

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：32206

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20157

研究課題名(和文)体外受精が初期胚のゲノム・エピゲノムに与える影響の解析

研究課題名(英文) Genome wide DNA methylation analysis in spontaneous abortion between ART and natural conceived pregnancies

研究代表者

久須美 真紀 (Kusumi, Maki)

国際医療福祉大学・臨床医学研究センター・講師

研究者番号：70470002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：流産絨毛組織を用いてゲノム微細構造異常とDNAメチル化異常を調べた。ART群で優位にゲノム構造異常がない流産が多く、他の要因による流産の可能性が示唆された(30%と8.6%)。人工妊娠中絶症例を加えて流産検体の特徴を明確化すると、ART群で高メチル化を呈するCpGサイトが明らかとなった。それらの領域はゲノム領域の中でも全能性維持機能性領域や分化制御に関わる領域に集約された。さらに、配偶子から初期胚では低メチル化領域であり、ART群での高メチル化の原因として、配偶子形成時のメチル化消去異常と、受精後の異常なメチル化獲得のいずれの病態も考えられた。

研究成果の概要(英文)：Genome structure and genome wide DNA methylation were analyzed in chorionic villi of spontaneous abortion. There were many miscarriages with no genome structural abnormality in the ART group, suggesting the possibility of miscarriage due to other factors (30% and 8.6%). Clarifying the features of miscarriage specimens by adding an artificial pregnancy abortion cases revealed some CpG sites exhibiting hypermethylation at no random in the ART group. When clusters were made with the top 1000 ranked sum, we found that some ART cases are clustered. The half of the CpG sites was consolidated in the region of both activated and suppressive modification related to the maintenance of stemness or differentiation in the genomic region. It is assumed that those CpG sites show low methylation from gamete to early embryo and is suggested to be caused by abnormality of de novo methylation after fertilization.

研究分野：ART, epigenetics

キーワード：ART epigenetics DNA methylation 体外培養 ゲノム構造異常 初期胚

### 1. 研究開始当初の背景

生殖補助医療で必須の手技に体外受精・体外培養があるが、その期間は DNA のメチル化などエピゲノムがダイナミックにリモデリングされる時期と合致する (図1)。生殖補助医療による出生児に大奇形の発生率が高いこと、ゲノムインプリンティング病が多いこと、等が報告されており、胚操作手技、培養液の組成、体外培養環境等の安全性の確立が望まれている。

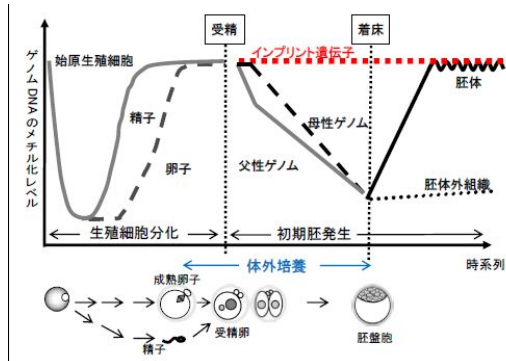


図1 「生殖細胞と受精卵における DNA メチル化リモデリング」

### 2. 研究の目的

生殖補助医療(ART; assisted reproductive technology, 体外受精・顕微授精)により出生する児は年々増加しており、本邦では出生児の7%に達する。技術が先行しており、生殖補助医療で行われる胚操作が胚発生に及ぼす未知の影響が懸念されている。本研究では、ゲノムの微細な構造異常あるいはエピゲノム異常の観点から生殖補助医療が胚発生に及ぼす影響を明らかにし、安全で妊娠率の高い良質な医療を提供するための研究成果を目指す。

### 3. 研究の方法

試料収集：生殖補助医療後の流産 50 例(ART 群)と自然妊娠後の流産 35 例(コントロール群)の絨毛組織 5 mm程度と各々の夫婦血液 2mL を回収した。

DNA 抽出：流産絨毛組織、夫婦血液から DNA を抽出する。QIAcube(QIAGEN)を用いた DNA 自動抽出、精製システムを使用した。

病理組織標本：流産絨毛組織の一部を用いて 10%ホルマリン固定後、パラフィン包埋し、組織切片を作製し、病理組織検査を施行した。

バイサルファイト処理：DNA メチル化解析のため、ART 群 40 例とコントロール群 27 例の絨毛組織から抽出した DNA 試料の一部にバイサルファイト処理を行う。EZ DNA Methylation Kit(ZYMO RESEARCH)を使用した。

アレイ解析：Infinium CytoSNP BeadChip (Illumina) で、全ゲノムの微細構造異常を調べる。両親の血液を同時解析することによって、異常の由来(正常多型の可能性)および新規異常を判定した。また、Infinium HumanMethylation450 BeadChip (Illumina)を用い、包括的 DNA メチル化解析を行った。

統計処理：GenomeStudio(Illumina)および Excel、R によって統計処理を行う。データの標準化、階層的クラスタリング分析、Mann-Whitney U 検定を行う。多重比較のため、FDR(false discovery rate)を用いた補正を行った。データベースを使用した GO 解析を追加した。

### 4. 研究成果

Infinium CytoSNP BeadChip で 85 例の流産絨毛組織とその両親の DNA を用いたトリオの全ゲノム微細構造異常解析を行った。ゲノム構造異常を認めない例は、ART 群で 15 例(30%; 全 50 例)、コントロール群では 3 例(8.6%; 全 35 例)と、コントロール群が少ないという数的バイアスはあるが、 $p=0.017$  で有意差を認めた。ART 群はゲノム構造異常以外の胚側の異常が存在しうる可能性が否定できないと考えられた。

