

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：82643

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15478

研究課題名(和文) 遺伝性乳がん・卵巣がんにおいてメチル化・ヒドロキシメチル化が果たす役割の解明

研究課題名(英文) Exploring the role of methylation and hydroxymethylation in Hereditary Breast and Ovarian Cancer

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究事業を通じ、ゲノムDNA中に存在するヒドロキシメチル化を網羅的に解析する新規解析手法を新たに開発した。この方法を用いて、先天性のメチル化異常に起因する稀少疾患症例を対象としてヒドロキシメチル化の分布を解析し世界で初めて報告した。一方で遺伝性腫瘍に関しては、収集できた臨床検体が少なく、またDNAの変性が著しいため解析に難渋した。検体の再収集や再解析などが必要で想定よりも時間を要したため、研究期間内には新規知見の発見に至っていない。研究期間終了後も、本解析を継続している。

研究成果の概要(英文)：The novel method to analyze the distribution of methylation/hydroxymethylation in genomic DNA has been developed. Using this method, we first reported the hydroxymethylation status in congenital human imprinting disorders. Next, we have tried to analyze the blood and tumor samples derived from the hereditary tumor syndromes; however, a limited number of tumor samples and denaturation of DNA have created much difficulties in performing the analysis. It has taken more time than expected to re-collect and re-analyze human tumor samples, thus the investigation has yet to be completed. We are still conducting the analysis.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：遺伝性乳癌卵巣癌 遺伝性腫瘍 メチル化 ヒドロキシメチル化

1. 研究開始当初の背景

がんの多くは体細胞変異により発症するが、約5~10%のがんは遺伝的に世代を越えて継承される生殖細胞変異に起因し、若年発症、多臓器重複、血縁者内に複数が発症、といった特徴が認められる。BRAC1/2 遺伝子の生殖細胞変異は遺伝性乳がん・卵巣がん(以下、HBOC)の主たる原因であり、変異を有する患者の50~80%は新たな乳がんを発症する(Antoniou et al. Am J Hum Genet 2003)。しかしながら HBOC 患者の約半数には病的変異が認められず(Sugano et al. Can Sci 2008)、他に原因となる(エピ)ゲノム異常の存在が示唆される。

近年、生殖細胞系列におけるがん関連遺伝子のエピ変異(メチル化異常)と遺伝性腫瘍、特にリンチ症候群との関連が指摘されている(Hitchins et al. Cancer Cell 2011)。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、メチル化異常のエピ変異はDNA配列そのものに起こる変異よりも容易に起こり、また容易に修復されると想定され治療・創薬の標的として魅力的であると考えられるが、その発症メカニズムは未だ明らかでない。

2009年、5-メチルシトシン(5-methyl C: 5mC)の酸化反応により得られる5-ヒドロキシメチルシトシン(5-hydroxymethyl C: 5hmC)がマウス神経細胞やES細胞のゲノムDNAに存在することが報告され(Kriaucionis et al. Science 2009, Tahiliani et al. Science 2009)。以来、5hmCは「第6の塩基」として大きな注目を集めている。実際に5hmCに関して幹細胞や神経細胞研究の分野で精力的な解析が行われ重要な知見が次々と明らかになっているが、HBOCをはじめとする遺伝性腫瘍と5hmCの関連に関する研究はこれまで報告がなされていない。

研究代表者はケンブリッジ大学においてメチル化異常の研究に従事し、母体の低栄養の影響が5hmCを介して胎児に伝達されること(Radford et al. Science 2014)などの知見を報告してきた。今回、この経験を踏まえて、5hmCがHBOCをはじめとする遺伝性腫瘍の発症に関係しているのではないかと、という着想に至った。

2. 研究の目的

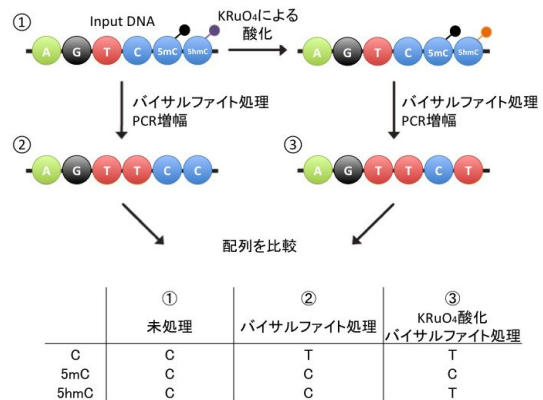
本研究は、HBOCおよびその他の遺伝性腫瘍において、メチル化およびヒドロキシメチル化が病態にどのように関与しているかを解明することが目的である。特に5hmCがDNA脱メチル化機構の中間代謝産物であることに着目し、遺伝性腫瘍において脱メチル化を促すことによるエピゲノム治療法の開発につながる知見の獲得を目指す。

