

図9 すべての年齢群と若年群（34歳以下）の生産分娩率

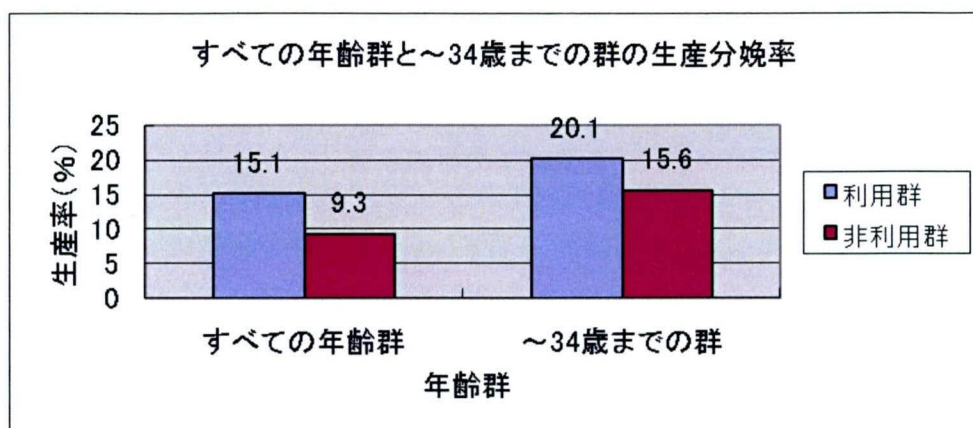


表1. 各治療群別生産分娩中37週以降の分娩率

	新鮮胚治療	凍結胚治療
利用群	76.7%	78.4%
非利用群	76.6%	77.4%

表2. 各治療群別37週以降生産分娩児の平均体重 (M+/-SD)

	新鮮胚治療	凍結胚治療
利用群	2941+/-423	3046+/-426
非利用群	2943+/-410	3053+/-411

表3. 各治療群別先天異常児率

	新鮮胚治療	凍結胚治療
利用群	1.4%	1.4%
非利用群	1.4%	1.4%

表4. 各治療群別新生児死亡率

	新鮮胚治療	凍結胚治療
利用群	0.7%	0.2%
非利用群	0.5%	0.2%

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）  
分担研究報告書

生殖補助医療由来児の発育・発達に関する研究：

分担研究者 緒方 勤 国立成育医療センター研究所 小児思春期発育研究部 部長

研究要旨

生殖補助医療がインプリンティング疾患発症に及ぼす影響を、シルバーラッセル症候群とプラダーウイリ症候群を主たる対象疾患として解析した。その結果、生殖補助医療が、高齢出産のほかに、メチル化異常、体外培養、排卵誘発などを介してインプリンティング疾患発症に関与しうることを示唆するデータが得られた。

A. 研究目的

近年、生殖補助医療により出生した児において、低出生体重や先天奇形の発症率が高いこと、および、インプリンティング異常疾患の発症率が有意に高いことが報告され、大きな問題となっている。

われわれは、生殖補助医療がインプリンティング疾患発症に関与するか否かをシルバーラッセル症候群 (SRS) 患者およびプラダーウイリ症候群 (PWS) 患者の解析から検討した。SRSは母親性ダイソミーと第11染色体上インプリンティング遺伝子 IGF2-H19 の発現パターンを支配する H19-DMR (differentially methylated region) の低メチル化により発症する疾患である。また、PWSは、第15染色体長腕近位部のインプリンティング領域の異常に起因疾患であり、従来から患者の70%程度で父性由来15番染色体 q11-13 領域の欠失が、25-30%で15番染色体母性片親性ダイソミー (UPD: uniparental disomy) が、5%未満で15番染色体上のインプリント調節領域の異常が認められるとされている。そして、UPD 発症機序のひとつに、相同染色体を2つ持つ卵子が正常な精子と受精した後、父親由来の当該染色体が除かれ、母親由来の相同染色体のみが残った結果 UPD となるものが知られている (trisomy rescue)。異数性を有する卵子の形成は減数分裂時の不分離に起因しており、この過程には母親の高年齢の関与が大きいと考えられている。さらに、生殖補助医療の影響や発症原因と臨床像との関連を解析した報告はほとんど見られない。

B. 研究方法

(1) シルバーラッセル症候群 (SRS) 患者

全国から集積した104例のSRS患者を対象とした。遺伝的原因を明確とし、生殖補助医療の生むとの関連について検討した。

(2) 第7染色体母親性ダイソミー解析

スクリーニングとして PEG1/MEST-DMR のメチル化解析をおこなった。末梢白血球からゲノム DNA を採取し、bisulphite 処理を行なった。DMR 上の CpG islands の cytosine 残基は、親由来により発現アリルでは

非メチル化, 非発現アリルではメチル化されている。そして、bisulphite 処理により非メチル化 cytosine 残基のみが uracil を経て thimine に変換されることから, bisulphite 処理によりメチル化 CpG と非メチル化 CpG を塩基配列として鑑別できる。その後、PEG1/MEST-DMR をシークエンス解析で検討した。また、第7染色体上の多座位にたいするマイクロサテライト解析を行った。

### (3)H19-DMR のエピ変異解析

末梢血ゲノム DNA にたいして bisulphite 処理を行ない、H19-DMR のメチル化パターンを COBRA 法と bisulfite -sequencing により解析した。この bisulphite 処理により非メチル化 cytosine 残基のみが uracil を経て thimine に変換されることから, メチル化 CpG と非メチル化 CpG を塩基配列として鑑別できる。そして、この H19-DMR 上の CpG islands の cytosine 残基 は, 母親由来アリルでは非メチル化, 父親由来アリルではメチル化され、父親アリルからのみ成長因子 IGF2 が発現する。したがって、低メチル化を生じるエピ変異は IGF2 発現低下を介してシルバーラッセル症候群を招く。

### (4) プラダーウイリ症候群(PWS)患者

獨協医科大学越谷病院小児科でフォロー中の PWS 患者 156 名を対象とした。全例において遺伝的発症機序を明確とした。その結果をもとに、30 歳以上の母親から生まれた児の数が、20-29 歳の母親より生まれた児の数を上回った 2003 年前後における各々の発症病因の割合を比較した。また、生殖補助医療との関連について解析した。

