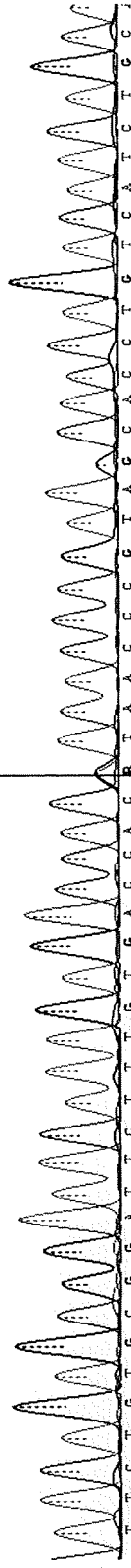


変異 1

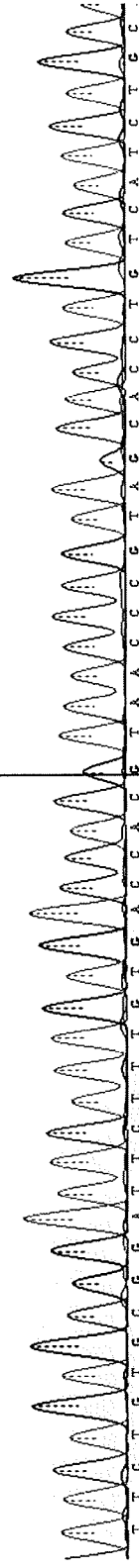
```
#43.gnu
NLRP7_Ex4seq1f_#40.gnu
NLRP7_Ex4seq1f_0135Mo.gnu
1: GGTTGCTGGATTGTGTGCACCGACTCTGAAGCTGCAGATGGAGAAAGGGGAGGACCCCGGT 60
1: GGTTGCTGGATTGTGTGCACCGACTCTGAAGCTGCAGATGGAGAAAGGGGAGGACCCCGGT 60
1: GGTTGCTGGATTGTGTGCACCGACTCTGAAGCTGCAGATGGAGAAAGGGGAGGACCCCGGT 60
*****
61: CCCCACCTGCCTCACCCCGCACGGGGCTGTT 90
61: CCCCACCTGCCTCACCCCGCACGGGGCTGTT 90
61: CCCCACCTGCCTCACCCCGCACGGGGCTGTT 90
*****
```

変異2

NIRP7_Exp7_#40_014_G10.ab1



NIRP7_Exp7_#42_001_A09.ab1



変異配列

コントロール配列

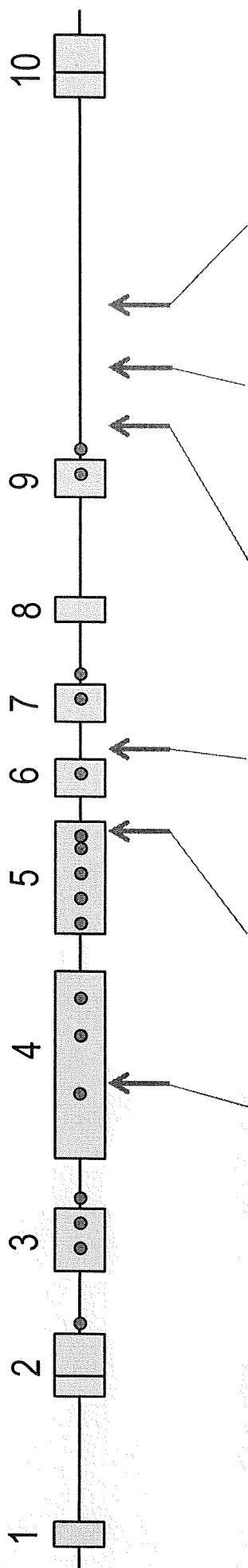
変異 2

```
ref.gnu          1: AAACAAGCTTCCTGAGTGACTCTTCTGTGCGGATTTCTTTGTGACCCACGTAACCCGTAGC 60
NLRP7_Ex5F_#40.gnu  1: AAACAAGCTTCCTGAGTGACTCTTCTGTGCGGATTTCTTTGTGACCCACGTAACCCGTAGC 60
*****
ref.gnu          61: ACCTGTCATCTGCAGAAAGTGGAGTAGAGAA          93
NLRP7_Ex5F_#40.gnu  61: ACCTGTCATCTGCAGAAAGTGGAGTAGAGAA          93
*****
```


