

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791799

研究課題名(和文) ヒト不妊症精子におけるメチル化インプリントの異常と分子機構の解析

研究課題名(英文) Aberrant DNA methylation of the imprinted genes in the sperm of

研究代表者

宮内 尚子 (MIYAUCHI, Naoko)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・技術補佐員

研究者番号：60596162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：インプリント遺伝子はDNAメチル化により、特定の親アレルを認識し、片親性発現をする。このDNAメチル化は、受精前の生殖細胞形成過程で決定され一生安定に維持されなければならない。不妊症男性精子のメチル化インプリント(22領域)の異常についてその頻度、程度、影響について解析した。197例の精子検体のうち50例(25.4%)にメチル化インプリントの異常が認められた。また、このメチル化異常と精液所見に正の相関がみられ、精子形成とメチル化異常に強い関連があることが示唆された。また、着床率や出生率とも関連を示した。

研究成果の概要(英文)：The parent-of-origin specific expression of the imprinted genes relies on DNA methylation during gametogenesis. We found aberrant DNA methylation of 22 imprinted loci in sperm from infertile men. We identified approximately 25%(84/337)abnormal methylation cases. We found strong correlation between methylation error and poor quality sperm(oligozoospermia),and low imprint rate and live-birth. We need carefully follow-up ART children.

研究分野：産婦人科学

科研費の分科・細目：産科

キーワード：生殖補助医療(ART) 男性精子 DNAメチル化 ゲノムインプリント

1. 研究開始当初の背景

我が国では少子化、晩婚化の社会情勢と不妊技術の進歩により、生殖補助医療 (ART) は一般的な不妊治療に普及し、定着している。しかし、この ART の普及と伴に、本来非常に稀であったインプリント疾患 (Beckwith-Wiedemann 症候群及び Angelman 症候群、Silver-Russel 症候群) の発症頻度が増加しているとの報告が数多くみられる。ART は不妊症患者に多大な恩恵をもたらすが、インプリントが獲得・維持される時期の配偶子・胚を操作するため、その影響について懸念されている。このゲノムインプリンティング (遺伝子刷り込み) は、生殖細胞形成過程で、母 (卵子) 由来と父 (精子) 由来のゲノムの特定領域に、DNA メチル化を確立することで親由来アレルの区別を行う。生殖細胞で起こる DNA メチル化の異常の原因として、男性不妊症患者の精子では異常が予想される。本研究では、不妊症精子に着目し、その異常の頻度、程度、及び着床率や出生率の影響について検討した。

2. 研究の目的

多数例の乏精子症患者精子を対象に、8 領域のメチル化インプリントについて網羅的解析を行い、異常の頻度・程度・影響を受けやすい遺伝子について解析すること、及びメチル化異常精子のパターン解析を行い、メチル化異常の発症機構について検討する事を目的とした。さらに、メチル化異常と着床率や出生率との関係についても検討を加えた。

3. 研究の方法

(対象) 不妊症男性精子 337 例: 乏精子症精子 (精子数 \times 運動率 $< 5 \times 10^6 / \text{mL}$) 61 例・中間群精子 ($20 - 5 \times 10^6 / \text{mL}$) 67 例・正常精子 ($> 20 \times 10^6 / \text{mL}$) 209 例。
(メチル化の解析法) Bisulphite-PCR 法で DNA メチル化について解析した。卵子型インプリント 5 種類 (LIT1, ZAC, PEG1, PEG3, SNRPN) と精子型インプリント 3 種類 (ZDBF2, H19, GTL2) また、インプリントを受けない反復配列 (LINE1 及び Alu) についても解析した。

4. 研究成果

(1) 精子型インプリント遺伝子の DNA メチル化の解析

精子型インプリント遺伝子 3 領域について、H19 領域: 220-bp (18 の CpG 部位)、GTL2 領域: 259-bp (15 の CpG 部位)、ZDBF2 領域: 220-bp (18 の CpG 部位) のメチル化について解析した。大多数の精子検体は、3 領域全て完全なメチル化を示した。しかし H19 の 10 例では、非メチル化を示した。このうち 7 例は重症型乏精子症患者であった。また、GTL2 では 16 例、ZDBF2 では 9 例に、異常な非メチル化精子を認めた。メチル化異常のうち乏精子症は、GTL2 で 8 例、ZDBF2 で 4 例であった。正常精子でもメチル化異常は認められた。

(2) 卵子型インプリント遺伝子の DNA メチル化の解析

卵子型インプリント遺伝子は、19 領域 (DIRAS3, NAP1L5, FAM50B, ZAC (PLAGL1), GRB10, PEG10, PEG1 (MEST), INPP5F-v2, LIT1 (KCNQ10T1), RB1, SNRPN, ZNF597, ZNF331, PEG3, PSIMCT-1, NNAT, L3MBTL, NESPAS, GNAS1A) で、DNA メチル化の解析をお

こなった。卵子型インプリント遺伝子で、でメチル化異常は 197 例中 50 例で 25.4%であった。その内訳は、図 1 にまとめた。また、異常なメチル化パターンを示す 50 例中 20 例は、複数のインプリント領域の異常であった。また、19 例は、精子型インプリントと卵子型インプリントの両方の異常がみられた。

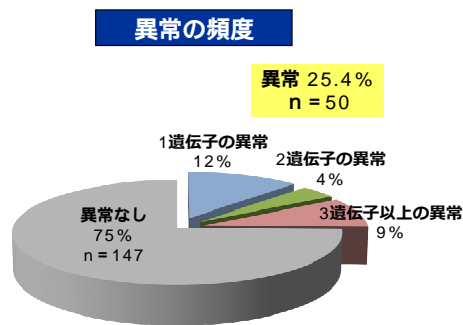


図 1 不妊症精子におけるインプリント遺伝子のメチル化異常

(3) 非インプリント遺伝子の DNA メチル化の解析

精子の DNA メチル化異常が、インプリント遺伝子に特異的であるのか、あるいはゲノム全体のメチル化の異常であるのか検討した。インプリントを受けない反復配列 (LINE1 及び Alu) について、DNA メチル化の解析をおこなった。LINE1 (413-bp、28 の CpG 部位) 及び Alu (152-bp、12 の CpG 部位) のメチル化について解析した。その結果、全ての症例で、これら反復配列領域のメチル化に有意な差は認められず、メチル化の異常はインプリント遺伝子に特有な現象と考えられた。

(4) メチル化インプリント異常の特徴

337 例の精子検体のうち、45 例 (13.3%) で、1 遺伝子以上にメチル化異常が確認された。精子型インプリン

トの異常は 18%、卵子型は 82%であった。3 領域以上のメチル化異常を示す症例は 50 例中 18 例で、このうち乏精子症の症例は 14 例 (77.8%) であった。

次に、メチル化異常と精液所見による精子性状との関連性について検討した。メチル化異常の頻度は、「重症型乏精子症」では 74.0%、「中等度乏精子症」では 21.0%、「正常精子」では 16.7%で、メチル化異常と精子濃度に負の相関が認められた。同様に、運動率を 10%以下、10-40%、40%以上の 3 群に分類した場合、運動率とメチル化異常との間に負の相関を認められた。さらに奇形率を 50%以下、50-65%、65%以上の 3 群に分類した場合、奇形率とメチル化異常の頻度の間に、正の相関を認められた。メチル化異常の有無と年齢および BMI に相関は認められなかった。次に、メチル化異常の程度について、「重症型乏精子症」、「中等度乏精子症」、「正常精子」の比較検討した。精子所見はメチル化異常の程度にも相関することが示された。このような事実よりメチル化異常と精子形成能には、密接な関連があることが考えられた (図 2)。

また、メチル化の程度と着床率、出生率との関連を検討した。着床率、出生率ともメチル化異常の程度と相関が認められた (図 3)。

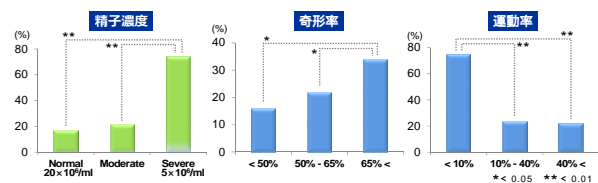


図 2 インプリントメチル化の異常と精子所見との関係

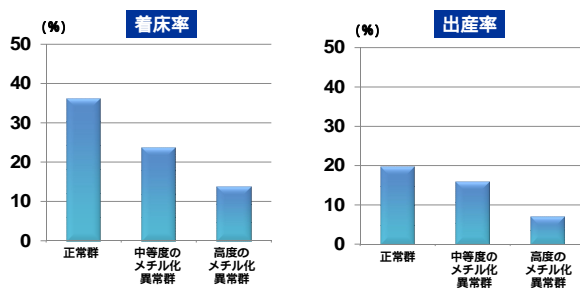


図3 メチル化異常の程度と着床率、出生率の関連

今後さらに、メチル化酵素関連遺伝子や精子形成関連遺伝子などのゲノム解析により、その原因が明らかになると予想している。

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4件)

Hiura H, Toyoda M, Okae H, Sakurai M, Miyauchi N, Sato A, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Nishino K, Umezawa A, Arima T. Stability of the abnormal imprinting of human induced pluripotent stem cells. **BMC Genetics**. 14, 32, 2013. (査読有) doi: 10.1186/1471-2156-14-32.

Chiba H, Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Arima T. DNA methylation errors in imprinting disorders and assisted reproductive technologies. **Pediatrics international**. 55, 542-549, 2013. (査読有) doi: 10.1111/ped.12185.

Hiura H, Okae H, Kobayashi H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Suzuki F, Nagase S, Sugawara J, Nakai K,

Yaegashi N, Arima T.

High-throughput detection of aberrant imprint methylation in the ovarian cancer by the bisulphite PCR-Luminex method. **BMC Medical Genomics**. 5, 8-17, 2012. (査読有) doi: 10.1186/1755-8794-5-8.

Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Van De Pette M, John R M, Kagami M, Nakai K, Soejima H, Ogata T, Arima T. Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproductive technologies. **Human Reproduction**. 27 (8), 2541-2548, 2012. (査読有) doi: 10.1093/humrep/des197.

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮内 尚子 (MIYAUCHI, Naoko)

東北大学・大学院医学系研究科・研究支援者

研究者番号：60596162