

C. 研究結果

前述の研究方法に沿って、分娩時の妊娠週数が36週以上で、妊娠分娩経過に特段の異常を認めなかった体外受精症例と、自然妊娠の対照群を、それぞれ19症例解析した。

体外受精症例群と自然妊娠群で、各プロンプト（42万カ所）の平均値を求め、scatter plots 解析を行うと、相関は $r^2=0.9992$ であった。また、各症例のデータを用いてクラスター解析を行うと、両群はそれぞれでクラスターを形成せず、区別できなかった。

D. 考察

エピジェネティックな情報は、発生時期や臓器によって異なる修飾状態を呈し、空間時間特異的な遺伝子発現を制御している。すなわち、新生児のエピジェネティックな状態を評価するには、新生児の組織を解析することが必須である。また、ジェネティックな情報には一塩基多型のような多様性・個体差があるが、エピジェネティックな情報にも同様に多様性・個体差があることはほぼ確実とされている。

本研究では、エピゲノム多様性の指標として、主にDNAメチル化状態を解析した。その理由は、これまで生殖補助医療が胎児に与える影響として報告された症例は主に、ゲノムインプリンティング異常を指標としているからである。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は、特に胎児と胎盤の発生発育に重要な役割を担うため、確かに生殖補助医療の影響の指標として魅力的である。一方で、これらの領域の異常は胎児と胎盤の発生発育に重篤な影響を与えるので、出生に至らず淘汰されてしまう可能性がある。しかし、胎児期に重要な機能を有さない領域にectopicな異常DNAメチル化が起これば、淘汰されずに出生児にも遺残している可能性が高い。このような仮説に基づき、我々は検索を行っている。実際にこのような手法を用

いた現在までの解析では、自然妊娠による出生児群と、体外受精による出生児群で、明らかな違いを検出するに至っていない。

E. 結論

エピジェネティックな情報は、環境因子によって変化することが知られており、体外受精などの生殖補助医療技術が与える影響が懸念されている。一方で、エピジェネティックな情報は、ジェネティックな情報と同様に多様性・個人差を有する。

解析対照群で真のエピジェネティックな異常を検出するには、このような背景に十分配慮し、適切な解析対象領域を選定し、厳密な統計的解析を行うことが求められる。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 和文総説

秦健一郎、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-。HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY 2012 ; 19 : 17-22.

2. 学会発表

1. 岩田圭子, 中林一彦, 松崎秀夫, 中村和彦, 秦健一郎, 森則夫: 自閉症死後脳縫線核メチル化状態の網羅的解析. 第39回日本脳科学会, 福岡, 2012.10.6
2. 秦健一郎: 発生とエピジェネティクス. 第30回日本受精着床学会, 大阪, 2012.8.31
3. 久須美真紀, 神通寛子, 秦健一郎, 千田将: 妊娠母獣の栄養状態に伴う新生仔レプチン受容体遺伝子領域のエピジェネティックな変化. 第64回日本産科婦人科学会, 兵庫, 2012.4.15
4. 直井裕子, 鳥巢弘道, 久須美真紀, 諸隈誠

一, 山田崇弘, 水上尚典, 和氣徳夫, 左合治彦, 秦 健一郎 : 異常妊娠のエピゲノム解析. 第 64 回日本産科婦人科学会高得点演題, 兵庫, 2012.4.13

5. Nakabayashi K, Trujillo A.M, Tayama C, Romanelli V, Lapunzina P, Kagami M, Soejima H, Ogata H, Court F, Monk D, Hata K: DNA methylation analysis of reciprocal genomewide UPDs to define imprinted differentially methylated regions in the human genome. The American Society of Human Genetics 62nd Annual Meeting, San Francisco, 2012.11.8
6. 久須美真紀, 中林一彦, 前原佳代子, 田嶋敦, 副島英伸, 吉原一, 秦健一郎 : 生殖補助医療技術が出生時の DNA メチル化状態に及ぼす影響の検討. 日本人類遺伝学会第 57 回大会, 東京, 2012.10.27
7. 中林一彦, 田山千春, Trujillo Alex Martin, 岡村浩司, 緒方勤, 副島英伸, Monk David, 秦健一郎 : 全ゲノム片親性ダイソミー症例の DNA メチル化解析によるヒトインプリントーム解明. 日本人類遺伝学会第 57 回大会, 東京, 2012.10.26

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
秦健一郎	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-	HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY	19	17-22	2012

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
秦健一郎	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-	HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY	19	17-22	2012

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
荒田尚子	妊娠を予定している・妊娠しているパセドウ病の患者さんをどう診る？	深田修司	あなたも名医！ 外来でどう診る？ 甲状腺疾患	日本医事 新報社	東京	2011	118-123

ART の品質管理と次世代への影響の検証に関する研究

研究分担者 東北大学大学院医学系研究科 教授 有馬 隆博

研究要旨

昨年度、ART の普及とともに、我が国では、本来非常に稀であったインプリント異常を原因とする先天性疾患 の発症頻度が約 10 倍に増加している疾患がある事について報告した。ART は不妊症患者に多大な恩恵をもたらすが、インプリントが獲得・維持される時期の配偶子を操作するため、DNA メチル化への影響について懸念されている。同時に、不妊症自身の遺伝的背景も、疾患増に影響をもたらす。本年度分担者は、不妊症男性精子に注目し、インプリント異常の頻度、程度、影響を受ける遺伝子について評価した。249 例の不妊症精子を用いて、ヒトインプリント領域（22 領域）を同定し、メチル化の解析を行った。その結果、全体で 29%に 1 領域以上にメチル化異常を認めた。また、この異常の頻度は、精子濃度、運動率、奇形率と相関を認めた。この事実はインプリント異常症の原因として、精子の影響が大きいことを示している。このインプリント異常は、先天性疾患だけでなく、周産期異常、乳幼児の身体的、精神的発育・発達にも関連するという報告は多数存在する。

研究協力者

樋浦 仁（東北大学大学院医学系研究科）
岡江 寛明（東北大学大学院医学系研究科）
宮内 尚子（東北大学大学院医学系研究科）
佐藤 芙美（東北大学大学院医学系研究科）

A. 研究目的

ゲノムインプリント（遺伝子刷り込み）とは、特定の方の親から継承した遺伝子が選択的に機能し、他方の遺伝子は機能しないユニークな遺伝子発現様式を示す現象で、哺乳類の胎児の正常な発生、胎盤機能あるいは神経行動上の発達に重要な役割を果たす。このゲノムインプリントを受ける遺伝子（インプリント遺伝子）は、2 本ある対立遺伝子（アレル）のうち、片親の由来が識別された結果、片親性発現を示す。この遺伝子発現調節には、アレル特異的な DNA メチル化領域（differentially methylated regions: DMR）の DNA メ

