

生殖補助医療由来の先天性ゲノムインプリンティング異常症

東北大学大学院医学系研究科情報遺伝学分野
有馬 隆博, 岡江 寛明, 樋浦 仁

はじめに

近年、生殖補助医療（ART）の普及により、これまで非常に稀であったゲノムインプリンティング異常症の発生頻度の増加が世界各国で指摘されている [1, 2]. このゲノムインプリンティング（遺伝子刷り込み）とは、特定の親由来の遺伝子発現（片親性発現）を示す現象で、生殖細胞形成過程におけるアレル特異的メチル化領域（DMR）のメチル化が刷り込みの本態と考えられている [3]. このメチル化には、卵子形成過程でメチル化を獲得する卵子型メチル化インプリントと精子形成過程でメチル化を獲得する精子型メチル化インプリントが存在する。卵子および精子で確立したそれぞれのメチル化インプリント（性特異的なメチル化状態）は、受精から着床初期に起きるリプログラミング（ゲノム全体の脱メチル化）の影響を受けず、そのメチル化は生涯安定して維持される。また、DMRにおけるメチル化は、始原生殖細胞においていったんリセット（インプリントの消去）され、その後、配偶子形成・成熟過程で性特異的にインプリントの獲得されることで再確立される。

DNAメチル化に代表されるエピジェネティックな修飾は、遺伝子配列の変化を伴わずに遺伝子機能を変換し、発生過程のゲノム機能を動的に制御している。初期胚におけるDNAメチル化は、可逆的な化学的な修飾であるため、生理的な環境とは異なる環境に暴露されると影響を受け、エピゲノム変異が起こることが動物実験で報告されている [4, 5]. ヒトARTはインプリントが獲得される時期の配偶子を操作するため、排卵誘発、配偶子操作、培養液などの外的要因のメチル化への影響について懸念されている [6-9]. このため、DNAメチル化異常（エピゲノム変異）を伴うインプリンティング異常症（先天奇形症候群）の発症率が増加している理由と指摘する研究者が数多くみられる。本稿では、わが国のゲノムインプリンティング異常症5疾患：Beckwith-Wiedemann症候群（BWS）、Angelman症候群（AS）、Prader-Willi症候群（PWS）、Silver-Russell症候群（SRS）、新生児一過性糖尿病（TNDM）について、ARTとの関連性の実態把握と、その分子機構の特性について紹介する。

先天性インプリンティング異常症とARTの関連性

「厚生労働省難治性疾患克服研究事業」(2009)として、わが国の先天性インプリント異常症5疾患についてその患者数、病態等の把握のために、実態調査を行った。

調査対象施設総数3,158施設のうち、1,602施設から有効回答があり（有効回答率56.3%）、報告患者総数は1,818人であった。その内訳は、BWSが70人、ASが123人、PWSが261人、SRSが42人、TNDMが25人である。回答のあった医療機関における患者数を階層毎に推計し、さらに抽出率と回答率から全患者数を推計した（表1）。BWS、SRSは最近増加傾向にあることが疑われた。ほとんどが孤発例で家族例は少なかった。また、不妊治療を受けたかどうか不明な患者が多いことが特徴で、十分な情報が得られていないことも判明した。しかし、不妊治療を受けていたことが明らかになったケースは、疾患別で比較した場合、PWS、BWS、AS、SRSの疾患は、それぞれ少なくとも1.5%、8.6%、1.6%、9.5%であった。平成17年度のIVF+ICSIの出生児は年間10,338人で全出生児の0.86%であることから、SRSとBWSでは約10倍リスクが高い事が推測された。また、このほとんどの症例は体外受精（IVF）と顕微授精（ICSI）によるものであった。

ART出生児のインプリンティング異常症のメチル化インプリントの特徴

これまでの報告では、ARTと関連するインプリント異常症の発症原因がエピゲノム変異（メチル化異常）の

表1 先天性インプリント異常症とARTの関連性（平成21年度）

疾患	実患者数	推定患者数 (95%信頼区間)	推定発症率	ART後の罹患児/ 患者総数
BWS	70	444(350-540)	1/287,000	6/70(8.6%)
AS	123	949(680-1220)	1/134,000	2/123(1.6%)
PWS	261	2070(1500-2640)	1/62,000	4/261(1.5%)
SRS	42	326(240-420)	1/392,000	4/42(9.5%)

階層毎に医療機関を推計し、抽出率と回答率から全患者数を推計した。IVF+ICSIの出生児は年間10,338人で全出生児の0.86%（平成17年度）を考慮すると、SRSとBWSでは約10倍リスクが高いことが推測される。

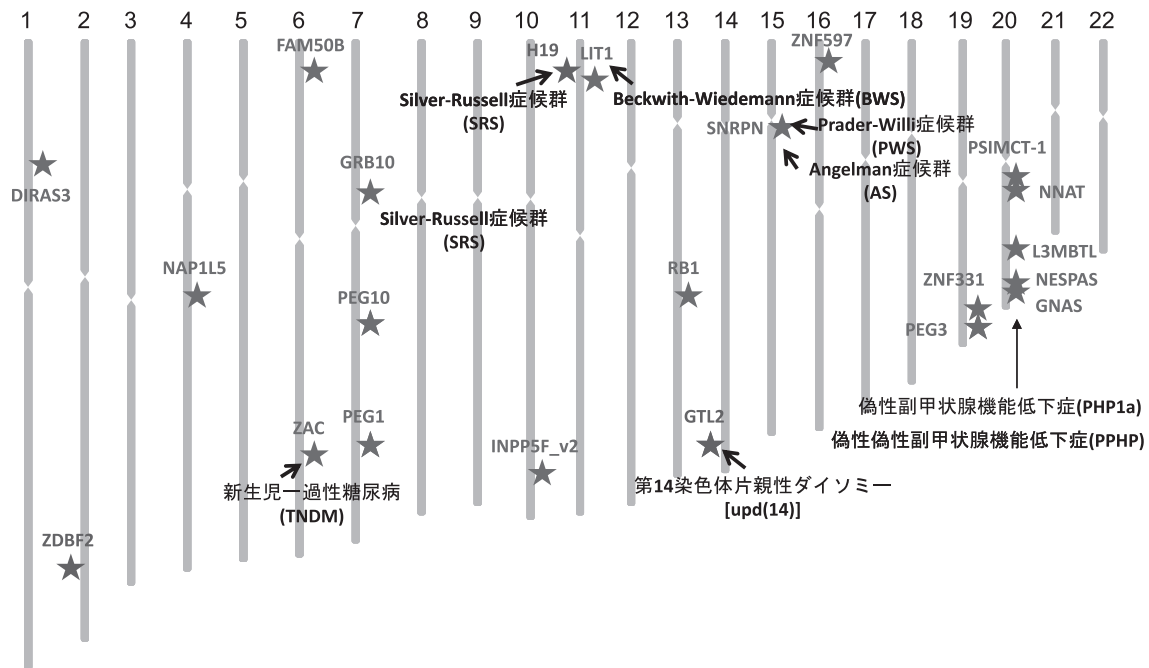


図1 ヒトメチル化インプリントマップと疾患
ヒトメチル化インプリント領域と関連する先天性疾患の染色体マップ。
★精子型メチル化インプリント (DMR) (3領域)．★卵子型メチル化インプリント (DMR) (19領域)．

頻度が圧倒的に高い。そのためDNAメチル化異常を呈するインプリンティング異常症を対象に、網羅的なメチル化インプリントの解析を行った。ヒトインプリントマップを作成し、DNA多型を含むBisulphite PCR Sequence法をデザインし、正確なメチル化解析を行った(図1)。ART後の罹患者と自然発症の患者にみられるメチル化異常のパターンについて比較分析し、その特徴から、発症機序について推測した。その結果、SRSの場合、ART治療を受けた患者では、5例中4例において、複数のインプリント領域で異常を認めた。さらに、4例は、精子型と卵子型DMRの両方に異常を認めた。また、同一症例で、高メチル化と低メチル化を示す症例が多く、またその程度は、完全型ではなく、細胞内のモザイクパターンを示す特徴にみられた。ART後のBWSはわずか1例の症例であるが、SRSの場合と同様の傾向がみられた(表2)。

これらの結果をまとめると、ART出生児の場合、複数のインプリント領域において複雑なメチル化異常のパターンが認められ、生殖細胞形成過程におけるメチル化の獲得の異常というより、むしろ受精以降のメチル化の安定性維持機構の障害が疑われる。

ART後の罹患者の臨床症状の特徴

ART群と非ART群で、各疾患についてその臨床症状について比較した(表3)。

その結果、ART症例では疾患毎にいくつかの特徴が示されたが、特異性のあるものではなかった。また、網羅的なメチル化解析を行った症例に関しても、特徴的な差はみられなかった。しかし、症例数が少なく正確な評価ができなかったものかもしれない。今後、エピゲノム変異の頻度、程度、パターン分類を正確に行うことで、臨床症状の特異性が現れるかもしれない。近年、ART出生児で、診断のつかない症候群やBWS、SRS類似疾患などの報告が散見される。これらの症例では、これまでに報告のないエピゲノム変異が原因となっている可能性は否定できない。

おわりに

ARTの新技术は着実に進歩し、不妊症に重要な治療法として多大な恩恵をもたらし、国内では、年間数万人が出生している。しかしARTは配偶子を操作するため、ゲノムインプリンティングを引き起こす可能性が十分示

表2 ART後の先天性インプリント異常症患者のメチル化異常

A.SRS						
Case	ART	Abnormal methylation				
1	IVF-ET	H19 Hypomethylated (mosaic)	PEG1 Hypermethylated	PEG10 Hypermethylated (mosaic)	GRB10 Hypermethylated	ZNF597 Hypomethylated
2	IVF-ET	H19 Hypomethylated (mosaic)				
3	IVF-ET	H19 Hypomethylated (mosaic)	PEG1 Hypermethylated (mosaic)			
4	IVF-ET	H19 Hypomethylated	GRB10 Hypermethylated			
5	IVF-ET	H19 Hypomethylated (mosaic)	INPP5F Hypermethylated			
6	-	H19 Hypomethylated				
7	-	H19 Hypomethylated (mosaic)	ZNF597 Hypermethylated (mosaic)	ZNF331 Hypomethylated (mosaic)		
8	-	H19 Hypomethylated				
9	-	H19 Hypomethylated (mosaic)				
10	-	H19 Hypomethylated				
11	-	H19 Hypomethylated (mosaic)	PEG1 Hypermethylated			
12	-	H19 Hypomethylated				
13	-	H19 Hypomethylated (mosaic)	FAM50B Hypomethylated			
14	-	H19 Hypomethylated				
15	-	H19 Hypomethylated				
B.BWS						
Case	ART	Abnormal methylation				
1	IVF-ET	LIT1 Hypomethylated	ZDBF2 Hypermethylated	PEG1 Hypermethylated	NESPAS Hypomethylated (mosaic)	
2	-	LIT1 Hypomethylated				
3	-	LIT1 Hypomethylated				
4	-	LIT1 Hypomethylated				
5	-	LIT1 Hypomethylated				
6	-	LIT1 Hypomethylated	ZDBF2 Hypomethylated	ZNF331 Hypomethylated (mosaic)		
7	-	LIT1 Hypomethylated				

SRS, BWS の場合, ART 治療を受けた患者では, 1) 複数のインプリント領域での異常, 2) 精子型と卵子型 DMR の両方に異常, 3) 高メチル化と低メチル化を示す症例が多い, 4) 完全型の異常ではなく, 細胞内のモザイクパターンを示す, など複雑なメチル化異常を示す特徴がみられた。

唆される。インプリンティング異常, 特にエピゲノム変異は, 先天性疾患だけでなく, 身体的, 精神的発育・発達, 性格, 行動異常等に関連し, さらに, 次世代の癌や成人性疾患の原因となりうる。わが国では, 晩婚化, 少子化により今後も ART 出生児が増加すると予想され, インプリンティング異常については, 次世代社会の重要な課題として早急の実態を把握し, 適切な対応が必要とされる。ART を受ける患者が一般の人口統計と異なる特殊な集団であるため, 単純に ART 治療がそのような危険を引き起こすのか, 正確に評価することは難しい。しかし, 分子生物学的解析による正確なリスク評価が十分ではなく, 現時点で明確な結論は得ていない。今後長

期追跡調査も含め, 詳細な表現型やエピゲノム型の比較検討が必要と考える。

一方で, ART を適正に実施するための制度が十分であるとはいえず, ART をめぐり発生する倫理上, 健康上のさまざまな問題に対して適切な対応ができていないのが現状である。さらに, ART の多くは, 医療保険が適用されていない自由診療であり, 受診者は多額の費用を負担しなければならない。また, 経済上の問題をクリアして ART に臨んだとしても, 薬物療法による副作用や, 出生した児の健康に問題があるなどのリスクは避けることはできない。このような現状を打開し, 不妊に悩む人々に対し, 身体的, 経済的負担の少ない, 良質かつ

表3 臨床症状の相違点

BWS

	耳介の溝		眼間開離		巨舌症		ギョロ眼		咬合障害		臍ヘルニア		半身肥大症		停留辜丸	
全体	48/89	53.9	19/89	21.3	81/89	91.0	24/89	27.0	7/89	7.9	67/89	75.3	22/89	24.7	12/89	13.5
非 ART	44/82	49.4	18/82	20.2	74/82	83.1	21/82	23.6	7/82	7.9	61/82	68.5	20/82	22.5	11/82	12.4
ART	4/7	57.1	1/7	14.3	7/7	100	3/7	42.9	0/7	0.0	6/7	85.7	2/7	28.6	1/7	14.3
	腎腫大		肝腫大													
全体	20/89	22.5	8/89	9.0												
非 ART	18/82	20.2	7/82	7.9												
ART	2/7	28.6	1/7	14.3												

