

平成22年 4月20日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19791131  
 研究課題名 (和文) 男性不妊と ART 後の流産におけるインプリント遺伝子の DNA メチル化の解析  
 研究課題名 (英文) DNA methylation of imprinted loci in the infertile sperm and assisted conception.  
 研究代表者  
 鈴木 史彦 (SUZUKI FUMIHIKO)  
 東北大学・大学院医学系研究科・助教  
 研究者番号：20400343

## 研究成果の概要 (和文)：

不妊症男性精子 97 例と様々な ART 治療後の流産検体 78 例のメチル化インプリント (7 領域) の解析を行い、それぞれ、24.7%、21.7%に異常を認めた。アンケート調査では、低出生体重児が多く、探索と社会指数が低い児が多い傾向がみられた。今後 ART を用いた不妊治療は増加する事が予想される、安全性や危険性について評価するために、さらに症例を増やして解析する必要がある。

## 研究成果の概要 (英文)：

We analyzed the methylation of the 7 imprinted genes of 97 infertile sperm and 78 miscarriage DNA specimen after various ART treatment. We found the abnormality to be 24.7%, 21.7% respectively. We found much low birth weight children after ART treatment, and by the questionnaire survey, the tendency that a search and a social index were low in the ART children. To evaluate safety and danger of infertility treatment using ART which is expected to increases in future, further analyses of a large number of the ART baluy.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	0	1,600,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	510,000	3,810,000

## 研究分野：産婦人科学

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：ゲノムインプリンティング、生殖補助医療 (ART)、DNA メチル化、乏精子症

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ゲノムインプリント (GI) は、特定の親由来の遺伝子のみ選択的に発現する哺乳

類特有の機構である。この機構は個体の発生や発育に必須である。また、GI の破綻は先

天性疾患（Beckwith-Wiedemann 症候群、Angelman 症候群）や悪性腫瘍と関連する事が報告されている。主にマウスを用いた研究から、インプリント遺伝子は配偶子形成過程においてアレル特異的なメチル化領域（Differentially methylated region : DMR）にDNAメチル化を獲得し、両親のアレル間の区別（目印）をしていると考えられている。この目印には精子形成過程にメチル化を獲得する精子型メチル化インプリント（以降、精子型インプリント）と卵子形成過程にメチル化を獲得する卵子型メチル化インプリント（以降、卵子型インプリント）がある。精子型インプリントは新生仔マウスの精子で出生直前の精原細胞において新規にメチル化を獲得し、受精以降成体まで安定して維持される事が報告されている。一方卵子型インプリントは一次卵胞期から成熟卵胞期にいたる卵細胞で、遺伝子ごとにインプリントの獲得時期が異なると報告されている。

(2) ART（生殖補助医療）の技術の発達と共に本来非常に稀であったインプリント異常を原因とする先天性疾患（Beckwith-Wiedemann 症候群、Angelman 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は不妊症患者に重要な治療法であるが、インプリントが獲得される時期の配偶子を操作するため、排卵誘発、配偶子操作、培養液などの影響について危惧されている。実際 IVF-ET や ICSI (卵細胞質内精子注入) などの ART を用いた妊娠例では、その流産率は自然妊娠の約3倍である。本研究は男性不妊患者の精子と不妊症治療後の自然流産検体を用い、メチル化インプリントの解析を行い、異常の頻度、程度、影響を受けやすい遺伝子の有無に関する知見を得ること、またART治療後の出生状況、1歳半と3歳児検診時における発育状態など

の疫学的調査をもとにインプリント異常症の状況について実態の把握と発症リスクについて検討を行う。

## 2. 研究の目的

- (1) 男性不妊（乏精子症を含む）精子を用い、精子型・卵子型インプリント遺伝子のDNAメチル化解析
- (2) 不妊治療後の流産検体を用い、インプリント遺伝子のDNAメチル化解析
- (3) ART治療後の出生児について、出生・発育調査の後方的分析を行ない、ARTとインプリント異常の関連性もついて評価することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究は、東北大学医学部倫理委員会の審査を受け、承認を得て開始した。

### (1) 検体の登録

#### ① ヒト精子の収集と登録

東北大学医学部産婦人科不妊外来および関連病院を受診し、精液検査を受けた患者の精子（97症例）を対象とした。精液検査により正常群と異常群に分類した。精子は体細胞の混入がないように、swim-up法にて精子細胞のみを回収し、DNAを抽出した。

#### ② 不妊治療後の自然流産産物の収集と登録

①と同様、不妊治療を受けた後の流産検体を収集した（78例）。患者登録には、治療歴、妊娠歴等も含まれる。検体の一部よりDNAを抽出する。

### (2) インプリント遺伝子のDNAメチル化解析

登録された精子検体と流産検体のインプリント遺伝子のDNAメチル化解析を行った。解析するインプリント遺伝子は卵子型インプリント（LIT1, ZAC, PEG1, PEG3）と精子型インプリント（H19, RASGRF1, GTL2）の7種類について、

Bisulphite (BS)-PCR法でDNAメチル化について解析した。

BSはDNAの非メチル化 CpG 部位は TpG に置換し、非メチル化 CpG 部位は CpG のまま置換しない。そのため増幅した PCR 産物は制限酵素によりメチル化と非メチル化産物に区別され、その比率からメチル化の定量を行う COBRA 法とクローニング vector を用いてシークエンスし、PCR 領域内のメチル化部位についてメチル化の有無を調べる Sequence 法を同時に行う。両解析結果を基に、インプリント遺伝子のDNAメチル化の定量を行った。コントロールには末梢血DNAを用いた。

### (3) ART出生児の両親へのアンケート調査

ART出生児の両親(817人)へのアンケート調査を行ない、ART治療後の出生児について、出生時状況調査と3歳児検診時における出生・発育調査を行った。アンケート内容は、(1)不妊治療と妊娠経過に関する調査、(2)出生児の生後身体発育に関する調査、(3)出生児の生後の精神発達状況に関する調査である。

## 4. 研究成果

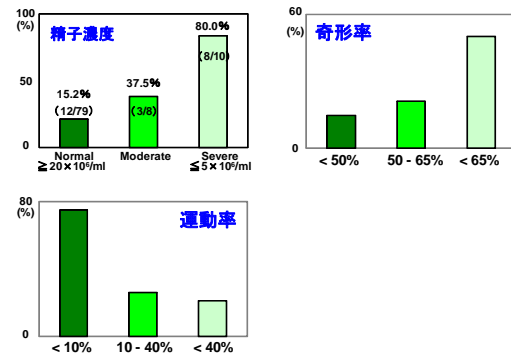
### (1) 不妊症男性精子を用いたメチル化インプリントの解析

不妊症男性精子97例中、24例(24.7%)にメチル化インプリントに異常があることが判明した。父方メチル化インプリントの異常は14.4%、母方メチル化インプリントは20.6%で有意差はみられなかった。しかし45.8%は父方、母方両方にメチル化インプリントの異常を認め、複数の部位での異常が確認された。一方、非インプリント遺伝子にメチル化の変化はみられなかった。ここで重要な点は、インプリント異常を示す領域に癌抑制遺伝子として機能す

る複数の領域が含まれていることである

(LIT1, ZAC, PEG1, PEG3 H19, GTL2 は、癌抑制遺伝子として機能する)。また、重症乏精子症の83%(5/6)は2種類以上の異常を呈し、精子濃度、奇形率、運動率に関連することが予想された(図1)。

