

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：82643

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25713040

研究課題名(和文)メチル化異常に起因する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

研究課題名(英文)The role of hydroxymethylation in congenital anomaly syndromes caused by aberrant methylation

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) 19,400,000円

研究成果の概要(和文):5-ヒドロキシメチル化シトシン(5hmC)は5-メチル化シトシン(5mC)から合成され、脱メチル化反応における中間代謝産物として近年注目されている。5mCと5hmCを区別することのできる酸化バイサルファイト法を用いて、代表的なインプリンティング異常疾患であるKagami-Ogata症候群(KOS)における5mCおよび5hmCの分布を解析した。血液中には5hmCは含有量が少なく、KOSにおいて5hmCが果たす役割は不明であったが、一方で脳組織には5hmCが多く含まれていることが確認された。インプリンティング異常疾患の多くは神経症状を伴うことから、神経組織の解析が重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文):5-hydroxymethylcytosine (5hmC), converted from 5-methylcytosine (5mC) by TET enzymes, is an intermediate of the demethylation pathway. We applied the newly developed oxidative BS (oxBS) treatment to detect 5hmC in blood samples from Kagami-Ogata syndrome (KOS) patients. As a result, it was found that 5hmC was not a major component in abnormally hypermethylated IG-DMR or at a global level, at least in blood from KOS patients. As the brain sample contained large amounts of 5hmC, the neural tissues of KOS patients are promising candidates for analysis in elucidating the role of 5hmC in the neurodevelopmental context.

研究分野：小児科学 臨床遺伝学

キーワード：ゲノムインプリンティング エピジェネティクス メチル化

1. 研究開始当初の背景

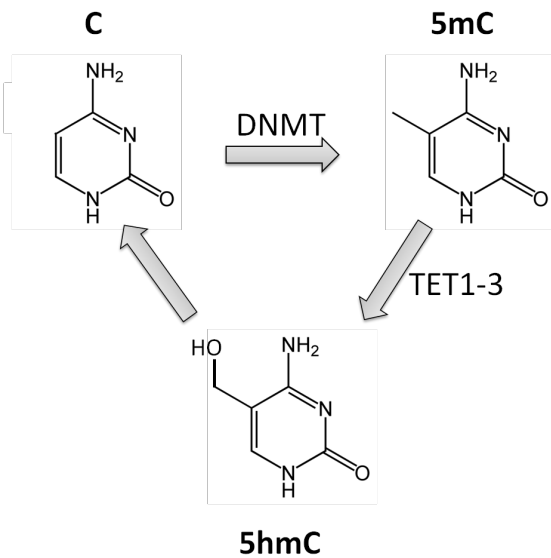
ゲノムインプリンティングとは、母親と父親由来のゲノムにその親由来の起源が記憶される哺乳類に特有の現象であり、その結果、母方と父方から受け継がれた一对の対立遺伝子が識別され異なる発現を示す。母方と父方染色体とで異なるメチル化を呈する領域 (Differentially methylated region: DMR) がインプリンティング遺伝子の発現を規定しており、インプリンティング調節領域

(Imprinting control region: ICR) と呼ばれる。メチル化を欠損したマウス胎児ではインプリンティング異常が見出されることが知られており、実際にヒトにおいても、ICRにおける先天性のメチル化異常は Silver-Russell 症候群、Beckwith-Wiedemann 症候群、Prader-Willi 症候群、Angelman 症候群、Kagami-Ogata 症候群 (KOS)、Temple 症候群などの先天異常症候群の原因となる。一方で後天性のメチル化異常は、生活習慣病や癌、精神疾患等の原因となることが知られている。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、こうしたメチル化異常 (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るが、そのメカニズムは未だに明らかにされていない。

2009 年、5-メチル化シトシン (5-methyl C: 5mC) の酸化反応により得られる 5-ヒドロキシメチル化シトシン (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た

