

令和元年6月24日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19535

研究課題名(和文) エピゲノム脆弱性とゲノム脆弱性の観点から見た生殖・発生異常未知因子の探索

研究課題名(英文) Screening for unknown factors of reproductive and developmental abnormalities from the viewpoint of epigenetic and/or genetic fragility.

研究代表者

秦 健一郎 (HATA, KENCHIRO)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・周産期病態研究部・部長

研究者番号：60360335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムと同様にエピゲノムには多様性が存在するため、通常の解析では膨大な数の病的意義不明エピゲノム変異候補が見つかる。実際に我々は、生殖補助医療を受けた24症例と、自然流産12例の、絨毛組織のDNAメチル化状態を比較したが、明らかな有意差を有する異常値は検出できなかった。そこで我々が報告した手法(Kawai T, SciRep 2015)に基づきDNAメチル化の外れ値検定を行うと、生殖補助医療後の流産群は外れ値が多かった(すなわちエピゲノム脆弱性が観察された)。現在、外れ値を呈したプロンプ周辺配列の特徴の詳細解析を継続中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、不妊症(妊娠に至らないこと)や不育症(途中で流産してしまうこと)に悩むカップルは非常に多く、その一方でおよそ半数は原因がわかりません。本研究は、「エピゲノム」という遺伝子の制御機構(ヒトが育っていくごく初期や胎盤(赤ちゃんに栄養を供給する臓器)の機能に影響を与えるらしいことがわかりつつあるが、実際に不妊症や不育症にどの程度かかわっているのかがよくわかっていない機構)に着目し、実際の不育症患者さんでその様子を調べました。その結果、我々が開発した「乱れ具合」を検知する手法で、不育症の患者さんでは「エピゲノム」が乱れている可能性が見つかり、現在更に詳しい解析を進めています。

研究成果の概要(英文)：Because of the diversity of the epigenome as well as the genome, a large number of pathologically unclear epigenetic variants can be found by ordinal analysis. In fact, we compared the DNA methylation of villous tissue in 24 cases who received assisted reproduction (treatment action including embryo manipulation) and 12 cases of spontaneous abortion, but no statistic differences could be detected. Therefore, the outlier test of DNA methylation was performed based on the method we previously reported (Kawai T, SciRep 2015), the abortion group after assisted reproduction had many outliers (ie, epigenetic fragments were observed). At present, detailed analysis of the features of DNA sequences that exhibited outliers is ongoing.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス 発生異常

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティックな修飾は正常な発生に必須の機構であることが知られており、申請者らもモデル生物やヒト発生異常例を報告してきた (Hata K, et al. *Development* 2002, Ito Y, et al. *Gynecol Obstet Invest.* 2016)。エピゲノムにもゲノムと同様に多様性があり (Hellman, *Epigenet Chrom.* 2010) 解析は慎重な解釈が必要であるが、我々はすでに多様性を加味して差異を検出することに成功しており (Kawai T, et al. *Sci Rep.* 2015, Miyata T, et al. *Sarcoma* 2015) この解析手法を胎児発育異常症例に応用すると、我々の狙い通りに、疾患と直接関係ない複数のゲノム領域の DNA メチル化異常を有する症例が散見された。このようなエピゲノム変異パターンは、これまで注目されずに詳細な解析がなされていないが、これらの症例を再分類すれば、未知の病態が明らかになるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、原因不明の流産や胎児発育不全症例のエピゲノム解析とゲノム解析を行い、未知の分子病態を解明することを目的とする。具体的には、ゲノム全体に複数のエピゲノム異常を有する症例 (エピゲノム脆弱性を呈する症例) の存在を明らかにする。また、エピゲノム脆弱性を呈する症例では、レトロトランスポソンの活性化と de novo 挿入が起こり、その結果ゲノム異常 (ゲノム脆弱性) が惹起される可能性を検証する。

