

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

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

平成29年度 総括・分担研究報告

研究代表者

北海道大学環境健康科学研究教育センター

岸 玲子

研究分担者

山梨大学大学院総合研究部医学域社会医学講座

三宅 邦夫

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教室

石塚真由美

中央大学保健センター

佐田 文宏

北海道大学環境健康科学研究教育センター

荒木 敦子

北海道大学環境健康科学研究教育センター

宮下ちひろ

北海道大学環境健康科学研究教育センター

伊藤佐智子

北海道大学環境健康科学研究教育センター

山崎 圭子

北海道大学環境健康科学研究教育センター

三浦りゅう

福岡県保健環境研究所保健科学部生活化学課

堀 就英

いであ株式会社環境創造研究所

松村 徹

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

松浦 英幸

北海道大学大学院医学研究院腎泌尿器外科学教室

篠原 信雄

平成30(2018)年 3月

目 次

| | |
|--|----|
| I. はじめに | 1 |
| II. 総合研究報告書 | |
| 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 | |
| 岸 玲子 | 2 |
| III. 分担研究報告書 | |
| 1. 胎児期 PCB 類濃度と臍帯血中 <i>IGF-2</i> ・ <i>H19</i> ・ <i>LINE-1</i> メチル化との関連 | |
| 宮下ちひろ, 佐田 文宏, 石塚 真由美, 堀 就英, 松村 徹 | 11 |
| 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 | |
| 三浦りゅう, 荒木 敦子, 宮下ちひろ, 伊藤佐智子, 山崎 圭子, 松浦 英幸, 篠原 信雄 | 19 |
| 3. 胎児期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 | |
| 三宅 邦夫, 三浦 りゅう, 荒木 敦子 | 37 |
| IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 46 |

はじめに

PCBs・ダイオキシン類や有機フッ素化合物などは、環境での蓄積性や残留性が強いことから、いわゆる POPs (Persistent Organic Pollutants) として、世界的に生産や使用が制限されていますが、半減期が長いため、私たちの体内から容易にはなりません。さらにプラスチック可塑剤として使われているフタル酸エステル類などは、半減期は短いのですが広範囲に使用されているため、多くの人々の血液から検出されます。このような化学物質の人への影響は、大人よりも小児、胎児期に大きいことが懸念されています。たとえば尿道下裂・停留精巣をはじめとする先天異常は、その原因が器官形成期のアンドロゲンの作用に依存しますので、いわゆる環境ホルモン作用を示すといわれる PCBs・ダイオキシン類などとの関係を調べる必要があります。しかし、世界的にも多様な環境化学物質による胎児期曝露が、児の Epigenetics を介して引き起こされる次世代影響の全体像および詳細について、未だ明らかになっていません。さらに、次世代影響については、最近各国で報告が増えてきているものの、わが国では、一般的なヒトの集団で、環境化学物質による Epigenetics を介した次世代影響の環境リスクを評価することがなされていませんでした。

そこで、私たちは 2002 年から 2 つの前向き研究を立ち上げて研究を行っています。そのうち札幌市の 1 産院で説明し同意を得た妊婦様 514 人の母体血とお子様の臍帯血について、PCBs・ダイオキシン類、有機フッ素化合物 (PFOS・PFOA)、フタル酸エステル類などの測定を行い、種々のアウトカムとの関係を調べています。また、北海道全域の北海道 (大規模) コーホートでは、母子ペアで参加者が 20929 名になり 2 万組を超えました。妊娠初期に同意を得た妊婦について母体血の有機フッ素化合物もより詳しく 11 種類の測定を行い、成長・発達、甲状腺ホルモン、アレルギー・感染症、および性ホルモン・第二次性徴への影響を研究し、先天異常や疾病との関係について解析を進めています。

一方、最近のゲノム研究の進歩から、化学物質の影響の強さは、曝露された個体の異物 (薬物) 代謝酵素類の遺伝子多型や疾病感受性遺伝子等によっても修飾されることが考えられます。このような研究は、同じ曝露濃度でも遺伝的ハイリスク群である場合、より予防的な対応を進める必要があります。今後、行政が化学物質曝露による次世代影響を検討する上で、どのような動物実験や *In vitro* によるエピゲノム試験法や技術開発が重要か、政策上、どのようなアウトカムを優先的に検討すべきか、それらをヒトでの解析データから示すことにもつながります。

本研究は臨床家と環境疫学専門家の協力で進めています。このような地域をベースに胎児期から立ち上げ、環境リスク評価を行っている研究は、最近増えてきていますが、本研究はその先駆的な位置づけになります。今後、遺伝と環境の両面からのアプローチで予防医学的な数多くの成果が出ることを期待されますので、引き続き皆様のご協力をお願い申し上げます。

最後に多くの皆様のご尽力により研究を継続することができ、本年度報告書をこのようにまとめることができましたことに対して、衷心より御礼申し上げます。

平成 30 年 3 月

研究代表者 岸 玲子

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 (Log_{10} 変換値) と *IGF2*, *H19*, および *LINE1* メチル化率 (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 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 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 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 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 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参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

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

胎児期 PCB 類濃度と臍帯血中 IGF-2・H19・LINE-1 メチル化との関連

| | | | |
|-------|--------|----------------------|---------|
| 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 | 佐田 文宏 | 中央大学保健センター | 医療管理者 |
| 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 | 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 | 松村 徹 | いであ株式会社環境創造研究所 | 取締役 |

研究要旨

胎児期ポリ塩化ビフェニル類(PCBs)濃度と出生体重の減少との関連、およびインスリン様成長因子である(IGF-2/H19)と *Long interspersed nuclear element-1(LINE-1)*の DNA メチル化と出生体重の減少との関連は既に報告されている。しかし、胎児期 PCB 類濃度と IGF-2/H19 および LINE-1 の DNA メチル化との関連はまだ報告されていない。そこで、これらの関連を児の性差を含めて検討することを本研究の目的とした。2002-2005 年に札幌市内 1 参加病院外来を受診し同意を得た妊娠後期の妊婦 169 名を対象に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を使って母体血中の PCB 類を分析し、出生時の臍帯血 DNA を使って IGF-2/H19 および LINE-1 の DNA メチル化 3 領域をバイサルファイトシークエンス法で解析した。母体血中 PCB 類濃度と IGF-2/H19 および LINE-1 メチル化との関連は交絡因子で調整した重回帰分析で検討した。その結果、母体血中 DecaCB 異性体濃度が 10 倍増えると、H19 メチル化率の Log_{10} 変換値が 0.017 増加(95%信頼区間[CI]: 0.003-0.031)した。また HeptaCB 異性体濃度が 10 倍増えると LINE-1 メチル化率の Log_{10} 変換値が 0.005 増加(95% CI:0.000-0.010)した。男女別では、女兒で DecaCB 異性体濃度と H19 メチル化との関連、および HeptaCB 異性体濃度と LINE-1 メチル化との関連が認められた。本研究の結果から胎児期 PCB 類濃度と H19 および LINE-1 メチル化との関連があり、これらの関連は特に女兒で認められることが示唆された。

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)

A . 研究目的

ポリ塩化ビフェニル(PCBs)類はわが国で 1970 年代に使用禁止になっているものの、現在もまだ残存している。わが国の PCB 類摂取では魚介類からの摂取が最も多く、現在でも一日当たり体重 1kg あたり 0.059 μg 摂取している(厚生労働省, 2014; 東京都, 2014)。先行研究では胎児期の PCB 類曝露によって出生体重に及ぼす報告がある(Casas et al., 2015; Konishi et al., 2009)。そして、児の成長促

進に関わるインスリン様成長因子(IGF)-2/H19, および転移因子の一つである *Long interspersed nuclear element-1(LINE-1)*の DNA メチル化による出生体重に及ぼす影響もまた報告されている(Kappil et al., 2015; Michels et al., 2011; Xiao et al., 2016)。しかし、PCB 類曝露によるこれらの領域の DNA メチル化への影響の報告はほとんどない。そこで本研究では、PCB 類濃度によるこれらの領域の DNA メチル化への影響を明らかにすることを本研究の目的とした。

B . 研究方法

分担研究報告書

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妊婦 169 名を対象に、出生前向きコホート研究を実施した。対象者の基本的属性は自記式調査票、出生時所見は病院記録から得た。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・高分解能マススペクトロメーターを使って 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、*IGF-2* 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), *LINE-1* の 3 領域を Pyromark Q24 system (Qiagen) を使って、DNA メチル化率を定量した。

統計解析では、男児と女児との属性の違いは *t*-検定、カイ二乗検定、Mann-Whitney の *U*-検定を使った。母体血中 Total PCBs 濃度、臍帯血中 *IGF-2*, *H19*, および *LINE-1* メチル化率は Kolmogorov-Smirnov 検定で検討したところ、全て $p < 0.05$ であり、非正規分布を示した(図 1)。このため、母体血中 PCBs 濃度と *IGF-2*, *H19*, および *LINE-1* メチル化率との関連を検討する際、 Log_{10} 変換することとした。*IGF-2*, *H19*, および *LINE-1* メチル化率と属性との関連は交絡因子を考慮しない重回帰分析で検討した。そして、母体血中 PCB 類濃度と *IGF-2*, *H19*, および *LINE-1* メチル化率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、血中 PCBs 濃度あるいは臍帯血中 DNA メチル化率との関連が既に報告されている母の年齢、母の身長、妊娠前体重、妊娠後期喫煙状況、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とした(Eguchi et al., 2017; Lee et al., 2014; Miyashita et al., 2015; Todaka et al., 2008)。さらに、*IGF-2* メチル化率と、過去の流産歴および DNA メチ

ル化率分析のバッチ差との関連が認められたので *IGF-2* メチル化率をアウトカムとする時にこれらを交絡因子として追加した。*H19* メチル化率と、妊娠中の練り物摂取、*IGF-2* メチル化率、および DNA メチル化率分析のバッチ差との関連が認められたので、*H19* メチル化率をアウトカムとする時にこれらを交絡因子として追加した。*LINE-1* メチル化率と、*IGF-2* メチル化率と DNA メチル化率分析のバッチ差との関連が認められたので、*LINE-1* メチル化率をアウトカムとする時にこれらを交絡因子として追加した。統計解析には SPSS 22.0J を使用した。

（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大学院医学研究科・医の倫理委員会の倫理規定に従って実施した。インフォームド・コンセントはヘルシンキ宣言に基づいて行った。本研究によって得られた個人名及び個人データの漏えいが一切生じないように、研究者によりデータ保管を厳重に行った。採血の方法は日常の一般診療で行われている血液生化学検査の際の採血と同様であり、格段の危険性は伴わなかった。

C . 研究結果

169 名の属性を表 1 で示す。男児の母と女児の母との間に有意な違いはなかった。男児と比較して、女児の出生頭囲は有意に小さかった(33.7 ± 1.1 cm versus 32.9 ± 1.2 cm; $p < 0.001$)。

Non-dioxin-like PCBs 類異性体の濃度分布を表 2 で示す。Non-dioxin-like PCBs 類の全体を 100%とした場合、HeptaCB 異性体は全体の 30.743%、DecaCB 異性体は全体の 0.477%を占めた。HeptaCB 異性体の中央値は 29,622.5 pg/g lipid、DecaCB 異性体の中央値は 454.7 pg/g lipid だった。

PCBs 類と *IGF-2*, *H19*, *LINE-1* メチル化

分担研究報告書

率との関連を表 3 で示す。PCBs 類と *IGF-2* 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 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)。これらの関連は量反応関係性も認められた(表 4)。HeptaCB 異性体濃度が 10 倍増えると、*LINE-1* メチル化率の 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)。

HeptaCB 異性体 10 種類と *LINE-1* メチル化率との関連を表 5 で示す。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、量反応関係性も認められた(表 6)。

D. 考察

胎児期 PCB 類濃度と *H19* および *LINE-1* メチル化との関連が認められ、男女別では女児で有意な違いがあった。しかし、胎児期ダイオキシン類濃度と *IGF-2*, *H19*, および *LINE-1* メチル化との関連はみられなかった(表なし)。女児では、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 Log_{10} 変換値が 0.029 増加し(≈1.07%増加に相当), HeptaCBs 異性体が 10 倍増えると *LINE-1* メチル化率の Log_{10} 変換値が 0.008 増加した(≈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., 2016)および *IGF-2/H19* メチル化と胎児発育との関連(Koukoura et al., 2011; 2012)が報告されている。PCB 異性体別で *H19* および *LINE-1* メチル化率との関連で認められた 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.,

2010; Uslu et al., 2013; Wolff et al., 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。

LINE-1 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., 2014), *H19* メチル化率が約 1.4 倍増えるこ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., 2013), 臍帯血中 PCB#153 が 100pg/mL 増えることに出生体重が 118g 減少した報告が既にある (Verner et al., 2013)。これらの先行研究と本研究の結果から、胎児期 PCB 類濃度が *H19* および *LINE-1* 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。

強い健康影響を示すダイオキシン類では関連が見られず、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*, および *LINE1* 以外の DNA メチル化変化の関与が示唆されるため、今後、網羅的 DNA メチル化解析により検討する。

本研究の強みは、母体血中に含まれる PCB 類 56 種の異性体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を使って測定したことである。さらに、前向きコホートの研究デザインなので、胎児期 PCB 類濃度と臍帯血中 *H19* および *LINE-1* メチル化率との因果関係は強い。しかし、本研究の限界点もまたある。最終的な解析対象者が 169 名とサンプルサイズが限られているものの、コホート全体の妊婦 514 名と属性に大きな違いはなかった。対象者の偏りはなかったと考えられる。

E. 結論

胎児期 PCB 類濃度と *H19* および *LINE-1* メチル化との関連があり、これらの関連は特に女児で認められた。

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

F . 研究発表

1.論文発表

1. Kobayashi S, Sata F, 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*. 2017; 390: 135-145.

2.学会発表

1. 小林澄貴, 佐田文宏ほか. 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.

G . 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当なし

参考文献

1. Bouwland-Both MJ, van Mil NH, et al. DNA methylation of IGF2DMR and H19 is associated with fetal and infant growth: the Generation R study. *PLoS One* 2013; 8: e81731.

2. Burris HH, Baccarelli AA, et al. Association between length of gestation and cervical DNA methylation of PTGER2 and LINE-1. *Epigenetics*. 2014; 9: 1083-1091.

3. Casas M, Nieuwenhuijsen M, et al. Prenatal exposure to PCB-153, p,p'-DDE and birth outcomes in 9000 mother-child pairs: exposure-response relationship and effect modifiers. *Environ Int*. 2015; 74: 23-31.

4. Eguchi A, Otake M, et al. Assessment of questionnaire-based PCB exposure

focused on food frequency in birth cohorts in Japan. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2017; 24: 3531-3538.

5. Kappil MA, Green BB, et al. Placental expression profile of imprinted genes impacts birth weight. *Epigenetics*. 2015; 10: 842-849.

6. Kappil MA, Li Q, et al. In utero exposures to environmental organic pollutants disrupt epigenetic marks linked to fetoplacental development. *Environ Epigenet*. 2016; 2: dvv013.

7. Konishi K, Sasaki S, et al. Prenatal exposure to PCDDs/PCDFs and dioxin-like PCBs in relation to birth weight. *Environ Res*. 2009; 117: 660-667.

8. Koukoura O, Sifakis S, et al. Loss of imprinting and aberrant methylation of IGF2 in placentas from pregnancies complicated with fetal growth restriction. *Int J Mol Med*. 2011; 28: 481-487.

9. Koukoura O, Sifakis S et al. DNA methylation in the human placenta and fetal growth (review). *Mol Med Rep*. 2012; 5: 883-889.

10. Lee HS, Barraza-Villarreal A, et al. Dietary supplementation with polyunsaturated fatty acid during pregnancy modulates DNA methylation at IGF2/H19 imprinted genes and growth of infants. *Physiol Genomics*. 2014; 46: 851-857.

11. Michels KB, Harris HR, et al. Birthweight, maternal weight trajectories and global DNA methylation of LINE-1 repetitive elements. *PLoS One*. 2011; 6: e25254.

12. Miyashita C, Sasaki S, et al. Demographic, behavioral, dietary, and socioeconomic characteristics related to

分担研究報告書

- persistent organic pollutants and mercury levels in pregnant women in Japan. *Chemosphere*. 2015; 133: 13-21.
13. Shin JY, Choi YY, et al. Low-dose persistent organic pollutants increased telomere length in peripheral leukocytes of healthy Korean. *Mutagenesis*. 2010; 25: 511-516.
 14. Todaka T, Hori T, et al. Congener-specific analysis of non-dioxin-like polychlorinated biphenyls in blood collected from 195 pregnant women in Sapporo City, Japan. *Chemosphere*. 2008; 73: 923-931.
 15. Uslu U, Sandal S, et al. Evaluation of estrogenic effects of polychlorinated biphenyls and organochlorinated pesticides using immature rat uterotrophic assay. *Hum Exp Toxicol*. 2013; 32: 476-482.
 16. Verner MA, McDougall R, et al., Is the relationship between prenatal exposure to PCB-153 and decreased birth weight attributable to pharmacokinetics? *Environ Health Perspect*. 2013; 121: 1219-1224.
 17. Wolff MS, Camann D, et al. Proposed PCb congener groupings for epidemiological studies. *Environ Health Perspect*. 1997; 105: 13-14.
 18. Xiao X, Zhao Y, et al. Fetal growth restriction and methylation of growth-related genes in the placenta. *Epigenomics*. 2016; 8: 33-42.

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

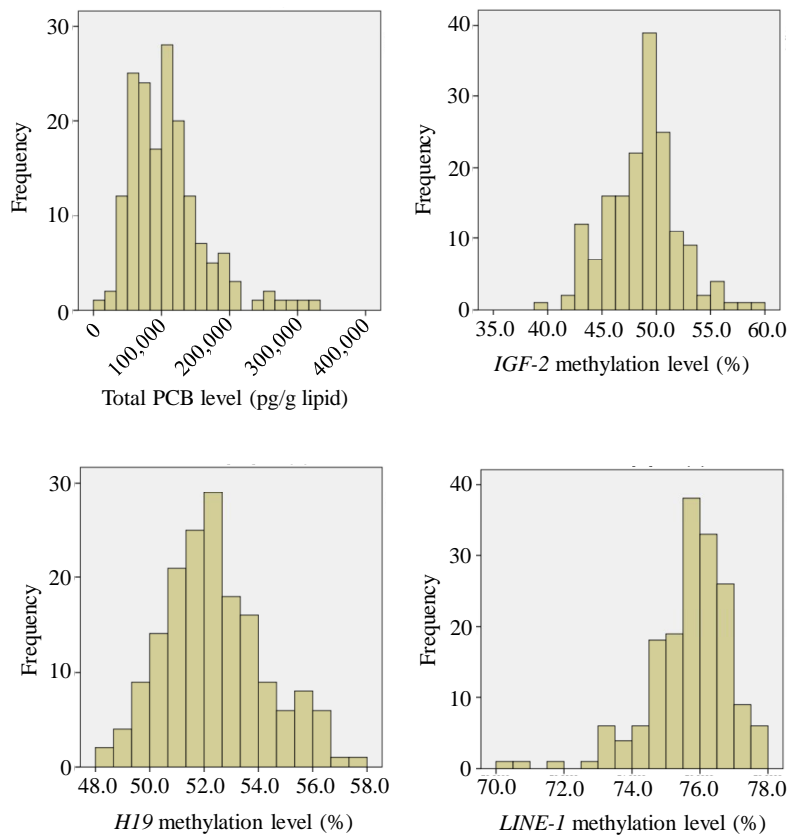


図 1. 母体血中 Total PCB 類濃度と臍帯血中 IGF-2, H19, LINE-1 メチル化率の分布

表 1. 対象者（母児）の属性

| | 全児 (n = 169) n (%) | 男児 (n = 77) n (%) | 女児 (n = 92) n (%) | <i>p</i> ^f |
|-----------------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| 母 | | | | |
| 年齢(歳) ^{a,d} | 30.3 ± 4.8 | 30.5 ± 5.0 | 30.1 ± 4.6 | 0.626 |
| 身長(cm) ^{a,d} | 158.7 ± 5.1 | 158.2 ± 5.1 | 158.9 ± 4.9 | 0.349 |
| 妊娠前体重(kg) ^{a,d} | 53.6 ± 8.3 | 52.6 ± 8.0 | 54.3 ± 8.3 | 0.163 |
| 教育歴(≤12 年) ^b | 72 (42.6) | 29 (37.7) | 43 (46.7) | 0.235 |
| 妊娠中労働者 ^b | 14 (8.3) | 6 (7.8) | 8 (8.7) | 0.832 |
| 世帯収入(<500 万円) ^b | 118 (69.8) | 53 (68.8) | 65 (70.7) | 0.797 |
| 妊娠中食品摂取(≥1 回/週) | | | | |
| 近海魚摂取 ^b | 84 (49.7) | 38 (49.4) | 46 (50.0) | 0.933 |
| 遠洋魚摂取 ^b | 94 (55.6) | 42 (54.5) | 52 (56.5) | 0.797 |
| 妊娠後期喫煙者 | | | | |
| 母 ^b | 31 (18.3) | 10 (13.0) | 21 (22.8) | 0.988 |
| 同居者 ^b | 31 (18.3) | 11 (14.3) | 20 (21.7) | 0.259 |
| 職場での受動喫煙者(母) ^b | (n = 14) 6 (42.9) | (n = 6) 3 (50.0) | (n = 8) 3 (37.5) | 0.640 |
| 妊娠中アルコール摂取(g/day) ^{c,e} | 0.0 (0.0-51.8) | 0.0 (0.0-51.8) | 0.0 (0.0-14.8) | |
| 妊娠中カフェイン摂取(mg/day) ^{c,e} | 117.1 (3.0-425.5) | 114.0 (10.5-356.5) | 108.3 (3.0-425.5) | 0.856 |
| 出産歴(経産婦) ^b | 73 (43.2) | 31 (40.3) | 42 (45.7) | 0.481 |
| 過去の流産歴あり ^b | 31 (18.3) | 61 (16.9) | 18 (19.6) | 0.642 |
| 児 | | | | |
| 出生体重(g) ^{a,d} | 3,141.6 ± 322.7 | 3,167.8 ± 280.3 | 3,119.6 ± 354.6 | 0.335 |
| 出生身長(cm) ^{a,d} | 48.4 ± 1.9 | 48.7 ± 2.3 | 48.2 ± 1.5 | 0.106 |
| 出生頭囲(cm) ^{a,d} | 33.3 ± 1.2 | 33.7 ± 1.1 | 32.9 ± 1.2 | <0.001 |
| 出生胸囲(cm) ^{a,d} | 31.8 ± 1.3 | 31.9 ± 1.1 | 31.7 ± 1.5 | 0.254 |
| 在胎週数(週) ^{a,d} | 39.5 ± 1.0 | 39.3 ± 0.9 | 39.6 ± 1.1 | 0.072 |

^a *t*-検定; ^b カイ二乗検定; ^c Mann-Whitney の *U*-検定; ^d 平均 ± 標準偏差; ^e 中央値(最小値-最大値); ^f 男児 versus 女児.

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 2. PCBs 類異性体の濃度分布

| | 寄与率 (%) | 異性体濃度(pg/g lipid) | | | | | |
|------------|---------|-------------------|----------|------------|-----------|------------|-----------|
| | | 平均 | 最小値 | 25 パーセンタイル | 中央値 | 75 パーセンタイル | 最大値 |
| Total PCBs | 100.000 | 107,773.8 | 16,016.9 | 67,666.1 | 101,278.2 | 132,403.8 | 326,821.0 |
| TriCBs | 1.144 | 1,540.1 | 238.9 | 893.7 | 1,189.8 | 1,662.7 | 17,655.2 |
| TetraCBs | 6.134 | 6,796.8 | 1,692.9 | 4,610.2 | 6,278.5 | 8,130.6 | 24,037.5 |
| PentaCBs | 6.134 | 6,796.8 | 1,692.9 | 4,610.2 | 6,278.5 | 8,130.6 | 24,037.5 |
| HexaCBs | 47.262 | 49,210.1 | 6,120.2 | 30,847.8 | 45,523.0 | 60,376.2 | 159,214.1 |
| HeptaCBs | 30.743 | 34,316.8 | 3,658.7 | 19,423.4 | 29,622.5 | 43,184.4 | 167,252.1 |
| OctaCBs | 6.454 | 6,976.2 | 1,108.1 | 4,268.3 | 6,224.6 | 8,891.0 | 22,737.6 |
| NonaCBs | 0.876 | 968.5 | 203.6 | 608.9 | 881.3 | 1,206.1 | 3,463.2 |
| DecaCBs | 0.477 | 507.0 | 93.5 | 333.2 | 454.7 | 565.6 | 3,300.5 |

表 3. PCBs 類異性体と IGF-2, H19, および LINE-1 メチル化率との関連

| PCBs 類異性体 | IGF-2 ^a | H19 ^b | LINE-1 ^c |
|--------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | β (95% CI) | β (95% CI) | β (95% CI) |
| 全児 (n = 169) | | | |
| HeptaCBs | 0.003 (-0.018, 0.023) | 0.009 (-0.002, 0.021) | 0.005 (0.000, 0.010)* |
| DecaCBs | -0.007 (-0.032, 0.018) | 0.017 (0.003, 0.031)* | 0.003 (-0.003, 0.009) |
| Total PCBs | -0.002 (-0.025, 0.020) | 0.010 (-0.003, 0.023) | 0.004 (-0.002, 0.009) |
| 男児 (n = 77) | | | |
| HeptaCBs | -0.001 (-0.035, 0.034) | 0.007 (-0.013, 0.026) | 0.001 (-0.007, 0.009) |
| DecaCBs | -0.004 (-0.038, 0.030) | 0.005 (-0.014, 0.024) | 0.002 (-0.006, 0.010) |
| Total PCBs | 0.002 (-0.033, 0.038) | 0.004 (-0.016, 0.024) | 0.000 (-0.008, 0.009) |
| 女児 (n = 92) | | | |
| HeptaCBs | -0.003 (-0.030, 0.024) | 0.010 (-0.006, 0.025) | 0.008 (0.002, 0.015)* |
| DecaCBs | -0.009 (-0.046, 0.028) | 0.029 (0.010, 0.051)* | 0.005 (-0.005, 0.014) |
| Total PCBs | -0.011 (-0.041, 0.020) | 0.013 (-0.005, 0.031) | 0.007 (0.000, 0.014) |

^a 母の年齢, 身長, 妊娠前体重, 妊娠後期喫煙状況, 出産歴, 教育歴, 世帯収入, 妊娠中近海魚摂取状況, 妊娠中遠洋魚摂取状況, 過去の流産歴, 妊娠中アルコール摂取状況, 児の性別, DNA メチル化解析のバッチ差で調整した重回帰分析.

^b 母の年齢, 身長, 妊娠前体重, 妊娠後期喫煙状況, 出産歴, 教育歴, 世帯収入, 妊娠中近海魚摂取状況, 妊娠中遠洋魚摂取状況, 妊娠中練り物摂取状況, 妊娠中アルコール摂取状況, IGF-2 メチル化率, DNA メチル化解析のバッチ差で調整した重回帰分析.

^c 母の年齢, 身長, 妊娠前体重, 妊娠後期喫煙状況, 出産歴, 教育歴, 世帯収入, 妊娠中近海魚摂取状況, 妊娠中遠洋魚摂取状況, 妊娠中アルコール摂取状況, IGF-2 メチル化率, 児の性別, DNA メチル化解析のバッチ差で調整した重回帰分析.

β は PCB 類濃度が 10 倍増加するごとの IGF-2, H19, および LINE-1 メチル化率の Log₁₀ 変換値の変化量を表す.

* p < 0.05.

表 4. DecaCB 異性体 (2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-DecaCB [#209]) と H19 メチル化との量反応関係

| | n | 全児 (n = 169) | 男児 (n = 77) | 女児 (n = 92) |
|----------------------------------|----|------------------------|-----------------------|------------------------|
| | | β (95% CI) | β (95% CI) | β (95% CI) |
| 第一四分位(93.5-<333.2 pg/g lipid) | 42 | Reference | Reference | Reference |
| 第二四分位(333.2-<454.7 pg/g lipid) | 43 | 0.005 (-0.002, 0.012) | 0.006 (-0.005, 0.016) | 0.008 (-0.003, 0.018) |
| 第三四分位(454.7-<565.6 pg/g lipid) | 42 | 0.006 (-0.002, 0.013) | 0.012 (0.000, 0.022) | 0.001 (-0.009, 0.011) |
| 第四四分位(565.6-<3,305.5 pg/g lipid) | 42 | 0.012 (0.004, 0.020)** | 0.006 (-0.006, 0.019) | 0.017 (0.005, 0.028)** |
| | | p for trend = 0.007 | p for trend = 0.253 | p for trend = 0.040 |

母の年齢, 身長, 妊娠前体重, 妊娠後期喫煙状況, 出産歴, 教育歴, 世帯収入, 妊娠中近海魚摂取状況, 妊娠中遠洋魚摂取状況, 妊娠中練り物摂取状況, 妊娠中アルコール摂取状況, IGF-2 メチル化率, DNA メチル化解析のバッチ差で調整した重回帰分析.

β は PCB 類濃度が第一四分位と比較した H19 メチル化率の Log₁₀ 変換値の変化量を表す.

* p < 0.05.

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 5. HeptaCBs 異性体と LINE-1 メチル化との関連

| HeptaCBs 異性体 | 全児 (n = 169) β (95% CI) | 男児 (n = 77) β (95% CI) | 女児 (n = 92) β (95% CI) |
|---------------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 2,2',3,3',5,6,6'-HeptaCB (#179) | 0.002 (0.000, 0.004) | 0.002 (-0.001, 0.005) | 0.002 (-0.001, 0.005) |
| 2,2',3,3',5,5',6-HeptaCB (#178) | 0.004 (-0.001, 0.008) | 0.001 (-0.007, 0.008) | 0.007 (0.001, 0.013)* |
| 2,2',3,4,4',5,6-HeptaCB (#182) | 0.005 (0.000, 0.009)* | 0.002 (-0.005, 0.009) | 0.007 (0.001, 0.013)* |
| 2,2',3,4,4',5',6-HeptaCB (#183) | 0.004 (-0.001, 0.008) | 0.002 (-0.005, 0.009) | 0.006 (0.000, 0.012) |
| 2,2',3,4,4',5,6-HeptaCB (#181) | 0.001 (-0.002, 0.003) | 0.000 (-0.004, 0.003) | 0.002 (-0.001, 0.005) |
| 2,2',3,3',4',5,6-HeptaCB (#177) | 0.003 (-0.001, 0.007) | 0.001 (-0.005, 0.008) | 0.006 (0.000, 0.012) |
| 2,2',3,3',4,5,5'-HeptaCB (#172) | 0.001 (-0.002, 0.005) | 0.002 (-0.005, 0.010) | 0.001 (-0.002, 0.005) |
| 2,2',3,4,4',5,5'-HeptaCB (#180) | 0.005 (0.000, 0.010)* | 0.000 (-0.008, 0.009) | 0.009 (0.002, 0.015)** |
| 2,3,3',4,4',5',6-HeptaCB (#191) | 0.001 (-0.002, 0.003) | -0.001 (-0.006, 0.004) | 0.002 (-0.002, 0.005) |
| 2,2',3,3',4,4',5-HeptaCB (#170) | 0.005 (0.000, 0.010) | 0.000 (-0.008, 0.008) | 0.008 (0.002, 0.015)* |

母の年齢, 身長, 妊娠前体重, 妊娠後期喫煙状況, 出産歴, 教育歴, 世帯収入, 妊娠中近海魚摂取状況, 妊娠中遠洋魚摂取状況, 妊娠中アルコール摂取状況, IGF-2 メチル化率, 児の性別, DNA メチル化解析のバッチ差で調整した重回帰分析.

β は PCB 類濃度が 10 倍増加することの LINE-1 メチル化率の Log₁₀ 変換値の変化量を表す.

* p < 0.05.

表 6 . HeptaCBs 異性体と LINE-1 メチル化との量反応関係

| | n | 全児 (n = 169) β (95% CI) | 男児 (n = 77) β (95% CI) | 女児 (n = 92) β (95% CI) |
|--------------------------------------|----|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Total heptaCBs | | | | |
| 第一四分位(3,658.7-<19,423.4 pg/g lipid) | 42 | Reference | Reference | Reference |
| 第二四分位(19,423.4-<29,622.5 pg/g lipid) | 42 | -0.001 (-0.004, 0.002) | -0.004 (-0.007, 0.000) | 0.001 (-0.004, 0.004) |
| 第三四分位(29,622.5-<43,184.4 pg/g lipid) | 43 | 0.002 (-0.001, 0.005) | 0.001 (-0.007, 0.006) | 0.003 (-0.001, 0.006) |
| 第四四分位(43,184.4-167,252.1 pg/g lipid) | 42 | 0.003 (0.000, 0.016) | -0.001 (-0.006, 0.004) | 0.005 (0.001, 0.010)* |
| | | p for trend = 0.019 | p for trend = 0.705 | p for trend = 0.015 |
| 2,2',3,3',5,5',6-HeptaCB (#178) | | | | |
| 第一四分位(111.1-<907.8 pg/g lipid) | 42 | Reference | Reference | Reference |
| 第二四分位(907.8-<1,334.7 pg/g lipid) | 43 | 0.000 (-0.003, 0.002) | -0.002 (-0.006, 0.002) | 0.001 (-0.003, 0.005) |
| 第三四分位(1,334.7-<1,968.3 pg/g lipid) | 42 | 0.002 (-0.001, 0.005) | 0.002 (-0.003, 0.006) | 0.003 (-0.001, 0.006) |
| 第四四分位(1,968.3-7,130.4 pg/g lipid) | 42 | 0.002 (-0.001, 0.005) | -0.001 (-0.006, 0.004) | 0.005 (0.000, 0.009)* |
| | | p for trend = 0.065 | p for trend = 0.853 | p for trend = 0.031 |
| 2,2',3,4,4',5,6-HeptaCB (#182) | | | | |
| 第一四分位(741.3-<4,082.7 pg/g lipid) | 42 | Reference | Reference | Reference |
| 第二四分位(4,082.7-<6,321.4 pg/g lipid) | 43 | 0.000 (-0.003, 0.002) | -0.002 (-0.006, 0.002) | 0.002 (-0.003, 0.006) |
| 第三四分位(6,321.4-<8,726.6 pg/g lipid) | 42 | 0.002 (-0.001, 0.005) | 0.000 (-0.004, 0.005) | 0.003 (-0.001, 0.007) |
| 第四四分位(8,727.6-36,847.7 pg/g lipid) | 42 | 0.003 (0.000, 0.006) | 0.000 (-0.004, 0.005) | 0.005 (0.001, 0.010)* |
| | | p for trend = 0.028 | p for trend = 0.624 | p for trend = 0.022 |
| 2,2',3,4,4',5,5'-HeptaCB (#180) | | | | |
| 第一四分位(1,475.7-<8,652.3 pg/g lipid) | 42 | Reference | Reference | Reference |
| 第二四分位(8,652.3-<12,976.4 pg/g lipid) | 43 | -0.001 (-0.003, 0.002) | -0.002 (-0.006, 0.002) | 0.001 (-0.003, 0.004) |
| 第三四分位(12,976.4-<19,913.8 pg/g lipid) | 42 | 0.002 (-0.001, 0.005) | 0.002 (-0.003, 0.006) | 0.003 (-0.001, 0.007) |
| 第四四分位(19,913.8-75,056.0 pg/g lipid) | 42 | 0.003 (0.000, 0.007)* | 0.000 (-0.006, 0.005) | 0.006 (0.001, 0.011)* |
| | | p for trend = 0.015 | p for trend = 0.689 | p for trend = 0.005 |
| 2,2',3,3',4,4',5-HeptaCB (#170) | | | | |
| 第一四分位(615.2-<2,999.1 pg/g lipid) | 42 | Reference | Reference | Reference |
| 第二四分位(2,999.1-<4,491.8 pg/g lipid) | 42 | -0.002 (-0.004, 0.001) | -0.002 (-0.007, 0.002) | -0.001 (-0.005, 0.002) |
| 第三四分位(4,491.8-<6,462.8 pg/g lipid) | 43 | 0.002 (-0.001, 0.005) | 0.001 (-0.003, 0.006) | 0.003 (-0.002, 0.007) |
| 第四四分位(6,462.8-24,488.3 pg/g lipid) | 42 | 0.003 (-0.001, 0.006) | -0.001 (-0.006, 0.005) | 0.004 (0.000, 0.009) |
| | | p for trend = 0.031 | p for trend = 0.837 | p for trend = 0.018 |

母の年齢, 身長, 妊娠前体重, 妊娠後期喫煙状況, 出産歴, 教育歴, 世帯収入, 妊娠中近海魚摂取状況, 妊娠中遠洋魚摂取状況, 妊娠中アルコール摂取状況, IGF-2 メチル化率, 児の性別, DNA メチル化解析のバッチ差で調整した重回帰分析.

β は PCB 類濃度が第一四分位と比較した LINE-1 メチル化率の Log₁₀ 変換値の変化量を表す.

* p < 0.05.

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
An epigenome-wide study of cord blood DNA methylations in relation to prenatal perfluoroalkyl substance exposure

| | | | |
|-------|--------|---------------------|---------|
| 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 |
| 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 | 特任准教授 |
| 研究分担者 | 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 |
| 研究分担者 | 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 |
| 研究分担者 | 松浦 英幸 | 北海道大学大学院農学研究院 | 教授 |
| 研究分担者 | 篠原 信雄 | 北海道大学大学院医学研究院 | 教授 |

研究要旨

Background: Prenatal exposure to perfluoroalkyl substances (PFASs) influences fetal development and later in life.

Objective: To investigate cord blood DNA methylation changes associated with prenatal exposure to PFASs.

Methods: We assessed DNA methylation in cord blood samples from 190 mother-child pairs from the Sapporo cohort of the Hokkaido Study (discovery cohort) and from 37 mother-child pairs from the Taiwan Maternal and Infant Cohort Study (replication cohort) using the Illumina HumanMethylation 450 BeadChip. We examined the associations between methylation and PFAS levels in maternal serum using robust linear regression models and identified differentially methylated positions (DMPs) and regions (DMRs).

Results: We found four DMPs with a false discovery rate below 0.05 in the discovery cohort. Among the top 20 DMPs ranked by the lowest *P*-values for perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) exposure, four DMPs showed the same direction of effect and *P*-value < 0.05 in the replication assay: cg16242615 mapped to *ZBTB7A*, cg21876869 located in the intergenic region (IGR) of *USP2-AS1*, cg00173435 mapped to *TCPI1L2*, and cg18901140 located in the IGR of *NTN1*. For DMRs, we found a region associated with PFOA exposure with family-wise error rate < 0.1 located in *ZFP57*, showing the same direction of effect in the replication cohort. Among the top five DMRs ranked by the lowest *P*-values that were associated with exposure to PFOS and PFOA, in addition to *ZFP57*, DMRs in the *CYP2E1*, *SMAD3*, *SLC17A9*, *GFPT2*, *DUSP22*, and *TCERGIL* genes showed the same direction of effect in the replication cohort.

Conclusion: We suggest that prenatal exposure to PFASs may affect DNA methylation status at birth. Longitudinal studies are needed to examine whether methylation changes observed are associated with differential health outcomes.

研究協力者

湊屋 街子・アイツバマイ ゆふ・田村 菜穂美
（北海道大学環境健康科学研究教育センター）

A . 研究目的

Perfluoroalkyl substances (PFASs) are synthetic compounds ubiquitously distributed in the environment that can disrupt endocrine system functions (Lau et al. 2007). PFASs have long half-lives in human: 5.4 years for perfluorooctane sulfonate (PFOS) and 3.8 years for perfluorooctanoic acid (PFOA) (Olsen et al. 2007). Furthermore, PFASs can pass through the placental barrier (Inoue et al. 2004). Consequently, fetuses can be exposed to PFASs via maternal circulation, which suggests a possibility of PFAS negative effects on embryonic and fetal development. Epidemiological studies have shown that prenatal exposure to PFASs has been associated with various health outcomes, including birth size reduction, disruption of hormone balance, obesity, neurodevelopmental problems, and immune function impairment (Apelberg et al. 2007; Chen et al. 2013; Grandjean et al. 2012; Halldorsson et al. 2012; Kishi et al. 2017; Olsen et al. 2009). However, the mechanisms underlying these associations are not clear. One hypothesis is that prenatal exposure to PFASs might lead to health outcomes in the offspring through epigenetic alterations *in utero* because epigenetics (i.e., chemical modification of DNA) is an *intrinsic* biological mechanism that can be affected by *extrinsic* environmental factors in humans.

DNA methylation is an epigenetic modification that plays a role in embryonic

development and cellular differentiation (Breton et al. 2017). It occurs by the addition of a methyl group to a cytosine mostly at cytosine-guanine dinucleotide (CpG) loci and acts like a gene expression switch (Hackett and Surani 2013). Human epidemiological studies, including genome-wide approaches, have indicated that environmental factors such as diet, hormones, stress, drugs, or toxicants (e.g., lead, mercury, or tobacco smoke) during prenatal development influence DNA methylation patterns in children (Breton et al. 2017). Despite a significant impact of PFASs on health outcomes, there were few epidemiological studies of epigenetic effects of PFAS exposure *in utero*. Guerrero-Preston et al. (2010) observed that cord blood PFOA concentrations negatively correlated with cord serum global DNA methylation levels. We also reported that prenatal PFOA exposure was associated with reduced *IGF2* methylation in cord blood, which could predict infant ponderal index at birth (Kobayashi et al. 2017).

Genome-wide methylation analyses allow a hypothesis-free assessment of epigenetic alterations in relation to the environmental factors (Christensen and Marsit 2011). To our knowledge, only one study showed an association between maternal PFOA levels and genome-wide DNA methylation using 44 cord blood samples (Kingsley et al. 2017). The objective of the present study was to investigate cord blood DNA methylation changes in association with prenatal exposure to PFASs using the genome-wide approach and to determine CpG loci epigenetically vulnerable to prenatal PFAS exposure.

B . 研究方法

450K DNA methylation analysis. We assessed

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

DNA methylation in cord blood samples from 190 mother-child pairs from the Sapporo cohort of the Hokkaido Study (discovery cohort) and from 37 mother-child pairs from the Taiwan Maternal and Infant Cohort Study (replication cohort) using the Illumina HumanMethylation 450 BeadChip. After quality control (Aryee et al. 2014), signal intensities were normalized using functional normalization (Fortin et al. 2014). We applied the ComBat method to adjust methylation data for sample plate to reduce a potential bias due to batch effects (Leek et al. 2012). Beta-values were calculated from signal intensities and used for the subsequent data analyses by using the following equation (Bibikova et al. 2011): $\beta = \text{methylated} / (\text{methylated} + \text{unmethylated} + 100)$.

Exposure assessment. PFOS and PFOA levels were measured in maternal serum by using column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) as previously described (Lien et al. 2011; Okada et al. 2012; Washino et al. 2009).

Data analysis. Cord blood cell proportion was estimated by the method implemented in the R/Bioconductor package *minfi* (Bakulski et al. 2016). Using *limma* package in R, robust linear regression analyses (Fox and Weisberg 2011) and empirical Bayesian methods (Smyth 2004) were applied to determine the associations of β -value at each CpG site with either PFOS or PFOA \log_{10} -transformed concentration, adjusted for maternal age, parity, maternal educational levels, maternal blood sampling period, maternal pre-pregnancy BMI, maternal smoking during pregnancy, gestational age, infant sex, and cord blood cell estimates. Due to the small sample size of the replication

cohort, we used only maternal age, infant sex, and cord blood cell estimates as covariates. For multiple comparisons, *P*-values were adjusted by the false discovery rate (FDR) to obtain *q*-values. Successful replication for differentially methylated positions (DMPs) was defined as having the same direction of effect with those observed in the discovery cohort and *P*-value < 0.05 . We also identified differentially methylated regions (DMRs) associated with PFAS exposures using *bumphunter* function in R/Bioconductor (Jaffe et al, 2012) and the same models as those in the linear regression analyses. *P*-values were adjusted by the family-wise error rate (FWER). Statistical analyses were performed using *minfi*, *sva*, and *limma* packages in R ver. 3.3.2 and Bioconductor ver. 3.3.

Gene ontology analysis. We identified the enrichment of genes corresponding to the DMPs with *P*-value < 0.001 in Kyoto Encyclopedia Genes and Genomes (KEGG) pathways (Kanehisa et al. 2002) using *missMethyl* package in R/Bioconductor (Phipson et al. 2016)

（倫理面への配慮）

The study was conducted with the informed consent of all subjects in the written form. The institutional Ethical Board for human gene and genome studies at the Hokkaido University Graduate School of Medicine and the Hokkaido University Center for Environmental and Health Science approved the study protocol. The Human Ethics Committee of the National Health Research Committee of Taiwan approved the study of the replication cohort.

C . 研究結果

Epigenome-wide association study in the discovery cohort. Maternal and infant characteristics and their relationship to PFOS and PFOA concentrations are described in Table 1. Median (25th to 75th percentiles) of PFOS and PFOA concentrations in maternal blood were 5.2 ng/mL (3.8 to 7.1) and 1.4 ng/mL (0.9 to 2.1), respectively. The average (\pm SD) age of the mothers was 29.7 ± 4.8 years. Of the 190 newborns, 84 (44.2%) were male. We observed statistically significant differences in both PFOS and PFOA levels by parity, maternal blood sampling periods, and smoking during pregnancy. Additionally, PFOA level was significantly higher among mothers with male infants, and PFOS levels were marginally affected by the educational level.

Figure 1 shows the results of genome-wide analyses of the association between cord blood DNA methylation and prenatal PFOS (Figure 1A) or PFOA (Figure 1B) exposure. The volcano plots (Figure 1) showed imbalance in positive versus negative methylation changes, suggesting global methylation shifts due to PFAS exposure.

Differentially methylated positions (DMPs). We found epigenome-wide significant associations (FDR q -value < 0.05) between PFOS exposure and DNA methylation for two CpGs: one located in the intergenic region (IGR) of *CXADRP3* (cg02044327), and another mapped to *SNAPIN* (cg25705526). In addition, significant associations between PFOA exposure and DNA methylation for another two CpGs were found: one located in the IGR of *AC002480.3* (cg11260715), and another mapped to *GPR126* (cg04461802).

Top 20 DMPs ranked by the lowest P -value for the association with exposure to PFOS and PFOA are shown in Table 2. Among them, four DMPs met the criteria for replication that showed the same direction of effect and P -value < 0.05 in the replication assay: cg16242615 mapped to *ZBTB7A* for PFOS; cg21876869 located in the IGR of *USP2-AS1*, cg00173435 mapped to *TCP11L2*, and cg18901140 located in the IGR of *NTN1* for PFOA.

Differentially methylated regions (DMRs). Next, we assessed DMRs associated with prenatal PFAS exposures using *bumphunter* function (Jaffe et al, 2012). We found one region associated with PFOA exposure with FWER < 0.1 that was located in the IGR of *ZFP57* and included 21 CpGs. We showed top five regions for PFOS and PFOA exposures ranked by the smallest P -value (Table 3). We also compared the direction of methylation changes in the discovery and replication cohorts (Table 4), in which we averaged methylation levels of each site because those were highly correlated (data not shown). A DMR in *CYP1E2* was observed for both PFOS and PFOA exposures. Eight of the ten regions showed the same direction of methylation changes in the replication cohort.

Gene ontology analysis. Lastly, we tested for the enrichment of KEGG pathways (Kanehisa et al. 2002) among the genes with annotated CpGs showing P -value < 0.001 . Among the 323 pathways analyzed, 31 and 26 KEGG pathways were significantly enriched after Bonferroni correction among the genes affected by for PFOS and PFOA exposures, respectively. Gene Ontology analyses of the data obtained using 450K chip are known to be

biased for cancer-related genes (Haper et al. 2013). Human disease pathways, including cancer, were therefore excluded from the list of the pathways affected by PFAS exposures (Figure 2). Enrichments in the pathways involved in signal transduction and signal molecules and interactions were observed among the genes affected by both PFOS and PFOA exposures

D . 考察

Few studies have focused on the epigenetic effects of prenatal exposure to PFASs. In this study, median concentrations of PFOS and PFOA were 5.2 and 1.4 ng/mL, respectively, which were lower than those reported in the United States (PFOS: 8.2, PFOA: 2.9 ng/mL) (Stein et al. 2012), Canada (PFOS: 16.6, PFOA: 2.1 ng/mL) (Monroy et al. 2008), Denmark (PFOS: 21.5, PFOA: 3.7 ng/mL) (Huang et al. 2012), Norway (PFOS: 13, PFOA: 2.2 ng/mL) (Starling et al. 2014), South Korea (PFOS: 9.3, PFOA: 2.6 ng/mL) (Lee et al. 2013), and China (PFOS: 6.7, PFOA: 4 ng/mL) (Jiang et al. 2014). Despite the low levels of exposure, we showed suggestive evidence for the presence of CpGs epigenetically vulnerable to PFAS exposure *in utero*.

We observed potential global methylation shifts resulting from prenatal PFAS exposure (see volcano plots in Figure 1): up-methylation for PFOS exposure and down-methylation for PFOA exposure. This was consistent with previous reports for prenatal PFOA exposure (Guerrero-Preston et al. 2010; Kingsley et al. 2017). Two studies in adult populations have suggested a possibility of PFAS exposure effect on global methylation (Leter et al. 2014;

Watkins et al. 2014).

We then focused on the changes at specific regions and found four DMPs with $FDR < 0.05$: cg02044327 (*CXADRP3*), cg25705526 (*SNAPIN*), cg11260715 (*AC002480.3*), and cg04461802 (*GPR126*) (Figure 1), although these DMPs did not meet the criteria for replication (Table 2). Among 20 DMPs with lowest *P*-values for PFOS and PFOA exposures (Table 2), four DMPs were replicated: cg16242615 (*ZBTB7A*), cg21876869 (*USP2-ASI*), cg00173435 (*TCP11L2*), and cg18901140 (*NTN1*). *ZBTB7A* (Zinc finger and BTB domain containing 7A) encodes a proto-oncogenic transcription factor that interacts directly with MBD3 (methyl-CpG-binding domain protein 3) in the nucleus (Choi et al. 2013). *TCP11L2* (T-Complex 11 Like 2) codes for the TCP11 like protein. TCP11 plays a role in the process of sperm capacitation and acrosome reactions. *USP2-ASI* (USP2 Antisense RNA 1) belongs to the non-coding RNAs. Netrin 1 (NTN1) is a secreted laminin-like protein identified as an axon guidance molecule.

Next, we explored DMRs that are potentially more informative than individual CpG sites (Solomon et al. 2017). We found one down-methylated region with $FWER < 0.1$, which was located in the IGR of *ZFP57* (*ZFP57* Zinc Finger Protein) (Table 4). *ZFP57* is necessary for maintaining repressive epigenetic modifications at imprinting control regions (Riso et al. 2016). We observed down-methylation of this region in the replication cohort (Table 4). In addition to a DMR in *ZFP57*, we reported six DMRs in *CYP2E1*, *SMAD3*, *SLC17A9*, *GFPT2*, *DUSP22*, and *TCERGIL* that showed the same direction of

methylation change in the replication cohort (Table 4). Among them, methylation of *SMAD3* (SMAD Family Member 3) at birth has been previously linked to asthma in children of asthmatic mothers (DeVries et al. 2016). Cord blood DNA methylation of *GFPT2* (Glutamine-Fructose-6-Phosphate Transaminase 2) was associated with adiposity in childhood (Kresovich et al. 2017). Furthermore, methylations of *CYP2E1* (Cytochrome P450 Family 2 Subfamily E Member 1), *DUSP2* (Dual Specificity Phosphatase 2), and *TCERGIL* (transcription elongation regulator 1-like) were associated with rheumatoid arthritis (Mok et al. 2017) and colon tumors (Bae et al. 2014). Additionally, PFOS inhibited the oxidation reaction of *CYP2E1 in vitro* (Narimatu et al. 2011).

Gene ontology analysis showed that differentially methylated genes were enriched in multiple KEGG pathways (Figure 2), including signal transduction, signaling molecules and interaction, endocrine system, and immune system. However, in this assay we used genes with annotated CpGs with *P*-value < 0.001, i.e., not achieving epigenome-wide significance. It remains to be seen whether identified DNA methylation changes are functionally relevant.

Methylation changes derived from the exposures to PFOS and PFOA were different. We have reported that PFOS and PFOA differentially affected health outcomes related to these pathways. Prenatal exposure to PFOS, but not PFOA, was negatively associated with the levels of maternal fatty acids (Kishi et al. 2015), possibly disrupted both maternal and infant thyroid hormone levels (Kato et al. 2016), and showed an inverse relationship with

cord blood levels of glucocorticoids (Goudarzi et al. 2017). Dehydroepiandrosterone level was positively associated with the exposure to PFOS and negatively associated with the exposure to PFOA (Goudarzi et al. 2017). PFOS and PFOA showed both positive and inverse associations with the levels of several reproductive and steroid hormones (Ito et al. 2016). The observed different potencies and modes of action may partly account for the distinct patterns of methylation changes. The differences in PFOS and PFOA concentrations and/or placental permeability could be an alternative explanation.

E . 結論

In this epigenome-wide study, we suggested that even relatively low levels of prenatal exposure to PFASs impacted DNA methylation status at birth. Further study is needed to examine the persistence of DNA methylation changes due to prenatal exposure throughout life, and the associations of these changes with health outcomes causally linked to PFAS exposure in longitudinal studies.

F . 研究発表

1 . 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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

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

International. 115 21-28, 2018.

2 . 学会発表

- 1) Kobayashi, S., R. Miura, C. Miyashita, A. Araki, M. Ishizuka, H. Nakazawa, Y. M. Ito, T. Kubota, R. Kishi, Epigenome-wide Pathway Analyses of Prenatal Perfluoroalkyl Acids Exposure on Cord Blood DNA Methylation: The Hokkaido Study, ISEE-ISES AC2016, Sapporo, Hokkaido, Japan, (2016.6.26-29)
- 2) Kobayashi, S., R. Miura, C. Miyashita, A. Araki, M. Ishizuka, H. Nakazawa, Y. Ito, T. Kubota, R. Kishi, Epigenome-wide analyses of prenatal perfluoroalkyl acids exposure on cord blood DNA methylation: the Hokkaido study, ISEE2016: 28th Annual Conference International Society for Environmental Epidemiology, (2016.9.1-4)

G . 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

参考文献

1. Lau C, Anitole K, Hodes C, Lai D, Pfahles-Hutchens A, Seed J. 2007. Perfluoroalkyl acids: A review of monitoring and toxicological findings. *Toxicological Sciences* 99:366-394.
2. Olsen GW, Burriss JM, Ehresman DJ, Froehlich JW, Seacat AM, Butenhoff JL, et al. 2007. Half-life of serum elimination of perfluorooctanesulfonate, perfluorohexanesulfonate, and perfluorooctanoate in retired fluorochemical production workers. *Environmental Health Perspectives* 115:1298-1305.
3. Inoue K, Okada F, Ito R, Kato S, Sasaki S, Nakajima S, et al. 2004. Perfluorooctane sulfonate (pfos) and related perfluorinated compounds in human maternal and cord blood samples: Assessment of pfos exposure in a susceptible population during pregnancy. *Environmental Health Perspectives* 112:1204-1207.
4. Apelberg BJ, Witter FR, Herbstman JB, Calafat AM, Halden RU, Needham LL, et al. 2007. Cord serum concentrations of perfluorooctane sulfonate (pfos) and perfluorooctanoate (pfoa) in relation to weight and size at birth. *Environmental Health Perspectives* 115:1670-1676.
5. Chen YA, Lemire M, Choufani S, Butcher DT, Grafodatskaya D, Zanke BW, et al. 2013. Discovery of cross-reactive probes and polymorphic cpgs in the illumina Infinium humanmethylation450 microarray. *Epigenetics* 8:203-209.
6. Grandjean P, Andersen EW, Budtz-Jorgensen E, Nielsen F, Molbak K, Weihe P, et al. 2012. Serum vaccine antibody concentrations in children exposed to perfluorinated compounds. *Jama* 307:391-397.
7. Halldorsson TI, Rytter D, Haug LS, Bech BH, Danielsen I, Becher G, et al. 2012. Prenatal exposure to perfluorooctanoate and risk of overweight at 20 years of age: A prospective cohort study. *Environmental Health Perspectives* 120:668-673
8. Kishi R, Araki A, Minatoya M, Hanaoka T, Miyashita C, Itoh S, et al. 2017. The Hokkaido birth cohort study on environment and children's health: Cohort profile—updated 2017. *Environmental Health and Preventive Medicine* 22.
9. Olsen GW, Butenhoff JL, Zobel LR. 2009.