図1 メチル化インプリントの異常と精子所見との関係



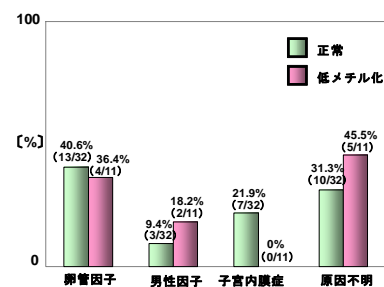
メチル化インプリント異常と精液所見は相関を示す

### (2) ART治療後の流産検体を用いたメチル化インプリントの解析

ART後の流産検体78例のうち17例(21.7%)にメチル化インプリントの異常を認めた。自然流産検体と比較し、ART後の流産検体は4領域で低メチル化を示した(P<0.01)。この異常のうち、父方インプリントの異常は71%、母方インプリントは29%であった。(図2)

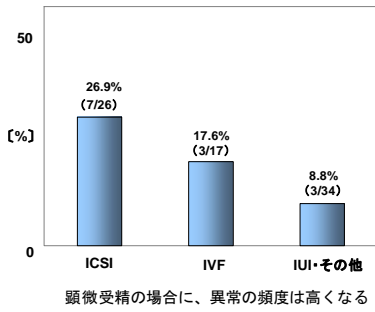
図2

① ART流産児のメチル化インプリントの異常不妊因子との関係

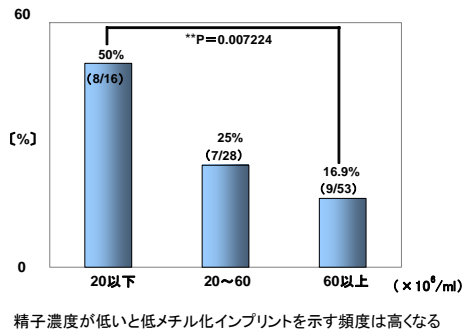


男性因子(精子異常)の場合、メチル化インプリントの異常の頻度は高くなる傾向にある

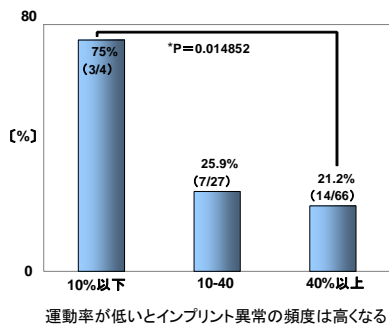
② ART流産児のメチル化インプリントの異常と不妊治療法との関係



③ 精子濃度における検討



④ 精子運動率における検討

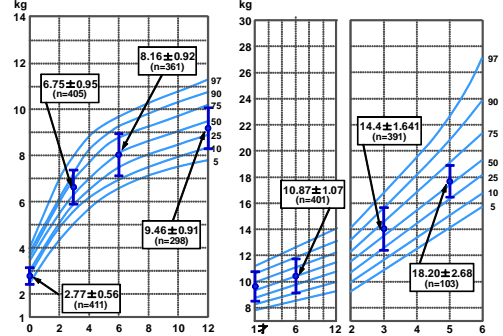


治療法について分類すると、体外授精/顕微受精 (IVF/ICSI) 群と非 IVF/ICSI 群に有意差はみられなかった。

(3) ART出生児の両親へのアンケート調査

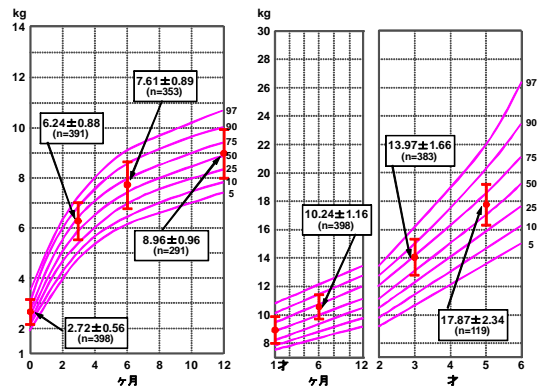
身体的発育と精神的発育、奇形率に分類し評価した。① 817例のアンケート調査では、低出生体重児が多い傾向が見られたが、身体的な発育は生後数ヶ月で回復していた。(超未熟児や極小未熟児は除外) (図3)

