

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
久須美真紀、 秦健一郎	妊娠維持機構とその破綻	HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY	19	17-22	2012

研究成果の刊行物・別刷り

HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY

別刷

（株）メディカルレビュー社

基礎編(2)

妊娠維持機構とその破綻

—ジェネティクス・エピジェネティクスの視点から—

久須美真紀／秦 健一郎

Summary

妊娠維持には、胎盤と胎児の正常な発生分化が必須である。発生分化の異常は、慢性疾患や成人期発症の疾患とは異なり、多くの場合ジェネティクスやエピジェネティクスの寄与が高いと推測される。実際にヒト疾患やモデル生物の解析から、エピジェネティックな制御を受けて胎児や胎盤の発生分化に関与する遺伝子(群)が明らかになりつつあり、分子機構の知見が増す一方で、日常診療で遭遇する妊娠維持機構の破綻との関連は不明な点が多い。本稿では、妊娠を維持するために必要とされる胎児・胎盤発生分化の分子生物学的機構を、ジェネティックなあるいはエピジェネティックな機構の観点から、最近の知見を交えて紹介する。

Key words

エピジェネティクス●DNAメチル化
ゲノムインプリンティング●胎児発育不全

Maki Kusumi

独立行政法人国立成育医療研究センター研究所
周産期病態研究部
東京都保健医療公社豊島病院産婦人科

Kenichiro Hata

独立行政法人国立成育医療研究センター研究所
周産期病態研究部部長

ジェネティクスの視点

1. 染色体構造異常

流産は、その多くが染色体の過不足に起因する胎児染色体異常であるとされている。頻度の高い異常として、常染色体トリソミー(60%)、ターナー症候群[モノソミー X(20%)], 倍数体異常[polyploidy (20%)]が挙げられる¹⁾。不育症も3~5%に染色体異常が認められ、代表的な異常として相互転座、ロバートソン転座、逆位、superfemale, turner mosaicismなどが知られている。夫婦ともに染色体異常を有する場合は、妊娠予後も不良となる²⁾。近年、comparative genomic hybridization (CGH)アレイといった手法により、細胞培養を経ずに直接検体のDNAを用い、従来の手法では同定されなかった詳細な欠失や重複等の染色体異常診断が可能となった³⁾。さらに一塩基多型(single nucleotide polymorphisms ; SNPs)アレイを用いれば、全ゲノム領域から数十万~数百万ヵ所のSNPs情報を取得し、より高解像度の染色体構造解析が可能であるとともに、親のSNPs情報との比較による片親性ダイソミーの診断や、起源の推測も含めたモザイク・キメラといった異常の詳細な解析が可能である⁴⁾。今後はさらに、次世代シーケンサーによる一塩基レベルの解像度の解析応用が期待される。

2. 絨毛発生分化・胎盤形成に関わる遺伝子発現

受精後、初期胚は次第に非対称性の分裂を行

い、胚盤胞は明確に異なる性質をもつ2つの細胞成分、すなわち inner cell mass [ICM (将来胎児成分へ分化する)] と trophoblast (胚盤胞の外側を構成する細胞層で、将来胎盤へ分化する) から構成される⁵⁾。胎盤分化時には、胎盤構成細胞同士の相互作用、あるいは着床および栄養ガス交換機能という特殊な現象下での母体組織との相互作用において、核となる機能を有するさまざまな遺伝子とその下流遺伝子群の制御機構が明らかになりつつある(表1)⁶⁾⁷⁾。倫理的、技術的問題のためヒト初期胚の解析例は少なく、これらの知見の多くはモデル生物から得られたものである。今後はヒト trophoblast stem (TS) 細胞の樹立や、ヒト胚性幹細胞 (embryonic stem cell ; ES 細胞) を用いた特殊な分化系、あるいは人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell ; iPS 細胞) の技術を用いた組織幹細胞の樹立等々により、ヒト初期胚の詳細も明らかになっていくことが期待される。

エピジェネティクスの視点

ヒトの体は原則として同一の遺伝情報 (DNA 配列) を有する細胞から構成され、すべての細胞

が有する2万数千個の遺伝子は、必要な発生分化時期に必要な臓器でのみ発現し、いったん最終分化すると容易に脱分化せず、異分化 (異所性の組織形成) も起こさず、何十年も個体の恒常性を保つ。このような厳密かつ安定した遺伝子発現制御には、「遺伝子配列を介さずに『遺伝』する情報」= エピジェネティクスが重要なカギを握っている。

