

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業

# インプリント異常症のエピゲノム分子機構と 生殖補助医療との関連

(H25-難治等(難)-一般-032)

平成25年度 総括研究報告書

研究代表者 有馬 隆博 (東北大学大学院医学系研究科)

平成 26 (2014) 年 5月

# 目 次

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| I . 研究組織                           | 1 |
| . 総括研究報告                           |   |
| インプリント異常症のエピゲノム分子機構と<br>生殖補助医療との関連 | 3 |

## I . 研究組織

|       | 氏名     | 所属(職)                        |
|-------|--------|------------------------------|
| 主任研究者 | 有馬 隆博  | 東北大学大学院医学系研究科 情報遺伝学分野(教授)    |
| 分担研究者 | 仲井 邦彦  | 東北大学大学院医学系研究科 発達環境医学(教授)     |
|       | 岡江 寛明  | 東北大学大学院医学系研究科 情報遺伝学分野(助教)    |
|       | 龍田 希   | 東北大学大学院医学系研究科 発達環境医学(助教)     |
|       | 坂本 修   | 東北大学大学院医学系研究科 小児病態学分野(准教授)   |
| 研究協力者 | 八重樫 伸生 | 東北大学大学院医学系研究科                |
|       | 海老名 雅仁 | 東北大学大学院医学系研究科                |
|       | 中澤 徹   | 東北大学大学院医学系研究科                |
|       | 呉 繁夫   | 東北大学大学院医学系研究科                |
|       | 松原 洋一  | 国立成育医療研究センター                 |
|       | 梅澤 明弘  | 国立成育医療研究センター                 |
|       | 伊藤 建雄  | 一般社団法人日本難病・疾病団体協議会           |
|       | 鈴木 茂伸  | 国立がんセンター                     |
|       | 宇津宮 隆史 | 日本生殖再生医学会                    |
| 事務局   | 宮内 尚子  | 東北大学大学院医学系研究科 情報遺伝学分野(技術補佐員) |
|       | 佐藤 芙美  | 東北大学大学院医学系研究科 情報遺伝学分野(技術補佐員) |

## **. 統括研究報告書**

## インプリント異常症のエピゲノム分子機構と生殖補助医療との関連

課題番号：H25-難治等(難)-一般-032

主任研究者：有馬隆博（東北大学大学院医学系研究科情報遺伝学分野・教授）

### 研究要旨

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）は一般的な不妊治療となり、年々増加の一途を辿り、不妊症患者には多大な恩恵を与えている。しかし、一方で産科合併症の頻度の増加や出生児の奇形や障害など陰の部分も比例して、増加している。注目されるのは、特定のゲノムインプリント異常症の発生頻度の増加が世界中で報告されている事である。これには、ART がゲノムインプリンティングが確立する時期の配偶子进行操作が原因であると推察されている。先天性ゲノムインプリンティング（GI）異常症には、以下の疾患が含まる。Beckwith-Wiedemann 症候群（BWS）、Angelman 症候群（AS）、Prader-Willi 症候群（PWS）、Silver-Russell 症候群（SRS）、偽性副甲状腺機能低下症タイプ 1b（PHP1b）、クロム親和性パラングリオーマ（PGL）、網膜芽細胞腫（Rb）。

本研究では、多施設共同の全国調査として、これら 8 疾患の発症頻度と同時に ART との関連性について検索した。調査対象施設総数 3153 施設のうち、1376 施設から有効回答があり（有効回答率 43.6%）、報告患者総数は 2837 人であった（BWS：288 人、AS：576 人、PWS：1536 人、SRS：213 人、TNDM：42 人、PHP1b：15 人、Rb：167 人）。各疾患の年齢別推移では、BWS、SRS は最近増加傾向にある事が判明した。BWS、SRS の疾患は、それぞれ 8.6%、9.5% が不妊治療を受けていたことが判明した。また、その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 の出生児は年間約 1 万人で全出生児の 0.86% であることを考慮すると、BWS、SRS では約 10 倍にリスクが高まる事が判明した。さらに、患者の頬粘膜細胞 DNA を用い、原因遺伝子のメチル化の解析を行い、メチル化異常（エピ変異）の頻度、および全てのインプリント領域の DNA メチル化の解析を行い、ART 児と非 ART 児を比較し、その異常のパターン解析を行った。その結果、ART 児では、エピ変異の頻度が高い傾向がみられた。

次に、ART により発症したインプリント異常症の患者と自然発症例について、全ゲノム領域のメチル化インプリントの分子機構について解析し、異常のパターン解析を行った。その結果、ART 出生児では、（1）同一症例で、複数のインプリント領域の異常（2）同一症例で、精子型と卵子型 DMR の両方に異常（3）同一症例で、高メチル化と低メチル化を示す（4）メチル化異常の程度は、モザイク型の特徴を示した。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（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る。つまり、受精以降のプロセス（受精卵培養、凍結解凍操作など）で、異常が起こり、疾患発症を導いた可能性が推察される。弧発性小児がん Rb については、現在も詳細な調査を継続している。

今後も ART 出生児が増加すると予想される。ART と先天性ゲノムインプリンティング病との関連性については、早急に実態を把握し、適切な対応をとる必要性があり、次世代社会の最重要な課題である。

## 研究分担者

東北大学大学院医学系研究科 発達環境医学分野

教授 仲井 邦彦

東北大学大学院医学系研究科 情報遺伝学分野

教授 岡江 寛明

東北大学大学院医学系研究科 発達環境医学分野

教授 龍田 希

東北大学大学院医学系研究科 小児病態学分野

准教授 坂本 修

研究協力者：

東北大学大学院医学系研究科

八重樫 伸生

東北大学大学院医学系研究科

海老名 雅仁

東北大学大学院医学系研究科

中澤 徹

東北大学大学院医学系研究科

呉 繁夫

国立成育医療研究センター

松原 洋一

国立成育医療研究センター

梅澤 明弘

一般社団法人日本難病・疾病団体協議会

伊藤 建雄

国立がんセンター

鈴木 茂伸

日本生殖再生医学会

宇津宮 隆史

## A. 研究目的

生殖補助医療 (ART) の普及により、本来非常に稀であるゲノムインプリンティング (GI) 異常疾患の発生頻度の増加が世界中で報告されている。ART が、GI が確立する時期の配偶子、受精卵を人為的に操作する事が原因であると推察されているためである。先天性 GI 異常症は精神遅滞や発達障害を示し、根本的な治療法はないため対症療法により長期介護が必要となるケースが多い。疾患の発症機序、つまり影響を受ける遺伝子効果により、その病態や重症度は異なる。未だ原因不明例も多くみられる。

一方、近年 ART の普及により、これら疾患の発生頻度の増加が世界中で注目されている。我々は、これまでの調査により GI 異常症のうち、Silver-Russell 症候群 (SRS) と Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) の患者では、ART と関連性が深い事を明らかにした。これには、ART が、GI が確立する時期の配偶子などを操作する事が原因で、この時期の細胞は環境に対し非常に脆弱で、影響を受けやすいと推察されているが、実態は全く不明である。また、海外では、その他の GI 異常で発症する疾患で、ART との因果関係が報告されている。

網膜芽細胞腫 (RB) は、GI を受けるがん抑制遺伝子 RB1 の異常により発生する。非遺伝性 RB の場合、精子 RB1 アレルのメチル化異常が突然変異となり、体細胞で維持される。網膜形成過程で、対立 RB1 遺伝子に欠失 (LOH) が生じると発症する。同様に、新生児一過性糖尿病 (TNDM)、クロム親和性パラガングリオーマ (PGL)、Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS)、Angelman 症候群 (AS)、Prader-Willi 症候群 (PWS)、Silver-Russell 症候群 (SRS)、偽性副甲状腺機能低下症タイプ Ib (PHP1b) を含め、GI 異常症 8 疾患と ART との関連性、関連が示された場合はリスク要因について検討することを目標とする。

本研究では、1) インプリント異常 8 疾患 (RB、TNDM、PGL、BWS、AS、PWS、SRS、PHP1b) について、全国規模の実態調査 2) 患者検体の収集

と遺伝子診断を行い、発症機序と影響を受ける遺伝子を解析 3) 遺伝子型と臨床型に基づいた診断手順を作成 4) 新規メチル化解析システムの構築 5) ART 治療法とメチル化異常との関連について分子生物学的アプローチにより、リスク要因について評価する事を目的とした。

本研究の成果により、稀な GI 病の遺伝子解析と診断手順の作成を行い、発症機序分類に基づいた病態、予後について明らかにする。GI 病と ART の因果関係を認めた場合は、次世代社会の問題として早急な対応が必要とされ、リスク要因を特定し、ART 治療の見直しを行う。

## B. 研究方法

【1】先天性ゲノムインプリンティング病 8 疾患に関する全国多施設質問票調査

受療患者数推計のための第 1 次調査と、臨床疫学像実態把握のための第 2 次調査に分けて実施した。

### (1) 対象施設・診療科

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。また、国立がん研究センター、小児がん拠点病院、がん診療連携拠点病等と連携した体制を構築した。

### (2) 調査法

調査法は全て郵送法で行った。依頼状・診断基準・調査票を対象科に送付し、受療患者数（新患および再来）の報告を依頼した。期限までに返送のなかった診療科には再度依頼を行った。第 1 次調査で「患者あり」と報告された診療科には依頼状・診断基準とともに第 2 次調査票（患者個人用）を随時送付した。

