

201442020A

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患等実用化研究事業）

先天性インプリント異常症におけるメチル化体外診断薬の実用化
と生殖補助医療の影響

（H26－委託（難）－一般－020）

平成26年度 委託業務成果報告書

研究代表者 有馬 隆博（東北大学大学院医学系研究科）

平成 27（2015）年 3 月

目 次

I. 研究組織	1
II. 総括研究報告	
先天性インプリント異常症におけるメチル化体外診断薬の実用化 と生殖補助医療の影響	2

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 発達環境医学分野（教授）
	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）
	龍田 希	東北大学大学院医学系研究科 発達環境医学分野（助教）
	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）

Ⅱ. 統括研究報告書

先天性インプリント異常症におけるメチル化体外診断薬の実用化
と生殖補助医療の影響

課題番号：H26－委託（難）－一般－020

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

生殖補助医療（ART）の普及により、ART 出生児にこれまで非常に稀であった先天性インプリンティング（GI）異常症の発生頻度の増加が国内外で報告され、注目されている。本研究では、地元企業と共同で、簡便、迅速な世界初ハイスループット新規メチル化解析システムを開発することを目的とする。初年度は、非臨床の POC 取得、次年度からは、臨床性能試験を実施、最終的には体外診断薬としての承認を出口とする実用化を目指す。本システムにより、臨床の現場ではインプリント異常の頻度、程度の把握だけでなく、ART 治療の安全性評価、リスク因子の同定の一助となり、インプリント異常症の早期診断、予防に貢献し、罹患児の予後と家族の負担を大きく軽減する。

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 小児病態学分野
准教授 坂本 修

東北大学大学院医学系研究科 発達環境医学分野
助教 龍田 希

東北大学大学院医学系研究科 情報遺伝学分野
助教 岡江 寛明

A.研究目的

我が国の晩婚化、少子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定着している。しかしこの ART の普及とともに、先天異常、低出生体重、周産期合併症の増加との関連性が指摘されている。また ART 出生児では、本来非常に稀であったインプリント異常を原因とする先天性インプリント異常症（Beckwith-Wiedemann 症候群：BWS（NIM130650）、Angelman 症候群：AS（NIM105830））の発症頻度が増加しているとの報告が数多くみられる。

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、DNA メチル化への影響について懸念されている。また代表者らは、男性不妊症精子にインプリント遺伝子のメチル化異常の頻度がおおよそ 25%であることを報告した。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、つまり精子のインプリント遺伝子領域のメチル化異常であることを示唆している。男性不妊症とメチル化異常の

関連性は、他の論文でも報告されている⁵⁻⁷⁾。男性不妊症の場合、現在有効な治療法はなく、ART が実施されている。さらに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 出生児のインプリント異常のリスク回避は、次世代社会の最も重要な要件の一つとして、早急な対応が求められている。

これまでにインプリンティングを調節するメチル化インプリント領域は精子型、卵子型合わせて 22 ヶ

所報告されている。いずれもヒトの発生、分化に重要な領域であるが、代表者らは 8 つのインプリント領域が、先天性疾患の原因である事を確認した。

これまでの研究結果より、インプリント異常症発生リスク (8 領域) の判定方法として PCR-Luminex 法を用いた DNA メチル化異常診断領域システムを開発する。男性精子の質的機能評価を行うことで、より安全で効率的な ART に貢献できる「インプリント病関連疾患のスクリーニングシステム」としての承認を目指すものである。

基本情報

研究課題名	先天性インプリント異常症におけるメチル化体外診断薬の実用化と生殖補助医療の影響
研究代表者名・所属機関名	有馬 隆博・東北大学大学院医学系研究科
研究課題分類	難治性疾患実用化研究(革新的医薬品)
試験物の名称	メチル化異常診断薬の開発(8領域)
対象疾患	先天性インプリント異常症

疾患名	BWS	PWS	AS	SRS
				
責任領域 (DNAメチル化)	LIT1	SNRPN	SNRPN	H19 PEG1
	新生児一過性糖尿病	行動異常	小児癌、胎盤異常	PHP1a (偽性副甲状腺機能低下症)
責任領域 (DNAメチル化)	ZAC	PEG1	PEG3	GNAS

BWS : Beckwith-Wiedemann症候群
AS : Angelman症候群
PWS : Prader-Willi症候群
SRS : Silver-Russell症候群

知財権の確保状況

発明の名称	特許出願人	発明者	出願日	権利の残存期間	出願番号	出願国/出願ルート(移行国)	特許登録状況	侵害調査侵害性の有無
ヒト精子の質的機能評価システムに適用するDNAメチル化解析技術	東北大学	開発責任者(有馬 隆博)	2012/5/16	2022/5/16	PCT/JP2012/3196	PCT(日本、米国、欧州)	指定国移行済	侵害調査中
インプリント異常性の指標としてのZDBF2メチル化異常の検査方法	東北大学 G&Gサイエンス	開発責任者及び共同研究者(有馬 隆博 阿部 由紀子 越坂卓也)	2010/5/20	2020/5/20	特願2010-116634	日本	審査請求済	侵害調査中

○ 権利の強さ(物質、用途、製剤、製法等)

調査の対象とする遺伝子を特定し、検査方法等について特許出願済みである(PCT/JP2012/3196)。また、関連する遺伝子検査方法についても特許出願済みである(特願2010-116634)。

