

平成30年6月21日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15096

研究課題名(和文) 網羅的メチル化解析法を用いたヒトインプリンティング異常症発症機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the onset mechanism of human imprinting disorders using the method of methylation analysis with high-density DNA methylation arrays

研究代表者

鏡 雅代 (Kagami, Masayo)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・分子内分泌研究部・室長

研究者番号：70399484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：複数のDifferential methylated region (DMR)メチル化異常を示すMultiple Imprinting Disturbance (MLID)を持つ症例の頻度、発症機序、臨床像は不明な点が多い。我々はインプリンティング異常症約1300名に対し、包括的メチル化解析を行い、38名のMLID症例を同定した。加えて、Kagami-Ogata症候群エビ変異症例5名とTemple症候群(TS14)エビ変異症例4名に対しメチル化アレイを用いた網羅的メチル化解析にて、TS14症例にて世界で初めてMLIDを同定した。

研究成果の概要(英文)：Patients with multiple imprinting disturbance (MLID) show abnormal methylation levels in the multiple differentially methylated regions (DMRs), however, the frequencies, onset mechanism, and clinical features of MLID remain to be clarified. We screened 1300 patients with imprinting disorders by methylation analysis using pyrosequencing and detected 38 patients with MLID. Furthermore, we examined methylation levels of 43 DMRs using high-density DNA methylation arrays in 5 patients with Kagami-Ogata syndrome caused by epimutation and 4 patients with Temple syndrome (TS14) caused by epimutation. We detected first TS14 patients with MLID.

研究分野：人類遺伝学、小児科学

キーワード：エピジェネティクス インプリンティング DNAメチル化

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

### 1. 研究開始当初の背景

ゲノムインプリンティングは epigenetic な現象の一つであり、インプリンティング遺伝子の発現異常はインプリンティング異常症を引き起こす。インプリンティング遺伝子は片親性に発現し、その発現は責任メチル化可変領域 (Differentially methylated region (DMR)) が制御している。

インプリンティング遺伝子発現異常は、片親性ダイソミー (UPD)、欠失・重複、エピ変異および責任遺伝子の変異で生じる。代表的な8インプリンティング異常症に対する包括的インプリンティング異常症遺伝子診断システムを構築した。これにより8疾患すべての遺伝子診断が可能となり、臨床像がオーバーラップする症例 (Kagami et al. *Eur J Hum Genet*, in press)、責任 DMR 以外のメチル化異常を持つ (Multiple Methylation Defects (MMD)) 症例の同定も可能になり、すでに約600症例を集積済みである。我々は、14番染色体インプリンティング異常症において、エピ変異のみならず UPD、欠失症例においても MMD が存在することを見出し、さらに染色体構造異常症例で11番染色体インプリンティング領域 DMR のメチル化異常を示す症例を同定した。この結果は、DMR 間の trans の相互作用を示唆し、網羅的メチル化解析から DMR 間の相互作用、インプリンティング遺伝子の標的遺伝子を同定することを着想した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、インプリンティング異常症における MLID の頻度を明らかとすること、インプリンティング異常症責任メチル化可変領域 (DMR) と他のインプリンティング領域 DMR および遺伝子発現調節領域との相互作用を明らかとし、最終的にインプリンティング遺伝子の標的遺伝子を同定することである。

### 3. 研究の方法

包括的遺伝子診断システムにより同定したインプリンティング異常症症例 (エピ変異、UPD、欠失・重複) ゲノム DNA を用いた網羅的メチル化解析を施行する。このデータを用いて、初めに DMR となっていることが確認されている約 50 領域 (約 750 プローブ) について検討し、疾患別、遺伝学的原因別 MMD の頻度、MMD を生じやすい DMR を同定する。次に、45 万プローブ全部の結果を用いて疾患ごとに解析し、共通するメチル化異常領域を同定する。メチル化異常領域近傍に存在する遺伝子は標的遺伝子候補となるので、この遺伝子の発現を患者検体とコントロ

ール検体とで比較する。

### 4. 研究成果

我々はこれまでに集積した8インプリンティング異常症約1300名に対し、8インプリンティング異常症責任DMRに対する包括的メチル化解析を行い、38名のMLID症例を同定した。これら、全MLID症例に対し、Infinium Human Methylation 450K BeadChip kit (イルミナ社)を用いた網羅的メチル化解析を施行し、そのうちメチル化可変領域に存在する約750のプローブについてメチル化状態を検討した。14番染色体インプリンティング異常症であるKagami-Ogata症候群 (KOS)とTemple症候群 (TS14) についての網羅的メチル化解析の報告はこれまでになかった。我々はエピ変異で生じたKOS 5症例、TS14 4症例の網羅的メチル化解析を施行し、世界で初めてTS14においてMLIDを同定し、報告した(Kagami et al. *Genet Med*. 2017)。これらのMLID症例において、既知のMLID責任遺伝子には変異を認めず、epigeneticな原因もしくは未知のgeneticな原因により生じたと予想された。また、同定されたさまざまなMLID症例の中には、構造異常である片親性ダイソミー症例や欠失症例も含まれ、インプリンティング領域間の相互作用の破たんがMLID発症に関連することを示唆した。

Silver-Russell症候群の責任DMRであるH19-DMRの低メチル化と染色体構造異常を合併した症例を3例同定した。メチル化アレイを用いた網羅的メチル化解析にて、共通したメチル化異常を認める遺伝子は同定できなかった。構造異常領域にDMRの正常メチル化維持に関連する遺伝子の変異が含まれている可能性を考えエクソーム解析による変異解析を施行中である。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

1. Kawasima S, Nakamura A, Inoue T, Matsubara K, Horikawa R, Wakui K, Takano K, Fikushima Y, Tatematsu T, Mizuno S, Tsubaki J, Kure S, Matsubara Y, Ogata T, Fukami M, Kagami M. Maternal uniparental disomy for chromosome 20: physical and endocrinological characteristics of five patient. *J Clin Endocrinol Metab*. [accepted].
2. Nakamura A, Muroya K, Ogata-Kawata H, Nakabayashi K, Matsubara K, Ogata T,

- Kurosawa K, Fukami M, Kagami M. A case of paternal uniparental isodisomy for chromosome 7 associated with overgrowth. *J Med Genet*. 2018 Feb 17 doi: 10.1136/jmedgenet-2017-104986. [Epub ahead of print]
3. Inoue T, Nakamura A, Matsubara K, Nyuzuki H, Nagasaki K, Oka A, Fukami M, Kagami M. Continuous hypomethylation of the KCNQ1OT1:TSS-DMR in monozygotic twins discordant for Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet A*. 173(10):2847–2850. 2017.
  4. Kagami M, Nagasaki K, Kosaki R, Horikawa R, Naiki Y, Saitoh S, Tajima T, Yorifuji T, Numakura C, Mizuno S, Nakamura A, Matsubara K, Fukami M, Ogata T. Temple syndrome: comprehensive molecular and clinical findings in 32 Japanese patients. *Genet Med*. 19(12):1356–1366. 2017.
  5. Inoue T, Nakamura A, Fuke T, Yamazawa K, Sano S, Matsubara K, Mizuno S, Matsukura Y, Harashima C, Hasegawa T, Nakajima H, Tsumura K, Kizaki Z, Oka A, Ogata T, Fukami M, Kagami M. Genetic heterogeneity of patients with suspected Silver-Russell syndrome: genome-wide copy number analysis in 82 patients without imprinting defects. *Clin Epigenetics*. 9:52. 2017.
  6. Kagami M, Matsubara K, Nakabayashi K, Nakamura A, Sano S, Okamura K, Hata K, Fukami M, Ogata T. Genome-wide multilocus imprinting disturbance analysis in Temple syndrome and Kagami-Ogata syndrome. *Genet Med*. 19(4):476–482. 2017.
  7. Goto M, Kagami M, Nishimura G, Yamagata T. A patient with Temple syndrome satisfying the clinical diagnostic criteria of Silver-Russell syndrome. *Am J Med Genet A*. 170(9):2483–2485. 2016.
  8. Nakamura A, Hamaguchi E, Horikawa R, Nishimura Y, Matsubara K, Sano S, Nagasaki K, Matsubara Y, Umezawa A, Tajima T, Ogata T, Kagami M, Okamura K, Fukami M. Complex Genomic Rearrangement within the GNAS Region Associated with Familial Pseudohypoparathyroidism Type 1b. *J Clin Endocrinol Metab*. 101(7):2623–2627. 2016.
  9. Luk HM, Ivan Lo FM, Sano S, Matsubara K, Nakamura A, Ogata T, Kagami M. Silver-Russell syndrome in a patient with somatic mosaicism for upd(11)mat identified by buccal cell analysis. *Am J Med Genet A*. 170(7):1938–1941. 2016
  1. 鏡雅代 片親性ダイソミー：両親の年齢と生殖補助医療、ワークショップ、第 40 回日本分子生物学会、2017.12.6
  2. 鏡雅代 Kagami-Ogata 症候群、シンポジウム、第 62 回日本人類遺伝学会、2017.11.16
  3. 松原圭子、中村明枝、井上毅信、川嶋明香、深見真紀、鏡雅代、種々の発症原因を有するインプリンティング疾患患者 127 名における Multilocus Methylation Defects の検討、第 51 回日本小児内分泌学会学術集会、2017.9.28
  4. 鏡雅代、松原圭子、早野崇英、細道一善、高田修治、井ノ上逸朗、緒方勤、深見真紀、14q32.2 インプリンティング領域発現制御機構の解明：患者生体試料を用いたメチローム、トランスクリプトーム解析、第 51 回日本小児内分泌学会学術集会、2017.9.28
  5. 鏡雅代、Kagami-Ogata 症候群、教育講演、nordiscience forum 2017、2017.6.3
  6. Kagami M, Nagasaki K, Kosaki R, Horikawa R, Naiki Y, Saitoh S, Tajima T, Yorifuji T, Numakura C, Mizuno S, Nakamura A, Matsubara K, Fukami M, Ogata T. Temple syndrome: comprehensive molecular and clinical findings in 32 Japanese patients, European Human Genetics Conference (ESHG) 2017, 2017.5.29.
  7. 鏡雅代、長崎啓祐、小崎里華、齋藤伸治、松原圭子、中村明枝、深見真紀、緒方勤、Temple 症候群 32 症例における遺伝子診断に基づいた臨床像の検討、第 120 回日本小児科学会学術集会、2017.4.14
  8. 鏡雅代、松原圭子、中林一彦、秦健一郎、中村明枝、緒方勤、深見真紀、14 番染色体インプリンティング異常症エピソード例に対する網羅的 DMR メチル化解析および臨床像についての検討、第 39 回分子生物学会、2016.12.1
  9. 鏡雅代、松原圭子、中村明枝、井上毅信、佐野伸一郎、緒方勤、深見真紀、当研究室で同定した 132 名の片親性ダイソミーにおける両親の年齢および生殖補助医療についての検討、第 39 回日本小児遺伝学会、2016.12.9
  10. 鏡雅代、New Syndrome Session Kagami-Ogata 症候群：疾患概念の確立とその病態（教育講演）、第 39 回日本小児遺伝学会、2016.12.9
  11. Kagami M, Nagasaki K, Kosaki R, Horikawa R, Naiki Y, Saitoh S, Tajima T, Nakamura A, Matsubara K, Fukami M, Ogata T, Comprehensive clinical studies in 32 patients molecularly diagnosed with Temple syndrome. The 9th Biennial Scientific Meeting of the Asia Pacific Paediatric Endocrine Society, 2016.11.19

