

2. 学会発表

- 1) Ichikawa G., Yamamoto T., Aoki Y., Kuno S., Murase T., Chishima H.: Effects of anti β 2-GPI antibody positive sera on VEGF, PlGF, Endoglin and sVEGFR1 production from cultured choriocarcinoma cell line. American Society for Reproductive Immunology-28th Annual Meeting, June 10-14, 2008. Chicago, USA.
- 2) 市川剛, 中村晃和, 鈴木真美, 久野宗一郎, 村瀬隆之, 山本樹生: 抗 β 2-GPI 抗体の絨毛癌細胞よりの PlGF 産生に対する影響. 第23回生殖免疫学会. 2008年12月6日-7日. 富山.
- 3) 青木洋一, 山本樹生, 村瀬隆之, 久野宗一郎, 市川剛, 佐々木重胤, 中沢禎子, 山本範子: 妊娠高血圧症候群患者血清の胎盤絨毛よりの soluble endoglin 産生に対する影響. 第23回生殖免疫学会. 2008年12月6日-7日. 富山.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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
Yamamoto T., Murase T., Kuno S., Ichikawa G., Chishima F.	Leukocyte subpopulation in ascites of women with preeclampsia.	Am. J. Reprod. Immunol.	60(4)	318-324	2008
<u>山本樹生</u>	妊娠時の免疫系	周産期医学	38 増刊号	48-53	2008

分担研究報告書 22

分担課題：妊娠中のプロテインS活性と不育症との関係に関する研究

研究分担者 康 東天 九州大学大学院医学研究院臨床検査医学教授

研究要旨

<目的>不育症のリスク因子の1つである血液凝固異常の不育症における関与の程度をその(1)遺伝子変異と(2)活性の観点から明らかにする。

<方法>(1)XII因子、プロテインC、プロテインS活性低下症例について全エクソンの遺伝子検査を行なう。(2)九州大学病院での胎児成長遅延症例102人と正常出産例58人の母親の妊娠中のプロテインS活性を測定。

<結果>遺伝子解析については各分担研究者でDNA試料を蓄積中で遺伝子解析例はまだない。母親の妊娠中のプロテインS活性は不育症症例で対照群に比べ優位に低値であった。

<結論>妊娠中の獲得性のプロテインS活性の過度の低下とそれに関連して起こると予想される血液凝固の過度な促進状態は、胎児の成長遅延に関連する可能性が示唆された。

A. 研究目的

本邦における不育症の実態は不明であり、かつ不育症例に対するスクリーニング法や治療法の確立には至っていない。これらを明らかにするため、不育症のリスク因子の検索と評価を行う必要がある。リスク因子の1つとして、血液凝固異常の関与が強く示唆されている。本研究では、不育症における血液凝固異常の関与の程度をその(1)遺伝子変異と(2)活性の観点から明らかにすることで、EBMに基づいた不育症の診断、検査、および治療に関する指針の確立に寄与することを目的としている。

B. 研究方法

(1) 遺伝子変異解析

XII因子、プロテインC、プロテインS活性検査は一次スクリーニングとして各施設で全て行ない、低下症例について全エクソンの遺伝子検査を行なう。

(2) プロテインS活性低下と不育症との関連

九州大学病院での胎児成長遅延症例102人と正常出産例58人の母親の妊娠中のプロテインS活性とその遊離プロテインS結合蛋白質である補体因子4b結合蛋白質(C4BP)の濃度を後方視的に解析。

(倫理面への配慮)

研究方法、試料提供協力者に対する説明同意等、九州大学を含む各大学倫理委員会で承認された計画のもとで行われている。

C. 研究結果

(1) 遺伝子変異解析

現在、主任並び各分担研究者でサンプルが蓄積されている状態で、現時点で遺伝子検査を行うために九州大学に送られてきたサンプルはない。

(2) プロテインS活性低下と不育症との関連

不育症症例における妊娠中のプロテインS活性は対照例に比べ有意に低かった(図1)。一方、血漿C4BPの濃度に有意差はなかった(図2)。今回症例では全症例において、プロテインS遺伝子のエクソン部分には異常は認められなかった。

