

- PWS 患者集団における ART 出生群と自然妊娠出生群間の出産年齢比較: 母親出産年齢は Table 1 に、分布は図 6 に示す通りである。出産年齢は、ART 群、中央値 38 歳、範囲 26-45 歳で、自然妊娠群、中央値 31 歳、19-42 歳で、ART 軍において有意に高かった(P=0.001)。

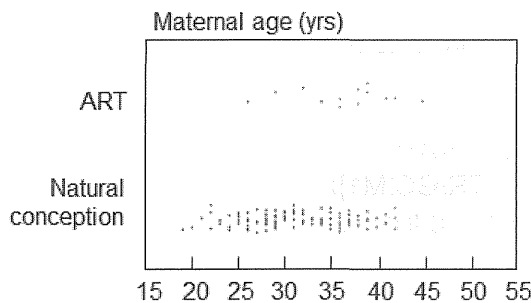


図 6. ART 出生 PWS 患者と自然妊娠 PWS 患者における出産年齢。

- PWS 患者集団における ART 出生群と自然妊娠出生群間の TR/GC[M1] の発症頻度比較: TR/GC[M1] の発症頻度は、出産年齢が有意に異なる場合にのみ有意に ART 出生群に多く認められたが、出産年齢に有意差が見られない年齢では、両群で同等であった (Table 2)。

Table 2. Comparison of relative frequency of TR/GC between IVF/ICSI/COS group and natural conception group

	Maternal age (y)	Median (range)	Comparison of maternal age P value ^a	No of pts with TR/GC[M1] (%)	Comparison of relative frequency of TR/GC[M1] P value ^a
ART	All	38 (26-45)	-	5 (38.5)	-
Natural Conception group	≥20	31 (19-42)	0.0015	14 (11.2)	0.018
	≥21	31 (20-45)	0.0016	14 (11.3)	0.019
	≥22	31 (21-45)	0.0017	14 (11.4)	0.020
	≥23	31 (22-45)	0.0019	14 (11.5)	0.020
	≥24	31 (23-45)	0.0024	14 (11.8)	0.022
	≥25	31 (24-45)	0.0031	14 (12.1)	0.024
	≥26	32 (25-45)	0.0040	14 (12.4)	0.027
	≥27	32 (26-45)	0.0084	14 (13.3)	0.035
	≥28	33 (27-45)	0.0026	14 (14.4)	0.034
	≥29	34 (28-45)	0.0039	14 (14.9)	0.038
	≥30	34 (29-45)	0.0098	14 (16.5)	0.055
	≥31	35.5 (30-45)	0.0096	14 (20.0)	0.20
	≥32	36 (31-45)	0.023	14 (22.2)	0.26
	≥33	36 (32-45)	0.046	14 (24.6)	0.32
	≥34	37 (33-45)	0.029	14 (27.5)	0.33
	≥35	37 (34-45)	0.046	14 (29.2)	0.37
	≥36	37 (35-45)	0.037	14 (35.0)	0.43
	≥37	37 (36-45)	0.089	12 (34.3)	0.42
	≥38	38 (37-45)	0.15	11 (42.3)	0.51
≥39	39 (38-45)	0.93	8 (47.1)	0.61	
≥40	40.5 (39-45)	0.66	6 (50.0)	0.56	
≥41	41 (40-45)	0.20	4 (50.0)	0.58	

Table 3. Comparison of the frequency of births conceived by IVF/ICSI between PWS patients and general population

	Mat age (y)	Comparison of maternal age P-value ^a	Number of naturally conceived births ^b	All patients conceived by IVF/ICSI		Pts with TR/GC[M1][M2] conceived by IVF/ICSI	
				Number of births conceived by IVF/ICSI (%)	P-value ^a	Number of births conceived by IVF/ICSI (%)	P-value ^a
PWS(1989-2010)	Median 32 Range 19-45	—	106	7 (6.4%)	—	5 (4.5%)	—
General population (1989-2010)	Average 30.2	1.4×10^{-7}	25,249,178	271,068 (1.1%)	1.0×10^{-7}	271,068 (1.1%)	0.0004
General population (2007-2008) ^c	≥25	0.0095	1,859,674	39,700 (2.1%)	0.00094	39,700 (2.1%)	0.047
	≥30	4.9×10^{-5}	1,221,660	35,920 (2.9%)	0.00047	35,920 (2.9%)	0.031
	≥35	0.19	419,914	20,284 (4.6%)	0.00098	20,284 (4.6%)	0.043

- PWS 患者集団と一般集団における ART 出生児頻度の比較: 本邦一般集団における ART 統計は、1989-2000 年において存在し、年齢別 ART 統計は、2007-2008 年において存在する。PWS 患者のうち、1989-2000 年に ART で出生した児は 7 例で、このうち 4 例が TR/GC[M1]、残る 1 例が TR/GC[M2]であった。ART 出生児頻度は、PWS 患者集団において、1989-2000 年の一般集団により顕著に高く (1.0×10^{-7})、この有意差は、ART 出生全体と TR/GC[M1]+ TR/GC[M2] の合計において、出産年齢を加味しても有意にとどまった (P=0.00098、P=0.043) (Table 3)。

D. 考察

1. 高齢主産が減数第一分裂の不分離で産生される disomic oocyte を介する upd(15)mat 発症のリスク因子であるか否か

PWS 患者 138 名中、15 番染色体 q11-13 領域の父性由来欠失が 99 名に、15 番染色体母性片親性ダイソミ

ーが31名に (TR/GC[M1]19名、TR/GC[M2]9名、MR/PE3名)、エピ変異が2名で認められた。6名では、FISH解析により欠失の存在は否定されたものの、マイクロサテライト解析以降の解析は未施行であるため非欠失群と分類されたが、既存の報告よりこの多くはTR/GC[M1]であることが推測される。これらの結果は、欧米人と日本人で、PWSの発症原因の比率が同等であることを示す。

本研究結果は、第一減数分裂時の不分離を伴い易い高齢出産がTR/GC[M1] type upd(15)mat発症のリスクファクターであることを示すものである。事実、出産年齢は、TR/GC[M1]において欠失群に比し有意に高く、2003年以降に認められたTR/GC[M1]の相対的頻度の有意な増加は、母体の高齢化の影響を強く受けている現象であると考えられる。この発症機序は、ダウン症候群の発症頻度が出産年齢と共に増加することと同じであると推測される。

高齢出産以外に、発症原因の相対的比率の変化を及ぼしうる要因として、父性因子と環境因子を考慮する必要がある。父性因子としては、父親年齢の上昇に伴い、染色体の微小欠失や数的異常が生じる可能性が示唆されており、父親の高年齢が、欠失、あるいはGCやMRを介したupd(15)matによるPWSの発症リスクとなる可能性がある。しかし、父親年齢が上昇した2003年以降で、欠失群やMR/PE群の相対的頻度は増加していなかった。また、GCの過程において、0染色体性の精子と2倍体の卵子が同時に発生するのは非常にまれであると推測され、TR/GC[M1]群でGCによるものの頻度は低いと考えられる。環境因子としては、母体の加齢に伴い、環境化学物質への暴露期間が長くなることで、卵子の減数分裂の異常が起りやすくなる可能性が示唆されている。しかし、母体の環境物質への暴露量増加のみでTR/GC[M1]の相対的増加を説明することは難しいと考えられる。また、化学物質の暴露を受けた父親の頻度は、コントロール集団に比し、PWS患者集団で高いという報告が複数存在するが、父親の化学物質への暴露が、特定のPWS発症原因に強く関与するという報告はない。これらのことから、母親の高齢出産以外の因子が、2003年前後での発症原因の相対的頻度の変化に与える影響は、あまり大きくないと推察される。

