

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 生殖発生にかかわる細胞のエピゲノム解析基盤研究
(英語) Epigenome analysis of cells in the placenta and endometrium forming the fetal-maternal interface

研究開発担当者 (日本語) 生体防御医学研究所 教授 佐々木裕之
所属 役職 氏名： (英語) Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University
Professor, Hiroyuki Sasaki

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語) 生殖系エピゲノム解析基盤研究
開発課題名： (英語) Epigenome analysis of the human reproduction system with a special focus on DNA methylation and small RNA

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人九州大学 生体防御医学研究所 教授 佐々木裕之
所属 役職 氏名： (英語) Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University
Professor, Hiroyuki Sasaki

分担研究 (日本語) 胎盤と関連疾患のエピゲノム解析
開発課題名： (英語) Epigenome analysis of cells in normal and pathological placentas
研究開発分担者 (日本語) 東北大学大学院医学系研究科 教授 有馬隆博
所属 役職 氏名： (英語) Tohoku University School of Medicine
Professor, Takahiro Arima

分担研究 (日本語) 子宮内膜と関連疾患のエピゲノム解析
開発課題名： (英語) Epigenomic profiling for endometrium and related diseases
研究開発分担者 (日本語) 国立成育医療研究センター研究所 部長 秦健一郎
所属 役職 氏名： (英語) Department of Maternal-Fetal Biology,

National Research Institute for Child Health and Development
Department Head, Kenichiro Hata

分担研究 (日本語) エピゲノムデータに基づく生殖系遺伝子発現制御機構の解明
開発課題名 : (英語) Analysis of gene regulation in the human reproduction system based on
epigenome data
研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人九州大学 生体防御医学研究所 教授 須山幹太
所属 役職 氏名 : (英語) Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University
Professor, Mikita Suyama

II. 成果の概要（総括研究報告）

平成 28 年度は当初計画に従って研究を実施し、以下の成果を得た。

まず、有馬・秦グループが正常胎盤、正常子宮内膜から各種細胞を純化し、佐々木・有馬・秦グループがこれまでに確立したプロトコルにより DNA メチル化、転写物、6 種類のヒストン修飾、小分子 RNA の標準エピゲノムデータを取得した。須山グループは各グループが産出したデータを集約し、国際ヒトエピゲノムコンソーシアム (IHEC) が推奨する基準に則って解析し、国際データベースへの登録、および IHEC Data Portal への登録を行った。また、効率的なデータ登録のために、データの整合性やメタデータの記述を確認するためのプログラムを開発した。これにより、研究チーム全体で合計 13 の完全標準エピゲノムデータを IHEC に登録することができた。さらに、佐々木・須山グループは、Illumina 社製の次世代シーケンサーに搭載されたソフトウェアのバージョンにより DNA メチル化データが影響を受けることを示し、同分野の研究者に警鐘を鳴らすとともに、最も信頼できるバージョンを特定するなど、その対策を発表した (BMC Genomics 2017)。

有馬・佐々木・須山のグループは得られた標準エピゲノムデータを用い、胎盤特異的に父母由来対立遺伝子間で DNA メチル化の差異を示す領域を同定し、胎盤におけるメチル化制御がヒトとマウスで大幅に異なること、及びこれらのメチル化差異領域がインプリント遺伝子の制御と関連することを報告した (Am. J. Hum. Genet. 2016)。この成果は、2016 年 11 月に Cell 誌に掲載された IHEC 特集の論文リストにおいて紹介された (Cell 2016 ; 佐々木・有馬・須山は Cell の記事の共著者)。また、須山グループは得られたデータをもとにゲノム領域の分類や組織特異的なエンハンサーの同定を行った。これらの解析は標準エピゲノムデータにもとづく遺伝子発現ネットワークの解析や疾患エピゲノムデータとの比較解析の基礎となるものである。一方、エピゲノムデータ解析においては、DNA 多型のエピゲノム変化への影響の有無の判定が重要である。そのため、秦グループでは標準エピゲノムを取得した子宮内膜検体ドナーについて多型情報取得のために全ゲノムリシーケンスを実施した。