ART 群 40 例とコントロール群 27 例で計 67 例の流産絨毛組織を用いて Infinium HumanMethylation450 BeadChip による包括的 DNA メチル化解析を行った。

(1)ART 群とコントロール群でメチル化率の異なる CpG サイトは認められなかった。コントロール群に人工妊娠中絶検体 22 例を含めた非 ART 群と ART 群の群間比較を行ったところ、多重検定補正後に  $p<0.05$  以下で DNA メチル化に有意差があると判定された部位が 3029 個存在し、そのうちの 7 割の図

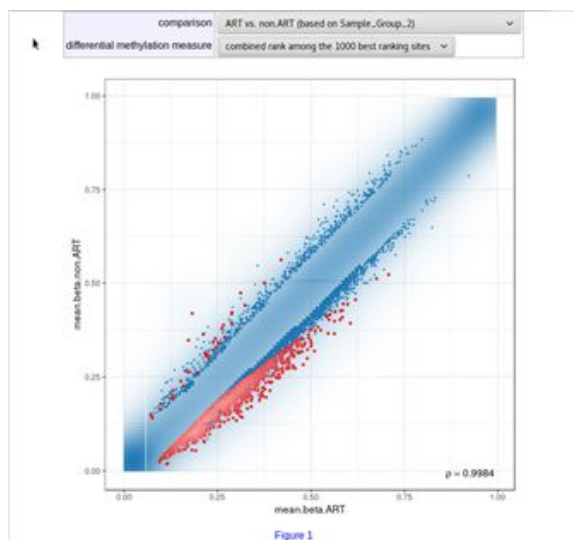


図2 「scatter plot(メチル化β値):ART 群(縦軸) vs 非 ART 群(横軸)」

2058 個が ART 群で有意に高メチル化を示した。( 図 2 ; 赤色の点)。

クラスター解析を行うと、ART 群が一部クラスターを形成することがわかった ( 図 3、左側)。青で表示された群が ART 群で赤と水色は非 ART 群である。

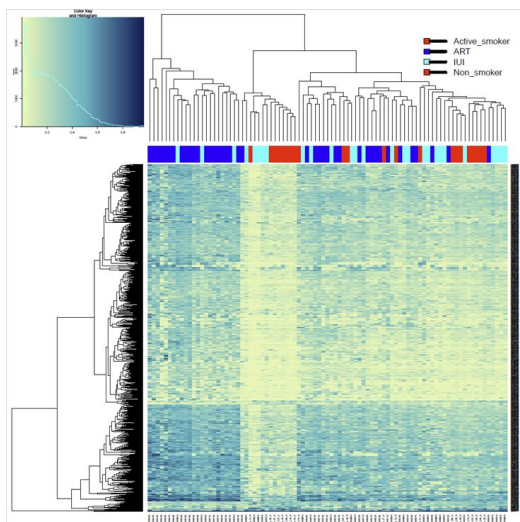


図 3 「クラスター解析 : ART 群(青)、コントロール群(水色)、人工妊娠中絶検体(赤)」

-(2)

ART 群と非 ART 群で有意にメチル化差のあった 3029 個のうち、RnBeads 独自の統計モデルからメチル化変化の効果量を順位付けし、上位 1000 個を gene ontology 解析すると、EED 遺伝子の結合する標的遺伝子が最も多数含まれており、EED 標的 156 遺伝子の近傍の 315 個が ART 群で異常メチル化を呈していたまた、NIH Roadmap Epigenomics の trophoblast cultured cells のデータと比較すると、前述の上位 1000 異常部位のうち 459 が、活性型(H3K4me)と抑制型(H3K27me)のヒストン修飾が共局在している部位であった。ART 群では、EED の標的遺伝子など、多くの分化全能性維持機能性領域に高メチル化変化が観察された。また、メチル化変化をきたした領域の多くは、活性型と抑制型のヒストン修飾が共局在していることから、分化制御に重要な遺伝子制御領域が異常を呈している可能性が示唆された。

-(3)

メチル化変化率の上位 1000 部位のうち、ART で高メチル化異常が観察された部位の多くは、正常では配偶子から初期胚まで低メチル化状態に保たれている領域であり ( 図 4)、配偶子形成時のメチル化消去異常と、受精後の異常なメチル化獲得のいずれの病態も考えられた。また、ART 群での ICSI や培養期間の有無でメチル化に差は生じていない。さらに、ART との関連が示唆されているイ

ンプリンティング関連領域のメチル化異常は、今回の網羅的な解析では検出されなかった。

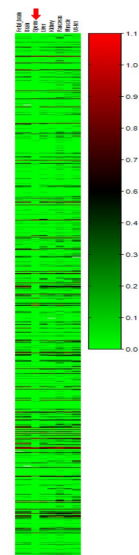


図 4 「Heat Map : ART 群で高メチル化を示す CpG サイトにおける sperm のメチル化率」

## 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 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 2 件 )

Maki Kusumi

A rare case report: monozygotic quadruplets following intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and single blastocyst transfer (SBT)

The 13<sup>th</sup> International Congress of Human Genomics

April 3-7, 2016/ Kyoto

久須美真紀

染色体構造異常を認めない流産既往から見る次回妊娠予後

第 62 回日本生殖医学会学術講演会・総会  
2017 年 11 月 16-17 日/山口県下関

久須美真紀

体外受精が初期胚のゲノム・エピゲノムに与える影響の解析

第 62 回日本人類遺伝学会

2017 年 11 月 15-18 日/兵庫県神戸

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

○出願状況 ( 計 0 件 )

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

久須美 真紀 (Kusumi Maki)

国際医療福祉大学・臨床医学研究センター・  
講師

研究者番号：70470002

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )