

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 年度～2008 年度
 課題番号：19791170
 研究課題名 (和文) ヒト初期胚におけるメチル化状態の解析
 研究課題名 (英文) Methylation status in human embryo
 研究代表者
 近藤朱音 (KONDO AKANE)
 東海大学・医学部・助教
 研究者番号：00384884

研究成果の概要：

当初ヒト初期胚をもとに解析を開始したが、ヒト初期胚では得られるサンプル数が少量であり、研究継続のためにサンプルを蓄積中である。妊娠帰結におけるメチル化状態と初期胚の時点での形態学的評価との関連性について検討したところ、妊娠中の環境因子がメチル化状態に影響を与えている可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：生殖医学

科研費の分科・細目：7308

キーワード：初期胚、エピジェネティクス、メチル化、対外受精、生殖

1. 研究開始当初の背景

(1) DNA のメチル化、ヒストンのメチル化・アセチル化などのエピジェネティクスと呼ばれる DNA の修飾は遺伝子のサイレンス・安定化などその発現の調節機構として非常に重要であることは 1980 年代よりとなえられてきた。哺乳類の体を構成する様々な組織や細胞はそれぞれ固有の DNA メチル化パターン

をもつことが明らかになっており、個体発生や細胞分化にも DNA のメチル化が重要な役割を果たしていると考えられている。

(2) 一方で生殖医療の発展は目覚ましく IVF の症例数は年々増加傾向にある。しかし現在も初期胚の質の評価は形態学的分類に基づいたものしかない。IVF で産まれた児におい

て悪性腫瘍が多いのではないか、などの意見もあるもののまだはっきりとした結論は得られていない。そのため初期胚の質を示す客観的指標は生殖医療に貢献するものである。

2. 研究の目的

ヒトの初期発生におけるメチル化状態などのエピジェネティクスについて明らかにし、その結果を実際の生殖医療の発展につなげるのが本研究の目的である。胚の形態学的評価 (Veeck分類) と胚のメチル化状態の相関について解析し、関連性を見出すことができれば、良好な胚を移植することで妊娠帰結を得ることができると考えられるため、その実用性について検討することは有意義であると考えた。

3. 研究の方法

東海大学産婦人科外来にて不妊症のために体外受精施行中の患者より余剰となった受精卵 (胚) の提供を受け、それぞれの受精卵から遺伝子を抽出しメチル化状態についての解析を行った。

破棄処分する受精卵の例：

分割異常のある受精卵 (low-grade)

患者から破棄の希望があったもの 等

今回の解析では遺伝子の異常 (疾患等) を調べるのではなく、それぞれの受精卵での遺伝子のメチル化状況について解析を行った。正常の受精卵での遺伝子のメチル化状態についてはこれまでに報告がなく、これを明らかにすることが最初の段階での目標となる。凍結受精卵は 4-cell から胚盤胞までの各段階のものが存在したが、より古い時期に保存されたもので 4-cell が多かった。さらにはこの結果をもとに今後受精卵の評価の精度を高めることを目標とする。予定する解析受精卵の個数は Veeck 分類 (Veeck et al.,

1983) をもとに分類しそれぞれの Grade につき 20 個を目標とした。

受精卵一つ一つの DNA は微量でありゲノムワイドの解析は困難であることから初期発生に重要な役割を果たしているとされている遺伝子のうち 5 箇所 (Oct4DE, Oct4 PE/Pro, Dnmt1o, mPer1, Sal13) の遺伝子領域についてメチル化状態の解析を行う。これらの遺伝子はマウスクローンの研究においてメチル化状態の変化が認められた部位である。(Ohgane et al., 2004; Shiota and Yanagimachi, 2002) メチル化状態の解析は Bisulfite Restriction Mapping (Frommer et al., 1992)、Pyrosequencing (Ronaghi et al., 1998) を用いる。具体的にはそれぞれの Grade の凍結受精卵について 8cell の段階で受精卵を 3 つまとめて DNA をアガロースビーズ法で抽出 (Olek et al., 1996) し、各遺伝子プロモーター領域の CpG 領域を含む配列について PCR にて増幅後メチル化状態を解析し、最終的に受精卵の形態学的分類とを照らし合わせることを試みた。

4. 研究成果

(1) 初期胚の検討について

得られた初期胚は主に Grade の低いものであった。当初マウスと同様に 8-cell を 3 つ集めて行う方法にて何とか DNA が得られたものの十分な解析が困難であったため 4 つずつとして解析を試みた。しかし、統計処理を行うには得られた総胚数が 20 個あまりと少なく継続的な解析が困難となった。研究代表者が以前に行っていたマウス初期胚では 5 か所の遺伝子領域についてメチル化状態を検討していたが、多くの遺伝子領域についての検討をすることは難しく、Oct-4, Sal1 の 2 か所についてまず解析を行った。また当然で

