

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 2 日現在

機関番号：34605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592494

研究課題名(和文)大規模塩基配列情報を利用した稀少産科疾患の病態解明と新規診断法の確立

研究課題名(英文)The analysis of genetic features of rare obstetric diseases using whole-exome sequencing and genome-wide association study

研究代表者

前原 佳代子 (Maehara, Kayoko)

畿央大学・健康科学部・教授

研究者番号：80421311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：稀少性の原因不明の産科疾患の原因同定に、次世代シーケンサーやSNPアレイ技術を利用した網羅的配列解析は極めて有効であると考えられる。本研究では、次世代シーケンサーで取得した大規模配列解析情報やマイクロアレイ技術で取得したゲノムワイドな一塩基多型(SNP)情報を駆使し、産科領域の稀少疾患である反復胎状奇胎の日本人の症例でNLRP7遺伝子の変異を疾患責任遺伝子として特定した。また、合併症のない正常産411例のゲノムワイドなSNP情報を収集し、産科疾患を解析する際に有用な日本人コントロール産婦のcopy number variant(CNV)データベースを構築した。

研究成果の概要(英文)： This study aimed to clarify the genetic and epigenetic features of rare obstetric diseases in Japanese using whole-exome sequencing and arrays. A novel homozygous nonsense mutation in NLRP7 (c.584G>A; p.W195X) was identified in recurrent hydatidiform mole of a Japanese patient using whole-exome sequencing. DNA methylation assay demonstrated that some maternally methylated regions in villi obtained from the case failed to methylate completely. The results reveal that the mutation of NLRP7 gene and the loss of DNA methylation in maternally methylated regions contribute to establish the disease. In addition, using a high resolution genotyping array and samples from 411 Japanese women with normal parity without significant complications, we have compiled 1043 copy number variable regions. This resource is useful for reducing the candidate pathogenetic variants of rare obstetric diseases in Japanese.

研究分野：産婦人科学

キーワード：周産期疾患 一塩基多型 ゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝学的解析手法の進歩により、家系症例を収集可能な一つの遺伝子の異常で発症する単一遺伝性疾患や、大きな染色体の構造異常を有する疾患で、原因遺伝子が同定されている。その一方で、点変異や微細な欠失による、遺伝的な要因と環境的な要因の両方に影響される、あるいは新しく生じた変異等の背景があることが推測される稀少産科疾患では、従来の遺伝学的手法を含む臨床診断では責任遺伝子の同定が困難である。

近年、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) の手法が導入され、大規模なケース・コントロールスタディが可能である罹患者数の多い2型糖尿病などで、多くの画期的な研究成果が得られている (Nat Genet 40: 1092-1097, 1098-1102, 2008)。稀少産科疾患では、罹患者数が少ないため、大規模なケース・コントロールスタディを計画することが難しく、GWAS 研究を産科疾患の原因遺伝子の同定に応用した例は少ない。しかし、GWAS で取得される一塩基多型 (SNP) 情報は、染色体全体にわたる点変異や微細欠失、コピー数異常といった構造異常の検出に利用でき、さらに次世代シーケンサーの普及に伴い、個人の全ゲノム情報に基づいた、大規模配列解析が可能となり、罹患者が少ない稀少疾患についても、疾患の責任遺伝子が明らかにされつつある (Nat Genet 43: 527-529, 2011)。

## 2. 研究の目的

稀少性の原因不明の産科疾患の原因同定に、次世代シーケンサーや SNP アレイ技術を利用した網羅的配列解析は極めて有効であると考えられる。本研究では、次世代シーケンサーで取得した大規模配列解析情報やマイクロアレイ技術で取得したゲノムワイドな一塩基多型 (SNP) 情報を駆使し、産科領域の難治性疾患や稀少疾患の関連遺伝子を解明する事を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 研究対象と試料

母体の遺伝的要因の関与が推測され、生児を得ることが困難な症例、胎児の発育異常を繰り返す症例など、現状での治療では生児を得ることができない不育症を解析対象とする。遺伝子解析に同意した症例の母体末梢血液及び臍帯血・胎盤組織から抽出したゲノム DNA (gDNA) を主たる材料とする。

### (2) 解析方法

#### 検体からの gDNA の抽出

QIA symphony (自動化 gDNA 抽出口ボット) を用い、血液から gDNA を抽出する。血液以外の胎盤組織は、QIA amp DNA mini kit を用い、gDNA を抽出する。

