

鳥取大学医学部 教授

押村 光雄

「ゲノムインプリンティング制御の分子機構」

1. 研究実施の概要

ゲノムインプリンティング（ゲノム刷り込み現象）とは、父母由来の対立遺伝子が識別され異なる発現レベルを示す現象である。親由来に偏りのある染色体異常を伴う先天性疾患において刷り込み遺伝子の発現異常が認められることから、組織特異的/時期特異的な刷り込みの正確な制御が正常な個体発生と生理機能の維持に重要であると考えられる。ヒトでは先天性疾患例における分子遺伝学的解析、実験的にはマウス遺伝学を中心に研究が進められてきた。これらに加え *in vitro* での細胞遺伝学実験が可能になれば、インプリンティング制御の分子機構解明に役立つと期待された。そこで我々は培養細胞を利用したインプリンティング解析系の開発を目標に、親起源の明らかなヒト正常染色体を1本含むマウス A9 細胞ライブラリーを作製してきた。本研究ではゲノムインプリンティング制御機構を包括的に理解することを目的として、この新規の実験系を用いたアプローチにより、1) ゲノム刷り込みを受けるヒト遺伝子の単離、2) 刷り込み遺伝子のドメインレベルでの発現制御を司るインプリンティングセンターの同定を行った。また、体細胞でのエピジェネティックな変異によるゲノムインプリンティングの異常はがんの発生と深い関わりを持つことから、3) インプリンティング異常の個体差と発がんにおける役割を明らかにすることを目指した。

1) ゲノム刷り込みを受けるヒト遺伝子の単離

i) 親由来の明らかなヒト染色体1本を保持するマウス細胞の作製

ヒト染色体を一本含むマウス細胞ライブラリーを染色体移入法により作製し、父親と母親由来の相同染色体を保持する雑種細胞の対を同定した。既知のインプリント遺伝子に関し発現パターンおよび遺伝子上流の CpG 配列のメチル化状態を調べたところ、本来のヒト正常2倍体細胞での状態を維持していたことから、これらの雑種細胞パネルがインプリント解析系に適用可能であることが明らかとなった。

ii) 新規ヒトインプリント遺伝子の体系的探索

インプリント遺伝子は染色体上の特定領域にクラスターを形成することが知られている。そこでランドマークとなる既知のインプリント遺伝子の周囲に位置する EST の発現を、先に準備した雑種細胞パネルにおいて RT-PCR により検索した。種々の染色体領域について検索した結果、計 19 種の EST がどちらか一方の親由来のヒト染色体を保持する雑種細胞でのみ発現を示した。なかでも重要なものとして、11p15.5 領域における Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) の原因遺伝子座に位置する父性発現の *LIT1*、15q11-q13 に位置する父性発現の *GABRB3*、Prader-Willi 症候群 (PWS) 候補領域に位置する父性発現の *snoRNA* および Angelman 症候群 (AS) 欠失領域に位置する母性発現の *ATP10C* が挙げられる。

PWS および AS の原因遺伝子座として知られる 15q11-q13 領域にはこれまで数種のインプリント遺伝子が同定されているものの、原因遺伝子の特定には至っていない。今回同定

した box C/D 型 *snoRNA* 遺伝子は、マウスでの実験から染色体の部分欠失により胎性致死となる領域に含まれる。同領域内の既知のインプリント遺伝子をノックアウトしたマウスでは胎性致死の表現型が現れていないため、*snoRNA* は PWS 原因遺伝子の有力な候補である。また *ATP10C* 遺伝子は AS 症例で発現低下が認められた。加えてマウスでは *Atp10c/Pfap* 遺伝子が体重増加に関わることが示唆されており、AS でも肥満を呈する症例がみられることから、*ATP10C* は AS 原因遺伝子の有力候補の 1 つである。さらに自閉症患者の数%に 15q11-q13 領域の母方アレルの増幅が認められることから、*ATP10C* は AS のみならず自閉症にも関与する可能性が指摘されており、現在機能解析を進めている。以上のように、親起源の明らかなヒト染色体を 1 本保持するマウス細胞を用い、刷り込みを受けるヒト遺伝子の体系的探索が可能になった。またこの細胞を用いることで、エピジェネティックな遺伝子発現制御に関与するヒストン修飾（アセチル化）を対立アレルを識別して解析できることが示された。

2) インプリンティングセンターの同定と制御機構の解析

i) インプリンティングセンターの存在を示唆する実験的証明

ゲノムインプリンティングは世代ごとに書き換えが起きるエピジェネティックな現象である。染色体の親起源はインプリンティングセンターに刷り込まれており、体細胞でのインプリントは細胞分裂を通じて安定に引き継がれるが、生殖細胞では配偶子形成過程で刷り込みが一旦消去されたのち個体の性に応じた書き換えが起きると考えられる。マウス雑種細胞中のヒト染色体は任意の細胞に移入可能である。そこで親起源の明らかなヒト 11 番染色体を多分化能を有するマウス胚性腫瘍細胞株に移入し、初期分化に伴うゲノムインプリンティングの確立について検討した。その結果未分化状態では供与細胞 (A9) において不活性化していたインプリント遺伝子 *H19* が活性化するが、分化誘導に伴い再び不活性化がみられた。このことから体細胞の染色体には親起源が刷り込まれており、インプリント遺伝子は細胞の分化段階に応じた発現様式を呈すること、および染色体に刷り込まれた親起源は生殖系列を経なければ書き換えられないことが *in vitro* 実験系において示された。

