っているかの指標となるカバレッジ数 (各CpG部位配列を重ねて読んだ回数) が十分に取得できなかったこと、サンプル間でカバレッジ数がばらついてしまい外れ値が多くなってしまったことが原因の1つと考えられ、現在、再解析を行っている。また、選択したCpG部位が妥当でなかったことも考えられ、今後、解析するCpG

部位の再検討が必要と考えている。

表1. BPA曝露によるメチル化変化の神経発達との関連解析部位

CpG No.	遺伝子	機能
cg26748578 cg19220282	<i>SLC1A4</i>	ナトリウム依存性中性アミノ酸輸送タンパク。この遺伝子の欠損は発達遅延や知的障害に関連している
cg21938532 cg12573482	<i>GNAS</i>	膜結合型GTPアーゼ
cg26902026	<i>SNX19</i>	小胞体輸送タンパク
cg12458485	<i>GMPPA</i>	GDP-マンノースピロホスホラーゼ
cg00047050	<i>CUL5</i>	E3ユビキチンリガーゼ複合体の主要成分
cg05714773	<i>TMEM176B</i>	小脳顆粒細胞の発生にかかわる
cg23016726	<i>CACNA1I</i>	カルシウムチャンネル
cg25967418	<i>PCDHA7</i>	神経発達に重要な役割を持つプロトカドヘリンの1つ
cg00888801	<i>PCDHGA4</i>	神経発達に重要な役割を持つプロトカドヘリンの1つ

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 15件)

- 1) Yamazaki K., Araki A., Nakajima S., Miyashita C., Ikeno T., Itoh S., Minatoya M., Kobayashi S., Mizutani F., Chisaki Y., Kishi R.; Association between prenatal exposure to organochlorine pesticides and the mental and psychomotor development of infants at ages 6 and 18 months: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *Neurotoxicology*. 2018. DOI: 10.1016/j.neuro.2017.11.011, 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. DOI:10.1038/s41598-018-23772-x, 査読有
- 3) Kishi R., Araki A., Minatoya M., Itoh S., Goudarzi H., Miyashita C.; Birth cohorts in Asia: The importance, advantages, and disadvantages of different-sized cohorts. *Science of the Total Environment*. 615 1143-1154, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.268>, 査読有
- 4) Minatoya M., Itoh S., Araki A., Tamura N., Yamazaki K., Miyashita C., Kishi R.; Association between fetal adipokines and child behavioral

