

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870033

研究課題名(和文)ART出生児由来インプリント疾患のエピゲノム解析

研究課題名(英文)Epigenetic analyses in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproduction technologies

研究代表者

樋浦 仁(Hiura, Hitoshi)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70451523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000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、Beckwith-Wiedemann症候群およびSilver-Russell症候群患者におけるART出生児は非ART児と比較し、メチル化異常の頻度および程度が大きいことを示し、ゲノムワイドなエピゲノム変異が起こっている事を明らかにした。また、エクソーム解析の結果、メチル化関連遺伝子に重大な影響を及ぼす変異は確認できなかった。以上より、ART出生児のゲノムワイドなメチル化異常はART操作時の影響を受けたと推測された。

研究成果の概要(英文)：The assisted reproduction technologies (ART) are generally considered to be safe, but several studies suggest have reported an increased frequency of imprinting disorder such as Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) and Silver-Russell syndrome (SRS) caused by epigenetic errors in ART children. In this study, to clarify the influence of ART for genome-wide epimutation in SRS and BWS patients derived by ART, we analyzed genome-wide DNA methylation in SRS and BWS patients using reduced representation bisulfite sequencing. In SRS, children derived from ART showed that the frequency and extent of differentially methylated regions in promoters, CpG islands and repeat elements are greater than those of non-ART children. In addition, we could not find mutations had serious effects on DNA methylation-related genes using exome sequencing. 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

キーワード：生殖補助医療(ART) インプリント疾患 DNAメチル化

## 1. 研究開始当初の背景

近年、生殖補助医療 (ART) の普及により、数万～数十万人に1人の発症頻度として知られるインプリンティング異常症の増加が世界中で数多く報告されている。これはARTが、ゲノムインプリンティング (GI) が確立する時期の配偶子や胚を人為的に操作する事が原因であると推察されている。これまでの先天性GI異常症におけるDNAメチル化の解析により、ARTとの関連が示された先天性GI異常症はSilver-Russell症候群 (SRS) およびBeckwith-Wiedemann症候群 (BWS) であり、いずれもDNAメチル化の異常を原因とする (エピゲノム変異) の症例が多かった。また、ART出生児においてもエピゲノム変異の症例がさらに多い傾向にあった。このメチル化異常がART出生児の場合、どのような分子機構を原因として起こっているのか、分子遺伝学的解析を行う必要がある。ART出生児では、多数のメチル化可変領域におけるメチル化異常を示すことを見出した (Hiura H, Human Reproduction. 2012)。

## 2. 研究の目的

ARTにより出生した先天性GI異常症SRSおよびBWSについて、網羅的なDNAメチル化解析を行うことにより、その特徴を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) サンプルの収集

ARTを受けた疾患患者 (SRS: 5名、BWS: 2名)、自然発症の患者 (SRS: 10名、BWS: 7名)、健常児 (8名) について解析した。ヘルシンキ宣言 (エジンバラ改訂)、臨床研究に関する倫理指針 (厚生労働省) に従い、本研究を実施した。東北大学医学部倫理委員会より、研究プロトコルの承諾を得た。研究対象者の登録にあたっては、機密保護に十分に配慮した。すなわち研究対象者の同定や照会には研究登録番号、症例イニシャル、生年月日を用いて行うこととし、直接患者を識別できる情報は事務局のデータベースには登録していない。また、本研究に係わる臨床記録、検査データ、同意に関する記録など医療機関において作成されたものについては保管責任者が鍵のかかるキャビネットに保管した。

### (2) Reduced Representation Bisulphite Sequencing (RRBS) による系統的、網羅的全ゲノムのメチル化解析

ARTおよび非ARTの先天性GI異常症SRSおよびBWS患者および健常児の末梢血からゲノムDNAを抽出した。10ngのゲノムDNAを制限酵素MspIで消化し、末端を修復した後、5メチルシトシンを含むメチル化アダプターとライゲーションした。次に、電気泳動で150-350bpのDNA断片を回収、精製した後、Bisulphite処理を行った。Bisulphite処理DNAを鋳型として、インデックス付きプライマーを用いて、PCRにより増幅し、RRBSライブラリーを作製した。作製したライブラリーのサイズ分布の確認および濃度を定量した後、次世代シーケンサーHiSeq2000 (Illumina) にて塩基配列を決定した。次世代シーケンサーにより得られた塩基配列データは、Bismarkでhg19ヒトゲノムにマッピングし、5リード以上マッピングされたCpGについて解析した。Bisulphite置換効率はnon-CpGの置換効率によって算出した。CpGのメチル化はプロモーター (転写開始点から $\pm 0.5$ kb)、CpGアイランド、LINE、SINE、LTR、Repeat DNAおよびSimple repeatについて、それぞれの領域毎のメチル化率として算出し、検体毎に健常児平均と比較して平均+10%のメチル化変化かつ平均+2SD以上、平均-10%のメチル化変化かつ平均-2SD以下の領域をメチル化異常領域とし、その後の解析を行った。プロモーターにおけるメチル化異常領域については、機能解析を行った。

