

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年 5月25日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16198

研究課題名(和文)メタボローム解析による化学物質曝露の健康影響評価

研究課題名(英文)Evaluation of the effect of chemical exposure using metabolome analysis

研究代表者

江口 哲史(Eguchi, Akifumi)

千葉大学・予防医学センター・助教

研究者番号：70595826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では残留性有機汚染物質(POPs)や、重金属類をはじめとする環境汚染物質の曝露によるヒトへの影響を、血清・尿中における低分子化合物を包括的に分析するメタボローム解析を用い、それらの組成の変化と化学物質の残留濃度の関係を解析することで解明を試みた。本研究の結果、POPsの一つであるPCBsがエネルギー代謝に関連する生体内パスウェイの変動に関わっている可能性があることおよび、鉛の曝露が腎臓や中枢神経系・ヘム合成系に関わる生体内パスウェイの変動に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the exposure effect of environmental pollutants such as heavy metals and persistent organic pollutants (POPs) on humans by using metabolome analysis that comprehensively analyzes low molecular compounds in serum and urine; We tried to elucidate by analyzing the relationship between profiles of metabolome and residual concentrations of chemical substances.

In this study, residue levels of PCBs were related to glutathione and amino acid metabolism in maternal serum and the amino acid metabolism and ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis (energy metabolism) in cord serum, indicating disruption of metabolic pathways by PCB exposure in pregnant women and fetuses. Residue levels of Pb were associated with ABC transport, possibly related to the disruption of small-molecule transport in the kidney; amino acid, porphyrin, and chlorophyll metabolism; and possibly, the heme biosynthetic pathway.

研究分野：環境分析化学

キーワード：メタボロミクス 残留性有機汚染物質 重金属 コホート調査

1. 研究開始当初の背景

残留性有機汚染物質 (POPs) や、重金属類をはじめとする環境汚染物質による生体への影響は、多様な遺伝子発現プロファイルを変化させることによって引き起こされる複合的な影響である。このような、化学物質の曝露に由来する複雑な生体影響パスウェイの解析手法として、細胞内に数千種類存在する低分子代謝物 (メタボローム) の解析が近年注目されている。しかし、化学物質の曝露影響評価をオミクス解析技術と組み合わせた研究は *in vitro*, *in vivo* の研究が主であり、疫学研究と組み合わせた研究は、疾病や肥満などを対象とした研究がほとんどである。

2. 研究の目的

本研究は細胞内に数千種類存在する低分子代謝物 (メタボローム) の解析を通して周辺環境の変化・化学物質の曝露を反映するバイオマーカーを特定し、環境疫学・環境毒性学の端緒開拓を目指すものである。具体的にはコホート調査により得られたヒト血清・尿中のメタボロームを測定し、環境要因・化学物質の曝露レベル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特定する。さらに、バイオマーカーの機能を解析することで、化学物質曝露による毒性発現機序の解明を試みる。

3. 研究の方法

本研究では代表者が所属する千葉大学予防医学センターにおけるコホートで採取した妊娠女性血清・胎児臍帯血清試料および、愛媛大学沿岸環境科学研究センターに保管されている電気電子機器廃棄物リサイクル従事者・対象地域住民の尿試料を使用し、メタボローム解析を試みた。メタボロームの分析には高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (HPLC-MS/MS) を使い、263 種の主要メタボロームを測定した。測定結果は既報で示した検体中化学物質濃度および年齢・性別などの基本属性と組み合わせ、機械学習により曝露レベルを反映する要因について探索を試みた。

機械学習モデルはモデル確立後に変数重要度を算出し、変数重要度の高いメタボロームをバイオマーカー候補とした。また、バイオマーカー候補となったメタボロームの Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) ID を使い、Reactome, MBrole2 などのオンライン解析ソフトウェアにより enrichment analysis を行った。

4. 研究成果

(1): 千葉出生コホートにおける母体血清・臍帯血清中ポリ塩化ビフェニル残留濃度とメタボローム組成の関係
母体血清・臍帯血清 93 ペアについて PCBs 濃度を測定した結果、母体血清で中央値 350 pg g⁻¹ wet wt, 臍帯血清で 70 pg g⁻¹ wet wt の

PCBs が検出された。PCBs はすべての検体から検出され、その異性体組成はヒト血清中で一般的な組成である CB153 > 138 > 180 > その他異性体のパターンを示した。また、検出された各異性体は互いに強い相関関係を持っており、残留傾向の異なる異性体は検出されなかった (Figure 1)。このため、メタボロームと PCBs の関係解析には検出された異性体濃度を合算した総 PCBs 濃度を使用した。

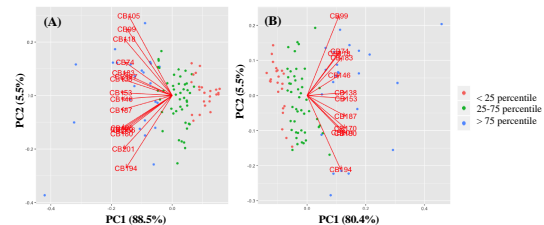


Figure 1. PCA plot of maternal (A) and fetal (B). (A): PC1 and PC2 account for 88.5% and 5.5% of the total variation, respectively.

喫煙習慣・アンケート不備などの検体を解析から取り除いた後 (母体血清: n = 67, 臍帯血清: n = 69)、PCBs 濃度の上位・下位 25% のグループのメタボロームレベルについて、random forest により判別分析を行ったところ、2 群の判別能を表す area under the curve (AUC) は母体血清で AUC = 0.812 と良好な値を示した。2 群の判別に有効だったメタボローム群を enrichment analysis で解析したところ、母体血清ではグルタチオン代謝に関連するパスウェイの変動が示唆された (Table 1)。グルタチオン代謝は動物実験等においても PCBs 曝露により変動するパスウェイの 1 つであり、疫学研究に置いて同様の傾向が認められた点は興味深い。

臍帯血清を用いた際のモデルの精度も同様に AUC = 0.919 と良好な値を示した。2 群の判別に有効だったメタボローム群を enrichment analysis で解析したところ、エネルギー代謝に関連するパスウェイの変動が示唆された (Table 1)。既報において、血清中 PCBs は胎児の出生体重を低下させる可能性があることが示唆されている。本研究においても同様の傾向がデータ解析結果から認められており、これらのパスウェイの変動が PCBs 曝露による低出生体重に関連している可能性が示唆された。

Table 1. Altered metabolic pathway in maternal and cord serum

Annotation	FDR correction
Maternal serum	
Pyrimidine metabolism	1.80E-02
Purine metabolism	3.28E-02
Glutathione metabolism	5.15E-02
Cysteine and methionine metabolism	8.53E-02
Cord serum	
Phenylalanine metabolism	3.40E-02
Glycine, serine and threonine metabolism	3.40E-02
Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	4.51E-02
Arginine and proline metabolism	4.51E-02

しかしながら、本研究では他の化学物質濃度や食事パターンなどについて共変量としていないため、将来的にこれら要因を補完したより詳細な研究が必要である。本研究については国際誌に投稿、受理された(Eguchi et al, Environment international 2017, 102, 157 - 164)。

(2) : 鉛バッテリーリサイクル地域における血中鉛濃度と尿中メタボローム組成の関係解析

研究対象は成人のみとし、ベトナムの鉛バッテリーリサイクル地域住民 (n = 44)、対照地域住民 (n = 51) より 2010-2011 年に採取した尿検体を測定に供した。本研究で対象とした 2 群の食習慣には差が認められなかったが、年齢および飲水量には差が認められたため、これらのパラメータは多変量解析に組み込んで解析を試みた。血中鉛濃度は既報のデータを利用し解析に用いた。

得られた尿中メタボロームデータは、機械学習手法の 1 つである lasso により解析を試みた。解析は、鉛バッテリーリサイクル地域住民、対照地域住民 2 群の判別分析に加え、鉛濃度とメタボロームデータの回帰分析を行った。

本研究で対象とした成人鉛バッテリーリサイクル地域住民の血中鉛濃度 (mean: 48 µg/dL, min-max: 14-122 µg/dL) は対照地域住民 (mean: 3.9 µg/dL, min-max: 0.98 - 10.6 µg/dL) の約 10 倍の値を示した。本値はアメリカ合衆国保健福祉省が推奨する成人血中鉛濃度の推奨基準である 25 µg/dL (Roscoe et al. 2002) を超過していた。また、鉛曝露による腎臓の機能不全が血中鉛濃度 10 µg/dL 程度でも発生することが報告されており (Flora et al. 2012)、本研究における鉛バッテリーリサイクル地域住民血中鉛濃度は健康影響が懸念されるレベルだった。

これらの結果に基づき、鉛バッテリーリサイクル地域住民、対照地域住民 2 群の判別分析を試みた。判別分析の結果、2 群の判別能を表す AUC はトレーニングセットで 0.88、テストセットで 0.92 と高い値を示し、尿中メタボロームの組成から 2 つのグループを明確に判別することができた。また、血中鉛濃度を目的変数として、メタボローム組成から回帰分析を試みたところ、R² 値はトレーニングセットで 0.82、テストセットで 0.65 であり、良好な値が得られた。

