

平成 30 年 7 月 18 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293365

研究課題名(和文) 生殖補助医療に伴う医原性エピゲノム変異の詳細な検証

研究課題名(英文) Verification of possible iatrogenic epimutations by artificial reproductive technologies.

研究代表者

秦 健一郎 (HATA, KENICHIRO)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・周産期病態研究部・部長

研究者番号：60360335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：日本では毎年、多くの赤ちゃんが体外受精で生まれて来ますが、その中にゲノムインプリンティング異常症と呼ばれる特殊な患者さんが多い可能性を心配する研究結果が以前報告されました。しかし我々は、そのような仮説に疑問を持っていましたので、日本人の体外受精を受けた方々のご協力をいただき、最先端の遺伝子解析技術や統計学的手法を駆使して詳細な解析を行いました。その結果、やはり当初我々が予想した通り、体外受精とゲノムインプリンティング異常のはっきりした関連は見つかりませんでした。我々の結論は最近の海外の類似研究とも矛盾ありません。一方で、新しい医療技術導入の際には詳細な安全性検証が今後も必要であると考えます。

研究成果の概要(英文)：It is suggested that the early embryo culture accompanying artificial reproductive technologies (ART) may cause iatrogenic epimutations and could cause genomic imprinting disorders. However, molecular epidemiological studies do not show a clear relationship between the two. Therefore, we analyzed the DNA methylation in the whole genome, focusing on areas other than genomic imprinting. The epigenetic analysis result by "genetic factors (SNP etc.)" were removed and epigenetic data were effectively normalized. Then, we performed various statistical analyzes. So far, no obtained analysis results suggest possible relation between the infants by ART and the infants outcome of spontaneous pregnancy.

研究分野：産婦人科学、分子生物学、ゲノム医学

キーワード：エピゲノム DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

<モデル生物では、初期胚の体外培養はエピゲノム変異を引き起こす>

環境因子により、エピジェネティックな修飾状態の変化(エピゲノム変異)が誘発されることが知られている。モデル生物では、長期の体外培養により、初期胚がエピゲノム変異、特にゲノムインプリンティング異常を起こす事が知られている(Young, Nat Genet 2001; Khosla, Biol Reprod 2001)。出生後にも確かに遺伝子発現変化が観察されるが、これらの出生仔のエピゲノム変異の有無は、明確なデータが示されるに至っていない(Kohda, BBRC 2011)。

<ヒト生殖補助医療とエピゲノム変異の因果関係を示すコホート研究結果は無い>

上述のモデル生物の結果に加え、ヒトでは顕微授精と Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) 発症との関連を指摘する報告(Michael, Am J Hum Genet 2004, BWS患者のうち顕微授精を受けていた症例が4.9%と一般集団より高率なことを報告)をはじめ、いくつかの症例報告やケースシリーズ研究がなされ、生殖補助医療による医原性(医療由来)のエピゲノム変異(DNAメチル化異常)が懸念されている。しかし、大規模なコホート研究では明確に生殖補助医療とゲノムインプリンティング異常の関連を示すには至っていない(Lidegaard, Human Reproduction 2005; Bowdin, Human Reproduction 2007)。また、ゲノムインプリンティング異常の一つである Angelman 症候群について行われた厳密な症例-対照研究では、拳児まで二年以上かかった無治療群あるいは排卵誘発のみの群は、ICSI 群と同様の相対危険度であったことから、そもそも「subfertile なカップル」が Angelman 症候群発症の高リスク群であることが示唆された(Ludwig, J Med Genet 2005)。

現在多くの医療機関で、長期間胚を体外培養し、優良な胚を選択して単一胚移植を行う選択的単一胚移植が積極的に導入されている(2007年日本生殖医学会「多胎妊娠防止のための移植胚数ガイドライン」)。これらの高度な生殖補助医療と医原性エピゲノム変異の因果関係の有無を明らかにすることは喫緊の課題であるが、ゲノムインプリンティング疾患の発症率(数万分の一)と、本邦の高度生殖補助医療による出生数(約2万人/年)を考え併せると、厳密な疫学研究を行うには大規模かつ長期的な研究体制が必要であり、早期の因果関係解明は困難である。疫学解析と並行して分子病態の解明を進め、多方面から因果関係の有無を明らかにしていくことが肝要である。