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

- Perfluoroalkyl chemicals and human fetal development: An epidemiologic review with clinical and toxicological perspectives. *Reproductive toxicology* 27:212-230.
10. Breton CV, Marsit CJ, Faustman E, Nadeau K, Goodrich JM, Dolinoy DC, et al. 2017. Small-magnitude effect sizes in epigenetic end points are important in children's environmental health studies: The children's environmental health and disease prevention research center's epigenetics working group. *Environmental Health Perspectives* 125:511-526.
11. Hackett JA, Surani MA. 2013. DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 368:20110328.
12. 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.
13. Kobayashi S, Azumi K, Goudarzi H, Araki A, Miyashita C, Kobayashi S, et al. 2017. Effects of prenatal perfluoroalkyl acid exposure on cord blood igf2/h19 methylation and ponderal index: The Hokkaido study. *Journal of Exposure Science & Environmental epidemiology* 27:251-259.
14. Christensen BC, Marsit CJ. 2011. Epigenomics in environmental health. *Frontiers in Genetics* 2:84.
15. Kingsley SL, Kelsey KT, Butler R, Chen A, Eliot MN, Romano ME, et al. 2017. Maternal serum pfoa concentration and DNA methylation in cord blood: A pilot study. *Environmental Research* 158:174-178.
16. Aryee MJ, Jaffe AE, Corrada-Bravo H, Ladd-Acosta C, Feinberg AP, Hansen KD, et al. 2014. Minfi: A flexible and comprehensive bioconductor package for the analysis of infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics (Oxford, England)* 30:1363-1369.
17. Fortin JP, Labbe A, Lemire M, Zanke BW, Hudson TJ, Fertig EJ, et al. 2014. Functional normalization of 450k methylation array data improves replication in large cancer studies. *Genome Biology* 15:503.
18. Leek JT, Johnson WE, Parker HS, Jaffe AE, Storey JD. 2012. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics* 28:882-883.
19. Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, et al. 2011. High density DNA methylation array with single cpG site resolution. *Genomics* 98:288-295.
20. Lien GW, Wen TW, Hsieh WS, Wu KY, Chen CY, Chen PC. 2011. Analysis of perfluorinated chemicals in umbilical cord blood by ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 879:641-646.
21. Okada E, Sasaki S, Saijo Y, Washino N, Miyashita C, Kobayashi S, et al. 2012. Prenatal exposure to perfluorinated chemicals and relationship with allergies and infectious diseases in infants. *Environmental Research* 112:118-125.

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

22. Washino N, Saijo Y, Sasaki S, Kato S, Ban S, Konishi K, et al. 2009. Correlations between prenatal exposure to perfluorinated chemicals and reduced fetal growth. *Environmental Health Perspectives* 117:660-667.
23. Bakulski KM, Feinberg JI, Andrews SV, Yang J, Brown S, S LM, et al. 2016. DNA methylation of cord blood cell types: Applications for mixed cell birth studies. *Epigenetics* 11:354-362.
24. Fox J, Weisberg S. 2011. *Robust regression in r*. Thousand Oaks, CA.:Sage.
25. Smyth GK. 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* 3:Article3.
26. Jaffe AE, Murakami P, Lee H, Leek JT, Fallin MD, Feinberg AP, Irizarry RA, 2012. Bump hunting to identify differentially methylated regions in epigenetic epidemiology studies. *International journal of epidemiology* 41:200-209.
27. Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Nakaya A. 2002. The kegg databases at genomnet. *Nucleic Acids Research* 30:42-46.
28. Phipson B, Maksimovic J, Oshlack A. 2016. Missmethyl: An r package for analyzing data from illumina's humanmethylation450 platform. *Bioinformatics* 32:286-288.
29. Harper KN, Peters BA, Gamble MV. 2013. Batch effects and pathway analysis: two potential perils in cancer studies involving DNA methylation array analysis. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 22:1052-60.
30. Stein CR, Wolff MS, Calafat AM, Kato K, Engel SM. 2012. Comparison of polyfluoroalkyl compound concentrations in maternal serum and amniotic fluid: A pilot study. *Reproductive Toxicology* 34:312-316.
31. Monroy R, Morrison K, Teo K, Atkinson S, Kubwabo C, Stewart B, et al. 2008. Serum levels of perfluoroalkyl compounds in human maternal and umbilical cord blood samples. *Environmental Research* 108:56-62.
32. Huang PC, Su PH, Chen HY, Huang HB, Tsai JL, Huang HI, et al. 2012. Childhood blood lead levels and intellectual development after ban of leaded gasoline in taiwan: A 9-year prospective study. *Environment International* 40:88-96.
33. Starling AP, Engel SM, Whitworth KW, Richardson DB, Stuebe AM, Daniels JL, et al. 2014. Perfluoroalkyl substances and lipid concentrations in plasma during pregnancy among women in the norwegian mother and child cohort study. *Environment International* 62:104-112.
34. Lee YJ, Kim MK, Bae J, Yang JH. 2013. Concentrations of perfluoroalkyl compounds in maternal and umbilical cord sera and birth outcomes in korea. *Chemosphere* 90:1603-1609.
35. Jiang W, Zhang Y, Zhu L, Deng J. 2014. Serum levels of perfluoroalkyl acids (pfaas) with isomer analysis and their associations with medical parameters in chinese pregnant women. *Environment International* 64:40-47.
36. Leter G, Consales C, Eleuteri P, Uccelli R,

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

- Specht IO, Toft G, et al. 2014. Exposure to perfluoroalkyl substances and sperm DNA global methylation in Arctic and European populations. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 55:591-600.
37. Watkins DJ, Wellenius GA, Butler RA, Bartell SM, Fletcher T, Kelsey KT. 2014. Associations between serum perfluoroalkyl acids and LINE-1 DNA methylation. *Environment International* 63:71-76.
38. Choi WI, Jeon BN, Yoon JH, Koh DI, Kim MH, Yu MY, et al. 2013. The proto-oncoprotein FBI-1 interacts with MBD3 to recruit the Mi-2/NuRD-HDAC complex and BCoR and to silence p21WAF/CDKN1A by DNA methylation. *Nucleic Acids Research* 41:6403-6420.
39. Solomon O, Yousefi P, Huen K, Gunier RB, Escudero-Fung M, et al 2017. Prenatal phthalate exposure and altered patterns of DNA methylation in cord blood. *Environmental Molecular Mutagenesis* 58:398-410.
40. Riso V, Cammisa M, Kukreja H, Anvar Z, Verde G, Sparago A, et al. 2016. ZFP57 maintains the parent-of-origin-specific expression of the imprinted genes and differentially affects non-imprinted targets in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Research*. 44:8165-78.
41. DeVries A, Wlasiuk G, Miller SJ, Bosco A, Stern DA, Lohman IC, et al. 2016. Epigenome-wide analysis links SMAD3 methylation at birth to asthma in children of asthmatic mothers. *Journal of Allergy Clinical Immunology* 140:534-542.
42. Kresovich JK, Zheng Y, Cardenas A, Joyce BT, Rifas-Shiman SL, Oken E, et al. 2017. Cord blood DNA methylation and adiposity measures in early and mid-childhood. *Clinical Epigenetics* 9:86.
43. Mok A, Rhead B, Hologue C, Shao X, Quach HL, Quach D et al. 2017. Hypomethylation of CYP2E1 and DUSP22 promoters associated with disease activity and erosive disease among rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheumatology* (in press) doi:10.1002/art.40408.
44. Bae JH, Park J, Yang KM, Kim TO, Yi JM; IBD study group of Korean Association for Study of Intestinal Diseases (KASID). *Molecular Medicine Reports* 9:725-9.
45. Narimatsu S, Nakanishi R, Hanioka N, Saito K, Kataoka H. 2011 Characterization of inhibitory effects of perfluorooctane sulfonate on human hepatic cytochrome P450 isoenzymes: focusing on CYP2A6. *Chemico-Biological Interactions* 194:120-126.
46. Kishi R, Nakajima T, Goudarzi H, Kobayashi S, Sasaki S, Okada E, et al, 2015. The Association of Prenatal Exposure to Perfluorinated Chemicals with Maternal Essential and Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids during Pregnancy and the Birth Weight of Their Offspring: The Hokkaido Study. *Environmental Health Perspectives* 123:1038-45.
47. Kato S, Itoh S, Yuasa M, Baba T, Miyashita C, Sasaki S, et al. 2016. Association of perfluorinated chemical exposure in utero with maternal and infant thyroid hormone levels in the sapporo cohort of Hokkaido study on the environment and children's health. *Environmental Health and Perspective*

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

Medicine 21:334-344.

48. Goudarzi H, Araki A, Itoh S, Sasaki S, Miyashita C, Mitsui T, et al. 2017. The association of prenatal exposure to perfluorinated chemicals with glucocorticoid and androgenic hormones in cord blood samples: The Hokkaido study. *Environmental Health Perspectives* 125:111-118.
49. Itoh S, Araki A, Mitsui T, Miyashita C, Goudarzi H, Sasaki S, et al. 2016. Association of perfluoroalkyl substances exposure in utero with reproductive hormone levels in cord blood in the Hokkaido study on environment and children's health. *Environment international* 94:51-59.

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 Characteristics of study population of the discovery cohort ($n=190$).

| | n | Mean \pm SD (%) | PFOS (ng/mL) | | PFOA (ng/mL) | |
|---|-----|----------------------|---|--------|---|--------|
| | | | Median (25th, 75th) or correlation ^a | P | Median (25th, 75th) or correlation ^a | P |
| Concentration in maternal blood | | | | | | |
| | 190 | | 5.2 (3.8, 7.1) | | 1.4 (0.9, 2.1) | |
| Maternal characteristics | | | | | | |
| Maternal age (year) ^a | 190 | 29.7 \pm 4.8 | $\rho = -0.087$ | 0.233 | $\rho = -0.041$ | 0.579 |
| Pre-pregnancy BMI (kg/m ²) ^a | 190 | 21.2 \pm 3.1 | $\rho = -0.018$ | 0.803 | $\rho = -0.056$ | 0.444 |
| Parity (times) ^b | | | | | | |
| 0 | 104 | 54.7 | 5.7 (4.2, 8.0) | 0.002 | 1.6 (1.2, 2.4) | <0.001 |
| ≥ 1 | 86 | 45.2 | 4.7 (3.1, 6.2) | | 1.0 (0.7, 1.5) | |
| Blood sampling period ^c | | | | | | |
| < 28 weeks | 74 | 38.9 | 5.8 (4.6, 7.5) | <0.001 | 1.7 (1.2, 2.3) | 0.004 |
| 28–36 weeks | 47 | 24.7 | 5.6 (4.0, 8.5) | | 1.3 (0.8, 1.8) | |
| 36 weeks | 69 | 36.3 | 4.6 (2.8, 5.7) | | 1.2 (0.8, 1.8) | |
| Educational level (year) ^b | | | | | | |
| ≤ 12 | 89 | 46.8 | 5.2 (4.1, 7.0) | 0.966 | 1.3 (0.8, 1.8) | 0.072 |
| > 12 | 101 | 53.2 | 5.3 (3.6, 7.4) | | 1.5 (1.0, 2.3) | |
| Annual household income (million yen) ^c | | | | | | |
| < 3 | 38 | 20 | 5.4 (3.9, 8.0) | 0.878 | 1.4 (0.8, 2.2) | 0.541 |
| 3–5 | 95 | 50 | 5.1 (3.5, 7.0) | | 1.4 (0.9, 1.8) | |
| 5–7 | 40 | 21.1 | 5.4 (4.2, 6.9) | | 1.4 (0.9, 2.1) | |
| > 7 | 15 | 7.9 | 5.1 (3.0, 8.8) | | 2.3 (0.8, 2.4) | |
| missing | 2 | 1.1 | 7.8 (4.5, 11.1) | | | |
| Smoking during pregnancy ^b | | | | | | |
| No | 157 | 82.6 | 5.3 (4.0, 7.3) | 0.039 | 1.4 (0.9, 2.2) | 0.011 |
| Yes | 33 | 17.4 | 4.3 (2.5, 6.8) | | 1.0 (0.7, 1.6) | |
| Alcohol consumption during pregnancy ^b | | | | | | |
| No | 130 | 68.4 | 5.2 (3.9, 7.2) | 0.954 | 1.4 (0.9, 2.1) | 0.821 |
| Yes | 60 | 31.6 | 5.3 (3.7, 7.1) | | 1.4 (0.9, 2.2) | |
| Infant characteristics | | | | | | |
| Sex ^b | | | | | | |
| Male | 84 | 44.2 | 5.1 (3.3, 7.0) | 0.117 | 1.6 (1.0, 2.4) | 0.025 |
| Female | 106 | 55.8 | 5.4 (4.1, 7.5) | | 1.3 (0.8, 1.9) | |
| Gestational age (week) ^a | 190 | 39.9 \pm 1.0 | $\rho = 0.031$ | 0.675 | $\rho = 0.093$ | 0.203 |
| Birth weight (g) ^a | 190 | 3131 \pm 330 | $\rho = -0.122$ | 0.095 | $\rho = -0.118$ | 0.104 |

^aSpearman's correlation test (ρ), ^bMann-Whitney U-test, ^cKruskal-Wallis test

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

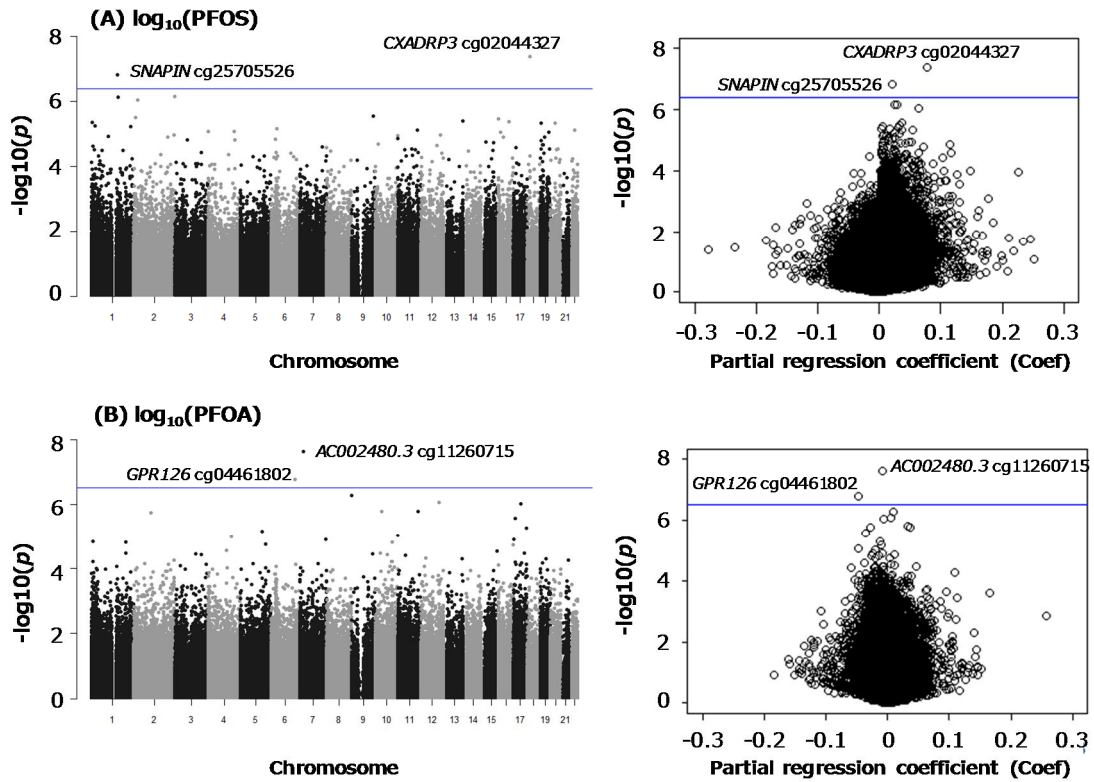


Figure 1. Manhattan (left panels) and volcano plots (right panels) of the genome-wide associations of DNA methylation with prenatal exposure to PFOS (A) or PFOA (B) in the discovery cohort.

Left panels: Manhattan plots of P -value for the associations between prenatal PFAS exposures and DNA methylation across chromosomes. Right panels: Volcano plots showing P -values versus the magnitude of effect (Coef) on DNA methylation associated with prenatal PFAS exposures. Horizontal lines represent the significance threshold of a FDR < 0.05.

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 2. Top 20 CpGs ranked by the smallest *P*-value from the epigenome-wide analysis of the association between prenatal PFAS exposure and cord blood DNA methylation.

| Probe ID | Gene | Chr | Feature ^a | Discovery cohort | | Replication cohort | | Replicated ^d |
|--------------------------|-------------------|-----|----------------------|-------------------|----------------------------|--------------------|---------|-------------------------|
| | | | | Coef ^b | P-Value | Coef ^b | P-Value | |
| log ₁₀ (PFOS) | | | | | | | | |
| cg25705526 | <i>SNAPIN</i> | 1 | TSS200 | 0.020 | 1.48E-07 ^{FDR, d} | -0.006 | 0.425 | |
| cg04928693 | <i>MTX1</i> | 1 | TSS1500 | 0.024 | 7.19E-07 | -0.003 | 0.737 | |
| cg18155888 ^c | <i>MORN1</i> | 1 | Body | 0.017 | 4.32E-06 | 0.023 | 0.277 | |
| cg17086204 | <i>PLA2G5</i> | 1 | 3'UTR | 0.025 | 5.56E-06 | 0.000 | 0.955 | |
| cg10504365 | <i>TRIM67</i> | 1 | TSS1500 | 0.032 | 5.84E-06 | -0.022 | 0.003 | |
| cg01889773 ^c | <i>GPC1</i> | 2 | Body | 0.030 | 6.92E-07 | 0.008 | 0.538 | |
| cg16845265 | <i>KLHL29</i> | 2 | IGR | 0.065 | 8.73E-07 | -0.019 | 0.528 | |
| cg25808157 | <i>GREB1</i> | 2 | Body | 0.034 | 3.13E-06 | -0.002 | 0.926 | |
| cg21969395 | <i>LRAT</i> | 4 | TSS200 | 0.016 | 8.23E-06 | -0.001 | 0.870 | |
| cg22953687 | <i>ZFYVE28</i> | 4 | Body | 0.025 | 8.25E-06 | -0.018 | 0.117 | |
| cg12215478 | <i>SRPK1</i> | 6 | Body | 0.008 | 6.93E-06 | -0.002 | 0.421 | |
| cg14369981 ^c | <i>LMX1B</i> | 9 | IGR | 0.037 | 2.81E-06 | 0.007 | 0.705 | |
| cg17918227 ^c | <i>CADM1</i> | 11 | Body | 0.012 | 7.56E-06 | 0.005 | 0.336 | |
| cg14120075 ^c | <i>TFDP1</i> | 13 | Body | 0.031 | 3.94E-06 | 0.008 | 0.626 | |
| cg03097541 ^c | <i>ZNF213</i> | 16 | 5'UTR | 0.006 | 3.38E-06 | 0.002 | 0.131 | |
| cg01718742 | <i>CDH8</i> | 16 | TSS200 | 0.003 | 4.06E-06 | -0.001 | 0.651 | |
| cg02044327 ^c | <i>CXADRP3</i> | 18 | IGR | 0.078 | 4.06E-08 ^{FDR, d} | 0.036 | 0.142 | |
| cg16242615 ^c | <i>ZBTB7A</i> | 19 | 5'UTR | 0.037 | 4.54E-06 | 0.035 | 0.028 | ✓ |
| cg15815607 | <i>HM13</i> | 20 | Body | 0.053 | 4.57E-06 | -0.008 | 0.645 | |
| cg12700033 | <i>YWHAH</i> | 22 | TSS200 | 0.006 | 7.41E-06 | 0.000 | 0.958 | |
| log ₁₀ (PFOA) | | | | | | | | |
| cg23049737 | <i>RERE</i> | 1 | 3'UTR | 0.011 | 1.43E-05 | -0.009 | 0.056 | |
| cg00567854 ^c | <i>BTG2</i> | 1 | TSS1500 | -0.025 | 1.48E-05 | -0.009 | 0.214 | |
| cg10403518 | <i>SLC9A4</i> | 2 | Body | 0.038 | 1.75E-06 | -0.014 | 0.083 | |
| cg22325921 | <i>DUX2</i> | 4 | IGR | -0.020 | 9.90E-06 | 0.002 | 0.719 | |
| cg05158146 ^c | <i>MIR4460</i> | 5 | IGR | -0.010 | 6.75E-06 | 0.000 | 0.931 | |
| cg23917868 ^c | <i>MIR145</i> | 5 | TSS200 | -0.020 | 1.76E-05 | -0.006 | 0.289 | |
| cg04461802 | <i>GPR126</i> | 6 | 5'UTR | -0.046 | 1.65E-07 ^{FDR, d} | 0.008 | 0.456 | |
| cg11260715 ^c | <i>AC002480.3</i> | 7 | IGR | -0.008 | 2.32E-08 ^{FDR, d} | -0.002 | 0.247 | |
| cg12105980 ^c | <i>EN2</i> | 7 | IGR | -0.023 | 1.24E-05 | -0.008 | 0.220 | |
| cg13951074 | <i>DMRT2</i> | 9 | IGR | 0.010 | 5.09E-07 | 0.000 | 0.888 | |
| cg07661167 ^c | <i>ZNF33BP1</i> | 10 | IGR | 0.032 | 1.62E-06 | 0.015 | 0.065 | |
| cg01486146 | <i>PAX2</i> | 10 | IGR | -0.014 | 1.50E-05 | 0.005 | 0.088 | |
| cg21876869 ^c | <i>USP2-AS1</i> | 11 | IGR | -0.027 | 1.64E-06 | -0.024 | 0.000 | ✓ |
| cg17114584 | <i>IRF7</i> | 11 | Body | -0.047 | 9.01E-06 | 0.001 | 0.928 | |
| cg00173435 ^c | <i>TCP11L2</i> | 12 | TSS200 | 0.006 | 8.52E-07 | 0.003 | 0.001 | ✓ |
| cg16475925 ^c | <i>SPG7</i> | 16 | TSS200 | 0.003 | 1.82E-05 | 0.002 | 0.095 | |
| cg00897875 | <i>MAP3K14</i> | 17 | 5'UTR | -0.006 | 9.16E-07 | 0.004 | 0.077 | |
| cg18901140 ^c | <i>NTN1</i> | 17 | IGR | -0.036 | 2.66E-06 | -0.029 | 0.000 | ✓ |
| cg01426818 ^c | <i>CBX4</i> | 17 | IGR | -0.012 | 5.20E-06 | -0.002 | 0.720 | |
| cg18002862 ^c | <i>RAP1GAP2</i> | 17 | Body | -0.008 | 1.22E-05 | -0.002 | 0.146 | |

Abbreviations: Chr, chromosome; IGR, intergenic region; TSS, transcription start site; TSS200, 200 bases from TSS; TSS1500, 1500 bases from TSS; body, gene body; UTR, untranslated region.

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

^aGene feature category of the methylation locus.

^bPartial regression coefficient; the magnitude of the effect on DNA methylation.

^cCpG that showed the same direction of effect in both the discovery and replication cohorts.

^dGenome-wide significance threshold (FDR $q < 0.05$).

^eSuccessful replication defined as having the same direction of effect and a P -value < 0.05 in the discovery cohort.

Table 3. TOP5 of differentially methylated regions indicated by the bumphunting method.

| Gene | Chr | Start | End | Number of Probes | Features ^a | CGI ^b | P-value |
|--------------------------|-----|-----------|-----------|------------------|-----------------------|------------------|----------------------------|
| log ₁₀ (PFOS) | | | | | | | |
| <i>CYP2E1</i> | 10 | 135342560 | 135343280 | 6 | Body | island/shore | 3.75E-04 |
| <i>KLHL35</i> | 11 | 75139390 | 75139736 | 4 | Body | island/shore | 8.86E-04 |
| <i>SMAD</i> | 15 | 67356310 | 67356942 | 5 | TSS1500/IGR | shore | 1.09E-03 |
| <i>HOOK2</i> | 19 | 12876846 | 12877188 | 4 | Body | island/shore | 1.65E-04 |
| <i>SLC17A9</i> | 20 | 61590751 | 61591209 | 4 | Body | island/shore | 4.83E-04 |
| log ₁₀ (PFOA) | | | | | | | |
| <i>GFPT2</i> | 5 | 179740743 | 179741120 | 4 | Body | island | 2.03E-03 |
| <i>ZFP57</i> | 6 | 29648225 | 29649084 | 21 | IGR | open sea | 1.00E-04 ^{FWER,c} |
| <i>DUSP22</i> | 6 | 291687 | 293285 | 10 | Body | island | 7.87E-04 |
| <i>CYP2E1</i> | 10 | 135342560 | 135343280 | 6 | Body | island/shore | 3.72E-04 |
| <i>TCERG1L</i> | 10 | 132910868 | 132911152 | 4 | Body | open sea | 1.52E-03 |

Abbreviations: Chr, Chromosome; body, gene body; IGR, intergenic region; TSS, transcription start site; TSS1500, 1500 bases from TSS, FWER, family-wise error rate

^aGene feature category of the methylation locus.

^bRelation to CpG island.

^cFWER < 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

Table 4. The average partial regression coefficient of TOP5 DMRs in the discovery and replication cohorts.

| Gene | Chr | Discovery cohort | | Replication cohort | |
|-------------------------------|-----|---------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|
| | | Average Coef ^a | Direction ^b | Average Coef ^a | Direction ^b |
| log₁₀(PFOS) | | | | | |
| <i>CYP2E1</i> | 10 | 0.040 | + | 0.059 | + |
| <i>KLHL35</i> | 11 | 0.134 | + | -0.127 | - |
| <i>SMAD</i> | 15 | 0.128 | + | 0.027 | + |
| <i>HOOK2</i> | 19 | -0.212 | - | 0.290 | + |
| <i>SLC17A9</i> | 20 | 0.165 | + | 0.163 | + |
| log₁₀(PFOA) | | | | | |
| <i>GFPT2</i> | 5 | -0.100 | - | -0.035 | - |
| <i>ZFP57</i> | 6 | -0.112 | - | -0.052 | - |
| <i>DUSP22</i> | 6 | -0.030 | - | -0.113 | - |
| <i>CYP2E1</i> | 10 | 0.112 | + | 0.007 | + |
| <i>TCERG1L</i> | 10 | 0.025 | + | 0.009 | + |

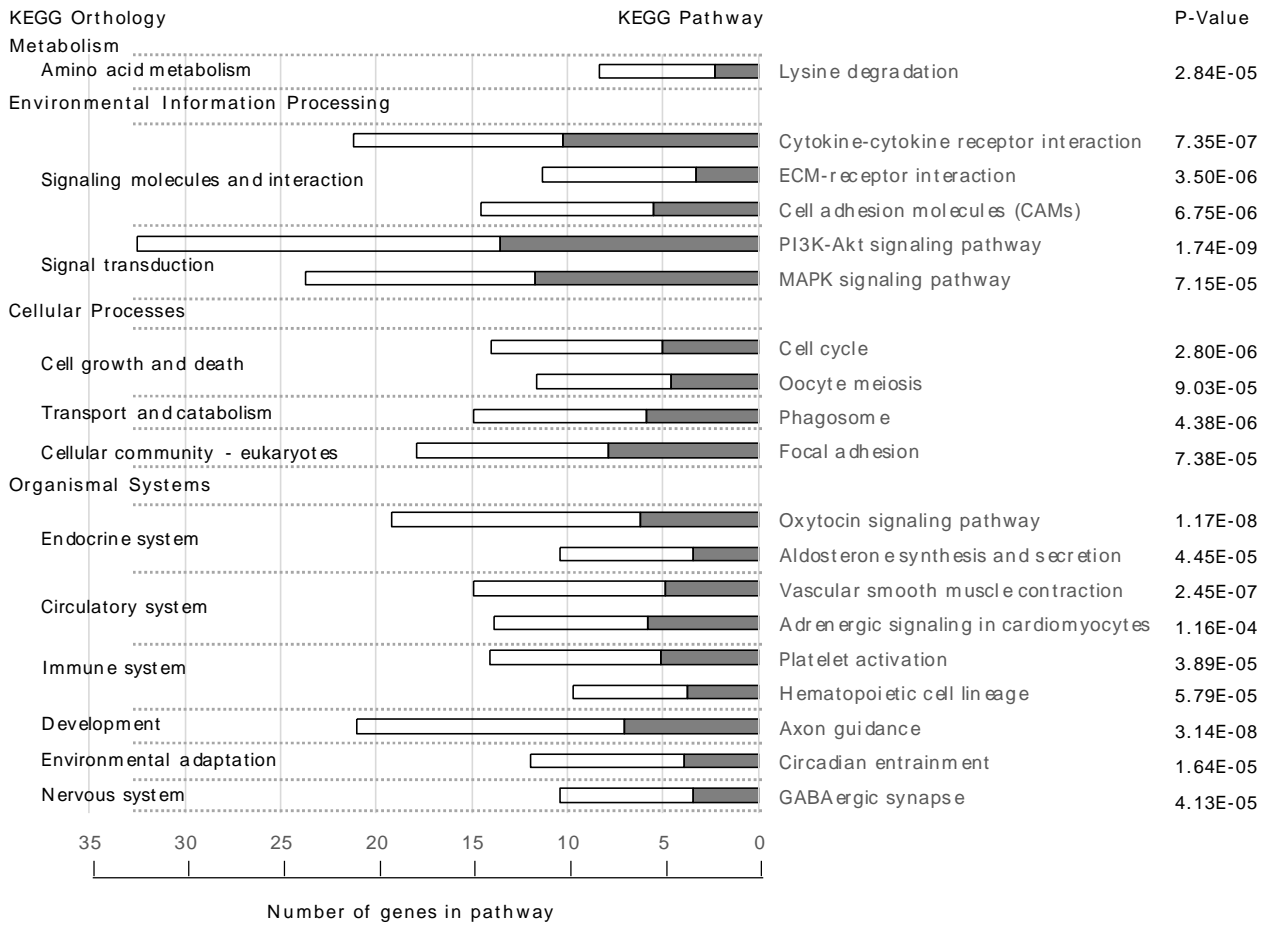
Abbreviations: Chr, Chromosome.

^aAverage partial regression coefficient at CpG sites in the region.

^bdirection of methylation change: +, up-methylated, -, down-methylated.

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

(A) PFOS



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

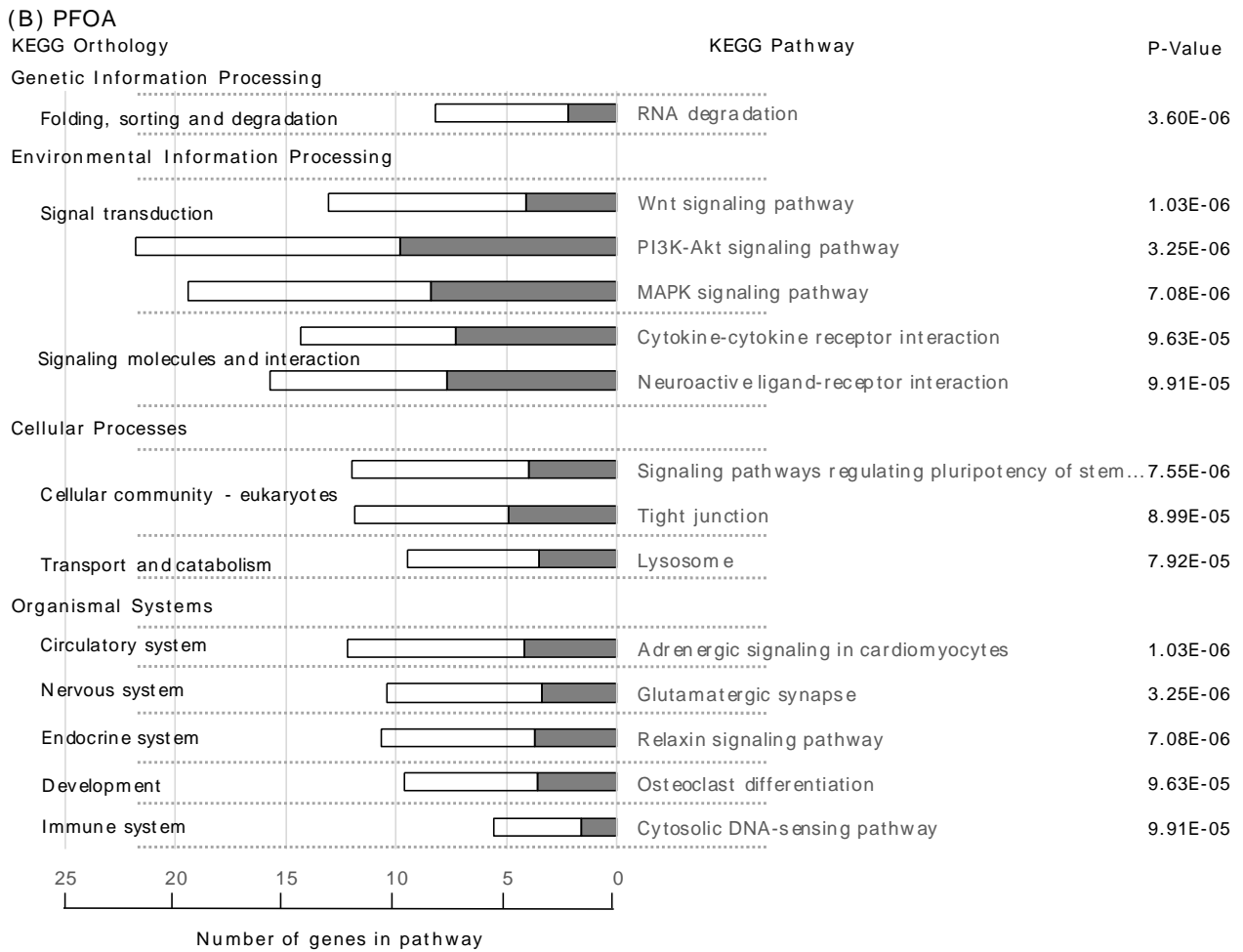


Figure 2. Significantly enriched pathways among the genes with differentially methylated CpGs associated with the exposures to PFOS (A) and PFOA (B).

White bars, observed number of genes; black bars, expected number of genes in each pathway. $P < 0.001$ vs. the expected number of genes.

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
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 学術研究員
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

研究要旨

背景：胎児期や乳幼児期の化学物質曝露が子供の様々な疾患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 DNA メチル化形成異常が関与している可能性が考えられているが、これまで疫学研究、特に日本人集団での検討はあまりなされていない。

目的：本研究は、胎児期の喫煙曝露により影響を受ける DNA メチル化領域を同定し、次世代シーケンサーを用いたメチル化解析による検証法を確立することを目的とした。

方法：北海道スタディ札幌コーホート参加者 514 名のうち、初期調査票・出産時カルテ情報、臍帯血 DNA のそろう母児ペア 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。Infinium HumanMethylation450 BeadChip による網羅的解析から喫煙曝露と DNA メチル化変化を解析し、再現性の検証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法でメチル化率を算出した。

結果：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。さらに喫煙を中止することによりDNAメチル化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。再現性検証を行なった結果、8CpGsのうち7CpGsで網羅的DNAメチル化解析結果と同様のメチル化変化が確認でき、スピアマンの相関係数は > 0.6 で高い相関を示した。

考察：以上の結果から、別の大規模集団において次世代シーケンサーを用いた DNA メチル化解析の利用が可能であると考えられる。

A．研究目的

胎児期の化学物質曝露が子供の様々な疾患リスクに影響することが報告されている (Tran et al., 2017)。将来的ながんや喘息のリスクだけでなく、近年、自閉症スペクトラム障害 (ASD) や注意欠陥多動性障害 (ADHD) などの発達障害のリスクを増加させる可能性も指摘されている (Melchior et al., 2015, Joelsson et al., 2016)。胎児期曝露の影響が児の健康リス

クに影響を及ぼすメカニズムとしてエピジェネティクスの中心的メカニズムである DNA メチル化変化の関与が考えられている。DNA メチル化の形成は胎児期や乳幼児期で特に重要(臨界期) (Lister et al., 2015) であることから、この時期の化学物質曝露と疾患発症リスクをつなぐ分子メカニズムとして DNA メチル化形成異常が関与している可能性が考えられるが、これまで疫学研究、特に日本人集団での検

討はあまりなされていない。

網羅的エピゲノム解析は全遺伝子領域を含む約 45 万 CpG を解析できる一方で、偽陽性を検出する可能性も考えられる。また疫学研究のような大規模集団において全て網羅的解析を行うことは費用面から考えても困難であり、網羅的解析により同定された特定の遺伝子領域について別手法による検証法の確立が必要である。

そこで本研究では、胎児期の喫煙曝露に着目し、網羅的 DNA メチル化解析により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を用いたメチル化解析による検証法を確立することを目的とし、胎児期喫煙曝露と子供の疾患リスクをつなぐ DNA メチル化領域を明らかにすることである。

B . 研究方法

1 . 対象

北海道スタディ札幌コーホート参加者 514 名のうち、初期調査票・出産時カルテ情報、臍帯血 DNA のそろそろ母児ペア 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。なお妊娠前喫煙中止群 (中止群) (n = 44) については、禁煙時期が妊娠時を基準とした時期から対象者に毎に異なるため解析から除外した。

2 . 方法

網羅的な DNA メチル化は Infinium HumanMethylation450 BeadChip (イリミナ社) 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) (Aryee et al., 2014, Fortin et al., 2014, Chen et al., 2013, Touleimat et al., 2012, Leek et

al., 2012), 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 (Fox et al., 2012, Smyth et al., 2004, Houseman et al., 2014), 喫煙曝露により変化するメチル化変化する領域 (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、同一サンプルの DNA をバイサルファイト PCR, エンドリペア, アダプター・バーコード付加によりライブラリー調整を行い, IonChef によるテンプレート調整後, Ion PGM 次世代シーケンサー (サーモフィッシャー社) を用いてシーケンスデータの取得し, 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

網羅的エピゲノム解析から、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。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 メチル化が非喫煙者と同等レベルになる 9CpGs (Figure 1), 喫煙を中止しても変化しない 1CpG (Figure 2)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 (NGS) による再現性検証を行った結果, 8CpGs のうち AHRH (cg21161138) を除く 7CpGs で網羅的 DNA メチル化解析 (450K) 結果と同様のメチル化変化が確認でき, 450K と NGS のスピアマンの順位相関係数は > 0.6 で高い相関を示した (Figure 3)。

網羅的メチル化解析では設計されていない周辺 CpG についてのメチル化状態を次世代シーケンサー解析により検討した結果, 多くの CpG で同方向にメチル化変化していることが確認できた (Table 1)。

D . 考察

本研究により, 胎児期喫煙曝露により影響を受ける遺伝子として従来の報告と同様に *AHRH*, *CYP1A1*, *MYO1G* などが含まれる一方で, 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いない新たな遺伝子領域を同定することができた。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。また妊娠が分かって喫煙を中止することにより DNA メチル化が非喫煙者と同等レベルになる遺伝子を多数見いだせたことから, 妊娠初期に喫煙を止めれば DNA メチル化レベルで影響を及ぼさない可能性が示唆された。

大規模コー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も現実的ではない。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ケ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ケ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ケ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, 大規模コーホートを用いて, 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

網羅的エピゲノム解析から, 胎児期の喫煙曝露により影響を受ける遺伝子を同定することができた。次世代シーケンサーを用いて特異的な遺伝子領域のメチル化解析法を確立し, 同定されたほとんどの CpG で再現性が確認できた。

F . 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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, 山縣然太郎, 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

参考文献

1. Tran NQV, Miyake K. 2017. Neurodevelopmental Disorders and Environmental Toxicants: Epigenetics as an Underlying Mechanism. *Int J Genomics*. 2017:7526592.
2. Melchior M, Hersi R, van der Waerden J, Larroque B, Saurel-Cubizolles MJ, Chollet A, Galéra C; EDEN Mother-Child Cohort Study Group. 2015. Maternal tobacco smoking in pregnancy and children's socio-emotional development at age 5: The EDEN mother-child birth cohort study. *Eur Psychiatry*. 30(5):562-8.
3. Joelsson P, Chudal R, Talati A, Suominen A, Brown AS, Sourander A. 2016. Prenatal smoking exposure and neuropsychiatric comorbidity of ADHD: a finnish nationwide population-based cohort study. *BMC Psychiatry*. 16:306.
4. Lister R, Mukamel EA. 2015. Turning over DNA methylation in the mind. *Front Neurosci*. 9:252.
5. Aryee MJ, Jaffe AE, Corrada-Bravo H, Ladd-Acosta C, Feinberg AP, Hansen KD, Irizarry RA. 2014. Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics*. 30:1363-1369.
6. Fortin JP, Labbe A, Lemire M, Zanke BW, Hudson TJ, Fertig EJ, Greenwood CM, Hansen KD. 2014. Functional normalization of 450k methylation array data improves replication in large cancer studies. *Genome Biol*. 15: 503..
7. Chen YA, Lemire M, Choufani S, Butcher DT, Grafodatskaya D, Zanke BW, Gallinger S, Hudson TJ, Weksberg R. 2013. Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium HumanMethylation450 microarray. *Epigenetics*. 8: 203-209.
8. Touleimat, N. & Tost, J. 2012. Complete pipeline for Infinium((R)) Human Methylation 450K BeadChip data processing using subset quantile normalization for accurate DNA methylation estimation. *Epigenomics*. 4: 325-341.
9. Leek, J. T., Johnson, W. E., Parker, H. S., Jaffe, A. E. & Storey, J. D. 2012. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics*. 28: 882-883.
10. Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, Delano D, Zhang L, Schroth GP, Gunderson KL, Fan JB, Shen R. 2011. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*. 98:

288-295.

