

◆特集：生殖補助医療

ART と遺伝

慶應義塾大学医学部産婦人科学

講師 久 慈 直 昭

生殖補助医療(以下 ART)によって出生した子どもでは、さまざまな疾患への罹患率が一般集団よりわずかではあるが高率であることが最近確認されている。しかし、これが ART 技術そのものの影響なのか、それとも不妊という形質に付随した遺伝的な危険性なのかは解明されていない。

一方、ART が普及したこの 30 年間に遺伝学、および遺伝学と疾病を結びつける遺伝子発現調節に関する研究領域は急速に進歩した。この結果いくつかの疾患については、ART が出生児に異常を発生させる機序が少しずつ明らかになりつつある。

その中でもとくに二つの分野においては、臨床知見と関連づけることが可能な、基礎的なデータが蓄積されつつある。

ひとつは、ICSI によって出生した児の染色体異常発生率増加の危険性についてである。ICSI の臨床応用後比較的早期から、出生児に染色体異常が多いという報告があったが、この 10 数年の間に男性不妊患者の染色体異常に関わる知識が急速に蓄積されたことから、その発生機序が明らかになりつつある。

いまひとつは、インプリンティング(ゲノム刷り込み)異常発生率増加の危険性についてである。こちらは畜産学における家畜体外受精例のデータからその危険性が指摘され、その後ヒトでの本疾患群発生率増加を示すデータもいくつか報告された。さらにその発生機序について、

動物実験による検討もなされている。

これらはいずれもその機序や、影響の大きさが完全に解明されたわけではないが、少なくとも ART に関与する産婦人科の医師としては知っておくべき知識である。そこで本項では、ICSI と染色体異常、およびインプリンティング異常による疾患発生の二つについて、最近の新知見を整理し、臨床と関連づけて解説する。

ICSI と染色体異常

ICSI を世界ではじめて成功させたベルギーのグループはすでに 1996 年に、ICSI 由来胎児 877 例の出生前診断の結果、1%(5 例)に de-novo の性染色体異常が見られ、これは自然妊娠における de-novo 染色体異常推定発生率に比較して約 5 倍高率であると報告している¹⁾。この報告から 10 年経って、最近のアメリカ不妊学会の委員会報告でも、ICSI 由来児において体外受精児に比較して性染色体異常の発生率が高い(0.8%~1.0% vs. 0.2%)ことを結論づけている²⁾。

このように ICSI 由来児に性染色体異常児が増加する機序について、最近 10 年間の不妊患者の体細胞および精子染色体検査の解析結果、および新しい遺伝学的研究手法によって、興味ある事実が蓄積されつつある。

1) 男性不妊患者の染色体異常および精子染色体異常

男性不妊において、男性患者自身が染色体異

常をもっている頻度はそれほど高くないが、吉田らの報告では6%程度といわれている³⁾。ただ、通常出生児の1/500にしかみられないKlinefelter症候群は、非閉塞性無精子症患者の実に14%にみられ⁴⁾、これらの患者では精巣内でのdisomic spermの割合も増加しており、当然子どもにXXYやXXXなどの性染色体異常を引き起こす可能性がある。

一方体細胞(末梢血リンパ球)に染色体異常が存在しない男性不妊患者の中に、生殖細胞系列に染色体異常が高頻度に出現する症例が存在することがFISH法による精子染色体検査の結果明らかになってきており⁵⁾、これらの患者の精子を用いてICSIを施行すると子どもの染色体異常が増加する危険性が明らかになってきた。これらの染色体異常精子の割合は重症の男性不妊(oligo-astheno-teratozoospermia)や、無精子症のためにTESEで精巣から回収した精子で高率である^{6,7)}。