【2】DNA の回収とメチル化インプリントの解析と結果送付（報告）

### (1) 検体送付の依頼

第 2 次調査で、遺伝子解析の「希望あり」と報告させた機関に、第 3 次調査として、末梢血、頬粘膜から細胞を塗抹、腫瘍の DNA を送付するように依頼した。キットを説明書と伴に送付した。

### (2) 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病患者の頬粘膜細胞から DNA を抽出し、インプリント遺伝子 8 領域のメチル化解析を行った。これには、DNA 多型を利用した Bisulphite PCR シークエンス法を用い、正確に評価し、結果は医療機関の主治医に郵送で報告した。

## （倫理面への配慮）

本調査は、東北大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を得て行った。第 1 次調査の記入は受療患者数のみであり、第 2 次調査の集計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。ゲノム解析では、担当医師から説明、同意を得て行い、匿名化し、東北大学で解析した。結果は、担当医から、患者および家族に口頭で説明することとした。

## C. 研究結果

【1】先天性ゲノムインプリンティング病 8 疾患に関する全国調査

調査対象施設総数 3153 施設のうち、1602 施設（有効回収率 56.2%）から有効回答があり、報告患者総数は 2837 人であった。その内訳は、BWS が 288 人、AS が 576 人、PWS が 1536 人、SRS が 213 人、TNDM が 42 人、PHP1b が 15 人、PGL が 0 人、Rb が 167 人である。2837 例のうち 21.2% にあたる 601 例の第 2 次調査票が回収された。このうち不適格率は見られなかった。

図 1 には、各疾患の症例数と年齢別推移を示した。調査内容を総括すると、特に BWS、SRS は最近増加傾向にあることが疑われた。また、性比には、全ての疾患で有意な差は見られなかった。また、家族歴と近親婚の有無では、PWS において 1.5%、BWS において 1.4%、AS において 0.8%、SRS において

1.4%、TNDM において 25%の症例に家族歴が認められた。しかし、ほとんどが孤発例であった。AS においてのみ 1.6%の症例に近親婚が認められた。RB に関しては、家族例が多く見られるが、正確な数字は現在統計解析中である。

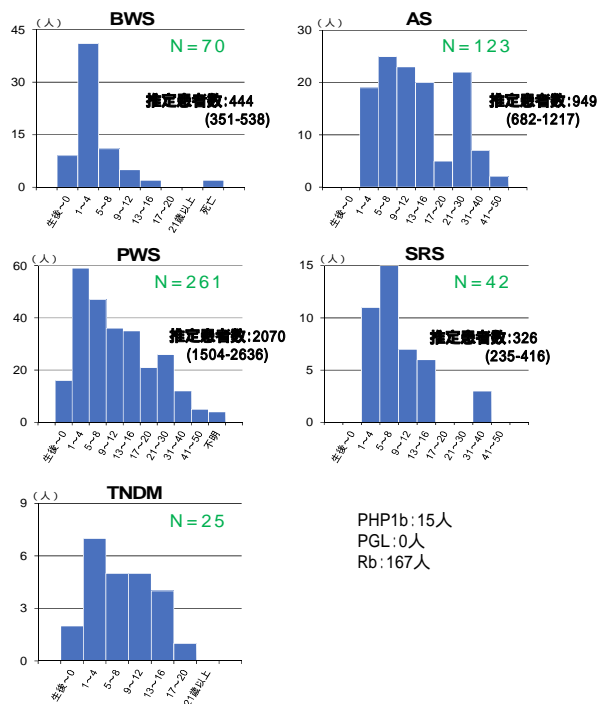


図 1 疾患別年齢推移

各疾患ともに増加傾向を示す。特に BWS、PWS、SRS は急増している。性差なし。地域性なし。ほとんど孤発例。近親婚は 1 例のみ (AS)。

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。全体では、何らかの不妊治療を受けた事が判明している親は 10%程度で、一般に不妊治療を受けている割合と比較し、多いとはいえない。しかし、個々の疾患別で比較した場合、BWS、SRS の疾患は、それぞれ 8.6%、9.5%が不妊治療を受けていた。平成 17 年度の IVF+ICSI の出生児は年間 10,338 人で全出生児の 0.86%であることから、SRS と BWS では約 10 倍リスクが高い事が判明した。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。RB に関しては、国立がんセンターと共同で、患者アンケートを作成し、調査中である。