エクソン解析による de novo 変異同定  
約 60 Mb の全エクソン配列を網羅したオリ

ゴキャプチャーで、gDNA からエクソン領域を選択的に捕捉回収し、次世代シーケンサー (HiSeq) で網羅的に配列情報を取得する。

### 網羅的 SNP 解析

illumina 社の BeadChip (Human Omni2.5-8) を用い、ゲノムワイドな SNP 情報を収集する。収集した多型情報に基づき、コピー数の異常など染色体構造解析や、アミノ酸置換を伴う多型の解析を行う。

### 網羅的 DNA メチル化解析

illumina 社の BeadChip (Human Methylation 450) を用い、ゲノムワイドな DNA のメチル化情報を収集する。

### データベースの活用

OMIM と文献情報データベースへのアクセスツールを利用して、責任遺伝子候補の同定とその生物学的機能注釈を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 反復胞状奇胎の原因遺伝子の同定

絨毛性疾患である胞状奇胎の多くは、雄核発生 (ゲノム欠損卵子に 1 精子受精あるいは 2 精子受精) や正常卵子に 2 精子受精が原因で発症すると考えられているが、海外の複数のグループから、家族性・孤発性の反復胞状奇胎の報告がされている (Hum. Mol. Genet. 1999; 8: 667-671, Nat. genet. 2006; 36: 300-302)。日本人の反復胞状奇胎症例を収集し、5 症例について母体血液から gDNA を抽出し、次世代シーケンサーを利用して全エクソンの配列情報を取得した。その結果、5 症例のうち 1 症例に染色体 19 番にコードされている *NLRP7* (*NLR family, pyrin domain containing 7*) 遺伝子に変異が見つかった (図 1 参照)。

illumina 社の BeadChip (Human Omni2.5-8) を用いて収集したゲノムワイドな SNP 情報に基づいて染色体構造について調べた結果、この症例 (母体) では *NLRP7* 遺伝子を含む周辺領域はヘテロ接合性を欠いていることが明らかになった。つまりこの症例では、*NLRP7* 遺伝子にホモ変異が生じ、その変異により、アミノ酸のトリプトファンをコードするコドンが終始コドンに変わるため、全長 1037 アミノ酸で構成される *NLRP7* タンパク質が 194 アミノ酸までしか翻訳されず、不完全なタンパク質が産生されていることがわかった (図 1 参照, Ito Y. et al., Gynecol. Obstet. Invest. 2015)。

この症例の反復胞状奇胎の組織では、通常の雄核発生による胞状奇胎とは異なり、父母に由来するゲノムを 1 セットずつ継承していることが一塩基多型情報を利用した解析により検証された。さらに反復胞状奇胎の組織の gDNA を材料に供して DNA メチル化解析を行ったところ、この症例の奇胎組織では、通常母親由来のアレルにメチル化が高度に

生じる領域で低メチル化状態になっているなど、DNA のメチル化に異常が生じていることがわかった。本研究で用いた手法により、日本人の反復胎状奇胎症例で疾患原因遺伝子とその病態の一端が明らかになった。

