

201128119B

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

本邦における反復胎状奇胎症例の実態把握と
確定診断法の開発に関する研究

平成22～23年度 総合研究報告書

研究代表者 秦 健一郎

平成24(2012)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

本邦における反復胎状奇胎症例の実態把握と
確定診断法の開発に関する研究

平成22～23年度 総合研究報告書

研究代表者 秦 健一郎

平成24（2012）年 3月

目 次

I. 総合研究報告

- 本邦における反復胎状奇胎症例の実態把握と確定診断法の開発に関する研究 ---- 1
秦 健一郎

II. 分担研究報告

1. 反復胎状奇胎の分子遺伝学的解析に関する研究----- 11
秦健一郎

資料 1、多型解析まとめ

資料 2、NALP7 遺伝子 SNV 解析まとめ

資料 3、染色体構造解析

資料 4、絨毛の DNA メチル化解析

資料 5、DNA メチル化解析のまとめ

2. 反復胎状奇胎症例の実態調査と臨床情報の収集解析

反復胎状奇胎症例の収集と奇胎の免疫組織学的解析----- 53

井篁一彦、齋藤滋、生水真紀夫、杉浦真弓、和氣徳夫、諸隈誠一

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 57

- IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 59

総 合 研 究 報 告

総合研究報告書

本邦における反復胎状奇胎症例の実態把握と確定診断法の開発

研究者代表者 秦健一郎 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

研究要旨

発生初期に病態を形成する異常妊娠は、慢性疾患などの出生後に発症する疾患と比較して、環境因子の影響を受けにくい。すなわち、より遺伝因子の関与が疑われる疾患であると考えられる。一方で、発生初期以上の多くは致死性であり淘汰されるため、従来の遺伝学的解析ではその病因および病態解明が困難であった。発生初期の異常の一つである全胎状奇胎は、水腫様に変性した絨毛成分のみで構成される組織像を特徴とする異常妊娠であるが、その中に反復して胎状奇胎を呈する症例が存在し、通常的全胎状奇胎と極めて異なる病因を有することが、最近の遺伝学的研究から明らかとなった。2006年に Murdoch らは、家族性の反復胎状奇胎を解析し、母親の *NALP7* 遺伝子変異が密接に関連している事を示したが、更に最新の報告では、孤発症例であっても、2回以上の奇胎を繰り返す症例では、ほとんどの症例に *NALP7* 遺伝子の変異が見出された。すなわち反復胎状奇胎には、従来の形態学的診断に加え、遺伝子解析による確定診断が重要であると考えられる。しかし本邦の反復胎状奇胎症例は、疫学的報告は散見されるが、病因病態から管理法までを系統的に検討解析した研究は見当たらない。

そこで本研究計画では、1) 全国規模で反復胎状奇胎症例を照会し、2) 候補症例検体および臨床情報を収集した。また、3) 母 *NALP7* 遺伝子の変異解析を行い、併せて、4) 反復胎状奇胎の発症起源を分子遺伝学的に確定した。これら1) から4) の解析結果を統合し、本邦の反復胎状奇胎症例に最適な確定診断法の開発と、臨床的特徴を抽出する事を目的とし、研究体制の構築と解析を進めている。本年度は、初年度に引き続き、反復胎状奇胎症例の収集を行った。正常（人工流産）絨毛と、異常妊娠症例の *NALP7* 遺伝子配列解析を行い、日本人集団で高頻度に認められる *NALP7* 遺伝子多型を同定した。また、絨毛組織の網羅的な DNA メチル化解析を行った。これらの解析から得られた遺伝子多型情報と、発生初期の絨毛組織 DNA メチル化プロファイルは、本邦症例の診断法確立に必須の知見である。

本研究の進捗により、本邦の反復胎状奇胎の確定診断法を確立できるのみならず、発症起源に遡って胎状奇胎を正確に分類・確定診断することが可能となり、絨毛性疾患のより適正な管理法の決定に貢献できる。*NALP7* 遺伝子変異は習慣流産との関連が示唆されており、他の難治性異常妊娠の病態解明への展開も期待される。

分担研究者

井篁一彦	和歌山県立医科大学産科婦人科学	教授
生水真紀夫	千葉大学大学院生殖機能病態学	教授
杉浦真弓	名古屋市立大学大学院医学研究科産科婦人科	教授
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	教授
諸隈誠一	九州大学病院産科婦人科	助教

A. 研究目的

全胎状奇胎は、発症高リスク集団が存在し、人種間差があることから、発症には遺伝因子が関与している事が示唆される。本邦では、全胎状奇胎に続く妊娠が再び全胎状奇胎となる確率は、通常的全胎状奇胎発生頻度の10倍前後で、反復率は2-5%に上るとされている。近年の本邦における胎状奇胎発症数は、出生数1,000人に対し1例前後であり、年間の出生数は100万人前後である事から、毎年数十人の患者が、胎状奇胎を反復して発症していると推定される。

最近の遺伝学的研究から、反復する胎状奇胎は、通常的全胎状奇胎と極めて異なる疾患背景を有することが明らかとなった。2006年に、家族性反復胎状奇胎症例の解析から、母親の *NALP7* 遺伝子変異と反復胎状奇胎に強い関連があることが同定された