チル化が必須であることが、マウスを使ったこれまでの研究で明らかにされた。このインプリントは、生殖細胞のうち、始原生殖細胞（primordial germ cells: PGC 精子、卵子の元になる細胞）で、インプリントの消去（メチル化の消去）が起こる。さらに各々の配偶子（精子、卵子）形成過程で父・母由来の各インプリントは性特異的な規律に従い再確立する。つまり、卵子特異的あるいは精子特異的に別々に DNA メチル化が起こる（精子型インプリント、卵子型インプリント）。マウスでは、卵形成過程で、メチル化を獲得する場合（卵子型インプリント）、遺伝子ごとにメチル化獲得の時期が異なっていた（第一減数分裂に始まり原始卵胞期や antral 卵胞期、つまり未熟卵から成熟卵にかけて起こる）。つまり、受精の参加する配偶子のメチル化インプリントは確立されなければならない。

これまでに、我々は網羅的、系統的なメチル化インプリント領域の同定に成功している。

そこで、大多数例の不妊男性精子を対象に、今回 22 種類のインプリント遺伝子を標的とした DNA メチル化解析を行い、異常の頻度・程度・影響を受けやすい遺伝子を明確にする事を目的とした。さらに、異常を示す精子の性状について評価した。

B. 研究方法

(1) 精子サンプルの採取と DNA 抽出：

精子サンプルは、東北大学病院および関連医療機関に通院している不妊症夫婦の男性患者 197 名から採取された。各精子サンプルにおいて精液検査（量、精子濃度、運動率、精奇形率）が行われた。精子は、スイムアップ法により、リンパ球、未成熟生殖細胞、上皮細胞の除去が行われた 197 名の患者のうち、132 名は正常精子数（ $> 20 \times 10^6/\text{mL}$ ）を示した。残りの 65 名の患者は、乏精子症（27 名は、重度な乏精子症）を示した。この研究は、患者の同意のもと、また倫理委員会の承認のもとで行われた。精子は PBS 液で繰り返し洗浄され、DNA は 0.1mM 2-メルカプトエタノールを用いた標準的抽出方法により抽出された。ヒト正常血液白血球 DNA が、コントロールとして使用した。

(2) DNA メチル化の解析：

DNA メチル化の解析は、COBRA 法とシーケンス法を用いて、22 のヒトインプリント遺伝子（H19, GTL2, ZDBF2, ZAC (PLAGL1), DIRAS3, NAP1L5, GRB10, PEG1 (MEST), LIT1 (KCNQ1OT1), SNRPN, ZNF331, FAM50B, PEG10, INPP5F-v2, RB1, ZNF597, PEG3, PSIM-CT, NNAT, L3MBTL, NESPAS, GNAS) の DMRs で行われた。各精子 DNA サンプルは、EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research) によりバイサルファイト処理され、以下の条件の通り PCR が行われた。PCR 反応液は、各 $0.5 \mu\text{M}$ プライマー、 $200 \mu\text{M}$ dNTPs、1x PCR バッファーが、1.25U の EX Taq Hot Start DNA Polymerase (TaKaRa Bio) を含む、20 マイクロリットルの用量に調整された。これらプライマー情報とそれ以外の遺伝子情報を図 1 にまとめた (CpG

部位の C はメチル化を受ける部位)。

シーケンスの結果が、クローニングによるバイアスの影響がないことを確認するために、精子細胞と体細胞（白血球）の DNA で制限酵素処理解析 (COBRA) が行われた。制限酵素処理によりメチル化しているテンプレート DNA (バイサルファイト処理済み) のみが切断された。各 DMR の PCR 産物を制限酵素処理した (図 1)。制限酵素反応後、2.5%アガロースゲルで電気泳動した。制限酵素で切断された断片はメチル化、切断されなかった断片はメチル化していないテンプレートであることを示す。父由来に刷り込みを受ける遺伝子 (精子インプリント) H19 と GTL2 など、非メチル化断片が見られた、もしくは母由来に刷り込みを受ける遺伝子 (卵子インプリント) PEG1, LIT1, ZAC, PEG3, SNRPN など、メチル化断片が見られた場合、各遺伝子でのメチル化の割合は Lumiimager analyzer と Lumianalyst ソフトウェアパッケージ (Roche Diagnostics) で定量化された。そして、制限酵素認識部位における各々のゲノムサンプルのメチル化のパーセンテージは、酵素で切断された PCR 産物量と PCR 産物総量との比率から計算された。PCR 産物は pGEM-T ベクター (Promega) によりクローニングされた。そして各クローンは M13 Reverse プライマーとオートメーション化した ABI Prism 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems) を用いてシーケンスされた。約 20 クローンずつがシーケンスされた。

(3) 統計学的解析：

測定した二つの比率データについては、二群の比率の差の検定 (STATISTICA) により解析された。有意差検定 (P 値) は 0.05 とした。COBRA 法と PCR-Luminex 法を用いたメチル化の解析値の評価には、Spearman's rank method と Pearson's product-moment correlation coefficient を用いた。

(倫理面への配慮)

研究に先立ち、東北大学医学系研究科倫理委員会に研究計画を提出し、承認を得て研究を開始した (受付

番号 2010-120)。解析は連結不可能匿名化された状況下で行い、プライバシー保護に万全の配慮を施している。

C. 研究結果

(1) 患者基本情報：

患者情報として、年齢、職業、既往歴などの情報は医師カルテを参照した。精子は、通常の精液検査後の本来破棄される精子を用いた。

年齢は、平均35.6歳(23-53歳)BMIは24.1(SD 3.47)であった。これらは、精子性状つまり、正常精子群と乏精子症群で有意な差は認められなかった(図2)。

(2) 精子におけるメチル化解析：

197検体中、50検体(25.4%)でメチル化に異常が確認された。症例別で見ると重症乏精子症で26例中21例、中等度乏精子症33例中14例、正常精子106例中16例となった(図3)。遺伝子別にみると、精子型メチル化の異常は18%が卵子型メチル化遺伝子に異常を持っていた。その中で、精子型、卵子型の両方に異常を持っているのは51例中11例であった。また、精子濃度との関係を調べてみたところ、重症乏精子症群で57.7%、中等度乏精子症群で12.1%、正常精子群で4.7%が、3種以上の遺伝子に異常を持つことが確認された(図4)。

D. 考察

(1) 不妊男性の精子のインプリント遺伝子特異的な異常

インプリント遺伝子のアレル特異的メチル化領域(DMR)のDNAメチル化は、次世代の配偶子でリセットされる。インプリントのリセットは特異的なインプリントの獲得を意味する。ヒトにおいて成熟した精子は父由来アレルのメチル化を示すDMRでメチル化を獲得し、母由来のDMRではメチル化を獲得しない。我々は不妊治療を受けている197人の男性の精子を用い、22のDMRについてメチル化の解析を行った。その結果約25%にDMRのメチル化の異常を認めた。このうち、およそ半分の症例で父と母由来の両方のDMRに異常を認めた。両方に異常を認めた大多数の症例は中程度あるいは重症の乏精子症の患者であった。また、これらの異常はイン

プリント領域特異的で、ゲノム全体のDNAメチル化は正常であった。

ヒト成人精子におけるインプリント遺伝子のDMRでのDNAメチル化の獲得に関する報告はごく少数存在する。MarquesらはH19のインプリント異常と精子形成異常の間に相関があることを示している。このH19の異常部位はCTCF結合領域で重症の乏精子症では30%と最も頻度が高く、正常な場合でも見られた。我々のH19の結果とほぼ一致した。しかし、インプリント異常はH19だけでなく他の部位においても異常は存在した。またH19、GTL2の違いはそれぞれの特異性、感受性を示しているのかもしれない。

精子の母由来アレルのメチル化の異常について解析した結果、父由来アレルのメチル化の異常よりその頻度が高いことが分かった。197例中20例(20.6%)でPEG1、LIT1、ZAC、PEG3、SNRPNの母由来アレルのメチル化の異常が見られた。また、正常精子では79例中12例(15.2%)、中程度乏精子症では8例中3例(37.5%)、重症の乏精子症では10例中5例(50%)に異常がみられた。この結果は、精子形成異常を母由来アレルのメチル化の異常、つまり消去の異常との関連が示唆される。症例毎に異常を示すDMRは異なっていた。これも、インプリント領域の特異性、感受性の違いを示すのかもしれない。ゲノム全体のメチル化の程度は安定しているので、インプリント遺伝子のDMRはより変化を受けやすいのかもしれない。インプリント遺伝子のDMRには小さな繰り返し配列が存在し、インプリンティングに重要な役割を果たすと考えられる。リピート構造を持つインプリント遺伝子は、メチル化状態を決定するのに、ある程度重要な役割を果たすと推察されるが、この仮説を調べることはできなかった。

もっともメチル化の異常の頻度の高い領域を同定する事はできなかった。多数のインプリント遺伝子の機能喪失が、新生児の成長や発達異常が報告されている。一般に、ARTをうけた児は低出生体重児が多く見られる。この結果は、不妊症患者の精子や卵子のインプリント領域のDNAメチル化の小さな変化の積み重ねた結果であるかもしれない。

(2) メチル化異常と精子性状の関連性

精子性状（濃度、運動率、奇形率）とメチル化異常の頻度、程度は相関し、精子数の少ない乏精子症患者では、その頻度（個体差）が高い事が示唆される。またその異常は、組織（精子）内での変動を認め、このメチル化状態の不安定さを示していると推測される。

(3) 精子のメチル化異常のメカニズム

異常があったほとんど全ての症例で部分的なメチル化異常が示された。この異常は特異性がなく様々な領域に分散していた。DNA メチル化酵素（Dnmts）やメチル化結合蛋白はおそらく、生殖細胞でのメチル化の獲得の重要な調節因子と考えられる。Dnmt3a と 3L ノックアウトマウスではメスは母由来メチル化の獲得の障害のため流産となる。また、オスはその表現型は乏精子症である。不妊症患者でまだこれらの遺伝子の異常の報告はない。DNMT1 の卵子型アイソフォーム（Dnmt10）の異常で一卵性双胎のうち 1 児にインプリント異常症である Beckwith-Wiedemann 症候群（BWS）が認められた報告はある。Annaud らは Dnmt3L のノックアウトマウスではその母由来アレルのメチル化の異常は不完全で、Dnmt3L 以外の要素がメチル化の獲得に必要なのではないかと提案している。さらに加齢と共に遺伝子の発現は自然の変化を受け、たとえば生殖細胞でインプリント遺伝子の DNA メチル化の獲得に必要な Dnmt3 蛋白の発現要因により変化を受けやすいのかもしれない。

E. 結論

不妊症の原因のおよそ半数は、男性因子と考えられている。また、男性不妊症患者数は、過去 10 年間で約 25 倍に増加し、ART を受ける患者の増加の原因となっている。精子数の減少、質の低下には、環境化学物質や加齢などの影響も報告されている。また、エピゲノム異常は、先天性疾患、小児がんととどまらず、小児の身体的、精神的発育・発達、性格形成、行動異常等に関連し、さらに癌や生活習慣病など成人の難治性疾

患の原因となりうる。精子に見られるエピゲノムの異常が、ART 出生児に継承される可能性は十分考えられる。ART のエピゲノム変異についてゲノムワイドな解析と確率的疾患リスク評価を行い、安全で質の高い生殖医療の実現を目指す必要があると予想される。

F. 健康危険情報

未だ正確に評価できないが、ART により発症するインプリント異常症に精子のインプリント異常が原因となる可能性が示唆された。実際に異常精子が疾患を発症したエビデンスはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Okae H, Hiura H, Nishida Y, Funayama R, Tanaka S, Chiba H, Yaegashi N, Nakayama K, Sasaki H, Arima T. Re-investigation and RNA sequencing-based identification of genes with placenta-specific imprinted expression. **Hum Mol Genet.** 21 (3), 548-558, 2012.
2. Sakurai M, Ohtake J, Ishikawa T, Tanemura K, Hoshino Y, Arima T, Sato E. Distribution and Y397 phosphorylation of focal adhesion kinase on follicular development in the mouse ovary. **Cell and Tissue Research.** 347, 457-465, 2012.
3. Arima T, Okae H, Hiura H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Hayashi C. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in male and female germ cells of infertile couples. **INTECH.** 29, 183-192, 2012
4. Hiura H, Okae H, Kobayashi H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Suzuki F, Nagase S, Sugawara J, Nakai K, Yaegashi N, Arima T. High-throughput detection of aberrant imprint methylation in the ovarian cancer by the bisulphite PCR-Luminex method. **BMC Medical Genomics.** 5, 8-17, 2012.
5. Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Van De Pette M, John R M, Kagami M, Nakai K, Soejima H, Ogata T, Arima T. Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproductive technologies. **Human Reproduction.** 27 (8): 2541-2548, 2012.

