

5' -AGTGCCCTTTTCATCAACTTC-3'
GAPDH センス:

5' -CATCACCATCTTCCAGGAGC-3'
GAPDH アンチセンス:

5' -TAAGCAGTTGGTGGTGCAGG-3'

PZ, ZPI および GAPDH はそれぞれ、28, 25, および 18 サイクルの PCR を行った後に、PCR 産物を 2.0% アガロースゲル泳動にて検出した。デンストメーターを用いて各バンドの濃さを半定量的に測定した。

2) PZ 発現調節のルシフェラーゼアッセイによる解析

プロゲステロンが PZ の発現に寄与する機構を明らかにするため、PZ 遺伝子の 5' 上流領域(-3058/+11)を挿入した pGL3-basic ルシフェラーゼベクターを用いてルシフェラーゼ活性測定をおこなった。10 μ g のレポーターベクターおよび β ガラクトシダーゼベクターを 3 x 10⁵ 個の HepG2 細胞にトランスフェクトし、24 時間培養した後に 1 μ g/mL の濃度となるようプロゲステロンを添加し、48 時間後にルシフェラーゼアッセイに供した。

3) 組換え ZPI の哺乳類細胞と昆虫細胞での発現

新しい ZPI のアッセイ系を開発し、標準タンパク質として用いる為に必要な組換えタンパク質を発現する細胞の樹立を試みた。DsRed タグとの融合 ZPI cDNA を BHK 細胞に一過性に導入し、無血清培地で 24 時間インキュベートした後に回収した培地および細胞溶解物を、抗 ZPI ポリクロナール抗体 MQ-126 (共同研究者より供与されたもの)あるいは H-137 (市販のもの)を用いたウエスタンブロットにより解析した。

安定発現株を樹立する為に、BHK 細胞に ZPI 発現ベクターを導入後 G418 で選別し、得られたクローンの培養上清を抗 ZPI 抗体 MQ-126 を用いてウエスタンブロット解析によりスクリーニングした。BHK-ZPI の培養上清 (0.2% BSA-DMEM) 1 mL に硫酸、PEG をそれぞれ 45, 75%、10, 20% になるように加えて、生じた沈殿を溶解後ウエスタンブロット解析した。次に、BHK-ZPI の培養上清 90 mL から 75%硫酸で沈殿したタンパク質を透析脱

塩後、Heparin-Sepharose カラム (0.5 mL) にアプライした。0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.4) で洗浄後、0.1-1 M リン酸緩衝液の濃度勾配で吸着タンパク質を溶出した。

バキュロウイルス発現系でより大量の組換えタンパク質を得る為に、組換え型ウイルスを作製した。組換えウイルスを Sf21 細胞に感染後、3 日間血清フリー培地で培養して培地を回収し、抗 ZPI 抗体 MQ-126 を用いてウエスタンブロット解析を行った。

4) ヒト血漿からの ZPI 蛋白質精製の検討

Han らによって報告されている精製手順 (Proc Natl Acad Sci USA, 1998)を参考にし、

Step 1: クエン酸バリウム沈殿によるビタミン K 依存性タンパク質の除去

Step 2: 硫酸分画 (45-75%画分)

Step 3: ポリエチレングリコール(PEG)分画 (7.5~18%画分)

Step 4: 陽イオン交換クロマトグラフィー (Phosphocellulose)

Step 5: ヘパリンセファロース

について、一部のステップを組み合わせて別々に実施し、精製効率の検討を行った。

Step 3 については、ヒト凍結血漿 10 mL をクエン酸バリウム吸着後、上清について硫酸分画を行った。沈殿を 10 mL の 20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM diisopropylfluorophosphate (DFP) に溶解した。次に、各硫酸画分に PEG を添加して分画した。沈殿は 5 mL の 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.4), 1 mM DFP に溶解した。Step 4 については、90 mL の凍結血漿をバリウム吸着後、30-75%硫酸画分、7.5-18% PEG 画分を順次回収し、40 mL の 0.1% Tween 20, 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.4), 1 mM DFP に溶解したものを Phosphocellulose P-11 (15 mL) を用いて陽イオン交換クロマトグラフィーを行った。20~500 mM リン酸緩衝液の濃度勾配にて吸着タンパク質を溶出した。Step 5 については、Phosphocellulose 画分 (6-10)を 0.1% Tween 20 で 3 倍に希釈後、Heparin-Sepharose カラム (4 mL) にアプライした。20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.4)で洗浄後、20~500 mM リン酸緩衝液の濃度勾配にて吸着タンパク質を溶出

した。

各精製のステップの前後で、ZPI を抗 ZPI ポリクロナール抗体 MQ-126 を用いたウエスタンブロットにより検出した。

(倫理面への配慮)

本研究の組換え DNA 実験については山形大学遺伝子組換え実験安全委員会の、動物実験については山形大学動物実験委員会の審議と承認を得て行う。

C. 研究結果

1) PZ および ZPI の発現量に対するエストラジオールおよびプロゲステロンの影響

PZ および ZPI のエストラジオールおよびプロゲステロンによる発現の変化を調べたところ、PZ は、エストラジオールの添加では有意な発現の増加が見られなかったが、プロゲステロンの添加により有意に発現が亢進した ($p < 0.05$)。エストラジオールとプロゲステロンを同時に添加すると、更に発現が亢進する傾向が見られた。一方、ZPI は、エストラジオールおよびプロゲステロンを添加しても、その発現に有意な差が見られなかった。

2) PZ 遺伝子発現に対するエストラジオールおよびプロゲステロンの影響

ルシフェラーゼアッセイの結果でも、RT-PCR と同様に、PZ 遺伝子を導入した細胞をプロゲステロンで処理すると有意に発現活性が亢進することが観察された ($p < 0.005$)。一方、エストラジオール添加では有意な差は見られなかった。

3) 組換え ZPI の哺乳類細胞及び昆虫細胞での発現

抗 ZPI ポリクロナール抗体 MQ-126 によって、DsRed 融合 ZPI が約 80 KDa の位置にウエスタンブロットで培養上清中に検出された。別の H-137 を用いたウエスタンブロットでも、DsRed 融合 ZPI が約 80 KDa の位置に検出されたが、やや感度は低かった。これにより、哺乳動物細胞発現系で分泌型組換え ZPI タンパク質を発現することが可能であることが確認された。次に、安定発現細胞株を樹立して、組換えタンパク質をより多く発現するクローン

を得た。組換え ZPI は、0-45%より 0-75%硫安分画に多く、0-20%よりも 0-10%PEG 分画に多く得られた。Heparin-Sepharose カラムクロマトグラフィーでは、組換え ZPI はフラクション 4-7 に溶出された。

単離した組換えバキュロウイルス (rbvZPI) を感染させた Sf21 細胞の培地を回収し、抗 ZPI 抗体 MQ-126 を用いてウエスタンブロット解析を行ったところ、分子量約 58kDa と哺乳類細胞で発現した組換え ZPI よりやや小さかった。これは、昆虫細胞では、炭水化物付着部位に糖の付加がされていないためと思われる。

4) ヒト血漿からの ZPI 蛋白質精製

硫安分画では、0-45%、45-75%の両分画に ZPI タンパク質が現れ、Han らの報告と異なり 0-45%により多く得られた。PEG 分画では、0-7.5%、7.5-17.5%の両分画に ZPI タンパク質が現れ、0-7.5%により多く得られた。Phosphocellulose P-11 (15 mL) を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーでは、フラクション 7-10 に ZPI タンパク質が溶出された。Heparin-Sepharose クロマトグラフィーでは、フラクション 6-8 に ZPI タンパク質が溶出された。ただし、フラクション 4, 5 にも大量のアルブミンの干渉を受けたと思われるバンドの痕跡が認められた。

D. 考察

前年度の研究により、ZPI と PZ の血中レベルが妊娠期に上昇すること、不育症においては不変であることが発見されたが、その正常妊娠における生理的意義、不育症における因果関係は不明であり、妊娠時に増加する女性ホルモンの両遺伝子の発現調節機構に対する影響も全く解明されていない。