ヒストン修飾や DNA メチル化等のエピジェネティックな修飾 (エピゲノム) は、生殖・発生に必須の情報である。すでに様々なマウスモデルや、胎児発育不全を伴う一部の先天奇形症候群などで、エピゲノム異常がこれらの病因となることが証明されている。一方で、実際のヒト不妊症や不育症で、エピゲノム異常が証明された例は限られている。その理由として、「エピゲノムの多様性」が挙げられる。ゲノムの多様性はよく知られており、例えば流産検体の高解像度な遺伝学的解析を行うと、膨大な病的意義不明の多型、いわゆる Variant of Uncertain Significance (VUS) が同定され、その中に仮に真の病因があったとしても確定診断に至らないことが多い。同様に、生殖・発生異常の検体をエピゲノム解析しても、多数の候補多型が見つかり、病因エピゲノム変異に辿り着くのは難しい。

そこで本研究では、従来の疾患責任エピゲノム変異を探索する異常スクリーニングと異なり、我々の開発したエピゲノム異常の外れ値頻度を検出するという全く異なる戦略でエピゲノム異常スクリーニングを行う (Kawai T, et al. *Sci Rep.* 2015;5:14224)。

また近年、レトロトランスポソンが何らかの理由で活性化して de novo 挿入され、遺伝子を破壊し、あるいは周囲の遺伝子機能に影響を与え、疾患が発症する例が数多く報告されてきている (Hancks et al. *Mobile DNA.*;7:9 2016)。

レトロトランスポソンは通常エピジェネティックな修飾で強固に抑制されていると考えられてきたが、哺乳類でもある程度の頻度で de novo 挿入が起こっていることがわかってきた。また、進化生物学的な観点からは、生殖・発生においては反復配列やレトロトランスポソンが特殊な制御を受け、様々な機能を獲得してきた事が示唆されており (Lynch et al. *Cell Rep.* 10:551-561 2016, Kaneko-Ishino et al. *J Mamm Ova Res.*30:16-46 2013) 元来生殖・発育過程においては、レトロトランスポソンが活性化しやすい状態にあると推測される。そこで、前述のようなゲノム全体にエピゲノム異常を呈する症例、すなわちエピゲノム脆弱性を呈する症例に着目し、レトロトランスポソンの de novo 挿入の可能性を検証する。これらの結果から、「エピゲノム脆弱性 (ランダムかつ高頻度のエピゲノム異常の存在)」あるいは「エピゲノム脆弱性に起因するゲノム脆弱性 (レトロトランスポソンの de novo 挿入)」が、不育症や胎児発育不全の原因となる可能性を検証する。

3. 研究の方法

原因不明の習慣流産・不育症・胎児発育不全症例を対象に、胎盤 (絨毛) 臍帯血、臍帯から抽出したゲノム DNA を用い、DNA メチル化状態のスクリーニングを行う。スクリーニングにはエピタイパー (バイサルファイト処理によって生じる非メチル化シトシンの多型を、質量分析器で解析する手法) と、DNA メチル化アレイ (バイサルファイト処理によって生じる非メチル化シトシンの多型を、SNP アレイを用いて網羅的に検出する手法) を組み合わせ、効率的に行う。

生殖・発生の重篤な異常を呈する症例 (次世代を生み育てることが困難な集団) では、仮にエピゲノムあるいはゲノムの病因変異が存在すれば、大部分はランダムに起こった de novo 変異であると推測される。また、ゲノムと同様にエピゲノムにも多様性存在するため、通常解析では膨大な数の病的意義不明エピゲノム変異候補が見つかり、解析に苦慮する。申請者はこれまで、多様性を考慮しつつランダムに起こる生殖発育異常症例のゲノム変異あるいはエピゲノム変異を同定することに成功しており (Migita et al. *J Hum Genet.* 2014;59:326-31., Ito et al. *Gynecol Obstet Invest.* 2016;81:353-8., Kawai T, et al. *Sci Rep.* 2015;5:14224., Miyata T, et al. *Sarcoma* 2015;2015:412068.) 本研究でもこれらの手法を応用展開し、エピゲノム異常とゲノム異常を同定する。