2. 研究の目的

モデル生物の解析からも明らかなように、エピゲノム変異が胎児・胎盤の発生分化に関わる領域で起これば、多くは出生に至らない。

従って、出生児を対象にエピゲノム変異を検索するのであれば、淘汰されずに遺残していることが期待できるエピゲノム変異、すなわち、胎児・胎盤の発生分化に重篤な影響を与えない領域を積極的に検索するのが有効と考えられる。そこで本研究は、ゲノムインプリンティング領域に標的を絞らず、全ゲノム領域のDNAメチル化状態を広く解析する。一方で、DNAメチル化状態には、メチル化自体の個人差に加え、ゲノム多様性に起因するエピゲノム多様性も存在する(Hellman, Epigenet Chrom 2010)。これらの「生理的」なエピゲノム多様性を十分に考慮し、真のエピゲノム変異を同定するためには、症例毎に遺伝的背景を検証する必要がある。初年度は、年齢と妊娠週数をマッチングさせた自然妊娠による出生児群(自然妊娠児群)と、体外受精による出生児群(体外受精児群)の二群間で、アレイ解析技術を用いて約45万か所の主にプロモーター領域のDNAメチル化状態を比較検証し、体外受精児群に特徴的に認められるDNAメチル化状態の変化(エピゲノム変異)の有無についての結論を得る。エピゲノム変異の有無を検証する際には、必ず各症例の遺伝的背景を併せて解析し、厳密に「確からしいエピゲノム変異」を同定する。次年度は、アレイが網羅していない領域のDNAメチル化状態を検証するために、次世代シーケンサーを利用して、非プロモーター領域を中心に解析する。これらの領域は、DNAメチル化変化が直ちに遺伝子発現に強い影響を与えない部分が多いため、医原性エピゲノム変異が遺残しやすいと期待される。最終年度は、臨床情報で層別化した解析を行う。特に、不妊期間が長かった自然妊娠症例、排卵誘発のみを行った症例、顕微授精を行った症例、を中心に、自然妊娠群との比較検討を行う。

これまで生殖補助医療に伴うエピゲノム変異の解析は主に、胚操作に伴うゲノムインプリンティング異常に着目した研究が行われてきた。その理由として、1)モデル生物では胚操作に伴ってエピゲノム変異(DNAメチル化異常)によるゲノムインプリンティングの破綻が起こり得ることが明確に示されていること、2)DNAメチル化異常の表現型(ゲノムインプリンティング疾患)が明確なためケースシリーズ研究が行いやすいこと、等が挙げられる。これらの分子生物学的な解析に加え、疫学研究による検証が重要であるが、ゲノムインプリンティング疾患は元来稀な疾患なため、厳密な症例-対照研究やコホート研究が困難であり、長期大規模な疫学研究の成果を待たねばならない。

本研究では、懸念される医原性エピゲノム変異を、従来とは全く異なる戦略で検証する。具体的には、インプリンティング遺伝子調節領域以外のDNAメチル化領域に着目する。その理由として、正常な発生に必須のインプリンティング遺伝子のDNAメチル化異常よりも、

それ以外の領域の DNA メチル化異常の方が、淘汰されずに出生児に遺残する可能性が高く、検出の機会が増えると予測される事が挙げられる。また、生理的 DNA メチル化は、圧倒的大多数がゲノムインプリンティング以外の領域を対象としており、かつ発生初期にこれらの領域では劇的な DNA メチル化の消去と再構築が起こっていることから、環境負荷による DNA メチル化エラー（医原性エピゲノム変異）が起こりやすい場所と考えられる。一方で、エピゲノム状態には臓器差・個体差があり、さらに遺伝的多様性が DNA メチル化状態に影響する事も知られているので（Hellman, Epigenet Chrom 2010）、これらを慎重に考慮した DNA メチル化異常の判定が必要となる。このような解析戦略で生殖補助医療による出生児の厳密なエピゲノム解析を行った報告は未だなされていない。

