

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
総括研究報告書

間葉性異形成胎盤の臨床的・分子遺伝学的診断法の開発を目指した基盤研究

研究代表者：副島英伸
佐賀大学医学部分子生命科学講座
分子遺伝学・エピジェネティクス分野 教授

研究要旨

間葉性異形成胎盤(placental mesenchymal dysplasia, PMD)は、原因不明の胎盤形態異常で、妊娠中の超音波断層法にて部分胞状奇胎や胎児共存奇胎と類似した嚢胞状変化を呈する。誤診されると無用の人工流産を招くこと、高率に妊娠高血圧症候群・早産・胎児発育不全(FGR)・胎児死亡(IUFD)を合併することが問題である。本研究では、PMDの臨床診断基準を確立し、原因遺伝子の同定による病因・病態の解明および遺伝子診断の開発基盤を整え、臨床的ケア・治療法の開発を目指す。全ゲノムSNP解析を行った症例の91%に11p15領域のpatUPDのモザイクを認め、SNPアレイで解析できた6例全例がandrogenetic/biparentalモザイクであった。このことから、PMDの大半の症例はandrogenetic/biparentalモザイクであることが示唆される。HumanMethylation450BeadChipによるエピゲノム解析では、PMDで異常メチル化を示す遺伝子を5同定した。胎盤におけるメチル化は、妊娠週数による違い、個体差による違い、同一胎盤内での部位による違いが存在することから、今後これらの遺伝子については詳細且つ慎重に解析していく必要がある。

研究分担者

1. 片淵 秀隆
熊本大学大学院生命科学研究部・産科
婦人科学・教授
2. 大場 隆
熊本大学大学院生命科学研究部・産科
婦人科学・准教授

A. 研究目的

間葉性異形成胎盤(Placental mesenchymal dysplasia: PMD)は、胞状奇胎と類似した嚢胞状変化を呈するが、組織学的にはトロホプラストの異常増殖を認めない胎盤形態異常である。その頻度は分娩例の0.02%と

まれな病態とされてきたが、2007年以降、国内外での報告が急増しており、臨床診断基準の必要性が高まっている。この胎盤は超音波断層法にて嚢胞状変化を呈するため、部分胞状奇胎や胎児共存奇胎との鑑別を要し、誤診されると無用の人工流産を招く。また高率に早産、胎児発育不全(FGR)、胎児死亡(IUFD)を合併し、現時点でIUFDを予知する方法はない。そのため、鑑別ならびに適切な臨床的ケアのための臨床診断基準が必要かつ重要であるが、未だ確立されていない。本研究では、病理組織学的に診断された症例を収集し、レトロスペクティブに臨床情報を解析することで、臨床診断

基準の確立、病態の解明を行うことを目的とした。また、これらの検体を用いて原因遺伝子の同定、遺伝子診断の基盤開発を行い、最終的には臨床的ケア・治療法の開発を目指す。本研究の成果は、無用の人工流産を避け、適切な妊娠管理により生児獲得を可能にすることから、少子高齢化社会において重要な意義を持つと考えられる。

B. 研究方法

1. 症例の集積

今年度は 8 例の新規症例を得、合計症例数（凍結保存組織およびホルマリン固定切片など遺伝子解析可能症例）は 34 例となった。解析可能な DNA を抽出できた症例について以下の解析を行った。

2. 臨床情報解析・病理学的解析

分担研究報告書（研究分担者：片淵秀隆、大場隆）を参照。

3. エピゲノム解析

凍結 PMD 検体 5 例と妊娠週数を可能な限りあわせた正常胎盤 7 例より DNA を抽出し、HumanMethylation450 BeadChip (Illumina 社)を用いて、全ゲノムの DNA メチル化解析（ゲノム中の 47 万カ所の CpG のメチル化を解析）を行った。

4. 全ゲノム多型解析

全染色体に分布する 4 塩基反復配列マーカー（Short tandem repeat: STR）あるいは Genome-Wide Human SNP array 6.0 (Affymetrix 社)を用いて全ゲノムの多型解析を行った。一部の症例では、インプリント遺伝子 *p57^{KIP2}* と *PHLDA2* の遺伝子発現を定量リアルタイム RT-PCR で解析した。遺伝子発現量は *GAPDH* を内部コントロールとし補正した。

（倫理面への配慮）

本研究は、佐賀大学医学部倫理委員会、佐賀大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会、熊本大学大学院生命科学研究部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会

の承認を受けて実施した。

C. 研究結果

1. エピゲノム解析

凍結 PMD 検体 5 例と妊娠週数を可能な限りあわせた正常胎盤 7 例より DNA を抽出し、HumanMethylation450 BeadChip を用いて、全ゲノムの DNA メチル化解析を行った。得られたメチル化データに基づいたクラスター解析結果を図 1 に示す。

