

胎児期のメチル水銀とフタル酸エステル類曝露が児の DNA メチル化に及ぼす影響

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環境獣医科学講座 教授

研究要旨

背景：胎児期環境要因の影響は、その持続性からエピジェネティックな変化をもたらしていると考えられてきている。しかし、胎児期環境要因としての化学物質曝露については、動物実験において DNA メチル化などのエピジェネティクス機構への影響が示されているが、現在のところ疫学研究での報告、特に胎児期曝露の影響を評価した報告は少ない。

目的：本研究では、環境化学物質の胎児期曝露が DNA メチル化に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、曝露要因として水銀・フタル酸エステル曝露とゲノム全体のメチル化指標である LINE1 遺伝子、および、胎生環境と DNA メチル化との関連性を示すマーカー遺伝子座 IGF2/H19 のメチル化変化との関連を検討した。

方法：札幌の一産科病院で 2002 年から 2005 年にリクルートし、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、母毛髪水銀(N=244)もしくはフタル酸エステル代謝物である MEHP の母体血中濃度(N=187)のそろう母児ペアを対象とした。IGF2/H19、LINE1 遺伝子領域の臍帯血メチル化はパイロシークエンス法を用いて定量し、得られた DNA メチル化率と母の毛髪水銀濃度および MEHP の血中濃度との関連を重回帰分析で検討した。

結果：交絡因子調整後、母毛髪水銀量と LINE1 メチル化との間に有意な正の関連がみられた($r=0.7$, $p=0.04$)。MEHP 濃度については、H19 メチル化との間に有意な負の関連がみられた($r=-1.3$, $p=0.02$)。男女別解析では、母毛髪水銀量と LINE1 メチル化、MEHP 濃度と H19 メチル化、どちらも男児のみで有意な関連がみられた。また、それぞれの曝露濃度を 4 分位に分けて解析を行なった結果、MEHP 濃度と H19 メチル化との関連で有意な濃度依存性が見られた(p for trend = 0.02)。水銀と LINE1 メチル化との関連では有意ではないが濃度依存傾向がみられ、特に、男児でその傾向が強かった。

結論：水銀、フタル酸エステルの胎児期曝露による LINE1、H19 のメチル化への影響が認められ、環境化学物質の胎児期曝露により、児の DNA メチル化が影響を受けることが示唆された。

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）
中澤 裕之
（星薬科大学薬品分析化学教室）
那須 民江（中央大学生命健康科学部）
蜂谷 紀之
（環境省国立水俣病総合研究センター）
安武 章
（熊本大学大学院自然科学研究科）

A．研究目的

エピジェネティクスは環境影響による可塑性を示し，胎児期環境と生後の表現型を結ぶ重要な因子であると考えられている（Baccarelli and Bollati, 2009）。一方，環境に蔓延している化学物質の胎児期曝露は児の健康へのリスクファクターとなっている。その影響は成長後まで持続することから，児の DNA メチル化を始めとするエピジェネティクス機構への影響が考えられ，動物実験による報告が急増している。しかし，現在のところ疫学研究での報告，特に胎児期曝露によるエピジェネティクスへの影響を評価した報告は少ない。

DNA メチル化は最も研究が進んでいるエピジェネティクス機構の一つであり，ゲノムのおよそ 17%を占める反復配列の LINE1 遺伝子がゲノム全体のメチル化指標として用いられている（Ruiz-Hernandez et al. 2015）。Insulin-like growth factor 2 (IGF2) と，IGF2 の発現制御に関わっている H19 は，胎児発達や細胞分化に重要な役割を果たしており，2 つの遺伝子が並んだ IGF2/H19 遺伝子座は，胎生環境と DNA メチル化との関連性を示すマーカーとなるインプリンティング遺伝子座である（Cui et al. 2002; Hoyo et al. 2012）。

一方，環境化学物質については，魚介類摂取が主な曝露源となるメチル水銀は胎盤を通過し，児の神経系などへの影響が懸念されている（Bukulski et al. 2015）。フタル酸エステルはプラスチックの可塑剤として使用されている化学物質であり，様々な製品に汎用されているため，恒常的かつ長期的な曝露による健康影響が懸念されている（Zhao et al. 2015）。

そこで本研究では，環境化学物質の胎児期曝露が DNA メチル化に及ぼす影響を明らかにすることを目的に，水銀およびフタル酸エステルの胎児期曝露と臍帯血の LINE1，IGF2/H19 領域の DNA メチル化変化との関連について出生コホートを用いて検討した。

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，臍帯血 DNA，母毛髪水銀 (N=244) もしくはフタル酸エステル代謝物である MEHP の出産前母体血中濃度 (N=187) のそろそろ母児ペアを対象とした。

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 EpiTect 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シング法により，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。母の毛髪

を出産後5日以内に採取し、メチル化水銀の曝露指標として毛髪中の総水銀濃度を酸化燃焼金アマルガム法（AAS法）で測定した。母体血中MEHP濃度はGC-MSで測定を行った。曝露濃度を \log_{10} 変換し、重回帰分析により統計解析を行った。

（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48.7%（ \pm 2.9）、H19が52.3%（ \pm 2.0）、LINE1が75.8%（ \pm 1.1）であった。母毛髪中水銀量の中央値は1.42 μ g/g（最小値-最大値：0.30-7.55）、出産前に採血を行った187名の母体血中MEHP濃度の中央値は10.4 ng/ml（最小値-最大値：3.4-64.0）であった。表1に解析に用いた集団の母児の属性、および、母毛髪中水銀濃度・母体血中MEHP濃度との関連を示した。母毛髪中水銀濃度と魚摂取量、母体血中MEHP濃度と採血時期および児のポンドラル指数との有意な相関が認められた。

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（表2）、母毛髪水銀量との関連については、母年齢・世帯年収・妊娠中喫煙・魚摂取量・

パーマの有無・児性別で調整後、LINE1メチル化との間に有意な正の関連がみられた（ $\beta=0.7$, $p=0.04$ ）。MEHP濃度については、母年齢・学歴・妊娠中喫煙・児性別・母体血採血時期で調整後、H19メチル化との間に有意な負の関連がみられた（ $\beta=-1.3$, $p=0.02$ ）。性別での層別解析を行なったところ、母毛髪水銀量とLINE1メチル化、MEHP濃度とH19メチル化、どちらも男児のみで有意な関連がみられた（表3）。また、濃度依存性を見るために、それぞれの曝露濃度を4分位に分けて解析を行った。図1に示すように、MEHP濃度とH19メチル化との関連で有意な濃度依存性が見られた（ p for trend = 0.02）。一方、水銀とLINE1メチル化との関連では有意な濃度依存は見られなかったが（図2-a）、男児において水銀濃度が増加するにつれて、メチル化率が高くなっていた（図2-b）。しかし、表4に示すように、LINE1、および、H19のメチル化率共に、児の出生時体格との相関は見られなかった。

D．考察

胎児期水銀曝露によるゲノム全体のメチル化指標であるLINE1の高メチル化、フタル酸エステル曝露による胎生環境とメチル化との関連指標であるH19の低メチル化、およびそれらの影響の性差が示された。

本研究において、90%以上の対象者の毛髪水銀濃度は、次世代影響が認められる可能性がある下限値：2.75 μ g/g未満であるにも関わらず、ゲノム全体へのDNAメチル化への影響が示された。これは、出産後の母の爪の水銀レベルと臍帯血DNAのメチル化との関連において、CpGアイランド上流に位置するCpGサイトの高メチル化

が認められた結果 (Cardenas et al. 2015)と一致するものである。しかし、LINE1 メチル化と児の出生時体格との関連は見られなかったことから、一般環境レベルである水銀曝露と関連する DNA メチル化変化は出生時体格に影響を及ぼすレベルではない可能性がある。あるいは、出生時体格以外のアウトカムに影響を及ぼす可能性も考えられ、検討が必要である。

フタル酸エステル曝露の影響については、妊娠中の曝露が胎盤の LINE1 (Zhao et al. 2015)、IGF2/H19 (LaRocca et al. 2014) のメチル化に影響するという報告があるが、胎児の DNA メチル化に関する疫学研究での報告はない。本研究では、ゲノム全体のメチル化の指標として用いた LINE1 には有意な影響は見られず、遺伝子特異的に H19 の低メチル化が認められ、その影響に性差および濃度依存性が見られた。H19 は IGF2 の発現制御に関わっているが、H19 メチル化と出生時体格との間に有意な関連は認められなかった。しかし、IGF2 の役割は胎児の発育のみに限られたものではなく、また、H19 は細胞分化において重要な役割を果たしており、出生時体格以外の表現型に影響している可能性がある。水銀曝露と同様に、フタル酸エステル曝露で観察されたメチル化変化と関連する児のアウトカムを検討していく必要がある。

我々はこれまでにフタル酸エステル曝露のほか、PFCs、ダイオキシン・PCBs の胎児期曝露による IGF2/H19 メチル化への影響を明らかにした (Kobayashi et al. submitted)。これは、胎児期環境としての化学物質曝露が DNA メチル化変化と関連することを示している。DNA メチル化変化は時間・組織特異的に制御されていることから (Bale TL. 2015)、環境化学物質曝

