

の通りであった。

- ・一般産科児：12.5kg/m²
- ・非 ART 不妊治療児：12.4 kg/m²
- ・新鮮胚による ART 児：12.4 kg/m²
- ・凍結胚による ART 児：12.5 kg/m²

BMI については有意な差を認めなかった。

②1 歳 6 ヶ月児健診時の BMI、身長、体重

1 歳 6 ヶ月児健診時のデータが得られ、交絡因子に欠損値のない 3361 例について、重回帰モデルによる多変量解析を行った。

その結果、最小 2 乗法を用いた調整後の 1 歳 6 ヶ月児健診時の BMI の平均値は以下の通りであった。

- ・一般産科児：16.1 kg/m²
 - ・非 ART 不妊治療児：16.0 kg/m²
 - ・新鮮胚による ART 児：16.2 kg/m²
 - ・凍結胚による ART 児：16.2 kg/m²
- 一般産科例の児に比べて、有意差を認めた群はなかった。

同様に体重について、3395 例の検討を行ったところ、調整後の平均値は以下の通りであった。

- ・一般産科児：10.3 kg
- ・非 ART 不妊治療児：10.2kg
- ・新鮮胚による ART 児：10.4 kg
- ・凍結胚による ART 児：10.4 kg

さらに身長について、3365 例の検討を行ったところ、調整後の平均値は以下の通りであった。

- ・一般産科児：80.2cm
- ・非 ART 不妊治療児：80.0cm
- ・新鮮胚による ART 児：80.2cm
- ・凍結胚による ART 児：80.2cm

体重、身長それぞれについても、一般産科例の児に比べて有意差を認めた群はなかった。

③3 歳児健診時の BMI、身長、体重

3 歳児健診時のデータが得られ、交絡因子に欠損値のない 2531 例について、重回帰モデルによる多変量解析を行った。その結果、最小 2 乗法を用いた調整後の 3 歳児健診時の BMI の平均値は以下の通りであった。

- ・一般産科児：15.8 kg/m²
- ・非 ART 不妊治療児：15.6kg/m² (p=0.02)
- ・新鮮胚による ART 児：15.7 kg/m²
- ・凍結胚による ART 児：15.8 kg/m²

一般産科例の児に比べて、非 ART 児で有意に BMI が小さくなっていたが、ART 群では有意差を認めなかった。

同様に体重について、2560 例の検討を行ったところ、調整後の平均値は以下の通りであった。

- ・一般産科児：13.7kg
- ・非 ART 不妊治療児：14.0kg (p=0.04)
- ・新鮮胚による ART 児：14.2kg (p<0.001)
- ・凍結胚による ART 児：14.1kg (p<0.001)

さらに身長について、2535 例の検討を行ったところ、調整後の平均値は以下の通りであった。

- ・一般産科児：93.2cm
- ・非 ART 不妊治療児：94.6cm (p<0.001)
- ・新鮮胚による ART 児：94.6cm (p<0.001)
- ・凍結胚による ART 児：94.3cm (p<0.001)

体重、身長それぞれについて、一般産科例の児に比べて不妊治療を行った群で有意に大きい傾向を認めた。

2. 1 歳 6 ヶ月児健診時、さらに 3 歳児

健診時における発達 (KIDS スケール得点) について、ART が与える影響についての解析

①1歳6ヶ月児健診時のKIDSスケール得点

1歳6ヶ月児健診時のKIDSスケール得点データが得られ、交絡因子に欠損値のない3831例について、重回帰モデルによる多変量解析を行った。

その結果、最小2乗法を用いた調整後の1歳6ヶ月健診時のKIDSスケール総得点(142点満点)の平均値は以下の通りであった。

- ・一般産科児：83.1
- ・非ART不妊治療児：88.3 (p<0.001)
- ・新鮮胚によるART児：89.1 (p<0.001)
- ・凍結胚によるART児：89.2 (p<0.001)

一般産科例の児に比べて、その他の群で有意に得点が高い傾向を示した。

なお、サブスケールごとの解析においては、6. 対子ども社会性(13点満点)において、一般産科児とその他の群で有意な差を認めなかったが、他のサブスケールにおいては総得点と同様の傾向を示した。

この時点でのKIDSスケール得点に関しては、医療施設ごとの平均値が80点~110点と大きなばらつきも観察された

②3歳児健診時のKIDSスケール得点

3歳児健診時のKIDSスケール得点データが得られ、交絡因子に欠損値のない2767例について、重回帰モデルによる多変量解析を行った。

その結果、最小2乗法を用いた調整後の3歳児健診時のKIDSスケール総得点(133

点満点)の平均値は以下の通りであった。

- ・一般産科児：88.3
- ・非ART不妊治療児：85.7
- ・新鮮胚によるART児：85.0 (p=0.005)
- ・凍結胚によるART児：86.1

一般産科例の児に比べて、新鮮胚によるART児の群で有意に得点が高い傾向を示した。

なお、サブスケールごとの解析においては、3. 理解言語での非ART不妊治療群と、新鮮胚によるART児の群、4. 表出言語での新鮮胚によるART児の群、6. 対子ども社会性での不妊治療を行った全ての群、7. 対成人社会性での新鮮胚によるART児の群、8. しつけにおける、非ART不妊治療群で、一般産科児に比べ有意に低い得点となっていた。

D. 考察

3歳児健診時点では、自然妊娠群に比べ、不妊治療で生まれた児でBMIには有意な差を認めなかったものの、身長、体重は有意に大きい傾向を示した。なお、出生体重については、特に凍結胚を用いたARTで出生した児の出生体重が大きく、一方、1歳6ヶ月児健診時点では、どの指標も大きな差を示さなかったことから、不妊治療が出生体重および、1歳6ヶ月から3歳までの発育に影響する可能性を示唆した。3歳児健診時の調査では、母親の妊娠中の喫煙などの生活習慣など、発育に影響すると思われる要因についても調査を実施しており、今後、これらを考慮した解析を実施す

る必要があると思われる。

発達については、1歳6ヶ月時点で不妊治療による大きな差を認めていなかったが、今回は不妊治療群でやや点数が低い傾向を認めた。しかしながら、1歳6ヶ月時点における各施設間の点数にばらつきが大きかったこと、また、発達に関しては、家庭環境などの影響が大きいことから、今後、社会経済的状況などを考慮した解析が必要であると考えられた。

また、本研究では、発育、発達ともに、3歳児健診時調査まで追跡可能だった児について検討しており、調査開始当初のコホートから偏りのある集団であることも予想される。今回追跡可能だった児のみを対象とし、出生時、また1歳6ヶ月児健診時のデータを用いた感度分析を実施することにより、上記の偏りについても検討が必要であると考えられる。

E. 結論

ARTにより出生した児の3歳児健診時における調査を実施したところ、一般産科で出生した児に比べ、ART児を含む不妊治療で出生した児ではBMIに有意差を認めないものの、身長、体重が有意に大きい傾向を認めた。一方、発達についてのKIDSスケール得点については、一般産科で出生した児に比べ、やや低い点数となっていた。今後、発育、発達に大きな影響を及ぼすと考えられる、社会経済的状況などを考慮した解析が必要である。

F. 健康危険情報： なし

G. 研究発表： なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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
（成育疾患克服等総合研究事業）） 分担研究報告書
「生殖補助医療により出生した児の長期予後と技術の標準化に関する研究」

乳児期におけるART児の粗大運動能力および全般的発達の検討

研究分担者 橋本 圭司 国立成育医療研究センター
発達評価センター長、リハビリテーション科医長

研究要旨：【目的】乳児期における生殖補助医療（以下 ART）による妊娠で生まれた児の粗大運動能力及び全般的発達の経過を明らかにすることである。【方法】国立成育医療研究センターで妊娠・分娩管理を行った症例で同意を得た症例 1115 名のうち、ART 群 238 名とコントロール群 365 名を対象とした。粗大運動の評価は、小児基本動作評価スケール (ABMS-C) を、全般的発達評価は乳幼児発達スケール (KIDS ; KINDER INFANT DEVELOPMENT SCALE) をそれぞれ用い、母親への質問紙調査によって行った。【結果】ABMS-C の評価結果によると、月齢 1 カ月、3 カ月、6 ヶ月、9 カ月、12 カ月時の粗大運動能力は、両群間に有意差を認めなかった。一方で、ART 群の KIDS による月齢 3 カ月時の表出言語発達指数、9 カ月時の操作発達指数、12 カ月時の総合発達指数、操作、理解言語、対子ども社会性発達指数が、コントロール群と比較して有意に高かった。【結論】ART 群の乳児では、コントロール群と比較して月齢 1~12 カ月時の粗大運動能力に有意差を認めなかったが、月齢 12 カ月時の操作や言語理解、対子ども社会性を含めた総合発達指数が ART 群で有意に高く、将来の知的機能も高い可能性が示唆された。

