

# Targeted long-read sequencingを用いた 生殖補助医療のエピ変異によるインプリンティング 疾患発症機序の解明

The effect of assisted reproductive technology for the development of epimutation-mediated imprinting disorders: Analysis using targeted long-read sequencing

慶應義塾大学医学部 小児科学教室 助教 原 香織

## 要 約

インプリンティング疾患 (Imprinting disorders: IDs) は、インプリンティング遺伝子の発現異常によって生じる疾患である。その原因は、メチル化可変領域 (Differentially methylated region: DMR) のメチル化異常によるエピ変異、片親性ダイソミー、DMRを含む欠失や重複、責任遺伝子の点変異に分類される。生殖補助医療 (Assisted reproductive technology: ART) は、配偶子や胚への人為的な操作によりインプリンティング遺伝子における親由来インプリント獲得およびその維持過程に関与することから、ARTのリスクの一つとしてIDs、特にエピ変異によるIDs (epi-IDs) の発症が懸念されてきた。しかしながら、ARTそのものあるいは両親の不妊のどちらかがepi-IDs発症に寄与しているのかは未解明であり、ヒトの卵子や受精卵を対象とした研究は倫理的制約が大きいいため、この分野の研究は十分に進展していなかった。Targeted long-read sequencing (T-LRS) は、解析領域内のCpG部位のメチル化レベルを測定し、親アレル別に評価できる新たな手法である。本研究では、新たに構築したT-LRS解析系を用いて、エピ変異が多いIDsであるSilver-Russell症候群 (ART出生児および非ART出生児各3名) とBeckwith-Wiedemann症候群 (ART出生児および非ART出生児各3名) を対象にT-LRSを実施した。その結果、ART出生児では非ART出生児に比して、ゲノムワイドなメチル化異常が父アレルにも母アレルにも生じている可能性があることを初めて示した。このことから、ART出生児におけるメチル化異常は、受精前の精子や卵子に起因するものではなく、ART過程そのものによって生じている可能性が示唆された。

## 緒 言

インプリンティング疾患 (Imprinting disorders: IDs) は、エピジェネティックなマーキングによって制御されるインプリンティング遺伝子の発現異常によって生じる疾患である。その原因は、メチル化可変領域 (Differentially methylated region: DMR) のメチル化異常によるエピ変異、片親性ダイソミー、DMRを含む欠失や重複、責任遺伝子の点変異に分類される。

生殖補助医療 (Assisted reproductive technology: ART) は、配偶子や胚への人為的な操作により親由来インプリント獲得およびその維持過程に関与することから (図1)、ARTのリスクの一つとしてIDs、特にエピ変異によるIDs (epi-IDs) の発症が懸念さ

れてきた<sup>1</sup>。我々の先行研究では、epi-IDsにおけるART出生児の頻度は、22/132例 (16.1%) であり、一般集団におけるART出生児の頻度 (2021年日本産婦人科学会発表データでは8.6%) の約2倍であった<sup>2,3</sup>。また、エピ変異が多いIDsであるSilver-Russell症候群 (SRS) とBeckwith-Wideman症候群 (BWS) におけるART出生児の頻度は、それぞれ15.6%、25.8%で、一般集団に比して高かった<sup>2,3</sup>。これらの結果から、ARTはepi-IDs発症のリスク因子となり得ることが示唆されたが、ARTそのものあるいは両親の不妊のどちらかがepi-IDs発症に寄与しているかについては未解明であった。

