

で本研究では、*AHR* (G>A, Arg554Lys, rs2066853), *CYP1A1* (A>G, Ile462Val, rs1048943) および *XRCC1* (C>T, Arg194Trp, rs1799782) 遺伝子多型について、母の喫煙曝露によるこれらの遺伝子型の違いが出生時体格に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

北海道内 40 産科病院外来を受診し同意を得た妊娠初期の妊婦を対象に、出生前向きコーホート研究を実施した。対象者の基本的属性は自記式調査票、出生時所見は病院記録から得た。妊娠後期に母体血漿を採取し、Enzyme-linked Immunosolvent Assay (ELISA)法でコチニン値を求めた。そして Receiver Operating Characteristic (ROC)曲線を用いてコチニン値による非喫煙群と喫煙群のカットオフ値を算出した（カットオフ値 = 11.48 ng/mL）（Sasaki et al., 2011）。出産時の血液から DNA を抽出し、PAHs の受容体、代謝や DNA 修復に関与する遺伝子多型として、*AHR* (G>A, rs2066853), *CYP1A1* (A>G, rs1048943) および *XRCC1* (C>T, rs1799782) 遺伝子多型はリアルタイム PCR 法で解析した。生後 4 か月時に母から児の出生時体格情報について母子健康手帳からの転記を依頼した。

対象者の選択は図 1 に示した。2003～2007年に研究参加協力が得られた 10,731 名のうち、出生記録 (N = 10,720)、血漿コチニン値 (N = 9,011)、およびゲノム DNA (N = 9,647) が全てあったのは、8,257 名であり、双胎 (N = 92)、妊娠高血圧 (N = 120)、妊娠性糖尿病 (N = 39) を除外すると 8,015 名だった。妊娠後期の血漿コチニン値のカットオフ値で二分すると 11.48 ng/mL 以下が 6,730 名、11.49 ng/mL 以上が 1,285 名であった。11.48 ng/mL 以下の 6,730 名からランダムサンプリングで 2,010 名に絞り、このうち出生体重、出

生身長、および出生頭囲のデータがあった 1,998 名を非喫煙群とした。11.49 ng/mL 以上では、人数が限られていたので、ランダムサンプリングを行わなかった。1,285 名のうち、出生体重、出生身長、および出生頭囲のデータがそろった 1,265 名を喫煙群とした。

統計解析では、連続変数間には Spearman の相関係数、カテゴリー変数と連続変数間には Mann-Whitney の *U*-検定で行った。妊娠後期の喫煙状況と出生時体格との関連は *AHR*, *CYP1A1* および *XRCC1* 遺伝子多型で組合せて、母の年齢、身長、妊娠前体重、出産歴、妊娠中アルコール摂取、妊娠中喫煙状況、教育歴、世帯収入、児の性別および在胎週数で調整し重回帰分析で検討した。妊娠後期の喫煙状況と *AHR*, *CYP1A1*, あるいは *XRCC1* 遺伝子多型との間の交互作用は交互作用項を加えることで検討した。2 つあるいは 3 つの遺伝子型の組合せによる交互作用もまた検討した。交互作用の *P* 値は、妊娠後期の喫煙状況と遺伝子型との 2 つの交互作用項に対する *F*-検定を組合せたポスト推定 (Postestimation) を使って計算した。多重比較の場合は、Bonferroni 法で *P* 値を補正した。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。

### C. 研究結果

母児の属性を表 1 に示した。非喫煙群と喫煙群との間で有意差が認められたのは、児の性別、在胎週数、出生時体格、母の年齢、出産歴、飲酒歴、教育歴、および世帯収入であった（いずれも  $P < 0.05$ ）。

妊娠後期の自己申告による喫煙習慣と母体血漿コチニン濃度との関連を表 2 に示した。自己申告で非喫煙と答えた 1,759 名のうち、母体血漿コチニン値が 11.49 ng/mL 以上だったのは 157 名（8.9%）だった。また自己申告で喫煙していたと答えた 692 名のうち、母体血漿コチニン値が 11.48 ng/mL 以下だったのは 37 名（5.3%）だった。

母児の属性と出生時体格との関連を表 3 に示した。出生時体格と有意な関連が認められたのは、児の性別、在胎週数、母の年齢、身長、妊娠前体重、出産歴、教育歴および世帯収入であった（いずれも  $P < 0.05$ ）。

妊婦の遺伝子多型の組合せによる妊娠後期の喫煙状況と出生時体格との関連を表 4 に示した。非喫煙群の児と比較して、喫煙群の児の出生体重は 71 g 小さく（95%信頼区間 (CI); -103, -40）、出生身長は 0.23 cm 小さく（95%CI; -0.41, -0.06）、出生頭囲は 0.28 cm 小さかった（95%CI; -0.41, -0.15）。妊娠後期の喫煙状況と *AHR* 遺伝子多型では、*AHR-GA/AA* 型をもつ非喫煙群の児と比較して、*AHR-GG* 型をもつ喫煙群の児の出生体重は 56 g 小さく（95%CI; -91, -20）、出生身長は 0.35 cm 小さかった（95%CI; -0.55, -0.16）。妊娠後期の喫煙状況と *CYP1A1* 遺伝子多型では、*CYP1A1-AA* 型をもつ非喫煙群の児と比較して、*CYP1A1-AG/GG* 型をもつ喫煙群の児の出生体重は 62 g 小さく（95%CI; -95, -30）、出生身長は 0.27 cm 小さく（95%CI; -0.45, -0.09）、出生頭囲は 0.21 cm 小さかった（95%CI; -0.35, -0.08）。妊娠後期の喫煙状況と *XRCCI* 遺伝子多型では、

*XRCCI-CC* 型をもつ非喫煙群の児と比較して、*XRCCI-CT/TT* 型をもつ喫煙群の児の出生体重は 59 g 小さく（95%CI; -87, -30）、出生頭囲は 0.18 cm 小さかった（95%CI; -0.30, -0.06）。妊娠後期の喫煙状況と *AHR* および *CYP1A1* 遺伝子多型の組合せでは、*AHR-GA/AA* 型で *CYP1A1-AA* 型をもつ非喫煙群の児と比較して、*AHR-GG* 型で *CYP1A1-AG/GG* 型をもつ喫煙群の児の出生体重は 114 g 小さかった（95%CI; -185, -43）。妊娠後期の喫煙状況と *AHR*, *CYP1A1* および *XRCCI* 遺伝子多型の組合せでは、*AHR-GA/AA* 型、*CYP1A1-AA* 型で *XRCCI-CC* 型をもつ非喫煙群の児と比較して、*AHR-GG* 型、*CYP1A1-AG/GG* 型で *XRCCI-CT/TT* 型をもつ喫煙群の児の出生体重は 145 g 小さかった（95%CI; -241, -50）。

### D. 考察

本研究では、*AHR-GG* 型、*CYP1A1-AG/GG* 型で *XRCCI-CT/TT* 型をもつ喫煙群の児は出生体重の減少に、より大きな影響を及ぼしていたことが分かった。この結果は先行研究の *AHR-GG* 型や *CYP1A1-AG/GG* 型をもつ喫煙者の児が子宮内での発育により大きな影響を被っていたと報告された先行研究と一致していた（Wang et al., 2002; Sasaki et al., 2006）。また、基準とした遺伝子型と比較して、*AHR-GG* 型や *CYP1A1-AG/GG* 型は代謝活性の亢進や代謝酵素のタンパク発現の亢進と関連しており（Wong et al., 2001; Kisselev et al., 2005）、*XRCCI-CT/TT* 型は DNA 修復遺伝子のタンパク発現の低下と関連していた（Hanova et al., 2010）。基準とした遺伝子型の組合せをもつ非喫煙群と比較して、*AHR-GG* 型、*CYP1A1-AG/GG* 型で *XRCCI-CT/TT* 型をもつ喫煙群は PAHs の代謝物がより多く、そして PAH-DNA 付加体がより多く生成されると予想された（Maloue et al., 2005; Nevert et al., 2004; Gao et al., 2014; Hecht

et al., 1999; Wang et al., 2003; Shen et al., 2005; Indra et al., 2014; Karttunen et al., 2010; Lodovici et al., 2004)。AHR-GG型、CYP1A1-AG/GG型でXRCC1-CT/TT型をもつ喫煙群の児が145g小さかった理由はわからないものの、PAHsの代謝物やPAH-DNA付加体の濃度の増加が児の出生体重の減少に関連している可能性が考えられた。

本研究の対象者で、自己申告で非喫煙と答えた1,759名のうち、157名は母体血漿コチニン値が11.49 ng/mL以上であった。この157名は母体血漿コチニン値が11.49 ng/mL以上である1,265名全体の12.4%を占めていた。血漿コチニン値が11.49 ng/mL以上であっても非喫煙と申告した母は、先行研究から正直に申告していない（Walsh et al., 1996; Lindqvist et al., 2002）、あるいはパートナーや同居喫煙者あるいは職場喫煙者からのたばこ煙に強く曝されている可能性が考えられた。

また、自己申告で喫煙していたと答えた692名のうち、37名は母体血漿コチニン値が11.48 ng/mL以下であった。この37名は、母体血漿コチニン値が11.48 ng/mL以下の1,998名全体の1.9%を占めていた。喫煙していると申告した母であっても血漿コチニン値が11.48 ng/mL以下であった理由は、機会的喫煙であると考えられた。機会的喫煙は、コチニン値を用いると過小評価されることは既に言われている（Jhun et al., 2010; Klebanoff et al., 1998）。これらからコチニン濃度による喫煙状況の分類は、自記式調査票による喫煙状況の分類よりも正確度が高いと考えられた。

本研究の限界は、妊娠後期のコチニン値を1回しか測定していないことである。コチニンの生物学的半減期は17.9時間との報告がある（Dempsey et al., 2013）。しかし、表2より、1日当たり1本以上吸ったと自己申告した686名のうち、血漿コチニン値が11.49 ng/mL以上の人は655名であり、95.5%の正確度であった。また、非喫煙と申告した1,759名のうち、血漿コチニン値が11.48 ng/mL以下の人は1,602名であり、91.1%の正確度であった。これらから、この結果の信頼度は高いと考えられた。

本研究の結果から、胎児期の母の喫煙と児の出生時体格の減少との関連が明らかになったものの、これらの量反応関係についてはわからない。今後は、受動喫煙も含めた胎児期の母の喫煙と出生時体格との量反応関係を明らかにした上で、これらの関係に対する遺伝要因の関与についてもさらに検討していく予定である。

本研究の結果から、胎児期の母の喫煙と児の出生時体格の減少との関連が明らかになったものの、これらの量反応関係についてはわからない。今後は、受動喫煙も含めた胎児期の母の喫煙と出生時体格との量反応関係を明らかにした上で、これらの関係に対する遺伝要因の関与についてもさらに検討していく予定である。

## E. 結論

胎児期の母の喫煙は児の出生時体格に影響を及ぼし、たばこ煙中のPAHs代謝およびDNA修復に関わる遺伝子多型で有意な関連が認められたのはAHR (G>A, rs2066853)、CYP1A1 (A>G, rs1048943)およびXRCC1 (C>T, rs1799782) 遺伝子多型の3つであった。AHR-GG型、CYP1A1-AG/GG型でXRCC1-CT/TT型をもつ喫煙群の児は、出生時体格の減少により大きな影響が認められた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Sumitaka Kobayashi, Fumihiko Sata, Seiko Sasaki, Titilola Serifat Bramoh, Atsuko Araki, Chihiro Miyashita, Houman Goudarzi, Sachiko Kobayashi, Reiko Kishi. Combined effects of AHR, CYP1A1, and XRCC1 genotypes and prenatal tobacco smoking on infant birth size: Biomarker assessment in the Hokkaido Study. *Nicotine & Tobacco Research* (Submitted)

### 2. 学会発表

小林澄貴, 佐田文宏, 佐々木成子, Titilola Serifat Bramoh, 荒木敦子, 宮

下ちひろ, Houman Goudarzi, 小林祥子, 岸玲子. 母の喫煙曝露と胎児発育との関連: 遺伝的なハイリスクについて—北海道スタディ. 第86回日本衛生学会学術総会. 北海道旭川市. 2016.5.11.-13.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当なし

#### 参考文献

- (1) Dempsey DA, Sambol NC, Jacob P 3<sup>rd</sup>, et al. CYP2A6 genotype but not age determines cotinine half-life in infants and children. *Clin Pharmacol Ther.* 2013; 94: 400-406.
- (2) Gao M, Li Y, Xue X, et al. Impact of AhR, CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms on TP53 R273G mutations in individuals exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15: 2699-2705.
- (3) Hanova M, Stetina R, Vodickova L, et al. Modulation of DNA repair capacity and mRNA expression levels of XRCC1, hOGG1 and XPG genes in styrene-exposed workers. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010; 248: 194-200.
- (4) Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91: 1194-1210.
- (5) Indra R, Moserova M, Kroftova N, et al. Modulation of human cytochrome P450 1A1-mediated oxidation of benzo[a]pyrene by NADPH: cytochrome P450 oxidoreductase and cytochrome b5. *Neuro Endocrinol Lett.* 2014; 35 Suppl 2: 105-113.
- (6) Jhun H, Seo HG, Lee DH, et al. Self-reported smoking and urinary cotinine levels among pregnant women in Korea and factors associated with smoking during pregnancy. *J Korean Med Sci.* 2010; 25: 752-757.
- (7) Karttunen V, Myllynen P, Prochazka G, et al. Placental transfer and DNA binding of benzo(a)pyrene in human placental perfusion. *Toxicol Lett.* 2010; 197: 75-81.
- (8) Kisselev P, Schunck WH, Roots I, et al. Association of CYP1A1 polymorphisms with differential metabolic activation of 17beta-estradiol and estrone. *Cancer Res.* 2005; 65: 2972-2978.
- (9) Klebanoff MA, Levine RJ, Clemens JD, et al. Serum cotinine concentration and self-reported smoking during pregnancy. *Am J Epidemiol.* 1998; 148: 259-262.
- (10) Lindqvist R, Lendahls L, Tollbom Ö, et al. Smoking during pregnancy: comparison of self-reports and cotinine levels in 496 women. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2002; 81: 240-244.
- (11) Lodovici M, Luceri C, Guglielmi F, et al. Benzo(a)pyrene diolepoxide (BPDE)-DNA adducts levels in leukocytes of smokers in relation to polymorphism of CYP1A1, GSTM1, GSTP1, GSTT1 and mEH. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev.* 2004; 13: 1342-1348.
- (12) Marloue JL, Puga A. Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity, and tumorigenesis. *J Cell Biochem.* 2005; 96: 1174-1184.
- (13) Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, et al. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J Biol Chem.* 2004; 279: 23847-23850.
- (14) Sasaki S, Kondo T, Sata F, et al. Maternal smoking during pregnancy and genetic polymorphisms in the Ah receptor, CYP1A1 and GSTM1 affect infant birth size in Japanese subjects. *Mol Hum Reprod.* 2006; 12: 77-83.
- (15) Sasaki S, Braimoh TS, Yila TA, et al. Self-reported tobacco smoke exposure and

plasma cotinine levels during pregnancy—a validation study in Northern Japan. *Sci Total Environ.* 2011; 412-413: 114-118.

(16) Shen J, Gammon MD, Terry MB, et al. Polymorphisms in XRCC1 modify the association between polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts, cigarette smoking, dietary antioxidants, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14: 336-342.

(17) Walsh RA, Redman S, Adamson L. The accuracy of self-report of smoking status in pregnant women. *Addict Behav.* 1996; 21: 675-679.

(18) Wang X, Zuckerman B, Pearson C, et al. Maternal cigarette smoking, metabolic gene polymorphism, and infant birth weight. *JAMA.* 2002; 287: 196-202.

(19) Wang Y, Spitz MR, Zhu Y, et al. From genotype to phenotype: correlating XRCC1 polymorphisms with mutagen sensitivity. *DNA Repair.* 2003; 2: 901-908.

(20) Wong JM, Harper PA, Meyer UA, et al. Ethnic variability in the allelic distribution of human aryl hydrocarbon receptor codon 554 and assessment of variant receptor function in vitro. *Pharmacogenesis.* 2001; 11: 85-94.