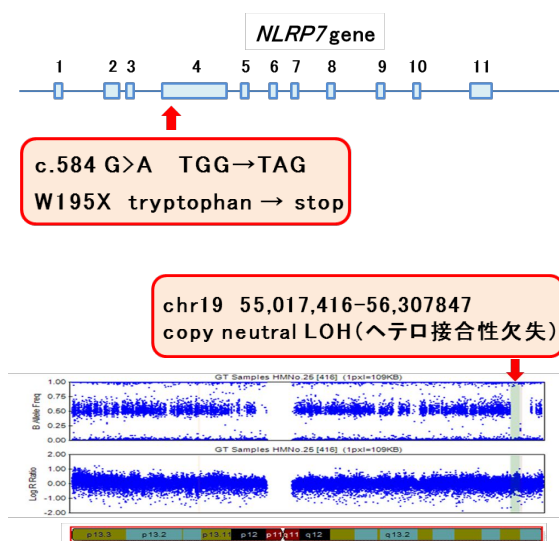


図1 *NLRP7* 遺伝子変異が同定された反復胎状奇胎の症例

## (2) 反復流早産症例の解析

流早産を7回繰り返し、生児を得ることができなかった原因不明の症例について、次世代シーケンサーを利用したエキソーム解析を行った。その結果、妊娠初期から中期にかけて子宮筋の抑制に関与する *PTGER3* (プロスタグランジンレセプターのひとつ) 遺伝子に一塩基多型があることがわかった。この一塩基多型が疾患関連遺伝子の有力な候補になりうるか、反復流早産症例で見出された *PTGER3* 遺伝子に生じた一塩基多型の頻度を、核酸の質量分析法(シーケノム社の MassARRAY)を用いて正常妊産婦約100例のgDNAを利用して調べた。反復流早産症例で見つかった *PTGER3* 遺伝子の一塩基多型は、稀な一塩基多型であることがわかった。

## (3) 日本人コントロールの copy number variant (CNV) データベースの構築

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業と連携し、コントロール(合併症のない正常産)のリファレンスデータの収集を行った。具体的には合併症のない正常産411例について、illumina社のBeadChip (Human Onmi2.5-8)を用い、ゲノムワイドなSNP情報を収集した。収集した多型情報に基づき、コピー数異常(欠失、copy neutral loss of heterozygosity、重複)について詳細な解析を行い、日本人コントロール産婦の copy number variant (CNV) データベースを構築した(Migita O. et al., J. Hum. Genet. 2014)。これらのデータベースは、今後産科疾患の症例を解析する際に、日本人の参照データとし

て活用されることが期待される。

## 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)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Ito Y., Maehara K., Kaneki E., Matsuoka K., Sugahara N., Miyata T., Kamura H., Yamaguchi Y., Kono A., Nakabayashi K., Migita O., Higashimoto K., Soejima H., Okamoto A., Nakamura H., Kimura T., Wake N., d Taniguchi T., and Hata K. Novel nonsense mutation in the *NLRP7* gene associated with recurrent hydatidiform mole. *Gynecol. Obstet. Invest.* 2015, DOI:10.1159/000441780 査読有

Miyata T., Sonoda K., Tomikawa J., Tayama C., Okamura K., Maehara K., Kobayashi H., Wake N., Kato K., Hata K., and Nakabayashi K. Genomic, epigenomic, and transcriptomic profiling towards identifying omics features and specific biomarkers that distinguish uterine leiomyosarcoma and leiomyoma at molecular levels. *Sarcoma* vol. 2015, 14 pages, 2015, DOI:10.1155/2015/412068 査読有

Migita O., Maehara K., Kamura H., Miyakoshi K., Tanaka M., Morokuma S., Fukushima K., Shimamoto T., Saito S., Sago H., Nishihama K., Abe K., Nakabayashi K., Umezawa A., Okamura K., and Hata K. Compilation of copy number variants identified in phenotypically normal and parous Japanese women. *J. Hum. Genet.* 59, 326-331, 2014, DOI:10.1038/jhg.2014.27 査読有

〔学会発表〕(計 15 件)

宮田知子、園田顕三、富川順子、田山千春、前原佳代子、小林裕明、和氣徳夫、加藤聖子、秦健一郎、中林一彦 子宮平滑筋肉腫のゲノム・エピゲノムプロファイリング解析～分子病態解明と診断マーカー同定を目指して～ 第19回バイオ治療法研究会 2015年12月5日 東京理科大学森戸記念館(東京)

春日義史、秦健一郎、宮越敬、福武麻里絵、正木繭、池ノ上学、落合大吾、松本直、峰岸一宏、前原佳代子、田中守、青木大輔 日本人妊娠糖尿病の分子遺伝学的病態解析 第67回日本産科婦人科学会学術講演会 2015年4月11日 パシフィコ横浜(横浜)

榊みずほ、海老原侑子、岡村浩司、中林一彦、秦健一郎、小林芳郎、**前原佳代子** ヒト老化細胞を利用したエピゲノム解析 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 27 日 パシフィコ横浜 (横浜)

Migita O., **Maehara K.**, Nakabayashi K., Okamura K., and Hata K. Copy number variants identified in Japanese women. The American Society of Human Genetics 2014 Annual Meeting, San Diego (U.S.A.), October 18-22, 2014