両者を発現する肝癌細胞の培養系で、エストロゲンとプロゲステロンの影響を調べたところ、プロゲステンによって PZ 遺伝子の発現が有意に増加すること、ZPI 遺伝子の発現は不変であることが判明した。更に、エストロゲンとプロゲステロンの ZPI と PZ の血中レベルの変動のメカニズムや妊娠維持に果たす役割、意義を追究する必要がある。

哺乳動物細胞発現系及びバキュロウイルス発現系の両者で、組換え ZPI タンパク質を発現することが可能であることが確認された。昆虫細胞で発現された組換え ZPI のバンドの分子量は約 58kDa と哺乳類細胞で発現されたものよりやや小さかったが、炭水化物付着部位に糖の付加がないためと思われ、このバンドは目的の ZPI タンパク質であることを示していると考えられた。

血漿からの ZPI タンパク質の精製の各ステップの条件検討を行ったところ、それらしい分子量のバンドが特異的抗体を用いたウェスタンブロッティングで検出された。今後、精製組換え ZPI を用いて、より特異性の高い抗体を検索もしくは作製し、その抗体と本抗体を用いて新 ELISA アッセイ系を構築する予定である。

ただし、ウェスタンブロッティングによるスクリーニングでは、ZPI がアルブミンとほぼ同じ移動度を示すため、膜への転写効率が低下し検出に影響があることも明らかである。従って、極力早い段階でアルブミンと分離することや、ZPI の抗凝固活性を指標とすることも検討したい。血漿 ZPI 濃度は~3 mg/L であるので、各ステップの収率から概算すると、数百 mL の血漿が必要と思われる。

E. 結論

妊娠期における ZPI と PZ の血中レベルの変動に関与する女性ホルモンのそれぞれの遺伝子の発現機構に対する影響の一端が明らかになり、病態の解明に一步前進した。

また、ZPI の組換えタンパク質の生合成に成功し、これを検出する特異的抗体も確認したので、新 ELISA アッセイ系の開発に着手することが可能になった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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, 113(6): 3857-3864.

- 2) 一瀬白帝: 不育症と凝固XIII因子. 日本血栓止血学会誌, 2009; 20(5): 519-526.
2. 学会発表
 - 1) 岩田宏紀, 杉浦真弓, 一瀬白帝: 正常妊娠と不育症におけるプロテインZおよびプロテインZ依存性プロテアーゼインヒビターの動態. 第9回TTMフォーラム学術集会, 東京: 2009年3月7日
 - 2) 岩田宏紀, 杉浦真弓, 一瀬白帝: 妊娠および不育症におけるプロテインZおよびプロテインZ依存性プロテアーゼインヒビターの動態. 第32回日本血栓止血学会学術集会, 北九州; 2009年6月4-6日
 - 3) Souri M, Iwata H, Zhang WG, Nakagaki T, Ichinose A: γ -Glutamyl carboxylase is a cargo receptor for vitamin K-dependent proteins. XXII International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) Congress with 55th Annual Scientific and Standardization Committee (SSC) Meeting, July 11-16, 2009, Boston, MA, USA
 - 4) 惣宇利正善, 岩田宏紀, 張 偉光, 中垣智弘, 一瀬白帝: 翻訳後修飾反応を触媒する γ グルタミルカルボキシラーゼは基質タンパク質の細胞内輸送における積荷受容体として働く. 第17回山形分子生物学セミナー, 鶴岡; 2009年12月16日

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 inefficient, vitamin K-dependent and warfarin-sensitive secretion.	Blood	113(6)	3857-3864	2009
<u>一瀬白帝</u>	不育症と凝固 XIII 因子.	日本血栓止血学会誌	20(5)	519-526	2009

分担研究報告 30

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

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

研究要旨

流産、不育つなが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。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。この異数性の原因の一つに姉妹染色体合着に関わるコヒーシ複合体の不安定性が考えられている。コヒーシ複合体の一つであるSMC3のアセチル化を起こすESC02遺伝子の変異体モデル動物を作出し、染色体の数の異常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。哺乳類の解析に比べ、卵が大量に採取できること、卵が透明なため胎生致死個体も容易に観察できること、場所、費用の負担が少ないこと、などがあげられる。また、胎内発生の可視化が行えるため、胎内死亡する変異体の解析にも適している。