疾患サンプルについては、有馬グループが純化した妊娠高血圧症、胎児発育不全、18 番染色体トリソミー由来の細胞性栄養膜細胞、及び秦グループが純化した子宮内膜症病変部由来の腺上皮細胞・間質細胞について、佐々木グループも参加してエピゲノム解析を実施した。調製が難しかった子宮内膜症病変部由来の細胞についても、遺伝子の発現プロファイル解析から目的の細胞を純化できたことが示唆されて、疾患特異的エピゲノム情報を抽出する準備が整った。

有馬グループが樹立したヒト胎盤幹 (TS) 細胞、及び絨毛外栄養膜 (EVT) 細胞について、佐々木・有馬グループでエピゲノム解析を実施した。また、TS 細胞から分化誘導した細胞についても解析を行った。標準エピゲノムデータとの比較により、ヒト TS 細胞は生体内の栄養膜細胞とよく似た遺伝子発現プロファイルを持つことを明らかにした。この研究については早期の論文化を目指している。

In the fiscal year of 2016, we conducted experiments and analyses as initially planned and obtained the following research outcomes.

Arima G and Hata G prepared highly purified cells from normal human placenta and endometrium samples, and Sasaki G, Arima G, and Hata G performed whole genome DNA methylation analysis, transcriptome analyses, histone modification analyses (on six modification types), and small RNA analyses using the established protocols. Suyama G collected the data generated by the three groups, processed them using the pipeline recommended by the International Human Epigenome Consortium (IHEC), and submitted the quality-controlled data to the public databases and IHEC Data Portal. To facilitate efficient data deposition, Suyama G developed new programs that enabled efficient data coordination and metadata confirmation. In this way, our team deposited a total of 13 complete epigenomes of highly purified placental and endometrial cells. In the course of the study, Sasaki G and Suyama G discovered that software updates in the Illumina HiSeq platform affect whole-genome DNA methylation data. To alleviate the problem, Sasaki G determined the most reliable software version that is currently available, and reported our important findings to the research community (BMC Genomics 2016).

Using the obtained epigenomic data, Arima G, Sasaki G, and Suyama G identified genomic regions showing placenta-specific differential DNA methylation depending on the parental origin. The allelic differences in methylation lead to the discovery of new placenta-specific imprinted genes in the human, of which orthologues are not imprinted in the mouse (Am. J. Hum. Genet. 2016). This work was listed as one of the series of papers contributed by IHEC in a special essay published in Cell (Cell 2016; Sasaki, Arima, and Suyama are coauthors of the essay). Suyama G also used the epigenomic data to categorize given genomic regions for functional annotation and identification of tissue-specific enhancers. These studies will provide the basis for the elucidation of the gene regulatory network in the human reproduction system and for the identification of disease-specific epigenomic differences. Hata G further performed whole genome resequencing of the endometrial tissue donors to reveal the effect of DNA polymorphisms on epigenomic differences.

Regarding the disease samples, Arima G purified cytotrophoblast from the placentae of pregnancy-induced hypertension, growth retardation, and 18 trisomy, and Hata G purified epithelial and stromal cells from the tissues of endometriosis. Arima G, Hata G, Sasaki G performed epigenomic analyses with these samples. Although it was difficult to purify cells from the endometriosis tissues, the gene expression profiles did suggest that they were derived from the correct endometrium-like tissues.

Lastly, Sasaki G and Arima G examined the epigenomic profiles of the human trophoblastic stem (TS) cells established in vitro by Arima G and normal human extra-villous trophoblast. Several differentiated cells, including EVT-like cells, derived from the TS cells in culture were also studied. It was found that the TS cells and their derivatives had gene expression profiles very similar to their in vivo counterparts. We will try to publish these important findings in the next fiscal year.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1件、国際誌 4件）

1. Shirane, K., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Yamaji, M., Satoh, J., Ito, S., Watanabe, A., Hayashi, K., Saitou, M. & Sasaki, H. Global landscape and regulatory principles of DNA methylation reprogramming for germ cell specification by mouse pluripotent stem cells. **Dev. Cell** 2016, 39, 87-103（論文の主題は本研究に直接関係しないが、データの一部を IHEC のエピゲノム解析技術研究（論文 5）にも活用する目的で取得。論文中に AMED への謝辞を記載。）
2. Hamada, H., Okae, H., Toh, H., Chiba, H., Hiura, H., Shirane, K., Sato, T., Suyama, M., Yaegashi, N., Sasaki, H. & Arima, T. Allele-specific methylome and transcriptome analysis reveals widespread imprinting in the human placenta. **Am. J. Hum. Genet.** 2016, 99, 1045-1058
3. Stunnenberg, H.G., The International Human Epigenome Consortium & Hirst, M. The International Human Epigenome Consortium: a blueprint for scientific collaboration and discovery. **Cell** 2016, 167, 1145-1149（研究開発担当者の佐々木が共著者リストに掲載された）
4. 富川順子, 有馬隆博, 佐々木裕之, 秦健一郎. IHEC で把握された胎盤・子宮内膜のエピゲノムと周産期疾患におけるエピゲノム異常. **病理と臨床** 2016, 34, 708-713
5. Toh, H., Shirane, K., Miura, F., Kubo, N., Ichiyanagi, K., Hayashi, K., Saitou, M., Suyama, M., Ito, T. & Sasaki, H. Software updates in the Illumina HiSeq platform affect whole-genome bisulfite sequencing. **BMC Genomics** 2017, 18, 31

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Incomplete reprogramming of germline DNA methylation in the human placenta. 口頭, Sasaki, H. The 13th International Congress of Human Genetics, Kyoto, 2016/4/5-6, 国内
2. 生殖発生にかかわる細胞のエピゲノム解析基盤研究, 口頭, 佐々木裕之, 第 6 回 AMED-CREST エピゲノム領域会議, 東京, 2017/2/3-4, 国内
3. イルミナ HiSeq の搭載ソフトのバージョンが全ゲノムメチル化解析に及ぼす影響, ポスター, 藤英博, 第 6 回 AMED-CREST エピゲノム領域会議, 東京, 2017/2/3-4, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. エピジェネティクスと細胞記憶と疾患、佐々木裕之、第 5 回日本 DOHaD 研究会学術集会（特別講演）、2016.7.23、国内
2. エピジェネティクスと細胞記憶と医学、佐々木裕之、九州大学医学部第一内科第 112 回開講記念会（特別講演）、2016.11.23、国内

3. エピジェネティクスと細胞記憶と医学、佐々木裕之、三和化学研究所 Advans 研究会 2016（招聘講演）、016.12.11、国内
4. AMED-CREST・IHEC 対応チームの金井弥栄教授（慶応大）より国際ヒトエピゲノムコンソーシアム日本チームホームページの管理運営を引き継ぎ、その内容の更新を行った。エピゲノムとは何か、エピゲノム研究がどのように社会へ役立つかを解説した「一般の方へ」のページを充実させるため、「エピゲノムがわかる本」の追加・更新などを行った。
URL: <http://crest-ihec.jp/index.html>

(4) 特許出願
なし。

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 生殖発生にかかわる細胞のエピゲノム解析基盤研究
(英語) Epigenome analysis of cells in the placenta and endometrium forming the fetal-maternal interface

分担研究 (日本語) 胎盤と関連疾患のエピゲノム解析
開発課題名： (英語) Epigenome analysis of cells in normal and pathological placentas

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人東北大学 大学院医学系研究科 教授 有馬隆博
所属 役職 氏名： (英語) Tohoku University School of Medicine
Professor, Takahiro Arima

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者： 九州大学生体防御医学研究所・佐々木裕之 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 3件、国際誌 3件）

1. 有馬隆博, 宮内尚子, 北村茜, 樋浦仁, 岡江寛明, 千葉初音. 生殖補助医療とインプリンティング異常の予防, *Pharma Medica*, メディカルレビュー社. 2016, 34 (4)
2. 有馬隆博. インプリンティング疾患の解析と診断, 産科と婦人科, 診断と治療社. 2016, 84 (1)
3. 濱田裕貴, 高橋聡太, 服部裕充, 有馬隆博. 生殖医療の安全性評価, 先端医療シリーズ 48 「臨床医のための最新産科婦人科」 先端医療技術研究所. 2016
4. Okae H, Arima T. DNA methylation dynamics during early human development. *Journal of Mammalian Ova Research*. *Journal of Mammalian Ova Research*. 2016, 33, 2.
5. Hamada H, Okae H, Toh H, Chiba H, Hiura H, Shirane K, Sato T, Suyama M, Yaegashi N, Sasaki H & Arima T. Allele-specific methylome and transcriptome analysis reveals widespread imprinting in the human placenta. *The American Journal of Human Genetics*. 2016, 99, 1045-1058.
6. Stunnenberg HG; International Human Epigenome Consortium, Hirst M. The International Human Epigenome Consortium: A Blueprint for Scientific Collaboration and Discovery. *Cell*. 2016, 167, 1145-1149.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 分化多能性を持つヒト胎盤栄養膜幹細胞の樹立, 口頭, 岡江寛明, 有馬隆博, 第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2016/11/30, 国内
2. Incomplete reprogramming of germline DNA methylation in the human placenta, 口頭, Arima T., Okae H. IHEC Science Days & Annual Meeting 2016, Brussels, 2016/9/6, 国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み 特になし

(4) 特許出願 特になし

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 生殖発生にかかわる細胞のエピゲノム解析基盤研究
(英語) Epigenome analysis of cells in the placenta and endometrium forming the fetal-maternal interface

分担研究 (日本語) 子宮内膜と関連疾患のエピゲノム解析
開発課題名： (英語) Epigenomic profiling for endometrium and related diseases

研究開発分担者 (日本語) 国立成育医療研究センター研究所 部長 秦健一郎
所属 役職 氏名： (英語) Department of Maternal-Fetal Biology,
National Research Institute for Child Health and Development
Department Head, Kenichiro Hata

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者：九州大学生体防御医学研究所・佐々木裕之 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1件、国際誌 0件）

1. 富川順子, 有馬隆博, 佐々木裕之, 秦健一郎. IHEC で把握された胎盤・子宮内膜のエピゲノムと周産期疾患におけるエピゲノム異常. **病理と臨床** 2016, 34, 708-713

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Integrative analysis of reference epigenomes for endometrium, ポスター, Kenichiro Hata, IHEC Annual Meeting 2016, Brussels, Belgium. 2016/9/6, 国外
2. Integrative analysis of reference epigenomes for endometrium ポスター, 富川順子, 第6回 AMED-CREST エピゲノム領域会議, 東京, 2017/2/3-4, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
なし。

(4) 特許出願
なし。

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation

研究開発課題名： (日本語) 生殖発生にかかわる細胞のエピゲノム解析基盤研究
(英語) Epigenome analysis of cells in the placenta and endometrium forming the fetal-maternal interface

分担研究
開発課題名： (日本語) エピゲノムデータに基づく生殖系遺伝子発現制御機構の解明
(英語) Analysis of gene regulation in the human reproduction system based on epigenome data

研究開発分担者 (日本語) 生体防御医学研究所 教授 須山幹太
所属 役職 氏名： (英語) Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University
Professor, Mikita Suyama

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者： 九州大学生体防御医学研究所・佐々木裕之 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 2件）

1. Hamada, H., Okae, H., Toh, H., Chiba, H., Hiura, H., Shirane, K., Sato, T., Suyama, M., Yaegashi, N., Sasaki, H. & Arima, T. Allele-specific methylome and transcriptome analysis reveals widespread imprinting in the human placenta. **Am. J. Hum. Genet.** 2016, 99, 1045-1058
2. Toh, H., Shirane, K., Miura, F., Kubo, N., Ichiyonagi, K., Hayashi, K., Saitou, M., Suyama, M., Ito, T. & Sasaki, H. Software updates in the Illumina HiSeq platform affect whole-genome bisulfite sequencing. **BMC Genomics** 2017, 18, 31

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
なし。

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
なし。

(4) 特許出願
なし。