

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15592

研究課題名(和文) ヒト生殖細胞におけるメチローム制御機構の解明

研究課題名(英文) DNA methylation analyses in the human placenta cells

研究代表者

有馬 隆博 (Arima, Takahiro)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80253532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：胎盤と胎児は、同じの受精卵に由来し、同じゲノムDNA情報を持ちながらも、DNAメチル化修飾は全く異なる。このメチル化の異常は、流産、生活習慣病、癌などの発症に関連する。本研究では、ヒト正常精子、卵子が受精卵を経て胎盤へと分化する過程で、DNAメチル化がどのように変化するのかを明らかにすることを目的とした。ヒト検体を用い、全ゲノムメチローム解析を行った。その結果、ヒトでは受精卵におけるDNAメチル化の脱メチル化が不完全で、卵子のDNAメチル化情報の一部が胎盤に引き継がれていることが判明した。この現象は、マウスとは異なり、ヒト特異的な遺伝子発現制御機構が働くことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Placental is common as the interface between mother and fetus to obtain nutrients essential for embryonic growth and gene expression is regulated by epigenetic mechanism. DNA methylation is a kind of epigenetic factors and globally reprogrammed after fertilization. Genomic imprinting is also leads to parent-of-origin specific mono-allelic expression of certain genes by DNA methylation (DMR). In this study, we performed genome-wide allelic DNA methylation analyses of human germ cells, blastocyst and purified trophoblast cells from placentas. We found that incomplete demethylation in blastocyst. RNA sequencing-based allelic expression analyses revealed that some of the placenta-specific maternal DMRs were associated with imprinted gene expression. These findings highlight the incomplete erasure of germline DNA methylation in the human placenta, which is important for understanding normal placental development and the pathogenesis of developmental disorders with imprinting effects.

研究分野：産婦人科学、分子生物学

キーワード：生殖医学 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

DNA のメチル化は、発生のプログラムに従って確立され、核のリプログラミング、ゲノムインプリンティング、ゲノム安定性、遺伝子の発現調節などに働く。

最近、次世代シーケンサーを用いた一塩基解像度でのゲノムワイドなメチル化解析 (WGBS) により、マウス発生過程における DNA メチル化の全体像 (メチローム) が示された (Smith ZD et al. Nature 2012 他)。また、5-メチルシトシン (5mC) が水酸化された 5-ヒドロキシメチルシトシン (5hmC) が発見され、5mC とは対照的に 5hmC は遺伝子発現の亢進や能動的な脱メチル化機構に関与することが報告されている (Chuan et al. Cell 2012 他)。ヒト受精卵、胚盤胞での遺伝子発現パターンは、マウスと異なることが報告されており (Xie et al. Genome Res 2010)、マウスで明らかとなったメチロームをそのままヒトに適用することはできない。しかし、ヒトでは検体数 (DNA 量) が十分確保されないため、発生初期の DNA メチル化制御の詳細は全く不明である。本研究は、微量検体を正確に解析する高精度エピゲノム測定法を開発し、ヒト生殖細胞のメチローム解析を実施する、世界で初めての試みである。

2. 研究の目的

ヒト生殖細胞 (卵子および精子)、胚盤胞および初期胎盤絨毛細胞の標準メチロームプロファイルを作成し、機能的、構造的分類によるメチル化制御 (5mC および 5hmC) について、生物統計学的解析を行い、受精後の脱メチル化機構のゲノム特異性について明らかにする。特に、卵子 - 精子特異的メチル化領域に注目し、新規のゲノムインプリンティング領域を特定する。さらに、ヒト・マウス間の比較エピゲノム解析を行い、保存性、多様性について検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト卵子、精子、胚盤胞、初期胎盤細胞の収集と精製：

文部科学省、日本産科婦人科学会へ研究の申請を行った後、十分な説明とインフォーム

ドコンセントを得て、ヒト検体の収集を行う。

- 卵子、胚盤胞は、顕微授精、体外受精などの目的で採取されたもののうち、未成熟卵子 (GV 期、MI 期) と確認され、臨床使用から外れた形態学的に正常な未受精卵 (30 個) を収集。卵子は、体細胞の混入を避けるため、顆粒膜細胞および透明帯をタイロート処理により完全に除去し、回収。同時に破棄予定の胚盤胞 (10 個) を収集。

- 精子は、精液検査後の精子を Swim-up 法を用い回収し、体細胞を除去。

- 初期胎盤絨毛細胞は、人工妊娠中絶術後の正常胎盤 (妊娠 7 - 8 週) の一部を使用する。絨毛部分を採取後、FACS 及びパーコール法を用いて細胞性栄養膜細胞 (CT) を純化・精製し、ゲノム DNA を抽出する。

