

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22591831

研究課題名（和文）胎児発育不全におけるエピジェネティクス分析と関連遺伝子の解析

研究課題名（英文）The study for fetal growth restriction by epigenetic and genetic analyses

研究代表者

鈴木 伸宏（SUZUMORI NOBUHIRO）

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：70326148

研究成果の概要（和文）：

胎児発育不全におけるエピジェネティクス分析と関連遺伝子の解析として、14 番染色体のインプリンティング解析を施行し、不育症における染色体不分離に関与する *SYCP3* と凝固系に関連する *ANXA5* の遺伝子多型解析を行った。エピジェネティクス解析として、羊水過多、胎児胸郭低形成・腹部膨満を伴う症例において、胎盤・臍帯血の FISH 解析、エピジェネティクス分析をして、両親の末梢血のメチル化などエピゲノム分析し、胎児父性 14 染色体ダイソミーと診断された。また、父性 14 染色体ダイソミーと関連する疾患について、胎盤における遺伝子解析と組織学的分析が施行された。

習慣流産 101 名、コントロール 82 名より説明と同意の上で採血し、DNA 抽出、*SYCP3* 遺伝子のエクソン 1 からエクソン 8 とその周辺領域でプライマーを設定して PCR し、ダイレクトシーケンスで塩基配列を解析した。また、習慣流産患者のうち前回までの流産のときの絨毛染色体分析結果を含めて解析した。*SYCP3* のエクソン 8 のスプライシング領域において 653A>G 変異が習慣流産患者 1 名とコントロール 1 名で見つかった。アネキシンについては *Annexin A5* の 6 つの SNP 間での強い連鎖不平衡と有意な相関を認めた。Max 検定の結果からはすべての SNP で dominant モデルが選択された。ハプロタイプ解析では A-C-C-A-G-T で有意差が認められた ($p=0.02$)。 *ANXA5* の遺伝子多型解析において先行研究と同様に流産との関連性を検出し、これらが dominant モデルであることも統計的に確認できた。

研究成果の概要（英文）：

Human chromosome 14q32.2 carries a cluster of imprinted genes including paternally expressed genes such as *DLK1* and *RTL1* and maternally expressed genes such as *MEG3* (alias *GTL2*) and *RTL1as* (*RTL1* antisense), together with the germline-derived intergenic differentially methylated region (IG-DMR) and the postfertilization-derived *MEG3*-DMR. Consistent with this, paternal uniparental disomy 14 (upd(14)pat) results in a unique phenotype characterized by facial abnormality, small bell-shaped thorax with coat-hanger appearance of the ribs, abdominal wall defects, placentomegaly, and polyhydramnios, and maternal uniparental disomy 14 (upd(14)mat) leads to less-characteristic but clinically discernible features including growth failure.

We found the 657T>C mutation of *SYCP3* may not be associated with recurrent miscarriage caused by

aneuploidy. No clinical significance of routine examination of *SYCP3* mutation was found because only one benign mutation was ascertained in 101 patients. Our patient with 657T>C had repeated miscarriages with euploidy. Our data showed that among the normal fetal karyotypes, XX and XY were found at a similar frequency, indicating that fetal rather than maternal karyotypes were obtained. In this study, about 90 % of patients with abnormal and normal embryonic (fetal) karyotype tended to have repeat miscarriages with abnormal and normal karyotypes, respectively. Our data suggest that the 657T>C mutation is a polymorphism without the specific function ascertained. Further studies with larger numbers and a wide range of cases are needed to define if the *SYCP3* mutations can be a cause of recurrent miscarriage. As for *ANXA5*, The variations with the *ANXA5* gene upstream region, especially SNP5 were confirmed to be risk factors of RPL. However, clinical use was not needed because we could not ascertain the predictive value of risk allele for further miscarriage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：胎児発育、流産、エピジェネティクス、胎盤・絨毛、遺伝子多型、DNAメチル化、不育症

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクス機構には、DNAのメチル化、ヒストン等の翻訳後修飾、クロマチンの形成、細胞核内構造が含まれており、遺伝情報発現および細胞機能を制御している。ヒトの疾患は大部分が遺伝要因と環境要因が複雑に絡まる多因子疾患であり、多くの候補遺伝子、成育環境、生活習慣など多様な成り立ちによるからである。近年、遺伝子発現プロフィールやエピゲノムの網羅的解析が急速に進行しており、疾患のエピジェネティクスが新展開する時期になっている。一方、インプリンティング遺伝子が存在する理由は、おそらく胎盤の進化と関連し、インプリンティング遺伝子は胎盤を有する哺乳類から認

