

早産・胎内発育不全の胎盤等生体資料を用いたDNAメチル化を含めたエピジェネティック分析

担当責任者 氏名 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：

エピジェネティックな遺伝子発現制御は、胎児や胎盤の発生分化の必須の機構である事が知られている。また、子宮内環境は胎児のエピジェネティックな修飾状態を変化させる事がモデル生物で示されている。これらの知見を基に、本研究では、ヒト早産や胎児発育不全症例の臍帯血あるいは胎盤を用い、エピジェネティックな修飾状態の変化の有無を正確に検出する系を確立し、病態の解明や、出生後も長期遺残しうるエピゲノム変化の同定を行う。

A．研究目的

エピジェネティックな遺伝子発現制御は、胎児や胎盤の発生分化の必須の機構である事が知られている。また、子宮内環境は胎児のエピジェネティックな修飾状態を変化させる事がモデル生物で示されている。これらの知見を基に、本研究では、ヒト早産や胎児発育不全症例の臍帯血あるいは胎盤を用い、エピジェネティックな修飾状態の変化の有無を正確に検出する系を確立し、病態の解明や、出生後も長期遺残しうるエピゲノム変化の同定を行う。本研究班の特徴を生かし、他の分担研究との連携により、早産・胎児発育不全症例の経過あるいは疫学的情報を含めた解析を進める。

B．研究方法

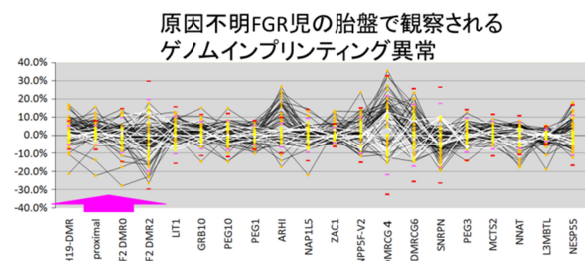
胎児発育不全症例および妊娠 37 週未満に出生した早産例から、臍帯血および胎盤（胎児面の絨毛膜板）を回収し、ゲノム DNA を精製する。エピジェネティックな修飾のうち、インプリンティング遺伝子の DNA メチル化状態は、諸家の報告からすでに胎児や胎盤の発生分化に直接重要な役割を担っていることが知られており、かつ、週数や環境因子に影響を受けない（受けにくい）領域と予測される。これらの特異的領域の DNA メチル化異常スクリーニングは、Bio-COBRA 法により行った（バイサルファイト変換後に非メチル化シトシンがウラ

シルに変換され、多型が生じることを利用し、制限酵素処理により多型判定をする手法、COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis) 法を改変し、キャピラリー電気泳動により定量性を高めたスクリーニング手法）。

（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



上図に示すように、原因不明胎児発育不全症例の一部に、H19 領域の低 DNA メチル化異常が

同定された。これらの異常は、胎盤形成不全と胎児発育不全を呈することが知られており、実際にこれらの症例の病態に關与していると考えられた。

D. 考察

本年度は、既収集検体 250 例の解析を行い、そのうち 3 例に結果に示したようなエピゲノム異常を同定した。これらのエピゲノム異常は、同部位にエピゲノム異常を来すシルバー・ラッセル症候群が胎児発育不全を呈すること、あるいはモデル生物の解析結果から、胎児発育不全に直接關与する異常と考えられる。来年度以降は、これらの異常がインプリンティング遺伝子の調節領域特異的な変化か否かを検証するために、より広い領域を標的としたスクリーニングを進めていく。すなわち、Infinium Human Methylation450Beadchip を用い、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。胎児発育遅延の表現型に直結しない領域も含めてゲノム全域をスクリーニングすることで、これらの症例のエピジェネティックな背景を評価し、エピジェネティックな変異(変化)のホットスポットの有無を解析する。

E. 結論

本年度は、既収集検体を用いたエピゲノム異常のスクリーニングを用い、原因不明とされる胎児発育不全症例の一部に、実際にエピゲノム異常(胎児と胎盤の発育に關与するインプリンティング遺伝子の調節領域の DNA メチル化異常)を見出した。これらの症例の詳細な解析と報告を進めると共に、来年度以降は、よりスクリーニング領域を広げ、症例群で觀察されるより広範なエピゲノム異常、あるいは診断指標となるエピゲノム変化の有無を検索する。

F. 研究発表

1. 論文発表

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 CTNBN1 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

2 . 学会発表

(招待講演のみ)

1. 秦健一郎： 胎盤における環境エピゲノム変化とその医療活用。 第3回日本DOHaD研究会学術集会， 東京， 2014.7.26
2. 秦健一郎： 「次世代シーケンサーの日常診療への応用～環境は遺伝するか？ 新型出生前診断の次は？」 第13回別府遺伝医学セミナー， 別府， 2014.6.4
3. 秦健一郎： 生殖・周産期のエピジェネティクス。 第87回日本内分泌学会学術総会， 福岡， 2014.4.27
4. 秦健一郎： 胎児発育異常のゲノム・エピゲノムの解析。 群馬大学生体調節研究所， 前橋， 2014.3.7
5. 秦健一郎： 「環境は遺伝する？～周産期医療にかかわるジェネティクスとエピジェネティクス～」， 第7回福岡胎児医療フォーラム， 福岡， 2014.1.31

H . 知的財産権の出願・登録状況

なし