碓井宏和、瞿佳、中林一彦、**前原佳代子**、秦健一郎、生水真紀夫 雄核発生奇胎の SNP アレイによる診断について 第 22 回日本胎盤学会学術集会・第 32 回日本絨毛性疾患研究会 2014 年 10 月 3 日~4 日 芝蘭会館 (京都)

碓井宏和、瞿佳、**前原佳代子**、埜真輔、山本憲子、錦見恭子、植原貴史、楯真一、三橋暁、秦健一郎、生水真紀夫 絨毛性疾患の発生と管理：SNP アレイ解析による雄核発生ヘテロ奇胎発生機序の推定 第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会 2014 年 4 月 17 日~20 日 東京国際フォーラム (東京)

伊藤由紀、**前原佳代子**、兼城英輔、宮田知子、増田彩子、右田王介、岡村愛光、中村仁美、木村正、和氣徳夫、谷口武、秦健一郎 正常二倍体だが反復する胞状奇胎に観察される母由来アレルの DNA メチル化異常と NLRP7 遺伝子変異 第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会 2014 年 4 月 17 日~20 日 東京国際フォーラム (東京)

右田王介、**前原佳代子**、嶋本富博、諸隈誠一、福嶋恒太郎、和氣徳夫、宮越敬、田中守、齋藤滋、左合治彦、秦健一郎 日本人正常分娩妊婦集団の遺伝的特徴~標準データとしての有用性と注意点~ 第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会 2014 年 4 月 17 日~20 日 東京国際フォーラム (東京)

伊藤睦美、荻山友貴、榊みずほ、石井浩二郎、齋藤成昭、秦健一郎、高橋考太、**前原佳代子** ヒト新規中心体タンパク MORE の機能解析 第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3 日 神戸ポートアイランド (神戸)

伊藤睦美、荻山友貴、榊みずほ、石井浩二郎、齋藤成昭、秦健一郎、高橋考太、**前原佳代子** ヒト新規中心体タンパク MORE の機能解析 第 31 回染色体ワークショップ・第 12 回核ダイナミクス研究会

2013 年 11 月 25 日 ホテルおかだ (足柄下郡)

右田王介、岡村浩司、**前原佳代子**、嘉村浩美、中林一彦、秦健一郎 日本人正常分娩集団に観察される遺伝的多様性 日本人類遺伝学会第 58 回大会 2013 年 11 月 22 日 江陽グランドホテル (仙台)

右田王介、**前原佳代子**、嶋本富博、諸隈誠一、福嶋恒太郎、和氣徳夫、左合治彦、宮越敬、田中守、齋藤滋、秦健一郎 正常分娩妊婦に観察される遺伝的多様性 第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会 2013 年 5 月 10 日~12 日 ロイトン札幌、ホテルさっぽろ芸文館、札幌プリンスホテル、札幌市教育文化会館 (札幌)

右田王介、**前原佳代子**、岡村浩司、西濱啓一郎、中林一彦、秦健一郎 日本人集団に共通するコピー数多型 第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 11 日~14 日 福岡国際会議場、マリンメッセ福岡 (福岡)

宮田知子、中林一彦、**前原佳代子**、小林裕明、和氣徳夫、秦健一郎 子宮平滑筋肉腫の分子病態の統合解析 日本婦人科がん分子標的研究会 第 11 回学術集会 2014 年 6 月 22 日 中禅寺金谷ホテル (日光市)

久須美真紀、中林一彦、**前原佳代子**、田島敦、秦健一郎 生殖補助医療技術が出生児の DNA メチル化状態に及ぼす影響の検討 第 6 回日本エピジェネティクス研究会年会 2012 年 5 月 14 日~15 日 学術総合センター (東京)

〔その他〕

ホームページ等  
畿央大学教員紹介データベース  
[http://webinfo.kio.ac.jp/kio1/view2.asp?msg\\_no=275](http://webinfo.kio.ac.jp/kio1/view2.asp?msg_no=275)

国立成育医療研究センター  
<http://www.ncchd.go.jp/research.php>  
<http://www.ncchd.go.jp/research/nch/ntec/index.html>  
<http://ntec.heteml.jp/nch/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前原 佳代子 (MAEHARA Kayoko)  
畿央大学・健康科学部・教授  
研究者番号：80421311

### (2) 研究協力者

嘉村 浩美 (KAMURA Hiromi)  
国立成育医療研究センター・研究員