

## 網羅的エピゲノム解析を用いた化学物質による次世代影響の解明：新しい 試験スキームへの基礎的検討

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

### <研究要旨>

メチル化を含む後天的 DNA 化学修飾であるエピゲノムは、塩基配列の変化なしに遺伝情報を分裂後の細胞に伝える生体機能に必須のメカニズムである。可塑性に富む胎児期および生後早期の環境要因による児のエピゲノム変化が後世の健康・疾病リスク発現に参与していることが示唆されている(Developmental Origins of Health and Disease(DOHaD)仮説 [Science 2004; Nature 2004; Trends Genet 2017])。そのため、欧米諸国ではコンソーシアムが形成されるなど、エピゲノムを介したメカニズム解明は世界的に注目され、環境リスク評価や健康障害の予防にとって重要な課題となっている(Int J Environ 2017)。しかし、日本での研究は全くなされていない。

また、DNA メチル化の解析法として、近年エピゲノム網羅的メチル化解析の技術が開発されてきた。一方、世界的に製造・使用量が増加し、健康影響が懸念されている合成化学物質の胎児期曝露に関する網羅的メチル化解析研究は非常に少ない(Environ Res 2017; Environ Mol Mutagen 2017)。さらに、曝露によるエピゲノム変化が関与する次世代影響については未だ明らかにされていない。

本研究は、種々の環境化学物質曝露による多様なアウトカムが発現する機序としてエピゲノム変化を介する毒性メカニズムを遺伝的差異や多様なライフスタイルをもつヒト集団で明確にし、新規の次世代影響試験スキーム開発に資する。具体的には、化学物質曝露により変化する DNA メチル化領域を 45 万か所のメチル化部位(CpG 部位)の網羅的解析により同定し、どのような機能を持つ遺伝子・経路が影響を受けるかを明らかにする。DNA メチル化網羅的解析はスクリーニング法であり、また、データの複雑性から擬陽性を抽出してしまう可能性もあることから、結果の妥当性検証が必須である。そこで、次世代シーケンサーによる多サンプルメチル化検証法を確立し、また、海外のコホートとの共同研究により、妥当性の検証の効率化を図る。それぞれの曝露に起因する DNA メチル化変化が、どの健康影響に関与するのか、その影響の何% (介在の大きさ) を DNA メチル化変化で説明できるのかを介在解析(Mediation analysis)により明確にする。遺伝子多型(SNPs)の影響を母児ペアで検討し、遺伝的差異を背景にもつヒト集団でのメチル化変化を明らかにする。以上の検討により、胎児期の化学物質曝露がエピゲノム変化を介して成長後の疾病発現に影響を与えるエピゲノム試験法の開発につなげる。

まず、DNA メチル化変化と環境化学物質曝露との関連を調べるため、研究仮説に基づいて選択した胎児発育に重要な遺伝子 *IGF2/H19*、および、遺伝子全体のメチル化指標となる *LINE1* 遺伝子にターゲットを絞り、パイロシーケンスにより臍帯血 DNA のメチル化率を測定した。PCB およびダイオキシン類への胎児期曝露との関連を検討したところ、PCB 異性体の DecaCB 濃度と *H19* の DNA メチル化率、および HeptaCB 異性体と *LINE-1* メチル化率との正の関連が認められた。その傾向は女児で顕著だった。この結果から、胎児期の PCB 類曝露によって、児の DNA メチル化が影響を受ける可能性が考えられた(Toxicology 2017)。しかし、強い負の健康影響を示すダイオキシン類

では関連が見られず、DNAメチル化変化を介さない健康影響への生物学的機序、あるいは *IGF2/H19*, *LINE1* 以外の遺伝子のDNAメチル化変化の関与が示唆された。

またわれわれは、胎児期の有機フッ素化合物(PFAS)の1つであるPFOA曝露が *IGF2* の低メチル化を介して胎児の成長に影響を及ぼす可能性を示した(J Expo Sci Environ Epidemiol 2017)。PFAS曝露により影響を受ける他の遺伝子のメチル化変化を仮説なしに明らかにするため、エピゲノム網羅的解析を行った。解析した45万CpG部位全体のメチル化変化としては、PFOS曝露では高メチル化、PFOA曝露では低メチル化が見られた。また、同定したDNAメチル化変化領域を有する遺伝子については、成長後の喘息と関連する *SMAD3* や肥満と関連する *GFPT2*、PFAS曝露によりその機能が影響を受ける *CYP2E1* 等が含まれていた。

さらに、胎児期の喫煙曝露により変化するDNAメチル化領域を同定し、次世代シーケンサーにより定量的なメチル化検証を行った。喫煙経験のない非喫煙群(n = 124)、妊娠前から妊娠中まで喫煙を継続した喫煙群(n = 46)、妊娠がわかって喫煙を止めた喫煙中止群(n = 77)の3群を対象とし解析を行ったところ、喫煙を中止することによりDNAメチル化状態が非喫煙者と同等レベルになる9CpGs、喫煙を中止しても変化しない1CpGを見出すことができた。また、次世代シーケンサーによる再現性検証を行なった結果、8CpGsのうち7CpGsで網羅的解析結果と同様のメチル化変化が確認できた。このことから、次世代シーケンサーを用いた多サンプルの定量的メチル化解析が可能であると考えられる。

今後、種々の化学物質曝露に起因するDNAメチル化部位をエピゲノム網羅的に明らかにし、さらにどのアウトカムに影響するか、介在の大きさを含めて解明する。

<研究分担者>

三宅 邦夫

山梨大学大学院総合研究部医学域・  
社会医学講座，講師

石塚 真由美

北海道大学大学院獣医学研究院環境  
獣医科学講座毒性学分野，教授

佐田 文宏

中央大学保健センター，医療管理者

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

宮下 ちひろ

北海道大学環境健康科学研究教育セ  
ンター，特任准教授

伊藤 佐智子

北海道大学環境健康科学研究教育セ  
ンター，特任講師

山崎 圭子

北海道大学環境健康科学研究教育セ  
ンター，特任助教

三浦 りゅう

北海道大学環境健康科学研究教育セ  
ンター，学術研究員

堀 就英

福岡県保健環境研究所保健科学部，  
課長

松村 徹

いであ株式会社環境創造研究所，常  
務取締役

松浦 英幸

北海道大学大学院農学研究院応用生  
命科学部門生命有機化学分野，教授

篠原 信雄

北海道大学大学院医学研究院腎泌尿  
器外科学教室，教授

関与していることが示唆されているため、エピゲノムを介したメカニズム解明は環境リスク評価や健康障害の予防にとって重要である。

DNA のシトシン塩基 (C) とグアニン塩基 (G) が連続する 2 塩基配列 (CpG) 上のシトシンに生ずる DNA メチル化修飾は、最も研究されているエピゲノム変化の 1 つである (Int J Epidemiol 2017)。DNA メチル化修飾により、DNA の三次構造の変化やメチル基結合タンパク質との相互作用、転写因子の結合あるいは阻害などが起こり、遺伝子発現が制御される。近年、母のストレス (Genet Epigenet 2014)、社会経済要因 (Am J Public Health 2014)、毒性物質曝露 ((EHP 2012, 2013; Environ Mol Mutagen 2014; Epigenetics 2015)、栄養因子 (Epigenetics 2011)、母の BMI (Environ Mol Mutagen 2014) などの胎児期環境要因により児の DNA メチル化が影響を受けることが疫学研究により報告されている。

DNA メチル化の解析法としては、ゲノム全体の DNA メチル化をまとめて測定する手法 (グローバル DNA メチル化解析) と、数個の CpG 部位をターゲットとして解析する手法 (ターゲット CpG 解析) がある。グローバル DNA メチル化解析は、ゲノム全体への影響が検討できるが、実際に異常なメチル化変化を起こしている CpG 部位の特定はできない。ターゲット CpG 解析は、研究仮説に基づいて選択した CpG のメチル化変化を個別に検討できる。しかし、ヒトのゲノム上には約 2800 万か所の CpG 部位、また、1 つの遺伝子上にも数十個から数百個の CpG 部位が存在し、それを 1 つ 1 つ検討するのは不可能である。そこで、近年 DNA メチル化を広範囲かつ迅速に獲得できるエピゲノム網羅的メチル化解析の技術が開発されてきた。その中で、イルミナ社の Infinium

## A . 研究目的

母体の環境要因が胎児に負の健康影響をもたらすメカニズムとして、エピゲノムに基づく遺伝子制御システムの関与が注目されている。遺伝子を構成する DNA やヒストンタンパク質の化学修飾であるエピゲノムは、塩基配列の変化なしに遺伝情報を分裂後の細胞に伝える個体発生や生体機能維持に必須のメカニズムである。母体の環境要因による児のエピゲノム変化が後世の健康・疾病リスク発現に

HumanMethylation450 BeadChip (450K) はヒト全遺伝子調節領域の DNA メチル化情報を迅速に獲得できる解析システムとして、多くの研究に使用されている(EHP 2017)。

化学物質では、喫煙、ヒ素や鉛などの重金属の胎児期曝露による児のメチル化への影響について、網羅的解析による報告が多くなされている(Int J Epidemiol 2017; EHP 2016; Chemosphere 2015)。一方、世界的に製造・使用量が増加し、健康影響が懸念されている合成化学物質への胎児期曝露とメチル化との関連に関しては、ターゲット CpG 解析、グローバルメチル化解析により、有機フッ素化合物、PCB 類やフタル酸エステル類と臍帯血や胎盤組織の *IGF2/H19*, *AHRR*, *LINE1* 遺伝子などのメチル化との関連が示された(J Expo Sci Environ Epidemiol 2017; Repro Toxicol 2017; Sci Rep 2016; Environ Res 2016)。しかし、網羅的メチル化解析に関しては、世界的にも非常に少数の報告のみである(Environ Res 2017; Environ Mol Mutagen 2017)。さらに、曝露によるエピゲノム変化が関与する次世代影響については未だ明らかにされていない。

本研究は、種々の環境化学物質曝露による次世代の多様な疾病エンドポイントへの影響を解明するために、網羅的エピゲノム解析により、化学物質がエピゲノム変化を介して影響する新規の毒性メカニズムを遺伝的差異や多様なライフスタイルをもつヒト集団で明らかにし、次世代影響の試験法の開発に資する。具体的には、1)札幌コホートにおける *IGF2/H19*, *LINE1* のターゲット CpG メチル化解析により、環境化学物質曝露が児のメチル化変化に影響を及ぼすことを示したが、曝露により影響を受ける次世代の多様な疾病エンドポイントに対応した様々なメチル化変化が起こっていると考えられる。

そこで、エピゲノム網羅的メチル化解析により、環境化学物質曝露に起因するメチル化変化を同定し、どのような機能を持つ遺伝子・経路が影響を受けるかを明らかにする。2)網羅的 DNA メチル化解析はスクリーニング法であり、また、データの複雑性から擬陽性を抽出してしまう可能性もあることから、解析結果の妥当性検証が必須である。そこで、次世代シーケンサーによる多サンプルのメチル化検証法を確立し、さらに、海外のコホートとの共同研究により検証の効率化を図る。3)それぞれの化学物質曝露に起因するメチル化変化がどの健康影響に関与するのか、その影響の何%(介在の大きさ)をメチル化変化で説明できるのかを介在解析(Mediation analysis; Int J Epidemiol 2016)で明確にする。4)遺伝子多型(SNPs)の影響を母児ペアで検討し、遺伝的差異を背景にもつヒト集団でのメチル化変化を明らかにする。

以上の検討により、胎児期の化学物質曝露がエピゲノム変化を介して成長後の疾病発現に影響を与えるエピゲノム試験法の開発につなげる。

## B . 研究方法

### 1 . 胎児期 PCB 類濃度と臍帯血中 *IGF2*・*H19*・*LINE1* メチル化との関連

札幌市内 1 産科病院外来を受診し同意を得た妊娠後期の 169 名の妊婦を対象に、出生前向きコホート研究を実施した。妊娠後期に母体血を採取し、高分解能ガススペクトロメトリー・高分解能マスペクトロメーター(GS-MS)を使って PCB 類を分析した。出生時に臍帯血を採取し、DNA を抽出した。バイサルファイト処理した上で、*IGF2* DMR0 (chr11p15.5, site 1: 2109519; site 2: 2109516), *H19* DMR (chr11p15.5, site 1: 1964257; site 2: 1964259; site 3: 1964257; site 4:

1964254), *LINE1* の 3 領域を Pyromark Q24 system (Qiagen) を使って, DNA メチル化率を定量した。母体血中 PCB 類濃度 ( $\text{Log}_{10}$  変換値) と *IGF2*, *H19*, および *LINE1* メチル化率 ( $\text{Log}_{10}$  変換値) との関連は交絡因子で調整した重回帰分析で検討した。交絡因子は, 母の年齢, 母の身長, 妊娠前体重, 妊娠後喫煙状況, 出産歴, 教育歴, 世帯収入, 妊娠中近海魚摂取, 妊娠中遠洋魚摂取, 妊娠中アルコール摂取, DNA メチル化率分析のバッチ差, 過去の流産歴 (*IGF2* メチル化率がアウトカムの時のみ), 妊娠中の練り物摂取 (*H19* メチル化率がアウトカムの時のみ), *IGF2* メチル化率 (*H19* および *LINE1* メチル化率がアウトカムの時のみ) とした。

## 2. 胎児期有機フッ素化合物 (PFASs) 曝露の臍帯血 DNA 網羅的エピゲノム解析

初期調査票・出産時カルテ情報・出産前母体血中 PFASs (PFOS および PFOA) 濃度・臍帯血がそろった北海道スタディ札幌コホートの 190 母児ペア (discovery cohort), および, Taiwan Maternal and Infant Cohort Study (TMICS) の 37 母児ペア (replication cohort) を対象とした。PFAS 濃度は LC-MS/MS で測定した。臍帯血 DNA を抽出後, Infinium HumanMethylation450 BeadChip (イルミナ社) により 45 万 CpG 部位のメチル化を解析した。得られたメチル化値を標準化後, バッチ間の補正を行った。臍帯血中細胞組成をメチル化値から推定した (Bakulski et al. 2016)。メチル化値と  $\text{log}_{10}$  変換した PFAS 濃度との関連を robust linear regression (Fox and Weisberg 2011), 経験ベイズ法 (Smyth 2004) を用いて解析し, メチル化変化部位 (differentially methylated position; DMP) を同定した。Discovery cohort では, 母の年齢, 出産歴, 出産前 BMI, 教育歴, 妊娠中喫煙, 採血時期,

児の性別, 在胎週数, および, 細胞組成値, replication cohort では, 母の年齢, 児の性別, および, 細胞組成値で調整した。また, robust linear regression と同じモデルを用いて, メチル化変化領域 (differentially methylated region; DMR) を bump hunter 法 (Jaffe et al, 2012) により同定した。

## 3. 胎児期の喫煙曝露により変化する DNA メチル化領域の同定, および次世代シーケンサーによる定量的なメチル化検証手法の確立

北海道スタディ札幌コホート参加者から 291 名を対象とし, 喫煙経験のない非喫煙群 ( $n = 124$ ), 妊娠中も喫煙を継続した喫煙群 ( $n = 46$ ), 妊娠がわかって喫煙を止めた喫煙中止群 ( $n = 77$ ) の 3 群を解析対象とした。網羅的な DNA メチル化は Infinium HumanMethylation450 BeadChip (イルミナ社) により約 45 万 CpGs のデータを取得し, 先行文献を参考にデータの前処理 (標準化, バッチ効果補正など), 統計モデル (細胞組成, 母年齢, 児性別, 母教育歴で調整) を構築し, 喫煙曝露により変化するメチル化領域 (CpG) の同定を行った。同定された CpG 領域の再現性を検証するため, 同一のサンプルを Ion PGM 次世代シーケンサー (サーモフィッシャー社) を用いたバイサルファイトシーケンス法によりメチル化率を測定した。

## 倫理面への配慮

疫学調査は北海道大学環境健康科学研究教育センター, 北海道大学大学院医学研究科, 山梨大学の倫理委員会および遺伝子解析審査小委員会および共同研究施設の倫理規定に従って実施し, インフォームドコンセントは「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」, 「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」

およびヘルシンキ宣言に基づいて行った。研究への参加は自由意志により、自発的に中止しても不利益を被らないよう配慮し、対象者のプライバシーの保持には細心の注意を払った。すべての実験・研究は、北海道大学大学院医学研究科で規定されている「ヒト組織及び動物を用いた実験指針」に従い、本研究は倫理面の十分な配慮のうえ行った。