A. 研究目的

研究の目的は、生殖補助医療（以下 ART）による妊娠で生まれた児の乳幼児期の粗大運動能力及び全般的発達の経過を明らかにすることである。

B. 研究方法

2011年1月から2013年4月の期間に、国立成育医療研究センターで妊娠・分娩管理を行った症例のうち、成育母子コホートへの参加の同意を得た症例の中で、経時的にデータを収集できたのは 1155 名であった。本研究の対象は、ART 群 238 名と母親の年齢、経産、初産などの条件

でマッチングしたコントロール群 365 名である。純粹に ART による児の発達への影響を検討することを目的に、多胎、早産児、低出生体重児は対象から除外した。

ART群（238名；男児126名、女児112名）の平均在胎週数は 39.0 ± 1.2 週、平均出生体重は 3105.3 ± 359.7 gであり、母親の平均年齢は 38.2 ± 3.1 歳、初産180名、経産58名であった。コントロール群（365名；男児189名、女児176名）の平均在胎週数は 38.8 ± 1.10 週、平均出

生体重は3054.4±345.1gであり、母親の平均年齢は34.0±3.5歳、初産208名、経産157名であった。多胎と早産児、低出生体重児を除外した結果として母親の年齢のみART群の方が有意に高い結果となった(Mann-Whitney U検定, p>0.01)。

粗大運動の評価は、乳幼児基本動作スケール (Ability for Basic Movement Scale for Children; ABMS-C) ¹⁾ 一般的な発達は、乳幼児発達スケール(KIDS ; KINDER INFANT DEVELOPMENT SCALE) ²⁾³⁾ を、それぞれ児の両親への質問紙調査によって行った。ABMS-Cは、日常の診療において、医師及び他のメディカルスタッフが、乳幼児の粗大運動の達成度を簡便に評価する方法で、評価項目は「頸部保持」「座位保持」「平面移動」「立位保持」「歩行」の5項目で、それぞれを0、1、2、3の4段階のグレードで評価する。各項目とも乳幼児がその時点で発揮できる最大限の能力によって評価点をつける。たとえば「平面移動」において、四つバイ・背バイができなくても、殿部を挙げての膝バイが可能であれば、「平面移動」のグレードは3となる。図1にABMS-Cを示した。

KIDS (図2) は、「運動」「操作」「理解言語」「表出言語」「概念」「対子ども社会性」「対成人社会性」「しつけ」「食事」などの項目について、質問紙に○×で答え、総合発達指数と各項目の発達指数も算出可能である。

統計ソフトは、IMB®社製のSPSS® Statistics Desktop Version 22.0を用いた。

図1. ABMS-C

Ability for Basic Movement Scale for Children (ABMS-C)

グレード	0	1	2	3
1 頸部保持	首が全くすわっていない	両腕を90度引寄せた状態で首が45度引寄せられている	両腕を90度引寄せた状態で首が10秒維持できない	両腕を90度引寄せた状態で首が10秒維持できている
2 座位保持	全くお座りできない	骨盤を支えればお座りできる	手をついて10秒お座りできる	手だけで10秒お座りできる
3 平面移動	全く平面移動できない	腹這いができる	ズリバイ・背バイができる	膝バイができる
4 立位保持	全く立たない	膝を支えて10秒立てる	両手につかまって10秒立てる	手だけで10秒立てる
5 歩行	全く歩けない	膝を支えて歩歩ける	つかまりのりをつかまえて歩歩ける	手だけで歩歩ける

図2. KIDS



C. 研究結果

ABMS-Cの下位項目である頸部保持、座位保持、平面移動、立位保持、歩行のそれぞれの項目の評価結果の推移を表1に示した。

表1. 小児基本動作スケール (ABMS-C) の得点 (中央値) の比較

	1カ月	3カ月	6カ月	9カ月	12カ月
頸部保持	ART群	0.000	1.000	3.000	3.000
	コントロール群	0.000	1.000	3.000	3.000
	p値	0.305	0.630	0.734	1.000
座位保持	ART群	0.000	0.000	1.000	3.000
	コントロール群	0.000	0.000	1.000	3.000
	p値	0.788	0.322	0.337	0.810
平面移動	ART群	0.000	0.000	1.000	3.000
	コントロール群	0.000	0.000	1.000	3.000
	p値	0.192	0.674	0.422	0.545
立位保持	ART群	0.000	0.000	0.000	2.000
	コントロール群	0.000	0.000	0.000	2.000
	p値	0.530	0.830	0.325	0.617
歩行	ART群	0.000	0.000	0.000	0.000
	コントロール群	0.000	0.000	0.000	0.000
	p値	0.411	0.323	0.518	0.854
合計	ART群	0.000	2.000	6.000	11.000
	コントロール群	0.000	2.000	6.000	10.500
	p値	0.187	0.563	0.699	0.769
データ数	ART群	224	166	89	48
	コントロール群	334	264	170	118

ABMS-Cの評価結果では、月齢1カ月、

3カ月、6カ月、9カ月、12カ月時の粗大運動発達は、両群間に有意差を認めなかった (Mann-WhitneyのU検定 ; $p>0.05$)。

また、KIDSの総合発達指数、及び下位項目である「運動」「操作」「理解言語」「表出言語」「概念」「対子ども社会性」「対成人社会性」「しつけ」「食事」の各発達指数の推移を表2に示した。

表2. 乳幼児発達スケール(KIDS)の発達指数(中央値)の比較

		1カ月	3カ月	6カ月	9カ月	12カ月
総合発達指数	ART群	200.000	150.000	120.000	111.000	125.000
	コントロール群	200.000	133.000	117.000	100.000	117.000
	p値	0.192	0.309	0.822	0.069	0.038*
運動発達指数	ART群	100.000	100.000	100.000	100.000	116.670
	コントロール群	100.000	100.000	116.670	100.000	108.330
	p値	0.493	0.390	0.542	0.529	0.154
操作発達指数	ART群	100.000	133.330	100.000	111.110	130.000
	コントロール群	100.000	100.000	114.585	111.110	116.670
	p値	0.189	0.125	0.349	0.005*	0.026*
理解言語発達指数	ART群	200.000	200.000	133.330	111.110	116.670
	コントロール群	200.000	200.000	133.330	100.000	100.000
	p値	0.416	0.934	0.176	0.066	0.018*
表出言語発達指数	ART群	200.000	200.000	133.330	111.110	129.165
	コントロール群	200.000	166.670	133.330	100.000	125.000
	p値	0.342	0.016*	0.587	0.131	0.106
概念発達指数	ART群					136.360
	コントロール群					125.000
	p値					0.705
対子ども社会性発達指数	ART群					127.270
	コントロール群					100.000
	p値					0.032*
対成人社会性発達指数	ART群	125.000	133.330	100.000	111.000	133.330
	コントロール群	100.000	133.330	116.670	100.000	116.670
	p値	0.262	0.222	0.326	0.246	0.109
しつけ発達指数	ART群					141.670
	コントロール群					133.330
	p値					0.255
食事発達指数	ART群	200.000	133.330	116.670	111.000	108.330
	コントロール群	200.000	133.330	107.145	111.000	100.000
	p値	0.302	0.110	0.441	0.191	0.518
データ数	ART群	218	169	92	49	54
	コントロール群	343	269	172	118	119

* $p<0.05$

KIDSの評価結果は、ART群の月齢3カ月時の表出言語発達指数、9カ月時の操作発達指数、12カ月時の総合発達指数、操作、言語理解、対子ども社会性発達指数が、コントロール群と比較して有意に高かった (Mann-WhitneyのU検定 ; $p>0.05$)。

D. 考察

Hvidtjørn ら⁴⁾は、これまでに行われた脳性麻痺・自閉症・神経学的発達障害に関わる研究をまとめた meta-analysis で、ART 由来出生児は自然妊娠由来児に比べて 2.18 倍脳性麻痺となる確率が高いと述べられている。脳性麻痺が多い原因は、多くの研究で多胎・低出生体重・早産に関係すると言われている。

石井ら⁵⁾は、ART 自体が明らかな予後増悪因子であると示唆するような傾向はなかったが、ART の結果として発生する多胎、それによる早産・低出生体重児などの要因の法が ART の有無自体よりも予後に影響を与えるのではないかと考察している。

本研究においては、早産児、低出生体重児は対象から除外しているため、より純粹に ART の有無による発達の違いを検出できたと考えている。1歳時の粗大運動に差を認めない一方で、言語や社会性を含めた総合発達指数が、ART 群で有意に高かったことは、注目に値する。

Carson ら⁶⁾は、英国の ART 由来単胎出生児 99 人と対照 10,575 児を比較した研究から、ART 由来単胎出生児は、1) 性別・母体年齢・親の職業を match させた対照群、2) 不妊群(妊娠まで 12 ヶ月以上かかった)、3) 妊孕性良好群(妊娠まで 12 カ月以内)、4) 自然妊娠全体の 4 群のいずれよりも 3 歳時点での認知発達が有意に優れており、ART 由来であることは認知発達に悪い影響がないと結論づけている。

本研究における ART 群の 1 歳時の微細運動や言語・コミュニケーション能力の高さは、前述の Carson らの研究と同じように、将来の高い認知機能につながる可能性がある。

一方で、研究の限界として、1) 本調査はあくまでも、母親による発達評価であり、専門家による客観的な発達検査によって行われていない、2) 調査のフォローアップ率が思わしくなく、一部の熱心な親から生まれてきた児についてのみ検討している可能性がある、3) 親の職業や教育歴などの要因については検討していない、などが挙げられ、今後、さらに症例数を増やして検討する必要がある。

E. 結論

母体妊娠合併症及び ART 群の乳児では、

コントロール群と比較して月齢1～12カ月時の頸部保持・座位保持・平面移動・立位保持・歩行などの粗大運動発達に有意差を認めなかった。

一方で、1歳時の微細運動やコミュニケーションを含めた総合発達指数が、ART群で有意に高く、将来の高い認知機能につながる可能性が示唆された。

【参考文献】

- 1) Miyamura K, Hashimoto K, Honda M. Validity and reliability of Ability for Basic Movement Scale for Children (ABMS-C) in disabled pediatric patients. *Brain Dev* 2011;33:508-11.
- 2) Hashimoto K, Matsui N, Yakuwa H, Miyamura K. Evaluation of the Family-rated Kinder Infant Development Scale (KIDS) for Disabled Children. *Jikeikai Medical Journal* 2012;59:5-10.
- 3) Hashimoto K, Sakamoto ,Takekoh M, Ikeda N, Kato K, Honda M, Tamai S, Miyamura K, Horikawa R, Ohya Y. Validity of the Family-Rated Kinder Infant Development Scale (KIDS) for Children. *Pediat Therapeut* 2013;3:153.
- 4) Hvidtjørn D, Schieve L, Schendel D, et al: Cerebral palsy, autism

spectrum disorders, and developmental delay in children born after assisted conception: a systematic review and meta-analysis. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2009; 163: 72-83.

- 5) 石井のぞみ、安藤朗子、佐藤紀子、加部一彦、安達知子、岡井 崇、中林正雄、山口規容子. 生殖補助医療と周産期・小児医療生殖補助医療による出生児の予後 乳幼児期を中心に. *日本周産期・新生児学会医学会雑誌* 2014; 50: 102-104.
- 6) Carson C, Kurinczuk JJ, Sacker A, et al: Cognitive development following ART: effect of choice of comparison group, confounding and mediating factors. *Hum Reprod* 2010; 25: 244-252.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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
（成育疾患克服等総合研究事業））分担研究報告書
「生殖補助医療により出生した児の長期予後と技術の標準化に関する研究」

ARTの遺伝的安全性の検証

Silver-Russell症候群発症における生殖補助医療のリスク評価

分担研究者 緒方勤 浜松医科大学 小児科 教授

研究要旨：近年、生殖補助医療 (ART) における遺伝的安全性が重要な課題として挙げられている。そして、種々のインプリンティング疾患の発症頻度が、生殖補助医療出生児において、一般集団よりも高いというデータが集積されつつある。これに関して、われわれは、昨年度、代表的インプリンティング疾患である Prader-Willi 症候群患者を対象とする検討により、第 15 染色体母性ダイソミーによる Prader-Willi 症候群の増加には、高齢出産が関与することを見出した。

本年度は、同じく代表的インプリンティング疾患である Silver-Russell 症候群患者を対象とする検討を行い、エピ変異による Silver-Russell 症候群発症頻度が、生殖補助医療出生児において、一般集団よりも高いことを見出した (4/6 vs. 39/162, $P=0.019$, Fisher exact probability test)。これらの成果は、生殖補助医療がインプリンティング疾患発症のリスク因子であることを示唆するものである。特に、体外培養によりメチル化が正確には維持されない可能性が指摘されていることから、今回の結果は、受精後の体外培養という生殖補助医療に特異的な因子が密接に関与する可能性を示唆する。

A. 研究目的

近年、生殖補助医療 (ART) における遺伝的安全性が重要な課題として挙げられている。特に、インプリンティング疾患は、その臨床診断が比較的容易であること、および、末梢血を用いた分子遺伝学的解析により原因を特定できることから、生殖補助医療との関連において大きな注目を集めている。そして、種々のインプリンティング疾患の発症頻度が、生殖補助医療出生児において、一般集団よりも高いというデータが集積されつつある。しかし、これらのデータは、単純にその発症頻度を比較したのみであり、生殖補助医療 (ART) における遺伝的安全性の評価には、生殖補助医療に関連する両親因子（高齢であることや不妊症の影響など）や環境因子（環境化学物質の影響など）などの交絡因子を考慮することが必須である。

これに関し、われわれは、過去 3 年間の研究期間において、特に、高齢出産が重要な交絡因子であることを見出してきた。すなわち、代表的インプリンティング疾患である Prader-Willi 症候群 138 例の解析から、減数第一分裂時 (M1) の不分離により産生され

る disomic oocyte を介する第 15 染色体母性ダイソミーが、高齢出産により有意に増加していることを明らかとした。さらに、第 14 染色体父性ダイソミー (UPD(14)pat) および類似表現型を伴う疾患 (UPD(14)pat 症候群と命名) において、減数第一分裂時の不分離により産生される nullisomic oocyte を介する第 14 染色体父性ダイソミーが、高齢出産により有意に増加していることを明らかとした。

本年度は、同じく代表的インプリンティング疾患である Silver-Russell 症候群患者を対象とする検討を行い、エピ変異による Silver-Russell 症候群発症頻度が、両親年齢が同等であるにもかかわらず、生殖補助医療出生児において、一般集団よりも高いことを見出した。

B. 研究方法

対象：Silver-Russell 症候群と臨床診断された 168 例である。Silver-Russell 症候群に診断は、Netchine らのクライテリアによった。これは、生下時身長あるいは体重が $-2SD$ 以下であることを必須条件とし、さらに、[1] 生後の成長障害 (2 歳以降の身長が $-2SD$ 以下)、

[2] 生下時の相対的頭圍拡大（身長あるいは体重 SDS と頭圍 SDS の差が 1.5 以上）、[3] 早期の前頭部突出、[4] 左右非対称、[5] 早期摂食障害、の 5 つのマイナークライテリア中の 3 つ以上を満足するものを Silver-Russell 症候群と見なすというものである。また、ART 施行の有無はアンケートによった。

19-DMR のエピ変異（低メチル化）解析：この *H19*-DMR が存在する 11p15 領域には、共通のエンハンサーにより調節される *IGF2* (*PEG*) と *H19* (*MEG*) が存在し、その発現は *H19*-DMR のメチル化パターンに依存する（図 1）。すなわち、*H19*-DMR は、正常では父（精子）由来のときメチル化状態にあり、母（卵子）由来のとき非メチル化状態にある。そして、メチル化 DMR には CTCF 蛋白が結合できないためにエンハンサーは *IGF2* に作用し、非メチル化 DMR には CTCF 蛋白が結

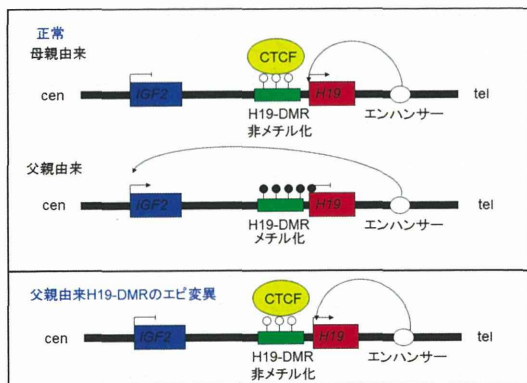


図 1. *IGF2*-*H19* インプリンティングドメインの構造。

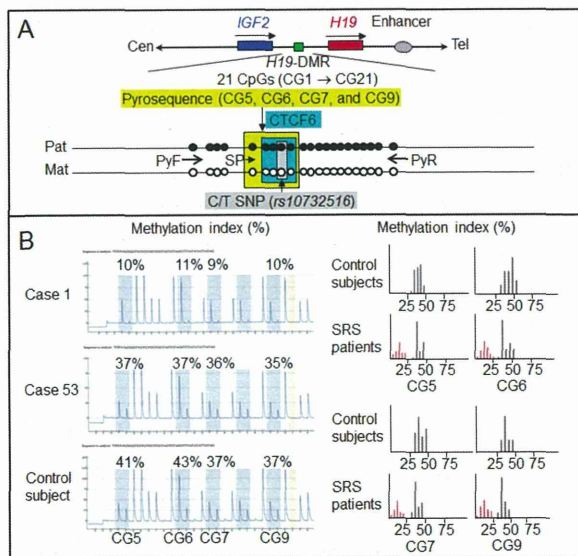


図 2. シルバーラッセル症候群患者 138 例と正常対象 50 例におけるエピ変異解析。

合するためにエンハンサーは *H19* に作用する。そして、この父由来 *H19*-DMR がエピ変異のために低メチル化状態になると、母由来ドメインと同じ挙動を示し、*IGF2* 発現低下と *H19* の発現過剰を招き、*IGF2* 発現低下のためにシルバーラッセル症候群を生じる

（*H19* は腫瘍抑制遺伝子とされ、その発現過剰は表現型には関与しない）。

われわれは、この *H19*-DMR のメチル化状態を、pyrosequencing という最新の信頼度の極めて高い方法で解析している（図 2）。この pyrosequencing は、*H19*-DMR の中でも特に遺伝子発現に重要な役割を果たす第 6-CTCF タンパク結合サイトの CpG 4 個のメチル化状態を直接解析できるという利点がある。

第 7 染色体母親性ダイソミー (*upd(7)mat*) 解析：片親性ダイソミーとは、相同染色体の全てあるいは一部分が共に父親あるいは母親に由来する状態であり、母親性ダイソミーでは *MEG* の発現過剰と *PEG* の発現喪失が疾患発症を招く。この片親性ダイソミーの発症機序としては、trisomy rescue、gamete complementation、monosomy rescue、postfertilization error が知られている。現在、第 7 染色体上のインプリンティング遺伝子の中で *SRS* の原因と判明したものはない。しかし、segmental isodisomy および部分的重複の *SRS* 症例から、7p11.2-p13 領域と 7q31-qetr 領域の 2 つが候補領域とされている。特に長腕遠位部の segmental isodisomy が複数例で報告されていることから、この領域に *SRS* 発症責任ドメインが存在すると推測される。

われわれは、通常、*PEG1/MEST*-DMR に対するメチル化テストでスクリーニングを行い、その後、マイクロサテライト解析で確認している（図 3）。この *PEG1/MEST*-DMR は、父由来のとき非メチル化状態で、母由来のときにメチル化状態にある。これに一致して、正常者では非メチル化アレル特異的プライマーとメチル化アレル特異的プライマーの両方で PCR 産物が得られるが、*upd(7)mat* 患者では、メチル化アレル特異的プライマーのみで PCR 産物が得られる。そして、マイクロサテライト解析により、ヘテロダイソミーとアイソダイソミーの鑑別を含めて、ダイソミーが確認できる。

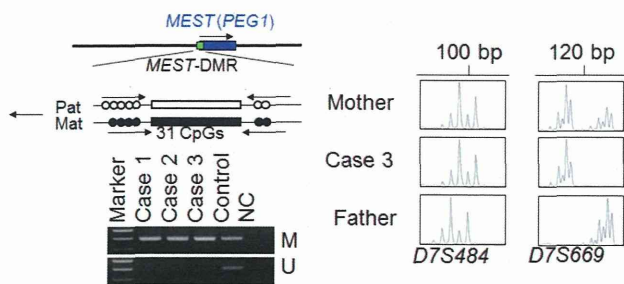


図3. 第7染色体母性ダイソミー解析。正常者では非メチル化アレル特異的プライマーとメチル化アレル特異的プライマーの両方でPCR産物が得られているが、upd(7)mat患者では、メチル化アレル特異的プライマーのみでPCR産物が得られている。症例3のマイクロサテライト解析で、D7S484はヘテロダイソミーで、D7S669はアイソダイソミーで存在する。

(倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針を遵守し、検体の収集を含めた研究計画については、国立成育医療センター、および検体収集施設において予め倫理委員会の承認を得ている。検体は、書面によるインフォームド・コンセントを取得後に収集した。

C. 研究結果

ART 施行頻度: 168 例中 6 例において確認された。内訳は、IVF-ET が 4 例、ICSI が 2 例であった。

全解析患者の発症原因: 168 例中 43 例において H19-DMR エピ変異 (低メチル化) が 9 例において第 7 染色体母性ダイソミー (upd(7)mat) が同定された (図 4)。43 例の H19-DMR のエピ変異陽性患者のうち 3 例が IVF-ET で、1 例が ICSI で出生していた。

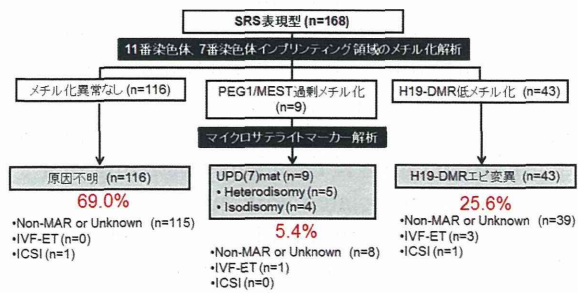


図4. シルバーラッセル症候群患者 168 例における発症頻度。

H19-DMR エピ変異陽性例における検討: 発症頻度は、ART 出生児で 4/6、自然妊娠あるいは ART 施行不明児で 39/162 であった。この頻度は Fisher exact probability test において P=0.019 と有意に ART 出生児において高かった。

D. 考察

以上の結果は、ART がエピ変異の発症を増加させることで、インプリンティング疾患発症リスクとなることを示唆するデータである。ここで、マウスの実験から、メチル化が体外培養条件下では正確には維持されない可能性が指摘されていることから、今回の結果は、受精後の体外培養という生殖補助医療に特異的な因子が密接に関与する可能性を示唆する。そして、この概念は、体外培養がすべての生殖補助医療において共通して行われていることから、ART の手技が 3 例では IVF-ET、1 例では ICSI と異なるにもかかわらず、エピ変異が発症したことを説明する。今後、すべてのインプリンティング疾患において、エピ変異と生殖補助医療 (特に体外培養) の関連性を検討する必要がある。

E. 結論

代表的インプリンティング疾患である Silver-Russell 症候群患者を対象とする検討から、エピ変異による Silver-Russell 症候群発症頻度が、生殖補助医療出生児において、一般集団よりも高いことを見出した (4/6 vs. 39/162, P=0.019, Fisher exact probability test)。この成果は、体外培養によりメチル化が正確には維持されない可能性が指摘されていることから、受精後の体外培養という生殖補助医療に特異的な因子が密接に関与する可能性を示唆する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujisawa Y*, Yamaguchi R, Satake E, Ohtaka K, Nakanishi T, Ozono K, **Ogata T**: Identification of AP2S1 mutation and effects of low calcium formula in an infant with hypercalcemia and hypercalciuria. *J Clin Endocrinol Metab* 98 (12): E2022–2027, 2013.

