

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ンドラル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、**log₁₀** 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)

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

A. 研究目的

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デ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 μ 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⁺T 細胞・CD4⁺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 との関連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, 関連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 (± 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 (± 1.1)、出生体重は **3108 g (± 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 ≥ 0.075** 、**PFOA ≥ 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 **log₁₀** 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⁺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 ± 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⁺T 細胞・CD4⁺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- α , γ 1, γ 2** の結合部位を持つ (**DECODE, 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- α , γ 1, γ 2** の結合部位を持つが (**DECODE, 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 **Ca²⁺** 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、**Bumphunter** 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- γ 1, γ 2** のほか、**ER- α** 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- α , γ 1, γ 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- α , γ 1, γ 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- α , γ 1, γ 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った。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、未測定以外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, Burriss 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 metabonomics 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.**

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

Table 1. 母児の属性と PFAs 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) ^a	164	30.0 (\pm 4.7)	$\rho = -0.102$	0.195	$\rho = -0.114$	0.145
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²) ^a	164	20.9 (\pm 2.9)	$\rho = 0.016$	0.841	$\rho = -0.015$	0.852
Parity ^b						
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 ^b						
≤ 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 ^b						
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 ^b						
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 ^c						
< 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)	
≥ 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) ^a	164	39.7 (\pm 1.1)	$\rho = 0.112$	0.155	$\rho = 0.123$	0.116
Sex ^b						
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) ^a	164	3108 (\pm 318)	$\rho = -0.102$	0.195	$\rho = -0.019$	0.813