1. DNA メチル化

DNA のメチル化は、CpG 配列 (シトシンとグアニン間のリン酸も含めて CpG 配列と表記する) のシトシンがメチル化された状態で、原則としてメチル化された領域の機能は抑制される。哺乳類の発生過程では、ゲノム全域にわたりダイナミックな DNA メチル化の変化が観察される⁸⁾⁹⁾。受精後から胚盤胞期にかけて、ゲノム全域にわたり DNA メチル化の消去による初期化が進むことで、胚盤胞期以降の胚の分化全能性を担保する。将来胎児となる ICM (内部細胞塊) は、以降の分化に伴い、細胞系譜・組織特異的な DNA メチル化状態が確立されるとともに、全能性を失う。一方、trophectoderm (栄養外胚葉、将来胎盤になる組織) では、メチル化領域の大半を占める反復配列など

表1 着床前後に働くジェネティック/エピジェネティックな因子の例

着床前	
ジェネティックな因子 (分化を決定する主要な転写因子)	ICM : <i>NANOG</i> , <i>OCT3/4</i> , <i>DPPA5</i> , <i>REX1</i> , <i>SOX2</i> TE : <i>CDX2</i>
エピジェネティックな因子	脱分化に伴う DNA メチル化の低下
着床後	
ジェネティックな因子 (trophoblast の維持・分化に働く 主要な因子)	<i>CDX2</i> , <i>EOMES</i> , <i>ELF5</i> , <i>GATA2/3</i> , <i>TCFAP2A/C</i>
エピジェネティックな因子	胎盤では低 DNA メチル化状態が維持される 生理機能を有するレトロトランスポゾン由来遺伝子 (<i>Syncytin</i> , <i>Peg11/Peg10</i>)

TE : trophectoderm

(文献7)より引用・改変)

を中心に低 DNA メチル化状態が維持されるため、ゲノム全体としては低 DNA メチル化状態を呈するものの、胎盤の発生分化に DNA メチル化そのものが必須であることには変わらない。

2. その他のエピジェネティックな分子機構

核蛋白質であるヒストン修飾や、蛋白質をコードしない RNA である non-coding RNA (ncRNA) もまた、重要なエピジェネティクス因子である。ゲノムインプリンティング制御の一部や、後述の女性の X 染色体不活性化は、ncRNA が重要な役割を担っており¹⁰⁾、卵子で働く生理的な small RNA の存在なども最近みつかってきた¹¹⁾。また、妊娠経過中さまざまな microRNA が特異的に機能しており¹²⁾、その一部は母体血中の遊離核酸として測定可能である¹³⁾。これらの ncRNA とヒト異常妊娠の病態との関連は、今後新たな知見をもたらすものとして注目される。

3. ゲノムインプリンティング

哺乳類が単為発生できない主因の 1 つは、ゲノムインプリンティングの存在である。モデル生物で実験的に作製された雄核発生胚(精子由来のゲノムのみを有する二倍体)は胎盤の過形成を、雌性発生胚(卵子由来ゲノムのみを有する二倍体)は胎盤の形成不全と、全く逆の発生分化異常傾向を示し、いずれも胚性致死である¹⁴⁾¹⁵⁾。卵子と精子の形成過程で、メチル化可変領域(differentially methylated region; DMR)と称される特殊なゲノム領域が、オスとメスで正反対の DNA メチル化修飾を受け、受精後も体細胞では生涯にわたり親由来のメチル化状態が維持される。周辺の遺伝子は、DNA メチル化状態により発現制御されるため、生涯にわたり片親性発現する。このように親由来の情報が「刷り込まれ」、由来を区別して片親性発現する現象をゲノムインプリンティングと称する。DMR のメチル化パターン確立には、

DNMT3A/3B¹⁶⁾¹⁷⁾ および DNA メチル化酵素関連因子遺伝子 *Dnmt3L*¹⁸⁾¹⁹⁾ が必須で、これらが失われると胎盤の形成不全をきたす²⁰⁾。進化生物学的な観点からも、そもそもゲノムインプリンティングと胎盤の進化には密接な関連があることが示唆されている^{21)~24)}。