2. Fukami M*, Suzuki J, Nakabayashi K, Tsunashima R, **Ogata T**, Shozu M, Noguchi S: Lack of genomic rearrangements involving the aromatase gene *CYP19A1* in breast cancer. *Breast Cancer* 21 (3): 382–385, 2014.
3. Nagasaki K*, Asami T, Sato H, Ogawa Y, Kikuchi T, Saitoh A, **Ogata T**, Fukami M: Long term follow up study for a patient with Floating-Harbor syndrome due to a hotspot *SRCAP* mutation. *Am J Med Genet A* 164 (3): 731–735, 2014.
4. Shihara D, Miyado M, Nakabayashi K, Shozu M, Nagasaki K, **Ogata T**, Fukami M*: Aromatase excess syndrome in a family with upstream deletion of *CYP19A1*. *Clin Endocrinol* 81(2): 314–316, 2014.
5. Tsuchiya T, Shibata M, Numabe H, Jinnno T, Nakabayashi K, Nishimura G, Nagai T, **Ogata T**, Fukami M*: Compound heterozygous deletions in pseudoautosomal region 1 in an infant with mild manifestations of Langer mesomelic dysplasia. *Am J Med Genet A* 164A (2): 505–510, 2014.
6. Yagasaki H*, Nakane T, Saito T, Koizumi K, Kobayashi K, **Ogata T**: Disorder of sex development in an infant with molecularly confirmed 46,XY,+der(10)t(10;21)(q21.1;q21.3), –21. *Am J Med Genet A* 164 (3): 841–843, 2014.
7. Sasaki A, Sumie M, Eada S, Kosaki R, Kurosawa K, Fukami M, Sago H, **Ogata T**, Kagami M*: Prenatal Genetic testing for a microdeletion at chromosome 14q32.2 imprinted region leading to upd(14)pat-like phenotype. *Am J Med Genet A* 164A (1): 264–266, 2014.
8. Kitsuda K*, Yamaguchi R, Nagata E, Nakagawa Y, Ohzeki T, **Ogata T**, Ishii M, Nakanishi T: Hypertrophic cells in hypophagic intrauterine growth retarded rats without catch-up growth. *Kitasato Med J* 44 (1): 38–46, 2014.
9. Kato F, Hamajima T, Hasegawa T, Amano N, Horikawa R, Nishimura G, Nakashima S, Fuke T, Sano S, Fukami M, **Ogata T***: IMAGE syndrome: clinical and genetic implications based on investigations in three Japanese patients. *Clin Endocrinol* 80 (5): 706–713, 2014.
10. Court F, Tayama C, Romanelli V, Martin-Trujillo A, Iglesias-Platas I, Okamura K, Sugahara N, Simon C, Moore H, Harness J, Keirstead H, Vicente Sanchez-Mut J, 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): 554–569, 2014.
11. Amano N, Mukai T, Ito Y, Narumi S, Tanaka T, Yokoya S, **Ogata T**, Hasegawa T*: Identification and functional characterization of two novel *NPR2* mutations in Japanese patients with short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 99 (4): E13–18, 2014.
12. **Ogata T***, Niihori T, Tanaka N, Kawai M, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, Nakashim S, Kato F, Fukami M, Aoki Y, Matsubara Y: *TBX1* mutation identified by exome sequencing in a Japanese family with 22q11.2 deletion syndrome-like craniofacial features and hypocalcemia. *PLoS One* 9 (3): e91598, 2014.
13. Yamamoto M, Iguchi G, Bando H, Fukuoka H, Suda K, Takahashi M, Nishizawa H, Matsumoto R, Tojo K, Mokubo A, **Ogata T**, Takahashi Y*: A missense single-nucleotide polymorphism in the sialic acid acetyl esterase gene is associated with anti-PIT-1 antibody syndrome. *Endocr J* 61 (6): 641–644, 2014.
14. Suzuki J, Azuma N, Dateki S, Soneda S, Muroya K, Yamamoto Y, Saito R, Sano S, Nagai T, Wada H, Endo A, Urakami T, **Ogata T**, Fukami M*: Mutation Spectrum and Phenotypic Variation in Nine Patients with *SOX2* abnormalities. *J Hum Genet* 59 (6): 353–356, 2014.
15. Matsubara K, Kataoka N, Ogita S, Sano S, **Ogata T**, Fukami M*, Katsumata N: Uniparental disomy of chromosome 8 leading to homozygosity of a *CYP11B1* mutation in a patient with congenital adrenal hyperplasia: Implication for a rare etiology of an autosomal recessive disorder. *Endocr J* 61 (6): 629–633, 2014.
16. Ohishi A, Nakashima S, **Ogata T**, Iijima S: Early vitamin K deficiency bleeding in a neonate associated with maternal Crohn's disease. *J Perinatol* 34 (8): 636–639, 2014.
17. Suzuki E, Yatsuga S, Igarashi M, Miyado M, Nakabayashi K, Hayashi K, Hata K, Umezawa A, Yamada G, **Ogata T**, Fukami M*: De novo frameshift mutation in fibroblast growth factor 8 in a male patient

- with gonadotropin deficiency. *Horm Res Paediatr* 81 (2): 139–44, 2014
18. Kawamoto T, Nitta H, Murata K, Toda E, Tsukamoto N, Hasegawa M, Yamagata Z, Kayama F, Kishi R, Ohya Y, Saito H, Sago H, Okuyama M, **Ogata T**, Yokoya S, Koresawa Y, Shibata Y, Nakayama S, Michikawa T, Takeuchi A, Saitoh H: Rationale and study design of the Japan environment and children's study (JECS). *BMC Public Health* 2014 Jan 10;14:25. doi: 10.1186/1471-2458-14-25.
 19. Higashimoto K, Jozaki K, Kosho T, Matsubara K, Sato 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 OCT-binding site in the *IGF2/H19*-imprinting control region in a patient with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Clin Genet* 86 (6): 539–544, 2014.
 20. Maeda T, Higashimoto K, Jozaki K, Hitomi H, Nakabayashi K, Makita Y, Tonoki H, Okamoto N, Takada F, Ohashi H, Migita M, Kosaki R, Matsubara K, **Ogata T**, Matsuo M, Hamasaki Y, Ohtsuka Y, Nishioka K, Joh K, Mukai T, Hata K, Soejima H*: Comprehensive and quantitative multilocus methylation analysis reveals the susceptibility of specific imprinted differentially methylated regions (DMRs) to aberrant methylation in Beckwith-Wiedemann syndrome with epimutations. *Genet Med* 16 (12): 903–912, 2014.
 21. Izumi Y, Suzuki E, Kanzaki S, Yatsuga S, Kinjo S, Igarashi M, Maruyama T, Sano S, Horikawa R, Sato N, Nakabayashi K, Hata K, Umezawa A, Ogata T, Yoshimura Y, Fukami M*: Genome-wide copy number analysis and systematic mutation screening in 58 patients with hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril* 102 (4): 1130–1136, 2014.
 22. Ishikawa T*, Takehara Y, Yamashita S, Iwashima S, Sugiyama M, Wakayama T, Johnson K, Wieben O, Sakahara H, **Ogata T**: Hemodynamic assessment in a child with renovascular hypertension using time-resolved three-dimensional cine phase-contrast MRI. *J Magn Reson Imaging* 41 (1): 165–168, 2015.
 23. Nakashima S, Oishi A, Takada F, Kawamura H, Igarashi M, Fukami M, **Ogata T***: Clinical and molecular studies in four patients with *SRY*-positive 46,XX testicular disorders of sex development: implications for variable sex development and genomic rearrangements. *J Hum Genet* 59 (10):549-53, 2014.
 24. Nagata E, Kano H, Kato F, Yamaguchi R, Nakashima S, Takayama S, Kosaki R, Tonoki H, Mizuno S, Watanabe S, Yoshiura K, Kosho T, Hasegawa T, Kimizuka M, Suzuki A, Shimizu K, Ohashi H, Haga N, Numabe H, Horii E, Nagai T, Yoshihashi H, Nishimura G, Toda T, Takada S, Yokoyama S, Asahara H, Sano S, Fukami M, Ikegawa S, **Ogata T***: Japanese founder duplications/triplications involving *BHLHA9* are associated with split-hand/foot malformation with or without long bone deficiency and Gallop-Wolfgang complex. *Orphanet J Rare Dis* 9 (1): 125, 2014.
 25. Kagami M, Mizuno S, Matsubara K, Nakabayashi K, Sano S, Fuke T, Fukami M, **Ogata T***: Epimutations of the IG-DMR and the *MEG3*-DMR at the 14q32.2 imprinted region in two patients with Silver-Russell syndrome-compatible phenotype. *Eur J Hum Genet* (in press).
 26. Izumi Y, Musha I, Suzuki E, Iso M, Jinno T, Horikawa R, Amemiya S, **Ogata T**, Fukami M, Ohtake A: Hypogonadotropic hypogonadism in a female patient previously diagnosed as having Waardenburg syndrome due to a *SOX10* mutation. *Endocrine* (in press).
 27. Nakashima S, Kato F, Kosho T, Nagasaki K, Kikuchi T, Kagami M, Fukami M, **Ogata T***: Silver-Russell syndrome without body asymmetry in three patients with duplications of maternally derived chromosome 11p15 involving *CDKN1C*. *J Hum Genet* (in press).
 28. Miyatake S, Koshimizu E, Fujita A, Fukai R, Imagawa E, Ohba C, Kuki I, Makita Y, **Ogata T**, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito H, **Matsumoto N***: Detecting copy number variations in whole exome sequencing data using exome hidden markov model - an expectation of "exome-first" approach. *J Hum Genet* (in press).
 29. Saito K, Miyado M, Kobori Y, Tanaka Y, Ishikawa H, Yoshida A, Katsumi M, Saito H, Kubota T, Okada H, **Ogata T**, Fukami M*: Copy-number variations in Y chromosomal azoospermia factor regions identified by multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Hum Genet* (in