- problems at preschool age: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 15(1) (120):2018. doi:10.3390/ijerph15010120, 査読有
- 5) Miura R., Araki A., Miyashita C., Kobayashi Su., Kobayashi Sa., Wang SL., Chen CH., Miyake K., Ishizuka M., Iwasaki Y., Y.M. Ito, Kubota T., Kishi R.; An epigenome-wide study of cord blood DNA methylations in relation to prenatal perfluoroalkyl substance exposure: the Hokkaido study. *Environment International*. 115 21-28, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.03.004>, 査読有
- 6) Kishi R., Araki A., Minatoya M., Hanaoka T., Miyashita C., Itoh S., Kobayashi S., Ait Bamai Y., Yamazaki K., Miura R., Tamura N., Ito K., Goudarzi H.; The Hokkaido birth cohort study on environment and children's health: Cohort profile - updated 2017. *Environmental Health and Preventive Medicine*. 22-46, 2017. DOI 10.1186/s12199-017-0654-3, 査読有
- 7) 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. (<http://www.nature.com/jes>), 査読有
- 8) Nakajima S., Saijo Y., Miyashita C., Ikeno T., Sasaki S., Kajiwara J., Kishi R.; Sex-specific differences in effect of prenatal exposure to dioxin-like compounds on neurodevelopment in Japanese children: Sapporo cohort study. *Environmental Research*. 159 222-231, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.08.006>, 査読有
- 9) Kobayashi S., Sata F., Miyashita C., Miura R., Azumi K., Kobayashi S., Goudarzi H., Araki A., Ishizuka M., Todaka T., Kajiwara J., Hori T., Kishi R.; 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*. 390 135-145, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.12.002>, 査読有
- 10) Minatoya M., Itoh S., Araki A., Tamura N., Yamazaki K., Nishihara S., Miyashita C., Kishi R.; Associated factors of behavioural problems in children at preschool age: the Hokkaido study on environment and children's health. *Child Care Health Dev.* 43 (3):385-392, 2016. [|https://doi.org/10.1111/cch.12424](https://doi.org/10.1111/cch.12424), 査読有
- 11) 岸玲子, 荒木敦子, 宮下ちひろ, 伊藤佐智子, 湊屋街子, 小林澄貴, 山崎圭子, アイツバマイゆふ, 三浦りゅう, 田村菜穂美「2万人規模の出生コーホートと、500人規模の小コーホートからなる北海道スタディが目指してきたもの: 環境と子どもの健康—先天異常・発達・アレルギーの15年におよぶ経験と成果」、*日本衛生学雑誌*, 73, 164-177, 2018, 査読有
- 12) 西原進吉, 荒木敦子, 宮下ちひろ, 山崎圭子, 岸玲子; 殺虫用途の農薬への曝露と ADHD を中心とした神経発達障害との関連についての疫学研究動向. *北海道公衆衛生学雑誌*. 30 (2):27-40, 2016, 査読有
- 13) 小林澄貴, 池野多美子, 荒木敦子, 山崎圭子, 西原進吉, 岸玲子; 環境化学物質の胎児期曝露による児の神経発達への影響に関する疫学文献レビュー: 注意欠如・多動性障害 (AD/HD)・自閉症スペクトラム (ASD) を含めて. *北海道公衆衛生学雑誌*. 29 (2):31-40, 2016, 査読有
- 14) 宮下ちひろ, 小林祥子, 岸玲子, 【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第 17 回 胎児期の化学物質曝露による後天的な遺伝子発現制御への影響, *公衆衛生*, 80(7), 531-537, 2016, 査読有
- 15) 池野多美子, 小林澄貴, 山崎圭子, 西原進吉, 岸玲子, 【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第 16 回 ADHD(注意欠如・多動性障害) と ASD(自閉スペクトラム症), *公衆衛生*, 80(6), 445-450, 2016, 査読有
- [学会発表] (計 14 件)
- 1) 山崎圭子, 荒木敦子, 中島そのみ, 宮下ちひろ, 池野多美子, 伊藤佐智子, 湊屋街子, 水谷太, 荻木洋一, 岸玲子; 胎児期の有機塩素系農薬曝露が 3.5 歳の児の知的機能に及ぼす影響- 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. 22-24)
- 2) 湊屋街子, 伊藤佐智子, 小林澄貴, 山崎圭子, 宮下ちひろ, 荒木敦子, 岸玲子