められ、ほぼすべてのインプリンティング遺伝子が胎盤で発現している。インプリンティング遺伝子の獲得が胎盤形成と進化を可能にしたと考えられている。

子宮内胎児発育不全 (Intrauterine growth restriction, IUGR) の胎児発育については不明な点も多く、ある程度その病態が進んだ時期に胎児発育不全と診断されることがしばしばあり、原因究明は困難であり、また予防や根本的な治療法が見つからない。子宮内胎児発育については、胎盤の発育・分化と密接に関連していると考えられているが、胎児発育不全に直接的に関係する胎盤増殖・抑制因子は IGF など以外にはほとんど見つからないのが現状である。更に、家族内発生

や同胞例での胎児発育不全の症例も散見され、次の妊娠の再発率などを患者側から求められるケースもある。ゲノムインプリンティング制御の破綻は胎盤発生や胎児発育の異常を引き起こすと言われており、胎児-胎盤のエピジェネティクス機構の分子遺伝学的な解析が重要と考えている。

2. 研究の目的

胎児発育不全の半数以上は原因不明であり、DNAメチル化や特異的遺伝子発現の解析などについては十分な解析が施行されていない。今回、胎児発育不全におけるエピジェネティクス分析と関連遺伝子の解析を目的とした。ゲノムインプリンティングが破綻したモデル動物は、胚と胎盤の発生・分化異常となることが知られており、ゲノムインプリンティング異常疾患の解析から、ヒトでも同様に、DNAメチル化を介したエピジェネティックな遺伝子発現制御が、胎盤の発生・分化や胎児発育に重要であることが示唆されている。しかし、胎児発育不全の半数以上は原因不明であり、DNAメチル化や特異的遺伝子発現の解析などについては十分な解析が施行されていない。

今回、胎児発育不全におけるエピジェネティクス分析と関連遺伝子の解析を目的とした。流産を繰り返す原因として、第一減数分裂における不分離が原因の1つとされ、*SYCP3* 遺伝子は減数分裂第一期に、相同染色体を対合する蛋白質をコードし、*SYCP3* 遺伝子変異によって反復流産が起きることが予想され、この遺伝子変異解析を行った。不育症の原因として抗凝固作用を示すアネキシンの関与が報告されており、今回、日本人女性における *Annexin A5 (ANXA5)* の遺伝子多型と不育症の関連について検討し不育症の原因検索を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

胎児発育不全におけるエピゲノム解析・分子遺伝学的解析として、名古屋市立大学病院における妊婦を対象とし、子宮内胎児発育遅延 (IUGR) の分娩後の胎盤から IUGR 群として症例検体を収集し、高血圧や蛋白尿を伴わず、胎児発育が正常である妊婦をコントロール群としてその胎盤からの症例検体を集めて、臍帯血を採取し血清と EDTA 添加の全血、胎盤のパラフィン組織を保存し、胎盤検体に RNA later 保存、のちに RNA を抽出、Oligo dT primer を用いて一本鎖・二本鎖 cDNA を合成した。胎盤・臍帯血は DNA 抽出、定量を行ってから保存し、Epitect を用いて、Bisulfite 処理をした。胎盤メチル化分析のため、IGF-II、H19 のメチレーション・アンメチレーションプライマーを作成し、メチレーション PCR を施行し、また胎児 (臍帯血) と胎盤の DNA メチル化を比較して解析をした。

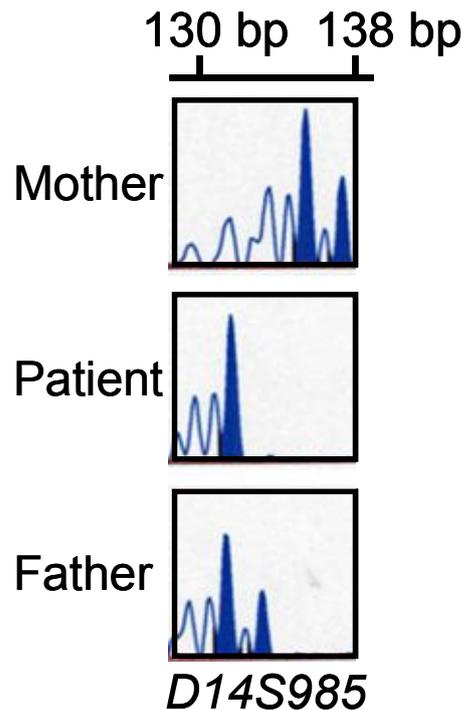
施設内倫理委員会の承認の下、習慣流産症例、コントロール症例より説明と同意の上で採血し、DNA 抽出、*SYCP3* 遺伝子のエクソン 1 からエクソン 8 とその周辺領域でプライマーを設定して PCR し、ダイレクトシーケンスで塩基配列を解析とした。また、習慣流産患者のうち前回までの流産のときの絨毛染色体分析結果を含めて解析した。一方、*Annexin A5* についても本研究に同意された流産歴のない正常コントロール群 195 例と当科で不育症と診断された 2 回以上の流産歴のある患者群 192 例を対象とし、血液検体から genomic DNA を抽出し 6 か所の遺伝子多型 (SNP1 : -467G/A、SNP2 : -448A/C、SNP3 : -422T/C、SNP4 : -373G/A、SNP5 : -302T/G、SNP6 : -1C/T) について TaqMan PCR 法を行い不育症との関連を検討した。次に流産に影響を及ぼす要因として年齢、既往流産回数、遺伝子多型などの関連を解析した。

4. 研究成果

子宮内胎児発育遅延 (IUGR) の分娩後の胎盤から IUGR 群として現時点として 13 症例、高血圧や蛋白尿を伴わず、胎児発育が正常である妊婦をコントロール群としてその胎盤から 37 症例を検体として採取し、臍帯血を採取し血清と EDTA 添加の全血、胎盤のパラフィン組織を保存し、胎盤検体に RNAlater 保存、のちに RNA を抽出、二本鎖 cDNA を合成した。胎盤・臍帯血は DNA 抽出、定量を行ってから保存し、一部は Epitect を用いて、Bisulfite 処理をした。胎盤メチル化分析のため、IGF-II、H19 のメチレーション・アンメチレーションプライマーを作成し、メチレーション PCR を施行し、また胎児 (臍帯血) と胎盤の DNA メチル化を比較解析で試みたところ定量化が困難と判断された。胎児臍帯血では症例によってばらつきがあり、十分な精度の DNA が採取できなかった。

一方、エピジェネティクス解析としては、羊水過多、胎児胸郭低形成・腹部膨満を伴う症例において、胎盤・臍帯血の FISH 解析、エピジェネティクス解析をして、両親の末梢血のメチル化などエピゲノム分析し、A 分析を加えて、胎児父性 14 染色体ダイソミーと診断された症例 (図 1) があり、American Journal of Medical Genetics(2010)へ論文報告をした。また、父性 14 染色体ダイソミーと関連する疾患について、胎盤における遺伝子解析と組織学的分析が施行された。胎盤組織において、*DLK1* と *MEG* の微小欠失の解析が施行され、さらに血管内皮細胞の発達に関与する *DLK1*, *DI03*, *RTL1* などのタンパクの解析が行われ、*RTL1as* をコードする microRNA が *RTL1* 発現に関連することがわかった。

(図 1)



習慣流産 101 名、コントロール 82 名より説明と同意の上で採血し、DNA 抽出、*SYCP3* 遺伝子のエクソン 1 からエクソン 8 とその周辺領域でプライマーを設定して PCR し、ダイレクトシーケンスで塩基配列を解析した。また、習慣流産患者のうち前回までの流産のときの絨毛染色体分析結果を含めて解析した。*SYCP3* のエクソン 8 のスプライシング領域において 653A>G 変異が習慣流産患者 1 名とコントロール 1 名で見つかり、Human Reproduction(2011)へ論文報告した。

アネキシンについては *Annexin A5* の 6 つの SNP 間での強い連鎖不平衡と有意な相関を認めた (図 2)。Max 検定の結果からはすべての SNP で dominant モデルが選択された。ハプロタイプ解析では A-C-C-A-G-T で有意差が認められた ($p=0.02$)。次に患者群において年齢・既往流産回数・SNP などを要因として単変量解析を行ったところ、すべての要因で有意な関連は認められなかった。*ANXA5* の遺伝子多型解析において先行研究と同様に流産

との関連性を検出し、これらが dominant モデルであることも統計的に確認できた。これらの遺伝子多型を含む多要因についての多変量解析では有意差が認められず、今後、症例数を増やし検討していく必要があるという結論に至った。

(図 2)

	SNP1	SNP2	SNP3	SNP4	SNP5	SNP6
SNP1		0.979	0.977	0.973	0.505	0.974
SNP2			0.964	0.993	0.496	0.994
SNP3				0.958	0.507	0.960
SNP4					0.493	0.990
SNP5						0.496
SNP6	r					