3. 研究の方法

(1) 若年発症(40歳未満) (2) 多臓器重複

がん、(3) 血縁者に悪性腫瘍患者が多発、のいずれかの要件を満たし、遺伝性が示唆される乳がん、卵巣がんおよび関連がん患者とその血縁者を対象とする。末梢血および摘出組織の提供を受け、DNAの抽出を行う。このDNAを用い、メチル化ビーズチップアレイ(Illumina HumanMethylation 450 BeadChip Array)による網羅的なエピゲノム解析を行い、"methylome"を明らかにする。特にゲノムインプリンティング調節領域、組織特異的メチル化可変領域、DNaseI 高感受性領域(クロマチン構造弛緩部位)等に注目し、また末梢血と癌組織のメチル化の程度を比較することで、腫瘍発生に関わるエピゲノム異常を明らかにする。

次に5hmCに注目し、以下の方法により5mCと5hmCとを分けて検出する。従来のバイサルファイト法では、5hmCと5mCとを識別することは不可能であったが、最近、これを改良したoxBS法が発表された(Booth et al. Science 2012)。通常のBS法を行うと、CがTに変換される一方で、5mCおよび5hmCは変換されずCと判定される。oxBS法では、まず過ルテニウム酸カリウム(KRuO4)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。引き続いてのバイサルファイト処理により、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、元の配列、バイサルファイト処理、KRuO4酸化+バイサルファイト処理、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。



患者DNAをoxBS処理したのち、同様にビーズチップアレイによる解析を行う。ここで得られたデータは5hmCを含まず5mCそのものを反映していると想定されるため、5mCの結果と差し引きすることで一塩基レベルの解像度で5hmCの分布、"hydroxymethylome"が明らかとなる。

4. 研究成果

本研究に先立ち、oxBS法とビーズチップアレイを組み合わせた新規解析手法(oxBS-array法)を新たに開発し、先天性のメチル化異常に起因する稀少疾患症例を対象に、5hmCの分布を一塩基レベルでゲノム

ワイドに解析し報告した(Matsubara et al. Clin Epigenetics、研究代表者山澤が最終・責任著者)。本論文はヒトメチル化異常症例において 5hmC の分布を明らかにした初めての報告である。本手法によって、5mC および 5hmC の分布をゲノムワイドに探索することが可能となった。

この手法を用いて HBOC および関連がん症例検体の解析を開始した。しかしながら収集できた臨床検体、特に腫瘍組織検体が想定より少なく、また組織固定のため DNA の変性が著しかったため、oxBS 処理の実施に難渋した。この結果、臨床検体の再収集や再解析に多大な時間を要したため、HBOC およびその他の遺伝性腫瘍における methylome および hydroxymethylome の解明、および phenotype-(epi)genotype correlation の知見の獲得には研究期間内には至らなかった。研究期間終了後も、本解析を継続している。今後、より大規模に臨床検体を集積するとともに、oxBS 法をブラッシュアップし解析手法の改善を図ることで、遺伝性腫瘍における 5hmC の役割の解明および脱メチル化機構を介した治療法開発に繋がる知見の獲得を目指したい。

#### 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 28 件)

Matsushima K, Nakano A, Arimoto Y, Mutai H, Yamazawa K, Murayama K, Matsunaga T. High-level heteroplasmy for the m.7445A>G mitochondrial DNA mutation can cause progressive sensorineural hearing loss in infancy. *Intl J Ped Otorhinolaryng* 2018;108:125-131. 査読有  
doi: 10.1016/j.ijporl.2018.02.037.

河津桃子, 三春晶嗣, 鳥井健一, 雨宮あつこ, 鈴木絵理, 山澤一樹, 藤田尚代, 込山修, 樋口理, 中根俊成, 小平隆太郎, 高橋孝雄. 起立性低血圧症状で発症した自己免疫性自律神経節障害の 9 歳児例. *小児科臨床* 2018;71(1):47-53. 査読無  
<http://shoni-iji.com/paper/paper71-69/paper-71-1.html>

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. 査読有  
doi: 10.1002/ajmg.a.38556.

山澤一樹. 単為生殖とゲノムワイド片親性ダイソミー. *医学のあゆみ* 2017;263(4):317-321. 査読無  
<https://www.ishiyaku.co.jp/magazines/ayumi/AyumiArticleDetail.aspx?BC=926304&AC=17827>

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. 査読有  
doi: 10.1186/s13148-017-0350-6.

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. 査読有  
doi: 10.1016/j.stemcr.2016.04.015.

山澤一樹. 図説「目で見える遺伝医学」シリーズ ゲノム時代の到来と遺伝リテラシー. *国立医療学会誌 医療* 2016;70(2):106-109. 査読有  
<http://iryogakkai.jp/2016-70-02/106-9.pdf>

山澤一樹. 今月の用語 次世代シーケンサー. *国立医療学会誌 医療* 2015;69(8/9):383. 査読有  
<http://iryogakkai.jp/2015-69-08.9/383yogo.pdf>

Matsubara K, Kagami M, Nakabayashi K, Hata K, Fukami M, Ogata T, Yamazawa K. Exploration of hydroxymethylation in Kagami-Ogata syndrome caused by hypermethylation of imprinting control regions. *Clin Epigenetics* 2015;7(1):90. 査読有  
doi: 10.1186/s13148-015-0124-y

Strogantsev R, Krueger F, Yamazawa K, Shi H, Gould P, Goldman-Roberts M, McEwen K, Sun B, Pedersen R, Ferguson-Smith AC. Allele-specific binding of ZFP57 in the epigenetic regulation of imprinted and non-imprinted monoallelic expression. *Genome Biol* 2015;16(1):112. 査読有  
doi: 10.1186/s13059-015-0672-7

Kanno A, Mutai M, Namba K, Morita N, Nakano A, Ogahara N, Sugiuchi T, Ogawa K, Matsunaga T. Frequency and Specific Characteristics of the Incomplete Partition Type III Anomaly in Children. *Laryngoscope* 2017;127(7):1662-1669. 査読有  
doi: 10.1002/lary.26245.

Hosoya M, Fujioka M, Sone T, Okamoto S,

Akamatsu W, Ukai H, Ueda HR, Ogawa K, Matsunaga T, Okano H. Cochlear cell modeling using disease-specific iPSCs unveils a degenerative phenotype and suggests treatments for congenital progressive hearing loss. *Cell Rep* 2017;18(1):68-81. 査読有  
doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.020.

Kasakura-Kimura N, Masuda M, Mutai H, Masuda S, Morimoto N, Ogahara N, Misawa H, Sakamoto H, Saito K, Matsunaga T. WFS1 and GJB2 mutations in patients with bilateral low-frequency sensorineural hearing loss. *Laryngoscope* 2017; 127:E324–E329. 査読有  
doi: 10.1002/lary.26528.

Mutai H, Watabe T, Kosaki K, Ogawa K, Matsunaga T. Mitochondrial mutations in maternally inherited hearing loss. *BMC Medical Genetics* 2017; 18(1):32. 査読有  
doi: 10.1186/s12881-017-0389-4.

Kaneko Y, Nakano A, Arimoto Y, Nara K, Mutai H, Matsunaga T. The first sporadic case of DFNA11 identified by next-generation sequencing. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2017; 100:183-186. 査読有  
doi: 10.1016/j.ijporl.2017.07.007.

Yamamoto N, Mutai H, Namba K, Morita N, Masuda S, Nishi Y, Nakano A, Masuda S, Fujioka M, Kaga K, Ogawa K, Matsunaga T. Prevalence of TECTA mutation in patients with mid-frequency sensorineural hearing loss. *Orphanet J Rare Dis*. 2017; 12:157. 査読有  
doi: 10.1186/s13023-017-0708-z.

Masuda M, Mutai H, Arimoto Y, Nakano A, Matsunaga T. A novel frameshift variant of COCH supports the hypothesis that haploinsufficiency is not a cause of autosomal dominant nonsyndromic deafness 9. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016; 469(2):270-274. 査読有  
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.11.106.