ii) ゲノムインプリンティングの進化的保存

ヒト 11p15.5 に位置する母性発現のインプリント遺伝子 *H19* は、有袋類/鳥類まで保存されているが、非胎盤哺乳類での刷り込みの有無は明らかでない。そこでヒト 11 番染色体を A9、m5S (マウス)、BP6T (ハムスター)、FM7 (インドホエジカ)、PTK1 (ラットカンガルー)、DT40 (ニワトリ) 細胞に移入し、ヒト *H19* 遺伝子の刷り込み状態を検討した。胎盤哺乳類由来の細胞では母方アレルのみ発現していたのに対し、非胎盤哺乳類 (有袋類) と鳥類細胞では父方アレルからも発現がみられた。さらに、ヒト 11 番染色体を PTK1 ないし DT40 細胞から再度マウス A9 細胞に回収したところ、父方アレルからの発現が抑制された。一方、父方 *H19* 遺伝子上流の CpG アイランドの高メチル化状態は、いずれの細胞でも *H19* の発現に関わらず維持されていた。これらの知見は、ヒト染色体上に刷り込まれ

た親由来の情報は有胎盤類以外の細胞中でも維持されるが、発現パターンの制御機構は胎盤哺乳類と非胎盤哺乳類では異なり、少なくともヒトの刷り込みは非胎盤哺乳類においては機能しないことを示唆している。

iii) ヒト *LIT1* 遺伝子 CpG アイランド領域の機能解析

我々が 11p15.5 領域から新規に単離した父性発現のインプリント遺伝子 *LIT1* は、過成長症候群 (BWS) の染色体転座点に位置する。同領域に位置する *KvLQT1* 遺伝子のイントロン 10 から逆方向に転写され、明確な ORF を持たないことから、周囲の遺伝子発現を調節する機能を持つ可能性が示唆された。*LIT1* 上流には約 1.9kb にわたる CpG アイランドが存在するが、その中にはルシフェラーゼ活性を指標としたレポーターアッセイにより 228bp のプロモーター領域が同定され、さらにプライマー伸長法および RNase プロテクションアッセイにより転写開始点が同定された。そこでインプリンティングドメイン制御における *LIT1* の機能を明らかにする目的で、ヒト 11 番染色体上の *LIT1* CpG アイランド領域を欠失した改変染色体を作製し、*LIT1* および近傍に位置するインプリント遺伝子の発現を検索した。染色体改変は高頻度に相同組み換えを起こすニワトリ DT40 細胞を宿主として行った。はじめに父方あるいは母方のヒト 11 番染色体上の *LIT1*CpG アイランド領域をターゲティングにより欠失させた。この改変染色体を CHO 細胞に回収し、*LIT1* 近傍に位置する母性発現のインプリント遺伝子 *KvLQT1*、*SMS4*、*p57/KIP2* について刷り込み状態を検索したところ、*LIT1* の発現抑制に伴って本来発現のない父方のヒト染色体からこれら遺伝子の発現が検出された。よって *LIT1* CpG アイランドは少なくとも *LIT1*、*KvLQT1*、*SMS4*、*p57KIP2* の 4 つのインプリント遺伝子の刷り込みに必須であり、インプリンティングセンター (IC) として機能することが示唆された。このように、ニワトリ DT40 細胞を用いたヒト染色体改変技術は、染色体ドメインレベルにおける遺伝子発現の制御機構を解明するためにきわめて有用であることが示された。

3) インプリンティング異常の個体差と発がんにおける役割の解明

インプリント遺伝子の発現異常とがんとの関連については、はじめに *IGF2* 遺伝子の両アレル性発現が遺伝病に併発する小児がんで見出されて以来、成人においても各種のがんで発現異常が報告されるようになった。例えば大腸がんの場合、患者のがん組織のみならず非がん部組織および末梢リンパ球においても *IGF2* のインプリンティング異常が高頻度に観察され、インプリント遺伝子発現の個体差とがんの易罹患性との関わりが示唆された。そこで本研究ではインプリント遺伝子の発現異常と発がんを含めた個体差との関連を理解するため、正常人におけるインプリント遺伝子発現の個体差ならびにがん症例におけるインプリント遺伝子の発現異常を検討した。

i) 正常人末梢血液細胞でのインプリント遺伝子発現の解析

11p15.5 に位置する *IGF2*、*IMPT1* ならびに 15q11-q13 に位置する *SNRPN* について、正常人末梢血における発現を検討した。*IGF2* は 10% が両アレル性発現を呈したのに対し