図3 ① ART 出生単胎男児の生後体重の増加



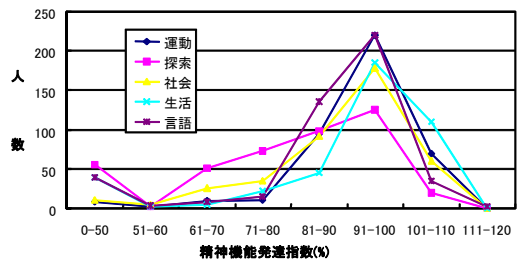
出生時体重は平均より低いが、3ヶ月以降非ART出生児と変わらず発育は良好である。

② ART 出生単胎女児の生後体重の増加



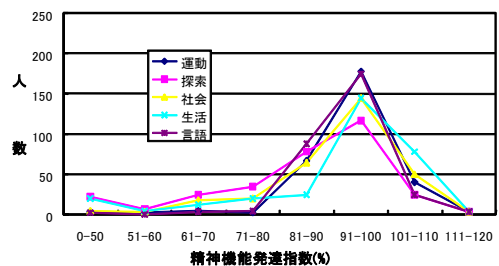
② ICSI 児で、探索と社会指数が低い児が多く認められたことは、自閉症が懸念されるが、親の関与が強いことも影響するため、過保護の反映であるかもしれない。(図4)

図4 ① 顕微受精 (ICSI) 出生児の精神発達



100%を正常とする。顕微受精 (ICSI) 出生児は、体外授精児 (IVF) と同様、探索、社会指数が低い傾向が見られる

② IVF 出生児の精神発達



③ART児の奇形率は5歳児で3.1%であった。出生時に発見される奇形は約1/2-1/3にしか過ぎないので、生下時にはおよそ、1.03-1.55%と見込まれる。日本産婦人科学会の集計では、一般集団の奇形率が0.97-1.55%なので、差がないのかもしれない。

今回の解析結果より、ARTとインプリント異常の関連性が予想され、社会的な影響も考慮しなければならない。このARTによるリスクは、患者が一般の集団とは異なる特殊な集団であるため、その評価は単純ではない。精度の高い評価には、正確な診断と細分化した解析が重要で、その結果を裏付ける科学的根拠が必要である。日本人におけるART出生児は年々増加してきている。我が国におけるART出生児とインプリント病や癌との関連およびその原因を探究する意味でも、病因を解明することは重要であり、本研究の結論が国民の生活、行政指導に有益な情報をもたらすものと考えられる。しかし、現在のサンプルサイズでは十分な統計学的パワー(検出力)が得られないため、病因について結論を導き出すことはできず、結論は今後さらに詳細な解析を行った後に報告する。(1)調査期間(出生後から成人に達するまで)(2)調査数(3)比較する対照の統一(4)先天異常の診断の統一(診断医、定義)等の問題点をクリアーした上で、再調査が必要であると痛感した。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

- ① Jun-ichi Akahira, Fumihiko Suzuki, Takashi Suzuki, Ikumi Miura, Noriko Kamogawa, Yasuhiro Miki, Kiyoshi Ito, Nobuo Yaegashi, Hironobu Sasano. Decreased expression of RIZ1 and its clinicopathological significance in epithelial ovarian carcinoma: correlation with epigenetic inactivation by aberrant DNA methylation. *Pathology International*, 57(11):725-33. 2007. 査読有

- ② Fumihiko Suzuki, Jun-ichi Akahira, Ikumi Miura, Takashi Suzuki, Kiyoshi Ito, Shin-ichi Hayashi, Hironobu Sasano, Nobuo Yaegashi. Loss of estrogen receptor  $\beta$  isoform expression and its correlation with aberrant DNA methylation of the 5'-untranslated region in human epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Science*, 99(12):2365-72. 2008. 査読有
- ③ Hisato Kobayashi, Hitoshi Hiura, Rosalind M John, Akiko Sato, Eiko Otsu, Naoko Kobayashi, Rei Suzuki, Fumihiko Suzuki, Chika Hayashi, Takafumi Utsunomiya, Nobuo Yaegashi, Takahiro Arima. DNA methylation errors at imprinted loci after assisted conception originate in the parental sperm. *European Journal of Human Genetics*, (12):1582-91. 2009. 査読有
- ④ Eri Hiroki, Jun-ichi Akahira, Fumihiko Suzuki, Satoru Nagase, Kiyoshi Ito, Takashi Suzuki, Hironobu Sasano, Nobuo Yaegashi. Changes in microRNA expression levels correlate with clinicopathological features and prognoses in endometrial serous adenocarcinomas. *Cancer Science*, 101(1):241-9. 2009. 査読有

[学会発表](計19件)

- ① 第66回日本癌学会学術集会 横浜 2007/10/4 「上皮性卵巣癌における CpG island methylator phenotype の解析」鈴木史彦、赤平純一、三浦伊久美、鈴木貴、三木康宏、伊藤潔、八重樫伸生、笹野公伸
- ② 第66回日本癌学会学術集会 横浜 2007/10/5 「卵巣癌における Estrogen receptor-related receptors の発現」赤平純一、鈴木貴、鈴木史彦、三浦伊久美、三木康宏、長崎修治、伊藤潔、八重樫伸生、笹野公伸
- ③ 第15回日本ステロイドホルモン学会学術集会 仙台 2007/11/24 「ヒト上皮性卵巣癌における Estrogen receptor beta isoforms の発現についての検討」鈴木史彦、赤平純一、伊藤潔、鈴木貴、林慎一、笹野公伸、八重樫伸生
- ④ 第30回日本分子生物学会 横浜 2007/12/14 「男性不妊症の精子におけるインプリント異常」小林久人、鈴木史彦、齋藤昌利、林千賀、佐藤晶子、宇津宮隆史、八重樫伸生、有馬隆博
- ⑤ 第3回日本生殖再生医学会 東京 2008/3/30 「男性不妊症精子におけるゲ

