

新川詔夫先生 説明資料

第 29 回生命倫理専門調査会 ヒアリング資料
平成 16 年 3 月 30 日

難病や先天性疾患に関する研究におけるヒト受精胚の利用の可能性

新川 詔夫

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科原爆後障害医療研究施設分子医療部門

難病や先天性疾患に関する研究におけるヒト受精胚の利用は以下の可能性が考えられる。

(1) 先天性疾患・難病の原因解明

ヒト致死遺伝子の同定・・・ヒト初期胚における死亡率やその原因は不明だが、ヒトのもつ最大の遺伝的負荷である。受精胚の多くは着床前に淘汰されると考えられる（頻度は不明）。妊娠第 1 三半期でも、ヒト自然流産は全認知妊娠の 15% に起き、その半数は染色体異常であるが残余の原因は不明であり、多くは致死遺伝子が原因かも知れない。このことを確かめるため、実験動物においてみられる致死遺伝子を候補とする研究や受精胚における染色体異常の役割を解明する研究が考えられる。得られる核酸量が微量なため、網羅的解析には手法の break through が必須であるが、RNA に関しては現存の T7-based RNA 増幅法を加味した cDNA マイクロアレイによる網羅的解析は可能である。問題点は、得られる受精胚は正常胚を含み、形態・機能異常の検出は困難なこと、流産個体における調査に比べて非効率なことであろう。

クロマチン病・インプリンティング病の解明・・・最近、生殖補助医療（ART）による受精で imprinting 病である Angelman 症候群や Beckwith-Wiedemann 症候群の子供が産まれた報告がある。ICSI が母性インプリントを改変させた可能性がある。否定的な報告もあるが、ヒト受精胚で検証する必要がある。

一絨毛膜性二卵性キメラ双胎の発生機構・・・同様に、生殖補助医療による着床で、従来 1 卵性双生児に特有と思われていた 1 絨毛膜性 2 卵性双胎が 2003 年だけで日本から 5 例の報告がある。胎盤を共有するため、血液細胞系はキメラである。近接して着床するため（？）に外細胞塊が融合することが原因だと考えられる。あるいは、胚盤胞まで培養することで細胞表面の変化が生じるためかも知れない。この現象を検証することが必要。問題点は、動物実験で可能であり、実験動物で明らかになることを確認するだけでよいのではないだろうか。また、ヒトでは能動的実験は不可能だからである。

(2) 先天性疾患・難病の診断・治療

(1-A) 着床前診断と着床前治療の可能性・・・割愛

(3) エピジェネティクス研究・・・ポストシーケンシング期に至り、ヒト遺伝子発現の調節は大きな研究課題である。その機構の1つが DNA のメチル化やヒストンのアセチル化・メチル化などのエピジェネティクス機構である。受精後、父性ゲノムは能動的に脱メチル化され、母性ゲノムは着床前胚の卵割中に受動的に脱メチル化される。新規のメチル化は胚盤胞の内細胞塊で開始される。重要なのはインプリントはこの間も維持されていることである。このような機構を受精胚で網羅的に解析する必要がある。例えば、(A) ゲノム DNA におけるメチル化確立の網解析、(B) X 不活化機構の研究、(C) 受精卵における親由来クロマチン構造の解析などが想定される。一方、精神遅滞を伴う先天性遺伝疾患における神経系の発生・分化をエピジェネティクスの変化からアプローチすることも可能かもしれない。エピジェネティクスの調節に関与する遺伝子異常によって起きるクロマチン病群 [Immunodeficiency centromeric instability facial anomalies (ICF) 症候群、レット症候群、 α サラセミア精神遅滞症候群 (ATRX)] の原因遺伝子である MeCP2, DNMT3b, ATRX 遺伝子の発現・機能を、初期胚由来初代培養神経細胞を実験系として用い、脳高次機能障害の分子機構を神経細胞におけるエピジェネティクスの変化から解析する。当研究には、初代神経細胞培養、bisulfate 法による DNA メチル化の解析、ChIP 法によるヒストン修飾の解析、RNase protection assay など確立した分子生物学的解析法が利用可能だと思われる。