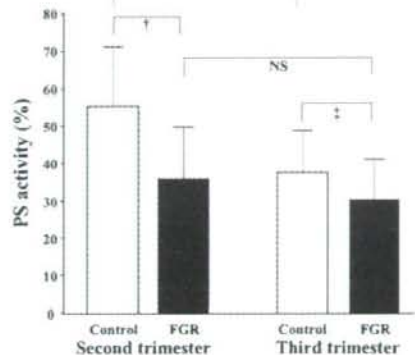


図1 不育症例と対象例におけるプロテインS活性

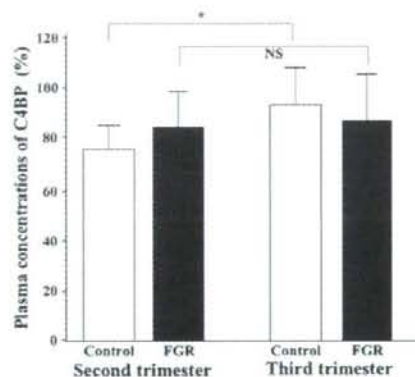


図2 不育症例と対象例におけるC4BP濃度

D. 考察

血液凝固制御系因子の先天異常などは血栓性素因として考えられ、これまで多くの研究が積み重ねられている。中でもプロテインSが日本人を含むアジア系人種における主要なリスク因子であることを我々のグループは報告してきた。実際、健常人でも深部静脈血栓症患者でも、プロテインS活性低下を示す割合は欧米人の比率（健常人で約0.2%、血栓症患者で約2%）に比してアジア人（台湾人、中国人、日本人）では、それぞれに約10倍高い（健常人で約2%、血栓症患者で約20%）。

不育症は胎盤の形成不全を伴う妊娠においてしばしば見られる現象である。近年、血栓性素因と不育症との関連が注目されており、血栓性素因を持つ頻度が不育症経験者群でコントロール群に比べ優位に高いこと

が報告されている。妊娠中にプロテインS活性が減少していくことは良く知られており、獲得性プロテインS欠損とも呼ばれている。妊娠中のプロテインS活性低下は凝固抑制系の抑制を通して出産時の出血過剰を防止するという意味で合目的である。一方で妊娠中の胎盤での静脈血栓症発生のリスクを増大させると言う側面を持っており、過度の活性低下は不育症のリスクとなることが予測される。国立循環器病センターの宮田らは不育症の4.8%にプロテインS遺伝子変異が見出されたと報告している（第30回日本血栓止血学会学術集会、2007年）。しかし、プロテインS活性低下の程度と不育症との関連は十分には調べられていなかった。今回の結果は、妊娠中における凝固抑制系の微妙な制御が正常な妊娠の進行に重要であることを示している。たとえプロテインS遺伝子に変異がなくとも、妊娠中の獲得性プロテインS活性低下の変動の経過観察も重要になると思われる。

E. 結論

不育症症例では妊娠中の妊婦のプロテインS活性の平均値は対象に比べ有意に低く、妊娠中のプロテインS活性の過度の低下とそれに関連して起こると予想される血液凝固の過度な促進状態は、胎児の成長遅延に関連する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hayashi Y., Yoshida M., Yamato M., Ide T., Wu Z., Ochi-Shindou M., Kanki T., Kang D., Sunagawa K., Tsutsui H., Nakanishi H.: Reverse of age-dependent memory impairment and mitochondrial DNA damage in microglia by an overexpression of human mitochondrial transcription factor a in mice. *J. Neurosci.* 28:8624-8634, 2008.
- 2) Hojo S., Tsukimori K., Kinukawa N., Hattori S., Kang D., Hamasaki N., Wake N.: Decreased maternal protein S activity is associated with fetal growth restriction. *Thromb. Res.* 123: 55-59, 2008.
- 3) Ishimura M., Saito M., Ohga S., Hoshina T., Baba H., Urata M., Kira R., Takada H., Kusuhara K., Kang D., Hara T.: Fulminant sepsis/meningitis due to *Haemophilus influenzae* in a protein C-deficient heterozygote treated with activated protein C therapy. *Eur. J. Pediatr.* in press
- 4) Ohga S., Ideguchi H., Kato J., Ishimura M., Takada H., Harada N., Kawanaka H., Hattori Y., Kang D., Hamasaki N., Hara T.: Thromboembolic complications in splenectomized patients with dominantly inherited beta-thalassemia. *Acta. Haematol.* 120: 31-35, 2008.
- 5) Urata M., Koga-Wada Y., Kayamori Y., Kang D.: Platelet contamination causes large variation as well as overestimation of mitochondrial DNA content of peripheral blood mononuclear cells. *Ann. Clin. Biochem.* 45:513-514, 2008.

2. 学会発表

- 1) Kang D., Fukuoh A.: Promoter-independent RNA synthesis activity of human mitochondrial RNA polymerase: its implication in biased RNA accumulation in mtDNA. The seventh European Meeting on Mitochondrial Pathology. June 11- 14, 2008. Stockholm, Sweden. (Invited speaker)

