

母体血中ダイオキシン類と臍帯血中網羅的メチル化解析の関連

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 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
研究分担者 堀 就英 福岡県保健環境研究所保健科学部生活化学課 課長
研究分担者 三浦 りゅう 北海道大学環境健康科学研究教育センター 特任助教

研究要旨

PCB・ダイオキシン類は残留性有機汚染物質（POPs）に分類される環境化学物質であり，環境およびヒトの生体内に長期に残存する。PCB・ダイオキシン類は胎盤通過性であるため，胎児は子宮内で母体を介して PCB・ダイオキシン類に曝露される。未熟な胎児は外部環境に脆弱であり，子宮内で環境化学物質に曝露された影響は，生後も長期に持続することが懸念されている。しかし胎児期曝露が生後の健康影響を引き起こす生態学的機序については不明な点が多い。

一方，胎生期から乳幼児期にいたる発達期の環境要因により DNA の化学修飾を伴う後天的遺伝子制御・エピゲノム変化が起こり，成長後の健康リスクをもたらすという疾病の胎児期/乳幼児期起源(DOHaD)仮説が注目されている。エピゲノム変化の1つである 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が実施されている。本研究は胎児期のダイオキシン類曝露により変化する DNA メチル化領域を 45 万か所(450K)のメチル化部位(CpG 部位)を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。

292名の対象者のうち，児の性別は男児132名(45%)，女児160名(55%)であった。DMPの解析でFDR $q < 0.05$ の有意水準でダイオキシン類濃度と関連があったCpG(遺伝子)は男児のcg01228410(SLC9A3, FDR= 0.041)のみで，女児では同定されなかった。DMP解析から $p < 2.50E-04$ 水準で男児317CpG，女児262CpGが抽出された。男児で高メチル化の割合が高く，男児でよりDNA高メチル化変化量(logFC)は大きかった。ダイオキシン類やPCB類の胎児期曝露による出生体重や生後の免疫への影響には性差があり，男児に影響が顕著に認められることを既に報告しており，本研究から，エピゲノム変化も性差がある可能性が示唆された。

研究協力者

小林 澄貴 (北海道大学環境健康科学研究教育センター，特任講師)

A．研究目的

我々のこれまでの研究で，有機フッ素化合物，PCB 類と IGF2/H19，LINE1 遺伝子などの CpG をターゲットとした DNA メチル化との関連を報告した(Kobayashi, Azumi, et al. 2017; Kobayashi, Sata, et al.

2017)。さらに，有機フッ素化合物と BPA と臍帯血中の網羅的 DNA メチル化解析に関しても報告した(Miura et al. 2019; Miura et al. 2018)。海外の網羅的 DNA メチル化解析の先行研究では，有機フッ素化合物や DDT の胎児期曝露と児の網羅的 DNA メチル化解析との関連について報告がある(Kingsley et al. 2017; Leung et al. 2018; Yu et al. 2018)。これらの報告は

胎児期の化学物質曝露が、一般生活で曝される低レベルであっても、胎児の DNA メチル化を変化させ、生後の健康・疾病発生に影響する可能性を示している。

しかし、残留性有機汚染物質（POPs）に分類される環境化学物質の PCB・ダイオキシン類の胎児期曝露と網羅的 DNA メチル化解析の関連を検討した報告はない。PCB・ダイオキシン類は製造禁止および発生予防対策によってヒトの曝露レベルは低下していることが報告されているが、環境およびヒトの生体内に長期に残存するため、生体影響が懸念され続けている。PCB・ダイオキシン類は胎盤通過性であるため、胎児は子宮内で母体を介して PCB・ダイオキシン類に曝露される。未熟な胎児は外部環境に脆弱であり、子宮内で環境化学物質に曝露された影響は、生後も長期に持続することが懸念されている。しかし胎児期曝露が生後の健康影響を引き起こす生態学的機序については不明な点が多い。

胎生期から乳幼児期にいたる発達期の環境要因により DNA の化学修飾を伴う後天的遺伝子制御・エピゲノム変化が起こり、成長後の健康リスクをもたらすという疾病の胎児期/乳幼児期起源(DOHaD)仮説が注目されている (Bianco-Miotto et al. 2017; Gluckman and Hanson 2004)。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。エピゲノム変化の1つである 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が実施されている。本研究は胎児期のダイオキシン類曝露により変化する DNA メチル化領域を 45 万か所（450K）のメチル化部位（CpG 部位）を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。