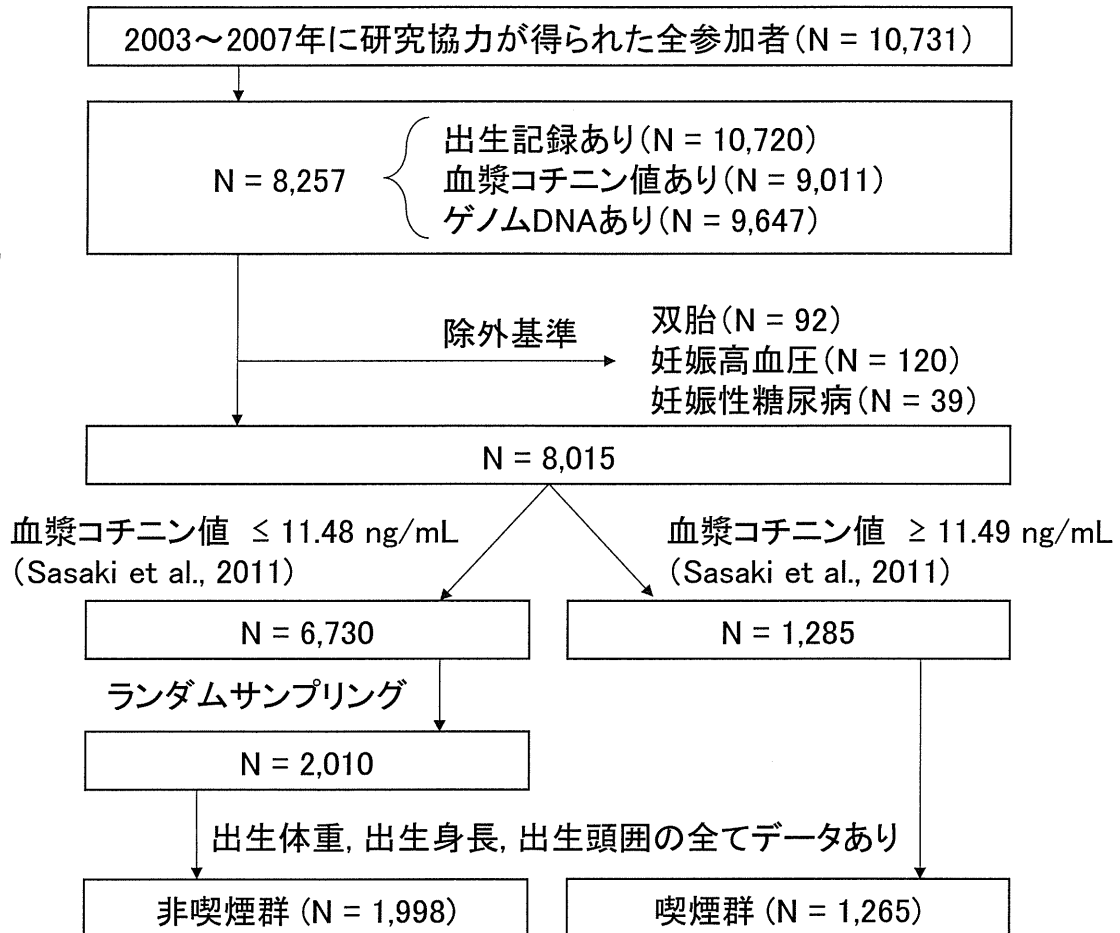


図 1. 対象者の選択フローチャート

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. 母児の属性 (N = 3,263)

属性	非喫煙群	喫煙群
	(N = 1,998)	(N = 1,265)
	N (%)	N (%)
	平均 ± SD	平均 ± SD
<b>児</b>		
性別		
男	<b>959 (48.0)</b>	<b>652 (51.5)</b>
女	<b>1,039 (52.0)</b>	<b>613 (48.5)</b>
不明	<b>0 (0.0)</b>	<b>1 (0.1)</b>
在胎週数 (週)	<b>39.0 ± 1.3</b>	<b>38.9 ± 1.3</b>
出生体重 (kg)	<b>3,081 ± 384</b>	<b>3,002 ± 379</b>
出生身長 (cm)	<b>49.1 ± 2.1</b>	<b>48.8 ± 2.6</b>
出生頭囲 (cm)	<b>33.3 ± 1.5</b>	<b>33.0 ± 1.5</b>
<b>母</b>		
年齢 (歳)	<b>30.3 ± 4.5</b>	<b>29.4 ± 4.7</b>
身長 (cm)	158 ± 5	158 ± 6
妊娠前体重 (kg)	53 ± 8	53 ± 11
出産歴		
初産	<b>895 (44.8)</b>	<b>431 (34.1)</b>
経産	<b>1,103 (59.6)</b>	<b>784 (62.0)</b>
不明	<b>0 (0.0)</b>	<b>50 (4.0)</b>
妊娠初期の飲酒歴		
なし	<b>807 (40.4)</b>	<b>431 (34.1)</b>
あり	<b>1,191 (59.6)</b>	<b>812 (64.2)</b>
不明	<b>0 (0.0)</b>	<b>22 (1.7)</b>
教育歴 (卒業)		
中学	<b>49 (2.5)</b>	<b>176 (13.9)</b>
高校	<b>833 (41.7)</b>	<b>726 (57.4)</b>
短大・専門学校	<b>880 (44.0)</b>	<b>316 (25.0)</b>
大学	<b>235 (11.8)</b>	<b>23 (1.8)</b>
不明	<b>1 (0.1)</b>	<b>24 (1.9)</b>
世帯収入 (万円)		
300 未満	<b>419 (21.0)</b>	<b>310 (24.5)</b>
300-500	<b>900 (45.0)</b>	<b>499 (39.4)</b>
500-800	<b>527 (26.4)</b>	<b>186 (14.7)</b>
800 以上	<b>152 (7.6)</b>	<b>57 (4.5)</b>
不明	<b>0 (0.0)</b>	<b>213 (16.8)</b>
妊娠後期の 1 日当たりの喫煙本数 (本)		
0-4	15 (0.8)	97 (7.7)
5-9	14 (0.7)	196 (15.5)
10-14	5 (0.3)	247 (19.5)
15-19	3 (0.2)	51 (4.0)
20 以上	0 (0.0)	58 (4.6)
不明	—	616 (48.7)

カイ二乗検定, Mann-Whitney の U-検定. 不明は除外した.

SD; 標準偏差.

太字:  $P < 0.05$ .

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 2. 妊娠後期の自己申告による喫煙習慣と母体血漿コチニン濃度との関連

妊娠後期	自己申告による喫煙習慣 (4 か月時調査票の回答)	N (%)	中央値(25%-75%)	妊娠後期母体血漿コチニン値 (ng/mL)		
				N (%)		
				≤0.21	0.22-11.48	≥11.49
非喫煙		1,759 (53.9)	0.34 (0.15-0.91)	607 (34.5)	995 (56.6)	157 (8.9)
喫煙 (本/日)						
1-4		112 (3.4)	55.1 (26.6-95.4)	0 (0.0)	15 (13.4)	97 (86.6)
5-9		210 (6.4)	88.9 (52.4-128.9)	2 (1.0)	12 (5.7)	196 (93.3)
10-14		252 (7.7)	117.3 (79.5-155.9)	0 (0.0)	5 (2.0)	247 (98.0)
15-19		54 (1.7)	140.0 (104.2-190.9)	0 (0.0)	3 (5.6)	51 (94.4)
20 以上		58 (1.8)	128.5 (101.6-175.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	58 (100.0)
不明		6 (1.4)	76.0 (58.0-92.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (100.0)
4 か月時に脱落		812 (24.9)	62.5 (0.41-111.0)	124 (15.3)	235 (28.9)	453 (55.8)
全員		3,263 (100.0)	1.01 (0.25-79.2)	733 (22.5)	1,265 (38.8)	1,265 (38.8)



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. 母児の属性と出生時体格との関連 (N = 3,263)