- 2) Nakamura J., Ibaragi Y., Tsumita C., Tanimura T., Kanki T., Kang D., Matsuura T.E.: Effects of mitochondrial transcription factor A on aging in *Drosophila*. XX International Congress of Genetics. July 12-17, 2008. Berlin, Germany.
- 3) 山口知宏, 藤井高志, 阿部義人, 平井照久, 難波啓一, 康東天, 濱崎直孝, 光岡薫.: ヒト赤血球膜蛋白質 Band3 膜貫通ドメインの極低温電子顕微鏡構造解析. 第 64 回日本顕微鏡学会学術講演会, 2008 年 5 月 21 日-23 日. 京都.
- 4) 康東天: 静脈血栓症とプロテイン S 変異 (シンポジウム妊婦の血栓塞栓症, 招待講演) 第 18 回日本産婦人科・新生児血液学会. 2008 年 6 月 27 日-28 日. 福岡.
- 5) 康東天: 臨床検査技術科教育に望むこと, 大学病院検査部ができること (シンポジウム招待講演) 第 3 回臨床検査学教育学会学術大会. 2008 年 8 月 20 日. 福岡.
- 6) 山口知宏, 廣明洋子, 阿部義人, 康東天, 濱崎直孝, 藤吉好則, 平井照久: The structure of human erythrocyte band 3 membrane domain determined by electron crystallography. ヒト赤血球膜蛋白質バンド 3 膜貫通ドメインの電子線結晶構造解析. 第 46 回日本生物物理学会年会. 2008 年 12 月 3 日-5 日. 福岡.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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
Hayashi Y., Yoshida M., Yamato M., Ide T., Wu Z., Ochi- Shindou M., Kanki T., Kang D., Sunagawa K., Tsutsui H., Nakanishi H.	Reverse of age- dependent memory impairment and mitochondrial DNA damage in microglia by an overexpression of human mitochon- drial transcription factor a in mice.	J. Neurosci.	28	8624-8634	2008
Hojo S., Tsukimori K., Kinukawa N., Hattori S., Kang D., Hamasaki N., Wake N.	Decreased maternal protein S activit- is associated with fetal growth rest- riction.	Thromb. Res.	123	55-59	2008
Ishimura M., Saito M., Ohga S., Hoshina T., Baba H., Urata M., Kira R., Takada H., Kusuhara K., Kang D., Hara T.	Fulminant sepsis/ meningitis due to Haemophilus influ- enzae in a protein C-deficient hetero- zygote treated with activated protein C therapy.	Eur. J. Pediatr.		in press	
Ohga S., Ideguchi H., Kato J., Ishimura M., Takada H., Harada N., Kawanaka H., Hattori Y., Kang D., Hamasaki N., Hara T.	Thromboembolic complications in splenectomized patients with dominantly inherited beta- thalassemia.	Acta. Haematol.	120	31-35	2008
Urata M., Koga-Wada Y., Kayamori Y., Kang D.	Platelet contami- nation causes large variation as well as overestimation of mitochondrial DNA content of periphe- ral blood mononu- clear cells.	Ann. Clin. Biochem.	45	513-514	2008

分担研究報告書 23

分担課題：日本人の不育症におけるプロテインZとプロテインZ依存性プロテイン
インヒビターの解析

研究分担者 一瀬白帝 山形大学医学部分子病態学教授

研究要旨

プロテインZ (PZ) はプロテインZ依存性プロテインインヒビター(ZPI)の補因子として、活性型FX (FXa) を効果的に不活性化する働きを助けるので、抗凝固作用を持つタンパク質である。低PZ血症が血栓症や再発性流産、早期胎児死亡などの症例の一部に関与しているという報告があるが、日本人におけるデータが皆無なので、生殖年齢にある正常日本人女性と正常妊婦、不妊症症例においてPZとPZI値を測定したところ、正常日本人女性は白人より低値であること、妊娠時に増加すること、不妊症では増加しないという予備的な結果が得られた。従って、PZとPZIは妊娠の維持に働いている可能性がある。

A. 研究目的

【目的と意義】

日本人におけるプロテインZ (PZ) とプロテインZ依存性プロテインインヒビター(ZPI)の正常値を決定し、これらの妊娠における変動と不育症との関係を明らかにすることが目的である。本研究の実施によりそれらの何れかの、あるいは両者の異常値が不育症の原因である可能性や不育症のマーカーになる可能性に結論が下され、臨床的に貢献することが期待される。

【背景】

PZは、肝臓で合成される偽セリンプロテアーゼであり、N末端領域にγ-カルボキシグルタミン酸 (Gla) 残基を有するビタミンK依存性蛋白質の一つである。血中ではPZは、serpinファミリーに属するZPIとの複合体として存在し、リン脂質上でカルシウム依存性に活性型FX (FXa) を効果的に不活性化する。PZとZPIの血中濃度は個人差が大きいが、その原因の一部はゲノムの塩基配列の多型に基づいており、少なくとも一部は実際に血漿PZレベルに影響を及ぼす。

当初、低PZ血症は出血に関与していると報告されたが、FXaを不活性化するというPZ-ZPI系の機能からは、両者の減少はむしろ血栓形成を促進すると推測される。事実、PZ欠乏症例は虚血性脳血管障害の相対危険度が高いこと、急性冠症候群に相関することなどが報告されている。我々は、深部静脈血栓

