

日本医療研究開発機構 成育疾患克服等総合研究事業 事後評価報告書

公開

I. 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 被虐待児の脳・エピゲノムに刻まれた傷跡解析による子ども虐待予防・介入法開発
(英語) Research for Prevention and Intervention of Child Abuse by analyzing Scars
on the Brain and Epigenome of Abused Children

研究開発実施期間: 令和2年4月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 西谷正太
(英語) Shota Nishitani

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人福井大学・子どものこころの発達研究センター発達支援研究部門・特命講師
(英語) Associate Professor / Lecturer, Research Center for Child Mental Development, University
of Fukui

II. 研究開発の概要

(和文) 2 ページ以上

1. 研究開発の概要

児童相談所における虐待の相談対応件数は右肩上がりに増加している。これは虐待やマルトリートメントという概念の理解や、「体罰の禁止」、「189」といった行政による啓発活動の努力が浸透し、社会全体が虐待を検出しやすくなった成果とも考えられる。実際に児童相談所の介入や医療機関への受診に繋がった場合、身体と心の適切な治療を受ける機会に結びつくであろう。しかし、行政、医療機関等が社会的に取り組む虐待の予防策にも限界があり、相談や治療に繋がれたのは氷山の一角で、水面下に潜む虐待を未然に防ぐのは難しい。

福井大学の友田は、人文・社会学分野のトピックであった児童虐待に、本邦で初めて科学的、生物学的な視点を取り入れた、この研究分野のパイオニアである。特に 2009-12 年にかけて、幼少期に被虐待経験のあった若年成人群と、同年代の対照群との脳灰白質容積を脳 MRI 撮像解析から比較を行い、身体的虐待、性的虐待、心理的虐待のそれぞれに対応して、異なる局所脳部位の非定型性が生じていた、という一連の成果で著名である。以降、これら成果が元となり、虐待、或いは、より日常に即した言い方となるマルトリートメントが、子どもの脳の発達にとって、如何に悪影響をもたらすのかといった、社会が強い関心を寄せるトピックを生み、友田氏の数多くの講演による啓発・アウトリーチ活動や、書籍、メディア報道等を通じ、多くの医療従事者、行政職員、一般市民らの意識改革がこの十数年間に急速に進んだ。しかし、虐待によって、ある局所脳部位の発達が非定型化されていたことを示す成果がこれ以上に判明しても、科学的関心は高いものの、社会が科学研究に求めるものが、その成果を用いた虐待の予防技術の実用化だとすれば、この一連の研究を続けるだけでは十分ではない。そこで、被虐待児の特徴を反映し得る、脳以外の生物学的な指標によるマーカーの開発が必要となった。

エピジェネティックな分子機序の 1 つで、塩基配列上の化学修飾である DNA メチル化 (以下、メチル化) は、生涯変化することのない遺伝子配列とは異なり、加齢、がん、免疫反応、生活習慣 (喫煙、肥満、栄養等)、ストレス、トラウマ等、様々な環境要因の影響を受け、変化し得る。また、メチル化⇄脱メチル化の可逆性を有する性質から、何らかの原因メチル化が同定された場合、それが多過ぎたものを少なくする、少な過ぎたものを多くする等、将来的に治療の標的や介入の効果判定マーカーになる可能性も考えられる。このようにメチル化が、生まれつきの遺伝子配列だけで決まるものではなく、生後の環境要因の影響を受けて変化する性質に注目し、被虐待という環境要因が、ある特定のメチル化群を変えている、という仮説の下、我々の他、これまでに多くの研究が行われてきた。しかし、従来の研究に多いのは、仮説駆動型に数種類程度に焦点を当てた候補遺伝子解析で、研究者自身の考えによるバイアスの影響が入ることに加え、これまでの人知を超えた予想外の結果が現れないことから、真に関連するメチル化群のフロンティアを発見することができていない。したがって、多くの医学研究でも行われているデータ駆動型のゲノムワイド解析からアプローチしなければならない。