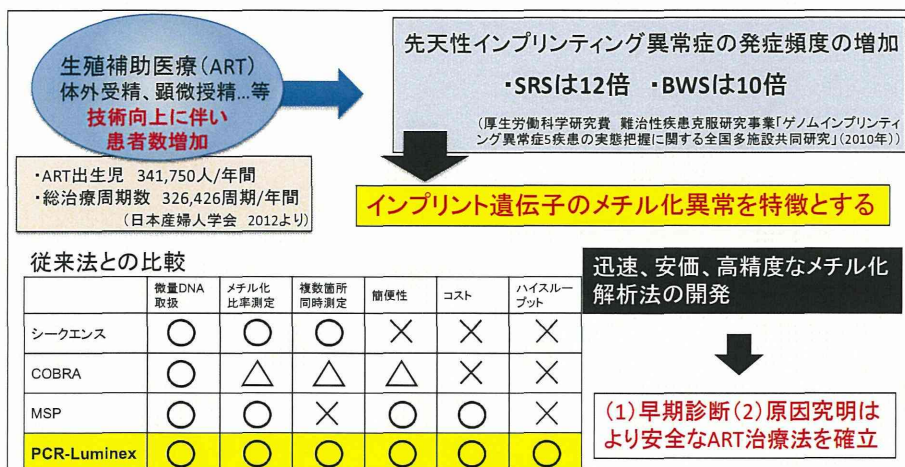
○ 今後の強化策

PCT/JP2012/3196 の各国での権利化を進める。また、必要な周辺技術について、適宜権利化を検討する。

開発トラック

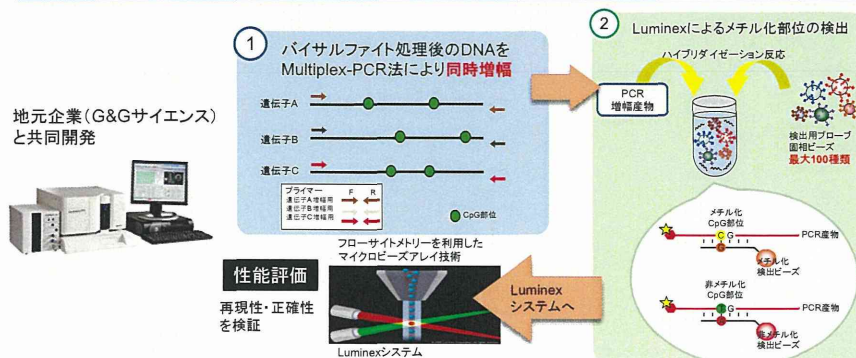
体外診断用医薬品(→臨床性能試験)

診断薬の臨床応用を目的として、難病患者の病因、病態解明につなげる



開発コンセプト

区分	体外診断用医薬品
想定される治療学的ポジション	First-in-human以外
対象疾患	先天性インプリント異常症(8疾患)
患者選択基準(診断基準)と 評価法(効果判定基準)	【患者選択基準】先天性インプリント異常症の患児(末梢血) 【評価法】先天性インプリント異常症の責任遺伝子DNAのメチル化の検出
開発の意義	先天性インプリント異常症の診断
優先審査	非該当



これまでヒト精子検査は、形態的な評価しか行わず、検査後破棄していた。本検査では、形態的な検査後のヒト精子を用い、その精子の質的評価として、DNAメチル化異常を確認することでインプリント異常症のリスクを評価し、安全性の高いARTの標準化治療に貢献するものと考えられる。また、質的良好な精子を選択してARTを実施することで、繰り返しARTを実施する必要がなくなることが予想され、受診者の精神的、経済的な負担を軽減することが期待される。これまで消化器癌、膵癌、メラノーマおよび老化の診断に、DNAメチル化の変異を応用する類似先行研究が存在する。しかし、本検査は、男性精子のメチル化異常を迅速、安価で正確な評価が可能であり、臨床の現場で実践的な世界初の画期的な診断法となると考えられる。

B.研究方法

当該 DNA メチル化診断システムは、複数のプライマーを用いて DNA 上の複数の配列を同時に増幅する Multiplex PCR 法と、解析対象に結合するプローブを表面に固定した蛍光ビーズをフローサイトメトリーで解析する Luminex 法（Luminex 社より技術導入）を用いてメチル化率を検出する技術である。下記 3 つのステップで構成される。

- 1) 精子 DNA のバイサルファイト処理
- 2) バイサルファイト処理後の DNA を Multiplex-PCR 法により、8 領域を同時増幅
- 3) Luminex によるメチル化部位の検出（ハイブリダイゼーション反応）

下記に想定しているキット内容及び操作手順を示す。

製剤／製造法の概要

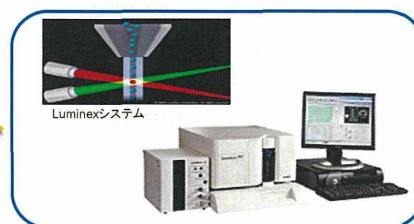
調達法	国内企業(G&Gサイエンス株式会社)
製剤規格	感度試験、正確性試験、同時再現性試験、測定範囲
再生医療等製品	非該当
生物由来原料	該当無

<品目概要>

キットの開発(①-③を1つにキット化)



Luminexシステムによる測定



<キット内容>

(1) メチレーションキット

- ①CT Conversion Reagent
- ②Dilution Buffer
- ③Binding Buffer
- ④Wash Buffer

(2) PCR 増幅キット

- ①8 遺伝子の特異的プライマーセット
(各 0.2mM)
- ②PCR 反応液 (50mM KCl+10mM Tris Buffer)
- ③dNTP (0.2mM)
- ④Taq ポリメラーゼ (0.625IU)

(3) ハイブリダイゼーションキット

- ①メチル化検出プローブ (100oligobeads/ μ l)
- ②非メチル化検出プローブ (100oligobeads/ μ l)
- ③ハイブリダイゼーション液

<操作手順>

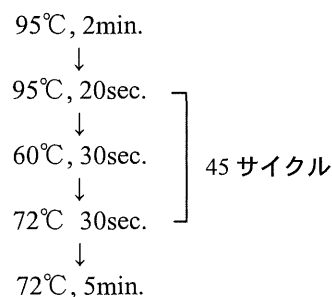
(1) メチレーションキット

- a. 1.5ml チューブにサンプル DNA (500pg \sim 2 μ g DNA) +milliQ が 45 μ l になるように入れる。
- b. Dilution Buffer を 5 μ l 加え、回転倒混和し、スピンドウン
- c. 37 $^{\circ}$ C ドライヒートブロックで 30 分間インキュベート
- d. 調整済みの CT Conversion Reagent を 100 μ l 加える。ボルテックスで 10 秒攪拌し、スピンドウン
- e. 50 $^{\circ}$ C ドライヒートブロックで 12-16 時間、遮光し、インキュベート
- f. 4 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベート
- g. Binding Buffer を 400 μ l 加え、回転倒混和
- h. 全量を Spin IC Columns に移す
- i. 15000 g で 30 秒遠心
- j. 廃液を捨て、Wash Buffer を 100 μ l 加える。
- k. 15000 g で 30 秒遠心
- l. Desulphonation Buffer を 200 μ l 加え、室温で 15 分間インキュベート

- m. 15000 g で 30 秒遠心
- n. Wash Buffer を 200 μ l 加える。
- o. 15000 g で 30 秒遠心
- p. Wash Buffer を 200 μ l 加える。
- q. 15000 g で 30 秒遠心
- r. カラムを Collection Tubes にセットし、Elution Buffer を 10 μ l 加える
- s. 15000 g で 30 秒遠心
- t. milliQ を 10 μ l 加える (変換 DNA)

(2) PCR 増幅

0.2 μ M primer (Mix)、0.2mM dNTPs、1xPCR buffer、3mM MgCl₂、2%dimethyl sulfoxide、0.625IU Taq DNA Polymerase (Roche,Tokyo, Japan)、100-200ng のパイサルファイト処理 DNA 25 μ L を混合し、8 連チューブに入れてサーマルサイクラーにて PCR 反応を行う。



(3) ハイブリダイゼーション

- 各メチル化検出プローブ (100oligobeads/ μ l)
(配列は非公開)
- 各非メチル化検出プローブ (100oligobeads/ μ l)
(配列は非公開)
- 62.5mM Tris-HCl
- 0.5M EDTA
- 0.125% N-Lauroylsarcosine Sodium salt
- 1.5M Tetramethylammonium chloride
- 0.5M NaCl

PCR 産物 5 μ l にハイブリダイゼーション液 (3.75M TMAC, 62.5mM TB, 0.5mM EDTA,

0.125% N- Lauroylsarcosine Sodium salt) を加え
 95℃ 2分、48℃ 30分反応させる。100mlPBS で
 洗浄し、3300rpm で1分間遠心し、上清を除く。
 ペレットはSA-PE液 (70ml) を加え48℃ 15分
 反応させる。

(4) Luminex システムによる蛍光値 (635nm レー
 ザー) 検出

95℃, 2min.

↓

48℃, 30min.

遺伝子	プライマー配列		Amplicon (bp)	annealing	判定基準
H19	F	TATATGGGTATTTTTGGAGGTTTT	220	57	90%>
	R	ATAAATATCCTATTCCCAAATAACCCC			
GTL2	F	GGGTTGGGTTTTGTTAGTTGTT	259	57	90%>
	R	CCAATTACAATACCACAAAATTAC			
ZAC	F	GGGGTAGTYGTGTTTATAGTTTAGTA	207	57	15%<
	R	CRAACACCCAAACACCTACCCTA			
PEG1	F	TYGTTGTTGGTTAGTTTTGTAYGGTT	219	57	15%<
	R	ACCACCAACCACACCCCCTC			
PEG3	F	GTAAGAYGGTTATTTTGGTTTAGAG	322	55	15%<
	R	AAAAATATCCACCCTAAACTAATAA			
LIT1	F	TTTTGGTAGGATTTTGTGAGGAGT	307	57	15%<
	R	CCTCACACCCAACCAATACCTC			
SNRPN	F	AGGGAGTTGGGATTTTTGTATTG	240	59	15%<
	R	ACTAACCCTCCTCAAACAAATAC			
GNAS1A	F	GTGTGAGTGTATTTTATTTATATGTAAGT	236	55	15%<
	R	AACAAAATCTATTTACCCTCAAAC			

C. 研究結果

製品概要に沿って、これまでに下記の 4 つのステップを検討した。

- 1) 精子 DNA のバイサルファイト処理の検討
- 2) 対象となる 8 領域の DNA 同時増幅の検討ハイブリダイゼーション
- 3) 増幅産物と検出プローブおよび Luminex システムによる検出条件の検討
- 4) ヒト精子を用いた Luminex システムによる蛍光値測定検討

1) 精子 DNA のバイサルファイト処理の検討

バイサルファイト処理工程の安定化と供試検体中の必要 DNA 量および供試精子量を決定した。

使用キット：

- ①EpiTect Bisulfite Kit (QIAGEN 社)
- ② EZ DNA Methylation Kit (ZYMORESEARCH 社)
- ③ EZ DNA Methylation-Gold Kit (ZYMORESEARCH 社)

健常人検体を 500ng 準備し、各キットのプロトコールにしたがってバイサルファイト処理を行った。

各キットを用いた場合、処理に要する時間は、下記の通りである。

- ①EpiTect Bisulfite Kit：6 時間程度
- ②EZ DNA Methylation Kit：13～17 時間
- ③EZ DNA Methylation-Gold Kit：3 時間程度

各キットにて処理を行ったバイサルファイト DNA (以下、BS-DNA) は、(1)バイサルファイト処理後の DNA 量、精製度の測定、(2)回収率の算出、(3)PCR 増幅反応を行い、バイサルファイトの効率を評価した。

<結果>

①バイサルファイト処理後の精製度

BS-DNA の吸光 (260nm、280nm) を測定し、

回収量および精製度 (260nm/280nm の値) を算出した。結果を表 1 に示す。

通常の DNA 検体の場合、精製度 (吸光値 260nm/280nm) の値が 1.6～1.8 であれば良好な状態である。

これらの結果より、回収率は①EpiTect Bisulfite Kit が最も多いが、バイサルファイト処理前の DNA 量が 500ng であること、精製度が 3.0 前後であることから、本キットの性能には疑問が残るため、②EZ DNA Methylation Kit、③EZ DNA Methylation-Gold Kit が妥当な状態であると推察する。

②回収率

各検体の DNA 回収率をバイサルファイト処理前の DNA との比較により算出した。結果を表 2 に示す。

③PCR 増幅反応

作製したバイサルファイト処理済み DNA (以下、BS-DNA) を鋳型とし、リアルタイム PCR 反応を行い、増幅状況を確認した。下記に PCR 条件を示す。

- ・ BS-DNA 使用量：5ng, 10ng, 50ng
- ・ 増幅に使用したプライマー：H19 増幅用プライマー

F プライマー

5'- TATATGGGTATTTTTGGAGGTTTTT -3'

R プライマー

5'- ATAAATATCCTATTCCTAAATAACCCC -3'

- ・ 増幅プログラム

95℃, 2 分 → (95℃, 20 秒 → 60℃, 30 秒 → 72℃, 30 秒) ×50 サイクル

- ・ 融解曲線分析

PCR 増幅産物の融解温度によって、非特異的増幅産物やプライマーダイマーと分別するため、増幅反応終了後 72℃から 100℃まで温度を上げ、2 本差 DNA の解離温度を特定した。

反応を行った結果、各 BS-DNA にてほぼ良好に増幅が確認された。

A の増幅曲線より、増幅の開始（曲線立ち上がり点）が①EpiTect Bisulfite Kit が 24 サイクルと、他の 2 キットが 21 サイクル程度であるのに比べ、やや遅れていることが確認された。

また B の融解曲線分析より、増幅産物の 2 本鎖が解離する温度を確認した結果、②、③はメチル化された配列を持つ産物と非メチル化の配列の 2 種類の増幅産物を示す 2 つのピークが確認されたが、①はこれらの 2 ピークが判別しにくいことに加え、低温度域にもう一つのピークが確認された。これはプライマー同士が結合して生成されるプライマーダイマーのピークであると考えられる。

①EpiTect Bisulfite Kit の回収率が異常に高い。本キットでバイサルファイト処理を行った DNA 溶液には、DNA 以外に 260nm の吸光をもつ物質が含まれている可能性が否定できず、測定の際、これらの影響が懸念される。また、5～50ng の BS-DNA で良好な増幅が可能であったが、感度についてはさらにデータを取得する必要がある。また、EpiTect Bisulfite Kit にて処理を行った検体については、他のキットに比べ、増幅しにくい状態であることが判明したため、市販のキットを用いて処理を行う際には EZ DNA Methylation Kit または EZ DNA Methylation-Gold Kit を選定することに決定した。

表 1 バイサルファイトキットの精製度

	検体 1		検体 2		検体 3		検体 4	
	回収量	精製度	回収量	精製度	回収量	精製度	回収量	精製度
①EpiTect	2.12μg	3.150	1.99μg	3.169	2.20μg	3.246	2.11μg	3.050
②EZ Methylation	325ng	1.694	315ng	1.658	390ng	1.770	413ng	1.800
③EZ Methylation-Gold	336ng	1.843	328ng	1.630	455ng	1.805	399ng	1.714

表 2 バイサルファイトキットの回収率

	検体 1	検体 2	検体 3	検体 4
①EpiTect	424.0%	398.0%	440.0%	422.0%
②EZ Methylation	65.0%	63.0%	78.0%	82.6%
③EZ Methylation-Gold	67.2%	65.6%	91.0%	79.8%

①では回収率が異常に高い。DNA 溶液には、DNA 以外に 260nm の吸光を持つ物質の存在が疑われる。測定の際、これらの影響が懸念される。

2) 対象となる 8 領域の DNA 同時増幅の検討ハイブリダイゼーション

反応液組成、反応温度、反応時間および増幅サイクル数の観点から検討を行なった。

<結果>

①プライマー設計

Multiplex 増幅のためのプライマーは、各領域フォワード、リバースプライマーを各々 2 から 5 本ずつ設計した。これらは長さ 20 ~28 塩基、Tm 値 60~72℃に設定し、検討を行った。GC 含量については、バイサルファイト処理により「C」が「T」に変換されているため、各プライマーの値をそろえることは難しく、18~58%となっている。

②反応液組成

DNA 合成酵素として、FastStart DNA Polymerase および AptaTaq DNA Polymerase (いずれも Roch 社) を検討した。これらの酵素にあわせ、溶液組成も検討し、下記 2 種類にてデータを取得した。

③反応温度、反応時間および増幅サイクル数
プライマーの Tm 値、長さをもとに下記プログラムを設定し検討した。

95℃,2min.

95℃,20sec.→58℃ または 60℃,30sec.→72℃,30sec.×45 または 50 サイクル

72℃.7min.

8 遺伝子 (H19、GTL2、ZAC、PEG1、PEG3、LIT1、SNRPN、ZDBF2) のメチル化プラスミド、非メチル化プラスミド、50%メチル化プラスミドすべてにおいて増幅開始 (曲線立ち上がり点) は同じであり、良好な増幅が確認された。

上記①、②、③の検討の結果、現時点では、溶液 1、アニーリング温度 58℃、サイクル数 45 サイクルにて良好な結果が得られている。ただし、対象領域によっては、Multiplex にて検出が難しいものもあり、引き続きプライマーの Tm 値などを調整し、設計する必要がある (図 1、2)。

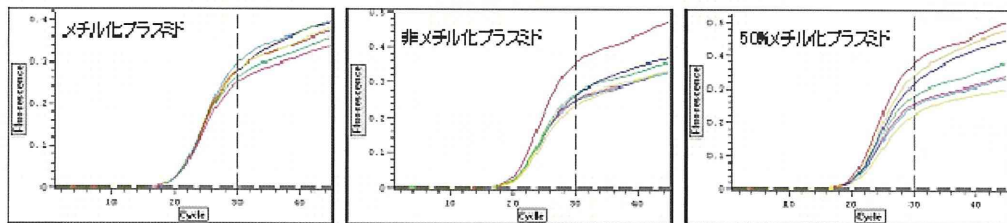


図 1 プラスミドを用いた Multiplex PCR 増幅産物

対象遺伝子 メチル化領域	H19				GTL2				ZAC		PEG1				
	領域1		領域2		領域1		領域2		領域1	領域2	領域1		領域2		
	メチル化 対応プ ローブ	非メチル 化対応プ ローブ	メチル化 対応プ ローブ	非メチル 化対応プ ローブ	メチル化 対応プ ローブ	非メチル 化対応プ ローブ	メチル化 対応プ ローブ	非メチル 化対応プ ローブ	メチル化 対応プ ローブ	非メチル 化対応プ ローブ	メチル化 対応プ ローブ	非メチル 化対応プ ローブ	メチル化 対応プ ローブ	非メチル 化対応プ ローブ	
カットオフ値	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	100	
メチル化プラスミド	H19	1229	62	689	129	61	89	105	83	97	64	79	74	87	46
非メチル化プラスミド	H19	37	560	54	512	30	74	99	75	71	59	81	75	61	39
50%メチル化プラスミド	H19	1063	325	529	309	62	94	137	104	111	82	138	103	119	73
メチル化プラスミド	GTL2	22	58	44	72	1598	131	986	247	77	45	70	60	66	46
非メチル化プラスミド	GTL2	47	69	61	100	61	1121	173	1285	77	60	89	78	86	59
50%メチル化プラスミド	GTL2	33	74	85	130	1263	607	822	767	83	56	90	79	82	50
メチル化プラスミド	ZAC	12	55	51	91	41	65	95	71	1752	55	69	50	49	34
非メチル化プラスミド	ZAC	21	62	63	97	42	77	85	92	75	802	71	76	60	38
50%メチル化プラスミド	ZAC	30	74	75	116	54	66	114	99	1139	442	119	93	105	53
メチル化プラスミド	PEG1	19	40	56	74	39	54	56	56	62	42	1135	71	4054	53
非メチル化プラスミド	PEG1	6	25	41	68	27	48	63	58	63	32	83	1946	238	346
50%メチル化プラスミド	PEG1	49	75	94	125	65	89	95	85	87	55	940	1348	4221	215
メチル化プラスミド	PEG3	14	45	52	48	51	73	76	81	69	35	76	55	38	32
非メチル化プラスミド	PEG3	41	43	41	97	35	52	91	73	60	55	84	70	60	62
50%メチル化プラスミド	PEG3	72	84	107	141	83	102	134	95	114	81	140	89	130	71
メチル化プラスミド	LIT1	14	49	48	98	38	75	96	63	62	47	90	75	74	43
非メチル化プラスミド	LIT1	49	64	95	148	63	70	127	87	85	71	116	84	112	45
50%メチル化プラスミド	LIT1	30	78	80	166	54	85	122	88	77	67	112	85	117	67
メチル化プラスミド	SNRPN	33	48	58	66	39	71	87	67	80	39	74	61	65	50
非メチル化プラスミド	SNRPN	36	58	48	101	50	67	83	68	70	51	65	103	66	52
50%メチル化プラスミド	SNRPN	31	67	68	105	59	82	108	71	64	61	78	85	109	36
陰性コントロール		30	39	56	76	34	71	92	71	66	37	67	72	66	38