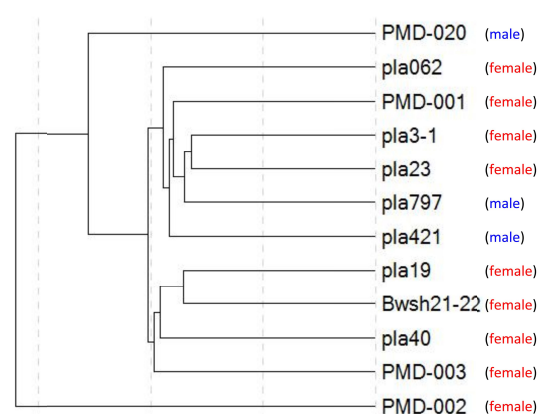


図 1 DNA メチル化に基づいたクラスター解析
凍結 PMD 検体 5 例と正常胎盤 7 例より DNA を抽出し、HumanMethylation450 BeadChip を用いて行った DNA メチル化データに基づくクラスター解析を示す。PMD と正常胎盤が入り交じっている。Pla：正常胎盤、Bwsh21-22:BWS 合併 PMD

クラスター解析では、図のように PMD と正常胎盤が入り交じっており、PMD 特異的なクラスター形成は認められない。このことは、PMD 特異的なメチル化異常の存在の可能性が低いことを示す。しかし、HumanMethylation450 BeadChip は男女間でデータが異なるプローブが存在することが報告されている（Chen YA, et al., Epigenetics, 8(2):203-209, 2013）。このため、男女別に以下の条件で解析した。まず、女兒 PMD 群と女兒正常群を比較し、PMD 群でメチル化が 20%以上変化している CpG サイトを選別した。男児群についても同様

に CpG サイトを選別し、女兒群で選択した CpG サイトと共通する CpG サイトを抽出した。次に、抽出した CpG サイトのうち、複数の CpG サイトが連続して異常値を示し、かつその部位がプロモーター近傍であるような遺伝子を絞り込んだ。この結果、PMD で高メチル化を示す遺伝子 2 個と低メチル化を示す遺伝子を 5 個同定した。

2. 全ゲノム SNP 解析

主に BWS の遺伝子座である 11p15 領域の STR を用いて解析した。解析できた 22 例中 20 例 (91%) に父性片親性ダイソミー (patUPD) のモザイクを認めた。このうち、17 例が isodisomy で 3 例が heterodisomy であった。また、20 例のうち 6 例について Genome-Wide Human SNP array 6.0 (Affymetrix 社) で解析したところ、全例全染色体 patUPD モザイク、つまり androgenetic/biparental モザイクであった。モザイク率は、10%程度～60%程度であった。一方、22 例中 2 例 (9%) は patUPD を認めず、このうち 1 例ではインプリント遺伝子の発現を制御する *KvDMR1* 領域の異常低メチル化を認めた。さらに、*KvDMR1* によって制御されるインプリント遺伝子である *p57^{KIP2}* (*CDKN1C*) と *PHLDA2* の遺伝子発現を定量リアルタイム RT-PCR で解析したところ、遺伝子発現量が低下していた (図 2)。

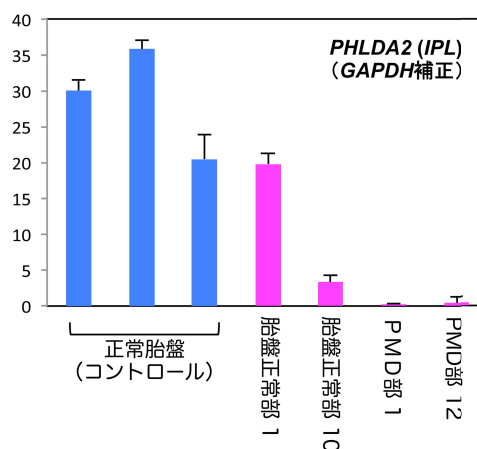
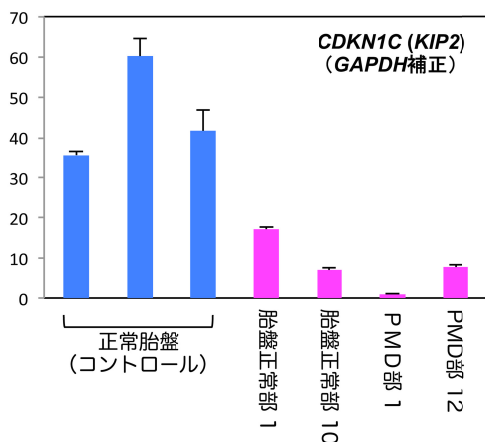