### (5) PWS発症原因の解明

全例において上記 bisulfite 処理された末梢血ゲノム DNA を用いた SNRPM-DMR のメチル化解析、SNRPN 領域の FISH 解析と MLPA 解析、第15染色体上の多くの座位に対するマイクロサテライト解析を行い、発症原因を明らかとした。

### (倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守し、検体の収集を含めた研究計画については、国立成育医療センター、および各検体の収集施設において予め倫理委員会の承認を得ている。検体は、書面によるインフォームド・コンセントを取得後に収集している。

## C. 研究結果

### (1) シルバーラッセル症候群(SRS)

3例が目された。症例1は、生殖補助医療により双胎第2子として出生した SRS 女児である。双胎第1子の女児は正常である。両親の生殖補助医療の原因は不明で、10年間妊娠しなかったために in vitro

fertilizationを受けた。症例1では、PEG1/MEST 遺伝子のDMRにおいて、父親に軽度の過剰メチル化 (4/31) が児にやや高度の過剰メチル化 (8/31) が認められた(図1)。

症例2は、乏精子症のためにICSIが行われ、双胎第2子として出生した SRS 男児である。症例2では、H19-DMR の低メチル化が認められた(図2)。

症例3は、生殖補助医療においてしばしば認められる双胎児の解析から、片方のみがシルバーラッセル症候群表現型を呈する双胎女児(症例3)として見出された。この双胎児は自然妊娠で受精している。胎盤の血管吻合は認められていない。マイクロサテライト解析により双胎女児が一卵性であることが確認された。同時に、シルバーラッセル症候群を招く第7染色体母親性ダイソミー、子宮内発育不全を招く第14染色体母親性ダイソミーが否定された。そして、H19-DMR のメチル化パターンが患者では低メチル化、健常姉妹では正常であり、エピ変異が同定された(図3)。患者の低メチル化の頻度は、およそ1:3であった。

## (2) プラダーウイリ症候群(PWS)

2002年以前に出生した患者では欠失が83%、trisomy rescueを介したUPD(trisomy rescue type UPD)が14%に認められたのに対し、2003年以降に出生した患者では欠失が60%、trisomy rescue type UPDが28%に認められ、2003年以降出生群においてUPD比率の増加を認めた( $p=0.014$ )。母親の年齢が上昇するほど、または児の出生年次が最近であるほど、trisomy rescue type UPD の割合が増加していた(図4)。2002年以前と2003年以降出生群の母親年齢を比較すると、2003年以降で上昇(2002年以前中央値30歳(19-48)vs. 2003年以降中央値35(23-45),  $p=0.00041$ )していたが、trisomy rescue type UPD群でのみ母親の出産年齢の上昇を認めた( $p=0.031$ )。さらに、少なくとも11名の患者が生殖補助医療で出生し、この頻度が一般集団の生殖補助医療による出生児の割合よりも有意に高いこと(したがって、本排卵誘発を含む生殖補助医療がリスク因子となりうること)が判明した(図5, 6)。

## D. 考察

### (1) シルバーラッセル症候群(SRS)

今回の結果は、生殖補助医療がインプリンティングのすく因子である可能性を示唆する。そして、現在までに知られている生殖補助医療に伴うメチル化異常が、卵の低メチル化とそれに伴う Beckwith-Wiedemann 症候群や Angelman 症候群など、過成長を呈する疾患において認められていることと異なり、精子におけるメチル化異常の存在が成長障害を有するシルバーラッセル症候群において同定されてことが注目される。

さらに、今回の成績は、不妊症自体がインプリンティング疾患発症に関連する可能性を示唆する。症例1では、父親において軽度のメチル化異常が存在し、症例2では乏精子症が存在した。さらに症例2ではICSIが行なわれており、これは、最近、乏精子症患者の精子においてさまざまなDMRのメチル化異常が

存在することが明らかとされていることから、このような精子を受精させることが直接的にインプリンティング異常症発症を招く可能性が危惧される。

症例3のデータは、一卵性姉妹の片方だけに H19-DMR の低メチル化が生じ、その結果、シルバーラッセル症候群が発症したことを示す。その原因として、4-8 細胞期に DNMT1 によるメチル化維持が阻害されたことが推測される。事実、低メチル化の頻度がおよそ1:3であったことは、この概念に一致する。そして、この DNMT1 が X 染色体不活化のためのメチル化維持にも用いられることから、双胎女児において、DNMT1 の相対的不足が生じやすく、そのために、このようなインプリンティング異常が発症しやすいと考えられる。なお、今回の症例では、胎盤の血管吻合がなかったために、末梢血で低メチル化が検出されたが、血管吻合があると正常児の細胞移行のために、マスクされることになり、この場合、細胞移行が生じない皮膚繊維芽細胞などを解析する必要がある。この成績は、生殖補助医療における多胎(特に双胎)妊娠が、インプリンティング異常症の原因の一つである可能性を示唆する。このようなインプリンティング異常の発症は、生殖補助医療において出生した双胎児(特に女児)において、皮膚繊維芽細胞などを用いて解析する必要があると考えられる。

## (2) プラダーウイリ症候群(PWS)

今回の成績は以下のことを示唆する。第一に、本邦における晩婚化を背景とした出産年齢の高齢化は、trisomy type UPD 患者の割合の増加に強く関与しているものと考えられる。しかし、母親年齢の上昇が trisomy rescue type UPD 発症を招く詳細な機序や、出産年齢の上昇以外に UPD 患者の比率を上昇させる要因については、さらなる検討が必要である。第二に、生殖補助医療により生まれた患者が優位に多いことは、高齢出産とは別の生殖補助医療に関わる因子がPWSの発症に関連することを示唆する。その候補として、体外培養や排卵誘発剤の使用が危惧される。

## E. 結論

本研究は、生殖補助医療が遺伝的安全性のリスクとなりうること、したがって、生殖補助医療出生児のフォローアップが必須であることを示すものである。また、母体高齢化も、それ自体がインプリンティング疾患発症シルクになることを示すものである。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kagami M, Nagai T, Fukami M, Kazuki Yamazawa K, Ogata T. Silver-Russell syndrome in a girl born after *in vitro* fertilization: partial hypermethylation at the differentially methylated region of *PEG1/MEST*.

- Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 24 (4): 131–136, 2007.
2. Yamazawa K, Kagami M, Ogawa M, Horikawa R, Ogata T. Placental hypoplasia in maternal uniparental disomy for chromosome. *American Journal of Medical Genetics A* 146 (4): 514–516, 2008
  3. Kagami M, Sekita Y, Nishimura G, Irie M, Kato F, Okada M, Yamamori S, Kishimoto H, Nakayama M, Tanaka Y, Matsuoka K, Takahashi T, Noguchi M, Tanaka Y, Masumoto K, Utsunomiya T, Kouzan H, Komatsu Y, Ohashi H, Kurosawa K, Kosaki K, Ferguson-Smith AC, Ishino F, Ogata T. Deletions and epimutations affecting the human chromosome 14q32.2 imprinted region: implications for the phenotypic development in paternal and maternal uniparental disomy for chromosome 14. *Nature Genetics* 40 (2): 237–242, 2008.
  4. Hosoki K, Ogata T, Kagami M, Tanaka T, Saitoh S. Epimutation (hypomethylation) affecting the chromosome 14q32.2 imprinted region in a girl with upd(14)mat-like phenotype. *European Journal of Human Genetics* 16 (8): 1019–1023, 2008.
  5. Yamazawa K, Kagami M, Nagai T, Kondoh T, Onigata K, Maeyama K, Hasegawa T, Hasegawa Y, Yamazaki T, Mizuno S, Miyoshi Y, Miyagawa S, Horikawa R, Matsuoka K, Ogata T. Molecular and clinical findings and their correlations in Silver-Russell syndrome: implications for the critical role of *IGF2* as the growth determinant and the differential imprinting regulation of the *IGF2–HI9* domain in bodies and placentas. *Journal of Molecular Medicine* 86 (10): 1171–1181, 2008.
  6. Kagami M, Yamazawa K, Matsubara K, Matsuo N, Ogata T. Placentomegaly in paternal uniparental disomy for human chromosome 14. *Placenta* 29 (8): 760–761, 2008
  7. Yamazawa K, Kagami M, Fukami M, Ogata T. Monozygotic female twins discordant for Silver-Russell syndrome and hypomethylation of the *HI9-DMR*. *Journal of Human Genetics* 53 (10): 950–955, 2008.
  8. da Rocha ST, Edwards CA, Ito M, Ogata T, Ferguson-Smith AC. Genomic imprinting at the mammalian *Dkl1-Dio3* domain. *Trends in Genetics* 24 (6): 306–16, 2008.
  9. Ogata T, Kagami M, Ferguson-Smith AC. Molecular mechanisms regulating phenotypic outcome in paternal and maternal uniparental disomy for chromosome 14. *Epigenetics* 3 (4): 181–187, 2008.
  10. Hosoki K, Kagami M, Tanaka T, Kubota M, Kurosawa K, Kato M, Uetake K, Tohyama J, Ogata T, Saitoh S. Maternal uniparental disomy 14 syndrome demonstrates Prader-Willi syndrome-like phenotype. *Journal of Pediatrics* 155 (6): 900–903, 2009.
  11. 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* 93 (5): 461–472, 2009.
  12. Kagami M, O'Sullivan MJ, Green AJ, Watabe Y, Arisaka O, Masawa N, Matsuoka K, Fukami M, Matsubara K, Kato F, Ferguson-Smith AC, Ogata T. The IG-DMR and the *MEG3-DMR* at Human

Chromosome 14q32.2: Hierarchical Interaction and Distinct Functional Properties as Imprinting Control Centers. *PLoS Genetics* (in press).

H. 知的財産権の出願・登録状況

Estrogen receptor alpha gene, genomic DNA, and diagnosis marker. 米国特許出願 Patent No: US 7,601,828 B2、2009年10月13日

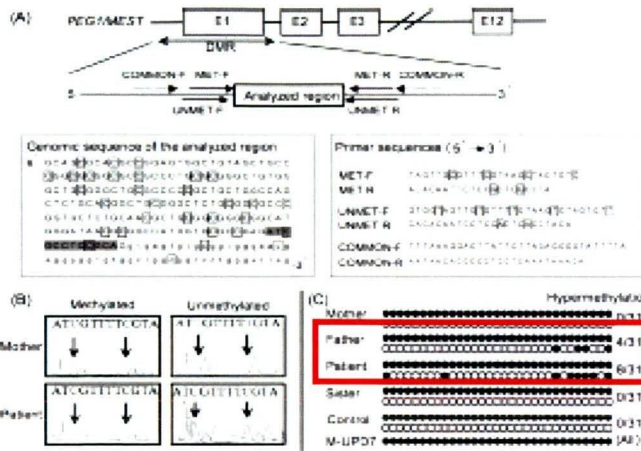


図1. 症例1における PEG1/MEST-DMR のメチル化解析. 父親において 4/31、児において 8/31 の過剰メチル化が認められる。

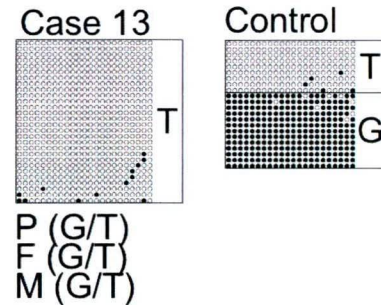
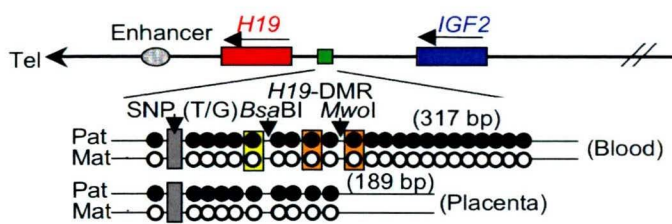