Targeted long-read sequencing (T-LRS) は、解析領域内のCpG部位 (DNAメチル化が起こる遺伝

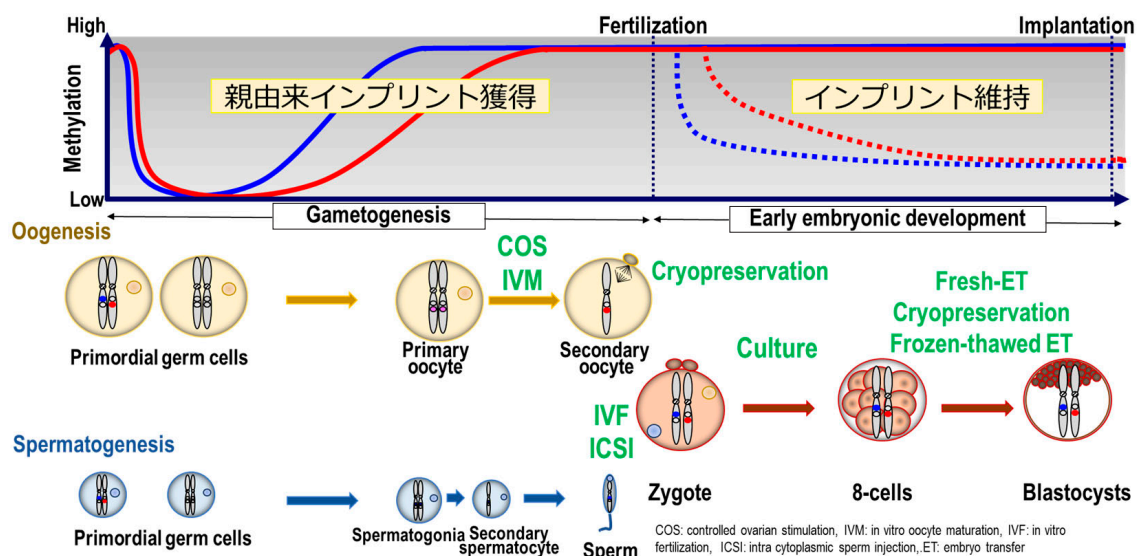


図1 生殖補助医療とGenomic imprinting

上段はGenomic imprintingにおけるメチル化レベルの推移で青線が父由来ゲノム、赤線が母由来ゲノムを示す。下段は卵子、精子、受精卵の成熟過程を示す。

表1 患者背景

SRS	ARTの有無	ART手技	性別	年齢	父の年齢	母の年齢	NH-CSS
Case 1	あり	IVF-ET	M	5	36	35	4
Case 2	あり	FET	M	5	34	37	5
Case 3	あり	IVF-ET	M	1	32	31	5
Case 4	なし		F	11	31	31	5
Case 5	なし		F	4	38	30	6
Case 6	なし		F	3	33	34	5
BWS	ARTの有無	ART手技	性別	年齢	父の年齢	母の年齢	BWS score
Case 1	あり	IVF-ET	M	0	36	34	4
Case 2	あり	IVF-ET	F	1	36	40	5
Case 3	あり	IVF-ET	F	1	38	40	5
Case 4	なし		F	0	39	39	5
Case 5	なし		M	0	40	39	6
Case 6	なし		M	2	36	40	5

NH-CSS, Netchine-Harbisson clinical scoring system: 6項目中4項目以上でSRSと診断。BWS score: 4点以上でBWSと診断。

子調節の主要な部位)のメチル化レベルを測定し、フェージング解析を用いて親アレル別に評価できる新たな手法である。従来のパイロシーケンス法やメチル化アレイを用いた定量的メチル化解析では、アレル別のメチル化解析ができないこと、領域内の特定のCpG部位のメチル化レベルしか測定できないことが課題であった。T-LRSは、これらの課題を克服すると共に、これまで複数の解析手法を組み合わせで行っていたIDsの遺伝学的原因検索を一元的に行うことができる強力なツールとして期待されている。

本研究では、新たに構築したT-LRS解析系により、epi-IDs患者の血液サンプルを用いて、ARTがその発症に及ぼす影響を細胞レベルで解明することを目

的とする。

## 方法

### 対象

エピ変異によるSRS 6例 (ART出生児 (ART-SRS) 3名、非ART出生児 (nonART-SRS) 3名)、BWS 6例 (ART出生児 (ART-BWS) 3名、非ART出生児 (nonART-BWS) 3名)を対象とした。いずれの症例も、MS-MLPA法あるいはpyrosequencing法を用いてエピ変異が遺伝学的原因であることを確認した。患者背景を表1に示す。ART群とnon-ART群で両親の年齢に大きな差異はなく、SRS、BWS共に全例で診断基準を満たしていた。