6. Hiura H, Toyoda M, Okae H, Sakurai M, Miyauchi N, Sato A, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Nishino K, Umezawa A, **Arima T**. Stability of the abnormal imprinting of human induced pluripotent stem cells. **BMC Genetics. (in press)**
7. **有馬隆博**, 樋浦仁, 岡江寛明. 「生殖補助医療由来の先天性ゲノムインプリンティング異常症」 *Japanese Journal of Reproductive Endocrinology* 日本生殖内分泌学会雑誌. 17, 54-58, 2012.
8. **有馬隆博**. 「ヒト生殖補助医療 (ART) とエピジェネティクスの異常」 遺伝子医学 MOOK (印刷中)

メチル化解析システムの開発 (P20110420) 発明者
有馬隆博 (出願人 東北大学) 出願日 2012.5.16 PCT
出願

2. 学会発表

1. 熊本大学発生発生医学研究所セミナー 「胎盤形成とゲノムインプリンティング」有馬隆博 2012.2.10 熊本
2. 卵巣に関する国際カンファレンス 2012 "The International Ovarian Cancer 2012" 「ART and Epigenetic Errors - Abnormal DNA methylation in imprinting disorders after ART」 有馬隆博 2012.3.17 東京
3. 日本生殖再生医学会・第7回学術集会 「ARTにおけるエピジェネティック機構」 有馬隆博 2012.3.25 東京
4. Planet xMAP Japan 2012 「男性不妊症精子のインプリント遺伝子を標的とした DNA メチル化解析」 有馬隆博 2012.5.16 東京
5. 2012 セント・ルカセミナー 「胎盤形成とゲノムインプリンティング」 有馬隆博 2012.6.3 大分
6. 第11回学術集会日本不妊カウンセリング学会 「生殖医療とエピジェネティクス」 有馬隆博 2012.6.8 東京
7. 第5回生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク 「Non-random loss of imprinting in cloned mice」 有馬隆博 2012.11.20-21 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

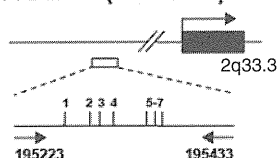
特になし

3. その他

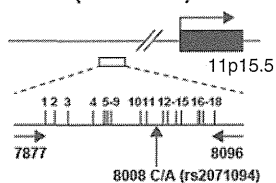
ヒト精子の質的機能評価システムに応用する DNA

A. Paternal DMRs

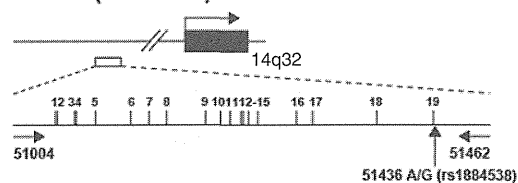
(a) *ZDF2* (AC007383)



(b) *H19* (AF125183)

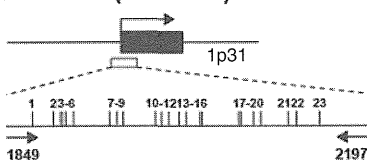


(c) *GTL2* (AL117190)

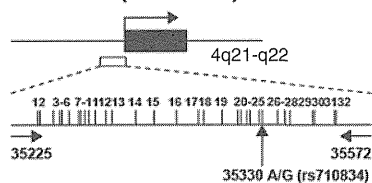


B. Maternal DMRs

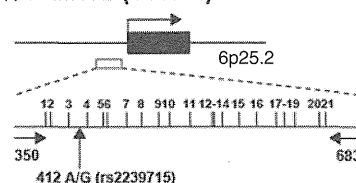
(d) *DIRAS3* (AF202543)



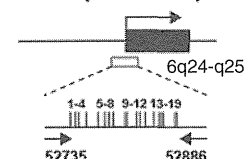
(e) *NAP1L5* (AC108065)



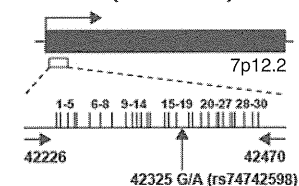
(f) *FAM50B* (Y18504)



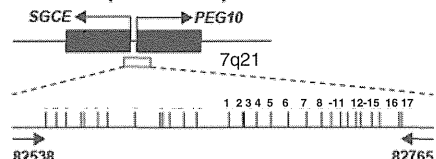
(g) *ZAC* (AL109755)



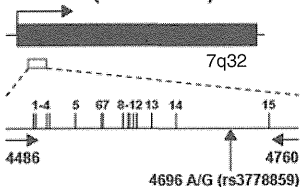
(h) *GRB10* (AC004920)



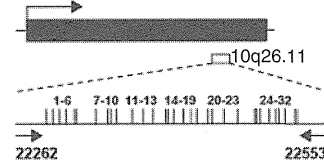
(i) *PEG10* (AC069292)



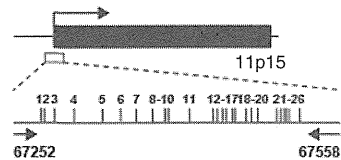
(j) *PEG1* (AB045582)



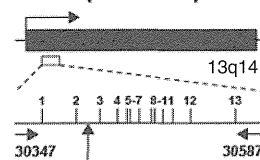
(k) *INPP5F v2* (AL133461)



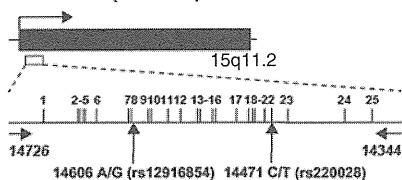
(l) *LIT1* (U90095)



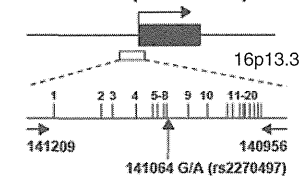
(m) *RB1* (AL392048)



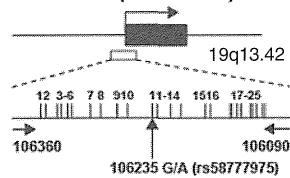
(n) *SNRPN* (U41384)



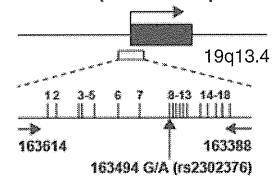
(o) *ZNF597* (AC025283)



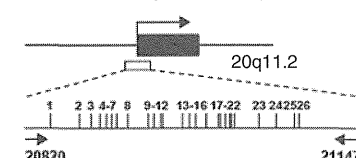
(p) *ZNF331* (AC011487)



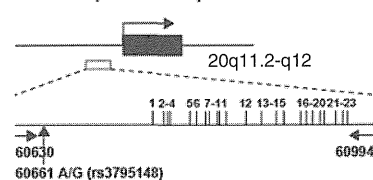
(q) *PEG3* (AC006115)



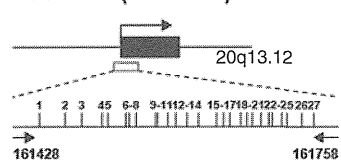
(r) *PSIMCT-1* (AL110115)



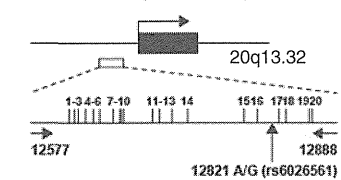
(s) *NNAT* (AL109614)



(t) *L3MBTL* (AL031681)



(u) *NESPAS* (AJ251760)



(v) *GNAS1A* (AF246983)

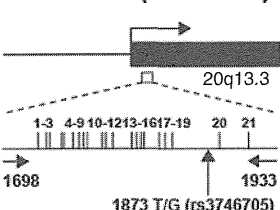
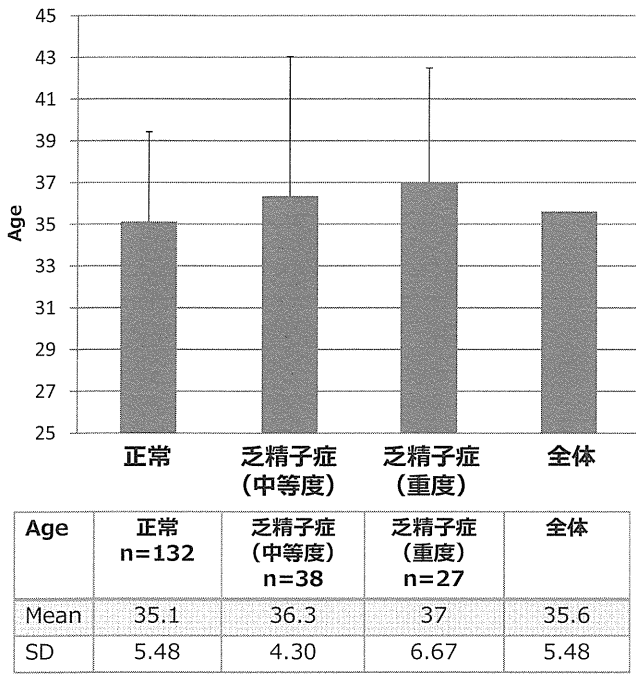


