

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号：26-13

課題名：「原因不明先天異常・産科異常の総合診断体系の構築」

秦健一郎 (所属施設) 国立成育医療研究センター
(所属・職名) 周産期病態研究部・部長

日本で有数の貴重・希少な症例が集積する当センターの特徴を生かし、原因不明の先天異常あるいは産科異常症例を関連診療科と連携して診断する実用的な総合診断体系を構築するとともに、その有用性を検証することを目的とした。また、これらの症例は成育バイオバンクに寄託し、他の研究者らにも利用可能な状態として合計約500例の試料を収集した。特に、これらの症例に対するゲノム解析とエピゲノム解析体制を確立し、妊娠糖尿病や、病的妊娠状態下における胎児期環境の胎児エピゲノムへの影響の有無を解析した。

1. 研究目的

次世代シーケンサー等の高速かつ大量並列に遺伝子配列を解析できる手法等の進歩により、従来は遺伝子解析の対象とならなかった非症候性の先天異常や産科異常の一部にも、関連遺伝子変異候補が同定されつつある。また、様々な疾患やモデル生物で、環境因子がエピジェネティックな変化を介した特殊な機構で、「遺伝」することが示されているが、特に胎児期の栄養状態は、出生後も長期にわたって個体の健康状態に影響を与え、成人期の生活習慣病等に影響する可能性がある。本研究提案は、当センターの特徴である多彩な周産期症例を生かし、社会医学/周産期医学/基礎医学の研究手法と成果を連携させ、原因不明先天異常・産科異常を統合的・系統的に診断する実用的な総合診断体系を構築し、その有用性を検証することを目的とする。

本年度は特に、網羅的エピゲノム解析(DNAメチル化解析)による不明先天異常・胎児胎盤異常の解析に加え、バイオバンクを利用して収集体制を構築し、慶應義塾大学産婦人科と当センター母性内科との共同研究により、妊娠糖尿病症例の解析を進めた。すなわち、これらの病的妊娠状態(不適切な胎児期環境)が、胎児のエピゲノムに与える影響の有無の解析を開始した。

分担研究者の副島らは特にこれまで、より広範なゲノム領域を検索するための質量分析器を用いたスクリーニング法(MALDI-TOF MS)を用いた定量的マルチローカスDNAメチ

ル化解析法)を新規に確立してきたが、本研究では、研究代表者らのゲノムワイドDNAメチル化解析技術を組み合わせることで、様々な症例に最適化した、より正確・迅速なスクリーニングを進めた。また、これまで主に測定してきたDNAメチル化に加え、また、これらのスクリーニング法に加え、5ヒドロキシメチル化シトシン(5hmC)の解析系も確立した。

以上の研究成果は、学術的成果として論文発表した。また、公的データベースにも解析データを登録した。これらの成果発表・公開を通じ、成育医療の発展に資する情報を発信するこれまでの症例収集を引き続き継続する。

2. 研究組織

研究者	所属施設
秦健一郎	国立成育医療研究センター研究所
副島英伸	佐賀大学医学部

3. 研究成果

最終年度は、症例収集体制の構築と、既に収集している症例の解析を進めた。成育バイオバンクと連携した収集体制の確立に注力し、対照群となる正常妊婦症例を合計約400例収集した。本研究班の3年目より、胎児異常例や母体搬送症例(急速遂娩例)の収集も開始し、周産期センター産科および胎児治療科との連携により進めた。

胎児胎盤発育異常例と、非症候性の先天奇形症例に対しては、網羅的遺伝因子解析とDNAメチル化解析体制をすでに構築し、染色体微細構造異常の有無（通常の染色体検査より高解像度で安価）、既知の病因遺伝子異常の有無、既知のエピゲノム異常の有無を検証し、一部症例については既知遺伝子異常の確定診断を定期的に行い、主治医との症例検討会を行なっている。