2. 高齢主産が減数第一分裂の不分離で産生される nullisomic oocyte を介する upd(14)pat 発症のリスク因子であるか否か

本研究のデータは、第一減数分裂時の不分離を伴い易い高齢出産がMR/PE type-upd(14)pat発症のリスクファクターであることを示すものである。これは、われわれが昨年度 disomic oocyte を介するTR/GC[M1] type-upd(15)matが、高齢出産により有意に増加していることに一致するものである(図1)。なお、母性ダイソミーで発症するPrader-Willi症候群では、マイクロサテライト解析で動原体近傍がヘテロダイソミーであるかホモダイソミーであるかによって disomic oocyte が第一減数分裂時の不分離と第二減数分裂時の不分離のいずれの時期に形成されたかを識別しえるが、父性ダイソミーで発症する upd(14)pat 症候群では、nullisomic oocyte が第一減数分裂時の不分離と第二減数分裂時の不分離のいずれの時期に形成されたかを鑑別することは不可能である(図1)。したがって、今回のMR/PE type-upd(14)patグループには、高齢出産が影響する第一減数分裂時の不分離に起因する upd(14)pat のみならず、高齢出産が影響しない第二減数分裂時の不分離に起因する upd(14)pat やPEによる upd(14)pat が含まれていると考えられる。これは、今回のMR/PE type-upd(14)patグループにおいて、高齢ではない母親が比較的多く認められたこと(図2)、ならびにPrader-Willi症候群においてTR/GC[M1] type-upd(15)matグループが全員高齢出産であったこととの差異を説明するものである。

なお、MR/PE type-upd(14)patは、減数分裂時の不分離のみならず、姉妹染色分体の早期分裂によっても発症しうる。姉妹染色分体の早期分裂は、減数分裂時の不分離と同様に、MRまたはGCにおける nullisomic oocyte 形成の原因であり、女性の高齢化がそのリスクファクターであると考えられている。これは、今回のデータの解釈に影響するものではないが、減数分裂時の不分離以外にも nullisomic oocyte 産生を招く発症機序が存在することは付記に値すると考えられる。

以上、本研究の成果は、生殖補助医療におけるインプリンティング疾患、特に母性ダイソミータイプのみならず父性ダイソミータイプのインプリンティング疾患、発症を評価する上で重要な示唆を与えるものである。すなわち、生殖補助医療は通常高齢のカップルを対象としているため、その遺伝的安全性の検討では、本研究で判明したように、年齢という交絡因子を勘案する必要がある。今後、生殖補助医療のリスク評価は、このような交絡因子を勘案してなされなければならない。われわれは、現在、このような因子を勘案したうえで、種々のインプリンティング疾患とARTの関連性を解析中である。

3. ARTにおける upd(15)mat 発症に、高齢出産以外の因子が関与するか否か

本研究の結果は、(1) 高齢出産を発症危険因子とするダイソミー陽性患者が ART 出生児において相対的に高くなっていること、(2) PWS 患者群では、ART 出生児における TR/GC[M1]の発症増加は、高齢出産で説明できること、(3) PWS 患者群と一般集団の比較では、TR/GC[M1]+TR/GC[M2]の発症に COS のような排卵誘発が関与していること、を示唆するデータである。したがって、症例数が少ないことから現時点では、明確な結論は導けないが、ART に関連する upd(15)mat の増加には、高齢出産と ART に関わる COS などの技術的因子の両者が関与すると推測される。

1. Dateki S, Kosaka K, Hasegawa K, Tanaka H, Azuma N, Yokoya S, Muroya K, Adachi M, Tajima T, Motomura K, Kinoshita E, Moriuchi H, Sato N, Fukami M, Ogata T*. Heterozygous *OTX2* mutations are associated with variable pituitary phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 95 (2): 756–764, 2010. (IF = 6.202)
2. Fukami M, Maruyama T, Dateki S, Sato N, Yoshimura Y, Ogata T*. Hypothalamic dysfunction in a female with isolated hypogonadotropic hypogonadism and compound heterozygous TACR3 mutations and clinical manifestation in her heterozygous mother. *Horm Res Peadiatr* 73 (6): 477–481, 2010. (IF = 1.730)
3. Muroya K, Mochizuki T, Fukami M, Iso M, Fujita K, Ogata T*. Diabetes mellitus in a Japanese girl with HDR syndrome and *GATA3* mutation. *Endocr J* 157 (2): 171–174, 2010. (IF = 1.806)
4. Fukami M*, Nagai T, Mochizuki H, Muroya K, Yamada G, Takitani K, Ogata T. Anorectal and urinary anomalies and aberrant retinoic acid metabolism in cytochrome P450 oxidoreductase deficiency. *Mol Genet Metab* 100 (3): 269–273, 2010. (IF = 2.897)
5. Ashkenazi-Hoffnung L, Leberthal Y, Wyatt AW, Ragge NK, Dateki S, Fukami M, Ogata T, Phillip M*, Gat-Yablonski G. A novel loss of function mutation in *OTX2* is associated with phenotypically variable anophthalmia and isolated growth hormone deficiency. *Hum Genet* 127 (6): 721–729, 2010. (IF = 4.523)
6. Iijima K*, Nozu K, Kamei K, Nakayama M, Ito S, Matsuoka K, Ogata T, Kaito H, Nakanishi K, Mastuo M. Severe Alport syndrome in a young woman caused by a t(X;1)(q22.3;p36.32) balanced translocation. *Pediatr Nephrol* 25 (10): 2165–2170, 2010. (IF = 2.425)
7. Dateki S, Fukami M, Uematsu A, Kaji M, Iso M, Ono M, Mizota M, Yokoya S, Motomura K, Kinoshita E, Moriuchi H, Ogata T*. Mutation and gene copy number analyses of six pituitary transcription factor genes in 71 patients with combined pituitary hormone deficiency: identification of a single patient with *LHX4* deletion. *J Clin Endocrinol Metab* 95 (8): 4043–4047, 2010. (IF = 6.202)
8. Kagami M, O'Sullivan MJ, Green AJ, Watabe Y, Arisaka O, Masawa N, Matsuoka K, Fukami M, Matsubara K, Kato F, Ferguson-Smith AC, Ogata T*. The IG-DMR and the *MEG3*-DMR at human chromosome 14q32.2: hierarchical interaction and distinct functional properties as imprinting control centers. *PLoS Genet* 6 (6): e1000992, 2010. (IF = 9.532)
9. Yamazawa K, Nakabayashi K, Kagami M, Sato T, Saitoh S, Horikawa R, Hizuka N, Ogata T*. Parthenogenetic chimaerism/mosaicism with a Silver-Russell Syndrome-like Phenotype. *J Med Genet* 47 (11): 782–785, 2010. (IF = 5.751)
10. Kato H, Yoshida R, Tsukamoto K, Suga H, Eto H, Higashino T, Araki J, Ogata T, Yoshimura K*: Familial cases of atypical clinical features genetically diagnosed as LEOPARD syndrome (multiple lentiginos syndrome). *Int J Dermatol* 49 (10): 1146–1151, 2010. (IF = 1.177)
11. Hiraoka M*, Takahashi H, Orimo H, Hiraoka M, Ogata T, Azuma N: Genetic screening of Wnt signaling factors in advanced retinopathy of prematurity. *Mol Vis* 16 (12): 2572–2577, 2010. (IF = 2.541)
12. Matsubara K, Iwamoto H, Yoshida A, Ogata T*: Semen analysis and successful paternity by intracytoplasmic sperm injection in a man with steroid 5 α -reductase-2 deficiency. *Fertil Steril* 94 (7): 2770.e7–2770.e10, 2010. (IF = 3.970)
13. Suzumori N*, Ogata T, Mizutani E, Hattori Y, Matsubara K, Kagami M, Suguhara-Ogasawara M: Prenatal diagnosis of paternal uniparental disomy 14: delineation of further patient. *Am J Med Genet A* 152A (12): 3189–3192, 2010. (IF = 2.404)
14. Inoue H*, Kangawa N, Kinouchi A, Sakamoto Y, Kimura C, Horikawa R, Shigematsu Y, Itakura M, Ogata T, Fujieda K: Identification and functional analysis of novel human growth hormone-releasing hormone receptor (*GHRHR*) gene mutations in Japanese subjects with short stature. *Clin Endocrinol* 74 (2): 223–233, 2011 (IF = 3.201)
15. Yamazawa K, Nakabayashi K, Matsuoka K, Matsubara K, Hata K, Horikawa R, Ogata T*: Androgenetic/biparental mosaicism in a girl with Beckwith-Wiedemann syndrome-like and upd(14)pat-like phenotypes. *J Hum Genet* 56 (1): 91–93, 2011. (IF = 2.547)

16. Inoue H*, Kangawa N, Kinouchi A, Sakamoto Y, Kimura C, Horikawa R, Shigematsu Y, Itakura M, Ogata T, Fujieda K: Identification and functional analysis of novel human growth hormone secretagogue receptor (GHSR) gene mutations in Japanese subjects with short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 96 (2): E373–378, 2011. (IF = 6.202)
17. Fukami M, Muroya K, Miyake T, Iso M, Yokoi H, Suzuki Y, Tsubouchi K, Nakagomi Y, Kikuchi N, Horikawa R, Ogata T*: *GATA3* abnormalities in six patients with HDR syndrome. *Endocr J* 58 (2): 117–121, 2011.
18. Dateki S, Fukami M, Tanaka Y, Sasaki G, Moriuchi H, Ogata T*: Identification of chromosome 15q terminal deletion with telomere sequences and its bearing on genotype-phenotype analysis. *Endocr J* 58 (3): 155–159, 2011
19. Brandão MP, Costa EM, Fukami M, Gerdulo M, Pereira NP, Domenice S, Ogata T, Mendonca BB. MAMLD1 (Mastermind-Like Domain Containing 1) Homozygous Gain-of-Function Missense Mutation Causing 46,XX Disorder of Sex Development in a Virilized Female. *Adv Exp Med Biol* 707 (10):129–31, 2011.
20. Miyazaki O*, Nishimura G, Kagami M, Ogata T: Radiological evaluation of dysmorphic thorax in paternal uniparental disomy for chromosome 14. *Ped Radiol* 41 (8): 1013–1019, 2011.
21. Fukami, Shozu M, Soneda S, Kato F, Inagaki A, Takagi H, Hanaki K, Kanzaki S, Ohyama K, Sano T, Nishigaki T, Yokoya S, Binder G, Horikawa R, Ogata T*: Aromatase excess syndrome: identification of cryptic duplications and deletions leading to gain-of-function of *CYP19A1* and assessment of phenotypic determinants. *J Clin Endocrinol Metab* 96 (6): E1035–1043, 2011.
22. Ogata T*, Matsubara K: Steroid 5 α -reductase-2 deficiency and fertility. *Fertil Steril* 95 (7): e46.
23. Nakamura M, Fukami M, Sugawa F, Miyado M, Nonomura K, Ogata T*: *Mamld1* knockdown reduces testosterone production and *Cyp17a1* expression in mouse Leydig tumor cells. *PLoS ONE* 6 (4): e19123, 2011.
24. Matsubara K, Murakami N, Nagai T, Ogata T*: Maternal age effect on the development of Prader-Willi syndrome resulting from upd(15)mat through meiosis I errors. *J Hum Genet* 56 (8): 566–71, 2011.
25. Nakabayashi K*, Trujillo AM, Tayama C, Camprubi C, Yoshida W, Lapunzina P, Sanchez A, Soejima H, Aburatani H, Nagae G, Ogata T, Hata K, David Monk D: Methylation screening of reciprocal genome-wide UPDs identifies novel human specific imprinted genes. *Hum Mol Genet* 20 (16): 3188–97, 2011.
26. Inoue H, Sakamoto Y, Kangawa N, Kimura C, Ogata T, Fujieda K, Qian, ZR, SanoT, Itakura M. Analysis of expression and structure of the rat GH secretagogue/ghrelin receptor (Ghsr) gene: roles of epigenetic modifications in transcriptional regulation. *Mol Cell Endocrinol* 345: 1–15, 2011.
27. Soneda S, Yazawa T, Fukami M*, Adachi M, Mizota M, Fujieda K, Miyamoto K, Ogata T: Proximal promoter of the cytochrome P450 oxidoreductase gene: identification of microdeletions involving the untranslated exon 1 and critical function of the SP1 binding site. *J Clin Endocrinol Metab* 96 (11): E1881–1887, 2011.
28. Ishizuka B, Okamoto N, Hamada N, Sugishita Y, Saito J, Takahashi N, Ogata T, Itoh MT. Number of CGG repeats in the FMR1 gene of Japanese patients with primary ovarian insufficiency. *Fertil Steril* 96 (5): 1170–1174, 2011.
29. Ayabe T, Ishizuka B, Maruyama T, Uchida H, Yoshimura Y, Yoshida R, Fukami M, Nagai T, Ogata T*: Association of primary ovarian insufficiency with a specific HLA haplotype (A*24:02-C*03:03-B*35:01) in Japanese patients. *Sex Dev* 5 (5): 235–240, 2011.
30. Kalfa N, Cassorla F, Audran F, Abdennabi OI, Philibert P, Bérout C, Guys JM, Reynaud R, Alessandrini P, Wagner K, Bréaud J, Valla JS, Morisson Lacombe G, Daures JP, Baskin L, Fukami M, Ogata T, Sultan C: Polymorphisms of *MAMLD1* gene in hypospadias. *J Pediatr Urol* 7 (6): 585–591, 2011.
31. Inoue H, Mukai T, Sakamoto Y, Kimura C, Kangawa N, Itakura M, Ogata T, Ito Y, Fujieda K: Identification of a novel mutation in the exon 2 splice donor site of the POU1F1/PIT-1 gene in Japanese identical twins with mild combined pituitary hormone deficiency. *Clin Endocrinol* 76 (1): 78–87, 2012.
32. Sugihara S*, Ogata T, Kawamura T, Urakami T, Takemoto K, Kikuchi N, Takubo N, Tsubouchi K, Horikawa R, Kobayashi K, Kasahara Y, Kikuchi T, Koike A, Mochizuki T, Minamitani K, Takaya R, Mochizuki H, Nishii A, Yokota I, Kizaki Y, Mori T, Shimura N, Mukai T, Matsuura N, Fujisawa T, Ihara K, Kosaka K, Kizu R, Takahashi T, Matsuo S, Hanaki K, Igarashi Y, Sasaki G, Soneda S, Teno S, Kanzaki S, Saji H, Tokunaga K, Amemiya S, The Japanese Study Group of Insulin Therapy for Childhood and Adolescent Diabetes (JSGIT): Genetic characteristics on HLA-cass II and class I among Japanese type 1A and type 1B diabetic children and their families. *Pediatr Diabetes* 13 (1): 33–44, 2012.
33. Kagami M, Kato F, Matsubara K, Sato T, Nishimura G, Ogata T*: Relative frequency of underlying genetic causes for the development of UPD(14)pat-like phenotype. *Eur J Hum Genet* 20 (9): 928–932, 2012.
34. Oto Y*, Obata K, Matsubara K, Kozu Y, Tsuchiya T, Sakazume S, Yoshino A, Murakami N, Ogata T, Nagai T: Growth hormone secretion and its effect on height in pediatric patients with different genotypes of Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet A* 158A (6): 1477–1480, 2012.