12. 鏡雅代, プレカンファランスシンポジウム:小児内分泌ガイドラインから学ぶ「シルバーラッセル症候群 診療ガイドライン」(シンポジウム)、第 50 回日本小児内分泌学会学術集会、2016.11.16
13. 鏡雅代: 胎児期発育異常を示すインプリンティング異常症, 新生児科指導医養成事業 第 5 回教育セミナー, 教育講演, 2016.5.21
14. Masayo Kagami, Kagami-Ogata syndrome: Clinically recognizable imprinting disorder caused by upd(14)pat and related condition, 2016 ICHG (The 13th International Congress of Human Genetics), シンポジウム, 2016.4.6
15. 鏡雅代: 染色体異常が関連するインプリンティング異常症, 第 34 回小児内分泌・代謝研究会信濃町フォーラム, 教育講演, 2016.1.30
16. 鏡雅代, インプリンティング異常症と先天異常-基礎から Kagami-Ogata 症候群まで- (招待講演)、神奈川小児医療センター医師の会講演会、2015.11.4
17. 鏡雅代、早野崇英、細道一善、深見真紀、緒方勤、井ノ上逸朗、ヒト 14 番染色体インプリンティング異常症患者における 14 番染色体インプリンティング領域のメチローム解析、日本人類遺伝学会第 60 回大会、2015.10.17
18. 鏡雅代、Year book 4 臨床遺伝、橋渡し研究、教育講演、第 49 回日本小児内分泌学会学術集会、2015.10.10
19. 鏡雅代、松原圭子、中林一彦、嘉村浩美、中村明枝、深見真紀、緒方勤、14 番染色体インプリンティング異常症エピソード例に対する網羅的 DMR メチル化解析および臨床像についての検討、第 49 回日本小児内分泌学会学術集会、2015.10.10
20. Kagami M, Matsubara K, Sano S, Nakamura A, Mizuno S, Hamajima N, Yanagisawa A, Hashimoto M, Yukote A, Fukami M, Ogata T, Various imprinting disorders underlying Silver-Russell syndrome-compatible phenotype, 54th European for Paediatric Endocrinology Annual Meeting, 2015.10.2
21. 鏡雅代、PWSに関連する最近の遺伝学的知見, PWSMTS2015, 特別講演, 2015.9.13.
22. 鏡雅代、インプリンティング異常症, 第 35 回日本小児病理研究会学術集会, 教育講演, 2015.8.29.
23. 鏡雅代、松原圭子、中林一彦、中村明枝、緒方勤、深見真紀、14 番染色体インプリンティング異常症エピソード 11 例に対する網羅的な DMR メチル化状態の検討、第 38 回日本小児遺伝学会、2015.7.25
24. 鏡雅代、インプリンティング異常症, 第三回中国四国若手内分泌の会, 教育講演,

2015.5.31.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

鏡 雅代 (KAGAMI MASAYO)  
国立成育医療研究センター 研究所分子内  
分泌研究部臨床内分泌研究室・室長  
研究者番号：70399484

##### (2) 研究分担者

松原圭子 (MATSUBARA KEIKO)  
国立成育医療研究センター 研究所分子内  
分泌研究部・上級研究員  
研究者番号：90542952

##### (3) 研究分担者

中林 一彦 (NAKABAYASHI KAZUHIKO)  
研究者番号：10415557

##### (4) 連携研究者

高田 修治 (TAKADA SHUJI)  
研究者番号：20382856