

分担課題: 流産のエピジェネティックな異常の解析

研究分担者 秦健一郎 国立成育医療センター研究所周産期病態研究部 部長

研究要旨

DNA メチル化やヒストンのメチル化をはじめとするエピジェネティックな遺伝子発現制御は、哺乳類の発生と生存に必須の機構である。エピジェネティックな異常は、細胞分裂を通じて安定して伝搬する為、一見通常の遺伝子変異と変わらないが、実際には遺伝子配列の変異を伴わない為、従来の遺伝学的解析では同定することができない。ゲノムインプリンティングは、DNA メチル化によって制御されるエピジェネティックな生命現象であるが、インプリンティングが破綻すると、ヒトでもマウスでも、胎盤形成異常を伴った胎児発生発育異常が観察される。これらの状況証拠から、DNA メチル化による遺伝子発現制御は、初期の絨毛発生分化に特別な役割を担っていると推測されている。

流産には、明らかな成因が同定できない症例が多数含まれており、およそ半数は正常核型とされている。これらの症例には、未知の微細な染色体異常あるいはエピジェネティックな異常が含まれていると考えられるが、系統的な解析は行われていない。

本分担研究計画では、異なる染色体上に散在し、DNA メチル化によって周囲の遺伝子発現を制御し、胎児や胎盤の発生発育に関わることが示されている領域(既知のインプリンティング遺伝子関連メチル化領域全て)と、反復配列、X 染色体、胎盤特異的非メチル化遺伝子領域を含む合計 32 箇所を標的に、定量的かつ半網羅的なメチル化解析法を確立した。

現在までに流産症例合計 59 例の DNA メチル化スクリーニングを行い、7 症例で DNA メチル化異常候補領域を同定した。今後は、多数検体の解析から、さらに正確なエピジェネティックな多様性(標準値)を確定するとともに、検出された DNA メチル化異常候補領域の詳細な解析と、さらに網羅的な解析を行い、流産発症との関連を検証する。多領域の厳密な定量解析は、現在まで本研究の他に報告が無く、病態と直結した DNA メチル化異常を同定し、診断への応用へと結びつけるにとどまらず、ヒト疾患のエピゲノム診断の嚆矢とし今後の予防法や安全性確保の指針に、全く新しい観点から有用な知見をもたらす事が期待される。

A. 研究目的

ヒトゲノムシーケンスプロジェクトの完了により、ほぼ全ての遺伝子配列が明らかになり、遺伝学的な異常を同定する技術(ジェネティックな異常の解析技術)が飛躍的に進歩した。一方で、遺伝子配列の異常(ジェネティックな異常)だけでは説明できない疾患の存在も明らかになった。

DNA メチル化をはじめとするエピジェネティックな遺伝子発現制御機構は、記念特に疾患や発生異常との因果関係が明らかにされてきており、従

来の解析手法(ジェネティックな解析手法)を超えたポストゲノムシーケンス時代の重要な医学研究領域として注目が高まっている。

特にエピジェネティックな生命現象の一つであるゲノムインプリンティングの破綻は、ヒトの発生異常と密接な関わりを持つことが知られている。いくつかのヒト先天性奇形症候群では、ゲノムインプリンティングの破綻がその原因であることが知られている。また、モデル生物の詳細な解析から、エピジェネティックな異常やゲノムインプリンテ

イングの破綻は、胎盤の発生分化異常を引き起こすことが示された。さらに最近、生殖補助医療後の出生児で、インプリンティング異常症が高頻度で発生する可能性が示唆された。しかし、流産におけるエピジェネティックな異常は系統的網羅的に解析されておらず、そもそもヒト正常発生を参考とした正常値も定義されるに至っていない。

一方で、流産症例を細胞遺伝学的に解析した報告は多数存在するが、およそ半数の症例では明らかな染色体構造異常を認めない。本研究は、従来の解析技術では検出できないエピジェネティックな異常、特に絨毛の発生分化に深く関与しているインプリンティング遺伝子領域の DNA メチル化状態に注目し、1)ヒト絨毛組織の DNA メチル化状態を網羅的かつ定量的に解析する手法を独自に確立し、2)流産症例の DNA メチル化異常の有無を解析することで、流産の未知の病因病態を解明し、診断治療へと発展させる事を目的とする。

B. 研究方法

1. 解析標的領域の決定

現在までにヒトで報告されている DMR (Differentially Methylated Region: 父由来と母由来の対立遺伝子間で DNA メチル化の状態が異なり、片親性発現すなわちゲノムインプリンティング現象に必要な領域) 全てを、文献的に検索した。また、ヒトでは報告されていないが、マウス DMR との配列相同性からヒトでも DMR であると予想される領域を決定し、これらが DMR である事を正常血液(リンパ球)および正常胎盤由来のゲノム DNA を用いて検証した。また、胎盤特異的な DNA メチル化を受ける領域、X 染色体上の DNA メチル化領域も併せ、合計 32 ヶ所を解析対象領域とした。

2. COBRA 条件検討

上記の領域を、COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis) 法により解析するための条件検討を行った。実際に解析を行う配列領域は、PCR 法による増幅の際に偏りが無く効率的な反応が起こるように、増幅産物長は約 500bp 以下になるよう設定した。また、増幅産物を特定の制限酵素で切断する必要があるため、領域内に適切な制限酵素認識配列を有する配列が存在する事も必須である。解析するゲノム DNA は、bisulfite 変換により非メチル化シトシンがウラン

ルに変換されるため、本来 4 種類の DNA で構成されるゲノム配列が、ほぼ 3 種類で構成される配列に変換される。このため、PCR の為のプライマー設計の自由度が格段に狭められると共に、特異的な増幅を行う為には、徹底した事前の条件設定が必要である。一方で、解析をハイスループット化する為に、PCR の反応条件は可能な限り統一した。これらの条件を満たしつつ、非特異的増幅を起こさない PCR 条件を確立し、決定した。

3. 電気泳動

一般的に COBRA 法では、アガロースゲルやポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動を行い、得られる泳動像から半定量的な解析を行うが、我々の事前検討では、従来の解析法はダイナミックレンジが低く、定量性が劣る事が判明した。そこで我々は、測定値の定量性を厳密に担保するために、キャピラリー電気泳動法を採用した。

4. 倫理面への配慮

倫理面においてはヒトゲノム・遺伝子に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針、臨床研究に関する指針を遵守する。また本研究内容は、報告者の所属する機関の倫理委員会の承認を受けている(国立成育医療センター倫理委員会承認番号 234)。

C. 研究結果

初年度は主に解析条件の検討を行い、初年度から本年度にかけて、正常検体(正常成人末梢血、正常絨毛組織)を用いた網羅的 DNA メチル化解析を行った。これらのデータから、末梢血リンパ球と正常絨毛組織における DNA メチル化状態正常値を定義した。

次年度は、初年度に確立した解析手法を用い、すでに収集されていた習慣流産 30 症例の解析を行った。最終年度は、本研究班分担研究者である名古屋市立大学産婦人科杉浦真弓教授のご協力により収集した流産 29 検体を解析した。以下の D. 考察と E. 結論の中で、結果の詳細も併せて述べる。

D. 考察

DNA メチル化を初めとするエピジェネティックなゲノム機能の制御は、発生と生存に必須の機構

であると共に、様々な疾患との関連が指摘されている。我々は、特に胎盤(絨毛)の発生分化に関与することが知られている DNA メチル化領域(インプリンティング遺伝子の発現制御に関わる特殊な DNA メチル化領域)を網羅的に解析した。「B. 研究方法」の項でも触れたように、我々は、既に報告されているヒトの DMR を全て網羅すると共に、ヒトではまだ報告されていないが、マウス配列との相同性検索により、少なくとも4箇所の新規ヒト DMR を同定し、解析系に組み込んだ。同様の網羅的解析を行った報告は前例が無く、我々が独自に解析・定義した DNA メチル化状態の「正常値」を用い、習慣流産症例の解析を行った。昨年度も報告したように、この手法は、先天奇形症候群(これらの症例では、DNA メチル化異常を伴っている事が確認されている)を解析した例では、従来の定性的な解析法と矛盾の無い、正確な診断が可能であった。大変興味深い事に、今回我々が行った解析結果を元に、きわめてその正確性を検証済みである。またこの検証過程で、稀な発生異常である母ゲノムダイソミーモザイク症例と、父ゲノム代祖ミーモザイク症例を同定する事に成功した。すなわち、我々の分子診断系は、1)分子診断に実用可能であり、しかも、2)今まで見逃されていた未知の病態を同定できる。

これまでにを行った合計 59 症例の解析からは、少なくとも7症例に、合計 20 箇所の DNA メチル化異常が同定された。そのうち遺伝的に独立した2症例では、*H19* 遺伝子と呼ばれる領域の DNA メチル化異常が認められた。*H19* 遺伝子の発現異常や DNA メチル化異常は、胎盤発生異常に関与することが動物実験等からも示されており、流産という症状との直接の因果関係が疑われる。その他の例では、異なる染色体上に存在する複数の領域で DNA メチル化異常が検出され、受精後に何らかの系統的な DNA メチル化維持の破綻が起こった事が推測される。

以上のように、これまでの解析結果から、1)一部の流産絨毛検体には DNA メチル化異常が確かに存在し、2)共通のエピジェネティックな病因もしくは病態を有する症例が存在する可能性が示唆された。3)また、複数領域を網羅的に解析することで、その発生源や分子病態の推測が可能であることが期待された。

我々は現在この手技手法を他の疾患解析へも応用展開すべく、研究を進めている。具体的に

は、胎児発育不全症例および妊娠高血圧症候群症例、合計 130 症例の胎盤・臍帯血について 25 箇所の DMR のメチル化を定量解析した結果、27 症例(20%)の胎盤において、一箇所あるいは複数箇所の DMR における DNA メチル化異常が検出された。更に、胎盤と臍帯血におけるメチル化レベルの比較から、同定されたメチル化異常の大半は胎盤特異的であることが明らかになった。これらの結果は、胎盤における DMR のメチル化異常が一部の異常妊娠の病因となっている可能性を示唆している。

E. 結論

我々の DNA メチル化異常スクリーニング系は、分子診断法として実用性がある。また、網羅的なメチル化異常解析を行うことで、従来見逃されていた分子病態を同定することが可能である。流産絨毛組織合計 59 検体を用いた解析で、合計 7 症例の DNA メチル化異常を同定した。これらの症例は、従来の解析手法ではいずれも「原因不明の習慣流産」であるが、我々の解析から異なる DNA メチル化状態の破綻を呈しており、各々の症例に固有の分子病態が存在することが示唆された。今後さらに多数の症例をスクリーニングすると共に、ビーズアレイによるゲノム全域約 27,000 箇所のプロモーター領域メチル化解析、個別領域の詳細な解析を併せて行い、未知の分子病態の解明を行う。

今後これらの基盤的知見は、流産の解析に止まらず、前述のように胎児発育遅延や妊娠高血圧症候群の病因病態解析、あるいは生殖補助医療の初期胚に対する影響の有無といった分野への応用展開も期待される。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tomizawa SI, Kobayashi H, Watanabe T, Andrews S, Hata K, Kelsey G, Sasaki H. Development. Dynamic stage-specific changes in imprinted differentially methylated regions during early mammalian development and prevalence of non-CpG