11. Fox, J. & Weisberg, S. 2011. Robust Regression in R: *An Appendix to An R Companion to Applied Regression*. 2nd edn.
12. Smyth, G. K. 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3: Article3.
13. Houseman, E.A., Molitor, J., Marsit, C.J. 2014. Reference-free cell mixture adjustments in analysis of DNA methylation data. *Bioinformatics*. 30:1431-9.

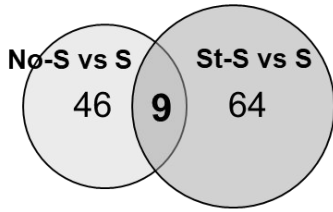
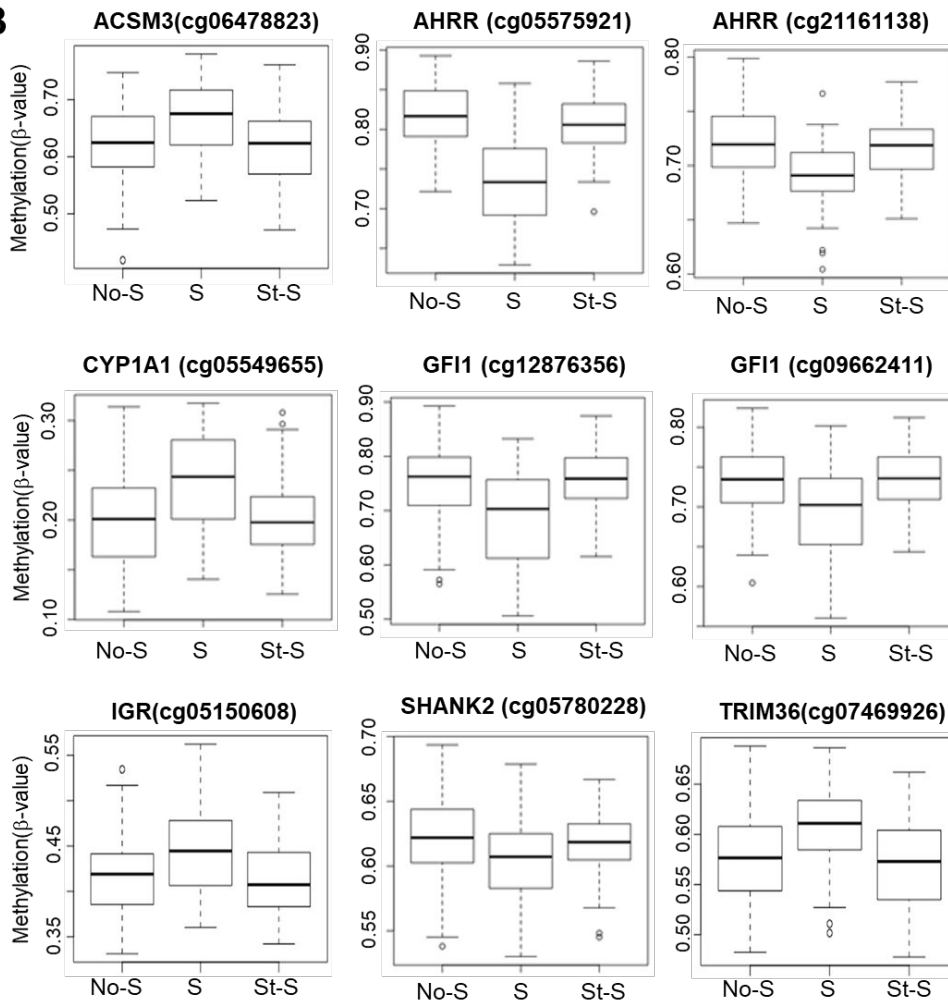
A**B**

Figure 1. Secondary comparison of differentially methylated CpG sites identified in the Ne-S vs. Su-S comparison relative to those identified in the St-S vs. Su-S comparison. (A) Venn diagram showing 9 CpG sites that were common between the Ne-S vs. Su-S comparison (46 sites) and the St-S vs. Su-S comparison (64 sites). (B) Box plots showing methylation rates (β -value) at 9 common CpG sites.

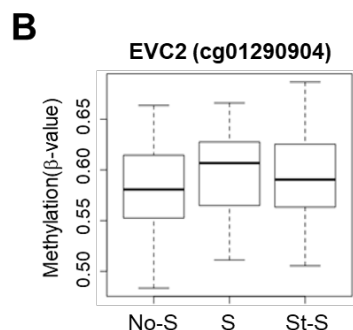
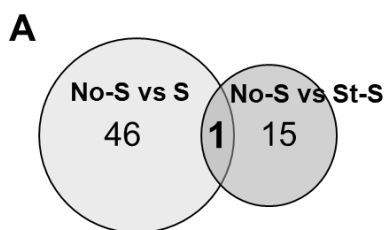


Figure 2. Secondary comparison of differentially methylated CpG sites identified in the Ne-S vs. Su-S comparison relative to those identified in the Ne-S vs. St-S comparison. (A) Venn diagram showing one CpG site that was common between the Ne-S vs. Su-S comparison (46 sites) and the Ne-S vs. St-S comparison (15 sites). (B) Box plots showing methylation rates (β -value) at one common CpG site.

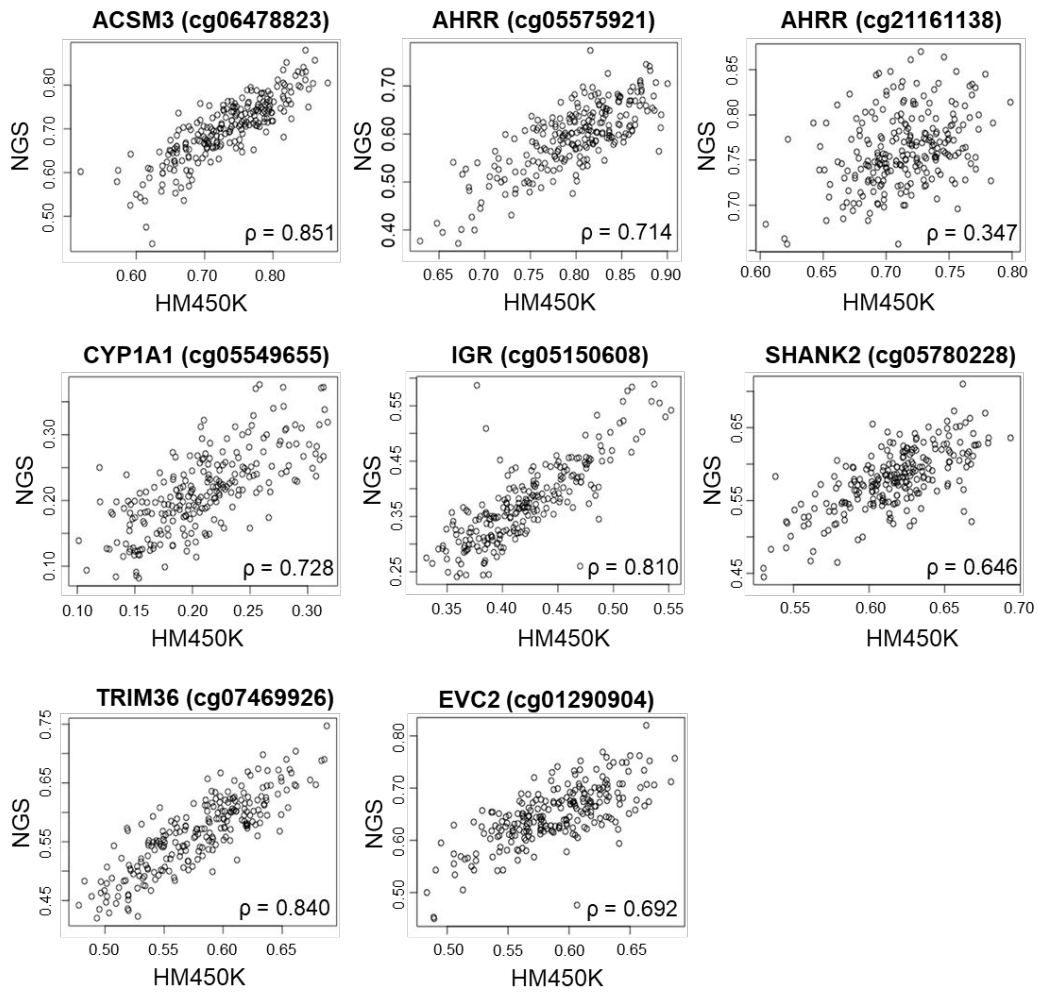


Figure 3. Correlation between HumanMethylation450K array (HM450K) and next generation sequencing (NGS) data analysis for the DNA methylation status of eight CpG sites after removing outliers. Values of Spearman correlation coefficient (ρ) are indicated.

Table 1. Verification result for selected CpG sites using Next Generation Sequencing

| Gene region | CpG site ^a | P-value | | | Mean (SD ^e) methylation (ratio) | | |
|-------------|-----------------------|--|---------------------------|--------------------------|---|---------------|---------------|
| | | Ne-S ^b vs Su-S ^c | Ne-S vs St-S ^d | St-S vs Su-S | Ne-S | St-S | Su-S |
| ACSM3 | cg59 (cg06478823) | 0.032 * | 0.728 | 0.033 * | 0.700 (0.062) | 0.690 (0.078) | 0.722 (0.080) |
| AHRR | cg26 | 1.17E-10 ** | 0.258 | 1.55E-08 ** | 0.644 (0.052) | 0.636 (0.049) | 0.564 (0.068) |
| | cg28 | 6.64E-12 ** | 0.205 | 6.24E-09 ** | 0.640 (0.054) | 0.630 (0.050) | 0.549 (0.067) |
| | cg51 (cg05575921) | 1.05E-11 ** | 0.625 | 9.76E-11 ** | 0.615 (0.060) | 0.609 (0.050) | 0.519 (0.072) |
| | cg71 | 3.73E-12 ** | 0.587 | 1.48E-10** | 0.738 (0.064) | 0.733 (0.057) | 0.611 (0.097) |
| | cg96 | 1.33E-10** | 0.388 | 6.18E-08 ** | 0.679 (0.058) | 0.670 (0.057) | 0.579 (0.082) |
| AHRR | cg26 | 0.964 (0.984) | 0.768 (0.826) | 0.980 (0.980) | 0.854 (0.034) | 0.851 (0.037) | 0.854 (0.035) |
| | cg56 | 0.007 ** (0.656) | 0.827 (0.892) | 0.042* (0.429) | 0.785 (0.150) | 0.814 (0.111) | 0.768 (0.150) |
| | cg79 (cg21161138) | 0.064 (0.064) | 0.669 (0.576) | 0.280 (0.350) | 0.767 (0.040) | 0.755 (0.063) | 0.749 (0.046) |
| CYP1A1 | cg26 (cg05549655) | 8.47E-04 ** | 0.941 | 7.06E-04 ** | 0.210 (0.061) | 0.202 (0.053) | 0.245 (0.061) |
| | cg31 | 0.008 ** | 0.986 | 0.005 ** | 0.242 (0.066) | 0.236 (0.054) | 0.274 (0.060) |
| | cg42 | 0.009 ** | 0.312 | 3.67E-04 ** | 0.480 (0.081) | 0.461 (0.073) | 0.518 (0.071) |
| | cg49 | 0.166 | 0.288 | 0.007 ** | 0.470 (0.070) | 0.453 (0.065) | 0.491 (0.070) |
| | cg57 | 8.93E-4 ** (0.002 **) | 0.781 (0.781) | 7.07E-5 ** (2.19E-04 **) | 0.566 (0.077) | 0.558 (0.064) | 0.604 (0.069) |
| IGR | cg26 | 0.72 (0.849) | 0.600 (0.600) | 0.303 (0.422) | 0.371 (0.076) | 0.367 (0.070) | 0.374 (0.087) |
| | cg75 (cg05150608) | 0.024 * | 0.736 | 0.010 * | 0.368 (0.066) | 0.365 (0.071) | 0.403 (0.080) |
| | cg77 | 0.044 * | 0.707 | 0.041 * | 0.376 (0.078) | 0.372 (0.085) | 0.415 (0.110) |
| SHANK2 | cg39 (cg05780228) | 2.50E-04 ** (1.98E-04 **) | 0.287 (0.246) | 0.034 * (0.034 *) | 0.590 (0.042) | 0.579 (0.040) | 0.558 (0.046) |
| | cg67 | 0.09 (0.120) | 0.986 (0.964) | 0.163 (0.163) | 0.937 (0.018) | 0.938 (0.013) | 0.932 (0.017) |
| | cg74 | 0.025 * | 0.793 | 0.022 * | 0.848 (0.027) | 0.849 (0.028) | 0.837 (0.027) |
| TRIM36 | cg26 | 0.003 ** | 0.777 | 0.003 ** | 0.549 (0.085) | 0.538 (0.088) | 0.602 (0.098) |
| | cg38 | 0.031 * | 0.562 | 0.009 ** | 0.569 (0.082) | 0.556 (0.087) | 0.606 (0.088) |
| | cg40 (cg07469926) | 0.005 ** | 0.678 | 0.002 ** | 0.563 (0.057) | 0.551 (0.065) | 0.595 (0.063) |
| EVC2 | cg34 (cg01290904) | 0.007 ** (0.007) ** | 0.0526 (0.042 *) | 0.429 (0.527) | 0.637 (0.056) | 0.658 (0.088) | 0.667 (0.054) |

^aCpG sites are numbered according to their position on the sequencing products, overlapped CpG sites with Human Methylation 450K array are indicated in parentheses.

^bNever-smoker. ^cSustained-smoker. ^dStopped-smoker. ^eStandard deviation.

Steel-Dwass tests. *, P < 0.05; **, P < 0.01, P value from analysis before removal of outliers are indicated in parentheses.

6. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|--|--|-------|---------|------|
| 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 |
| 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 |
| 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 |
| 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 Reports | 8 | 5654 | 2018 |
| 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 |

7. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況： なし

8. 健康危険情報： なし