

機関番号：82612

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390101

研究課題名（和文）14 番染色体インプリンティング異常症の臨床スペクトラムと  
その発症機序の解明研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenic mechanism and the clinical spectrum of  
disorders associated with imprinted genes on human chromosome 14

研究代表者

鏡 雅代（KAGAMI MASAYO）

独立行政法人 国立成育医療研究センター・分子内分泌研究部・上級研究員

研究者番号：70399484

研究成果の概要（和文）：

個体および胎盤における 14 番染色体インプリンティングセンターを同定した。生殖細胞レベルでメチル化が確立する germ line DMR である IG-DMR と受精後にメチル化が確立する secondary DMR である MEG3-DMR の役割、機能を明らかとし、同一インプリンティング領域内に存在する germline DMR と secondary DMR の役割、機能を世界で初めて明らかとした。

研究成果の概要（英文）：

We identified two 14q32.2 imprinting centers in the body and the placenta, respectively. The germline-derived primary *DLK1-MEG3* intergenic differentially methylated region (IG-DMR) acts as an upstream regulator for the methylation pattern of the postfertilization-derived secondary *MEG3-DMR* in the body but not in the placenta, and that the IG-DMR and the *MEG3-DMR* function as imprinting control centers in the placenta and the body, respectively. This is the first study demonstrating an essential long-range imprinting regulatory function for the secondary DMR.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2009 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2010 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：人類遺伝学

科研費の分科・細目：エピジェネティクス

キーワード：インプリンティング、エピジェネティクス、成長障害、胎盤、臨床像、遺伝子調節

## 1. 研究開始当初の背景

14 番染色体の q32.2 には父性発現遺伝子 *DLK1*、*RTL1* と母性発現遺伝子 *MEG3*、*MEG8*、*RTL1as* (*RTL1 antisense*) など多数のインプリンティング遺伝子群が存在する。そして、父親性ダイソミー (upd(14)pat) は羊水過多、特徴的顔貌、ベル型小胸郭、腹壁異常を示し、母親性ダイソミー (upd(14)mat) は胎児期、

生後の成長障害、思春期早発傾向、筋緊張低下を示す。われわれは upd(14)pat 症状陽性で 14q32.2 のインプリンティング領域の微小欠失あるいはエピ変異をもつ非ダイソミー症例と、その家族解析で判明した 3 例の upd(14)mat 症状陽性患者の upd(14)pat あるいは upd(14)mat との表現型の重症度と遺伝子発現量の関連性の検討、および、詳細な分子遺

伝学的解析データから、

(1) ヒト染色体14q32.2に存在するインプリンティング遺伝子群が *intergenic differentially methylated region (IG-DMR)* により調節されていること、(2) *upd(14)pat* の表現型が主に父親性発現遺伝子 *RTL1* の過剰発現に起因すること、(3) *upd(14)mat* の表現型が主に父親性発現遺伝子 *RTL1* と *DLK1* の発現消失により生じること、(4) 母親性発現遺伝子 *RTL1 antisense* が *RTL1* の発現抑制因子として作用すること、(5) 胎盤におけるインプリンティング制御が個体と異なること、を世界で初めて報告した。この研究の過程で我々は遺伝子解析方法を確認し、解析に必要な遺伝子地図、多型マーカー、FISHプローブを整備した。

## 2. 研究の目的

エピ変異の発症機序および個々のインプリンティング遺伝子の生理的役割を解明し、その成果を先天奇形症候群および成長障害の診断・治療に役立てることである。

## 3. 研究の方法

- (1) ヒト染色体 14q32.2 上のインプリンティング遺伝子の確定  
ヒト胎盤サンプルを用いて本領域のインプリンティング遺伝子 *RTL1*, *DLK1*, *MEG3* がインプリンティングをうけていることを *SNP typing* にて確認する。
- (2) *upd(14)pat* 表現陽性患者胎盤における定量的遺伝子発現解析  
患者由来の新鮮凍結胎盤から抽出した cDNA を用いて定量 PCR 法により行う。
- (3) *RTL1*, *DLK1* の胎盤発現部位の検討  
正常胎盤、患者胎盤を用いて免疫染色にて、*DLK1*, *RTL1* の発現部位、患者における発現量の変化を検討した。
- (4) *IG-DMR* エピ変異発症の原因解析  
エピ変異症例において、*CGH* アレイ、次世代シーケンサーによる解析を行い、エピ変異の原因となる変異を同定する。
- (5) 出生前あるいは出生後の成長障害を示す患者における *RTL1*, *DLK1* 変異解析、出生前あるいは出生後の成長障害を示す患者における患者におけるメチル化解析  
患者の血液由来ゲノム DNA を用いて、直接シーケンス法による変異解析、*COBRA* 法によるメチル化解析を行う。

## 4. 研究成果

*IG-DMR* のみを欠失し *upd(14)pat* 表現型を体と胎盤の両者において示した症例および *MEG3-DMR* のみを欠失し *upd(14)pat* 表現型を体においてのみ示した症例を同定し、この2症例の詳細な解析から以下のことを明らか

とした (1) *IG-DMR* は個体と胎盤の両者で *DMR* となっているが、*MEG3-DMR* は個体でのみ *DMR* となっており胎盤では低メチル化状態にある。(2) *IG-DMR* は個体において *MEG3-DMR* のメチル化パターンを支配する。(3) 個体では母親由来アレルの *MEG3-DMR* が全インプリンティング遺伝子の発現パターンを制御し、胎盤では母親由来アレルの *IG-DMR* が全インプリンティング遺伝子の発現パターンを直接制御する。(4) *MEG3-DMR* 周辺には様々な転写制御作用を有する *CTCF* 蛋白結合領域が7カ所存在し、そのうち2カ所が *MEG3-DMR* の性質を有する。さらに、我々は2例の *upd(14)pat* 患者の新鮮凍結胎盤サンプルを入手し定量発現解析を行った。患者において、母性発現遺伝子 (*MEG3*, *MEG8*, *microRNAs*) の発現は消失し、父性発現遺伝子 *DLK1* は、正常胎盤に比較し2倍から4倍、*RTL1* は約10倍の発現量の増加を認めた。マウスにおいて、*Rtl1* の発現は母性発現遺伝子 *Rtl1as* 上に存在する *microRNA* によって制御されていることは明らかとなっている。ヒト 14q32.2 との相同領域の父親性ダイソミーマウスにおいて *Rtl1* の著しい発現増加が認められており、これは母性発現遺伝子の *Rtl1as* の発現消失と両アレルからの *Rtl1* 発現による相乗効果であることが示されているが、ヒトにおいては検討がなされていなかった。我々の研究はヒトにおける *Rtl1as* の抑制効果を示した世界初の報告である。さらに *RTL1* 抗体を作成し、*Upd(14)pat* 患者胎盤、正常胎盤を用いて免疫染色を行った結果、*RTL1* がマウスと同様胎児側血管内皮細胞に発現していることをヒトではじめて同定し、患者においてその発現が著しく増強し、発現部位に一致して、電顕にて患者血管内皮細胞基底膜の異常を同定した。ヒトにおいても *RTL1* は胎盤の発育に大きな役割をはたしていることが明らかとなった。

## 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10件)

1. Miyazaki O, Nishimura G, Kagami M, Ogata T. Radiological evaluation of dysmorphic thorax of paternal uniparental disomy 14. *Pediatric Radiology*. 2011 May 24. [Epub ahead of print] 査読あり
2. Suzumori N, Ogata T, Mizutani E, Hattori Y, Matsubara K, Kagami M, Sugiura-Ogasawara M. Prenatal findings of paternal uniparental disomy 14: Delineation of further patient.

- American Journal Medical Genetics A.* 152A (12): 3189–3192, 2010. 査読あり
3. Kagami M, J O'Sullivan M, Green AJ, Watabe Y, Arisaka O, Masawa N, Matsuoka K, Fukami M, Matsubara K, Kato F, Ferguson-Smith AC, Ogata T. The IG-DMR and the *MEG3*-DMR at Human Chromosome 14q32.2: Hierarchical Interaction and Distinct Functional Properties as Imprinting Control Centers. *PLoS Genetics* 6 (6): e1000992, 2010. 査読あり
  4. Yamazawa K, Nakabayashi K, Kagami M, Satoh T, Hata K, Saitoh S, Nagai T, Horikawa R, Hizuka N, Ogata T. A Parthenogenetic Female with a Silver-Russell Syndrome-like Phenotype and a 45,X Cell Lineage Accompanied by Biparentally Derived Autosomes. *Journal of Medical Genetics*: Aug 3. [Epub ahead of print], 2010. 査読あり
  5. Hosoki K, Kagami M, Tanaka T, Kubota M, Kurosawa K, Kato M, Uetake K, Tohyama J, Ogata T, Saitoh S. Maternal uniparental disomy 14 syndrome demonstrates Prader-Willi syndrome-like phenotype. *Journal of Pediatrics* 155 (6): 900–903, 2009.
  6. Kobayashi H, Yamada K, Morita S, Hiura H, Fukuda A, Kagami M, Ogata T, Hata K, Sotomaru Y, Kono T. Identification of the mouse paternally expressed imprinted gene *Zdbf2* on chromosome 1 and its imprinted human homolog *ZDBF2* on chromosome 2. *Genomics* 93 (5): 461–472, 2009. 査読あり
  7. Kagami M, Yamazawa K, Matsubara K, Matsuo N, Ogata T. Placentomegaly in paternal uniparental disomy for human chromosome 14. *Placenta* 29 (8): 760–761, 2008. 査読あり
  8. Hosoki K, Ogata T, Kagami M, Tanaka T, Saitoh S. Epimutation (hypomethylation) affecting the chromosome 14q32.2 imprinted region in a girl with upd(14)mat-like phenotype. *European Journal of Human Genetics* 16 (8): 1019–1023, 2008. 査読あり
  9. Yamazawa K, Kagami M, Nagai T, Kondoh T, Onigata K, Maeyama K, Hasegawa T, Hasegawa Y, Yamazaki T, Mizuno S, Miyoshi Y, Miyagawa S, Horikawa R, Matsuoka K, Ogata T. Molecular and clinical findings and their correlations in Silver-Russell syndrome: implications for a positive role of *IGF2* in growth determination and differential imprinting regulation of the *IGF2-H19* domain in bodies and placentas. *Journal of Molecular Medicine* 86 (10): 1171–1181, 2008. 査読あり
  10. Yamazawa K, Kagami M, Fukami M, Matsubara K, Ogata T. Monozygotic female twins discordant for Silver-Russell syndrome and hypomethylation of the *H19*-DMR. *Journal of Human Genetics* 53 (10): 950–955, 2008. 査読あり
- [学会発表] (計 16 件)
1. Masayo Kagami, Maureen J O'Sullivan, Andrew J Green, Yoshiyuki Watabe, Osamu Arisaka, Toshiro Nagai, Shuji Takada, Maki Fukami, Kazuki Yamazawa, Keiko Matsubara, Fumiko Kato, Anne C Ferguson-Smith, Tsutomu Ogata. Hierarchical interaction and distinct functional properties of the IG-DMR and the *MEG3*-DMR at the human chromosome 14q32.2 imprinted region. 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology, Kyoto, 2010.
  2. Masayo Kagami, Maureen J O'Sullivan, Andrew J Green, Yoshiyuki Watabe, Osamu Arisaka, Toshiro Nagai, Shuji Takada, Maki Fukami, Kazuki Yamazawa, Keiko Matsubara, Fumiko Kato, Anne C Ferguson-Smith, Tsutomu Ogata. Hierarchical interaction and distinct functional properties of the IG-DMR and the *MEG3*-DMR at the human chromosome 14q32.2 imprinted region. International Symposium on Pediatric Endocrinology, Tokyo, 2010.
  3. 鏡雅代、高田修治、加藤芙弥子、Anne C Ferguson-Smith、緒方勤. ヒト 14q32.2 のインプリンティング領域において、IG-DMR と *MEG3*-DMR は異なった役割をはたす. 第 4 回エピジェネティクス研究会、鳥取、2010.
  4. 鏡雅代、加藤芙弥子、宮戸真美、高田修治、松岡健太郎、山中美智子、金子さおり、松原圭子、佐藤智子、緒方勤. 14 番染色体インプリンティング遺伝子の胎盤における機能の解明. 第 44 回日本小児内分泌学会学術集会、大阪、2010
  5. 鏡雅代. ヒト 14 番染色体インプリンティング異常症発症機序の解明、第 55 回 日本人類遺伝学会奨励賞受賞講演、大宮、2010.
  6. 鏡雅代、加藤芙弥子、松原圭子、佐藤智子、緒方勤. 14 番染色体父親性ダイソミー症候群の病因別頻度の解明. 第 55 回 日本人類遺伝学会学術集会、大宮、2010.
  7. Masayo Kagami, Maureen J O'Sullivan, Andrew J Green, Yoshiyuki Watabe, Osamu Arisaka, Nobuhide Masawa, Kentarou Matsuoka, Maki Fukami, Keiko Matsubara, Fumiko Kato, Anne C Ferguson-Smith, and Tsutomu Ogata. The IG-DMR and the

- MEG3-DMR* at Human Chromosome 14q32.2: Hierarchical Interaction and Distinct Functional Properties as Imprinting Control Centers, International Symposium on Epigenome Network, Development and Reprograming of Germ Cells, Fukuoka, 2010.
8. Masayo Kagami, Kentaro Matsuoka, Keiko Matsubara, Tomoko Sato, Michiko Yamanaka, Nobuhiro Suzumori, Tsutomu Ogata. *RTL1* plays a key role in human placental development. International Symposium on Epigenome Network, Development and Reprograming of Germ Cells, Fukuoka, 2010.
9. Masayo Kagami, Maki Fukami, Maureen O'Sullivan, Andrew Green, Shuji Takada, Fumiko Kato, Anne Ferguson-Smith, Tsutomu Ogata. Essential role of the *MEG3-DMR* in the regulation of the maternally inherited human chromosome 14q32.2 imprinting region. The 24th Naito Conference, Sapporo, 2009.
10. 鏡雅代、高田修治、加藤芙弥子、Anne C Ferguson-Smith、緒方勤. 14 番染色体インプリンティング遺伝子群の調節において、IG-DMR と MEG3-DMR は異なる役割をはたす. 第 3 回日本エピジェネティクス研究会, 東京, 2009.
11. 鏡雅代、高田修治、加藤芙弥子、Anne C Ferguson-Smith、緒方勤. 14 番染色体インプリンティング遺伝子群の調節において、IG-DMR と MEG3-DMR は異なる役割を果たす. 第 54 回日本人類遺伝学会, 東京, 2009.
12. 鏡雅代、高田修治、加藤芙弥子、Anne C Ferguson-Smith、緒方勤. 14 番染色体インプリンティング遺伝子群の調節において、IG-DMR と MEG3-DMR は異なる役割をはたす. 第 43 回日本小児内分泌学会, 宇都宮, 2009.
13. Masayo Kagami, Shuji Takada, Maki Fukami, Kazuki Yamazawa, Keiko Matsubara, Fumiko Kato, Anne C Ferguson-Smith Tsutomu Ogata. Hierarchical interaction and distinct functional properties of the IG-DMR and the *MEG3-DMR* at the human chromosome 14q32.2 imprinted region. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009.
14. 鏡雅代、斎藤伸治、高桑聖、田中藤樹、緒方勤. 14 番染色体母性片親性ダイソミーは Prader-Willi 症候群の鑑別疾患である. 第 42 回日本小児内分泌学会学術集会, 米子, 2008.
15. 鏡雅代、加藤芙弥子、西村玄、緒方勤. 14 番染色体インプリンティング遺伝子群の調節には *GTL2-DMR* が決定的な役割

を果たす第 53 回日本人類遺伝学会, 横浜, 2008.

16. 鏡雅代、加藤芙美子、西村玄、田中葉子、黒澤健司、石野史敏、緒方勤. 14 番染色体父親性ダイソミー、母親性ダイソミーの表現型を招く疾患発症機序の解明. 第 111 回日本小児科学会学術集会, 東京, 2008.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<http://www.nch.go.jp/endocrinology/upd14/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鏡 雅代 (Kagami Masayo)

独立行政法人国立成育医療研究センター・分子内分泌研究部・上級研究員  
研究者番号 : 70399484

### (2) 研究分担者

緒方 勤 (Ogata Tsutomu)

独立行政法人国立成育医療研究センター・分子内分泌研究部・部長  
研究者番号 : 40169173  
(H20:分担研究者、H21-22:連携研究者)

山澤 一樹 (Yamazawa Kazuki)

独立行政法人国立成育医療研究センター・分子内分泌研究部・共同研究員

研究者番号：10338113  
(H20-21:分担研究者、H22:留学のため、分担研究者から降りる)

高田 修治 (Takada Shuji)  
独立行政法人国立成育医療研究センター・システム発生・再生医学研究部・室長  
研究者番号：20382856  
(H21-22:分担研究者)

(3) 連携研究者

緒方 勤 (Ogata Tsutomu)  
独立行政法人国立成育医療研究センター・分子内分泌研究部・部長  
研究者番号：40169173  
(H20:分担研究者)