35. Fuke-Sato T, Yamazawa K, Nakabayashi K, Matsubara K, Matsuoka K, Hasegawa T, Dobashi K, Ogata T*: Mosaic upd(7)mat in a patient with Silver-Russell syndrome: correlation between phenotype and mosaic ratio in the body and the placenta. *Am J Med Genet A* 158A (2): 465–468, 2012.
36. Stoppa-Vaucher S, Ayabe T, Paquette J, Patey N, Francoeur D, Vuissoz J-M, Deladoëy J, Samuels ME, Ogata T, Deal CL*: 46, XY gonadal dysgenesis: new *SRY* point mutation in two siblings with paternal germ line mosaicism. *Clin Genet* 82 (6): 505–513, 2012.
37. Abe Y, Aoki Y*, Kuriyama S, Kawame H, Okamoto N, Kurosawa K, Ohashi H, Mizuno S, Ogata T, Kure S, Niihori T, Matsubara Y: Prevalence and clinical features of Costello syndrome and cardio-facio-cutaneous syndrome in Japan: Findings from a nationwide epidemiological survey. *Am J Med Genet A* 158A (5): 1083–1094, 2012.
38. Koyama Y*, Homma K, Fukami M, Miwa M, Ikeda K, Ogata T, Hasegawa T, Murata M: Two-step biochemical differential diagnosis of classical 21-hydroxylase deficiency and cytochrome P450 oxidoreductase deficiency in Japanese infants using uUrinary Pregnanetriolone / Tetrahydrocortisone Ratio and 11 β -hydroxyandosterone by Gas chromatography - mass spectrometry. *Clin Chem* 58 (4): 741–747, 2012.
39. Sekii K*, Itoh H, Ogata T, Iwashima S: Deterioration of myocardial tissue Doppler indices in a case of fetal hydrothorax as a promising indication for clinical intervention before the development of nonimmune hydrops fetalis. *Arch Gynecol Obstet* 286 (4): 1079–1080, 2012.
40. Kalfa N, Fukami M, Philibert P, Audran F, Pienkowski C, Weill G, Pinto C, Manouvrier S, Polak M, Ogata T, C Sultan C*: Screening of *MAMLD1* mutations in 70 Children with 46,XY DSD: Identification and functional analysis of two new mutations. *PLoS One* 7 (3): e32505, 2012.
41. Qin X-Y, Miyado M, Kojima Y, Zaha H, Akanuma H, Zeng Q, Yoshinaga J, Yonemoto J, Fukami M, Ogata T, Sone H*: Identification of novel low-dose bisphenol A targets in human foreskin fibroblast cells derived from hypospadias patients. *PLoS ONE* 7 (5): e36711, 2012.
42. Sekii K*, Ishikawa T, Ogata T, Itoh H, Iwashima S: Fetal myocardial tissue Doppler indices before birth physiologically change in proportion to body size adjusted for gestational age in low-risk term pregnancies. *Early Hum Dev* 88 (7): 517–523, 2012.
43. Fukami M*, Tsuchiya T, Takada S, Kanbara A, Asahara H, Igarashi A, Kamiyama Y, Nishimura G, Ogata T: Complex genomic rearrangements in the *SOX9* 5' region in a patient with Pierre Robin sequence and hypoplastic left scapula. *Am J Med Genet A* 158A (7): 1529–1534, 2012.
44. Ogata T*, Fukami M, Yoshida R, Nagata E, Fujisawa Y, Yoshida A, Yoshimura Y: Haplotype analysis of *ESR2* in Japanese patients with spermatogenic failure. *J Hum Genet* 57 (7): 449–452, 2012.
45. Qin X-Y, Kojima Y, Mizuno K, Ueoka K, Massart F, Spinelli C, Zaha H, Okura M, Yoshinaga J, Yonemoto J, Kohri K, Hayashi Y, Ogata T, Sone H*: Association of variants in genes involved in environmental chemical metabolism and risk of cryptorchidism and hypospadias. *J Hum Genet* 57 (7): 434–441, 2012.
46. Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Van De Pette M, John RM, Kagami M, Nakai K, Soejima H, Ogata T, Arima T*: Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproduction technologies. *Hum Reprod* 27 (8): 2541–2548, 2012.
47. Nagasaki K, Iida T, Sato H, Ogawa Y, Kikuchi T, Saitoh A, Ogata T*, Fukami M: *PRKARIA* mutation affecting cAMP-mediated G-protein-coupled receptor signaling in a patient with acrodysostosis and hormone resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 97 (9): E1808–1813, 2012.
48. Kagami M, Matsuoka K, Nagai T, Yamanaka M, Kurosawa K, Suzumori N, Sekita Y, Miyado M, Matsubara K, Fuke T, Kato F, Fukami M, Ogata T*: Paternal uniparental disomy 14 and related disorders: placental gene expression analyses and histological examinations. *Epigenetics* 7 (10): 1142–1150, 2012.
49. Moritani M, Yokota I, Tsubouchi K, Takaya R, Takemoto K, Minamitani K, Urakami T, Kawamura T, Kikuchi N, Itakura M, Ogata T, Sugihara S, Amemiya S: Identification of *INS* and *KCNJ11* gene mutations in type 1B diabetes in Japanese children with onset of diabetes before 5 yr of age. *Pediatr Diabetes*
50. Suzuki-Suwanai A, Ishii T, Haruna H, Yamataka A, Narumi S, Fukuzawa R, Ogata T, Hasegawa T*: A report of two novel NR5A1 mutation families: possible clinical phenotype of psychiatric symptoms of anxiety and/or depression. *Clin Endocrinol* (accepted).
51. Miyado M, Nakamura M, Miyado K, Morohashi K, Sano S, Nagata E, Fukami M, , Ogata T*: *Mamld1* deficiency significantly reduces mRNA expression levels of multiple genes expressed in mouse fetal Leydig cells but permits normal genital and reproductive development. *Endocrinology* (accepted).
52. Sekii K*, Itoh H, Ogata T, Iwashima S*: Possible contribution of fetal size and gestational age to myocardial tissue Doppler velocities in preterm fetuses. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* (accepted).

53. Nagasaki K*, Tsuchuya S, Saitoh A, Ogata T, Fukami M: Neuromuscular symptoms in a patient with familial pseudohypoparathyroidism type 1b diagnosed by methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification. *Endocr J* (accepted).
54. Ohishi A*, Ueno D, Matsuoka, H, Kawamoto, F Ogata T: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and adrenal hemorrhage in a Filipino neonate with hyperbilirubinemia. *Am J Perinatol Reports* (in press).
55. Fuke T, Mizuno S, Nagai T, Hasegawa T, Horikawa R, Miyoshi Y, Muroya K, Kondoh T, Numakura C, Sato S, Nakabayashi K, Tayama C, Hata K, Sano S, Matsubara K, Kagami M, Tamazawa K, Ogata T*: Molecular and clinical studies in 138 Japanese patients with Silver-Russell syndrome. *PLoS ONE* (accepted).
56. Ayabe T, Matsubara K, Ogata T, Ayabe A, Murakami N, Nagai T, Fukami M*: Birth seasonality in Prader-Willi syndrome resulting from chromosome 15 microdeletion. *Am J Med Genet A* (accepted).

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・生殖医療の新たな枠組み構築

～広汎性子宮頸部摘出術後の ART 症例の周産期予後に関する検討および遺伝子発現解析から見た卵子妊孕性解析の基礎的検討～

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 小川誠司 慶應義塾大学医学部産婦人科 助教
菅原かな 慶應義塾大学医学部産婦人科 助教
奥村典子 慶應義塾大学医学部産婦人科 助教
浜谷敏生 慶應義塾大学医学部産婦人科 講師
的場 亮 DNA チップ研究所
石川 円 DNA チップ研究所

研究要旨：

広汎性子宮頸部摘出術（Radical Abdominal Trachelectomy、以下 RAT）は、子宮頸部早期浸潤癌を伴う若年女性の妊孕性温存手術として本邦で急速に普及しつつあるが、術後一部の患者は不妊治療を要し、また早産リスクが高くなると推測される。今回我々は RAT 術後の妊娠分娩例 8 症例を経験したので、妊娠に至る治療と妊娠経過・分娩転帰を検討した。8 症例のうち 5 症例に AIH や IVF の不妊治療を必要としたが、不妊治療を行った 5 妊娠中 3 妊娠で妊娠 28 週以前に前前期破水を来たし、それぞれ 28 週未満での早産となった。自然妊娠群 3 例では 34 週以前の早産例はなかった。RAT 術後妊娠では予防的頸管縫縮術を行った症例であっても妊娠 28 週未満の早産分娩が起こる危険性が高く、不妊治療を要した症例で高くなる傾向が示唆された。

