

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06356

研究課題名(和文)14番染色体miRNAsクラスターの機能の解明：胎盤発育、肝芽腫発症に注目して

研究課題名(英文)Elucidation of the function of miRNAs at the 14q32.2 imprinted region in the placental development and hepatoblastoma development

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：正常肝組織および14症例の肝芽腫組織を用いた発現解析、メチル化解析、染色体構造解析を行った。9症例の腫瘍組織でDLK1、MEG3の著しい発現増加を認めた。過剰発現していたMEG3遺伝子のプロモーター領域のメチル化解析は正常メチル化もしくは過剰メチル化を示した。14番染色体における構造異常症例は同定されなかった。

14q32.2インプリンティング領域内のmiRNAs KOモデルマウスを作成した。マウス表現型は正常であった。胎盤解析においては、miRNAs KOマウスの胎盤は、グリコーゲン細胞の発育が悪く、海綿層の発育が悪かった。絨毛細胞において、細胞質の変性および胎児絨毛血管内皮の異常を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝芽腫において14番染色体インプリンティング遺伝子のDLK1、MEG3の発現上昇を明らかにした。発現調節領域のMEG3プロモーターの低メチル化を示さないことから、これらの遺伝子の肝芽腫における発現増加は通常のインプリンティング調節機構によらないと予想された。加えて、KOマウスを用いた解析から、本領域内の多数の母性発現miRNAsは、胎盤におけるグリコーゲン細胞の形成、絨毛細胞特に胎児絨毛血管内皮の機能維持に関連していることを明らかとした。しかし、miRNAs KOマウスは出生し、その後の成長も野生型と違いがないことから、胎盤の異常についてはなんらかの代償機構が存在することが予想された。

研究成果の概要(英文)：We conducted expression, methylation, and chromosome structure analyses in 14 hepatoblastoma tissues together with normal liver samples. Nine hepatoblastoma tissues showed increased expression of the imprinted genes at 14q32.2. Methylation analysis of the promoter region of the overexpressed MEG3 gene showed normal methylation or hypermethylation without structural abnormalities of the imprinted region on chromosome 14. We generated a mouse model which delete miRNAs cluster at the human 14q32.2 imprinting region. The mouse phenotype was normal. The placenta of miRNAs KO mice had poor glycogen cells development and poor development of spongiotrophoblast layer. In trophoblasts, we observed cytoplasmic degeneration, and abnormalities in fetal vascular endothelium.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：インプリンティング miRNA 14番染色体 肝芽腫 胎盤

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

インプリンティング遺伝子は片親性に発現する遺伝子で、有袋類と真獣類で同定されるが、ヒト 14q32.2 領域のインプリンティング遺伝子は、有袋類ではインプリントされておらず、真獣類固有の機能への関与が推測される。本領域は miRNAs (C14MC) を含む多数の母性発現 non-coding RNA を含むが、その発現制御機構や機能、標的遺伝子は不明な点多い。

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) は胎盤過形成を、KOS と鏡像関係にある Temple 症候群 (TS14) は胎盤低形成を示し、本領域インプリンティング遺伝子が胎盤発育に関与していることは明白である。我々は父性発現遺伝子 *RTL1* の胎盤発育への関与を明確にしたが、母性発現するクラスターを作って存在する多数の miRNAs の役割は未だ不明である。19 番染色体上のインプリントされた miRNAs 群 (C19MC) は胎盤機能への関与することが知られており、14q32.2 領域インプリンティング遺伝子が胎盤をもつ真獣類にのみ存在する遺伝子であること、本領域 miRNAs の発現が妊娠後期に増加することから、本領域 miRNAs がヒトの妊娠後期の胎盤機能に関連する機能をもつと推測した。加えて、KOS 患者において約 10% に肝芽腫を合併することが報告されている (文献 1)。肝芽腫における 14 番染色体インプリンティング遺伝子の関与については明らかとなっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では患者生体試料とマウスモデルを用いて、14q32.2 領域インプリンティング遺伝子の肝芽腫への関与の検討および 14 番染色体インプリンティング遺伝子内の miRNAs の胎盤、肝臓における機能、標的遺伝子を明らかにすることを目的とする。胎盤や肝臓、肝芽腫における 14 番染色体インプリンティング遺伝子、とくに、母性発現する多数の miRNAs の機能、制御機構、標的因子を明確にし、胎盤機能不全、肝芽腫の病態解明に貢献することを目標とする。

### 3. 研究の方法

[1] ヒト肝芽腫および肝臓組織を用いた 14 番染色体インプリンティング遺伝子の発現変動および 14 番染色体インプリンティング領域のメチル化解析

集積した KOS 合併肝芽腫組織、10 例以上の KOS 非合併肝芽腫組織および周辺正常肝臓組織を用いて、Infinium Methylation EPIC (Illumina) をもちいた網羅的メチル化解析、発現アレイを用いた発現解析、染色体構造異常同定のための aCGH 解析を施行する。14 番染色体インプリンティング遺伝子が肝芽腫組織で発現変動を示しているのか、それは肝芽腫における染色体構造異常と関連するのかを明らかにする。

[2] マウスモデルを用いた表現型解析、組織解析

ヒト 14q32.2 領域相同領域の miRNAs 欠失マウスを、CRISPER/CAS9 システムを用いて作成する。Genotyping、組織での miRNAs の発現解析にて、KO されていることが確認されたラインにつき交配を重ね、表現型解析 (母アレル KO マウス出生頻度、体重の経過、既報のマウスモデルとの表現型の比較など)、肝臓、胎盤を中心に組織学的検討を行う。

[3] マウスモデルを用いた発現解析、メチル化解析

miRNAs KO マウスの肝臓、胎盤における発現解析を行い、miRNAs の標的遺伝子を探索し、表現型との関連性を明らかにする。発現アレイを用いた網羅的解析にて、標的遺伝子候補を抽出し、Taqman プローブを用いた qPCR 解析に発現レベルを検討する。miRNAs KO により *Dkl1-Dio3* インプリンティング領域の DMR のメチル化レベルに影響がないかどうかの検討については、パイロシーケンス法もしくはバイサルファイト法にて施行する。

### 4. 研究成果

[1] ヒト肝芽腫および肝臓組織を用いた 14 番染色体インプリンティング遺伝子の発現変動および 14 番染色体インプリンティング領域のメチル化解析

ヒト正常肝臓組織および肝芽腫組織 14 サンプルを用いた発現解析、メチル化解析、染色体構造解析を行った。9 サンプルの腫瘍組織で遺伝子発現の変動が大きい遺伝子上位 5% に 14 番染色体インプリンティング遺伝子が含まれていた。過剰発現していた *MEG3* 遺伝子のプロモーター領域のパイロシーケンス法によるメチル化解析を施行した。*MEG3* 遺伝子プロモーター領域は父由来アレルでメチル化を受け、母由来アレルではメチル化を受けず通常 50% 程度のメチル化レベルを示し、母由来アレルからのみ *MEG3* は発現する。*MEG3* 過剰発現を示す腫瘍細胞ではプロモーター領域のメチル化状態は、正常メチル化もしくは過剰メチル化を示した。プロモーター領域のメチル化異常による発現異常の場合は、低メチル化を示すことが予想されることから、腫瘍組織での *MEG3* の高発現は、プロモーター領域の異常メチル化にはよらない機構によると考えられた。SNP アレイによる構造解析では、14 番染色体における構造異常症例は同定されず 14q32.2 インプリンティング領域の構造異常による *MEG3* 過剰発現は否定された。肝芽腫では、trans に作用する何らかの因子が、14 番染色体インプリンティング遺伝子の肝芽腫における過剰発現に関与すると予想された。

## [2] マウスモデルを用いた表現型解析、組織解析

B6D2F マウス受精卵にヒト 14CMC と相同領域の miRNAs クラスターを欠失させるためのガイド RNA および CAS タンパクを注入し、ICR マウスに移植後、出生した仔をタイピングし、BL6 マウスで継代した。既報では、生後の低血糖から回復できないことによる早期死亡例が半数近くで認めるとの報告であったが（文献 2）、早期死亡例は認めず、genotype 別の出生数も推定通りであった。体重は miRNAs KO マウスは WT に比較し小さい傾向は認め、これは既報に一致した。miRNAs KO マウスの母の出産数は WT の母の出産数と比較して変わりなかった。胎盤解析においては、e17.5 母アレルの miRNAs KO 胎盤は（母の miRNAs 欠失を引き継いだ仔の胎盤で miRNAs の発現は消失）WT 胎盤と比較し、グリコーゲン細胞の発育が悪いこと、spongiotrophoblasts の発育が悪いことが判明した。胎盤重量は genotype による差は認めなかった。グリコーゲン細胞が多い e15.5 胎盤で再度解析をしたが、同様の結果となった。e15.5 の肝臓の組織学的検討では明らかな異常は認めなかった。低血糖による生後早期死亡を BL6 マウスで認めなかったことから、マウスの種類による違いの可能性も考え、DBA2 マウスのバッククロスし、その表現型を検討した。DBA2 マウスでも生後早期死亡例は認めなかった。e15.5 胎盤組織解析では、KO 胎盤ではグリコーゲン細胞の発育が悪いことが BL6 マウスと同様に認められた。spongiotrophoblasts の発育も BL6 マウスと同様に悪かった。さらに、trophoblast 細胞の検討では、KO マウス胎盤の trophoblast の細胞質の変性および胎児絨毛血管内皮の異常を認めた。

## [3] マウスモデルを用いた発現解析

BL6 e15.5 胎盤組織を用いた発現アレイ解析では、約 50 遺伝子が、miRNAs KO マウス胎盤で WT および父アレル欠失（ともに miRNAs 発現は正常）に比較して、発現上昇（2 倍以上 KO マウス胎盤で発現増加）を認めた。これらの遺伝子は、C14MC 相同領域 miRNAs の標的遺伝子候補となる。既報にて、C14MC 内の miRNA の標的遺伝子候補と報告されていた *ALK5*, *ALK7*, *NODAL*, *CCNG2* はリストには含まれていなかった。50 遺伝子のうち、インプリンティング遺伝子は含まれておらず、成長に関連する遺伝子もなかった。糖代謝に関連する遺伝子が 4 遺伝子含まれており、本領域 miRNAs の標的遺伝子候補として、検討を進めていく。BL6 新生児マウスの肝臓、脳、皮膚、骨を用いた qPCR による欠失領域に含まれる miR134 の発現解析では、KO マウスでは発現は消失しており、KO されていることは確認できた。既報で、miRNAs 欠失マウスで、筋肉における *Dlk1* の発現が上昇しているとの報告があったが（文献 3）、我々の検討では KO マウスでも正常発現であった。e15.5 胎児、新生児、成体のマウス肝臓を用いた発現アレイ解析では KO マウスで発現上昇を認めた遺伝子のうち、2 群以上で共通して発現上昇した遺伝子は 6 遺伝子同定したが、糖代謝と関連するものでなかった。

## 引用文献

1. Kagami M, Kurosawa K, Miyazaki O, Ishino F, Matsuoka K, Ogata T. Comprehensive clinical studies in 34 patients with molecularly defined UPD(14)pat and related conditions (Kagami-Ogata syndrome). *Eur J Hum Genet.* 2015 Nov;23(11):1488-98.
2. Labialle S, Marty V, Bortolin-Cavaillé ML, Hoareau-Osman M, Pradère JP, Valet P, Martin PG, Cavaillé J. The miR-379/miR-410 cluster at the imprinted *Dlk1-Dio3* domain controls neonatal metabolic adaptation. *EMBO J.* 2014 Oct 1;33(19):2216-30.
3. Gao YQ, Chen X, Wang P, Lu L, Zhao W, Chen C, Chen CP, Tao T, Sun J, Zheng YY, Du J, Li CJ, Gan ZJ, Gao X, Chen HQ, Zhu MS. Regulation of *DLK1* by the maternally expressed miR-379/miR-544 cluster may underlie callipyge polar overdominance inheritance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Nov 3;112(44):13627-32.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kagami M, Yanagisawa A, Ota M, Matsuoka K, Nakamura A, Matsubara K, Nakabayashi K, Takada S, Fukami M, Ogata T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Temple Syndrome in a Patient With Variably Methylated CpGs at the Primary MEG3/DLK1:IG-DMR and Severely Hypomethylated CpGs at the Secondary MEG3:TSS-DMR	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Epigenetics	6. 最初と最後の頁 41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13148-019-0640-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鏡雅代、義岡孝子、 阪本靖介、福田晃也、大橋博文、松原圭子、井上毅信、川嶋明香、 深見真紀、笠原群生
2. 発表標題 インプリンティング遺伝子の肝芽腫発症への関与の検討
3. 学会等名 日本小児遺伝学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	高田 修治  (Takada Shuji)  (20382856)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・システム発生・再生医学研究部・部長       (82612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------