

DNA メチル化を介する有機フッ素化合物胎児期曝露の児への影響

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 石塚 真由美 北海道大学大学院獣医学研究科 教授
研究分担者 松浦 英幸 北海道大学農学研究院生命有機化学 准教授

研究要旨

背景：有機フッ素化合物（**Perfluoroalkyl acids; PFAAs**）の胎児期曝露は児の健康に影響を及ぼすことが報告されている。その作用機序の1つとして、**DNA** メチル化への影響が介在していると考えられているが、疫学研究で検討した報告はない。

目的：本研究は、**PFAAs** 曝露による胎児発達への影響に **DNA** メチル化変化が関与しているかを明らかにすることを目的とした。

方法：対象は、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 **DNA**、母体血中 **PFAAs** 濃度のそろそろ母児ペア(N=177)とした。**Insulin-like growth factor 2 (IGF2)**, **H19**, および **long interspersed element 1 (LINE1)** 遺伝子領域の臍帯血メチル化をパイロシークエンス法を用いて定量した。得られた **DNA** メチル化率と **PFAAs** の血中濃度との関連を重回帰分析で解析し、媒介分析により、**PFAAs** 曝露と出生時体格との関連にメチル化が介在しているかを検討した。

結果：交絡因子調整後、**PFOA**濃度と**IGF2**メチル化との間に有意な負の関連が見られた($\beta = -0.73, p = 0.04$)。次に、**IGF2**メチル化と出生時体格との関連を検討した結果、**IGF2**メチル化とポンドラル指数との間に有意な正の相関が認められた($\beta = 0.17, p = 0.002$)。さらに媒介分析の結果、**IGF2**メチル化が**PFOA**曝露によるポンドラル指数の減少を仲介しており、その影響の20%を説明できることが示された。

考察：以上の結果は、**PFAAs** 曝露は、**DNA** メチル化への影響を介して、胎児発達に影響を与えていることを示唆している。

研究協力者

三浦 りゅう, 小林 祥子, 小林 澄貴
(北海道大学環境健康科学研究教育センター)

A . 研究目的

有機フッ素化合物 **perfluoroalkyl acids (PFAAs)** は身近な日用品、工業製品の成分として広く使用されている化合物である。**PFAAs** の中で、**perfluorooctane sulfonate (PFOS)** および **perfluorooctanoic acid (PFOA)** が最も使用されていたが、近年その高い毒性・残留性から、世界各国で使用

制限が実施されるようになってきた。しかし、**PFOS**, **PFOA** は難分解性のため未だ環境中に多く残存し、また、人での半減期は **PFOS** で 5.4 年、**PFOA** で 3.8 年と長い(Olsen et al., 2007)。さらに、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。曝露による出生時体格の低下は各国で報告があり、我々も **PFOS** 胎児期曝露による女児での出生体重低下 (Washino et al., 2009)を報告している。また、我々は、**PFAAs** 胎児期曝露が生後のアレルギー症状と関連していることを見出した

（Goudarzi et al., 2016）。このように、胎児期曝露が長期にわたり児の健康に影響を及ぼす作用機序の1つとして、DNAメチル化を含むエピジェネティクス変化の影響が介在していると考えられている（Baccarelli and Bollati, 2009）。しかし、PFAAs 胎児期曝露による児 DNA メチル化への影響を検討した疫学研究は、臍帯血 PFOA 濃度と臍帯血中のゲノム全体のメチル化低下を報告した横断研究のみである（Guerrero-Preston et al. 2010）。

本研究では、PFAAs の胎児期曝露による児の健康への影響に DNA メチル化変化が関与しているかを明らかにすることを目的とし、胎児期の PFAAs 曝露と long interspersed element-1（LINE1）、Insulin-like growth factor 2(IGF2)/H19 領域の臍帯血 DNA メチル化変化、および児の出生体格との関連について出生コホートを用いて検討した（Kobayashi et al., 2016）。

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、臍帯血 DNA、PFOS、PFOA の出産前母体血中濃度のそろった母児ペア(N=177)を対象とした。