## サンプル前処理

白血球由来DNAをMonarch HMW DNA Extraction KitまたはGenra Puregene Blood Kitを用いて抽出した。抽出したDNAはg-TUBEにより10-15kBに剪断し、Short Read Eliminator Kitで短鎖断片を除去した。DNA Ligation Sequencing Kit V14 (Oxford Nanopore Technologies)を用いてライブラリを調整し、R10.4.1フローセルを用いてPromethION 2 Soloでシーケンスを行った。なお、シーケンスは既知の78か所のDMRを指定領域として実施した。

## ベースコールとマッピング

塩基配列決定およびCpG部位のメチル化情報はGuppy v6.4.6を用いて取得した。リードはminimap2を用いてGRCh38参照ゲノムにアライメントした。PEPPER-Margin-Deep-Variantを用いてフェージング解析を実施し、Single nucleotide polymorphism (SNP) に基づいてアレルを分類した。

## メチル化レベルの評価

78か所のDMR内のCpG部位(約7000個)におけるメチル化比率(Methylation index (MI):メチル化されたリード数/総リード数)を算出した。続いて、両アレルが共に10リード以上取得できたCpG部位を対象に、MIが既に取得しているcontrolの最大値および最小値を超えたCpG部位(外れ値)を抽出し、その割合を算出した。

既に取得した6例のcontrolにおいて、明瞭かつ安定したアレル特異的メチル化差を示す33か所のcomplete DMR<sup>4</sup>を抽出した。抽出した33か所のDMRを対象に、①両アレルにおけるメチル化レベルの評価、②アレル毎のメチル化レベルの評価を行った。フェージング解析はSNPの違いを利用してアレルを分類するため、解析領域内に分類可能なSNPが存在しない場合には、分類不能(unphase)となってしまう。最終的に、①においては計33か所のDMRを、②においてはSRSの6例、BWSの6例全てで可能であった各8か所のDMRを対象とした。

なお、本研究は国立成育医療研究センター倫理審査委員会の承認を受けている(承認番号:518, 2024-245)。また、本研究への参加にあたっては、すべての対象者またはその保護者から文書によるインフォームド・コンセントを取得している。

## 結果

### 1. 両アレルのメチル化レベルの評価

#### 1-1. 疾患責任DMRのメチル化レベル

SRSの疾患責任DMRである*HI9/IGF2:IG*-DMRでは、ART群でもnon-ART群でもほとんどのCpG部位が低メチル化の外れ値を示した。同様に、BWSの疾患責任DMRである*KCNQ1OT1:TSS*-DMRにおいても、ほぼ全てのCpG部位が低メチル化の外れ値を示した。

#### 1-2. その他のDMRにおける外れ値の割合

疾患責任DMR以外の32か所のDMRにおける外れ値の割合を図3に示す。SRSでは、ART群とnon-ART群における外れ値の割合に差異はなかった(図2A)。一方、BWSでは、ART群でnon-ART群に比して外れ値の割合が多かった(図2B)。

### 2. アレル毎のメチル化レベルの評価

#### 2-1. フェージングが可能であったDMRにおける外れ値の割合

アレル毎に評価すると、ART-SRSではnonART-SRSに比して外れ値の割合が多く、外れ値は父アレルにも母アレルにも存在していた(図2C)。一方、アレル毎に評価すると、ART-BWSとnonART-BWSにおける外れ値の割合に差異はなかった。しかしながら、両アレルの評価において外れ値の割合が多かった2つのDMR(*IGF1R: Int2*-DMR, *GNAS-A/B:TSS*-DMR)に着目すると、外れ値は父アレルにも母アレルにも存在していた(図2D)。

#### 2-2. ART群で外れ値が多かったDMRのメチル化レベル

ART-SRSで外れ値が多かった*L3MBTL1:alt-TSS*-DMRの結果を図3A, Bに示す。両アレルで評価すると、ART群とnonART群における外れ値の割合に大きな差異はなかった(図3A)。アレル別に評価すると、ART-SRS(case 1-3)で外れ値が多く、外れ値は父アレルにも母アレルにも存在していた(図3B)。

ART-BWSで外れ値が多かった*GNAS-A/B:TSS*-DMRの結果を図3C, Dに示す。両アレルで評価すると、ART-BWSのcase 2, 3で外れ値が多かった(図3C)。アレル別に評価すると、ART-BWSのcase 1, 2で外れ値が多く、外れ値は父アレルにも母アレルにも存在していた(図3D)。

