

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に関する研究

研究分担者 安住 薫 北海道大学環境健康科学研究教育センター特任講師
研究代表者 岸 玲子 北海道大学環境健康科学研究教育センター特任教授

研究要旨

環境化学物質の胎児期曝露が、児の発育・発達、疾病に影響を及ぼすことが明らかになりつつある。その作用機序の解明に、最近、エピジェネティクスが注目されている。本研究では、胎児期環境化学物質曝露が児ゲノム DNA のメチル化に与える影響について、研究の現状と課題を把握することを目的とし、PubMed を用いて 2012 年までの先行研究を検索して報告内容を精査した。その結果、タバコ由来化学物質や多環芳香族炭化水素などの環境化学物質の胎児期曝露により、児ゲノム DNA のメチル化パターンが変動することが確認された。曝露要因の中では、喫煙曝露による影響を調べた報告が最も多かった。DNA メチル化の変化は蓄積することによって遺伝子発現を変化させるため、胎児期の化学物質曝露によって生じる児ゲノム DNA メチル化の変化は、胎児の発育・発達への影響のみならず、出生後の児の健康リスクに影響を及ぼすことが示唆された。

研究協力者

小林 祥子
(北海道大学環境健康科学研究教育センター)

A . 研究目的

現代の先進国では、多種多様な化学物質を原材料とした化学製品が、私たちに便利で快適な生活を提供してくれている。一方で、私たちは環境中の化学物質に常に曝露されており、これらの化学物質の人体への影響が懸念されている。特に胎児期においては、母体経由の化学物質への曝露が胎児の発育、あるいは出生後の児の健康に影響を及ぼすことが Colborn らにより指摘された¹⁾。また、Barker らは、胎児期の低栄養などの環境が、成人後の循環器疾患や 2 型糖尿病などの生活習慣病罹患率に影響を及ぼす「胎児プログラミング仮説」を提唱した²⁾。この仮説は、Gluckman と Hanson らによって、胎児期に加えて乳幼児期の環境もその後の健康に影響する「Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD)」の概念となり³⁾、こ

れらの仮説を検証する研究が精力的になされている。さらに最近では、胎児期のプログラミングのメカニズムを明らかにするために、遺伝要因と環境要因の交互作用の解析への関心も高まっている。

欧州⁴⁾、米国⁵⁾、台湾⁶⁾ではすでに複数の出生コーホートが立ち上がり、両親のライフスタイルや環境化学物質曝露の児の健康に与える影響を解明する研究がなされているが、日本においては、我々のグループが初めて 2001 年に「環境と子どもの健康に関する北海道スタディ」を立ち上げ、これまでに、札幌市内 514 人の小規模コーホートおよび北海道全域 20,000 人の大規模コーホートの二つの追跡型疫学研究を実施してきた⁷⁾。この研究により、母親血液中のダイオキシン類濃度が高いほど、児の出生体重が有意に低く、また、生後の中耳炎罹患率が有意に高いこと、この影響は男児で顕著であることが明らかになった。さらに、母親の妊娠中の喫煙によって児の出生体重が有意に低下し、化学物質の解毒に關与する母親 AhR 遺伝子と CYP1A1 遺伝子、

CYP1A1 遺伝子と GSTM1 遺伝子の特定の塩基配列の組み合わせで児の出生体重への影響が大きいことなどが明らかになった。これらの成果からも、遺伝要因と環境要因の相互作用が児の発育に影響を及ぼすことが示唆されている。

このように、生活環境中の化学物質に胎児期に曝露することにより、胎児、あるいは出生後の児の健康に負の影響が生じることが明らかになりつつあるが、その分子メカニズムについては、まだ詳細は明らかではない。しかしながら、その作用機序の解明の一つのアプローチとして、エピジェネティクスが注目を集めている。エピジェネティックな遺伝子発現制御のしくみを模式的に図 1、2 に示した。エピジェネティックな修飾機構は、1) DNA のメチル化（ゲノム DNA 中の CpG 配列中のシトシンをメチル化して、転写因子などの結合を阻害することによって遺伝子の転写や発現を調節）、2) ヒストンの翻訳後修飾（ヒストンをアセチル化またはメチル化することにより、クロマチン構造を変化させ、遺伝子の転写や発現を調節）、3) クロマチンリモデリング（クロマチン構造を凝縮、あるいは弛緩させることにより、転写因子などの結合を調節して遺伝子の転写や発現を制御）、で成り立っている。

本研究では、最近、報告が急増している、胎児期の環境化学物質曝露と「DNA メチル化」に関する疫学研究を整理し、今後の研究課題について考察を試みた。

B . 研究方法

英語の原著論文については、PubMed を用いて「DNA methylation exposure cord blood」および「methylation exposure (pregnancy OR birth)」(2000 年以降 2012 年まで)で検索した。多数の論文がヒットしたので、その中から、胎児期化学物質曝露の DNA メチル化への影響を調べた疫学研究の論文を絞り込んだ。レビュー等は除

いた。日本語論文については、医中誌データベースを用い、「メチル化 曝露 化学物質」のキーワードで同一期間の検索を行った。

C . 研究結果

(1) 先行研究の動向

胎児期化学物質曝露の DNA メチル化への影響を調べた疫学研究の英語原著論文は 19 報あった。日本語の原著論文および、国内外の疫学研究を網羅した総説はなかった。英語原著論文の中で、曝露要因としては、妊娠中の喫煙が 10 報^{8~17)}と最も多く(表 1)、喫煙以外の曝露では、多環芳香族炭化水素 (PAHs) が 3 報^{18~20)}、有機フッ素化合物 (PFCs)¹²⁾、有機塩素系化合物 (DDE)²¹⁾が各 1 報、天然由来のヒ素 (3 報)^{22~24)}および鉛²⁵⁾があった(表 2)。

DNA メチル化を調べた 19 報の疫学研究のうち、ゲノム全体のメチル化状態を調べたものが 11 報と一番多く、メチル化シトシンに対する抗体を用いた ELISA 法でゲノム全体のメチル化率を調べる方法や、LINE-1、Alu などの反復配列(ゲノムの半分以上を占める、遺伝子をコードしていない領域)のメチル化率をゲノム全体のメチル化率の指標として測定する方法が用いられている。また、ヒトゲノム上のメチル化されうるほぼすべての CpG アイランド(45 万カ所)を 1 枚の基盤上に搭載した DNA チップが開発されており、化学物質曝露によってメチル化が変化する遺伝子の網羅的探索を行った研究もすでに 4 報あった。胎児期の環境化学物質曝露で DNA メチル化が変化する遺伝子の詳細は表 3 にまとめた。

DNA メチル化解析の対象とした組織については、19 報の内 10 報で、臍帯血の DNA メチル化を測定し、胎児期曝露の影響を評価していた。5 報では、出生後(小児期、思春期、成人後)の末梢血や口腔細胞から DNA を抽出してメチル化を測定し、胎児期曝露による影響を評価していた。ま

た、3 報では、胎児の発育との関連から、胎盤の DNA メチル化の変化に着目していた。

（2）喫煙曝露

胎児期喫煙曝露による低出生体重に関わるメカニズムのひとつとして、IGF2 など胎児の発育に関与し、ゲノムインプリンティング制御を受ける遺伝子のメチル化が考えられている。Murphy らは 2012 年、臍帯血 DNA (418 名) を用いて、胎児期喫煙曝露により男児で IGF2 遺伝子が高メチル化されることを報告した⁸⁾。この曝露により、2,500g 未満の低体重児が生まれるリスクが 4 倍以上になることが示された。また、同じコーホートでの研究で、IGF2 遺伝子メチル化率と臍帯血血清 IGF2 蛋白質濃度との間に負の相関があること、IGF2 蛋白質濃度と出生体重との間に正の相関があることが報告されている²⁶⁾。これらの結果から、男児においては、胎児期喫煙曝露により胎児ゲノム DNA の IGF2 遺伝子が高メチル化され、胎児血液中の IGF2 蛋白質濃度が低下し、子宮内での胎児発育抑制につながる可能性が示唆された。また、IGF2 遺伝子の高メチル化状態は出生後も維持されるため、出生後の健康へのリスクも懸念される。

その他の遺伝子では、胎児期喫煙曝露により、小児（4～6 歳）口腔細胞で AXL 遺伝子および PTPRO 遺伝子の高メチル化⁹⁾の報告があった。また、思春期男女末梢血の BDNF-6 遺伝子が高メチル化するとの報告もあり¹⁰⁾、胎児期喫煙曝露により BDNF-6 遺伝子の発現量が低下し、眼窩前頭皮質の薄化（思春期の薬物使用行動と関連）が進行する可能性も指摘されている²⁷⁾。また、母体胎盤組織で解毒酵素である CYP1A1 遺伝子の低メチル化と、それによる遺伝子発現の亢進の報告もあった¹¹⁾。

ゲノム全体の DNA メチル化を調べた報告は 5 報あり、うち 1 報は臍帯血、3 報は出生以後の末梢血・口腔細胞、1 報は胎盤

を使用していた。臍帯血血清を使用して ELISA 法でメチル化シトシンを定量した研究では、血清コチニン濃度とゲノム全体のメチル化レベルとの間に負の相関が見られた ($p < 0.001$)¹²⁾。また、成人女性の末梢血を用いた解析では、胎児期喫煙曝露の有無とセントロメア近傍配列 Sat2 メチル化との間に負の相関が確認されたが、反復配列である LINE-1 や Alu メチル化との間には有意な相関は見られなかった¹³⁾。また、同じコーホートで、三重水素標識メチル基を用いる手法で、胎児期喫煙曝露によりゲノム全体が高メチル化されるとの結果も出されたが、解析手法が一般的でないため、結果の信頼性に疑問もある^{9, 14)}。小児の口腔細胞を用いた解析では、胎児期喫煙曝露の有無と反復配列 Alu のメチル化との間に負の相関がみられた⁹⁾。反対に胎盤では、胎児期喫煙曝露により Alu は高メチル化されるが、LINE-1 のメチル化は変化しないとの報告もあり¹⁵⁾、組織によって化学物質に対する感受性やエピジェネティックな制御が異なる可能性も考えられる。

さらに、DNA チップを用いた網羅的な解析では、臍帯血 DNA で、CYP1A1 遺伝子の高メチル化および、AHRR 遺伝子や GFI1 遺伝子の低メチル化¹⁶⁾が新たに検出された。胎盤では、喫煙曝露によって、623 個の遺伝子の発現と、1,024 カ所の CpG サイトのメチル化が有意に変化していた。この内、メチル化率が 10 % 以上変動した CpG は 38 カ所あり、低体重に関連する 6 カ所の CpG サイトが含まれていた。また、PURA、GTF2H2、GCA、GPR135 遺伝子の高メチル化および、HKR1 遺伝子の低メチル化などが新たに見出された¹⁷⁾。

（3）喫煙以外の環境化学物質曝露

Perera ら¹⁸⁾は、米国ニューヨーク市の児の喘息罹患率が高い（25%）原因の一つとして、交通車両から排気される多環芳香族炭化水素 (PAH) への胎児期曝露を考え、700 人の出生コーホートを用い、PAH 曝露

レベルの高い妊婦グループと低いグループの各 10 児の臍帯血 DNA のメチル化部位を網羅的に解析して比較した。その結果、PAH 曝露レベルが高い児の臍帯血では、脂質代謝に關与する ACSL3 遺伝子のプロモーター領域が著しく高メチル化されており、胎盤での ACSL3 蛋白質の発現量も有意に減少していることを見出した。さらに同一コーホートの 56 児で、臍帯血 ACSL3 遺伝子のメチル化と曝露 PAH レベル、5 歳時の喘息発症に、いずれも正の關連があることを明らかにした。これらの結果から、ACSL3 遺伝子の DNA メチル化が PAH 曝露のエピジェネティックマーカーとなりうると考察している。その他にも、妊婦の多環芳香族炭化水素（PAHs）曝露と臍帯血 DNA メチル化を調べた報告は 2 報あり、PAHs 曝露レベルと、臍帯血ゲノム全体のメチル化レベルとの間には弱い負の關連（ $p=0.05$ ）¹⁹が、IFN 遺伝子のメチル化との間には正の關連²⁰が示されているが、アウトカムとの關連については調べていなかった。

有機フッ素化合物（PFOS, PFOA）曝露による DNA メチル化への影響を調べた報告は 1 報のみで、臍帯血血清 PFOA 濃度とゲノム全体のメチル化レベルの間には負の關連が示唆された（ $p=0.06$ ）¹²。ただし、この報告のサンプルサイズは $N=30$ と小さいため、規模の大きいコーホートで再確認する必要がある。

かつて殺虫剤として大量に使用され、環境中に残留している有機塩素系化合物の一種 DDE については、臍帯血血清中の DDE 濃度と 4 歳児末梢血 DNA の ALOX12 遺伝子のメチル化との間に負の關連が見られた²¹。ALOX12 遺伝子は、喘息症状のある 4 歳児とない児の血液 DNA を用いてメチル化部位の網羅的な解析の結果、見出された遺伝子で、喘息症状を持つ児で有意に低メチル化されていた（ $p=0.003$ ）。

東南アジアには、土壌や飲料水から高濃

度のヒ素に曝露される地域が存在する。ヒ素には発がん性があるが、肝臓がんを発症しやすい系統のマウスで、妊娠中の母親マウスに無機ヒ素を含む水を摂取させると、生まれたオスの仔の肝臓の発症率が増加することが報告された³⁰。これらの仔マウスでは、細胞増殖や癌化を促進する ER 遺伝子のプロモーター領域が低メチル化されており、かつ、ER 遺伝子の発現も亢進されていることから、無機ヒ素がエピジェネティックな作用を介して発癌に關与すると考えられている。飲料水からの胎児期ヒ素曝露による臍帯血 DNA のメチル化の変化を調べた 3 報の疫学研究では、母体のヒ素曝露濃度の高さと、臍帯血 DNA の反復配列 LINE-1、Alu、がん抑制遺伝子 p16 および p53 プロモーターのいずれもの高メチル化が關連することが報告されている^{22~24}。鉛曝露については、母体骨の鉛レベルと臍帯血の反復配列 Alu および LINE-1 に負の關連が見られている²⁵。

D. 考察

本研究では、胎児期の化学物質曝露が児ゲノム DNA メチル化へ与える影響を調べた疫学研究のレビューを行った。この分野の報告はまだ多くはないが、2008 年から 2011 年まで年に 1~4 報だった報告が、2012 年には 8 報と急に増えており、今後、各国でさらに精力的に研究が行われていくことが予想される。また、現時点では、日本で行われた研究の報告はまだなく、遺伝的背景の違いによりエピジェネティックな制御に差がみられる^{29, 30}ことを鑑みても、日本人で同様の研究を進めることが必要である。

児ゲノム DNA メチル化へ与える影響を調べた疫学研究の多くは臍帯血 DNA を用いて解析を行っていたが、出生後の年数を経た児の血液を用いたメチル化解析の報告も複数見られた。このような場合は、出生後の環境曝露について質問票等で把握し、

重回帰分析の際に交絡要因として調整した上で胎児期の曝露評価をしている。しかしながら、出生後に曝露される様々な環境要因全てを考慮（調整）して解析することは難しく、臍帯血を使用する場合に比べ、解析精度の低下は否めないと思われる。

近年、生命科学分野でエピジェネティクス研究が急激に進展した背景には、解析技術の著しい進歩が挙げられる。ゲノム上のメチル基が結合している部位の同定に、パイロシーケンス法などが考案され、ハイスループットな解析機器も開発されている。また、ヒトゲノム上のメチル化されうるほぼ全部の CpG 配列が搭載された DNA チップを用いて、短時間で、細胞あるいは組織ゲノム全体のメチル化パターンを知ることでもできるようになった。本研究でも、網羅的な解析手法を用い、特に喫煙曝露において、児あるいは胎盤ゲノム上の多数の遺伝子（領域）のエピジェネティックな変化が見出されていた。これらの変化が、児の発育・発達や疾病にどのような影響を与えるのか、今後の研究が期待される。また、環境化学物質曝露リスク、あるいは疾病発症リスクを示すエピジェネティックマーカーが見つければ、曝露のモニタリングや疾病予防に有益である。このようなエピジェネティックマーカーの探索に加えて、実用性の証明や、遺伝的背景の異なる人種間での共通性などの検討も、今後の重要な研究課題であろう。

E . 結論

今回の文献レビューを通して、現段階では、胎児期の環境化学物質曝露によるエピジェネティックな変化の統一的な見解はまだ得られていないと思われた。さらに、疫学研究の多くでは、動物実験の結果のように化学物質の曝露による遺伝子のメチル化の変化と、蛋白質レベルの変化、あるいはアウトカム（表現型）の変化が必ずしもすぐには結びつかず、遺伝的、環境的背景が

異なるヒトの集団を対象にした疫学研究の難しさも考えられる。遺伝子の突然変異は、その部位が蛋白質の機能発現に重要な場合、ストレートに表現型の変化が現れる。一方、エピジェネティクスは、メチル化部位の変異が多少生じてもすぐには影響が現れず、変異が蓄積され、閾値を越えると遺伝子発現に影響が出ると考えられている。胎児期に環境化学物質に曝露することにより生じた、児ゲノムへのエピジェネティックな「変化」は、出生後の成長過程でさらに様々な環境要因に曝露されることにより蓄積され、将来、疾病発症リスクへとつながる可能性がある。

環境化学物質の児の健康影響の解明におけるエピジェネティクス研究はまだ緒に付いたばかりである。今後の基礎研究の課題としては、1) DNA のメチル化、ヒストンのアセチル化とメチル化、およびそれらの逆反応の詳細な分子メカニズムの解明、2) モデル動物やヒト細胞株を用いた、組織ごとのエピジェネティックな制御機構の解明が重要である。また、疫学研究としては、環境化学物質による胎児期曝露の結果生じた児ゲノム上のエピジェネティックな変化が、出生後の児の成長過程でどのように維持、あるいは変化していくのか、また、発育・発達や疾病とどのように関わるのか、肥満・がん・ADHD・生活習慣病などをアウトカムに設定したコホート研究や症例対象研究などで追跡することが必要であろう。そのような地道な研究の積み重ねの上に、将来、児臍帯血 DNA のメチル化パターンから、成長後の健康リスクの評価ができるようになり、かつ、DNA メチル化の可逆性を利用した（メチル化状態を正常に戻す）薬の開発や、栄養・運動エクササイズ、あるいは禁煙などの行動変容を含むヘルスプロモーション等、有効な予防策を講じることでもできるようになると考えられる。

F . 研究発表

1) 論文発表

1. 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. 26 (2):29-38, 2012.

2) 学会発表

1. 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 IGF2 DNA メチル化に及ぼす影響」第 83 回日本衛生学会学術総会. 金沢市; 2013 3/ 24-26.

G . 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

参考文献

- 1) Colborn T, Dumanoski D, Myers JP. Our Stolen Future. Dutton, New York, 1996.
- 2) Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. Lancet 1986; 1: 1077-1081.
- 3) Gluckman PD, Hanson MA. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. Science. 2004; 305: 1733-1736.
- 4) Govarts E, Nieuwenhuijsen M, Schoeters G, et al. Birth weight and prenatal exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) and dichlorodiphenyldichloroethylene

(DDE): a meta-analysis within 12 European Birth Cohorts. Environ Health Perspect 2012; 120(2): 162-170.

- 5) Goodman JE, Kerper LE, Boyce CP, Prueitt RL, et al. Weight-of-evidence analysis of human exposures to dioxins and dioxin-like compounds and associations with thyroid hormone levels during early development. Regul Toxicol Pharmacol 2010; 58(1): 79-99.
- 6) Hsieh CJ, Hsieh WS, Su YN, et al. The Taiwan Birth Panel Study: a prospective cohort study for environmentally-related child health. BMC Res Notes 2011; 12(4): 291.
- 7) 岸玲子, 佐々木成子. 環境化学物質の次世代影響に関するわが国における研究事例- 北海道スタディの概要とこれまでの成果 . 医学のあゆみ 2010 ; 235 : 1117-1121 .
- 8) Murphy SK, Adigun A, Huang Z, et al. Gender-specific methylation differences in relation to prenatal exposure to cigarette smoke. Gene 2012; 494(1): 36-43.
- 9) Breton CV, Byun HM, Wenten M, et al. Prenatal tobacco smoke exposure affects global and gene-specific DNA methylation. Am J Respir Crit Care Med 2009; 180(5): 462-467.
- 10) Toledo-Rodriguez M, Lotfipour S, Leonard G, et al. Maternal smoking during pregnancy is associated with epigenetic modifications of the brain-derived neurotrophic factor-6 exon in adolescent offspring. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2010; 153B(7): 1350-1354.
- 11) Suter M, Abramovici A, Showalter L, et al. In utero tobacco exposure

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

- epigenetically modifies placental CYP1A1 expression. *Metabolism* 2010; 59(10): 1481-1490.
- 12) Guerrero-Preston R, Goldman LR, Brebi-Mieville P, et al. Global DNA hypomethylation is associated with in utero exposure to cotinine and perfluorinated alkyl compounds. *Epigenetics* 2010; 5(6): 539-546.
- 13) Flom JD, Ferris JS, Liao Y, et al. Prenatal smoke exposure and genomic DNA methylation in a multiethnic birth cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20(12): 2518-2523.
- 14) Terry MB, Ferris JS, Pilsner R, et al. Genomic DNA methylation among women in a multiethnic New York City birth cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17(9): 2306-2310.
- 15) Wilhelm-Benartzi CS, Houseman EA, Maccani MA, et al. In utero exposures, infant growth, and DNA methylation of repetitive elements and developmentally related genes in human placenta. *Environ Health Perspect* 2012; 120(2): 296-302.
- 16) Joubert BR, Håberg SE, Nilsen RM, et al. 450K epigenome-wide scan identifies differential DNA methylation in newborns related to maternal smoking during pregnancy. *Environ Health Perspect* 2012; 120(10): 1425-1431.
- 17) Suter M, Ma J, Harris A, et al. Maternal tobacco use modestly alters correlated epigenome-wide placental DNA methylation and gene expression. *Epigenetics* 2011; 6(11): 1284-1294.
- 18) Perera F, Tang WY, Herbstman J, et al. Relation of DNA methylation of 5'-CpG island of ACSL3 to transplacental exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and childhood asthma. *PLoS One* 2009; 4(2): e4488.
- 19) Herbstman JB, Tang D, Zhu D, et al. Prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, benzo[a]pyrene-DNA adducts, and genomic DNA methylation in cord blood. *Environ Health Perspect* 2012; 120(5): 733-738.
- 20) Tang WY, Levin L, Talaska G, et al. Maternal Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and 5'-CpG Methylation of Interferon- γ in Cord White Blood Cells. *Environ Health Perspect* 2012; 120(8): 1195-1200.
- 21) Morales E, Bustamante M, Vilahur N, et al. DNA hypomethylation at ALOX12 is associated with persistent wheezing in childhood. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185(9): 937-943.
- 22) Kile ML, Baccarelli A, Hoffman E, et al. Prenatal arsenic exposure and DNA methylation in maternal and umbilical cord blood leukocytes. *Environ Health Perspect* 2012; 120(7): 1061-1066.
- 23) Intarasunanont P, Navasumrit P, Waraprasit S, et al. Effects of arsenic exposure on DNA methylation in cord blood samples from newborn babies and in a human lymphoblast cell line. *Environ Health* 2012; 11: 31.
- 24) Pilsner JR, Hall MN, Liu X, et al. Influence of prenatal arsenic exposure and newborn sex on global methylation of cord blood DNA.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

- PLoS One 2012; 7(5): e37147.
- 25) Pilsner JR, Hu H, Ettinger A, et al. Influence of prenatal lead exposure on genomic methylation of cord blood DNA. *Environ Health Perspect* 2009; 117(9): 1466-1471.
- 26) Hoyo C, Fortner K, Murtha AP, et al. Association of cord blood methylation fractions at imprinted insulin-like growth factor 2 (IGF2), plasma IGF2, and birth weight. *Cancer Causes Control* 2012; 23(4): 635-645.
- 27) Lotfipour S, Ferguson E, Leonard G, et al. Orbitofrontal cortex and drug use during adolescence: role of prenatal exposure to maternal smoking and BDNF genotype. *Arch Gen Psychiatry* 2009; 66(11): 1244-1252.
- 28) Waalkes MP, Liu J, Chen H, et al. Estrogen signaling in livers of male mice with hepatocellular carcinoma induced by exposure to arsenic in utero. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(6): 466-774.
- 29) McKay JA, Groom A, Potter C, et al. Genetic and non-genetic influences during pregnancy on infant global and site specific DNA methylation: role for folate gene variants and vitamin B12. *PLoS One* 2012; 7(3): e33290.
- 30) Heijmans BT, Kremer D, Tobi EW, et al. Heritable rather than age-related environmental and stochastic factors dominate variation in DNA methylation of the human IGF2/H19 locus. *Hum Mol Genet* 2007; 16(5): 547-554.

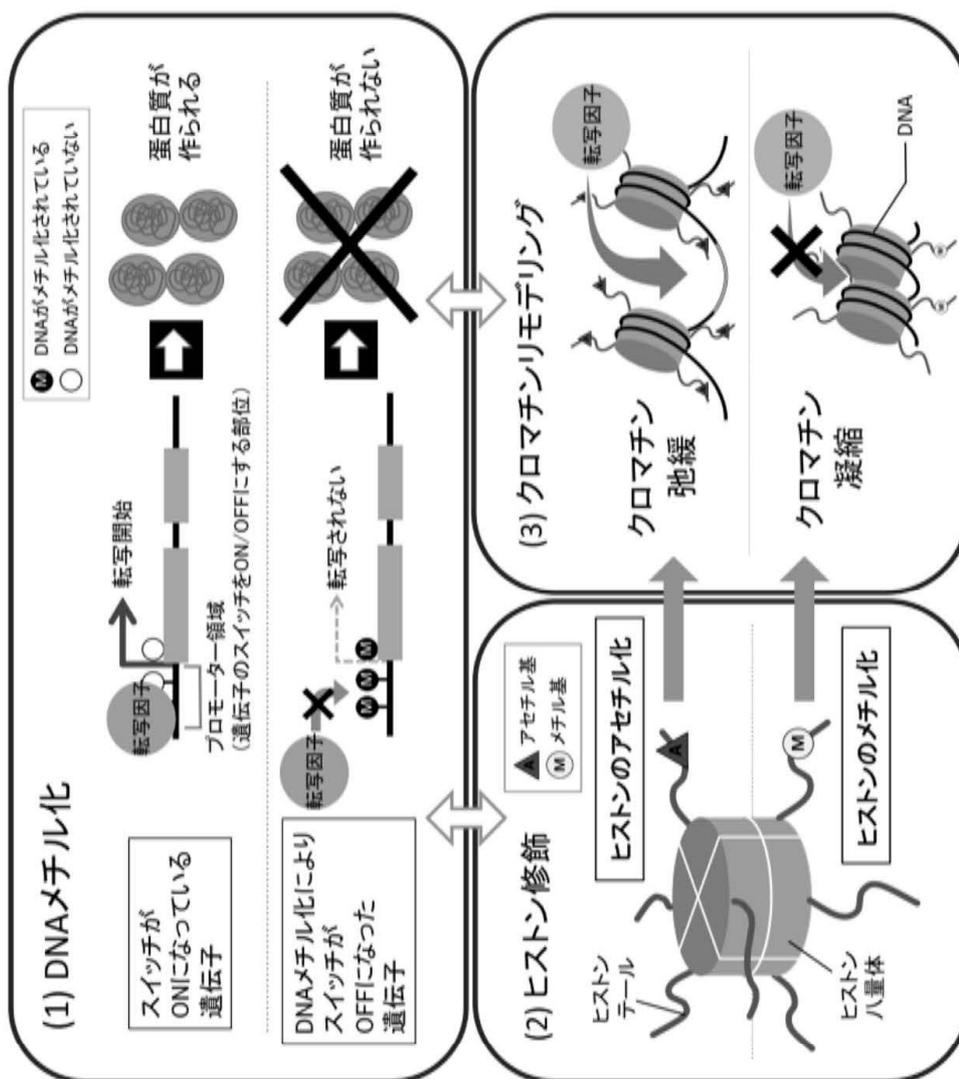


図2 エピジェネティック修飾による遺伝子発現制御機構

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表1 タバコ由来化学物質（喫煙）の胎児期曝露とエピジェネティクス

	著者 / 年 / 国	対象者	曝露評価	DNAメチル化解析 (測定方法)	DNA抽出組織	対象メチル化 領域	結果
遺伝子特異的メチル化	Murphyら / 2012 / USA ⁸⁾	前向き出生コーホート 新生児418名	妊娠中の喫煙の有無(質問票)	臍帯血遺伝子領域のメチル化率(パイロシーケンス法)	臍帯血	IGF2 DMR H19 DMR	・H19 DMRに喫煙者而非喫煙者の間で違いなし ・IGF2 DMRは喫煙者の方が高メチル化(2.9-3.7%) ・男女で層別化した場合、喫煙曝露で男児でのみIGF2高メチル化
	Bretonら / 2009 / USA ⁹⁾	後ろ向きコーホート 小児(4~7歳児) 348名 272名	妊娠中の喫煙・受動喫煙の有無(質問票)	パイロシーケンス法 メチル化レベルに差のあるCpGサイトのスクリーニング(Illumina GoldenGate Cancer methylation panel, Illumina社)	口腔細胞	ゲノムDNA 全体のメチル化レベル(Alu, LINE-1) 807遺伝子, 1505CpGサイト	・胎児期喫煙曝露により、Alu低メチル化(= -0.31, p=0.03) ・GSTM1 null genotypeでLINE-1に喫煙の影響あり ・曝露によりAXL高メチル化(= 0.37, p=0.005)、PTPRO高メチル化(= 0.34, p=0.02)
	Toledo-Rodriguezら / 2010 / UK ¹⁰⁾	後ろ向きコーホート 思春期男女156名(カナダ)	妊娠中の喫煙(中期以降1日1本以上)の有無(質問票)	バイサルファイトシーケンス法	末梢血	BDNF6	・胎児期喫煙曝露によりBDNF-6エクソン高メチル化
	Suterら / 2010 / USA ¹¹⁾	前向き出生コーホート 新生児34名	妊娠中(登録時)の喫煙の有無(質問票)	バイサルファイトシーケンス法	胎盤	CYP1A1プロモーター	・胎児期喫煙曝露により、CYP1A1プロモーター領域が低メチル化(喫煙あり55.6% vs. なし45.9%, p=0.027) ・上記メチル化は胎盤CYP1A1遺伝子発現と相関あり(r=0.737, p=0.007)
ゲノム全体のメチル化	Guerrero-Prestonら / 2010 / USA ¹²⁾	前向き出生コーホート 新生児30名	臍帯血血清中のコチニン濃度(LCタンデム質量分析)	臍帯血血清中のグローバルDNAメチル化率(ELISA法)	臍帯血血清	ゲノムDNA全体のメチル化レベル(5mC)	・臍帯血血清DNAメチル化率は、血清コチニン濃度と濃度依存的な負の相関を示した(p<0.001)。
	Flomら / 2011 / USA ¹³⁾	前向き出生コーホート 成人女性90名(1959-63年 出生)	妊娠中の喫煙の有無(出生時質問票) 1959-63年時	MethylLight法(メチル化・非メチル化CpG識別)	末梢血	ゲノムDNA全体のメチル化レベル(Sat2, Alu, LINE-1)	・胎児期喫煙曝露と43才時末梢血Sat2メチル化とは負の相関(= -0.22) ・LINE-1・Aluメチル化とは有意な相関なし
	Terryら / 2008 / USA ¹⁴⁾	前向き出生コーホート 成人女性85名(1959-63年 出生)	妊娠中の喫煙の有無(出生時質問票) 1959-63年時	³ H]-methyl acceptance assay	末梢血	ゲノムDNA全体のメチル化レベル	・胎児期喫煙曝露により、高メチル化
	Wilhelm-Benartziら / 2012 / USA ¹⁵⁾	前向き出生コーホート 新生児 380名 184名	妊娠中の喫煙の有無(質問票)	パイロシーケンス法 網羅的メチル化解析(Infinium HumanMethylation27 BeadChip, Illumina社, 14,000遺伝子, 27,000CpGサイト搭載)	胎盤	ゲノムDNA全体のメチル化レベル(Alu, LINE-1) ポリコーム関連遺伝子群(ヒストン修飾など)に關与)	・胎児期喫煙曝露によりAlu高メチル化(喫煙あり66.2% vs. なし64.8%, p<0.01)、LINE-1有意差なし(p=0.10) ・Aluメチル化とポリコーム関連遺伝子群メチル化との間に正の相関
網羅的メチル化解析	Joubertら / 2012 / USA ¹⁶⁾	前向き出生コーホート2つのコーホートの母児 Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa), 1062組 Newborn Epigenetics Study (NEST)36名(母喫煙:非喫煙=1:1)	妊婦血液中のコチニン濃度(LCタンデム質量分析)	網羅的メチル化解析(Infinium HumanMethylation450 BeadChip, Illumina社, 45万CpGサイト搭載)	臍帯血	ゲノムDNAの全メチル化サイト	・10個の遺伝子上の26カ所のCpGサイトのメチル化レベルと母体血中コチニン濃度に強い関連性あり(p-value < 1.06 x 10 ⁻⁷) ・喫煙曝露によりAHRHが高メチル化、CYP1A1, GF11が低メチル化
	Suterら / 2011 / USA ¹⁷⁾	コーホート内コーホート研究 新生児 36名; Discovery cohort 18名; Validation cohort (各 母喫煙:非喫煙=1:1)	妊娠中の喫煙の有無(質問票)	網羅的メチル化解析(Infinium HumanMethylation27 BeadChip, Illumina社, 14,000遺伝子, 27,000CpGサイト搭載)	胎盤	ゲノムDNAのメチル化サイト	・胎児期喫煙曝露により623の遺伝子発現と1024CpGサイトが有意に変化 ・うち10%以上メチル化が変化していたCpGは38ヶ所 ・38CpG中、6ヶ所は喫煙による低体重に關連