(Kriaucionis et al. *Science* 2009, Tahiliani et al. *Science* 2009)。その後、ヒドロキシメチル化酵素 TET1-3 による脱メチル化カスケード (図 1) の存在が示され、5hmC は 5mC → C という DNA 脱メチル化反応の途中で合成されることが判明した (Guo et al. *Cell* 2011)。以来、5hmC は「第 6 の塩基」として大きな注目を集めている。特にこれまで幹細胞研究の分野で精力的な解析が行われており、ES 細胞の分化全能性維持のために 5hmC が必須であること (Ito et al. *Nature* 2010) など、重要な知見が次々に明らかとなっている。しかしながらメチル化とゲノムインプリンティングは密接に関連しているにも関わらず、ヒドロキシメチル化とゲノムインプリンティングの関係についての研究は、マウス、ヒトいずれにおいてもこれまで全くなされていない。また特記すべきことに、5mC の検出のためにこれまで 20 年来行われてきたバイサルファイト処理による塩基置換では、5mC と 5hmC とを鑑別することができないことが判明した (Huang et al. *Plos One* 2010)。この事実は、これまで 5mC と評価していたものの少なくとも一部は 5hmC である可能性があることを意味し、この結果、メチル化研究において大きなパラダイムシフトが起きている。

(図 1)



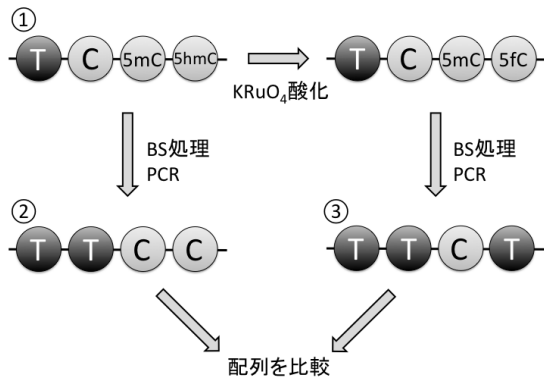
2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでのマウスでの研究成果をもとに、本研究ではゲノムインプリンティング異常に起因するヒト先天異常症候群において 5hmC の果たす役割を明らかにすることを目標とする。特に 5hmC が脱メチル化の中間代謝物であることに注目し、DNA メチル化の可塑性を踏まえて 5mC/5hmC の挙動を明らかにし、新しい診断方法や治療薬の開発の基盤となる知見を目指す。

3. 研究の方法

研究開始当初は、5mC/5hmC 抗体を用いた免疫沈降法による解析を予定していたが、酸化バイサルファイト (oxBS) 法を代替法として導入することにより、一塩基レベルの解像度でより詳細かつ正確な解析が可能となった。従来のバイサルファイト (BS) 法では、5hmC と 5mC とを識別することは不可能であったが、oxBS 法ではそれが可能となった。すなわち BS 法では、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。具体的には BS による定量値 (メチル化比率) は 5mC と 5hmC の合計であり、一方で oxBS によるそれは 5mC ののみを含むため、BS から oxBS を差し引きすることで 5hmC の定量値が得られる (図 2)。

(図 2)



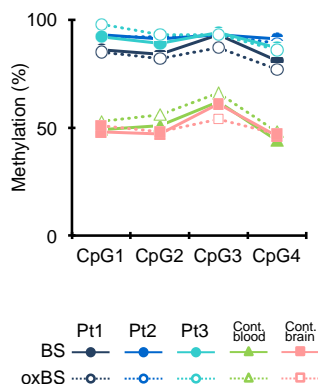
元の配列	未処理	BS	oxBS
C	C	T	T
5mC	C	C	C
5hmC	C	C	T

今回は、代表的なインプリンティング異常疾患であり、IG-DMR の高メチル化により発症し、羊水過多、ベル型小胸郭、腹壁異常、精神運動発達遅滞等を示すインプリンティング異常症である KOS 症例を集積し解析を行った。まず、oxBS 処理サンプルを用いて、メチル化異常が確認されている IG-DMR においてパイロシーケンス法を行い、通常の BS 法によるメチル化比率から差し引くことで 5hmC を定量した (oxBS-pyro)。次に、oxBS 処理サンプルを DNA メチル化ビーズアレイ (Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip) で解析し、ゲノムワイドな 5hmC の分布を検討した (oxBS-array)。

4. 研究成果

KOS 患者末梢血 DNA においては、正常コントロールと同様に 5hmC の含有量が非常に少なく、IG-DMR 等の ICR を含めて特徴的な分布パターンは認められなかった。一方で正常脳 DNA には多量の 5hmC が含まれており、これは既報と一致した (図 3)。

(図 3)



KOS 症例 (Pt1-3) および正常コントロールの末梢血、脳を用いた IG-DMR における oxBS-pyro 解析

血液中には 5hmC は含有量が少なく、KOS において 5hmC が果たす役割は不明であったが、一方で脳組織には 5hmC が多く含まれていることが確認された。インプリンティング異常症は神経症状を伴うことから、神経組織の解析を今後行う必要があると思われた。脳サンプルの入手は困難であることを踏まえ、患者由来 iPS 細胞から神経細胞を分化誘導し、解析を継続中である。

本研究の成果は **Clinical Epigenetics** 誌 2015 年 7 巻 1 号に掲載された (研究代表者山澤が最終・責任著者)。これは世界で初めてのヒトインプリンティング異常症における 5hmC に関する報告である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

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.

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.

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.

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.

doi: 10.1186/s13059-015-0672-7

Radford EJ, Ito M, Shi H, Corish JA, Yamazawa K, Isganaitis E, Seisenberger S, Hore TA, Reik W, Erkek S, Peters AH, Patti ME, Ferguson-Smith AC. In utero

undernourishment perturbs the adult sperm methylome and intergenerational metabolism.

Science 2014;345(6198):1255903.

doi: 10.1126/science.1255903

Yamada M, Yamazawa K, Sekiguchi S, Shinjoh M, Tomita K, Takenouchi T,

Takahashi T. A pediatric case of antibiotic-associated hemorrhagic colitis caused by *Klebsiella oxytoca*. **Glob Pediatr**

Health 2014.

doi: 10.1177/2333794X14550525.

[学会発表] (計 10 件)

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.

山澤一樹, 鏡雅代, 松原圭子, 中村明枝, 深見真紀. メチル化異常に起因するヒトインプリンティング異常症においてヒドロキシメチル化の果たす役割の解明. 日本人類遺伝学会第 590 回大会, タワーホール船堀(東京都江戸川区), 2014 年 11 月 19 日.

Yamazawa K, Ferguson-Smith AC. Allele-specific distribution of 5-hydroxymethylation at imprinting control regions. ASHG 2014 Annual Meeting, San Diego (USA), 2014 年 10 月 18 日.

山澤一樹, 鏡雅代, 松原圭子, 中村明枝, 深見真紀. メチル化異常に起因するヒトインプリンティング異常症においてヒドロキシメチル化の果たす役割の解明. 第 48 回日本小児内分泌学会, アクトシティ浜松(静岡県浜松市), 2014 年 9 月 25 日.

山澤一樹. ゲノムインプリンティングと先天異常症候群. TTT meeting, 明治安田生命ビル(東京都千代田区), 2014 年 3 月 21 日.

Yamazawa K, Ito M, Ferguson-Smith AC. Allele-specific distribution of 5-hydroxymethylation at differentially methylated imprinting control regions. 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸国際展示場(兵庫県神戸市), 2013 年 12 月 3 日.

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・医師
研究者番号: 10338113

(2)研究協力者

緒方 勤 (OGATA, Tsutomu)

鏡 雅代 (KAGAMI, Masayo)

松原 圭子 (MATSUBARA, Keiko)

中林 一彦 (NAKABAYASHI, Kazuhiko)

FERGUSON-SMITH, Anne C.

6. 研究組織

(1)研究代表者

山澤 一樹 (YAMAZAWA, Kazuki)