

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461554

研究課題名(和文) Sotos症候群における刷り込み遺伝子制御領域のメチル化異常発生メカニズムの解明

研究課題名(英文) Aberrant DNA methylation at imprinting control regions in Sotos syndrome

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Sotos症候群 (SoS) と Beckwith-Wiedemann症候群 (BWS) は、各々、NSD1の変異あるいは欠失によるハプロ不全、11p15.5刷り込み領域のDNAメチル化異常によって発症する。このように両疾患の原因は異なるが、共に過成長疾患であり、その表現型が類似する場合がある。

本研究ではNSD1の変異と欠失持つSoS患者末梢血DNAにおいて、11p15.5領域にDNAメチル化異常が生じていることを明らかにした。また、このDNAメチル化異常を模した細胞は、BWSで過剰発現する成長因子遺伝子の発現上昇を示した。これらは、両疾患の類似性を説明するかもしれない。

研究成果の概要(英文)：The cause of Sotos syndrome (SoS) and Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) is haploinsufficiency of NSD1 due to intragenic mutations and submicroscopic deletions and aberrant methylation in imprinting regulatory regions at 11p15.5, respectively. These two syndromes belong to overgrowth syndrome and the phenotype is occasionally similar, although the cause is different.

In this study, we showed that aberrant DNA methylation aroused at 11p15.5 in peripheral blood DNA derived from SoS patients. In addition, the HEK293 cells treated by DNA-demethylating agent mimicked the aberrant methylation in SoS patients and the cells increased the expression of growth factor related gene, which is overexpressed in BWS. These suggest that it might be possible to explain the similarity between both syndromes.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：Sotos症候群 NSD1 Beckwith-Wiedemann症候群 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

(1) Sotos 症候群 (SoS) と NSD1

本疾患は、出生前から学童期まで継続する過成長、骨年齢促進、特異顔貌、精神遅滞を特徴とする疾患である。また、2~3%の患児にウィルムス腫瘍などの腫瘍を合併する。その原因は、5q35 に位置する *NSD1* の片アレルのみの変異・欠失である (ハプロ不全)。NSD1 にはメチル化酵素活性を示す SET ドメインが存在し、ヒストン H3 リジン 36 をモノ・ジメチル化 (H3K36me1・H3K36me2) する。一般的に、このようなヒストン修飾は、転写制御、細胞分裂、DNA 修復などに関与するが、NSD1 に関しては、転写制御における役割とその標的遺伝子がわずかに判明しているのみである。

(2) DNMT3A とヒストン H3K36 トリメチル化 (H3K36me3)

DNMT3A は、刷り込み遺伝子に関連する DNA メチル化可変領域 (differentially methylated region: DMR) の確立に重要な因子である。DMR とは、両親由来の片側のアレルのみに DNA メチル化が存在し、もう一方のアレルは非メチル化状態として存在する DNA 領域のことである。この DMR は、両親由来の片側アレルのみから発現する刷り込み遺伝子の発現制御に極めて重要である。プロモーター領域の DNA メチル化は、遺伝子の転写を抑制するので、刷り込み遺伝子では非メチル化アレルのみから転写が認められる。

近年、SoS 患者由来のリンパ芽球において H3K36me3 の減少が示された。これは、*NSD1* のハプロ不全により H3K36me2 が減少し、2 次的に生じていると考えられている。一方、刷り込み遺伝子制御領域の DMR の確立に重要な DNMT3A は、その PWWP ドメインにより H3K36me3 を認識する。つまり、SoS における H3K36me3 の減少は、DNMT3A のリクルートに影響を与え、刷り込み遺伝子制御領域の DNA メチル化レベルを低下させる可能性がある。その結果、刷り込み遺伝子の発現に影響を及ぼすと考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、SoS において異常な DNA メチル化状態を示す刷り込み遺伝子制御領域を同定し、同領域の NSD1 による DNA メチル化制御メカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 臨床検体

NSD1 点変異 20 例、欠失 11 例の計 31 例の SoS 患者由来の末梢血 DNA とコントロールとして正常小児由来末梢血 24 例を用いた。

(2) 刷り込み制御領域 (DMR) のメチル化状

態の解析

上述の臨床検体を用いて、既知の 35 カ所の DMR のメチル化状態を、2 種の定量的メチル化解析法にて解析した。具体的には、まず MassARRAY 法にてスクリーニングを行い、その後パイロシーケンス法にてその異常を確定した。

(3) DNA メチル化阻害薬による DNA 脱メチル化

HEK293 を DNA メチル化阻害薬 5-aza-2'-deoxycytidine にて処理し、SoS 末梢血で認められた DMR の DNA メチル化異常を再現した。その後、その DMR が存在する *IGF2* 遺伝子の発現を脱 DNA メチル化阻害薬処理前と後で定量的 RT-PCR にて比較した。

(4) NSD1 のノックダウン

NSD1 を標的にした 3 種類の shRNA ベクターを構築し、HEK293 にリポフェクション法にてトランスフェクションした。トランスフェクション 72 時間後に細胞を回収し、定量 RT-PCR により、NSD1 のノックダウン効率を解析した。

(5) ヒト多能性幹細胞株 (hPSC) NCCIT 細胞の内在性 NSD1 の C 末に 3xFLAG タグをノックイン

ウェスタンブロットやクロマチン免疫沈降に適した NSD1 抗体は市販されていなかった。そこで、レチノイン酸 (RA) で容易に分化誘導できる NCCIT 細胞の内在性 NSD1 の C 末に 3xFLAG タグをノックインすることを試みた。Addgene より CRISPR-Cas9 システムである pX330 プラスミドを購入し、NSD1 のストップコドンすぐ下流の配列を標的にしたプラスミドを構築した。さらに、NSD1 のストップコドンを欠失させ、その下流に 3xFLAG タグを in-frame でノックインするようにしたドナープラスミドを構築した。これら 2 つのプラスミドをリポフェクション法にてトランスフェクションした。その後、クローニングを行い、PCR にてスクリーニングした後、シーケンスとサザンブロットにて確認した。

(6) (5) で作成した細胞の RA 分化誘導能

(5) で作成した細胞:NCCIT NSD1-3xFLAG が親株同様に未分化能を維持し、RA による分化誘導能を保持しているかを定量 RT-PCR にて評価した。未分化マーカーとして *OCT3/4*、*NANOG*、分化マーカーとして *PAX6* を使用した。内部コントロールには、*GAPDH* を用いた。

(7) NCCIT NSD1-3xFLAG を用いた NSD1 の検出

抗 FLAG 抗体を用いて、ウェスタンブロ

ット、免疫沈降-ウエスタンブロットにて、内在性 NSD1 を検出した。

(8) クロマチン免疫沈降

NCCIT NSD1-3xFLAG において、抗 FLAG 抗体を用いたクロマチン免疫沈降を行うため、クロマチンの断片化条件を Bioruptor にて決定した。

4. 研究成果

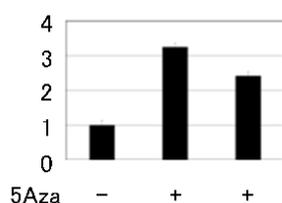
(1) SoS における刷り込み制御領域 DMR の異常メチル化

正常小児末梢血 DNA に比べて、メチル化レベルが 15%以上の違いを示す時、異常とした。認められたメチル化異常は、全て低メチル化異常であった。以下に異常の認められた DMR とその頻度を示す。ARHI-CG1 (6/31: 20%)、IGF2R-DMR2 (2/31: 6%)、IGF2-DMRO (15/31: 48%)、IGF2-DMR2 (3/31: 10%)、IG-DMR-CG6 (13/31: 42%)、TCEB3CpG (2/31: 6%)、USP29 (10/31: 32%)、GNASXL (1/31: 3%)。上記に示すように、約半数の症例で、IGF2-DMRO の低メチル化が認められた。IGF2-DMRO は BWS の原因遺伝子座 11p15.5 に位置する。BWS でこの刷り込みドメインに認められるメチル化異常は、H19DMR の高メチル化であり、IGF2 の過剰発現を引き起こすことが知られている。IGF2 は、成長因子であり、BWS の過成長の表現型に主要に関与することが知られている。一方、SoS では、バイサルファイトシーケンスにて H19DMR にはメチル化異常が起こっていないこと、IGF2-DMRO の低メチル化が両アレルに生じていることを確認した。

現在のところ、IGF2-DMRO の機能は分かっていない。しかしながら、大腸癌において、IGF2-DMRO の低メチル化は、H19DMR のメチル化状態非依存的に、IGF2 の過剰発現を引き起こすことが知られている。SoS における IGF2-DMRO の低メチル化が IGF2 の過剰発現を引き起こし、その過成長に関与する可能性が示唆された。

(2) IGF2-DMRO の機能解析

上述のように IGF2-DMRO の機能は不明である。そこで、HEK293 を DNA メチル化阻害薬 5-aza-2'-deoxycytidine:5Aza(0.5uM) にて処理し、IGF2-DMRO の低メチル化を生じさせ、その処理前後で、IGF2 の発現変化を定量 RT-PCR にて解析した (下図)。

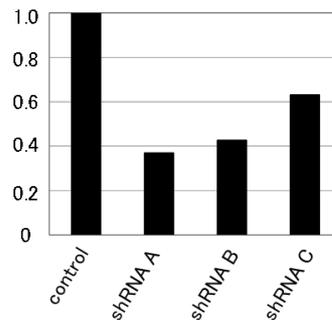


結果、5Aza 処理により、IGF2 の発現は 2.5 ~ 3 倍上昇した。

しかし、細胞への 5Aza 処理は、IGF2-DMRO 以外の DNA メチル化領域にも脱メチル化を生じさせるため、IGF2-DMRO の低メチル化が、本当に IGF2 の発現に影響を与えていることを直接的に証明しない。現在、CRISPR によって、IGF2-DMRO を欠失させることにより、その機能の解明を試みている。

(3) NSD1 ノックダウン

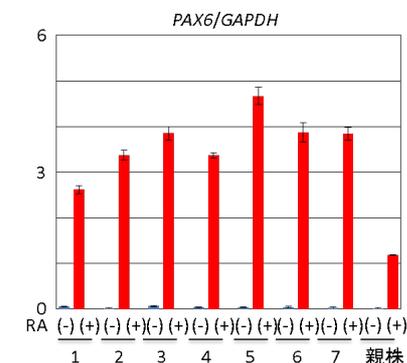
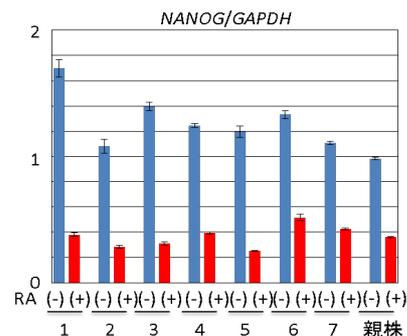
NSD1 を標的にした 3 種類の shRNA ベクターを構築し、HEK293 にてそのノックダウン効率を定量 RT-PCR にて評価した (下図)。



結果、shRNA A と B で約 60%ほどノックダウンすることができた。現在、この shRNA A と B を用い、HEK293 と NCCIT NSD1-3xFLAG にて stable cell line を樹立中である。今後、これら細胞とコントロール間で、IGF2-DMRO のメチル化、IGF2 の発現を比較する。

(4) NCCIT NSD1-3xFLAG の性質

樹立した NCCIT NSD1-3xFLAG が親株同様に未分化能を維持し、RA により分化誘導



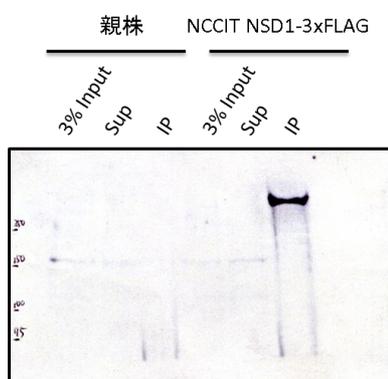
できるかを定量 RT-PCR にて解析した (上

図)。

7つの独立した NCCIT NSD1-3xFLAG クロオンを解析した。全てのクロオンは親株同様に、未分化では、*NANOG* と *OCT3/4* を強く発現していた (*OCT3/4* に関しては図省略)。これら細胞を RA により分化誘導すると、親株同様に *NANOG* と *OCT3/4* の発現が低下し、*PAX6* の発現が強く誘導された。*NSD1* についても、RA 処理前、後の発現解析を行ったが、親株同様に全てのクロオンでその発現量は変化しなかった。親株に比べると、発現量に差異を認めるが、基本的にこれらクロオンは未分化を維持し、RA による分化誘導ができることが分かった。

(5) NSD1 タンパクの検出

NCCIT NSD1-3xFLAG を用いて、クロマチン免疫沈降法 (ゲノム中の NSD1 の局在を解析する) が可能であることを調べるために、その whole extract を用いて、抗 FLAG 抗体にて、免疫沈降 ウェスタンブロットを行った (下図)。



結果、予想サイズにきれいな単一バンドを認めた。このことは、この細胞を用いた抗 FLAG 抗体によるクロマチン免疫沈降法により、内在性 NSD1 の局在をゲノム網羅的に調べることができることを示唆している。今後、ChIP-seq を行う予定である。

今後の展望

IGF2-DMRO の低メチル化が、SoS の過成長にどのように関与するかを明らかにするため、IGF2-DMRO を機能解析する。また、NSD1 による DMRO のメチル化制御の機構を明らかにする。以上により、なぜ、SoS の表現型が、時に、BWS の表現型に類似するかを説明可能にするのではないかと考える。

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8件)

1 Rumbajan JM, Yamaguchi Y, Nakabayashi K,

Higashimoto K, Yatsuki H, Nishioka K, Matsuoka K, Aoki S, Toda S, Takeda S, Seki H, Hatada I, Hata K, Soejima H, Joh K. The HUS1B promoter is hypomethylated in the placentas of low-birth-weight infants. *Gene*. 査読有、583 巻、2016、141-146
DOI: 10.1016/j.gene.2016.02.025.

Ohtsuka Y, Higashimoto K, Sasaki K, Jozaki K, Yoshinaga H, Okamoto N, Takama Y, Kubota A, Nakayama M, Yatsuki H, Nishioka K, Joh K, Mukai T, Yoshiura KI, Soejima H. Autosomal recessive cystinuria caused by genome-wide paternal uniparental isodisomy in a patient with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Clin Genet*. 査読有、88 巻、2015、261-266

DOI: 10.1111/cge.12496.

Takama Y, Kubota A, Nakayama M, Higashimoto K, Jozaki K, Soejima H. Fibroadenoma in Beckwith-Wiedemann syndrome with paternal uniparental disomy of chromosome 11p15.5. *Pediatr Int*. 査読有、56 巻、2014、931-934

DOI: 10.1111/ped.12406.

Maeda T, Higashimoto K, Jozaki K, Yatsuki H, Nakabayashi K, Makita Y, Tonoki H, Okamoto N, Takada F, Ohashi H, Migita M, Kosaki R, Matsubara K, Ogata T, Matsuo M, Hamasaki Y, Ohtsuka Y, Nishioka K, Joh K, Mukai T, Hata K, Soejima H. Comprehensive and quantitative multilocus methylation analysis reveals the susceptibility of specific imprinted differentially methylated regions to aberrant methylation in Beckwith-Wiedemann syndrome with epimutations. *Genet Med*. 査読有、16 巻、2014、903-12

DOI: 10.1038/gim.2014.46.

Higashimoto K, Jozaki K, Kosho T, Matsubara K, Fuke T, Yamada D, Yatsuki H, Maeda T, Ohtsuka Y, Nishioka K, Joh K, Koseki H, Ogata T, Soejima H. A novel de novo point mutation of the OCT-binding site in the IGF2/H19-imprinting control region in a Beckwith-Wiedemann syndrome patient. *Clin Genet*. 査読有、86 巻、2014、539-544

DOI: 10.1111/cge.12318.

Rumbajan JM, Maeda T, Souzaki R, Mitsui K, Higashimoto K, Nakabayashi K, Yatsuki H, Nishioka K, Harada R, Aoki S, Kohashi K, Oda Y, Hata K, Saji T, Taguchi T, Tajiri T, Soejima H, Joh K. Comprehensive analyses of imprinted differentially methylated regions reveal epigenetic and genetic characteristics in hepatoblastoma. *BMC Cancer*. 査読有、13 巻、2013、608

DOI: 10.1186/1471-2407-13-608.

Higashimoto K, Maeda T, Okada J, Ohtsuka Y, Sasaki K, Hirose A, Nomiyama M, Takayanagi T, Fukuzawa R, Yatsuki H, Koide K, Nishioka K, Joh K, Watanabe Y, Yoshiura K, Soejima H, Eur J Hum Genet、査読有、21 巻、2013、1316-1319

DOI: 10.1038/ejhg.2013.45.

Soejima H, Higashimoto K, Epigenetic and genetic alterations of the imprinting disorder Beckwith-Wiedemann syndrome and related disorders, J Hum Genet、査読有、58 巻、2013、402-409

DOI: 10.1038/jhg.2013.51.

〔その他〕

ホームページアドレス：
<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・分子生命科学講座・分子遺伝学・助教

研究者番号：30346887

(2) 連携研究者

松本直通 (MATSUMOTO, Naomichi)

横浜市立大学・医学部医学科・遺伝学・教授

研究者番号：80325638