図 2 インプリント遺伝子発現解析

patUPD を認めず *KvDMR1* の異常低メチル化を示した PMD 胎盤での *p57^{KIP2}* (*CDKN1C*) と *PHLDA2* の遺伝子発現を定量リアルタイム RT-PCR で解析した。遺伝子発現量は内部コントロール *GAPDH* で補正した。正常コントロールに比べ肉眼的正常胎盤部でも肉眼的 PMD 部でも、両遺伝子ともに発現量の低下を認めた。

D. 考察

全ゲノム SNP 解析を行った症例の 91% に 11p15 領域の patUPD のモザイクを認め、SNP アレイで解析できた 6 例全例が androgenetic/biparental モザイクであった。このことから、PMD の大半の症例は androgenetic/biparental モザイクであることが示唆される。従って、臨床的に PMD を疑う場合は、絨毛生検を行い SNP アレイで解析することで診断できる可能性がある。androgenetic/biparental モザイクにおける androgenetic 細胞では、すべてのインプリント遺伝子が父型になっているため、ゲノム・インプリンティングの異常が関与している可能性がある。実際、1 例のみではあるが、正常 biparental 細胞で構成されている PMD 検体で *KvDMR1* 領域の異常低メチル化とそれに伴うインプリント遺伝子 *p57^{KIP2}* と *PHLDA2* の発現量低下を認めた。この結果は、*p57^{KIP2}* の免疫染色の結果ともよく合致していることから、11p15 のゲノム・

インプリンティング異常が PMD 発症に関与している可能性を示す。一方で、androgenetic/biparental モザイクの存在は、他のインプリント遺伝子の関与の可能性も示しているため、ゲノム中のインプリント DMR のメチル化を網羅的に解析する必要があると思われる。我々は、MALDI-TOF-MS および pyrosequence を用いたインプリント DMR の網羅的メチル化解析法を確立しているため、この方法を応用して解析を進めていきたい。

また、HumanMethylation450 BeadChip によるエピゲノム解析に基づくクラスター解析からは PMD 特異的なメチル化異常の存在の可能性が低いことが示唆された。しかしながら、男女別に解析し直したところ、PMD で高メチル化を示す遺伝子 2 個と低メチル化を示す遺伝子を 5 個同定した。胎盤におけるメチル化は、妊娠週数による違い、個体差による違い、同一胎盤内での部位による違いが存在することから、今後これらの遺伝子については詳細且つ慎重に解析していく必要がある。

E . 結論

PMD は新しい疾患概念で、頻度が極めて低いことから、病態の認知度が低かった。しかし、2007 年以降、論文数・症例報告数が急増していることから、国内外での認知が進んでいることがうかがえる。本研究において、本邦 PMD 症例に関する遺伝学的特徴および候補遺伝子を見出すことができた。今後、更なる症例を集積し、臨床情報解析および遺伝子解析を進めることで遺伝子診断も含めた診断基準確立や診療ガイドラインを策定することが肝要と思われる。

F . 研究発表

1 . 論文発表

- 1) Court F, Tayama C, Romanelli V, Martin-Trujillo A, Iglesias-Platas I,

Okamura K, Sugahara N, Simón C, Moore H, Harness JV, Keirstead H, Sanchez-Mut JV, Kaneki E, Lapunzina P, Soejima H, Wake N, Esteller M, Ogata T, Hata K, Nakabayashi K, Monk D. Genome-wide parent-of-origin DNA methylation analysis reveals the intricacies of the human imprintome and suggests a germline methylation independent establishment of imprinting. *Genome Res.* 24(4):554-69, 2014

- 2) Ohnishi K, Semi K, Yamamoto T, Shimizu M, Tanaka A, Mitsunaga K, Okita K, Osafune K, Arioka Y, Maeda T, Soejima H, Moriwaki H, Yamanaka S, Woltjen K, Yamada Y. Premature termination of reprogramming *in vivo* leads to cancer development through altered epigenetic regulation. *Cell*, 156(4), 663–677, 2014
- 3) Higashimoto K, Jozaki K, Kosho T, Matsubara K, Fuke T, Yamada D, Yatsuki H, Maeda T, Ohtsuka Y, Nishioka K, Joh K, Koseki H, Ogata T, Soejima H. A novel de novo point mutation of the OCT-binding site in the *IGF2/H19*-imprinting control region in a Beckwith-Wiedemann syndrome patient. *Clin Genet*, published online: 4 December 2013
- 4) Rumbajan JM, Maeda T, Souzaki R, Mitsui K, Higashimoto K, Nakabayashi K, Yatsuki H, Nishioka K, Harada R, Aoki S, Kohashi K, Oda Y, Hata K, Saji T, Taguchi T, Tajiri T, Soejima H, Joh K. Comprehensive analyses of imprinted differentially methylated regions reveal epigenetic and genetic characteristics in hepatoblastoma. *BMC Cancer*, 13:608, 2013