男性不妊患者に性染色体異常精子が増える機序は長い間不明であったが、最近減数第一分裂前期の細胞を染色することによって、減数分裂機構そのものの異常を検出しようという試みが行われている。この手法では、染色体組み替えの結果生じるキアスマを形成した対合2価染色体を、対合構造およびキアスマに特異的なタンパク質に対する抗体を用いて染色・可視化する。その結果重症男性不妊患者(その多くは閉塞性無精子症)において、全染色体にみられるキアスマ総数減少、キアスマを一カ所も持たない染色体の増加、および対合した染色体の解離などの異常(図1)が正常より有意に増加しており⁸⁾、またこれらの異常所見の発現頻度とXY disomic spermの出現頻度が相関するとの報告がある⁹⁾。

とくに高度の乏精子症患者にICSIを行う場合、とくに出生児に性染色体異常が発生するリスクが高くなる説明の必要性が、羊水検査の施行を含めて、あらためて見直されている。

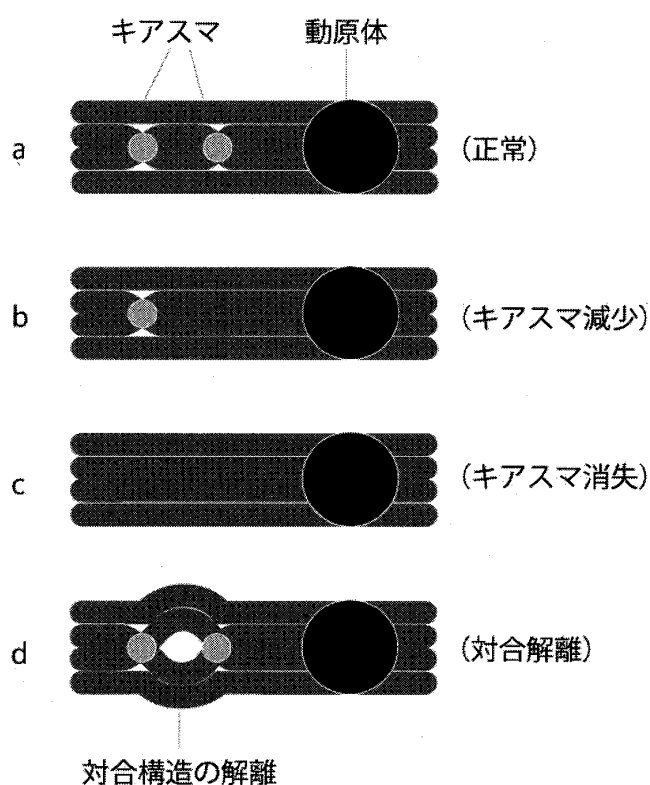


図1 2価染色体構造の可視化

a. 正常の2価染色体。動原体と、2個のキアスマが見られる。 b. キアスマが1個に減少。 c. キアスマの消失。 d. 対合した染色体の一部が解離している。

2) AZFによる男性不妊の伝播

Y染色体長腕(Yq11)に存在するAZF(Azoospermic factor)領域の微小欠損(その多くはde-novoの異常である)は、従来より無精子症を中心とする重症男性不妊との関係が報告されてきた。AZF領域にはRBMVやDAZなど、欠失により無精子症をきたすといわれる遺伝子が存在するが、現在ではAZF領域において、欠失により無精子症や男性不妊をきたす領域はより広範囲にわたることが知られている。この領域が欠失している場合、その染色体異常は男児に100%遺伝することになる。

最近のFerlinによる総説では、彼らの行った男性不妊患者3,073例の染色体およびAZF領域の遺伝子解析の結果に基づき、いくつかの提言を行っている¹⁰⁾。まず、精子濃度500万/mL

以上の症例では1例もAZF欠失例がみられなかったことから、精液濃度がこれ以下の症例にAZF領域の解析を行う臨床的意義があるといっている。その臨床的意義は第一に、不必要な医学的介入、たとえば乏精子症に対する精索静脈瘤手術などを回避することが可能であること、第二に、AZF欠失症例では年齢とともに精液所見が悪化(高度の乏精子症から無精子症へ)する例があることから、AZF欠失男性不妊患者での早めの精子凍結保存をすすめたり、AZF欠失男性患者からICSIによって出生した男児に対し、成人になったらできるだけ早く精子凍結保存をすすめるようアドバイスすることができることであるという。

さらに彼らは同じ論文の中で、AZF領域の微小欠失ではXY disomyあるいは性染色体の完全な欠失を示す精子の割合が増加すると報告しており、これらの患者の精子を用いたICSI治療によって父親と同じ男性不妊ばかりでなく、XXYやXOといった性染色体異常も増加させる危険性があるとのべている。

3) 女性側の染色体異常による受精障害

Gekasらは、男性不妊や体外受精における受精障害によってICSIを必要とした夫婦の大規模な染色体検査の解析から、男性患者の6.1%だけでなく、女性患者の4.8%にもさまざまな染色体構造異常があったと報告している¹¹⁾。女性の構造異常の内訳は、妊孕性には一般に関係ないといわれている低頻度モザイクを含む性染色体異常を除いても、2%(21/1,012)にみられ、またこの中には男性配偶者には染色体にも、精液性状にも全く異常が見られない症例が存在することから、女性側の常染色体構造異常によって受精障害を起こす症例があることを主張している。

彼らはまた、性染色体数異常の低頻度モザイク症例(45,X/46,XXなど)についても、この集団で見つかった女性染色体異常の半数以上を占めていることから(28/49)、受精障害との関

連を否定できないと述べている。最近のreviewでも、ICSIや体外受精を必要とした女性患者の性染色体異常が高頻度にみられ、またそれ以外に逆位や均衡型の転座症例も多数みられることが報告されており¹²⁾、女性側の染色体異常の不妊や受精障害への影響は再評価する必要がある。

とくに男性側に異常のない受精障害に対してICSIを行い、反復不成功となった症例に対しては、妻の染色体異常の可能性を考慮する必要がある。今後議論される可能性がある。

インプリンティング(Genomic imprinting)とART

インプリンティングとは、父親・母親から受け継いだ2本の染色体上にある対立遺伝子のうち、片方だけが発現する現象をいう。通常、両親から受け継いだ1対の遺伝子は、両方ともが発現するか、または両方ともが発現しないかのどちらかになるが、インプリンティングを受けた遺伝子の発現様式は、このメンデルの遺伝の原則に従わない。このようなインプリンティングをうける遺伝子はそれほど多くなく、現在までに約80種類報告されているだけであるが¹³⁾、その多くは胎盤形成や発生に重要であり、その異常は先天性疾患や成人病、あるいは癌発症にも関わっている。

刷り込みを起こす代表的機構として、遺伝子発現調節領域のDNAメチル化がよく知られており、これによって遺伝子、あるいはタンパクをコードしないが他の遺伝子発現を調節するRNAの発現抑制により、DNA配列を変えることなくタンパク合成をオンにしたり、オフにしたりすることができる(図2)。刷り込み遺伝子を調節する部位のメチル化状態は、DNA複製(すなわち細胞分裂)を経ても維持されるが、メチル化状態はDNA塩基配列ほど強固なものではなく環境などさまざまな影響を受けて変化するため、排卵誘発や初期胚の体外培養条件に

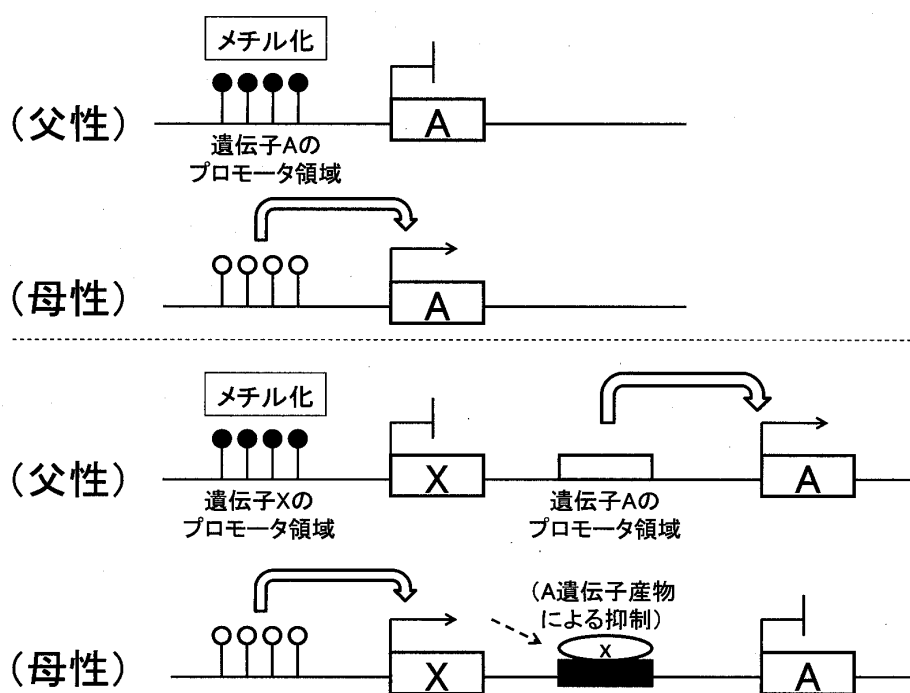


図2 DNAメチル化による遺伝子発現調節の模式図

(上段) メチル化により遺伝子発現が抑制される例. 父性染色体上で遺伝子 A のプロモータ領域がメチル化されることにより, 遺伝子 A が転写されなくなる. この領域がメチル化されない母性染色体上では, A 遺伝子産物が発現する.

(下段) メチル化により遺伝子発現が促進される例. 父性染色体上で遺伝子 X のプロモータ領域がメチル化されることにより発現しなくなる. 遺伝子 A のプロモータを抑制する X 遺伝子産物が発現しなくなることによって, 遺伝子産物 A が発現するようになる. 遺伝子 X のプロモータ領域がメチル化されていない母性染色体上では, X 遺伝子産物が A 遺伝子産物の発現を抑制している.

よってこれが変化して疾患を起こすことが懸念される.

とくに ART とインプリンティング異常の関連が議論された背景には, 動物胚の体外培養によって, 胚移植後に子宮内での過剰胎児発育が起こり, 出生した産仔の死亡率や疾病罹患率が高くなる, いわゆる Large Offspring syndrome (以下 LOS) の増加が報告されたことがある¹⁴⁾. LOS を起こした産仔では刷り込み遺伝子である IGF-2R の発現低下と, この遺伝子の発現調節部位のメチル化の消失が見られた¹⁵⁾. このメチル化異常は, 動物における排卵誘発, あるいは体外培養に由来すると推測され, 同様の操作を行うヒトの ART でもメチル化異常による刷り込み遺伝子関連疾患の発生頻度増加が

懸念された.

1) 配偶子発生・初期発生と刷り込み～人為的介入による刷り込み異常の発生機序

インプリンティング異常が ART 治療において, どの段階で起きうるかについては, さまざまな説がある.

排卵誘発については, PMSG で過排卵処理したマウスと, 処理をしていないマウスで, 採取された卵子 DNA のメチル化パターンに差があることが報告されている¹⁶⁾. この報告ではメチル化の差が本当に刷り込み部位に起こっているかどうかは検討されていないが, 最近佐藤らは, ヒトおよびマウス卵で, 過排卵によってインプリンティング遺伝子のメチル化異常が増加する可能性を報告している¹⁷⁾.