申請者はすでに約 70 例の解析可能な症例検体を収集しており、そのうち 16 例を用いた試験的な解析も終了し、必要な解析手法は確立していることから、自然妊娠児群と体外受精児群間のエピゲノム多様性の相違の有無は、本研究期間内に十分に結論が得られる。本研究結果の意義は、生殖補助医療の安全性の検証に止まらない。新生児期は、エピゲノム修飾の初期状態を反映していると考えられるため、本研究で自然分娩群から収集される新生児期のエピゲノム多様性に関するデータは、生理的なエピゲノム変異のホットスポットの同定や、様々な慢性疾患におけるエピゲノム変化を同定する為の対照標準データとしての活用等、今後のヒト疾患エピゲノム研究の基盤的知見として応用展開できる。

3. 研究の方法

本研究では、臍帯血を用いて全ゲノム領域の DNA メチル化解析を行い、ゲノム多様性とエピゲノム多様性を慎重に考慮した比較により、生殖補助医療による医原性エピゲノム変異の有無を抽出する事を目的とする。申請者はすでに、少数のサンプルを用いた試験的解析を行っており、解析手技と解析体制は整っている。年齢と週数でマッチングさせた体外受精群と自然妊娠群の比較を行い、主に遺伝子プロモーター近傍の DNA メチル化状態について結論を得る。これらの知見をもとに、次世代シーケンサーを利用した解析手法により、非プロモーター領域に注目したエピゲノム変異の有無を検証する。最終的に、顕微授精の有無、あるいは subfertile な集団を中心に、臨床経過に基づいた分類とエピゲノム異常の関連を解析し、未知のエピゲノム変異病態の有無を検証する。

4. 研究成果

生殖補助医療に伴う初期胚操作が医原性エピゲノム変異の誘因となり、ゲノムインプリンティング異常症を引き起こす可能性を懸念するいくつかの報告が注目を集めている

が、厳密な症例対照研究、大規模な後ろ向きコホート研究、さらにこれらの多数の報告を網羅したシステマティックレビューでは、明確な両者の因果関係は示されるに至っていない。仮に生殖補助医療による医原性エピゲノム変異が存在するならば、しかもその変異を出生児で検証するのであれば、胎児発育に重篤な影響を与えるゲノムインプリンティング領域にエピゲノム変異を持つ胚は、流産等の初期発生異常で失われやすいと考えられるため、マーカーとして適切ではない可能性がある。そこで我々は、ゲノムインプリンティング以外の領域を中心に DNA メチル化状態を全ゲノム網羅的に解析し、健常な個体にも存在するエピゲノム多様性を検証しつつ、ゲノム多様性も考慮した DNA メチル化状態の評価法、特定の領域に偏重しない可能性があるエピゲノム変異の評価法、の考案と検証を進めた。

具体的には、本年度は体外受精による出生児群（体外受精児群と略記）と、自然妊娠による出生児群（自然妊娠児群と略記）を、母体の年齢と分娩時妊娠週数でマッチングさせ、二群間のエピゲノム多様性を比較した。明らかな感染症及び先天異常を伴わない各群症例の臍帯血からゲノム DNA を回収し、マイクロアレイ技術による網羅的 DNA メチル化解析（illumina 社の DNA メチル化アレイ解析）を行い、既知遺伝子プロモーター領域ほぼ全てをカバーする 473,929 ヶ所の DNA メチル化状態を定量解析した。併せて網羅的一塩基多型解析を行い、ゲノム多様性を考慮した層別化解析を行った。ゲノム多様性の検証は、250 万箇所の一塩基多型情報の主成分分析によって行い、DNA メチル化状態は、47 万全プローム DNA メチル化計測値の相関解析及び、ノンパラメトリック手法である Mann-Whitney U 検定、さらに外れ値の多寡（乱れ具合）をスミルノフ・グラブス検定で比較評価した。当初の予定通り、想定した症例数の解析を終えた。その結果、当初想定していた、「ジェネティックな要因（網羅的塩基多型解析による遺伝的背景情報）によるエピジェネティックな解析結果への影響の排除」に成功し、今後のエピゲノム解析を進めていく上で重要な標準化の目途が立った。またこれまでのところ、様々な統計解析で、体外受精による出生児群と、自然妊娠による出生児群間で、当初の我々の仮説を支持する解析結果を得ており、現在投稿準備中である。次頁に、解析結果要約図を提示する。