変異 3

```
ref.gnu      1: TCCCAGACAGGGAATGTATTCCCTCAAACAGGCCCTGTGGGGAGTGGCCCTCCTCCTT 60
NLRP7_Re_Ex6F 1: TCCCAGACAGGGAATGTATTCCCTCAAACAGGCCCTGTGGGGAGTGGCCCTCCTCCTT 60
*****
ref.gnu      61: TCCCCCACCAGCTT      74
NLRP7_Re_Ex6F 61: TCCCCCACCAGCTT      74
*****
```

NALP7 遺伝子変異解析



	G>C	G>A	G>T	C>T	G>C	del T
健康成人女性 末梢血 (13例)	1/13	0/13	1/13	0/13	1/13	13/13
人工妊娠中絶 絨毛 (4例)	0/4	1/4	0/4	1/4	0/4	4/4
習慣流産 絨毛 (11例)	0/11	1/11	0/11	0/11	0/11	11/11

• 未知の遺伝子多型 (日本人集団で頻度の高い多型) が多数同定された。
 • 健康女性で検出されない多型が存在した (疾患関連変異の可能性)。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

反復胞状奇胎症例の実態調査と臨床情報の収集解析

分担研究者	齋藤滋	富山大学大学院医学薬学研究部産科婦人科学	教授
	和氣徳夫	九州大学大学院生殖病態生理学産科婦人科	教授
	諸隈誠一	九州大学病院産科婦人科	助教

研究要旨

従来胞状奇胎は、絨毛ののう胞化という病理形態学的な観点から診断がなされてきた。近年、絨毛細胞の発生における分子メカニズムが明らかになり、父親由来ゲノムが絨毛細胞の発生・増殖・分化に必須であるというゲノムインプリンティングの観点から、父親由来ゲノム量とトロホプラスト過形成の関連を説明する事が可能となった。これらのゲノムインプリンティング研究の成果を踏まえ、海外ではトロホプラスト過形成を考慮した鑑別診断が行われている。本邦の絨毛性疾患取り扱い規約に基づく嚢胞化絨毛の診断は、全胞状奇胎では正診率が高いが、部分胞状奇胎、顕微鏡的奇胎では低く、多くの雄核発生全胞状奇胎が部分胞状奇胎あるいは顕微鏡的奇胎と診断され、全胞状奇胎娩出後の治療プロトコルを利用されることなく経過観察されている。現行の絨毛性疾患取り扱い規約は、絨毛ののう胞化に焦点を絞っている為に以上の様な限界があり、新たな診断基準の確立と管理法の検証は喫緊の課題である。反復胞状奇胎は、組織形態学的に全胞状奇胎と区別ができない為、当然全胞状奇胎と同様の取り扱いを成されていると予想される。そこで本研究では、関連施設および関連学会等へ反復奇胎疑い症例の照会を行うと共に、独自に見出した絨毛細胞特異的遺伝子 (TSSC3 インプリト遺伝子) に着目し、新たな診断法を開発することを目的とする。

A. 研究目的

全胞状奇胎は、胎盤の主要な構成要素である絨毛の選択的増殖と のう胞化等の形態的特徴を有する一方、胎児成分の欠除を特徴とする異常妊娠である。10-20%の全胞状奇胎は、絨毛癌を含む続発症を発生する。本邦ではこれまで、全胞状奇胎娩出後、適切な一次及び二次管理が実施されて来た事が一因となり、絨毛癌の発生は減少し、絨毛性疾患寛解率も著明に改善してきた。

全胞状奇胎は、ゲノム欠損卵に一精子

或いは二精子受精し、発生が進行する雄核発生を起源とする。このため、父親由来ゲノムのみを選択的継承が遺伝的な特徴である。部分胞状奇胎は、一部の絨毛が のう胞化を呈し、2精子受精の3倍体を発生母地とする。また、短径が2mm以内の のう胞化を示す顕微鏡的奇胎は、流産絨毛であるため正常2倍体を起源とするとされる。いずれも絨毛の のう胞化という形態的類似性を示すが、これらの異常妊娠の鑑別は、続発症の早期発見のための一次管理と いった、過不足の無い適切な管理を

施する上で、極めて重要である。解像力の高い超音波断層装置が普及し、のう胞化絨毛を妊娠初期に見つける事が可能となった事により、全ての絨毛がのう胞化を示すに至るまで病像が進行する機会が失われ、その結果として典型的な全胞状奇胎が見掛け上減少すると共に、部分胞状奇胎あるいは顕微鏡的奇胎と鑑別困難な症例が相対的に比率を増している事が予想される。このような異常発生絨毛には、分子遺伝学的な診断法が有効である。反復胞状奇胎妊娠は、組織形態学的に通常の全胞状奇胎と同一であるが、正常2倍体であると同時に、DNAメチル化の異常を伴う事から、ゲノムインプリンティングは通常の全胞状奇胎と同様に失われていると予測され、同じく分子遺伝学的な診断法が有用であると考えられる。

本研究では、反復胞状奇胎疑い症例およびのう胞化絨毛を収集し、多型マーカーを用いたゲノム診断による発生起源の同定、インプリンティング遺伝子TSSC3抗体を用いた免疫組織診断を行い、反復胞状奇胎を含むのう胞化絨毛の確定診断法を確立することを目的とする。

B. 研究方法

1) 検体と臨床情報の収集

症例照会により反復胞状奇胎候補症例が見出されたら、患者の末梢血を抗凝固剤入りの採血管で5ml採取し、末梢血リンパ球からゲノムDNAを回収する。奇胎組織は、固定標本が保存されていれば、標本からゲノムDNAを回収する。検体収集と併せて、詳細な臨床

情報（特に妊娠分娩歴、家族歴、治療経過）を収集する。すべての情報は、連結可能匿名化を行い、個人情報厳密かつ適正に扱う。

2) 胞状奇胎組織の分子遺伝学的解析
収集された検体は連結可能匿名化を行い、2.1) ゲノム診断 2.2) TSSC3免疫組織染色、2.3) 臨床病理学的診断、を実施する。

2.1) ゲノム診断

絨毛及び患者血液からDNAを抽出する。PCRによるDNA増幅後8つのDNA多型マーカー(CSFIPO, TPOX, TH01, vWA, D16s539, D13S317, Amelogenin)を解析し、その比較から雄核発生、二精子受精三倍体、正常二倍体(父母ゲノム二倍体)、に分類する。

2.2) TSSC3抗体免疫組織染色

ヒトTSSC3抗体を用い、症例絨毛から作製した標本の免疫組織染色を行い、TSSC3染色性の有無(TSSC3タンパク質の有無)を診断する。

2.3) 臨床病理学的診断

症例絨毛からヘマトキシリンエオジン染色病理標本を作成し、トロホプラスト過形成の程度、のう胞化絨毛の有無、間質血管と胎児赤血球の有無、間質内デブリスの有無、scalloping、などの所見を詳細に解析し、代表的病理所見を網羅的に取得する。

以上のゲノム診断結果、TSSC3組織染色結果、病理診断結果及び現行の日本絨毛性疾患取り扱い規約に基づく所見を比較対照する。これにより、ゲノム診断結果と比較することにより現状の日本絨毛性疾患取り扱い規約に基づい

