

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：近年，胎児期の喫煙曝露が神経発達障害のリスクを増加させ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ジェネティクス 特に DNA のメチル化の関与が指摘されているが，これまでに大規模出生コホートによる検証は行われていない。

目的：大規模出生コホート（北海道スタディ）を用いて，胎児期喫煙曝露と ADHD 疑いリスクとの間にどの程度 DNA メチル化が介在するかを検証することを目的とする。

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 1300 名を解析対象とした。妊娠後期での母体の血清コチニン濃度により，非喫煙群，受動喫煙群，能動喫煙群へ群別化した。また 6 歳の ADHD-RS スコアにより ADHD 疑い群，健常者群とした。DNA メチル化は喫煙曝露により有意に DNA メチル化が変化する 5 つの遺伝子領域（AHRR，CYP1A1，MYO1G，ESR1，GFI1）を解析対象とし，次世代シーケンサー（NGS）を用いたパイサルファイトシーケンス法で解析した。NGS は Ion Torrent PGM system を用いてシーケンスを行い，MethylationAnalysis 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。統計解析は SPSS ver26 で行った。

結果：コチニン 3 群における一元配置分散分析の結果，AHRR は 5CpGs，CYP1A1 は 6CpGs，MYO1G は 20CpGs，GFI1 は 21CpGs で有意差（ $P < 0.05$ ）を認められたが，ESR1 は全ての CpGs で有意差が認められなかった。ロジスティック回帰分析の結果，出産歴（OR = 0.51；95% CI [0.34, 0.76]），世帯年収（OR = 0.39；95% CI [0.25, 0.60]），能動喫煙（OR = 2.51；95% CI [1.32, 4.75]）で有意な関連が認められた。妊婦（能動）の喫煙と ADHD 疑いの関連において AHRR のメチル化の媒介（mediation）分析した結果，AHRR の CpG_34 は間接効果の傾向が見られ，CpG_57 は有意に間接効果が認められた。

考察：妊婦の喫煙と 6 歳児の ADHD 疑いの関連について AHRR の 2 つの CpG のメチル化が媒介することを明らかにした。

A．研究目的

胎児期の喫煙曝露が子供の自閉症スペクトラム障害（ASD）や注意欠陥多動性障害（ADHD）などの神経発達障害のリスクを増加させることが報告されている（Joelsson et al., 2016, Tran et al., 2013, Kalkbrenner et al., 2012）。その分子メカニズムとしてエピジェネティクス 特に DNA のメチル化の関与が指摘されている。胎児期は DNA メチル化の臨界期であり，こ

の時期の環境要因が DNA メチル化形成に影響し，成長後も維持されてしまうことが疾患リスクにつながると想定されている。

これまでに臍帯血 DNA を用いた網羅的 DNA メチル化解析から，胎児期の喫煙曝露により変化する遺伝子領域を明らかにしてきた（Miyake et al., 2018）。しかしながら，喫煙曝露による臍帯血 DNA のメチル化変化が，子供の ADHD リスクに関連するかはわかっていない。そこで本研究では，

大規模出生コホートをを用いて、喫煙曝露に影響される特異的遺伝子領域において次世代シーケンサーを用いた多検体の DNA メチル化解析を行い、“胎児期の喫煙曝露と DNA メチル化”および“DNA メチル化と ADHD”の関連を解析し、胎児期喫煙曝露と ADHD リスクとの間にどの程度 DNA メチル化が介在するか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 1300 名を解析対象とした。妊娠後期（約 8 ヶ月）での母体の血清コチニン濃度（Sasaki et al., 2011）により、非喫煙群（ ≤ 0.21 ）、受動喫煙群（ $0.22-11.48$ ng/mL）、能動喫煙群（ ≥ 11.49 ）へ群別化した。また 6 歳の ADHD-RS スコア（男児 ≥ 14.9 、女児 ≥ 9.4 ）により ADHD 疑い群、健常者群とした。

2．方法

これまでに実施した網羅的 DNA メチル化解析（450K）ならびに次世代シーケンサー解析（NGS）から喫煙曝露により有意に DNA メチル化が変化する 5 つの遺伝子領域（AHRR, CYP1A1, MYO1G, ESR1, GFI1）を解析対象とした（表 1）。DNA メチル化は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で解析した。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 Ion PGM HiQ view kit を用いてテンプレート調整（Ion Chef）、シーケンスランを行った。取得したシーケンスデータは ThermoFisher 社の Torrent Suite Software ver5.0 を用いてベースコールを行い、MethylationAnalysis Amplicon プラグインを用いて、各遺伝子標的領域おける各 CpG サイトのメチル化率を算出した。統計解析は SPSS ver26 で行った。

（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、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

コチニン 3 群において各 CpG のメチル化率に差があるかについて一元配置分散分析を行った。AHRR は 5CpGs, CYP1A1 は 6CpGs, MYO1G は 20CpGs, GFI1 は 21CpGs で有意差（ $P < 0.05$ ）を認めしたが、ESR1 は全ての CpGs で有意差が認められなかった。次に ADHD 疑い群、健常者群において各 CpG のメチル化率に差があるかについて分析した。その結果、AHRR は 2CpGs, CYP1A1 は 4CpGs, MYO1G は 17CpGs, GFI1 は 18CpGs, ESR1 は 10CpGs で有意差（ $P < 0.05$ ）を認めた。これらの 2 つの結果から共通して差があった AHRR の 2CpGs, MYO1G の 17CpGs,

GF11 の 18CpGs についてさらなる解析を行った。

次に 6 歳児の ADHD 疑いを目的変数として、出産年齢、出産歴、世帯収入、飲酒、子の性別、NGS 実験年、回帰分析、受動喫煙、能動喫煙を説明変数としてロジスティック回帰分析を行った(表 2)。その結果、出産歴(OR = 0.51; 95% CI [0.34, 0.76])、世帯年収(OR = 0.39; 95% CI [0.25, 0.60])、能動喫煙(OR = 2.51; 95% CI [1.32, 4.75])で有意な関連が認められた。また非喫煙、受動喫煙、能動喫煙の 3 群をトレンド解析した結果の P 値=0.027 で有意であったことから量反応性が認められた。

次に胎児期喫煙と各 CpG サイトのメチル化の関連について回帰分析を行った。その結果、能動喫煙と AHRR の 2CpGs, MY01G の 17CpGs, GF11 の 18CpGs の全てで有意な関連(P < 0.01) が認められた。さらにメチル化と ADHD 疑いとの関連について回帰分析を行った結果、AHRR の 2CpGs と MY01G の 3CpGs で有意な関連(P < 0.05) が認められた。

さらに妊婦(能動)の喫煙と ADHD 疑いの関連において AHRR の 2CpGs, MY01G の 3CpGs のメチル化の媒介(mediation)を解析した。その結果、AHRR の CpG_34(図 1A) は CpG_34 から ADHD 疑いの経路で有意差が認められなかった(p = 0.0559)が間接効果の傾向が見られ、CpG_57(図 1B)は有意に間接効果が認められた MY01G の 3 つの CpGs(MY01G_143, MY01G_186, MY01G_212) については媒介効果の判定が困難であった。

D. 考察

これまでに網羅的解析により臍帯血 DNA における胎児期喫煙曝露により変化する

DNA メチル化部位を報告している(Miyake et al., 2018)。その内 5 つの遺伝子領域に着目し、次世代シーケンサーを用いたバイサルファイト シーケンス法により 1300 検体のメチル化を解析し、胎児期の喫煙曝露と ADHD 疑いの関連について DNA メチル化の媒介効果を判定することができた。

一元配置分散分析から AHRR, MY01G, GF11 の多くの CpG で CYP1A1 の一部の CpG で有意な差が認められたが、ESR1 は全ての CpG で有意差が認められなかった。AHRR, MY01G, GF11, CYP1A1 はこれまでに喫煙曝露によりメチル化が変化する遺伝子としていくつか報告(Joubert et al., 2016, Morales et al., 2016)されており、本研究においても同様の結果が示された。ESR1 については偽陽性である可能性が高いと考えられる。

ロジスティック回帰分析の結果、非喫煙者と比較して喫煙者で 6 歳児の ADHD 疑いが 2.51 倍になることがわかった。受動喫煙では 1.04 倍であることから、妊娠中の母親自身の喫煙が子供の ADHD のリスクにつながると考えられる。

本研究において妊婦の喫煙と ADHD 疑いの関連に対して AHRR の 2 つの CpG のメチル化が媒介することを明らかにした。これまでは妊婦の喫煙と出生体重に対してメチル化が媒介することは報告(Witt et al., 2018, Küpers et al., 2015)されていたが、子供の神経発達障害に対するメチル化の媒介効果は世界で初めての報告である。MY01G の 3CpGs についても媒介分析を行ったが、直接効果(喫煙 ADHD 疑い)と間接効果(“喫煙 メチル化” × “メチル化 ADHD 疑い”) で偏回帰係数の正負が不一致となってしまったため媒介効果を判