また、卵子の妊孕性を確認するための方法として注目されている遺伝子発現解析について、マウスをモデルとしてその基礎的検討をおこない、単一卵子より抽出した全遺伝子増幅後のビオチン標識法の違いによって、DNA マイクロアレイによる解析結果が大きく違ってくることを確認した。一方同じ試料を用いた次世代シーケンサーによる遺伝子発現解析結果は、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、また試料の標識の必要がないために DNA チップ解析のように標識法による差は見られない。さらに卵子からの RNA 抽出時のキャリア RNA の添加は次世代シーケンサーの解析結果に影響せず、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）は急速に発展し続けているが、その応用による問題点や、その限界についての研究は始まったばかりである。

本研究では第一に、子宮頸部初期浸潤ガンに対して行われている広汎性子宮頸部摘出術（RAT）施行後の患者における、ART由来妊娠後の不妊および周産期予後の検討を行った。RATはこれまで子宮摘出を余儀なくされていた子宮頸部初期浸潤ガン患者に対して、子宮頸部を広汎に摘出する代わりに体部を温存し、妊よう性を維持せんとするものである。しかし、長時間の手術、妊よう性や早産予防に必要な子宮頸部の完全な欠損など、不妊や早産を起こす可能性は高い事が予想される。さらに頸部摘出がより高度で、生殖補助技術を用いなければ妊娠しない症例において、早産リスクがさらに高くなるのかどうかも大きな懸念である。

第二に、卵子または受精卵の妊孕性を解析する方法として、DNA マイクロアレイ法と次世代シーケンサーによる方法の二つの方法を比較検討した。卵子の妊よう性低下による不妊は現在の生殖補助技術が突き当たっている大きな壁であるが、その分子実態はまだよくわかっていない。卵子妊よう性の研究、あるいは臨床的な診断法として、遺伝子発現解析は有望なもののひとつであるが、その解析のためのプラットフォームとしてこれまでの DNA マイクロアレイを用いるべきかはまだ検討されていない。

そこで本研究では、第一に広汎性子宮頸部摘出術施行後の患者に ART を行った場合の周産期予後について検討するとともに、

卵子の妊孕性解析法として注目される遺伝子発現解析法について基礎的な検討を行った。

B. 方法・結果・考察

1) 広汎性子宮頸部摘出術後の ART 症例の周産期予後に関する検討

広汎性子宮頸部摘出術の術式は、以下の通りである。術前に、尿管損傷を防ぐため全例に膀胱鏡下逆行性に一時的に尿管カテーテルを留置した。その後我々がこれまで行ってきた広汎子宮全摘術に準じて、第一に腹式に骨盤内リンパ節郭清（総腸骨節、仙骨節、外腸骨節、内腸骨節、基靭帯節、閉鎖節、単径節）、第二に基靭帯処理を施行した。第三に子宮頸部を切除し、この時原則として子宮動脈本幹は温存した。第四に残存子宮頸部と膣の接合および頸管縫縮を行った。周産期合併症の増加を考慮して、初期に行った症例を除いて全例に頸管縫縮術を行った。また術後 Ashermn 症候群となった経験があるため、子宮内腔癒着防止のために術後 IUD を挿入した。術後は内診、経膣超音波検査、断端細胞診、腫瘍マーカー、CT・MRI 検査などで経過観察し、術後 6 か月程度経過した時点で妊娠許可とした。自然妊娠に至らない症例は当科にて不妊一般検査を施行し、AIH や IVF の不妊治療を試みた。広汎性子宮頸部摘出術後の患者の経過観察において、すべての患者で術後 3 か月は毎月、続く 6 か月は 2 か月毎、2 年目は 3 か月毎、3 年目は 6 か月毎に経過観察とした。それぞれの予約時に合併症を記録し、子宮頸部細胞診を施行した。

手術症例の詳細を図 1 に示す。全手術症例のうち、広汎性子宮頸部摘出術を施行した症例が 80 例、病変の範囲が術前の予想以

上に拡大しており術中に広汎子宮全摘術に変更した例が10例であった。広汎性子宮頸部摘出術を施行した中で、術後追加治療が必要となった症例が10例あり、経過観察例70例のうち未婚症例も含めた挙児希望41例を妊娠症例の分母とした。当科での挙児希望例について図2に示す。結婚率は80症例中37例、46.2%、挙児希望率は80症例中41例、51.2%であった。挙児希望のあった41症例中、自然妊娠による妊娠成立は3例、症例あたり妊娠率は7.3%であった。80症例中17例、21.2%でAIHやIVFといった不妊治療を行った。自然妊娠による妊娠成立は3症例、症例あたり妊娠率は7.3%と高くありません。考えられる不妊原因からも、多くの術後症例がAIHやIVFの不妊治療を必要とすることが予想される。総妊娠は8症例で、症例あたり妊娠率19.5%であったが、IVFまで行った症例では、10症例中4症例、40%に妊娠が成立した。

次に当科での妊娠例の周産期予後を図3に示す。妊娠例は8症例9妊娠であるが、前述したように自然妊娠は症例6以下の3例しかなく、1例はAIH妊娠、4例はIVFによる妊娠であった。不妊治療群と自然妊娠群とでみてみると、上段の不妊治療群で5症例中2例、6妊娠中3例が前前期破水を起こし、32週以前の早産となった。これに対して自然妊娠群ではそのような例が見られず、不妊治療群で早産リスクが高くなっている可能性が示唆される。予防的頸管縫縮術については、第一症例の初回妊娠以外、全ての例で施行している。この妊娠では妊娠22週より子宮口が自然開大したため、腔閉鎖術を行っているが妊娠23週6日で前前期破水を起こし、妊娠24週3日で早産に至っている。これに対して、子宮頸管縫縮術

を行った他の症例では、ほぼ妊娠28週以降に分娩となっている。一方、出生体重を見てもみると、不妊治療群、自然妊娠群とも10パーセント未満のIUGRは一例も認められなかった。このことから、妊娠中の子宮胎盤血流は、不妊治療群も含めて自然妊娠と同様に保たれていることが推測される。分娩、および産褥経過を図4に示す。全前置胎盤合併症例以外は全例体下部横切開で分娩可能、輸血を要しなかった。ただし腹腔内癒着症例があり、腸管損傷のリスクや癒着剥離の必要性は高くなる可能性がある。これらの合併症がなければ手術時間は通常と変わらず、また子宮内感染などの産褥合併症も認められなかった。

この治療は妊よう性を保存可能であるが、縮小手術であるため標準治療と比較して追加治療や、再発リスクが高くなり、また妊娠成立・および妊娠維持に必要な頸部を切除していることから術後不妊や早産となるリスク増加が懸念される。不妊の原因としては第一に、子宮頸部切除により精子リザーバー機能の消失、および子宮頸管という感染防御機構の消失による子宮内環境悪化が考えられる。実際、本術式施行後は不妊検査や治療に伴う子宮内操作後の骨盤腹膜炎のリスクが高く、我々も子宮卵管造影後、および人工授精施行後に骨盤腹膜炎を起こした症例を経験しており、注意が必要である。第二に、子宮口狭窄によって精子侵入不全が起こることが考えられる。第三に、長時間に亘る手術であるため、腹腔内癒着発生による卵管通過障害・pickup障害が考えられる。図3で示した体外受精の成功率はそれほど低くなかったことから、体内での受精障害による不妊が増加している可能性が考えられる。また、術後Asherman症

候群発症例が報告されており 9)当科でも経験があることから、術中の子宮血流低下、術後の子宮内環境悪化による子宮内膜の非薄化が不妊の原因となっている可能性もあり、これは体外受精の成功率を低下させる原因となり得る。また、この術式で行われる予防的頸管縫縮術は頸管を狭窄させてしまうため、流産の処置が困難となる可能性や、分娩後の子宮内容遺残のリスクが増える可能性があり、その施行には議論の余地があると考えられる。広汎性子宮頸部摘出術後の不妊治療後妊娠例の周産期予後の報告は多くないが、Wong らは腹式、および腔式の広汎性子宮頸部摘出術を含む 6 症例の ART 後妊娠を報告している。これをみると、双胎を除く 14 週以降の妊娠例 5 例中、4 例が 30 週以前の早産となっており、やはり早産リスクが高いことが示唆される。なお、この報告では予防的縫縮術を行っているかどうかの記載はなかった。なおこの中の症例は IVF による双胎妊娠例であり、22 週で流産となっている。本術式後の妊娠では、多胎妊娠を可及的に回避する工夫が必要と考えられる。また、広汎性子宮頸部摘出術後妊娠では、頸管粘液の減少により頸管機能不全により感染が増加すると考えられ、妊娠 14~16 週に予防的抗生剤投与を示唆する報告や、子宮頸癌臨床進行期 I a2 期や I b1 期の妊婦に対して広汎性子宮頸部摘出術が試みられた報告もある。

とくに広汎性子宮頸部摘出術時には妊孕性温存を熱望する患者に厳しい妊娠予後の説明伝達は不十分となりやすく、特に本手術後の不妊患者に AIH・IVF 等の積極的な医学的介入を行う際には、治療に関わる不妊治療担当医からも、周産期管理上危険性が高いことについて再度十分な説明を行う

ことが望ましく、妊娠管理には周産期担当医との連携も密にしていく必要があると考えられた。

2) 卵子遺伝子発現解析法の基礎的検討

本研究では第一に、単一卵子遺伝子解析を行う際、Ribo-SPIA 法 (WT-Ovation Pico RNA Amplification System) を用いて遺伝子を増幅した後、ULS labeling 法 (FL-Ovation cDNA Fluorescent Module) と Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit(5190-0449 : Agilent) のふたつの方法を用いて増幅産物のラベリングを行い、遺伝子発現解析の結果を比較した。その結果、同一卵子由来の total RNA サンプルから増幅後に二つのラベリング法でラベル化を行ったものを、同一の DNA microarray (Mouse Whole Genome オリゴマイクロアレイ、Agilent) にて解析した結果、主成分分析およびクラスター解析の結果で明らかに異なる結果が得られた (n=2)。

第二に、前者と同一試料を用い、次世代シーケンサーにより解析を行った。

まず 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、dsDNA 合成後、Tru Seq DNA Sample Preparation Kit を用いてシーケンズプライマー、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。この試料を、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。その結果、トリミング（15 塩基除去）を行った群と、行わなかった群における、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 $\pm 2SD$ 以内の距離にマッチしたメイトリード）はそれぞれ総リード数の 87.62%、66.06%であったが、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。また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 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。

次に 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。ここで、可能な限り多種の断片を得るために 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。8 週齢マウス卵子由来の試料の解析結果を、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、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。また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) 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。

C. 結論

RAT 術後妊娠では予防的頸管縫縮術を行った症例であっても妊娠 28 週未満の早産分娩が起こる危険性が高く、ART を含む不妊治療を要した症例で高くなる傾向が示唆される。また RAT 手術時には妊孕性温存を熱望する患者に妊娠予後の説明が不十分となることがあり、治療に関わる不妊治療担当医からも、周産期管理上危険性が高いことについて十分な説明を行うことが望ましいと考えられた。

一方次世代シーケンサーによる解析は現在まだ高価であるが、解析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から、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本法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。

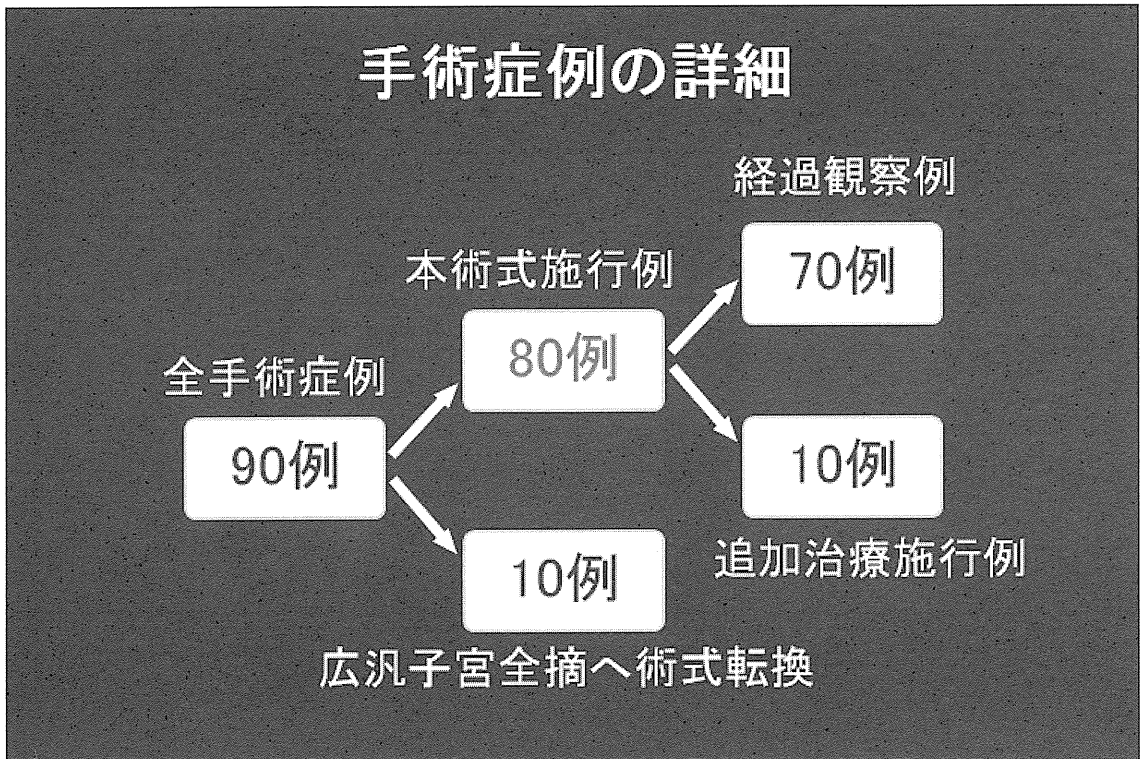


図 1

妊 娠 率

	症例数	率(%)
結婚率	37	46.2
拳児希望率	41	51.2
不妊治療	17	21.2
自然妊娠率	3/41	7.3
総妊娠率	8/41	19.5

図 2

当科での妊娠例

症例	年齢	妊娠形式	術中縫縮術	妊娠中縫縮術等	分娩週数	児体重(g)	APGAR 1/5分後	早産適応
1	35	AIH	-	膣閉鎖術	24w3d	744*	4/4	PPROM
	40	AIH	+	-	31w1d	1953*	6/7	PPROM
2	34	IVF	+	-	27w6d	969	6/8	PPROM
3	38	IVF	+	-	34w0d	2096	1/5	全前置胎盤
4	35	IVF	+	-	36w6d	2546	8/9	(予定帝切)
5	33	IVF	+	-	37w2d	2690	8/9	
6	35	NI	+	-	35w6d	2658	8/8	
7	33	NI	+	-	37w1d	2598	8/9	
8	27	NI	+	-	37w2d	2450	9/9	

不妊治療群でPPROMが多い傾向があるが、術中の予防的頸管術により分娩をほぼ28週以降に出来る可能性がある
IUGRは一例もなかった(*:90%以上のHeavy For Date児)

図 3

当科分娩例の経過(8症例中6例)

症例	妊娠形式	頸管縫縮	分娩週数	早産適応	帝切術式	出血量(ml)	その他
1	AIH	-	24w3d	PPROM	体下部・横	1693	(腹腔内癒着)
	AIH	+	31w1d	PPROM	体下部・横	1550	
2	IVF	+	27w6d	PPROM	体下部・横	2054	(術中小腸損傷)
3	IVF	+	34w0d	全前置胎盤	底部・横	4920 (輸血)	
4	IVF	+	36w6d	(予定)	体下部・横	1749	
5	IVF	+	37w2d	(予定)	体下部・横	1800	
6	NI	+	35w6d	(予定)	体下部・横	1680	

前置胎盤合併症例以外は体下部横切開で分娩可能
輸血を要しなかった
ただし腹腔内癒着のため、腸管損傷リスクや癒着剥離の必要性は高くなる

図 4

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

ART は不妊症に重要な治療法であるが、配偶子を操作するため、エピジェネティックの異常（ゲノムインプリンティングの異常）を起し、先天性疾患や悪性腫瘍、性格や行動異常を引き起こす可能性が示唆されている。この可能性を評価するのは、不妊症患者が一般集団とは異なるため非常に難しい。ART 操作のリスク要因と不妊症患者背景の両面について解析する必要がある。そこで、本研究では、1) ART 治療と先天性ゲノムインプリンティング病に関する発症頻度調査を行い、その実態を把握すること（ART 症例の頻度、ART 治療内容と臨床像等）2) インプリント異常症患者 DNA を用いたエピゲノム解析（メチル化解析）を行い、メチル化異常の頻度、程度との関連性について疾患別に正確に評価すること 3) 不妊症男性に注目し、その精子の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することを目的とした。その結果、1) 全国調査対象施設総数 3158 施設（産婦人科/小児科/重症心身障害者施設）より、報告患者総数は 1818 人であった（BWS 216 人、AS 415 人、PWS 992 人、SRS 161 人、TNDM 34 人）。各疾患の年齢別推移では、AS 以外の 4 疾患で、近年増加傾向にあることが示唆された。実際に PWS、BWS、AS、SRS の患者のそれぞれ 1.5%、8.6%、1.6%、9.5%が不妊治療を受けていた。またほとんどの症例は体外受精（IVF）あるいは顕微授精（ICSI）によるもので、平成 17 年度の IVF+ICSI の出生児が 0.86%である事を考慮すると、4 疾患とも発症率は高く、特に SRS では 11.2 倍、BWS では 10 倍と圧倒的な高リスクである事が判明した。2) 22 領域のヒトメチル化インプリント領域を同定し、ART により発症したインプリンティング異常症の患者について、DNA メチル化について解析し、異常のパターン分析を行った。ART 出生児の場合の特徴は、1) 複数のインプリント領域の異常を示す 2) 精子型と卵子型 DMR の両方に異常を示す 3) 高メチル化と低メチル化のメチル化異常を示す 4) メチル化異常の程度は、モザイク型であった。症例数が少ないため、正確な評価はできないが、これらの結果から、ART により発症したインプリンティング異常症（SRS と BWS）の場合は、受精以降のメチル化の維持に原因が多いと推測された。3) 249 例の不妊症精子を用いて、ヒトインプリント領域の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られた。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。今後も ART 出生児が増加することが予想され、ART によるインプリント異常のリスク回避は、国民健康管理において重要な課題と考えられる。そのため、今後も ART 出生時の大規模なフォローアップが重要である。

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

近年、少子化、晩婚化の社会情勢と医療技術の進歩により、生殖補助医療（ART）が急速に普及した。しかし、同時にこれまで非常に稀であったゲノムインプリンティング異常症の発症頻度が増加していることが世界中で報告され、注目されている。代表的な先天性ゲノムインプリンティング異常症は、Beckwith-Wiedemann 症候群（BWS）、Angelman 症候群（AS）、Prader-Willi 症候群（PWS）、Silver-Russell 症候群（SRS）、新生児一過性糖尿病（TNDM）で、いずれも発生頻度数万～数十万人に 1 人で非常に稀な疾患と考えられている。これには、ゲノムインプリンティングが確立する時期の配偶子は環境変化に対して非常に脆弱であり、その時期に ART により配偶子を操作する事が様々な異常を招く原因である可能性が高い。ゲノムインプリンティング異常は、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、性格、行動異常等にも関連する。さらに、癌や生活習慣病などの成人性疾患の原因となりうるため、次世代社会の最重要な問題として早急に実態を把握し、適切な対応が必要とされる。

本研究では、1) 療育センターや重症心身障害者施設を含む全国多施設の協力下に、ART 治療と先天性ゲノムインプリンティング病 5 疾患に関する疫学調査（ART 症例の頻度、ART 治療内容と臨床像等）を行う。2) 患者情報と患者検体を用い、遺伝子型と臨床型の関連を明らかにする。特に、DNA メチル化に着目し、異常の頻度、程度、影響を受けやすい遺伝子領域を同定し ART 治療法やメチル化異常との関連について実態を把握し、リスク要因について評価する事。3) 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する。

B. 研究方法

1) ART 治療と先天性ゲノムインプリンティング病 5 疾患に関する全国調査：

全国病院の小児科および産婦人科を対象として、大学病院／一般病院の別、病院の病床数で層別化した層化無作為抽出による抽出調査を実施した。全病院のリストは「病院要覧」を、大学病院は「医療機関名簿」を使用した。患者が特に集中すると予想される重症心身障害者施設（以下「特別病院」）については、全数調査を行った。

2) 先天性インプリント異常症のメチル化インプリントの解析：

先天性ゲノムインプリンティング異常症患者の頬粘膜細胞あるいは血液から DNA を抽出し、責任インプリント遺伝子領域のメチル化解析を行った。これには、DNA 多型を含めた Bisulphite PCR Sequence 法を用い、正確に評価した。また、結果については、各医療機関の主治医に郵送で報告した。

3) 不妊症男性精子における DNA メチル化の異常

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。

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。

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。

（倫理面への配慮）

患者検体を用いる研究：ヘルシンキ宣言（エジンバラ改訂）、臨床研究に関する倫理指針（厚生労働省）に従い、本研究を実施。東北大学医学部倫理委員会より、研究プロトコルの承諾を得た。研究対象者の登録にあたっては、機密保護に十分に配慮した。すなわち研究対象者の同定や照会には研究登録番号、症例イニシャル、生年月日を用いて行うこととし、直接患者を識別できる情報は事務局のデータベースには登録していない。また、本研究に係わる臨床記録、検査データ、同意に関する記録など医療機関において作成されたものについては保管責任者が鍵のかかるキャビネットに保管。その保管期間は本研究終了時までとし、その後廃棄予定。

組換え DNA 実験：全ての実験について、遺伝子組み換え実験および動物実験の承認を得ている。参加者は遺伝子組換え実験の教育訓練をうけ「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づき、実験拡散防止措置確認を行っている。

C. 研究結果

1) ART 治療と先天性ゲノムインプリンティング病に関する全国調査

調査対象施設総数 3158 施設のうち、1602 施設から有効回答があり（有効回答率 56.3%）、報告患者総数は 1818 人であった。その内訳は、BWS が 216 人、AS が 415 人、PWS が 992 人、SRS が 161 人、TNDM が 34 人である。1818 例のうち 27.7%にあたる 504 例の第 2 次調査票が回収された。このうち不

適格率はなかった。

図 1 に不妊治療を受けたかどうか、また受けた場合はその治療内容（表 1）について示した。全体に、不妊治療を受けたかどうか分からない患者が多いことが特徴で、十分な情報が得られていないことが判明した。何らかの不妊治療を受けた事が判明している親は 0~9.5%で、一般に不妊治療を受けている割合が 10%前後なので、多いとはいえない。しかし、実際少なくとも PWS、BWS、AS、SRS の疾患のそれぞれ 1.5%、8.6%、1.6%、9.5%が不妊治療を受けていた。またほとんどの症例は体外受精（IVF）あるいは顕微授精（ICSI）によるものであった。平成 17 年度の IVF+ICSI の出生児は年間 10338 人で全出生児の 0.86%となる。いずれの 4 疾患も発症率は高く、特に SRS では 11.2 倍、BWS では 10 倍と圧倒的な高リスクである事が判明した。