属性	平均 ± SD	出生体重(g)	出生身長 (cm)	出生頭囲 (cm)
	N (%)	平均 ± SD	平均 ± SD	平均 ± SD
<b>児</b>				
性別				
男	1,611 (49.4)	<b>3,111 ± 386</b>	<b>49.3 ± 2.5</b>	<b>33.4 ± 1.7</b>
女	1,651 (50.6)	<b>3,002 ± 376</b>	<b>48.7 ± 2.0</b>	<b>33.0 ± 1.3</b>
不明	1 (0.0)			
在胎週数 (週)	39.0 ± 1.3	$\rho = 0.421^a$	$\rho = 0.421^a$	$\rho = 0.202^a$
出生体重 (kg)	3,055 ± 384	—	$\rho = 0.759^a$	$\rho = 0.568^a$
出生身長 (cm)	49.0 ± 2.3	$\rho = 0.759^a$	—	$\rho = 0.384^a$
出生頭囲 (cm)	33.2 ± 1.5	$\rho = 0.568^a$	$\rho = 0.384^a$	—
<b>母</b>				
年齢 (歳)	30.0 ± 4.6	$\rho = 0.005^a$	$\rho = -0.035^a$	$\rho = 0.104^a$
身長 (cm)	158.1 ± 5.4	$\rho = 0.186^a$	$\rho = 0.214^a$	$\rho = 0.139^a$
妊娠前体重 (kg)	53.0 ± 9.3	$\rho = 0.249^a$	$\rho = 0.196^a$	$\rho = 0.176^a$
出産歴				
初産	1,341 (4.6)	3,044 ± 365	<b>49.1 ± 2.5</b>	<b>33.0 ± 1.4</b>
経産	1,887 (57.8)	3,064 ± 400	<b>48.9 ± 2.1</b>	<b>33.3 ± 1.5</b>
不明	35 (1.1)			
妊娠初期の飲酒歴				
なし	1,238 (37.9)	3,056 ± 389	49.0 ± 2.1	33.2 ± 1.6
あり	2,003 (61.4)	3,056 ± 382	49.0 ± 2.4	33.2 ± 1.5
不明	22 (0.7)			
教育歴 (卒業)				
中学	225 (6.9)	<b>3,042 ± 381</b>	<b>49.0 ± 2.0</b>	<b>33.1 ± 1.4</b>
高校	1,559 (47.8)	<b>3,036 ± 385</b>	<b>49.0 ± 2.2</b>	<b>33.1 ± 1.4</b>
短大・専門学校	1,196 (36.7)	<b>3,066 ± 388</b>	<b>49.0 ± 2.0</b>	<b>33.3 ± 1.6</b>
大学	258 (7.9)	<b>3,127 ± 361</b>	<b>49.4 ± 1.8</b>	<b>33.5 ± 1.5</b>
不明	25 (0.8)			
世帯収入 (万円)				
300 未満	729 (22.3)	<b>3,050 ± 378</b>	<b>49.1 ± 1.8</b>	<b>33.1 ± 1.4</b>
300-500	1,399 (42.9)	<b>3,050 ± 391</b>	<b>49.0 ± 2.1</b>	<b>33.1 ± 1.5</b>
500-800	713 (21.9)	<b>3,091 ± 388</b>	<b>49.1 ± 2.2</b>	<b>33.4 ± 1.5</b>
800 以上	209 (6.4)	<b>2,999 ± 361</b>	<b>48.6 ± 1.9</b>	<b>33.3 ± 1.3</b>
不明	213 (6.5)			

カイ二乗検定, Spearman の相関係数. 不明は除外した.

SD; 標準偏差. <sup>a</sup>; Spearman の相関係数.

太字;  $P < 0.05$ .

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 4. 妊婦の *AHR* (G>A, rs2066853), *CYP1A1* (A>G, rs1048943), *XRCC1* (C>T, rs1799782) 遺伝子多型による児の出生時体格への影響

喫煙 状況	遺伝子多型			N	出生体重 (g)	出生身長 (cm)	出生頭囲 (cm)
	<i>AHR</i>	<i>CYP1A1</i>	<i>XRCC1</i>		$\beta$ (95%CI)	$\beta$ (95%CI)	$\beta$ (95%CI)
非喫煙	—	—	—	1,998	Reference	Reference	Reference
喫煙	—	—	—	1,265	<b>-71 (-103, -40)</b>	<b>-0.23 (-0.41, -0.06)</b>	<b>-0.28 (-0.41, -0.15)</b>
非喫煙	GA/AA	—	—	1,396	Reference	Reference	Reference
非喫煙	GG	—	—	602	<b>57 (30, 83)</b>	<b>0.21 (0.07, 0.36)</b>	<b>0.19 (0.07, 0.30)</b>
喫煙	GA/AA	—	—	878	-32 (-52, -6)	0.00 (-0.14, 0.15)	<b>-0.17 (-0.29, -0.06)</b>
喫煙	GG	—	—	387	<b>-56 (-91, -20)</b>	<b>-0.35 (-0.55, -0.16)</b>	-0.12 (-0.27, 0.03)
					$P_{int} = 0.130$	$P_{int} = 0.016$	$P_{int} = 0.858$
非喫煙	—	AA	—	1,255	Reference	Reference	Reference
非喫煙	—	AG/GG	—	743	<b>39 (15, 63)</b>	0.09 (-0.04, 0.22)	<b>0.19 (0.08, 0.29)</b>
喫煙	—	AA	—	807	-20 (-47, 7)	-0.01 (-0.16, 0.14)	-0.09 (-0.21, 0.03)
喫煙	—	AG/GG	—	458	<b>-62 (-95, -30)</b>	<b>-0.27 (-0.45, -0.09)</b>	<b>-0.21 (-0.35, -0.08)</b>
					$P_{int} = 0.206$	$P_{int} = 0.364$	$P_{int} = 0.154$
非喫煙	—	—	CC	937	Reference	Reference	Reference
非喫煙	—	—	CT/TT	1,061	<b>38 (17, 60)</b>	0.07 (-0.04, 0.20)	<b>0.16 (0.06, 0.25)</b>
喫煙	—	—	CC	615	-19 (-48, 10)	-0.09 (-0.25, 0.08)	-0.10 (-0.23, 0.02)
喫煙	—	—	CT/TT	650	<b>-59 (-87, -30)</b>	-0.18 (-0.34, -0.02)	<b>-0.18 (-0.30, -0.06)</b>
					$P_{int} = 0.188$	$P_{int} = 0.886$	$P_{int} = 0.384$
非喫煙	GA/AA	AA	—	858	Reference	Reference	Reference
非喫煙	GA/AA	AG/GG	—	538	31 (0, 63)	0.08 (-0.10, 0.25)	0.15 (0.02, 0.29)
非喫煙	GG	AA	—	397	<b>58 (23, 94)</b>	0.24 (0.04, 0.43)	0.17 (0.02, 0.32)
非喫煙	GG	AG/GG	—	205	<b>68 (21, 115)</b>	0.24 (-0.02, 0.50)	0.24 (0.04, 0.44)
喫煙	GA/AA	AA	—	540	-16 (-54, 22)	0.15 (-0.06, 0.36)	-0.13 (-0.29, 0.03)
喫煙	GA/AA	AG/GG	—	338	-43 (-87, 0)	-0.14 (-0.38, 0.10)	-0.21 (-0.40, -0.03)
喫煙	GG	AA	—	267	-22 (-72, 27)	-0.23 (-0.51, 0.04)	-0.05 (-0.26, 0.17)
喫煙	GG	AG/GG	—	120	<b>-114 (-185, -43)</b>	-0.54 (-0.93, -0.15)	-0.26 (-0.56, 0.05)
					$P_{int} = 0.970$	$P_{int} = 0.608$	$P_{int} = 0.732$
非喫煙	GA/AA	AA	CC	144	Reference	Reference	Reference
非喫煙	GA/AA	AA	CT/TT	174	34 (-1, 69)	0.13 (-0.07, 0.32)	0.07 (-0.08, 0.22)
非喫煙	GA/AA	AG/GG	CC	96	19 (-24, 63)	0.04 (-0.20, 0.29)	0.10 (-0.08, 0.29)
非喫煙	GA/AA	AG/GG	CT/TT	100	43 (0, 86)	0.10 (-0.14, 0.34)	0.19 (0.00, 0.37)
非喫煙	GG	AA	CC	72	<b>81 (31, 131)</b>	<b>0.44 (0.16, 0.71)</b>	0.18 (-0.03, 0.40)
非喫煙	GG	AA	CT/TT	74	36 (-14, 86)	0.03 (-0.25, 0.31)	0.14 (-0.08, 0.35)
非喫煙	GG	AG/GG	CC	25	28 (-46, 102)	0.08 (-0.34, 0.49)	0.10 (-0.22, 0.42)
非喫煙	GG	AG/GG	CT/TT	48	<b>97 (32, 162)</b>	0.35 (-0.01, 0.71)	0.33 (0.05, 0.60)
喫煙	GA/AA	AA	CC	250	22 (-32, 76)	0.25 (-0.05, 0.55)	-0.10 (-0.34, 0.13)
喫煙	GA/AA	AA	CT/TT	290	-56 (-111, -2)	0.04 (-0.26, 0.34)	-0.18 (-0.41, 0.05)
喫煙	GA/AA	AG/GG	CC	164	-70 (-136, -4)	-0.21 (-0.57, 0.16)	-0.24 (-0.52, 0.04)
喫煙	GA/AA	AG/GG	CT/TT	178	-22 (-83, 39)	-0.09 (-0.43, 0.25)	-0.21 (-0.47, 0.05)
喫煙	GG	AA	CC	122	0 (-72, 72)	-0.29 (-0.69, 0.11)	-0.10 (-0.40, 0.21)
喫煙	GG	AA	CT/TT	129	-47 (-121, 26)	-0.19 (-0.60, 0.22)	-0.01 (-0.33, 0.31)
喫煙	GG	AG/GG	CC	64	-64 (-186, 58)	-0.28 (-0.96, 0.40)	0.19 (-0.34, 0.71)
喫煙	GG	AG/GG	CT/TT	68	<b>-145 (-241, -50)</b>	-0.70 (-1.24, -0.17)	-0.53 (-0.94, -0.13)
					$P_{int} = 0.199$	$P_{int} = 0.346$	$P_{int} = 0.487$

母の年齢, 身長, 妊娠前体重, 出産歴, 妊娠中アルコール摂取, 教育歴, 世帯収入, 在胎週数, 児の性別で調整した重回帰分析.