- methylation in oocytes. 2011 Jan 19. [Epub ahead of print]
- 2) Yamazawa K, Nakabayashi K, Matsuoka K, Masubara K, Hata K, Horikawa R, Ogata T. *J Hum Genet. Androgenetic/biparental mosaicism in a girl with Beckwith–Wiedemann syndrome-like and upd(14)pat-like phenotypes.* 2010 Nov 11. [Epub ahead of print]
 - 3) 秦健一郎 (2010)「胎児発育とゲノムインプリンティング」*HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY* 17, 43–48.
 - 4) Takashima, S., Takehashi, M., Lee, J., Chuma, S., Okano, M., Hata, K., Suetake, I., Nakatsuji, N., Miyoshi, H., Tajima, S., Tanaka, Y., Toyokuni, S., Sasaki, H., Kanatsu-Shinohara, M. and Shinohara, T. (2009) Abnormal DNA methyltransferase expression in mouse germline stem cells results in spermatogenic defects. *Biol Reprod.* **81**, 155–164.
 - 5) Shoji, M., Tanaka, T., Hosokawa, M., Reuter, M., Stark, A., Kato, Y., Kondoh, G., Okawa, K., Chujo, T., Suzuki, T., Hata, K., Martin, S. L., Noce, T., Kuramochi–Miyagawa, S., Nakano, T., Sasaki, H., Pillai, R. S., Nakatsuji, N. and Chuma, S. (2009) The TDRD9–MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline. *Dev Cell.* **17**, 775–787.
 - 6) Kobayashi, H., Yamada, K., Morita, S., Hiura, H., Fukuda, A., Kagami, M., Ogata, T., Hata, K., Sotomaru, Y. and Kono, T. (2009) Identification of the mouse paternally expressed imprinted gene *Zdbf2* on chromosome 1 and its imprinted human homolog *ZDBF2* on chromosome 2. *Genomics.* **93**, 461–472.
 - 7) Henckel, A., Nakabayashi, K., Sanz, L. A., Feil, R., Hata, K. and Arnaud, P. (2009) Histone methylation is mechanistically linked to DNA methylation at imprinting control regions in mammals. *Hum Mol Genet.* **18**, 3375–3383.
 - 8) 秦健一郎 (2009)「DNA メチル化の網羅的解析」*医学のあゆみ* 230, 553–554.
 - 9) Kuramochi–Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Totoki Y, Toyoda A, Ikawa M, Asada N, Kojima K, Yamaguchi Y, Ijiri TW, Hata K, Li E, Matsuda Y, Kimura T, Okabe M, Sakaki Y, Sasaki H, Nakano T. (2008). DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes Dev* 22, 908–917.
 - 10) Hu YG, Hirasawa R, Hu JL, Hata K, Li CL, Jin Y, Chen T, Li E, Rigolet M, Viegas–Pequignot E, Sasaki H, Xu GL (2008). Regulation of DNA methylation activity through Dnmt3L promoter methylation by Dnmt3 enzymes in embryonic development. *Hum Mol Genet* 17, 2654–2664.
 - 11) Kobayashi H, Yamada K, Morita S, Hiura H, Fukuda A, Kagami M, Ogata T, Hata K, Sotomaru Y, Kono T.(2009) Identification of the mouse paternally expressed imprinted gene *Zdbf2* on chromosome 1 and its imprinted human homolog *ZDBF2* on chromosome 2. *Genomics* 93, 461–472.
 - 12) 久須美真紀、中林一彦、秦健一郎 (2008). 体外培養・長期培養の胚発生への影響：動物実験と臨床データから。 *J Mammal Ova Res* 25, 221–230.
 - 13) 秦健一郎 (2008). 死産の動物モデル。 *産科と婦人科* 75, 419–425.
- ## 2. 学会発表
- 1) 秦健一郎「生殖に関わるエピジェネティクスとその異常」教育講演、日本生殖医学会、徳島、11月12日、2010.
 - 2) 秦健一郎「ヒト発生異常のエピジェネティクス」胎生期エピジェネティクス研究会、東京、6月17日、2009.
 - 3) 秦健一郎「胎児・胎盤分化発育異常のエピジェネティクス —網羅的ゲノム・エピゲノム解析の試み—」日本周産期新生児学会ワークショップ不育症の新たな原因探索と治療、第45回日本周産期・新生児医学会学術集会、横浜、7月12日、2009.
 - 4) 秦健一郎「異常妊娠の epigenetics」第50回日本哺乳動物卵子学会ワークショップ、東京、5月9日、2009.
 - 5) Kenichiro Hata. “ Roles of genomic imprinting in reproduction”, The 7th Conference of the Pacific Rim Society for Fertility and Sterility, Taipei, August 22, 2009.
 - 6) Keichiro Hata. “ Epigenetics in abnormal pregnancies”, The 7th Conference of the