た診断の精度が明らかとなり、また、より簡便かつ廉価な確定診断法として、TSSC3 や p57^{KIP2} 免疫組織染色などの有用性の評価が可能となる。これらの知見に基づき、改めて反復胞状奇胎症例の臨床病理学的特徴を抽出し、確定診断基準の作成に役立てる。

C. 研究結果

結果 1) 検体と臨床情報の収集

九州大学が過去 20 年間に扱った胞状奇胎 110 例中に、病歴に 2 回以上の奇胎を認める症例は見出されなかったが、家族歴（本人と母親）を有する胞状奇胎症例が 1 例存在した。また、形態学的に通常の全胞状奇胎と診断されていたが、遺伝子多型マーカー解析により、分子遺伝学的に雄核発生ではなく正常 2 倍体と考えられる胞状奇胎症例が 1 例存在した。このような症例は、典型的な反復胞状奇胎と同様の分子病態を有する事が海外症例で示されており、今後疑い症例として解析を進める。267 例の嚢胞化絨毛組織の DNA 多型解析を行い、15 例 (6%) は両親由来の DNA 多型、すなわち、父親と母親のゲノムを有する正常二倍体であった。これらの異常絨毛組織は、反復胞状奇胎と同様の背景を持っているが、早期に診断と治療介入がなされたために典型的な全胞状奇胎の形態を呈さなかった可能性がある。今後これらの症例の、NALP7 遺伝子変異と DNA メチル化異常（ゲノムインプリンティング異常）を解析する予定である。

富山大学では、施設症例 7 例のうち、1 例に胞状奇胎の反復を認め、現在外

来経過観察中である。

結果 2) 胞状奇胎組織の分子遺伝学的解析

分担研究者和氣らは、絨毛の発生分化に重要な役割を担うインプリンティング遺伝子 TSSC3 を見出しており、その抗体を用いた胞状奇胎の免疫組織診断を試みた。TSSC3 遺伝子は、母ゲノムのみから発現することから、正常二倍体を発生起源とする絨毛組織では発現しているが、雄核発生を起源とする絨毛細胞では発現しない。このため、形態的に判別が困難な絨毛細胞も、TSSC3 遺伝子の発現の有無により、母ゲノムの有無（正常二倍体か否か）を診断可能であると予想された。そこで、抗 TSSC3 抗体による免疫組織染色を試みると、正常絨毛や部分胞状奇胎中の絨毛細胞（母ゲノムを持つ二倍体）は染色されるが、全胞状奇胎の絨毛細胞（父ゲノムのみを有し、母ゲノムを持たない二倍体）は染色されなかった。よって、同遺伝子の発現の有無により、正常な父母ゲノム二倍体である反復胞状奇胎の絨毛細胞と、雄核発生である通常の全奇胎の鑑別に応用可能であると考えられる。また、母ゲノムの有無の簡便なスクリーニングや、モザイク症例（異なる核型が混在する胞状奇胎組織）の診断にも有用であると期待される。

D. 考察

絨毛の形態異常を妊娠初期に診断することが可能となり、早期に妊娠終結に至る症例が増加した。その結果、全

胞状奇胎や部分胞状奇胎、さらには顕微鏡的胞状奇胎が、典型的な胞状奇胎の形態的特徴を示すよりも早い時期に娩出されている可能性が推測される。雄核発生の全胞状奇胎は高率に絨毛癌等を続発するが、他ののう胞化絨毛では、絨毛癌等の続発は極めて稀であり、のう胞化絨毛娩出後の管理も異なる。しかし上述のように現状では、雄核発生の全胞状奇胎と同じ発生起源であっても、組織形態学的な所見から全胞状奇胎と診断されずに管理されている症例が多数存在していると推測され、近い将来の絨毛癌増加が懸念される。このように、のう胞化絨毛を、分子遺伝学的発生起源に基づいて鑑別診断する事が重要であるが、DNA 多型マーカー等を用いたゲノム診断は、精度は高いがコストも高く、手技が煩雑である。

そこで、TSSC3 抗体を用いたのう胞化絨毛の確定診断法の確立は、絨毛性疾患の発生予防になるのみならず、のう胞化絨毛の臨床病理学を確立する礎になる。現状の取り扱い規約は絨毛ののう胞化に焦点をあて、診断の根拠としている。しかし父親由来ゲノム量がトロホblast過形成を招来するというゲノムインプリンティングの、初期発生の関与を考えれば、のう胞化絨毛よりトロホblast過形成に焦点をあてた臨床病理学的診断法の有効性が示唆される。本研究においてゲノム診断により雄核発生・全奇胎と診断されたのう胞化絨毛の詳細な病理学的所見の解析は、新たな取り扱い規約作製の基盤となり、国民の保健・医療・福祉の向上に大きく貢献する事が期待できる。

E. 結論

我々の施設で経過観察中の症例、あるいは施設症例を遡って検討し、反復胞状奇胎疑い症例、あるいはその関連疾患と推定される症例が捕捉された。現在これらの症例の臨床情報あるいは検体の収集およびその解析を進めている。絨毛特異的発現遺伝子産物に対する抗体を用いた組織免疫染色では、明瞭に正常二倍体絨毛と雄核発生絨毛組織を染め分ける事に成功しており、今後、簡便なスクリーニング方としての応用を検討する。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

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
秦健一郎	胎児・胎盤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・新生児医学会雑誌	45	1159-1161	2009

ワークショップ 12 「不育症の新たな原因探索と治療」

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—

国立成育医療センター研究所周産期病態研究部

秦 健一郎

日本周産期・新生児医学会雑誌 第45巻 第4号 別刷

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—

国立成育医療センター研究所周産期病態研究部

秦 健一郎

Key words

エピジェネティクス
DNA メチル化
子宮内胎児発育遅延
流産

要旨 DNA メチル化をはじめとするエピジェネティックな情報は、遺伝子配列を介さずに細胞分裂を経て安定して伝達され、遺伝子発現を長期にわたり変化させることができる。モデル動物の解析から、エピジェネティックな情報による遺伝子発現制御は、哺乳類の発生と生存に必須の機構である事が示されている。また、インプリンティング異常症 (DNA メチル化によって制御されるゲノムインプリンティングの破綻による疾患) の症状等から、ヒトでも同様に、エピジェネティックな遺伝子発現制御が、胎児と胎盤の発生発育に重要な役割を担っている事が強く示唆されている。我々は、ゲノムインプリンティングを制御する領域の DNA メチル化状態を中心に、ヒト DNA メチル化異常の網羅的定量的解析系を確立した。また、マイクロアレイ技術を用いたジェネティックな異常 (染色体構造異常) の解析も併せ、異常妊娠症例の網羅的なゲノム・エピゲノム解析を進めている。

エピジェネティックな遺伝子発現制御は正常な胎児と胎盤の発生分化に必須である

DNA のシトシンのメチル化や、核タンパク質ヒストンのメチル化・アセチル化は、遺伝子変異を介さずに遺伝子発現状態を変化させることができる。図 1 の例では、遺伝子 A の発現が DNA メチル化によって抑制されている。メチル化による抑制は細胞分裂を経ても安定して伝達する事があり、まるで遺伝子 A に機能喪失変異が生じたように見えるが、実際には変異は存在しない。このような現象あるいはこのような現象を扱う学問を、genetics (遺伝学) に接頭辞 *epi-* を付け、あるいは発生学の用語である *epigenesis* (後成説) の意味も加味し、「*epigenetics*」と称している。適切な日本語訳が存在しないので、本稿中では「エピジェネティクス」と表記する。

エピジェネティックな生命現象は、胎児や胎盤の発生分化と関連が深く、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。我々は父母から受け継いだ遺伝子を二個ずつ持っているが、一部の遺伝子 (数%と推定されている) は、親の由来を区別して発現が制御されている。例えば *H19* と呼ばれる遺伝子は、常に父親由来の *H19* が発現し、母親由来の *H19* は抑制さ

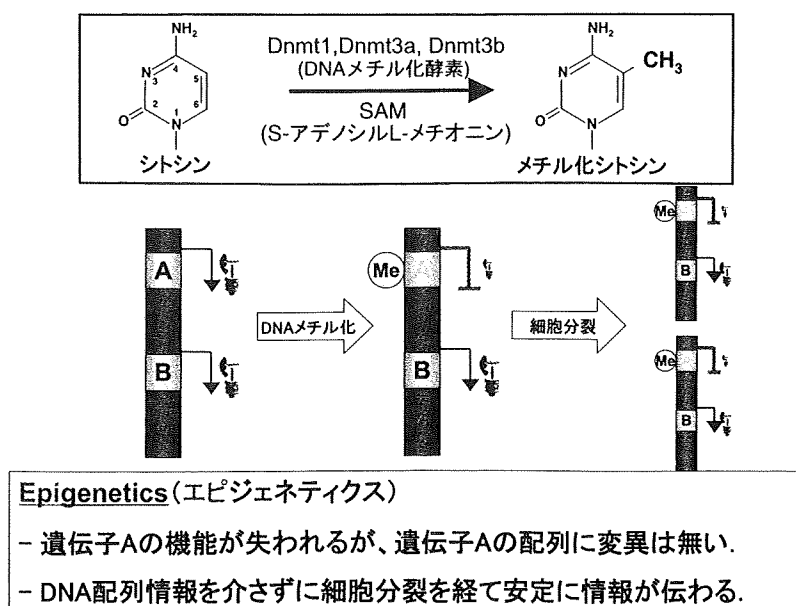
れる。親の由来情報が刷り込まれて発現が制御されているので、ゲノムインプリンティング現象と呼ばれる所以である。雄核発生胚 (父ゲノム二倍体) や雌性発生胚 (母ゲノム二倍体) などの異常胚では、インプリンティング遺伝子群の発現量が、あるものは二倍に、あるものはゼロにといった大きな乱れが生ずるため、正常な個体が発生し得ない。また、父ゲノム (父由来の染色体) は胎盤形成に促進的に、母ゲノム (母由来の染色体) は胎盤形成に抑制的に働くことが実験的に示されており、全胎状奇胎と卵巣奇形腫の病理組織学的特徴や、ゲノムインプリンティング異常症で観察される胎児発育異常の所見と矛盾しない。これらの状況証拠から、ヒト発生分化においても、ゲノムインプリンティングは重要な役割を担っていると考えられる。

我々はこれらの知見を背景に、「原因不明の流産・子宮内胎児発育遅延症例には、未知のジェネティックな異常やエピジェネティックな異常が存在する」という仮説を立て、スクリーニング手法を確立し、解析を進めている。

ヒト DNA メチル化異常スクリーニング系の確立

我々は特に、DNA メチル化に着目して解析を進めている。前述のようにゲノムインプリンティングは胎児

図1 DNAのシトシンのメチル化によるエピジェネティックな遺伝子発現制御



と胎盤の発生発育に深く関与するが、その分子の実体は、図1に示したシトシンのメチル化である。DMR (Differentially Methylated Region) と呼ばれる特殊なゲノム領域には、精子と卵子の形成過程で正反対のDNAメチル化パターンが確立され、受精後も変化しない。これら DMR のメチル化状態がインプリンティング遺伝子の発現を制御するため、結果として例えば前述の *H19* 遺伝子は常に父親由来のものが発現する。我々は、既知のヒト DMR 全てに加え、独自の検索と検証により (未発表データ)、真のヒト DMR である可能性の高い 30 領域、その他の非 DMR 領域、X 染色体関連遺伝子を DNA メチル化異常スクリーニング対象に選定した。これらの領域を、Bio-COBRA 法 (COBRA 法 (Combined Bisulfite Restriction Analysis) とキャピラリー電気泳動法を併用する DNA メチル化スクリーニング手法) によりスクリーニングする解析系を確立した。本稿では詳細を割愛するが、COBRA 法を実施する際は、反応過程での偏りを避ける事が原理的に困難であり、緻密な条件検討によって定量性を検証することが必須である。

