

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15686

研究課題名(和文) iPS細胞を用いたインプリンティング領域のメチル化維持機構の機序解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of methylation maintenance of imprinting region using iPS cells

研究代表者

奥野 博庸 (OKUNO, Hiironobu)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：70445310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：人体にある様々な細胞が、どのように働くかは、細胞内にあるゲノム情報により制御される。ゲノム情報は、つねに「働いている状態」となっている訳ではなく、「働いている」「やすんでいる」の組み合わせにより、多様な働きが作り出されている。ゲノムの中のchr15q11.2という領域は、脳のはたらきに大きく関わっている。この領域が欠けている患者由来iPS細胞において、「休んでいる」状態になっているゲノム情報が、「働いている」状態へと勝手に変換しやすくなっていた。人為的に領域欠失させた細胞は、細胞自体を維持するのが難しく、この領域がiPS細胞において極めて重要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム情報が「働いている」「やすんでいる」は、その領域が「脱メチル化している」「メチル化している」ことが目印として用いられる。さらに15q11.2領域は、父親から受け継いだ領域が「脱メチル化」、母親から受け継いだ領域が「メチル化」された状態になるインプリンティングと呼ばれる領域である。インプリンティングは、どのような仕組みでメチル化状態が決められ、維持されているかについて、未だわかっていない。今回の研究では、そのインプリンティング領域のメチル化状態がどのように決められているかを解明しようとする研究である。

研究成果の概要(英文)：How various cells in the human body work is controlled by the genomic information in the cells. The genomic information is not always in a "working state," but various functions are created by combining "working" and "resting" information. The region called chromosome 15q11.2 in the genome is greatly involved in brain functions. In patient-derived iPS cells lacking this region, genomic information in a "resting" state is easily converted to a "working" state on its own. This region seems to control not only brain function but also maintenance of the genomic methylation, i.e. "working" and "resting" information. Cells artificially deleted the region by genome-editing technology are difficult to maintain its survival and this region is considered to be extremely important for iPS cells.

研究分野：幹細胞学

キーワード：iPS細胞 視床下部 Prader-Willi症候群 メチル化維持機能 インプリンティング

1. 研究開始当初の背景

本研究の学術的背景

哺乳類では片親アレル由来のみが遺伝子発現することが初期発生の段階で定まった領域がある。これらは DNA メチル化により発現もしくは非発現が決まり、インプリンティングと呼ばれる。父方アレル由来、母方アレル由来のみがどのような仕組みで遺伝子のメチル化、非メチル化がなされ、遺伝子発現の制御を受けているかは未だ解明されていない。

申請者はインプリンティング疾患として有名なプラダー・ウィリー症候群 (PWS; Prader-Willi syndrome) 4 名 (父方由来 15q11-13 領域欠失型 2 名、片親性ダイソミー (UPD) 型 2 名) より研究協力を得て、すでに患者線維芽細胞由来 iPS 細胞を樹立し、PWS 患者 (欠失型) 由来 iPS 細胞 22 株および健常者由来 iPS 細胞 12 株についてインプリンティング領域のメチル化解析を行なった。健常者由来 iPS 細胞 12 株では iPS 細胞化に伴った PWS 関連インプリンティング遺伝子領域 (15 番染色体 11.2 領域) のメチル化の変化は認めなかったが、PWS 由来 iPS 細胞 22 株中 4 株で元細胞 (線維芽細胞) と比較してメチル化率が大きく変化していることを見出した。(Okuno et al., Cong. Anomalies 2017) 申請者らは、上記父方由来 15q11-13 領域欠失による PWS 患者以外に、UPD 型 2 名よりこれまでに iPS 細胞を作成し、樹立した iPS 細胞株についてメチル化解析をおこなったが、PWS 関連インプリンティング遺伝子領域のメチル化の変化を認めていない。iPS 細胞化に伴う欠失型 PWS 患者で有意に多く認められたインプリンティング領域のメチル化維持機構の破綻は、どのようにインプリンティング領域が維持されているかを知る大きな手がかりになると考えた。

申請者らが見出した PWS 関連インプリンティング遺伝子領域 (15 番染色体 11.2 領域) が脱メチル化した iPS 細胞 4 株は偶発的にみとめたが、これらを意図的に領域特異的に脱メチル化することができれば、iPS 細胞を病気の主体となっている視床下部へ誘導する技術と組み合わせることにより、患者由来の正常化した神経系細胞を作成することが可能となる。PWS 患者は極度の過食による心不全や成人以降に特に著明となる自閉的で被害妄想を有し、攻撃的な気質のために社会的な問題を起こしたり、自殺に至るといったことが問題となっている。将来的に患者由来の正常化した神経細胞による移植治療が可能となれば、治療方法のなかった PWS の神経症状を治療できる可能性を秘めていると考えている。

研究課題の核心をなす学術的「問い」

申請者らが解析した PWS 患者 (父方由来 15q11-13 領域欠失型) 由来 iPS 細胞株で有意に PWS インプリンティング領域の脱メチル化をみとめた。この領域には MECP2 結合認識配列がクラスターとして存在し、この領域を介して 3 次元構造的に染色体内および染色体間で遠位にある領域と結合することが知られている (Dag H. Yasui et al., HMG 2011, M. Meguro-Horike et al. HMG 2011)。MECP2 は DNMT1 と直接結合して局所のメチル化維持を行なう働きがあることが報告されている (H. Kimura and K. Shiota, JCB 2003)。この MECP2 結合認識配列が欠失していることにより、PWS 関連インプリンティング領域が 3 次元構造による遠位の領域と作用することを妨げ、PWS 患者 (欠失型) 由来 iPS 細胞株で PWS インプリンティング領域の脱メチル化を生じやすくしたと推察した。

2. 研究の目的

インプリンティング領域である染色体 15q11.2 領域は機能不全により Prader-Willi 症候群という特徴的な脳高次機能の関連する症状を呈する疾患が生じる。すでに PWS 患者皮

膚線維芽細胞由来 iPS 細胞を多数樹立して、疾患領域のメチル化解析をおこなったところ 5-10%で本来メチル化しているべき 15q11.2 領域のメチル化領域が脱メチル化していることが判明した (Okuno et al. 2016)。これは正常患者由来細胞ではみとめなかった。該当領域が未分化細胞においてメチル化維持にも関わっていると考え、またメチル化維持に重要である MECP2 結合領域が存在するため、その機能を調べるとともに、これらの事象と患者の表現型の関連をしらべるため、疾患細胞と考えられている視床下部細胞へ分化誘導を行う技術を開発を目指した。

3 . 研究の方法

1) ゲノム編集技術を用いて健常者および UPD 型 PWS 患者由来 iPS 細胞より 15q11.2 領域の MECP2 結合領域が微細欠失した iPS 細胞株を作成し、継代ごとに 15q11.2 領域のメチル化状態をパイロシーケンス法により調べる。

2) MECP2 結合領域を微細欠失させた皮膚線維芽細胞株より iPS 細胞樹立およびメチル化解析により、培養維持過程でのインプリンティング領域のメチル化の変化の有無を調べる。

3)iPS 細胞より下垂体-視床下部神経への分化誘導を行い、疾患モデルを探索すると共に、分化誘導後にインプリンティング領域のメチル化状態の変化のしやすさを調べる。

4 . 研究成果

1) iPS 細胞樹立に関して、本領域はメチル化維持に重要と考えられ、ゲノム編集により欠失させても、培養維持が困難であった。脱メチル化剤を用いた解析において、本領域の脱メチル化を一過性に生じさせても、自然修復しやすい領域であることがしられている。

2)本領域が大きく欠失している血液細胞より iPS 細胞を作成したが、10株における検討では、脱メチル化はみとめなかった。5-10%で生じる事象とかんがえると、さらに Nを増やす検討が必要と思われる。

3)脱メチル化現象が、iPS 細胞化以外にも、神経分化途中、視床下部細胞への分化途中でも生じるかを検討した。合計100日におよび分化誘導をおこなった視床下部細胞においても該当領域が由来細胞と異なり脱メチル化することはなかった。インプリンティング領域の脱メチル化およびメチル化維持は、未分化状態において特に重要なはたらきを有すると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Akisa Nemoto, Hironobu Okuno, Hideyuki Okano
2. 発表標題 Modeling Prader-Willi syndrome using hypothalamic neurons from patient-derived induced pluripotent stem cells
3. 学会等名 第64回神経化学会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akisa Nemoto, Hironobu Okuno, Hideyuki Okano
2. 発表標題 Generation of Hypothalamic Cell Model of Prader-Willi Syndrome Using Patient-derived induced Pluripotent Stem Cells
3. 学会等名 The 2021 Tokyo International Symposium（国際学会）（国際学会）
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------