Namba K, Mutai H, Takiguchi Y, Yagi H, Okuyama T, Oba S, Yamagishi R, Kaneko H, Shintani T, Kaga K, Matsunaga T. Molecular impairment mechanisms of novel OPA1 mutations predicted by molecular modeling in patients with autosomal dominant optic atrophy and auditory neuropathy spectrum disorder. *Otol Neurotol* 2016; 37(4):394-402. 査読有  
doi: 10.1097/MAO.0000000000000978.

Matsunaga T, Morimoto N. The auditory phenotype of children harboring mutations in the prestin gene. *Acta Otolaryngol* 2016; 136(4):397-401. 査読有

doi: 10.3109/00016489.2015.1126858.

Minami SB, Mutai H, Namba K, Sakamoto K, Matsunaga T. Clinical characteristics of a Japanese family with hearing loss accompanied by compound heterozygous mutations in LOXHD1. *Auris Nasus Larynx* 2016; 43(6):609-613. 査読有  
doi: 10.1016/j.anl.2016.02.010.

Wasano K, Matsunaga T, Ogawa K, Kunishima S. Late onset and high-frequency dominant hearing loss in a family with MYH9 disorder. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2016; 273(11):3547-3552. 査読有  
doi: 10.1007/s00405-016-3954-0.

Takano K, Ogasawara N, Matsunaga T, Mutai H, Sakurai A, Ishikawa A, Himi T. A novel nonsense mutation in the NOG gene causes familial NOG-related symphalangism spectrum disorder. *Hum Genome Variation* 2016; 3:16023. 査読有  
doi: 10.1038/hgv.2016.23.

Kitao K, Mizutari K, Nakagawa S, Matsunaga T, Fukuda S, Fujii M. Recovery of endocochlear potential after severe damage to lateral wall fibrocytes following acute cochlear energy failure. *Neuroreport* 2016; 27(15):1159-1166. 査読有  
doi: 10.1097/WNR.0000000000000673.

Yamashita D, Sun GW, Cui Y, Mita S, Otsuki N, Kanzaki S, Nibu KI, Ogawa K, Matsunaga T. Neuroprotective effects of cutamesine, a ligand of the sigma-1 receptor chaperone, against noise-induced hearing loss. *J Neurosci Res* 2015; 93:788–795. 査読有  
doi: 10.1002/jnr.23543.

Mutai H, Miya F, Fujii M, Tsunoda T, Matsunaga T. Attenuation of Progressive Hearing Loss in DBA/2J Mice by Reagents that Affect Epigenetic Modifications Is Associated with Up-Regulation of the Zinc Importer Zip4. *PLoS ONE* 2015; 10(4): e0124301. 査読有  
doi:10.1371/journal.pone.0124301

Mizutari K, Mutai H, Namba K, Miyayama Y, Nakano A, Arimoto Y, Masuda S, Morimoto N, Sakamoto H, Kaga K, Matsunaga T. High prevalence of CDH23 mutations in patients with congenital high-frequency sporadic or recessively inherited hearing loss. *Orphanet J Rare Dis* 2015; 10(1):60. 査読有  
doi: 10.1186/s13023-015-0276-z.

Wasano K, Mutai H, Obuchi C, Masuda S, Matsunaga T. A novel frameshift mutation in KCNQ4 in a family with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *Biochem Biophys*

Res Commun 2015; 463:582-586. 査読有  
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.05.099.

Miya F, Mutai H, Fujii M, Boroevich KA, Matsunaga T, Tsunoda T. Gene expression profiling of DBA/2J mice cochleae treated with L-methionine and valproic acid. Genomic Data 2015; 5:323-325. 査読有  
doi: 10.1016/j.gdata.2015.06.022

〔学会発表〕(計 17 件)

山澤一樹, 簗生なおみ, 香取奈穂, 前田直則, 鈴木絵理, 込山修, 筒井英光, 長尾俊孝, 佐藤武志, 石井智弘, 長谷川奉延. CDC73 遺伝子の生殖細胞系列における全欠失および体細胞系列における病的バリエーションを同定した原発性副甲状腺機能亢進症の男児例. 第 40 回日本小児遺伝学会, 慶應義塾大学三田キャンパス (東京都港区), 2018 年 1 月 12-13 日

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

山澤一樹, 前田直則, 簗生なおみ, 香取奈穂, 鈴木絵理, 込山修, 佐藤武志, 石井智弘, 長谷川奉延, 筒井英光, 長尾俊孝. CDC73 遺伝子全領域を含む 3.4 Mb の欠失を認めた副甲状腺腺腫の 15 歳男児例. 第 23 回日本家族性腫瘍学会, ホテルさっぽろ芸文館 (北海道札幌市), 2017 年 8 月 4-5 日.