異常妊娠症例の DNA メチル化状態スクリーニング

ヒト DNA メチル化状態の解析はまだ先行例が少なく、現在我々は暫定的に正常成人末梢血の解析結果を基準値に用いている。図2上段に示したように、すでに診断の確定している7番染色体母性ダイソミー症例 (国立成育医療センター研究所小児思春期発育研究部 緒方勤部長との共同研究) を解析すると、7番染色体領域の DNA メチル化のみが異常高値を示していることが一目瞭然である。また、この DNA メチル化スクリーニング解析を端緒とし、稀な発生異常である母ゲノム

二倍体モザイク症例、父ゲノム二倍体モザイク症例の同定にもつながった (未発表データ)。我々のスクリーニング系は、従来の診断法と矛盾なく実用性があり、また、従来の診断法では看過される発生異常を検出可能である事が示されたと考える。

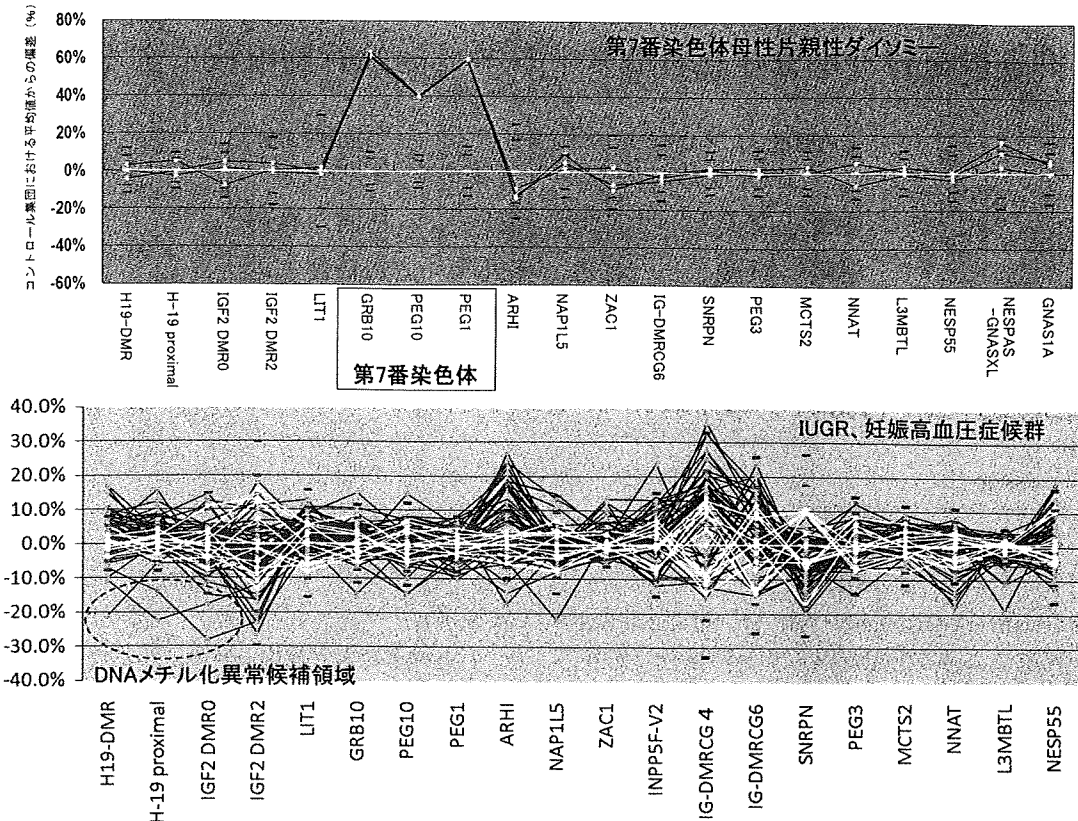
現在我々は、このスクリーニングシステムを用い、異常妊娠の解析を行っている。習慣流産 29 症例の解析を行ったところ、散発的に様々な DMR で DNA メチル化異常を認めた。これらの領域は従来、生殖細胞以外では決してメチル化状態が変化しないと考えられていた領域であり、その分子病理学的意義は大変興味深い。また、全く独立の複数症例が類似のメチル化異常パターンを呈しているが、これらの症例は、類似の疾患背景を有している可能性が示唆され、今後の最重点解析対象の一つと考えている。

子宮内胎児発育遅延 75 症例と妊娠高血圧症候群 9 症例の胎盤ゲノム DNA の解析からは、現在までのところ各々 1 例の低 DNA メチル化異常疑い症例を見出している (図2下段)。この領域の DNA メチル化異常は、インプリンティング異常症あるいはモデルマウスでは胎盤形成不全や胎児発育不全といった症状を呈する事が報告されており、疾患との因果関係が非常に興味深い。今後はこれらのスクリーニング結果を元に、各異常領域の詳細なメチル化解析、他の組織 (臍帯血) のメチル化解析を行う予定である。

染色体構造解析解析、その他の網羅的解析手法

最近発売された illumina 社の Infinium DNA メチル化解析プラットフォームにより、プロモーター領域約 27,000 カ所の DNA メチル化状態が定量解析可能とな

図 2 Bio-COBRA 法による DNA メチル化異常スクリーニング



った。我々も疾患解析に利用しているが、残念ながらこの手法では任意の領域を解析できないため、本稿で論じたインプリンティング遺伝子のような特殊な領域の解析や、我々が新規に見出している候補領域の解析には必ずしも有用でない。網羅的大規模解析を誰でも発注できる時代になったが、大規模解析系の原理的特徴を熟知し、手作りの解析系でデータを補足する重要性は、むしろ増している。

また、本稿では詳細を割愛するが、我々はマイクロアレイ技術により染色体構造解析を行う手法も確立している。我々の解析した検体の多くは冷凍保存検体で、分染法による染色体検査が不可能であった。そこで、高密度 SNP アレイ (Affymetrix 社 Human Mapping 250k array set) を使い、染色体異常の同定を行っている (東京大学医学部 小川誠司先生との共同研究)。分染法と比較して飛躍的に解像度が高く、様々なコピー数多型も多数同定できているが、これらの分子病理学的意義は、今後の健常者集団解析結果との比較により明らかにできると期待している。

まとめ

以上のように我々は、ポストゲノムシーケンス技術を用いたゲノム解析とエピゲノム解析手技双方を確立し、異常妊娠の解析を進めている。エピジェネティ

ックな異常は、周産期疾患との関連の可能性に止まらず、環境因子が遺伝子発現を長期的に変化させる現象 (例として、胚培養による遺伝子発現の変化、胎内環境が出生児に長期的に与える影響、DOHaD 仮説など) を説明するのに適したモデルである。我々の研究から得られる基盤的知見と解析技術を応用し、様々なヒト疾患の解明に貢献したい。

【謝辞】

本研究は、以下の方々 (敬称略) との共同研究で行われている。

- 名古屋市立大学産婦人科 北折珠央, 杉浦真弓
- 国立成育医療センター研究所小児思春期発育研究部 緒方勤, 山澤一樹
- 東常大学大学院医学研究科 小川誠司
- 醍醐渡辺クリニック 森崇英
- 千葉大学大学院医学研究院 鳥巢弘道
- 国立成育医療センター研究所周産期病態研究部 山口裕子, 中林一彦

文 献

1) 秦健一郎. “生殖・発生の異常とエピジェネティクス”. エピジェネティクス. 佐々木裕之編. シュプリンガー・フェアクラーク東京. 2004. p.183-190