変動が認められたメタボロームについて enrichment analysis によるパスウェイ解析を試みた。この結果、低分子化合物の輸送に関わるパスウェイの変動が示唆される結果が得られた。

重金属曝露は腎臓において糖、アミノ酸、リン酸類など、低分子化合物の再吸収低下を引き起こすファンコーニ症候群の発症と関係することが知られている。本研究においてもファンコーニ症候群と同様に、アミノ酸、タンパク質の尿中排泄量増加に関連するパ

スウェイの変動が確認されており、本研究で対象としたベトナム鉛バッテリーリサイクル地域住民が鉛曝露により、腎臓への悪影響を受けている可能性が示唆された (Table 2)。また、関連はより不明瞭ではあったが中枢神経系に関わるパスウェイについても変動が示唆される結果が得られた。

Table 2. Altered metabolic pathways in urine.

	Annotation	FDR correction
	ABC transporters	1.50E-03
	Histidine metabolism	1.09E-02
	Arginine and Proline Metabolism	1.68E-02
	Urea Cycle	1.68E-02
	Histidine Metabolism	1.68E-02
	Citrulline biosynthesis	1.90E-02
	Porphyrin and chlorophyll metabolism	2.78E-02
	Glycine and Serine Metabolism	4.80E-02

鉛曝露による中枢神経系への影響は既報があるが、尿中メタボロームの変動から神経系への影響に関連するマーカーが検出されたことは意義深い。

本研究の結果は国際誌に投稿中である。

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. Exploration of potential biomarkers and related biological pathways for PCB exposure in maternal and cord serum: A pilot birth cohort study in Chiba, Japan.

Eguchi A, Sakurai K, Watanabe M, Mori C. Environment international 2017, 102, 157 - 164 (査読あり)

2. Accelerated oligosaccharide absorption and altered serum metabolites during oral glucose tolerance test in young Japanese with impaired glucose tolerance.

Miki T, Lee EY, Eguchi A, Sakurai K, Sawabe Y, Yoshida T, Saito K, Yokoh H, Ishikawa K, Yokote K, Kuzuya T, Miki E, Mori C, Nomura F. Journal of diabetes investigation, 2018 in press (査読あり)

[学会発表] (計 4 件)

1. Exploration of lead exposure related biological pathways in Vietnamese acid-lead battery recycling workers.

Akifumi Eguchi, Kei Nomiyama, Kenichi Sakurai, Pham Thi Kim Trang, Pham Hung Viet, Shin Takahashi, Hisato Iwata, Shinsuke Tanabe, Emiko Todaka, Chisato Mori

Chemical Hazard Symposium, 2017 北海道札幌市

2. Effects of fetal exposure of PCBs with omics analysis such as microbiome, epigenome and metabolome analyses using maternal blood, umbilical cord blood and cord tissues in birth cohort study named Chiba Study of Mother and Children's Health (C-MACH) Chisato Mori, Akifumi Eguchi, Kenichi Sakurai, Kaori Tachibana, Emiko Todaka Society of Toxicology - Annual Meeting 2017, Baltimore, USA

3. The relationship between congener profiles of PCBs and levels of metabolome in maternal serum and H19 methylation in cord tissues Chisato Mori, Akifumi Eguchi, Hidenobu Miyaso, Kenichi Sakurai
環境ホルモン学会第 20 回研究発表会 2017 兵庫県神戸市

4. メタボローム解析による血清中 PCBs 曝露マーカーの探索 江口 哲史, 櫻井 健一, 渡邊 応宏, 森千里 第 22 回日本環境毒性学会研究発表会 2017 愛媛県松山市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 2 件)

名称: 妊娠糖尿病の発症リスクの診断用バイオマーカー

発明者: 三木 隆司、李 恩瑛、江口 哲史、櫻井 健一

権利者: 国立大学法人千葉大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-176169

出願年月日: 2016 年 9 月 9 日

国内外の別: 国内

名称: 妊娠糖尿病の発症リスクの診断用バイオマーカー

発明者: 櫻井健一、森千里、江口哲史、山本 緑

権利者: 国立大学法人千葉大学

種類: 特許

番号: 特願 2017-146681

出願年月日: 2017 年 7 月 28 日

国内外の別: 国内

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

https://www.researchgate.net/profile/Akifumi_Eguchi

<https://researchmap.jp/siero5335/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

江口 哲史 (Eguchi Akifumi)

千葉大学・予防医学センター・助教

研究者番号: 70595826