- press).
30. Kagami M, Kurosawa K, Miyazaki O, Ishino F, Matsuoka K, **Ogata T***: Comprehensive clinical studies in 34 patients with molecularly defined UPD(14)pat and related conditions (Kagami-Ogata syndrome). *Eur J Hum Genet* (in press)
 31. Igarashi M, Wada Y, Kojima Y, Miyado M, Nakamura M, Muroya K, Mizuno K, Hayashi Y, Nonomura K, Jofri K, **Ogata T**, Fukami M*: Novel splice site mutation in *MAMLD1* in a patient with hypospadias. *Sex Dev* (in press).
 32. Kon M, Suzu ki E, Dung VC, Hasegawa Y, Mitsui T, Muroya K, Ueoka K, Igarashi N, Nagasaki K, Oto Y, Hamajima T, Yoshino K, Igarashi M, Kato-Fukui Y, Nakabayashi K, Hayashi K, Hata K, Matsubara Y, Moriya K, **Ogata T**, Nonomura K, Fukami M*: Molecular basis of non-syndromic hypospadias: Systematic mutation screening and genome-wide copy-number analysis of 62 patients. *Hum Reprod* (in press).
 33. Fujisawa Y, Napoli E, Wong S, Song G, Yamaguchi R, Matsui T, Nagasaki K, **Ogata T**, Giulivi C Impact of a novel homozygous mutation in nicotinamide nucleotide transhydrogenase on mitochondrial DNA integrity in a case of familial glucocorticoid deficiency. *BBA Clinical* (in press).
 34. Igarashi M, Mikami H, Katsumi M, Miyado M, Izumi Y, **Ogata T**, Fukami M*: *SOX3* overdosage permits normal sex development in females with random X inactivation. *Sex Dev* (in press).
 35. Momori Katsumi^a, Hiromichi Ishikawa^b, Yoko Tanaka^c, Kazuki Saito^{a, d}, Yoshitomo Kobori^c, Hiroshi Okada^c, Hidekazu Saito^d, Kazuhiko Nakabayashi^f, Yoichi Matsubara^g, Tsutomu Ogata^{a, h}, Maki Fukami^a, Mami Miyado^a Microhomology-Mediated Microduplication in the Y Chromosomal Azoospermia Factor a (AZFa) Region in a Male with Mild Asthenozoospermia. *Cytogenetic and Genome Research* (in press).
 36. Fukami M*, Miyado M, Nagasaki K, Shozu M, **Ogata T**: Aromatase excess syndrome: a rare autosomal dominant disorder leading to pre- or peri-pubertal onset gynecomastia. *Pediatr Endocr Rev* 11 (3): 298–305, 2014.
 37. Shozu M*, Fukami M, **Ogata T**: Understanding the pathological manifestations of aromatase excess syndrome: lessons for the clinic. *Expert Rev Endocrinol Metab* 9 (4): 397–409, 2014.
 38. Fukami M*, **Ogata T**: Cytochrome P450 oxidoreductase deficiency: Rare congenital disorder leading to skeletal malformations and steroidogenic defects. *Pediatr Int* 2014 Oct 8. doi: 10.1111/ped.12518. [Epub ahead of print]
- H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

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
（成育疾患克服等総合研究事業）） 分担研究報告書
「生殖補助医療により出生した児の長期予後と技術の標準化に関する研究」

ARTのインプリンティング異常例などの遺伝的安全性の検討

分担研究者 秦 健一郎 独立行政法人国立成育医療研究センター・部長

研究要旨：モデル生物の知見から、胚操作に伴う初期胚へのエピジェネティックな影響が示唆されており、ヒトでも同様な状況すなわち ART に起因して医原性のインプリンティング異常が起こる可能性が懸念されているが、元来非常に稀な疾患であり、疫学調査に加えて分子病態の解明が必須である。そこで、臍帯血ゲノム DNA を用い、ゲノム・エピゲノム解析を進めた。本研究結果により、日本人正常妊婦の標準データを確立した (Migita et al. 2014) ことで、インプリンティング異常を含む正確なエピゲノム診断が初めて可能となった。現在、ART 群と非 ART 群を統計的手法で比較検証しているが、これまでのところ、ART 群での明らかな「エピゲノムへの悪影響」は見出されていない。

A. 研究目的

体外受精などの生殖補助医療技術が胚発生に与える影響が、様々な観点から検証されている。近年特に、顕微授精や長期の胚培養が、胚の、あるいは出生後も児の遺伝子発現に影響を与えることがモデル生物で示され、注目されている。ヒトでは、生殖補助医療により出生した児で、ゲノムインプリンティング異常が自然妊娠より高頻度に観察される可能性を懸念するケースシリーズ研究結果が報告されている。環境因子（胚培養など）が除去されても胚や児の遺伝子発現に影響を与える分子機構として、エピジェネティックな遺伝子発現制御が有力な候補として示唆されているが、ヒトで網羅的系統的に解析した例は無い。そこで、ヒト ART 出生児の DNA メチル化状態を、特定領域（胎児胎盤の発生に重篤な影響を与える領域）に限定せず、広範に検証することで、発生異常により淘汰されない DNA メチル化異常を検出する機会が増える事を期待し、網羅的な DNA メチル化解析を行い、統計的な差異の有無を検証する。

B. 研究方法

妊娠 36 週以降に出生した新生児のうち、母体年齢を一致させた ART 群と、コントロール群の臍帯血より回収したゲノム DNA を用い、Infinium Human Methylation450Beadchip で、常染色体上の 47 万か所の CpG サイトの DNA メチル化状態を比較検討する。同時に、これらの症例の網羅的一塩基多型情報を取得し、遺伝的背景（DNA メチル化状態に影響を与える可能性のある多型情報）を加味した解析を行う。

統計的な比較検討手法として、ART 群とコントロール群の網羅的 DNA メチル化データのクラスター解析を行う。事前情報無しに両群のゲノムワイドな DNA メチル化状態をクラスター解析することで、軽微な変化のために見過ごされている「隠された DNA メチル化変化」の有無を検証する。また、各プローブのシグナル値（DNA メチル化状態）のばらつきを群間比較し、「DNA メチル化の揺らぎ」が ART 群で大きくなる可能性を検証する。

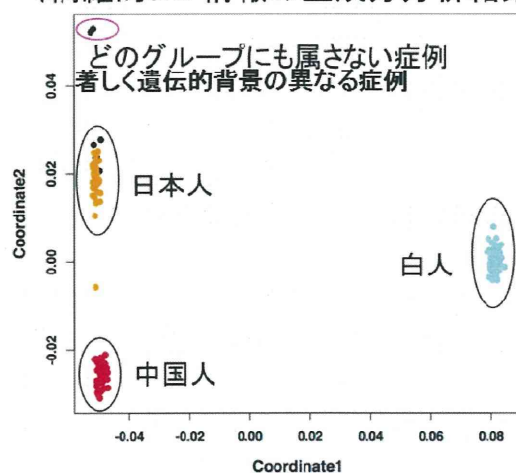
(倫理面への配慮)

