

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09215

研究課題名(和文) ART由来先天性インプリンティング異常症の発症機序の検討とリスク要因の探索

研究課題名(英文) Investigation of the pathogenesis of imprinting disorders in ART patients and search for risk factors in ART

研究代表者

樋浦 仁 (HIURA, Hitoshi)

東京農業大学・生命科学部・准教授

研究者番号：70451523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Silver-Russell症候群患者およびBeckwith-Wiedemann症候群の生殖補助医療(ART)由来と非ART由来の患者末梢血のDNAメチル化を比較し、ARTのリスク要因について評価した。非ART群と比較して、ART群はDNAメチル化可変領域(DMV)が多く、ゲノムの広範囲に広がっていた。また、DMVは脱メチル化よりもメチル化されている頻度が高く、精子でメチル化される領域で起こりやすいことが明らかとなった。以上より、ARTにおけるDMVは授精操作、体外培養に用いられる培養液等によって影響を受けた可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

晩婚化の社会情勢に伴い、生殖補助医療(ART)が急速に普及してきた。しかし、これまで非常に稀であったゲノムインプリンティング(GI)異常症の発症頻度が増加していることが世界中で報告されている。本研究では、ART由来のGI異常症と非ART由来の患者末梢血のDNAメチル化を比較し、ARTのリスク要因について評価した。その結果、DNAメチル化可変領域はARTにおける体外受精または顕微授精操作、体外培養に用いられる培養液等によって影響される可能性が示唆された。本研究成果はARTにおける疾患発症予防に繋がること期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we compared comprehensive DNA methylation in peripheral blood with assisted reproductive technologies (ART)-conceived and spontaneously conceived imprinting disorders (Silver-Russell syndrome and Beckwith-Wiedemann syndrome) patients to evaluate risk factors for ART. We found that ART-conceived patients had incomplete and more widespread DNA methylation variations (DMVs) than spontaneously conceived patients, especially in sperm-specific methylated regions. These results suggest that the imprinting disorders related to ART might tend to take place just after fertilization at a time when the epigenome is most vulnerable and might be affected by the techniques of manipulation used for in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection and the culture medium of the fertilized egg.

研究分野：分子生物学

キーワード：生殖補助医療(ART) インプリント疾患 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

晩婚化の社会情勢に伴い、生殖補助医療 (ART) が急速に普及してきた。しかし、同時にこれまで非常に稀であったゲノムインプリンティング (遺伝子刷り込み: GI) 異常症の発症頻度が増加していることが世界中で報告され、注目されている。これには、GI が確立する時期の配偶子や受精卵が、環境変化 (排卵誘発、配偶子操作、培養液など) に対して非常に脆弱であり、その時期に ART により操作する事が様々な異常を招く原因である可能性が高い。GI 異常は、先天性疾患だけでなく、周産期異常、乳幼児の身体的、精神的発育・発達、性格、行動異常等にも関連する。さらに、癌や生活習慣病などの成人性疾患の原因となりうるため、次世代社会の最重要な問題として早急に実態を把握し、適切な対応が必要とされる。しかしながら、ART 由来の先天性 GI 異常症が発症するのか、そのリスク要因は何であるのか、これまで全く明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、ART 由来の先天性 GI 異常症と非 ART 由来の患者末梢血の DNA メチル化を比較し、メチル化異常のパターン分析により、ART のリスク要因について評価する。

3. 研究の方法

(1) サンプルの収集

ART を受けた疾患患者 (SRS: 5 名、BWS: 2 名)、自然発症の患者 (SRS: 5 名、BWS: 7 名)、健常児 (10 名) について解析した。ヘルシンキ宣言 (エジンバラ改訂) 臨床研究に関する倫理指針 (厚生労働省) に従い、本研究を実施した。東北大学医学部倫理委員会より、研究プロトコルの承諾を得た。研究対象者の登録にあたっては、機密保護に十分に配慮した。すなわち研究対象者の同意や照会は研究登録番号、症例イニシャル、生年月日を用いて行うこととし、直接患者を識別できる情報は事務局のデータベースには登録していない。また、本研究に係わる臨床記録、検査データ、同意に関する記録など医療機関において作成されたものについては保管責任者が鍵のかかるキャビネットに保管した。