(*Nat Genet.* 2006;38:300-2)。さらに最新の報告では、家族歴を有しない孤発症例であっても、2回以上の奇胎を繰り返す症例のほとんどに、*NALP7* 遺伝子に変異が存在することが示された (*Hum Mutat.* 2009;30:E629-39, *Hum Mol Genet.* 2009;18:888-97)。その他の特異な所見として、反復胎状奇胎は両親ゲノムを有する一見正常な核型であること(通常的全胎状奇胎は父ゲノムのみを有する二倍体)、また、インプリンティング遺伝子制御領域のDNAメチル化異常を伴っている等の特徴も明らかになった。

従来の形態的組織学的診断に加え、上記の分子遺伝学的解析に基づく最新の知見を考慮すれば、反復胎状奇胎

の確定診断が可能となる。しかし本邦では、反復胎状奇胎症例の疫学的報告は散見されるが、病因病態を分子遺伝学的に解析した例は報告されておらず、当然分子診断に基づいた治療転帰や適切な管理法を系統的に検討解析した研究は見当たらない。

そこで本研究計画では、1) 全国規模で反復胎状奇胎症例を照会し、2) 候補患者検体および病歴等の臨床情報を収集する。また、3) 母 *NALP7* 遺伝子の変異解析を行い、併せて、4) 反復胎状奇胎組織の発症起源を分子遺伝学的に確定する。これら1) から4) の解析結果を統合し、本邦の反復胎状奇胎症例に最適な確定診断法の開発と、臨床的特徴を抽出する事を目的とする。

反復胎状奇胎の分子遺伝学的診断に成功しているのは海外の数グループのみで、本邦の反復胎状奇胎疑い症例に対する分子遺伝学的化解析は、一切試みられていない。従来胎状奇胎は、形態学的な特徴に従って分類が成されてきたが、分子遺伝学的な病因病態による細分類・再分類を行えば、発症後の妊娠転帰や合併症発症率が異なる症例群が抽出される可能性が予測される。本研究で得られる知見は、絨毛性疾患の診断管理法に、多大な貢献を成すことが期待される。海外の報告では、2回以上の全胎状奇胎を反復する症例の大部分に、*NALP7* 遺伝子に変異が存在することが示された。本邦の症例も、同様の分子遺伝学的解析手法により、確定診断を開発できると予想される。また、確定診断に基づいた新たな分類で臨床経過を再評価し、適正な反復胎状奇胎症例の管理法が提唱

できると考えられる。

現在、「染色体転座に起因する習慣流産」は、着床前診断の審査対象とされている。反復胎状奇胎は、このような習慣流産よりもはるかに重篤な母体合併症のリスクが高く、医学的な見地からも着床前診断を考慮すべき疾患であると言える。本研究結果により、微量細胞を用いた反復胎状奇胎の分子遺伝学的診断方法が確立されれば、着床前診断の適応検討に十分値する疾患であると考えられる。

NALP7 遺伝子ヘテロ変異は、不妊症患者で有意に高率に認められるという報告もあり (*Hum Mutat.* 2007;28:741)、本研究は習慣流産など反復胎状奇胎以外の異常妊娠解析にも展開できる可能性がある。また、海外症例では様々な *NALP7* 遺伝子点変異が見つかり、日本人集団で特異的な変異(日本人患者の確定診断に有用な遺伝子変異)が見つかる可能性がある。

本研究で行う免疫組織染色や DNA メチル化解析法は、研究代表者及び分担研究者らが独自に開発した技術に基づいており、応用診断法による特許取得が見込まれる。

B. 研究方法

本邦での反復胎状奇胎症例の実態は把握されておらず、分子診断法の有効性も検証されていない。そこで、1) 全国の不育症および絨毛性疾患を取り扱う中核病院に、反復胎状奇胎症例の有無について照会し、2) 該当症例が存在すれば、患者検体および病歴治療

歴等臨床情報を収集する。また、3) 母親末梢血の *NALP7* 遺伝子の変異解析を行い、4) 反復胎状奇胎の分子遺伝学発生起源診断を行う。1) - 4) の解析結果を統合し、より適正な診断治療法を検証することを目的とする。

上記目的を達成するために、次頁に記した以下の計画に沿って研究を進めた。

1) 反復胎状奇胎症例情報の収集(井籠、生水、杉浦、齊藤、和氣、諸隈、秦)

妊娠分娩歴に二回以上の胎状奇胎(部分および全胎状奇胎のいずれかあるいは両方)を認める症例を、全国の医療機関に照会する。

分担研究者の齊藤を介して厚労科研費の不育症研究班(H20-子ども一般-002、代表齊藤滋)に、また、分担研究者を介して日本絨毛性疾患研究会および日本産婦人科医会のネットワークに協力を仰ぎ、反復胎状奇胎症例の有無を照会した。

2) 検体と臨床情報の収集(齊藤、和氣、諸隈、秦)

反復胎状奇胎候補症例からは、患者(母体)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。胎状奇胎組織は、凍結組織が得られない場合でも、固定標本が保管されている検体は、標本からゲノム DNA を回収した。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)を収集した。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った。研究代表者秦は現在、類似の遺伝子

解析研究を行っており、ゲノム DNA 回収技術及び個人情報等の管理体制はすでに確立している。

3) *NALP7* 遺伝子変異解析 (秦)

海外の家系例およびいくつかの孤発症例で、患者 (母体) の *NALP7* 遺伝子変異が同定されている。これらの有無を、サンガー法による従来型の DNA 配列解析装置を用いた変異解析システムで解析した。当初リアルタイムシーケンス解析装置を用いた解析を予定していたが、実際に本邦症例を解析してみると、日本人集団にも未知の多型が予想以上に存在したことから、リアルタイムシーケンス解析装置による狭い領域の解析では却って低効率となるため、サンガー法による遺伝子配列解析を行った。また、海外の症例で同定された遺伝子変異は多岐にわたっており (2012 年 2 月時点で約 30 種類)、いわゆるホットスポットは存在しないことから、原則として今後も、*NALP7* 遺伝子変異解析には、同遺伝子の全配列解析が必要と考えられる。

4) 胞状奇胎組織の分子遺伝学的解析 (秦、和氣、諸隈)

4.1) 多型マーカー解析による発症起源の決定 (秦)

胞状奇胎組織のゲノム DNA と、母末梢血の多型マーカー解析を行い、その比較により、奇胎の発症起源 (雄核発生、正常 2 倍体、2 精子受精 3 倍体、等) の決定を行った。

4.2) DNA メチル化解析 (秦)

海外の反復胞状奇胎組織はいずれも、インプリンティング遺伝子の DNA

メチル化異常を伴う。研究代表者らは、すでにヒトインプリンティング遺伝子の制御領域を含む 32 箇所 DNA メチル化状態を網羅的に解析する系を確立している。この解析系を用い、反復胞状奇胎絨毛組織の網羅的 DNA メチル化解析を行った。

4.3) 免疫組織染色解析 (和氣、諸隈)

胞状奇胎の補助診断法としての臨床的有用性が認められている p57KIP2 免疫染色に加えて、分担研究者和氣らが独自に同定・開発した、TSSC3 免疫染色法を用い、奇胎の分類診断法を行った。

C. 研究結果

結果 1) 症例照会

九州大学が扱った胞状奇胎 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、胞状奇胎の家族歴 (本人と母親と娘) を有する症例が 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。このような孤発症例であっても、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、疑い症例として解析を進めた。

富山大学では、反復胞状奇胎疑い症例 (2004 年から 2007 年の間に 2 度の胞状奇胎、1 度の流産、1 度の自然分娩) から、遺伝子解析の同意を得て患者末梢血を回収した。

これら分担研究者らの保有する症例の解析に加え、国内の関連学術団体と関連する厚労省研究班に呼び掛け、症例照会を行った。

症例の照会と並行し、当初の研究計画通り、対照症例となる胞状奇胎の既往の無い経産婦末梢血を 50 例以上、人工妊娠中絶例の絨毛を 15 例、雄核発生の胞状奇胎 10 例を収集した。富山大学から反復胞状奇胎症例を 1 例、九州大学から反復胞状奇胎症例を 1 例、正常二倍体の顕微鏡的胞状奇胎症例を 7 例収集した。また、本分担研究班の照会活動により、研究班外の 2 医療機関の協力を得て、合計 2 例の反復胞状奇胎症例検体を収集することができた。これらの一例から、後程詳細を述べるように、新規のナンセンス変異が同定された。

結果 2) 遺伝マーカー診断

九州大学と同大学関連病院で得られた、水腫化した絨毛組織を伴う流産 267 例の DNA 多型解析を行ったところ、18 例 (7%) 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。これらの水腫化流産は、反復胞状奇胎と同様の背景を持っているが、ごく初期に治療介入がなされたために典型的な奇胎の形態を取らず、流産と診断されていた可能性がある。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) を網羅的に解析したが、特に異常 DNA メチル化は認めなかった。

結果 3) 候補遺伝子変異診断法の開

発

海外の報告では、流産を繰り返す症例にも *NALP7* 遺伝子の変異を見出しており、これらは反復胞状奇胎と同じ病態を背景に持つ潜在的な反復胞状奇胎症例と推測されている。初年度は、形態学的解析により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二倍体と考えられる胞状奇胎症例 1 例、267 例の嚢胞化絨毛組織の DNA 多型解析を行い、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が 15 例 (6%) 存在した。これらの異常核型絨毛組織は、反復胞状奇胎と同様の背景を持っていることが疑われた。また、富山大学の施設症例から回収された 1 例の反復胞状奇胎症例、合計 7 症例の母 (患者) ゲノム DNA を用い、*NALP7* 遺伝子変異の解析を行った。正常例 (人工妊娠中絶由来の絨毛) も含めて、7 箇所 of 未知の多型が見つかった。これらは、日本人集団で比較的頻度の高い多型と考えられる。海外症例で報告されている *NALP7* 遺伝子のホモ変異部位および我々が新規に同定した同遺伝子の多型部位で、候補症例群で有意に高い頻度で認められる多型は存在しなかった。

結果 4) 胞状奇胎組織の DNA メチル化診断

我々が独自に確立した、インプリンティング遺伝子関連ゲノム領域の DNA メチル化スクリーニング法を用い、「のう胞化絨毛組織を呈するが両親

由来のゲノムを有する正常二倍体」の絨毛ゲノム DNA の解析を行った。現在までのところ、これらの症例の DNA メチル化状態は、正常絨毛（人工妊娠中絶症例）の DNA メチル化状態と明らかな差異は認められなかった。

結果 5) 次世代シーケンサーを用いた全エクソン配列解析

結果 3) で候補遺伝子の既知変異が同定されなかった症例について、次世代シーケンサーを用いた全エクソン配列解析を行った。孤発症例の解析から、約 10 万ヶ所の SNV（一塩基多様性）が見いだされ、そのうち約 1 万ヶ所がアミノ酸置換を伴う SNV、そのうち約 700 ヶ所が新規 SNV（既知の SNV ではない配列）、29 ヶ所がホモの SNV であった。ホモの SNV を有する 13 遺伝子の一ヶ所で、ナンセンス変異を同定した。

D. 考察

胎状奇胎の大部分は、何らかの理由で雄核発生（父親由来の染色体しか持たない異常胚発生）を起源とする。本邦では、反復胎状奇胎症例を含め、奇胎症例の遺伝子診断は行われていないが、海外の胎状奇胎を反復して発症する家系例の遺伝学的解析から、反復胎状奇胎関連遺伝子（*NALP7* 遺伝子）の変異が多数同定・報告されている。本邦の症例にも同様の分子病態が存在すると考えられ、本邦症例の分子診断法の確立は確実に可能であり、臨床的意義は高い。そこで本邦の反復胎状奇胎症例を広く照会して収集すると共に、これらの分子遺伝学的解析を試みた。その結果、初年度は、海外では報告されていない、あるいは、一塩

基多型データベースに登録されていない未知の SNV（一塩基多様性）を複数見出している。これらの SNV は、日本人集団で比較的高頻度に認められる遺伝子型と考えられ、本邦症例に最適化した診断法の確立に必須の貴重な知見が得られたと考える。本邦症例に最適化した確定診断に基づいた新たな分類に基づく治療経験を重ねれば、適正な反復胎状奇胎症例の管理法が提唱できる。

海外の報告では、家族性反復胎状奇胎症例のみならず、家族歴を伴わない孤発例・正常な妊娠歴のある症例・奇胎と診断されていなかった不育症症例などでも、*NALP7* 遺伝子変異が同定されていることから、本研究は、習慣流産など反復胎状奇胎以外の異常妊娠解析にも展開できる可能性がある。

現在、「染色体転座に起因する習慣流産」は着床前診断の審査対象とされているが、反復胎状奇胎は習慣流産よりもはるかに母体の重篤な合併症リスクが高く、医学的な見地からは着床前診断を考慮すべき疾患であると考えられる。本研究成果の展開応用により、微量組織（一細胞）を用いた反復胎状奇胎の分子遺伝学的診断法が可能であり、確実な着床前診断法の確立が期待できる。最終年度である本年、診断不明症例群の中から、次世代シーケンサーを用いた全エクソン配列解析により、反復胎状奇胎症例の遺伝子変異同定に成功した。本解析結果は、本邦で初の症例報告であり、またみつかった変異は、これまで報告されていなかった新規変異である。

本研究で開発される免疫組織染色

やDNAメチル化解析法は、研究代表者及び分担研究者らが独自に開発した技術に基づいており、応用診断法による特許取得が見込まれる。

今後の課題として、以下に挙げる5点が考えられる。

1) 診断法の確立

本研究により、日本人集団で高頻度に認められる一塩基多様性および、新規のホモナンセンス変異の同定に成功した。従来の診断法では、遺伝子変異を伴う反復胎状奇胎を鑑別する事は不可能である。本研究では、主にエクソン領域の解析を行ったが、診断不能例に関しては、他の遺伝子制御領域(イントロンやプロモーター領域などを含めた合計約30,000bp)の解析が必要である。

海外の報告では、典型的な反復胎状奇胎症例でない症例、特に、流産と診断されていた症例に *NALP7* 遺伝子変異が同定されている。これらの症例は、顕微鏡的にしか奇胎所見が見つからず、流産と診断されている症例であると推測される。これらの症例に対し、候補領域を絞って低コストで変異スクリーニングを行う必要がある。

上記に加え、最近さらに *c6orf221* 遺伝子変異との関連を示唆する報告がなされた (Am J Hum Genet 2011)。これらの因子については、今回収集した症例全例の解析は行っておらず、今後の検討が必要である。

2) 過去症例の検証、および3) 新たな治療管理法の提言

本研究で同定した症例で同定された *NALP7* 遺伝子変異は、ホモのナンセ

ンス変異であることから、そして、同遺伝子のナンセンス変異は海外の家系例でも同様に多数同定されている事から、本遺伝子異常と、反復胎状奇胎発症との関連は、ほぼ間違いないと推測される。一方で、これらの分子遺伝学的診断を踏まえた転機の検討はまだ行われていない。また、病因病態は不明であり、今後の分子生物学的解析に基づいた治療管理法の提言が必要と考える。

4) 着床前診断

胎状奇胎の標準的治療管理法では、一定期間次の妊娠を控え、定期的に経過観察の必要がある。その一方で、海外症例では、*NALP7* 遺伝子ホモ変異患者でも、正常分娩を行った例が報告されている。すなわち、*NALP7* 遺伝子に変異があっても、胚が受ける発生異常には程度差があり、胎状奇胎を発症せずに正常に出生できる胚も存在すると考えられる。様々な研究成果から、胎状奇胎の発生とDNAメチル化状態の異常は関連があると考えられている。よって、母体に *NALP7* 遺伝子変異が存在しても、胚自体のDNAメチル化異常が無い(あるいは軽微な)症例は、反復胎状奇胎の発症リスクが低いと期待される。そこで、本研究成果を基に、着床前胚のDNAメチル化解析を行えば、反復胎状奇胎発症リスクの低い胚を選択する事が可能であり、安全な妊娠の成立と継続が期待できる。現在、「染色体転座に起因する習慣流産」は、着床前診断の審査対象とされている。反復胎状奇胎は、このような習慣流産よりもはるかに重篤な母体合併症のリスクが高く、医学的な見地からも着床前診断の適応検討に十分値する疾

患であると考えられる。

F. 健康危険情報

5) 反復胎状奇胎症例類縁疾患に対する新たな概念の確立

本研究を通じ、反復胎状奇胎の候補責任遺伝子解析手法が確立された。海外の報告では、DNA メチル化異常や *NALP7* 遺伝子変異が様々な絨毛性疾患あるいは流産(と診断されていた潜在的な反復胎状奇胎症例の可能性も否定できない)にも存在する可能性が指摘されている。更に最近報告された *c6orf221* 遺伝子との関連を含め、「母体のホモ変異や絨毛の DNA メチル化異常を伴う絨毛発生分化異常妊娠」という新たな病態概念を確立し、新たな診断・治療法の開発を行う必要がある。

特記事項なし。

E. 結論

全国規模の反復胎状奇胎疑い症例の照会を行うと共に、分担研究者と共同研究者の医療機関あるいは関連医療機関の症例を後ろ向きに検索し、疑い症例を見出した。

これらの疑い症例および妊娠分娩歴に特に異常を有さない日本人集団で比較的頻度の高いと推測される *NALP7* 遺伝子多型を 7 箇所見出すと共に、本邦初の *NALP7* 遺伝子ホモ変異症例を同定することに成功した。本研究で確定診断法は確立できたが、得られた知見を元にさらに候補領域を絞り込み、簡便安価なスクリーニングへと応用展開していく。

分 担 研 究 報 告

反復胞状奇胎の分子遺伝学的解析

分担研究者 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

全胞状奇胎は、大部分が雄核発生（父ゲノムのみを有する二倍体）を発生母地とするが、全胞状奇胎を何度も繰り返す一部の症例（反復胞状奇胎）では、奇胎組織は一見正常な二倍体であるが、DNA メチル化の異常を伴い、また、母体の *NALP7* 遺伝子変異と関連している事が明らかとなった。従来の形態学的診断では、反復胞状奇胎を通常的全胞状奇胎と区別する事は不可能であり、反復胞状奇胎の診断には、分子遺伝学的な解析が有効かつ必須である。しかし本邦の反復胞状奇胎症例は、疫学的報告は散見されるが、分子遺伝学的診断法について系統的に検討解析した研究は見当たらない。

そこで本研究計画では、候補症例検体および臨床情報を収集し、母 *NALP7* 遺伝子の変異解析を行い、反復胞状奇胎の発症起源を分子遺伝学的に確定した。これらの解析結果を統合し、本邦の反復胞状奇胎症例に最適な確定診断法の開発と、臨床的特徴を抽出する事を目的とした。試験的に行った習慣流産症例の解析では、5つの新規遺伝子多型が得られた。また、最終年度の研究で、本邦初の *NALP7* 遺伝子ホモ変異症例の同定に成功した。

本研究の進捗により、発症起源に遡って胞状奇胎を正確に分類・確定診断することが可能となる。最近新たな候補因子遺伝子 (*c6orf221* 遺伝子) も報告されており、*NALP7* 遺伝子変異と併せ、反復胞状奇胎周辺類縁疾患との関連解明も期待される。

A. 研究目的

通常経験する全胞状奇胎は、雄核発生により発症することが知られている。本邦では、全胞状奇胎に続く妊娠が再び全胞状奇胎となる確率は、通常的全胞状奇胎発生頻度の10倍前後で、反復率は2-5%に上るとされている。近年の胞状奇胎の発症数は、出生数1,000人に対し1例前後であり、年間の出生数は100万人前後である事から、毎年数十人の患者が、胞状奇胎を反復して発

症していると推定される。

最近の遺伝学的研究から、反復胞状奇胎（反復胞状奇胎）は、通常的全胞状奇胎と極めて異なる病因を有することが明らかとなった。2006年に、家族性反復胞状奇胎の解析から、母親の *NALP7* 遺伝子変異が反復胞状奇胎の原因であることが同定された (*Nat Genet.* 2006;38:300-2)。さらに最新の報告では、孤発症例であっても、2回以上の奇胎を繰り返す症例のほとんどに、*NALP7* 遺伝子に変異が存在することが示され

た。(Hum Mutat. 2009;30:E629-39, Hum Mol Genet. 2009;18:888-97) その他に、反復胞状奇胎は両親ゲノムを有する一見正常な核型で(通常的全胞状奇胎は父ゲノムのみを有する)、DNAメチル化異常を伴う等の特徴も明らかになった。これらの分子遺伝学的診断と従来の形態的診断を併用すれば、反復胞状奇胎の確定診断が可能となる。しかし本邦では、反復胞状奇胎症例の疫学的報告は散見されるが、病因病態から管理法までを系統的に検討解析した研究は見当たらない。

そこで本研究計画では、候補患者検体および病歴等の臨床情報を収集する。また、NALP7遺伝子をはじめとする遺伝子変異解析を行い、併せて、反復胞状奇胎組織の発症起源を分子遺伝学的に確定する。これらの解析結果を統合し、本邦の反復胞状奇胎症例に最適な確定診断法の開発と、臨床的特徴を抽出する事を目的とする。初年度は、日本人集団で頻度が高いと考えられる、公的なデータベースに登録されていない候補因子遺伝子多型を同定したが、既知の候補因子遺伝子変異を同定することはできなかった。最終年度は、既知変異以外の配列の特徴の解析を中心に行った。

B. 研究方法

本邦では反復胞状奇胎の分子診断は行われていないが、それ以前に、本邦の反復胞状奇胎症例の実態が把握されておらず、分子診断法の有効性も検証されていない。そこで、分担研究者ら

の協力を得て、1)患者検体および病歴等の臨床情報を収集する。また、2)母親末梢血のNALP7遺伝子の変異解析を行い、3)反復胞状奇胎組織の分子遺伝学発症起源診断を行った。

上記目的を達成するために、次頁に記した以下の計画に沿って研究を推進した。

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を回収した。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を回収した。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)を収集した。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った。

研究代表者秦は現在、類似の遺伝子解析研究を行っており、ゲノムDNA回収技術及び個人情報等の管理体制はすでに確立している。

2) NALP7遺伝子変異解析

海外の孤発症例および家族性症例で同定された母体のNALP7遺伝子変異の有無を、サンガー法による遺伝子配列解析装置を用いて解析した。海外の症例で同定された遺伝子変異は多岐にわたっており(2009年7月時点で約30種類)、日本人集団にもおそらく日本人集団で頻度の高い新規の多型が、初年度の解析で多数見つかった。これらの知見を元に、症例で特異的な候補因子遺伝子配列の特徴を同定する。

3) 胞状奇胎組織の分子遺伝学的解析

3.1) 多型マーカー解析による発症起源の決定

胞状奇胎組織のゲノム DNA と、母末梢血の多型マーカー解析を行い、その比較により、奇胎の発症起源（雄核発生、正常 2 倍体、2 精子受精 3 倍体、等）の決定を行った。

3.2) DNA メチル化解析

海外の反復胞状奇胎組織はいずれも、インプリンティング遺伝子の DNA メチル化異常を伴う。研究代表者らは、すでにヒトインプリンティング遺伝子の制御領域を含む 32 箇所の DNA メチル化状態を網羅的に解析する系を確立している。この解析系を用い、反復胞状奇胎絨毛組織の網羅的 DNA メチル化解析を行った。

C. 研究結果

結果 1) 候補遺伝子変異診断法の開発

初年度は、*NALP7* 遺伝子約 30,000 塩基対の中から、海外で報告のあった 10 領域で、合計 5,796 塩基の配列解析を行った。その結果、合計 8 箇所、未知の、しかしおそらくは日本人集団では比較的高頻度に同定される *NALP7* 遺伝子多型を見出した（資料 1）。その一方で、症例特異的な異常を乱すことができなかつた。本年はさらに解析範囲を広げ、*NALP7* 遺伝子にホモ変異を同定した（資料 2）。これらの領域は、約 2M にわたり多型が homozygosity になっており、いわゆる HBD (Homozygosity by descent) の状態であると考えられた（資料 3）。

結果 2) 胞状奇胎組織の分子遺伝学的

解析

上記の、*NALP7* 遺伝子ホモ変異を同定した症例の絨毛組織は、海外の類似症例結果から、見かけ上は父ゲノムと母ゲノムを有する正常二倍体であることが予想される。しかし、絨毛組織標本から回収されたゲノム DNA を用いたマーカー解析では、父由来の遺伝マーカーを検出できず、確定診断に至らなかった。父由来の遺伝マーカーが検出できないことから、パラフィン包埋ブロックから回収されたゲノム DNA のほとんどは、母親由来（脱落膜組織由来）であったと考えられる。