図1 メチル化解析したインプリント 22 領域の遺伝子マップ

(A) 年齢と精子所見の関連



(B) BMI の分布

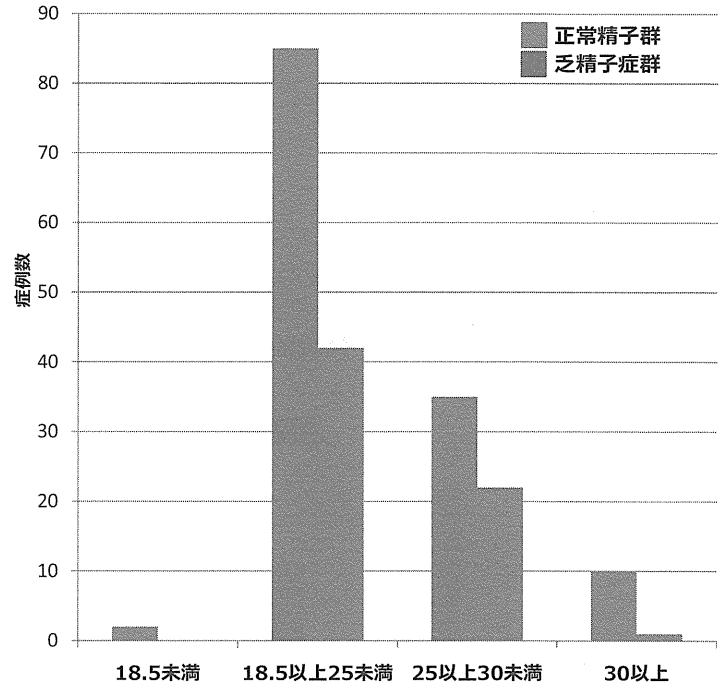


図2 精子性状と年齢及びBMI

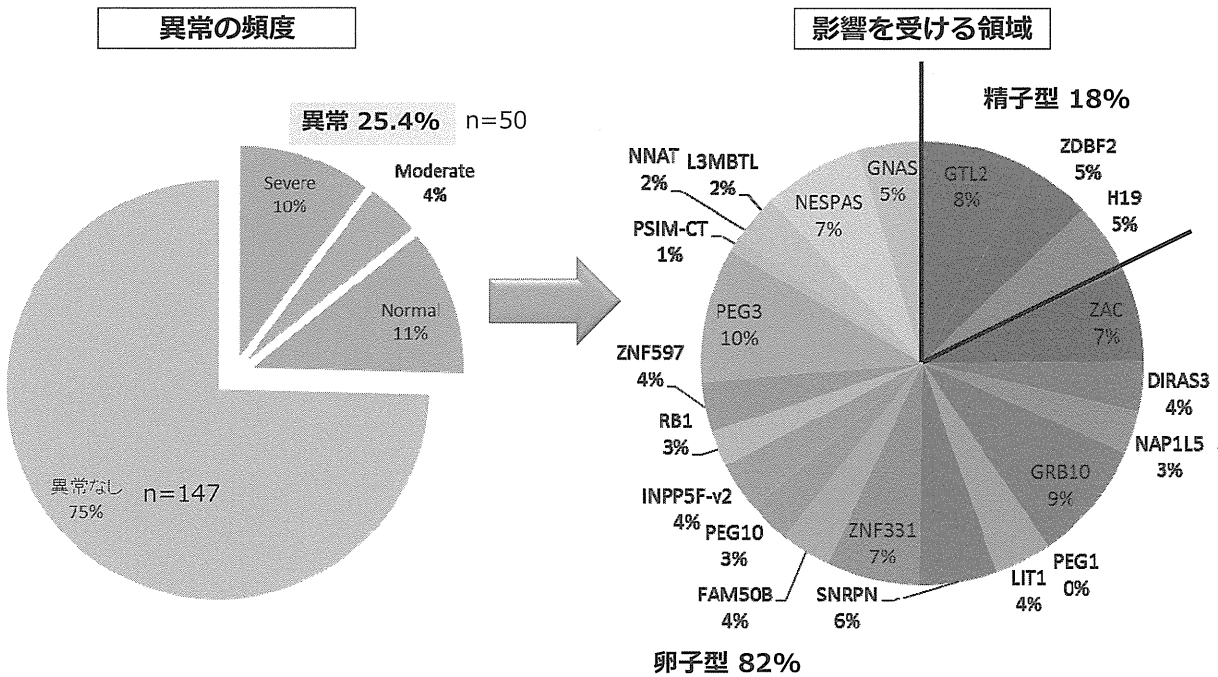


図3 メチル化インプリント異常の頻度

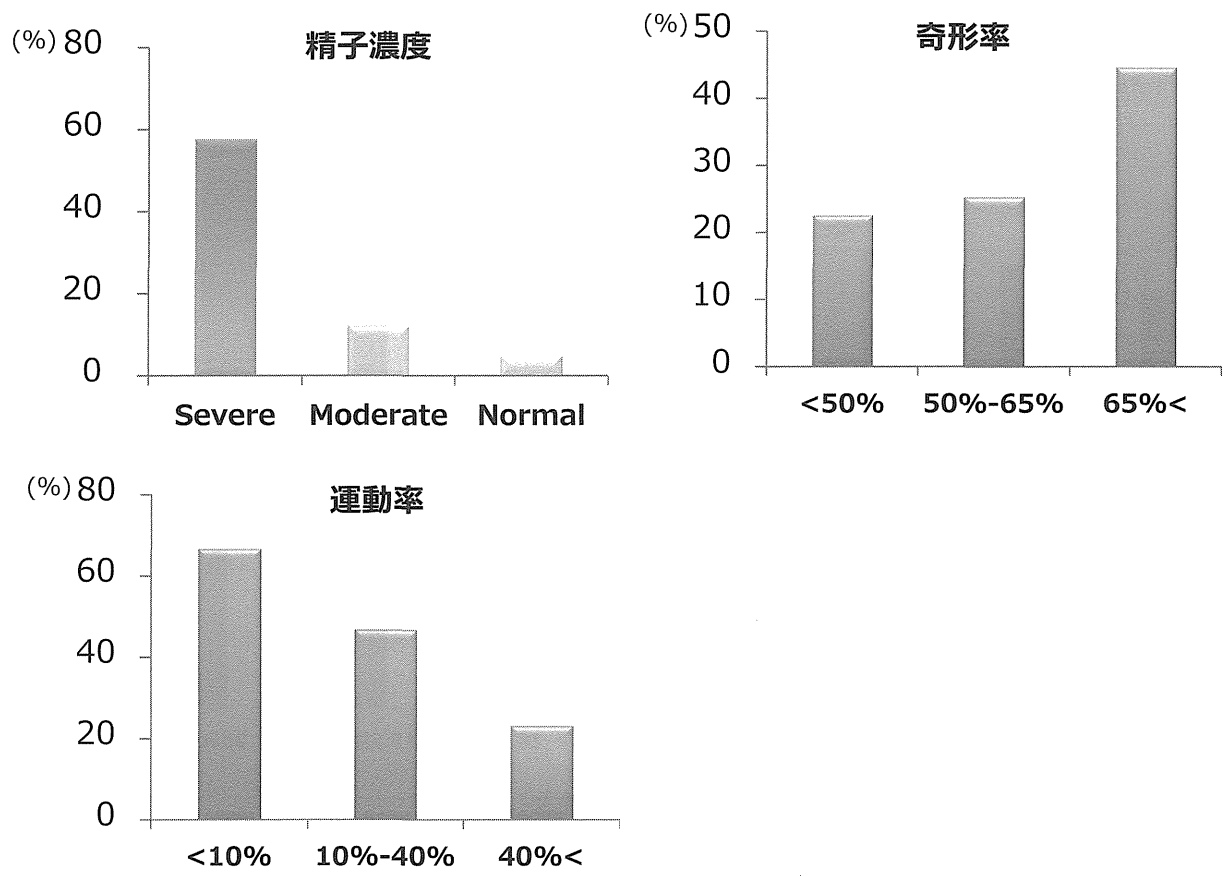


図4 インプリントメチル化の異常と精子所見との関係

厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）
分担研究報告書

ART の品質管理～次世代シーケンサーを用いた単一卵子の遺伝子発現解析

研究分担者	久慈直昭	慶應義塾大学医学部産婦人科	講師
研究協力者	井上 治	慶應義塾大学医学部産婦人科	助教
同上	小川誠司	慶應義塾大学医学部産婦人科	助教
同上	菅原かな	慶應義塾大学医学部産婦人科	助教
同上	奥村典子	慶應義塾大学医学部産婦人科	助教
同上	浜谷敏生	慶應義塾大学医学部産婦人科	講師
同上	的場 亮	DNA チップ研究所	
同上	石川 円	DNA チップ研究所	

研究要旨：

本研究ではマウスをモデルとして、単一卵子から抽出・増幅した遺伝子増幅産物（DNA）を用いて、次世代シーケンサー解析の信頼性を検討した。

結果として、次世代シーケンサーで解析した遺伝子発現の結果はこれまで我々が多数の個体由来の複数の卵子をマイクロアレイ解析した結果とほぼ一致し、キャリア RNA を加え、Ribo-SPIA 法にて遺伝子増幅を行った試料を用いても、単一卵子の遺伝子解析法として次世代シーケンサーを応用可能であることを示された。さらに Ribo-SPIA 増幅法で不可避免的に付与されるアダプター配列については、次世代シーケンサー解析で通常行われる DNA の断片化を行うことにより影響がほぼ無視できる範囲となることも明らかとなった。

A. 研究の目的

生殖補助医療（ART）において、成功率を左右するのは精子・卵子の妊孕性である。最近の受精卵染色体検査の結果、胚盤胞に達した胚を生検して microarray による CGH で染色体分析を行った結果、正常核型の胚盤胞の約 7 割しか着床しなかったという報告からもⁱ、胚盤胞まで発育する胚であってもそのかなりの部分が着床しないことがあきらかであり、これは何らかの形で受精卵の細胞質の問題であることが予想され

る。

卵子または受精卵の妊孕性を解析する方法として、様々な方法が知られているが、遺伝子発現解析は有望なもののひとつである。ただ、この方法も卵子一個という微量な検体から発現遺伝子を増幅する必要があり、またその解析のためのプラットフォームとしてこれまでは DNA マイクロアレイが唯一利用できるものであった。

近年、次世代シーケンサーと呼ばれる遺伝子解析技術が普及し始めている。これ

は、ある検体に含まれる DNA を一旦担体に吸着、これから塩基を一つずつ読んでいくことで、極めて多数の異なった DNA 配列を一度に決定することが出来る。卵子の発現遺伝子解析にこれを用いることが出来れば、妊孕性と発現プロフィールの関係はもちろん、卵子特異的遺伝子の発見、あるいは alternative-splicing 等を検出することが可能であり、DNA マイクロアレイよりその情報量は飛躍的に増加する。

そこで、本研究ではマウス単一卵子からの抽出遺伝子 (mRNA) を試料として、Ribo-SPIA 法によるその遺伝子増幅産物を次世代シーケンサーにより解析可能かを、従来我々が行っていたマイクロアレイ解析の結果と比較することにより検証する。ここでとくに、試料の確実な採取のために添加したキャリア RNA*、および遺伝子増幅のため遺伝子配列に付加された SPIA アダプター配列の影響の有無を検討することとした。

*yeast tRNA

B. 方法

1) 10 卵子より抽出した RNA の増幅

遺伝子産物の MiSeq による遺伝子解析 (test-run)