(4) 外細胞塊、特に栄養膜細胞層を用いる生殖医学研究・・・受精胚の ES 細胞との違いの1つは外細胞塊である。外細胞塊は胎児外組織形成に関わるので、父性遺伝子の同定・解析に利用できる。また、ヒト受精胚における（外細胞塊特異的）発現遺伝子ライブラリーの構築にも利用可能である。他に、栄養膜細胞・合胞体層における遺伝子発現プロファイリング、胎盤形成過程の研究（幹細胞？、人工胎盤の研究？→胎盤機能不全の治療法への応用？）、胎盤（栄養膜細胞層）由来ホルモンの研究、腫瘍研究への応用（栄養膜細胞や侵入性胞状奇胎の侵入増殖性から）、免疫応答研究への応用（栄養膜細胞の異個体間接着・増殖性から）などが考えられる。しかし、これらは実験動物を利用できること、ヒト胚における研究の倫理的制限から、実験動物でえられる知見を確認するだけでよいのではないと思われる。

したがって、難病や先天性疾患に関する研究領域に限って考えると、ヒト受

精胚は、正常胚を含む（発端者集団ではない）ので非効率的・非実際的なこと、研究には多数の受精胚が必要なこと、研究目的の大部分は実験動物で可能なことから、ヒト受精胚を利用する研究は、現時点では実験動物での知見を確認する役割しかもたないであろうし、また積極的にヒト受精胚を作成・利用する必要性に欠けると思われる。

難病や先天性疾患に関する研究における ヒト受精胚の利用の可能性

先天性疾患・難病の原因解明

- ・ ヒト致死遺伝子の同定
- ・ クロマチン病・インプリンティング病の解明
ICSI胚におけるimprinting病 (Angel man症候群、Beckwith-Wiedemann症候群) の増加？
- ・ 一絨毛膜性二卵性キメラ双胎の発生機構

先天性疾患・難病の診断・治療

- ・ 着床前診断
- ・ 着床前治療の可能性

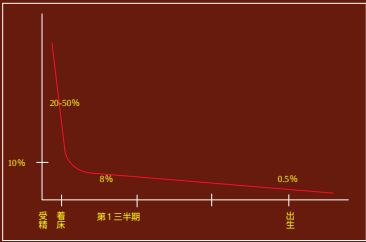
エピジェネティクス研究

- ・ ゲノムDNAにおけるメチル化確立の網羅的解析
- ・ X不活化機構の研究
- ・ 受精卵における親由来クロマチン構造の解析

外細胞塊、特に栄養膜細胞層を用いる生殖医学研究

- ・ 胎児外組織形成に関わる父性遺伝子の同定・解析
- ・ ヒト初期胚における発現遺伝子ライブラリー

ヒト致死遺伝子の同定

背 景	方 法
ヒト初期胚死亡は不明 ヒトのもつ最大の遺伝的負荷 着床前(頻度不明だが高頻度?) ヒト自然流産(全認知妊娠中15%) 自然流産中(50%染色体異常) 残余50%の原因不明 致死遺伝子・染色体異常の役割を解明	動物における致死遺伝子を候補とする解析 T7-based RNA増幅法とcDNAマイクロアレイ による網羅的解析 ゲノムワイドなCGHアレイによる網羅的解析
	問題点 正常胚を含み、形態・機能異常の検出は困難 流産個体における調査に比べて非効率の

クロマチン病・インプリンティング病の解明

ART (ICSI) 胚における Angel man 症候群 および Beckwith-Wiedemann 症候群の増加?

- Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects.
Am J Hum Genet 71:162-164, 2002.

In germ cells and the early embryo, the mammalian genome undergoes widespread epigenetic reprogramming. Animal studies suggest that this process is vulnerable to external factors. We report two children who were conceived by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and who developed Angelman syndrome. Molecular studies, including DNA methylation and microsatellite and quantitative Southern blot analysis, revealed a specific imprinting defect in both patients. We discuss the possibility that ICSI may interfere with the establishment of the maternal imprint in the oocyte or pre-embryo.

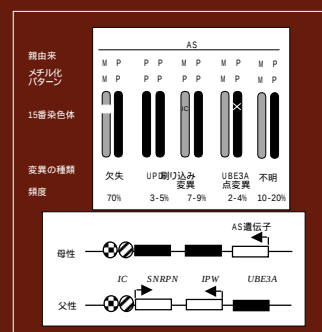
- Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection. J Med Genet 40:62-64, 2003

- Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART).
Am J Hum Genet 72:218-219, 2003

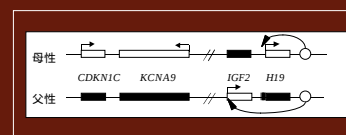
- Study of DNA-methylation patterns at chromosome 15q11-q13 in children born after ICSI reveals no imprinting defects. Mol Hum Reprod 6:1049-1053, 2000.

The introduction of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) has raised concern about safety in terms of a possible increase in the incidence of major congenital malformations, chromosomal aberrations or developmental problems. The possible influence of genetic imprinting on an ICSI procedure has not yet been investigated. We therefore studied the DNA-methylation status at a defined region in chromosome 15q11-q13 in 92 children born after an ICSI procedure. Imprinting defects in this region are associated with neurogenetic disorders, e.g. Angelman syndrome (AS) and Prader-Willi syndrome (PWS). Blood samples were taken directly after birth and stored at -80 degrees C. Genomic DNA purification was performed from 3-7 ml EDTA-blood. Sodium bisulfite treatment was carried out in order to distinguish methylated from unmethylated DNA by transferring the unmethylated nucleic acid cytosine into uracil and leaving the methylated cytosine unchanged. Subsequently, a methylation-specific polymerase chain reaction (M-PCR) was performed. In all 92 children (83 from ICSI with ejaculated spermatozoa and nine from ICSI with non-ejaculated spermatozoa), a regular DNA-methylation pattern was found in the PWS/AS region. In none of the children were clinical symptoms of PWS or AS present. In conclusion, the results of this study do not indicate a higher risk of DNA-methylation defects in children born after ICSI.

Angelman syndrome

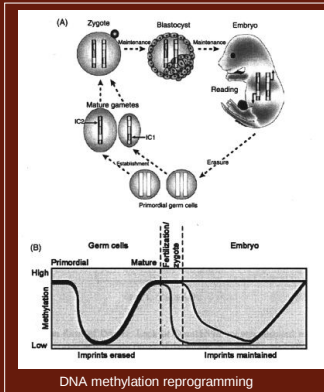


Beckwith-Wiedemann syndrome



クロマチン病・インプリンティング病の解明

ヒトにおけるインプリント獲得・維持・消去の研究



受精後、父性ゲノムは能動的に脱メチル化される。一方、母性ゲノムは着床前胚の卵割中に受動的に脱メチル化される。新規のメチル化は胚細胞の内細胞塊で開始。重要なものはインプリントはこの間も維持されている？

ヒト脳の神経細胞系におけるエpiジェネティック因子の解析と精神発達遅滞

・ 脳高次機能障害を重度精神遅滞を伴う先天性遺伝疾患における神経系の発生・分化をエpiジェネティクスの変化からアプローチする。

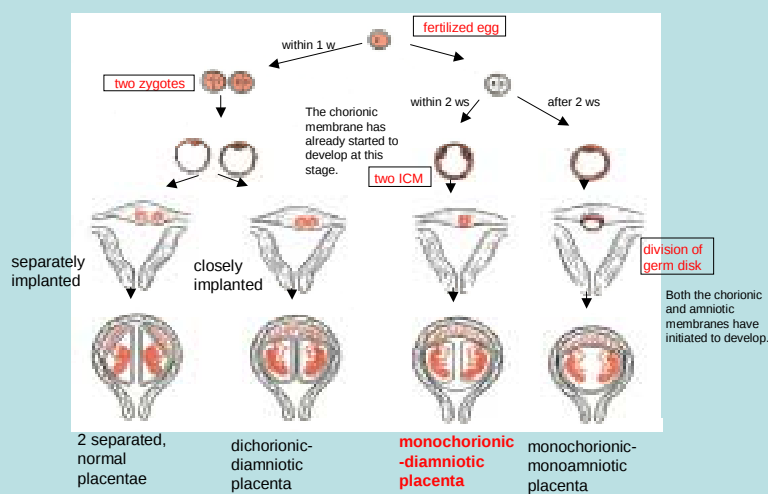
・ エpiジェネティクスの調節に關する遺伝子異常によって起きるクロマチン病群[Immunodeficiency centromeric instability facial anomalies (ICF) 症候群、レット症候群、 α サラセミア精神遅滞症候群(ATRX)]の原因遺伝子であるMeCP2(methyl CpG-binding protein), DNMT3b (DNA methyltransferase), ATRX遺伝子の発現・機能を、初期胚由来初代培養神経細胞を実験系として用い、脳高次機能障害の分子機構を神経細胞におけるエpiジェネティクスの変化から解析。

・ マウス初代神経培養系を用いた解析はAngel man症候群責任遺伝子Ube3aで報告し、培養実験系としてエpiジェネティクスとその調節因子の解析に十分利用できることは確認済み。