| BWS   | 年齢 | 性別 | 治療法               |
|-------|----|----|-------------------|
| Case1 | 4  | 女性 | IVF-ET、夫リンパ球免疫治療法 |
| Case2 | 4  | 男性 | IVF-ET            |
| Case3 | 4  | 男性 | IVF-ET            |
| Case4 | 3  | 女性 | IVF-ET            |
| Case5 | 2  | 男性 | IVF-ET            |
| Case6 | 2  | 女性 | ICSI              |

| AS    | 年齢 | 性別 | 治療法    |
|-------|----|----|--------|
| Case1 | 11 | 女性 | 排卵誘発のみ |
| Case2 | 2  | 女性 | AIH    |

| PWS   | 年齢 | 性別 | 治療法       |
|-------|----|----|-----------|
| Case1 | 15 | 女性 | AIH *凍結精子 |
| Case2 | 6  | 女性 | ICSI      |
| Case3 | 3  | 女性 | ICSI      |
| Case4 | 1  | 男性 | ICSI      |

| SRS   | 年齢 | 性別 | 治療法         |
|-------|----|----|-------------|
| Case1 | 4  | 女性 | IVF-ET      |
| Case2 | 2  | 男性 | IVF-ET      |
| Case3 | 8  | 男性 | ICSI        |
| Case4 | 5  | 男性 | IVF-ET *凍結卵 |

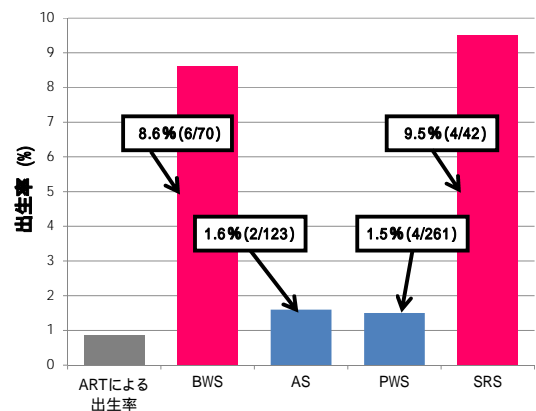


表 1 ART により出生した GI 異常症

BWS、SRS の ART による発症頻度は、自然妊娠より高い(10-12 倍)。AS、PWS は約 2 倍程度の増加がみられる。

## [2] 疾患患者 DNA を用いたインプリント遺伝子の DNA メチル化の解析

### (1) サンプル収集

メチル化インプリントの異常(エピ変異)症例に着目した。これまでの報告では、ART と関連するインプリント異常症の発症原因が圧倒的にエピ変異の頻度が高いからである。また、これまでに収集したサンプル、副島教授(佐賀医大)、緒方教授(浜松医大)も合わせ、ART を受けた疾患患者(SRS: 5



名、BWS: 1 名) 自然発症の患者(SRS: 10 名、BWS: 6 名) について解析した。

## (2) 疾患患者のインプリント遺伝子の DNA メチル化の解析と ART との関連

22 領域のメチル化インプリントの解析を、DNA 多型を含む Bisulphite PCR Sequence 法を用いて、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、1) 複数のインプリント領域で異常を認めた。2) 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。3) また、同一症例で、高メチル化と低メチル化を示し、4) 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(表 2)。現在、症例登録継続中であり、全測定結果がそろってから発症リスクについて再評価する。

| SRS     |        |                         |                          |                   |                            |
|---------|--------|-------------------------|--------------------------|-------------------|----------------------------|
| Case    | ART    | Abnormality             |                          |                   |                            |
| S-Case1 | IVF-ET | H19 partial-LOM (15.6%) |                          |                   |                            |
| S-Case2 | IVF-ET | PEG1 (99.6%)            | PEG10 GOM (67.8%)        | GRB10 GOM (97.1%) | ZNF597 LOM (0.0%)          |
| S-Case3 | IVF-ET | H19 partial-LOM (33.7%) | PEG1 partial-GOM (82.7%) |                   |                            |
| S-Case4 | IVF-ET | H19 LOM (0.3%)          | GRB10 GOM (95.9%)        |                   |                            |
| S-Case5 | IVF-ET | H19 normal (55.6%)      | INPP5F GOM (97.3%)       |                   |                            |
| BWS     |        |                         |                          |                   |                            |
| B-Case1 | ICSI   | LIT1 LOM (0.0%)         | ZDBF2 GOM (93.3%)        | PEG1 GOM (97.8%)  | NESPAS partial-LOM (11.3%) |

ART 群 (n=6) 非ART 群 (n=16)

