

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790340

研究課題名（和文） エピジェネティック因子 MeCP2 による骨形成制御機構の解明

研究課題名（英文） The regulation of bone formation by epigenetic factor MeCP2

研究代表者 東元 健（HIGASHIMOTO KEN）

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：30346887

研究成果の概要（和文）：MeCP2 遺伝子はレット症候群の原因遺伝子である。レット症候群は、神経発達障害による精神遅滞を示すが、それ以外に骨減少症がしばしばおこることが知られている。しかしながら、骨減少症の発症メカニズムは不明である。今研究では、レット症候群のモデルマウスである MeCP2 欠損マウスの大腿骨を解析し、骨形成における MeCP2 の役割を調べた。その結果、MeCP2 は骨形成には関与しないことが分かった。レット症候群における骨減少症は、神経発達障害による運動障害によって2次的に引き起こされていると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Mutations in the MeCP2 gene are a cause of Rett syndrome. One of feature of Rett syndrome is mental retardation by progressive neurologic developmental disorder. Although it is also known that osteopenia often occurs, the mechanism is unknown. In this study, it was investigated the role of MeCP2 in the bone formation using MeCP2 null femurs. The results of the analysis showed that MeCP2 was not involved in the bone formation. The cause of osteopenia in Rett syndrome may be movement problem by neurologic developmental disorder.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2010年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2011年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：細胞・組織、発生・分化

1. 研究開始当初の背景

(1) MeCP2: 個体を形成する様々な細胞は、全て同一のゲノムを有しているが、その機能や形態は多様性に富む。これは、同一ゲノムからの遺伝子発現パターンが異なることに起因する。この異なる発現パターンの形成には、DNA メチル化、ヒストン化学修飾やクロマチンリモデリング因子などのエピジェネ

ティック因子による遺伝子発現制御が重要である。エピジェネティック因子の1つである MeCP2 は、メチル化 DNA に結合する蛋白質であり、リクルートするコファクターの種類を変えることにより、標的遺伝子の転写を正あるいは負に制御する。また、この MeCP2 による遺伝子発現制御は、細胞の分化・増殖に関与していることが知られている。

(2) MeCP2 と骨減少症：MeCP2 遺伝子は、X 染色体上にあり、レット症候群の原因遺伝子である。レット症候群は、乳幼児期の神経発達障害による精神遅滞を示す。また、神経発達障害以外に骨減少症がしばしばおこることが知られている。実際、9-14 歳の患児の腸骨を定量的骨組織形態計測で調べた結果、骨量や骨形成率の減少が報告されている。また、骨組織において骨芽細胞の供給源となる骨髄由来間葉系幹細胞は極めて重要である。患児と正常人の間葉系幹細胞の比較から、レット症候群患者由来の幹細胞は、本来持つ自己複製能が阻害され、未分化な状態からやや分化した傾向を示すことが報告されている。これらのことを考えると、MeCP2 は骨形成において機能的に重要な分子であることが予想される。しかしながら、骨形成において、エピジェネティックな制御機構を視点とした研究は、国内外においてほとんどなかった。

2. 研究の目的

(1) レット症候群のモデルマウスを使用し、MeCP2 による骨形成制御機構を明らかにする。

(2) 癌間質における MeCP2 の役割を検討する(追加研究)。

(3) 皮膚組織における MeCP2 の役割を検討する(追加研究)。

3. 研究の方法

(1) MeCP2 による骨形成制御機構の解明

レット症候群のモデルマウスである MeCP2 欠損マウス(雄：MeCP2^{-/y})を使用した。神経症状発症による運動障害に起因する骨への影響を排除する為に、2 週齢のマウスを野生型と比較した。方法は、マウスをネブタール麻酔下で灌流固定後、大腿骨を摘出し再度固定液に一昼夜浸漬させた。その後、筋肉などの周辺組織を取り除き、緩衝液で洗浄後、EDTA にて脱灰した。パラフィン包埋後、3-5 ミクロンの切片を作製し、HE 染色後、顕微鏡下で大腿骨の骨の性状を観察した。

(2) 癌間質における MeCP2 の役割

新生仔マウスの体表面をネグミン液にて消毒後、皮膚を剥離し、PBS にて洗浄した。その後、皮膚を短冊上に切断し、ディスペーゼ液に浸漬させることにより表皮と真皮を分離した。そして、真皮の部分を培養液に浸し培養を行った。この方法により MeCP2 欠損初代線維芽細胞と野生型初代線維芽細胞を複数樹立した。これら細胞を用いて、マウスメラノーマ細胞(B16)の浸潤能力に与える影響を invasion assay により解析した。

(3) 皮膚組織における MeCP2 の役割
高齢になると MeCP2^(-/+)雌マウスは時折、MeCP2 欠損雄マウスは必ず皮膚病変を発症した。その皮膚病変を HE 染色し、病理学的に解析した。

4. 研究成果

(1) MeCP2 による骨形成制御機構の解明

2 週齢の MeCP2 欠損マウスと野生型マウスの大腿骨を HE 染色し比較した結果、骨芽細胞と破骨細胞の数は同等であり、骨組織にも特に異常を認めなかった。この結果は、2 週齢の時点では、少なくとも MeCP2 が骨芽細胞と破骨細胞への分化、さらに骨形成制御機構に関与していないことを示す。しかしながら、このマウスでは、神経発達障害による運動障害が 3 週齢以降に発症するため、大人に至るまでの骨の経緯時変化を調査できない。また、2 週齢のマウスの大腿骨はあまりにも小さく、その骨髄から間葉系幹細胞を分離できないため、その後の生化学的な解析と骨の性状を定量化するマイクロ CT による解析を行うことができなかった。これらのことから、骨芽細胞特異的に MeCP2 を欠損させるようなコンディショナルノックアウトマウスを使用した研究が望まれる。

(2) 癌間質における MeCP2 の役割

癌において、腫瘍抑制遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化による遺伝子発現抑制はよく知られている。MeCP2 は、その DNA メチル化を認識し、その抑制を確立するのに必要な 1 つの因子である。しかしながら、癌そのものでなく、癌間質における MeCP2 の役割が存在するかどうか検討されたことはない。これを明らかにするため、*in vitro* において、MeCP2 欠損線維芽細胞が、マウスメラノーマ細胞(B16)の浸潤能力に与える影響を invasion assay により検討した。その結果、その浸潤程度に野生型と MeCP2 欠損線維芽細胞間で有意な差を見いだす事はできなかった。

(3) 皮膚組織における MeCP2 の役割

MeCP2 欠損マウスに生じた皮膚病変部を HE 染色後、顕微鏡下で観察したところ、上皮の基底膜層を欠如していた。このことは、MeCP2 の欠損によって基底膜層にある幹細胞が正常なライフサイクルを失い、治癒機転がうまく働いていない可能性を示唆しているかもしれない。

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 5 件)

- ① Higashimoto K, Nakabayashi K, Yatsuki H, Yoshinaga H, Jozaki K, Okada J, Watanabe Y, Aoki A, Shiozaki A, Saito S, Koide K, Mukai T, Hata K, Soejima H. Aberrant methylation of H19-DMR acquired after implantation was dissimilar in soma versus placenta of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet Part A*, 査読有、in press
- ② Al-Dhaheri M, Wu J, Skliris GP, Li J, Higashimoto K, Wang Y, White KP, Lambert P, Zhu Y, Murphy L, Xu W. CAR1 is an important determinant of ER α -dependent breast cancer cell differentiation and proliferation in breast cancer cells. *Cancer Res*. 査読有、71 (6): 2118-2128, 2011.
- ③ Aoki A, Shiozaki A, Sameshima A, Higashimoto K, Soejima H, Saito S. Beckwith-Wiedemann syndrome with placental chorangioma due to H19-DMR hypermethylation: A Case Report. *J Obstet Gynaecol Res*. 査読有、37 (12): 1872-1876, 2011.
- ④ Yamamoto S, Toyama D, Yatsuki H, Higashimoto K, Soejima H, Isoyama K. Acute megakaryocytic leukemia (AMKL, FAB:M7) with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Pediatr Blood Cancer*. 査読有、55 (4): 733-735, 2010.
- ⑤ Joh K, Yatsuki H, Higashimoto K, Mukai T, Soejima H. Antisense transcription occurs at the promoter of a mouse imprinted gene, *Commd1*, on the repressed paternal allele. *J Biochem*. 査読有、146 (6): 771-774, 2009.

〔学会発表〕 (計 19 件)

- ① Soejima H (発表者), Nakabayashi K, Yatsuki H, Jozaki K, Hata K, Higashimoto K. Aberrant methylation of H19-DMR acquired after implantation was dissimilar in soma versus placenta of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011. 12. 13~16. 横浜.
- ② Miyazaki H, Higashimoto K, Yada Y, Komori T, Matsuda M, Koseki Y, Nakayama M, Soejima H, Handa H, Koseki H, Hirose S, Nishioka K (発表者). Histone H3 Lys36 methylation by Ash11 triggers a regulatory cascade of the chromatin reprogramming that counteracts Polycomb silencing. 第 34 回日本分子生物学会、2011. 12. 13~16. 横浜.

- ③ 副島英伸 (発表者)、城崎幸介、八木ひとみ、前田寿幸、大塚泰史、東元 健. 本邦 Beckwith-Wiedemann 症候群の臨床像とゲノム・エピゲノム解析. 180 超例の解析により明らかとなった本邦 Beckwith-Wiedemann 症候群の臨床像とゲノム・エピゲノム変異. 日本人類遺伝学会第 56 回大会・第 11 回東アジア人類遺伝学会、2011. 11. 9~12. 幕張.
- ④ 三好潤也 (発表者)、岡島 翠、松尾雄児、坂口 勲、大場 隆、片渕秀隆、東元 健、副島英伸. Beckwith-Wiedemann 症候群に間葉性異形成胎盤を合併し、両者のインプリンティング異常に乖離を呈した 1 例. 第 19 回日本胎盤学会学術集会、2011. 9. 30~10. 1. 東京.
- ⑤ Soejima H (発表者), Nakabayashi K, Yatsuki H, Jozaki K, Hata K, Higashimoto K. Acquisition of aberrant hypermethylation after implantation induces discordant hypermethylation at H19-DMR between bodies and placentas in Beckwith-Wiedemann syndrome patients. *Idibell Cancer Conferences on Imprinting and Beyond; "Mono-allelic expression in Health and Disease*. 2011. 9. 21. ~23. Barcelona, Spain.
- ⑥ 岡田純一郎 (発表者)、東元 健、八木ひとみ、芳野 信、副島英伸、渡邊順子. p57KIP2 (KIP2) の遺伝子変異を認めた Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) の 1 例. 第 34 回日本小児遺伝学会学術集会、2011. 8. 11. 横浜.
- ⑦ 三好潤也 (発表者)、坂口 勲、大場 隆、片渕秀隆、副島英伸、東元 健. Beckwith-Wiedemann 症候群に間葉性異形成胎盤を合併し、両者のインプリンティング異常に乖離を呈した 1 例. 遺伝医学合同学術集会、2011. 6. 16~19. 京都.
- ⑧ 副島英伸 (発表者)、城崎幸介、八木ひとみ、前田寿幸、大塚泰史、東元 健. 本邦 Beckwith-Wiedemann 症候群の臨床像とゲノム・エピゲノム解析. 遺伝医学合同学術集会、2011. 6. 16~19. 京都.
- ⑨ Higashimoto K, Yada Y, Komori T, Matsuda M, Koseki Y, Nakayama M, Soejima H, Handa H, Koseki H, Hirose S, Nishioka K (発表者). Role of Ash11 for transcriptional pause release. 第 33 回日本分子生物学会年会、2010. 12. 7~10. 神戸.
- ⑩ Yoshinaga H, Higashimoto K, Yatsuki H, Maeda T, Ohtsuka Y, Jozaki K, Nakabayashi K, Hata K, Yoshiura KI, Soejima H (発表者). Clinical features and genome/epigenome analyses of Japanese patients with

Beckwith-Wiedemann syndrome. 第33回日本分子生物学会年会、2010.12.7~10.神戸.

- ⑪ 副島英伸 (発表者)、吉永北斗、東元 健、八木ひとみ、前田寿幸、大塚泰史、中林一彦、秦 健一郎、吉浦孝一郎. 本邦 Beckwith-Wiedemann 症候群の臨床像とゲノム・エピゲノム解析. 日本人類遺伝学会第55回大会、2010.9.30~10.1.埼玉.
- ⑫ 副島英伸 (発表者)、東元 健. インプリンティング疾患 Beckwith-Wiedemann 症候群本邦例の臨床像とゲノム・エピゲノム解析. 第69回日本癌学会学術総会、2010.9.22~24.大阪.
- ⑬ 吉永北斗 (発表者)、東元 健、八木ひとみ、中林一彦、秦 健一郎、吉浦孝一郎、副島英伸. 本邦 Beckwith-Wiedemann 症候群の臨床像とゲノム・エピゲノム解析. 第4回日本エピジェネティクス研究会年会、2010.5.28-29.鳥取.
- ⑭ Higashimoto K, Yada Y, Komori T, Matsuda M, Koseki Y, Nakayama M, Soejima H, Handa H, Koseki H, Hirose S, Nishioka K (発表者). A role of histone methylation by ASH1L in the establishment of transcriptional memory. Cold Spring Harbor Conferences Asia (Epigenetics, Chromatin & Transcription). 2010.5.17~21.China.
- ⑮ 東元 健 (発表者)、八木ひとみ、岡田純一郎、渡邊順子、副島英伸. H19-DMR のメチル化インプリントは正常発生過程で変化しうる. 第32回日本分子生物学会年会、2009.12.9-12.横浜.
- ⑯ Higashimoto K, Yada Y, Komori T, Matsuda M, Koseki Y, Nakayama M, Soejima H, Handa H, Koseki H, Hirose S, Nishioka K (発表者). Histone methylation by mammalian Ash1l facilitates induction of Hox genes in response to retinoic acid, thereby contributes to acquisition of proper identities of cervical vertebrae. 第32回日本分子生物学会年会、2009.12.9-12.横浜.
- ⑰ 東元 健 (発表者)、八木ひとみ、岡田純一郎、渡邊順子、副島英伸. H19-DMR のメチル化インプリントは正常発生過程で変化しうる. 第54回日本人類遺伝学会、2009.9.23-26.東京.
- ⑱ Higashimoto K, Yada Y, Komori T, Matsuda M, Koseki Y, Nakayama M, Soejima H, Handa H, Koseki H, Hirose S, Nishioka K (発表者). Histone methylation by mammalian Ash1l facilitates induction of Hox genes in response to retinoic acid, thereby

contributes to acquisition of proper identities of cervical vertebrae. Cold Spring Harbor Meeting 2009 Mechanism of Eukaryotic Transcription.

2009.8.25-29. New York, United States.

- ⑲ 西久保敏也 (発表者)、田中一郎、八木ひとみ、東元 健、副島英伸、高橋幸博. Beckwith-Wiedemann 症候群の遺伝子診断. 第32回日本小児遺伝学会学術総会、2009.4.16.奈良.

[図書] (計1件)

- ① 東元 健、副島英伸. Beckwith-Wiedemann 症候群、小児科・小児疾患における臨床遺伝学の進歩、第50巻、第7号、1046-1052、2009. 金原出版.

[その他]

ホームページ等

<http://www.biomol.med.saga-u.ac.jp/mbg/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東元 健 (HIGASHIMOTO KEN)
佐賀大学・医学部・助教
研究者番号：30346887

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

小守 壽文 (KOMORI TOSHIHISA)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：00252677

木住野 達也 (KISHINO TATSUYA)
長崎大学・先導生命科学研究支援センター・准教授
研究者番号：70315232

宮崎 敏博 (MIYAZAKI TOSHIHIRO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：10174161