2．方法

臍帯血全血 400 μ L から Maxwell® 16 DNA Purification Kit (Promega 社)を用いて DNA 抽出を行った。得られた臍帯血 DNA を Epiect Plus Bisulfite Kit (Qiagen 社)にてバイサルファイト処理後、Pyromark Q24 system (Qiagen 社)を用いたパイロシーケンス法により、IGF2 DMR0 (chr11p15.5, site 1: 2,109,519;

site 2: 2,109,516; NCBI Human Genome Build 37.1), H19 DMR (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 領域について DNA メチル化解析を行った。母体血中 PFOS、PFOA 濃度は LC/MS-MS で測定した。得られた曝露濃度を log 変換し、重回帰分析により統計解析を行った。また、媒介分析（Hayes, 2013）により、DNA メチル化の介在性について検討した。

（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

本研究に用いた集団の臍帯血 DNA メチル化率の平均値（ \pm SD）は、IGF2 が 48.5% (\pm 3.0)、H19 が 52.3% (\pm 2.0)、LINE1 が 75.8% (\pm 1.1)であった。出産前母体血中 PFOS 濃度の中央値は 5.2 ng/ml (最小値-最大値: 3.9-7.2)、PFOA 濃度の中央値は 1.3 ng/ml (最小値-最大値: 0.9-2.1)であった。Table 1 に解析に用いた集団の母児の属性、および、PFOS、PFOA 濃度との関連を示した。PFOS、PFOA 濃度ともに出産歴および採血時期との有意な相関が認められた。また、PFOA 濃度については、母の教育歴および児の性別との相

関が認められた。

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（Table 2）、母年齢・学歴・妊娠中喫煙・児性別・母体血採血時期で調整後、PFOA 濃度と IGF2 メチル化との間に有意な負の関連がみられた（ $\beta = -0.73$, $p = 0.04$ ）が、H19, LIN1 との関連は認められなかった。PFOS 濃度については、いずれのメチル化とも有意な関連は認められなかった。

次に、メチル化と出生時体格との関連を調べた結果（Table 3）、IGF2 の低メチル化によるポンデラル指数の低下が認められた（ $\beta = 0.17$, $p < 0.01$ ）。

さらに、媒介分析の結果（Figure 1）、IGF2 メチル化が PFOA 曝露によるポンデラル指数の減少を仲介しており（ $ab = -0.11$; $BCaCI: -0.30$ to -0.02 ）その影響の 21%（ $P_M = 0.21$; Preacher and Hayes, 2008）を説明出来ることが示された。

D．考察

本研究により、PFOA 曝露による出生時体格低下への影響において、IGF2 メチル化が仲介していることが示された。

疫学および動物実験による先行研究で PFAAs 曝露による出生体格の低下が報告されている（Olsen et al., 2009; Washino et al., 2009; Verner et al. 2015）。しかしながら、その作用機序については明らかにされていない。我々の結果は、PFAAs 胎児期曝露による胎児発達への作用機序の 1 つとして、曝露による児のメチル化変化、その結果として起こる遺伝子発現への影響が関与していることを示唆するものである。

IGF2 は胎児発育に重要なインスリン様

成長因子をコードしており、そのメチル化は出生体重や体格のみならず、生後の肥満状態とも相関が示されている（Perkins et al., 2012）。デンマークの出生コホート研究では、胎児期 PFOA 曝露により女児の 20 年後の肥満傾向の上昇、レプチン濃度の低下、アディポネクチン濃度の上昇といった影響を与えることが示されている（Halldorsson et al., 2012）。ポンデラル指数は脂肪組織などの軟組織に対する骨構造の割合を示し、児の肥満度を表す。その減少、つまり胎児発達の遅れは、将来の肥満のみならず、2 型糖尿病、心疾患などの疾病リスクを上昇させる可能性がある（Barker, 2010）。PFAAs の胎児曝露による長期的な影響を考えると、曝露によるメチル化変化の影響が児の将来の健康とどうかかわるのか、出生コホートを追跡し解明することが必要である。

E．結論

胎児期 PFOA 曝露による IGF2 の低メチル化、さらに低メチル化による出生時ポンデラル指数低下が認められた。媒介分析により、IGF2 メチル化が PFOA 曝露によるポンデラル指数減少を仲介しており、その影響の 20% を説明できることが示された。

F．研究発表

1．論文発表

(1) Kobayashi S, Azumi K, Goudarzi H, Araki A, Miyashita C, Kobayashi S, Itoh S, Sasaki S, Ishizuka M, Nakazawa H, Ikeno T, Kishi R. 2016. Effects of prenatal perfluoroalkyl acid exposure on cord blood IGF2/H19 methylation and ponderal index: The

**Hokkaido Study. J Expo Sci Environ
Epidemiol. 2016 Aug 24.**

2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

参考文献

1. Olsen GW, Burris JM, Ehresman DJ, Froehlich JW, Seacat AM, Butenhoff JL, Zobel LR. 2007. Half-life of serum elimination of perfluoro-octanesulfonate, perfluorohexanesulfonate, and perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers. *Environ Health Perspect.* 115:1298-305.
2. Midasch O, Drexler H, Hart N, Beckmann MW, Angerer J. 2007. Transplacental exposure of neonates to perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoate: a pilot study. *Int Arch Occup Environ Health.* 80:643-8.
3. Washino N, Saijo Y, Sasaki S, Kato S, Ban S, Konishi K, Ito R, Nakata A, Iwasaki Y, Saito K, Nakazawa H, Kishi R. 2009. Correlations between prenatal exposure to perfluorinated chemicals and reduced fetal growth. *Environ Health Perspect.* 117:660-7.
4. Goudarzi H, Miyashita C, Okada E, Kashino I, Kobayashi S, Chen CJ, Ito S, Araki A, Matsuura H, Ito YM, Kishi R. 2016. Effects of prenatal exposure to perfluoroalkyl acids on prevalence of allergic diseases among 4-year-old children. *Environ Int.* 94:124-32.
5. Baccarelli A and Bollati V. 2009. Epigenetics and environmental chemicals. *Curr Opin Pediatr.* 21:243-251.
6. Guerrero-Preston R, Goldman LR, Brebi-Mieville P, Ili-Gangas C, Lebron C, Witter FR, Apelberg BJ, Hernández-Roystacher M, Jaffe A, Halden RU, Sidransky D. 2010. Global DNA hypomethylation is associated with in utero exposure to cotinine and perfluorinated alkyl compounds. *Epigenetics.* 5:539-46.
7. Hayes AF. 2013. Introduction to Mediation, Moderation, and Conditional Process Analysis. In *A Regression-Based Approach*. New York, NY, USA: Guilford Press.
8. Preacher KJ, Hayes AF. 2008. Asymptotic and resampling strategies for assessing and comparing indirect effects in multiple mediator models. *Behav Res Methods*, 40: 879-891.
9. Olsen GW, Butenhoff JL, Zobel LR. 2009. Perfluoroalkyl chemicals and human fetal development: an epidemiologic review with clinical and toxicological perspectives. *Reprod Toxicol.* 27:212-30.
10. Verner MA, Luccisano AE, Morken NH, Yoon M, Wu H, McDougall R, Maisonet M, Marcus M, Kishi R, Miyashita C, Chen MH, Hsieh WS, Andersen ME, Clewell HJ 3rd,

- Longnecker MP. 2015. Associations of Perfluoroalkyl Substances (PFAS) with Lower Birth Weight: An Evaluation of Potential Confounding by Glomerular Filtration Rate Using a Physiologically Based Pharmacokinetic Model (PBPK). Environ Health Perspect. 123:1317-24.**
- 11. Perkins E, Murphy SK, Murtha AP, Schildkraut J, Jirtle RL, Demark-Wahnefried W, Forman MR, Kurtzberg J, Overcash F, Huang Z, Hoyo C. 2012. Insulin-like growth factor 2/H19 methylation at birth and risk of overweight and obesity in children. The Journal of pediatrics. 161:31-9.**
- 12. Halldorsson TI, Rytter D, Haug LS, Bech BH, Danielsen I, Becher G, Henriksen TB, Olsen SF. 2012. Prenatal exposure to perfluorooctanoate and risk of overweight at 20 years of age: a prospective cohort study. Environmental health perspectives. 120:668-73.**
- 13. Barker DJ. Adult consequences of fetal growth restriction. 2006. Clin Obstet Gynecol. 49:270-83.**

Table 1. Maternal and infant characteristics and their relationships with maternal serum PFAAs concentrations (N=177).