本年度は特に、妊娠糖尿病母体より出生した児の網羅的エピゲノム解析を進めた。解析を行うに当たっては、特にエピゲノム多様性を考慮し、あるいは疾患毎に共通のエピゲノム異常分子メカニズム背景を持たない症例群の解析を考慮し、DNAメチル化測定値の外れ値の頻度（「ばらつき具合」の測定）を検証することに昨年度成功したが、この手法を発展応用し、妊娠糖尿病症例の臍帯血の解析を開始した。加えてゲノム全体のDNAメチル化値を網羅的に取得し、疾患群（本研究においては妊娠糖尿病の母体より出生した児を意味する）で対照群（本研究においては75gOGTTを行って正常と判定された群を意味する）と比較して有意にDNAメチル化が変動している領域を検索した。その結果、分担研究報告書に詳細を記載したように、妊娠糖尿病全体と対照群との比較では有意な変化を見いだせなかったが、インスリン投与を受けた妊娠糖尿病群（比較的控制が不良であったと推測される群）を層別化すると、有意差を持つDNAメチル化変化領域が同定できた。

分担研究者の副島らは、ゲノム解析・エピゲノム解析を用いて、間葉性異形成胎盤（placental mesenchymal dysplasia: PMD）の原因遺伝子の同定を試みた。ゲノム解析では原因となるような異常を見いだせなかったが、PMD検体の約60%がandrogenetic/biparental mosaic（ABM mosaic）を示す一方で、40%は正常biparentalを示すことが明らかとなった。正常biparentalを示すPMD検体のインプリントDMRを解析したところ、15カ所のDMRでDNAメチル化異常とインプリント遺伝子の発現異常を認めた。DMRのメチル化異常によるインプリント遺伝子の発現異常がPMDの原因であることが示唆された。一方、低メチル化の原因である脱メチル化は近年、ヒ

ドロキシチル化によりヒドロキシメチル化シトシン(5hmC)ができることが重要であることがわかってきたが、その簡便で正確なスクリーニング法はあまりない。そこで5hmCが β -glucosyltransferaseにより特異的にグルコシル化されることを利用した5hmC定量系の開発を試みた。その結果、複数の症例でインプリントDMRのメチル化異常とインプリント遺伝子の発現異常を見だし、PMDの原因エピゲノム異常の有力な候補領域と考えられた。5hmC定量法に関しては、おそらくサンプル純度の問題によりノイズとなる蛍光発光が無視できないレベルで観察され、UDPを正確に定量することによる簡便な5hmC定量は困難と考えられた。

以上の様に、本研究計画は当初の計画通りに進んでいる。また人材育成の観点からも、当方で行なっている勉強会や症例検討会に、研究に直接かかわっていない主治医などの若い医師にご出席いただいております。引き続き教育体制、情報提供体制のモデルケースとして充実させていきたい。

4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究で行われる試料収集及び解析は全て、関連指針を順守し、説明と同意の下に行われている。個々の具体的な研究内容は、以下の研究計画を申請し、すでに成育倫理委員会によって承認されている。

受付番号 234 胎児発育異常の遺伝子・ゲノム解析

受付番号 408 早産のゲノム疫学研究

受付番号 630 妊娠例における三世代ゲノムのバイオバンク事業

受付番号 699 妊婦の生体試料に含まれる胎児あるいは病原体由来核酸の特異的検出法の確立

（一行分あける）

4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究で行われる試料収集及び解析は全て、関連指針を順守し、説明と同意の下に行われている。個々の具体的な研究内容は、以下の研究計画を申請し、すでに成育倫理委員会によって承認されている。

受付番号 234 胎児発育異常の遺伝子・ゲノム解析

受付番号 408 早産のゲノム疫学研究
受付番号 630 妊娠例における三世代
ゲノムのバイオバンク事業
受付番号 699 妊婦の生体試料に含ま

れる胎児あるいは病原体由来核酸の
特異的検出法の確立
(一行分あける)