

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390083

研究課題名(和文) 14番染色体インプリンティング遺伝子の生理学的機能と発現調節機構の解明

研究課題名(英文) Paternal uniparental disomy 14 and related conditions: Placental expression analyses and histological examination

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・その他部局等・その他

研究者番号：70399484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：14番染色体父親性ダイソミー(UPD(14)pat)症候群患者胎盤の組織およびインプリンティング遺伝子の発現を検討した。胎盤過形成はUPD(14)pat症例、欠失例で認められた。DLK1, RTL1は絨毛血管内皮に発現し、患者胎盤では絨毛血管内皮基底膜の腫大を認めた。RTL1の発現は全例で著しく増強し、DLK1の発現はUPD(14)pat症例でのみ増強し、母性発現遺伝子の発現は消失していた。以上の結果は1) RTL1は胎盤絨毛血管の発育に重要な役割を果たしている、2) RTL1はRTL1as上のmicroRNAsによってtransにRNAiで制御されることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：We performed placental study of two cases with UPD(14)pat and a case with maternal microdeletion involving DLK1, DMRs and MEG3. RTL1 and DLK1 expressed only in endothelial cells of villous vessels. In the placentas of UPD(14)pat revealing placentomegaly, the expression of DLK1 and RTL1 increased, even though in the placenta of a case with microdeletion revealing placentomegaly, only the expression of RTL1 increased. Electron microscopic study showed hyperplasia of the endothelial cells and the pericytes in the placentas of UPD(14)pat. Expression analysis using placentas of UPD(14)pat showed excessive RTL1 expression above the normal control levels because of a synergic effect between the biallelic activation of RTL1 and loss of functional microRNA in RTL1as as a repressor for RTL1. These results indicate that excessive RTL1 expression causes placentomegaly and RTL1 expression is regulated through an RNAi mechanism. RTL1 may play an essential role in the development of human placenta.

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：人類遺伝学

キーワード：エピジェネティクス ゲノムインプリンティング

1. 研究開始当初の背景

我々のグループはこれまでに、14番インプリンティング異常症発症機序の解明、個体および胎盤におけるインプリンティングセンターの同定と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。*Rtl1* KO マウスにおいて胎盤低形成が、*Rtl1* 過剰発現マウスにおいて胎盤過形成が認められていることからヒトにおいても *RTL1* が胎盤形成異常症の原因であると考えた。さらに我々は、*RTL1* 発現が消失している UPD(14)mat 患者で成長障害、子宮内胎児発育遅延を認めることから、*RTL1* が成長障害、子宮内胎児発育遅延の候補遺伝子であると考えた。加えて、14番染色体インプリンティング遺伝子をどのように制御されているのかは未だ不明であり、患者検体を用いた発現解析から 14番染色体インプリンティング遺伝子発現制御メカニズムを明らかにしようと着想した。

2. 研究の目的

研究の目的を以下の通り設定した。胎盤における 14 番染色体インプリンティング遺伝子の機能解明と胎盤形成異常症の原因解明、14 番染色体インプリンティング遺伝子発現調節機構の解明

3. 研究の方法

胎盤における 14 番染色体インプリンティング遺伝子の機能解明と胎盤形成異常症の原因解明

胎児診断された UPD(14)pat 症候群患者の新鮮凍結胎盤、もしくはパラフィン包埋された標本を用いて、光学顕微鏡での HE 染色標本の検討、電顕像の検討、DLK1 抗体、RTL1 抗体、DIO3 抗体を用いた免疫染色法による胎盤の組織学的検討に加え、14 番染色体インプリンティング遺伝子の発現を定量 PCR 法にて検討する。DLK1 抗体、DIO3 抗体は購入し、RTL1 抗体については我々が作成した。

14 番染色体インプリンティング遺伝子発現調節機構の解明

の胎盤サンプルを用いた定量 PCR 法により、*RTL1as* にコードされる microRNA の *RTL1* に対する trans の制御機構を明らかとする。次に、UPD(14)pat 症候群エピソード症例、UPD(14)mat エピソード症例の検体を用いて、Infinium HumanMethylation450 BeadChip を用いた網羅的メチル化解析を施行する。14 番染色体インプリンティング領域以外のメチル化異常も示す症例については、trans に関与す

るインプリンティング制御因子関連遺伝子の変異が予想されることから両親の検体と合わせてエクソーム解析を施行する。一方 14 番染色体メチル化可変領域以外のメチル化異常が同定されない場合、インプリンティング関連因子の結合に障害を及ぼす cis の変異がメチル化可変領域に存在すると予想されることから 14q32.2 インプリンティング領域全領域の target resequence を行う。

4. 研究成果

症例 1、2 は UPD(14)pat、症例 3 は既報のように母親由来アレルの *DLK1* から *MEG3* までの 108,768 bp の欠失症例、症例 4 は父親由来アレルの重複例であった。症例 1-3 は胎盤過形成を認める。症例 4 は胎盤過形成を認めない。表現型は症例 1-3 は典型的な UPD(14)pat 表現型を示すが、症例 4 は腹壁異常および特徴的顔貌のみを認める。

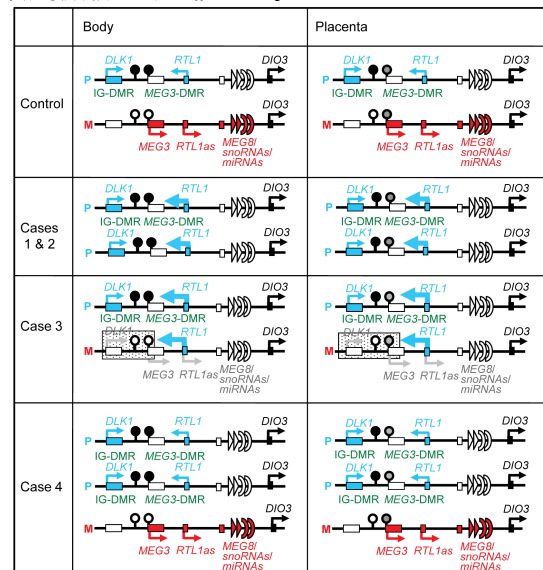


図 1. 症例 1-4 における 14 番染色体インプリンティング遺伝子の発現

症例 1-3 の光顕像では、中間から幹絨毛において、血管内腔の拡張が認められたが、末端絨毛での変化は同定されなかった。電顕像では、末端絨毛の血管内皮、周皮細胞の腫大が同定された。免疫染色にて、DLK1、RTL1、DIO3 とともに絨毛血管内皮および周皮細胞で発現していることが明らかとなった。DLK1 は症例 1、2 では発現が増強していたが、症例 3 ではコントロールと同程度の発現であった。RTL1 は症例 1-3 全てで過剰発現となっていた。DIO3 は発現の差は認められなかった(図 2)。症例 1、2 の新鮮凍結胎盤を用いた定量 PCR 法による発現定量解析では、*DLK1*、*RTL1* の過剰発現を認め、すべての母性発現遺伝子の発現は消失していた(図 3)。*DLK1*、*RTL1* が発現している絨毛の血管内皮基底膜および周皮細胞の分布のサンプル間

でのばらつきを補正するために、症例 1 と 2 の *DLK1* 発現量が正常コントロールの 2 倍となるようにし、それぞれ *RTL1*、*DIO3* の発現量を補正した。結果、UPD(14)pat の 2 症例に

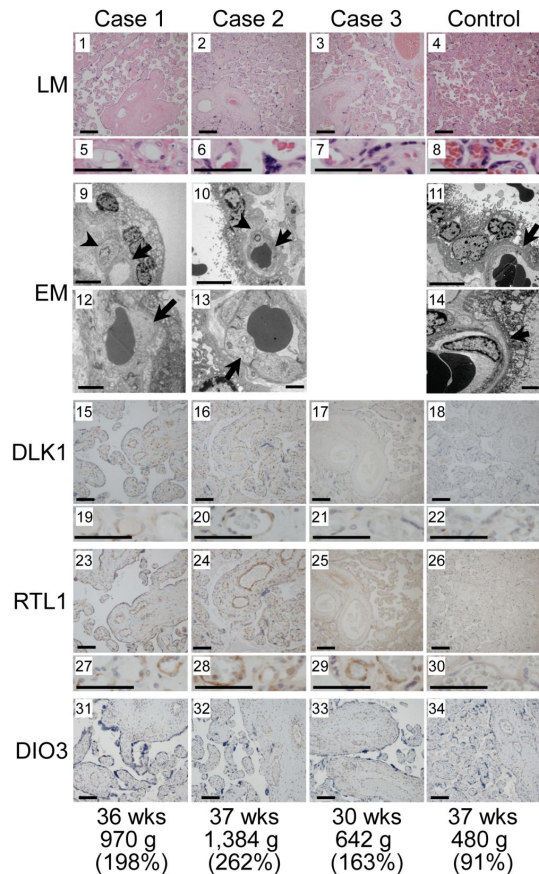


図 2. 図 3 胎盤の組織学的検討 LM: 光学顕微鏡像、EM: 電顕像、DLK1: DLK1 抗体を用いた免疫染色、RTL1: RTL1 抗体を用いた免疫染色、DIO3: DIO3 抗体を用いた免疫染色。下段は在胎週数、胎盤重量、在胎週数別平均胎盤重量比を示す。

において *DLK1* は正常コントロールの 2 倍、*RTL1* は 4-6 倍、*DIO3* は 1 倍という結果になった (図 3)。

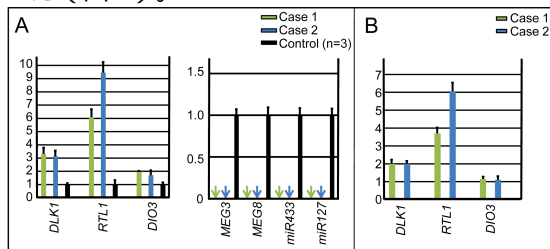


図 3. 発現定量解析結果

症例 1-3 の組織学的検討により、*DLK1*、*RTL1*、*DIO3* が絨毛血管内皮に発現し、UPD(14)pat の 2 例において電顕にて、血管内皮基底膜および周皮細胞の腫大が同定された。免疫染色にて胎盤過形成を認める症例 1-3 全てに *RTL1* の過剰発現を認めたが、*DLK1* は症例 1、

2 では発現増強を認めたが、症例 3 では認めなかった。これらの結果により UPD(14)pat に認められる胎盤過形成の責任遺伝子は *RTL1* であり、胎盤絨毛血管の発育に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

発現定量解析では、UPD(14)pat 胎盤の 2 例において *DLK1* は約 2 倍、*RTL1* は約 4-6 倍、*DIO3* はコントロールとほぼ同程度、母性発現遺伝子の発現は消失という結果となった。*RTL1* の過剰発現は *RTL1as* 内の *microRNAs* の発現消失により 1 コピーあたりの *RTL1* 発現量が増加し、2 コピーからの発現でさらにその発現量が増加したと考えられる。以上の結果は、1) *DIO3* はインプリンティングをうけていない。2) *RTL1* は *RTL1as* 上の *microRNAs* によって trans に RNAi で制御されていることを示す。この結果はマウスでの解析結果に一致する結果である。

エピ変異症例におけるインプリンティング制御因子および制御因子結合配列の検索については、網羅的メチル化解析を施行し、複数領域メチル化可変領域のメチル化異常症例についてはエクソーム解析を施行し、塩基置換を同定した。現在サンガー法により確認作業を施行中である。14q32.2 インプリンティング領域メチル化可変領域のみの異常症例に対しては 14q32.2 領域全領域の target resequence を施行した。こちらもサンガー法現による塩基置換の確認作業中である。

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 18 件)

1. Kosaki R, Takenouchi T, Takeda N, Kagami M, Nakabayashi K, Hata K, Kosaki K. Somatic CTNNB1 mutation in hepatoblastoma from a patient with Simpson-Golabi-Behmel syndrome and germline GPC3 mutation. *American Journal Medical Genetics A*. 164A(4):993-997, 2014.
2. Sasaki A, Sumie M, Wada S, Kosaki R, Kuroswa K, Fukami M, Sago H, Ogata T, and Kagami M. Prenatal Genetic Testing for a Microdeletion at Chromosome 14q32.2 Imprinted Region Leading to UPD(14)pat-like Phenotype. *American Journal Medical Genetics A*, 164(1): 264-266, 2014.
3. Fuke T, Mizuno S, Nagai T, Hasegawa T, Horikawa R, Miyoshi Y, Muroya K, Kondoh T, Numakura C, Sato S, Nakabayashi K, Tayama C, Hata K, Sano S, Matsubara K, Kagami M, Yamazawa K, Ogata T. Molecular and clinical studies in 138 Japanese patients with silver-russell syndrome. *PLoS One*. 8(3): e60105, 2013.
4. Kagami M, Matsuoka K, Nagai T, Yamanaka M, Kurosawa K, Suzumori N,

- Sekita Y, Miyado M, Matsubara K, Fuke T, Kato F, Fukami M, Ogata T. Paternal uniparental disomy 14 and related disorders: Placental gene expression analyses and histological examinations. *Epigenetics*, 7 (10) : 1142–1150, 2012.
5. Kagami M, Kato F, Matsubara K, Sato T, Nishimura G, Ogata T. Relative frequency of underlying genetic causes for the development of UPD(14)pat-like phenotype. *European Journal of Human Genetics*, 20 (9): 928–932. 2012.
 6. Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Van De Pette M, John RM, Kagami M, Nakai K, Soejima H, Ogata T, Arima T. Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproduction technologies. *Human Reproduction*, 27(8): 2541–2548, 2012.
 7. Miyazaki O, Nishimura G, Kagami M, Ogata T. Radiological evaluation of dysmorphic thorax of paternal uniparental disomy 14. *Pediatric Radiology*, 41(8): 1013–1019, 2011.
 8. Matsuoka K, Hayashi S, Urano F, Zhu LJ, Okita H, Sago H, Nakazawa A. Squamous metaplasia in the cyst epithelium of type 1 congenital pulmonary airway malformation after thoracoamniotic shunt placement. *Human Pathology*, 43(9): 1413–1417. 2012.
 9. Song N, Endo D, Koji T. Roles of epigenome in mammalian spermatogenesis. *Reproductive Medicine and Biology*, 13: 59–69, 2014.
 10. Hikiji H, Endo D, Horie K, Harayama T, Akahoshi N, Igarashi H, Kihara Y, Yanagida K, Takeda J, Koji T, Shimizu T, Ishii S. TDAG8 activation inhibits osteoclastic bone resorption. *FASEB Journal*, 28(2): 871–879, 2014
 11. Chen X, Song N, Matsumoto K, Nanashima A, Nagayasu T, Hayashi T, Ying M, Endo D, Wu Z and Koji T: High expression of trimethylated histone H3 at lysine 27 predicts better prognosis in non small cell lung cancer. *International Journal of oncology*, 143(5): 1467–1480, 2013.
 12. Chojjookhuu N, Sato Y, Nishino T, Endo D, Hishikawa Y, Koji T. Estrogen-dependent regulation of sodium/hydrogen exchanger-3 (NHE3) expression via estrogen receptor β in proximal colon of pregnant mice. *Histochemistry and Cell Biology* 137(5): 575–587, 2012.
 13. Otake S, Endo D, Park MK: Molecular characterization of two isoforms of ZFAND3 cDNA from the Japanese quail and the leopard gecko, and different expression patterns between testis and ovary. *Gene* 488(1-2): 23–34, 2011.
 14. 鏡雅代. UPD(14)pat/mat 症候群、小児科臨床 増刊 臨床医が知っておきたい先天異常、66 (suppl) :1315–1320, 2013.
 15. 鏡雅代 14 番染色体インプリンティング異常症 小児内科 45 (6): 2013–2016, 2013.
 16. 伊藤由紀、松岡健太郎、林 聡、江川真希子、田中忠夫、左合治彦、一絨毛膜性二羊膜性胎盤を用いた血管吻合検索方法の検討日本周産期・新生児医学会雑誌 48 (1): 81 新生児医学会雑誌 86, 2012.
 17. 松岡健太郎、胎児死亡と胎盤病理 12. 双胎妊娠、産科と婦人科、78 (6): 733–739. 2011
 18. 遠藤大輔, 小路武彦: In situ ハイブリダイゼーションの原理と実践. [組織細胞化学 2012] (日本組織細胞化学会編), 中西印刷, 京都, 59–72, 2012.
- 〔学会発表〕(計 32 件)
1. Masayo Kagami. Clarification of (epi)genetic mechanisms leading to UPD(14)pat and UPD(14)mat phenotypes. 9th Joint Meeting of Paediatric Endocrinology, Meeting Theme Symposium, Milan, Italy, 2013
 2. Masayo Kagami, Kentaro Matsuoka, Keiko Matsubara, Tomoko Sato, Michiko Yamanaka, Nobuhiro Suzumori, Tsutomu Ogata, Role of *RTL1* in Human Placenta: Placental study in Affected Cases with Structural Abnormality of the Imprinted Region on Human Chromosome 14. International Federation of Placenta Associations Meeting, Hiroshima, 2012
 3. 鏡雅代: インプリンティング異常症(教育講演). 第 28 回北陸小児内分泌学会, 石川、2014
 4. 鏡雅代: インプリンティング異常症(教育講演). Forum on Growth Hormone Research 2013、京都、2013
 5. 鏡雅代: インプリンティング異常症と生殖補助医療 第 54 回日本卵子学会 シンポジウム、東京、2013
 6. 鏡雅代, 西村玄, 黒澤健司, 柴崎淳, 左合治彦, 深見真紀, 緒方勤: 14 番染色体父親性ダイソミー症候群: 遺伝学的病因、臨床像、治療. 第 47 回日本小児内分泌学会学術集会、東京、2013
 7. 鏡雅代, 長崎啓祐, 依藤亨, 中村明枝, 沼倉周彦, 緒方勤, 深見真紀, 齋藤伸治: 本邦における 14 番染色体母親性ダイソミーおよび類縁疾患に関する検討: 遺伝学的原因および臨床像. 日本人類遺伝学会第 58 回大会、仙台、2013
 8. 鏡雅代、加藤英弥子、松原圭子、佐藤智子、西村玄、緒方勤 14 番染色体父親性ダイソミー症候群の遺伝学的病因別頻

- 度の解明、第 35 回日本小児遺伝学会学術集会、久留米、2012
9. 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 (UPD(14)pat) 症候群の病因別頻度の検討、第 6 回日本エピジェネティクス研究会学術集会、東京、2012
 10. 鏡雅代、長崎啓祐、佐藤英利、鹿島京子、依藤亨、中村明枝、加藤光広、沼倉周彦、緒方勤、深見真紀、斉藤伸治、14 番染色体母親性ダイソミーおよび類縁疾患に関する全国調査：遺伝学的頻度および臨床像、第 46 回日本小児内分泌学会、大阪、2012
 11. 鏡雅代、古庄知己、中林一彦、松岡健太郎、松原圭子、福家智子、深見真紀、緒方勤、14 番染色体インプリンティング領域メチル化制御機構の解明：MEG3-DMR エピ変異症例の解析から第 56 回人類遺伝学会、東京、2012
 12. 鏡雅代、松岡健太郎、加藤芙弥子、宮戸真美、松原圭子、深見真紀、山中美智子、鈴森伸宏、永井敏郎、緒方勤。RTL1 遺伝子の胎盤における機能の解明：胎盤発育不全、子宮内胎児発育遅延の原因解明をめざして。第 45 回日本小児内分泌学会学術集会、埼玉、2011。
 13. 鏡雅代、黒澤健司、宮寄治、柴崎淳、左合治彦、西村玄、深見真紀、緒方勤。14 番染色体父親性ダイソミー症候群：遺伝学的病因、臨床像、治療。第 56 回日本人類遺伝学会学術集会、幕張、2011。
 14. 鏡雅代、松岡健太郎、加藤芙弥子、宮戸真美、山中美智子、鈴森伸宏、松原圭子、佐藤智子、永井敏郎、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と発現調節メカニズムの解明、第 5 回エピジェネティクス研究会、熊本、2011。
 15. 鏡雅代、松岡健太郎、加藤芙弥子、宮戸真美、山中美智子、鈴森伸宏、松原圭子、佐藤智子、永井敏郎、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と発現調節メカニズムの解明、第 34 回日本小児遺伝学会、横浜、2011。
 16. 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 114 回日本小児科学会、東京、2011
 17. 鏡雅代、松岡健太郎、加藤芙弥子、宮戸真美、松原圭子、深見真紀、山中美智子、鈴森伸宏、永井敏郎、緒方勤。RTL1 遺伝子の胎盤における機能の解明：胎盤発育不全、子宮内胎児発育遅延の原因解明をめざして。第 45 回日本小児内分泌学会学術集会、埼玉、2011。
 18. 鏡雅代、黒澤健司、宮寄治、柴崎淳、左合治彦、西村玄、深見真紀、緒方勤。14 番染色体父親性ダイソミー症候群：遺伝学的病因、臨床像、治療。第 56 回日本人類遺伝学会学術集会、幕張、2011。
 19. 鏡雅代、松岡健太郎、加藤芙弥子、宮戸真美、山中美智子、鈴森伸宏、松原圭子、佐藤智子、永井敏郎、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と発現調節メカニズムの解明、第 5 回エピジェネティクス研究会、熊本、2011。
 20. 鏡雅代、松岡健太郎、加藤芙弥子、宮戸真美、山中美智子、鈴森伸宏、松原圭子、佐藤智子、永井敏郎、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と発現調節メカニズムの解明、第 34 回日本小児遺伝学会、横浜、2011。
 21. 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 114 回日本小児科学会、東京、2011
 22. Kentaro Matsuoka, Yuki Ito, Haruhiko Sago, Atsuoko Nakazawa, Kenichiro Hata, Progression of VUE is represented with terminal villous inflammation of cytotoxic T cells and ascending inflammation of intravillous space progress to vasculopathy International Federation of Placenta Associations Meeting, Hiroshima, 2012
 23. Kentaro Matsuoka, Masayo Kagami, Tsutomu Ogata, Fetal vessels dilatation contribute placentomegaly of uniparental disomy chromosome 14. 2011/9/14. International Federation of Placenta Associations Meeting, Norway, 2011
 24. 松岡健太郎、トーニエス麻弥、伊藤由紀、大喜多肇、左合治彦、中澤温子、胎盤絨毛間質線維化の病態病理学的検討、第 19 回日本胎盤学会、東京、2011
 25. 伊藤由紀、松岡健太郎、トーニエス麻弥、左合治彦、中澤温子、田中忠夫、潜在性絨毛膜羊膜炎の臨床病理学的検討、第 19 回日本胎盤学会、東京、2011
 26. 松岡健太郎、伊藤由紀、山田健二、中野夏子、大喜多肇、中澤温子、VUE におけるアポトーシス誘導と Hofbauer 細胞動態の免疫組織学的検討、第 101 回日本病理学会総会、札幌、2012
 27. 松岡健太郎、伊藤由紀、左合治彦、秦健一郎、大喜多肇、中澤温、Villitis of unknown etiology における Hofbauer 細胞の役割についての検討、第 31 回日本小児病理研究会、横浜、2012

28. 松岡健太郎、伊藤由紀、左合治彦、秦健一郎、大喜多 肇、中澤温子、Villitis of unknown etiology における Hofbauer 細胞の役割についての検討、第 31 回日本小児病理研究会、横浜、2012
29. 松岡健太郎、山田健二、佐藤泰樹、林聡、左合治彦、中澤温子、肺形成不全疾患群における肺形成の病理学的検討、第 9 回胎児治療学会、福岡、2011
30. 松岡健太郎、畑中政博、左合治彦、中澤温子、肺動脈を用いた肺発育評価の試み、第 10 回胎児治療学会、仙台、2012
31. 遠藤大輔、小路武彦: マウス精巣における特異的 microRNA の発現細胞の同定と機能探索. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, S4-1, 香川, 2013
32. Endo D, Song N, Koji T: Cellular localization of microRNAs in paraffin embedded sections by in situ hybridization with nonradioactive oligo-DNA probes. 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Kyoto, Japan, 2012

<http://www.nch.go.jp/endocrinology/UPD14/>

6. 研究組織

- (1)研究代表者
鏡 雅代 (国立成育医療研究センター研究所 分子内分泌研究部)
研究者番号: 70399484
- (2)研究分担者
松岡健太郎 (国立成育医療研究センター病理診断部)
研究者番号: 90286443
- (3)連携研究者
遠藤大輔 (東京医科歯科大学難治疾患研究所 エピジェネティクス分野→長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科組織細胞生物学分野)
研究者番号: 90516288

〔図書〕(計 2 件)

1. 鏡雅代、5) インプリント異常症 遺伝子医学 MOOK25 メディカルドゥ社 エピジェネティクスと病気: 202-209, 2013.
2. 松岡健太郎、小児・周産期病理アトラス、診断と治療社、2012.

〔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

「14 番染色体父親性・母親性ダイソミーおよび類縁疾患の実態把握と診断・治療指針作成に関する研究」