被虐待に関連するメチル化群をゲノムワイド解析から同定を試みる研究は、これまでもいくつか行われてきた。まず、子どもが対象ではなく、成人を対象に、幼少期の虐待や貧困等を含む逆境体験をレトロスペクティブな質問紙から調査し、成人時点のメチル化との関連を調べた研究は多く散見されるが、このような研究は、今回の我々の長期的な目標とは合わない。メチル化の可逆性や動的性質を考慮した場合、介入後、間もない子どもの内に、被虐待に関連した負の変化を見つけ、それを治療の標的や介入の効果判定マーカーにしようという、将来的なブレイクスルーを見据えた場合、研究実施の難易度が高い (未成年への研究同意の取得が極めて難しい) のに、あくまでも子どもを対象とした研究に拘るのは、研究の科学的な価値が違いためである。そうすると、被虐待という同じテーマでありながら、あくまでも子どもを対象としたゲノムワイドメチル化解析に挑戦している研究は限られる。これまでの研究の現状は、何千箇所の関連メチル化群リストを呈示したもの、定性的なパターンの違いを示すに留まったもの、ゲノムワイドデータがあっても候補遺伝子の結果に終始したもの、希少な対象でサンプルサイズが少ないもの等、被虐待に関連した特定のメチル化や遺伝子を絞り込むまでの決定打には至っていない。そこで、本研究はこれまでの研究になかった以下の特徴を持った 3 つの独自コホートから、被虐待に関

連したエピゲノムを包括的に明らかにする、という共通目的で研究を行った。

特徴 1：小児の司法解剖事例

特徴 2：児童相談所の介入という公的事実に基づく、小児の虐待症候群（ICD-10:T74）

特徴 3：被虐待児の特徴を反映する中間表現型（胸腺重量比、目元注視時間、脳 MRI）を同時取得

（1）司法解剖事例のエピゲノムワイド解析による被虐待メチル化マーカーの探索

広島大学の長尾（分担者）が 20 年以上に亘り保存してきた、極めて希少な生体試料である、被虐待児（血：11 名、脳：13 名）、対照児（血：7 名、脳：11 名）の血液、ホルマリン固定脳組織（前頭前野）から DNA を抽出し、IlluminaEPIC アレイによる群間比較を行った。血液メチル化の DMP (Differentially Methylated Probe) 解析の結果、94 箇所のメチル化がゲノムワイド有意として検出された。胸腺重量比の群間比較の結果、被虐待児は対照児に比べ、有意に低いことがわかった。そこで、被虐待児の中間表現型とも言える胸腺重量比と 94 箇所のメチル化との関連性を調べた結果、62 箇所のメチル化が有意に関連した。血液メチル化の DMR (Differentially Methylated Region) 解析の結果、20 領域が有意であった。この内、*WDR5B* 遺伝子は連続した 4 メチル化から DMR を構成し、内 1 箇所は DMP として関連性が示されていた。GAMuT (Gene Association with Multiple Traits) 解析 (Hüls A, 2022, *Biological Psychiatry*) では、有意な遺伝子の関連性は検出されなかった。一方、脳メチル化は、長期ホルマリン浸漬の影響から最低限の品質基準 (detection $P < 0.05$) を満たす場合でも平均 369,562 箇所 (133,759~755,594) と少なかった。そこで、統一基準の適応で多くのプローブが失われるのを避け、各プローブに各群 > 3 名以上が残ることを基準にすると、567,433 箇所、23,244 遺伝子が残った。これは被虐待児の脳メチル化のゲノムワイドデータとしては、世界初で最大となるものとなった。血液メチル化で、ゲノムワイドレベルに有意な群間差があり、かつ胸腺重量比とも相関した 62 箇所のメチル化が、脳メチル化でも群間差があるかを調べた結果、有意な違いを示したものは、*CCR8* (*C-C motif chemokine receptor 8*)、*DCDC2* (*doublecortin domain containing 2*) 遺伝子を含む 3 箇所のメチル化であった。