B．研究方法

出生前向きコホート北海道スタディ（札幌コホート）において、1 産科病院を受診した妊婦 514 名から参加同意を得た。妊娠中期から後期の母体血中ダイオキシン類を、高分解能ガススペクトロメトリー・高分解能マススペクトロメーター（GS-MS）を用いて分析した。抽出した臍帯血 DNA をバイサルファイト処理し、臍帯血 DNA 約 45 万 CpG のエピゲノム網羅的メチル化データ（イルミナ社 Infinium HumanMethylation450 BeadChip）を得た。母体血中ダイオキシン類の濃度によって臍帯血 DNA メチル化率に差異がある CpG（differentially methylated position; DMP）を抽出することを目的に、ロバスト線形回帰 robust linear regression (Fox and Weisberg 2011)、経験ベイズ法 (Smyth 2004) を用いて多変量解析を男女別に実施した。従属変数には臍帯血 DNA 約 45 万 CpG 網羅的メチル化データ、独立変数にダイオキシン類濃度 (log10)、母の出産歴、妊娠中喫煙、採血時期、および、メチル化値から推定した細胞組成値 (Bakulski et al. 2016) を投入した。多重比較を考慮した FDR $q < 0.05$ を有意水準とした。男女で比較的差異がある CpG サイトを群間で比較するため、DMP 解析で $p < 2.50E-04$ 水準の CpG サイトを抽出して、DNA メチル化の可変領域 (differentially methylated region; DMR) について bumpHunter 法で解析した。さらに抽出された CpG 部位が関連する遺伝子機能を明らかにするため遺伝子オントロジー (Gene Ontology (GO)) および KEGG パスウェイ解析を行った。

（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

本研究の対象者は292名で、母親の年齢（平均±SD）は30±4.9歳、初産151名（51.7%）、学歴が高校卒業以下131名（44.9%）、世帯年収500万未満205名（70.7%）、母の妊娠中喫煙46名（15.8%）、児の性別は男児132名（45%）、女児160名（55%）であった。妊娠中の母体血中ダイオキシン類濃度は14.03（10.10-18.24）pg/g TEQ（中央値（25%th-75%th））であった。DMPの解析でFDR $q < 0.05$ の有意水準でダイオキシン類濃度と関連があったCpG（遺伝子）は男児のcg01228410（SLC9A3, FDR=0.041）のみで、女児では同定されなかった。DMP解析から $p < 2.50E-04$ 水準で男児317CpG、女児262CpGが抽出された。それぞれのCpGが高メチル化、低メチル化されている割合を男女で比較すると、男児で高メチル化283CpG（89.3%）、低メチル化34（10.7%）、女児で高メチル化203CpG

（77.5%）、低メチル化（22.5%）と、全体的に高メチル化の割合が高く、男児でさらに顕著であった。メチル化の変化量を示すlogFCの男女別のヒストグラムを示した。高メチル化（logFC > 0）の範囲で、中央値、75%thともに男児のほうが大きい。女児では1CpGでlogFCが0.4を超えただけであった。DNA高メチル化の変化量を男女で比較すると、男児でよりDNAメチル化変化量は大きかった。男女とも有意なDNAメチル化の可変領域DMRは同定されなかった。KEGGパスウェイ解析では、男児で有意な6つの経路（Viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor等）、女児では有意な2つの経路（Amino sugar and nucleotide sugar metabolism）が同定された。

D．考察

ダイオキシン類は芳香族炭化水素受容体（AhR）を介した毒性作用を持ち、発育途中の胎児は臓器組織中のAhR活性が高いためにダイオキシン類に脆弱であると報告されている。臍帯血中のDNAメチル化は胎児が子宮内で受けた外部環境からの影響を反映しており、ダイオキシン類は胎児DNAメチル化に影響することが示唆された。DMPの解析でダイオキシン類濃度と関連があった男児のcg01228410（ $q = 0.041$ ）はSLC9A3遺伝子上に位置しており、SLC9A3は先天異常および糖やナトリウム代謝に関与する遺伝子である（Dorfman et al. 2011）。KEGGパスウェイ解析ではウイルス感染に対するサイトカイン産生に関与する経路等が抽出されており、本研究で抽出されたダイオキシン曝露による変化するCpGが生体に影響を与えるかさらに検討する必要がある。これまでの我々の研

究で、母体血中ダイオキシン類は児の臍帯血 IgE、出生体重、乳幼児期の感染症と発達、および学童期の喘鳴リスクに影響し、特に男児で顕著であることを報告した (Kishi et al. 2017)。児の性別による DNA メチル化変化の差異を明らかにするため、男女別で解析したところ、男児でのみ DMP 解析で有意な CpG が抽出され、女児と比較し男児では高メチル化の割合が高く、DNA メチル化変化量が大きく、KEGG パスウェイでより多くの経路が検出された。網羅的エピゲノム解析はスクリーニングであるが、ダイオキシン類曝露が引き起こすエピゲノム修飾には男女差があり、影響の程度は男児でより強い可能性が示唆された。

