

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870139

研究課題名(和文)染色体異数性による転写調節異常機構の解明：パリスターキリアン症候群をモデルとして

研究課題名(英文)Molecular mechanism of aneuploidy syndrome: Pallister-Killian syndrome as a model

研究代表者

泉 幸佑 (Kosuke, Izumi)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：40383707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：パリスターキリアン症候群(PKS)は12番短腕染色体重複により発症するモザイク染色体異常症である。本研究では、PKSの病態メカニズム解明のため、次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現検討・エピゲノム修飾検討を行った。その結果として、PKSに特徴的と考えられる遺伝子発現異常、そして、その遺伝子発現異常に関与していると考えられるエピゲノム修飾変化を同定した。これらの知見はPKSの病因を解明する上で、有用な情報となる上に、他の染色体異常症の発症原因解明にも有用な知見と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Pallister-Killian syndrome (PKS) is caused by chromosomal duplication of 12p, which exists as mosaic aneuploidy. In order to understand the molecular mechanism of PKS, we evaluated the transcriptome pattern and epigenomic alteration in PKS patient-derived samples. Our data indicates the presence of unique transcriptome profile in PKS. Furthermore, there were unique epigenomic alterations seen only in PKS samples, suggesting the involvement of epigenomic alteration in the pathogenesis of PKS. Our study revealed these novel insights into the molecular mechanism of PKS, and such insights may have implications for other aneuploidy syndromes such as Down syndrome.

研究分野：細胞遺伝学

キーワード：染色体異常 モザイク

## 1. 研究開始当初の背景

パリスターキリアン症候群(MIM: 601803. 以下 PKS)は、12 番染色体短腕テトラソミーモザイクで発症する多発奇形症候群である。PKS の染色体異常はモザイク状に認められるため、患者由来の細胞には核型正常の細胞と12 番染色体短腕テトラソミーをマーカー染色体として含むテトラソミー細胞の2群が認められる。テトラソミー細胞は正常の46本の染色体に加え、12番染色体短腕の重複した12p 同腕染色体を有している。臨床症状は多岐にわたり、特徴的顔貌、先天性心疾患、横隔膜ヘルニア、発達遅滞・てんかんなどの合併症が知られている。興味深い事に患者細胞のテトラソミー細胞の占める割合(モザイク率)と病態の重症度に関連は認められていない。PKS の染色体異常は受精卵の段階で存在し、その後の体細胞分裂時にマーカー染色体を失い、核型正常細胞が生じる物と考えられている。<sup>1</sup>

PKS の頻度は13,000 から45,000 人に1人と推定されており、ダウン症候群に次ぐ2番目に頻度の多い、長期生存可能な常染色体異常症と考えられる。そのように染色体異常症の中では比較的頻度の高い染色体異常症でありながら、モザイク状の染色体異常という *in vitro/in vivo* モデルの確立が難しい病態であるため PKS の病態は未だに明らかになっていない点が多い。モザイクでは無い12番染色体短腕の部分重複でも PKS と同様の症状を認める事から、12番染色体の遺伝子コピー数が多い事により多岐にわたる臨床症状が引き起こされると考えられる。<sup>2</sup> しかしながら、12番染色体短腕の重複がどのようなメカニズムで多発奇形を引き起こしているのかは明らかになっていない。

PKS はモザイク状の染色体異常で発症する。末梢血中の染色体異常細胞は生後初期に消失される事が知られており、末梢血を用いた染色体検査では染色体異常が同定されない症例も数多く存在する。感度の高い染色体異常検出システムの開発が臨床上の観点からも求められている。そして、そのような、検査システムは、遺伝子発現異常とモザイク率の相関を検討する意味においても必要とされていたが、従来検査に用いられている Fluorescence in situ hybridization 法は検査に時間もかかり、さらに細胞が必要とされているため、DNA ベースで迅速にモザイク率の測定出来る検査システムが必要とされていた。

## 2. 研究の目的

本研究では PKS 患者の核型正常細胞とテトラソミー細胞を比較し、遺伝子発現レベルの変化を調べ、その遺伝子発現異常の原因を明

らかにする事が目的である。PKS はモザイク染色体異常症であるため、正確にモザイク率を測定する検査システムの構築も本研究の一部として行った。

## 3. 研究の方法

### 1) モザイク率測定システムの構築

Droplet digital PCR システム(DDPCR)の有用性評価を行った。患者由来ゲノム DNA を抽出し、12p の染色体コピー数を内在性コントロール染色体座位(RNaseP)の染色体コピー数と比較し、モザイク率の測定を試みた。ゲノム DNA 抽出には NucleoSpin Tissue キット(MACHERY-NAGEL 社)を用いた。

ゲノム DNA を DDPCR システム(QX200 Droplet Digital PCR システム:バイオ・ラッド社)でドロプレット状の分画に区画し、その上で Taqman プロブを用いた qPCR を行い、PCR 反応溶液中での絶対的コピー数を測定した。コピー数定量の為に下記のプロブを用いた(ING4 gene at 12p13.31 (Hs02490252\_cn)、ETNK1 gene at 12p12.1 (Hs01860263\_cn)、DNM1L gene at 12p11.21 (Hs00527169\_cn)ライフテクノロジー社)。DDPCR システムのモザイク率の正確性を評価するため、現在、PKS 診断のゴールドスタンダードと考えられている Fluorescence in situ hybridization 法も患者由来細胞を用いて実施し、結果を比較した。

### 2) 遺伝子発現異常とその影響の評価

遺伝子発現検討のため Affymetrix 社製遺伝子発現解析チップ、Nanostring nCounter expression assay, RNA-sequencing の実験プラットフォームを用い、ゲノムワイドな転写解析を行った。Affymetrix 社製遺伝子発現解析チップ(Affymetrix HG-U133 plus 2.0)と RNA-sequencing ではゲノムワイドの遺伝子発現検討をおこなった。Nanostring nCounter expression assay では12p に座位するマイクロ RNA の発現、そのターゲット遺伝子の発現、そして、Affymetrix HG-U133 plus2.0 で同定された発現変動遺伝子の解析を行った。

遺伝子発現検討は、PKS 患者由来のリンパ芽球細胞、皮膚線維芽細胞を用い、健常人由来細胞との比較検討を行った。さらに、統計学的有意に遺伝子発現変化の認められた臨床的に診断・治療に有意義と考えられる遺伝子(IGFBP2)に関しては、PKS 患者から採血を行い、血中 IGFBP2 値を ELISA 法により測定した。

### 3) エピゲノム修飾異常の評価

2) で明らかになった遺伝子発現異常の原因を探るために、ChIP-sequencing を行い、クロマチン修飾異常の有無を PKS 患者由来リンパ芽球細胞、皮膚線維芽細胞において評価を行った。細胞をホルマリン固定し、DNA-クロマチン関連タンパクのクロスリンクを行

う。細胞を溶かし、クロマチン関連タンパクを認識する抗体を用いて、免疫沈降反応を行い、回収した DNA フラグメントを次世代シーケンサーにより定量を行い ChIP-seq 解析を行った。DNA メチル化解析は PBAT 法 (Post-bisulfite adaptor-tagging 法) を用いた全ゲノムバイサルファイトシーケンスを行った。

#### 4. 研究成果

本研究の成果として、DDPCR が PKS 診断に有用である事、PKS 患者に特徴的な遺伝子発現パターンが存在すること、血清 IGFBP2 値が臨床症状と相関する事を明らかにした。

##### 1) DDPCR におけるモザイク率測定

PKS はモザイク状の染色体異常で発症するため、正確にモザイク率を測定する技術は、PKS 研究において重要である。そこで、Droplet digital PCR システムの PKS モザイク率測定への有用性を検討し、現在、ゴールドスタンダードと考えられている、Fluorescence in situ hybridization 法との結果比較を行った。最初に、健常人 DNA とモザイクでは無く 100%12p 異常を有する PKS 細胞より抽出された DNA を様々な比率で混合し、予想通りのモザイク率を DDPCR で検出出来るか調べた。すると、サンプル混合率から予想された通りのモザイク率が DDPCR で推定された。次に DDPCR と Fluorescence in situ hybridization 法の比較検定をおこなった。両検査から導きだされたモザイク率はほぼ同一であった。最後に 12p に存在する複数の Taqman probe ( ING4 gene, ETNK1 gene, DNM1L gene ) を用いて、比較検討を行った。3 つの 12p プローブではほぼ同一のコピー数変化が同定された。これは PKS が 1 2 番染色体短腕全体の重複で発症するという既知の事実と合致する結果であった。以上から、Droplet digital PCR システムが PKS モザイク率測定に有用である事を明らかにした。<sup>3</sup>

DDPCR は患者サンプルの收拾から数時間でモザイク率の推定まで到達でき、従来の Fluorescence in situ hybridization 法と比較して、迅速かつ簡便にモザイク率が測定出来るという優位性を持つ。そのため、研究におけるモザイク率測定のみならず、DDPCR は臨床診断にも応用可能と考えられた。

##### 2) 遺伝子発現異常

パリスターキリアン症候群 (PKS) における転写異常を確認するために、患者由来皮膚線維芽細胞を用いて、ゲノムワイド遺伝子発現解析を行った。その結果、PKS 患者に特徴的な遺伝子発現パターンを同定した。<sup>4</sup>

PKS 患者では 180 の遺伝子発現上昇遺伝子、174 の遺伝子発現低下遺伝子が明らかになった。180 の発現上昇遺伝子には、57 個もの 12p に座位する遺伝子が含まれており、PKS が 12p 重複で発症するとの既知の知見と合致する

結果であった。さらに、遺伝子発現の変化している遺伝子の多くは 12p13.31 領域に座位していた。この領域は以前に申請者のグループが同定した PKS の発症に關与との關与が疑われる PKS 責任領域と合致した。<sup>2</sup> 発現変動遺伝子を DAVID Gene Ontology 解析にかけたところ、HOX cluster 遺伝子の発現異常、初期発生に重要な働きを示している遺伝子の異常が明らかになった。

PKS で発現の変動している遺伝子には、ZFPM2, GATA6, IGFBP2 といった遺伝子が含まれていた。ZFPM2 変異は先天性心疾患・横隔膜ヘルニアの原因として知られている。GATA6 変異は先天性心疾患の原因として知られている。そして、IGFBP2 の過剰発現は成長障害の原因として知られている。そのため、これらの遺伝子発現変化が PKS の病態に直接關与している可能性が示唆された。

次に、IGFBP2 遺伝子発現異常に注目し、PKS 患者血液を採取し、IGFBP2 タンパク値を計測した。すると、血中 IGFBP2 タンパク値は PKS 患者において正常値と比較し上昇を認めた。さらに、高 IGFBP2 値を認めた PKS 患者では著明な成長障害が確認された。そのため、IGFBP2 高値が PKS の成長障害の原因に關与している可能性が明らかになった。<sup>5</sup>

PKS における遺伝子発現異常における、1 2 番染色体短腕に座位する microRNA の關与を調べるために、12p に存在する microRNA レベルを Nanostring システムにより、患者由来皮膚線維芽細胞で測定した。すると、12p に座位する全ての microRNA 発現が上昇していたが、その中でも、miR-1244 の発現上昇が一番顕著であった。そして、miR-1244 のターゲットと考えられている MEIS2 遺伝子の発現も miR-1244 発現レベルと逆相関を示し、MEIS2 遺伝子は低下していた。以上から PKS の遺伝子発現異常の一部に microRNA 発現異常が關与している可能性を明らかにした。<sup>6</sup>

##### 3) エピゲノム修飾異常

遺伝子発現異常が起きる分子メカニズムの検討を行った。最初に、転写調節異常と、染色体モザイク率の相関關係を検討したが、明らかな相関は認められなかった。そのため、モザイク率以外の他の要因が PKS 遺伝子発現異常に關与している可能性を考えた。そこで、DNA メチル化、クロマチン修飾といったエピゲノム修飾の關与を検討した。

その遺伝子発現パターンの相違点の原因として、遺伝子発現調節領域のメチル化率の変化の可能性に着目し、12 番染色体短腕とは異なる 11 番染色体短腕の IGF2/H19 クラスターにおける遺伝子発現調節領域のメチル化レベルを調べたところ、PKS 患者由来の核型正常細胞とテトラソミー細胞両方にメチル化レベルの異常を確認した (Izumi et al. 未発表データ)。そのため、PKS 患者由来の核型正常細胞の遺伝子発現パターンの異常は、初期発生時に存在する 12p 同腕染色体の影響に

より生じるゲノムワイドに起こる遺伝子発現調節領域のメチル化異常が関与しているという可能性を全ゲノムバイサルファイトシーケンスにて現在検討中である。

さらにヒストンのアセチル化・メチル化といった他のクロマチン修飾の発現異常への関与を調べるために、ChIP-sequencingを行ったところ PKS 患者で同様のエピゲノム修飾変化が確認された。

上記から、PKS 遺伝子発現異常の原因として、12p 遺伝子の重複のみならず、DNA メチル化やエピゲノム修飾といったクロマチン修飾の変化の関与が明らかとなった。

#### <引用文献>

1 Conlin LK, Kaur M, Izumi K, Close L, Wilkens A, Clark D, Deardorff MA, Zackai EH, Pallister P, Hakonarson H, Spinner NB, Krantz ID. (2012) "Utility of SNP Arrays in Detecting, Quantifying, and Determining Meiotic Origin of Tetrasomy 12p in Blood from Individuals with Pallister-Killian Syndrome." *Am J Med Genet A*. 158A: 3046-3053.

2 Izumi K., Conlin LK., Berrodin D., Fincher C., Wilkens A., Haldeman-Englert C., Saitta SC., Zackai EH., Spinner NB., Krantz ID. (2012) "Duplication 12p and Pallister-Killian Syndrome: A Case Report and Review of the Literature Towards Defining a Pallister-Killian Syndrome Minimal Critical Region" *Am J Med Genet A*. 158A: 3033-3045.

3 Fujiki K., Shirahige K., Kaur M., Deardorff MA., Conlin LK., Krantz ID., Izumi K. (2016) "Mosaic Ratio Quantification of Isochromosome 12p in Pallister-Killian syndrome using Droplet Digital PCR" *Mol Genet Genomic Med*. 4(3): 257-61.

4 Kaur M., Izumi K., Wilkens AB., Chatfield KC., Spinner NB., Conlin LK., Zhang Z., Krantz ID. (2014) "Genome-Wide Expression Analysis in Fibroblast Cell Lines from Proband with Pallister Killian Syndrome" *PLoS One*. 2014 Oct 16;9(10):e108853.

5 Izumi K., Kellogg E., Fujiki K., Kaur M., Tilton RK., Noon S, Wilkens A., Shirahige K., Krantz ID. (2015) "Elevation of Insulin-Like growth Factor Binding Protein-2 Level in Pallister-Killian Syndrome: Implications for the Postnatal Growth Retardation Phenotype" *Am J Med Genet A*. 167(6):1268-74.

6 Izumi K., Kaur M, Zhang Z., Krantz ID. (2014) "12p microRNA expression in Fibroblast Cell Lines from Proband with Pallister-Killian Syndrome" *Chromosome*

*Res*. 22(4):453-461

#### 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 6件)

1 Kaur M., Izumi K., Wilkens AB., Chatfield KC., Spinner NB., Conlin LK., Zhang Z., Krantz ID. (2014) "Genome-Wide Expression Analysis in Fibroblast Cell Lines from Proband with Pallister Killian Syndrome" *PLoS One*. 2014 Oct 16;9(10):e108853. 査読有

2 Izumi K., Kellogg E., Fujiki K., Kaur M., Tilton RK., Noon S, Wilkens A., Shirahige K., Krantz ID. (2015) "Elevation of Insulin-Like growth Factor Binding Protein-2 Level in Pallister-Killian Syndrome: Implications for the Postnatal Growth Retardation Phenotype" *Am J Med Genet A*. 167(6):1268-74. 査読有

3 Izumi K., Kaur M, Zhang Z., Krantz ID. (2014) "12p microRNA expression in Fibroblast Cell Lines from Proband with Pallister-Killian Syndrome" *Chromosome Res*. 22(4):453-461. 査読有

4 Izumi K., Krantz ID (2014) "Pallister-Killian Syndrome" *Am J Med Genet C*. 166C:406-413. 査読有

5 Tilton R., Wilkens A., Krantz ID., Izumi K. (2014) "Cardiac Manifestations of Pallister-Killian Syndrome" *Am J Med Genet A*. 164A:1130-5. 査読有

6 Fujiki K., Shirahige K., Kaur M., Deardorff MA., Conlin LK., Krantz ID., Izumi K. (2016) "Mosaic Ratio Quantification of Isochromosome 12p in Pallister-Killian syndrome using Droplet Digital PCR" *Mol Genet Genomic Med*. 4(3): 257-61. 査読有

[学会発表](計 1件)

Izumi K., Fujiki K., Shirahige K., Kaur M., Deardorff MA., Conlin LK., Krantz ID. "Mosaic Ratio Quantification of Isochromosome 12p in Pallister-Killian syndrome using Droplet Digital PCR" The 13th International Congress of Human Genetics (国際学会), Kyoto International Conference Center (京都府京都市), Japan (April 2016)

[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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

泉 幸佑 (IZUMI, Kosuke)  
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教  
研究者番号：40383707

##### (2) 研究分担者

無し

##### (3) 連携研究者

無し