

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710223

研究課題名(和文)先天性ゲノムインプリント異常症に關与するアレル特異的メチル化領域の同定

研究課題名(英文) Identification of allele-specific methylation regions involved in congenital genomic imprinting disorders

研究代表者

樋浦 仁 (HIURA, Hitoshi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70451523

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)：ヒト生殖補助医療(ART)の普及に伴い、本来稀なゲノムインプリント異常症の発症頻度の増加が世界中で報告されている。本研究では、ヒトARTがゲノムインプリンティング機構に与える影響について明らかにすることを目的とした。ART出生児のBeckwith-Wiedemann症候群(BWS)およびSilver-Russell症候群(SRS)におけるDNAメチル化およびメチル化異常パターンを解析した結果、ARTのリスクは、配偶子形成期よりも受精以降の過程であることが推察された。

研究成果の概要(英文)：Recently, assisted reproductive technologies (ART) have become available to infertile couples who wish to have children. However, reports of rare imprinting disorders have been increased around the globe with the popularization of assisted reproductive technologies. In this study, to clarify the influence of ART for genomic imprinting and identify the ART-related risk factor(s), we analyzed the DNA methylation status of 22 differentially methylated regions in BWS and SRS patients. We observed a widespread disruption of genomic imprints after ART. Our data suggest that ART-related risk factor(s) was a process after the fertilization than the gamete formative period.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：胎児・新生児医学

キーワード：生殖補助医療 インプリント

1. 研究開始当初の背景

ヒト生殖補助医療 (ART) の普及に伴い、本来稀なゲノムインプリント異常症の発症頻度の増加が世界中で報告されている。現在、ART は不妊症患者にとって最も重要な治療法になっているが、インプリントが獲得・維持される時期の配偶子および初期胚を操作するため、その影響について懸念されている。実際に、米国では、5 万人規模のゲノムコホート研究により、ART 出生児のインプリント異常症の頻度が一般集団のおよそ 6 倍であると報告されている。また、我が国でも、Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) および Silver-Russell 症候群 (SRS) が ART との関連性が高いことが報告されている。さらに、インプリント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・発達にも関連するという報告は多数存在する。ART 出生児は今後も増加することが予想され、ART 出生児のインプリント異常の病態および病因の解明は、次世代社会の最も重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究では、生殖細胞系列のエピゲノム基盤として、マウスメチル化インプリント領域 (DMR) の系統的単離・同定および領域内分子機構の解明、ヒトへの保存性を基に、ヒト ART がゲノムインプリンティング機構に与える影響について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) ヒト精子、臍帯血、胎盤の収集および登録：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、精液検査を受けた体外受精、顕微授精予定の患者の精液検査後精子 197 例、同様に出生児臍帯血を 48 例、胎盤を 50 例収集した。精子はリンパ球、上皮細胞などの体細胞の混入を防ぐ為に、スイムアップ法により回収した。
- (2) 先天性ゲノムインプリント異常症の収集および登録：BWS 研究班 (佐賀大 副島英伸教授) と SRS 研究班 (浜松医大 緒方勤教授) と連携し、BWS は 7 症例 (ART 群：1 例)、SRS は 15 症例 (ART 群：5 例) の血液 DNA を得た。
- (3) 多型解析：臍帯血よりゲノム DNA を抽出し、DMR 領域にプライマーを設計し、PCR 後、ダイレクトシーケンスにより、多型部位および頻度を調べた。
- (4) DNA メチル化解析：精子、臍帯血および胎盤よりゲノム DNA を抽出後、Bisulphite 処理し、PCR により増幅後、クローニングし、10 個以上のクローンのシーケンスを行った。PCR 増幅領域内の全てのメチル化部位について解析した。

4. 研究成果

(1) ヒト DMR22 領域の同定

マウスにおける DMR の網羅的探査から得られた 450 候補領域について、ヒト精子、臍帯血および胎盤 DNA のメチル化解析を行った。その結果、H19、GTL2、ZDBF2、DIRAS3、NAP1L5、FAM50B、PLAGL1 (ZAC)、GRB10、PEG10、MEST (PEG1)、INPP5F、LIT1 (KCNQ10T1)、RB1、SNRPN、

ZNF597、ZNF331、PEG3、PSIMCT-1、NNAT、L3MBTL、NESPAS および GNAS1A の 22 領域について、DNA 多型解析を可能にした bisulphite-polymorphic PCR sequence 法を確立した。

(2)不妊症男性精子の DNA メチル化解析
 確立した bisulphite-polymorphic PCR sequence 法を用いて、不妊症男性精子のメチル化インプリント領域の解析を行った。形態学的な精液検査（精子濃度、量、運動率、奇形率）を受けた男性 197 名より精子を回収した。精液検査では、正常精子は 132 例、中等度乏精子症は 38 例、重症型乏精子症は 27 例であった。197 例中、50 例(25.4%) にメチル化の異常が観察された。メチル化異常が見られた 50 例中、重症型乏精子症は 20 例、中等度乏精子症は 8 例、正常精子は 22 例であった。精子でメチル化される精子型 DMR において、メチル化異常頻度が高かったのは GTL2 領域であった。精子でメチル化されない卵子型 DMR において、メチル化異常頻度が高かったのは PEG3 および GRB10 領域であった。一方、PEG1 領域に異常を認められた症例はなかった。次に、メチル化異常の中で、卵子型(母方メチル化 DMR) および精子型 (父方メチル化 DMR) 領域の両方に異常があったのは、50 例中 19 例であった。また、メチル化異常と精子濃度との関係を調べてみたところ、重症型乏精子症群は 66.7%、中等度乏精子症群は 11.1%、正常精子群は 22.2%において、3 領域以上のメチル化の異常が観察された。

(3)インプリント疾患患者の DMR のメチル化解析および ART との関連
 インプリント疾患患者の血液 DNA を用

いて、bisulphite-polymorphic PCR sequence 法により、メチル化インプリント 22 領域およびインプリントを受けないメチル化領域(Alu および LINE) の DNA メチル化解析を行った。SRS において、ART 治療を受けた患者では 5 症例中 4 例に複数のインプリント領域でメチル化異常が観察された。4 例全てにおいて、卵子型および精子型 DMR の両領域に異常が見られた。また、同一症例で、高メチル化および低メチル化を示し、その程度は完全型ではなくモザイク型を示す特徴が観察された。BWS では、ART 治療を受けた症例は 1 例しか解析できなかったが、同様の傾向が見られた。一方、非 ART 群において、SRS では 10 症例中 3 例、BWS では 6 症例中 1 例に複数領域にメチル化異常が観察された (図 1)。

A SRS		Abnormal methylation				
Case	ART	H19 Hypomethylated (mosaic)	PEG1 Hypermethylated	PEG10 Hypermethylated (mosaic)	GRB10 Hypermethylated	ZNF597 Hypomethylated
1	IVF-ET	H19 Hypomethylated (mosaic)	PEG1 Hypermethylated	PEG10 Hypermethylated (mosaic)	GRB10 Hypermethylated	ZNF597 Hypomethylated
2	IVF-ET	H19 Hypomethylated (mosaic)	PEG1 Hypermethylated (mosaic)			
3	IVF-ET	H19 Hypomethylated (mosaic)	PEG1 Hypermethylated (mosaic)			
4	IVF-ET	H19 Hypomethylated (mosaic)	GRB10 Hypermethylated			
5	IVF-ET	H19 Hypomethylated (mosaic)	INPP5F Hypermethylated			
6	-	H19 Hypomethylated (mosaic)				
7	-	H19 Hypomethylated (mosaic)	ZNF597 Hypermethylated (mosaic)	ZNF331 Hypomethylated (mosaic)		
8	-	H19 Hypomethylated (mosaic)				
9	-	H19 Hypomethylated (mosaic)				
10	-	H19 Hypomethylated (mosaic)				
11	-	H19 Hypomethylated (mosaic)	PEG1 Hypermethylated			
12	-	H19 Hypomethylated (mosaic)				
13	-	H19 Hypomethylated (mosaic)	FAM50B Hypomethylated			
14	-	H19 Hypomethylated (mosaic)				
15	-	H19 Hypomethylated (mosaic)				

B BWS		Abnormal methylation			
Case	ART	LIT1 Hypomethylated	ZDF2 Hypermethylated	PEG1 Hypermethylated	NESPAS Hypomethylated (mosaic)
1	IVF-ET	LIT1 Hypomethylated	ZDF2 Hypermethylated	PEG1 Hypermethylated	NESPAS Hypomethylated (mosaic)
2	-	LIT1 Hypomethylated			
3	-	LIT1 Hypomethylated			
4	-	LIT1 Hypomethylated			
5	-	LIT1 Hypomethylated			
6	-	LIT1 Hypomethylated	ZDF2 Hypermethylated (mosaic)	ZNF331 Hypomethylated (mosaic)	
7	-	LIT1 Hypomethylated			

図 1 DNA メチル化と ART との関連

インプリント疾患は、体外受精や顕微授精の ART 症例に多い傾向が見受けられるが、体外受精や顕微授精の ART 操作に含まれる排卵誘発、排卵、胚培養液など種々の ART 操作もリスク要因になりうるため、原因特定に至っていない。ART 操作と DNA メチル化異常に関する動物実験の報告は多数あるが、ヒト研究においてこれらの検証を行うは困難である。本研究のインプリン

ト疾患患者のメチル化解析結果から、非 ART 児に比較して、複数のメチル化異常およびメチル化異常パターンがモザイクを示すなど複雑であることから、ART におけるリスクは、配偶子形成期よりも受精以降の過程であることが推察された。今後、エピゲノム異常を示す症例の発症機序の解明およびリスク要因の同定が急務である。

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)

[雑誌論文] (計 5 件)

Hiura H, Toyoda M, Okae H, Sakurai M, Miyauchi N, Sato A, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Nishino K, Umezawa A, Arima T. Stability of the abnormal imprinting of human induced pluripotent stem cells. BMC Genetics. 14, 32, 2013. (査読有)
doi: 10.1186/1471-2156-14-32.

Chiba H, Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Arima T. DNA methylation errors in imprinting disorders and assisted reproductive technologies. Pediatrics international. 55, 542-549, 2013. (査読有) doi: 10.1111/ped.12185.

Arima T, Okae H, Hiura H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Hayashi C. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in male and female germ cells of infertile couples. DNA METHYLATION INTECH. 29: 183-192, 2012. (査読有)
<http://www.intechopen.com/books/dna-methylation-from-genomics-to-t>

echnology

Hiura H, Okae H, Kobayashi H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Suzuki F, Nagase S, Sugawara J, Nakai K, Yaegashi N, Arima T.

High-throughput detection of aberrant imprint methylation in the ovarian cancer by the bisulphite PCR-Luminex method. BMC Medical Genomics. 5, 8-17, 2012.

(査読有)

doi: 10.1186/1755-8794-5-8.

Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Van De Pette M, John R M, Kagami M, Nakai K, Soejima H, Ogata T, Arima T. Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproductive technologies. Human Reproduction. 27 (8), 2541-2548, 2012. (査読有)
doi: 10.1093/humrep/des197.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

樋浦 仁 (HIURA, Hitoshi)

東北大学・大学院医学系研究科・
助教

研究者番号 : 70451523