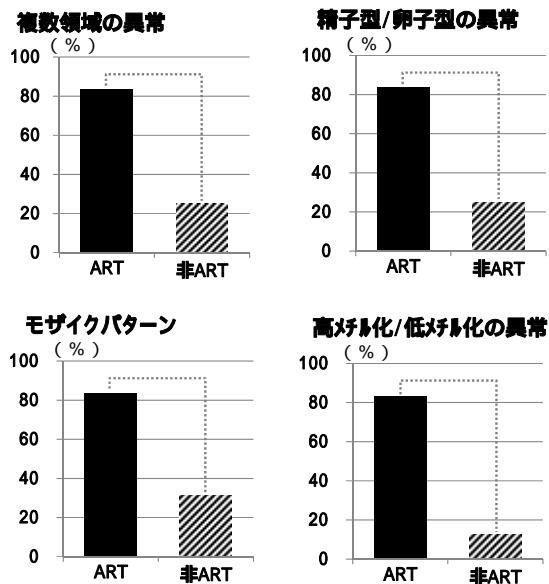


表 2 ART 出生インプリント異常症のメチル化インプリント異常

複雑なメチル化異常のパターンは、メチル化の獲得よりも維持に異常が生じると考えられる。

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。これらの結果をまとめると、ART 出生児の場合、複数のインプリント領域において複雑なメチル化異常のパターンが認められ、生殖細胞形成過程におけるメチル化の獲得の異常というより、むしろ受精以降のメチル化の安定性維持機構の障害が原因と考えられる。

## (3) 臨床症状の比較

メチル化解析を行った症例について、ART 群と非 ART 群で臨床症状について比較した。その結果は、特徴的に差はみられなかったが、解析を行っていない症例を併せて分析した場合、ART 症例では疾患毎にいくつかの臨床症状に特徴が認められた(表 3)。

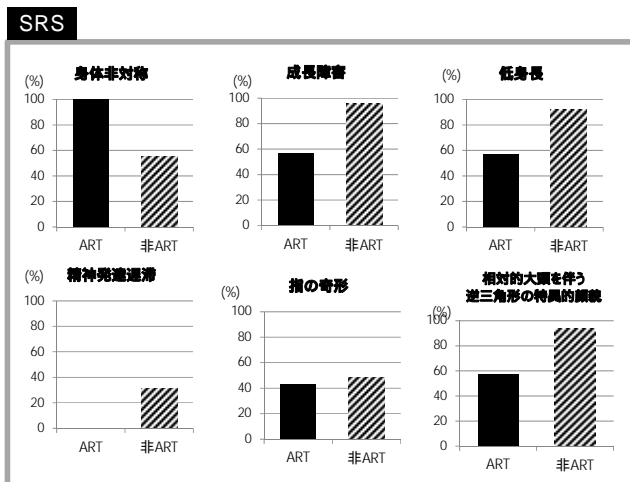
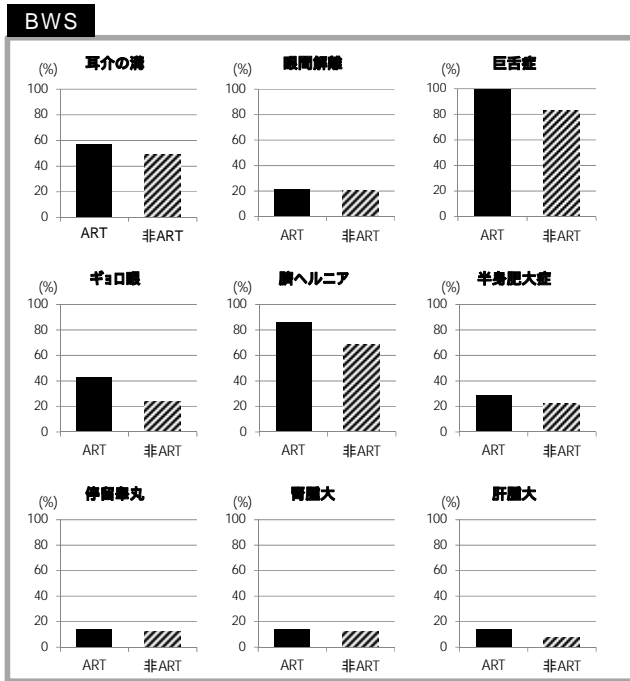


表 3 ART 出生インプリント異常症の臨床症状の特異性

大きな違いは認められないが、軽微な違いがみられる。メチル化の軽微な変化は表現型の変化としても表れにくいかもしれない。

### 【3】新規メチル化診断法の開発

臨床現場で測定可能な、ハイスループット系の新規 Bisulphite PCR メチル化定量測定システム (PCR-Luminex 法) の開発を行った。PCR-Luminex 法はフローサイトメトリーを利用したマイクロビーズアレイ技術である蛍光ルミネックス法を用いた技術である。これまでに、一塩基置換を検出可能なことから SNP 検査等に应用されてきた。本法ではバイサルファイト (BS:亜硫酸水素塩) 処理で

塩基置換した非メチル化をメチル化アレルと区別し、定量化を行う。BS は DNA の非メチル化 CpG 部位は TpG に置換し、非メチル化 CpG 部位は CpG のまま置換しない。労力とコストの削減が可能となり、96 検体の測定が約 1 時間と短時間で処理可能である。効率良く増幅可能な条件検討は行い、特許申請している (図 2)。

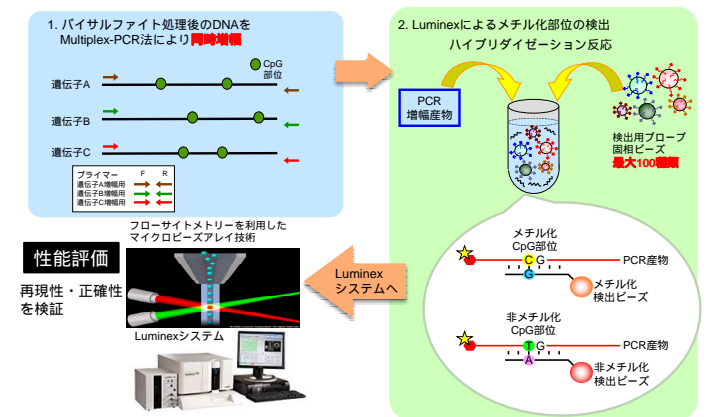


図 2 PCR-Luminex 法による新規メチル化解析法の開発

特許出願 (東北大学) し、地元企業 (G&G サイエンス) と共同開発を行っている。

### D. 考察

先天性インプリント異常症の頻度と ART との関係性：

全国 3153 施設の実態調査を行い、1602 施設 (有効回収率 56.2%) から有効回答があり回答を得た。次に対象 8 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 593 名)。不妊治療を受けた患者は BWS、SRS で多くみられ、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% となり、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、母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

査研究も重要と考えられる。全国医療機関では、独自の倫理委員会と倫理審査が行なわれている。また、倫理委員会開催時期も、年に数回の機関も存在する。東北大学では、倫理委員会を委託するシステムが存在する。広く周知することで、検体の収集は、増加する事が予想される。また、コントロールとして、ART 治療を受けた児の DNA が必要である。全国不妊医療機関(クリニック)に依頼し、研究協力体制を確立していく。

#### GI 疾患と DNA メチル化異常の頻度

ART との関連性を評価する上で、正確な診断が必要である。つまり患者試料を用い、遺伝子診断を行い、発症機序と影響を受ける遺伝子の解析を行い、病型との関連性を見出す事である。そのためできるだけ多くの症例に関し、遺伝子解析を行なう必要がある。現時点で、81 名の患者の遺伝子解析を行っており、その結果評価し、最終結果として報告する予定である。正確な診断を、請け負う体制と新規解析法は確立された。各疾患の主な臨床症状の特徴と ART 児における特異な症状は見られなかった。症例数が少ない事も原因と考えられた。今後、DNA メチル化異常の頻度と症状との関連、ART との関連性について評価する。

#### ART のリスク要因に関する考察

インプリント異常症は、IVF や ICSI 症例に多い傾向にあるが、リスク要因となりうる ART 操作は排卵誘発法や量、胚培養液の種類など様々であり、特定するに至っていない。ART 操作と DNA メチル化異常に関する動物実験や細胞培養での報告は多数あるものの、ヒト研究においてこれらの検証を行うには限界もある。我々の ART 出生児の疾患患者解析より、非 ART 児に比し、複雑なメチル化異常を呈すること、臨床症状に特異性が見られることから、ART によるリスクは、配偶子形成よりむしろ受精以降の過程で発症するものと考えられた。この結果は、受精卵培養や培養液(法)が影響を与えているように思える。動物胚(ウシ、ヒツジ等)の体外培養によって、胚移植後に子宮内での過剰胎児発育が起り、出生した産仔の死亡率や疾患罹患率が高く

なる事が報告されている(Large offspring syndrome : LOS)。これは GI 遺伝子 IGF2R のメチル化の低下と発現の低下によって、IGF2 が過剰に産生されることが原因と推測されている。また、このメチル化の異常は、排卵誘発あるいは体外培養によって生じる事が判明している。マウスにおいても、培養液の組成や体外操作によるメチル化異常についての報告がある。ヒトでは、BWS は胎児、胎盤の肥大が特徴で LOS と関連する。逆の現象として、SRS では GI 異常が子宮内発育不全(IUGR)の原因となる。インプリント異常疾患である新生児一過性糖尿病(TNDM)でも IUGR がみられ、ART と関連するかもしれない。しかし、不妊症自身の遺伝的背景も考慮しなければならない。つまり、相乗効果が働くのかもしれない(図3)。現在、インプリント遺伝子以外の影響についても比較している。