2) インプリント異常症患者のメチル化インプリントの解析と ART との関連：

DNA 多型を含む Bisulphite PCR Sequence 法を用いて、ヒトメチル化インプリント領域の DNA メチル化の解析を正確に行い、メチル化異常のパターンについて分析し、発症機序を推測した。また、インプリントを受けない領域に関して、2 領域についても同様の解析を行った。

SRS の場合、ART 治療を受けた患者では、6 例中 5 例において、複数のインプリント領域で異常を認めた。これらの症例は全例、精子型と卵子型 DMR の両方に異常を認めた。また、同一症例で、高メチル化と低メチル化を示し、またその程度は、完全型ではなく、モザイク型を示す事が特徴にみられた。

BWS は 1 例しか ART 後の症例は解析出来なかったが、SRS の場合と同様の傾向が見られた。

一方、非 ART 群においては、SRS では 10 例中 3 例、BWS では 6 例中わずか 1 例に複数領域にメチル化異常を示すことが判明した。

3) 不妊症男性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。症例別でみ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。遺伝子別にみると、精子型メチル化の異常は 13.5%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 2)。

D. 考察

1) ART と先天性インプリント異常症との関連

1 次アンケート調査では、全国 3158 施設の実態調査を行い、1602 施設 (有効回収率 56.2%) より回答を得た。次に 2 次アンケート調査では、対象 5 疾患を治療している 380 施設のうち 171 施設より、臨床像や治療法等 14 項目についての回答を得た

(総患者数は 454 名)。不妊治療を受けた患者は 0 ~9.5%で、一般に不妊治療を受けている割合が 10 ~15%なので、多いとはいえない。しかし、PWS、BWS、AS、SRS の疾患のそれぞれ 1.5%、8.6%、1.6%、9.5%が不妊治療を受けていた。またほとんどの症例は体外受精 (IVF) あるいは顕微授精 (ICSI) によるものであった。平成 17 年度の IVF+ICSI の出生児は年間 1 万人以上で、全出生児の 0.86%となる。4 疾患の発症率は高く、特に SRS では 11.2 倍、BWS では 10 倍と圧倒的な高リスクが予想される。しかし、症例数も少なく、親の年齢も考慮しなければ正確な評価は出来ない。さらに、これら疾患の発症率は、年齢が低い程高く、増加傾向に有る事が予想される。長期的な調査研究も重要である。

2) ART により発症したインプリント異常症の分子機構の解明 :

これまでの先天性ゲノムインプリンティング病における DNA メチル化の解析により、ART との関連が示されたインプリント異常症は、SRS と BWS で、いずれも DNA メチル化の異常を原因とする (エピゲノム変異) の症例が多く、ART 出生児においてもエピゲノム変異の症例が多い傾向にあった。このメチル化異常が ART 出生児の場合、どのような分子機構を原因として起こっているのか、つまり発

症時期を特定し、そのリスク要因を同定する事を試みた。その結果、ART 出生児の特徴としては、1) 責任領域以外の複数のインプリント領域で異常を認めた 2) 同一症例で、精子型と卵子型 DMR の両方に異常を認めた 3) 同一症例で、高メチル化と低メチル化を示す症例が多い 4) メチル化異常の程度は、完全型ではなく、モザイク型を示す症例が多く見られた。症例数が少ないため、正確な評価はできないが、これらの結果から、ART により発症したインプリント異常症の場合は、受精以降のメチル化の維持に原因があると推測される。また、非インプリント遺伝子では、全く影響を受けていない。このことから、ゲノム全体では影響を受けず、インプリント遺伝子特有の現象で、インプリント遺伝子領域は影響を受けやすい事が唆された。

3) 不妊症男性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 の結果とはほぼ一致した。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ができなかった。

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。

4) 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、程度は関連し、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。

E. 結論

インプリント遺伝子のDNAメチル化は、エピジェネティックな修飾として変化を受けやすい特徴があり、先天性疾患に限らず、小児期の性格、行動異常や癌、生活習慣病などの成人性疾患の原因にもなる事で、注目を集めている。配偶子操作を行う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、その影響について懸念されている。BWSやAS等の先天性疾患の発症頻度が増加しているとの報告が数多くみられるが、今回の解析した症例数はこれまでの報告例では国内ではじめてで、PWSやSRSの報告は世界ではじめてである。これら疾患が増加傾向に有り、ART治療と関連する事が示唆される。

ARTにより発症したインプリント異常症の分子機構について異常のパターン分析に、共通の特徴的なパターンが見られ、ARTにより発症したインプリント異常症の場合は、受精以降のメチル化の維持に原因があると推測される。つまり、受精以降のプロセス(受精卵培養、凍結胚操作など)に注意を払わなければならないと考えられる。しかし、症例数が少ないため、正確な評価はできないため、今後も症例の収集が必要である。

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、小児がんにとどまらず、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

未だ正確には評価できないが、ARTにより発症したインプリント異常症の場合は、受精以降のメチル化の維持に原因があると推測される。つまり、受精以降の

プロセス（受精卵培養、凍結胚操作など）に注意を払わなければならないと考えられる。また同時に、不妊症男性精子のおよそ 25% にメチル化異常を認める。特に乏精子症患者精子に多い傾向にある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hiura H, Sugawara A, Yaegashi N, Sasaki H, Kono T, **Arima T**. A tripartite paternally methylated region within the Gpr1-Zdbf2 imprinted domain on mouse chromosome 1 identified by meDIP-on-chip. **Nucleic Acids Research**. 38, 4929-45, 2010.
2. Watanabe T, Tomizawa S, Mitsuya K, Totoki Y, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Iida N, Hoki Y, Murphy P.J, Toyoda A, Gotoh K, Hiura H, **Arima T**, Fujiyama A, Sado T, Shibata T, Nakano T, Lin H, Ichiyangi K, Soloway P.D. & Sasaki H. Role for piRNAs and non-coding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse Rasgrfl locus. **Science**. 332, 848-852, 2011.
3. Sato A, Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Abe Y, Utsunomiya T, Yaegashi N, **Arima T**. Assessing loss of imprint methylation in sperm from subfertile men using novel methylation PCR-Luminex analysis. **Fertility and Sterility**. 95, 129-34, 2011.
4. Maeda T, Oyama J, Higuchi Y, Nishiyama Y, Kudo Y, Yamori Y, Nakazono T, **Arima T**, Mimori K, Makino N. The physical ability of Japanese female elderly with cerebrovascular disease correlates to the telomere length and subtelomeric methylation status in their peripheral blood leukocytes. **Gerontology**. 57, 137-43, 2011.
5. Maeda T, Oyama J, Sasaki M, **Arima T**, Makino N. The correlation between the clinical laboratory data and the telomere length in peripheral blood leukocytes of Japanese female patients with hypertension. **The Journal of Nutrition, Health and Aging (JNHA)**. 15, 240-4, 2011.
6. Maeda T, Oyama J, Sasaki M, Nishiyama Y, Kudo Y, Yamori T, Nakazono T, **Arima T**, Makino N. The physical ability of elderly female Japanese patients with cerebrovascular disease correlates with the telomere length in their peripheral blood leukocytes. **Aging Clinical and Experimental Research**. 57, 137-43, 2011.
7. 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.
8. 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.
9. **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.
10. 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.
11. 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.
12. 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)
13. 岡江寛明, 樋浦仁, 有馬隆博. 「胎盤とエピジェネティクス」 **HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY**, メディカルレビュー社. 37-42, 2010.
14. 有馬隆博, 樋浦仁, 岡江寛明, 佐藤晶子. 「生殖補助医療 (ART) とエピジェネティクスの異常」 **生命の誕生に向けて (第 2 版)**, 臨床と微生物, 近代出版. 281-283, 2010.
15. 有馬隆博, 樋浦仁, 岡江寛明, 佐藤晶子, 宮内尚子, 阿部千鶴, 林千賀. 「ART におけるエピジェネティクス異常」 **産婦人科の実際**. 金原出版株式会社, 741-750, 2011