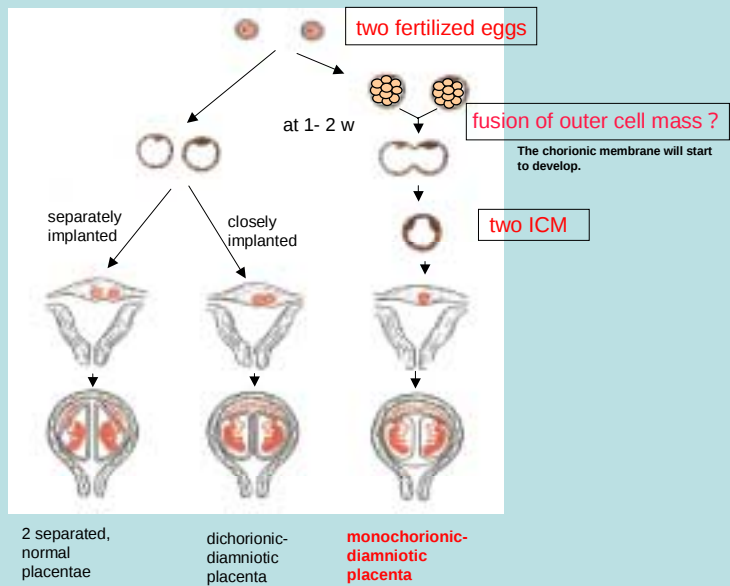
・ 当研究には、初代神経細胞培養、bisulfate法によるDNAメチル化の解析、ChIP法によるヒストン修飾の解析、RNase protection assayなど確立した分子生物学的解析法が利用可能。

一絨毛膜性二卵性双胎の発生機構

Placental development in monozygotic twins



Placental development in dizygotic twins



Six cases of monochorionic dizygotic twins

Cases	ART	Karyotypes	Confirmation of MCM	Confirmation of chimerism	Fetus
1	IVF-ET	chi XX/XY	USG + pathology	Genotyping in leukocytes/skin	Initially triple with a nonviable fetus
2	IVF-ET	chi XX/XY	USG + pathology	Genotyping in leukocytes/skin	A boy and girl with normal external genitalia; anastomosis
3	Superovulation + intrauterine insemination	chi XX/XY	USG + pathology	?	A boy and girl with normal external genitalia
4	TESE-ICSI	chi XX/XY	USG + pathology	Genotyping in leukocytes/skin	Triplet, initially; one reduced; polycythemia in one; anemia in one
5	IVF-ET	chi XX/XY	USG + ?	?	?
6	IVF-ET	chi XX/XY	USG + ?	?	A boy and girl with chimeric ABO blood type

可能性のある原因

- (1) *In utero* implantation of several eggs at close sites
- (2) Simultaneous placing of several eggs into the uterus
- (3) Use of eggs that have developed to the blastocyst stage
(alteration of cell surface?)
- (3) Cell culture procedure that may lead to changes of the nature of cell surface

問題点・困難性

動物実験で可能であり、実験動物で明らかにすることを確認するだけでよいのでは？
ヒトでは能動的実験は不可能

エピジェネティクス研究

- ・ 受精胚におけるゲノムDNAメチル化確立の網羅的解析
- ・ X不活化機構の研究
- ・ 受精卵・受精胚における親由来クロマチン構造の解析

外細胞塊、特に栄養膜細胞・合胞体層を用いる生殖医学研究

栄養膜細胞・合胞体層における遺伝子発現プロファイリング

- ・ ヒト初期胚における発現遺伝子ライブラリー
- ・ 胎児外組織形成に関わる父性遺伝子の同定・解析
- ・ 胎盤形成過程の研究(幹細胞?、父性ゲノム発現?)
→人工胎盤の研究? →胎盤機能不全の治療法への応用?
- ・ 胎盤(栄養膜細胞層)由来ホルモンの研究
- ・ 腫瘍研究への応用(栄養膜細胞や侵入性胞状奇胎の侵入増殖性から)
- ・ 免疫応答研究への応用(栄養膜細胞の異個体間接着・増殖性から)

問題点

- ・ 実験動物で可能
- ・ 実験動物での知見の確認

難病や先天性疾患に関する研究領域では

- ・ ヒト受精胚は、正常胚を含む(発端者集団ではない)ので非効率的・非実際の
- ・ 研究には多数の受精胚が必要
- ・ 研究目的の大部分は実験動物で可能
- ・ 現時点では実験動物での知見を確認する役割しかもたない
- ・ 積極的にヒト受精胚を作成・利用する必要性に欠ける