露の影響を受ける特異的メチル化部位の存在が考えられる。現在、その特異的メチル化部位を特定するため、HumanMethylation450 BeadChip (Illumina 社)を用いた網羅解析を行っている。今後、特異的メチル化部位とその変化に伴う成長発育・アレルギー・神経発達等のアウトカムとの関連を明らかにしていく。

E. 結論

本研究で、水銀の胎児期曝露によるゲノム全体のメチル化の亢進、および、フタル酸エステル曝露による H19 のメチル化への負の影響が認められ、胎児期の環境化学物質曝露が胎児に与える影響に DNA メチル化変化が関与している可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
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. Baccarelli A and Bollati V. 2009. Epigenetics and environmental chemicals. *Curr Opin Pediatr.* 21:243-251.
2. Cui H, Onyango P, Brandenburg S, Wu Y, Hsieh CL, Feinberg AP. 2002. Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2. *Cancer Res.* 15;62(22):6442-6.

3. Hoyo C, Fortner K, Murtha AP, Schildkraut JM, Soubry A, Demark-Wahnefried W, Jirtle RL, Kurtzberg J, Forman MR, Overcash F, Huang Z, Murphy SK. 2012. Association of cord blood methylation fractions at imprinted insulin-like growth factor 2 (IGF2), plasma IGF2, and birth weight. *Cancer Causes Control*. 23(4):635-45.
4. Ruiz-Hernandez A, Kuo CC, Rentero-Garrido P, Tang WY, Redon J, Ordovas JM, Navas-Acien A, Tellez-Plaza M. 2015. Environmental chemicals and DNA methylation in adults: a systematic review of the epidemiologic evidence. *Clin Epigenetics*. 29;7(1):55.
5. Bakulski KM, Lee H, Feinberg JI, Wells EM, Brown S, Herbstman JB, Witter FR, Halden RU, Caldwell K, Mortensen ME, Jaffe AE, Moye J Jr, Caulfield LE, Pan Y, Goldman LR, Feinberg AP, Fallin MD. 2015. Prenatal mercury concentration is associated with changes in DNA methylation at TCEANC2 in newborns. *Int J Epidemiol*. 44(4):1249-62
6. Zhao Y, Shi HJ, Xie CM, Chen J, Laue H, Zhang YH. 2015. Prenatal phthalate exposure, infant growth, and global DNA methylation of human placenta. *Environ Mol Mutagen*. 56(3):286-92.
7. Cardenas A, Koestler DC, Houseman EA, Jackson BP, Kile ML, Karagas MR, Marsit CJ. 2015. Differential DNA methylation in umbilical cord blood of infants exposed to mercury and arsenic in utero. *Epigenetics*. 10(6):508-15
8. LaRocca J, Binder AM, McElrath TF, Michels KB. 2014. The impact of first trimester phthalate and phenol exposure on IGF2/H19 genomic imprinting and birth outcomes. *Environ Res*. 2014 Aug;133:396-406.
9. Kobayashi S, Azumi K, Itoh S, Goudarzi H, Sasaki S, Ishizuka M, Nakazawa H, Kobayashi S, Miyashita C, Ikeno T, Araki A, Kishi R. Effects of Prenatal Perfluorinated Chemicals Exposure on Cord Blood *IGF2/H19* Methylation and Ponderal Index: The Hokkaido Study. Submitted.
10. Bale TL. 2015. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nat Rev Neurosci*. 16(6):332-44.

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. 母毛髪水銀濃度・母体血中 MEHP 濃度と母児の属性との関連

	N=244		Total Hg (µg/g)				N=187		MEHP (ng/ml)			
	Mean ± SD	N (%)	Median	25th	75th	p	Mean ± SD	Median	25th	75th	p	
Maternal Characteristic												
Maternal age (year) ^a	30.0 ± 4.8		= 0.032			0.619	29.9 ± 4.9		= 0.042		0.565	
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²) ^a	20.9 ± 2.9		= -0.033			0.606	21.1 ± 2.9		= 0.059		0.425	
Parity ^b												
0	132 (54.1)		1.42	0.99	1.89	0.945	103 (55.1)	10.15	5.68	15.06	0.465	
1	112 (45.9)		1.44	0.95	2.02		84 (44.9)	10.46	6.28	15.47		
Educational level (year) ^b												
12	107 (43.9)		1.47	0.95	1.89	0.691	85 (45.5)	10.37	5.99	14.34	0.886	
> 12	137 (56.1)		1.42	1.01	1.97		102 (54.5)	10.49	5.69	15.42		
Annual household income ^b												
5,000,000	169 (69.3)		1.48	0.97	1.89	0.592						
> 5,000,000	75 (30.7)		1.42	1.01	2.08							
Smoking during pregnancy ^b												
No	205 (84.0)		1.44	0.99	1.93	0.209	156 (83.4)	10.44	5.99	15.36	0.273	
Yes	39 (16.0)		1.30	0.96	1.61		31 (16.6)	9.96	5.12	14.38		
Alcohol consumption during pregnancy ^b												
No	165 (67.6)		1.42	0.96	1.92	0.666	121 (64.7)	10.48	5.96	15.33	0.854	
Yes	79 (32.4)		1.44	1.03	1.89		66 (35.3)	10.35	5.63	15.09		
Caffein in take during pregnancy (mg/day) ^b	149.9 ± 125.0		= -0.026			0.686	145.9 ± 127.3		= 0.043		0.562	
Blood sampling period ^c												
< 28 weeks							17 (9.1)	14.18	8.84	17.35	0.013*	
28-36 weeks							109 (58.3)	10.87	6.45	15.38		
36 weeks							61 (32.6)	7.13	5.24	13.96		
Fish consumption (g/day) ^a												
Inshore fish	47.1 ± 32.3		= 0.244			0.0001**						
Deep-sea fish	36.8 ± 27.6		= 0.257			<.0001**						
Hair permanemt ^b												
No	172 (70.5)		1.44	0.96	1.93	0.579						
Yes	72 (29.5)		1.40	0.99	1.70							
Infant Characteristic												
Geatation age (week) ^a	39.8 ± 1.0		= 0.004			0.954	39.8 ± 1.0		= 0.0002		0.998	
Sex ^b												
Male	115 (47.1)		1.48	0.97	1.97	0.484	88 (47.1)	10.48	5.68	16.27	0.528	
Female	129 (52.9)		1.36	0.97	1.87		99 (52.9)	9.86	6.37	14.26		
Birth weight (g) ^a	3129.2 ± 333.4		= 0.007			0.909	3130.7 ± 335.4		= -0.091		0.217	
Birth length (cm) ^a	48.4 ± 1.6		= -0.080			0.214	48.5 ± 1.6		= 0.071		0.338	
Ponderal Index (kg/m ³) ^a	27.5 ± 2.3		= 0.100			0.121	27.4 ± 2.2		= -0.166		0.023*	

^aSpearman's correlation, ^bMann-Whitney U-test, ^cKruskal-Wallis test

*p < 0.05. **p < 0.01

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 . 水銀・フタル酸エステルの胎児期曝露による DNA メチル化への影響（重回帰分析）

	IGF2 methylation (%)			H19 methylation (%)			LINE1 methylation (%)		
		(95% CI)	p		(95% CI)	p		(95% CI)	p
Total Hg (log ₁₀)									
Crude	0.034	(-1.783, 1.851)	0.971	0.707	(-0.509, 1.922)	0.253	0.649	(-0.026, 1.324)	0.060
adjusted ^a	0.041	(-1.829, 1.911)	0.965	0.364	(-0.880, 1.608)	0.565	0.704	(0.047, 1.361)	0.035*
MEHP (log ₁₀)									
Crude	0.548	(-1.014, 2.109)	0.490	-1.341	(-2.385, -0.297)	0.012*	-0.199	(-0.798, 0.400)	0.513
adjusted ^b	0.524	(-1.072, 2.120)	0.518	-1.309	(-2.355, -0.22)	0.015*	-0.097	(-0.665, 0.472)	0.738

^aAdjusted for maternal age, annual house income, smoking during pregnancy, fish consumption, hair permanemt, infant's sex

^bAdjusted for maternal age, maternal education, smoking during pregnancy, blood sampling period, infant's sex

: partial regression coefficient

*p < 0.05

表 3 . 水銀曝露の LINE1 メチル化およびフタル酸エステル曝露の H19 メチル化に及ぼす影響の性差

	N	LINE1 methylation (%)				N	H19 methylation (%)		
			(95% CI)	p				(95% CI)	p
Total Hg (log ₁₀) ^a					MEHP (log ₁₀) ^b				
Male	115	1.019	(0.060, 1.978)	0.038*	Male	88	-2.817	(-4.335, -1.298)	<0.001**
Female	129	0.379	(-0.576, 1.334)	0.434	Female	99	-0.707	(-2.163, 0.750)	0.338

^aAdjusted for maternal age, annual house income, smoking during pregnancy, fish consumption, hair permanemt

^bAdjusted for maternal age, maternal education, smoking during pregnancy, blood sampling period

: partial regression coefficient

*p < 0.05, **p < 0.01

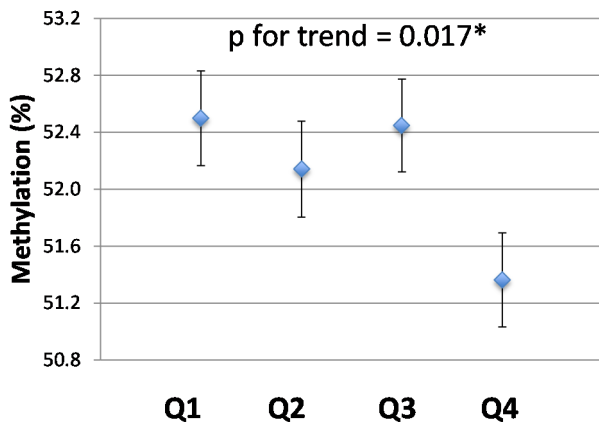


図1. 母体血 MEHP と臍帯血 H19 メチル化変化との関連の濃度依存 (N=187)

Q1: < 5.9 ng/ml
Q2: 5.9 - 10.4 ng/ml
Q3: 10.4 - 15.2 ng/ml
Q4: > 15.2 ng/ml

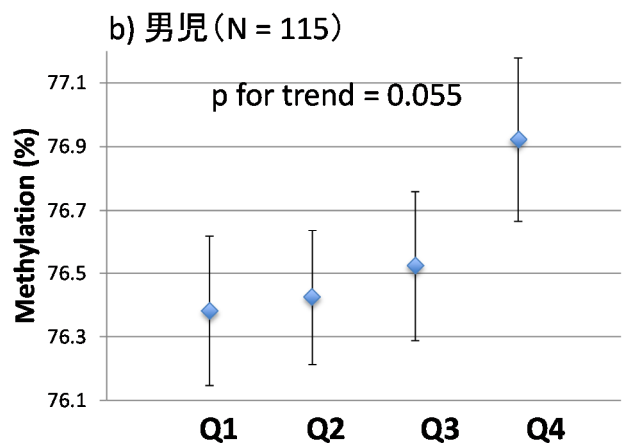
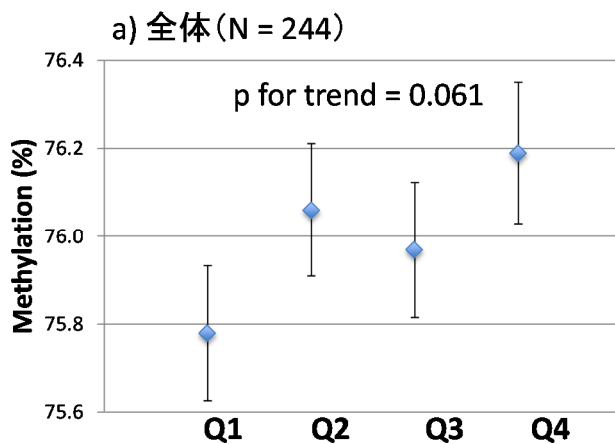


図2. 母毛髪水銀と臍帯血LINE1メチル化変化との関連の濃度依存

Q1: < 0.97 $\mu\text{g/g}$, Q2: 0.97 - 1.42 $\mu\text{g/g}$, Q3: 1.42 - 1.91 $\mu\text{g/g}$, Q4: > 1.91 $\mu\text{g/g}$

	LINE1 methylation (%), N=244			H19 methylation (%), N=187		
	β	(95% CI)	p	β	(95% CI)	p
Birth weight (g)						
adjusted ^a	7.943	(-28.01, 43.90)	0.664	2.673	(-20.72, 26.06)	0.822
adjusted ^b	-8.061	(-45.14, 29.01)	0.669	4.554	(-19.15, 28.25)	0.705
Birth length (cm)						
adjusted ^a	-0.003	(-0.179, 0.172)	0.970	0.041	(-0.071, 0.152)	0.472
adjusted ^b	-0.114	(-0.296, 0.069)	0.221	0.043	(-0.067, 0.154)	0.440
Ponderal index (kg/m ³)						
adjusted ^a	0.109	(-0.151, 0.369)	0.408	-0.044	(-0.203, 0.116)	0.587
adjusted ^b	0.150	(-0.125, 0.425)	0.284	-0.032	(-0.192, 0.129)	0.699

^aAdjusted for gestational age

^bAdjusted for gestational age, maternal age, parity, maternal education, pre-pregnancy BMI, smoking during pregnancy, infant's sex

β : partial regression coefficient, *p < 0.05

表4. LINE1およびH19DNAメチル化と出生時体格との相関