

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 13 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16807

研究課題名(和文) 胎児染色体数的異常に起因する不育症の関連遺伝子の解析とリスク評価の開発

研究課題名(英文) Association analysis and risk assessment of genes for recurrent pregnancy loss caused by fetal chromosomal aneuploidy

研究代表者

吉原 紘行 (Yoshihara, Hiroyuki)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教

研究者番号：30812094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：加齢により停止期が長いほど染色体数的異常が増加し、体細胞分裂では1%以下の染色体分配エラーが卵母細胞では10-30%起こる。減数分裂特異的遺伝子について遺伝子多型解析を行ったが、有意なSNPsを認めず網羅的な解析を行った。胎児染色体異常性不育症患者192人を対象として、66万か所のSNPsのタイピングを行った。日本人1157人のリファレンスと二乗検定を行い、最も有意な関連を示したSNVのrs7908491 ($P=1.06E-06$, $OR=1.72$) は、減数分裂関連因子であるMEIG1 遺伝子のスプライシングQTLとして報告され、染色体異常性ともっともな関連があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的である胎児染色体数的異常の関連遺伝子を同定することにより、不育症のrisk alleleが見つかることが予測される。「流産しやすい体質」についての遺伝カウンセリングを提供することができる。流産しやすい体質だと分かれば早めの出産を検討するなど、流産リスクを知ることにより、女性がライフプランを考えるためのbiomarkerとして貢献する波及効果が期待できる。ここに本研究の創造性があり、妊娠の高年齢化した日本だけでなく世界中に貢献できると考えている。また、関連遺伝子の同定は将来的には新たな不育症の治療・予防法の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：Ageing increases chromosome aneuploidy with longer arrest periods, with chromosome partitioning errors of less than 1% in somatic cell division occurring in 10-30% of oocytes. A genetic polymorphism analysis was performed for meiosis-specific genes, but no significant SNPs were found and a comprehensive analysis was performed. A total of 660,000 SNPs were typed in 192 patients with fetal chromosome aneuploidy. A χ^2 -square test was performed with 1157 Japanese references and the SNV with the most significant association, rs7908491 ($P=1.06E-06$, $OR=1.72$), was reported as a splicing QTL for the MEIG1 gene, a meiosis-related factor and most likely associated with chromosome aneuploidy. It was considered to be most likely associated with chromosome aneuploidy.

研究分野：不育症

キーワード：不育症 減数分裂 コヒーシオン ジャポニカアレイ ゲノムワイド関連解析 東北メディカル・メガバンク 再現性研究 胎児染色体数的異常

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

流死産を繰り返す不育症は妊娠経験者の 4.2%、3 回以上の習慣流産は 0.9%、1 回以上の流産は 38% である。抗リン脂質抗体症候群、子宮奇形、夫婦染色体均衡型転座、胎児 (胎芽) 染色体数的異常が不育症の 4 大原因であるが、半数以上が原因不明とされてきた。原因不明の不育症については約 187 の関連遺伝子が報告されているが、胎児染色体数的異常の不育症の関連遺伝子は見つかっていない。卵母細胞は胎生初期に形成され、その後、創られることはない。卵子形成は第一減数分裂前期で停止し、排卵時に LH サージをトリガーとして減数分裂が再開され染色体が分配される。加齢により停止期が長いほど染色体数的異常が増加し、体細胞分裂では 1% 以下の染色体分配エラーが卵母細胞では 10-30% 起こる。その原因として、染色体接着を制御する減数分裂に関わるコヒーシンが加齢とともに減少することが分かってきた。コヒーシンは、姉妹染色单体の接着保護や動原体の一方向性を制御する働きをしている。

2. 研究の目的

胎児染色体数的異常は 41% と最も高頻度の不育症原因であり、これらの患者は数的異常を繰り返す傾向があることを明らかにした。胎児染色体数的異常に起因する不育症患者は出産可能であることから多数の遺伝子多型による多因子遺伝によることが推測され、Stromal antigen 3 (*STAG3*) などの減数分裂特異的遺伝子が候補であると考えた。コヒーシンは体細胞分裂と減数分裂とで構成が異なり、減数分裂コヒーシンを構成する蛋白質を誘導する *STAG3* などが動原体の接着、動原体の一方向性の結合において重要な役割を担うことが報告されている。*STAG3* はコヒーシンを構成する減数分裂特異的蛋白であり、*STAG3* は胎生初期の卵巣のみに発現する減数分裂特異的遺伝子である。stag3 欠失マウスは卵子形成が発生初期で止まり不妊であり、ヒトでは *STAG3* 欠失によって家族性卵巣不全症候群を起こすことが報告されている。

また 2015 年に体細胞由来数的異常関連遺伝子 Polo-like kinase 4 (*PLK4*) が報告され、この遺伝子の変異を持つと受精卵が胚盤胞に到達しないことがわかった。*PLK4* は体細胞分裂の中心小体の生合成に重要な役割を果たし、マウス胚で最初の細胞分裂の紡錘体形成に不可欠であることが知られている。母体の *PLK4* が枯渇すると、微小管の核形成と成長が阻害され、紡錘体形成の異常が生じる。McCoy らは、着床前診断で使用した胚盤胞を調べ、ゲノムワイド関連解析で *PLK4* (rs2305957) と母体の体細胞分裂由来の異数性との関連を発見した。この遺伝子型を持つ女性は、胚盤胞の数が少なく、胚が胚盤胞形成まで生き残る可能性が低いことを示唆していた。また、*PLK4* は体細胞分裂由来の染色体数的異常関連遺伝子であるが、*PLK4* (rs2305957) は不育症と関連していると報告がある。しかし、この研究は絨毛染色体が異数性を示す患者に焦点を当てていなかった。

減数分裂コヒーシン蛋白を構成する遺伝子など減数分裂特異的遺伝子に着目し、不育症における減数分裂に由来する胎児染色体数的異常の関連遺伝子を同定することが、本研究の目的である。そこで、本研究では既往流産において絨毛染色体が異数性を示した不育症患者において、*PLK4* (rs2305957) と *STAG3* と不育症の関連性を調べた。

3. 研究の方法

胎児染色体異数性を示した不育症患者 184 人と、流産歴がなく出産歴のある女性 190 人について症例対照研究を行った。適合基準として 2 回以上の流産歴があり、胎児染色体異数性を少なくとも 1 回認めていることとした。除外基準として抗リン脂質抗体症候群、夫婦染色体異常、子宮奇形、絨毛染色体が倍数体異常または 45,X である患者とした。この研究は当院倫理委員会の承認を得て実施した。1000 Genomes JPT のデータベースから 218 個の *STAG3* の SNP 情報を取得した。マイナーアレル頻度(MAF)が 0.05 以上で、遺伝子発現と関連しうると報告のある 27 個の SNP を候補として選定した。ここから連鎖不平衡係数(r^2)が 0.8 以上となるような 5 個のタグ SNP を選択し遺伝子多型解析を行った。DNA は末梢血から抽出し、TaqMan PCR を用いてジェノタイプングを行った。

4. 研究成果

患者群の年齢は 36.8±4.3 歳、流産数 3.09±1.13 回、出産数 0.46±0.64 回、体外受精を行っていたのは 26.1% であった。コントロール群の年齢は 36.8±5.5 歳、流産数 0 回、出産数 1.66±0.70 回であり、年齢の有意差は認めなかった。*PLK4*、*STAG3* から合計 6 個の SNP を解析した。患者群とコントロール群の MAF は *PLK4* (rs2305957)0.367,0.361、*STAG3* (rs941288)0.079,0.053、*STAG3* (rs13230744)0.394,0.363、*STAG3* (rs1061230)0.440,0.411、*STAG3* (rs1624099)0.359,0.355、*STAG3* (rs4727450)0.245,0.261 であった。6 個の SNP において、患者群とコントロール群との間で MAF に有意差は認めなかった。その頻度は日本人のゲノムデータベース Integrative Japanese Genome

Variation Database (iJGVD) の報告と類似していた。

PLK4, *STAG3* (rs13230744,rs1061230,rs1624099,rs4727450)については最大の検定統計量を優性、劣性、相加モデルから選択する max 検定を用い P 値を計算した。P 値は *PLK4* で 0.619、*STAG3* (rs13230744,rs1061230,rs1624099,rs4727450)でそれぞれ 0.537,0.655,0.803,0.857 であり、統計的に有意な関連を示すことはできなかった。*STAG3* (rs941288)はマイナーホモ接合体が観察されなかったので、フィッシャーの正確検定を行ったが、統計的に有意な関連は示唆されなかった (P = 0.168)。

PLK4 (rs2305957)および *STAG3* は胎児染色体の異数性によって引き起こされる不育症とは関連していなかった。McCoy らの報告では *PLK4* (rs2305957)は 減数分裂ではなく、体細胞分裂における染色体異数性の原因となり、リスクアレルを持つ女性は、胚盤胞の数が少なく、胚が胚盤胞形成まで生き残る可能性が低いことを示唆していた 4)。臨床的にはモザイクにより着床不全、つまり不妊症の原因となる。*PLK4* (rs2305957) および *STAG3* は絨毛染色体の異数性によって引き起こされる不育症とは関連していなかった。これまでの報告と合わせて考えると、*PLK4* のリスクアレルは流産ではなく、むしろ不育症患者が不妊となる合併症に寄与しているのではないかと推測する。

本研究の 1 つの制限は、網羅的な関連遺伝子の分析ができないことである。減数分裂時のセントロメアの接着を保護するために、*REC8* はシュゴシンと *MEIKIN* をリクルートし、セントロメアの一方向性結合を維持する。他の減数分裂特異的遺伝子 *REC8*, *MEIKIN* などについてデータベースから取得した遺伝子多型を絞り込んだとしても、機能的な多型の報告は比較的多く、実行するには非現実的である。さらに、比較的最近発見された遺伝子には多くの未報告の多型があり、データベースに依存する分析を行うことはできない。

減数分裂特異的遺伝子のリスクアレルは、加齢による不妊症、不育症の予知因子であるためだけでなく、女性が自分のライフプランを考えるために重要であり、今後ゲノムワイド関連解析にて網羅的に解析を行うことを予定している。

以下に現在進行中のゲノムワイド関連解析 (GWAS) を概説する。

胎児染色体異数性を示した不育症患者 189 人と、日本人健常者 1157 人をコントロールとして解析した。全患者に系統的検査を実施し、抗リン脂質症候群、夫婦染色体異常、子宮奇形がある患者は除外された。過去に流産した胎児染色体が 3 倍体または 45,X を示した患者は除外された。保存した EDTA 血液サンプルから DNA を分離し、Axiom Japonica-array v2 (659,503 SNVs) で遺伝子型判定を行った。GWAS では、対立遺伝子頻度モデルで 2×2 の分割表にカイ二乗検定を適用した。患者および対照被験者の平均 (SD) 年齢は 36.8 (4.3) 歳であった。過去の流産回数の平均 (SD) は 3.09 (1.13) であった。保存した EDTA 血液サンプルから DNA を分離し、Axiom Japonica-array v2 (659,503 SNVs) で遺伝子型判定を行った。GWAS データにより、示唆的な有意性を示す SNV が 5 つ見つかった (p < 9.46e-06)。最も有意な関連を示した SNV (P=1.06E-06、OR=1.72) は、解析 SNV 数を考慮したボンフェローニ補正後の対立遺伝子モデルにおいて、meiosis/spermiogenesis associated 1 (*MEIG1*) 遺伝子に位置していた。SNV の rs7908491 は、減数分裂/減数分裂関連因子である *MEIG1* 遺伝子のスプライシング QTL として報告され、染色体異数性ともっともな関連があると考えられる。今後全ゲノムインピュテーション解析により、より有意な関連を有する SNV を検出する。

我々の発見は、*MEIG1* 遺伝子の特定の遺伝子型が異数性妊娠喪失の危険因子となり得ることを実証している。臨床的に適用可能な母体生殖細胞マーカーが確立されれば、PGT がより有用であるグループを特定したり、妊娠に関する予後情報を提供するカウンセリングを患者に提供したりすることができる。

<参考文献>

- 1) Sugiura-Ogasawara M, et al. Abnormal embryonic karyotype is the most frequent cause of recurrent miscarriage. Hum Reprod 2012 ; 27 : 2297–303.
- 2) Popescu F, et al. Recurrent pregnancy loss evaluation combined with 24-chromosome microarray of miscarriage tissue provides a probable or definite cause of pregnancy loss in over 90% of patients. Hum Reprod 2018 ; 33 : 579–87.
- 3) Tsutsumi M. et al. Age-related decrease of meiotic cohesins in human oocytes. PLoS ONE 2014 ; 9 : e96710.
- 4) McCoy R. C. et al. Common variants spanning *PLK4* are associated with mitotic-origin aneuploidy in human embryos. Science 2015 ; 348 : 235–8.
- 5) Zhang Q. et al. Maternal common variant rs2305957 spanning *PLK4* is associated with blastocyst formation and early recurrent miscarriage. Fertil Steril 2017 ; 107 : 1034-40.e1035

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshihara Hiroyuki, Sugiura-Ogasawara Mayumi, Ozawa Fumiko, Kitaori Tamao, Ozaki Yasuhiko, Aoki Koji, Shibata Yasuhiro, Ugawa Shinya, Nishiyama Takeshi, Omae Yosuke, Tokunaga Katsushi	4. 巻 7
2. 論文標題 Polo-like kinase 4 and Stromal antigen 3 are not associated with recurrent pregnancy loss caused by embryonic aneuploidy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Genome Variation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41439-020-0106-2	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9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 吉原紘行 北折珠央 尾崎康彦 杉浦真弓
2. 発表標題 胎児染色体異数性による不育症の遺伝子関連解析
3. 学会等名 第31回日本産婦人科・新生児血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉原紘行 北折珠央 尾崎康彦 杉浦真弓
2. 発表標題 胎児染色体異数性による不育症の遺伝子関連解析
3. 学会等名 第39回受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉原紘行 杉浦真弓 小澤史子 後藤志信 北折珠央 鈴森伸宏 佐藤剛 尾崎康彦 青木耕治 柴田泰宏 鶴川真也 西山毅 大前陽輔 徳永勝士
2. 発表標題 絨毛染色体異数性による不育症の遺伝子関連解析
3. 学会等名 第66回日本生殖医学会学術講演会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshihara H, Sugiura-Ogasawara M, Kitaori T, Ozaki Y.
2. 発表標題 Polo-like kinase 4, PLK4, and Stromal antigen 3, STAG3, are not associated with recurrent pregnancy loss caused by embryonic aneuploidy.
3. 学会等名 第72回 日本産科婦人科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroyuki Yoshihara, Mayumi Sugiura-Ogasawara, Fumiko Ozawa, Tamao Kitaori, Nobuhiro Suzumori, Takeshi Sato, Yasuhiko Ozaki, Koji Aoki, Yasuhiro Shibata, Shinya Ugawa, Takashi Nishiyama, Yosuke Omae, Katsushi Tokunaga
2. 発表標題 Impact of Polo-like kinase 4 and Stromal antigen 3 in women with recurrent pregnancy loss caused by embryonic aneuploidy
3. 学会等名 日本人類遺伝学会 第65回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉原紘行 杉浦真弓 小澤史子 後藤志信 北折珠央 鈴森伸宏 佐藤剛 尾崎康彦 青木耕治 柴田泰宏 鶴川真也 西山毅 大前陽輔 徳永勝士
2. 発表標題 Polo-like kinase 4 (PLK4)・Stromal antigen 3 (STAG3)と絨毛染色体異常による不育症との関連性について
3. 学会等名 第6回 日本産科婦人科遺伝診療学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroyuki Yoshihara
2. 発表標題 Polo-like kinase 4, PLK4, is not associated with recurrent pregnancy loss caused by embryonic aneuploidy
3. 学会等名 第4回国際不育症学会(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroyuki Yoshihara, Mayumi Sugiura-Ogasawara, Fumiko Ozawa, Tamao Kitaori, Yasuhiko Ozaki, Koji Aoki, Yasuhiro Shibata, Shinya Ugawa, Takashi Nishiyama
2. 発表標題 PLK4 is not associated with recurrent pregnancy loss caused by embryonic aneuploidy
3. 学会等名 35th Annual meeting of ESHRE (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroyuki Yoshihara, Otani Takahiro, Takashi Nishiyama, Yosuke Omae, Katsushi Tokunaga, Fumiko Ozawa, Shinobu Goto, Tamao Kitaori, Mayumi Sugiura-Ogasawara
2. 発表標題 Genome-wide association study identified meiotic variant associated with aneuploid pregnancy loss
3. 学会等名 38th Annual meeting of ESHRE (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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	杉浦 真弓 (Sugiura Mayumi)		
研究協力者	尾崎 康彦 (Ozaki Yasuhiko)		
研究協力者	西山 毅 (Nishiyama Takeshi)		

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
研究協力者	大谷 隆弘 (Otani Takahiro)		
研究協力者	徳永 勝士 (Tokunaga Katsushi)		
研究協力者	大前 陽輔 (Omae Yosuke)		
研究協力者	鶴川 眞也 (Ugawa Shinya)		
研究協力者	柴田 泰弘 (Shibata Yasuhiro)		
研究協力者	小澤 史子 (Ozawa Fumiko)		
研究協力者	北折 珠央 (Kitaori Tamao)		
研究協力者	後藤 志信 (Goto Shinobu)		

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
研究協力者	青木 耕治 (Aoki Koji)		

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