(2) Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS) による系統的、網羅的全ゲノムのメチル化解析

ART および非 ART の先天性 GI 異常症 SRS および BWS 患者および健常児の末梢血からゲノム DNA を抽出した。10ng のゲノム DNA を制限酵素 MspI で消化し、末端を修復した後、5 メチルシトシンを含むメチル化アダプターとライゲーションした。次に、電気泳動で 150-350bp の DNA 断片を回収、精製した後、Bisulfite 処理を行った。Bisulfite 処理 DNA を鋳型として、インデックス付きプライマーを用いて、PCR により増幅し、RRBS ライブラリーを作製した。作製したライブラリーのサイズ分布の確認および濃度を定量した後、次世代シーケンサー HiSeq2000 (Illumina) にて塩基配列を決定した。次世代シーケンサーにより得られた塩基配列データは、Bismark で hg19 ヒトゲノムにマッピングし、5 リード以上マッピングされた CpG について解析した。Bisulfite 置換効率は non-CpG の置換効率によって算出した。CpG のメチル化はプロモーター (転写開始点から ± 0.5 kb)、遺伝子領域、CpG アイランド、CpG アイランドショア、CpG アイランドシェルフ、LINE、SINE、LTR、Repeat DNA、SVA およびシンプルリピートについて、それぞれの領域毎のメチル化率を算出し、健常児平均と比較して 7.5% のメチル化変化かつ FDR が 0.05 未満の領域を DNA メチル化変動領域 (DNA methylation variation: DMV) とし、ART 群と非 ART 群を比較した。プロモーターにおけるメチル化異常領域については、Gene Ontology (GO) 解析による生物学的機能解析を行った。

(3) エクソーム解析

SRS および BWS 患者および健常児の 1 μ g の末梢血ゲノム DNA をソニケーターで断片化後、末端を修復し、インデックス用アダプターとライゲーションした。その後、Agilent SureSelect V5 + UTRs を用いて、エクソン領域内の DNA 断片を濃縮し、回収した。次に、PCR により増幅し、ライブラリーを作製した。作製したライブラリーのサイズ分布の確認および濃度を定量した後、次世代シーケンサー HiSeq2000 にて塩基配列を決定した。SIFT および PolyPhen-2 予測アルゴリズムにより、DNA メチル化やエピジェネティクス制御に関わる遺伝子の非同義塩基変異を探索した。

4. 研究成果

(1) SRS 患者末梢血の RRBS 法による DNA メチル化解析

ART 及び非 ART の SRS 患者について解析した結果、プロモーター、遺伝子領域、CpG アイランド、CpG アイランドショア、CpG アイランドシェルフ、SINE、LTR およびシンプリリピートの領域において、DMV の数は ART 群の方が有意に多く、また、高メチル化されている領域が多かった(図1)。常染色体上における DMV の分布を検討したところ、ゲノム全体にランダムに分布していた(図2)。SRS で DMV を示した 83 のプロモーター領域(79 遺伝子)の DMV を生物学機能解析に供試したが、濃縮された GO term はひとつも得られなかった。次に生殖細胞におけるメチル化パターンで DMV を分類した結果、ART 群では精子でメチル化される領域が多かった(図3)。精子でメチル化されている領域は、受精後の 1 細胞期で速やかに脱メチル化されるものが多いため、ART 群の DMV は、受精操作または培養操作によって誘引された可能性が示唆された。

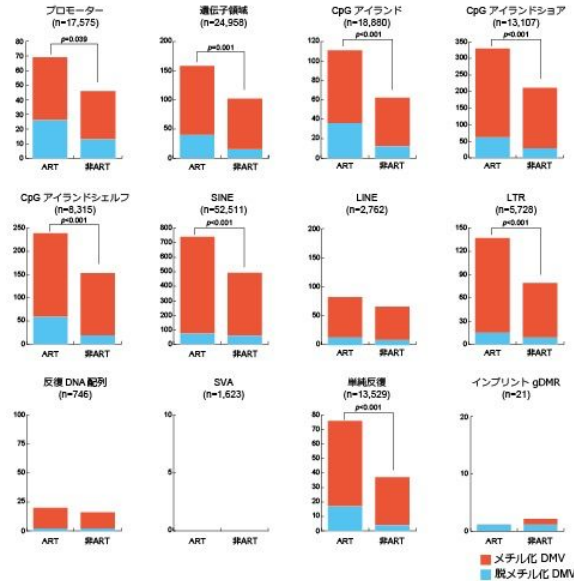


図1 常染色体上におけるDMVの分布

(2) BWS 患者末梢血の RRBS 法による DNA メチル化解析

SRS 同様に、ART 及び非 ART の SRS 患者について解析した結果、プロモーター、ジーンボディ、CpG アイランド、CpG アイランドショア、CpG アイランドシェルフ、SINE およびシンプリリピートの領域において、DMV の数は ART 群の方が有意に多く、また、高メチル化されている領域が多かった。常染色体上における DMV の分布を検討したところ、ゲノム全体にランダムに分布していた。BWS で DMV を示した 64 のプロモーター領域(61 遺伝子)の DMV を生物学機能解析に供試したが、濃縮された GO term はひとつも得られなかった。次に生殖細胞におけるメチル化パターンで DMV を分類した結果、SRS 同様に ART 群では精子でメチル化される領域が多かった。

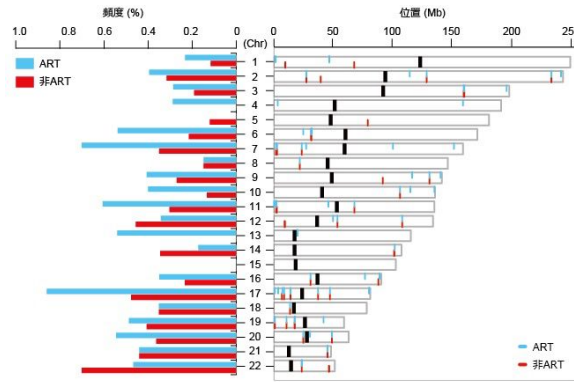


図2 常染色体上におけるDMVの分布

(3) エクソーム解析による DNA メチル化異常の原因遺伝子の探索

SRS および BWS 患者の末梢血ゲノム DNA の非同義塩基変異について、DNA メチル化酵素 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、DNMT3L、メチル化基質合成酵素遺伝子 MAT2A、DNA メチル化関連因子 CTCF、YY1、NLRP2、NLRP5、NLRP7、KHDC3L、ZFP57、UHRF1、ARID4A、ARID4B、MBD3 の変異を探索した。その結果、DNMT1 遺伝子に 2 つの Single Nucleotide Variant (SNV)、NLRP2 遺伝子に 2 つの SNV、NLRP7 遺伝子に 1 つの SNV および KHDC3L 遺伝子に 1 つの SNV が明らかになった(表1)。これらの SNV は全て非同義置換 SNV であった。予測アルゴリズム SIFT および PolyPhen-2 の解析の結果、KHDC3L 遺伝子の機能に重大な影響を及ぼすような非同義塩基変異が明らかになった。

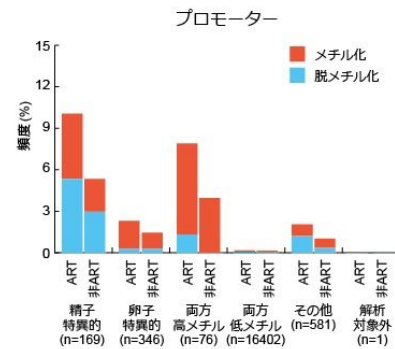


図3 DMVの生殖系列特異的メチル化パターン

Symbol	dbSNP	exonic : type	CDS	Protein	SIFT score	PolyPhen2 HDIV score	SRS		BWS	
							ART (n=5)	非ART (n=5)	ART (n=2)	非ART (n=7)
DNMT1	rs75616428	非同義置換SNV	G358C	V120L	0.350	0.264	1	0	0	0
DNMT1	rs2228612	非同義置換SNV	A979G	I327V	0.310	0.000	2	0	1	0
NLRP2	rs144821238	非同義置換SNV	G323T	A108T	0.730	0.082	0	1	0	0
NLRP2	rs41514352	非同義置換SNV	G1022A	R341K	0.700	0.363	0	1	1	0
NLRP7	rs775882	非同義置換SNV	G955A	V319I	0.600	0.010	0	2	1	0
KHDC3L	rs561930	非同義置換SNV	C602G	A201G	0.050	0.997	1	4	1	1

表1 DNAメチル化関連遺伝子の変異

本研究では、SRS 患者および BWS 患者について、ART 由来と非 ART 由来患者の DNA メチル化を RRBS 法にて解析し、その特長を調べた。その結果、ART 由来の場合では DMV の数が多く、広範囲に広がっていた。また、DMV は脱メチル化よりもメチル化されている頻度が高く、さらに、DMV

