

令和元年6月13日現在

機関番号：82643

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05362

研究課題名（和文）ヒドロキシメチル化に着目したインプリンティング異常症の病態解明と新規治療薬の開発

研究課題名（英文）Pathologic clarification and development of new medicine for imprinting disorders in terms of hydroxymethylation

研究代表者

山澤 一樹（Yamazawa, Kazuki）

独立行政法人国立病院機構（東京医療センター臨床研究センター）・その他部局等・医師

研究者番号：10338113

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：5-ヒドロキシメチル化シトシン（5hmC）は、DNA 脱メチル化反応における中間代謝産物として注目されている。本研究はメチル化異常に起因する小児のインプリンティング異常症において、5hmCが病態にどのように関与しているかを解明することを目的とする。方法として、疾患モデルiPS細胞および胎盤を解析し、5hmCの挙動を明らかにすることを試みた。その結果、iPS細胞においては全体的な5hmC含有量は親細胞である繊維芽細胞に比し増加していた。また、胎盤は血液と比較して5hmCの含有量が多く、特に胎盤のインプリンティング制御領域に5hmCが集簇して存在していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はインプリンティング異常症において5hmCの果たす役割を明らかにすることを目標とする、ヒト臨床検体を用いた世界初の5hmC解析である。不可逆的なゲノム配列の異常とは対照的に、メチル化をはじめとするエピゲノムは可塑性を持ち、治療の標的となる可能性がある。今回得られた知見はpreliminaryなものであるが、今後もサンプルを増やし広範に解析を行うことにより、メチル化・脱メチル化を制御することによるエピゲノム治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：5-hydroxymethyl cytosine (5hmC) has been noted as an intermediate metabolite in DNA demethylation reactions. The purpose of this study is to elucidate how 5hmC is involved in pathogenesis of imprinting disorders caused by methylation defects. We analyzed patient-derived iPS cells for disease model and placenta to clarify the dynamic behavior of 5hmC. The overall 5hmC content in iPS cells was increased compared to the skin fibroblasts. In addition, placenta had a higher content of 5hmC as compared to blood, and in particular, 5hmC was concentrated in the imprinting control regions in placental genome.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス メチル化 インプリンティング 先天異常症候群

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA シトシン塩基のメチル化は最も詳細に解析されているゲノムのエピジェネティック修飾であり、遺伝子のサイレンシング、細胞の分化増殖、X染色体不活化、ゲノムインプリンティング等に深く関与していることが知られている。ここでゲノムインプリンティングとは、母親と父親由来のゲノムにその親由来の起源が記憶される哺乳類に特有の現象であり、その結果、母方と父方から受け継がれた一对の対立遺伝子が識別され異なる発現を示す。母方と父方染色体とで異なるメチル化状態を呈する領域がインプリンティング遺伝子の発現を制御しており、インプリンティング調節領域 (Imprinting Control Region: ICR) と呼ばれる。ヒトの ICR における先天性のメチル化異常は、Silver-Russell 症候群 (SRS)、Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS)、Prader-Willi 症候群 (PWS)、Angelman 症候群 (AS)、鏡-緒方症候群 (KOS)、Temple 症候群 (TS) などの小児先天異常症候群の原因となる。一方で後天性のメチル化異常は、生活習慣病や癌、精神疾患等の原因となることが知られている。

メチル化をはじめとするエピジェネティックな DNA 修飾は可塑性を伴いダイナミックに変化するため、こうしたメチル化異常といった「エピ変異」は、DNA 配列そのものに起こる「変異」よりも高頻度で起こり、また容易に修復されると想定されるが、その機序は未だに解明されていない。特に、メチル基 -CH₃ を付与する酵素としては DNA メチル化酵素 DNMT の存在が知られているが、逆の脱メチル化が起きるメカニズムは全く不明であった。

2009 年、5mC の酸化反応により得られる 5hmC がマウス神経細胞や ES 細胞のゲノム DNA に存在することが相次いで報告された^{1,2)}。その後、ヒドロキシメチル化酵素 TET1-3 による脱メチル化カスケードの存在が示され、5hmC は 5mC C という DNA 脱メチル化反応の途中で合成されることが判明した³⁾。すなわち、5hmC は脱メチル化反応の中間代謝産物であり、A、T、C、G、5mC に次ぐ「第 6 の塩基」として現在大きな注目を集めている。特にメチル化によるエピジェネティックな転写制御という観点から、幹細胞・リプログラミング研究の分野で 5hmC に関する精力的な解析が行われており、ES 細胞の分化全能性維持のために *Nanog* 遺伝子プロモーターの 5hmC が必須であること⁴⁾、受精直後の脱メチル化リプログラミングに 5hmC が関与していること^{5,6)}など、重要な基礎的知見が次々に明らかとなっている。

特記すべきことに、5mC の検出のためにこれまで 20 年来、メチル化解析の標準的手法として頻用されてきたバイサルファイト処理による塩基置換では、5mC と 5hmC とを鑑別することができないことが判明した⁷⁾。この事実は、これまで 5mC と評価していたものの少なくとも一部は 5hmC である可能性があることを意味し、この結果、メチル化研究において大きなパラダイムシフトが起こりつつある。

しかしながら、メチル化とゲノムインプリンティングは密接に関与しているにも関わらず、ヒドロキシメチル化とゲノムインプリンティングの関係についての研究はこれまでほとんどなされていなかった。そこで我々は先行研究として、前述の KOS 症例を集積し、酸化バイサルファイト処理、パイロシーケンス法および DNA メチル化ビーズアレイという新規解析方法を用いて 5hmC の分布を解析し報告した⁸⁾。これは世界で初めてのヒトインプリンティング異常症における 5hmC に関する報告である。この報告によって KOS 症例における 5hmC の分布の一部が明らかとなり、また脳サンプルでの解析が重要であることが示され、また新たに開発した新解析法の有用性が証明された。

2. 研究の目的

本研究は、メチル化異常に起因する小児のインプリンティング異常症において、ヒドロキシメチル化が病態にどのように関与しているかを解明することが目的である。特に脳における 5mC/5hmC のダイナミックな挙動を明らかにし、メチル化・脱メチル化を制御することによって神経症状を改善する新規治療薬の開発・発見を目指す。

3. 研究の方法

従来のバイサルファイト (BS) 処理では、5hmC と 5mC とを識別することは不可能であったが、酸化バイサルファイト (oxBS) 処理を用いると識別可能となる。通常の BS 処理では、C が T に変換される一方で、5mC および 5hmC はどちらも変換されず、両者とも C となり区別できない。oxBS 処理では、まず過ルテニウム酸カリウムを用いた酸化反応によって 5hmC のみが 5-formylcytosine (5fC) に変換される。引き続いての BS 処理により、C と 5fC が T に変換される一方で、5mC は変換されず C と判定される。従って、未処理、BS、oxBS の三者の配列を比較することにより、一塩基の解像度で C、5mC、5hmC の同定が可能である。具体的には BS による定量値 (メチル化比率) は 5mC と 5hmC の合計であり、一方で oxBS によるそれは 5mC のみを含むため、BS から oxBS を差し引きすることで 5hmC の定量値が得られる。引き続いて oxBS 処理サンプルを DNA メチル化ビーズアレイで解析し、ゲノムワイドな 5hmC の分布を検討する (oxBS-array)。本法は申請者らの先行研究により、ヒトインプリンティ

ング異常症においてその有用性が実証されている⁸⁾。

我々はマウス脳の IG-DMR において、5mC の脱メチル化中間代謝産物である 5hmC が特徴的な分布を示し、神経分化に重要な役割を果たす可能性があるという preliminary なデータを得ている。代表的なインプリンティング異常症である KOS 患者では、インプリンティング調節領域 IG-DMR が高メチル化を示すこと、成長障害や精神運動発達遅滞が必発であること、また脳に 5hmC が大量に含まれていることから、KOS の特に神経組織における解析は重要である。患者の神経細胞に直接アクセスすることは困難であることから、疾患モデル神経細胞を対象として、5mC および 5hmC の挙動を明らかにすることを試みる。具体的には上述の oxBS-array 法を用いて、KOS 症例および KOS と真逆のメチル化異常、遺伝子発現異常を示す TS 症例の親細胞である皮膚繊維芽細胞、樹立した KOS/TS 症例由来 iPS 細胞、分化誘導した神経幹細胞を用いて 5hmC の分布について明らかにする。

4. 研究成果

KOS 欠失症例 4 例、KOS エピ変異症例 3 例、KOS と鏡像関係を示す TS 欠失症例 1 例より iPS 細胞を樹立し、神経幹細胞への分化誘導することに成功した。樹立した iPS 細胞に対しては特性解析を行い、多能性および三胚葉への分化能を確認した。これらを oxBS-array 法で解析した。iPS 細胞に関しては、全体的な 5hmC 含有量は親細胞である繊維芽細胞に比しわずかに増加しており、ばらつきが大きかった(図1)。 $\Delta\beta$ 値(5hmC レベルを表す数値、0 が非ヒドロキシメチル化、1 が完全なヒドロキシメチル化状態にあることを示す)が 0.1 以上を示した CpG 部位数は iPS 細胞で多く認められた(図2)。また、親細胞、iPS 細胞ともに、 $\Delta\beta > 0.1$ を示す CpG 部位は転写開始点(TSS)近傍や CpG island で少なく、親細胞、iPS 細胞の間で 5hmC の多い CpG 部位の分布パターンには大きな違いは認められなかった(図3)。

一方、iPS 細胞を分化誘導して得られた神経幹細胞においては、5hmC の含有量が非常に少なく、また細胞株間で計測値の幅が大きく、再現性のあるデータが得られなかった。

また、胎盤にはインプリンティング遺伝子が強く発現していることが知られているが、罹患児の胎盤組織を入手できたため、これに関しても同様の解析を実施した。解析の結果、胎盤は血液と比較して 5hmC の含有量が多く、特に胎盤のインプリンティング制御領域に 5hmC が集簇して存在していることが明らかになった。

今後、解析する細胞株数および胎盤数を増やし、5hmC とゲノムインプリンティング異常の関係について更に研究を進める計画である。

図1 各サンプルの $\Delta\beta$ 値

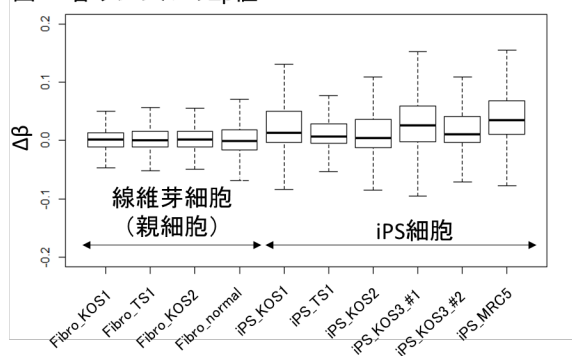


図2 $\Delta\beta > 0.1$ を示したCpG部位数

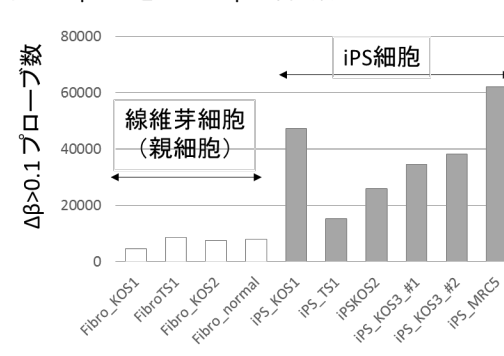
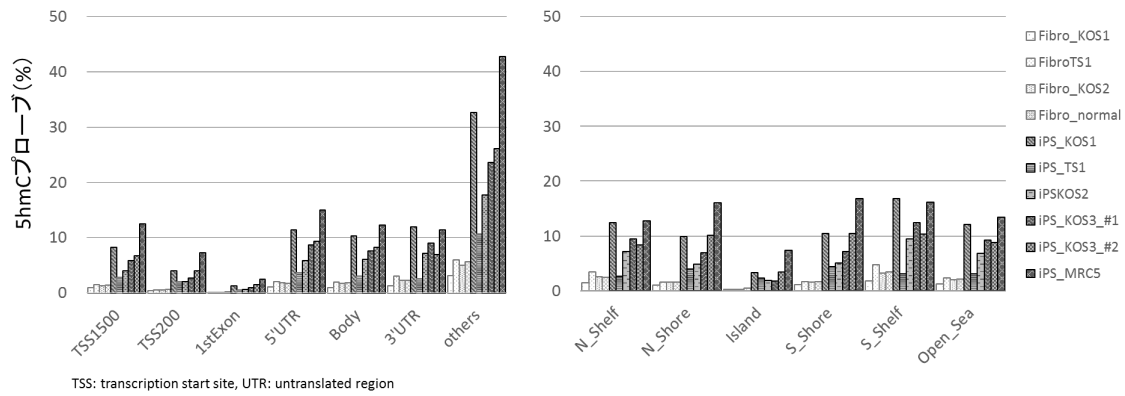


図3 $\Delta\beta > 0.1$ を示したCpG部位のgenomic feature



<参考文献>

- 1) Kriaucionis S et al. Science. 2009 May 15;324(5929):929-30.
- 2) Tahiliani M et al. Science. 2009 May 15;324(5929):930-5.
- 3) Guo JU et al. Cell. 2011 Apr 29;145(3):423-34.
- 4) Ito S et al. Science. 2011 Sep 2;333(6047):1300-3.
- 5) Wossidlo M et al. Nat Commun. 2011;2:241.
- 6) Nakamura T et al. Nature. 2012 Jun 3;486(7403):415-9.
- 7) Huang Y et al. PLoS One. 2010 Jan 26;5(1):e8888.
- 8) Matsubara K et al. Clin Epigenetics. 2015 Aug 28;7:90.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 19 件)

1. Inoue T, Yagasaki H, Nishioka J, Nakamura A, Matsubara K, Narumi S, Nakabayashi K, Yamazawa K, Fuke T, Oka A, Ogata T, Fukami M, Kagami M. Molecular and clinical analyses of two patients with UPD(16)mat detected by screening 94 patients with Silver-Russell syndrome phenotype of unknown etiology. J Med Genet 2018 Sep 21. pii: jmedgenet-2018-105463.
doi: 10.1136/jmedgenet-2018-105463.
2. Yamazawa K, Yamada Y, Kuroda T, Mutai H, Matsunaga T, Komiyama O, Takahashi T. Spontaneous intramural duodenal hematoma as the manifestation of Noonan syndrome. Am J Med Genet A 2018;176(2):496-498.
doi: 10.1002/ajmg.a.38556.
3. Matsubara K, Kagami M, Fukami M. Uniparental disomy as a cause of pediatric endocrine disorders. Clin Pediatr Endocrinol. 2018;27(3):113-121.
doi: 10.1297/cpe.27.113.
4. Hernandez Mora JR, Tayama C, Sánchez-Delgado M, Monteagudo-Sánchez A, Hata K, Ogata T, Medrano J, Poo-Llanillo ME, Simón C, Moran S, Esteller M, Tenorio J, Lapunzina P, Kagami M, Monk D, Nakabayashi K. Characterization of parent-of-origin methylation using the Illumina Infinium MethylationEPIC array platform. Epigenomics. 2018 Jul;10(7):941-954.
doi: 10.2217/epi-2017-0172.
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 2017;9:52.
doi: 10.1186/s13148-017-0350-6.
6. 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 Aug;55(8):567-570.
doi: 10.1136/jmedgenet-2017-104986.

7. Sano S, Nakamura A, Matsubara K, Nagasaki K, Fukami M, Kagami M, Ogata T. (Epi)genotype-Phenotype Analysis in 69 Japanese Patients With Pseudohypoparathyroidism Type I. *J Endocr Soc*. 2017 Nov 21;2(1):9-23. doi: 10.1210/js.2017-00293.
8. Suzuki E, Bo R, Sue K, Awano H, Ogata T, Narumi S, Kagami M, Sano S, Fukami M. A de novo 50-bp GNAS Intragenic Duplication in a Patient with Pseudohypoparathyroidism Type 1a. *Cytogenet Genome Res*. 2017;153(3):125-130. doi: 10.1159/000485644.
9. Ushijima K, Yatsuga S, Matsumoto T, Nakamura A, Fukami M, Kagami M. A severely short-statured girl with 47,XX, + 14/46,XX,upd(14)mat, mosaicism. *J Hum Genet*. 2018 Mar;63(3):377-381. doi: 10.1038/s10038-017-0381-z.
10. Inoue T, Nakamura A, Matsubara K, Nyuzuki H, Nagasaki K, Oka A, Fukami M, Kagami M. Continuous hypomethylation of the KCNQ10T1:TSS-DMR in monozygotic twins discordant for Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet A*. 2017 Oct;173(10):2847-2850. doi: 10.1002/ajmg.a.38419.
11. 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*. 2017 Dec;19(12):1356-1366. doi: 10.1038/gim.2017.53.
12. Dateki S, Kagami M, Matsubara K, Izumi K, Watanabe S, Nakatomi A, Kondoh T, Fukami M, Moriuchi H. Maternally derived 15q11.2-q13.1 duplication and H19-DMR hypomethylation in a patient with Silver-Russell syndrome. *J Hum Genet*. 2017 Oct;62(10):919-922. doi: 10.1038/jhg.2017.62.
13. Yamoto K, Saito H, Nakagawa N, Nakajima H, Hasegawa T, Fujisawa Y, Kagami M, Fukami M, Ogata T. De novo IGF2 mutation on the paternal allele in a patient with Silver-Russell syndrome and ectrodactyly. *Hum Mutat*. 2017 Aug;38(8):953-958. doi: 10.1002/humu.23253.
14. Kunitomi A, Yuasa S, Sugiyama F, Saito Y, Seki T, Kusumoto D, Kashimura S, Takei M, Tohyama S, Hashimoto H, Egashira T, Tanimoto Y, Mizuno S, Tanaka S, Okuno H, Yamazawa K, Watanabe H, Oda M, Kaneda R, Matsuzaki Y, Nagai T, Okano H, Yagami K, Tanaka M, Fukuda K. H1foo Has a Pivotal Role in Qualifying Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* 2016;6(6):825-33. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.04.015.
15. Wakeling EL, Brioude F, Lokulo-Sodipe O, O'Connell SM, Salem J, Bliiek J, Canton AP, Chrzanowska KH, Davies JH, Dias RP, Dubern B, Elbracht M, Giabicani E, Grimberg A, Grønskov K, Hokken-Koelega AC, Jorge AA, Kagami M, Linglart A, Maghnie M, Mohnike K, Monk D, Moore GE, Murray PG, Ogata T, Petit IO, Russo S, Said E, Toumba M, Tümer Z, Binder G, Eggermann T, Harbison MD, Temple IK, Mackay DJ, Netchine I. Diagnosis and management of Silver-Russell syndrome: first international consensus statement. *Nat Rev Endocrinol*. 2017 Feb;13(2):105-124. doi: 10.1038/nrendo.2016.138.
16. 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*. 2017 Apr;19(4):476-482. doi: 10.1038/gim.2016.123.
17. 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*. 2016 Jul;101(7):2623-7. doi: 10.1210/jc.2016-1725.
18. 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*. 2016 Jul;170(7):1938-41. doi: 10.1002/ajmg.a.37679.

19. Ogata T, Kagami M. Kagami-Ogata syndrome: a clinically recognizable upd(14)pat and related disorder affecting the chromosome 14q32.2 imprinted region. J Hum Genet. 2016 Feb;61(2):87-94.
doi: 10.1038/jhg.2015.113.

〔学会発表〕(計2件)

1. 山澤一樹. メチル化異常に起因する小児先天異常症候群においてヒドロキシメチル化が果たす役割の解明. 第51回日本小児内分泌学会, 梅田スカイビル(大阪府大阪市), 2017年9月28-30日
2. Yamazawa K, Matsubara K, Kagami M, Nakabayashi K, Hata K, Fukami M, Ogata T. Exploration of hydroxymethylation in Kagami-Ogata syndrome caused by hypermethylation of imprinting control regions. ICHG 2016 Annual Meeting, Kyoto (Japan), 2016年4月3-7日.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 鏡 雅代

ローマ字氏名: Masayo KAGAMI

所属研究機関名: 国立研究開発法人国立成育医療研究センター

部局名: 分子内分泌研究部

職名: 室長

研究者番号(8桁): 70399484

研究分担者氏名: 松原 圭子

ローマ字氏名: Keiko MATSUBARA

所属研究機関名: 国立研究開発法人国立成育医療研究センター

部局名: 分子内分泌研究部

職名: 研究員

研究者番号(8桁): 90542952

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 中林 一彦

ローマ字氏名: Kazuhiko NAKABAYASHI

研究協力者氏名: 松永 達雄

ローマ字氏名: Tatsuo MATSUNAGA

研究協力者氏名: 阿久津 英憲

ローマ字氏名: Hidenori AKUTSU

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。