^a Spearman's correlation, ^b Mann-Whitney U-test, ^c Kruskal-Wallis

Figure 1. 網羅的 DNA メチル化解析のフローチャート

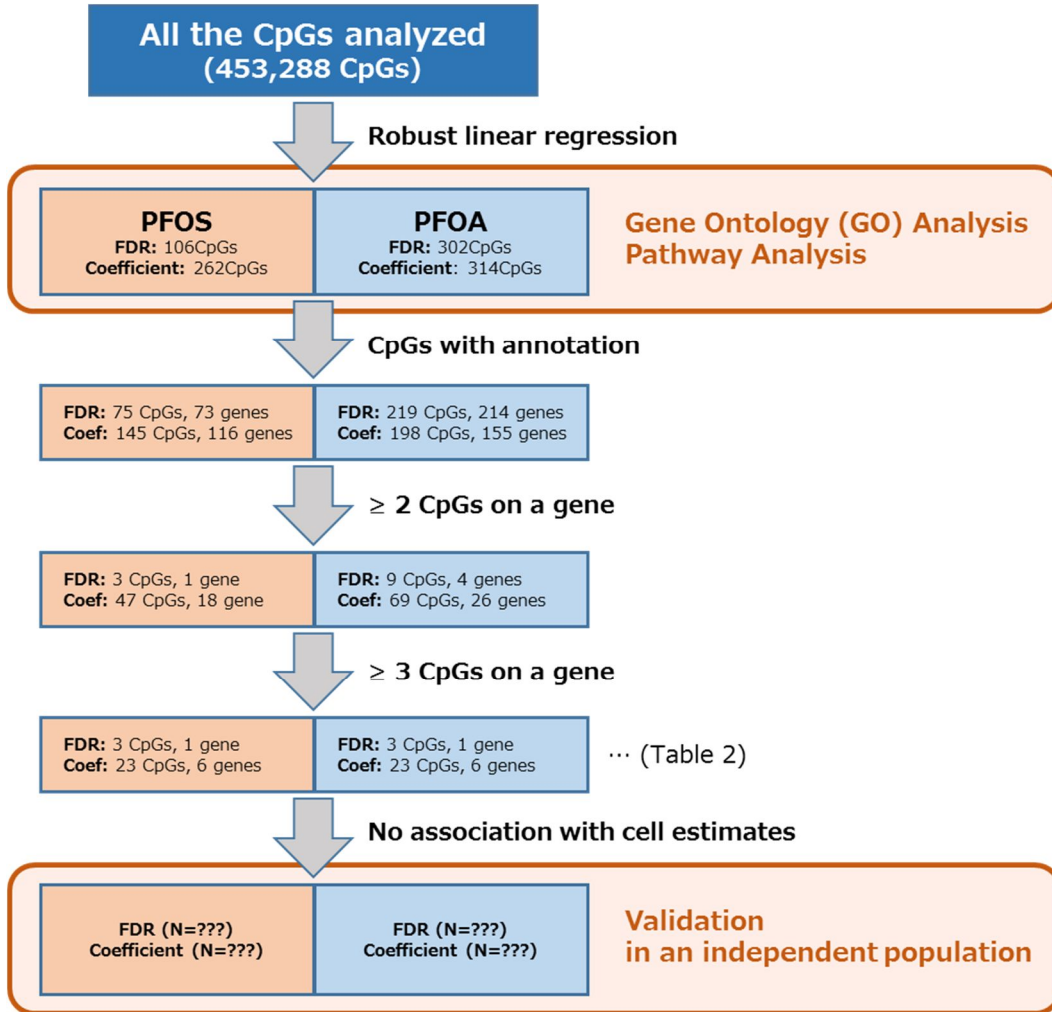
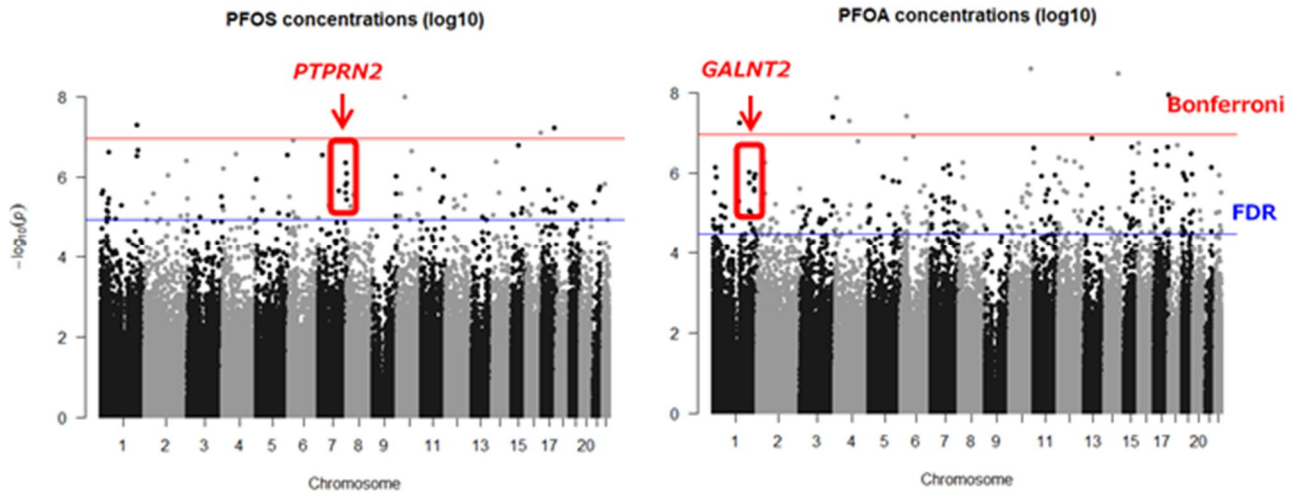


Figure 2. PFAAs 曝露と 45 万 CpGs メチル化との関連

(A) マンハッタン・プロット



横線(上) ボンフェローニ法での有意基準 ($p < 1.1 \times 10^{-7}$)

横線(下) **False-discovery rate** での有意基準

(B) ボルケーノ・プロット

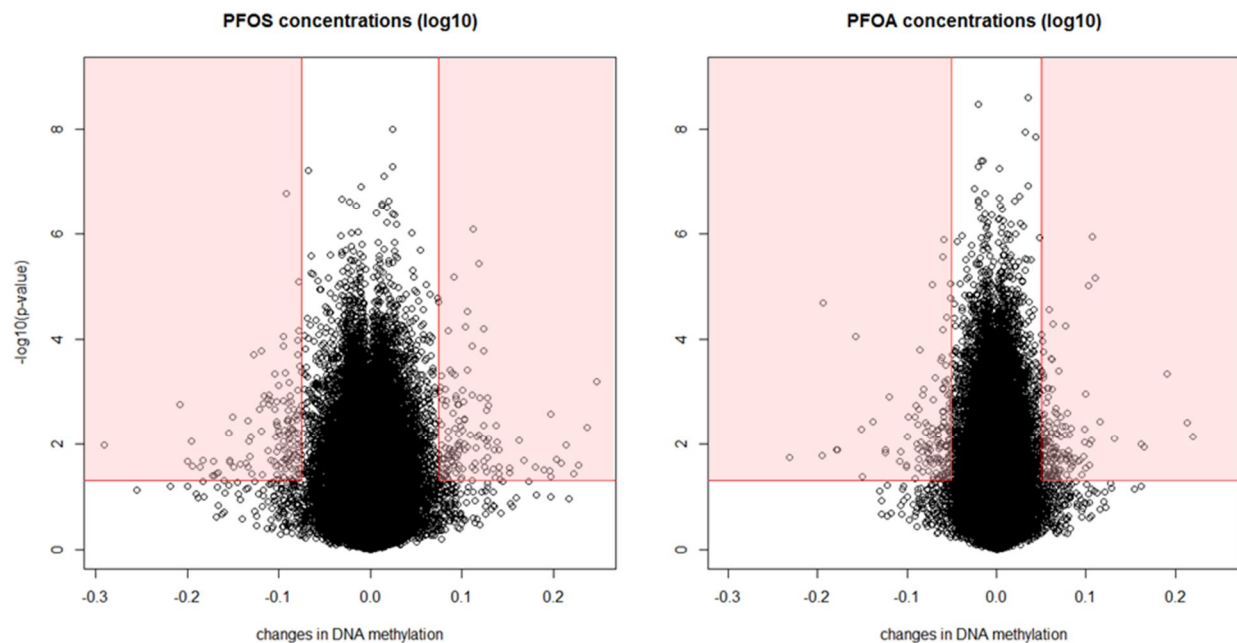


Figure 3. 抽出された CpGs の特徴

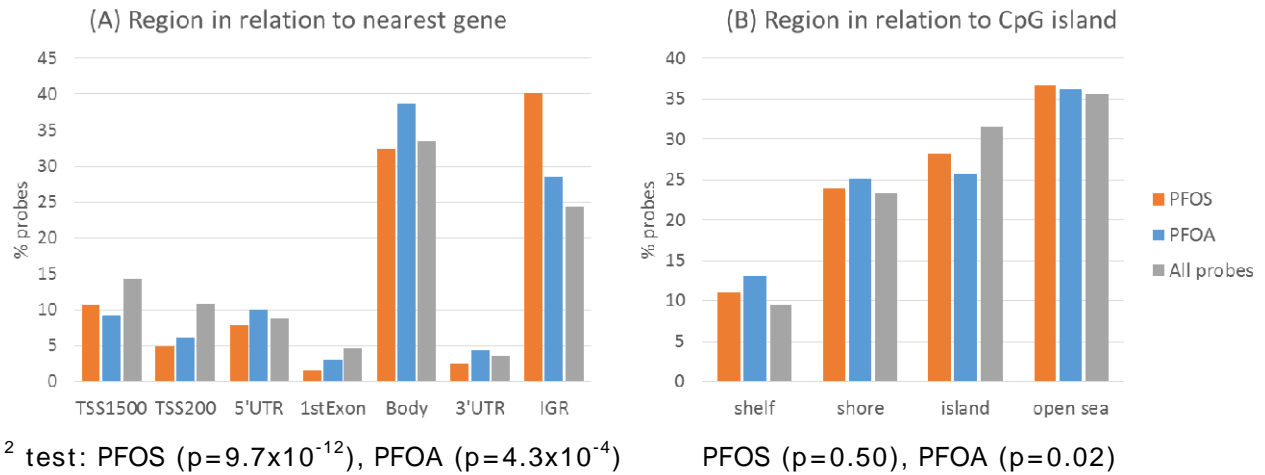


Table 2. Differentially methylated positions associated with PFOS and PFOA concentrations.

(A) PFOS

Gene name	Probe ID	CHR	MAPINFO	Coef	P	feature	CpGI	method ¹⁾	cell ²⁾
PTPRN2	cg20528787	7	158032352	0.12	6.3E-05	Body	open sea	c	
	cg23066280	7	158032496	0.25	6.3E-04	Body	open sea	c	
	cg06715136	7	158046025	0.12	3.7E-06	Body	open sea	p	
	cg02770061	7	158046166	0.12	1.3E-03	Body	open sea	c	
	cg06400119	7	158046222	0.11	8.1E-07	Body	open sea	p	
	cg23759393	7	158110405	0.13	1.3E-03	Body	shore	c	
	cg09756125	7	158250978	-0.15	2.7E-02	Body	shore	c	
	cg17429772	7	158269409	0.13	2.2E-03	Body	open sea	c	
	cg17812313	7	158270995	0.01	1.5E-06	Body	open sea	p	
	DNHD1	cg11185456	11	6592066	-0.10	7.4E-04	Body	island	c
cg01833234		11	6592585	-0.10	3.8E-03	Body	island	c	
cg10208301		11	6592745	-0.09	3.6E-03	Body	island	c	
KLHL35	cg06329735	11	75139390	0.13	1.8E-02	Body	shore	c	
	cg05353869	11	75139544	0.15	2.8E-02	Body	island	c	
	cg10909185	11	75139736	0.21	1.0E-02	Body	island	c	
RPH3AL	cg04897931	17	152089	0.08	1.9E-02	Body	shore	c	
	cg17316718	17	152308	0.09	3.1E-02	Body	island	c	
	cg17193961	17	152350	0.09	1.2E-02	Body	island	c	
HOOK2 *	cg04657146	19	12876947	-0.17	4.1E-02	Body	island	c, b	CD8T, Bcell
	cg23899408	19	12877188	-0.17	3.7E-02	Body	shore	c, b	
FRG1B	cg07753967	20	29611652	0.08	2.5E-02	TSS1500	island	c	CD8T, NK
	cg14815891	20	29611903	0.14	4.4E-03	Body	island	c	
	cg20811988	20	29611924	0.12	6.8E-03	Body	island	c	
RFPL2	cg01124132	22	32599511	0.10	1.1E-02	TSS200	open sea	c	CD4T, Gran
	cg12906381	22	32599516	0.12	4.3E-03	TSS200	open sea	c	
	cg13405775	22	32599648	0.10	9.4E-04	TSS200	open sea	c	

¹⁾ method: **c** (coefficient based), **p** (p-value based), **b** (Bumphunter)

²⁾ cell: cell proportion that was associated with methylation levels (Spearman's correlation $> \pm 0.1$)

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

(B) PFOA

Gene name	Probe ID	CHR	MAPINFO	Beta	P	feature	CpGI	method ¹⁾	cell ²⁾
PRKCZ	cg00653281	1	1991051	-0.01	2.0E-05	Body	island	p	
	cg13918804	1	2043761	0.10	1.1E-03	5'UTR	shelf	c	
	cg12718519	1	2058417	-0.07	2.3E-02	5'UTR	open sea	c	
C1orf109	cg24088508	1	38156462	0.22	7.3E-03	TSS1500	shore	c	CD8T
	cg12339802	1	38156545	0.07	4.5E-03	TSS1500	shore	c	
	cg06917450	1	38156652	0.17	1.1E-02	TSS1500	shore	c	
LGR6	cg04811114	1	202172778	0.08	1.6E-02	TSS200	open sea	c	
	cg26347746	1	202172848	0.07	3.1E-02	TSS200	open sea	c	CD8T, CD4T, NK, Bcell, Gran
	cg05044291	1	202172867	0.06	4.9E-02	TSS200	open sea	c	
GALNT2	cg05697274	1	230415377	-0.04	1.4E-06	3'UTR	island	p	CD8T, NK, Mono
	cg24250902	1	230415547	-0.06	1.3E-06	3'UTR	island	p	
	cg03144619	1	230415668	-0.05	1.2E-03	3'UTR	island	c	
	cg24401487	1	230416880	-0.03	2.5E-06	3'UTR	shore	p	
PAX8	cg21482265	2	113992762	0.07	4.3E-02	Body	shore	c	CD8T, NK
	cg12889195	2	113992843	0.07	3.1E-02	Body	shore	c	
	cg11763394	2	113992921	0.07	1.8E-02	Body	shore	c	
	cg21550016	2	113992930	0.06	2.3E-02	Body	shore	c	
	cg07772999	2	113993052	0.05	2.7E-02	Body	shore	c	
	cg19083407	2	113993142	0.07	3.4E-02	Body	shore	c	
	cg07594247	2	113993304	0.06	3.2E-02	Body	island	c	
	cg17445212	2	113993313	0.06	3.8E-02	Body	island	c	
	cg09704166	2	114031854	-0.10	2.8E-02	Body	shore	c	
HDAC4	cg08825699	2	239983929	-0.09	1.0E-02	Body	open sea	c	CD4T, Gran
	cg20784693	2	239984030	-0.10	2.9E-03	Body	open sea	c	
	cg09155776	2	239984105	-0.05	8.2E-03	Body	open sea	c	
	cg06583077	2	240090977	-0.02	2.9E-05	Body	open sea	p	
LRPAP1	cg00356499	4	3516065	0.06	1.9E-02	Body	shore	c	CD4T, Bcell, Mono, Gran
	cg26401028	4	3516534	0.06	4.4E-02	Body	island	c	
	cg04857395	4	3516637	0.08	1.7E-02	Body	island	c	
	cg27321949	4	3516692	0.06	1.9E-02	Body	island	c	
TNXB	cg01337207	6	32063835	0.05	1.2E-02	Body	island	c	CD8T, CD4T
	cg10365886	6	32063874	0.06	4.7E-02	Body	island	c	
	cg07524919	6	32063901	0.05	3.7E-02	Body	island	c	
	cg00872984	6	32063991	0.05	2.1E-02	Body	island	c	
DDO	cg19196401	6	110721138	0.07	2.0E-02	Body	island	c	
	cg01119278	6	110721349	0.06	4.5E-02	Body	island	c	
	cg23891903	6	110725439	0.01	2.9E-06	Body	shelf	p	
PRKAR1B	cg11064039	7	766100	-0.11	1.4E-02	5'UTR	island	c	CD8T, CD4T
	cg06242242	7	766104	-0.09	2.9E-02	5'UTR	island	c	
	cg05729249	7	766119	-0.07	4.2E-02	5'UTR	island	c	
EBF3	cg05636467	10	131669406	-0.08	1.1E-02	Body	shelf	c	
	cg04043455	10	131669461	-0.12	1.3E-02	Body	shelf	c	
	cg09252806	10	131669630	-0.09	2.1E-03	Body	shelf	c	
TK2	cg03448915	16	66583078	-0.08	4.3E-03	Body	shore	c	
	cg07127456	16	66583081	-0.06	2.4E-03	Body	shore	c	
	cg09238666	16	66584358	-0.05	8.6E-04	TSS200	shore	c	

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

Table 3. Differentially methylated regions indicated by Bumphunting method.

CHR	Start (Mb)	Gene	CpGs	Probes	Features	CGI	Area	p-value (area)	FDR (area)
PFOS log ₁₀ -transformed									
19	12.9	HOOK2	3	cg04657146* cg06417478 cg11738485 cg23899408*	Body	island/shore	0.83	0.0001	0.112
PFOS (1st vs. 4th Quartiles)									
19	12.9	HOOK2	3	cg04657146* cg06417478 cg11738485	Body	island/shore	0.38	0.0056	0.037
22	24.3	GSTTP1	3	cg11141652 cg15242686 cg22666875	TSS1500	open sea	0.33	0.0108	0.072

***cg0457146, cg23899408** は **robust linear regression** でもスクリーニングされた **CpGs**

Table 4. Estimated cell proportion in cord blood and their relation to PFAAs concentration (N=164).

	Proportion		PFOS		PFOA	
	Median	(25th, 75th)		p-value		p-value
Lymphocytes						
CD8 ⁺ T	0.064	(0.049, 0.083)	-0.043	0.585	-0.068	0.384
CD4 ⁺ T	0.116	(0.0912, 0.142)	0.057	0.468	-0.037	0.638
NK cells	0.024	(0.000, 0.053)	0.103	0.188	0.128	0.101
B cells	0.101	(0.0874, 0.120)	0.020	0.800	0.035	0.656
Myeloid cells						
Monocytes	0.109	(0.097, 0.120)	-0.214	0.006*	-0.053	0.505
Granulocytes	0.603	(0.566, 0.649)	-0.022	0.784	0.054	0.494

ρ: Spearman's correlation coefficient

Figure 4. Spearman's correlation between cell proportion estimates and DNA methylation at selected CpGs.