$\beta$  は Reference と比較したときの出生時体格の変化量 (g あるいは cm) を表す.

交互作用の  $P$  値 ( $P_{int}$ ) は, 遺伝子型と喫煙状況との 2 つの交互作用項に対する  $F$  検定を組合せたポスト推定

(Postestimation) を使って計算した (例. *AHR*-GG 型×喫煙; *AHR*-GG 型×*CYP1A1*-AG/GG 型×喫煙).

太字; Bonferroni の補正後有意が認められたところ (1 つの遺伝子型の場合,  $P < 0.013$  (0.05/4); 2 つの遺伝子型の組合せの場合,  $P < 0.006$  (0.05/8); 3 つの遺伝子型の組合せの場合,  $P < 0.003$  (0.05/16)).

## 胎児期有機フッ素化合物曝露影響の臍帯血網羅的エピゲノム解析

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 特別招へい教授  
研究分担者 荒木 敦子 北海道大学環境健康科学研究教育センター 准教授  
研究分担者 宮下ちひろ 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任講師  
研究分担者 佐々木成子 北海道大学大学院医学研究科 助教  
研究分担者 石塚真由美 北海道大学大学院獣医学研究科 教授

### 研究要旨

胎児期有機フッ素化合物(perfluoroalkyl acids; PFAAs)曝露による出生体重の減少などといった児の健康への有害な影響が報告されている。その影響の一端は曝露によるエピゲノムへの影響が関与していると考えられるが、疫学研究で検討した報告はほとんどない。我々はこれまでに胎児期 PFOA 曝露による *Insulin-like growth factor 2 (IGF2)* 遺伝子の DNA メチル化低下、それに伴う出生時ポNDERAL 指数減少を報告した。しかしながら、胎児期 PFAAs 曝露がその他の遺伝子領域のメチル化に与える影響については不明であり、網羅的に解析することにより胎児期 PFAAs 曝露による健康影響の一端が明らかになることが期待される。

札幌の一産科病院で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・臍帯血・母体血中 PFAAs 濃度の得られた 164 名を対象とし、イルミナ社 Infinium Human Methylation450 BeadChip を用いて臍帯血 DNA 約 45 万 CpG 部位の網羅的メチル化解析を行った。データは標準化、バッチ補正を行い、 $\log_{10}$  変換後の PFOS, PFOA 濃度との関連を robust linear regression で解析した。False-discovery rate  $< .05$ , 若しくは偏回帰係数の絶対値の大きさを基準にし、曝露と関連する CpGs のスクリーニングを行った。

抽出された PFOS 曝露関連 368 CpGs, PFOA 曝露関連 316 CpGs のうち、同一遺伝子上に 3 CpGs 以上位置していたものは PFOS で 7 遺伝子 26 CpGs, PFOA で 7 遺伝子 26 CpGs あった。中でも PFOS 曝露では *PTPRN2* の高メチル化が広領域にわたり観察された。PFOA 曝露では *PAX8*, *HDAC4* 等の低メチル化が顕著であった。今後は得られた網羅的解析結果について別集団で再現性を確認し、結果の妥当性について検討する。また、観察された胎児期 PFAAs 曝露によるメチル化変化と、PFAAs 曝露による児の生後の肥満、アレルギー、神経発達等、健康への影響との関連について、出生コーホートを追跡し調べる必要がある。

### 研究協力者

小林 祥子, 三浦りゅう, 安住 薫  
(北海道大学環境健康科学研究教育センター)  
中澤 裕之  
(星薬科大学薬品分析化学教室)

### A. 研究目的

有機フッ素化合物(perfluoroalkyl acids; PFAAs)は家庭用品、工業製品に使用されている化合物で、中でも perfluorooctane sulfonate (PFOS) は 2009 年に POPs に指定され使用が制限さ

れた。しかしながら、難分解性のため未だ環境中に多く残存している。生体内では難代謝性を示し、人での半減期は PFOS で 5.4 年、perfluorooctanoic acid (PFOA) で 3.8 年と長い(Olsen et al., 2007)。また胎盤透過性を示し(Midasch et al., 2007)、妊娠中の母を介した胎児への曝露影響が懸念される。曝露による出生体重・サイズの低下は各国で報告があり、我々の出生コホートでも PFOS 胎児期曝露による女児での出生体重低下を報告している(Washino et al., 2009)。さらには、生後 20 歳時の肥満との関連も報告されており(Halldorsson et al., 2012)、その生体影響の少なくとも一部は、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)や、estrogen receptor (ER)等の核内受容体を介し作用していると考えられている(Takacs and Abbott 2007)。近年、我々は出生コホート研究で胎児期 PFOA 曝露による *Insulin-like Growth Factor 2 (IGF2)* 遺伝子の低メチル化、さらに低メチル化による出生時ポンドラル指数の低下を報告し、PFOA 曝露と出生体格低下への影響において *IGF2* のメチル化による仲介が示唆された(Kobayashi et al., *in preparation*)。しかしながら、胎児期 PFAAs 曝露の児 DNA メチル化への影響は疫学研究ではほとんど調べられておらず、我々の報告以外では、臍帯血 PFOA 濃度と臍帯血清中のゲノム全体のメチル化低下を報告した横断研究が一報のみである(Guerrero-Preston et al. 2010)。

DNA メチル化等のエピジェネティックな機構は、ゲノム配列の変化を伴わず遺伝子発現調節を行うことができ、エピゲノムの状態は細胞分裂後も引き継がれていく。また、DNA メチル化は環境影響による可

塑性をもっており、胎児期の環境と生後の表現型を結ぶ因子だと考えられている(Baccarelli and Bollati 2009)。そのため、胎児期 PFAAs 曝露が児のどのような遺伝子の DNA メチル化へ作用するか詳細を調べることにより、PFAAs の曝露影響について、胎児期の PFAAs 曝露が生後の児の健康にどのような影響を及ぼす可能性があるのかを探る、重要な手がかりとなる。

そこで本研究では、胎児期の PFAAs 曝露が、児のどのような遺伝子のメチル化に影響するのか、出生コホートの臍帯血を用いて、網羅的メチル化解析ツール、イルミナ社 Infinium HumanMethylation450 BeadChip にて検討を行った。

## B. 研究方法

### 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 292 名の DNA を用い、網羅的 DNA メチル化解析を行った。うち 96 名分のサンプルは、現在再解析を実施しており今回の解析からは除外した。今回は、うち母体血があり、PFAAs 濃度を測定した 164 名について統計解析を行った。

### 2. 方法

母体血中 PFOS、PFOA 濃度は LC-MS/MS により測定を行った。

DNA メチル化解析は、臍帯血 400  $\mu$ L 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 は、PicoGreen (Molecular Probes, Inc, USA)による 2 本鎖 DNA 定量と電気泳動法により過度な断片化がない良質な DNA であることを確認した

上で、その 500ng を材料に、Zymo EZ DNA Methylation Kit(Zymo Research, Irvine, CA, USA)を用いて亜硝酸ナトリウムによる化学処理を行い、HumanMethylation450 DNA Analysis Kit (Illumina, SanDiego, CA, USA)により、(1) 全ゲノム増幅、(2) 断片化処理(300～600bp 程度)、(3) HumanMethylation 450 BeadChip(ヒト全遺伝子の調節領域(プロモーター領域内およびその上流・下流の近傍領域)に存在する 485,577 カ所の CpG 配列が搭載)上へのハイブリダイゼーション、(4) 一塩基伸長反応、(5) 蛍光標識、(6) スキャナーによる読み取り(イルミナ社製スキャナーiScan を使用)の各工程を、G&G サイエンス株式会社(福島県松川町)で実施した。