図2. 症例2における H19-DMR のメチル化解析. 高度の低メチル化が認められる。

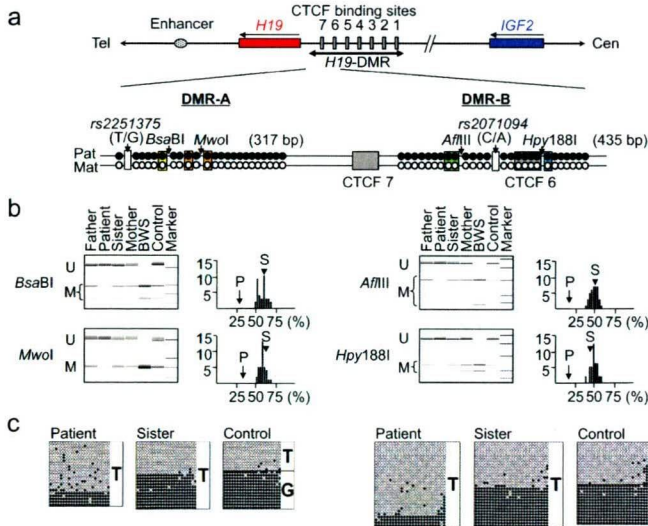


図3. H19-DMR のメチル化解析. 片方のみがシルバーラッセル症候群と H19-DMR の低メチル化を呈する一卵性双胎。A. 解析した H19-DMR の構造。ここは、父由来のときメチル化され父性発現遺伝子 IGF2 が作用し、母由来のとき非メチル化状態にあり母性発現遺伝子 H19 が作用する。黒丸はメチル化された CpG dinucleotides、白丸は非メチル化の CpG dinucleotides を示す。B. COBRA の成績。PCR 産物をメチル化アレルのみ特異的に切断する酵素 (BsaBI, MwoI, AfiIII, Hpy188I) で切断し、メチル化クローンと非メチル化クローンの比率を算出すると、姉妹 (S) の成績は正常者の範囲内にあるが、患者 (P) のデータは正常範囲より低い。C. Bisulfite sequencing の成績。各々のクローンをシーケンスすると、患者では非メチル化クローンが優位である。



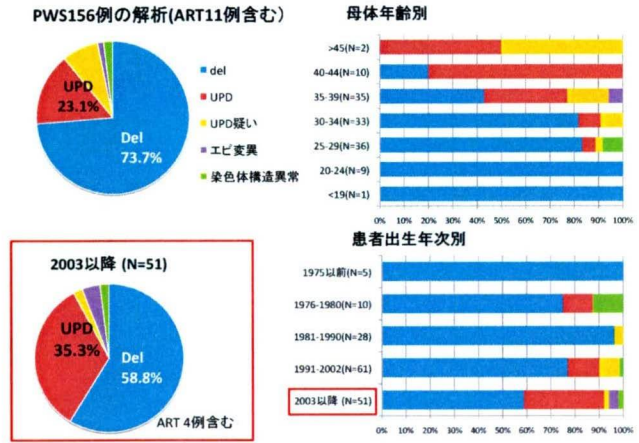


図4. 近年、卵由来の染色体不分離とその後のトリソミーレスキューによると考えられるダイソミータイプの患者が増えている。

患者および両親の年齢

	全体	del	UPD(疑い含む)	エビ変異	染色体異常	Del vs UPD
患者数	156	115	36	2	3	
M:F	97:59	76:39	18:18	2:0	1:2	
年齢 median (min-max)	11y6m (11m-53y)	13y2m (1y1m-53y)	6y5m (11m-30y)	3y7m (1y8m-5y5m)	18y (5y5m-29y3m)	
父親年齢(全体)	33y(21-53y)	32y6m(21-47y)	37y(28-53y)	41y6m(38-45y)	27y(27-31y)	p=0.0001
母親年齢(全体)	32y(19-48y)	30y(19-42y)	37y(29-48)	38y6m(38-39y)	26y(25-27y)	p=0.022
父親(ARTのみ)	42y(27-53y)	34y(27-42y)	42y6m(31-53y)			p=0.12
父親(ART除く)	33y(21-47y)	32y6m(21-47y)	36y(28-40y)			p=0.0043
母親(ARTのみ)	39y(26-45y)	34y(26-38y)	41y(32-45y)			p=0.087
母親(ART除く)	31y(19-48y)	30y(19-42y)	36y6m (29-48y)			p=3.2E-06

図5. このダイソミー患者増加は高齢出産と関連している。

UPD群の両親年齢が欠失群に比し有意に高い

ART症例の内訳

PWS156例中、ART症例は11例

	ART(+)	ICSI	IVF	AID	排卵誘発剤のみ	不妊外来通院
欠失	3	1	0	0	2	0
UPD	7	3	2	1	0	1
エビ変異	1	0	0	0	1	0
計	11	4	2	1	3	1

図6. 生殖補助医療出産児は有意に多い。

総出生数、PWS患者におけるART児の割合

	ART(+)	ART(-)	ART出生児の割合
PWS(2000-2004、自験例)	5*	66	7.0%
総出生数(2000-2004)	307237**	5442158	1.5%

\* Del 1名、UPD 4名  
\*\* IVF 191916, ICSI 115321

厚生労働省人口動態調査・日本産婦人科学会報告より作成

PWS群におけるART児の割合は、一般集団より高い

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）

総合研究報告書

生殖補助医療の医療技術の標準化、安全性の確保と生殖補助医療により生まれた児の長期予後の検証に関する研究

ARTの安全性に関する研究

分担研究者：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メチル化は、シトシンの可逆的な化学修飾で、哺乳類の発生と生存に必須のエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の代表例である。ART（生殖補助医療）後の出生児で、ゲノムインプリンティング異常症（DNAメチル化異常に伴う先天性奇形症候群）の発症率が上昇する可能性を示唆する報告がなされ、ART関連技術による生殖細胞や初期胚への影響の可能性が懸念されている。しかしこれまでの報告では、網羅的かつ定量的なDNAメチル化異常が解析されておらず、重篤な症状を呈する症例以外ではその生理的あるいは病理的意義を評価することが困難であった。

本分担研究計画で我々は、ART後妊娠症例のDNAメチル化異常の有無を確定的に解析することを目的とし、臨床的分子診断に資するDNAメチル化解析系を確立した。具体的には、異なる染色体上の、異なる生理的機構によってメチル化される領域（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）を網羅した解析対象領域を設定し、解析条件を詳細に検討し、網羅的定量的DNAメチル化解析系を確立した。既知のDNAメチル化異常疾患を試験的に解析し、我々の解析系が臨床的実用性のあることを確認した。また、流産、子宮内胎児発育遅延症例で、DNAメチル化異常を示唆する結果が得られた。我々の解析した、ART後妊娠に子宮内胎児発育遅延を来した12症例は、DNAメチル化異常が見出されていないが、関連性の評価には、今後さらに多数症例の解析が必要であると考えられる。

A. 研究目的

2003年にヒトゲノムプロジェクトが完了し、遺伝子配列が全て明らかとなり、遺伝子変異を同定する技術（ジェネティックな異常の同定技術）が飛躍的に進歩した。一方で、遺伝子変異（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。その最たるものが、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の破綻による疾患や発生異常である。エピジェネティクスと疾患との関連は、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最も重要な医学研究領域である。

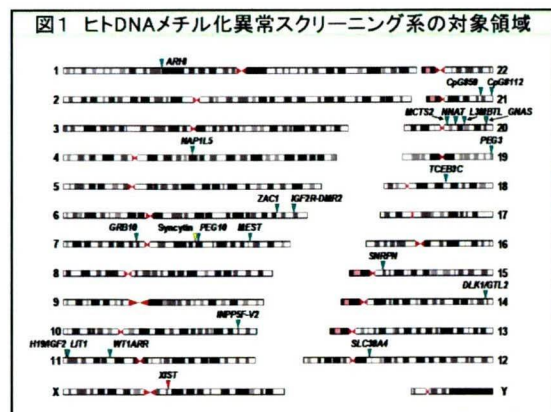
エピジェネティックな生命現象の代表例として、ゲノムインプリンティング現象が挙げられる。インプリンティング遺伝子と呼ばれる一群の遺伝子は、配偶子形成過程で、精子と卵子では異なる DNA メチル化修飾を受ける。その結果、受精卵に受け継がれる父由来のインプリンティング遺伝子と母由来のインプリンティング遺伝子は、同じ配列であっても、DNA メチル化修飾状態に違いがあるため、常に片親性発現する。ゲノムインプリンティングが破綻しているインプリンティング異常症では、様々な発生異常が観察される。また、モデル生物の詳細な解析から、エピジェネティックな異常やゲノムインプリンティングの破綻は、絨毛・胎盤の発生分化異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は、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、ヒトの流産やその他の発生異常におけるエピジェネティックな破綻の有無は、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組織の DNA メチル化基準値も定義されるに至っていない。

本研究では、正常な発生の指標のひとつとして、DNA メチル化によるエピジェネティックな遺伝子制御の異常の有無に着目し、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する。更に、実際にヒト検体を用いた DNA メチル化解析を行い、ART の安全性を評価する新たな手法を開発する事を目的とする。

## B. 研究方法

### 1. 解析標的領域の決定

前述のように、ART 後の出生児では、ゲノムインプリンティング異常の発生リスクが高まる可能性が懸念されている。報告されたゲノムインプリンティング異常は、特定領域の DNA メチル化状態の破綻を原因としている。このような領域 (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る領域、DMR: Differentially Methylated Region) が存在する。そこで、現在までに報告されている全てのヒト DMR を、文献的に検索した。また、ヒトでは報告されていないが、マウスゲノム配列との比較から、ヒトでも DMR が存在すると推定される領域を選定した。これらの領域は、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、我々の実験系で実際に DMR である事を再確認した。これらの DMR に加え、胎盤の発生に必須であると予想されている DNA メチル化領域 (胎盤で特異的な DNA メチル化を受ける領域、X 染色体上の DNA メチル化領域) も選定し、合計 32 ヶ所を解析対象領域とした (図 1)。



## 2. COBRA 条件検討

上記選定された領域を、バイサルファイト変換法と制限酵素感受性試験を組み合わせた COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis) 法により解析するために、詳細な条件検討を行った。解析対象ゲノム領域内配列から、PCR 法による増幅の際に偏りが無く効率的な反応が起こり、かつ増幅産物長が約 500bp 以下になるような部分を選び、至適 PCR 条件を検討した。また、増幅産物を特定の制限酵素で切断するため、上記領域内に適切な制限酵素認識配列が一ヶ所以上存在する事が必須である。解析するゲノム DNA は、前述のようにバイサルファイト変換により非メチル化シトシンがウラシルに、そしてその後の PCR 反応で最終的にチミンに変換されるため、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てしまう。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、非特異的な増幅反応が起こりやすい。しかし、これらを事前に予測することは困難であり、各領域ごとに複数回の試行を行い、最適な条件を決定した。一方で、解析をハイスループット化する為、PCR の反応条件は可能な限り統一した。

## 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、測定値の

定量性を厳密に担保するために、キャピラリースループット解析を実現化するために、並列キャピラリー電気泳動装置を利用した。

## 4. 倫理面への配慮

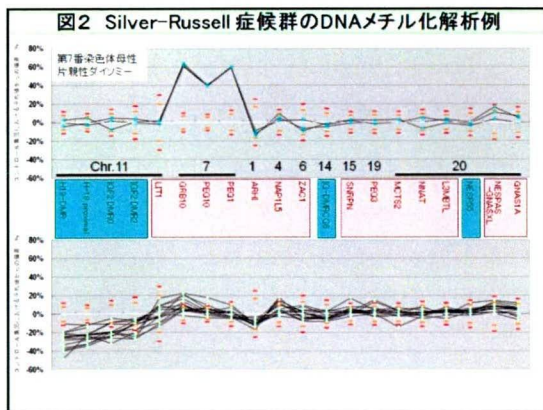
倫理面においてはヒトゲノム・遺伝子研究に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針、臨床研究に関する指針を遵守する。また本研究内容は、報告者の所属する機関の倫理委員会の承認を受けている(国立成育医療センター倫理委員会承認番号 234)。

## C. 結果

本解析主義の原理上避け難い実験誤差は、初年度の条件検討により、解析に影響のない程度にまで排除することができた。次に、正常末梢血由来のゲノム DNA を用いた解析を行ない、検体間および検者間差を生じやすい因子(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)を見極め、精度維持に必要な評価法を確立した。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ールを作成した。これらの予備的な解析から、ヒト検体の解析では、正常検体でもある程度の“エピゲノム多様性”が観察されることが予想されたので、さらに、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、以前の諸家の報告では 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

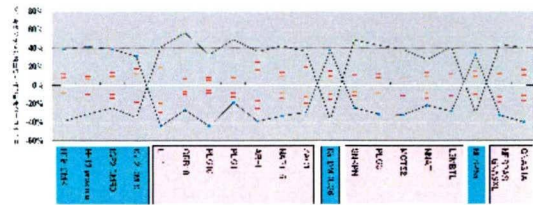
とも胎盤組織で DMR を形成していないと考えられる領域（組織特異性があると考えられる領域）が存在した。これらの領域は、我々の網羅的解析系から除き、最終的に 24 箇所の DMR、X 染色体 1 領域、反復配列 2 種類、合計 27 領域に対する DNA メチル化解析系を確立した。本解析系を用い、正常末梢血と正常分娩胎盤の測定値を元に、DNA メチル化の「正常値」を定義した。