8wICR マウス成熟卵子 10 個から抽出した mRNA を Ribo-SPIA 法で増幅した遺伝子産物 (ssDNA) を出発試料とした。dsDNA 合成後、Tru Seq DNA Sample Preparation Kit を用いてシーケンスプライマー、マルチプレックス用の Index 配列を付加し、PCR を 12cycle 施行して試料 DNA を enrich した (表 1)。それぞれの試料を、Illumina 社 MiSeq 次世代シーケンサーを用いてペアエンド法により塩基配列解析

し、解析結果をマウス既知発現遺伝子配列と照合、分析した。このとき、遺伝子配列の読み始めを SPIA アダプターの影響を軽減するためすべての解析塩基配列からアダプター配列を除去 (通常の方法) した後、さらに 5' 末端 15 塩基を除去して開始した (トリミング) 場合と、除去しないで読み始めた場合を対比した。さらに、マイクロアレイ解析の結果、卵子に比較的多量に発現していると考えられる H1foo、Eef1a、GAPDH、 β -actin と対応する配列の解析結果から、発現遺伝子の exon 解析を行った。

2) 1 卵子より抽出した RNA の増幅 遺伝子産物の MiSeq による解析

8 週齢マウス単一卵子 1 個 (Y1-3)、44 週齢マウス単一卵子 2 個 (A2-1、AB1-1) よりキャリア RNA 付加法にて抽出・増幅した遺伝子産物を試料として、コバリス社 DNA Shearing システム M220 により断片化後、Encore NGS Multiplex System I (Nugen, NG3019) を用いてシーケンスアダプターおよびマルチプレックス用の Index 配列を付加し、これを Illumina 社 MiSeq 次世代シーケンサーにて解析した。

C. 結果・考察

1) 10 卵子より抽出した RNA の増幅 遺伝子産物の MiSeq による遺伝子 解析 (test-run)

トリミング (15 塩基除去) を行った群と、行わなかった群の解析結果を、読み取った DNA 配列の既知発現遺伝子配列とのマッチ度 (Normal Read ; 予想されるフラグメント長から $\pm 2 SD$ 以内の距離にマッチしたリード) から検討した。トリミングによ

り、Normal Read は総リード数の 66.06% から 87.62% に上昇したが (図 1, 図 2)、一方存在が推定された遺伝子はトリミングありで 9082 遺伝子、トリミング無しで 9167 遺伝子と、やや減少した (表 2)。また、H1foo、Eef1a、GAPDH、 β -actin の exon 解析の結果、全ての遺伝子で既知の cDNA 配列に対応する配列が得られた (図 3~図 9)。

マウス卵子 10cell から抽出する際、キャリア RNA を付加して抽出したサンプル (10-cell_plus_raw) と、付加しないで抽出したサンプル (10-cell_minus_raw) をマイクロアレイで解析した結果、および 10-cell_plus と 10-cell_minus を等量混合した試料をそれぞれ 15 塩基のトリミングあり (10-cell_timmed_raw)、なし (10-cell_raw) で解析した結果の、遺伝子発現解析全体としての相関は、図 10 の通りであり、相関係数はマイクロアレイと次世代シーケンサーで 0.6 程度であったが、次世代シーケンサーの解析結果同士はトリミングのある、なしの影響はほとんど見られず、その相関係数は 0.997 と極めて高かった。このことから、SPIA-primer の影響を除去するための 15 塩基のトリミングは実質上必要ないことがわかったため、以下の実験からはこの手順を省くことにした。

2) 1 卵子より抽出した RNA の増幅

遺伝子産物の MiSeq による解析

第一に、バージョンアップを行いリード数が格段に増えた MiSeq に対応し、可能な限り多種の断片を得るために 1 サンプルにつき 1 ラン、合計 3 ラン行ってデータを得ることとした。また、SPIA cDNA を断片化

してからシーケンスアダプターを付加するプロトコルに変更した。その結果、5' 末側 15 塩基の Per base sequence content (リード上の各塩基の割合) が改善したことから、断片化処理により、5' 末端が必ずしも SPIA アダプターとなっているわけではない DNA 断片を増やす結果となり、その影響を軽減する結果をもたらしたと考えられた (図 11)。

本解析では、シーケンスのリード数が多かった 8 週齢マウス卵子由来の試料 (Y1-3) を 2 等分し、これをそれぞれ一試料として解析した。NCBI に登録されている 34877 遺伝子すべてに対する照合 (アラインメント) を行い、それぞれ約 10000 遺伝子が hit、このうち約 7 割の遺伝子に対して、一致するリードは 10 以上であった (表 5)。

マイクロアレイ解析で 8 週齢 (若齢、young) および 44 週齢 (加齢、aged) マウス卵子で、発現量が変化していたと考えられる 1419 プローブのうち、次世代シーケンスのアノテーションに含まれていたものは 1147 遺伝子であった。この遺伝子のうち、今回の若齢卵子 1 個と加齢卵子 2 個の解析から、マイクロアレイの結果と増減方向までがすべて一致した遺伝子は 153 遺伝子 (若齢に比較して加齢卵子で up ; 77 遺伝子、加齢卵子で down ; 76 遺伝子) (表 7) であった。

exon 別のリード数の検討からも、Aurka、Kif22、Anapc11 など減数分裂・細胞周期に関与する遺伝子の発現量低下はマイクロアレイの結果と一致していた。

D. 結論

次世代シーケンサーによる解析は現在まだ高価であり、単一卵子の解析について若齢卵子はわずかに1個、加齢卵子は2個しか解析が行えなかったため、今回得られたこの遺伝子の解析結果の解釈には注意が必要である。しかし、次世代シーケンサーで解析した結果がこれまで我々が多数の個体由来の複数の卵子をマイクロアレイ解析した結果とほぼ一致する結果であったことは、キャリア RNA を加え、Ribo-SPIA 法にて遺伝子増幅を行った試料を用いても、単一卵子の遺伝子解析法として次世代シーケンサーを応用可能であることを示している。さらに、Ribo-SPIA 増幅法で不可避免的に付与されるアダプター配列については、次世代シーケンサー解析で通常行われる DNA の断片化を行うことにより影響がほぼ無視できる範囲となることも明らかとなった。

ⁱ Katz-Jaffe MG, Surrey ES, Minjarez DA, Gustofson RL, Stevens JM, and Schoolcraft WB. Association of Abnormal Ovarian Reserve Parameters With a Higher Incidence of Aneuploid Blastocysts. OBSTET GYNECOL 2013 ;121(1):71-77

表1. MiSeqプロトコル概要

<dsDNA合成>

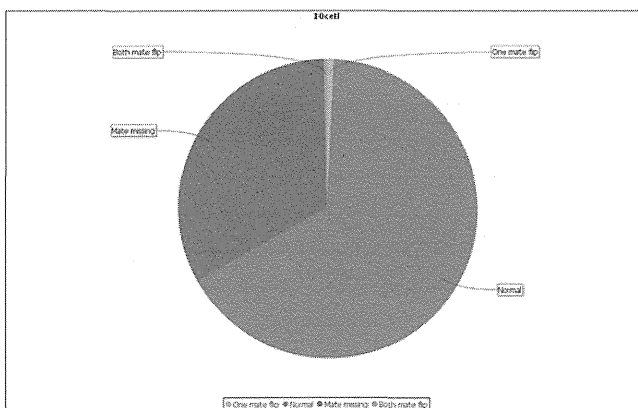
- SPIA増幅後 ss cDNA 1ug
 サンプル: 10cell+, 10cell-
- ↓
 random primerをアニーリング
- ↓
 以下の酵素を用いて2本鎖のDNAを合成
- E.coli DNA Ligase
 - E.coli DNA Polymerase I
 - T4DNA Polymerase
- ↓
 ds cDNA
- BioAnalyzer DNA1000で電気泳動

<Truseq DNA Sample Preparation>

- ds DNA : 379.75ng (2サンプル分をmix)
- ↓
 End Repair
- ↓
 Adenylate 3' Ends
- ↓
 Ligate Adapters
- シーケンスプライマー、マルチプレックス用のIndexをライゲーションする
- ↓
 Enrich DNA Fragments
- PCRを行う(10 cycle)
- ↓
 シークエンス用ライブラリ
- BioAnalyzer DNA High Sensitivityで電気泳動
 - KAPA qPCR(KAPA Library Quantification Kits)でシーケンスアダプターの付いたライブラリの濃度を定量

図1. アライメント結果(1)

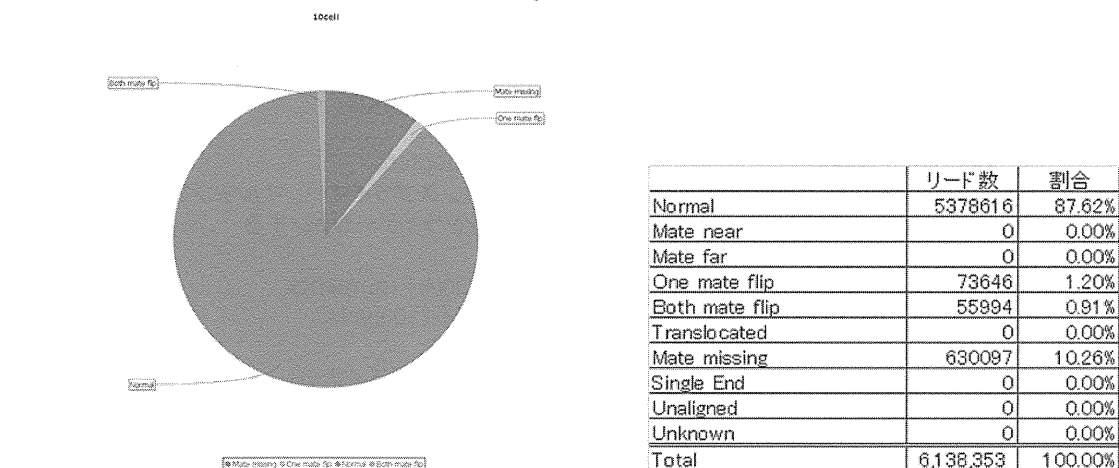
読み始めの15bpをトリミングしない場合



	リード数	割合
Normal	3,356,643	66.06%
Mate near	0	0.00%
Mate far	0	0.00%
One mate flip	39,268	0.77%
Both mate flip	15,042	0.30%
Translocated	0	0.00%
Mate missing	1,670,180	32.87%
Single End	0	0.00%
Unaligned	0	0.00%
Unknown	0	0.00%
Total	5,081,133	100.00%

図2. アライメント結果(2)

読み始めの15bpをトリミングした場合



- Mate missingが減った
- マルチヒットが増えた

表2. 遺伝子数の比較

データの取れている遺伝子の数を比較した。
マイクロアレイデータは、Flagを考慮せず、全データを採用。

		遺伝子数
マイクロアレイ	10cell+	21215
	10cell-	21215
次世代シーケンス Miseq	5'末側15塩基トリミング	9082
	通常トリミング	9167

Miseqの方が圧倒的にデータ量は少なかった。

図3. H1fooの既知cDNAとの対比

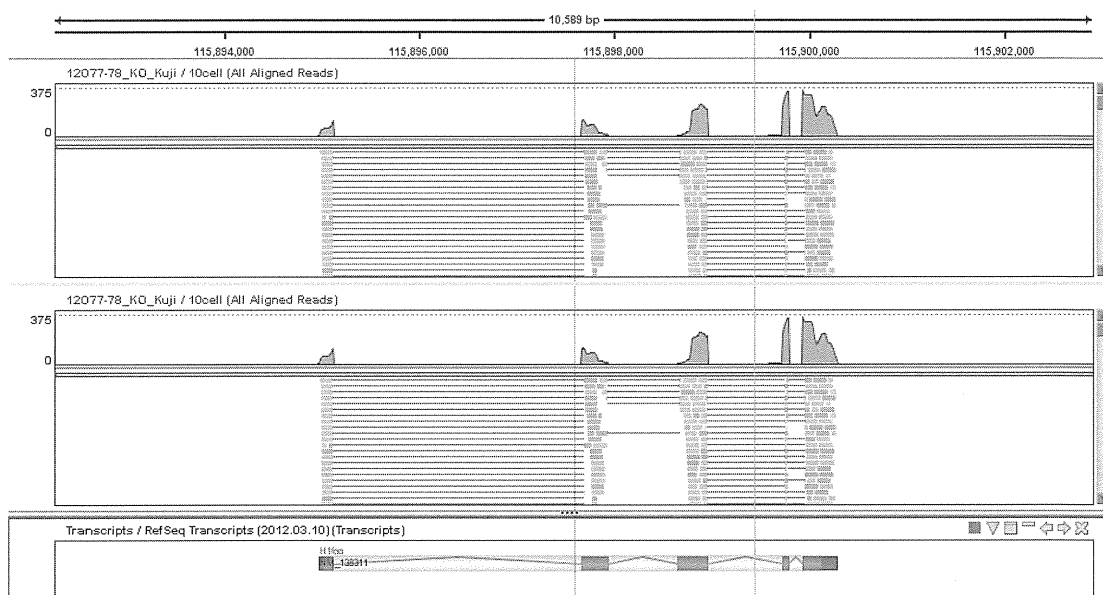


図4. H1foo遺伝子との対比