結果 3) 胞状奇胎組織の DNA メチル化診断

我々が独自に確立した、インプリンティング遺伝子関連ゲノム領域の DNA メチル化スクリーニング法を用い、収集した反復胞状奇胎組織および「のう胞化絨毛組織を呈するが両親由来のゲノムを有する正常二倍体」の絨毛ゲノム DNA の解析を行ったが、現在までのところ、これらの症例の DNA メチル化状態は、正常絨毛（人工妊娠中絶症例）の DNA メチル化状態と明らかな差異は認められなかつた（資料 4, 5）。これらの結果からは、のう胞化絨毛組織は、通常の流産組織であり、絨毛性増殖性異常は背景に存在しないことが示唆される。

D. 考察

最終年度の解析により、*NALP7* 遺伝子にホモ変異を同定することに成功した。本研究に因り、本邦で初めて、反復胞状奇胎の関連候補因子に、新規のホモ

変異を見出すことに成功した。また、本研究により、海外では報告されていない未知の SNV (一塩基多様性) を複数見出している。これらの SNV は、症例に特異的な異常か、あるいは一定の頻度で正常集団にも見出される多型なのかは、今後のさらなる検討が必要であるが、いずれにせよ日本人集団に特有の遺伝子型と考えられ、本邦症例に最適化した診断法の確立に必須の貴重な知見が得られたと考える。また最近、*c6orf221* 遺伝子変異との関連も海外症例では報告されており、今後候補遺伝子を増やして解析が必要であろう。

現在、反復胞状奇胎の分子遺伝学的診断に成功しているのは海外の研究グループのみで、国内で類似の検討は行われていない。従来奇胎は、形態学的分類に従って分類が成されてきたが、分子遺伝学的な病因病態による細分類・再分類を行えば、発症後の妊娠転帰や合併症発症率が異なる可能性が十分考えられる。本研究で得られる知見は、絨毛性疾患の診断管理法に、多大な貢献を成すことが期待される。海外の報告では、2 回以上の全胞状奇胎を反復する症例の大部分に、*NALP7* 遺伝子に変異が存在することが示された。本邦の症例も、同様の分子遺伝学的解析手法により、確定診断を開発できると予想される。また、確定診断に基づいた新たな分類で臨床経過を再評価し、適正な反復胞状奇胎症例の管理法が提唱できると考えられる。

E. 結論

本研究により、反復胞状奇胎の分子遺伝学的診断法を確立し、本邦の候補症例の解析を行った。海外症例で報告さ

れている既知の *NALP7* 遺伝子変異は同定されなかったが、新規のホモ変異 (ナンセンス変異) の同定に成功した。また、未知の *NALP7* 遺伝子 SNV (一塩基多様性)、すなわち、日本人集団で比較的頻度の高いと推測される SNV を 8 箇所同定した。これらの知見により、本邦症例を分子遺伝学的に解析するための体制は整ったと考える。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

[原著論文 (欧文)]

1. Yamazawa K, Nakabayashi K, Matsuoka K, Masubara K, Hata K, Horikawa R, Ogata T. J Hum Genet. Androgenetic/biparental mosaicism in a girl with Beckwith-Wiedemann syndrome-like and upd(14)pat-like phenotypes. 2010 Nov 11. [Epub ahead of print]
2. Kobayashi H, Sakurai T, Sato S, Nakabayashi K, Hata K, Kono T. A cis-linkage between large-range Gpr1-Zdbf2 intergenic transcription and imprinted DNA methylation at Gpr1 locus during early embryogenesis. *FEBS Letters* (in press)
3. Fuke-Sato T, Yamazawa K, Nakabayashi K, Matsubara K, Matsuoka K, Hasegawa T, Dobashi K, Ogata T (2012) Mosaic upd(7)mat in a patient with Silver-Russell syndrome. *Am J Med Genet A* 158A:465-468.
4. Kobayashi H, Sakurai T, Takahashi N, Fukuda A, Obata Y, Sato S, Nakabayashi K, Hata K, Sotomaru Y, Suzuki Y, Kono T (2012) Mouse gametic DNA methylomes

show the role of intragenic DNA methylation in the establishment of oocyte-specific heritable marks. *PLoS Genet* 8:e1002440.