E . 結論

ダイオキシン類や PCB の胎児期曝露により引き起こされる胎児のエピゲノム変化には性差があり、特に男児で高メチル化に顕著である可能性が示唆された。

F . 研究発表

1. 論文発表

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. 学会発表

Miyashita, C., and R. Kishi, Effect of prenatal exposure to persistent organic pollutants on children's health in the Hokkaido Study on Environment and Children's Health. DIOXIN2019, 39th International Symposium on

Halogenated Persistent Organic Pollutants, 2019.8.25-30, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan.

G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

参考文献

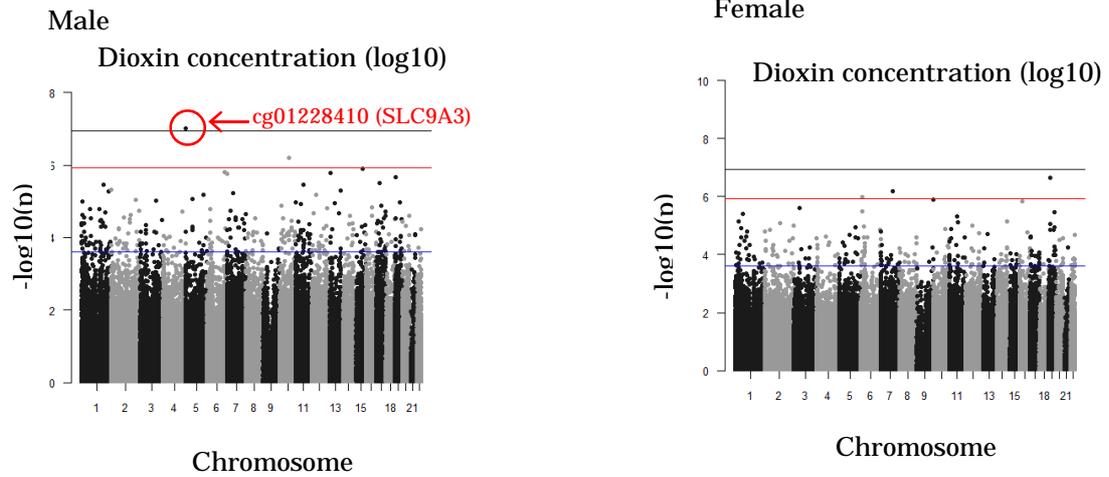
1. Bakulski, K. M., J. I. Feinberg, S. V. Andrews, J. Yang, S. Brown, L. McKenney S, F. Witter, J. Walston, A. P. Feinberg, and M. D. Fallin. 2016. 'DNA methylation of cord blood cell types: Applications for mixed cell birth studies', *Epigenetics*, 11: 354-62.
2. Bianco-Miotto, T., J. M. Craig, Y. P. Gasser, S. J. van Dijk, and S. E. Ozanne. 2017. 'Epigenetics and DOHaD: from basics to birth and beyond', *J Dev Orig Health Dis*, 8: 513-19.
3. Dorfman, R., C. Taylor, F. Lin, L. Sun, A. Sandford, P. Pare, Y. Berthiaume, M. Corey, P. Durie, J. Zielenski, and Canadian Consortium CF Genetic. 2011. 'Modulatory Effect of the SLC9A3 Gene on Susceptibility to Infections and Pulmonary Function in Children With Cystic Fibrosis', *Pediatric Pulmonology*, 46: 385-92.
4. Fox, J. and S. Weisberg, Robust regression in R, in *An R Companion to Applied Regression*. 2011, Sage: Thousand Oaks, CA.