症や自然流産を繰返した世界初の先天性PZ欠乏症（白人）の遺伝子変異を同定したが、これはGlaドメイン内のGlu30アミノ酸をGlnに置換し、変異蛋白質の細胞内輸送を障害するので、細胞外への分泌を阻害する。また、ZPI遺伝子のナンセンス変異保持者は静脈血栓症のオッズ比が高いことも報告されている。このように、血中PZレベル低値と血栓症の関係は濃厚である。

妊娠中は凝固亢進状態にあるが、胎盤の血液循環は凝固・線溶のバランスの上に成り立っており、出血性素因である凝固XIII因子欠損症は反復性自然流産を、血栓傾向である抗凝固因子プロテインCやSの欠損症も流産を合併する。従って、血栓症を惹起する低PZ血症も胎盤機能不全を惹起する可能性が高い。事実、欧米では、正常妊娠では血中PZ濃度が増加するのにも拘らず、再発性流産、早期胎児死亡などの症例の一部は逆に低値を示し、特に後者ではPZ欠乏の割合が高いという複数の報告がある。また、抗PZ抗体の存在が胎児死亡に関与しているという論文もある。これらには異論もあるが、最近、低PZ血症が早産や子癩に関与しているという報告、更に上述した遺伝的多型性は再発性流産に関係があるという論文が加わった。

ところが、我が国では、妊娠合併症と血中PZ濃度との関係はおろか、正常妊娠、更に健康人における正常値さえ決定されていないので、日本人独自の解析が不可欠である。

B. 研究方法

[対象と検体]

文書によるインフォームドコンセントが得られた、生殖年齢にある正常非妊娠女性(n=20)、正常妊婦(n=32)および不育症症例(n=146)を対象とした。対象者の肘静脈からクエン酸採血を行い、遠心して血漿を得た。周産期におけるPZおよびZPIの変動を追跡するため、同一症例の妊娠初期(6-12週)、中期(20-25週)、後期(30-37週)および産褥期に採血を行った。

[測定方法]

PZおよびZPIの抗原量は、特異抗体を用いたサンドイッチELISA法にて測定した。PZおよびZPIそれぞれに対する抗体をELISAプレートの各ウェルに注入することにより、抗原捕捉用抗体(PZ:ウサギ由来抗PZ抗体, ZPI:ウサギ由来抗ZPI抗体MQ126)を固定化した。各ウェルを洗浄した後、ウシ血清アルブミンでブロッキングし、希釈した血漿検体を注入して、2時間インキュベートした。その後各ウェルを洗浄し、抗原検出用抗体(PZ:ペルオキシダーゼ標識ヒツジ由来抗PZ抗体, ZPI:ビオチン標識ウサギ由来抗ZPI抗体)を加え、1.5時間インキュベートした。ZPI測定系では、さらに洗浄後にペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを加え、1時間インキュベートした。5回洗浄した後に、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン(TMB)を加え、15-20分反応を行った後に、450nmの吸光度をプレートリーダーにて測定した。得られたデータは、正規性の検定およびF検定の後に、Student's t-testあるいはWelch's t-testを用いて有意差検定を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、山形大学及び名古屋市立大学の倫理委員会の承認を得て実施された。対象者からは、文書による同意を得た。

C. 研究結果

生殖年齢にある正常な日本人女性20名の血中PZおよびZPIレベルは、それぞれ $1.34 \pm 0.41 \mu\text{g/mL}$ 、 $2.25 \pm 0.46 \mu\text{g/mL}$ であった。

一方、周産期における血中PZおよびZPIレベルは、正常非妊婦時に比べ増加し、PZは、初期: 2.34 ± 0.80 、中期: 2.54 ± 0.93 、後期: 3.10 ± 1.04 と上昇し、産褥期: $2.56 \pm 0.81 \mu\text{g/mL}$ であった。ZPIは、初期: 3.56 ± 0.82 、中期: 4.34 ± 0.70 、後期: 4.74 ± 0.73 、産褥期: $4.04 \pm 0.93 \mu\text{g/mL}$ といずれも有意に高値を示した($p < 0.001$, $n=32$)。以上の妊娠初期から後期にかけるとPZおよびZPIが増加は、統計学的に有意(PZ: $p=0.002$, ZPI: $p < 0.001$)であった。また、不育症の146例では、ZPIは $3.64 \pm 0.50 \mu\text{g/mL}$ と軽度な増加に留まったのに対し、PZは $2.12 \pm 0.56 \mu\text{g/mL}$ と正常妊婦の各期に比べPZレベルが有意に低値であった(PZ: $P < 0.02 - 0.001$, ZPI: $P < 0.02 - 0.001$; ただし前期を除く)。

D. 考察

正常日本人女性における血漿PZ、ZPIのレベルが初めて決定され、PZ値は報告されている白人の値よりも低い傾向があることが判明した。ただし、例数が20名と少ないので、更に研究を継続してより信頼できる測定値を出す必要がある。また、正常日本人男性における血漿PZ、ZPIのレベルも不明なので、今後対象者の範囲を拡大するべきであろう。

PZおよびZPIは、共に周産期において有意に増加し、妊娠の維持に有用な役割をしていると思われる。背景で述べたように周産期におけるPZの増加は既に報告されていたが、周産期におけるZPIの増加は全く新しい知見であり、妊娠の維持における役割やその分子機序に大いに興味を持たれる。

一方、不育症の症例では、正常妊娠に比べPZの上昇が認められず、PZの不足が抗凝固能の不足を引き起こす可能性が示唆された。現時点では、原因であるか結果であるか不明であるが、PZ低値の群と高値の群の不妊症になる割合を比較することによって、近い将来、結論を出すことができるかも知れない。

また、PZ および ZPI が周産期において増加することから、これらのタンパク質が特にエストロゲンやプロゲステロンのような性ホルモンによって転写調節されている可能性が示唆される。そのメカニズムは、PZ および ZPI 遺伝子の発現調節エレメントの解析によって明らかにすることができるので、分子細胞生物学的なアプローチを実施したい。

最後に、PZ、ZPI 変動の臨床的な側面については、不育症では PZ のみ低下することから、これらの調節機序の解明は不育症の診断や治療をする上で有用な知見になる可能性があり、新しい別のコホートで再検する必要がある。

E. 結論

我が国における血漿 PZ、ZPI のレベルの測定を初めて実施し、白人との違いがある可能性、妊娠時に増加するという事実、不妊症では増加しないという予備的な知見を得た。今後、これらを確認し、その意義を解明するよう努力したい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Souri M., Iwata H., Zhang WG., Ichinose A.: Unique secretion mode of human Protein Z: Its Gla domain is responsible for inefficient, Vitamin K-dependent and warfarin-sensitive secretion. Blood, 2009, Feb 2. 電子版.

2. 学会発表

- 1) 惣宇利正善, 岩田宏紀, 張偉光, 中垣智弘, 一瀬白帝: 分泌型ルシフェラーゼを用いたビタミン K 依存性タンパク質分泌メカニズムの解析. 第 31 回日本血栓止血学会学術集会. 2008 年 11 月 20 日-22 日. 大阪.

- 2) 惣宇利正善, 岩田宏紀, 張偉光, 中垣智弘, 一瀬白帝: γ -グルタミルカルボキシラーゼはビタミン K 依存性タンパク質の Cargo receptor である. BMB2008. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会. 2008 年 12 月 9 日-12 日. 神戸.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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
Souri M., Iwata H., Zhang WG., <u>Ichinose A.</u>	Unique secretion mode of human Protein Z: Its Gla domain is responsible for in- efficient, Vitamin K-dependent and warfarin-sensitive secretion.	Blood		電子版	2009

分担研究報告書 24

分担課題：姉妹染色体の異数性に関する研究

研究分担者 柳原 格 大阪府立母子保健総合医療センター研究所
免疫部門部長

研究要旨

流産、不育つながらる染色体の数の異常（異数性）のメカニズムについて、そのモデル動物の作出を行った。姉妹染色体合着異常、その後の発生異常を確認した。

A. 研究目的

妊娠後、初期発生を含め7割が妊娠継続できないという。その主な原因として染色体の正常な分配が行われない染色体異数性の問題が挙げられている。そこで、これまでほとんど注目されてこなかった染色体異数性の問題を個体レベルで解析するためモデル動物を作出し、将来的な染色体の数の異常問題に正面から向き合うための基礎的な解析を行う。

B. 研究方法

変異原（ENU）を用いた大規模な遺伝子変異体作出・解析には、わが国固有のメダカ（*O. latipes*）を使用した。理由として、マウスなど哺乳類の解析に比べ、卵が大量に採取できること、卵が透明なため容易に観察できること、近年その遺伝情報が公開されたこと、場所、費用の負担が少ないこと、などがあげられる。また、哺乳類では動物を作成できない個体の解析にも適している。

（倫理面への配慮）

施設内動物委員会で承認を受け、規定を遵守し研究を行っている。

C. 研究結果

これまで姉妹染色体の合着異常を起こす世界でも非常にまれな疾患原因遺伝子の同定を行った（Vega, et al. Nature Genet, 2005）。特徴は、染色体が分裂前に中心体で結合しているいわゆるX字状にはならず、平行（線路様）になる（PCS）。メダカの遺伝情報を元に、合着関連遺伝子のクローニングを行った。次に5771のメダカ精子遺伝子から、合着にかかわると考えられる遺伝子のスクリーニングを行い、6つのミスセンス変異を見出した。しかしながら、ナンセンス変異は見出されず本遺伝子が初期

発生においても重要な遺伝子である可能性が示唆された。交配の結果、この変異をホモにもつ卵を得ることに成功した。さらに、染色体解析でPCSを起こすこと、ホモ個体の発生段階の種々の段階で異常を起こすことを確認した。

D. 考察

染色体の異数性のモデル生物の構築にむけて本年度の目標は達した。

E. 結論

姉妹染色体の合着異常モデル動物（メダカ）を作成した。その結果、発生段階で致死的なものを含め、発生異常が起こった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hamaguchi M., Hamada D., Suzuki N. K., Sataka I., Yanagihara I.: Molecular basis of actin reorganization promoted by binding of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* EspB to α -catenin. FEBS. J. 275:6260-6267, 2008.
- 2) Hamada D., Tsumoto K., Sawara M., Tanaka N., Nakahira K., Shiraki K., Yanagihara I.: Effect of amyloidogenic sequence attached to yellow fluorescent protein. Proteins. 72:811-821, 2008.
- 3) 難波文彦, 柳原格他.: 子宮内感染/抗アネキシンA2 IgM抗体. 小児科. 49 (7): 989-994, 2008.

4) 柳原格, 下屋浩一郎: ワークショップ5
「胎内炎症と流早産・新生児合併症」座長
のまとめ. 日本周産期・新生児医学会雑誌
44 (4) :1032-1033, 2008.

5) 白石淳, 藤村正哲, 柳原格他.
当センターにおける超早産児からのウレ
アプラズマ属細菌の検出頻度とその臨床
背景. 近畿新生児研究会. 17:31-35, 2008.

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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
Hamaguchi M., Hamada D., Suzuki N. K., Sataka I., Yanagihara I.	Molecular basis of actin reorganization promoted by binding of enterohaemorrhagic <i>Escherichia coli</i> EspB to α -catenin.	FEBS. J.	275	6260-6267	2008
Hamada D., Tsumoto K., Sawara M., Tanaka N., Nakahira K., Shiraki K., Yanagihara I.	Effect of an amyloidogenic sequence attached to yellow fluorescent protein.	Proteins	72	811-821	2008
難波文彦, 柳原格他	子宮内感染/炎症と 抗アネキシンA2 IgM抗体	小児科	49(7)	989-994	2008
柳原格, 下屋浩一郎	ワークショップ5 「胎内炎症と流早産・ 新生児合併症」 座長のまとめ	日本周産期・ 新生児医学会 雑誌	44(4)	1032-1033	2008
白石淳, 藤村正哲, 柳原格他	当センターにおける超早 産児からのウレアプラズ マ属細菌の検出頻度とそ の臨床背景	近畿新生児 研究会	17	31-35	2008

分担研究報告書 25

分担課題：流産のDNAメチル化解析

研究分担者 秦 健一郎 国立成育医療センター周産期病態研究部部長

研究要旨

DNAメチル化をはじめとするエピジェネティックなゲノム機能制御は、哺乳類の発生と生存に必須の機構である。その破綻による代表的疾患のゲノムインプリンティング異常症では、胎盤形成異常が認められる。また、DNAメチル化異常によりゲノムインプリンティングを失われたモデルマウスは胎盤の分化異常を呈し、胎仔は全例致死である。様々な生物種の解析から、DNAメチル化によるゲノムインプリンティング制御は、胎盤の獲得と進化上密接に関連していると考えられており、これらの状況証拠を考え併せると、DNAメチル化による遺伝子発現制御は、ヒトでも同様に、胎盤の発生分化において特別な役割を担っていることが予想される。

流産には、明らかな成因を同定できない症例が多数含まれ、およそ半数はジェネティックな異常（染色体構造異常）を認めないとされている。しかしこれらの症例の、エピジェネティックな異常の有無は系統的に解析されるに至っていない。

そこで我々は、異なる染色体上に散在し、様々な機構によってDNAメチル化されることが示されている領域（既知のインプリンティング遺伝子関連メチル化領域全て、反復配列、X染色体、胎盤特異的非メチル化遺伝子領域を含む合計27箇所を標的に、定量的かつ半網羅的なメチル化解析法を確立した。

本解析法により、多領域を厳密に定量解析する事で、診断に直結するDNAメチル化異常のみならず、異常の成立機序（成立時期や作用因子）を同定するためのより詳細な情報が得られ、今後の予防法や安全性確保の指針に必須の知見をもたらす。

さらに本解析法は、あらゆる疾患のメチル化異常スクリーニングに直ちに転用可能であり、ポストゲノムの重要な医学研究分野であるヒトエピゲノム研究に資する技術である。

A. 研究目的

ヒトゲノムプロジェクトの完了により、遺伝子配列が全て明らかとなり、遺伝学的な異常を同定する技術（ジェネティックな異常の解析技術）が飛躍的に進歩した。一方で、遺伝子配列の異常（ジェネティックな異常）だけでは説明できない疾患の存在も明らかになった。DNAメチル化をはじめとするエピジェネティックなゲノム制御機構と疾患や発生異常との関連は、近年特に様々な因果関係が明らかにされてきており、従来の解析手法（ジェネティックな解析手法）を超えたポストゲノムシーケンス時代の重要な医学研究領域として注目が高まっている。

エピジェネティックな生命現象の一つであるゲノムインプリンティングの破綻は、実際にヒトの先天性疾患の原因であることが明らかになっている。また、モデル生物の詳細な解析から、エピジェネティックな

異常やゲノムインプリンティングの破綻は、胎盤の発生分化異常を引き起こすことが示された。さらに最近、生殖補助医療後の出生児でインプリンティング異常症の発症率が上昇する可能性を懸念する報告がなされた。しかし、流産におけるエピジェネティックな異常は系統的網羅的に解析されておらず、そもそもヒト正常発生を参考とした正常値も定義されるに至っていない。

一方で、流産症例を細胞遺伝学的に解析した報告は多数存在するが、およそ半数の症例で明らかな染色体構造異常を認めない。（細胞遺伝学的な解析では）

本研究は、従来の解析技術では検出できないエピジェネティックな異常、特に絨毛の発生分化に深く関与しているインプリンティング遺伝子領域のDNAメチル化状態に注目し、1) ヒト絨毛組織のDNAメチル化状態を網羅的かつ定量的に解析する手法を独

自に確立し、2) 流産症例の DNA メチル化異常の有無を解析することで、流産の未知の病因病態を解明し、診断治療へと発展させる事を目的とする。

B. 研究方法

1. 解析標的領域の決定

現在までにヒトで報告されている DMR

(Differentially Methylated Region: 父由来と母由来の対立遺伝子間で DNA メチル化の状態が異なり、片親性発現すなわちゲノムインプリンティング現象に必要な領域) 全てを、文献的に検索した。また、ヒトでは報告されていないが、マウス DMR との配列相同性からヒトでも DMR であると予想される領域を決定し、これらが DMR である事を正常血液 (リンパ球) および正常胎盤由来のゲノム DNA を用いて検証した。また、胎盤特異的な DNA メチル化を受ける領域、X 染色体上の DNA メチル化領域も併せ、合計 32 ヶ所を解析対象領域とした。

2. COBRA 条件検討

上記の領域を、COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis) 法により解析するための条件検討を行った。実際に解析を行う配列領域は、PCR 法による増幅の際に偏りが無く効率的な反応が起こるように、増幅産物長は約 500bp 以下になるよう設定した。また、増幅産物を特定の制限酵素で切断する必要があるため、領域内に適切な制限酵素認識配列を有する配列が存在する事も必須である。解析するゲノム DNA は、bisulfite 変換により非メチル化シトシンがウラシルに変換されるため、本来 4 種類の DNA で構成されるゲノム配列が、ほぼ 3 種類で構成される配列に変換される。このため、PCR の為のプライマー設計の自由度が格段に狭められると共に、特異的な増幅を行う為には、徹底した事前の条件設定が必要である。一方で、解析をハイスループット化する為に、PCR の反応条件は可能な限り統一した。これらの条件を満たしつつ、非特異的な増幅を起さない PCR 条件を確立し、決定した。

3. 電気泳動

一般的に COBRA 法では、アガロースゲルやポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動を行い、得られる泳動像から半定量的な解析を行うが、我々の事前検討では、従来の解析法はダイナミックレンジが低く、定量性が劣る事が判明した。そこで我々は、測定値の定量性を厳密に担保するために、キャピラリー電気泳動法を採用した。

(倫理面への配慮)

倫理面においてはヒトゲノム・遺伝子研究に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針、臨床研究に関する指針を遵守する。また本研究内容は、報告者の所属する機関の倫理委員会の承認を受けている (国立成育医療センター倫理委員会承認番号 234)。

C. 研究結果

上記のような (PCR 条件、電気泳動など)、実験手法そのものに起因する避け難い実験誤差は、事前の条件検討によって検討できたが、実際に検体の解析を始めるにあたり、正常検体由来ゲノム DNA を実際に用いて、検体間および検者間差を生じやすい因子の同定 (ゲノム DNA の精製法、テンプレート量、制限酵素処理過程の DNA 量、泳動量などの各実験操作) を行った。これらの知見を加味し、観測値の偏りを極力排除するための実践的な解析プロトコルを確立した。

正常ヒト胎盤ゲノム DNA および正常成人末梢血リンパ球ゲノム DNA を用い、本解析系による試験解析を行った。当初解析を予定していた DMR 中には、文献的には DMR と報告されていたが我々の検討では DMR である証拠が得られなかった領域が含まれていた。また、少なくとも胎盤組織で DMR を形成していないと考えられる (組織特異性があると考えられる) 領域が存在した。これらの領域は網羅的解析系から除き、最終的に 24 箇所の DMR、X 染色体 1 領域、反復配列 2 種類、合計 27 領域に対する DNA メチル化解析系を確立した。本法を用い、すでに収集されていた習慣流産 29 症例の解析を行った。また、すでに診断の確定していた子宮内胎児発育遅延を合併する先天奇形症候群症例を終了させた。現在本研究班員の協力により、流産 10 検体を解析中である。これらの結果については、以下の考察と結論の中で詳細を述べる。