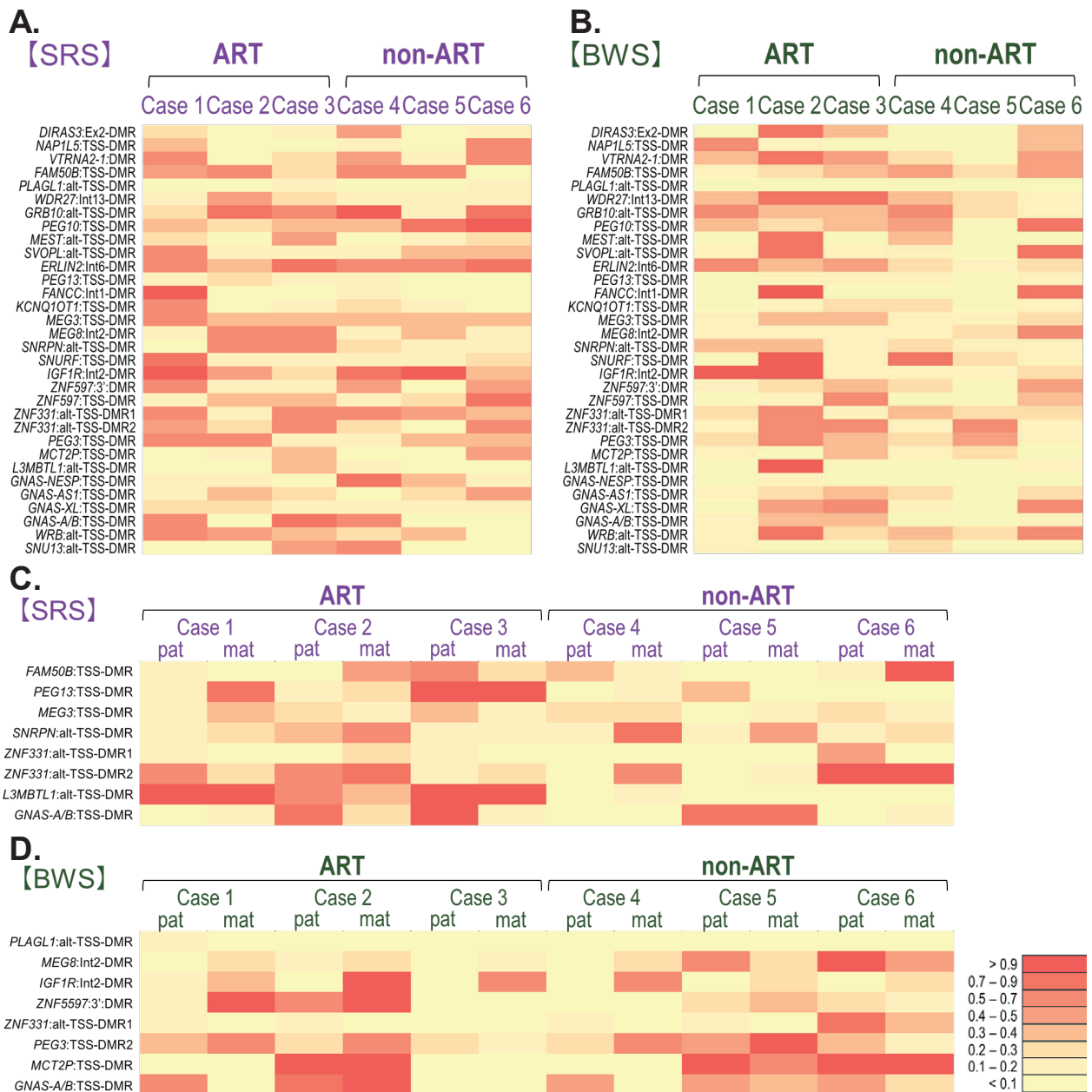


図2 各DMRにおける外れ値の割合

A, Bは両アレルにおける評価、C, Dはアレル毎の評価を示す。pat, 父アレル、mat, 母アレル。

## 考察

本研究では、ART出生児では、non-ART出生児に比して、ゲノムワイドなメチル化異常が両アレルに生じている可能性があることを示した。ARTあるいは両親の不妊のどちらかがepi-IDs発症に寄与しているかは未解明であり、ヒトの卵子や受精卵を対象とした研究は倫理的制約が大きいため、この分野の研究は十分に進展していなかった。本研究では、メチル化異常を持つepi-IDs患者の血液サンプルと、T-LRSという最先端の技術を用いることで、これま

で指摘されてきた倫理的制約を克服し、ARTそのものがepi-IDs発症に寄与している可能性を初めて示した。

両アレルのメチル化レベルの評価において、疾患責任DMRでは、ART群とnon-ART群共にほとんどのCpG部位が低メチル化の外れ値を示した。ART群とnon-ART群で疾患責任DMRの低メチル化の程度には差異がないと考えられた。また、疾患責任DMR以外のDMRでは、ART-BWSでnonART-BWSに比して外れ値の割合が多かった。このことから、ART-BWSでは、両アレルで評価してもゲノムワイドなメ

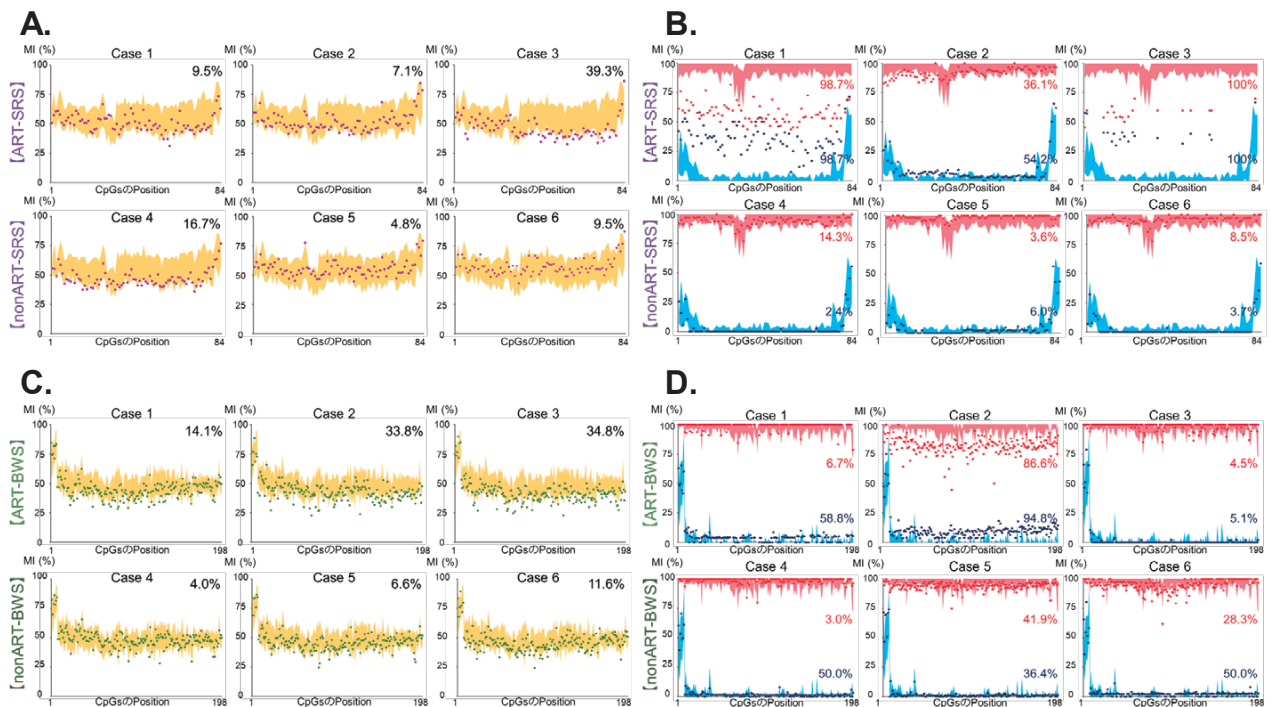


図3 ART群で外れ値が多かったDMRのメチル化レベル

A: *L3MBTL1*:alt-TSS-DMRにおける両アレルの評価、B: *L3MBTL1*:alt-TSS-DMRにおけるアレル毎の評価、C: *GNAS-A/B*:TSS-DMRにおける両アレルの評価、D: *GNAS-A/B*:TSS-DMRにおけるアレル毎の評価を示す。各グラフの右上の数字は外れ値の割合を示す。黄色い範囲はControlにおける両アレルの正常範囲、青い範囲はControlにおける父アレルの正常範囲、赤い範囲はControlにおける母アレルの正常範囲を示す。MI, メチル化比率。

