

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成 25 年 3 月 31 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 群馬大学  
 職名 教授  
 研究代表者 荒川浩一  
 勤務先所在地 〒371-8511  
 前橋市昭和町3-39-22  
 電話番号 027-220-8200  
 ファックス番号 027-220-8215  
 E-メール harakawa@gunma-u.ac.jp

下記により共同研究成果を報告します。

記

(課題番号 11027)

1. 研究プロジェクト名と共同研究課題名	プロジェクト名:「代謝疾患ゲノム研究プロジェクト」 共同研究課題名: 免疫系のエピゲノム破綻機構の研究			
2. 共同研究目的	共同研究により MIAMI 法やパイロシーケンス法などのエピゲノム解析、発現解析をおこない免疫系のエピゲノム破綻機構を明らかにする。			
3. 共同研究期間	平成 24年 4月 1日 ~ 平成 25年 3月 31日			
4. 共同研究組織				
氏名	年齢	所属部局等	職名等	役割分担
(研究代表者) 荒川浩一	54	小児科学	教授	研究総括
(分担研究者) 小林靖子	44	大学院教育研究支援センター	助教	検体収集、細胞抽出、DNA メチル化解析
渡部登志雄	46	小児科	講師	検体収集
相澤明	49	小児科	研究員	メチル化解析、データ解析
林佐智子	51	小児科	技官	細胞抽出、メチル化解析
石井清恵	32	小児科	技官	細胞抽出、メチル化解析
5. 群馬大学生体調節研究所の共同研究担当教員	分野名	生体情報ゲノムリソースセンター	氏名	畑田出穂

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号 11027)

## 6. 共同研究計画

小児期発症の微小変化型ネフローゼ症候群(MCNS)患者より倫理的配慮を行ったうえで、その再発時及び寛解時の末梢血を採取する。比重遠心法にて末梢血単核分画を採取し、マイクロビーズを用いて単球細胞及びナイーブ Th(Th0)細胞を分取する。定法に従ってゲノム DNA 及び RNA を採取する。ゲノム DNA では MIAMI 法 (Microarray-based Integrated Analysis of Methylation by Isoschizomers)にて DNA メチル化を検討し、MCNS 再発-寛解間で DNA メチル化に差のある遺伝子プロモーター領域を検出する。DNA メチル化に差を認めた部位についてはパイロシーケンス法でも DNA メチル化の程度を確認する。また上記細胞での遺伝子発現解析を行い、DNA メチル化によって発現が制御されている領域を検討し、MCNS の発症に関与する遺伝子を探索する。

## 7. 共同研究の成果

1) 疾患活動期と寛解期の比較: 同一患者の疾患活動期および寛解期に採取した単球と Th0 細胞で MIAMI 法にて活動期・寛解期間の DNA メチル化変化を解析した。Th0 細胞で GATA2,PBX4,NYX にある3つのプローブで DNA メチル化に有意に変化を認め、どの箇所でも活動期で DNA メチル化が低下していた。この3プローブの両側近傍の制限酵素認識領域での DNA メチル化について、バイサルファイトーパイロシーケンスで解析したところ、どの CpG サイトでも寛解期に比べて活動期でメチル化率は低下していた。この遺伝子の発現を、他の MCNS 患者群から採取した Th0 細胞で検討したところ、活動期、寛解期で優位な発現の変化を認めなかった。

単球では DNA メチル化が有意に変化するプローブを検出しなかった。この結果は従来病因との関連が指摘されてきた Th 細胞の MCNS 発症への関与を指示するものである。(Kobayashi et al. *Pediatr Nephrol* 27:2233-41, 2012)

2) 疾患群とコントロール群との比較: 同じく患者活動期/健常群と患者寛解期/健常群との比較を MIAMI 法で解析した。閾値の取り方を集団の中心点から99%CI(マハラノビス距離)としてデータを解析したところ、Th0 細胞では疾患群活動期/寛解期間で469、活動期/健常群で445、寛解期/健常群で291のプローブでメチル化率が優位に変化していた。この3比較で共通して検出したプローブが85個あり、うち82プローブで疾患の活動性に一致して DNA メチル化が変化していた。また疾患群活動期/寛解期間および活動期/健常群、すなわち、蛋白尿のある群とない群の2比較で共通して検出したプローブは206、活動期/健常群および寛解期/健常群、すなわち、患者群と健常群の2比較で共通して検出したプローブは58で、いずれのプローブもメチル化の変化の仕方は各2比較で同様であった。3比較で共通して検出したプローブはエフェクター細胞の前駆細胞で病勢に一致してメチル化制御が変化するもので、MCNS の病因のみならず、病勢のマーカーになる可能性も示唆される。206のプローブは蛋白尿の出現に関連して変化する遺伝子、58のプローブは疾患の発症に関連して変化する遺伝子と捉えられる。バイオインフォマティクスによる解析では、細胞誘導性免疫応答、細胞分化、細胞機能維持に関するパスウェイと遺伝子発現、細胞分化、細胞分化増殖に関するパスウェイが85遺伝子の解析で検出された。

単球では3比較で共通して検出したプローブは4個であったが、メチル化の変化の仕方に共通性を認めなかった。

以上より、MCNS ではヘルパーT 細胞の DNA メチル化変化が発症に関与することが示唆されたため、患者数を増やして、男女別(各 10 名)に他の MCNS 患者群からサンプル採取し、同一の細胞から得た検体で発現アレイおよび DNA メチル化解析を行い、DNA メチル化により発現が制御される遺伝子を探索する。現段階では発現アレイ、DNA メチル化アレイによる解析を終了し、データ解析中である。

## 8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

Yasuko Kobayashi, Akira Aizawa, Takumi Takizawa, Chikage Yoshizawa, Hiromi Horiguchi, Yuka Ikeuchi, Tomonori Gotoh, Satoko Kakegawa, Toshio Watanabe, Akihiro Morikawa, Izuho Hatada and Hirokazu Arakawa, DNA Methylation Changes between Relapse and Remission of Minimal Change Nephrotic Syndrome. *Pediatric Nephrology* 27:2233-41, 2012

小林靖子 教育講演5) オピニオン: ヘルパーT細胞にみる微小変化型ネフローゼ症候群の病因論 第47回 日本小児腎臓病学会学術集会 平成24年6月30日 東京