## C . 研究結果

### 1 . 胎児期 PCB 類濃度と臍帯血中 IGF2・H19・LINE1 メチル化との関連

PCB 類と IGF2 メチル化率との関連はなかった。DecaCB 異性体濃度が 10 倍増えると、H19 メチル化率の  $\text{Log}_{10}$  変換値が全児で 0.017 増加 (95% CI: 0.003, 0.031), 女児で 0.029 増加した (95% CI: 0.010, 0.051)。HeptaCB 異性体濃度が 10 倍増えると、LINE1 メチル化率の  $\text{Log}_{10}$  変換値が全児で 0.005 増加 (95% CI: 0.000, 0.010), 女児で 0.008 増加した (95% CI: 0.002, 0.015)。LINE1 メチル化率との関連で、HeptaCB 異性体 10 種類のうち、2,2',3,3',5,5',6-HeptaCB (#178), 2,2',3,4,4',5,6-HeptaCB (#182), 2,2',3,4,4',5,5'-HeptaCB (#180), および 2,2',3,3',4,4',5-HeptaCB (#170) の 4 種類が女児において関連が認められた。

### 2 . 胎児期有機フッ素化合物 (PFASs) 曝露の臍帯血 DNA 網羅的エピゲノム解析

解析した 45 万 CpG 部位全体のメチル化変化としては、PFOS 曝露との関連ではメチル化の増加 (高メチル化), PFOA 曝露ではメチル化の減少 (低メチル化) が認められた。

個々の CpG 部位におけるメチル化変化では、多重比較補正後も統計学的に有意な DMP は、PFOS 曝露、PFOA 曝露それ

ぞれ 2 つずつあった (false discovery rate < 0.05)。discovery cohort で最も有意な P 値を示した上位 20 の DMPs のうち、ZBTB7A (cg16242615), TCP11L2 (cg00173435), ZNF33BP1 (cg07661167), および NTN1 (cg18901140) に位置する 4 つの DMP が replication cohort でも同じメチル化変化の方向を示し、P 値が 0.05 以下であった。DMR に関しては、PFOA 曝露と関連する 21 個の CpG 部位を含む ZFP57 の領域が family-wise error rate < 0.1 を示した。PFOS および PFOA それぞれとの関連において discovery cohort で最も有意な P 値を示した上位 5 の DMRs のうち、ZFP57 に加え、CYP2E1, SLC17A9, SMAD3, DUSP22, TCERG1L, および GFPT2 に位置する 7 領域が replication cohort でも同じメチル化変化の方向を示した。

### 3 . 胎児期の喫煙曝露により変化する DNA メチル化領域の同定、および次世代シーケンサーによる定量的なメチル化検証手法の確立

ゲノムワイド有意水準 (FDR < 0.05) かつメチル化変化の大きさ ( $|\text{偏回帰係数}| > 0.02$ ) の条件で、非喫煙群と喫煙群の比較で 46CpGs 領域 (27 遺伝子) が同定された。従来報告と同様に AHRR, MYO1G などの遺伝子が含まれる一方で、シナプス関連分子である SHANK2 やタンパク質の分解に関連する TRIM36 など、これまで報告されてない領域を同定することができた。また同様の条件で非喫煙群と中止群の比較で 15CpGs 領域 (5 遺伝子), 中止群と喫煙群の比較で 64CpGs 領域 (38 遺伝子) をそれぞれ同定した。これらの 3 つの解析から共通する CpGs を抽出することにより、喫煙を中止することにより DNA メチル化状態が非喫煙者と同等レベルになる 9CpGs, 喫煙を中止しても変化しない 1CpG を見出すことができた。さらに同

一の DNA サンプルを用いて次世代シーケンサーによる再現性検証を行なった結果, 8CpGs のうち 7CpGs でマイクロアレイの結果と同様のメチル化変化が確認できた。

## D . 考察

### 1 . 胎児期 PCB 類濃度と臍帯血中 *IGF2*・*H19*・*LINE1* メチル化との関連

胎児期 PCB 類濃度と *H19* および *LINE1* メチル化との関連が認められ, 男女別では女兒で有意な違いがあった。女兒では, DecaCB 異性体 (2,2', 3,3', 4,4', 5,5', 6,6' -DecaCB [#209]) が 10 倍増えると *H19* メチル化率の  $\text{Log}_{10}$  変換値が 0.029 増加し ( $\approx 1.07\%$  増加に相当), HeptaCBs 異性体が 10 倍増えると *LINE1* メチル化率の  $\text{Log}_{10}$  変換値が 0.008 増加した ( $\approx 1.02\%$  増加に相当)。先行研究では, PCB 類濃度と *H19* 遺伝子発現との関連 (Kappil et al. *Environ Epigenet.* 2016) および *IGF2/H19* メチル化と胎児発育との関連 (Koukoura et al. *Int J Mol Med.* 2011; Koukoura et al. *Mol Med Rep.* 2012) が報告されている。*H19* および *LINE1* メチル化率との関連で認められた PCB 異性体のうち, PCB#170 と PCB#180 の生体内における作用の一部は既に報告されているものの (Shin et al. *Mutagenesis.* 2010; Uslu et al. *Hum Exp Toxicol.* 2013; Wolff et al. *Environ Health Perspect.* 1997), PCB#178, PCB#182, および PCB#209 は疫学研究, 動物実験および細胞実験での報告がまだない。

*LINE1* メチル化率が 7%-9% 増加することにより在胎週数が 3.3 日短くなった報告 (Burris et al. *Epigenetics.* 2014), *H19* メチル化率が約 1.4 倍増えるごとに妊娠中期から出産までの胎児の体重増加が 0.51g 減少した報告 (Bouwland-Both

et al. *PLoS One.* 2013), 臍帯血中 PCB#153 が 100pg/mL 増えるごとに出生体重が 118g 減少した報告が既にある (Verner et al. *Environ Health Perspect.* 2013)。これらの先行研究と本研究の結果から, 胎児期 PCB 類濃度によって, *H19* および *LINE1* メチル化が影響される可能性が考えられたものの, 胎児期 PCB 類濃度が *H19* および *LINE1* メチル化を介して, 出生体重の減少に及ぼす影響は比較的小さいと予想された。

一方, 強い健康影響を示すダイオキシン類では関連が認められなかった。メチル化変化を介さないアウトカムへの影響メカニズム, あるいは, *IGF2/H19*, *LINE1* 以外の遺伝子のメチル化変化の関与が示唆されるため, 今後, 網羅的メチル化解析により検討する。

### 2 . 胎児期有機フッ素化合物 (PFASs) 曝露の臍帯血 DNA 網羅的エピゲノム解析

網羅的 DNA メチル化解析により, 胎児期 PFAS 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。

メチル化変化全体としては, PFOS 曝露では高メチル化, PFOA 曝露では低メチル化が見られ, 曝露による global methylation が示唆された。我々は, 様々なアウトカムに対する PFOS と PFOA の影響の違いを示してきた。この作用の違いや, 曝露濃度, あるいは胎盤透過性の違いが, メチル化変化への影響の違いをもたらしている可能性が考えられる。

Replication cohort でも同様にメチル化変化が確認された 4 つの DMP が位置する遺伝子のうち, *ZBTB7A* は methyl-CpG-binding domain protein 3 と結合するがん原性転写因子をコードしている (Choi et al. 2013)。*TCP11L2* は精子受精能や先体反応で役割を果たす TCP11 の類似タンパク質をコードしている。*ZNF33BP1* は lncRNAs に分類される。*NTN1* がコードす

る Netrin 1 は軸索ガイド分子として同定されたラミニン様タンパク質である。

また、同定した7つの DMR の遺伝子のうち、*ZFP57* は imprinting control region でのエピゲノム修飾維持に必要なタンパク質をコードしている(Riso et al. 2016)。*SMAD3* の出生時メチル化変化は、成長後の喘息と関連することが示唆されている(DeVries et al. 2016)。*GFPT2* の臍帯血 DNA メチル化変化は成長後の肥満との関連が示されている(Kresovich et al. 2017)。*CYP2E1*, *DUSP2*, および、*TCERG1L* のメチル化はリュウマチや大腸がんとの関連が示唆されている(Mok et al. 2017, (Bae et al. 2014)。また、動物実験により PFAS 曝露は *CYP2E1* 活性に影響を及ぼすことが示されている(Narimatsu et al. 2011)。

今後、これらのメチル化変化がどのアウトカムに影響するか、介在の大きさを含めて明らかにする。

### 3. 胎児期の喫煙曝露により変化する DNA メチル化領域の同定、および次世代シークエンサーによる定量的なメチル化検証手法の確立

本研究結果から喫煙曝露により DNA メチル化が変化する遺伝子を新たにいくつか見いだすことが出来た。特に *SHANK2* 遺伝子は自閉症の原因とされる遺伝子の1つとして報告されていることから、喫煙曝露による神経発達障害発症メカニズムに関与しているかもしれない。大規模コホートにおける多サンプルの解析では網羅的メチル化解析はコスト面から現実的ではない。そこで特異的な領域に対して多サンプルの定量的解析が求められる。本研究において同一 DNA サンプルを用いて次世代シークエンサーによるメチル化解析を行いデータの再現性を検証した。その結果、8CpGs のうち 7CpGs で同様のメチル化変化が確認できたことから、結

果の妥当性ならびに次世代シークエンサーによるメチル化解析法が確立できた。しかしながら 1CpG については網羅的解析の偽陽性である可能性と次世代シークエンサー解析の影響も考えられることから更なる検証を行う必要がある。今後、大規模コホートを用いて、化学物質の影響を受ける特定の DNA メチル化領域について様々な疾患との関与について解析していく予定である。

## E. 結論

胎児期 PCB 類濃度と *H19* および *LINE1* メチル化に正の相関がみられ、その関係は女兒で顕著だった。

有機フッ素化合物と関連が認められた DNA メチル化部位には imprinting control region でのエピゲノム修飾維持に必要である *ZFP57*, 成長後の喘息と関連する *SMAD3*, 肥満と関連する *GFPT2*, 曝露によりその機能が影響を受ける *CYP2E1* 等が含まれていた。

次世代シークエンサーによるメチル化解析により、エピゲノム網羅的解析結果の妥当性を示すことが出来た。このことにより、次世代シークエンサーによる多検体のメチル化定量が可能と考えられた。

今後、化学物質曝露に誘引される DNA メチル化変化がどのアウトカムに影響するかを介在の大きさを含めて明らかにし、胎児期の化学物質曝露と成長後の疾病発現をつなぐ分子メカニズムとして、エピゲノム試験法開発につなげる。

## F. 研究発表

### 1) 論文発表 (原著・総説 査読有)

1. Kobayashi S., Sata F., Miyashita C., et al.; Gender-specific association of exposure to non-



- dioxin-like polychlorinated biphenyls during pregnancy with methylation levels of H19 and long interspersed nuclear element-1 in cord blood in the Hokkaido study. *Toxicology*. 390: 135-145, 2017.
2. Kishi R., Araki A., Minatoya M., et al.; The Hokkaido birth cohort study on environment and children's health: Cohort profile - updated 2017. *Environmental Health and Preventive Medicine*. 22: 46, 2017.
  3. Miura R, Araki A, Miyashita C, et al. An epigenome-wide study of cord blood DNA methylations in relation to prenatal perfluoroalkyl substance exposure: the Hokkaido study. *Environment International*. 115: 21-28, 2018.
  4. Miyake K, Kawaguchi A, Miura R, et al. Association of DNA methylation in cord blood and maternal smoking exposure: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *Scientific Report*. 8: 5654, 2018.
1. 小林澄貴, 佐田文宏, 宮下ちひろほか. 胎児期の PCB 類曝露による児の *H19・LINE-1* の DNA メチル化への影響: 北海道スタディ. 第 88 回日本衛生学会学術総会. 東京都大田区. 2018.03.22.-24.
  2. 三宅邦夫, 三浦りゅう, 小林祥子, 小林澄貴, 宮下ちひろ, 荒木敦子, 山縣然太朗, 岸玲子. 妊娠中の喫煙曝露における臍帯血を用いた DNA メチル化変化領域の同定. 第 46 回日本環境変異原学会. 東京都千代田区. 2017.11.6.-7.

## G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## 2) 論文発表 (解説 査読無)

1. 岸玲子, 湊屋街子, 荒木敦子, 宮下ちひろ, 【講座 子どもを取り巻く環境と健康】第24回 誰もが健康な人生のスタートを-世界で進むコーホート研究, 公衆衛生, 81(2), 175-183, 2017.

## 3) 学会発表