4. X 染色体不活性化

哺乳類の雌は、2本のうち片方の X 染色体全体を不活性化し、雌雄間の遺伝子量を補正している。マウスでは、2~4細胞期にすでに父性 X 染色体が部分的に不活性化しているが、胎生 3.5 日の胚盤胞期になると、trophectoderm で父性 X 染色体が選択的に不活性化され、ICM では逆に父性 X 染色体が再活性化され、胎生 6.5 日頃に胚体組織ではランダムな不活性化が起こる²⁵⁾²⁶⁾。ヒト胎盤では、おそらくマウスと異なりランダムな不活性化が起こっていると推測される²⁷⁾。X 染色体不活性化の異常は、著しい胚体外組織の形成不全を伴って胎性致死であることが知られていたが、最近マウス体細胞クローン胚で、異所性の *Xist* (不活性化に必要な非翻訳 RNA) 発現を抑制すると胚移植の成績が 10 倍以上に上昇することが示され、着床前後の X 染色体不活性化の重要性が改めて示された²⁸⁾。ヒト流産でも、かたよった X 染色体の不活性化の影響が示唆される一方²⁹⁾³⁰⁾、関連を認めないとする結果も提示されている³¹⁾。

エピジェネティックな変異と ヒト発生異常

1. 胎盤の発生分化異常を伴う疾患(胞状奇胎・卵巣奇形腫)

インプリンティング遺伝子(群)を有する染色体が 2 本とも片親由来になると、インプリンティング遺伝子(群)の発現量がゼロあるいは 2 倍と極端

にかたよるため、特徴的な発生異常を呈する。たとえば、父由来のゲノムのみでヒト発生が進むと、みかけ上は正常二倍体であっても、全胞状奇胎(絨毛の異常増殖)を呈するのに対し、母由来ゲノムのみで分化が進んだ卵巣奇形腫は、決して絨毛成分に分化しない。

最近、反復する全胞状奇胎(反復胞状奇胎)症例のなかに、両親由来のゲノムをもつ一見正常な二倍体が含まれていることが示された。未知の病態により母由来のインプリンティング遺伝子のDNAメチル化が系統的に失われ、父ゲノム二倍体と同様のゲノムインプリンティング異常を呈しているため、胞状奇胎を発症すると推測された³²⁾。その後 *NALP7* 遺伝子変異、*C6orf221* 遺伝子変異が報告されたが、病態解明には至っていない³³⁾³⁴⁾。

2. 不育症・胎児発育不全

エピジェネティックな異常を伴うモデルマウスの多くが、不妊症や不育症、胎児発育不全を呈する。また、ゲノムインプリンティングの破綻を原因とする先天奇形症候群(Beckwith-Wiedemann症候群、アンジェルマン症候群、プラダー・ウィリー症候群、シルバーラッセル症候群、片親性ダイソミーなど)では、胎児発育不全あるいは逆に過成長が必発である。児に明らかな先天性異常を伴わない原因不明の胎児発育不全症例を詳しく解析すると、一部症例の胎盤ではインプリンティングが破綻しており、胎児発育不全の直接の原因であると推測された(山口・中林ら投稿中)。われわれの解析結果と同様に、胎児発育不全とゲノムインプリンティング異常の関連を示す報告がなされており³⁵⁾³⁷⁾、確かに原因不明の胎児発育不全の一部に、エピジェネティックな変異が存在すると推測される。

流産検体にもわれわれの解析ではDNAメチル化の異常を疑う症例が散見されるが、ヒトの発生

初期絨毛組織では、ゲノムインプリンティング(片親性発現)が厳密に確立していない可能性も示唆されており³⁸⁾⁴⁰⁾、今後さらなる解析が必要である。

3. 環境因子が胚発生に影響する可能性

胎児期や乳幼児期の環境因子の影響が長期にわたって遺残し、成人後の癌や生活習慣病などの発症リスクを上げる可能性が示唆されている⁴¹⁾。モデル生物では、初期胚の体外培養によりDNAメチル化異常とそれに伴うゲノムインプリンティングの破綻が起こることが示されていることから⁴²⁾⁴⁵⁾、生殖補助医療に起因するエピジェネティックな変異が出生児に及ぼす影響を懸念する報告も散見されるが、明確な因果関係を示すには至っておらず、今後大規模な疫学的研究とともに、厳密な分子遺伝学的解析による正確な検証が待たれる。