また乏精子症患者の精子において刷り込みの異常が増えるという意見がある¹⁸⁾。Marquesらは乏精子症患者や、刷り込み異常をもつ男性の精子において、H19やMESTなどを支配する領域のDNAメチル化が変化していることを報告している¹⁹⁾。乏精子症患者での刷り込み遺伝子の異常による疾病が増加するかどうかはこれから検討が必要であるが、Silver-Russell症候群など、不妊を呈する疾患をARTで治療した際に、子どもに刷り込み異常が伝播するという報告もあり、その機序の説明としてもこの報告は重要であろう。

2) ARTで発生頻度が増加する可能性のあるインプリンティング異常による疾患

a) Beckwith-Wiedemann 症候群(BWS)

BWSは、過成長、巨舌、臍帯ヘルニアを三主徴とする症候群であり、そのほかに新生児期低血糖、耳垂の線状溝、腹腔内臓器腫大、腎奇形、片側肥大、口蓋裂などの症状を呈し、約10%の患児にWilms腫瘍、肝芽腫、横紋筋肉腫などの胎児性腫瘍が発生する。この疾患では新生児期に最も徴候が顕著で、成長とともに症状が軽快する。

BWSのほとんどは孤発例で、家族例は15%程度で常染色体優性遺伝形式をとり、その場合母由来の異常が子に受け継がれた時のみ発症する。その責任遺伝子座は11p15.5領域で、IGF2など成長関連遺伝子の過剰発現が原因と考えられている。BWSでも他のインプリンティング異常による疾患と同じく、染色体構造異常を含むさまざまな病因が存在するが、インプリンティング異常による症例が3~5割に達する²⁰⁾。

生殖補助医療によって生まれた子において、この疾患の頻度が高くなるという報告がある²¹⁾。この報告では、米国での通常妊娠におけるBWS発生頻度は0.8%であるが、ARTの場合はその約6倍、4.6%と有意に高く、ARTで生まれたBWS患者では、7例中5例に母由来

KvDMR1のメチル化喪失、母由来H19-DMRの高メチル化などの異常があり、ARTに関連する手技がimprinting control region(ICR)のメチル化に影響を及ぼすことが推測されている。

b) Angelman 症候群(AS)

ASは、精神発達遅滞、てんかん、失調歩行、容易に引き起こされる笑いなどを主徴とする疾患である。責任遺伝子座は15番染色体15q11-q13の領域で、SNRPNやUBE3Aといった遺伝子が含まれる。

2002年、CoxらはICSIで生まれたAS2例を、またOrstavikらはやはりICSIで生まれた1例を報告し、いずれもSNRPN遺伝子のICRが低メチル化となっており、インプリンティング異常であることを確認している。

c) 網膜芽細胞腫やその他の小児癌

網膜芽細胞腫では13番染色体q14にあるRB1遺伝子の変異が認められるが、この片側性症例の中にはインプリンティング異常による症例も認められる。Mollらは、体外受精で生まれた網膜芽細胞腫の5例を報告し、ARTでリスクが高くなる可能性を指摘している²²⁾が、これを否定するデータも多い。

d) 成人病との関係

高血圧や糖尿病は、生活習慣以上に出生児体重の影響が大きく、出生児体重が低くて早くcatch upする場合に最も発症のリスクが高いことがいわれている。20年以上前、Barkerらは、成人病は胎児期にその原因を求めることができるという仮説を唱えたが、これをインプリンティング現象で説明するとすれば、胎児期に低栄養にさらされると、飢餓状態の体内環境で生き抜くために胎児は細胞代謝応答系に関わる遺伝子をepigeneticに変化させ、この変化は出生後栄養状態が改善しても一生続くために過剰栄養暴露により成人病を発症しやすくなる、となる²³⁾。成人病発生については、最年長で30代前半のART出生児はこれからその年代に差し掛かるわけで現在はデータがないが、これら

生活習慣病を含めた ART 児の成人期・老年期に至る長長期 followup は早晚必要になることが予想される。またインプリンティング異常は細胞のガン化にも大きな関係があり、成人期の癌の発生については今後の調査が必要である。

3) ART とインプリンティング異常疾患に関する大規模調査の解析結果

2005 年から 2007 年にかけて、デンマーク・イギリス・オランダにおいて、ART が本当にインプリント異常を増加させるかどうかを検討する大規模調査が次々に行われた。デンマークでは 1995 年以降、2001 年までの全国民の疾病罹患記録をもとにして ART 出生児 6,052 例と非 ART 出生児 442,349 例の 4 年間の長期予後調査を比較して、BWS、AS などの発症は 1 例もなく、ART はインプリンティング疾患を増加させないと結論している²⁴⁾。イギリスの報告では、登録された 213 例の BWS、384 例の AS、522 例の PWD、および 38 例の新生児一過性低血糖症例について患者へ ART を利用したかどうかについてのアンケート調査を行い、BWS と AS については ART との関連が考えられたが、他については関連が認められなかったという²⁵⁾。さらに、最新のオランダの報告では BWS、AS、PWS などについてイギリスの報告と同様、ART を利用したかどうかを患者にアンケート調査し、不妊ということとこれらの疾患の発症が関連することが示唆された一方で、それを除いて考えるとこれらインプリント異常疾患が ART 手技そのもので増加するという結論は導けないと述べている²⁶⁾。

このように大規模調査の結果からは、これまでのところヒトにおいて ART 手技によりインプリンティング異常が増加することを積極的に示唆する報告はない。しかし、これらの疾患はいずれも発生率が非常に低いために、症例がさらに加えられれば危険性が再確認されることもありうる。さらに、成人病や発ガンなど、今後 ART 出生児に高頻度に起きてくる疾患がない

とは言い切れない。これらの疾患発生には人種差がある可能性は十分あり、我が国における ART 児の followup 体制整備が強く望まれる。

文 献

1. Bonduelle M, Wilikens A, Buysse A, Van Assche E, Wisanto A, Devroey P, Van Steirteghem AC, Liebaers I. Prospective follow-up study of 877 children born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI), with ejaculated epididymal and testicular spermatozoa and after replacement of cryopreserved embryos obtained after ICSI. *Hum Reprod* 1996 Dec;11 Suppl 4:131—155(Review)
2. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine; Practice Committee of Society for Assisted Reproductive Technology. Genetic considerations related to intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Fertil Steril* 2008 Nov;90 S182—S184 Review
3. Yoshida A, Miura K, Shirai M. Cytogenetic survey of 1,007 infertile males. *Urol Int* 1997; 58: 166—176
4. Rao MM, Rao DM. Cytogenetic studies in primary infertility. *Fertil Steril* 1977 Feb; 28: 209—210
5. Moosani N, Pattinson HA, Carter MD, Cox DM, Rademaker AW, Martin RH. Chromosomal analysis of sperm from men with idiopathic infertility using sperm karyotyping and fluorescence in situ hybridization. *Fertil Steril* 1995 Oct; 64: 811—817
6. Martin RH, Rademaker AW, Greene C, Ko E, Hoang T, Barclay L, Chernos J. A comparison of the frequency of sperm chromosome abnormalities in men with mild, moderate, and severe oligozoospermia. *Biol Reprod* 2003 Aug; 69: 535—539
7. Palermo GD, Colombero LT, Hariprashad JJ, Schlegel PN, Rosenwaks Z. Chromosome analysis of epididymal and testicular sperm in azoospermic patients undergoing ICSI. *Hum Reprod* 2002 Mar; 17: 570—575
8. Sun F, Turek P, Greene C, Ko E, Rademaker A, Martin RH. Abnormal progres-