<http://humrep.oupjournals.org>

Annexin A5 に関する本研究は Fertility and Sterility へ提出、Review をされ、Revised version を再提出中である。

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 7 件)

- ① 鈴森伸宏 胎児診断について Nagoya Medical Journal 53, 35-38, 2013
- ② Suzumori N, Obayashi S, Kumagai K, Goto S, Yoshida A, Sugiura-Ogasawara M. A case of microangiopathic antiphospholipid-associated syndromes (MAPS) during pregnancy- review of the literature. Case Report Med 2012, 827543, 2012. doi: 10.1155/2012/827543.
- ③ Kagami M, Matsuoka K, Nagai T, Yamanaka M, Kurosawa K, Suzumori N, Sekita Y,

Miyado M, Matsubara K, Fuke T, Kato F, Fukami M, Ogata T. Paternal uniparental disomy 14 and related disorders: Placental gene expression analyses and histological examinations. Epigenetics 7, 1142-1150, 2012. doi: 10.4161/epi.21937.

- ④ Sugiura-Ogasawara M, Ozaki Y, Kinue K, Suzumori N, Kitaori T, Mizutani E. Abnormal embryonic karyotype is the most frequent cause of recurrent miscarriage. Hum Reprod 27, 2297-2303, 2012. doi: 10.1093/humrep/des179.
 - ⑤ Mizutani E, Suzumori N, Ozaki Y, Oseto K, Yamada-Namikawa C, Nakanishi M, Sugiura-Ogasawara M. SYCP3 mutation may not be associated with recurrent miscarriage caused by aneuploidy. Hum Reprod 26, 1259-1266, 2011. doi: 10.1093/humrep/der035.
 - ⑥ 杉浦真弓、尾崎康彦、片野衣江、鈴森伸宏 習慣流産 不育症の遺伝学的要因 産婦人科の実際 60, 1287-1291, 2011
 - ⑦ Suzumori N, Ogata T, Mizutani E, Hattori Y, Matsubara K, Kagami M, Sugiura-Ogasawara M. Prenatal findings of paternal uniparental disomy 14: Delineation of further patient. Am J Med Genet 152A, 3189-3192, 2010. doi: 10.1002/ajmg.a.33719.
- [学会発表] (計 8 件)
- ① 林裕子、鈴森伸宏、水谷栄太、片野衣江、尾崎康彦、西山毅、杉浦真弓 不育症女性におけるアネキシソ A5 の遺伝子多型についての検討 第 65 回日本産科婦人

- 科学会学術講演会 (2013年5月10日～12日、札幌)
- ② 鈴木伸宏 習慣流産と遺伝カウンセリング第57回日本生殖医学会学術講演会 シンポジウム (2012年11月8日～9日、長崎)
- ③ 水谷栄太、鈴木伸宏、林裕子、出原麻里、大林伸太郎、熊谷恭子、杉浦真弓 胎児不均衡型相互転座症例の検討 日本人類遺伝学会第57回大会 (2012年10月24日～27日、東京)
- ④ Ozaki Y, Goto S, Goto K, Mizutani E, Suzumori N, Sugiura-Ogasawara M. Calpain in human reproduction: role of calpain in human placenta of patients with intrauterine growth restriction. XIIIth International Symposium on Proteinases, Inhibitors and Biological Control. Sept 22-26, 2012, Portoroz, Slovenia.
- ⑤ 鈴木伸宏 均衡型相互転座保因者の習慣流産第22回遺伝医学セミナーSGM (2012年9月7日～9日、大阪)
- ⑥ 鈴木伸宏 胎児診断について 第156回名古屋市立大学医学会例会 (2012年6月19日、名古屋)
- ⑦ 水谷栄太、鈴木伸宏、大瀬戸久美子、大林伸太郎、熊谷恭子、尾崎康彦、中西真、杉浦真弓 習慣流産におけるSYCP3遺伝子変異解析 第63回日本産科婦人科学会学術講演会 (2011年8月29日～31日、大阪)
- ⑧ Mizutani E, Suzumori N, Ozaki Y, Oseto K, Yamada-Namikawa C, Nakanishi M, Sugiura-Ogasawara M. SYCP3 mutation may not be associated with recurrent miscarriage caused by aneuploidy. The 27th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). July 3-6, 2011, Stockholm, Sweden.
- [その他]
ホームページ等
http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/obgyne.dir/group_sen.html
6. 研究組織
(1) 研究代表者
鈴木伸宏 (SUZUMORI NOBUHIRO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：70326148
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
杉浦真弓 (SUGIURA-OGASAWARA MAYUMI)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30264740