（2）乳幼児の認知エピゲノムワイド解析による被虐待メチル化マーカーの探索

被虐待児（36 名）、対照児（49 名）の頬粘膜から DNA を抽出し、IlluminaEPIC アレイによる群間比較を行った。また、同時に視線解析装置 (Gazefinder®) による様々な社会的場面に対する注視点解析を行った。DMP 解析の結果、99 箇所のメチル化がゲノムワイド有意として検出された。注視点解析の群間比較の結果、被虐待児は対照児に比べ、顔画像呈示中の目元への注視時間が有意に低いことは先行研究より明らかにしてきた (Suzuki S et al., 2020)。そこで、被虐待児の中間表現型とも言える目元への注視時間と 99 箇所のメチル化との関連性を調べた結果、7 箇所のメチル化が有意に関連した。これらは *NUDT15*、*MTUS1*、*KCNH8*、*HIC1* 遺伝子に含まれていた。一方、DMR 解析から有意な 97 領域が検出された。この内、*HIC1* 遺伝子は連続した 8 メチル化部位からなる DMR を構成し、2 箇所は DMP としての関連性も示され、cg23621097 については、中間表現型（目元への注視時間）とも相関を示すものであった。*HIC1* (*HIC ZBTB transcriptional repressor 1*) 遺伝子は、腫瘍抑制遺伝子である他、成長制御、神経細胞移動異常症 (Miller-Dieker 症候群、指定難病 138) の原因遺伝子の一つである。Miller-Dieker 症候群は、*LIS1* から *YWHAE* までを含む第 17 番染色体領域の微細欠失による隣接遺伝子症候群で、大脳皮質の形成過程における神経細胞移動（後）の障害によって生じた皮質形成異常である。本研究から関連性が見つかった *HIC1* 遺伝子上の DMP 及び DMR は、染色体異常による難病症状までを生じさせる原因となることは考えられないが、神経細胞移動による皮質形成を担う遺伝子の機能に影響するメチル化が被虐待児に多く見られたことで、被虐待児に特徴的な脳の非定型的な構造には、この遺伝子のメチル化が関連している可能性が推測される。GAMuT 解析では、有意な 15 遺伝子の関連性が検出された。この内、*RP5-912I13.1*、*RNU7-114P* 遺伝子は、身体的虐待、心理的虐待、ネグレクトの 3 ドメインの有無を包括した関連解析を行った場合でも有意であり、特に *RNU7-114P* 遺伝子は、心理的虐待との関連性が強く生じていた。GAMuT 解析で有意であった *LPPR4* 遺伝子

は、DMP の top1 でもあり、2 箇所だけではあるが DMR としても検出されていた。*LPPR4* (*phospholipid phosphatase related 4*) 遺伝子は、グルタミン酸作動性ニューロンの大脳皮質興奮性伝達を調節する *Plasticity-Related-Gene-1* (PRG-1)タンパクをエンコードし、主に神経細胞軸索の膜に発現する、発達期における軸索伸長に重要な遺伝子である。また、この遺伝子上の変異は、海馬発作性のてんかんの原因となることも報告されている。このような神経系の機能を持つ遺伝子のメチル化が、被虐待児の頬粘膜のメチル化から何故、関連性が見つかったのか、我々が開発・公開した脳—末梢組織間メチル化相関データベース (AMAZE-CpG: <https://snishit-amaze-cpg.web.app>) で調べたが、脳メチル化と直接関連するものではなかった。また、このメチル化については、目元への注視時間との関連性は見出されなかった。目元への注視時間は、被虐待児の社会性、対人コミュニケーションを主に捉えるための指標であった。PRG-1 は、海馬の樹状突起制御に影響し、痛みやうつ症状様行動を緩和する働きとの関連が示されている (Liu X et al., 2021) ことから、このメチル化は、他の臨床症状ドメインの脆弱性と関連していたのかもしれない。

(3) 思春期の脳画像エピゲノムワイド解析による被虐待メチル化マーカーの探索

被虐待児 (61 名)、対照児 (62 名) の唾液から DNA を抽出し、IlluminaEPIC アレイによる群間比較を行った。また、同時に脳 MRI 撮像による脳灰白質容積の群間比較を行った。DMP 解析の結果、16 箇所のメチル化がゲノムワイド有意として検出された。脳 MRI の群間比較 (Voxel-Based Morphometry) は、メチル化データがない既存データを含め、これまでにない大規模なスケール (被虐待児 83 名、対照児 154 名) で全脳探索を行った結果、右内側前頭回、左内側帯状回は、対照児に比べ、被虐待児では有意に灰白質容積が大きく、左後頭紡錘状回は、対照児に比べ、被虐待児では有意に灰白質容積が小さいことがわかった。左後頭部の視覚処理関連領域の容積が小さいことは、先行研究の結果とも一致していた。そこで、被虐待児の中間表現型とも言えるこの脳灰白質容積と 16 箇所のメチル化との関連性を調べた結果、右内側前頭回は 6 箇所 (*FOXP1*、*RNF121*、*NFIA* 遺伝子に含まれる)、左内側帯状回は 3 箇所 (*FOXP1* 遺伝子に含まれる)、左後頭紡錘状回は 3 箇所 (*FOXP1*、*ARMC5*、*COL5A1* 遺伝子に含まれる) と有意に関連することがわかった。一方、DMR 解析では、有意な領域は検出されなかった。GAMuT 解析では、5 つの有意な遺伝子 (*ARMC5*、*OR2A1-AS1*、*LYPLA1P2*、*CD70*、*TMEM9*) の関連性が検出された。この内、*ARMC5* 遺伝子は、身体的虐待、心理的虐待、ネグレクトの各ドメイン及び、性的虐待を含む 4 ドメインの有無との関連解析を行った場合でも有意であった。*ARMC5* (*armadillo repeat containing 5*) 遺伝子は、腫瘍抑制遺伝子であるが、この遺伝子上の変異は、両側副腎皮質大結節性過形成に関連し、クッシング症候群やそれに伴うコルチゾールの過剰分泌をもたらすことがわかっている。本研究の DMP 解析と GAMuT 解析の結果から、被虐待児では、この遺伝子内の 1 箇所のメチル化に加え、その近傍の 1 箇所のメチル化が対照児に比べ、高メチル化されていることがわかった。また、cg08509907 のメチル化が多い程、左後頭紡錘状回の灰白質容積が小さいという関連性が示された。先行研究から、被虐待者・児では、視覚野の灰白質容積が低下する現象が報告されていたことから、被虐待と視覚機能に何らかの関連性があることが疑われてきた (Tomoda A, 2009, Fujisawa TX, 2018)。左後頭紡錘状回は、一次視覚野ではないが、顔認知を司るなど、より高次の視覚機能を担っている点から、先行研究の結果と非定型性の機能的な特徴が一致している。*ARMC5* 遺伝子の cg08509907 のメチル化が高いことが、この脳灰白質容積の小ささと関連したことは、*ARMC5* 遺伝子の副腎やコルチゾール分泌機能への役割に何らかの脆弱性がもたらされたことが関連している可能性が考えられる。虐待は極度のストレス状態やトラウマ体験が慢性的に繰り返され、その状態が数年に亘って続く性質や、実際に被虐待児では視床下部—下垂体—副腎皮質 (HPA) 軸に脆弱性がもたらされ、高コルチゾール濃度が観察されたという知見もこれまでに複数報告されていることから、この遺伝子のメチル化の異常が、HPA 軸の制御異常をもたらす起点となっていた可能性が示唆される。他に、複数のメチル化部位が 3 つの脳部位の脳灰白質容積とも関連性を示していたが、特に *FOXP1* (*forkhead box P1*) 遺伝子が、3 脳部位のどれとも関連性を示していた。*FOXP1* 遺伝子も腫瘍抑制遺伝子であるが、同じファミリー遺伝子である *FOXP2* 遺伝子と共に、脳の発達に重要で、その異常は、知的発達障害、発達

遅延、言語障害、自閉スペクトラム症をもたらす *FOXP1* 症候群がある。本研究では、被虐待児に、この *FOXP1* 遺伝子上の cg04794662 の高メチル化が見られ、メチル化が多い程、右内側前頭回、左内側帯状回の灰白質容積が大きく、左後頭紡錘状回の灰白質容積が小さいという関連が見られた。即ち、本研究の脳 MRI データセットから捉えた、被虐待児に見られる脳灰白質の非定型的な特徴すべてと関連していたと言え、このメチル化が直接、被虐待児の脳の間接表現型の特徴を形作っている可能性が推測される。また、脳—末梢組織間メチル化相関データベースでは、cg04794662 の唾液メチル化は、脳メチル化と正の相関が見られる傾向にある ($\rho=0.43$, $P=0.07$)。したがって、脳のメチル化も本研究で測定した唾液メチル化と似通った挙動である可能性が高く、被虐待児に特徴的な脳構造をもたらす中枢でのエピジェネティックな機序に関連が深いのかもしれない。

(4) 三つの独自コホートの解析結果のメタ解析

(1) 司法解剖事例、(2) 乳幼児、(3) 思春期という、年代、試料が異なる三つの独自コホートそれぞれを対象に、被虐待児に関連するエピゲノムを明らかにする共通目的で解析を行ってきたが、各コホート固有の結果に加え、三つに共通するメチル化の特徴をメタ解析から調べた。メタ解析からゲノムワイドレベルで有意に検出されたのは4箇所、lncRNA 遺伝子 (*SERPINB9P1*) 内の cg23172545 と、*ATE1* (*arginyltransferase 1*)、*CHST11* (*carbohydrate sulfotransferase 11*) 遺伝子と、思春期の項で前述した *FOXP1* 遺伝子のメチル化であった。そこで、これら4箇所については、各コホートで得た中間表現型や、個別ケース毎の詳細な被虐待歴との関連解析も行い、それぞれのメチル化の特徴付けも行った。一方、メタ解析で解析結果の上位であったものが、どのような生体機能に関連していたかを俯瞰的に捉えるために、上位1500箇所に対し、Gene Ontology (GO) と KEGG のエンリッチメント解析を行った。GO では、142 タームが nominal レベルで有意であったので、この142 タームを使った semantic similarity matrix の解析を行ったところ、5つのクラスターに分類された。また、KEGG では、8 タームが nominal レベルで有意であった。トラウマ体験後、AMPA 型グルタミン酸受容体によるシナプス伝達がトラウマ記憶の鍵となり、そこにはアセチルコリン分泌が仲介していることが動物実験から示されている (Mitsushima D et al., *PNAS*, 2011, *Nat Comm*, 2013)。GO の5クラスターと KEGG の結果には、“コリン作動性”、“シナプス伝達”が共通して含まれ、KEGG では“グルタミン酸シナプス”が含まれていた。したがって、このエンリッチメント解析の結果から、トラウマ記憶の形成に関わる、シナプス伝達等の生体機能を構成する遺伝子群のメチル化が被虐待児では共通して見られた可能性を示唆した。Gene Expression Omnibus (GEO) に登録された GSE118940 の血液メチル化データセット (施設児: $n=29$ 、一般家庭児: $n=29$) を用い、この各4メチル化及びこれらから算出した MRS (Methylation Risk Score) (Hüls A and Czamara D, 2020) によるロジスティック回帰モデルから、その判定精度の評価を行った。その結果、MRS の精度は、 $AUC=0.74$ であった。また、最も精度に貢献していたのは *FOXP1* 遺伝子のメチル化であった。このデータセットの施設児のメチル化は、一般家庭児よりも高く、回帰モデルの予測因子として有効であったというだけでなく、メチル化の方向性の上でも、我々の結果と一致していた。

2. 顕著な成果

(1) 被虐待児と対照児からの貴重な生体試料、中間表現型データのリソースを蓄積・公開

概要：虐待の予防マーカー開発や治療に貢献する仕組みの解明に、被虐待児を対象に行う研究は、他の医学研究と同様必要であるが、その実行は容易ではない。類似研究の多くが、成人や本人等への質問紙に基づき被虐待群を主観を排除できずに定義する中、本研究は司法解剖事例、児童相談所の介入という事実をベースとした質の高い臨床群の確保に努めた。本研究で得た被虐待児の試料・情報は本邦最大規模で、このリソースの蓄積・公開が次の展開を生む顕著な成果である。

(2) 希少な司法解剖事例のゲノムワイドメチル化データを解析・公開

概要：法医学的に虐待による死因が診断された子どもの脳という極めて希少な検体から、ゲノムワイドレベルのメチル化解析を世界で初めて行った。遺伝子配列はどの組織でも同じだが、メチル化は組織によって異なる。虐待が脳エピゲノムに及ぼす影響は最も関心が高いが、脳組織を調べなければならず、通常、それはできない。そのため、この事例を扱った。保存状態が悪影響したが、約 57 万箇所の脳エピゲノムの解析結果を得ることができ、公開する。

(3) 中間表現型データとの関連解析による絞り込み

概要：本研究は被虐待児と対照児の群間比較から関連メチル化群を絞り込んだ。類似研究は、絞り込んだメチル化群のバイオインフォマティクスから、その特徴付けを示すにとどまる場合が多い。本研究は、群間比較からだけでなく、絞られたメチル化群と被虐待児の特徴を反映する中間表現型（胸腺重量比、顔画像の目元への注視時間、局所脳灰白質容積）との関連性を調べ、さらに厳選した絞り込みが加わり、科学的な解明の質の高さを際立たせている。

(4) 三つの独自コホート解析結果のメタ解析による共通した特徴の絞り込み

概要：本研究は、司法解剖事例、乳幼児、思春期という、性質、試料が異なる三つの独自コホートそれぞれを対象に、被虐待児に関連するエピゲノムを明らかにする共通目的で解析を行った。各コホート固有の結果に加え、三つに共通するエピゲノムの特徴をメタ解析から調べ、3 遺伝子を含む 4 メチル化部位を同定した。また、これらと各中間表現型や虐待歴との関連も確認した。類似研究は、複数のコホートを同時に扱ったものではなく、メタ解析も行われていない。

(5) メタ解析から絞り込まれた 4 メチル化の実用性検証

概要：本研究のメタ解析で被虐待児に関連する 4 メチル化部位が絞られた。しかし、このメチル化がこのデータセット内だけでなく、他のデータセットにおいても同様な関連性を示さなければ、汎化性の面で、実用性に繋がり難い。そこで、独立した公共データセットを用いた検証を行った結果、74%の判別精度であった。この 4 メチル化部位だけでは精度が十分でないが、これらを中心に判別に特化した実用化技術の創出に貢献できる可能性が示唆された。

Child maltreatment (CM) leads to adverse outcomes later in life. Our goal is to identify the epigenetic signatures uniquely engraved in CM and find a breakthrough technology to reverse them by therapeutic intervention in the future. In the present study, the three cohorts were analyzed by DNA methylation microarray while examining the association with their endophenotypes (thymus weight ratio, gaze fixation, and brain MRI) and maltreatment history.

(1) Epigenome-wide analysis of judicial autopsy cases to identify methylation markers of CM

DNA was extracted from blood and formalin-fixed brain tissue (prefrontal cortex) from CM (blood: 11, brain: 13) and Control (blood: 7, brain: 11) children and compared between groups using IlluminaEPIC array. For blood methylation, 94 DMP (Differentially Methylated Probe) and 20 DMR (Differentially Methylated Region) were identified as genome-wide significant. Group comparison of the thymus weight ratio revealed that CM was significantly lower than Control, and 62 methylation sites within the 94 DMP were significantly associated with it. The brain methylation data were not of acceptable quality for adapting the uniform quality control criteria for pre-processing due to long-term formalin immersion. Therefore, avoiding the loss of many probes and using the requirement that >3 individuals remain in each group for each probe with meeting the minimum quality standard (detection $P < 0.05$), 567,433 methylations, and 23,244 genes remained.

(2) Epigenome-wide analysis of toddlers with cognitive measurement to identify methylation markers of CM

DNA was extracted from buccal epithelium from CM (36) and Control (49) children and compared between groups using IlluminaEPIC array. Ninety-nine DMP, 97 DMR, and 15 GAMuT (Gene Association with Multiple Traits) genes were identified as genome-wide significant. Group comparison of gaze fixation time to the eyes during face image presentation revealed that CM was significantly lower than Control, and seven methylation sites within the 99 DMP were significantly associated with it.

(3) Epigenome-wide analysis of adolescents with brain MRI measurement to identify methylation markers of CM

DNA was extracted from saliva from CM (61) and Control (62) children and compared between groups using IlluminaEPIC array. Sixteen DMP, no DMR, and 5 GAMuT genes were identified as genome-wide significant. Group comparison of gray matter volume by Voxel-Based Morphometry brain MRI using maximum sample size (CM: 83 and Control 154) including subjects without biospecimen revealed that CM had larger right medial prefrontal and left medial cingulate gyrus and smaller left fusiform gyrus than Control. Six, 3, and 3 methylation sites within the 16 DMP were associated with the right medial prefrontal, the left medial cingulate, and the left fusiform gyrus, respectively.

(4) Meta-analysis for the three original cohorts

In addition to the results unique to each cohort, epigenetic signatures for CM across the three cohorts were examined through a meta-analysis. Four genome-wide significant methylation sites were identified. For these four methylations, endophenotypes obtained in each cohort and association analysis with detailed CM history were also performed to characterize those methylations. Gene Ontology (GO) and KEGG enrichment analysis were performed on the top 1500 sites to capture a global view of what biological functions were associated with the top results in the meta-analysis. In GO, 142 terms were significant at the nominal level, which led to an analysis of the semantic similarity matrix, which was classified into 5 clusters. In KEGG, eight terms were significant at the nominal level. The results for the 5 clusters of GO and KEGG commonly included "cholinergic" and "synaptic transmission," while KEGG included "glutamatergic synapses"; those were the components of key molecular mechanisms for memory consolidation of traumatic fear experiences revealed in rodents. Finally, using the GSE118940 blood methylation data set (institutional children: 29, general household children: 29) registered in the Gene Expression Omnibus (GEO), a logistic regression model based on each of these four methylations and the Methylation Risk Score (MRS) calculated from them was used to evaluate the accuracy of the classification. The results showed that the accuracy of the MRS was $AUC = 0.74$.