本研究は、ヒト由来のゲノム解析・遺伝子解析研究であるためヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針をはじめとする関連法令と指針を遵守して計画され、本センターおよび連携研究者の所属する機関の倫理委員会の承認を得て行っている。すべての検体は、書面で患者本人もしくは代諾者からインフォームドコンセントを得た後に採取され、採取時に各医療機関で匿名化が実施された。網羅的遺伝子解析については、説明書・同意書を用いて同意を取得した。

C. 研究結果

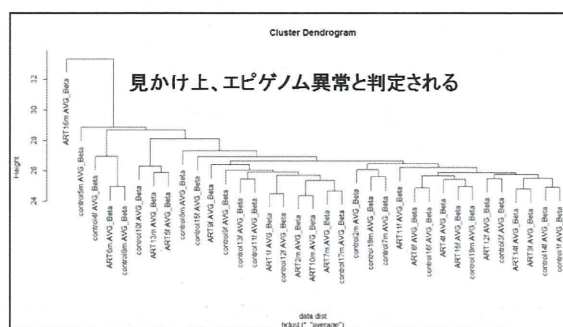
本年度は、昨年 H25 年度までの研究成果であるエピジェネティックな解析 (47 万か所の網羅的 DNA メチル化解析) に加え、各症例の遺伝背景を検証した。具体的には、250 万か所の一塩基多型情報を取得し、一塩基多型情報を基に主成分分析を行った。

ゲノム情報による症例分類
(網羅的 SNP 情報の主成分分析結果)



上図に示すように、我々が日本人として収集した検体の中に、どのグループ(日本人、中国人、白人)にも属さない一群が存在しする。

エピゲノム異常のスクリーニング (ART症例のDNAメチル化状態クラスター解析)



我々の先行研究で行ったエピゲノム解析では、前述の「著しく遺伝的背景の異なる症例」を含めて網羅的 DNA メチル化解析結果のクラスター解析を行うと、同症例は見かけ上他の症例と異なる DNA メチル化状態 (≡異常 DNA メチル化状態) と判定される。

以上の結果から、エピジェネティックな多様性や、各 DNA メチル化プローブの遺伝子内における位置や周辺配列の特徴による各 DNA メチル化プローブの生理的重みづけに加え、遺伝的背景も考慮した厳密な解析を行うことが、真に確からしい (真に ART 群に特異的な) DNA メチル化異常を検出・判定するのに必須であることがわかる。

D. 考察

H25 年度に行った網羅的エピゲノム解析 (網羅的 DNA メチル化解析) 結果の検証には、症例の遺伝的背景や、各 DNA メチル化プローブの生理的意義を加味した慎重な解釈が必要である。

E. 結論

H25 年度までのエピゲノム異常スクリーニング結果に、本年度の網羅的一塩基多型情報を加味することで、厳密なエピゲノム異常判定が可能となることを示した。現在までの解析では、ART 群と自然妊娠群を比較しても、明らかな DNA メチル化の偏りは見出されていない。本年度解析した 412 人分の日本人正常妊婦集団

の情報を利用し、正確なエピゲノム異常スクリーニングを進める。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Migita O, Maehara K, Kamura H, Miyakoshi K, Tanaka M, Morokuma S, Fukushima K, Shimamoto T, Saito S, Sago H, Nishihama K, Abe K, Nakabayashi K, Umezawa A, Okamura K, Hata K : Compilation of copy number variants identified in phenotypically normal and parous Japanese women. *J. Hum. Genet.* 2014;59:326-331
2. Sakashita A, Kobayashi H, Wakai T, Sotomaru Y, Hata K, Kono T : Dynamics of genomic 5-hydroxymethylcytosine during mouse oocyte growth. *Genes Cells.* 2014;19:629-636
3. Kao TH, Liao HF, Wolf D, Tai KY, Chuang CY, Lee HS, Kuo HC, Hata K, Zhang X, Cheng X, Goff SP, Ooi SK, Bestor TH, Lin SP : Ectopic DNMT3L Triggers Assembly of a Repressive Complex for Retroviral Silencing in Somatic Cells. *J Virol.* 2014;88:10680-10695
4. Liao HF, Chen WS, Chen YH, Kao TH, Tseng YT, Lee CY, Chiu YC, Lee PL, Lin QJ, Ching YH, Hata K, Cheng WT, Tsai MH, Sasaki H, Ho HN, Wu SC, Huang YH, Yen P, Lin SP : DNMT3L promotes quiescence in postnatal spermatogonial progenitor cells. *Development.* 2014;141:2402-2413
5. Lee SM, Lee YG, Bae JB, Choi JK, Tayama C, Hata K, Yun Y, Seong JK, Kim YJ : HBx induces hypomethylation of distal intragenic CpG islands required for active expression of developmental regulators. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:9555-9560
6. Yokonishi T, Sato T, Komeya M, Katagiri K, Kubota Y, Nakabayashi K, Hata K, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, Ogawa T : Offspring production with sperm grown in vitro from cryopreserved testis tissues. *Nat Commun.* 2014;5:4320
7. Maeda T, Higashimoto K, Jozaki K, Yatsuki H, Nakabayashi K, Makita Y, Tonoki H, Okamoto N, Takada F, Ohashi H, Migita M, Kosaki R, Matsubara K, Ogata T, Matsuo M, Hamasaki Y, Ohtsuka Y, Nishioka K, Joh K, Mukai T, Hata K, Soejima H : Comprehensive and quantitative multilocus methylation analysis reveals the susceptibility of specific imprinted differentially methylated regions to aberrant methylation in Beckwith-Wiedemann syndrome with epimutations. *Genet Med.* 2014;16:903-912
8. Romanelli V, Nakabayashi K, Vizoso M, Moran S, Iglesias-Platas I, Sugahara N, Simón C, Hata K, Esteller M, Court F, Monk D : Variable maternal methylation overlapping the nc886/vtRNA2-1 locus is locked between hypermethylated repeats and is frequently altered in cancer. *Epigenetics.* 2014;9:783-790 (in press)
9. Kosaki R, Takenouchi T, Takeda N, Kagami M, Nakabayashi K, Hata K, Kosaki K : Somatic CTNNB1 mutation in hepatoblastoma from a patient with Simpson-Golabi-Behmel syndrome and germline GPC3 mutation. *Am J Med Genet A.* 2014;164:993-7
10. Kawai YL, Yura K, Shindo M, Kusakabe R, Hayashi K, Hata K, Nakabayashi K, Okamura K : Complete genome sequence of the mitochondrial DNA of the river lamprey, *Lethenteron japonicum*. *Mitochondrial DNA.* 2014 (in press)
11. Court F, Tayama C, Romanelli V, Martin Trujillo A, Iglesias-Platas I, Okamura K, Sugahara N, Simón C, Moore H, Harness JV, Keirstead H, Vicente Sanchez-Mut J, 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.* 2014;24:554-569

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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
（成育疾患克服等総合研究事業）） 分担研究報告書
「生殖補助医療により出生した児の長期予後と技術の標準化に関する研究」

ART のインプリンティング異常例などの遺伝的安全性の検討

分担研究者 有馬 隆博 東北大学大学院医学系研究科 教授
研究協力者 岡江 寛明 東北大学大学院医学系研究科
研究協力者 樋浦 仁 東北大学大学院医学系研究科
研究協力者 千葉 初音 東北大学大学院医学系研究科
研究協力者 宮内 尚子 東北大学大学院医学系研究科
研究協力者 北村 茜 東北大学大学院医学系研究科

研究要旨：生殖補助医療（ART）は我が国で一般に普及し、出生児は増加の一途を辿っている。一方で、これまで非常に希少疾患として知られる先天性ゲノムインプリンティング異常症の発生頻度の増加が世界中で注目されている。これには、ART が、ゲノムインプリンティングが確立、維持される時期の配偶子や受精卵を操作する事が原因であると推察されている。全国多施設共同研究により、Beckwith-Wiedemann 症候群（BWS）、Silver-Russell 症候群（SRS）は、体外受精（IVF）や顕微授精（ICSI）などの治療を受けた児にその発症頻度が約 10 倍高く、また DNA メチル化の異常（エピゲノム変異）を高頻度に起こすことを明らかにしてきた。本年度は、ヒト初期発生に関わる細胞（卵子、精子胚盤胞）の網羅的全ゲノム DNA メチル化解析を行い、正常細胞の標準プロファイルを作成し、ヒト特異性について明らかにした。ヒト精子では高メチル化を示し、卵子では比較的メチル化の割合は低下する。一方で、胚盤胞ではさらにメチル化レベルは低下するが、卵子のメチル化状態に類似する。このことは、卵子の脱メチル化が起こる時期が着床後におこることが推測され、マウスとの相違を認めた。また、ゲノムインプリンティングやトランスポゾンの違いを認め、ヒトでの特異性を明らかにした。