はあるが良好胚はそのまま ET に使用されるために提供される数が少なく、比較する対象を得ることが困難であった。非良好胚ではフラグメンテーションを起こしているものもあり、それらにおいては DNA を得ることも比較的困難であった。現在は今後解析を再開する予定とし、引き続きサンプルを蓄積中である。

(2) 妊娠帰結時点での評価—胎盤での解析
早期に比較的得やすいサンプルとして、胎児付属物である胎盤でのメチル化状態の解析を行った。解析したのは胎盤形成に重要な役割を果たす PGF 遺伝子のプロモーター領域と初期発生において重要であるカドヘリン遺伝子のプロモーター領域である。

I V F 妊娠の症例は多くあったものの胚の Grade で分類することが出来るほど多くの症例を集めることが困難であったため、Grade での比較の前段階として正常妊娠と I V F による妊娠での比較を行った。症例は当院で分娩に至った正常妊娠症例と、I V F 妊娠症例（単胎、双胎を含む）である。また IVF の有無だけではなく、胎盤の成長に影響を及ぼすと考えられる因子についても同時に年齢、合併症、BMI、喫煙、糖尿病の有無などについても情報を得ることができたため後にメチル化との相関について検討した。

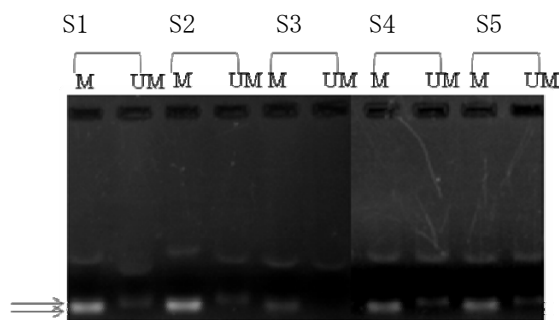


図1 Eカドヘリン遺伝子のメチル化状態の比較

図1の S1-S3 は正常妊娠、S4-S5 は I V F 妊娠にて児を得た症例の胎盤から DNA を得て Eカドヘリン遺伝子のプロモーター領域の一部についてメチル化状態を比較したものである。

正常妊娠と I V F 妊娠それぞれの群について 15 例ずつのサンプルを得て行ったが、最終的に正常妊娠と IVF 妊娠の群の間では明らかなメチル化状態の相違は認めなかった。ただし、S3 に示すように解析した部位が 100% メチル化されていた症例は全てのサンプルの中で二つだけであった。そのため I V F 以外の妊娠に影響を与える因子についてメチル化状態との相関の有無を検討したところ相関指数が比較的高いのは肥満であり、2 例とも BMI30% 以上であった。その他の合併症や嗜好品は比較的関連性が低かった。統計的には有意ではなかったものの、本結果については今後さらに検討する余地があると考えられた。

同時に行った PGF 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態の解析においてはどの因子も相関があるとは言い難い結果となったが、理論的には胎盤の大きさに関連する様な IUGR となる疾患すなわち妊娠高血圧症などでは PGF の発現が減少している可能性が考えられるため、今後症例を増やしてさらに検討したい。

当院では大学病院であることから糖尿病妊娠などを始めとする合併症妊娠が非常に多い。そのため本研究で得られた研究成果を元に、胎盤形成に影響すると考えられる環境因子（合併症、喫煙、ステロイドなどの投薬）と遺伝子領域のメチル化状態の相関についてさらに検討していくことが可能であると考えられた。本研究結果より I V F であったかどうかよりも妊娠中の環境因子の影響の方が胎盤形成に及ぼす影響は大きいと考え

られ、新生児予後に貢献するためにもそれぞれの疾患や状態が妊娠・胎盤形成に影響するかどうかの検討をすることは重要であると思われる。

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)

[学会発表] (計 2 件)

1. 近藤朱音、西島義博、石本人士
胎盤における PGF のメチル化に影響を与える因子についての検討
2009 年 11 月 28 日 (予定)
日本生殖内分泌学会
石川県金沢市 石川県立音楽堂

2. 近藤朱音
胎盤における PGF 及びカドヘリン遺伝子のプロモーター領域におけるメチル化
2008 年 12 月 8 日
東海大学産婦人科産科勉強会
神奈川県東海大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤朱音 (KONDO AKANE)
東海大学・医学部・助教
研究者番号：00384884

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし