

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：13501
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659519
 研究課題名（和文）精神発達分子同定のための次世代シーケンサーを用いた一卵性双生児比較ゲノム解析
 研究課題名（英文）Comparison of genomic and epigenomic expression in monozygotic twins using next-generation sequencing.
 研究代表者
 久保田 健夫 (KUBOTA TAKEO)
 山梨大学・医学工学総合研究部・教授
 研究者番号：70293511

研究成果の概要（和文）：精神・神経症状の重症度に差異を認めるレット症候群の一卵性双生児を対象に、ゲノム（配列あるいは修飾）の比較解析を行った。次世代シーケンサーによる配列解析の結果、ユニークな配列領域と繰り返し配列領域のいずれでも差異は認められなかった。一方、DNAチップを用いてのゲノムのDNAメチル化修飾を比較したところ、双子間で著しい差異が3遺伝子で見いだされ、これらは双子間の重症度差異に関係していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Discordance in disease manifestation between affected monozygotic twins has been attributed to either environmental factors or different patterns of X chromosome inactivation (XCI). However, recent studies have identified genetic and epigenetic differences between monozygotic twins, thereby challenging the accepted experimental model for distinguishing the effects of nature and nurture. Here, we report the genomic and epigenomic sequences in skin fibroblasts of a discordant monozygotic twin pair with Rett syndrome, an X-linked neurodevelopmental disorder characterized by autistic features, epileptic seizures, gait ataxia and stereotypical hand movements. In the twins, no reproducible differences were detected between the twins in single nucleotide polymorphisms (SNPs), insertion-deletion polymorphisms (indels), or copy number variations. Differences in DNA methylation between the twins were detected in fibroblasts in the upstream regions of genes involved in brain function and skeletal tissues, and thus, the differences in DNA methylation patterns likely underlie the discordance in Rett phenotypes between the twins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：ゲノム、遺伝子、精神発達障害、双生児、次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

国内・国外の研究動向

ヒトゲノム配列を基に迅速に塩基配列決定する新技術(個人ゲノムリシーケンス技

術)により、速く・安価に全ゲノム配列情報を得ることが可能となり(豊田ら、*Nature* 2008)、疾患遺伝子の同定にも応用されるようになった(*Clin Chem* 2009; *Hum Mol Genet* 2010)。これにより、同一とされてきた一卵

性双生児間の配列の違いを突き止めることが可能となった。最近、多発性硬化症の一卵性双生児間のゲノム配列比較がなされ、症状差異に関係する遺伝子は見いだせなかったと報告された (*Nature* 464:1351, 2010)。しかし、DNA の多型部分を中心に検討しただけであった (*Nature* 466:253, 2010)。一方、一卵性双生児間で配列が異なる場合は受精後の卵割後の突然変異が原因となるが、染色体規模の変異の報告はあったが (*Clin Genet* 2001; 久保田ら、投稿中)、DNA レベルでの報告はなかった。

着想に至った経緯

研究代表者の久保田は発達障害疾患における「ゲノム異常」 (*Clin Genet* 2003; *Am J Med Genet* 2007) や「エピゲノム異常」 (*Nat Genet* 1997; *Am J Med Genet* 2004; *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; *J Pharmacol Sci* 2010) を明らかにしてきた。一方連携研究者の佐々木は小児神経疾患の診療 (*Brain Dev* 2009; *Brain Dev* 2010) を通じて Rett 症候群双生児における臨床的差異 (論文投稿中) を、研究分担者の豊田は次世代シーケンス解析によりゲノム上の新知見 (*Nat Genet* 2008; *Genome Res* 2010) を見いだした。以上より本法による双子間比較に基づく精神発達関連遺伝子の探索の着想に至った。