5. Nakanishi M, Hayakawa K, Nakabayashi K, Hata K, Shiota K, Tanaka S (2012) Trophoblast-specific DNA methylation occurs after the segregation of trophectoderm and inner cell mass in mouse periimplantation embryo (2012) *Epigenetics* 7:173-182.
6. O'Doherty AM, Rutledge CE, Sato S, Thakur A, Lees-Murdock DJ, Hata K, Walsh CP (2011) DNA methylation plays an important role in promoter choice and protein production at the mouse Dnmt3L locus. *Dev Biol* 356:411-420.
7. Sato S, Yoshida W, Soejima H, Nakabayashi K, Hata K (2011) Methylation dynamics of IG-DMR and Gtl2-DMR during murine embryonic and placental development. *Genomics* 98:120-127. 2011.
8. Nakabayashi K, Trujillo AM, Tayama C, Camprubi C, Yoshida W, Lapunzina P, Sanchez A, Soejima H, Aburatani H, Nagae G, Ogata T, Hata K, Monk D (2011) Methylation screening of reciprocal genome-wide UPDs identifies novel human-specific imprinted genes. *Hum Mol Genet* 20:3188-3197.
9. Tomizawa S, Kobayashi H, Watanabe T, Andrews S, Hata K, Kelsey G, Sasaki H (2011) Dynamics stage-specific changes in imprinted differentially methylated regions during early mammalian development and prevalence of non-CpG methylation in oocytes. *Development* 138:811-820.

[総説 (和文)]

1. 秦健一郎 (2010) 「胎児発育とゲノムインプリンティング」 *HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY* 17, 43-48.
2. 秦健一郎 (2010) 「産科とエピジェネティクス」産婦人科の実際 第9巻 第12号、2051-2057
3. 秦健一郎:胎盤形成のエピジェネティクス 臨床産婦人科 第65巻第3号 243-246 2011
4. 久須美真紀、秦健一郎:妊娠維持機構とその破綻 ホルモンフロンティア 19:17-22. 2012

[特別講演・シンポジウム]

1. 教育講演 秦健一郎「生殖に関わるエピジェネティクスとその異常」、日本生殖医学会、徳島、11月12日、2010.
2. 招待講演 秦健一郎「ヒト異常妊娠のゲノム・エピゲノム解析」、大阪府立母子保健総合医療センターシンポジウム、2月14日、2011
3. 教育講演 秦健一郎「生殖に関わるエピジェネティクスとその異常」、日本生殖医学会、徳島、11月12日、2010.
4. 招待講演 秦健一郎「ヒト異常妊娠のゲノム・エピゲノム解析」、大阪府立母子保健総合医療センターシンポジウム、2月14日、2011

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

NLRP7の多型

No.	gDNA (2009)	rs No.	variants	Exon or Intron	Genotypes	Control (n=89)	HM (total) (n=21)	HM (diploid) (n=7)	RHM (n=3)	Yates Chi	P value	Yates Chi	P value	Yates Chi	P value
										Control vs HM (total)	Control vs HM (total)	Control vs HM (diploid)	Control vs HM (diploid)	Control vs HM (RHM)	Control vs HM (RHM)
1	55,458,801		C>T	Intron 1	C/C	84	21	7	3	0.2803	0.8692	0.0572	0.9718	0.7612	0.6834
					C/T	5	0	0	0						
					T/T	0	0	0	0						
2	55,453,134	rs775886	C>T	Intron 2	C/C	54	14	3	3	0.0738	0.9638	1.2967	0.5229	3.5438	0.17
					C/T	33	7	4	0						
					T/T	2	0	0	0						
3	55,453,096		C>A	Intron 2	C/C	88	21	7	3	0.6242	0.7319	2.7266	0.2558		
					C/A	1	0	0	0						
					A/A	0	0	0	0						
4	55,451,797	rs775883	G>A	Exon 4	G/G	54	14	3	3	0.0738	0.9638	1.2967	0.5229	3.5438	0.17
					G/A	33	7	4	0						
					A/A	2	0	0	0						
5	55,451,232	rs775882	G>A	Exon 4	G/G	57	14	3	3	0.0008	0.9996	0.5034	0.7775	0.4487	0.799
					G/A	32	7	4	0						
					A/A	0	0	0	0						
6	55,451,050	rs780287 96	G>A, C	Exon 4	G/G	53	13	3	3	0.984	0.9638	2.9498	0.7077	1.6321	0.8973
					G/A	32	6	3	0						
					A/A	0	0	0	0						
					G/C	4	1	0	0						
					C/C	0	0	0	0						
					A/C	0	1	1	0						
7	55,450,888		G>C	Exon 4	G/G	88	20	6	3	0.046	0.9772	0.9475	0.6227		
					G/C	1	1	1	0						
					C/C	0	0	0	0						
8	55,450,746	rs617474 14	G>A	Exon 4	G/G	84	21	7	3	0.2803	0.8692	0.0572	0.9718	0.7612	0.6834
					G/A	5	0	0	0						
					A/A	0	0	0	0						
9	55,449,446	rs770725 52	G>A	Exon 5	G/G	84	20	6	3	0.1435	0.9308	0.0103	0.9949	0.7612	0.6834
					G/A	5	1	1	0						
					A/A	0	0	0	0						
10	55,447,612	rs176995 61	C>A	Intron 6	C/C	61	14	3	3	0.009	0.9955	0.9438	0.6238	0.2777	0.8703
					C/A	28	7	4	0						
					A/A	0	0	0	0						
11	55,447,595	rs733992 6	T>C	Intron 6	T/T	59	14	3	3	0.0682	0.9665	1.8056	0.4054	3.3064	0.1914
					T/C	28	7	4	0						
					C/C	2	0	0	0						