

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：17201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659181

研究課題名(和文)ゲノム刷り込みに基づくiPS細胞分化能の指標作成

研究課題名(英文)Drawing a differentiation potency index of iPSC based on genomic imprinting

研究代表者

副島 英伸 (Soejima, Hidenobu)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：30304885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム刷り込みの観点からiPS細胞を評価するため、マウス・ヒトiPS細胞、刷り込み疾患Beckwith-Wiedemann症候群(BWS)患者由来iPS細胞、肝芽細胞を発生母地とする肝芽腫について、刷り込み関連メチル化可変領域(DMR)の網羅的DNAメチル化を解析した。マウスではiPS化すると大半のDMRが低メチル化すること、一部の刷り込みDMRは分化誘導により正常メチル化に回復することがわかった。ヒトiPS細胞では、特定のDMRで父性パターン(父性エピジェノタイプ)へのメチル化変化が生じることが示唆された。肝芽腫では、一部のDMRのメチル化は腫瘍化に先立って起こる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To evaluate iPSC from the aspect of genomic imprinting, we analyzed DNA methylation status of imprinting related differentially methylated regions (DMRs), which were scattered throughout the genome, in iPSCs derived from mouse fibroblast, peripheral blood cells of normal human and Beckwith-Wiedemann syndrome patients. We also analyzed hepatoblastomas, which originated from immature liver precursor cells. We found that in mouse iPSC, the methylation status of many DMRs decreased after reprogramming and that a certain number of DMRs restored their methylation status during retinoic acid induced differentiation. Human iPSC showed that methylation patterns of several DMRs changed to paternal epigenotype after reprogramming. Finally, hepatoblastoma analysis suggested that the occurrence of hypomethylation at a few DMRs prior to tumor development.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：エピジェネティクス ゲノム刷り込み iPS細胞 肝芽腫

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞の作成過程では、体細胞がリプログラムされ ES 細胞類似の分化万能性を示すようになるが、すべての iPS クローンが同一の分化能をもっているわけではない。これは、iPS 細胞クローン間でリプログラム状態が同一ではないことを示している。リプログラムの本体はエピゲノムの変化と考えられているが、実体はまだ明らかではない。つまり、各 iPS クローンが異なる分化能を示す原因は未解明である。一方、ゲノム全体の刷り込みの異常を持つ胚は正常な発生過程から逸脱すること、一部の限定的な刷り込み異常では刷り込み疾患や腫瘍が発生することから、胚発生(完全な分化万能性を示す)にはゲノム刷り込みがきわめて重要であるといえる。刷り込み遺伝子の発現は、両アレル間でメチル化の差異が認められるメチル化可変領域(DMR)によって制御されている。DMR には、卵および精子の形成過程で DNA メチル化の差異が確立する gametic DMR と受精後の体細胞で DNA メチル化の差異が確立する somatic DMR がある。「DMR のメチル化状態」が不十分あるいは不正確な場合は、刷り込み遺伝子の発現が狂ってしまい、正常な発生ができない。つまり、胚の分化万能性には「DMR のメチル化状態」が正常であることが重要である。事実、マウス刷り込み領域 *Dlk1-Dio3* の ICR のメチル化が異常であると分化万能性を示さないことが報告された(Stadtfield et al, Nature, 2010)。しかし、胚の発生(分化万能性)には多数の刷り込み領域が関与しており、各刷り込み領域のメチル化状態と分化万能性との関係は明らかでない。

2. 研究の目的

本研究では、iPS 細胞の分化万能性を刷り込み領域のメチル化状態をもって評価するシステムを構築することを目的とした。具体的には、F1 マウスの線維芽細胞から iPS 細胞を樹立し、ゲノム中に存在する刷り込み領域の ICR と付随するメチル化可変領域(DMR) 28 カ所のメチル化状態を解析してメチル化状態別に分類する。分類した iPS 細胞をキメラマウス作成法により、完全な分化万能性を持つかどうかを解析することで、分化万能性に最も重要な刷り込み領域(あるいはその組合せ)を同定する。一方、健常人および刷り込み疾患 Beckwith-Wiedemann 症候群(BWS) の患者由来 iPS 細胞を樹立し、マウスと同様にゲノム中に存在する刷り込み関連 DMR36 カ所を解析し、リプログラミングによる DMR のメチル化の変化を明らかにする。また、BWS には肝芽腫が高率に合併するが、肝芽腫は肝細胞に分化する前の肝芽細胞を発生母地とする。肝芽細胞における DMR のメチル化異常が腫瘍発生に関与する可能性が考えられるため、肝芽腫での DMR のメチル化異常を解析し腫瘍発生との関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) iPS 細胞の樹立

