

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）  
分担研究報告書

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、一見遺伝子変異に伴う異常と類似しているにもかかわらず、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代表的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、明らかな成因为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、様々な機構によってDNA メチル化され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、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。

現在までに合計流産症例 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、検出された DNA メチル化異常候補領域の詳細な解析を行い、発症機序の推定を含めた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、DNA メチル化異常の成立機序（成立時期や作用因子）を同定するためのより詳細な情報が得られ、今後の予防法や安全性確保の指針に有用な知見をもたらす事が期待される。

A. 研究目的

ヒトゲノムシークエ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クエ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ィングの破綻は、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に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シ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・遺伝子研究に関する倫理指針、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、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。

本法を用い、すでに収集されていた習慣流産 30 症例の解析を行った。また、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、流産 29 検体を解析中である。これらの結果については、以下の考察と結論の中で詳細を述べる。

## 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。今回我々は、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、既知のもの全てと、我々が新たに見出した領域 (論文未発表) について網羅的に解析した。「B. 研究方法」の項でも触れたように、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。

最初に行った習慣流産 30 症例の解析は、昨年報告したように、合計 5 例のメチル化異常候補症例を同定したが、そのうち 3 例は、遺伝学的に独立した症例であるにもかかわらず、同じゲノム領域で同様の DNA メチル化異常を呈し、ゲノム全体の DNA メチル化パターンが極めて類似していた。本年度新たに分担研究者杉浦から得た 29 症例の解析では、2 例のメチル化異常が見出された。その一例は、昨年度報告した症例と同様に、*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* 領域は、メチル化異常の起こりやすい領域、いわゆるホットスポットである可能性が示唆される。また、*H19* 領域の異常は、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。

他の一例は、異なる染色体上に存在する複数の領域でメチル化異常が検出された。また、これらの領域のメチル化状態確立・維持のタイミングは異なっていることから、偶発的散発的なメチル化異常が、精子と卵子で別個に起こっていたとは考えがたい。すなわち、受精後に、系統的な DNA メチル化状態の維持に何らかの破綻をきたしていた可能性が示唆される。

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る。3) また、複数領域を網羅的に解析することで、その発生起源や分子病態の推測が可能であることが期待された。

## 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。昨年度から本年度の流産純毛合計 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解析すると共に、特に詳細な解析が必要と考えられる症例は、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を行い、未知の分子病態の解明を行う。

## F. 健康危険情報

該当せず。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.

- 3) 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.
  - 4) 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.
  - 5) 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.
2. 学会発表
- 1) 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.
  - 2) 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.
  - 3) 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.
  - 4) Kenichiro Hata. " Roles of genomic imprinting in reproduction", The 7th Conference of the Pacific Rim Society for Fertility and Sterility, Taipei, August 22, 2009.
  - 5) Keichiro Hata. " Epigenetics in abnormal pregnancies", The 7th Conference of the Pacific Rim Society for Fertility and Sterility, Taipei, August 22, 2009.

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
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. 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. 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. 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> 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