SNRPN は全例が片アレル性発現を示した。一方 *IMPT1* は全例が両アレル性発現を示し、なおかつアレルの発現比に個体差が見出された。ポストゲノム戦略のひとつとして、がんを含む疾患に対する易罹患性の個体差と一塩基多型 (SNPs) との関連が注目されている。ジェネティックな多型に加えエピジェネティックな多型が個体差を与えるという新しい概念は今後重要になると考えられる。

ii) がんにおけるインプリンティング異常

大腸がん症例において *IGF2* および 7q31 に位置する *MEST* の発現を検索したところ、両アレル性発現がそれぞれ 42%、35% で認められた。興味深いことに、*IGF2* と *MEST* の両アレル性発現は患者非がん部組織の 38%、25% でも認められ、がんの易罹患性との関連を示唆するものであった。また大腸がん症例において *LIT1* の発現を調べたところ、60% で両アレル性発現がみられた。染色体改変によるノックアウト実験より *LIT1* はインプリンティングセンターの機能をもつと予想されることから、*LIT1* のインプリンティング異常が周囲のがん関連遺伝子の発現を撓乱している可能性が考えられる。

肺腺がんにおいて *IGF2* および *MEST* の発現を調べたところ、両アレル性発現が各々 47%、85% で認められたが、大腸がんにみられるような患者非がん部での両アレル性発現は見出されなかった。*IGF2*、*MEST* はともに細胞増殖を正に制御する因子として知られており、がん遺伝子タイプのインプリント遺伝子であるといえる。インプリンティング異常による両アレル性発現が、がん細胞の増殖を促進したと考えられた。

グリオーマ細胞株における検索では 19q34 に位置する *PEG3* の発現喪失が 44% で認められ、発現制御領域内の CpG アイランドの高メチル化を伴っていた。*PEG3* 遺伝子産物は細胞死への関与が示唆されており、がん抑制遺伝子タイプの刷り込み遺伝子といえる。インプリンティング異常による発現喪失ががん細胞の細胞死を抑制したと考えられた。

がん関連遺伝子の検索はこれまで塩基配列の突然変異、染色体の転座/増幅/欠失を中心に行われてきた。しかし近年、塩基配列の変化を伴わないエピジェネティックな変化が遺伝子発現の変動につながることも明らかになりつつある。本研究で行った刷り込み遺伝子の解析は、エピジェネティクスの関与が明確なことからがん化との関連を探る有効な手段であるといえる。

2. 研究構想

ゲノムインプリンティング (ゲノム刷り込み現象) とは、「二倍体生物の対立遺伝子が父親・母親のいずれに由来するかを記憶し、異なる発現レベルを示す現象」である。一对の対立遺伝子は等価であると仮定した古典的なメンデル遺伝学の枠を越えた現象であり、また哺乳類において単為生殖が成り立たないことを説明する理由の一つとして、その生物学的意義が注目されてきた。このような基本的生命現象であるゲノム刷り込みに関する分子レベルでの研究はこの 10 年で緒についたばかりで、染色体が父親あるいは母親由来であることをどのように標識しているかなど依然不明な点が多い。

我々は本研究課題の開始以前から、インプリンティングの分子機構を解明する技術の開発を目的として、親起源の明らかなヒト正常染色体1本を含むマウス A9 細胞の作製を行っていた。父親と母親由来の一对の相同染色体を分離してマウス雑種細胞中に保持させることで、対立遺伝子の発現や DNA メチル化などの後成的な修飾を容易に検索することが可能であると考えられた。

本研究課題では、この雑種細胞パネルおよび染色体移入技術を用いて、ヒトインプリント遺伝子の単離・分子機構の解明を進めることにより、ゲノム刷り込み現象について包括的な理解を深めることを目標とした。研究開始時には3つの課題（1. 刷り込みを受けるヒト遺伝子の単離、2. 刷り込み制御機構の解析、3. 刷り込み中心の同定）を設定したが、その後新たに、4. 刷り込み異常の発がんにおける役割と個体差に関する研究を進めた。

2.1 ゲノム刷り込みを受ける遺伝子の単離

2.1.1 親起源の明らかなヒト染色体を有するマウス A9 雑種細胞ライブラリーの作製

我々はゲノムインプリンティングの分子機構の解明およびヒトインプリント遺伝子の単離を目的として、親起源の明らかなヒト正常染色体1本を有するマウス A9 雑種細胞ライブラリーを染色体移入法により作製してきた。研究課題開始時点において、4番、10番、11番、15番染色体に関しては、父親と母親由来の染色体を有するマウス A9 細胞が準備できていた。このうちヒト11番、15番染色体上には、それぞれ母性発現を呈する *H19*、父性発現を呈する *SNRPN* 遺伝子が存在する。そこで最初にこれら既知のインプリント遺伝子について、雑種細胞における発現パターンが維持されているかどうか RT-PCR 法により検索した。その結果 *H19*、*SNRPN* 遺伝子ともに片アレルからの発現が認められ、雑種細胞においてヒト遺伝子のインプリンティングが維持されていることを確認した。さらに、父親と母親由来の染色体間で DNA のメチル化状態が異なることも明らかとなった。そこで DNA の複製タイミングが母親由来に比較して父親由来の染色体で早いという知見から刷り込み遺伝子である可能性が指摘されていた15番染色体上の GABA レセプター *GABRB3* 遺伝子について、雑種細胞における発現を検索した。その結果、父親由来の15番染色体を有するマウス A9 雑種細胞でのみ発現が認められ、*GABRB3* が父性発現のインプリント遺伝子であることが示唆された。