A. 研究目的

近年、晩婚化の社会情勢と生殖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により出生する児は増加の一途を辿っている。一方で、ART

の普及により、本来非常に稀であるインプリンティング異常疾患の発生頻度の増加が世界中で数多く報告されている。これには ART が、ゲノムインプリンティング（GI）が確立する時期の配

偶子を操作する事が原因であると推察されている。代表的な先天性 GI 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) である。インプリント領域での片親性ダイソミー (UPD)、重複、欠失、メチル化異常などが発症原因と考えられている。またこれまでの先天性 GI 異常症における DNA メチル化の解析により、ART との関連が示された先天性 GI 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さらに多い傾向にあった。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することにより、そのリスク要因を同定することが可能であるかもしれない。本研究では、1) ヒト生殖細胞標準メチル化プロファイルの作成 2) 男性不妊症精子の DNA メチル化について 3) ART により出生した先天性 GI 異常症の分子機構の特徴について明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

①ヒト卵子、精子、胚盤胞、初期胎盤の収集：

十分な説明とインフォームドコンセントを得た後、ヒト検体の収集を行った。卵子は、顕微授精、体外受精などの目的で採取されたもののうち、未成熟卵子 (GV 期もしくは MI 期) と確認され、臨

床使用から外れた形態学的に正常な未受精卵を収集した。シーケンス解析用のライブラリー調製を行うために最低 800 個の卵子を収集した。卵子は、体細胞の混入を避けるため、顆粒膜細胞および透明帯をタイロード処理により完全に除去し、回収した。精子は、Suim-up 法を用い、体細胞を除去した。胚盤胞は体外受精もしくは顕微授精後、in vitro で培養を行って成長させた胚のうち、顕微鏡下に正常形態を示す検体 (ガードナー分類によるグレードが BB 以上) を収集した。ライブラリー調製には 50 個の胚盤胞を用いた。初期胎盤 (妊娠 7-8 週) は、人工妊娠中絶術後の正常胎盤の一部を使用した。初期胎盤組織は生理食塩水で洗った後、絨毛部分を採取後、純化し、ゲノム DNA の抽出を行った。初期胎盤の絨毛からは大量の DNA (> 10 μ g) が得られることを確認した。3 検体よりゲノム DNA を抽出し、ライブラリー作製に用いた。以上のように、検体の収集は 4 ヶ月以内に全て終了する予定である。申請者は既に、10 ng のゲノム DNA (胚盤胞 30 個、卵子 800 個相当) からライブラリーを作製し、シーケンス解析を実施した。

②次世代シーケンサーを用いた大規模メチル化解析：

ライブラリーの作製には、PBAT 法を用いた。ライブラリー作製後、HiSeq2500 を用いて大規模シーケンス解析を行った。卵子および胚盤胞についてはそれぞれ 1 フローセル (8 レーン)

を用いてシーケンスを行い、マッピング可能な7億リード(700億塩基、ゲノムカバー率x23に相当)を取得した。精子、胎盤については各2レーンずつシーケンスを行い、計6億リードを取得した。

③シーケンスデータのマッピング：

②で得られたリードのマッピングおよびメチル化率の算出には、メチル化解析プログラム Bismark を用いた。また、リードおよびメチル化状態の可視化にはゲノムブラウザ IGV を使用した。

④構造、機能領域分類とメチル化制御の解析：

発生の各段階で、CpG island, リピート配列, プロモーター, Gene body などの、CG および non-CG のメチル化率を決定した。マウスでは、リピート配列の一部が受精後の脱メチル化から保護されることや、卵子で non-CG のメチル化が頻繁に観察されることが知られている。同様の現象がヒトでも見られるか検証した。また、既に報告されている RNA-seq のデータと比較することで、発現量と相関のある領域を同定した。解析には次世代シーケンサーのデータ解析ソフト GeneSpring および、統計解析ソフト”R”を使用した。

⑤DMR の同定とその維持・消去機構の解析：

卵子 - 精子特異的メチル化領域 (DMR) に注目し、受精後の脱メチル化や着床後の新規メチル化から保護されているか

どうかを明らかにした。着床後も維持される DMR については、母体血および臍帯血を用いたアレル特異的 DNA メチル化解析を行い、ゲノムインプリンティングへの関与を明らかにした。アレル特異的なメチル化が確認された DMR については、近傍にインプリント遺伝子があるかどうかを、臍帯血 cDNA を用いたアレル特異的発現解析によって明らかにした。さらに、DMR の保護に関与する共通配列モチーフの検索を行い、結合する転写因子などを推測した。

⑥マウスメチロームとの比較：

領域毎のメチル化制御や DMR の制御が、ヒトマウス間で保存されているかどうかを解析した。ヒトマウス間のゲノム配列の保存性に関するデータは UCSC より取得し、統計解析ソフト”R”を用いてメチル化状態の保存性を定量的に評価した。さらに、濃縮されるリピート配列や近傍遺伝子の機能・発現量による分類を行い、メチル化状態が保存されている領域とそうでない領域の配列の特徴を明らかにした。

(倫理面への配慮) ヒト検体を用いる研究：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は研究登録番号、症例イニシヤ

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、その後廃棄予定である。

C. 研究結果

ヒト発生の初期の細胞では、ヒト特異性を示すダイナミック変異を伴う現象が確認された。

(1) DNA メチル化の初期化

ヒト精子では高メチル化を示し、卵子では比較的メチル化の割合は低下する。一方で、胚盤胞ではさらにメチル化レベルは低下するが、卵子のメチル化状態に類似する。このことは、卵子の脱メチル化が起こる時期が着床後におこることが考えられる。

Sample	Number	Depth	≥ x1
Oocyte	202 oocytes	7.0	87.5%
Sperm	3 individuals	24.5	94.9%
Blastocyst	80 embryos	23.5	95.7%
Cord blood	5 individuals	16.4	94.7%

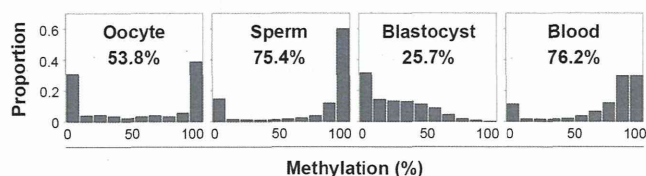


図1 ヒト発生初期細胞のDNAメチル化のダイナミック変異

(2) ゲノムインプリンティング

ゲノムインプリンティングを受ける遺伝子は、これまでに100以上知られている。また、クラスターを形成し、その領域はアレル特異的メチル化領域(DMR)によって制御されている。このDMRは卵子、精子の形成過程で確立し、胚盤胞の脱メチル化には影響を受けず、細胞の記憶としてメチル化を維持している。本研究で概知のDMRに加え、新規DMRを多数発現した。

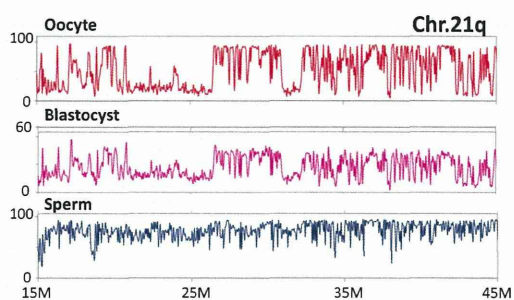


図2 胚盤胞における不完全な脱メチル化

(3) トランスポゾンにおけるDNAメチル化

転写する外来性遺伝子産物としてトランスポゾンが知られている。これらの遺伝子は、構造上に特徴を有するが、メチル化を維持する特徴も有する。

D. 考察

我々は、ヒト初期発生に関わる細胞のDNAメチル化の標準プロファイルを作成することに成功した。その特徴は、マウスとの共通性はあるが、多様性も確認された。メチル化インプリント異常症は、IVFやICSI症例に多い傾向に