(2) 超微量検体を用いたメチローム解析の確立：

● PBAT 法の改良

PBAT ライブラリーを増幅系・非増幅系で調製し、シーケンスを行う。増幅系ライブラリーでのマッピングのバイアスやメチル化状態の変化を非増幅系と比較し、増幅系を用いることで超微量検体でも十分なゲノムカバー率及び depth を実現する PBAT ライブラリー調製法を確立する。

(3) 次世代シーケンサーを用いた大規模配列解析：

ライブラリーの作製には、PBAT 法を用いる。ライブラリー作製後、HiSeq2500 を用いて大規模シーケンス解析を行う。卵子および胚盤胞についてはそれぞれ 7 億リード (700 億塩基、ゲノムカバー率 x20 に相当) 精子、胎盤については 6 億リードを取得予定である。

(4) シーケンスデータのマッピング：

(3) で得られたリードのマッピングおよびメチル化率の算出には、メチル化解析プログラム Bismark を用いる。また、リードおよびメチル化状態の可視化にはゲノムブラウザ IGV を使用する。以上の解析パイプラインは既に構築済みである。

(5) 構造、機能領域分類とメチル化制御の解析 :

発生の各段階で、CpG island, リピート配列, プロモーター、Gene body などの、CG および non-CG のメチル化率を決定する。マウスでは、リピート配列の一部が受精後の脱メチル化から保護されることや、卵子で non-CG のメチル化が頻繁に観察されることが知られている。同様の現象がヒトでも見られるか検証する。データ解析ソフトには、GeneSpring および、統計解析ソフト”R”を使用する。

(6) インプリント DMR の同定とその維持・消去機構の解析 :

卵子 精子特異的メチル化領域インプリント (DMR) に注目し、受精後の脱メチル化や着床後の新規メチル化から保護されているかどうかを既知の GI 遺伝子で明らかにする。さらに新規 GI 遺伝子領域を検索し、DMR の保護に関与する共通配列モチーフや、結合する転写因子などを推測する。

(7) マウスメチロームとの比較解析 :

領域毎のメチル化制御やインプリント DMR の制御が、ヒト - マウス間で保存されているかどうかを解析する。ヒト - マウス間のゲノム配列の保存性に関するデータは UCSC より取得し、統計解析ソフト”R”を用いてメチル化状態の保存性を定量的に評価する。さらに、濃縮されるリピート配列や近傍遺伝子の機能・発現量による分類を行い、メチル化状態が保存されている領域とそうでない領域の配列の特徴を明らかにする。

(8) アクセシビリティを考慮したデータベースの構築 :

次世代シーケンサーによる解析では、膨大なデータを取り扱う必要がある。国内では、ヒト生殖細胞研究に特化した情報処理パイプラインは未整備であり、迅速なシステム確立が求められている。そのため、得られる情報と公的データベースの情報を生命学者が自由に取り扱うインターフェイスを開発し、パイプラインを構築する。具体的には、エピゲノムの視覚的ツールとして UCSC Genome Browser を、エピゲノム情報のデータベースへの登録窓口として Galaxy を用い、高度な情報解析パイプラインを確立する。

4 . 研究成果

(1) ヒト初期胚のメチル化の変化

受精卵から全能細胞への初期化の過程のメチル化の変化は、マウスで研究されクローン作成技術などに活かされているが、ヒトでの研究は倫理的問題から限られている。我々は、生殖補助医療に由来するヒトの卵子及び胚を倫理委員会の承認を得て用い、ヒトの初期発生におけるDNAメチル化の変化をバイサルファイトDNAシーケンシング法で解析した。精子と卵子を比較すると、精子はメチル化の割合が高く、卵子は中程度であるというマウスと同じ傾向を示した。一方、初期化を受けた胚盤胞ゲノムのメチル化を見ると、精子由来では能動的脱メチル化を受けていたが、卵子ではあまり変化がみられなかった (図1)。ヒトでは受動的脱メチル化は起こっていないと考えられる (図2)。

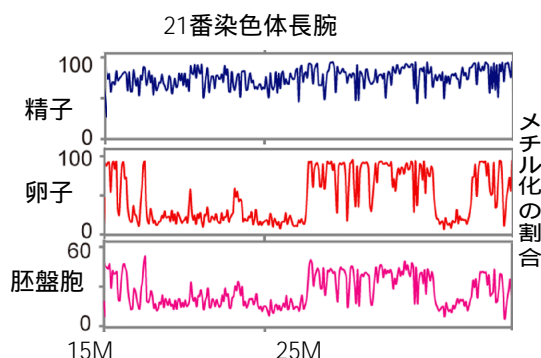


図1 ヒトの精子、卵子、胚盤胞のメチル化の比較

21 番染色体の長腕のメチル化のパターンの比較。胚盤胞の割合が卵子の半分程度 (半分は精子由来) でパターンが似ていることから、胚盤胞初期化で卵子のメチル化が残っていることがわかる。

