

大規模コホートにおける次世代シーケンサーを用いた領域特異的メチル化解析

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	三宅 邦夫	山梨大学大学院総合研究部	准教授
研究分担者	石塚 真由美	北海道大学大学院獣医学研究院	教授
研究分担者	佐田 文宏	中央大学保健センター	医療管理者

研究要旨

背景: 胎児期や乳幼児期の化学物質曝露が児の神経発達障害リスクに影響することが報告されている。その分子メカニズムとしてエピゲノム 特に DNA メチル化異常の関与が考えられているが、これまで日本人集団で大規模な出生コホートによる DNA メチル化解析はなされていない。

目的: 本研究では、大規模コホートにおける次世代シーケンサーを用いた DNA 解析手法の検証、喫煙曝露と DNA メチル化および ADHD の関連を検討することを目的とした。

方法: 北海道スタディ大規模コホートにおける ADHD ケース・サブコホートのうち臍帯血 DNA のそろう母児 562 名(ケース:245 名、コントロール:317 名)を対象とし、質問票(非喫煙群(n = 276)、喫煙群(n = 38))もしくは母体コチニン濃度(高濃度群(n = 48)、中程度濃度群(n = 200)、低濃度群(n = 262))へ群別化した。昨年度実施した網羅的 DNA メチル化解析から胎児期の喫煙曝露により有意に DNA メチル化変化した 46CpGs から 14CpGs(9 遺伝子)を解析遺伝子領域とし、次世代シーケンサーを用いたメチル化解析は ThermoFisher 社の IonPGM システムを用いた。

結果: 質問票により群別化した非喫煙群、喫煙群間で 5 つの CpGs(AHRR (cg05575921), MY01G (12803068), GF11 (cg12876356, cg18146737), ESR1 (cg15626350))については 450K の結果同様、喫煙曝露によるメチル化変化に統計的有意差(P < 0.05)を認めた。コチニン濃度で群別化した結果、ESR1 以外の 4 つの CpGs は質問票と同様に低濃度および中程度濃度群と比較して高濃度群で有意な差が認められた。喫煙曝露による ADHD 疑い群の危険率の指標としてのオッズ比は約 1.5 であったが、有意差は認めなかった。

考察: 次世代シーケンサーを用いた特異的遺伝子領域の DNA メチル化解析法から喫煙曝露の影響を受けやすい遺伝子領域の検証ができた。

A. 研究目的

近年、神経発達障害が世界的に増加していると報告されている(米国 CDC)。その要因は単一ではないが、胎児期や乳幼児期の化学物質曝露による影響が指摘されている(Tran et al., 2017)。これまで出生コホート研究から妊娠中の喫煙曝露が子供の ADHD のリスクを増加させること(Melchior M et al., 2015, Joelsson P et al., 2016)が報告されている。動物実験においても胎児期のタバコ煙が仔の記憶・学習障害、情動異常を示すこと(Zhu J et al., 2012, Yochum C et al., 2014)が報告されている。このような先行研究から胎児期・乳幼児期の喫煙曝露が脳神経発達に影響を及ぼしていると考えられる。その間を結びつける分子メカニズムとしてエピゲノム 特に DNA のメチル化が指摘されているが、これまで日本人集団で大規模な出生コホートによる DNA メチル化解析はほとんどなされていない。そこで本研究では、大規模コホートにおける次世代シーケンサーを用いた DNA 解析手法の検証、喫煙曝露と DNA メチル化および ADHD の関連を検討することを目的とする。

B. 研究方法

1. 対象

北海道スタディ大規模コホートにおける ADHD ケース・サブコホートのうち臍帯血 DNA のそろう母児 562 名(ケース:245 名、コントロール:317 名)を対象とした。喫煙経験のない非喫煙群(n = 276)、妊娠中も喫煙を継続した喫煙群(n = 38)、喫煙経験がある群については禁煙時期が明確でなかったため解析から除外した。妊娠後期(約 8 ヶ月)での母体の血清コチニン濃度(Sasaki 2011)により血清コチニン高濃度群(≥ 11.49 , n = 48)、中程度濃度群(0.22-11.48 ng/mL, n = 200)、

低濃度群(≤ 0.21 , n = 262)へ群別化した。血清コチニン濃度が測定されていない対象者は解析から除外した。またプライマリーエンドポイントとして 6 歳の ADHD-RS スコア(男児 ≥ 14.9 、女児 ≥ 9.4)により ADHD 疑い群(n = 224)、健常者群(n = 286)が解析対象者となった。

2. 方法

昨年度実施した網羅的 DNA メチル化解析から胎児期の喫煙曝露により有意に DNA メチル化変化した 46CpGs から 14CpGs(9 遺伝子)を選択した。次世代シーケンサーを用いたバイサルファイトシーケンス解析は ThermoFisher 社の IonPGM システムを用いた。具体的な方法は以下に示す。臍帯血をバイサルファイト処理した後、各 CpG を含むプライマーで PCR 増幅した。各 PCR 産物を検体ごとに混ぜ、エンドリペア、ニックリペア、アダプター・バーコード配列付加によりライブラリーを作成し、リアルタイム PCR により濃度を測定した。シーケンス用半導体チップ(Ion 318 chip)を用いて 96 検体/ chip でテンプレート調整(Ion Chef)、Ion PGM によるシーケンスランを行った。平均カバレッジ $>2500 \times$ 、ターゲット領域のカバレッジ $>500 \times$ になるようにシーケンス回数を調整した。取得したシーケンスデータは Thermo Fisher 社の Torrent Suite Software ver 5.0 を用いてベースコールを行い、Methylation Analysis Amplicon プラグインを用いて、各遺伝子標的領域における各 CpG サイトのメチル化率を算出した。

(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、北海道大学大学院医学研究科及び山梨大学医学部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

質問票により群別化した非喫煙群、喫煙群間とも正規性が認められないため、ウィルコクソンの順位和検定により、非喫煙群と喫煙群の間にメチル化率の差の統計的検定を行った結果を図1に示す。5つのCpGs(*AHRR* (cg05575921), *MYO1G* (12803068), *GF11* (cg12876356, cg18146737), *ESR1* (cg15626350))については450Kの結果同様、喫煙曝露によるメチル化変化に統計的有意差($P < 0.05$)を認めた。しかし、その他の遺伝子領域では統計的有意差は認められなかった。

コチニン濃度で群別化した解析結果を図2に示す。*ESR1*以外の4つのCpGsは質問票と同様に低濃度および中程度濃度群と比較して高濃度群で有意な差が認められた。

質問表による喫煙曝露とADHD疑い群との関連を検討するための分割表を表1に示す。この分割表における喫煙曝露によるADHD疑い群の危険率の指標としてのオッズ比は約1.5であったが、カイ二乗検定による比率の差の検定のP値 = 0.3052と喫煙曝露とADHD疑い群との関連に有意差は認めなかった。また母体血清コチニン濃度とADHD疑い群の関連を検討するための分割表を表2に示す。母体血清コチニン濃度とADHD疑い群との関連もP値 = 0.1889と有意差は認めなかった。

コントロール群とADHD疑い群間比較においてDNAメチル化に差があるCpGを解析した結果、*CYP1A1*の1CpGで有意な差があった(図3)。

D. 考察

大規模コホートにおいて多検体のDNAメチル化解析手法を確立することは重要である。その手法の1つとして次世代シーケンサーの利用が考えられる。本研究において、網羅的メチル化解析を行った集団(北海道スタディ札幌コホート)とは別集団である北海道スタディ大規模コホートを用いて次世代シーケンサーによるメチル化解析の妥当性を検証した。その結果、これまでに喫煙曝露による影響が数多く報告されている(Morales E et al., 2016, Joubert BR et al., 2016, Küpers LK et al., 2015)。*AHRR*, *MYO1G*, *GF11*については本研究においても有意にメチル化変化することがわかった。これらの遺伝子は喫煙曝露の影響を受けやすい領域であることが示唆される。しかしながらその他の遺伝子領域では有意差は認められなかった。考えられる理由は以下の通りである。1つ目に450K網羅的解析の偽陽性である。統計的有意差があるとはいえその変化は数%と微妙であることから偽陽性であった可能性が考えられる。2つ目に今回の集団においては非喫煙群($n = 276$)、喫煙群($n = 38$)とサンプルサイズの違いが大きく、十分な検出力が得られなかったことも原因の1つと推測される。3つ目に次世代シーケンサーを用いたバイサルファイトシーケンスによるメチル化解析において、サンプル間でカバレージ数がばらついてしまったことから外れ値が多くなってしまったことが考えられる。バイサルファイトDNAを使用する場合、PCR増幅長を短く設計することによりシーケンス効

率が上がることも考えられるため、今後はプライマーの再設計、PCR 増幅長を短くして検討していく予定である。

今回の集団において有意差は認められなかったが、質問表による喫煙曝露と ADHD 疑い群のオッズ比からは喫煙曝露が ADHD 発症に比較的強く寄与することを示唆された。喫煙曝露に関係なくコントロール群と ADHD 疑い群間比較において *CYP1A1* の 1 つの CpG で有意差があったが、外れ値も多いためさらなる検討が必要である。本研究では ADHD の有病率の小ささもサンプルサイズの大きさやバイアスを考慮できていなかったことから、今後はサブコホート集団を再検討することにより喫煙曝露と ADHD 発症の関連さらには DNA メチル化変化との関連を解析できる可能であると考えられる。

E. 結論

次世代シーケンサーを用いた特異的遺伝子領域の DNA メチル化解析法の妥当性を検討し、喫煙曝露の影響を受けやすい遺伝子領域を検証することができた。次世代シーケンサーによるメチル化解析の精度についてはさらなる検証が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Miyake K., Kawaguchi A., Miura R., Kobayashi S., Tran N. Q. V., Koybayashi S., Miyashita C., Araki A., Kubota T., Yamagata Z., Kishi R. Association of DNA methylation in cord blood and maternal smoking exposure: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *Scientific Report*. 2018; 8: 5654.

2. 学会発表

三宅邦夫, 川口章夫, 三浦りゅう, 小林祥子, 小林澄貴, 宮下ちひろ, 荒木敦子, 山縣然太郎, 岸玲子. 胎児期喫煙曝露による臍帯血における DNA メチル化変化領域の同定. 第 12 回日本エピジェネティクス研究会年会. (2018.5.24. -25)

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

参考文献

1. Tran NQV, Miyake K. Neurodevelopmental Disorders and Environmental Toxicants: Epigenetics as an Underlying Mechanism. *Int J Genomics*. 2017; 2017: 7526592.
2. Melchior M, Hersi R, et al. Maternal tobacco smoking in pregnancy and children's socio-emotional development at age 5: The EDEN mother-child birth cohort study. *Eur Psychiatry*. 2015; 30(5): 562-8.
3. Joelsson P, Chudal R, et al. Prenatal smoking exposure and neuropsychiatric comorbidity of ADHD: a finnish nationwide population-based cohort study. *BMC Psychiatry*. 2016; 16: 306.
4. Zhu J, Zhang X, et al. Prenatal nicotine exposure mouse model showing hyperactivity, reduced cingulate cortex volume, reduced dopamine turnover, and responsiveness to oral methylphenidate treatment. *J Neurosci*. 2012; 32(27): 9410-8.
5. Yochum C, Doherty-Lyon S, et al. Prenatal cigarette smoke exposure causes hyperactivity and aggressive behavior: role of altered catecholamines

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

- and BDNF. *Exp Neurol.* 2014; 254: 145-52.
6. Morales E, Vilahur N, et al. Genome-wide DNA methylation study in human placenta identifies novel loci associated with maternal smoking during pregnancy. *Int J Epidemiol.* 2016; 45(5): 1644-1655.
7. Joubert BR, Felix JF et al. DNA Methylation in Newborns and Maternal Smoking in Pregnancy: Genome-wide Consortium Meta-analysis. *Am J Hum Genet.* 2016; 98(4): 680-96.
8. Küpers LK, Xu X et al. DNA methylation mediates the effect of maternal smoking during pregnancy on birthweight of the offspring. *Int J Epidemiol.* 2015; 44(4): 1224-37.

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

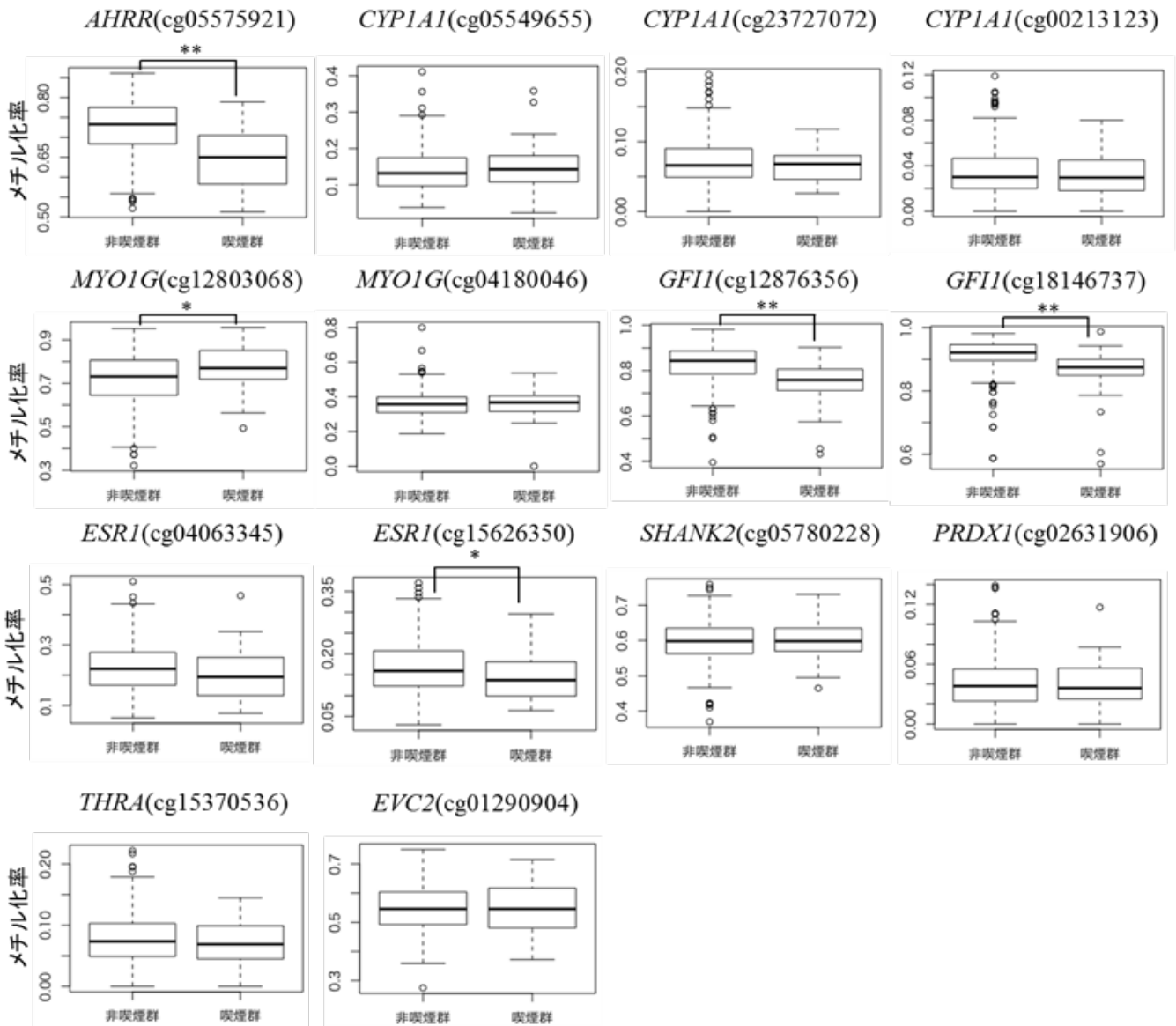


図 1. 質問票による群別化 (非喫煙群、喫煙群) における DNA メチル化率比較. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

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

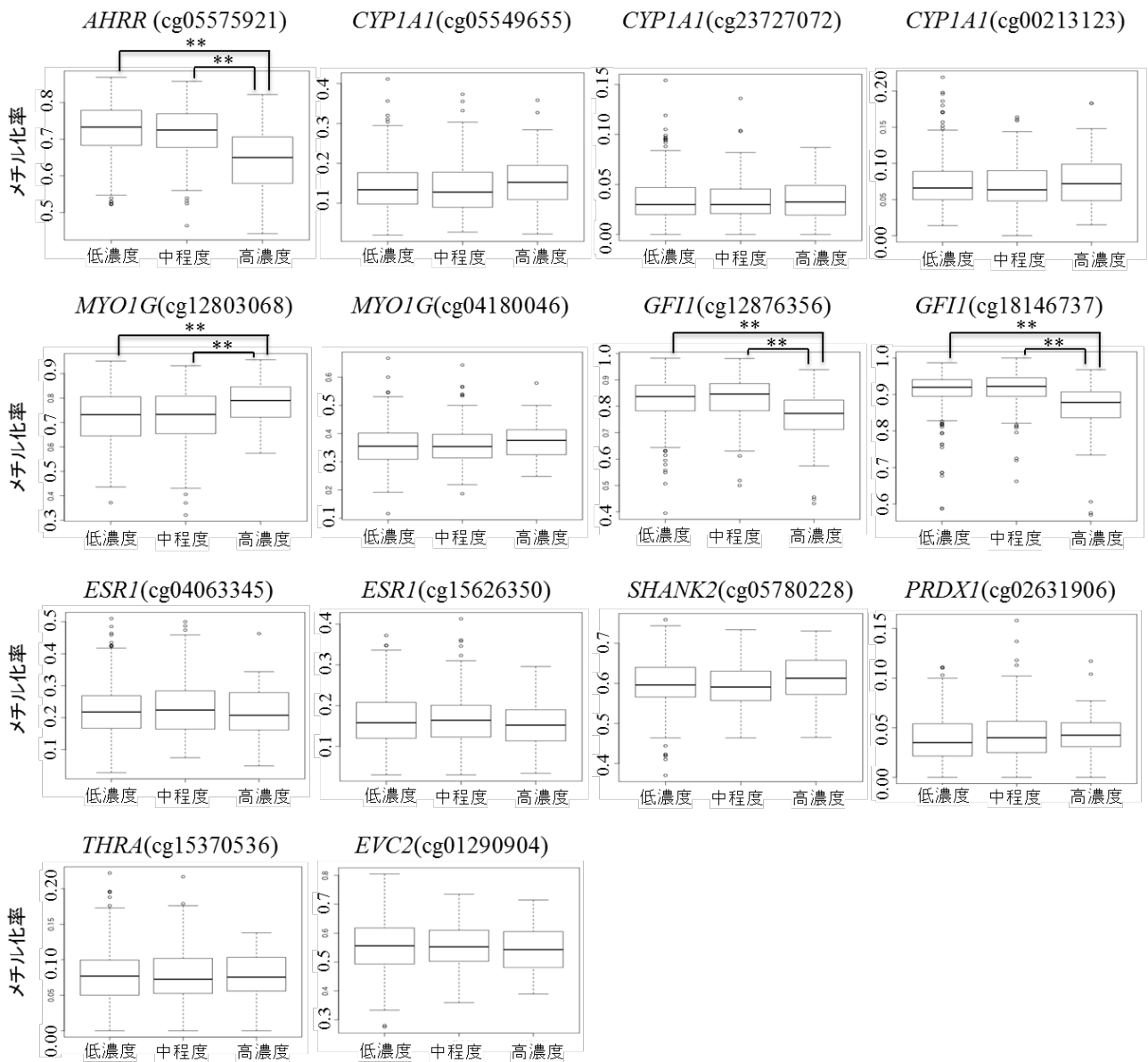


図 2. コチニン濃度による群別化 (低濃度群、中程度濃度群、高濃度群) における DNA メチル化比較. (**P<0.01)

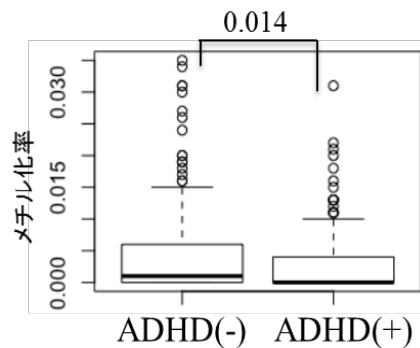


図 3. コントロール群(ADHD(-)), ADHD 疑い群(ADHD(+))における *CYP1A1* の 1CpG のメチル化比較

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. 質問票による喫煙曝露とADHD疑い群の分割表

	対照群	ADHD(疑い)	合計
非喫煙群	164	112	276
喫煙群	19	19	38
合計	183	131	314

表2. コチニン濃度による喫煙曝露とADHD疑い群の分割表

	対照群	ADHD(疑い)	合計
低濃度群	157	105	262
中程度群	105	95	200
高濃度群	24	24	48
合計	286	224	510