以上から、ヒト染色体上のインプリント遺伝子はマウス雑種細胞中においても染色体の親起源に従って発現することが明らかとなり、この雑種細胞がヒトのインプリント遺伝子の解析に有用な資材となることが示唆された。そこではじめに雑種細胞ライブラリーのうち、保持するヒト染色体とその親由来が特定されていない A9 細胞クローンについて FISH 解析・多型解析を行い、親起源の明らかなヒト正常染色体1本を有するマウス A9 雑種細胞パネルの整備を目指した。

2.1.2 ゲノムインプリンティングを受けるヒト遺伝子の単離

インプリンティングの理解は、ヒトゲノム上に存在するインプリント遺伝子を同定することから始まる。本研究課題開始時点において4番、10番、11番、15番染色体に関しては、父親と母親由来のヒト染色体を有するマウス A9 細胞が得られていた。そこではじめに4つの刷り込み領域が想定されていたヒト 11 番染色体からインプリント遺伝子の同定を試みた。

刷り込み遺伝子は染色体上の特定の領域にクラスターを形成して存在する。染色体上に刷り込み遺伝子が一つ見出されれば、その周囲にも刷り込み遺伝子が存在する可能性が高い。研究課題を開始した1996年当時はヒトゲノムプロジェクトも進行途上で、DNA 配列以前のゲノム地図として利用できたのは、放射線雑種細胞パネルを用いてマップされた EST (Expressed Sequence Tag) の地図であった。そこで既知の刷り込み遺伝子の周囲に位置する EST の発現を、父方と母方のヒト相同染色体を保持するマウス A9 細胞において RT-PCR により検索した。アレル特異的発現が認められるクローンについては転写領域内に存在する塩基配列多型を見出した後、ヒト組織におけるアレル特異的発現を確認することとした。

最初に着手した11番染色体において刷り込み候補遺伝子 *LIT1* が同定された。ゲノムプロジェクトの進行に伴って EST の染色体上での位置情報の整備が進んだことは、雑種細胞を用いたポジショナルなアプローチを有利にした。また確立された実験手法である RT-PCR 法によって大量の EST の検索が可能な点も有効である。そこで対象を刷り込み遺伝子の存在が報告されている1番、6番、7番、10番、15番、19番および X 染色体に広げ、EST の発現検索による刷り込み遺伝子単離を順次進めた。

X 染色体の場合は不活化の問題があり、染色体の供与細胞は X 染色体を2本持つ女性由来でなければならない。それまでに確立していた雑種細胞ライブラリーのヒト染色体供与細胞は男性由来であった。そこで新たに女性由来の細胞から、ヒト X 染色体を保持する雑種細胞パネルを作製することにした。

2.2 ゲノムインプリンティングの制御機構の解析

本研究課題はヒト染色体を保持する雑種細胞に立脚しており、染色体移入によって異種の細胞間でヒト染色体を移し替える。このため宿主細胞が変わった場合にヒト染色体の刷り込みが維持されるかどうかを知ることは重要な問題である。そしてヒト染色体の刷り込みを維持する細胞と維持しない細胞を見極めることは、同時に刷り込み制御機構の理解につながると考えて以下の実験を計画した。

2.2.1 インプリンティング現象の進化上の保存性について

インプリンティングは哺乳類でのみ認められる現象であるといわれている。これを実験的に検証するために、父親と母親由来のヒト 11 番染色体を種々の動物種(哺乳類、有袋類、

両生類、鳥類等) に由来する細胞株に移入した。これらの雑種細胞で 11 番染色体上の刷り込み遺伝子 *H19* の発現および周辺 DNA のメチル化状態を検索することにより、刷り込みの哺乳類での特異性および DNA メチル化の関与について検証した。

2.2.2 未分化な胚細胞での刷り込み維持についての解析

ゲノムインプリンティングは世代ごとに書き換えが起きるエピジェネティックな現象である。染色体の親起源はインプリンティングセンターに刷り込まれており、体細胞でのインプリントは細胞分裂を通じて安定に引き継がれるが、生殖細胞では配偶子形成過程で刷り込みが一旦消去されたのち個体の性に応じた書き換えが起きると考えられる。マウス雑種細胞中のヒト染色体は任意の細胞に移入可能である。そこで親起源の明らかなヒト 11 番染色体を多分化能を有するマウス胚性腫瘍細胞株に移入し、11 番染色体上の刷り込み遺伝子 *H19* の発現を指標として、初期分化に伴うゲノムインプリンティングの確立について検討した。

ゲノムの後成的な修飾により染色体特異的な遺伝子発現制御が確立される例として、インプリンティングと並んで X 染色体の不活性化現象が知られている。胚性腫瘍細胞を *in vitro* で分化させると X 染色体の不活性化が始まるとの報告がある。これに着想を得て、刷り込み遺伝子の発現様式が確立する時期を胚性腫瘍細胞の分化誘導実験により特定できないかと考えた。そこでヒト 11 番染色体を保持する胚性腫瘍細胞をレチノイン酸処理して分化を誘導し、分化誘導の前後での刷り込み遺伝子 *H19* の発現を検索した。