横浜理研 RCAI 古関明彦博士の協力を得て、マウス線維芽細胞と健常人(2名)および BWS の患者(刷り込み DMR である KvDMR1 低メチル化患者1名と H19DMR 高メチル化患者1名)の末梢血細胞より iPS 細胞を樹立した。

(2) マウス iPS 細胞における刷り込み DMR のメチル化解析

MALDI-TOF MS 質量分析器である MassARRAY (シーケノム社)を用いて、28カ所の刷り込み DMR の DNA メチル化の割合を定量的に解析した。対象は、未分化状態の iPS 細胞、レチノイン酸(RA)で5日間分化誘導した iPS 細胞、および線維芽細胞とした。

(3) ヒト iPS 細胞における刷り込み DMR のメチル化解析

末梢血細胞と iPS 細胞について、MassARRAY を用いて 36カ所の刷り込み DMR のメチル化を解析した。

(4) 肝芽腫における刷り込み DMR のメチル化解析

12例の肝芽腫および腫瘍隣接正常組織と3例の正常肝臓について、33カ所の DMR と LINE-1 のメチル化を MassARRAY および bisulfite pyrosequencing にて解析した。

4. 研究成果

(1) マウス iPS 細胞における刷り込み DMR のメチル化解析

B6 を母に JF1 を父に持つ F1 線維芽細胞から 8 クローンの iPS 細胞を作製した。未分化 iPS 細胞を線維芽細胞と比べたところ、4 クローン以上で低メチル化を示した DMR は 20 カ所で、高メチル化を示した DMR は 1 カ所であった。RA 処理 iPS 細胞は線維芽細胞に比べ、13 カ所で低メチル化を示し、1 カ所が高メチル化を示した。また、RA 処理 iPS 細胞は未分化 iPS 細胞に比べ、5 カ所で高メチル化を示した。このうち 4 カ所は、RA 処理 iPS 細胞と線維芽細胞でメチル化の差異がない領域であり、RA 処理により正常メチル化に回復したことを示す。これらの結果から、線維芽細胞を iPS 化すると大半の刷り込み DMR は低メチル化を生じること、一部の刷り込み DMR は RA 処理により正常メチル化に回復することがわかった。これらの iPS 細胞を用いてキメラマウス作成を試みたが、これまでにキメラマウスは得られていない。

(2) ヒト iPS 細胞における刷り込み DMR のメチル化解析

各検体よりそれぞれ 4 クローンずつ合計 16 クローンの iPS 細胞を樹立した。患者末梢血でみられた KvDMR1 低メチル化および H19DMR 高メチル化は、患者由来 iPS 細胞においても保たれていた。また、健常者由来、患者由来

に共通してメチル化が保たれていた DMR は 6 カ所で、すべて gametic DMR であった。KvDMR1 と H19-DMR を含む計 8 カ所の DMR のメチル化は、iPS 細胞化 (リプログラミング) による初期の対象とはならないと考えられた。一方、ほぼすべてのクローンで共通して iPS 細胞化によりメチル化が変化した DMR は 11 カ所あった (高メチル化 9 カ所、低メチル化 2 カ所)。高メチル化は、somatic DMR 5 カ所、gametic DMR 3 カ所、不明 1 カ所で、低メチル化は、gametic DMR 1 カ所、不明 1 カ所であった。さらに、母性メチル化 DMR は低メチル化を示し、父性メチル化 DMR は高メチル化を示した。この結果から、iPS 細胞化によって、特定の刷り込み DMR は、gametic、somatic に関わらずメチル化の変化が生じ、そのメチル化は父性パターン (父性エピジェノタイプ) へ変化することが示唆された。

(3) 肝芽腫における刷り込み DMR のメチル化解析

33 カ所中 18 カ所の DMR に異常メチル化が見られた。異常メチル化の発生頻度は DMR 毎に異なっており、高頻度に異常を示す DMR が存在した。異常高メチル化は腫瘍でのみ見られたが、異常低メチル化は腫瘍隣接正常組織でも見られた。LINE-1 に代表されるゲノム全体のメチル化に大きな差はなかった。これらの結果から、肝芽腫では、ゲノム全体のメチル化が比較的保たれているが、一部の DMR のメチル化は腫瘍化に先立って起こる可能性が示唆された。また、11p15.5 と 20q13.3 ではメチル化異常に加え、片親性ダイソミーやコピー数異常が見られたことから、DMR におけるエピゲノム・ゲノム異常による刷り込み遺伝子の発現異常が肝芽腫発生に関連することが示唆された (図 1)。これらの結果は、論文として発表した。

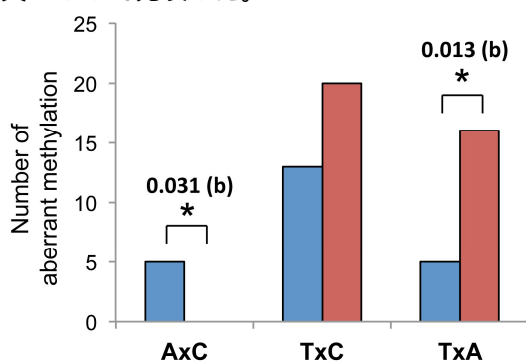


図 1 肝芽腫における DMR のメチル化異常
正常肝組織 (C)、肝芽腫隣接肝組織 (A)、肝芽腫組織 (T) をそれぞれ比較した際にメチル化異常を示した DMR の個数を示す。青：低メチル化、赤：高メチル化。(b) は二項検定での p 値を示す。肝芽腫隣接肝組織 (A) と正常肝組織 (C) を比較すると、肝芽腫隣接肝組織で有意に低メチル化が生じている。一方、高メチル化は腫瘍組織でのみ認められる。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 13 件)

- Ohnishi K, Semi K, Yamamoto T, Shimizu M, Tanaka A, Mitsunaga K, Okita K, Osafune K, Arioka Y, Maeda T, Soejima H, Moriwaki H, Yamanaka S, Woltjen K, Yamada Y. Premature termination of reprogramming *in vivo* leads to cancer development through altered epigenetic regulation. *Cell*, 156(4), 663-677, 2014 査読有
- Higashimoto K, Jozaki K, Kosho T, Matsubara K, Fuke T, Yamada D, Yatsuki H, Maeda T, Ohtsuka Y, Nishioka K, Joh K, Koseki H, Ogata T, Soejima H. A novel de novo point mutation of the OCT-binding site in the *IGF2/H19*-imprinting control region in a Beckwith-Wiedemann syndrome patient. *Clin Genet*, published online: 4 December 2013 査読有
- Rumbajan JM, Maeda T, Souzaki R, Mitsui K, Higashimoto K, Nakabayashi K, Yatsuki H, Nishioka K, Harada R, Aoki S, Kohashi K, Oda Y, Hata K, Saji T, Taguchi T, Tajiri T, Soejima H, Joh K. Comprehensive analyses of imprinted differentially methylated regions reveal epigenetic and genetic characteristics in hepatoblastoma. *BMC Cancer*, 13:608, 2013 査読有
- Miyazaki H[†], Higashimoto K[†], Yada Y[†], A. Endo T[¶], Sharif J[¶], Komori T, Matsuda M, Koseki Y, Nakayama M, Soejima H, Handa H, Koseki H, Hirose S, Nishioka K. Ash1l methylates Lys36 of histone H3 independently of transcriptional elongation to counteract Polycomb silencing. *PLoS Genet*, 9(11):e1003897, 2013 ([†] equal contribution) 査読有
- Higashimoto K[†], Maeda T[†], Okada J[†], Ohtsuka Y, Sasaki K, Hirose A, Nomiyama M, Takayanagi T, Fukuzawa R, Yatsuki H, Koide K, Nishioka K, Joh K, Watanabe Y, Yoshiura KI, Soejima H. Homozygous deletion of *DIS3L2* exon 9 due to non-allelic homologous recombination between LINE-1s in a Japanese patient with Perlman syndrome. *Eur J Hum Genet*, 21(11):1316-1319, 2013 ([†] equal contribution) 査読有
- Soejima H, Higashimoto K. Epigenetic and genetic alterations of the imprinting disorder Beckwith-Wiedemann syndrome and related disorders. *J Hum Genet*, 58(7): 402-409, 2013 査読有
- Fukuda K, Ichianagi K, Yamada Y, Go

Y, Udon T, Wada S, Maeda T, Soejima H, Saitou N, Ito T, Sasaki H. Regional DNA methylation differences between humans and chimpanzees are associated with genetic changes, transcriptional divergence and disease genes. *J Hum Genet*, 58(7):446-454, 2013 査読有

Adachi H, Takahashi I, Higashimoto K, Tsuchida S, Noguchi A, Tamura H, Arai H, Ito T, Masue M, Nishibori H, Takahashi T, Soejima H. Congenital hyperinsulinism in an infant with paternal uniparental disomy on chromosome 11p15: Few clinical features suggestive of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Endocr J*. 60(4):403-408, 2013 査読有

Yatsuki H, Higashimoto K, Jozaki K, Koide K, Okada J, Watanabe Y, Okamoto N, Tsuno Y, Yoshida Y, Ueda K, Shimizu K, Ohashi H, Mukai T, Soejima H. Novel Mutations of CDKN1C in Japanese Patients with Beckwith-Wiedemann Syndrome. *Genes & Genomics*, 35(2):141-147, 2013 査読有

前田寿幸、東元健、副島英伸 . Beckwith-Wiedemann 症候群と Silver-Russell 症候群 . *小児科臨床* 66(増刊号):1308-1314, 2013 査読無

副島英伸 . Beckwith-Wiedemann 症候群 , Sotos 症候群 . *周産期医学* 43(3):377-382, 2013 査読無

Hiura H, Okae H, Miyachi 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. *Hum Reprod*, 27(8):2541-2548, 2012 査読有

Higashimoto K, Nakabayashi K, Yatsuki H, Yoshinaga H, Jozaki K, Okada J, Watanabe Y, Aoki A, Shiozaki A, Saito S, Koide K, Mukai T, Hata K, Soejima H. Aberrant methylation of H19-DMR acquired after implantation was dissimilar in soma versus placenta of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet Part A*, 158A(7):1670-1675, 2012 査読有

[学会発表](計 13 件)

宮崎仁美、東元健、矢田有加里、遠藤高帆、Sharif Jafar、小森敏治、松田正史、古関庸子、中山学、副島英伸、半田宏、古関明彦、広瀬進、西岡憲一 Ash11 methylates Lys36 of histone H3 independently of transcriptional

elongation to counteract Polycomb silencing. 第 36 回日本分子生物学会年会 2013.12.3-6. 神戸 (1P-0177)

副島英伸 . Beckwith-Wiedemann 症候群と関連疾患におけるゲノム・エピゲノム異常 . 日本人類遺伝学会第 58 回大会「シンポジウム 8 先天異常とゲノム・エピゲノム」2013.11.20-23. 仙台 (S8-3 プログラム・抄録集 p108)

大塚泰史、佐々木健作、城崎幸介、東元健、岡本信彦、高間勇一、窪田昭男、松本富美、中山雅弘、吉浦孝一郎、副島英伸 . シスチン尿症を伴うゲノムワイド父性片親性ダイソミー症例の遺伝子解析 . 日本人類遺伝学会第 58 回大会 2013.11.20-23. 仙台 (032 プログラム・抄録集 p127)

東元健、城崎幸介、八木ひとみ、古庄知己、松原圭子、山田大輔、前田寿幸、大塚泰史、古関明彦、緒方勤、副島英伸 . H19DMR メチル化異常で発症するインプリント疾患における H19DMR の変異解析 . 第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会 2013.5.30-31. 奈良 (抄録集 p60, ポスターP-36)

前田寿幸、東元健、中林一彦、城崎幸介、八木ひとみ、緒方勤、秦健一郎、副島英伸 . Beckwith-Wiedemann 症候群におけるインプリント DMR のマルチローカスメチル化解析 . 第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会 2013.5.30-31. 奈良 (抄録集 p61, ポスターP-38)

東元健、城崎幸介、八木ひとみ、古庄知己、松原圭子、山田大輔、前田寿幸、大塚泰史、古関明彦、緒方勤、副島英伸 . H19-DMR メチル化異常で発症するインプリント疾患における H19-DMR の変異解析 . 第 35 回日本分子生物学会年会 2012.12.11-14. 福岡 (2P-0148 プログラム p300)

Rumbajan JM, Maeda T, Tajiri T, Higashimoto K, Souzaki R, Taguchi T, Soejima H, Joh K. Genome-wide Screening of Aberrant Methylations of Imprinted DMRs in Hepatoblastomas. 第 35 回日本分子生物学会年会 2012.12.11-14. 福岡 (2P-0454 プログラム p342)

Maeda T, Jozaki K, Yatsuki H, Higashimoto K, Soejima H. Genome-wide quantitative DNA methylation analysis of imprinted DMRs in patients with Beckwith-Wiedemann Syndrome by MALDI-TOF MS technology. The American Society of Human Genetics 62nd Annual Meeting (poster 3432T). 2012. 11. 6-10. San Francisco, California, USA

Ohtsuka Y, Jozaki K, Maeda T, Yatsuki H, Higashimoto K, Soejima H. The

relationship between paternal uniparental disomy and clinical features in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. The American Society of Human Genetics 62nd Annual Meeting (poster 3519T). 2012. 11. 6-10. San Francisco, California, USA

大塚泰史、城崎幸介、前田寿幸、八木ひとみ、東元健、副島英伸 . Beckwith-Wiedemann 症候群における片親性父性ダイソミーの多様性と臨床症状との関連 . 日本人類遺伝学会第 57 回大会 2012.10.24-27. 東京 (0-53 プログラム・抄録集 p140)

副島英伸、東元健、田尻達郎 . 肝芽腫におけるメチル化インプリント DMR のゲノムワイド検索 . 第 71 回日本癌学会学術総会 2012.9.19-21. 札幌市 (Proceedings, p256, English oral session, E-2058)

副島英伸、城崎幸介、八木ひとみ、前田寿幸、大塚泰史、東元健 . 本邦 Beckwith-Wiedemann 症候群の臨床像とゲノム・エピゲノム解析 . 180 超例の解析により明らかとなった本邦 Beckwith-Wiedemann 症候群の臨床像とゲノム・エピゲノム変異 . 日本人類遺伝学会第 56 回大会 第 11 回東アジア人類遺伝学会 2011.11.9-12. 幕張 (0-143 プログラム・抄録集 p168)

Soejima H, Nakabayashi K, Yatsuki H, Jozaki K, Hata K, Higashimoto K. Acquisition of aberrant hypermethylation after implantation induces discordant hypermethylation at H19-DMR between bodies and placentas in Beckwith-Wiedemann syndrome patients. *Idibell Cancer Conferences on Imprinting and Beyond; "Mono-allelic expression in Health and Disease"*, 2011.9.21-23, Barcelona, Spain (Psoter 34)

〔図書〕(計 3 件)

東元健、副島英伸 . Beckwith-Wiedemann 症候群と小児腫瘍 . 遺伝子医学 MOOK25 エピジェネティクスと病気 第 2 章 エピジェネティクスと病気 4 . 不妊・先天異常 監修: 佐々木裕之、編集: 中尾光善、中島欽一、メディカルドゥ、大阪、pp195-201, 2013

副島英伸 . ベックウィズ・ヴィーデマン症候群 第 XIV 章 先天異常・奇形 症候群ハンドブック . 井村裕夫総編集, 福井次矢・辻省次編集 . 中山書店 . 東京 . P679, 2011

副島英伸 . シルバー・ラッセル症候群 第 XIV 章 先天異常・奇形 症候群ハンドブック . 井村裕夫総編集, 福井次矢・

辻省次編集 . 中山書店 . 東京 . P685, 2011

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ

<http://www.biomol.med.saga-u.ac.jp/mbg/index.htm>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

副島 英伸 (SOEJIMA, Hidenobu)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号 : 3 0 3 0 4 8 8 5

(2) 連携研究者

小倉 淳郎 (OGURA, Atsuo)

独立行政法人理化学研究所・遺伝工学基盤技術室・室長

研究者番号 : 2 0 1 9 4 5 2 4