

## 4-2-9 周産期病態研究部（合併症妊娠管理研究室、胎児発育研究室）

### 1. 研究体制

秦健一郎（部長）、中林一彦（合併症妊娠管理室長）、に加え、流動研究員佐々木杏佳が参加した。深見真紀（胎児発育研究室長）の活動状況と業績は、小児思春期発育研究部の頁の記載を参照されたい。

### 2. 研究内容

#### 2.1 異常妊娠の病因と病態解明に関する研究

下記の異常妊娠の研究を行うために、課題名「子宮内胎児発育異常の遺伝子・ゲノム解析」を国立成育医療センター倫理委員会に申請し、平成19年7月に承認を得た（承認番号234）

##### 2.1.1 習慣流産の発生機序に関する分子遺伝学的研究

流産や胎児発育遅延等の異常妊娠は、染色体異常を含む様々な母体因子、胎児因子の異常により起こり得る事が知られている。しかし、従来の解析手技では明らかな病因を同定できない症例が稀ではない。染色体構造異常の一つであるUPD (uniparental disomy) は、マウスモデルの解析から流産や胎児・胎盤発育異常の原因となる事が明らかになっており、ヒトでも同様の異常が起こり得ると予測される。実際に、UPD を伴うゲノムインプリンティング異常症候群は、胎盤や胎児発育に異常を来す。また、DNAメチル化やX染色体不活性化などのエピゲノム因子に異常があるモデルマウスは、trophoblast cell の分化異常、胎盤の形成不全を伴い、不妊や胎児発育異常を呈する。加えて、インプリンティング遺伝子の発現異常モデルマウスは、胎盤形成不全や、妊娠高血圧症候群様の表現型を呈することが知られている。

このように、エピゲノム因子は胎盤の分化・発生と付随する周産期病態に深く関わっていると考えられるが、ヒト異常妊娠症例での系統的網羅的な解析は行われるに至っていない。

そこで、DNAマイクロアレイの技術を用いたデジタルカリオタイピングを、東京大学医学部小川誠司准教授との共同研究で開始した。また、DNAメチル化に注目したエピゲノム異常解析を行い、ヒト発生異常の新たな病因・病態を解明することを目的とした解析を行うために、ヒトの既知DNAメチル化領域約30カ所を網羅的に解析する系を立ち上げた。

##### 2.1.2 子宮内胎児発育遅延に関する分子遺伝学的研究

子宮内胎児発育遅延は、高い周産期死亡率を呈すると共に、生児を得た場合でもしばしば合併症や後遺症に対する長期医療介入が必要とされ、成育医療上重要な疾患である。およそ半数は孤発例とされ、成因が解明されていない為、確立された治療方針は無く、医療資源の適正配置という観点からも常に周産期管理法に苦慮する疾患である。近年の医学・生物学的知見より、生殖細胞・受精から出産に至るまで、胎児と胎盤の正常な発育に関わる様々な因子が同定されつつあるが、実際の疾患との関連は不明なものが多い。また、多くの症例で、既存の細胞遺伝学的検査では異常が同定されない。子宮内胎児発育遅延には、従来の細胞遺伝学的な解析では同定できない微細な染色体構造異常が存在すると予想される。

我々を含む複数の研究グループが作成したDNAメチル化異常マウスの解析により、生殖細胞・胎児・胎盤の発生と分化のポテンシャルにエピジェネティクス機構が深く関与していることが明らかとなった。また、エピゲノム異常は胎児発育異常や胎盤形成異常の病因・病態となり得ることが推測されるが、ヒト症例での詳細は解析されていない。

そこで、子宮内胎児発育遅延を呈する症例を対象に、(1)胎盤と臍帯血のゲノムDNAを用いて網羅的なメチル化解析を行い、(2)同定された異常領域の遺伝子発現異常の有無を解析し、(3)微細な染色体構造異常の有無を検討し、(4)臨床像および胎盤の病理学的解析結果との対比を行えば、子宮内胎児発育遅延を惹起するエピゲノム異常因子の抽出と、臨床経過や病理診断結果との相関を検討す

ることができると考えられる。

現在、当センター病院周産期診療部をはじめ、複数の外部病院および研究期間と協力し、子宮内胎児発育遅延のエピゲノム解析を行うための検体収集を進めている。小数集まった検体を用いた予備的解析を既に行い、検体収集法・核酸精製法に解析上の問題点が無いことを既に確認している。

## 2.2 胎盤の発生と分化に関する研究

### 2.2.1 DNA メチル化異常を呈する胎盤分化異常の解析

我々の作成した DNA メチル化異常モデルマウスは、全例妊娠中期に致死であった。これらの胎盤を病理学的に解析すると、ラビリンス層（母体胎児間のガス・栄養交換に必須の領域）の形成が著しく障害されており、妊娠が維持されない直接の要因であると考えられた。異常初期胚から樹立した trophoblast stem cell を用い、in vitro で分化実験を行うと、ラビリンス層を構成する spongiotrophoblast への分化が不良であり、分化に必須であることが知られている遺伝子やインプリンティング遺伝子の発現に異常が認められた。

現在これらの知見を元に、胎盤分化を制御するエピゲノム機構の解析を進めている。フランス国立科学研究センター・モンペリエ大学の Robert Feil 教授、Philippe Arnaud 研究員と共に、胎盤分化異常モデルマウスを用いた国際共同研究を行っている。

## 2.3 生殖細胞の発生と分化に関する研究

### 2.3.1 正常な胎児発育に必須の配偶子分化（配偶子性差）の研究

精子核に似たエピジノタイプの卵子を用いると、卵子2個からマウス個体を発生させる事が可能である。この結果から、DNAメチル化パターンは配偶子核の雌雄差を規定する主因の一つであることが示された。DNAメチル化酵素関連因子 *Dnmt3L* は、上述の配偶子DNAメチル化パターンの雌雄差形成に必須であることが明らかになった唯一の因子であるが、同遺伝子のみでは制御機構の説明が困難であり、未知因子と複合体を形成して作用する事が予想される。本研究は、性染色体に依存しない配偶子の性差を規定するエピゲノム分子機構を、特に *Dnmt3L* と相互作用する因子に着目し、メチル化パターン形成制御機構の観点から明らかにすることを目的とした。

上述のように、*Dnmt3L* タンパク質と相互作用する候補因子（機能未知の新規遺伝子のため、以下候補 A と記す）を同定した。In vitro でこれらの因子を用いて配偶子の DNA メチル化パターン雌雄差形成を再現する事が不可能なため、候補 A 機能解析を目的に、まず先行して遺伝学的解析（ターゲットマウスの作成）を現在準備している。並行して、候補 A タンパク質の機能を、特に *Dnmt3L* との相互作用能の観点から、哺乳類培養細胞を用いた強制発現系で解析中である。強制発現系では、他種とのパイオインフォマティクな比較解析を利用して様々な欠失変異体を作成し、相互作用に必須の領域やアミノ酸の同定を試みている。

### 2.3.2 精子形成異常の分子生物学的研究

本研究では、*Dnmt3L* 変異マウスが、臓器幹細胞である精原細胞を生後の生殖細胞分化過程で失うことに着目し、DNA メチル化を中心に、生殖幹細胞を特徴付けるエピジェネティクス機構を明らかにすることを目的とした。変異生殖細胞ゲノム DNA を用いた DNA メチル化解析により、変異マウスの卵子とは異なり、オス変異生殖細胞では、一部正常な DNA メチル化状態を呈するインプリンティング遺伝子も存在した。しかし、DNA マイクロアレイ解析により、変異マウス精巣では、レトロトランスポゾンのひとつである IAP の発現量が上昇しており、実際に同領域が低 DNA メチル化状態であることが確認された。このような表現型は他に類例を見ず、反復配列特異的かつ生殖幹細胞特異的な DNA メチル化制御機構の存在を示すものである。現在これら知見を元に、*Dnmt3L* タンパク質と相互作用する候補因子を同定し、その機能解析を進めている。

### 2.3.3 卵子老化のエピゲノム異常の解析

卵子は加齢の影響を受けやすく、臨床的には老化卵子核移植や提供未受精卵細胞質の移植がすでに試みられている。しかし、全ての老化卵子に有効ではないと共に、子供に両親以外の遺伝情報が混入するという倫理的・医学的問題を避けられず、標準的治療法とはなりえない。老化卵子核やクロ

ーンの体細胞核は、適当な環境下に置かれると失っていた分化能を取り戻すと捉えることができる。その分子機構として、遺伝子配列の変化を伴わないゲノム機能制御機構、すなわちエピジェネティクス機構が寄与していることが諸家の報告から示唆されている。本研究は、卵細胞核機能をエピジェネティックな観点から質的に診断するという独創的かつ先駆的な研究である。本研究の知見に沿って、卵子老化や高齢不妊症の質的診断を行うことにより、遺伝情報を改変せずに卵細胞核機能を修復し、安全で効率的な不妊症治療法への応用が早期に可能となる。

現在、加齢マウス卵子を用い、微量検体からのエピゲノム解析の準備を進めている。

## **2.4. 胎児発生を司るエピジェネティクス機構の研究**

### **2.4.1 染色体ドメインレベルでのゲノムインプリンティング維持機構の解明**

ゲノム刷り込み遺伝子はクラスターを形成することが多いが、そこでの協調的な発現制御機構については未知の部分が多い。疾患の責任領域に相当する刷り込み遺伝子クラスターの解析は疾患機序の解明という観点から重要であり、更に染色体ドメインレベルでの遺伝子発現制御の優れたモデル解析系となりうる。しかし、ヒト検体を用いてこれらの解析を行うには技術的・倫理的に様々な問題があるため、マウスモデルを用いた解析が必須である。我々は、卵子でメチル化される既知領域全てのDNAメチル化が失われているモデルマウス(Dnmt3Lホモ変異雌)を用い、その異常卵子由来胚の解析を行っている。具体的には、DNAメチル化シトシンに対するモノクローナル抗体を用い、DNAメチル化されている領域を免疫沈降後、DNAマイクロアレイシステムを用いて各領域のDNA量を定量する。