これまでの研究成果

久保田は MeCP2 蛋白質異常症のレット症候群の対象に、「X 染色体不活化の関与」 (*Brain Dev* 2001)、「MeCP2 の脳グリア細胞発現」 (*Dev Brain Res* 2005)、「MECP2 遺伝子の新しい変異」 (*Clin Genet* 2006)、「MeCP2 被制御シナプス病態分子 (2010 年小児神経学会、論文投稿中)」を明らかにし、豊田は「先天代謝異常症遺伝子のヘテロ接合体が成人神経疾患の発症リスクとなること」 (*Arch Neurol* 2009) を明らかにした。

2. 研究の目的

本研究は、重症度の異なる一卵性双生児を対象に新手法に基づく完全ゲノム配列比較により病因遺伝子の同定と新しい遺伝学的知見の獲得をめざすものである。具体的には、神経症状とその発症経過が著しく異なるレット症候群 (MECP2 遺伝子変異を共有) の一卵性双生児を対象に、次世代シーケンス技術により双方の全ゲノム配列を完全に決定する。その上で、両者の比較により配列上の相違箇所をすべて明確にし、神経関連遺伝子上に存在する相違 (変異) を同定する。これにより、症状差異の要因となった遺伝子を明らかにする。その成果は、

臨床医学的には疾患遺伝子同定のための新奇アプローチ法の確立を、基礎医学的には受精卵の第 1 卵割後の過程での突然変異の DNA レベルでの実証をめざす「挑戦的萌芽研究」である。

3. 研究の方法

ヒトゲノム配列の全情報を背景にしたゲノムワイドな患者群共通変異の探索に基づく先天性疾患の責任遺伝子の同定など (*Nat Genet* 2009)、長年なしえなかった知見が得られる時代が到来した。一卵性双生児間の配列の相違において、後天的な変化に基づくその可能性は想定されていても、これまで実証する術がなかった。そのような中、近年、年を追うごとに解析機器が進歩し、今回使用した機器 (ソレクサ社製 GAIIX) は 100 億塩基対 (ヒトゲノムの 3 倍以上の配列) を短期間に解読する性能を有する。このような「整備されたゲノム情報と最新解析機器の活用に基づく遺伝子探索アプローチ」が本研究の方法である。

具体的には、2 年間の研究期間において、

【平成 23 年度】次世代シーケンサーを用いて双子双方の全塩基配列を決定し、双子間で塩基の違いを同定した。また対象患者のサンプルは連携研究者の佐々木が採取する。なおこの双生児はいずれも遺伝子検査でレット症候群と診断されていた (いずれも MECP2 遺伝子変異を有していた)。

【平成 24 年度】前年度の知見を土台に、配列差異の箇所が存在する神経関連遺伝子の同定 (豊田、久保田) と発現差異の証明 (久保田) を行った。

4. 研究成果

【平成 23 年度】

対象の一卵性双生児患者の末梢血リンパ球より抽出したゲノム DNA サンプルを Human 610-Quad BeadChips (イルミナ社) で解析した。その結果、24,474,618 の SNP 箇所 (全ゲノム SNP の 99.99%) の比較解析を行い、また、次世代 DNA シーケンサー (HiSeq2000 イルミナ社製) を用いて、ヒトゲノム全長にわたる塩基配列を決定し (個人ゲノムリシーケンスを実施)、得られた双子それぞれのゲノム配列データを、バイオインフォマティクス技術 (マッピングやアセンブリ) を用いて比較し、塩基配列の一卵性双生児間不一致箇所 (一塩基多型や構造多型を含む) の検出を試みた。以上の結果、19 の SNP 箇所、双子間の塩基配列の違い (疑い) が認められたが次世代シーケンサー配列決定情報からはい

ぞれの SNP 箇所とも配列の違いを確認することが出来なかった。

【平成24年度】

(1) Copy number variation比較 [担当：豊田、久保田]：

前年度は、次世代シーケンサーにより双子間の全ゲノム配列差異の同定を行い、その結果、調べた限り、ユニークな配列における塩基配列の相違 (SNP) は認められなかった。これを受けて、今年度は、繰り返し配列領域である Copy number variation (CNV) の違いの有無を探索した。方法としては、2,419,193箇所 CNVを解析対象とするイルミナ社の Human 610-Quad Beadchips を用いた。その結果、29カ所の相違候補箇所が見いだされた。しかしながら、digital PCR装置を用いた確認実験で、すべて再現性がとれなかった。このことから Beadchips のデータは擬陽性であると考えられた。

以上より、昨年の結果と合わせると、本研究の対象双子において、ユニークな塩基配列部分と繰り返し配列部分のいずれにおいても、配列の相違は認められないと結論づけられた。

(2) エピゲノム比較解析 [担当：久保田]：

ヒトゲノム上の45万カ所の CpG サイトが搭載されたイルミナ社の 450k BeadChip を用いて網羅的な DNA メチル化比較解析を行った。その結果、ほとんどの箇所では DNA のメチル化修飾のほど同様であったが (図1)、いくつかの箇所では DNA メチル化の双子間相違が認められた (図2)。

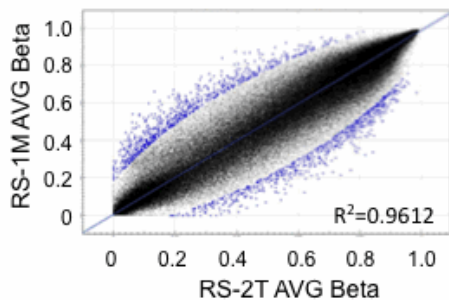


図1：DNA メチル化パターンの一卵性双生児姉妹の比較 (RS-2T が重症な姉、RS-1M が軽症な妹)。

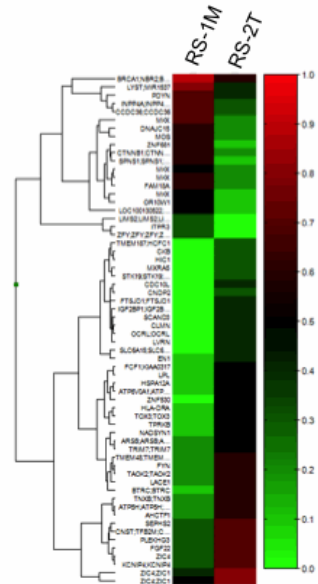


図2：D一卵性双生児姉妹で顕著な DNA メチル化パターンを呈したゲノム領域 (RS-2T が重症な姉、RS-1M が軽症な妹)。

BeadChip 解析で得られた特に顕著な差異が認められる領域について異なる DNA メチル化解析法である bisulfite sequencing 法確認した所、3つの遺伝子領域でメチル化差異が確認された (図3)。さらに発現解析を加えた結果、メチル化差異と呼応する遺伝子発現差異を認めた遺伝子が3つ同定された (図4)。これらは、本症候群の骨格異常の重症化との関連が推測される遺伝子 (*MKX*)、神経機能異常の重症化との関連が予測される2つの分子 (*CKB*, *FYN*) の遺伝子であった。

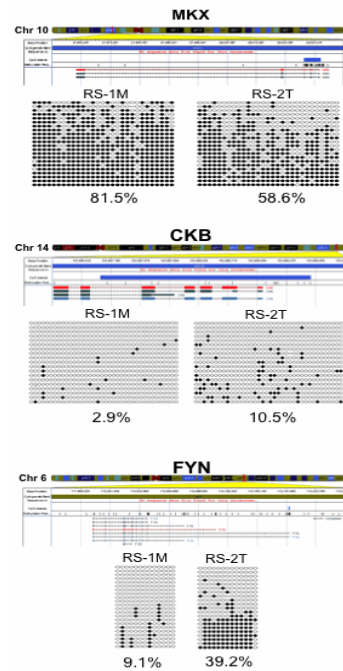


図3：Bisulfite seq 法による3遺伝子領域における双子間の DNA メチル化差異の確認

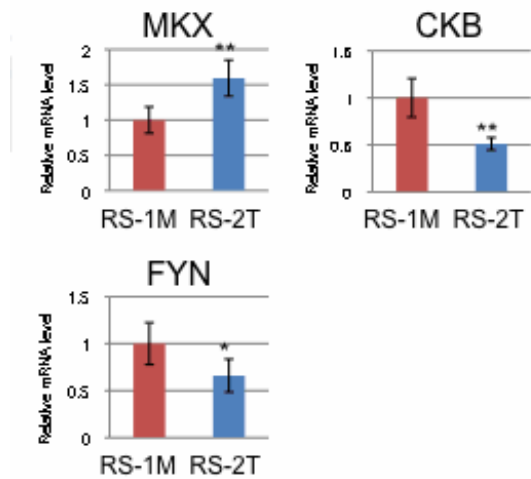


図4：定量RT-PCR法による3遺伝子における双子間のDNAメチル化の発現差異の確認

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13件)

- (1) Miyake K, Yang C, Minakuchi Y, Ohori K, Soutome M, Hirasawa T, Kazuki Y, Adachi N, Suzuki S, Itoh M, Goto Y, Andoh T, Kurosawa H, Oshimura M, Sasaki M, Toyoda A, Kubota T. Comparison of genomic and epigenomic expression in monozygotic twins discordant for Rett syndrome. PLoS ONE、査読有、2013 (印刷中), DOI:なし
- (2) Nakane T, Nakamura K, Hata S, Kamiya Y, Sato H, Kubota T, Sugita K. 6p subtelomere deletion with congenital glaucoma, severe mental retardation, and growth impairment. *Pediatr Int*、査読有り、Vol. 55、No. 3、2013、pp. 376-381, DOI:なし
- (3) Motizuki M, Isogaya K, Miyake K, Ikushima H, Kubota T, Miyazono K, Saitoh M, Miyazawa K. Olig1 is a Smad cofactor involved in cell motility induced by transforming growth factor- β . *J Biol Chem*、査読有、2013 (印刷中), DOI:なし
- (4) Nitta H, Unoki M, Ichiyanagi K, Kosho T, Shigemura T, Takahashi H, Velasco G, Franscastel C, Picard C, Kubota T, Sasaki H. Three novel ZBTB24 mutations identified in Cape Verdean type 2 ICF syndrome patients. *J Hum Genet*、査読有、2013 (印刷中), DOI:10.1038/jhg.2013.56
- (5) Miyake K, Hirasawa T, Soutome M, Itoh M, Goto Y, Endoh K, Takahashi K, Kudo S, Nakawaga T, Yokoi S, Taira T, Inazawa J, Kubota T. The protocadherins, PCDH1 and PCDH7, are regulated by MeCP2 in neuronal cells and brain tissues: implication for pathogenesis of Rett syndrome. *BMC Neurosci*、査読有り、Vol. 12、No. なし、2012、pp. 81, DOI:10.1186/1471-2202-12-81
- (6) Sakazume S, Ohashi H, Sasaki Y, Harada N, Nakanishi K, Sato H, Emi M, Endoh K, Sohma R, Kido Y, Nagai T, Kubota T. Spread of X-chromosome inactivation into chromosome 15 is associated with Prader-Willi syndrome phenotype in a boy with a t(X;15)(p21.1;q11.2) translocation. *Hum Genet*、査読有り、Vol. 131、No. 1、2012、pp. 121-130, DOI:10.1007/s00439-011-1051-4
- (7) Arai T, Oh-ishi T, Yamamoto H, Nunoi H, Kamizono J, Uehara M, Kubota T, Sakurai T, Kizaki T, Ohno H. Copy Number Variations due to Large Genomic Deletion in X-Linked Chronic Granulomatous Disease. *PLoS ONE*、査読有り、Vol. 7、No. 7、2012、pp. e27782, DOI:10.1371/journal.pone.0027782
- (8) Honda S, Hayashi S, Nakane T, Imoto I, Kurosawa K, Mizuno S, Okamoto N, Kato M, Yoshihashi H, Kubota T, Nakagawa E, Goto YI, Inazawa J. The incidence of hypoplasia of the corpus callosum in patients with dup (X)(q28) involving MECP2 is associated with the location of distal breakpoints. *Am J Med Genet A*、査読有り、Vol. 158A、No. 6、2012、pp. 1292-1303, DOI: 10.1002/ajmg.a.35321
- (9) Yoshimura K, Chen LC, Mandal MK, Nakazawa T, Yu Z, Uchiyama T, Hori H, Tanabe K, Kubota T, Fujii H, Katoh R, Hiraoka K, Takeda S. Analysis of Renal Cell Carcinoma as a First Step for Developing Mass Spectrometry-Based Diagnostics. *J Am Soc Mass Spectrom*、査読有り、Vol. 23、No. 10、2012、pp. 1741-1749, DOI:なし
- (10) Kubota T, Miyake K, Hirasawa T. Epigenetic understanding of gene-environment interactions in psychiatric disorders: a new concept of clinical genetics. *Clin Epigenetics*、査読有り、Vol. 4、No. 1、2012、pp. e1, DOI:10.1186/1868-7083-4-1
- (11) Kubota T, Hirasawa T, Miyake K. Epigenetic Mechanisms and Therapeutic Perspectives for Neurodevelopmental Disorders. *Pharmaceuticals*、査読有り、Vol. 5、No. なし、2012、pp. 369-383, DOI:なし