メチル化異常が生じている可能性があると考えられた。

アレル毎のメチル化レベルの評価において、ART-SRSではアレル別に見るとnonART-SRSに比して外れ値の割合が多かった。両アレルの評価では外れ値の割合に差異がなかったことから、これはT-LRSを用いてアレルを分けてメチル化レベルを評価することで初めて検出が可能な結果と考えられる。ART-SRSにおいても、ART-BWSにおいても、外れ値を示すCpG部位は父アレルにも母アレルにも存在していたことから、ART出生児におけるメチル化異常は、受精前の精子や卵子に起因するものではなく、ART過程そのものによって生じている可能性が示唆された。

今後の課題として、希少疾患であるIDsを対象としていることから症例数が少なかったこと、controlの症例数が少ないこと、unphaseの症例が多く、アレル別の評価が可能だったDMRがSRSとBWSで各8か所のみだったことが挙げられる。epi-IDs症例およびcontrolの症例数を増やし、再解析を行うことを

予定している。また、両親検体を用いた全ゲノム解析により、今回得られた結果を別手法で検証することも予定している。

#### 引用文献

1. Kagami M, Hara-Isono K, Sasaki A, et al. Association between imprinting disorders and assisted reproductive technologies. *Epigenomics*. 2025;17:397–410.
2. Hara-Isono K, Matsubara K, Mikami M, et al. Assisted reproductive technology represents a possible risk factor for development of epimutation-mediated imprinting disorders for mothers aged  $\geq 30$  years. *Clin Epigenetics*. 2020;12:111.
3. Hara-Isono K, Matsubara K, Nakamura A, et al. Risk assessment of assisted reproductive technology and parental age at childbirth for the development of uniparental disomy-mediated imprinted disorders caused by aneuploid gametes. *Clin Epigenetics*. 2023;15:78.
4. Urakawa T, Hattori A, Ogiwara Y, et al. A comprehensive long-read sequencing system to assess DNA methylation at differentially methylated regions and imprinting-disorder-related genes. *Genome Med*. 2025;17:144.

## **Abstract**

Imprinting disorders (IDs) are caused by abnormal expression of imprinted genes. The molecular etiologies of IDs include epimutations resulting from aberrant methylation of differentially methylated regions (DMRs), uniparental disomy, deletions or duplications involving DMRs, and pathogenic mutations in causative genes. Assisted reproductive technology (ART) involves artificial manipulation of gametes and embryos and may interfere with the establishment and maintenance of parent-of-origin–specific genomic imprinting. Therefore, ART has long been considered a potential risk factor for IDs, particularly epimutation-mediated IDs (epi-IDs). However, it remains unclear whether the increased risk of epi-IDs is attributable to ART procedures themselves or to underlying parental infertility. Moreover, research using human oocytes or embryos has been limited by substantial ethical constraints, and consequently, progress in this field has been slow. Targeted long-read sequencing (T-LRS) is a novel approach that enables the quantitative assessment of CpG methylation levels within target regions and allows allele-specific evaluation of parent-of-origin–dependent methylation patterns. In this study, we applied a newly established T-LRS pipeline to patients with Silver–Russell syndrome (three ART-conceived and three non-ART-conceived individuals) and Beckwith–Wiedemann syndrome (three ART-conceived and three non-ART-conceived individuals), both of which are imprinting disorders frequently associated with epimutations. Our results demonstrate, for the first time, that ART-conceived individuals exhibit genome-wide methylation abnormalities affecting both paternal and maternal alleles compared with non-ART-conceived individuals. These findings suggest that methylation abnormalities observed in ART-conceived individuals may arise during the ART process itself rather than originating from pre-fertilization defects in sperm or oocytes.