図 2 メチル化および非メチル化プローブによる定量解析

3) 増幅産物と検出プローブおよび Luminex システムによる検出条件の検討

対象遺伝子領域のメチル化識別、メチル化率の測定を Luminex 法により実施するため、検出プローブ設計、反応液組成、反応条件の検討を行い、適正化を図った。

<結果>

プローブの Tm 値に加え、増幅の状況も考慮し、反応に用いる増幅産物量の検討、ハイブリダイゼーションおよび SA-PE 反応温度の検討を行った。プローブの Tm 値より、ハイブリダイゼーションおよび SA-PE 反応を 48℃、52℃に設定し検討した。また、反応に用いる増幅産物を原液、2 倍希釈液、5 倍希釈液、10 倍希釈液にて検討し非特異的な検出がなく良好に検出される増幅産物の量を特定した。

現時点では、反応溶液を変更する必要はなく、ハイブリダイゼーション、SA-PE 反応温度を 48℃で行うことで、良好な結果が得られている。ただし、対象領域によっては、蛍光値が低く、実際の検体を用いた場合に陽性、陰性の判別が困難になる可能性が高いため、引き続きプローブの Tm 値などを調整し、設計する必要がある。

4) ヒト精子を用いた Luminex システムによる蛍光値測定検討

蛍光強度により、メチル化の有無および率の測定が可能な測定系を検討した。

①開発した測定系の蛍光値の妥当性確認

②別法との比較検証

別法（バイサルファイトシーケンス法/COBRA 法）のデータを比較検証し、結果に乖離がないことを確認

③ヒト精子検体を用いた検証：

対象：精液（精液検査後の検体）・血液

登録：・不妊症男性（337名）

・顕微鏡検査：数、運動率、奇形率の測定

症例：・乏精子症と診断された患者（精子数×運動率<5x10⁶/mL）61例・中間群

（20-5x10⁶/mL）67例・正常精子を有する男性（>20x10⁶/mL）209例

従来法（COBRA 法）と比較し、COBRA 法が 90% 以上の場合、Luminex が 90% 以上の割合 95.5% で比較的安定な値が得られた。そのため、診断的カットオフ値を精子型では 90% 以上、卵子型では 15% 以下に設定したいと考えている。また、乏精子症患者に異常を認める割合が多い傾向が見られた。成果は論文発表している（図 4）。

<まとめ>

精子 DNA のバイサルファイト処理においては、EpiTect Bisulfite Kit の回収率が異常に高い。本キットでバイサルファイト処理を行った DNA 溶液には、DNA 以外に 260nm の吸光をもつ物質が含まれている可能性が否定できず、測定の際、これらの影響が懸念される。また、5~50ng の BS-DNA で良好な増幅が可能であったが、感度についてはさらにデータを取得する必要がある。また、EpiTect Bisulfite Kit にて処理を行った検体については、他のキットに比べ、増幅しにくい状態であることが判明したため、市販のキットを用いて処理を行う際には EZ DNA Methylation Kit または EZ DNA Methylation-Gold Kit を選定した。

D. 考察

(1) 男性不妊症患者

ART 出生児では、本来非常に稀であったインプリント異常を原因とする先天性インプリント異常症（Beckwith-Wiedemann 症候群：BWS（NIM130650）、Angelman 症候群：AS（NIM105830））の発症頻度が増加しているとの報告が数多くみられる。2010 年厚生労働科学研究費 難治性疾患克服研究事業「ゲノムインプリンティング異常症 5 疾患の実態把握に関する全国多施設共同研究」により、インプリント異常症（Beckwith-Wiedemann 症候群：BWS、Angelman 症候群：AS、Prader-Willi 症候群：PWS、Silver-Russell 症候群）：SRS）について ART との関連性を調査した。その結果、BWS、SRS の発症頻度は ART 出生児では

自然出生時の約 10 倍になり、その殆どは IVF、ICSI であった。また、インプリント遺伝子のメチル化異常は、先天性インプリント異常症を含む先天性疾患の原因となることが既に報告されている。このようにインプリント異常症の発症にはインプリント遺伝子のメチル化異常が関与していること、また前述のように ART 出生児でインプリント異常症発症の頻度が高いことを考慮すると、ART 時における配偶子のインプリント遺伝子のメチル化状態が、インプリント異常症の発症に関与している可能性が高い。また、これまでの研究結果より、男性不妊症、特に乏精子症でメチル化異常が多く認められていることから、男性不妊症患者に対し本検査を実施することで、ART に先立ちインプリント遺伝子のメチル化異常のないより質のよい精子を選別することができる。この精子を用いて ART を実施することにより、インプリント異常症の発症リスクを低減することが期待される。