は精子でメチル化される領域で起こりやすいことが明らかとなった。これらの DNA メチル化異常の結果から、生殖細胞系列過程におけるメチル化の獲得より、むしろ脱メチル化に異常が生じたもの、すなわち、受精以降にメチル化異常の原因があると考えられた。以上の結果より、DMV は ART における体外受精 (IVF) または顕微授精 (ICSI) 操作、体外培養に用いられる培養液等によって影響される可能性が示唆された。また、これらの成果は、Clinical Epigenetics 誌に投稿し、掲載された (Hattori H, Hiura H (co-first author) et al. 2019)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ochiai Kyoko, Yamaoka Mari, Swaminathan Amrutha, Shima Hiroki, Hiura Hitoshi, Matsumoto Mitsuyo, Kurotaki Daisuke, Nakabayashi Jun, Funayama Ryo, Nakayama Keiko, Arima Takahiro, Ikawa Tomokatsu, Tamura Tomohiko, Sciammas Roger, Bouvet Philippe, Kundu Tapas K., Igarashi Kazuhiko	4. 巻 33
2. 論文標題 Chromatin Protein PC4 Orchestrates B Cell Differentiation by Collaborating with IKAROS and IRF4	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108517 ~ 108517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108517	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Bai H., Hiura H., Obara Y., Kawahara M., Takahashi M.	4. 巻 103
2. 論文標題 Short communication: Menaquinone-4 (vitamin K2) induces proliferation responses in bovine peripheral blood mononuclear cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dairy Science	6. 最初と最後の頁 7531-7534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3168/jds.2019-17987	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hattori Hiromitsu, Hiura Hitoshi, Kitamura Akane, Miyauchi Naoko, Kobayashi Norio, Takahashi Souta, Okae Hiroaki, Kyono Koichi, Kagami Masayo, Ogata Tsutomu, Arima Takahiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Association of four imprinting disorders and ART	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Epigenetics	6. 最初と最後の頁 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13148-019-0623-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Okae Hiroaki, Toh Hidehiro, Sato Tetsuya, Hiura Hitoshi, Takahashi Sota, Shirane Kenjiro, Kabayama Yuka, Suyama Mikita, Sasaki Hiroyuki, Arima Takahiro	4. 巻 22
2. 論文標題 Derivation of Human Trophoblast Stem Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 50 ~ 63.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2017.11.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 服部裕充、樋浦仁、北村茜、宮内尚子、小林記緒、高橋聡太、岡江寛明、京野廣一、鏡雅代、緒方勤、有馬隆博
2. 発表標題 インプリンティング疾患と生殖補助医療のリスク要因
3. 学会等名 第14回日本生殖発生医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林記緒、樋浦仁、岡江寛明、有馬隆博
2. 発表標題 ヒト胎盤幹（TS）細胞の樹立とその細胞特性
3. 学会等名 第14回日本生殖発生医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 記緒、岡江 寛明、高橋 聡太、樋浦 仁、有馬 隆博
2. 発表標題 ヒト胚性幹細胞の栄養膜幹細胞への分化転換
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田 晋也、田中 康貴、大谷 麗子、飯田 有紀、樋浦 仁、外丸 祐介、尾畑 やよい、河野 友宏
2. 発表標題 レトロトランスポソンの脱抑制がマウス前精原細胞の遺伝子発現制御に与える影響
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高島 友弥、横田 将、樋浦 仁、小林 久人、尾畑やよい、小川英彦、河野 友宏
2. 発表標題 マウス始原生殖細胞で発現するsmall RNA
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林記緒、樋浦仁、岡江寛明、有馬隆博
2. 発表標題 ヒト胎盤のトロフォブラスト幹細胞の樹立と臨床への応用
3. 学会等名 第70回日本産科婦人科学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林記緒、樋浦仁、岡江寛明、有馬隆博
2. 発表標題 ARTによるエピジェネティクスの変調
3. 学会等名 第63回日本生殖医学会学術講演会・総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 宮内尚子、服部裕充、小林記緒、樋浦 仁、有馬隆博	4. 発行年 2019年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 54
3. 書名 月刊「細胞」	

1. 著者名 樋浦 仁、岡江寛明、有馬隆博	4. 発行年 2019年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 342
3. 書名 Science and Practice 産科婦人科臨床シリーズ 1 生殖生理	

1. 著者名 Hattori H, Hiura H, Kobayashi N, Takahashi S, Okae H, Arima T.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Academic Press.	5. 総ページ数 1110
3. 書名 Therapeutic approaches to imprinting diseases. Epigenetics in Human Disease	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	緒方 勤 (OGATA Tsutomu) (40169173)	浜松医科大・医学部・教授 (13802)	
研究協力者	鏡 雅代 (KAGAMI Masayo) (70399484)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・分子内分沁研究部・室長 (82612)	
研究協力者	副島 英信 (SOEJIMA Hidenobu) (30304885)	佐賀大学・医学部・教授 (17201)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	有馬 隆博 (ARIMA Takahiro) (80253532)	東北大学・大学院医学系研究科・教授 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関