

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22591817

研究課題名(和文) 生殖補助医療がヒト受精卵におよぼすエピジェネシス制御に関する検討

研究課題名(英文) Analysis of epigenetic marks in human preimplantation embryos produced with assisted reproductive technology

研究代表者

藤本 晃久 (Fujimoto, Akihisa)

東京大学・医学部附属病院・臨床登録医

研究者番号：00323593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：生殖補助医療とインプリンティング遺伝子異常の増加の関連について、初期胚において、インプリンティング遺伝子の発現制御に重要な役割を果たすDNAメチル化に関する検討を行った。余剰胚の研究目的での使用に同意の得られた夫婦より提供された胚を融解、培養し、得られた良好胚盤胞よりgenomic DNAを抽出、バイサルファイト処理を行った後、H19、PEG1遺伝子のアレル特異的メチル化領域をPCRにより増幅、制限酵素切断により、メチル化アレルおよび非メチル化アレルの存在、またその存在比を求めた。結果、メチル化、非メチル化アレルの存在比はいずれも50%を有意に逸脱するものではなく、インプリントは正常であった。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the relationship between assisted reproductive technology (ART) and genomic imprinting, differentially-methylated regions (DMR) of two imprinting genes-H19 and PEG1-were analyzed in single blastocyst produced by ART. The frozen embryos at day3 or day5, use of which for research had been approved by the parents, were thawed and incubated in blastocyst medium. Genomic DNA samples were extracted from only high-grade blastocysts. Then the DMRs of the two genes were amplified with polymerase chain reaction, cut with restriction enzymes, and the ratios of methylated / unmethylated alleles were evaluated. All the blastocysts examined in this study showed normal methylation patterns of DMRs of two imprinting genes.

研究分野：医歯薬学

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：生殖補助医療 genomic imprinting 着床前期胚 DMR

## 1. 研究開始当初の背景

生殖補助医療による妊娠・出産例は国内外で急激に増えつつあるが、その児における安全性については自然妊娠によるものと概ね差がない、とされてきた。しかし、2002年ごろより、生殖補助医療による出生児にインプリンティング遺伝子の発現異常、いわゆるゲノミックインプリンティングの異常が増えるのではないかと、という報告がみられ、議論の対象となってきた。本研究者は、2003年から2005年にかけて、アメリカ合衆国オレゴン州留学中に、サル初期胚を用いたインプリンティング遺伝子の研究を行っており、着床前期胚の時点では、ゲノミックインプリンティングの一部が未完成であることを示した。

帰国後、生殖補助医療の現場に携わるにあたって、ヒトの着床前期胚ではゲノミックインプリンティングはどのように制御されているのか、またそれは生殖補助医療におけるゲノミックインプリンティング異常増加とどのように関連しているか、に関する研究を志し、本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

(1)ヒト着床前期胚における、インプリンティング遺伝子の発現アレルの検索、およびゲノミックインプリンティングを制御していると考えられる DMR 領域のメチル化に関する検討を行い、受精卵レベルにおけるゲノミックインプリンティング異常の有無、頻度について検討する。

(2)生殖補助医療におけるゲノミックインプリンティング異常の発生機序として体外における培養環境の影響が考えられ、体外で受精前の卵子成熟培養を行う IVM(in vitro maturation)においては、ゲノミックインプリンティング異常の増加が懸念されている。

今回、多嚢胞性卵巣症候群症例に対し、IVM の手法を用いて治療を行い、余剰胚を用いたインプリンティング異常の検討を行う。

## 3. 研究の方法

(1)東京大学医学部附属病院女性診療科において生殖補助医療を行った症例のうち、生児を得るに至り、凍結保存胚が不要となった症例に対し、本研究に関する説明を行い、胚の研究提供に同意を得た症例を対象とした。なお本研究は東京大学医学部ゲノム倫理委員会の審査、承認を得ている。同意を得た夫婦より採血し、白血球からゲノム DNA を抽出、PCR、ダイレクトシーケンス(もしくは制限酵素処理)により4つのインプリンティング遺伝子(IGF2、

NDN, H19, SNRPN)の exon における SNP(Single nucleotide polymorphism)を調べた。これらの遺伝子の発現アレルが父親由来か母親由来かが同定可能なカップルを抽出し、そのカップル由来の受精卵を融解、胚盤胞まで培養し、これからゲノム DNA, RNA を抽出、同様に PCR、ダイレクトシーケンスまたは制限酵素処理を行い、発現アレルの検討を試みた。

DMR 領域のメチル化に関しては、ゲノム DNA にバイサルファイト処理を行った後、H19, PEG1 遺伝子のアレル特異的メチル化領域(DMR)を PCR により増幅、制限酵素切断により、メチル化アレルおよび非メチル化アレルの存在、またその存在比を求めた。

(2)単孔式腹腔鏡下手術の手法を用いて多嚢胞性卵巣症候群症例に対し卵巣多孔術を行う症例に対し、手術の際に小卵胞から未成熟卵子を採取し、体外成熟培養の後、夫精子を用いて顕微授精を行った。受精卵は凍結保存を行い、卵巣多孔術の結果、排卵因子が改善したことを確認後、自然排卵周期(実際には低卵巣刺激周期)で受精卵融解胚移植を行った。

## 4. 研究成果

(1)余剰胚の研究目的での使用に同意の得られた39組の夫婦、計78名より採血を行い、白血球よりDNAを抽出、PCR、ダイレクトシーケンス(もしくは制限酵素処理)によりインプリンティング遺伝子のexonにおけるSNP(Single nucleotide polymorphism)を調べた。NDN exon1におけるMboI polymorphism、IGF2 exon9におけるApaI polymorphismについては、夫婦間の受精卵において発現アレルの解析が可能なカップルが、それぞれ13組および12組得られた。

インプリンティング遺伝子の胚盤胞における発現を確認するため、研究参加に同意が得られたが、夫婦のインプリンティング遺伝子解析の結果、発現アレルの同定が不可能で、研究に不適とされた夫婦間の凍結胚盤胞を融解し、DNA, RNA抽出、個々の胚盤胞におけるgenomic PCR, RT-PCRを行い、NDN, IGF2のSNPを含む領域の増幅を試みた。結果、genomic DNAによりDNAレベルでの増幅は安定した結果が得られたが、NDN, IGF2の発現が確認された胚盤胞はそれぞれ20%程度にとどまり、安定した発現が確認できなかった。

DNA メチル化の検討については、ゲノム DNA にバイサルファイト処理を行った後、H19 遺伝子については12個の胚盤胞、

PEG 遺伝子については 13 個の胚盤胞における DMR メチル化の検討を行った。結果、メチル化、非メチル化アレルの存在比はいずれも 40-60%の範囲にとどまっております、今回検討した範囲内においては、胚盤胞のレベルでの明らかなインプリンティング異常は認められなかった。

(2)34 歳の多嚢胞性卵巣症候群による不妊症例に対し、GnRH agonist による down regulation 後、pure FSH 製剤にて低卵巣刺激を行い、hCG 投与 35 時間後に単孔式腹腔鏡下手術施行。小卵胞を可能な限り穿刺し、卵胞液を吸引。顕微鏡下に卵子確認後、電気メスを用いて卵巣多孔術を行った。セルストレイナーにて血液成分を除去し、37 個の未成熟卵子を採卵。Medicult IVM medium を用いて成熟培養を行い、24 時間後、23 個の成熟卵子に顕微授精を行った。翌日、20 個の受精を確認し、その後培養継続、7 個の受精卵 (day3 胚 2 個、day5 胚 5 個) を凍結した。術後、自然排卵後に 1 回目の融解胚移植施行。妊娠反応陽性となるも化学的流産に至った。その直後の周期に、pure FSH による卵巣低刺激を行い、胚盤胞 1 個を融解移植。再び妊娠成立し、妊娠 39 週に正常経産分娩により、2262g の男児を出産した。児に奇形等は認めなかった。凍結保存胚については、今後第 2 子の希望もあることよりまだ研究提供はされていない。

#### 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 13 件 )

1. Isono W, Wada-Hiraike O, Shirane A, Fujimoto A, Osuga Y, Yano T, Taketani Y Alternative strategies to in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection treatment for aged infertile women *Reproductive Medicine and Biology*, 11(1):69-72, 2012
2. Tsutsumi R, Fujimoto A, Osuga Y, Harada M, Takemura Y, Koizumi M, Yano T, Taketani Y. Successful pregnancy following low-dose hCG administration in addition to hMG in a patient with hypothalamic amenorrhea due to weight loss *Gynecol Endocrinol* 2012 Jun;28(6):460-2.
3. Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Akiyama I, Harada M, Koga K, Fujimoto A, Yano T,

Taketani Y. Growth differentiation factor 3 is induced by bone morphogenetic protein 6 (BMP-6) and BMP-7 and increases luteinizing hormone receptor messenger RNA expression in human granulosa cells. *Fertil Steril*. 2012 Apr; 97(4): 979-83.

4. Takahashi S, Fujita M, Fujimoto A, Fujiwara T, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y, Akabayashi A. The decision-making process for the fate of frozen embryos by Japanese infertile women: a qualitative study *BMC Medical Ethics* 2012 May 20;13(1):9.
5. Tsutsumi R, Fujimoto A, Osuga Y, Ooi N, Takemura Y, Koizumi M, Yano Y, Taketani Y. Singleton pregnancy outcomes after assisted and non-assisted reproductive technology in infertile patients *Reproductive Medicine and Biology* 2012 July ; 11(3) : 149-153
6. Takemura Y, Osuga Y, Fujimoto A, Oi N, Tsutsumi R, Koizumi M, Harada M, Yano T, Taketani Y. Increased risk of placenta previa is associated with endometriosis and tubal factor infertility in assisted reproductive technology (ART) pregnancy *Gynecological Endocrinology* 2013 Feb;29(2):113-5.
7. Nakae H, Osuga Y, Fujimoto A, Nakagawa S, Ichinose M, Yano T, Taketani Y. Müllerian cyst of the uterus treated with laparoscopy and diagnosed using immunohistology. *J Obstet Gynaecol Res* 2013 Jan; 39(1):430-3.
8. Akiyama I, Yoshino O, Osuga Y, Shi J, Hirota Y, Hirata T, Harada M, Koga K, Fujimoto A, Yano T, Taketani Y. The Localization and Regulation of Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin (PCSK) 6 in Human Ovary. *Am J Reprod Immunol*. 2012 Dec;68(6):491-8.
9. Ichinose M, Fujimoto A, Osuga Y, Minaguchi T, Kawana K, Yano T, Kozuma S. The influence of infertility treatment on the prognosis of endometrial cancer and atypical complex endometrial hyperplasia. *Int J Gynecol Cancer* 2013 Feb; 23(2): 288-93.

10. Fujimoto A, Osuga Y, Sakurabashi A, Hisatomi S, Kaneko J, Hasegawa K, Yano T, Kokudo N, Kozuma S. Laparoendoscopic single-site concomitant surgery for gallstones and a giant ovarian teratoma. *Asian J Endosc Surg*. 2013 Aug;6(3):223-5.

11. Harada M, Osuga Y, Fujimoto A, Fujimoto A, Fujii T, Yano T, Kozuma S. Predictive factors for recurrence of ovarian mature cystic teratomas after surgical excision. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013 Dec;171(2):325-8.

12. Terao M, Koga K, Fujimoto A, Wada-Hiraike O, Osuga Y, Yano T, Kozuma S. Factors that predict poor clinical course among patients hospitalized with pelvic inflammatory disease. *J Obstet Gynaecol Res*. 2013 Oct 10. doi: 10.1111/jog.12189. [Epub ahead of print]

13. Hirata T, Fujimoto A, Koga K, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y. Concomitant ovarian drilling and oocyte retrieval by laparoendoscopic single-site surgery led to live birth using in vitro maturation of oocyte and transfer of frozen-thawed blastocyst in woman with polycystic ovary syndrome. *J Obstet Gynaecol Res*. 2014 May;40(5):1431-5.

{学会発表}(計10件)

1. Prognosis of endometrial cancer and atypical complex endometrial hyperplasia after conservative therapy and infertility treatment A Fujimoto, M Ichinose, Y Osuga, H Oishi, T Hirata, M Harada, A Hasegawa, K Morishima, A Sakuranashi, K Kawana, T Yano, S Kozuma, Y Taketani 28<sup>th</sup> ESHRE Annual Meeting 2012.7.1-4 Istanbul, Turkey

2. Elective single embryo transfer reduces cumulative pregnancy outcome in aged women K Morishima, A Fujimoto, H Oishi, T Hirata, M Harada, A Hasegawa, Y Osuga, T Yano, S Kozuma, Y Taketani 28<sup>th</sup> ESHRE Annual Meeting 2012.7.1-4 Istanbul, Turkey

3. 単孔式腹腔鏡下未熟卵採卵および卵巣多孔術施行後、未熟卵体外培養(IVM)、顕微授精(ICSI)、自然周期による融解胚移植を経て妊娠成立したPCOSの1例  
平田 哲也, 藤本 晃久, 大石 元, 原田 美由紀, 長谷川 亜希子, 森嶋 かほる, 櫻橋 彩子, 甲賀 かをり, 平池 修, 大須賀 穰, 藤井 知行, 矢野 哲, 上妻 志郎 第57回日本生殖医学会 2012.11.8-9 長崎

4. 当院におけるSETの現状と適応についての再検討  
森嶋 かほる, 藤本 晃久, 大石 元, 平田 哲也, 原田 美由紀, 堤 亮, 大須賀 穰, 矢野 哲, 藤井 知行, 上妻 志郎 第57回日本生殖医学会 2012.11.8-9 長崎

5. 40歳以上の不妊患者におけるARTの予後規定因子の検討  
三宅 友子, 原田 美由紀, 藤本 晃久, 大須賀 穰, 大石 元, 平田 哲也, 長谷川 亜希子, 藤井 知行, 矢野 哲, 上妻 志郎 第57回日本生殖医学会 2012.11.8-9 長崎

6. How can we treat aged infertile women? Fujimoto A. 14<sup>th</sup> Chongqing ART workshop 2012.11.15-17, Chongqing, China

7. The status of ART in Japan –increasing aged infertile patients Fujimoto A. 14<sup>th</sup> Chongqing ART workshop 2012.11.15-17, Chongqing, China

8. Fujimoto A, Ichinose M, Morishima K, Tsutsumi R, Harada M, Hirata T, Oishi H, Osuga Y, Yano T, Kozuma S  
Thin endometrium is related to low implantation rate of the patients after conservative treatment for endometrial cancer or atypical complex endometrial hyperplasia  
15<sup>th</sup> World Congress on Human Reproduction 2013.3.13-16 Venice

9. Akihisa Fujimoto, Tetsuya Hirata, Nagisa Ooi, Yuko Watanabe, Kaoru Morishima, Miyuki Harada, Hajime Oishi, Yutaka Osuga, Tetsu Yano, Shiro Kozuma  
Single incision laparoscopic ovarian drilling combined with immature oocyte retrieval, followed by IVM-ICSI and successful pregnancy

10. 子宮体癌、複雑型子宮内膜異型増殖症  
に対する子宮温存治療後の ART 成績に関  
する検討

藤本晃久、市瀬茉里、森嶋かほる、堤亮、  
原田美由紀、平田哲也、大石元、大須賀穰、  
矢野哲、上妻志郎 第 65 回日本産科婦人  
科学会 2013.5.10-12, 札幌

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤本 晃久 (FUJIMOTO, Akihisa)  
東京大学医学部附属病院 臨床登録医  
研究者番号：00323593

(2)研究分担者

( )  
研究者番号：

(3)連携研究者

( )  
研究者番号：