また、ESC02遺伝子の転写調節機構に関しては、これまで報告がない。ヒトESC02遺伝子の5'領域の領域からコアプロモーター領域を同定し、ルシフェラーゼアッセイ、EMSA、ChIP、などの手法を用いて基本転写因子を同定した。（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字状にならず、平行（線路様）になる（PCS）。5771個のメダカ精子遺伝子プールから、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。これらの交配の結果、この変異をホモにもつ卵を得ることに成功した。卵の解析の結果、約4分の1の確立で卵の発生異常を確認した。さらに、ホモ変異体に対して行った染色体解析ではPCSを起こすことが次第に明らかになりつつある。また、発生段階を追って解析した結果、発生の停止は特に細胞増殖の盛んな臓器を中心にアポトーシスを起こしていることが確認された。

D. 考察

姉妹染色体合着に関わるコヒーシ複合体の中のSMC3のアセチル化にかかわるESC02の変異体を作成した。この変異体は、正常発生過程における細胞増殖を行うことができず、アポトーシスによって多くの細胞死が認められ、受精後2日から発生異常が観察された。受精後1-2日後の染色体分析で、一部細胞にPCSや染色体数の異常が認められた。詳細は、さらに解析を行っている。このことは、異数性発症のメカニズム、女性のエイジングによる染色体の数異常（Down症など）の増加、そして、不育症の一つのメカニズムと捕らえることができる。

E. 結論

染色体異数性のおこるメカニズムにコヒーシ複合体安定性に関わるESC02が関与していることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Placental Features of Chorioamnionitis Colonized with Ureaplasma Species in Preterm Delivery. *Pediatr Res.* 2010. 67(2):166-172
- 2) Birth length is a predictor of adiponectin levels in Japanese young children. *J Pediatr Endocrinol Metab. (JPEM)*, 2010, In press, 2010.
- 3) Transcriptional Regulation of the Human Establishment of Cohesion 1 Homolog 2 Gene. *Biochem Biophys Res Com.* 2010, In Press
- 4) Intrinsically Less-ordered effectors from Pathogenic Gram-negative Bacteria: A case for EspB from Enterohaemorrhagic and Enteropathogenic Escherichia coli. *FEBS J*, In Press, 2010

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。)

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
Fumihiko Namba, Taeko Hasegawa, <u>Itaru Yanagihara*</u> et al.	Placental Features of Chorioamnionitis Colonized with <i>Ureaplasma</i> Species in Preterm Delivery.	Pediatr Res	67(2)	166-172	2010
Masahiro Nishihara, Mina Sonoda, <u>Itaru Yanagihara*</u> et al.	Birth length is a predictor of adiponectin levels in Japanese young children.	Journal Pediatr Endocrinol Metab			2010 In Press
Masahiro Nishihara, Minoru Yamada, Masatoshi Nozaki, Kumiko Nakahira, <u>Itaru Yanagihara*</u>	Transcriptional Regulation of the Human Establishment of Cohesion 1 Homolog 2 Gene	Biochem Biophys Res Com.			2010 In Press
Daizo Hamada, Mitsuhide Hamaguchi, Kayo Suzuki-Nagata, <u>Itaru Yanagihara</u>	Intrinsically Less-ordered effectors from Pathogenic Gram-negative Bacteria: A case for EspB from Enterohaemorrhagic and Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> .	FEBS J			2010 In Press

分担研究報告 31

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

分担課題：流産のエピジェネティックな異常の解析

研究分担者 秦健一郎 国立成育医療センター研究所周産期病態研究部 部長

研究要旨

DNA メチル化やヒストンのメチル化をはじめとするエピジェネティックな遺伝子発現制御は、哺乳類の発生と生存に必須の機構である。エピジェネティックな異常は、一見遺伝子変異に伴う異常と類似しているにもかかわらず、従来の遺伝学的解析では同定することができない。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る代表的エピジェネティックな生命現象であるが、インプリンティングが破綻すると、ヒトでもマウスでも、胎盤形成異常を伴った胎児発生発育異常が観察される。これらの状況証拠から、DNA メチル化による遺伝子発現制御は、初期の絨毛発生分化に特別な役割を担っていると推測されている。

流産には、明らかな成因が同定できない症例が多数含まれており、およそ半数は正常核型とされている。これらの症例には、未知の微細な染色体異常あるいはエピジェネティックな異常が含まれていると考えられるが、系統的な解析は行われていない。

本分担研究計画では、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32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。

現在までに合計流産症例59例のDNA メチル化スクリーニングを行い、7症例でDNA メチル化異常候補領域を同定した。今後は、検出されたDNA メチル化異常候補領域の詳細な解析を行い、発症機序の推定を含めた流産発症との関連を検証する。多領域の厳密な定量解析は、現在まで本研究の他に報告が無く、病態と直結したDNA メチル化異常を同定し、診断への応用へと結びつけるにとどまらず、DNA メチル化異常の成立機序（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有用な知見をもたらす事が期待される。

A. 研究目的

ヒトゲノムシーケンスプロジェクトの完了により、ほぼ全ての遺伝子配列が明らかになり、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遺伝子発現制御機構は、記念特に疾患や発生異常との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。

特に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、ヒトの発生異常と密接な関わりを持つことが知られている。いくつかのヒト先天性奇形症候群では、ゲノムインプリンティングの破綻がその原因であることが知られている。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が高頻度に発生する可能性が示唆された。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は明らかな染色体構造異常を認めない。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、非特異的増幅を起こさない 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。

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. 研究結果

初年度は主に解析条件の検討を行い、初年度から本年度にかけて、正常検体 (正常成人末梢血、正常絨毛組織) を用いた網羅的 DNA メチル化解析を行った。これらのデータから、末梢血リンパ球と正常絨毛組織における DNA メチル化状態正常値を定義した。

本法を用い、すでに収集されていた習慣流産 30 症例の解析を行った。また、本研究班分担研究者である名古屋市立大学産婦人科杉浦真弓教授のご協力により、流産 29 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。今回我々は、特に胎盤 (絨毛) の発生分化に関与することが知られている DNA メチル化領域 (インプリンティング遺伝子の発

現制御に関わる特殊な DNA メチル化領域) を、既知のもの全てと、我々が新たに見出した領域 (論文未発表) について網羅的に解析した。「B. 研究方法」の項でも触れたように、同様の網羅的解析を行った報告は前例が無く、我々が独自に解析・定義した DNA メチル化状態の「正常値」を用い、習慣流産症例の解析を行った。昨年度も報告したように、この手法は、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、きわめてその正確性を検証済みである。またこの検証過程で、稀な発生異常である母ゲノムダイソミーモザイク症例と、父ゲノム代祖ミーモザイク症例を同定する事に成功した。すなわち、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) 今まで見逃されていた未知の病態を同定できる。

最初に行った習慣流産 30 症例の解析は、昨年報告したように、合計 5 例のメチル化異常候補症例を同定したが、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。本年度新たに分担研究者杉浦から得た 29 症例の解析では、2 例のメチル化異常が見出された。その一例は、昨年度報告した症例と同様に、*H19* 遺伝子と呼ばれる領域の DNA メチル化異常が認められた。*H19* 領域は、メチル化異常の起こりやすい領域、いわゆるホットスポットである可能性が示唆される。また、*H19* 領域の異常は、胎盤発生異常に関与することが動物実験等からも示されており、流産という症状との直接の因果関係が疑われる。

他の一例は、異なる染色体上に存在する複数の領域でメチル化異常が検出された。また、これらの領域のメチル化状態確立・維持のタイミングは異なっていることから、偶発的散発的なメチル化異常が、精子と卵子で別個に起こっていたとは考えがたい。すなわち、受精後に、系統的な DNA メチル化状態の維持に何らかの破綻をきたしていた可能性が示唆される。

以上のように、これまでの解析結果から、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。3) また、複数領域を網羅的に解析することで、その発生源や分子病態の推測が可能であることが期待された。

E. 結論

我々の DNA メチル化異常スクリーニング系は、分子診断法として実用性がある。また、網羅的なメチル化異常解析を行うことで、従来見逃されていた分子病態を同定することが可能である。昨年度から本年度の流産純毛合計 59 検体を用いた解析で、合計 7 症例の DNA メチル化異常を同定した。これらの症例は、従来の解析手法ではいずれも「原因不明の習慣流産」であるが、我々の解析から異なる DNA メチル化状態の破綻を呈しており、各々の症例に固有の分子病態が存在することが示唆された。今後さらに多数の症例を解析すると共に、特に詳細な解析が必要と考えられる症例は、ゲノム全域約 27,000 箇所のプロモーター領域メチル化解析を行い、未知の分子病態の解明を行う。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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) 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. 学会発表
 - 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.

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
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. 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. Chuma, S.	The TDRD9-MIWI2 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., <u>Hata, K.</u> , 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	461-472.	2009
Henckel, A., Nakabayashi, K., Sanz, L. A., Feil, R., <u>Hata, K.</u> Arnaud, P.	Histone methylation is mechanistically linked to DNA methylation at imprinting control regions in mammals.	Hum Mol Genet.	18	3375-3383.	2009
<u>秦健一郎</u>	「DNAメチル化の網羅的解析」	医学のあゆみ	230	553-554	2009

分担研究報告 32

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

分担課題：ナノマテリアルと流産

研究分担者 堤 康央 大阪大学薬学研究科毒性学分野教授

研究要旨：

本研究では、医薬品や化粧品、食品などに含有されており、既に曝露を避け得ないナノマテリアルの生殖発生、特に流産に及ぼす影響に関して情報収集することを目的に、最も利用頻度の高いナノマテリアルの1つである非晶質ナノシリカに焦点を絞った。その結果、ナノシリカは、従来までのサブミクロンサイズ以上の非晶質シリカとは異なり、母体の血液凝固系を活性化し、胎盤の血流異常を引き起こし得ること、その結果、流産を招き得ることを見出した。今後さらに、これらの成果をもとに、ナノマテリアルの安全性に資する情報収集を加速していく予定である。

A. 研究目的

近年、産業利用を目的として開発・製造されるナノマテリアル（NM）およびNM利用製品の実用化が多様化・加速化している。しかし昨今、NM特有の物性に起因した革新的機能が、二面性を呈してしまい、予期しにくい毒性（ナノ毒性；NanoTox）を発現してしまうことが世界的に危惧されている。しかしNMのリスク管理に必須となる安全性情報は、あまりにも乏しい。以上の観点から本研究では、ナノマテリアルの安全性確保・リスク管理に資する情報の集積を目的として、特に次世代影響（生殖発生毒性）に焦点を絞り、ナノマテリアルの母体・胎児への影響に関して、流産を指標に、非晶質ナノシリカ（直径100nm以下のサイズの非晶質ナノシリカ）の安全性評価を試みた。また当該分担研究においては、研究の重要性と緊急性を鑑み、厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業との連携しつつ、研究の効率化を図った。

略語：ナノシリカ（直径100nm以下の非晶質シリカ；nSP）、従来型シリカ（直径がサブミクロンサイズ以上の非晶質シリカ）

B. 研究方法

- 1) ナノシリカ・従来型シリカ：Micromod社より購入した表面未修飾の非晶質ナノシリカ（直径30、70、100；それぞれnSP30、nSP70、nSP100）とサブミクロンサイズ以上の従来型シリカ（それぞれnSP300、mSP1000）と、粒子表面をアミノ基あるいはカルボキシル基で修飾した直径70nmのナノシリカ（それぞれnSP70-N、nSP70-C）を実験に供した。なお、赤色蛍光色素（RedF）で標識したナノシリカ・従来型シリカは、蛍光イメージング解析に用いた。
- 2) ナノシリカの生殖発生毒性評価：ナノシリカ・従来型シリカを0.8mg/mouseで妊娠16日目のBALB/cマウスに尾静脈内投与した後、各組織を回収・固定し、透過型電子顕微鏡で観察した。また、同量を妊娠16、17日目に2日間連続で尾静脈内投与した後、胎児・胎盤を観察した。

C. 研究結果（次項の考察にまとめて記述する）

D. 考察

1) ナノシリカの物性評価

本研究では、一次粒子径が70nm（nSP70）

の蛍光標識ナノシリカを使用し、対照として、300 nm (nSP300)、1000 nm (mSP1000) のサブミクロンサイズ以上の従来型シリカを供した。各ナノシリカ・従来型シリカの形状を透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察したところ、いずれもカタログ値と同等の一次粒子径を持った表面が滑らかな球状の粒子であり、分散性に優れていた。

2) 生殖発生毒性評価

nSP70 の胎盤形成や胎仔発育に及ぼす影響を評価した。各粒子径のナノシリカ・従来型シリカを妊娠マウスに投与し、胎仔・胎盤を観察した。まず、nSP70 を投与したマウスから出生した胎仔の重量を測定したところ、nSP300 および mSP1000 投与群ではコントロール群と比較して大きな変化は認められなかった。その一方で、nSP30 および nSP70 投与群では、流産と共に、胎仔発育障害を誘発することが示された。また母体においては血液凝固系が活性化されており、胎盤での血流異常が認められ、これらが流産の要因の 1 つとなっているものと考えられた。

E. 結論 (今後の展望)

本研究では、化粧品などに含有されているナノマテリアルの安全性確保・リスク管理に資する情報の集積を目的として、特に流産への影響を追求した。その結果、以下の結論を得た。

- ① 体内に侵入した非晶質ナノシリカは、流産を惹起し得ること。
 - ② ナノシリカに曝露された母体においては、血液凝固系が活性化され、胎盤での血流異常が生じ得ること。
- など、重要な知見を得た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. 吉川友章, 吉岡靖雄, 堤 康央: ナノ粒子の細胞内取り込みと経皮浸透., ナノ材料のリスク評価と安全性対策, フロンティア出版, in press.
- 2) 国内学会発表: 当該研究事業の成果のみ記載

【シンポジウム・招待講演など】

1. 堤 康央: ナノマテリアルの安全性確保を目指して., 第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会, 岩手 (盛岡), 2009 年 7 月.
2. 堤 康央: ナノマテリアルの安全確保に向けた NanoTox 研究の最前線 (Overview)., 日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010 年 3 月 (予定).

2) 国際学会発表

1. Yoshikawa T., Nabeshi H., Matsuyama K., Nakazato Y., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : In vitro nanotoxicological study of silica nanoparticles using dermal cell lines., The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.
2. Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Evaluation of size-dependent acute toxicity and toxicokinetics of amorphous nanosilicas., The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.
3. Matsuyama K., Yoshikawa T., Nabeshi H., Nakazato Y., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y.,

- Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S.,
Tsutsumi Y. : Evaluation of
size-dependent intracellular
distribution and genotoxicity of
amorphous nanosilicas in human
keratinocytes., The 46th Congress of
the European Societies of Toxicology
(EuroTox), Dresden (Germany), 13-16
September, 2009.
4. Nakazato Y., Yoshikawa T., Nabeshi H,
Matsuyama K, Imazawa T., Yoshioka Y.,
Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N.,
Tsunoda S., Tsutsumi Y. :
Differential acute toxicity and
toxicokinetics of amorphous
nanosilicas: The role of surface
physicochemical properties., The
46th Congress of the European
Societies of Toxicology (EuroTox),
Dresden (Germany), 13-16 September,
2009.
5. Yoshioka Y., Morishige T., Tanabe A.,
Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N.,
Nakagawa S. : Nanosilicas with
different sizes and surface charges
induce different profiles of
cytokine production on macrophages.,
The 46th Congress of the European
Societies of Toxicology (EuroTox),
Dresden (Germany), 13-16 September,
2009.

H. 知的所有権の取得状況

1) 特許取得

該当無し

2) 実用新案登録

該当無し

3) その他

該当無し

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
吉川友章, 吉岡靖雄, 堤 康央	非晶質ナノシリカの 経皮吸収性/生体内 動態と安全性との連 関追求	巨 理 文 夫 (北海道大 学大学院教 授)	ナノ材料のリ スク評価と安 全性対策	フロンテ ィア出版	東京	2010年	in press