- (12) Miyake K, Hirasawa T, Koide T, Kubota T. Epigenetics in autism and other neurodevelopmental diseases. Adv Exp Med Biol, 査読有り、Vol.724、No.なし、2012、pp. 91-98, DOI: 10.1007/978-1-4614-0653-2_7
- (13) Sakurada Y, Mabuchi F, Yoneyama S, Kubota T, Iijima H. Polymorphisms in ARMS2 (LOC387715) and LOXL1 Genes in the Japanese With Age-Related Macular Degeneration. Am J Ophthalmol, 査読有り、Vol. 152、No. 3、2012、pp. 499, DOI:10.1016/j.ajo.2011.04.022

[学会発表] (計3件)

- (1) Hirasawa T, Ishida I, Miyake K, Endo A, Kubota T. The epigenetic regulation of glucocorticoid receptors in juvenile maternal separation stress. Biological basis of mental functions and disorders. The 32nd Naito Conference (Yamanashi)、2011. 10. 18-21.
- (2) Miyake K, Hirasawa T, Kubota T. Identificaiton of MeCP2-target synaptic molecules associated with pathogenesis of Rett syndrome. 第34回日本分子生物学会年大会(横浜). 2011. 12. 14 (13-16).
- (3) 平澤孝枝、石田哲史、田原佑里子、三宅邦夫、久保田健夫. 母子分離ストレスによるマウス脳海馬領域のグルココルチコイド受容体の発現変化. 第6回日本エピジェネティクス研究会(東京)、2012. 5. 14-15.

[図書] (計2件)

- (1) Kubota T, Miyake K, Hirasawa T, Onaka T, Yamasue H. Chapter: Epigenetic Modulation of Human Neurobiological Disorders. In "Epigenetics in human disease". Elsevier, 2012 (印刷中).
- (2) Kubota T, Miyake K, Hirasawa T. Section 4: Chromatin and Epigenetic Influences on DNA Replication, Chapter 13: The Mechanism of Epigenetic Modifications during DNA Replication. In "The Mechanisms of DNA Replicaiton". Intech (Open Access Publisher), 2012 (ISBN 978-953-51-0991-4), pp 333-350.

[その他]

ホームページ等

<http://www.epigenetmed.com>

(山梨大学医学部環境遺伝医学講座)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 健夫 (KUBOTA TAKEO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：70293511

(2) 研究分担者

豊田 敦 (TOYODA ATSUSHI)

国立遺伝学研究所・生物遺伝資源情報総合センター・特任准教授

研究者番号：10267495

(3) 連携研究者

佐々木 征行 (SASAKI MASAYUKI)

国立精神・神経医療研究センター病院・部長

研究者番号：60235273