D. 考察

DNA メチル化を初めとするエピジェネティックなゲノム機能の制御は、発生と生存に必須の機構であると共に、様々な疾患との関連が指摘されている。多くの報告では、疾患と正常対照群を用いて、疾患関連候補因子遺伝子の周辺ゲノム領域のみに着目した DNA メチル化解析が行われている。このためそもそも、正常集団中での DNA メチル化状態の分散度は検討されておらず、所謂

正常値も明らかでない。

今回我々は、DNAメチル化状態を網羅的かつ定量的に解析する系を確立した。この系では、既知の疾患関連領域以外の領域も同時に解析する事が可能である。既に確定診断されていた先天奇形症候群（これらの症例では、DNAメチル化異常を伴っている事が確認されている）を解析した例では、従来

の定性的な解析法と矛盾の無い、正確な診断が可能であった。大変興味深い事に、今回我々が行った解析結果を元に、きわめて稀な発生異常である母ゲノムダイソミーモザイク症例を同定する事に成功した。通常これらの疾患に対して行われている分子診断法では、限定されたゲノム領域のDNAメチル化状態を定性的に解析するのみであるため、母ゲノムダイソミーで観察されるような全ゲノム領域のDNAメチル化異常が存在したとしても、気づかれる事はない。しかし前述のように、我々が確立した診断系は、全ゲノム領域を網羅的に解析する為、通常見逃されるDNAメチル化異常が検出され、この稀少症例を同定する事ができた。このように、我々の分子診断系は、1) 分子診断に実用可能であり、しかも、2) ゲノム網羅的解析により未知の病態を同定できる、という当初の目標を達成可能である事が、実際のヒト発生異常症例を用いて証明された。

習慣流産29症例の解析では、複数の症例で、DNAメチル化異常を疑う所見が得られている。しかもそのうち3例は、遺伝学的に独立した症例であるにもかかわらず、同じゲノム領域で同様のDNAメチル化異常を呈し、ゲノム全体のDNAメチル化パターンが極めて類似していた。これらの結果からは、1) 一部の流産絨毛検体にはDNAメチル化異常が確かに存在し、2) 共通のエピジェネティックな病因もしくは病態を有する症例が存在する可能性が示唆される。現在、本研究班員の協力を得て、更に解析症例数を増やしている。

E. 結論

我々のDNAメチル化異常スクリーニング系は、正確な分子診断法として実用性がある。試験的解析ですでに流産純毛検体のDNAメチル化異常を同定しているが、今後さらに多数の症例を解析する事により、流産とDNAメチル化異常との関連が明らかになる

ことが期待される。また、多数の正常対照群を解析することで、正常ヒト絨毛組織発生分化過程におけるDNAメチル化のリファレンスデータ取得といった、様々な類似の研究の発展に必須の重要な知見が得られる事が期待される。また我々の解析系は、あらゆる疾患のDNAメチル化異常スクリーニングにそのまま転用することが可能であり、ポストゲノムアプローチによる医学研究に様々な貢献が出来る技術である。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kuramochi-Miyagawa S., Watanabe T., Gotoh K., Totoki Y., Toyoda A., Ikawa M., Asada N., Kojima K., Yamaguchi Y., Ijiri TW., Hata K., Li E., Matsuda Y., Kimura T., Okabe M., Sakaki Y., Sasaki H., Nakano T.: DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes. Dev.* 22: 908-917, 2008.
- 2) Hu YG., Hirasawa R., Hu JL., Hata K., Li CL., Jin Y., Chen T., Li E., Rigolet M., Viegas-Pequignot E., Sasaki H., Xu GL.: Regulation of DNA methylation activity through Dnmt3L promoter methylation by Dnmt3 enzymes in embryonic development. *Hum. Mol. Genet.* 17:2654-2664, 2008.
- 3) Kobayashi H., Yamada K., Morita S., Hiura H., Fukuda A., Kagami M., Ogata T., Hata K., Sotomaru Y., Kono T.: Identification of the mouse paternally expressed imprinted gene Zdbf2 on chromosome 1 and its imprinted human homolog ZDBF2 on chromosome 2. *Genomics.* in press.

[総説 (和文)]

- 1) 久須美真紀, 中林一彦, 秦健一郎: 体外培養・長期培養の胚発生への影響: 動物実験と臨床データから. *J Mammal. Ova. Res.* 25:221-230, 2008.
- 2) 秦健一郎: 死産の動物モデル. *産科と婦人科.* 75:419-425, 2008.