本解析系の有用性を検証するために、すでに確定診断されていたインプリンティング疾患の末梢血を用いて網羅的 DNA メチル化解析を行った。これらの疾患は、前述のように、ART 後の出生児で発症が増加する可能性が懸念されている疾患であり、いわば、想定している DNA メチル化異常を同定するためのポジティブコントロールである。我々の解析結果は、従来の定性的な解析法と矛盾の無い、正確な診断を行うことができた（図 2）。



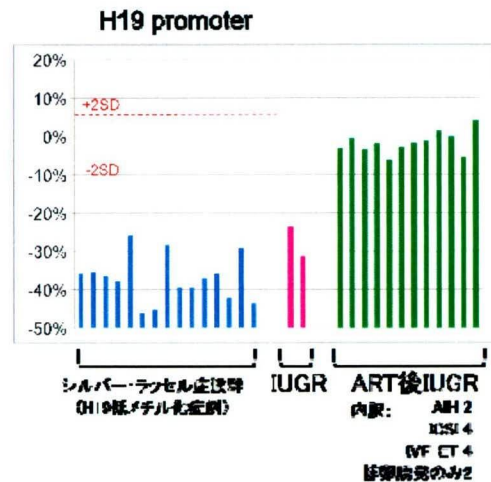
加えて、網羅的な解析を行うことで、初めて疾患関連領域以外の DNA メチル化異常が明らかとなり、雌性発生モザイク症例、雄核発生モザイク症例といった、きわめて稀な疾患がこれらのインプリンティング異常症例に含まれていたことを明らかにした（図 3）。

図3 本スクリーニングで捕捉された稀な発生異常症例



子宮内胎児発育遅延を伴う ART 後妊娠症例（内訳；AIH 2 例、ICSI 4 例、IVF-ET 4 例、排卵誘発のみ 2 例）を解析し、現在までのところ DNA メチル化異常は見出されていない（図 4）。

図4 ART後妊娠IUGR症例のDNAメチル化解析



ART後にIUGRを発症した12症例（緑カラム）を解析しても、現時点では明らかな DNA メチル化異常を見出さない。ただし、自然妊娠後のIUGR（赤紫カラム）でも2.5%程度にメチル化異常が見つかる事から、更に多数症例の解析が必要と考えられる。

### 考察

エピジェネティックな遺伝子発現機能の制御は、発生と生存に必須の機構である。特に、エピジェネティックな遺伝子発現制御の代表例であるゲノムインプリンティングは、DNA メチル化によって制御され、胎児や胎盤の発生・分化・発育に密接に関連

している。一方、DNA メチル化は可逆的な化学的修飾であるため、環境から影響を受けることが知られている。実際にモデル動物を用いた研究では、胚培養が初期胚の DNA メチル化状態に変異をもたらすことが示されている。これらの結果に合わせ、前述のように、生殖補助医療によって出生した児でインプリンティング疾患の発症率が高くなる可能性を示唆する報告もなされたことから、ヒト初期胚でも、生殖補助医療における生殖細胞や初期胚への操作が、何らかの化学的修飾の変化（エピジェネティックな変異）をもたらす可能性が懸念されている。しかし、ヒト症例で DNA メチル化異常を解析した報告はいずれも、疾患関連候補因子遺伝子周辺の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ため、エピゲノム異常という概念で疾患を評価することができなかつた。そもそも、正常末梢血や正常胎盤の DNA メチル化状態の標準値（正常値）も明らかでない。このため、仮に偏った DNA メチル化状態が疾患群に観察されても、因果関係を示唆するに止まり、確定的な結論に至ることが困難であった。

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。この系を用い、まず正常胎盤および正常成人末梢血 DNA メチル化状態を測定し、「正常値」を定義した。また、既知の DNA メチル化異常症例を用い、我々の解析系を検証したところ、従来の診断法と矛盾なく、かつ稀な病態を同定することに成功した。このように、我々の解析系は、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た。そこで、子宮内胎児発育遅延を伴う ART 後妊娠症例の

解析を行った。ART 後妊娠症例での発症が懸念されているインプリンティング異常疾患は、胎児発育異常（子宮内胎児発育遅延あるいは過形成）を呈する。また、様々なモデル生物等の解析から、DNA メチル化異常に伴うインプリンティング異常は、胎児や胎盤の発生発育に影響することが知られている。よって、典型的インプリンティング異常症の診断基準を満たしていなくても、子宮内胎児発育遅延を呈する症例は、DNA メチル化異常を伴う可能性が考えられる。今回解析した子宮内胎児発育遅延を伴う ART 後妊娠 12 症例（内訳；AIH 2 例、ICSI 4 例、IVF-ET 4 例、排卵誘発のみ 2 例）には、DNA メチル化異常は認められなかったが（図 3 ???）。しかし、我々が並行して別途進めている自然妊娠後の子宮内胎児発育遅延症例でも、DNA メチル化異常率は 2.5% 程度であり、DN 今後更に症例数を増やして解析する必要があると考えられる。

## 結論

我々が本分担研究で確立した DNA メチル化異常スクリーニング法は、既存の分子診断法と矛盾無く、かつ既存の診断法より感受性と定量性に優れた診断法として実用性がある。また、これまで看過されていた特殊な病態も検出可能である事が示された。今後は解析症例をさらに増やし、生殖補助医療後妊娠とゲノムインプリンティング異常症（DNA メチル化異常）との因果関係の有無の理解に大きく寄与できると考える。

近年報告された、いくつかの研究結果では、生殖補助医療技術と DNA メチル化異常発生やゲノムインプリンティング疾患発症との

関連は低いと結論付けられている。しかしこれらの報告は、少なくとも DNA メチル化に関しては限られた領域を定性的に解析しているため、関連性を否定する証拠としては不十分と考える。今後本研究をはじめとする類似の研究で網羅的なエピゲノム解析知見が蓄積すれば、ART 後のゲノムインプリンティング疾患にとどまらず、広く疾患とエピゲノム異常の関連を解析する基礎データとして活用されることが期待される。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表 (別紙にも同内容を記載)

- 1) Takashima, S., Takehashi, M., Lee, J., Chuma, S., Okano, M., Hata, K., Suetake, I., Nakatsuji, N., Miyoshi, H., Tajima, S., Tanaka, Y., Toyokuni, S., Sasaki, H., Kanatsu-Shinohara, M. and Shinohara, T. (2009) Abnormal DNA methyltransferase expression in mouse germline stem cells results in spermatogenic defects. *Biol Reprod.* 81, 155-164.
- 2) Shoji, M., Tanaka, T., Hosokawa, M., Reuter, M., Stark, A., Kato, Y., Kondoh, G., Okawa, K., Chujo, T., Suzuki, T., Hata, K., Martin, S. L., Noce, T., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Sasaki, H., Pillai, R. S., Nakatsuji, N. and Chuma, S. (2009) The TDRD9-MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline. *Dev Cell.* 17, 775-787.
- 3) Kobayashi, H., Yamada, K., Morita, S., Hiura, H., Fukuda, A., Kagami, M., Ogata, T., Hata, K., Sotomaru, Y. and Kono, T. (2009) Identification of the mouse paternally expressed imprinted gene *Zdbf2* on chromosome 1 and its imprinted human homolog *ZDBF2* on chromosome 2. *Genomics.* 93, 461-472.
- 4) Henckel, A., Nakabayashi, K., Sanz, L. A., Feil, R., Hata, K. and Arnaud, P. (2009) Histone methylation is mechanistically linked to DNA methylation at imprinting control regions in mammals. *Hum Mol Genet.* 18, 3375-3383.
- 5) Kuramochi-Miyagawa, S., Watanabe, T., Gotoh, K., Totoki, Y., Toyoda, A., Ikawa, M., Asada, N., Kojima, K., Yamaguchi, Y., Ijiri, T.W., Hata, K., Li, E., Matsuda, Y., Kimura, T., Okabe, M., Sakaki, Y., Sasaki, H., and Nakano, T. (2008). DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes Dev* 22, 908-917.
- 6) Hu, Y.G., Hirasawa, R., Hu, J.L., Hata, K., Li, C.L., Jin, Y., Chen, T., Li, E., Rigolet, M., Viegas-Pequignot, E., Sasaki, H., and Xu, G.L. (2008). Regulation of DNA methylation activity through Dnmt3L promoter methylation by Dnmt3 enzymes in embryonic development. *Hum Mol Genet* 17, 2654-2664.

- 7) Kato, Y., Kaneda, M., Hata, K., Kumaki, K., Hisano, M., Kohara, Y., Okano, M., Li, E., Nozaki, M., and Sasaki, H. (2007). Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Hum Mol Genet* 16, 2272-2280.

[総説 (和文) ]

- 1) 秦健一郎 (2009) 「DNA メチル化の網羅的解析」医学のあゆみ 230, 553-554.  
 2) 久須美真紀、中林一彦、秦健一郎 (2008). 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.  
 3) 秦健一郎 (2008). 死産の動物モデル. *産科と婦人科* 75, 419-425.

2. 学会発表

[特別講演・シンポジウム]

シンポジウム

- 1) 秦健一郎「ヒト発生異常のエピジェネティクス」胎生期エピジェネティクス研究会、東京、6月17日、2009.  
 2) 秦健一郎「胎児・胎盤分化発育異常のエピジェネティクス - 網羅的ゲノム・エピゲノム解析の試み-」日本周産期新生児学会ワークショップ不育症の新たな原因探索と治療、第45回日本周産期・新生児医学会学術集会、横浜、7月12日、2009.  
 3) 秦健一郎「異常妊娠の epigenetics」第

50 回日本哺乳動物卵子学会ワークショップ、東京、5月9日、2009.

- 4) Kenichiro Hata. " Roles of genomic imprinting in reproduction", The 7th Conference of the Pacific Rim Society for Fertility and Sterility, Taipei, August 22, 2009.  
 5) Keichiro Hata. " Epigenetics in abnormal pregnancies", The 7th Conference of the Pacific Rim Society for Fertility and Sterility, Taipei, August 22, 2009.  
 6) 秦 健一郎「異常妊娠のエピジェネティクス」日本人類遺伝学会第53回大会、周産期遺伝学の現状と展望-生殖医療と遺伝をめぐって-、横浜、9月28日、2008.  
 7) 秦 健一郎、「生殖機構のエピジェネティクス」大阪大学蛋白質研究所セミナー 大阪、11月28日、2008.  
 8) Kenichiro Hata, "Characterization of DNA methylation in abnormal pregnancies", International symposium Decoding Epigenetic Code, Tokyo, December 15, 2008.

[一般演題発表]

- 1) 中林一彦、吉田亘、山澤一樹、緒方勤、秦健一郎「DNA メチル化プロファイリングによるゲノムインプリンティング領域の網羅的解析」日本人類遺伝学会第54回大会、東京、5月25日、2009.  
 2) Kazuhiko Nakabayashi, Wataru Yoshida, Kazuki Yamazawa, Maki Kusumi, Tsutomu Ogata, and Kenichiro Hata. "MeDIP-chip detection and



quantitative DNA methylation analysis of differentially methylated regions in imprinted loci." The American Society of Human Genetics 59<sup>th</sup> Annual Meeting, Hawaii, October 22, 2009.

- 3) 吉田 亘・中林 一彦・田山 千春・久須美 真紀・佐藤 俊・秦 健一郎  
「MeDIP-Chip 法による新規 DNA メチル化可変領域 (DMR) の探索」第三回日本エピジェネティクス研究会、東京、5月22日、2009.
- 4) 吉田 亘、中林 一彦、山澤 一樹、永江 玄太、油谷 浩幸、緒方勤、秦 健一郎「DNAメチル化プロファイリングによるゲノムインプリンティング領域の網羅的解析」文部科学省特定領域研究生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク第2回公開シンポジウム、東京、11月26日、2009.
- 5) 吉田 亘、中林 一彦、田山 千春、久須美 真紀、佐藤 俊、秦 健一郎

"Identification of novel maternal differentially methylated regions (DMRs) and imprinting gene using MeDIP-Chip assays"第32回日本分子生物学会年会、横浜、12月11日、2009.

- 6) 山口裕子、鳥巢弘道、中林一彦、田辺香子、田山千春、菅原直子、佐々木裕之、森崇英、北折珠央、杉浦真弓、秦健一郎  
「異常妊娠のエピゲノム解析」第54回日本人類遺伝学会、東京、9月25日、2009.
- 7) 秦 健一郎、「異常妊娠のゲノム・エピゲノム解析」日本生殖再生医学会第3回学術集会、東京、3月30日、2008.
- 8) 秦 健一郎、「異常妊娠のゲノム・エピゲノム解析」日本生殖再生医学会第3回学術集会、東京、3月30日、2008.