上記の工程で得られたメチル化データを基に、クオリティーコントロール、Functional normalization(Fortin et al. 2014)、ComBat 法(Leek et al. 2012)によるバッチ補正といった標準化作業によって約 45 万 CpG 配列の DNA のメチル化値(ベータ値)を得た。得られたベータ値は母年齢、児性別、母体血採血時期、surrogate variables (Leek and Storey 2007) で調整した Robust linear regression (Fox and Weisberg 2011)、経験ベイズ法を用いて  $\log_{10}$  変換後の PFOS、PFOA 曝露との関連を解析した。CpGs の抽出は先行研究で用いられた手法を参考に(Huang et al. 2015; Khulan et al. 2014)、以下の 2 点を基準とした(図 1)。  
i) False-discovery rate  $q < 0.05$ 、もしくは、  
ii) 曝露による影響(偏回帰係数の絶対値の大きさで定義)が  $PFOS \geq 0.075$ 、 $PFOA \geq 0.05$  でかつ  $p < 0.05$ 。抽出された CpGs は位置情報と照らし合わせ、同一遺伝子上

で 3 CpGs 以上スクリーニングされた CpGs のみに絞り込んだ。メチル化値は細胞の種類によって異なり、臍帯血中の細胞組成が結果への交絡となる可能性があるため、細胞組成の違いによる解析結果への影響について確認した。CD8<sup>+</sup>T 細胞・CD4<sup>+</sup>T 細胞・ナチュラルキラー細胞・B 細胞・単球・顆粒細胞の全 6 種類の細胞組成の推定は、大人末梢血 DNA 網羅的メチル化データを参照にした Houseman の手法で行った(Houseman et al. 2012)。細胞組成推定値と抽出された CpGs との相関についてスピアマンの順位相関係数で確認した。同一領域上で一貫して相関係数が  $\geq \pm 0.1$  より大きかった箇所について、相関の見られた細胞推定値を個別に共変量としてモデルに加え、曝露とメチル化との関連を別途解析した。以上のデータ処理・統計解析は、R (ver.3.1.3)、Bioconductor (ver.3.0)の minfi, sva, limma package, JMP (ver.11)を用いて行った。

遺伝子名、機能についてはデータベース GeneCards を参考に記載した。

(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。

## C. 研究結果

本研究の対象者、164 組の母児の属性を表 1 に示した。対象者の母体血中 PFOS

濃度は中央値 4.7 ng/mL (IQR: 3.1-6.7), PFOA 濃度は 1.4 ng/mL (IQR: 0.8-1.8) だった。母の年齢の平均値は 30.0 才 ( $\pm 4.7$ ), 初産婦が 52.4%, 妊娠中喫煙者は 15.9% を占めた。児の在胎週数は 39.7 週 ( $\pm 1.1$ ), 出生体重は 3108 g ( $\pm 318$ ) だった。PFOS, PFOA 濃度と有意な関連がみられたものは, 出産歴, 母体血採血時期があった。また PFOA 濃度と児の性別の間に有意な関連が認められた。

図 2 に robust linear regression により PFOS, PFOA 曝露と解析を行った結果を示した。解析を行った 453,288 CpGsのうち, i) False-discovery rate  $< 0.05$  ((A)マンハッタン・プロット下線より上部), もしくは, ii) 曝露による影響(偏回帰係数の絶対値の大きさで定義)が PFOS  $\geq 0.075$ , PFOA  $\geq 0.05$  でかつ  $p < 0.05$  ((B)ボルケーノプロット薄枠部分)の基準で抽出されてきた CpGs は全部で PFOS 曝露が 368, PFOA 曝露が 616 あった。抽出された CpGs の特徴について, (A)近傍の遺伝子との位置関係, (B) CpGs アイランドからの位置関係の違いについて,  $X^2$  検定で確認した(図 3)。結果, 抽出された CpGs は PFOS, PFOA 曝露ともに元の 45 万 CpGs とは構成が異なり, transcription start site (TSS)近傍に位置する CpGs が少ない一方, intragenic region (IGR)の割合が大きかった。

表 2 に(A)PFOS, (B)PFOA の母体血中濃度との関連がみられた CpGsのうち, 一遺伝子上で 3CpGs 以上抽出されてきたものを示した。PFOS 曝露では, *Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type, N Polypeptide 2 (PTPRN2)* の 238 kbp に渡る領域上の 9 CpGs が p 値・偏回帰係数基準の双方で抽出され, その影響の向きも

1 CpG を除き一致していた。その他, *Dynein Heavy Chain Domain 1 (DNHD1)*, *Kelch-Like Family Member 35 (KLHL35)*, *Rabphilin 3A-Like (RPH3AL)*等の遺伝子上の CpG が複数個抽出され, いずれも影響の向きは各遺伝子内で一致していた。

PFOA 曝露については, Paired Box 8 (PAX8)の 39 kbp に及ぶ領域上の 9 CpGs が抽出され, うち 8 CpGs で一貫した高メチル化が見られた。また, *Histone Deacetylase 4 (HDAC4)*, *D-Aspartate Oxidase (DDO)*上の CpGs が p 値・偏回帰係数基準の双方で抽出されたほか, *Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein Associated Protein 1 (LRPAP1)*, *Protein Kinase, CAMP-Dependent, Regulatory, Type I, Beta (PRKAR1B)*, *Thymidine Kinase 2, Mitochondrial (TK2)*等の遺伝子上の CpGs が複数個抽出されたが, 一遺伝子を除き, 影響の向きはいずれも各遺伝子内で一致していた。

表 3 に近隣の CpGs の連続した変化領域を特定する Bumphunting 法(Jaffe et al. 2012) で PFOS 曝露について解析した結果を示した。PFOS を  $\log_{10}$  変換した値, もしくは第一四分位に対して第四四分位での影響を解析したところ, *Hook Microtubule-Tethering Protein 2 (HOOK2)* の gene body に位置する 4 CpGs で低メチル化が観察され, うち 2 CpGs については robust linear regression で抽出されたものと一致していた。PFOA 曝露に関してはこの手法では有意なメチル化変化をしている領域は見られなかった。

表 4 に Houseman の手法(Houseman et al. 2012)で行った臍帯血中細胞組成の

推定値、およびそれらと PFOS, PFOA との関連について示した。組成は顆粒細胞が全体のおよそ 60.3%を占めており、次いで CD4<sup>+</sup>T 細胞 11.6%, 単球 10.9%, B 細胞 10.1%が多かった。PFOS, PFOA との相関をスピアマンの順位相関係数で確認したところ、PFOS と単球の推定値との間に有意な負の相関が見られたが ( $\rho = -0.214, p = 0.006$ ), その他細胞組成との間には有意な相関はなかった。図 4 に各細胞の推定値と抽出された CpGs のメチル化値との相関を調べた結果を示した。各遺伝子内で一貫して相関係数 $\pm 0.1$ 以上の強い相関が見られた箇所について、表 2 右側の「cell」の列に示した。

抽出された各 CpGs について、母年齢、児性別、母体血採血時機、および細胞組成と相関が見られたものについては細胞組成の値で調整した重回帰分析を行った(図 5)。PAX8 等、一部曝露との関連が有意でなくなった CpGs もあったが、その影響の程度・方向については robust linear regression での網羅的解析結果と同様の傾向を示した。また、PFOA との関連が確認された *Leucine-Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 6 (LGR6)* については CD8<sup>+</sup>T 細胞・CD4<sup>+</sup>T 細胞・ナチュラルキラー細胞・B 細胞・顆粒細胞と相関が見られ、これらを共変量として重回帰分析を行ったところ、顆粒細胞が VIF 15.6 と多重共線性を示したため、PFOA 濃度との相関も小さい顆粒細胞をモデルから除いて解析を行ったが、いずれも結果に大きな変化は見られなかった。

#### D. 考察

本研究で行った網羅的 DNA メチル化解析により、胎児期 PFAAs 曝露で影響を受

ける可能性のあるメチル化部位が示された。

PFOS 曝露では、*PTPRN2* の gene body 上 238 kbp の広範囲に位置する 8 CpGs で高メチル化が示された。*PTPRN2* は受容体様タンパク質チロシンホスファターゼと類似した配列をコードしているが、実験的には示されていない。ラットの相同遺伝子はホスファチジルイノシトール脱リン酸化酵素をコードしていることが示唆され、インスリンの分泌に関わっている可能性がある。神経系や膵臓の内分泌細胞の発生への関与も示唆されており、インスリン依存性糖尿病の自己抗原となる。PFAAs 曝露との関係について報告はないが、動物実験では PFAAs と同様 PPARs を介して生体影響を及ぼすと考えられるフタル酸ジブチル(DBP)や、エストロゲン様作用を示すビスフェノール A(BPA)曝露による mRNA 遺伝子発現変化の報告がある(Ali et al. 2014; Johnson et al. 2011)。

その他、gene body に位置する 3 CpGs で PFOS 曝露による低メチル化が観察された *DNHD1* は、微小管輸送に関わるタンパク質をコードしており、プロモーター領域に PPAR- $\alpha$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  の結合部位を持つ(DECODER, SABiosciences)。同様に Gene body 上の 3 CpGs の高メチル化が見られた *KLHL35* についてもプロモーター領域に PPAR- $\alpha$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  の結合部位を持つが(DECODER, SABiosciences)、遺伝子がコードしているタンパク質の機能は不明である。Gene body 上の 3 CpGs で高メチル化が見られた *RPH3AL* がコードするタンパク質は内分泌・外分泌細胞での Ca<sup>2+</sup>依存性エキソサイトーシスを調節しており、膵臓でのインスリン分泌で主要な役割を担っている。動物実験では DBP による発

現低下が示されている(Gaido et al. 2007; Johnson et al. 2011)。また, Bumhunter を含めた複数の方法で低メチル化が観察された *Hook Microtubule-Tethering Protein 2 (HOOK2)*ではプロモーター領域に PPAR- $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2 のほか, ER- $\alpha$  の結合部位を持ち(DECODE, SABiosciences), 動物実験で DBP 曝露による遺伝子発現上昇(Ren et al. 2010), BPA 曝露による発現低下(Ali et al. 2014)が示されている。

胎児期 PFOA 曝露については, *PAX8* 遺伝子上の 8 CpGs で曝露による高メチル化が観察された。*PAX8*は転写因子をコードしており, 甲状腺濾胞細胞の分化, 甲状腺特異的遺伝子の発現に関わる。プロモーター領域に PPAR- $\alpha$ ,  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2 の結合部位を持ち(DECODE, SABiosciences), ラット細胞での *in vitro*, ゼブラフィッシュでの実験により, PFOS, PFOA 曝露による *PAX8* mRNA の発現変化が示されている(Du et al. 2013; Naile et al. 2012)。しかし今回の結果では, 臍帯血細胞組成調整後, 高メチル化傾向は見られたものの有意な結果は得られなかったため, 今後別集団にて再現性を確認する必要がある。

*Polypeptide N-Acetylgalactosaminyl-transferase 2 (GALNT2)*の 3'-非翻訳領域に位置する 4 CpGs は PFOA 曝露による低メチル化を示した。*GALNT2*は糖転移酵素をコードしており, 中性脂肪レベル, 2 型糖尿病との関連が示唆されている。PPAR- $\alpha$ ,  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2 の結合部位を持ち(DECODE, SABiosciences), ヒト細胞での *in vitro* 実験により, PFOA 曝露による発現上昇が示されている(Peng et al. 2013)。4 CpGs での低メチル化が見られた *HDAC4* はヒストン脱アセチル化酵素をコードしており, 遺伝子のプロモーター

部位に結合することで発現を抑制する。プロモーター領域に PPAR- $\alpha$ ,  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2 の結合部位を持ち(DECODE, SABiosciences), PFAAs 曝露についての報告はないが, フタル酸ビス(2-エチルヘキシル) (DEHP)曝露による HDAC4 の発現上昇, ヒストンアセチル化の減少が示されている(Guida N, et al. Toxicol Appl Pharmacol. 2014)。また, 5'-非翻訳領域での 3 CpGs の低メチル化が見られた *PRKAR1B*は cAMP 依存性プロテインキナーゼ A を構成するサブユニットをコードしており, 脂質や糖代謝を調節している。4 CpGs で高メチル化が見られた *LRPAP1*は, 発生初期に重要で脂質恒常性の維持に携わる *Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP1)*の折りたたみを助けるタンパク質をコードしている。

今回, スクリーニングされてきた CpGs が位置する遺伝子には PPAR の結合部位を持ち, インスリン分泌, 甲状腺機能, 脂質・糖代謝等の機能に関わるものがあつた。胎児期の PFAAs 曝露は, 甲状腺ホルモン攪乱(Wang et al. 2014)や将来の肥満への影響(Halldorsson et al. 2012)が疫学研究で示されており, 今回得られた結果には整合性がある。しかしながら, 例えばプロモーターに PPARs の結合部位を持つ遺伝子, インスリン経路や脂質代謝等の特定の経路に関わる遺伝子等のメチル化が選択的に変化する傾向にあるのかは, 今後, Gene Ontology (GO)解析, パスウェイ解析で明らかにする必要がある。また, 今回 PFAAs 曝露によりメチル化変化が観察された一部の CpGs の影響のみ示しており, 今後は同遺伝子上の近隣 CpGs についても曝露により一貫してメチル化変化が生じているか, 詳細に検討する必要がある。



今回、臍帯血中の細胞組成の結果への影響を極力小さくするため、Houseman の手法を用い細胞組成の推定を行ったが、この手法は大人末梢血を参照に推定を行っているため、臍帯血の推定には適していない。そのため、臍帯血細胞組成の違いによる結果への交絡の可能性については完全には否定できない点も注意が必要である。

最後に、DNA メチル化は様々な環境因子、および SNPs を含めた個人の遺伝的背景の影響を受けており、今回観察された結果にそれら未測定因子が強く影響している可能性は否定できない。今後、別集団である北海道コーホートでも DNA メチル化と曝露との関連を解析し、再現性を確認することによって、これら曝露以外の因子による影響の可能性は低くなり、より強固な結果が得られる。また、今回観察された胎児期 PFAAs 曝露によるメチル化変化が、肥満・糖尿病・甲状腺機能を含め、生後の児にどのような健康影響を及ぼすかについて、出生コーホートの集団を追跡し明らかにしていく必要がある。

## E. 結論

本研究により、胎児期の PFAAs 曝露により、児臍帯血で PFOS では *PTPRN2* 遺伝子、PFOA では *PAX8* 遺伝子等のメチル化が変化する可能性が示され、インスリン分泌、甲状腺機能、脂質・糖代謝等の機能への影響が懸念される。しかしながら、網羅的解析の特性上、今回の観察結果に近隣の SNPs 等、未測定因子の他の要因の影響がある可能性は否定できず、今後、別集団である北海道コーホートでの再現性の確認が必要になる。また、PFAAs 曝露によるメチル化変化が、児の生後の健康とどのように関わっているか、追跡し調べる必要が

ある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Kobayashi S, Azumi K, Goudarzi H, Araki A, Miyashita C, Kobayashi S, et al. Effects of Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals Exposure on Cord Blood IGF2/H19 Methylation and Ponderal Index: The Hokkaido Study. (*in preparation*)

### 2. 学会発表

- (1) 小林祥子, 三浦りゅう, 川口章夫, 宮下ちひろ, 三宅邦夫, 松村徹, 山本潤, 石塚真由美, 荒木敦子, 久保田健夫, 岸玲子, 胎児期ビスフェノール A 曝露影響に関する臍帯血 DNA 網羅的メチル化解析—北海道スタディ, 第 4 回日本 DOHaD 研究学術集会, 東京, 2015.8.1-2.
- (2) 小林祥子, 安住薫, 佐々木成子, 松村徹, 山本潤, 石塚真由美, 宮下ちひろ, 池野多美子, 荒木敦子, 岸玲子, 臍帯血ビスフェノール A 濃度と児の IGF2 DNA メチル化との関連—北海道スタディ, 第 85 回日本衛生学会学術総会, 和歌山, 2015.3.26-28.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## 参考文献

1. Fortin JP, Labbe A, Lemire M, Zanke BW, Hudson TJ, Fertig EJ, et al. Functional normalization of 450k methylation array data improves replication in large cancer studies.

- Genome Biol 2014;15(12):503.
2. Leek JT, Johnson WE, Parker HS, Jaffe AE, Storey JD. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics* 2012;28(6):882-3.
  3. Leek JT, Storey JD. Capturing heterogeneity in gene expression studies by surrogate variable analysis. *PLoS Genet* 2007;3(9):1724-35.
  4. Fox, J. and S. Weisberg, Robust regression in R, in *An R Companion to Applied Regression*. 2011, Sage: Thousand Oaks, CA.
  5. Smyth, G.K., Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*, 2004. 3: p. Article3.
  6. Olsen GW, Burris JM, Ehresman DJ, Froehlich JW, Seacat AM, Butenhoff JL, et al. Half-Life of Serum Elimination of Perfluorooctanesulfonate, Perfluorohexanesulfonate, and Perfluorooctanoate in Retired Fluorochemical Production Workers. *Environ Health Perspect* 2007;115(9):1298-305.
  7. Midasch O, Drexler H, Hart N, Beckmann MW, Angerer J. Transplacental exposure of neonates to perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate: a pilot study. *Int Arch Occup Environ Health* 2007;80(7):643-8.
  8. Washino N, Saijo Y, Sasaki S, Kato S, Ban S, Konishi K, et al. Correlations between prenatal exposure to perfluorinated chemicals and reduced fetal growth. *Environ Health Perspect* 2009;117(4):660-7.
  9. Halldorsson TI, Rytter D, Haug LS, Bech BH, Danielsen I, Becher G, et al. Prenatal exposure to perfluorooctanoate and risk of overweight at 20 years of age: a prospective cohort study. *Environ Health Perspect* 2012;120(5):668-73.
  10. Takacs ML, Abbott BD. Activation of mouse and human peroxisome proliferator-activated receptors (alpha, beta/delta, gamma) by perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate. *Toxicol Sci* 2007;95(1):108-17.
  11. Guerrero-Preston R, Goldman LR, Brebi-Mieville P, Ili-Gangas C, LeBron C, Witter FR, et al. Global DNA hypomethylation is associated with in utero exposure to cotinine and perfluorinated alkyl compounds. *Epigenetics* 2010;5(6):539-46.
  12. Baccarelli A, Bollati V. Epigenetics and environmental chemicals. *Curr Opin Pediatr* 2009;21(2):243-51.
  13. Khulan B, Manning JR, Dunbar DR, Seckl JR, Raikkonen K, Eriksson JG, et al. Epigenomic profiling of men exposed to early-life stress reveals DNA methylation differences in association with current mental state. *Transl Psychiatry* 2014;4:e448.
  14. Huang RC, Garratt ES, Pan H, Wu Y,

- Davis EA, Barton SJ, et al. Genome-wide methylation analysis identifies differentially methylated CpG loci associated with severe obesity in childhood. *Epigenetics* 2015;10(11):995-1005.
15. Houseman EA, Accomando WP, Koestler DC, Christensen BC, Marsit CJ, Nelson HH, et al. DNA methylation arrays as surrogate measures of cell mixture distribution. *BMC Bioinformatics* 2012;13.
16. Jaffe AE, Murakami P, Lee H, Leek JT, Fallin MD, Feinberg AP, et al. Bump hunting to identify differentially methylated regions in epigenetic epidemiology studies. *Int J Epidemiol* 2012;41(1):200-9.
17. Johnson KJ, McDowell EN, Viereck MP, Xia JQ. Species-specific dibutyl phthalate fetal testis endocrine disruption correlates with inhibition of SREBP2-dependent gene expression pathways. *Toxicol Sci* 2011;120(2):460-74.
18. Ali S, Steinmetz G, Montillet G, Perrard MH, Loundou A, Durand P, et al. Exposure to low-dose bisphenol A impairs meiosis in the rat seminiferous tubule culture model: a physiotoxicogenomic approach. *PLoS One* 2014;9(9):e106245.
19. Gaido KW, Hensley JB, Liu D, Wallace DG, Borghoff S, Johnson KJ, et al. Fetal mouse phthalate exposure shows that Gonocyte multinucleation is not associated with decreased testicular testosterone. *Toxicol Sci* 2007;97(2):491-503.
20. Ren H, Aleksunes LM, Wood C, Vallanat B, George MH, Klaassen CD, et al. Characterization of peroxisome proliferator-activated receptor alpha-independent effects of PPARalpha activators in the rodent liver: di-(2-ethylhexyl) phthalate also activates the constitutive-activated receptor. *Toxicol Sci* 2010;113(1):45-59.
21. Du G, Huang H, Hu J, Qin Y, Wu D, Song L, et al. Endocrine-related effects of perfluorooctanoic acid (PFOA) in zebrafish, H295R steroidogenesis and receptor reporter gene assays. *Chemosphere* 2013;91(8):1099-106.
22. Naile JE, Wiseman S, Bachtold K, Jones PD, Giesy JP. Transcriptional effects of perfluorinated compounds in rat hepatoma cells. *Chemosphere* 2012;86(3):270-7.
23. Peng S, Yan L, Zhang J, Wang Z, Tian M, Shen H. An integrated metabolomics and transcriptomics approach to understanding metabolic pathway disturbance induced by perfluorooctanoic acid. *J Pharm Biomed Anal* 2013;86:56-64.
24. Wang Y, Rogan WJ, Chen PC, Lien GW, Chen HY, Tseng YC, et al. Association between Maternal Serum Perfluoroalkyl Substances during Pregnancy and Maternal and Cord Thyroid Hormones: Taiwan Maternal and Infant Cohort Study. *Environ Health Perspect* 2014;122(5):529-34.

Table 1. 母児の属性と PFAAs 濃度との関連

	N	Mean ( $\pm$ SD) (%)	PFOS (ng/mL)		PFOA (ng/mL)	
			Median (25th, 75th)	p	Median (25th, 75th)	p
Concentration in maternal blood	164		4.7 (3.1, 6.7)		1.4 (0.8, 1.8)	
<i>Maternal characteristics</i>						
Maternal age (year) <sup>a</sup>	164	30.0 ( $\pm$ 4.7)	$\rho = -0.102$	0.195	$\rho = -0.114$	0.145
Pre-pregnancy BMI (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	164	20.9 ( $\pm$ 2.9)	$\rho = 0.016$	0.841	$\rho = -0.015$	0.852
Parity <sup>b</sup>						
Primiparous	86	52.4	5.4 (3.8, 7.6)	0.002**	1.5 (1.2, 2.1)	<.001**
Multiparous	78	47.6	4.2 (2.8, 5.3)		0.9 (0.6, 1.4)	
Maternal education <sup>b</sup>						
$\leq 12$ years	78	47.6	4.8 (3.3, 6.0)	0.931	1.2 (0.8, 1.7)	0.208
$> 12$ years	86	52.4	4.7 (3.0, 7.2)		1.4 (0.9, 1.8)	
Smoking during pregnancy <sup>b</sup>						
No	138	84.1	4.8 (3.2, 7.0)	0.178	1.4 (0.9, 1.8)	0.071
Yes	26	15.9	4.2 (2.5, 6.7)		1.2 (0.7, 1.6)	
Alcohol consumption during pregnancy <sup>b</sup>						
No	119	72.6	4.8 (3.2, 6.5)	0.536	1.3 (0.8, 1.7)	0.514
Yes	45	27.4	4.2 (3.1, 6.9)		1.4 (0.9, 2)	
Blood sampling period <sup>c</sup>						
$< 28$ weeks	9	5.5	6.7 (5.5, 7.8)	<.001**	1.6 (1.1, 2.7)	0.040*
28-36 weeks	73	44.5	5.2 (4.2, 7.5)		1.5 (0.9, 2.1)	
$\geq 36$ weeks	37	22.6	3.1 (2.4, 5.3)		1.1 (0.8, 1.4)	
After delivery	45	27.4	3.6 (2.7, 5.4)		1.3 (0.8, 1.7)	
<i>Infant characteristics</i>						
Gestational age (week) <sup>a</sup>	164	39.7 ( $\pm$ 1.1)	$\rho = 0.112$	0.155	$\rho = 0.123$	0.116
Sex <sup>b</sup>						
Male	63	38.4	5.0 (3.7, 7.5)	0.127	1.5 (1.1, 1.9)	0.019*
Female	101	61.6	4.6 (3.1, 6.2)		1.3 (0.8, 1.7)	
Birth weight (g) <sup>a</sup>	164	3108 ( $\pm$ 318)	$\rho = -0.102$	0.195	$\rho = -0.019$	0.813

<sup>a</sup> Spearman's correlation, <sup>b</sup> Mann-Whitney U-test, <sup>c</sup> Kruskal-Wallis