図1：生殖補助医療後妊娠群と自然妊娠群の流産絨毛の網羅的 DNA メチル化解析結果。約 45 万か所の CpG メチル化状態の定量値を群間比較しても、有意な領域が見つからないことから、「生殖補助医療後妊娠で流産」した検体に共通する DNA メチル化異常領域が孫斬しないことが示唆される。

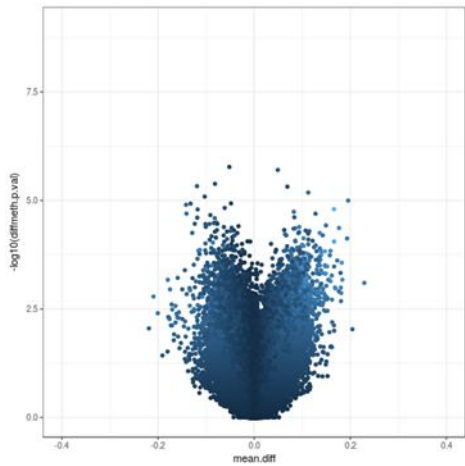
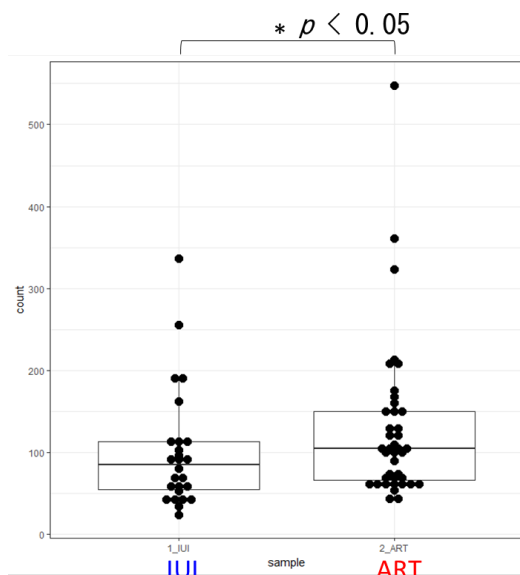


図2：外れ値の多寡の比較検定。縦軸は、各検体内で、異常に高 DNA メチル化あるいは低 DNA メチル化値を示した領域数を示す。IUI（自然妊娠群）と ART（生殖補助医療群）を比較すると、有意に、ART 群には、外れ値が多い検体が存在する。すなわち、生殖補助医療後妊娠で流産した症例では、共通して DNA メチル化異常をきたす領域は見つからないが（図1）外れ値が多いことより、DNA メチル化状態が自然妊娠群より「乱れ」ている症例が多いと推測される。



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)

1. 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, Hata K : Compilation of copy number variants identified in phenotypically normal and parous Japanese women. *J. Hum. Genet.* 2014;59:326-331
2. Kawai T, Yamada T, Abe K, Okamura K, Kamura H, Akaishi R, Minakami H, Nakabayashi K, Hata K : Increased epigenetic alterations at the promoters of transcriptional regulators following inadequate maternal gestational weight gain. *Sci Rep.* 2015;5:14224.
3. Kawai T, Hata K : Reproductive/Developmental Abnormalities Induced by Epigenetic Aberrations and Possible Environmental Causes. *Nihon Eiseigaku Zasshi.* 2016;71:195-199

〔学会発表〕(計 4 件)

招待講演のみ

1. 秦健一郎：生殖・周産期のエピジェネティクス。第 87 回日本内分泌学会学術総会，福岡，2014.4.27
2. 秦健一郎：胎児と胎盤発生異常のエピジェネティクス，第 37 回日本母体胎児医学会学術集会/第 17 回胎児遺伝子診断研究会/第 4 回日台韓母体胎児シンポジウム，佐世保，2014.11.7
3. 秦健一郎：「周産期におけるゲノム・エピゲノム解析の応用」第 51 回日本周産期・新生児医学会学術集会，福岡，2015.7.12
4. 秦健一郎：「ヒト生殖・発生異常のゲノムとエピゲノム -胎児期の環境による疾病素因形成のメカニズム-」第 39 回日本高血圧学会総会，仙台，2016.10.1

〔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〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秦 健一郎 (HATA KENICHIRO)
国立研究開発法人国立成育医療研究センター
一・周産期病態研究部・部長
研究者番号：60360335

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし