

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：大串 健一郎

専攻分野：小児科学

指導教授：清水 直樹

主論文の題目：

DNA Methylation Status of *SHOX*-Flanking CpG Islands in Healthy Individuals and Short Stature Patients with Pseudoautosomal Copy-Number Variations

(健常人及び擬常染色体領域にゲノムコピー数異常を持つ低身長患者における *SHOX* 隣接 CpG アイランドのメチル化状態についての検討)

共著者：Atsushi Hattori, Erina Suzuki, Hirohito Shima, Masako Izawa, Hideaki Yagasaki, Reiko Horikawa, Kimiaki Uetake, Akihiro Umezawa, Tomohiro Ishii, Koji Muroya, Noriyuki Namba, Toshiaki Tanaka, Yasuhiro Hirano, Hitoshi Yamamoto, Shun Soneda, Keiko Matsubara, Masayo Kagami, Mami Miyado, Maki Fukami

緒言

SHOX 遺伝子は、性染色体短腕擬常染色体領域 (Pseudoautosomal Region: PAR1) に位置し、X 不活性化 (X Chromosome Inactivation: XCI) から逃れる成長決定遺伝子である。*SHOX* ハプロ不全は、特発性低身長 (Idiopathic Short Stature: ISS) 及びレリーワイル軟骨異形成症 (Leri-Weill Dyschondrosteosis: LWD) の原因になる。*SHOX* ハプロ不全の原因の多くは、*SHOX* の発現制御候補領域を包含する PAR1 内のゲノムコピー数異常 (Copy-Number Variations: CNV) である。我々は、過去に末梢血由来 DNA を用いて、*SHOX* に隣接する CpG サイトが健常女性で低メチ

ル化状態であり、X 染色体複雑構造異常をもつ低身長症女性では高メチル化状態であったと報告した。これは、X 染色体複雑構造異常が *SHOX* 隣接 CpG アイランドを高メチル化状態にしたことを示唆している。しかし PAR1 における微細 CNV が *SHOX* 隣接 CpG アイランドの DNA メチル化異常と関係があるかは明らかではない。本研究では、健常人と PAR1 内に CNV を持つ ISS/LWD 患者の *SHOX* 隣接 CpG アイランドの DNA メチル化状態を解析した。

方法・対象

健常成人 9 人、健常小児 40 例および PAR1 領域に CNV を認める ISS/LWD 患者 10 例から得られた末梢血液由来 DNA を解析に使用した。また多指症小児 1 例の多指症手術により得られた軟骨から得られた培養軟骨細胞由来 DNA を解析に用いた。検体は成人本人、または小児の親からインフォームドコンセントを得たうえで採取された。

The UCSC Genome Browser (<https://www.genome.ucsc.edu/>; hg38, build 38) を用いたインシリコ解析にて *SHOX* 隣接 CpG アイランドを特定した。

全検体において、特定した CpG アイランド内の DNA メチル化状態をパイロシーケンス法によって算出した。また DNA メチル化状態を別方法で評価するために 10 例の ISS/LWD 患者と健常小児 2 例の末梢血液由来 DNA と培養軟骨細胞由来 DNA をバイサルファイトシーケンス法にて解析した。

なお本研究は国立成育医療研究センター倫理委員会(課題 519 号)の承認を得たものである。

結果

インシリコ解析にて *SHOX* 翻訳開始点から 20 kb 以内に 3 つの CpG アイランドを特定した。

それぞれの CpG アイランドのパイロシーケンス法によって解析された末梢血液由来の DNA メチル化状態は、健常成人・健常小児・ISS/LWD 患者において低メチル化状態であった。同様に培養軟骨細胞由来の DNA においても、CpG アイランドの DNA メチル化状態は低メチル化であった。

バイサルファイトシーケンス法にて解析した ISS/LWD 患者と健常小児 2 例の末梢血液由来 DNA と培養軟骨細胞由来 DNA の DNA メチル化状態もそれぞれ同様に低メチル化パターンを示した。

考察

DNA サンプルのパイロシーケンス法とバイサルファイトシーケンス法により、特定した *SHOX* 隣接 CpG アイランドは、健常な個人の末梢血液および培養軟骨細胞で低メチル化状態であることが明らかになった。これらの結果は、*SHOX* が XCI から逃れるという現在の理解と一致する。末梢血液細胞と軟骨細胞の DNA メチル化状態は同様のパターンを示した。*SHOX* は骨形成組織で強く発現し、他の組織では弱く発現することが知られている。末梢血液細胞と軟骨細胞の間で同様のメチル化パターンであることは、*SHOX* の組織特異的発現が隣接 CpG アイランドの DNA メチル化状態に依存していないことを示唆する。

さらに、*SHOX* 隣接 CpG アイランドのメチル化状態は、健常人と擬常染色体領域に CNV を有する ISS / LWD 患者で同等であった。患者の中には、既報と同様に *SHOX* 発現消失が予測される *SHOX* 下流発現制御候補領域の欠失を有する例があったことは興味深い。つまり本研究の結果は、*SHOX* 発現制御候補領域の CNV が *SHOX* 隣接 CpG アイランドの DNA メチル化異常ではない他のメカニズムによって *SHOX* ハプロ不全を引き起こす可能性がある。

我々の過去に報告した X 染色体構造異常女性症例の結果と今回の微細 CNV を有する ISS/LWD 症例の結果は異なった。その理由は X 不活性化特異的転写産物 (X Inactivation-Specific Transcript: XIST) と *SHOX*

間の物理的距離の減少により、XCI に影響を与えた可能性がある。今後様々なタイプの X 染色体構造異常症例における *SHOX* 隣接 CpG アイランドの DNA メチル化状態を解析し、DNA メチル化状態を検討する必要がある。