

分担課題：流産のDNAメチル化解析

研究分担者 秦 健一郎 国立成育医療センター周産期病態研究部部長

#### 研究要旨

DNAメチル化をはじめとするエピジェネティックなゲノム機能制御は、哺乳類の発生と生存に必須の機構である。その破綻による代表的疾患のゲノムインプリンティング異常症では、胎盤形成異常が認められる。また、DNAメチル化異常によりゲノムインプリンティングを失わせたモデルマウスは胎盤の分化異常を呈し、胎仔は全例致死である。様々な生物種の解析から、DNAメチル化によるゲノムインプリンティング制御は、胎盤の獲得と進化的に密接に関連していると考えられており、これらの状況証拠を考え併せると、DNAメチル化による遺伝子発現制御は、ヒトでも同様に、胎盤の発生分化において特別な役割を担っていることが予想される。

流産には、明らかな成因を同定できない症例が多数含まれ、およそ半数はジェネティックな異常（染色体構造異常）を認めないとされている。しかしこれらの症例の、エピジェネティックな異常の有無は系統的に解析されるに至っていない。

そこで我々は、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27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。

本解析法により、多領域を厳密に定量解析する事で、診断に直結するDNAメチル化異常のみならず、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必須の知見をもたらす。

さらに本解析法は、あらゆる疾患のメチル化異常スクリーニングに直ちに転用可能であり、ポストゲノムの重要な医学研究分野であるヒトエピゲノム研究に資する技術である。

#### A. 研究目的

ヒトゲノムプロジェクトの完了により、遺伝子配列が全て明らかとなり、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ゲノム制御機構と疾患や発生異常との関連は、近年特に様々な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。

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、実際にヒトの先天性疾患の原因であることが明らかになっている。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の発症率が上昇する可能性を懸念する報告がなされた。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明らかな染色体構造異常を認めない。（細胞遺伝学的な解析では）

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、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。

(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

上記のような (PCR 条件、電気泳動など)、実験手法そのものに起因する避け難い実験誤差は、事前の条件検討によって検討できたが、実際に検体の解析を始めるにあたり、正常検体由来ゲノム DNA を実際に用いて、検体間および検者間差を生じやすい因子の同定 (ゲノム DNA の精製法、テンプレート量、制限酵素処理過程の DNA 量、泳動量などの各実験操作) を行った。これらの知見を加味し、観測値の偏りを極力排除するための実践的な解析プロトコルを確立した。

正常ヒト胎盤ゲノム DNA および正常成人末梢血リンパ球ゲノム DNA を用い、本解析系による試験解析を行った。当初解析を予定していた DMR 中には、文献的には DMR と報告されていたが我々の検討では DMR である証拠が得られなかった領域が含まれていた。また、少なくとも胎盤組織で DMR を形成していないと考えられる (組織特異性があると考えられる) 領域が存在した。これらの領域は網羅的解析系から除き、最終的に 24 箇所の DMR、X 染色体 1 領域、反復配列 2 種類、合計 27 領域に対する DNA メチル化解析系を確立した。本法を用い、すでに収集されていた習慣流産 29 症例の解析を行った。また、すでに診断の確定していた子宮内胎児発育遅延を合併する先天奇形症候群症例を終了させた。現在本研究班員の協力により、流産 10 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。多くの報告では、疾患と正常対照群を用いて、疾患関連候補因子遺伝子の周辺ゲノム領域のみに着目した DNA メチル化解析が行われている。このためそもそも、正常集団中での DNA メチル化状態の分散度は検討されておらず、所謂

正常値も明らかでない。

今回我々は、DNA メチル化状態を網羅的かつ定量的に解析する系を確立した。この系では、既知の疾患関連領域以外の領域も同時に解析する事が可能である。既に確定診断されていた先天奇形症候群（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、きわめて稀な発生異常である母ゲノムダイソミーモザイク症例を同定する事に成功した。通常これらの疾患に対して行われている分子診断法では、限定されたゲノム領域の DNA メチル化状態を定性的に解析するのみであるため、母ゲノムダイソミーで観察されるような全ゲノム領域の DNA メチル化異常が存在したとしても、気づかれる事はない。しかし前述のように、我々が確立した診断系は、全ゲノム領域を網羅的に解析する為、通常見逃される DNA メチル化異常が検出され、この稀少症例を同定する事ができた。このように、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) ゲノム網羅的解析により未知の病態を同定できる、という当初の目標を達成可能である事が、実際のヒト発生異常症例を用いて証明された。

習慣流産 29 症例の解析では、複数の症例で、DNA メチル化異常を疑う所見が得られている。しかもそのうち 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。これらの結果からは、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。現在、本研究班員の協力を得て、更に解析症例数を増やしている。

#### E. 結論

我々の DNA メチル化異常スクリーニング系は、正確な分子診断法として実用性がある。試験的解析ですでに流産純毛検体の DNA メチル化異常を同定しているが、今後さらに多数の症例を解析する事により、流産と DNA メチル化異常との関連が明らかになる

ことが期待される。また、多数の正常対照群を解析することで、正常ヒト絨毛組織発生分化過程における DNA メチル化のリファレンスデータ取得といった、様々な類似の研究の発展に必須の重要な知見が得られる事が期待される。また我々の解析系は、あらゆる疾患の DNA メチル化異常スクリーニングにそのまま転用することが可能であり、ポストゲノムアプローチによる医学研究に様々な貢献が出来る技術である。

#### F. 健康危険情報 特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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. : DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes. Dev.* 22: 908-917, 2008.
- 2) 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. : Regulation of DNA methylation activity through Dnmt3L promoter methylation by Dnmt3 enzymes in embryonic development. *Hum. Mol. Genet.* 17:2654-2664, 2008.
- 3) Kobayashi H., Yamada K., Morita S., Hiura H., Fukuda A., Kagami M., Ogata T., Hata K., 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.* in press.

##### [総説 (和文)]

- 1) 久須美真紀, 中林一彦, 秦健一郎: 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.
- 2) 秦健一郎: 死産の動物モデル. *産科と婦人科.* 75:419-425, 2008.

2. 学会発表

[特別講演・シンポジウム]

シンポジウム

- 1) 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－. 2008年9月28日. 横浜. 特別講演
- 2) 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 2008年11月28日. 大阪.
- 3) Hata K:Characterization of DNA methylation in abnormal pregnancies. International symposium Decoding Epigenetic Code. December 15, 2008, Tokyo,  
[一般演題発表]  
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. 2008年3月30日. 東京.

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
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.		in press	
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