- ノムインプリントの解析」小林久人、樋浦仁、佐藤晶子、大津英子、宇津宮隆史、鈴木史彦、齋藤昌利、林千賀、八重樫伸生、佐々木裕之、有馬隆博
- ⑥ 第3回日本生殖再生医学会 東京 2008/3/30「ART後の流産産物におけるゲノムインプリント遺伝子の解析」佐藤晶子、大津英子、長木美幸、熊迫陽子、後藤香里、城戸京子、日下千賀子、小池恵、佐藤久、宇津宮隆史、鈴木史彦、齋藤昌利、林千賀、有馬隆博
- ⑦ 第60回日本産科婦人科学会学術講演会 横浜 2008/4/13「ヒト上皮性卵巣癌におけるEstrogen receptor beta isoformsの発現についての検討」鈴木史彦、赤平純一、永瀬智、高野忠夫、新倉仁、伊藤潔、林慎一、笹野公伸、岡村州博、八重樫伸生
- ⑧ 第65回 日本生殖医学会九州支部会 博多 2008/4/27「ART後の流産産物におけるゲノムインプリント遺伝子の解析」佐藤晶子、大津英子、長木美幸、熊迫陽子、後藤香里、城戸京子、日下千賀子、小池恵、佐藤久子、宇津宮隆史、鈴木史彦、齋藤昌利、林千賀、有馬隆博
- ⑨ 第81回日本内分泌学会学術総会 青森 2008/5/17「ヒト上皮性卵巣癌におけるSteroid sulfatase(STS)およびEstrogen sulfotransferase(EST)の発現について」赤平純一、鈴木貴、鈴木史彦、三木康宏、伊藤潔、八重樫伸生、笹野公伸
- ⑩ 第81回日本内分泌学会学術総会 青森 2008/5/18「ヒト上皮性卵巣癌におけるEstrogen receptor beta isoformsの発現とメチル化についての検討」鈴木史彦、赤平純一、永瀬智、高野忠夫、新倉仁、伊藤潔、林慎一、笹野公伸、岡村州博、八重樫伸生
- ⑪ 第49回 哺乳動物卵子学会 名古屋 2008/5/17「ART後の流産におけるゲノムインプリント解析」佐藤晶子、大津英子、長木美幸、熊迫陽子、後藤香里、城戸京子、日下千賀子、小池恵、佐藤久子、宇津宮隆史、鈴木史彦、齋藤昌利、林千賀、有馬隆博
- ⑫ ASCO2008 (American Society of Clinical Oncology) Annual Meeting Chicago 2008/6/1「Expression of estrogen receptor (ER) beta isoforms and Its correlation with DNA methylation in human epithelial ovarian cancer.」F. Suzukil, J. Akahira, I. Miura, S. Nagase1, T. Takano, H. Niikura, T. Suzuki, K. Ito, S. Hayashi, H. Sasano, N. Yaegashi
- ⑬ 第9回 ホルモンと癌研究会 岐阜 2008/6/21「ヒト上皮性卵巣癌におけるEstrogen receptor beta isoformsの発現とメチル化についての検討」鈴木史彦、赤平純一、三浦伊久美、伊藤潔、鈴木貴、林慎一、笹野公伸、八重樫伸生
- ⑭ 第26回 日本受精着床学会総会・学術講演会 福岡 2008/8/28「不妊治療後の流産時に得られた胎盤絨毛におけるゲノムインプリント遺伝子の解析」佐藤晶子、大津英子、長木美幸、熊迫陽子、後藤香里、城戸京子、日下千賀子、小池恵、佐藤久子、宇津宮隆史、鈴木史彦、齋藤昌利、林千賀、有馬隆博
- ⑮ 第53回 日本生殖医学会総会学術集会 神戸 2008/10/23「流産後の胎盤絨毛におけるインプリント遺伝子の解析と精液性状・患者背景との関係」佐藤晶子、大津英子、長木美幸、熊迫陽子、後藤香里、城戸京子、日下千賀子、小池恵、佐藤久子、宇津宮隆史、鈴木史彦、齋藤昌利、林千賀、有馬隆博
- ⑯ 第67回日本癌学会学術集会 名古屋 2008/10/28「上皮性卵巣癌における組織中性ステロイドホルモン濃度と臨床病理学的因子の関連について」赤平純一、鈴木史彦、鈴木貴、伊藤潔、三木康宏、長崎修治、八重樫伸生、笹野公伸
- ⑰ 第61回日本産婦人科学会学術講演会 京都 2009/4/4「子宮体部漿液性腺癌の予後と14-3-3σの発現異常との関連」廣木恵理、永瀬智、松田雪香、鈴木史彦、赤平純一、伊藤潔、岡村州博、八重樫伸生
- ⑱ 第68回日本癌学会学術集会 横浜 2009/10/1「子宮内膜癌におけるmiR34bの発現およびDNAメチル化による制御」山崎有人、鈴木史彦、廣木恵理、三木康宏、赤平純一、笹野公伸
- ⑲ 第68回日本癌学会学術集会 横浜 2009/10/1「子宮体癌漿液性腺癌におけるmicroRNAの発現と臨床病理学的因子および予後との関連」廣木恵理、赤平純一、鈴木史彦、永瀬智、伊藤潔、笹野公伸、八重樫伸生

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 史彦 (SUZUKI FUMIHIKO)  
 東北大学・大学院医学系研究科・助教  
 研究者番号：20400343