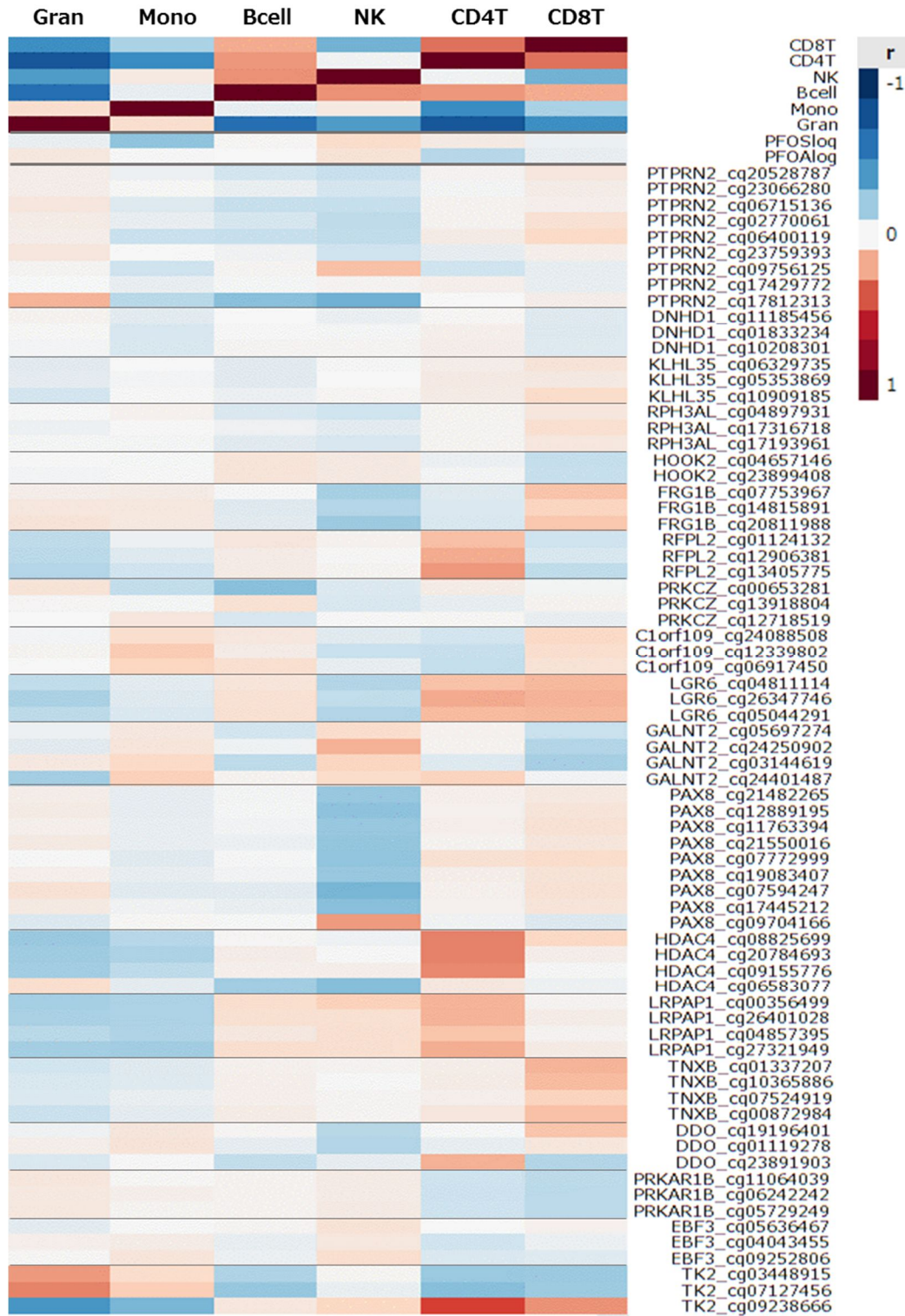
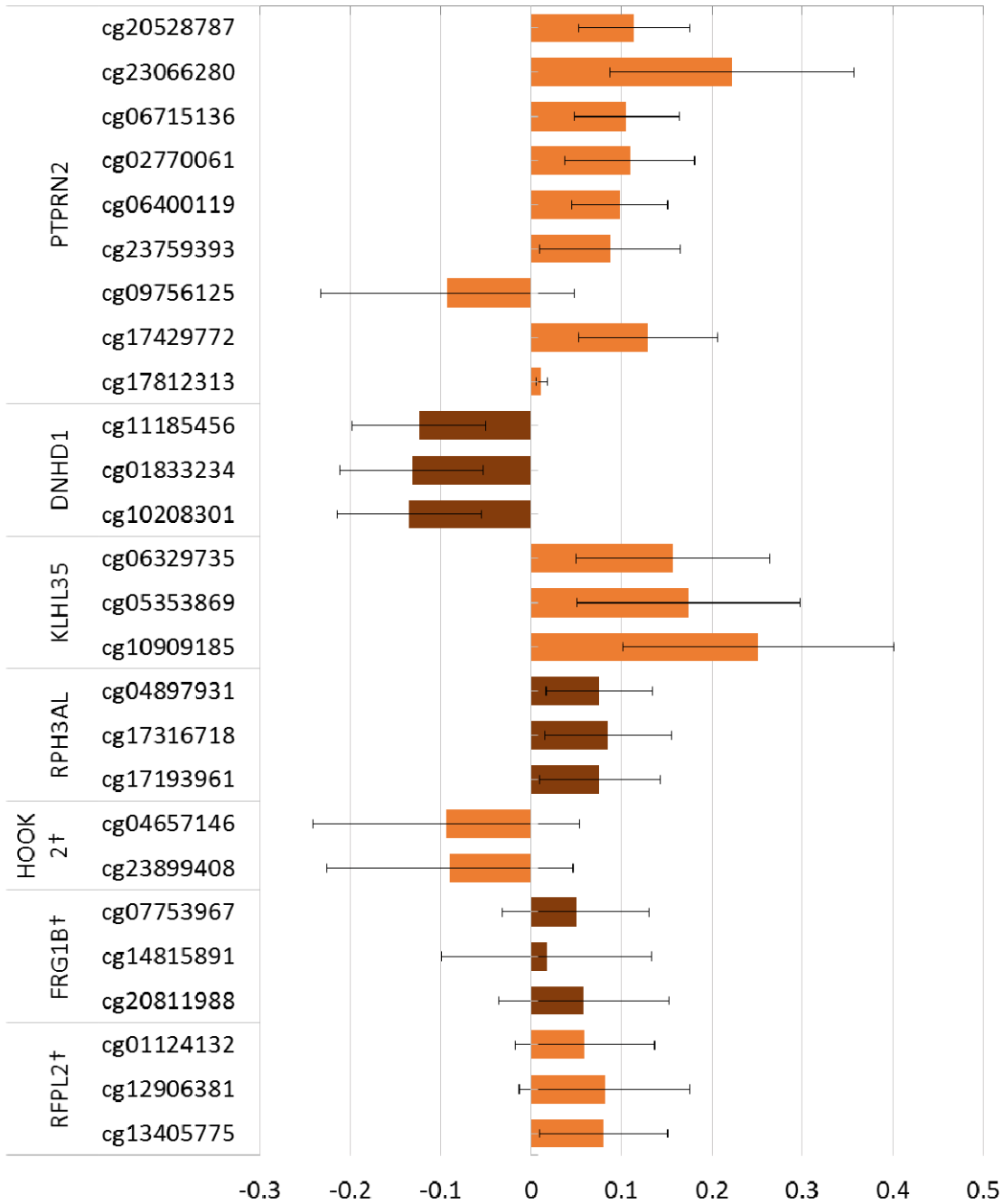


Figure 5. Changes in methylation with log₁₀-unit increase in PFOS and PFOA concentrations with adjustment for estimated cell proportion.

(A) PFOS



Adjusted for maternal age, infants sex, maternal blood sampling period, (†estimated cell proportion)

Error bars indicates 95% confidence intervals.

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

(B) PFOA