- 5) Miyazaki H, Higashimoto K, Yada Y, A. Endo T, Sharif J, Komori T, Matsuda M, Koseki Y, Nakayama M, Soejima H, Handa H, Koseki H, Hirose S, Nishioka K. Ash11 methylates Lys36 of histone H3 independently of transcriptional elongation to counteract Polycomb silencing. *PLoS Genet*, 9(11):e1003897, 2013
- 6) Soejima H, Higashimoto K. Epigenetic and genetic alterations of the imprinting disorder Beckwith-Wiedemann syndrome and related disorders. *J Hum Genet*, 58(7): 402-409, 2013
- 7) 大場隆、片渕秀隆、副島英伸 . 間葉性異形成胎盤Placental mesenchymal dysplasia (PMD)の診断と原因遺伝子 . *病理と臨床* 32(5):535-540, 2014
- 8) 東元健、副島英伸 . Beckwith-Wiedemann 症候群と小児腫瘍 . 遺伝子医学MOOK25 エピジェネティクスと病気 第2章エピジェネティクスと病気 4 . 不妊・先天異常 監修：佐々木裕之、編集：中尾光善、中島欽一、メディカルドゥ、大阪、pp195-201, 2013
- 9) 前田寿幸、東元健、副島英伸 . Beckwith-Wiedemann 症候群と Silver-Russell 症候群 . *小児科臨床* 66(増刊号):1308-1314, 2013
2. 学会発表
招待講演
- 1) 副島英伸 . ゲノム・インプリンティングとヒト疾患-間葉性異形成胎盤の分子遺伝学的解析 群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点セミナー 2013.9.20. 群馬大学
- 2) 副島英伸 . インプリンティング疾患 Beckwith-Wiedemann 症候群と類縁疾患におけるエピゲノム・ゲノム異常 . 第 5 回金沢大学学際科学実験センターシンポジウム「深遠なる疾患エピジェネティクス」2013.7.5. 金沢大学
- 一般発表
- 1) 宮崎仁美、東元健、矢田有加里、遠藤高帆、Sharif Jafar、小森敏治、松田正史、古関庸子、中山学、副島英伸、半田宏、古関明彦、広瀬進、西岡憲一 . Ash11 methylates Lys36 of histone H3 independently of transcriptional elongation to counteract Polycomb silencing. 第 36 回日本分子生物学会年会 2013.12.3-6. 神戸 (1P-0177)
- 2) 副島英伸 . Beckwith-Wiedemann 症候群と関連疾患におけるゲノム・エピゲノム異常 . 日本人類遺伝学会第 58 回大会「シンポジウム 8 先天異常とゲノム・エピゲノム」203.11.20-23. 仙台 (S8-3 プログラム・抄録集 p108)
- 3) 中林一彦、Trujillo Alex Martin、田山千春、兼城英輔、和氣徳夫、副島英伸、緒方勤、Monk David、秦健一郎 . ゲノムワイド 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 58 回大会 203.11.20-23. 仙台 (O27 プログラム・抄録集 p126)
- 4) 大塚泰史、佐々木健作、城崎幸介、東元健、岡本信彦、高間勇一、窪田昭男、松本富美、中山雅弘、吉浦孝一郎、副島英伸 . シスチン尿症を伴うゲノムワイド父性片親性ダイソミー症例の遺伝子解析 . 日本人類遺伝学会第 58 回大会 203.11.20-23. 仙台 (O32 プログラム・抄録集 p127)
- 5) 副島英伸、東元健、城崎幸介、八木ひとみ、大塚泰史、前田寿幸、青木早織、岡島翠、坂口勲、大場隆、片渕秀隆 . 間葉性異形成胎盤における 11p15 刷り込み領域の分子遺伝学的解析 . 日本人類遺伝学会第 58 回大会 203.11.20-23. 仙台 (O70 プログラム・抄録集 p137)