(2) 不妊症カップルの男性

男性不妊は、不妊原因の約 40～50%を占める（女性因子 50%）。また、男性不妊症患者数は、過去 10 年間で 20 倍以上に増加している。不妊症カップルでは、通常原因検索として下記の検査を行う。男性不妊症の検査（ヒト精子検査）としては顕微鏡による形態的な評価（表 2）¹⁸⁾しか行わず、質的な検査は行われず、検査後破棄していた。形態学的検査で異常が認められなかった精子についても、インプリント遺伝子のメチル化異常がある可能性は十分に考えられ、これまで述べてきたインプリント異常症とインプリント遺伝子のメチル化異常との関係を考えると、質的な側面からも男性不妊症を診断することは臨床的に意義のあるものと考えられる。したがって、不妊症カップルの男性すべてについて、形態的検査後の精子を用いて、インプリント遺伝子の DNA メチル化を検査することは、男性不妊症を形態的及び質的の両側面から詳細に評価すること

ができ、結果的にインプリント異常症のリスクの評価を行うことが可能となる。

【対象患者として(1)を妥当と考える理由】

我が国は ART 先進国として、ART によるインプリント異常症の発症リスクを低減することが重要な課題となる。そのため、対象患者として (1)の男性不妊症患者とした場合、これまでの複数のエビデンスによりその有用性とニーズは高いと予想される。まず、適応範囲を(1)に限定し、その後、少数ではあるが、インプリント異常症と関連する(2)の不妊症カップルの男性に拡大していくことが妥当ではないかと考えている。

【その他：患者数からみた臨床的意義】

男性不妊症患者の精子質的検査法として開発し、受託解析から開始し、試料のキット販売へと展開する計画である。体外受精、顕微授精を受けている ART 受診者をターゲットにした場合、年間治療周期数およそ 25 万人の検査数が見込まれるため、(1)を対象とした場合でも市場性は十分であると考えられる。また、通常は、不妊症治療を受ける患者（全体で 466,900 人）は全て精液検査を行うため、ART 受診者以外にも市場は拡大し、受診者数は飛躍的に増加すると考える（(2)の場合）。(1)から(2)への適応拡大するのも可能であると考えている。

E.結論（見込まれる成果）

●新規ハイスループットメチル化解析システムの性能評価：

開発した Luminex 測定系の妥当性確認および従来法との比較検証を行い、乖離がないこと（10%以下）を検証する。

【1】DNA バイサルファイト処理の検討

メチルシトシンと、メチル化されていないシトシンを判別するために、バイサルファイト（亜硫酸塩）処理を行う必要がある。本研究では、バイサルファイト処理を効率化するための試薬の選定、工程の検討。

【2】対象となる8領域のDNA同時増幅の最適条件の検討

対象となる8つの遺伝子におけるメチル化領域を検出するためには、バイサルファイト後のDNAを増幅する必要がある。本研究では、対象8領域を同時に増幅(Multiplex PCR)することにより、増幅の試薬、条件等の最適化検討。

【3】ハイブリダイゼーションおよびLuminexシステムによる検出の検討

Multiplex PCRにて増幅したメチル化領域のうち、さらにメチル化部位(CpG部位)のみを検出する。本研究では、Luminexシステムにて対象8領域のメチル化部位を同時に検出するためのハイブリダイゼーション条件の最適化検討。

(今後の計画)

●治験実施戦略策定と臨床試験体制の構築：

東北大学臨床研究推進センターの支援を受け、臨床性能試験実施プロトコルの作成、各種調整事務、PMDAとの治験相談対応、治験審査委員会の開催の準備及び実施。

●Luminexメチル化診断法の試験：

①DNAバイサルファイト処理の検討

メチルシトシンと、メチル化されていないシトシンを判別するために、バイサルファイト(亜硫酸塩)処理を行う必要がある。バイサルファイト処理を効率化するための試薬の選定、工程の検討を実施。

②対象となる8領域のDNA同時増幅の最適条件の検討

対象となる8つの遺伝子におけるメチル化領域を検出するためには、バイサルファイト後のDNAを増幅する必要がある。対象8領域を同時に増幅(Multiplex PCR)することにより、増幅の試薬、条件等の最適化検討。

③ハイブリダイゼーションおよびLuminexシステムによる検出の検討

Multiplex PCRにて増幅したメチル化領域のうち、さらにメチル化部位(CpG部位)のみを検出した。Luminexシステムにて対象8領域のメチル化部位を同時に検出するためのハイブリダイゼーション条件の最適化を検討した。

●試薬の安定性試験：

①感度試験、特異性試験

メチル化、非メチル化を正確に測定可能であるか評価する。

②再現性確認試験

同じサンプルで8重測定を行い、常に同等の蛍光値が得られるか検討する。

機器間差、試薬ロット差、日間差について検討する。

③保存安定性確認試験

試薬製造直後から保存1年後までのデータを取得し、安定性について評価する。

●先天性GI異常症患者血液を用いた解析：

これまでに約100例の患者検体を収集し、従来法でメチル化診断実施済。最適化の検討を加えたLuminex測定系を用いメチル化解析を行い、本システムの妥当性について最終的な検討を実施。