AS

	精神発達遅滞		難治性てんかん		色白		不眠症		小頭症		発語障害		下顎突出		操り人形様の歩行	
全体	133/146	91	69/146	47.2	101/146	69.1	65/146	44.5	54/146	36.9	129/146	88.3	91/146	62.3	71/146	48.6
非 ART	133/144	91	68/144	46.5	101/144	69.1	64/144	43.8	53/144	36.3	127/144	86.9	89/144	60.9	69/144	47.2
ART	0/2	0	1/2	50.0	0/2	0	1/2	1/250.0	1/2	50.0	2/2	100.0	2/2	100.0	2/2	100.0

PWS

	筋緊張低下		過食症		色白		精神発達遅滞		低身長		性器低形成		哺乳不良			
全体	259/297	87.2	155/297	52.1	215/297	72.3	249/297	84.0	186/297	62.6	125/297	42	236/297	79.4		
非 ART	256/290	86.1	153/290	51.5	211/290	71.0	245/290	82.0	183/290	61.6	124/290	41.7	232/290	78.1		
ART	3/7	42.9	2/7	28.6	4/7	57.1	4/7	57.1	3/7	42.9	1/7	14.3	4/7	57.1		
	停留辜丸		小さな手足		特異な顔貌		魚様の三角の口									
全体	100/297	33.6	207/297	69.6	238/297	80.1	192/297	64.4								
非 ART	99/290	33.3	204/290	68.6	234/290	78.7	188/290	63.2								
ART	1/7	14.3	3/7	42.9	4/7	57.1	4/7	57.1								

SRS

	身体非対称		成長障害		発汗		低身長		精神発達遅滞		指の奇形		相対的大頭を伴う逆三角形の特異的顔貌	
全体	37/54	68.5	49/54	90.7	11/54	20.3	54/54	100	17/54	31.4	29/54	53.7	54/54	100
非 ART	30/47	55.5	45/47	95.7	10/47	18.5	50/47	92.5	17/47	31.4	26/47	48.1	51/47	94.4
ART	7/7	100	4/7	57.1	1/7	14.3	4/7	57.1	0/7	0.0	3/7	42.9	4/7	57.1

ART 症例では疾患毎にいくつかの特徴が示されたが、特異的なものではなかった。しかし症例数を増やし、エピソードの頻度、程度、パターン分類を正確に行うことで、臨床症状の特異性が現れるかもしれない。

適切な ART を実施するためには、医療保険の適用や公的な補助の対象として検討することはもちろん、現在の ART における技術的な問題をできるだけ排除し、短期間で成功率の高い、より安全な治療システムの構築が必要であると考えられる。

引用文献

- Lucifero D, Chaillet JR, Trasler JM (2004) Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology. Hum Reprod Update 10, 3-18.
- Sasaki H, Matsui Y (2007) Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. Nat Rev Genet 9, 129-140.
- Bowdin S, Allen C, Kirby G, Brueton L, Afnan M, Barratt C, Kirkman-Brown J, Harrison R, Maher ER, Reardon W (2007) A survey of assisted reproductive technology births and imprinting disorders. Hum Reprod 22, 3237-3240.
- Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, Butterwith SC, Gutierrez CG, Carolan C, Broadbent PJ, Robinson JJ, Wilmut I, Sinclair KD (2001) Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. Nat Genet 27, 153-154.
- Market-Velker BA, Zhang L, Magri LS, Bonvissuto AC, Mann MR (2010) Dual effects of superovulation: loss of

maternal and paternal imprinted methylation in a dose-dependent manner. *Hum Mol Genet* 19, 36-51.

6. Sato A, Otsu E, Negishi H, Utsunomiya T, Arima T (2007) Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes. *Hum Reprod* 22, 26-35.
7. Kobayashi H, Sato A, Otsu E, Hiura H, Tomatsu C, Utsunomiya T, Sasaki H, Yaegashi N, Arima T (2007) Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Hum Mol Genet* 16, 2542-2551.
8. Kobayashi H, Hiura H, John R, Sato A, Otsu E, Kobayashi N, Suzuki R, Suzuki F, Hayashi C, Utsunomiya T, Yaegashi N, Arima T (2009) DNA methylation errors at imprinted loci after assisted conception originate in the parental sperm. *Euro J Hum Genet* 12, 1582-1592.
9. Sato A, Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Abe Y, Utsunomiya T, Yaegashi N, Arima T (2011) Assessing loss of imprint methylation in sperm from subfertile men using novel methylation PCR-Luminex analysis. *Fertil Steril* 95, 129-134.