- sion through meiosis in men with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2007 Mar; 87: 565—571
9. *Ferguson KA, Wong EC, Chow V, Nigro M, Ma S.* Abnormal meiotic recombination in infertile men and its association with sperm aneuploidy. *Hum Mol Genet* 2007 Dec 1; 16: 2870—2879
 10. *Ferlin A, Arredi B, Speltra E, Cazzadore C, Selice R, Garolla A, Lenzi A, Foresta C.* Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: a 10-year experience in Italy. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 762—770
 11. *Gekas J, Thepot F, Turleau C, Siffroi JP, Dadoune JP, Briault S, Rio M, Bourouillou G, Carré-Pigeon F, Wasels R, Benzacken B; Association des Cytogeneticiens de Langue Francaise.* Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ICSI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men. *Hum Reprod* 2001 Jan; 16: 82—90
 12. *Mau-Holzmann UA.* Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenet Genome Res* 2005; 111: 317—336 Review
 13. *Lewis A, Reik W.* How imprinting centres work. *Cytogenet Genome Res* 2006; 113: 81—89 Review
 14. *Young LE, Sinclair KD, Wilmut I.* Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod* 1998 Sep; 3: 155—163 Review
 15. *Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, Butterwith SC, Gutierrez CG, Carolan C, Broadbent PJ, Robinson JJ, Wilmut I, Sinclair KD.* Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet* 2001 Feb; 27: 153—154
 16. *Shi W, Haaf T.* Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure. *Mol Reprod Dev* 2002 Nov; 63: 329—334
 17. *Sato A, Otsu E, Negishi H, Utsunomiya T, Arima T.* Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes. *Hum Reprod* 2007 Jan; 22 (1): 26—35
 18. *Filipponi D, Feil R.* Perturbation of genomic imprinting in oligozoospermia. *Epigenetics* 2009 Jan; 4: 27—30 Review
 19. *Marques CJ, Costa P, Vaz B, Carvalho F, Fernandes S, Barros A, Sousa M.* Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Mol Hum Reprod* 2008 Feb; 14: 67—74
 20. *Sasaki K, Soejima H, Higashimoto K, Yatsuki H, Ohashi H, Yakabe S, Joh K, Niiikawa N, Mukai T.* Japanese and North American/European patients with Beckwith-Wiedemann syndrome have different frequencies of some epigenetic and genetic alterations. *Eur J Hum Genet* 2007 Dec; 15: 1205—1210
 21. *DeBaun MR, Niemitz EL, Feinberg AP.* Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet* 2003 Jan; 72: 156—160
 22. *Moll AC, Imhof SM, Cruysberg JR, Schouten-van Meeteren AY, Boers M, van Leeuwen FE.* Incidence of retinoblastoma in children born after in-vitro fertilisation. *Lancet* 2003 Jan 25; 361: 309—310
 23. *Barker DJ.* The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* 2007 May; 261 (5): 412—417 Review
 24. *Lidegaard O, Pinborg A, Andersen AN.* Imprinting diseases and IVF: Danish National IVF cohort study. *Hum Reprod* 2005 Apr; 20: 950—954
 25. *Sutcliffe AG, Peters CJ, Bowdin S, Temple K, Reardon W, Wilson L, Clayton-Smith J, Brueton LA, Bannister W, Maher ER.* Assisted reproductive therapies and imprinting disorders—a preliminary British survey. *Hum Reprod* 2006 Apr; 21: 1009—1011
 26. *Doornbos ME, Maas SM, McDonnell J, Vermeiden JP, Hennekam RC.* Infertility, assisted reproduction technologies and imprinting disturbances: a Dutch study. *Hum Reprod* 2007 Sep; 22: 2476—2480

ART and genetics

Naoaki KUJI

Department of OB/GYN, Keio University School of Medicine

Key words : Assisted Reproductive Technology · Male Infertility · ICSI · Chromosome anomaly · Genomic imprinting

索引語 : 生殖補助医療, 男性不妊, ICSI, 染色体異常, インプリンティング