定できなかった。今後、調整変数の選び方や他の解析手法の検討を行い、媒介効果を検証していく必要がある。

AhRR は、ダイオキシン類などのリガンドによって活性化される AhR と競合し、転写活性化を抑制する分子である。喫煙によりメチル化が変化する遺伝子として、がん、動脈硬化、喘息との関与が指摘されている（Rauschert et al., 2019, Neophytou et al., 2019）。AhRR のメチル化変化が ADHD の発症や病態メカニズムに直接関与するかはまだわかっていないが、ADHD のリスクマーカーとなる可能性がある。本研究は出生コホートをを用いて“胎児期の喫煙曝露 - 臍帯血 DNA のメチル化 - 6 歳の ADHD 疑い”の関連を明らかにしてきたが、今後の課題がいくつか考えられる。1 つ目に生後の喫煙曝露を含む環境要因を考慮できていない。2 つ目に臍帯血の DNA メチル化状態が 6 歳でも維持されているか測定できていない。3 つ目に臍帯血や末梢血の DNA のメチル化状態が ADHD の脳のメチル化と相関しているかはわからない。今後、出生コホートにおける追跡調査を進めていくだけでなく、細胞（iPS 細胞など）や動物実験での評価を含めて、胎児期喫煙曝露と ADHD リスクをつなぐ分子メカニズムの解明を行う必要がある。

E . 結論

妊婦の喫煙と 6 歳児の ADHD 疑いの関連について AhRR の 2 つの CpG のメチル化が媒介することを明らかにした。

F . 研究発表

1. 論文発表

1. Miura R, Araki A, Minatoya M, Miyake K, Chen ML, Kobayashi S, Miyashita C, Yamamoto J, Matsumura T, Ishizuka M, Kubota T, Kishi R. An epigenome-wide analysis of cord blood DNA methylation reveals sex-specific effect of exposure to bisphenol A. *Sci Rep.* 2019; 9(1):12369.
2. Itoh Y, Koinuma D, Omata C, Ogami T, Motizuki M, Yaguchi SI, Itoh T, Miyake K, Tsutsumi S, Aburatani H, Saitoh M, Miyazono K, Miyazawa K. A comparative analysis of Smad-responsive motifs identifies multiple regulatory inputs for TGF- β transcriptional activation. *J Biol Chem.* 2019; 294(42):15466-15479.
3. Ohtsubo K, Miyake K, Arai S, Fukuda K, Yanagimura N, Suzuki C, Otani S, Adachi Y, Tanimoto A, Nishiyama A, Yamashita K, Takeuchi S, Notohara K, Yoshimura K, Yano S. Aberrant Methylation of Tumor Suppressive miRNAs in Bile from Patients With Pancreaticobiliary Diseases. *Anticancer Res.* 2019; 39(10):5449-5459.

2. 学会発表

1. 大坪公士郎，三宅邦夫，矢野聖二．各種膵胆道疾患における胆汁中癌抑制型 miRNA のメチル化に関する検討．第 105 回日本消化器病学会総会．(2019.05.09)

2. 三宅邦夫. DOHaD 研究におけるエピジェネティクス. 第 13 回 DOHaD 疫学セミナー. (2019.06.29)
3. 渡邊 大輔, 矢ヶ崎 英晃, 成澤 宏宗, 牧野 耕一, 三井 弓子, 佐藤 和正, 佐野 友昭, 中根 貴弥, 太田 正法, 犬飼 岳史, 三宅 邦夫. 先天性甲状腺機能低下症における遺伝子解析スクリーニングの有用性. 第 53 回日本小児内分泌学会学術集会. (2019.09.27)

G. 知的財産権の出願・登録状況

三宅 邦夫, 犬飼 岳史, 渡邊 敦, 木内 博之, 川瀧 智之, 埴原 光人, 山田 有理子. 神経膠腫の予後判定方法. 特願 2020-007686. (2020.01.21)