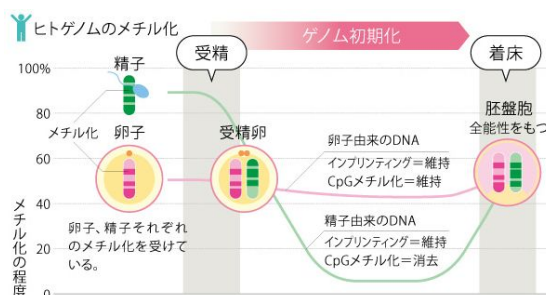


図2 ヒトの初期発生のメチル化の変化

ヒトでは卵子のメチル化は初期化を通し維持されることがわかった。

そこで卵子のメチル化を調べると、ヒトでは少なくとも44カ所の卵子特有のメチル化領域があり、そのうち15カ所が胎盤の細胞にのみ見られた。マウス卵子では、メチル化領域

は2カ所と胎盤だけは1カ所のみである。ヒトでは、初期化を経ても卵子由来のメチル化がマウスに比べて多く残り、胎盤の遺伝子の発現に関わるのではないかと考えられた。

次に卵子で発現する遺伝子との関係を調べたところ、遺伝子配列内のメチル化はその遺伝子を活性化するが、ヒトのみでメチル化している遺伝子はマウスに比べて千個近く多かった。その一方で、マウスでDNAメチル化に必要な酵素Dnmt3lは、ヒトでは発現がみられなかった。その代わりにヒトではセントロメア領域のメチル化に関わるDNMT3Bが多く発現していた。セントロメア領域はヒトではメチル化され、マウスではメチル化されていないので、この酵素がヒトの新規のメチル化とセントロメアのサテライト配列のメチル化にも寄与していると考えられる。

精子由来のDNAでは初期化の過程で大規模な脱メチル化がおこるが、残っている位置を調べたところ移動能力の高いレトロトランスポゾンにメチル化していた。レトロトランスポゾンによる転移がゲノムに変異をひきおこすと、発生異常や疾患の原因となるため、それを防御する役割があるのだろう。こうしてヒトとマウスでは異なる現象がみられるので、ヒトのエピジェネティクスの理解にはヒトでの研究が重要であることがと明らかとなった。

(2) エピジェネティクスから見える哺乳類の進化

最近、様々な動物の初期発生におけるDNAメチル化の変化が報告され、受精後の初期化機構は、生物種によって多様であることがわかってきた。ゲノムインプリンティングは哺乳類にしか認められない現象で、胎盤の進化とともに獲得されてきたと言われている。生物種によってインプリンティングを受ける遺伝子の数や領域は異なっているので、この共通性や多様性を明らかにすることが哺乳

類の進化を解明する上での手がかりになるかもしれない。また、エピジェネティクス機構の進化には、ウイルスゲノムの侵入も深く関わっている。例えば、ヒトゲノム上に散在する内在性ウイルスなどの反復配列の多くは強固にメチル化され、ゲノム中を転移にしないように抑制されている。これらの転移性の配列のゲノムへの侵入に対する感染防御の戦略が、高等動物では、エピジェネティクスに関わる様々な現象として発達した可能性が考えられる。塩基配列だけではわからない複雑なメカニズムが明らかになってきた今、哺乳類やヒトの進化の解明にも更なるエピジェネティクス研究が必要である。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

Kobayashi N, Miyauchi N, Tatsuta N, Kitamura A, Okae H, Hiura H, Sato A, Utsunomiya T, Yaegashi N, Nakai K, Arima T. Factors associated with aberrant imprint methylation and oligozoospermia. **Scientific Reports**. 10 (7) 42336, 2017. doi:10.1038/srep42336. (査読有)

Kobayashi N, Okae H, Hiura H, Chiba H, Shirakata Y, Hara K, Tanemura K, Arima T. Genome-Scale Assessment of Age-Related DNA Methylation Changes in Mouse Spermatozoa. **PLoS One**. 23, 11. 2016. doi:10.1371/journal.pone.0167127. (査読有)

Sakurai K, Nishigori H, Nishigori T, Mizuno S, Obara T, Iwama N, Watanabe Z, Ishikuro M, Tatsuta N, Nishijima I, Sugawara J, Fujiwara I, Arima T, Kuriyama S, Metoki H,

Takahashi F, Nakai K, Yaegashi N; Japan Environment & Children's Study Group. Incidence of Domestic Violence Against Pregnant Females After the Great East Japan Earthquake in Miyagi Prefecture: The Japan Environment and Children's Study. **Disaster Med Public Health Prep.** 27:1-11. 2016. doi:10.1017/dmp.2016.109. (査読有)

Mizuno S, Nishigori H, Sugiyama T, Takahashi F, Iwama N, Watanabe Z, Sakurai K, Ishikuro M, Obara T, Tatsuta N, Nishijima I, Fujiwara I, Arima T, Kuriyama S, Metoki H, Nakai K, Inadera H, Yaegashi N; Japan Environment & Children's Study Group. Association between social capital and the prevalence of gestational diabetes mellitus: An interim report of the Japan Environment and Children's Study. **Diabetes Res Clin Pract.** 9;132-141. 2016. doi:10.1016/j.diabres.2016. (査読有)

Hamada H, Okae H, Toh H, Chiba H, Hiura H, Shirane K, Sato T, Suyama M, Yaegashi N, Sasaki H & Arima T. Allele-specific methylome and transcriptome analysis reveals widespread imprinting in the human placenta. **The American Journal of Human Genetics.** 99;1-11. 2016. doi:10.1016/j.ajhg.2016.08.021. (査読有)

Okae H, Arima T. DNA methylation dynamics during early human development. **Journal of Mammalian Ova Research.** 33:2 2016. doi:10.1274/jmor.33.101. (査読有)

Obara T, Nishigori H, Nishigori T, Metoki H, Ishikuro M, Tatsuta N, Mizuno S, Sakurai K, Nishijima I, Murai Y, Fujiwara I, Arima T, Nakai K, Mano N, Yaegashi N, Kuriyama S, JECS group. Prevalence and Determinants of Inadequate Use of Folic Acid Supplementation in Japanese Pregnant Women: The Japan Environment and Children's Study (JECS). **J Matern Fetal Neonatal Med.** 18:1-24,2016. doi:10.1080/14767058.2016.1179273. (査読有)

Watanabe Z, Iwama N, Nishigori H, Nishigori T, Mizuno S, Sakurai K, Ishikuro M, Obara T, Tatsuta N, Nishijima I, Fujiwara I, Nakai K, Arima T, Takeda T, Sugawara J, Kuriyama S, Metoki H, Yaegashi N; Japan Environment & Children's Study Group. Psychological distress during pregnancy in Miyagi after the Great East Japan Earthquake: The Japan Environment and Children's Study. **J Affect Disord.** 15;190:341-8. 2016. doi:10.1016/j.jad.2015. (査読有)

Mizuno S, Nishigori H, Sugiyama T, Takahashi S, Iwama N, Watanabe Z, Sakurai K, Ishikuro M, Obara T, Tatsuta N, Nishijima I, Fujiwara I, Arima T, Kuriyama S, Metoki H, Nakai K, Inadera H, Yaegashi N. Social capital and the risk for onset of gestational diabetes mellitus: An interim report of the Japan Environment and Children's Study. **Diabetes Research and Clinical Practice.** 2015 Under submission.

(査読有)

Yamazaki I, Kimura F, Nakagawa K, Nakai K, Arima T, Kawabata T, Kagawa Y, Saitoh S, Mizuno S, Yaegashi N, Miyazawa T. Heterogeneity of the Fatty Acid Composition of Japanese Placentae for Determining the Perinatal Fatty Acid Status: a Methodological Study. **J Oleo Sci.** 64(8):905-14.2015.

doi:10.5650/jos.ess15071.(査読有)

Kitamura A, Miyauchi N, Hamada H, Hiura H, Chiba H, Okae H, Sato A, John RM, Arima T. Epigenetic alterations in sperm associated with male infertility. **Congenit Anom (Kyoto)**. 55(3), 133-144, 2015.

doi:10.1111/cga.12113.(査読有)

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.

doi:10.1093/hmg/ddt495.(査読有)

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.

doi:10.1007/s12522-014-0183-3.(査読有)

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. doi:10.1371/journal.pgen.1004868.(査読有)

[特許] (計 1 件)

胎盤を構成する細胞への分化能を有する哺乳動物の未分化前駆細胞及びその製造方法 (特願 2015-047236) 出願日 2015.3.10
発明者 : 有馬隆博 岡江寛明 (出願人 東北大学) PCT/JP2016/57625

6 . 研究組織

(1)研究代表者

有馬 隆博 (TAKAHIRO, ARIMA)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 80253532

(2)研究分担者

岡江 寛明 (HIROAKI, OKAE)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 10582695