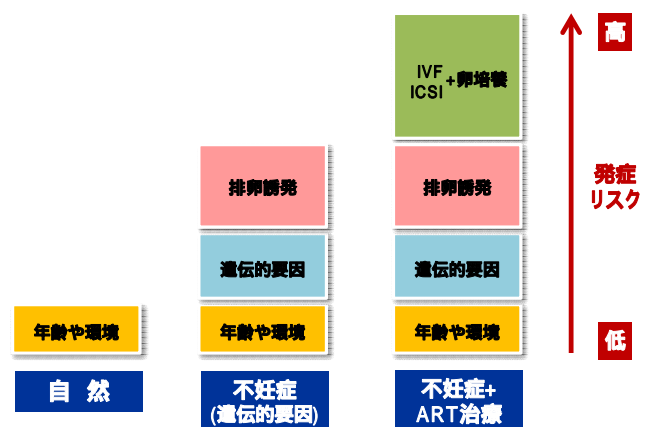


図3 インプリント異常症における閾値に関するモデル  
不妊症自身の遺伝的背景に ART 操作が加わり、インプリント異常症を発症しやすくしているのではないか。

#### 調査体制の連携と継続：

先天性インプリント異常症と関連する疾患を含む合同班会議を実施し、互いに発表、質疑を行なった。合同班会議に参加したメンバーは、副島教授(佐賀大)、緒方教授(浜松医大)、斉藤教授(名古屋市立大)、鏡研究員(成育医療センター)で今後も継続して、班会議を行ない、情報交換の場にしたい。また、関連学会では、シンポジウムとして、何度も開

催された。また、代表者は、患者支援団体等が主体となる難病研究支援実施体制の確立のための組織 JPA 研究班に参画し、Web サイトへの活動状況や研究報告なども行っている。

今後の計画と展望：

(1) 遺伝子解析と病型との関連性

患者検体の遺伝子診断を行い、発症機序と影響を受ける遺伝子の解析を行い、遺伝子型と臨床型の関連を明らかにする必要がある。その結果を基に新規メチル化解析システムの構築と診断手順を作成する必要がある。

(2) ART 治療との関連性

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必要がある。その結果を基に臨床の現場に役立つ遺伝子診断と発症機序の頻度に基づいたフローチャートを作成する。また遺伝子型と臨床型の病態や重症度との関連性について明らかにし、患者により良い医療とケアのため、治療実態や合併症に関する情報を提供する。ART とインプリント病の関連性、それに基づくリスク要因の特定は、今後の ART 技術の向上に繋がり、比較的高額な不妊治療に加え、児の健康問題に不安を抱える患者に高度な医療を提供し、身体的・精神的負担の軽減となる等社会的にも意義は大きい。また研究終了後は、疾患の予防、早期診断に応用できる新規メチル化解析システム（特許出願）を活用し、遺伝子診断の受託解析を行う。貴重な試料情報は、今後正常なインプリントの分子機構やその破綻の解明、また新規薬剤の開発に活用する。特にメチル化は可塑性を有し、メチル化基質の投与等で治療できる可能性が十分ある。

(3) 今後の展開

本調査では、追跡調査も行いうる基盤整備と同時に、両親のカウンセリング体制基盤の強化にも繋がっており、長期的に見極める事が出来る体制を構築する。東北大学ではカウンセリング活動に取り組んでおり、今回の調査への参加に際し、患者家族に、正しい情報を提供し、社会から孤立することなく健全な

子育ての環境を提供することを可能にする。医師や看護師を加えた活動の活性化と心理カウンセラーの人材養成に積極的に協力し、子育て支援の行政の取り組みにも貢献する。

## E. 結論（見込まれる成果）

全国 3158 施設の実態調査を行い、対象 8 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 項目についての特徴や実態が明らかとなった。現在報告患者総数は 2837 人で、その内訳は、BWS が 288 人、AS が 576 人、PWS が 1536 人、SRS が 213 人、TNDM が 42 人、PHP1b が 15 人、PGL が 0 人、Rb が 167 人である。ART との関連が深い疾患は BWS と SRS で、いずれもエピソード変異の異常を示す症例が多いことが判明した。また、エピゲノム異常のパターン分類から、この異常は受精以降、つまり受精卵培養や培養液（法）などが主な原因となっていることが予想された。今後、さらに症例を増やし、ART による疾患発症リスクについて評価し、結論付けたい。特に、小児がん RB の分子機構の解明を重点的に解析する。ART が本格的に始まって約 10 年が経過するが、これらの出生児はまだ成人に達していない。今後、成人病とくに、若年性のがんの発症頻度の増加が懸念されるためである。国立がんセンターと共同で、研究を進展させて行く計画である。これらの結果を加えて結論づけたい。