5. Gluckman, P. D., and M. A. Hanson. 2004. 'Living with the past: Evolution, development, and patterns of disease', *Science*, 305: 1733-36.
6. Kingsley, S. L., K. T. Kelsey, R. Butler, A. Chen, M. N. Eliot, M. E. Romano, A. Houseman, D. C. Koestler, B. P. Lanphear, K. Yolton, and J. M. Braun. 2017. 'Maternal serum PFOA concentration and DNA methylation in cord blood: A pilot study', *Environ Res*, 158: 174-78.
7. Kishi, R., A. Araki, M. Minatoya, T. Hanaoka, C. Miyashita, S. Itoh, S. Kobayashi, Y. A. Bamai, K. Yamazaki, R. Miura, N. Tamura, K. Ito, H. Goudarzi, and Hokkaido Study Environm Children's. 2017. 'The Hokkaido Birth Cohort Study on Environment and Children's Health: cohort profile-updated 2017', *Environmental Health and Preventive Medicine*, 22.
8. Kobayashi, S., K. Azumi, H. Goudarzi, A. Araki, C. Miyashita, S. Kobayashi, S. Itoh, S. Sasaki, M. Ishizuka, H. Nakazawa, T. Ikeno, and R. Kishi. 2017. 'Effects of prenatal perfluoroalkyl acid exposure on cord blood IGF2/H19 methylation and ponderal index: The Hokkaido Study', *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 27: 251-59.
9. Kobayashi, S., F. Sata, C. Miyashita, R. Miura, K. Azumi, S. Kobayashi, H. Goudarzi, A. Araki, M. Ishizuka, T. Todaka, J. Kajiwara, T. Hori, and R. Kishi. 2017. '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: 135-45.
10. Leung, Y. K., B. Ouyang, L. Niu, C. Xie, J. Ying, M. Medvedovic, A. Chen, P. Weihe, D. Valvi, P. Grandjean, and S. M. Ho. 2018. 'Identification of sex-specific DNA methylation changes driven by specific chemicals in cord blood in a Faroese birth cohort', *Epigenetics*, 13: 290-300.
11. Miura, R., A. Araki, M. Minatoya, K. Miyake, M. L. Chen, S. Kobayashi, C. Miyashita, J. Yamamoto, T. Matsumura, M. Ishizuka, T. Kubota, and R. Kishi. 2019. 'An epigenome-wide analysis of cord blood DNA methylation reveals sex-specific effect of exposure to bisphenol A', *Scientific reports*, 9: 12369.
12. Miura, R., A. Araki, C. Miyashita, S. Kobayashi, S. Kobayashi, S. L. Wang, C. H. Chen, K. Miyake, M. Ishizuka, Y. Iwasaki, Y. M. Ito, T. Kubota, and R. Kishi. 2018. 'An epigenome-wide study of cord blood DNA methylations in relation to prenatal perfluoroalkyl substance exposure: The Hokkaido study', *Environ Int*, 115: 21-28.

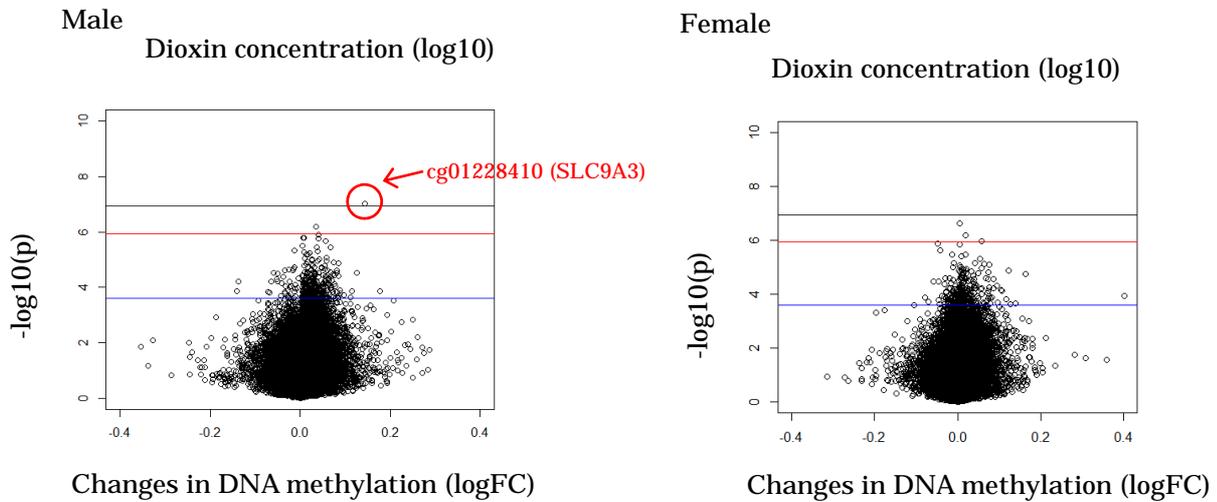
13. Smyth, G. K. 2004. 'Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments', *Stat Appl Genet Mol Biol*, 3: Article3.
14. Yu, X., B. Zhao, Y. Su, Y. Zhang, J. Chen, W. Wu, Q. Cheng, X. Guo, Z. Zhao, X. Ke, W. Danzeng, B. Zhao, and Q. Ma. 2018. 'Association of prenatal organochlorine pesticide-dichlorodiphenyltrichloroethane exposure with fetal genome-wide DNA methylation', *Life Sci*, 200: 81-86.