Pacific Rim Society for Fertility and Sterility,
Taipei, August 22, 2009. シンポジウム

- 7) 秦 健一郎「異常妊娠のエピジェネティクス」
日本人類遺伝学会第53回大会、周産期遺
伝学の現状と展望－生殖医療と遺伝をめぐ
って－、横浜、9月28日、2008.
- 8) 特別講演 秦 健一郎、「生殖機構のエピジェ
ネティクス」大阪大学蛋白質研究所セミナー
大阪、11月28日、2008.
- 9) Kenichiro Hata, “Characterization of DNA
methylation in abnormal pregnancies”, Inter-
national symposium Decoding Epigenetic
Code, Tokyo, December 15, 2008.
- 10) 秦 健一郎, 「異常妊娠のゲノム・エピゲノム
解析」日本生殖再生医学会第3回学術集
会、東京、3月30日、2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Totoki Y, Toyoda A, Ikawa M, Asada N, Kojima K, Yamaguchi Y, Ijiri TW, <u>Hata K</u> , Li E, Matsuda Y, Kimura T, Okabe M, Sakaki Y, Sasaki H, Nakano T.	DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes.	Genes Dev	22	908-917	2008
Hu YG, Hirasawa R, Hu JL, <u>Hata K</u> , Li CL, Jin Y, Chen T, Li E, Rigolet M, Viegas-Pequignot E, Sasaki H, Xu GL	Regulation of DNA methylation activity through Dnmt3L promoter methylation by Dnmt3 enzymes in embryonic development.	Hum Mol Genet	17	2654-2664	2008
久須美真紀、中林一彦、 <u>秦健一郎</u>	体外培養・長期培養の胚発生への影響：動物実験と臨床データから。	J Mammal Ova Res	25	221-230	2008
<u>秦健一郎</u>	死産の動物モデル	産科と婦人科	75	419-425	2008
Takashima, S., Takehashi, M., Lee, J., Chuma, S., Okano, M., <u>Hata, K.</u> , Suetake, I., Nakatsuji, N., Miyoshi, H., Tajima, S., Tanaka, Y., Toyokuni, S., Sasaki, H., Kanatsu-Shinohara, M. and Shinohara, T.	Abnormal DNA methyltransferase expression in mouse germline stem cells results in spermatogenic defects.	Biol Reprod.	81	155-164.	2009
Shoji, M., Tanaka, T., Hosokawa, M., Reuter, M., Stark, A., Kato, Y., Kondoh, G., Okawa, K., Chujo, T., Suzuki, T., <u>Hata, K.</u> , Martin, S. L., Noce, T., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Sasaki, H., Pillai, R. S., Nakatsuji, N. and Chuma, S.	The TDRD9-MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline.	Dev Cell.	17	775-787	2009

Kobayashi, H., Yamada, K., Morita, S., Hiura, H., Fukuda, A., Kagami, M., Ogata, T., <u>Hata, K.</u> , Sotomaru, Y. and Kono, T.	Identification of the mouse paternally expressed imprinted gene Zdbf2 on chromosome 1 and its imprinted human homolog ZDBF2 on chromosome 2.	Genomics.	93	461-472.	2009
Henckel, A., Nakabayashi, K., Sanz, L. A., Feil, R., <u>Hata, K.</u> and Arnaud, P.	Histone methylation is mechanistically linked to DNA methylation at imprinting control regions in mammals.	Hum Mol Genet.	18	3375-3383	2009
<u>秦健一郎</u>	DNAメチル化の網羅的解析	医学のあゆみ	230	553-554	2009
<u>秦健一郎</u>	胎児発育とゲノムインプリンティング	HORMONE FRONTIER IN GY7NECOLOGY	17	43-48	2010
Tomizawa SI, Kobayashi H, Watanabe T, Andrews S, <u>Hata K</u> , Kelsey G, Sasaki H.	Dynamic stage-specific changes in imprinted differentially methylated regions during early mammalian development and prevalence of non-CpG methylation in oocytes.	Development		in press	2010
Yamazawa K, Nakabayashi K, Matsuoka K, Masubara K, <u>Hata K</u> , Horikawa R, Ogata T	Androgenetic/biparental mosaicism in a girl with Beckwith-Wiedemann syndrome-like and upd(14)pat-like phenotypes.	J Hum Genet.		in press	2010