

学位論文題名

Prader-Willi 症候群関連ゲノム刷り込み遺伝子の
再活性化に関する研究

学位論文内容の要旨

ゲノム刷り込み現象とは親由来により遺伝子の発現が異なる現象であり、刷り込み遺伝子は父あるいは母由来の遺伝子のみが発現する。ゲノム刷り込みの異常は先天性疾患や癌などの発生に関与している。

Prader-Willi 症候群 (PWS) と Angelman 症候群 (AS) はゲノム刷り込み現象が発症機序に関連している代表的疾患である。第15番染色体長腕11-13(15q11-q13)には父性発現遺伝子 *SNURF-SNRPN*、*IPW*、*NDN*、*MKRN3*、母性発現遺伝子 *UBE3A* など複数の刷り込み遺伝子が存在する。PWS は15q11-q13 領域の父性発現遺伝子の、AS は母性発現遺伝子の機能喪失により起こる。それぞれ約70%の症例でPWSでは父由来の15q11-q13に欠失を、ASでは母由来の同領域に欠失を有する。PWSは新生児期から乳児期にかけての筋緊張低下、成長障害、乳児期以降の過食に伴う高度の肥満、精神遅滞、性腺機能低下、低身長などを特徴とする疾患であり、ASは重度の精神遅滞、失調性歩行、てんかんなどを特徴とする疾患である。

ゲノム刷り込み現象の分子機構としてDNAメチル化、ヒストン蛋白のアセチル化、クロマチン構造などのエピジェネティクスが重要な役割を果たしている事が知られている。15q11-q13 領域においても親由来による違いが明らかにされており、*SNURF-SNRPN* のプロモーター領域は、活性である父由来対立遺伝子ではDNAは完全に脱メチル化されており、ヒストンH3、H4は高アセチル化状態であり、不活性である母由来対立遺伝子ではDNAはメチル化され、ヒストンH3、H4は低アセチル化状態である事が報告されている。

PWSでは不活性化された母由来遺伝子が存在しており、これらの刷り込み遺伝子を再活性化することが出来れば疾患の治療に結びつく可能性が考えられる。Saitohらは欠失型PWS患者リンパ芽球をDNAメチル基転移酵素阻害剤である5-azadeoxycytidine(5-aza-dC)で処理し*SNURF-SNRPN*の再活性化が可能であることを報告している。今回、刷り込み遺伝子の再活性化におけるDNAメチル化、ヒストンアセチル化の役割を明らかにする目的で、5-aza-dCに加えヒストン脱アセチル化酵素阻害剤Trichostatin A(TSA)を投与し刷り込み遺伝子の発現(再活性化)、DNAメチル化、ヒストンアセチル化の変化を検討した。ヒトリンパ芽球に加え、15q11-q13領域に相同であるマウス7Cに欠失を有するPWSモデルマウス線維芽細胞を用い比較検討した。

<材料・方法>

ヒト細胞は 15q11 - q13 領域に欠失を有する PWS 患者及び正常対照リンパ芽球、マウス細胞は PWS モデルマウス、AS モデルマウス、正常対照マウス線維芽細胞を用いた。薬剤処理は薬剤なし、5-aza-dC のみ、5-aza-dC と TSA、TSA のみの 4 種類で行った。刷り込み遺伝子及び対照遺伝子に関し、遺伝子発現は RT-PCR、DNA のメチル化はメチル化 PCR、ヒストンアセチル化はクロマチン免疫沈降法で解析した。

<結果>

PWS 患者リンパ芽球では 5-aza-dC 処理で *SNURF-SNRPN*、*NDN* の発現が誘導されたが、TSA 処理では発現の増加を認めなかった。両者の併用では 5-aza-dC 処理と比べて発現の増加は認められなかった。5-aza-dC 処理で *SNURF-SNRPN* の脱メチル化が誘導されたが、TSA 処理では脱メチル化されなかった。両者の併用では 5-aza-dC 処理と比べて差はなかった。5-aza-dC 処理で *SNURF-SNRPN* のヒストン H4 のアセチル化増加を認めたが、H3 のアセチル化の変化はなかった。TSA 処理ではいずれも変化がなかった。*NDN* では逆に 5-aza-dC 処理でアセチル化の減少を認め、TSA 処理では H4 のアセチル化は増加していた。*MKRN3* ではいずれの薬剤処理でも変化ははっきりしなかった。

PWS モデルマウス線維芽細胞では 5-aza-dC 処理で *Snurf-Snrpn*、*Ndn* の発現増加を認めたが、ヒトの変化と比べると明らかではなかった。ヒトと同様に TSA 処理で発現の増加はなく、両者の併用でも 5-aza-dC 処理と比べて発現の増加は認められなかった。*Mkrn3* は両者併用時のみ軽度の発現増加を認めた。5-aza-dC 処理で *Snurf-Snrpn* の脱メチル化が誘導されたが、TSA 処理では脱メチル化されなかった。両者の併用では 5-aza-dC 処理と比べて差はなかった。5-aza-dC 処理で *Snurf-Snrpn*、*Mkrn3* のヒストンアセチル化の増加を認めたが、*Ndn* では変化ははっきりしなかった。TSA 処理で *Mkrn3*、*Ndn* のヒストンアセチル化の増加を認めたが、*Snurf-Snrpn* では増加がわずかであった。すべての刷り込み遺伝子で両者の併用で単独処理に比べ若干アセチル化の増加を認めた。ヒストン H3 と H4 でアセチル化の変化はほぼ共通していた。

<考案>

PWS 患者リンパ芽球において 5-aza-dC 処理で *SNURF-SNRPN*、*NDN* が再活性化することが認められた。しかし、TSA 単独ではいずれの刷り込み遺伝子の再活性化も得られず、両者の併用でも 5-aza-dC 処理と比べて差がみられなかった。この結果はマウス細胞を用いた実験結果と基本的には共通していた。これらの結果は PWS の責任染色体領域における刷り込み遺伝子の発現制御には、ヒストンのアセチル化よりも DNA メチル化がより重要な役割を果たしている可能性を示唆する。

ヒストンアセチル化の変化に関しては、刷り込み遺伝子ごとに振る舞いが異なり、各遺伝子でアセチル化の機序または程度が異なる可能性が考えられた。しかし、ヒストンアセチル化増加のみでは刷り込み遺伝子の活性化には不十分である事はヒトとマウスで共通していた。

SNURF-SNRPN、*Snurf-Snrpn* は他の刷り込み遺伝子に比べ TSA 処理でアセチル化の変化がほとんどなかった。*SNURF-SNRPN* の CpG アイランドは 15q11 - q13 の刷り込みを制御する刷り込み中心と重なっており、クロマチン構造が他の部分と異なっている可能性が指摘されており、今後詳細なクロ

マチン構造の解析が必要であると考えられた。

ヒトリンパ芽球、マウス線維芽細胞において、5-aza-dC 処理により刷り込み遺伝子の再活性化が得られた。今後は疾患の治療を目標にモデルマウスを用いた個体レベルでの評価が課題である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦

副 査 教 授 清 水 宏

副 査 教 授 佐々木 秀直

学 位 論 文 題 名

Prader-Willi 症候群関連ゲノム刷り込み遺伝子の 再活性化に関する研究

ゲノム刷り込み現象とは親由来により遺伝子の発現が異なる現象であり、刷り込み遺伝子は父あるいは母由来の遺伝子のみが発現する。ゲノム刷り込みの異常は先天性疾患や癌などの発生に関与している。

Prader-Willi 症候群 (PWS) と Angelman 症候群 (AS) はゲノム刷り込み現象が発症機序に関連している代表的疾患である。15q11 - q13 には父性発現遺伝子 *SNURF-SNRPN*、*NDN*、*MKRN3*、母性発現遺伝子 *UBE3A* など複数の刷り込み遺伝子が存在し、PWS は父性発現遺伝子の、AS は母性発現遺伝子の機能喪失により起こる。

PWS は新生児期から乳児期にかけての筋緊張低下、成長障害、乳児期以降の過食に伴う高度の肥満、精神遅滞、性腺機能低下、低身長などを特徴とする疾患であり、AS は重度の精神遅滞、失調性歩行、てんかんなどを特徴とする疾患である。

ゲノム刷り込み現象の分子機構として DNA メチル化、ヒストン蛋白のアセチル化、クロマチン構造などのエピジェネティクスが重要な役割を果たしている事が知られている。

PWS では不活化された母由来遺伝子が存在しており、これらの刷り込み遺伝子を再活性化することが出来れば疾患の治療に結びつく可能性が考えられる。Saitoh らは欠失型 PWS 患者リンパ芽球を DNA メチル基転移酵素阻害剤 5-aza-dC で処理し *SNURF-SNRPN* の再活性化が可能であることを報告している。今回、刷り込み遺伝子の再活性化における DNA メチル化、ヒストンアセチル化の役割を明らかにする目的で、5-aza-dC に加えヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 TSA を投与し刷り込み遺伝子の再活性化、DNA メチル化、ヒストンアセチル化の変化を検討した。ヒトリンパ芽球に加え、15q11 - q13 領域に相同であるマウス 7C に欠失を有する PWS モデルマウス線維芽細胞を用い比較検討した。

薬剤処理は薬剤なし、5-aza-dC のみ、5-aza-dC と TSA、TSA のみの 4 種類で行った。刷り込み遺伝子及び対照遺伝子に関し、再活性化は RT-PCR、DNA のメチル化はメチル化 PCR、ヒストンアセチル化はクロマチン免疫沈降法でヒストン H3、H4 のアセチル化について解析した。

PWS 患者リンパ芽球において 5-aza-dC 処理で *SNURF-SNRPN*、*NDN* が再活性化することが認められた。しかし、TSA 単独ではいずれの刷り込み遺伝子の再活性化も得られず、両者の併用でも 5-aza-dC 処理と比べて差がみられなかった。この結果はマウス細胞を用いた実験結果と基本的には共通していた。これらの結果は PWS の責任染色体領域における刷り込み遺伝子の発現制御には、ヒストンのアセチル化よりも DNA メチル化がより重要な役割を果たしている可能性を示唆する。

ヒストンアセチル化の変化に関しては、刷り込み遺伝子ごとに振る舞いが異なり、各遺伝子でアセチル化の機序または程度が異なる可能性が考えられた。しかし、ヒストンアセチル化増加のみでは刷り込み遺伝子の活性化には不十分である事はヒトとマウスで共通していた。

SNURF-SNRPN、*Snurf-Snrpn* は他の刷り込み遺伝子に比べ TSA 処理でアセチル化の変化がほとんどなかった。*SNURF-SNRPN* の CpG アイランドは 15q11 - q13 の刷り込みを制御する刷り込み中心と重なっており、クロマチン構造が他の部分と異なっている可能性が指摘されており、今後詳細なクロマチン構造の解析が必要であると考えられた。

ヒトリンパ芽球、マウス線維芽細胞において、5-aza-dC 処理により刷り込み遺伝子の再活性化が得られた。今後は疾患の治療を目標にモデルマウスを用いた個体レベルでの評価が課題である。

公開発表に際し、副査の佐々木教授から刷り込み遺伝子を認識する分子機構について、PWS,AS の片親性ダイソミーの起こるメカニズム、また薬剤による刷り込み遺伝子の再活性化の可逆性について質問があった。次に副査の清水教授からはリンパ芽球、線維芽細胞レベルでの研究結果を、個体レベルにどのように応用するのかという質問があった。また主査の小林教授からは TSA のヒトリンパ芽球とマウス線維芽細胞でのヒストンアセチル化の変化の違いについての考察、また今後の研究の展開について質問があった。申請者はいずれの質問に対しても実験結果や他の研究者からの報告を引用し妥当な回答を行った。

本研究は刷り込み遺伝子の再活性化における脱メチル化の重要性を明らかにし、今後このような疾病における薬物治療の可能性が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。