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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
Takashima S, Takehashi M, Lee J, Chuma S, Okano M, <u>Hata K</u> , Suetake I, Nakatsuji N, Miyoshi H, Tajima S, Tanaka Y, Toyokuni S, Sasaki H, Kanatsu-Shinohara M and Shinohara T.	Abnormal DNA methyltransferase expression in mouse germline stem cells results in spermatogenic defects.	Biol Reprod	81	155-164	2009
Shoji, M., Tanaka, T., Hosokawa, M., Reuter, M., Stark, A., Kato, Y., Kondoh, G., Okawa, K., Chujo, T., Suzuki, T., <u>Hata, K.</u> , Martin, S. L., Noce, T., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Sasaki, H., Pillai, R. S., Nakatsuji, N. and Chuma, S.	The TDRD9-MIW12 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline.	Dev Cell	17	775-787	2009
Kobayashi, H., Yamada, K., Morita, S., Hiura, H., Fukuda, A., Kagami, M., Ogata, T., Hata, K., Sotomaru, Y. and Kono, T.	Identification of the mouse paternally expressed imprinted gene Zdbf2 on chromosome 1 and its imprinted human homolog ZDBF2 on chromosome 2.	Genomics	93	461-472	2009
Henckel, A., Nakabayashi, K., Sanz, L. A., Feil, R., Hata, K. and Arnaud, P.	Histone methylation is mechanistically linked to DNA methylation at imprinting control regions in mammals.	Hum Mol Genet	18	3375-3383	2009
秦健一郎	DNAメチル化の網羅的解析	医学のあゆみ	230	553-554	2009
Hu YG, Hirasawa R, Hu JL, <u>Hata K</u> , 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
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
秦健一郎	死産の動物モデル	産科と婦人科	75	419-425	2008

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）  
総合研究報告書

生殖補助医療の医療技術の標準化、安全性の確保と生殖補助医療により生まれた児の長期予後の検証に関する研究  
主任研究者 吉村泰典 慶應義塾大学医学部 教授

分担総合研究報告書  
生殖補助技術の安全・品質管理

（平成 19 年；欧州における ART の安全管理）  
（平成 20 年；高解像度顕微鏡による精子選別と選別精子による ICSI）  
（平成 21 年；我が国における卵子提供由来分娩に関わる実態調査及び  
周産期母子センター担当者の意識調査）

分担研究者 久慈直昭 慶應義塾大学医学部 講師

（研究要旨）

第一に今後わが国の ART 管理体制を考慮するモデルケースとして 2004 年、EU 議会が採択した「ヒト組織および細胞の提供、採取、検査、加工、維持、保存、分配のための品質および安全性の基準設定に関する指針」（生殖細胞をその範囲に含む）その現状を調査した。技術的な規定、とくに空気清浄度の規定に関しては、高い空気清浄度をすべての ART 施設に準備することは非現実的であるという意見があった。このような意見を考慮し、2006 年版の EU directive<sup>1</sup>では、原則的に組織を扱う区域の清浄度は grade A が求められるが、特殊な場合でその妥当性が文書で明らかにされれば、例外を認めるとされた。

また近年普及しつつある、油浸レンズとモニタ画面上での拡大により高解像度で精子頭部微細構造を確認、異常のない精子を選別して顕微授精を行う手法（Intracytoplasmic Morphologically selected Sperm Injection: IMSI）について、その有用性を検討した。その結果、現在 ICSI に通常使用されている 400 倍の観察で正常と認められた精子 10 匹を高解像度 1000 倍で観察したところ、おのおの 3 匹、2 匹に異常が認められた。さらに当院で ICSI を行った 5 症例の 1) 高解像度顕微鏡観察結果、2) Kruger の診断基準による精子正常形態率、そして 3) Comet 法にて正常パターンを示す精子の割合を示した。結果として、高解像度による精子観察によって空胞のない形態良好精子を認めるものは Kruger 基準による正常形態率が高く、また Comet 法により DNA 正常精子率が高い傾向にあった。

卵子提供妊娠分娩に関する予後調査では、周産期母子センターに対して行った調査の結果、我が国における卵子提供妊娠・分娩の全分娩に対する割合は漸増しており、その割合は10000例に1例程度である。卵子提供妊娠はその年齢分布からも、およそ3つの適応の異なる対象群に分けられる可能性がある。全体として見た場合、卵子提供妊娠では妊娠高血圧の合併が多く、また異常出血の頻度が高いことが示唆された。母子センター担当者の過半数が卵子提供後妊娠・分娩は合併症が多く、周産期母子センターで取り扱うべきであると考えていた。

共同研究者

なし

#### A 研究目的

生殖補助技術（以下 ART）は、挙児希望の患者の大多数が最終的に本技術を利用していると考えられ、また生まれてくる児もわが国全出生の1%以上を占めるようになってきていることから、総括的な品質管理・安全性確保はこれまで以上に必要性を増しているとともに、国民的にも関心が高い。しかし管理の実際をどのようにするかについては、日本産科婦人科学会の会告はあるものの、現時点では強制力のあるものではなく、実質的には各施設の自律的な品質管理に負うところが大きい。また、次々と新しく発表される治療技術は、時に効率と安全性検証がないまま ART 臨床で使用されることがある。

本研究では第一に、2004年、EUが欧州議会で採択した「ヒト組織および細胞の提供、採取、検査、加工、維持、保存、分配のための品質および安全性

の基準設定に関する指針」（以下 EU directive 2004、あるいは本指針）を、ARTの管理指針として解析した。本指針は、第一にこれが生殖細胞を含んだ指針であること、第二に採択された当初大きな論争がEU加盟各国からわき起こり、現在でもこれを批准していない国があるなど発展途上の指針であることから、わが国がARTの安全管理・品質管理のあり方を考える上で大きな参考となるとおもわれる。そこで本研究では、このEU directive 2004を紹介するとともに、現在の欧州での状況を調査し、今後わが国のART体系に本指針のような管理体制を適用する際に注意すべき点を、この指針採択とともに起こっている問題・議論とともに検討した。

第二に強拡大顕微鏡による選別精子を用いたICSIについて実験的検証を行った。近年油浸レンズとモニタ画面上での拡大によって、精子頭部の微