参考文献

1. 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.
2. Tran PL, Lehti V, et al. Smoking during pregnancy and risk of autism spectrum disorder in a Finnish National Birth Cohort. Paediatr Perinat Epidemiol. 2013; 27(3):266-74.
3. Kalkbrenner AE, Braun JM, et al. Maternal smoking during pregnancy and the prevalence of autism spectrum disorders, using data from the autism and developmental disabilities monitoring network. Environ Health Perspect. 2012; 120(7):1042-8.
4. Miyake K, Kawaguchi A, et al. Association of DNA methylation in cord blood and maternal smoking exposure: The Hokkaido Study on 2019.09.27)Environment and Children's Health. Scientific Report. 2018; 8: 5654.
5. Sasaki S, Braimoh TS, et al. Self-reported tobacco smoke exposure and plasma cotinine levels during pregnancy--a validation study in Northern Japan. Sci Total Environ. 2011; 412-413:114-8.
6. 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.
7. 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.
8. Witt SH, Frank J et al. Impact on birth weight of maternal smoking throughout pregnancy mediated by DNA methylation. BMC Genomics. 2018;19(1):290.
9. 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.

10. Rauschert S, Melton PE et al. Maternal Smoking During Pregnancy Induces Persistent Epigenetic Changes Into Adolescence, Independent of Postnatal Smoke Exposure and Is Associated With Cardiometabolic Risk. *Front Genet.* 2019; 10:770.
11. Neophytou AM, Oh SS et al. In utero tobacco smoke exposure, DNA methylation, and asthma in Latino children. *Environ Epidemiol.* 2019; 3(3):e048.

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. DNA メチル化解析遺伝子領域

遺伝子名	メチル化解析領域 (hg38)	CpG数	領域内に含まれる450K CpG No.
AHRR	chr5:373,213-373,332	5	cg05575921
CYP1A1	chr15:74,726,610-74,726,828	17	cg05549655/cg00213123/cg23727072
MYO1G	chr7:44,963,075-44,963,360	20	cg12803068/cg04180046
GF11	chr1:92,481,065-92,481,301	21	cg12876356/cg18146737
ESR1	chr6:151,808,879-151,809,120	11	cg04063345/cg15626350

表 2. 胎児期喫煙曝露と 6 歳児 ADHD との関係

	OR (95%CI)
出産時年齢	1.01 (0.97, 1.06)
出産歴	0.51 (0.34, 0.76)**
世帯年収	0.39 (0.25, 0.60)**
母妊娠初期飲酒	1.13 (0.64, 1.98)
子_性別	1.05 (0.71, 1.53)
NGS実験年	0.02 (0.01, 0.04)**
コチニン 受動喫煙	1.04 (0.68, 1.58)
コチニン 能動喫煙	2.51 (1.32, 4.75)**
	**p < 0.01

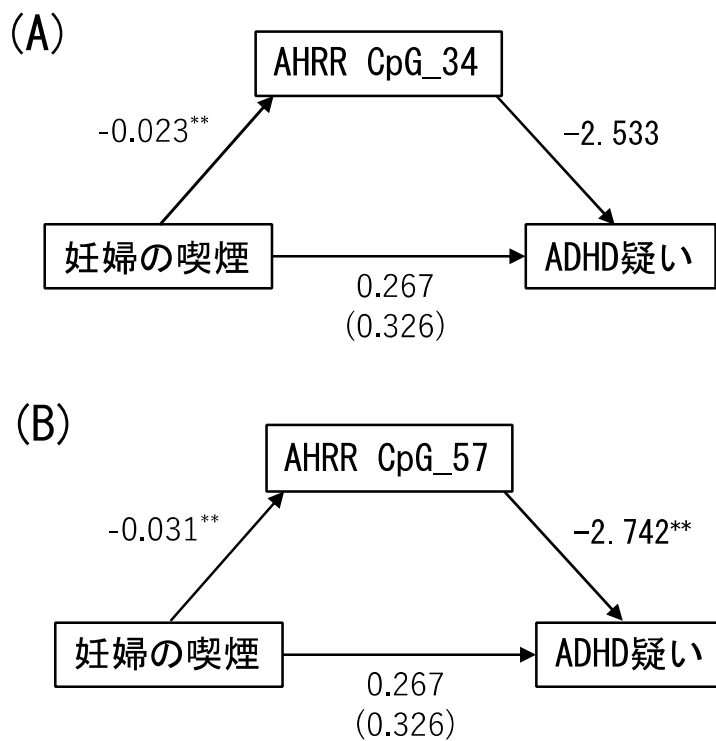


図1. 妊婦の喫煙とADHD疑いの関連におけるAHRRメチル化の媒介解析