

総括研究報告書

1. 研究開発課題名： インプリンティング異常症および合併症発症メカニズムの解明：患者由来 iPS 細胞を用いての研究
2. 研究開発代表者： 鏡 雅代（国立研究開発法人国立成育医療研究センター研究所分子内分泌研究部）
3. 研究開発の成果

患者検体、疾患モデル iPS 細胞および分化誘導した神経幹細胞などを用いた解析から以下のテーマで研究をすすめた。

研究目的①インプリンティング異常症エピ変異発症機序の解明：

エピ変異は Differentially Methylated Region (DMR) と呼ばれる親由来にシトシンのメチル基の修飾が異なるインプリンティング遺伝子の発現制御領域のメチル化異常を示す。エピ変異が未知の genetic な異常（正常メチル化維持のために必要な遺伝子の変異など）によるのか、発生過程の偶発的な epigenetic な事象によるのかを明らかにすることを目指す。

はじめに、未知の genetic な異常の同定のために、複数領域の DMR にメチル化異常を認める Multiple Methylation Defects (MMD)を示すエピ変異症例において、ビーズアレイ (Illumina Infinium HumanMethylation450 Beadchip) を用いて検索した。MMD の報告がない 14 番染色体インプリンティング異常症である Temple 症候群 (TS14) および Kagami-Ogata 症候群 (KOS14) において、TS14 5 例中 3 例で MMD を同定し、KOS14 では同定しなかった（論文投稿中）。MMD を示す TS14 エピ変異症例では DMR のメチル化に関連する因子の変異の可能性を考えエクソーム解析を施行したが病的変異は同定されず、cis な要因も考え 14 番染色体インプリンティング領域の次世代シーケンサー (NGS) を用いた target resequencing を施行中である。

研究目的②鏡-緒方症候群 (KOS14) の病態および合併症の発症機構の解明：

1) 14 番染色体インプリンティング領域のエピジェネティック修飾機構の解明

はじめに、TS14, KOS14 症例において NGS をもちいた 14 番染色体インプリンティング領域の網羅的メチル化解析を行い DMR の範囲を塩基レベルで決定した。次に、TS14 欠失症例（父アレル欠失）、KOS14 欠失症例（母アレル欠失）由来皮膚繊維芽細胞を用いて、H3K27AC、H3K9me3、H3K27me3 に対する ChIP assay を行い、IG-DMR の母アレルには H3K27me3 が父アレルには H3K9me3 が有意に結合すること、MEG3-DMR は H3K9me3、H3K27me3 が父アレル有意に結合していることを明らかとした。引き続き ChIP-seq を施行中である。さらに、DMR 内の small RNA の発現制御への役割を解明するため TS14, KOS14 症例の皮膚繊維芽細胞、胎盤を用いて RNAseq を施行した。現在データ解析中である。

2) 14 番染色体インプリンティング遺伝子の神経細胞における役割の解明

我々はマウス脳において 5mC の脱メチル化中間代謝産物である 5hmC が DMR で特徴的な分布を示し、神経分化に重要な役割を果たす可能性があるという preliminary なデータを得ている。DMR の高メチル化異常を示す KOS14 において、精神運動発達遅滞が必発であること、また脳に 5hmC が大量に含まれていることから、KOS14 の神経組織における 5hmC の解析は重要であると考えられる。これまでに酸化バイサルファイト法を用いて 5hmC と 5mC を区別してメチル化解析を行う方法を開発し、KOS14 症例および正常成人脳サンプルを用いて、酸化バイサルファイト法、パイロシーケンスおよび DNA メチル化ビーズアレイを組み合わせた解析を行い、

KOS14 における 5hmC の分布を解析し発表した (Matsubara et al. *Clinical Epigenetics* 2015)。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。すでに KOS14 および TS14 患者由来 iPS 細胞の樹立は完了し、神経幹細胞に分化誘導も終了している。今後、これらの細胞で、同様の手法を用いて 5hmC の分布を解析し、神経細胞の methylome/hydroxymethylome を明らかにする。

4. その他