山澤一樹, 込山修, 高橋孝雄. 非典型的表現型により未診断のまま重篤な出血エピソードを繰り返したヌーナン症候群の一例. 第 120 回日本小児科学会, グランドプリンスホテル高輪 (東京都港区), 2017 年 4 月 14-16 日.

山澤一樹, 山田洋平, 務台英樹, 松永達雄, 込山修, 高橋孝雄. 重篤な出血のエピソードを認め、エクソーム解析によって診断されたヌーナン症候群の一例. 第 39 回小児遺伝学会, 慶應義塾大学三田キャンパス (東京都港区), 2016 年 12 月 9-10 日.

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.

山澤一樹, 松原圭子, 鏡雅代, 中林一彦, 秦健一郎, 深見真紀, 緒方勤. インプリンティング調節領域の高メチル化に起因した Kagami-Ogata 症候群におけるヒドロキシメ

チル化の探索. 日本人類遺伝学会第 60 回大会, 京王プラザホテル (東京都新宿区), 2015 年 10 月 15 日.

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. ASHG 2015 Annual Meeting, Baltimore (USA), 2015 年 10 月 11 日.

山澤一樹, 松原圭子, 鏡雅代, 中林一彦, 深見真紀, 緒方勤. IG-DMR の高メチル化に起因する Kagami-Ogata 症候群におけるヒドロキシメチル化の探索. 第 49 回日本小児内分泌学会, タワーホール船堀 (東京都江戸川区), 2015 年 10 月 9 日.

山澤一樹, 松原圭子, 鏡雅代, 深見真紀, 中林一彦, 緒方勤. メチル化異常に起因する Kagami-Ogata 症候群においてヒドロキシメチル化の果たす役割の解明. 第 38 回小児遺伝学会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 2015 年 7 月 25 日.

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. 第 118 回日本小児科学会, 大阪国際会議場 (大阪府大阪市), 2015 年 4 月 18 日.

Matsunaga T. Personalized medicine for hereditary hearing loss by phenotype-driven approach. 14th Taiwan-Japan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery. Kaohsiung, Taiwan, 2017 年 12 月 1-2 日.

Matsunaga T, Mizutani K, Mutai H, Namba K, Nakano A, Arimoto Y, Masuda S, Morimoto N, Sakamoto H, Kaga K. High prevalence of CDH23 mutations in patients with a common clinical characteristics of early childhood hearing loss and the genotype-phenotype correlations. The 13th International Congress of Human Genetics. Kyoto, Japan, 2016 年 4 月 3-7 日.

Matsunaga T. An animal model of acute cochlear energy failure and experimental therapeutic strategies. Collegium Oto-Rhino-Laryngologicum Amicitiae Sacrum. Bordeaux, France, 2016 年 8 月 28-31 日.

Matsunaga T. Increasing contribution of genetic tests for hearing loss to patient care. 16th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery. Tokyo, Japan, 2016 年 3 月 28 日.

Matsunaga T, Morimoto N, Mutai H.

Audiological Characteristics in Patients Carrying Mutations in SLC26A5 Which Encodes Prestin-a Longitudinal Study. Collegium Oto-Rhino-Laryngologicum Amicitiae Sacrum. San Francisco, USA, 2015 年 8 月 23-26 日.

Matsunaga T. Promises and challenges of next generation sequencing in personalized medicine for sensorineural hearing loss. Symposium11: Sensorineural Hearing Loss. 13th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery. 東京都千代田区, 2015 年 12 月 3-4 日.

## 6 . 研究組織

### (1) 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)  
臨床遺伝センター/小児科 医員  
研究者番号 : 10338113

### (2) 研究分担者

松永 達雄 (MATSUNAGA, Tatsuo)  
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)  
聴覚平衡覚研究部 部長  
研究者番号 : 90245580