- 6) 佐々木かりん、右田王介、中林一彦、東元健、前田寿幸、橋本和法、松井英雄、副島英伸、高田史男、秦健一郎。胎児発育異常症例の網羅的ゲノム・エピゲノム解析。日本人類遺伝学会第58回大会 2013.11.20-23. 仙台 (O111 プログラム・抄録集 p147)
- 7) 中山真悠子、岡陽一郎、近藤剛、村守克己、岩田はるか、城賀本敏宏、石田也寸志、東元健、副島英伸。経過観察中に Wilms 腫瘍を発症した父性ダイソミー型 Beckwith-Wiedemann 症候群の1例。第88回日本小児外科学会愛媛地方会 2013.11.17.
- 8) 秋山辰穂、勝村啓史、埴原恒彦、太田博樹、中込滋樹、藤本一真、副島英伸、城圭一郎、木村亮介、石田肇、安河内朗、樋口重和。時計遺伝子 PERIOD2 の多型と光刺激応答の生理的多様性の関係及びその人類学的考察。第67回日本人類学会大会 2013.11.1-4. 筑波 (Y-1 抄録集 p43)
- 9) 小金淵佳江、中込滋樹、間野修平、石崎直也、河村正二、木村亮介、石田肇、城圭一郎、副島英伸、藤本一真、佐藤公俊、湯澤泉、安井美江、隈部俊宏、藤井清孝、秋山辰穂、埴原恒彦、太田博樹。モヤモヤ病原因遺伝子 *RNF213* の琉球諸島・北部九州ヒト集団における遺伝的多型。第67回日本人類学会大会 2013.11.1-4. 筑波 (A-28 抄録集 p57)
- 10) 副島英伸、東元健、城崎幸介、八木ひとみ、大塚泰史、前田寿幸、青木早織、岡島翠、坂口勲、大場隆、片淵秀隆。間葉性異形成胎盤における 11p15 インプリント領域の分子遺伝学的解析。第21回日本胎盤学会学術集会 2013.10.25-26. 名古屋市 (一般演題 2-1、プログラム・抄録集 p55)
- 11) 青木早織、大場隆、岡島翠、坂口勲、東元健、副島英伸、福永真治、片淵秀隆。本邦における間葉性異形成胎盤の臨床像。第21回日本胎盤学会学術集会 2013.10.25-26. 名古屋市 (一般演題 2-2、プログラム・抄録集 p55、相馬賞受賞)
- 12) 鮫島梓、米田徳子、森尻昌人、米澤理可、米田哲、塩崎有宏、夫律子、中山雅弘、副島英伸、齋藤滋。母体血中 sFlt-1 が異常高値を示した Placental Mesenchymal Dysplasia の一例。第21回日本胎盤学会学術集会 2013.10.25-26. 名古屋市 (一般演題 2-3、プログラム・抄録集 p56)
- 13) 副島英伸、東元健、八木ひとみ、青木早織、鮫島梓、齋藤滋、夫律子、中山雅弘、坂口勲、大場隆、片淵秀隆。11p15 インプリントドメインのメチル化異常を認めた間葉性異形成胎盤の1例。第20回遺伝性疾患に関する出生前診断研究会 2013.9.28. 鹿児島 (一般演題 3、抄録集 p10)
- 14) 大塚泰史、佐々木健作、城崎幸介、東元健、岡本信彦、高間勇一、窪田昭男、松本富美、中山雅弘、吉浦孝一郎、副島英伸。シスチン尿症を伴うゲノムワイド父性片親性ダイソミー症例の遺伝子解析。第48回日本小児腎臓病学会 2013.6.28-29. 徳島 (抄録集 p110, 口演 O-05, 優秀演題奨励賞受賞)
- 15) 東元健、城崎幸介、八木ひとみ、古庄知己、松原圭子、山田大輔、前田寿幸、大塚泰史、古関明彦、緒方勤、副島英伸。H19DMR メチル化異常で発症するインプリント疾患における H19DMR の変異解析。第7回日本エピジェネティクス研究会年会 2013.5.30-31. 奈良 (抄録集 p60, ポスターP-36)
- 16) 前田寿幸、東元健、中林一彦、城崎幸介、八木ひとみ、緒方勤、秦健一郎、

副島英伸 . Beckwith-Wiedemann 症候群におけるインプリント DMR のマルチローカスメチル化解析 . 第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会 2013.5.30-31. 奈良 (抄録集 p61, ポスター P-38)

- 17) 長嶋一昭、田中大祐、東元 健、八木ひとみ、杉崎 和、田原 裕美子、小倉かさね、佐藤広規、佐藤雄一、山野言、副島英伸、稲垣暢也 . 新生児期低

血糖合併 Beckwith-Wiedemann 症候群患者における病態形成機序の検討 . 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 2013.5.16-18. 熊本

G . 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 : なし
2. 実用新案登録 : なし
3. その他 : なし