図1. Dioxin 曝露と 45 万 CpGs メチル化(450k)との関連(DMP: differentially methylated position)

(A) マンハッタン・プロット



(B) ボルケーノ・プロット



Black line: q (FDR) < 0.05, Red line: q (FDR) < 0.1, Blue line: $p < 2.50 \times 10^{-4}$

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 メチル化変化量 (logFC) の男女別の高低メチル化の割合

	Hypo methylation	Hyper methylation	p
Male	34 (10.7)	283 (89.3)	0.0001
Female	59 (22.5)	203 (77.5)	

2 検定

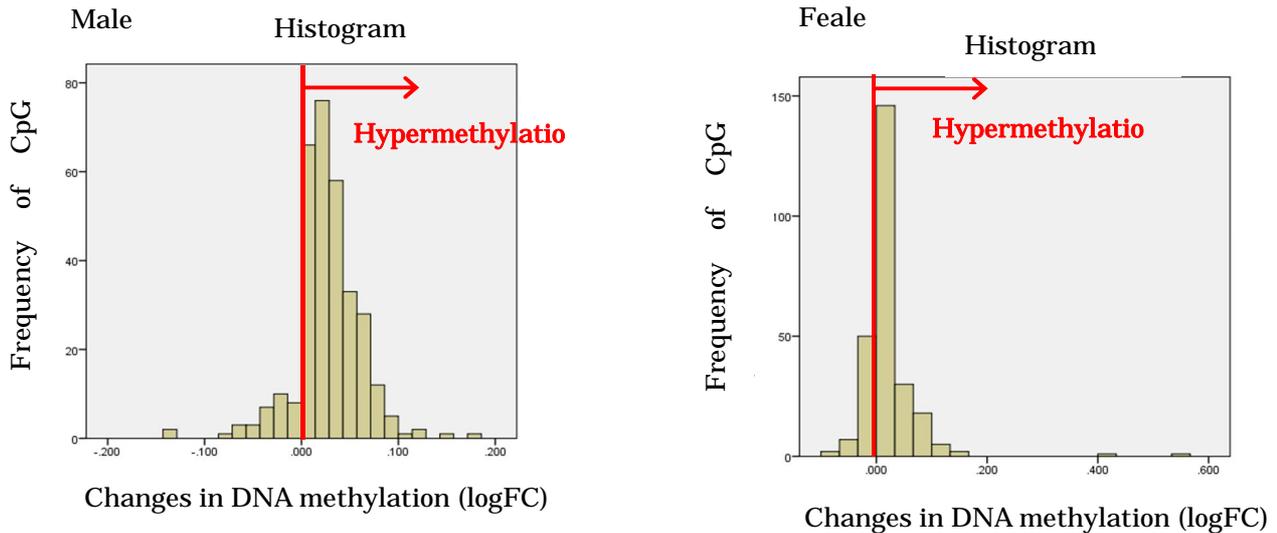
DMP から $p < 2.50E-04$ の水準で抽出された CpG sites

表 2. DNA メチル化変化量 (logFC) の男女別の分布

	Frequency of CpG sites	minimum	25%th	59%th	75%th	maximum	p
Male	317	-0.140	0.011	0.026	0.044	0.177	0.001
Female	262	-0.079	0.003	0.010	0.030	0.563	

Mann-Whitney U test

図 2. Dioxin(log10)による DNA メチル化変化量 (logFC) の分布



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 3. 男女別のダイオキシン類と臍帯血中 DNA メチル化の KEGG パスウェイ ($p < 0.05$)

path No	Description	N	DE	P.DE	FDR
male					
path:hsa04061	Viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor	100	4.5	0.009589074	1
path:hsa01210	2-Oxocarboxylic acid metabolism	18	2	0.019418557	1
path:hsa04360	Axon guidance	181	8	0.028704492	1
path:hsa04977	Vitamin digestion and absorption	24	2	0.037293153	1
path:hsa04064	NF-kappa B signaling pathway	104	4	0.042468097	1
path:hsa00020	Citrate cycle (TCA cycle)	30	2	0.045518804	1
female					
path:hsa00520	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	48	3	0.014026532	1
path:hsa04270	Vascular smooth muscle contraction	132	5	0.030635842	1

DMP から $p < 2.50E-04$ の水準で抽出された CpG sites (male: 317, female: 262)