2.2.3 ヒト染色体移入マウスを用いた刷り込み制御機構の解析

刷り込み領域においては染色体の親起源が Genomic Imprinting Center (GIC) に刷り込まれており、配偶子形成過程でその記憶が消去され、再度個体の性に応じた刷り込みがなされると考えられている。しかし配偶子形成過程のどの段階で親起源の消去・書き換えが起きるかなど、詳細は明らかでない。ヒト染色体上の刷り込みはマウス雑種細胞においても維持されることから、ヒト染色体を保持するキメラマウスを作製することで、発生過程におけるヒト染色体刷り込みの消去・書き換えを実験的に解析できると期待された。そこではじめに父方・母方のヒト 11 番染色体をマウス ES 細胞に移入してキメラマウスを作製したが、キメラ率の高い個体は得られなかった。*in vitro* の実験において 11 番染色体を保持する ES 細胞を選択薬剤を含まない培地中で長期継代培養したところ、継代に伴って 11 番染色体の脱落が認められた。これはヒト 11 番染色体の脱落した細胞が増殖優位性を獲得して細胞集団が置き換わったことを示唆する。このことから、キメラマウスの発生過程で ES 由来の細胞からヒト染色体が脱落したためにキメラ率の高い個体は得られなかったと考えられる。

我々はこれまでに 11 番染色体以外にもヒト染色体を保持するキメラマウスを作出してきた。その経験からマウス ES 細胞中にヒト染色体を移入した場合、ヒト染色体ごとに安

定性が異なり、同じ染色体であっても移入する領域が小さいほど安定であることがわかってきた。そこで ES 細胞中でのヒト 11 番染色体領域の安定保持を図る方法として、着目する 11p15.5 領域を内在のマウス染色体に転座させることを試みた。

2.2.4 インプリンティングにおけるアレル特異的ヒストン修飾の新しい解析システム

刷り込みに関与するゲノムの後成的な修飾には、DNA とりわけシトシン残基のメチル化が重要な役割を果たすことが示されてきた。加えて近年、メチル化シトシン残基に MeCP2 タンパクが結合することでヒストン脱アセチル化酵素が呼び込まれ、クロマチン構造の変化を通じて遺伝子発現を制御することが報告されている。

ゲノム刷り込みを解析する際の技術的な障害のひとつは、2 倍体細胞内で父親と母親由来のゲノムを区別することの困難さにある。アレル特異的な遺伝子発現や DNA メチル化解析では DNA 多型を利用して染色体の親由来を特定する。しかし転写領域、転写調節領域に存在する DNA 多型は希である。この問題点を克服するために、我々は親由来の明らかな単一ヒト染色体を保持するマウス雑種細胞ライブラリーを作製してきた。この雑種細胞内では、多型の有無によらず対立遺伝子の発現や後成的な修飾の状態を解析できる。そこで本研究ではこの雑種細胞を用いて、アレル特異的なヒストンのアセチル化状態と刷り込み遺伝子の発現状態について検討した。

2.3 インプリンティングセンター (IC) の同定

2.3.1 ゲノムインプリンティングセンター (GIC) のマッピング

ヒト 11 番染色体を保持するマウス雑種細胞ではヒトインプリント遺伝子 *H19* の発現パターンが保持されていることから、各々の染色体上にはその親起源が記憶されていると考えられた。そこで親起源が記憶されている染色体部位、すなわちゲノムインプリンティングセンター (GIC) を同定することを目的に、X線照射によりヒト 11 番染色体を断片化し、様々なヒト染色体領域を保持するマウス A9 雑種細胞 (Radiation Hybrid) のパネルを作製することにした。この雑種細胞パネルの中から *H19* の刷り込み発現を喪失するクローンを同定し、それらに共通する欠失領域を見出すことにより、GIC の特定を試みた。

2.3.2 培養細胞における染色体改変を通じた刷り込み中心同定へのアプローチ

刷り込み遺伝子は染色体上の特定領域にクラスターを形成することが知られており、その中には周囲の遺伝子発現制御に関わるシスエレメントの存在が示唆されてきた。このため刷り込み遺伝子クラスター内の染色体領域を実験的に改変し、周囲の刷り込み遺伝子の発現様式を検索することで、発現調節に重要な配列を特定できると考えられた。従来このような遺伝学実験は、主としてマウス ES 細胞で行われてきた。ヒトを対象とする場合は刷り込み遺伝子の関与する染色体異常を伴う先天性疾患の症例解析が主流であり、体細胞レベルであっても実験的にヒト染色体の改変を試みるという発想はなかった。

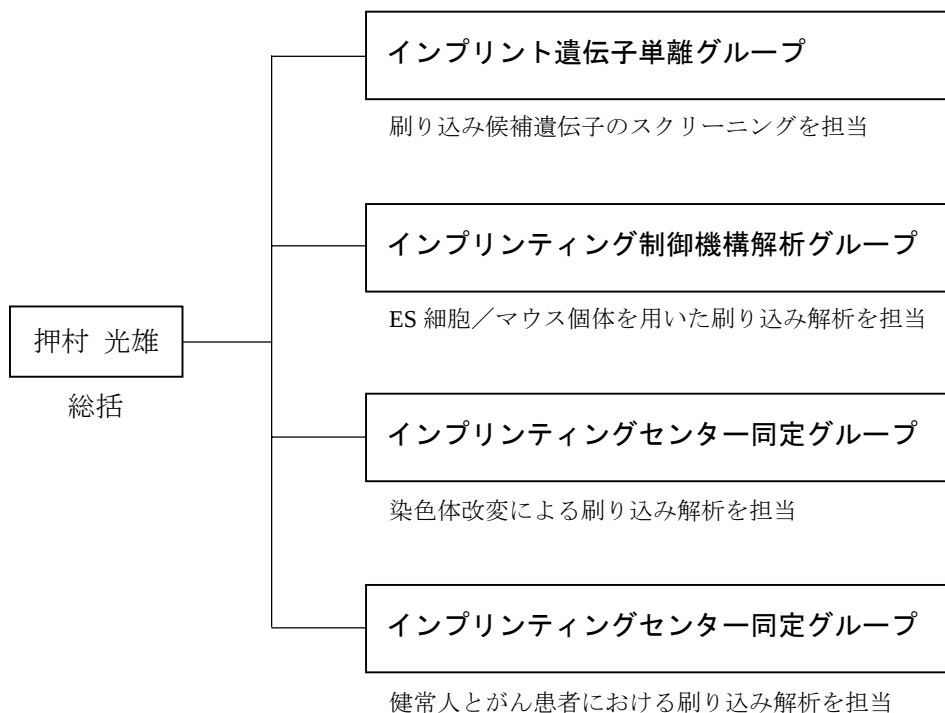
我々は親起源が明らかなヒト染色体を保持する雑種細胞における刷り込み遺伝子の発現様式の検索から、哺乳類体細胞中ではヒト染色体の刷り込みが維持されることを明らかにした。父母由来のヒト相同染色体を異なる雑種細胞中に維持させることで、アレル間の DNA 多型の有無によらず対立遺伝子の発現解析が可能になる。一方でターゲットインテグレーションが高頻度に誘導されるニワトリプレ B 細胞株 DT40 を利用して、任意の染色体改変を効率よく行う染色体工学の技術を開発してきた。そこで親由来の明らかなヒト染色体を DT40 細胞に移入して任意の染色体改変を施した後、刷り込み遺伝子の発現様式を維持する哺乳類細胞にヒト染色体を回収して、刷り込み遺伝子の発現を検索する実験系の構築を試みた。ヒトの刷り込み遺伝子クラスターが初めて見出され、解析が進んでいるヒト 11 番染色体 p15.5 領域および 15 番染色体 q11-q13 領域を対象とした。11p15.5 領域では Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) における染色体転座点に位置する *LIT1* 遺伝子、15q11-q13 領域では Prader-Willi/Angelman 症候群における染色体共通欠失領域に着目して、染色体改変を行った。

2.4 インプリンティング異常の発がんにおける役割と個体差に関する研究

ゲノム刷り込みは父母由来の染色体上にある対立遺伝子が識別され、発現レベルが異なる現象である。現在までにヒトで 36 の刷り込み遺伝子が報告されている。刷り込み遺伝子は特定の染色体領域にクラスターを形成する特徴があり、クロマチン構造の後成的な修飾 (DNA メチル化、ヒストンアセチル化) によって染色体ドメインレベルで発現調節を受けると考えられている。特定の染色体異常を伴う先天性疾患において刷り込み遺伝子の発現異常が認められることから、組織特異的/時期特異的な刷り込みの正確な制御が、正常な個体発生と生理機能の維持に重要であることが示唆される。

刷り込み異常とがんとの関連については、*IGF2* 遺伝子の両アレル性発現が遺伝病に併発する小児がんで見出されて以来、成人でも各種のがんで発現異常が報告されるに至った。例えば大腸がんの場合、患者のがん組織のみならず非がん部組織および末梢リンパ球においても *IGF2* の刷り込み異常が高頻度に観察され、刷り込み遺伝子発現の個体差とがんの易罹患性との関わりが示唆された。そこで本サブテーマでは刷り込み遺伝子の発現異常と発がんとの関連を明らかにする目的で、正常人における刷り込み遺伝子発現の個体差ならびにがんにおける刷り込み遺伝子の発現異常を解析した。

3. 研究実施体制



4. ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成10年 5月23日	シンポジウム 「ゲノムインプリン ティングの分子メカニ ズムと生殖細胞の分化」	千里ライ フサイエ ンスセン ター (大阪)	約70名	ゲノムインプリンティングに関する最 近の知見を広く研究者に報告し、かつ研 究者間の共同研究などの交流を深める ことによって研究のさらなる進展を目 的とした。
平成13年 1月13日 ～14日	Genomic Imprinting International Workshop in Japan	千里ライ フサイエ ンスセン ター (大阪)	約60名	国内外からゲノムインプリンティング 分野で第一線の研究を行っている共同 研究者を招き、最近の知見を直接に交換 し共同研究の打ち合わせを行った。また 参加者に対しては、今後共同研究を展開 しうる周辺領域の研究者との間で、共通 の関心について討議を行い共同研究に 発展させる機会を設けた。

5. 主な研究成果

(1) 論文発表

Tomizuka, K., Yoshida, H., Uejima, H., Kugoh, H., Satoh, K., Ohguma, A., Hayasaka, M., Hanaoka, K., Oshimura, M. and Ishida, I.: Functional expression and germline transmission of a human chromosome in chimeric mice. *Nature Genet.*, 16: 133-143, 1997

Meguro, M., Mitsuya, K., Sui, H., Shigenami, K., Kugoh, H., Nakao, M. and Oshimura, M.: Evidence for paternal expression of the human GABA_A receptor subunit genes, using microcell-mediated chromosome transfer. *Hum. Mol. Genet.*, 6: 2127-2133, 1997

Mitsuya, K., Sui, H., Meguro, M., Kugoh, H., Jinno, Y., Niikawa, N. and Oshimura, M.: Paternal expression of *WT1* in human fibroblasts and lymphocytes. *Hum. Mol. Genet.*, 6: 2243-2246, 1997

Matsuda, T., Sasaki, M., Kato, H., Yamada, H., Cohen, M., Barrett, J.C., Oshimura, M. and Wake, N.: Human chromosome 7 carries a putative tumor suppressor gene(s) involved in choriocarcinoma. *Oncogene*, 19: 2773-2781, 1997

三ツ矢幸造, 目黒牧子, 押村光雄: ヒト染色体移入マウス細胞を用いたゲノム刷り込みの解析 蛋白質 核酸 酵素, 43: 573-582, 1998

Mitsuya, K., Meguro, M., Sui, H., Schulz, T.C., Kugoh, H., Hamada, H. and Oshimura, M.: Developmental reprogramming of the human *H19* gene in mouse embryonic cells does not erase the primary parental imprint. *Genes to Cells*, 3: 245-255, 1998

押村光雄「遺伝子の集合体（染色体）改変」組織培養工学, 24: 534, 1998

野津智美, 押村光雄「ニワトリ B 前駆細胞株 DT40 を用いた染色体改変」組織培養工学, 24: 549-552, 1998

Lee, M.P., DeBaun, M.R., Mitsuya, K., Galonek, H.L., Brandenburg, S., Oshimura, M., Feinberg, A.P. Loss of imprinting of a paternally expressed transcript, with antisense orientation to *KvLQT1*, occurs frequently in Beckwith-Wiedemann syndrome and is independent of insulin-like growth factor II imprinting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 5203-5208, 1999

Mitsuya, K., Meguro, M., Lee, M.P., Katoh, M., Schulz, T.C., Kugoh, H., Yoshida, M.A., Niikawa, N., Feinberg, A.P., Oshimura, M. *LIT1*, an imprinted antisense RNA in the human *KvLQT1* locus identified by screening for differentially expressed transcripts using monochromosomal hybrids. *Hum. Mol. Genet.*, 8, 1209-1217, 1999

Kugoh, H., Mitsuya, K., Meguro, M., Shigenami, K., Schulz, T.C., Oshimura, M. Mouse A9 cells containing single human chromosomes for analysis of genomic imprinting. *DNA Res.*, 6,

165-172, 1999

- Tomizuka, K., Shinohara, T., Yoshida, H., Uejima, H., Ohguma, A., Tanaka, S., Sato, K., Oshimura, M. and Ishida, I.: Double trans-chromosomic mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 97: 722-727, 2000
- Kuroiwa, Y., Tomizuka, K., Shinohara, T., Kazuki, Y., Yoshida, H., Ohguma, A., Yamamoto, T., Tanaka, S., Oshimura, M. and Ishida, I.: Manipulation of human minichromosomes to carry greater than megabase-sized chromosome inserts. *Nat. Biotechnol.*, 18: 1086-1090, 2000
- Nishihara, S., Hayashida, T., Mitsuya, K., Schulz, T.C., Ikeguchi, M., Kaibara, N. and Oshimura, M.: Multipoint imprinting analysis in sporadic colorectal cancers with and without micrsatellite instability. *International Journal of Oncology*, 17: 317-322, 2000
- Tanabe, H., Nakagawa, Y., Minegishi, D., Hashimoto, K., Tanaka, N., Oshimura, M., Sofuni, T. and Mizusawa, H.: Human monochromosome hybrid cell panel characterized by FISH in the JCRB/HSRRB. *Chromosome Res.*, 8: 319-334, 2000
- Horike, S., Mitsuya, K., Meguro, M., Kotobuki, N., Kashiwagi, A., Notsu, T., Schulz, T.C., Shirayoshi, Y. and Oshimura, M.: Targeted disruption of the human *LIT1* locus defines a putative imprinting control element playing an essential role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Human Molecular Genetics*, 9: 2075-2083, 2000
- Engel, J.R., Smallwood, A., Harper, A., Higgins, M.J., Oshimura, M., Reik, W., Schofield, P.N. and Maher, E.R.: Epigenotype-phenotype correlations in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J. Med. Genet.*, 37: 921-926, 2000
- Meguro, M., Mitsuya, K., Nomura, N., Kohda, M., Kashiwagi, A., Nishigaki, R., Yoshioka, H., Nakao, M., Oishi, M. and Oshimura, M.: Large-scale evaluation of imprinting status in the Prader-Willi syndrome region: an imprinted direct repeat cluster resembling small nucleolar RNA genes. *Hum. Mol. Genet.*, 10: 383-394, 2001
- Inoue, J., Mitsuya, K., Maegawa, S., Kugoh, H., Kadota, M., Shinohara, T., Nishihara, S., Takehara, S., Yamauchi, K., Schulz, T.C. and Oshimura, M.: Construction of 700 human/mouse A9 monochromosomal hybrids and analysis of imprinted genes on human chromosome 6. *J. Hum. Genet.*, 46: 137-145, 2001
- Meguro, M., Kashiwagi, A., Mitsuya, K., Nakao, M., Kondo, I., Saitoh, S. and Oshimura, M.: A novel maternally expressed gene, *ATP10C*, encodes a putative aminophospholipid translocase associated with Angelman syndrome. *Nat. Genet.*, 28: 19-20, 2001

- Tanaka K, Shiota G, Meguro M, Mitsuya K, Oshimura M, Kawasaki H.: Loss of imprinting of long QT intronic transcript 1 in colorectal cancer. *Oncology*, 60: 268-273, 2001
- Maegawa, S., Yoshioka, H., Itaba, N., Kubota, N., Nishihara, S., Shirayoshi, Y., Nanba, E. and Oshimura, M.: Epigenetic silencing of PEG3 gene expression in human glioma cell lines. *Mol. Carcinog.*, 31: 1-9, 2001
- Shinohara, T., Tomizuka, K., Miyabara, S., Takehara, S., Kazuki, Y., Inoue, J., Katoh, M., Nakane, H., Iino, A., Ohguma, A., Ikegami, S., Inokuchi, K., Ishida, I., Reeves, R.H. and Oshimura, M.: Mice containing a human chromosome 21 model behavioral impairment and cardiac anomalies of Down syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, 10: 1163-1175, 2001
- Kohda, M., Hoshiya, H., Katoh, M., Tanaka, I., Masuda, R., Takemura, T., Fujiwara, M. and Oshimura, M.: Frequent loss of imprinting of *IGF2* and *MEST* in lung adenocarcinoma. *Mol. Carcinog.*, 31: 184-191, 2001
- Kazuki, Y., Shinohara, T., Tomizuka, K., Katoh, M., Ohguma, A., Ishida, I. and Oshimura, M.: Germline transmission of a transferred human chromosome 21 fragment in transchromosomal mice. *J. Hum. Genet.*, 46: 600-603, 2001
- Sakatani, T., Wei, M., Katoh, M., Okita, C., Wada, D., Mitsuya, K., Meguro, M., Ikeguchi, M., Itoh, H., Tycko, B. and Oshimura, M.: Epigenetic heterogeneity at imprinted loci in normal populations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 283: 1124-1130, 2001
- Yoshioka, H., Shirayoshi, Y. and Oshimura, M.: A novel in vitro system for analyzing parental allele-specific histone acetylation in genomic imprinting. *J. Hum. Genet.*, 46: 626-632, 2001
- Arima, T., Drewell, R.A., Oshimura, M., Wake, N. and Surani, M.A.: A novel imprinted gene, *HYMAI*, is located within an imprinted domain on human chromosome 6 containing *ZAC*. *Genomics*, 67: 248-255, 2000
- Arima, T., Drewell, R.A., Arney, K.L., Inoue, J., Makita, Y., Hata, A., Oshimura, M., Wake, N. and Surani, M.A.: A conserved imprinting control region at the *HYMAI/ZAC* domain is implicated in transient neonatal diabetes mellitus. *Hum. Mol. Genet.*, 10: 1475-83, 2001
- 目黒牧子, 押村光雄「プラダーウィリ症候群・アンジェルマン症候群研究の最前線ーゲノム刷り込み関連疾患の分子機構の解明」*実験医学*, 19: 2448-2452, 2001
- Mizuno, Y., Sotomaru, Y., Katsuzawa, Y., Kono, T., Meguro, M., Oshimura, M., Kawai, J., Tomaru, Y., Kiyosawa, H., Nikaido, I., Amanuma, H., Hayashizaki, Y. and Okazaki, Y.: *Asb4*, *Ata3*, and *Dcn* Are Novel Imprinted Genes Identified by High-Throughput Screening Using RIKEN cDNA Microarray. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 290: 1499-1505, 2002

Nakabayashi, K., Fernandez, B.A., Teshima, I., Shuman, C., Proud, V.K., Curry, C.J., Chitayat, D., Grebe, T., Ming, J., Oshimura, M., Meguro, M., Mitsuya, K., Deb-Rinker, P., Herbrick, J.A., Weksberg, R. and Scherer, S.W.: Molecular Genetic Studies of Human Chromosome 7 in Russell Silver Syndrome. *Genomics*. , 79: 186-196, 2002

(2) 特許出願

該当なし

(3) 受賞等

該当なし