おわりに

妊娠維持機構の破綻は淘汰されやすいと予測されるので、これまでは遺伝学的な解析が困難な面もあったが、高密度アレイや次世代シーケンサーなどの普及により、網羅的かつ高感度・高解像度な解析が実現可能になってきた。その一方で、これらの解析手技で得られる膨大なジェネティクス・エピジェネティクスの知見を、ただちに診断治療に結びつけるのはまだ容易ではない。今後、臨床像や環境因子も考慮した分子疫学的な解析も併せて進めていくことが重要と考えられる。

文献

- 1) Warren JE, Silver RM : Genetics of pregnancy loss. Clin Obstet Gynecol 51 : 84-95, 2008
- 2) Sugiura-Ogasawara M, Aoki K, Fujii T, et al : Subsequent pregnancy outcomes in recurrent miscarriage patients with a paternal or

- maternal carrier of a structural chromosome rearrangement. *J Hum Genet* **53** : 622-628, 2008
- 3) Schaeffer AJ, Chung J, Heretis K, et al : Comparative genomic hybridization-array analysis enhances the detection of aneuploidies and submicroscopic imbalances in spontaneous miscarriages. *Am J Hum Genet* **74** : 1168-1174, 2004
 - 4) Conlin LK, Thiel BD, Bonnemann CG, et al : Mechanisms of mosaicism, chimerism and uniparental disomy identified by single nucleotide polymorphism array analysis. *Hum Mol Genet* **19** : 1263-1275, 2010
 - 5) Yamanaka Y, Ralston A, Stephenson RO, et al : Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Dev Dyn* **235** : 2301-2314, 2006
 - 6) Maltepe E, Bakardjiev AI, Fisher SJ : The placenta : transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development. *J Clin Invest* **120** : 1016-1025, 2010
 - 7) Senner CE, Hemberger M : Regulation of early trophoblast differentiation-lessons from the mouse. *Placenta* **31** : 944-950, 2010
 - 8) Mayer W, Niveleau A, Walter J, et al : Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* **403** : 501-502, 2000
 - 9) Smallwood SA, Tomizawa S, Krueger E, et al : Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos. *Nat Genet* **43** : 811-814, 2011
 - 10) Flanagan JM, Wild L : An epigenetic role for noncoding RNAs and intragenic DNA methylation. *Genome Biol* **8** : 307, 2007
 - 11) Watanabe T, Totoki Y, Toyoda A, et al : Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature* **453** : 539-543, 2008
 - 12) Prieto DM, Markert UR : MicroRNAs in pregnancy. *J Reprod Immunol* **88** : 106-111, 2011
 - 13) Miura K, Miura S, Yamasaki K, et al : Identification of pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem* **56** : 1767-1771, 2010
 - 14) Surani MA, Barton SC, Norris ML : Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* **308** : 548-550, 1984
 - 15) McGrath J, Solter D : Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. *Science* **226** : 1317-1319, 1984
 - 16) Kaneda M, Okano M, Hata K, et al : Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* **429** : 900-903, 2004
 - 17) Kato Y, Kaneda M, Hata K, et al : 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, 2007
 - 18) Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, et al : Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* **294** : 2536-2539, 2001
 - 19) Hata K, Okano M, Lei H, et al : Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* **129** : 1983-1993, 2002
 - 20) Arima T, Hata K, Tanaka S, et al : Loss of the maternal imprint in Dnmt3Lmat^{-/-} mice leads to a differentiation defect in the extraembryonic tissue. *Dev Biol* **297** : 361-373, 2006
 - 21) Reik W, Dean W, Walter J : Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **293** : 1089-1093, 2001
 - 22) Yokomine T, Hata K, Tsudzuki M, et al : Evolution of the vertebrate DNMT3 gene family : a possible link between existence of DNMT3L and genomic imprinting. *Cytogenet Genome Res* **113** : 75-80, 2006
 - 23) Ono R, Nakamura K, Inoue K, et al : Deletion of Peg10, an imprinted gene acquired from a retrotransposon, causes early embryonic lethality. *Nat Genet* **38** : 101-106, 2006
 - 24) Sekita Y, Wagatsuma H, Nakamura K, et al : Role of retrotransposon-derived imprinted gene, Rtl1, in the feto-maternal interface of mouse placenta. *Nat Genet* **40** : 243-248, 2008
 - 25) Huynh KD, Lee JT : Inheritance of a pre-inactivated paternal X chromosome in early

- mouse embryos. *Nature* **426** : 857-862, 2003
- 26) Okamoto I, Otte AP, Allis CD, et al : Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science* **303** : 644-649, 2004
 - 27) Moreira de Mello JC, de Araújo ES, Stablini R, et al : Random X inactivation and extensive mosaicism in human placenta revealed by analysis of allele-specific gene expression along the X chromosome. *PLoS One* **5** : e10947, 2010
 - 28) Matoba S, Inoue K, Kohda T, et al : RNAi-mediated knockdown of Xist can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108** : 20621-20626, 2011
 - 29) Robinson WP, Beever C, Brown CJ, et al : Skewed X inactivation and recurrent spontaneous abortion. *Semin Reprod Med* **19** : 175-181, 2001
 - 30) Beever CL, Stephenson MD, Peñaherrera MS, et al : Skewed X-chromosome inactivation is associated with trisomy in women ascertained on the basis of recurrent spontaneous abortion or chromosomally abnormal pregnancies. *Am J Hum Genet* **72** : 399-407, 2003
 - 31) Warburton D, Kline J, Kinney A, et al : Skewed X chromosome inactivation and trisomic spontaneous abortion : no association. *Am J Hum Genet* **85** : 179-193, 2009
 - 32) Judson H, Hayward BE, Sheridan E, et al : A global disorder of imprinting in the human female germ line. *Nature* **416** : 539-542, 2002
 - 33) Murdoch S, Djuric U, Mazhar B, et al : Mutations in NALP7 cause recurrent hydatidiform moles and reproductive wastage in humans. *Nat Genet* **38** : 300-302, 2006
 - 34) Parry DA, Logan CV, Hayward BE, et al : Mutations causing familial biparental hydatidiform mole implicate c6orf221 as a possible regulator of genomic imprinting in the human oocyte. *Am J Hum Genet* **89** : 451-458, 2011
 - 35) Guo L, Choufani S, Ferreira J, et al : Altered gene expression and methylation of the human chromosome 11 imprinted region in small for gestational age (SGA) placentae. *Dev Biol* **320** : 79-91, 2008
 - 36) Bourque DK, Avila L, Peñaherrera M et al : Decreased placental methylation at the H19/IGF2 imprinting control region is associated with normotensive intrauterine growth restriction but not preeclampsia. *Placenta* **31** : 197-202, 2010
 - 37) McMinn J, Wei M, Schupf N, et al : Unbalanced placental expression of imprinted genes in human intrauterine growth restriction. *Placenta* **27** : 540-549, 2006
 - 38) Lambertini L, Diplas AI, Lee MJ, et al : A sensitive functional assay reveals frequent loss of genomic imprinting in human placenta. *Epigenetics* **3** : 261-269, 2008
 - 39) Yu L, Chen M, Zhao D, et al : The H19 gene imprinting in normal pregnancy and preeclampsia. *Placenta* **30** : 443-447, 2009
 - 40) Pozharny Y, Lambertini L, Ma Y, et al : Genomic loss of imprinting in first-trimester human placenta. *Am J Obstet Gynecol* **202** : 391 e1-8, 2010
 - 41) Jirtle RL, Skinner MK : Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet* **8** : 253-262, 2007
 - 42) Doherty AS, Mann MR, Tremblay KD, et al : Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* **62** : 1526-1535, 2000
 - 43) Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, et al : Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet* **27** : 153-154, 2001
 - 44) Mann MR, Lee SS, Doherty AS, et al : Selective loss of imprinting in the placenta following preimplantation development in culture. *Development* **131** : 3727-3735, 2004
 - 45) Rivera RM, Stein P, Weaver JR, et al : Manipulations of mouse embryos prior to implantation result in aberrant expression of imprinted genes on day 9.5 of development. *Hum Mol Genet* **17** : 1-14, 2008