●臨床治験(性能試験)の実施：

東北大学病院産婦人科および関連病院を受診し、IVF-ETやICSI等のART治療を受けた出生児(目標:200症例/2年間)と、自然分娩児(目標:400症例/2年間)を対象とする。分娩直後の臍帯血を、約1mlを採取し解析。症例は、不妊原因、治療法等で分類する。年齢、既往歴、生活歴、常用薬等の患者情報も登録。

●治験実施戦略策定と臨床研究体制の構築：

東北大学臨床研究推進センターの支援を受け、臨床性能試験実施プロトコルの作成、各種調整事務、PMDAとの臨床性能試験相談対応、倫理委員会の開催の準備及び実施。

●先天性 GI 異常症患者血液を用いた解析：

これまでに約 50 例の患者検体を収集し、従来法でメチル化診断実施済。最適化の検討を加えた Luminex 測定系を用いメチル化解析を行い、本システムの妥当性について最終的な検討を実施。

●解析結果の評価と産婦人科委員会報告：

Luminex による DNA メチル化解析より、異常の頻度、程度、影響を受けやすい遺伝子の有無の検討を行う。また、ART 治療法、不妊治療歴などの患者情報を基に分類し、評価する。日本産婦人科不妊治療のガイドラインの作成委員会に成果報告。

●実用化に向けた取り組み：

特許調査や市場調査など、事業化へと展開。

	H26	H27	H28	H29
品質関連事項				
試験物の至適条件の検討 (性能評価、他法との比較検証)	←→ 東北大学/G&Gサイエンス		1. 精子DNAのバイサルファイト処理の検討 2. 対象となる8領域のDNA同時増幅の検討 3. Luminexシステムによる検出条件の検討	
非臨床試験関連事項				
安定性試験 (感度、安定性、再現性の再確認)	←→	受託解析準備	受託事業開始	
臨床試験関連事項				
治療実施戦略策定 (薬事開発戦略、PMDA事前相談)		東北大学病院 臨床研究推進センターの支援		
プロトコル作成		←→		
治験実施			←→	
規制当局対応事項				
治験相談		←→		
治験審査委員会 等			←→	
事業性関連事項				
特許調査 (特許性、周辺・応用特許)		←→		
仕様検討 (ソフトウェアの開発)		←→		市場調査 → 試薬キット販売

開発スケジュール (ロードマップ)

健康危険情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

1. 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.** 23(4), 992-1001, 2014.
2. Hiura H, Okae H, Chiba H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Arima T. Imprinting methylation errors in ART. **Reproductive Medicine and Biology.** 13(4),193-202.2014.
3. Kitamura A, Hiura H, Miyauchi N, Okae H, Chiba H, Arima T. DNA methylation errors in imprinting disorders and male infertility. Congenital Anomalies. The Japanese teratology society. Invited Review.
4. Okae H, Chiba H, Hiura H, Hamada H, Sato A, Utsunomiya T, Kikuchi H, Yoshida H, Tanaka A, Suyama M, Arima T. Genome-wide analysis of DNA methylation dynamics during early human development. **PLOS Genetics.** 10(12): e1004868.2014.
5. 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.
6. 千葉初音、有馬隆博、生殖補助医療と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 249(1), 49-54. 2014.
7. 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の産業応用、株式会社シーエムシー出版 280-288 2014.

2.学会発表

1. 第 84 回日本衛生学会学術総会「臍帯血赤血球中の ω 3 系不飽和脂肪酸レベルと出生児の各種指標との関連 Association of omega-3 polyunsaturated fatty acids in cord blood red cells with neonatal outcome.」 仲井邦彦、齋藤彰治、

龍田希、下田和美、川端輝江、水野聖士、木村ふみ子、宮澤陽夫、有馬隆博、八重樫伸生、岡山 (5/25/2014-5/27/2014)

2. 第 28 回環境ホルモン学会講演会「エピゲノム変異に着目した環境由来化学物質の男性精子への影響に関する症例対照研究」有馬隆博、東京 (6/19/2014)
3. 東北大学災害科学国際研究所
平成 25 年度特定プロジェクト研究成果報告会「大規模震災後の胎児、新生児への健康影響に関するゲノムコホート研究と妊婦のメンタルヘルスケア」有馬隆博、仙台 (7/13/2014)
4. 第 54 回日本先天異常学会「発生期における化学物質暴露による中枢神経の異常」有馬隆博、神奈川 (7/26/2014)
5. 第 31 回日本受精着床学会総会・学術講演会「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスと 4 疾患」有馬隆博、東京 (7/31/2014)
6. 第 35 回不妊カウンセラー・体外受精コーディネーター養成講座「生殖医療とエピジェネティクス」有馬隆博、東京(10/4/2014)
7. 第 11 回 ART 生涯研修コース(日本受精着床学会)「ヒト胚発生におけるエピジェネティクスの変調」有馬隆博、東京 (3/8/2015)
8. 第 11 回 ART 生涯研修コース(日本受精着床学会)「ヒト胚発生におけるエピジェネティクスの変調」有馬隆博、東京 (3/8/2015)

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

PMDA 開発前相談：2 回 (6/11/2014、7/16/2014)

PMDA 対面助言：1 回 (11/11/2014)