	Mean ±SD N (%)	PFOS (ng/ml)		PFOA (ng/ml)	
		Median (25th-75th)	p-value	Median (25th-75th)	p-value
Maternal characteristics					
Maternal age (year) ^a	29.8 ± 4.8	= -0.105	0.165	= -0.067	0.376
Pre-pregnancy BMI (kg/m)	21.2 ± 3.1 ^b	= -0.019	0.799	= -0.08	0.292
Parity ^c					
0	98 (55.4)	6.0 (4.2, 8.0)	0.008**	1.6 (1.2, 2.4)	<0.001**
1	59 (33.3)	4.8 (3.1, 6.2)		1.1 (0.8, 1.4)	
≥ 2	20 (11.3)	4.6 (3.3, 6.6)		0.8 (0.5, 1.1)	
Educational level (year) ^c					
≤ 12	83 (46.9)	5.2 (4.0, 7.0)	0.846	1.2 (0.8, 1.8)	0.030*
> 12	94 (53.1)	5.5 (3.7, 7.5)		1.5 (1.0, 2.3)	
Smoking during pregnancy ^c					
No	144 (81.4)	5.3 (4.0, 7.2)	0.308	1.4 (0.9, 2.2)	0.133
Yes	33 (18.6)	4.8 (2.8, 7.3)		1.2 (0.8, 1.7)	
Alcohol consumption during pregnancy ^c					
No	120 (67.8)	5.2 (3.9, 7.3)	0.891	1.4 (0.9, 2.1)	0.907
Yes	57 (32.2)	5.5 (3.7, 7.2)		1.4 (0.9, 2.2)	
Blood sampling period ^d					
23–31 weeks	67 (37.9)	6.0 (4.8, 7.6)	<0.001**	1.6 (1.0, 2.3)	0.015*
32-34 weeks	45 (25.4)	6.2 (3.9, 8.6)		1.4 (0.8, 1.9)	
35-41 weeks	65 (36.7)	4.6 (2.9, 5.9)		1.1 (0.8, 1.8)	
Infant characteristics					
Gestational age (week) ^a	39.8 ± 1.0	= 0.042	0.575	= 0.063	0.403
Sex ^c					
Male	79 (44.6)	5.4 (4.2, 7.5)	0.158	1.6 (1.0, 2.2)	0.040*
Female	98 (55.4)	5.2 (3.3, 7.0)		1.3 (0.8, 1.9)	
Birth weight (g) ^a	3125 ± 330	= -0.126	0.096	= -0.116	0.124
Birth length (cm) ^a	48.5 ± 1.5 ^e	= 0.091	0.232	= 0.071	0.346
Ponderal Index (kg/m ³) ^a	27.4 ± 2.2 ^e	= -0.264	<0.001**	= -0.226	0.003**

Abbreviations: BMI, body mass index; PFAA, perfluoroalkyl acid; PFOA, perfluorooctanoic acid; PFOS, perfluorooctane sulfonate. ^aSpearman's correlation coefficient (ρ). ^bData missing: prepregnancy BMI (N = 1). ^cMann–Whitney U-test. ^dKruskal–Wallis test. ^eData excluded: birth length (N=1) and ponderal index (N= 1). *P<0.05; **P<0.01.

Table 2. Association between maternal PFAA concentrations and cord blood DNA methylation in multiple linear regression analyses (N=177).

	IGF2 methylation (%)		H19 methylation (%)		LINE1 methylation (%)	
	(95% CI)	p	(95% CI)	p	(95% CI)	p
log (PFOS)						
Crude	-0.60 (-1.53, 0.33)	0.203	-0.16 (-0.79, 0.46)	0.605	0.18 (-0.17, 0.53)	0.321
Adjusted	-0.56 (-1.56, 0.44)	0.274	-0.09 (-0.77, 0.59)	0.798	0.05 (-0.31, 0.42)	0.764
	R ² =0.056		R ² = 0.018		R ² =0.134	
log (PFOA)						
Crude	-0.82 (-1.50, -0.14)	0.019*	-0.10 (-0.56, 0.36)	0.673	-0.02 (-0.28, 0.24)	0.863
Adjusted	-0.73 (-1.44, -0.02)	0.043*	-0.08 (-0.57, 0.40)	0.736	-0.15 (-0.41, 0.10)	0.244
	R ² =0.072		R ² = 0.018		R ² =0.140	

Abbreviations: β , partial regression coefficient and indicates methylation changes with log-unit increase in concentration; CI, confidence interval; *IGF2*, insulin growth factor 2; *LINE1*, long interspersed element 1; PFAA, perfluoroalkyl acid; PFOA, perfluorooctanoic acid; PFOS, perfluorooctane sulfonate; R², squared multiple correlation coefficient in adjusted model. Adjusted for maternal age, maternal education, maternal smoking during pregnancy, infant sex, and maternal blood sampling period. *P<0.05.

Table 3. Association between DNA methylation and birth size in multiple linear regression analyses.

	Birth weight (g) (N=177)		Birth length (cm) (N=176)		Ponderal index (kg/m ³) (N=176)	
	(95% CI)	P-value	(95% CI)	P-value	(95% CI)	P-value
IGF2 methylation (%)						
Adjusted for gestational age	11.5 (-3.8, 26.9)	0.140	-0.05 (-0.12, 0.02)	0.190	0.19 (0.08, 0.29)	0.001**
Full adjustment ^a	13.2 (-2.5, 28.8)	0.099	-0.03 (-0.10, 0.05)	0.443	0.17 (0.06, 0.27)	0.002**
H19 methylation (%)						
Adjusted for gestational age	-0.2 (-23.3, 23.0)	0.987	0.03 (-0.08, 0.14)	0.545	-0.06 (-0.22, 0.10)	0.470
Full adjustment ^a	7.9 (-16.1, 31.9)	0.515	0.05 (-0.06, 0.16)	0.362	-0.02 (-0.18, 0.15)	0.839
LINE1 methylation (%)						
Adjusted for gestational age	10.0 (-31.3, 51.3)	0.634	0.15 (-0.05, 0.34)	0.142	-0.15 (-0.44, 0.14)	0.306
Full adjustment ^a	-3.1 (-47.1, 40.9)	0.889	0.01 (-0.20, 0.21)	0.940	-0.04 (-0.34, 0.27)	0.807

Abbreviations: β , partial regression coefficient and indicates methylation changes with log-unit increase in concentration; BMI, body mass index; CI, confidence interval; IGF, insulin growth factor; LINE1, long interspersed element 1. Full adjustment: Adjusted for maternal age, prepregnancy BMI, parity, maternal education, maternal smoking during pregnancy, gestational age, and infant sex. **P<0.01. ^aData missing: prepregnancy BMI (N=1).

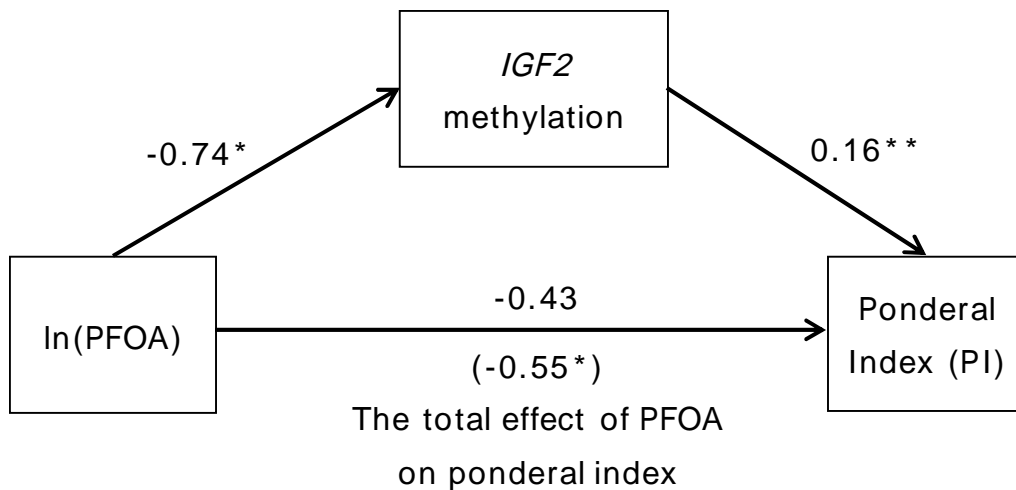


Figure 1. Mediation analysis of the association between PFOA and IGF2 methylation and between PFOA and ponderal index (N =175).

Regression coefficients of each path are described alongside with arrows. The total effect of PFOA on ponderal index is described within parentheses. A significant indirect effect of PFOA on ponderal index through IGF2 hypomethylation was observed ($ab = -0.11$; BCaCI: -0.30 to -0.02 ; Hayes, 2013). The IGF2 methylation as a mediator can account for ~20% of the total effect (PM=0.20; Preacher and Hayes, 2008). Maternal age, prepregnancy body mass index (BMI), parity, maternal education, maternal smoking during pregnancy, gestational age, infant sex, and maternal blood sampling period were adjusted. *ab*, indirect effect; BCa CI: bias-corrected and accelerated confidence interval; PM, percent mediation. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.