- 子；胎児期の両親の喫煙と幼児期における ADHD 症状の関連. 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. 22-24)
- 3) 小林澄貴, 佐田文宏, 宮下ちひろ, 三浦りゅう, ゴウダルジ・ホウマヌ, 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. 22-24)
- 4) 湊屋街子, 小林澄貴, 須山聡, 岸玲子; 臍帯血アディポカイン濃度と子どもの発達: 環境と子どもの健康に関する北海道スタディ. 第 76 回日本公衆衛生学会. かごしま県民交遊センター、鹿児島市、鹿児島県 (10/31-11/2, 2017)
- 5) Minatoya M., Itoh S., Miyashita C., Araki A., Tamura N., Yamamoto J., Onoda Y., Matsumura T., Kishi R.; Exposure to bisphenol A and phthalates during pregnancy and child neurobehavioral development at preschool age: The Hokkaido Study. The 29th Annual Scientific Conference of the International Society of Environmental Epidemiology (ISEE) 2017. The University of Sydney, Sydney, Australia. (9/24-28, 2017)
- 6) 山崎圭子, 岸玲子; 胎児期 PCB・Dioxin 曝露が学童期の脳活動に与える影響についての検討. 第 35 回日本生理心理学会. 江戸川大学駒木キャンパス (千葉県流山市) (2017. 5. 27-28)
- 7) 岸玲子; 2 万人規模の大規模出生コホートと、500 人規模の小コホートが目指してきたものと成果 (北海道スタディ 15 年の経験から). 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)
- 8) 湊屋街子, 伊藤佐智子, 宮下ちひろ, 荒木敦子, 佐々木成子, 岩崎雄介, 岸玲子; 胎児期有機フッ素化合物曝露と臍帯血中アディポカイン濃度と出生体格: 北海スタディ. 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)
- 9) Kobayashi, S., R. Miura, C. Miyashita, A. Araki, M. Ishizuka, H. Nakazawa, Y. Ito, T. Kubota, R. Kishi, Epigenome-wide analyses of prenatal perfluoroalkyl acids exposure on cord blood DNA methylation: the Hokkaido study, ISEE2016: 28th Annual Conference International Society for Environmental Epidemiology, (2016. 9. 1-4)
- 10) Minatoya, M., N. Tamura, S. Ito, C. Miyashita, A. Araki, R. Kishi, Associated prenatal factors of behavioral and emotional problems in 5 year-old children: The Hokkaido Study, ISEE2016: 28th Annual Conference International Society for Environmental Epidemiology, Roma, Italy, (2016. 9. 1-4)
- 11) Kobayashi, S., R. Miura, C. Miyashita, A. Araki, M. Ishizuka, H. Nakazawa, Y. M. Ito, T. Kubota, R. Kishi, Epigenome-wide Pathway Analyses of Prenatal Perfluoroalkyl Acids Exposure on Cord Blood DNA Methylation: The Hokkaido Study, ISEE-ISES AC2016, Sapporo, Hokkaido, Japan, (2016. 6. 26-29)
- 12) Minatoya, M., N. Tamura, S. Itoh, S. Suyama, C. Miyashita, A. Araki, T. Saito, A. Nakai, R. Kishi, Prenatal environment and child behavioral and coordination development at preschool age in the Hokkaido Study, ISEE-ISES AC2016, Sapporo, Hokkaido, Japan, (2016. 6. 26-29)
- 13) 池野多美子, 母親の精神健康と児の自閉傾向との関連-子供の健康と環境に関する北海道スタディ-, 第 75 回日本公衆衛生学会総会, 大阪 (グランフロント大阪) (2016. 10. 26-28)
- 14) 山崎圭子, 関あゆみ, 岸玲子; 胎児期 PCB・dioxin 曝露が学童期の脳活動に与える影響についての予備的検討. 第 34 回日本生理心理学会. 名古屋大学 (愛知県名古屋市) (2016. 5. 14-15)
- [図書] (計 0 件)
- [産業財産権] 特になし
- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)
- [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
<https://www.cehs.hokudai.ac.jp/>
- 環境と子どもの健康に関する北海道スタディ
<https://www.cehs.hokudai.ac.jp/hokkaido-study/>
6. 研究組織
(1) 研究代表者
岸 玲子 (KISHI, Reiko)
北海道大学・環境健康科学研究教育センター・特別招へい教授
研究者番号: 80112449

(2)研究分担者

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

齋藤 卓弥 (SAITO, Takuya)
北海道大学・医学研究院・特任教授
研究者番号：20246961

三浦 りゅう (MIURA, Ryu)
北海道大学・環境健康科学研究教育センター・特任助教
研究者番号：20506414

山崎 圭子 (YAMAZAKI, Keiko)
北海道大学・環境健康科学研究教育センター・特任助教
研究者番号：20506414

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者

アイツバマイ ゆふ (AIT BAMAI, Yu)
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：90752907

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