ART の新技術は着実に進歩し、不妊症に重要な治療法として多大な恩恵をもたらし、国内では、年間数万人が出生している。しかし ART は配偶子を操作するため、ゲノムインプリンティングを引き起こす可能性が十分示唆される。インプリンティング異常、特にエピゲノム変異は、先天性疾患だけでなく、身体的、神的発育・発達、性格、行動異常等に関連し、さらに、次世代の癌や成人性疾患の原因となりうる。我が国では、晩婚化、少子化により今後も ART 出生児が増加すると予想され、インプリンティング異常については、次世代社会の重要な課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。ART を受ける患者が一般の人口統計と異なる特殊な集団であるため、単純に ART 治療がそのような危険を引き起こすのか、正確に評価することは難しい。しかし、分子生物学的解析による正確なリスク評価が十分ではなく、現時点で明確な結論は得ていない。今後長期追跡調査も含め、詳細な表現型やエピゲノム型の比較検討が必要と考える。

一方で、ART を適正に実施するための制度がじゅうぶんであるとは言えず、ART をめぐり発生する倫理上、健康上の様々な問題に対して適切な対応ができていないのが現状である。さらに、ART の多くは、医療保険が適用されていない自由診療であり、受診者は多額の費用を負担しなければならない。また、経済上の問題をクリアして ART に臨んだとしても、薬物療法による副作用や、出生した児の健康に問題があるなどのリスクは避けることはできない。このような現状を打開し、不妊に悩む人々に対し、身体的、経済的負担の少ない、良質かつ適切な ART を実施するためには、医療保険の適用や公的な補助の対象として検討することはもちろん、現在の ART における技術的な問題をできるだけ排除し、短期間で成功率の高い、より安全な治療システムの構築が必要である。これには、科学的根拠に基づいた研究と成果が求められていると思われる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Hiura H, Okae H, Chiba H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Arima T. ART and imprinting errors. **Reproductive Medicine and Biology**. in press.
2. Okae H, Matoba S, Nagashima T, Mizutani E, Inoue K, Ogonuki N, Chiba H, Funayama R, Tanaka S, Yaegashi N, Nakayama K, Sasaki H, Ogura A, Arima T. RNA sequencing-based identification of aberrant imprinting in cloned

mice. **Hum Mol Genet**. in press.

3. 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**. 14: 32. 2013.
4. Chiba H, Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Arima T. DNA methylation errors in imprinting disorders and assisted reproductive technologies. **Pediatrics international**. 55: 542-549. 2013.
5. 千葉初音、有馬隆博、生殖医療と児の奇形、エピジェネティクス異常、医学のあゆみ 医歯薬出版株式会社 印刷中。
6. 樋浦仁、有馬隆博、生殖補助医療とエピジェネティクス、エピジェネティクス-基礎研究から産業応用への展望-、株式会社シーエムシー出版 印刷中。
7. 千葉初音、岡江寛明、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MOOK25号 178-183, 株式会社メディカルドゥ 2013.
8. 井原基公、有馬隆博、生殖細胞と酸化ストレス、医学のあゆみ 医歯薬出版株式会社 247(9), 851-855, 2013.
9. 濱田裕貴、岡江寛明、有馬隆博、ART とエピジェネティックな異常、臨床婦人科産科 医学書院 68(1), 98-105, 2014.

### 2. 学会発表

1. International Human Epigenome Consortium (IHEC) Annual Meeting 「Single-base resolution DNA methylomes of human germ cells and blastocysts」Arima T. Berlin, Germany. (11/12/2013)
2. 日本人類遺伝学会 第 58 回大会「ART と先天異常」有馬隆博、江陽グランドホテル、仙台 (11/22/2013) 招待講演
3. 第 58 回日本生殖医学会 学術講演会・総会「ART とゲノムインプリンティング」有馬隆博、神戸ポートピアホテル、神戸 (11/16/2013) 教育講演

4. 第31回日本受精着床学会総会・学術講演会「基礎から臨床へ、ARTとエピゲノム」有馬隆博、別府(8/9/2013) シンポジウム
5. 第54回日本卵子学会「生殖領域におけるエピジェネティクス研究の最前線」有馬隆博、学術総合センター2階 一橋記念講堂、東京(5/25/2013) 招待講演
6. 第116回日本小児科学会学術集会「生殖補助医療と小児科医療の接点」有馬隆博、広島市文化交流会館、広島(4/20/2013) 招待講演

## **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**

特になし