遺伝子略称; IGF2 DMR (Insulin-like growth factor 2 differentially methylated region), H19 DMR (H19 differentially methylated region), AXL (AXL receptor tyrosine kinase), PTPRO (protein tyrosine phosphatase, receptor type, O), CYP1A1 (cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1), BDNF (brain-derived neurotrophic factor), AHRH (aryl-hydrocarbon receptor repressor), GF11 (growth factor independent 1 transcription repressor)

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

著者 / 年 / 国	対象者	曝露物質	曝露評価	測定項目(測定方法)	DNA抽出組織	対象メチル化領域	結果
Pereraら /2009/USA ¹⁸⁾	出生コホート 母児20組 (ケーススタディ) 5歳児56名	多環芳香族炭化水素(PAH)	妊婦PAHs(大気中)曝露レベル (GC質量分析)	臍帯血DNAのメチル化部位を網羅的に解析(methylation sensitive restriction fingerprinting法)	臍帯血	ゲノムDNAの全メチル化サイト	・PAH高曝露群でACSL3遺伝子高メチル化(OR=13.8, p<0.001) ・PAH曝露濃度はACSL3高メチル化群>低メチル化群(P<0.001)、高メチル化群で5歳までの喘息発症リスクが高くなる(OR=3.9, p=0.03)
Herbstmanら /2012/USA ¹⁹⁾	縦断的コホート 母児164組	PAH	妊婦PAHs(大気中)曝露レベル (GC質量分析)	臍帯血DNAのメチル化レベル(ELISA法) 臍帯血中のBaP-DNA付加体濃度(HPLC)	臍帯血	ゲノムDNA全体のメチル化レベル(5mC)	・胎児期PAH曝露は、臍帯血DNAメチル化レベルと弱い負の関連あり(p=0.05) ・臍帯血DNAメチル化レベルは、臍帯血中のBaP(ベンゾピレン)-DNA付加体と正の相関あり(p=0.01) (PAH曝露がメチル化を介してDNA付加体の生成に影響を及ぼしている可能性あり)
Tangら /2012/USA ²⁰⁾	前向き出生コホート (Columbia Center for Children's Environmental Health cohort) 母児53組	PAH	妊婦PAHs(大気中)曝露レベル (GC質量分析)	臍帯血DNAのメチル化(バイサルファイトシークエンス法)	臍帯血	IFN プロモーター	・妊婦PAHs曝露レベルと児臍帯血IFN プロモーターのメチル化率は正の相関あり
Guerrero-Prestonら /2010/USA ¹²⁾	前向き出生コホート 母児30組	有機フッ素化合物(PFOS, PFOA)	臍帯血血清中の有機フッ素化合物濃度(LCタンデム質量分析)	臍帯血血清中のグローバルDNAメチル化率(ELISA法)(臍帯血血清から単離したDNAのメチル化シトシンをELISA法で定量)	臍帯血血清	ゲノムDNA全体のメチル化レベル(5mC)	・臍帯血血清DNAメチル化率は、血清PFOA濃度と負の相関(r=-0.35, p=0.06) ・PFOS濃度とは相関はなし
Moralesら /2012/Spain ²¹⁾	2つの出生コホート 4-6歳児 Menorca (122名) Sabadell (236名)	DDE (dichlorodiphenyldichloroethylene, POPs)	臍帯血血清DDE濃度(GC質量分析)	喘鳴の症状の有無 4歳児血液DNA網羅的DNAメチル化解析(Illumina GoldenGate Panel I)(パイロシークエンス法)	4歳児血液	ゲノムDNAの全メチル化サイト	・喘鳴症状のある児で、ALOX12が有意に低メチル化(p=0.003) ・臍帯血血清中の高DDE濃度は、ALOX12の低メチル化と関連あり(p=0.033)
Kileら /2012/Taiwan ²²⁾	前向き出生コホート(バングラディッシュ) 母児113組	ヒ素	飲料水および妊婦尿中のヒ素濃度(ICP質量分析)	母体血、臍帯血DNAメチル化率(パイロシークエンス法)	母体血および臍帯血	ゲノムDNA全体のメチル化レベル(Alu, LINE-1)癌抑制遺伝子(p16, p53)プロモーター	・母親尿中ヒ素濃度の高い群では、母体血(1.36%)、臍帯血(1.08%)両者のDNAでLINE-1が有意に高メチル化、臍帯血癌抑制遺伝子p16プロモーターも高メチル化の傾向あり
Intarasunanontら /2012/Thailand ²³⁾	2重コホート研究 新生児71名(ヒ素曝露55名、非曝露16名)	ヒ素	飲料水および臍帯血、母の爪、毛髪中のヒ素濃度(ICP質量分析)	臍帯血DNAメチル化率(COBRA法、HPLC-MS/MS)	臍帯血	ゲノムDNA全体のメチル化レベル(LINE-1)癌抑制遺伝子(p53)プロモーター	・ヒ素曝露群ではp53プロモーターが高メチル化、爪のヒ素濃度と正の相関あり(p<0.05)
Pilsnerら /2012/USA ²⁴⁾	前向き出生コホート(バングラディッシュ) 母児101組	ヒ素	母尿、血液、臍帯血中のヒ素濃度(ICP質量分析)	母体血、臍帯血DNAメチル化率([³ H]-methyl-incorporation assay, バイロシークエンス法、LUMA法)	母体血 臍帯血	ゲノムDNA全体のメチル化レベル(Alu, LINE-1)	・母尿中のヒ素濃度の増加は、臍帯血DNAゲノム全体のメチル化率の増加と関連 ・ヒ素曝露とAlu, LINE-1, LUMAのメチル化との正の相関が男児であり、女児ではなし
Pilsnerら /2009/USA ²⁵⁾	出生コホート(メキシコ) 母児103組	鉛	母体骨鉛レベル(蛍光X線分析)	臍帯血DNAメチル化率(パイロシークエンス法)	臍帯血	ゲノムDNA全体のメチル化レベル(Alu, LINE-1)	・母体骨の鉛レベルと児臍帯血Alu, LINE1には負の相関

遺伝子略称: ACSL3 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 3), IFN (interferon, gamma), ALOX12 (arachidonate 12-lipoxygenase)

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

表3 胎児期環境化学物質曝露でDNAメチル化レベルが変化する遺伝子				
遺伝子・領域	正式名称	役割	関連のあるアウトカム	胎児期曝露
<i>IGF2</i>	インスリン様成長因子2; Insulin-like growth factor 2	有糸分裂促進因子(母由来アレルで高メチル化)	胎児期成長制限	喫煙曝露により高メチル化(男児) ⁸⁾
<i>H19</i>	H19	IGF2転写調節(父由来アレルで高メチル化)	胎児期成長制限	喫煙曝露と関連なし ⁸⁾
<i>CYP1A1</i>	シトクロムP450; cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	薬物代謝経路(有毒な親水性DNA付加体への変換)	胎児期成長制限 がん	喫煙曝露により高メチル化(臍帯血) ¹⁶⁾ , もしくは低メチル化(胎盤) ¹¹⁾
<i>AHRR</i>	芳香族炭化水素受容体レセプター; aryl-hydrocarbon receptor repressor	薬物代謝経路(AhRを負に調節, CYP1A1転写抑制)	胎児期成長制限 がん	喫煙曝露により低メチル化 ¹⁶⁾
<i>PTPRO</i>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, O	胎児期のニューロンの分化・軸索伸長に關与	神経系発達	喫煙曝露により高メチル化 ⁹⁾
<i>BDNF-6</i>	脳由来神経栄養因子6; Brain-derived neurotrophic factor 6	ニューロンの軸索伸長(学習・記憶・脳の可塑性に關与)	神経系発達	喫煙曝露により高メチル化 ¹⁰⁾
<i>ACSL3</i>	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	脂肪酸代謝	喘息	PAHs曝露により高メチル化 ¹⁸⁾
<i>IFN</i>	インターフェロン ; Interferon	Th1サイトカイン(Th2細胞分化抑制)	喘息	PAHs曝露により高メチル化 ²⁰⁾
<i>ALOX12</i>	アラキドン酸-12-リポキシゲナーゼ; arachidonate 12-lipoxygenase	リポキシゲナーゼ(アラキドン酸を12[S]-HETEに代謝)	喘息	DDE曝露により低メチル化 ²¹⁾
<i>p16</i>	サイクリン依存性キナーゼ阻害因子2A; Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	がん抑制遺伝子(細胞周期調節)	がん	ヒ素曝露により高メチル化 ^{22, 23)}
<i>p53</i>	protein 53	がん抑制遺伝子(細胞周期調節)	がん	ヒ素曝露により高メチル化 ²³⁾
<i>GFI1</i>	growth factor independent 1 transcription repressor	ヒストン修飾(造血細胞・内耳・肺神経内分泌系の発生過程に關与)	がん 自己免疫疾患	喫煙曝露により低メチル化 ¹⁶⁾
<i>AXL</i>	AXL receptor tyrosine kinase	Gas6/Axlシグナル経路(抗アポトーシス・細胞分裂促進・細胞移動などに關与)	がん, 循環器疾患, 自己免疫疾患	喫煙曝露により高メチル化 ⁹⁾
<i>LINE-1*</i>	長鎖散在反復配列; long interspersed nucleotide element	レトロトランスポゾン型 長鎖散在反復配列(LINEs), ゲノム全体の約20%を占める	—	ヒ素曝露により高メチル化 ^{22, 23)}
<i>Alu*</i>	短鎖散在反復配列の一種; short interspersed nucleotide element	レトロトランスポゾン型 短鎖散在反復配列(SINE), ゲノム全体の約10%を占める	—	喫煙曝露により高メチル化(胎盤) ¹⁵⁾ , もしくは低メチル化(口腔細胞) ⁹⁾ , 鉛曝露により低メチル化 ²⁵⁾ , ヒ素曝露により高メチル化 ¹⁵⁾
<i>Sat2*</i>	juxtacentromeric satellite 2	セントロメア近傍の反復配列	—	喫煙曝露により低メチル化 ¹³⁾
*は遺伝子をコードしていない領域				