加えて本研究では、反復配列やレトロトランスポソンの DNA メチル化状態を評価し、これらの de novo 挿入によるゲノム変異同定法を新規に開発する。DNA メチル化スクリーニングには、バイサルファイト処理後に次世代シーケンサーを用いてショットガンシーケンスを行う手

法（バイサルファイトショットガンシーケンス法）で解析する。バイサルファイト処理後の DNA は、大部分のシトシンがチミンに変換されて low diversity の特殊な塩基配列になるため、マッピング効率が低下する等の理由でシーケンスコストが通常の三倍ほどかかる。しかし幸いなことに、レトロトランスポゾンや反復配列は合計するとゲノムのおよそ半分をも占めるコピー数を有する。よって、通常的全ゲノム配列解析数十分の一のシーケンスコストで、レトロトランスポゾンの DNA メチル化定量が可能である。下図 3 の試験的解析では、実際に二十分の一の情報量で DNA メチル化の差異を検出することに成功した。この新しい手技利用すれば、現実的なコストで、各サンプルのレトロトランスポゾンの DNA メチル化状態の定量比較が実現できる。この独自のスクリーニング系で、レトロトランスポゾンが低 DNA メチル化状態の症例を同定する。これらの症例では、レトロトランスポゾンの抑制が外れ、de novo 挿入を起こしやすい状態と考えられるため、全ゲノムシーケンスを行い、挿入部位を同定する。

4. 研究成果

原因不明の発生異常症例から得た生体試料（胎盤、臍帯血、臍帯、末梢血等）から抽出したゲノム DNA を用い、DNA メチル化状態のスクリーニングを行った。スクリーニングには、DNA メチル化アレイ（バイサルファイト処理によって生じる非メチル化シトシンの多型を、SNP アレイを用いて網羅的に検出する手法）を用いた。生殖・発生の重篤な異常を呈する症例（次世代を生み育てることが困難な集団）では、仮にエピゲノムあるいはゲノムの病因変異が存在すれば、大部分はランダムに起こった de novo 変異であると推測される。また、ゲノムと同様にエピゲノムにも多様性が存在するため、通常の解析では膨大な数の病的意義不明エピゲノム変異候補が見つかり、解析に苦慮する。実際に我々は、生殖補助医療（胚操作を含む治療行為）を受けた 24 症例と、自然流産 12 例の絨毛組織の DNA メチル化状態を評価した。症例数が少ないこともあるが、これらの群間比較では、明らかな有意差を呈する領域（生殖補助医療後の流産絨毛で特異的に DNA メチル化変化が起こる領域）は同定できなかった。そこで、我々が以前報告した手法（Kawai T, SciRep 2015）を用いて DNA メチル化外れ値検定を行い、その多寡を比較すると、生殖補助医療後の流産群で外れ値が多かった（すなわち、DNA メチル化状態が乱れていると考えられた）。現在、外れ値を呈したプロンプ周辺配列の特徴について、詳細解析を継続中である。

5. 主な発表論文等

Sato T, Migita O, Hata H, Okamoto A, Hata K : Analysis of Chromosome Microstructures in Products of Conception Associated with Recurrent Miscarriage. Reprod Biomed Online. 2018 doi: 10.1016/j.rbmo.2018.12.010.

秦健一郎：【臨床応用に向けた疾患シーケンス解析】（第 2 章）難病 オミックス解析を通じて希少難治性疾患の医療に貢献する基盤研究 周産期領域におけるオミックス解析の臨床応用。遺伝子医学 MOOK 2018;34:66-70

秦健一郎：「エピジェネティックな修飾状態からみたヒト発生異常の再検証」日本人類遺伝学会第 63 回大会，横浜，2018.10.12

〔雑誌論文〕(計 2 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

〔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：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1)研究分担者
該当せず

(2)研究協力者
該当せず

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。