

平成 29 年 8 月 8 日現在

機関番号：17201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670169

研究課題名(和文) ヒストンメチル化異常症の標的遺伝子探索と病態解明に基づく創薬基盤の確立

研究課題名(英文) A search for target genes of aberrant histone methylation diseases and the establishment of drug discovery platform based on elucidation of pathological conditions

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストンメチル化異常症におけるエピゲノム異常と標的遺伝子の同定、病態解明を目的に患者末梢血DNAのゲノムインプリンティング関連DMRのメチル化解析を行った。代表的疾患であるソトス症候群の患者の約半数で異常低メチル化を示すDMRを2カ所同定した。培養細胞を5-Aza-CdR処理したところ、これらのDMRで脱メチル化が誘導され、関連するインプリント遺伝子の発現量が増加した。NSD1遺伝子の変異により、DMRのメチル化異常に伴うインプリント遺伝子の発現異常が生じ、病態に影響していることが示唆された。一方、NSD1のC末にFLAGを付加した細胞を樹立したので、今後標的遺伝子探索を進めていく。

研究成果の概要(英文)：We screened methylation status of imprinting associated differentially methylated regions (DMRs) in patients with Sotos syndrome, an aberrant histone methylation disease, to find NSD1 target genes and elucidate pathological conditions. We found two DMRs reduced methylation in about half of patients. Cells cultured with 5-Aza-CdR revealed the increased expression of imprinted genes with the reduced methylation of the DMRs. It was suggested that NSD1 mutations induced hypomethylation of the DMRs followed by the increased expression of the imprinted genes. Aberrant expression of the genes were probably involved in the pathological conditions of Sotos syndrome. In addition, we established the cell lines, which expressed FLAG tagged NSD1 protein. We plan to identify the NSD1 target genes using the cell lines.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：ヒストンメチル化酵素 DNAメチル化 ソトス症候群 ゲノムインプリンティング

1. 研究開始当初の背景

先天性疾患の原因としてクロマチン関連遺伝子の変異が次々と同定されているが、遺伝子変異の結果として生じるエピゲノム異常と標的遺伝子の詳細は明らかでなく、分子レベルでの病態解明および治療薬開発は実現できていない。クロマチン構造に深く関連するヒストンメチル化酵素遺伝子の変異で発症する代表的疾患に歌舞伎症候群 (KS) とソトス症候群 (SS) がある。KS は、ヒストン H3K4 トリメチル化酵素 *KMT2D* (*MLL2*) の変異と H3K27 脱メチル化酵素 *KDM6A* (*UTX*) の変異で発症する。一方、SS は、ヒストン H3K36 モノ・ジメチル化酵素 *NSD1* の変異で発症する。

2. 研究の目的

本研究では、ヒストンメチル化異常症である KS および SS の病態解明と創薬基盤の確立のため、原因遺伝子がコードするヒストン修飾酵素の標的遺伝子を同定する。それぞれの遺伝子産物をタグ標識したヒト多能性幹細胞株およびノックアウト (KO) 細胞のエピゲノム解析を行うことで標的遺伝子を絞り込む。また、患者検体において DNA メチル化の変化を指標にした標的遺伝子探索も行う。さらに、個々の標的遺伝子を KO したヒト iPS ライブラリーを作製し、薬剤スクリーニングの基盤とする。標的遺伝子同定、病態理解と創薬基盤の確立が可能となり、先天性疾患の治療薬開発と患児の QOL 向上が期待される。

3. 研究の方法

(1) 患者末梢血 DNA を用いた異常メチル化スクリーニング

これまでに開発したインプリンティング関連 DMR (differentially methylated region) の包括的解析法を用いて、KS 18 例と SS 21 例の末梢血 DNA の異常メチル化をスクリーニングした。具体的には、MALDI-TOF 質量分析計 (MassARRAY) により 36 カ所の DMR をスクリーニングし、異常メチル化を示した DMR について bisulfite-pyrosequencing で確認した。

(2) DMR の異常メチル化とインプリント遺伝子発現の *in vitro* 関連解析

患者末梢血 DNA で異常メチル化を示した DMR に関して、培養細胞 HEK293 (ヒト胎児腎由来)、TCL-1 および HTR8 (ヒト trophoblast 由来) を DNA 脱メチル化剤 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-aza-CdR) 存在下で 7 日間培養し、DMR の脱メチル化を誘導した。メチル化状態は bisulfite-pyrosequence 法で解析した。また、当該 DMR 支配下の遺伝子発現量を real time-RT-PCR で定量的に解析した。

(3) ヒト多能性幹細胞を用いた標的遺伝子探索

ヒトテラトカルチノーマ由来幹細胞 NCCIT 細胞を使用した。CRISPR/Cas9 システムを用い

て *NSD1* の C 末端に 3xFLAG tag を挿入した Tagged *NSD1* 細胞の作製を試みた。

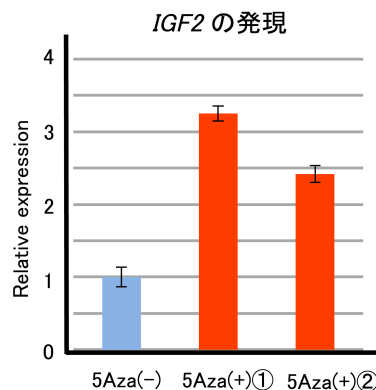
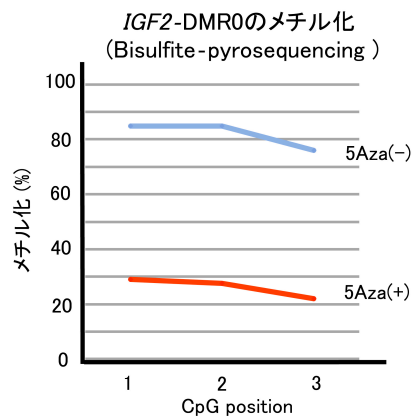
4. 研究成果

(1) 患者末梢血 DNA を用いた異常メチル化スクリーニング

MassARRAY と bisulfite-pyrosequencing でインプリント DMR のメチル化を解析した。KS では 2 カ所の DMR で低メチル化、3 カ所の DMR で高メチル化を認めたが、メチル化異常を示した症例の頻度は 6-11% と低く、DMR のメチル化異常との関連性は低いと考えられた。一方、SS では 8 カ所の DMR で低メチル化を認め、SS 患者 31 例中 26 例 (84%) で少なくとも一カ所以上の DMR で異常低メチル化を認めた。また、SS 症例の 48% で *IGF2*-DMR0 の異常低メチル化を、42% で *IG*-DMR-GC6 の異常低メチル化を認めた。

(2) DMR の異常メチル化とインプリント遺伝子発現の *in vitro* 関連解析

上記結果を受け、DMR の低メチル化が、その DMR に関連するインプリント遺伝子の発現を変化させるか否かを *in vitro* で解析した。培養細胞 HEK293、TCL-1 および HTR8 を 5-Aza-CdR 処理したところ、*IGF2*-DMR0 と *IG*-DMR-GC6 で脱メチル化が誘導された。脱メチル化誘導に伴い、*IGF2*-DMR0 と関連するインプリント遺伝子 *IGF2* は 5-6 倍程度、*IG*-DMR-GC6 と関連するインプリント遺伝子 *MEG3* は数百倍、*MEG8* は数十倍、発現量が増加した。



以上の結果から、DMR の異常メチル化とインプリント遺伝子の発現量の変化の関連性が強く示唆された。

(3) ヒト多能性幹細胞を用いた標的遺伝子探索

NSDI-3xFLAG 細胞を樹立し、抗 FLAG 抗体によるタンパク発現を確認した。また、レチノイン酸による前期神経前駆細胞への分化を確認した。

インプリント遺伝子 *IGF2* は増殖因子をコードし、その過剰発現は過成長を惹起することから、SS の過成長と関連する可能性がある。一方、IG-DMR-CG6 の低メチル化は精神発達遅滞を呈する Temple 症候群で認められることから、SS の精神遅滞と関連する可能性が示唆された。一方、*NSDI-3xFLAG* 細胞は樹立できたが ChIP-seq 解析による標的遺伝子の同定には至らなかったため、個々の標的遺伝子を KO したヒト iPS ライブラリーは作製できなかった。今後、この細胞を用いて ChIP-seq を行うことで標的遺伝子探索を進めていく予定である。

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 13 件)

- ① Ito Y, Maehara K, Kaneki E, Matsuoka K, Sugahara N, Miyata T, Kamura H, Yamaguchi Y, Kono A, Nakabayashi K, Migita O, Higashimoto K, Soejima H, Okamoto A, Nakamura H, Kimura T, Wake N, Taniguchi T, Hata K. Novel Nonsense Mutation in the NLRP7 Gene Associated with Recurrent Hydatidiform Mole. *Gynecol Obstet Invest*, 81(4):353-358, 2016 (DOI: 10.1159/000441780) 査読有
- ② Rumbajan JM, Yamaguchi Y, Nakabayashi K, Higashimoto K, Yastuki H, Nishioka K, Matsuoka K, Aoki S, Toda S, Takeda S, Seki H, Hatada I, Hata K, Soejima H, Joh K. The *HUS1B* promoter is hypomethylated in the placentas of low-birth-weight infants. *Gene*, 583(2):141-146, 2016 (10.1016/j.gene.2016.02.025) 査読有
- ③ Ohtsuka Y, Higashimoto K, Oka T, Yatsuki H, Jozaki K, Maeda T Kawahara K, Hamasaki Y, Matsuo M, Nishioka K, Joh K, Mukai T, Soejima H. Identification of consensus motifs associated with mitotic recombination and clinical characteristics in patients with paternal uniparental isodisomy of chromosome 11. *Hum Mol Genet*. 25(7):1406-1419, 2016 (doi:10.1093/hmg/ddw023) 査読有
- ④ Ohtsuka Y, Higashimoto K, Sasaki K, Jozaki K, Yoshinaga H, Okamoto N, Takama Y, Kubota A, Nakayama M, Yatsuki H, Nishioka K, Joh K, Mukai T, Yoshiura KI, Soejima H. Autosomal recessive cystinuria caused by genome-wide paternal uniparental isodisomy in a patient with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Clin Genet*, 88(3):261-266, 2015 (doi:10.1111/cge.12496) 査読有
- ⑤ Takama Y, Kubota A, Nakayama M, Higashimoto K, Jozaki K, Soejima H. Fibroadenoma in a Beckwith-Wiedemann syndrome with paternal uniparental disomy of chromosome 11p15.5. *Pediatr Int*, 56(6):931-934, 2014 (doi:10.1111/ped.12406) 査読有
- ⑥ Maeda T, Higashimoto K, Jozaki K, Yatsuki H, Nakabayashi K, Makita Y, Tonoki H, Okamoto N, Takada F, Ohashi H, Migita M, Kosaki R, Matsubara K, Ogata T, Matsuo M, Hamasaki Y, Ohtsuka Y, Nishioka K, Joh K, Mukai T, Hata K, Soejima H. Comprehensive and quantitative multilocus methylation analysis reveals the susceptibility of specific imprinted differentially methylated regions (DMRs) to aberrant methylation in Beckwith-Wiedemann syndrome with epimutations. *Genet Med*, 16(12):903-912, 2014 (doi:10.1038/gim.2014.46) 査読有
- ⑦ 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*, 86(6):539-544, 2014 (DOI: 10.1111/cge.12318) 査読有
- ⑧ Court F, Tayama C, Romanelli V, Martin-Trujillo A, Iglesias-Platas I, Okamura K, Sugahara N, Simón C, Moore H, Harness JV, Keirstead H, Sanchez-Mut JV, Kaneki E, Lapunzina P, Soejima H, Wake N, Esteller M, Ogata T, Hata K, Nakabayashi K, Monk D. Genome-wide parent-of-origin DNA methylation analysis reveals the intricacies of the human imprintome and suggests a germline methylation independent establishment of imprinting. *Genome Res*. 24(4):554-69, 2014 (doi:10.1101/gr.164913.113) 査読有

〔学会発表〕(計 31 件)

- ① 渡邊英孝、東元健、三宅紀子、前田寿幸、樋高秀憲、青木早織、八木ひとみ、西岡憲一、城圭一郎、松本直通、副島英伸。ソトス症候群とベックウィズ・ビーデマン症候群でオーバーラップする表現型の原因探索。第 39 回日本小児遺伝学会学術集会 2016. 12. 9-10. 慶應義塾大学三田キャンパス (東京)
- ② 渡邊英孝、東元健、三宅紀子、前田寿幸、樋高秀憲、青木早織、八木ひとみ、西岡憲一、城圭一郎、森田純代、堀居拓郎、木村美香、畑田出穂、松本直通、副島英伸。NSDI ハプロ不全は DNA メチル化インプリント異常と遺伝子発現異常を惹起する。第 39 回日本分子生物学会年会 2016. 11. 30-12. 2. パシフィコ横浜 (横浜)
- ③ Hidaka H, Higashimoto K, Takara Y, Takedomi H, Okamoto N, Kawakubo H, Yamamoto K, Yamanouchi K, Koga Y, Iwakiri R, Noshiro H, Fujimoto K, Soejima H. Comprehensive methylation analysis of imprinting-associated differentially methylated regions in colorectal cancer. 24th United European Gastroenterology Week. 2016. 10. 15-19. Vienna (Austria)
- ④ 樋高秀憲、東元健、古賀靖大、副島英伸。大腸癌におけるインプリント DMR の包括的メチル化解析 (Comprehensive methylation analysis of imprinting-associated differentially methylated regions in colorectal cancer)。第 75 回日本癌学会学術総会 2016. 10. 6-8. パシフィコ横浜 (横浜)
- ⑤ 青木早織、東元健、樋高秀憲、大塚泰史、渡邊英孝、三嶋博之、吉浦孝一郎、大場隆、片渕秀隆、副島英伸。間葉性異形成胎盤のゲノム・エピゲノム解析。第 10 回日本エピジェネティクス研究会年会 2016. 5. 19-20. 千里ライフサイエンスセンター (大阪)
- ⑥ 樋高秀憲、東元健、青木早織、渡邊英孝、前田寿幸、古賀靖大、岩切龍一、能城浩和、藤本一眞、副島英伸。大腸癌におけるインプリント DMR の包括的メチル化解析。第 10 回日本エピジェネティクス研究会年会 2016. 5. 19-20. 千里ライフサイエンスセンター (大阪)
- ⑦ Hidaka H, Higashimoto K, Aoki S, Watanabe H, Yatsuki H, Nishioka K, Joh K, Maeda T, Koga Y, Iwakiri R, Noshiro H, Fujimoto K, Soejima H. Comprehensive methylation analysis of imprinting-associated differentially methylated regions in colorectal cancer. The 13th International Congress of Human Genetics. 2016. 4. 3-7. Kyoto International Conference Center, Japan (京都)
- ⑧ Aoki S, Higashimoto K, Hidaka H, Watanabe H, Ohtsuka Y, Mishima H, Yoshiura KI, Yatsuki H, Nishioka K, Joh K, Ohba T, Katabuchi H, Soejima H. Aberrant methylation at imprinted DMRs is associated with placental mesenchymal dysplasia. The 13th International Congress of Human Genetics. 2016. 4. 3-7. Kyoto International Conference Center, Japan (京都)
- ⑨ 青木早織、東元健、樋高秀憲、渡邊英孝、大塚泰史、三嶋博之、吉浦孝一郎、八木ひとみ、西岡憲一、城圭一郎、大場隆、片渕秀隆、副島英伸。間葉性異形成胎盤の分子遺伝学的解析。第 23 回日本胎盤学会学術集会 2015. 11. 5-6. 東京 JA 共済ビル (東京)
- ⑩ 青木早織、東元健、樋高秀憲、渡邊英孝、大塚泰史、三嶋博之、吉浦孝一郎、八木ひとみ、西岡憲一、城圭一郎、大場隆、片渕秀隆、副島英伸。間葉性異形成胎盤のゲノム・エピゲノム解析。日本人類遺伝学会第 60 回大会 2015. 10. 14-17. 東京京王プラザホテル (東京)
- ⑪ 大塚泰史、岡岳彦、川原弘三、八木ひとみ、東元健、副島英伸。Beckwith-Wiedemann 症候群の原因となる片親性父性ダイソミーの切断点領域の解析。日本人類遺伝学会第 60 回大会 2015. 10. 14-17. 東京京王プラザホテル (東京)
- ⑫ 樋高秀憲、東元健、青木早織、渡邊英孝、八木ひとみ、西岡憲一、城圭一郎、前田寿幸、古賀靖大、岩切龍一、能城浩和、藤本一眞、副島英伸。大腸癌におけるインプリント DMR の包括的メチル化解析。日本人類遺伝学会第 60 回大会 2015. 10. 14-17. 東京京王プラザホテル (東京)
- ⑬ 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。第 22 回日本遺伝子診療学会大会。2015. 7. 17-19. かながわ労働プラザ (横浜)
- ⑭ 前田寿幸、城崎幸介、八木ひとみ、東元健、松尾宗明、副島英伸。Beckwith-Wiedemann 症候群エピソード例におけるインプリント DMR の包括的メチル化解析。第 57 回日本小児神経学会学術集会 2015. 5. 28-30. 帝国ホテル大阪 (大阪)
- ⑮ Aoki S, Ohba T, Okajima M, Higashimoto K, Soejima H, Katabuchi H. Clinical and histopathological features of placental mesenchymal dysplasia. The 6th Asan-Kumamoto Joint Symposium.

2015.5.23. Kumamoto University (Kumamoto)

- ⑩ Maeda T, Mareska RJ, Higashimoto K, Yatsuki H, Nishioka K, Joh K, Soejima H. Comprehensive and quantitative multilocus methylation analysis in Beckwith-Wiedemann syndrome and hepatoblastoma. Clinical Epigenetics Society 5th International Meeting. 2015.3.5-6. Düsseldorf (Germany)
- ⑪ 副島英伸, Rumbajan Janette Mareska, 畑田出穂、中林一彦、秦健一郎、青木茂久、関博之、竹田省、城圭一郎. Small for gestational age (SGA) 胎盤のゲノムワイドDNAメチル化解析. 日本人類遺伝学会第59回大会 2014.11.19-22. タワーホール船堀 (東京)
- ⑫ 前田寿幸、Rumbajan Janette Mareska、東元健、中林一彦、八木ひとみ、秦健一郎、城圭一郎、副島英伸. Beckwith-Wiedemann 症候群と肝芽腫における multiple methylation defect の解析. 第8回日本エピジェネティクス研究会年会 2014.5.25-27. 東京大学 (東京)
- ⑬ Nishioka K, Miyazaki H, Higashimoto K, Yada Y, Endo TA, Sharif J, Nakayama M, Soejima H, Koseki H, Hirose S. Ash11 methylates Lys36 of histone H3 independently of transcriptional elongation to counteract Polycomb silencing. 第8回日本エピジェネティクス研究会年会 2014.5.25-27. 東京大学 (東京)

〔図書〕 (計3件)

- ① 東元健、副島英伸. Beckwith-Wiedemann 症候群. 別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No. 29 神経症候群 (第2版) IV-その他の神経疾患を含めて- 日本臨牀社、大阪、498-501, 2014
- ② 前田寿幸、副島英伸. Silver-Russell 症候群. 別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No. 29 神経症候群 (第2版) IV-その他の神経疾患を含めて- 日本臨牀社、大阪、685-688, 2014
- ③ 副島英伸. エピジェネティクスの産業応用 第IV編疾患エピゲノム研究 第12章インプリンティング疾患のエピジェネティクス 監修: 畑田出穂・久保田健夫、シーエムシー出版、東京、pp266-279, 2014

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔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: 30304885

(2) 連携研究者

松本 直通 (MATSUMOTO, Naomichi)
横浜市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 80325638

吉浦 孝一郎 (YOSHIURA, Ko-ichiro)
長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授
研究者番号: 00304931

(3) 研究協力者

東元 健 (HIGASHIMOTO, Ken)
佐賀大学・医学部・助教
研究者番号: 30304885

八木 ひとみ (YATSUKI, Hitomi)
佐賀大学・医学部・技術専門職員
研究者番号: なし

渡邊 英孝 (WATANABE, Hidetaka)
佐賀大学大学院・医学系研究科・大学院生
研究者番号: なし