### (3) エクソーム解析

SRSおよびBWS患者および健常児の1 $\mu$ gの末梢血ゲノムDNAをソニケーターで断片化後、末端を修復し、インデックス用アダプターとライゲーションした。その後、Agilent SureSelect V5+UTRsを用いて、エクソン領域内のDNA断片を濃縮し、回収した。次に、PCRにより増幅し、ライブラリーを作製した。作製したライブラリーのサイズ分布の確認および濃度を定量した後、次世代シーケンサーHiSeq2000にて塩基配列を決定した。SIFTおよびPolyPhen-2予測アルゴリズムにより、DNAメチル化やエピジェネティクス制御に関わる遺伝子の非同義塩基変異を探索した。

#### 4. 研究成果

##### (1) SRS 患者の網羅的 DNA メチル化解析

ART 及び非 ART の SRS 患者について解析した結果、特に、ART 治療を受けた 1 症例 (S9) では健常児に比較して全体的に低メチル化状態であった。メチル化異常領域は、プロモーターでは 843、CpG アイランドでは 1771、SINE では 16067、LINE では 911、LTR では 1635、Repeat DNA では 251、Simple repeat では 2653 領域であった。また、メチル化異常領域数について、ART 群および非 ART 群で比較したところ、ART 群でメチル化異常数が多く、特に脱メチル化領域が多い傾向がみられた (図 1)。

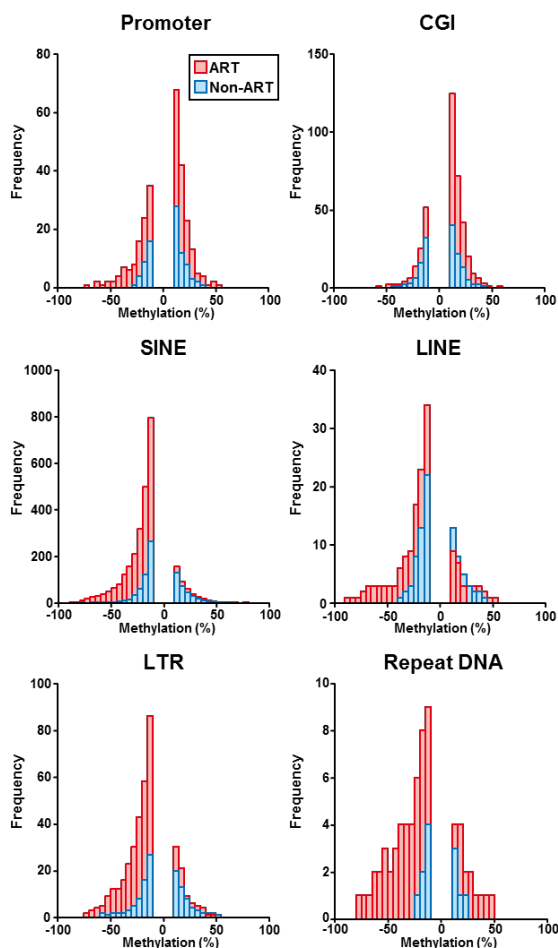


図1 メチル化異常領域の比較

メチル化異常領域を染色体レベルで比較したところ、プロモーター領域では 21 番染色体の異常領域が多かったが、ART 群および非 ART 群で比較すると、15 番染色体が ART 群の異常頻度が非 ART 群に比べ 11 倍高かった (図 2)。CpG アイランドでは 18 番染色体の異常領域が多かったが、ART 群および非 ART 群で比較すると、15 番染色体が ART 群の異常頻度が

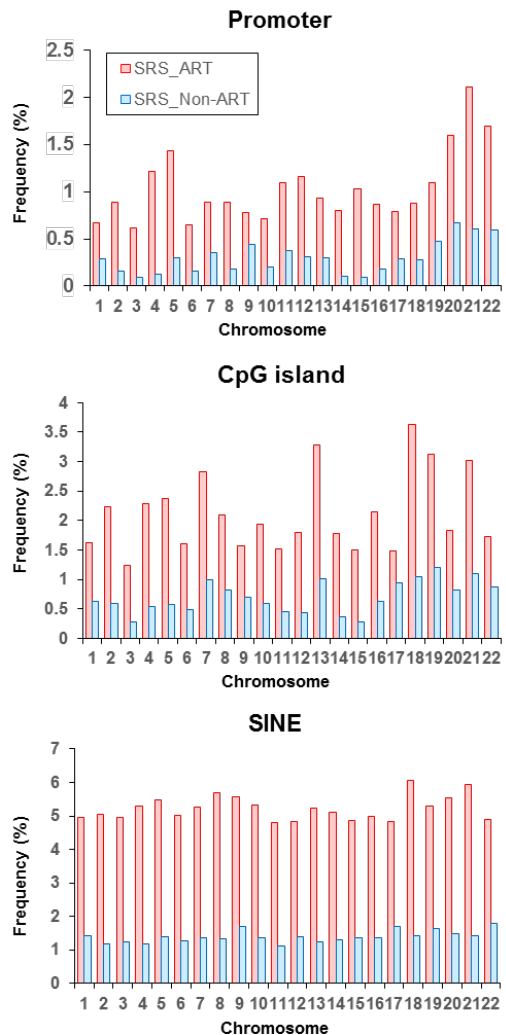


図2 染色体レベルにおけるメチル化異常領域の比較

非 ART 群に比べ 5.3 倍高かった。その一方、SINE、LINE、LTR、Repeat DNA および Simple repeat の繰り返し配列では染色体レベルでの違いはあまり見られなかったが、非 ART 群に比べ ART 群の異常頻度が 4 倍程度多かった。プロモーター領域においてメチル化異常であった遺伝子を Gene Ontology (GO) による機能解析の結果、pattern specification process、regulation of cell development、cell fate commitment など発生や成長に関連する GO term が抽出された。さらに ART 群および非 ART 群を比較すると、ART 群の方が発生に関する GO term の数多く、また有為性も高かった。プロモーター以外のメチル化異常領域の内訳として、CpG アイランドでは転写開始点、SINE では Alu、LINE では L1、LTR では ERV1 が最も多かった。

## (2)BWS 患者の網羅的 DNA メチル化解析

メチル化異常領域は、プロモーターでは 708、CpG アイランドでは 1442、SINE では 11449、LINE では 707、LTR では 1451、Repeat DNA では 204、Simple repeat では 2214 領域であった。次に、抽出した DMR を ART 群および非 ART 群で比較したところ、プロモーターおよび CpG アイランドでは ART 群の方がメチル化変化の程度および頻度は多かった一方、SINE などの繰り返し配列では非 ART 群の方が多かった。すべての BWS 患者におけるプロモーター領域にメチル化異常が見られた遺伝子群を GO 解析した結果、生物学的接着や細胞接着など成長に関わる GO term が抽出されたが、ART 群または非 ART 群単独では GO term は抽出されなかった。以上の結果から、BWS のゲノムワイドなメチル化には ART の影響は少ないと推察された。

## (3)エクソーム解析による DNA メチル化異常の原因遺伝子の探索

SRS および BWS 患者の末梢血ゲノム DNA の非同義塩基変異について、DNA メチル化酵素 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、DNMT3L、メチル化基質合成酵素遺伝子 MAT2A、DNA メチル化関連因子 CTCF、YY1、NLRP2、NLRP5、NLRP7、ZFP57、UHRF1、ARID4A、ARID4B、MBD3 の変異を探索した。しかしながら、予測アルゴリズム SIFT および PolyPhen-2 の解析では、これら遺伝子の機能に重大な影響を及ぼすような非同義塩基変異は見つからなかった。

ART の普及と共に、本来非常に稀な先天性疾患であるインプリンティング異常症の発症頻度が増加している。近年、インプリント異常症において、疾患責任 DMR 以外にもメチル化異常があるマルチローカースメチル化異常 (MMD) が報告されている。さらに、ART 出生児で診断基準に満たない症候群や BWS、SRS 類似疾患などが報告されている。このように ART 出生児にはエピゲノム変異の増加が示唆されている。我々は本解析により、メチル化異常領域は個人によって様々であること、ART 出生疾患患児が非 ART 児と比較し、メチル化異常の頻度および程度が大きいことを示し、ゲノムワイドなエピゲノム変異が起こっている事を明らかにした。また、プロモーターや CpG アイランドの解析では、予想

していたように密度の高い染色体で異常が多かったが、ART では 15 番染色体の異常頻度が高かった。自閉症や統合失調症では 15 番染色体のまれなコピー数変異 (CNV) が危険因子になっていること、統合失調症では LINE-1 (L1) のコピー数が増大していることが知られており、また、ART が精神発達遅延のリスクを上昇することも指摘されている。ART 手技により 15 番染色体のメチル化異常およびゲノムワイドな LINE-1 の脱メチル化を誘導することによって、これら精神疾患の素地になっている可能性が示唆される。しかしながら、父親の加齢により児の自閉症発症リスクが上昇する事も知られており、不妊症カップルの年齢やさらに遺伝的背景を考慮しなければならない。つまり、ART ではこれらのリスク要因が加算的または乗算的に作用しているかもしれない。疾患責任 DMR および遺伝子のメチル化異常以外にも、プロモーター領域のメチル化異常が見られ、続く GO 解析でも発生や成長に関する GO term が抽出されたことから、今後、これらメチル化異常遺伝子と多彩な臨床症状や ART 手技との関連性について検討していくことが急務である。

## 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6件)

1. Kobayashi N, Miyauchi N, Tatsuta N, Kitamura A, Okae H, Hiura H, Sato A, Utsunomiya T, Yaegashi N, Nakai K, Arima T. Factors associated with aberrant imprint methylation and oligozoospermia. Sci Rep. 2017 Feb 10;7:42336. doi:10.1038/srep42336. (査読有)
2. Kobayashi N, Okae H, Hiura H, Chiba H, Shirakata Y, Hara K, Tanemura K, Arima T. Genome-Scale Assessment of Age-Related DNA Methylation Changes in Mouse Spermatozoa. PLoS One. 2016 Nov 23;11(11):e0167127. doi:10.1371/journal.pone.0167127. (査読有)
3. Hamada H, Okae H, Toh H, Chiba H, Hiura H, Shirane K, Sato T, Suyama M,

Yaegashi N, Sasaki H, Arima T. Allele-Specific Methylome and Transcriptome Analysis Reveals Widespread Imprinting in the Human Placenta. Am J Hum Genet. 2016 Nov 3;99(5):1045-1058.

doi:10.1016/j.ajhg.2016.08.021.(査読有)

4. Luehders K, Sasai N, Davaapil H, Kurosawa-Yoshida M, Hiura H, Brah T, Ohnuma S. The small leucine-rich repeat secreted protein Asporin induces eyes in Xenopus embryos through the IGF signalling pathway. Development. 2015 Oct 1;142(19):3351-61. doi:10.1242/dev.124438. (査読有)

5. Okae H, Chiba H, Hiura H, Hamada H, Sato A, Utsunomiya T, Kikuchi H, Yoshida H, Tanaka A, Suyama M, Arima T. Genome-wide analysis of DNA methylation dynamics during early human development. PLoS Genet. 2014 Dec 11;10(12):e1004868.

doi:10.1371/journal.pgen.1004868.(査読有)

6. Hiura H, Okae H, Chiba H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Arima T. Imprinting methylation errors in ART. Reprod Med Biol. 2014;13(4):193-202.

doi:10.1007/s12522-014-0183-3. (査読有)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 2 件)

1. 樋浦仁、ART 出生児由来インプリント疾患のエピゲノム解析、産科と婦人科、診断と治療社 vol.83 No.7 821-822 2016
2. 樋浦仁、有馬隆博、生殖補助医療とエピジェネティクス、エピジェネティクスの産業応用、シーエムシー出版 280-288 2014

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

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: 7 0 4 5 1 5 2 3

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

有馬 隆博 (ARIMA, Takahiro)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 8 0 2 5 3 5 3 2

### (4) 研究協力者

緒方 勤 (OGATA, Tustomu)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号: 4 0 1 6 9 1 7 3

副島 英信 (SOEJIMA, Hidenobu)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号: 3 0 3 0 4 8 8 5