

---

ゲノム・エピゲノム解析に基づく刷り込み疾患  
Beckwith-Wiedemann 症候群の診断基準作成と  
治療法開発基盤の確立

---

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

平成22年度 総括・分担研究報告書

平成 23(2011)年 4月

研究代表者：副 島 英 伸

佐賀大学医学部分子生命科学講座・教授

## 目 次

I. 総括研究報告書-----	1
ゲノム・エピゲノム解析に基づく刷り込み疾患 Beckwith-Wiedemann 症候群の診断基準作成と治療法開発基盤の確立-----	2
副島英伸（佐賀大学医学部分子生命科学講座・教授） 研究分担者 東元 健（佐賀大学医学部分子生命科学講座・助教）	
II. 分担研究報告書-----	13
1. SNP アレイによる Beckwith-Wiedemann 症候群の ゲノム構造異常の解析-----	14
研究分担者 吉浦孝一郎（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授）	
2. Beckwith-Wiedemann 症候群の ゲノムワイドメチル化解析-----	22
研究分担者 秦 健一郎（国立成育医療センター研究所・部長）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	26
IV. 研究成果の刊行物・別冊 -----	30

# I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総括研究報告書

ゲノム・エピゲノム解析に基づく刷り込み疾患 Beckwith-Wiedemann 症候群の  
診断基準作成と治療法開発基盤の確立

研究代表者：副島英伸

佐賀大学医学部分子生命科学講座

分子遺伝学・エピジェネティクス分野 教授

研究分担者：東元 健

佐賀大学医学部分子生命科学講座

分子遺伝学・エピジェネティクス分野 助教

研究要旨

本邦におけるゲノム刷り込み関連疾患 Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) および関連疾患患者 231 例について解析を行った。3 種類の診断基準のいずれかに満たすのは計 184 例で、このうち 107 例について既知のゲノム・エピゲノム変異に関して解析した。これらの症例解析から、BWS の臨床像とゲノム・エピゲノム異常の頻度と特徴を明らかにした。一方、SNP array による UPD 解析、MALDI-TOF-MS による刷り込み DMR のメチル化解析の手法を確立したので、次年度には症例解析を進める。また、マウス iPSC の刷り込み DMR のメチル化解析を行い、メチル化状態が異なるクローンが存在するを見いだした。新生児期低血糖の原因としては、*KCNJ11*、*ABCC8*、*INS* の変異は否定的であった。

研究分担者

1. 東元 健

佐賀大学医学部分子生命科学講座分子遺  
伝学・エピジェネティクス分野・助教

2. 吉浦 孝一郎

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科原爆  
後障害医療研究施設分子医療部門人類遺

伝学分野・教授

3. 秦 健一郎

国立成育医療研究センター研究所周産期  
病態研究部・部長

A. 研究目的

過成長、巨舌、臍ヘルニアを三主徴と

する Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) は、ゲノム刷り込み関連疾患である。これまでに複数のゲノム・エピゲノム変異が見出されているが、3割程度は原因不明である。さらに、既知のゲノム・エピゲノム変異が生じる原因、つまり刷り込み機構の本態は不明な点が多い。今年度は、本邦 BWS 症例のゲノム・エピゲノム解析を通じて刷り込み異常の原因を明らかにしすること、またマウス iPSC 細胞 (iPSC) および患者由来 iPSC の樹立と解析によりゲノム刷り込み調節機構とリプログラミングとの関連性を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

(倫理面への配慮)

本研究に関しては、佐賀大学医学部倫理委員会および遺伝子・ゲノム解析倫理委員会の承認を受けて実施した。

### 1. 本邦 BWS 症例の臨床像解析

H21 年度から始まった本研究により、これまでに 231 例の BWS 症例および BWS 関連疾患症例の情報を得た。これらの臨床情報から、現在主に使用されている 3 種類の診断基準 (Elliot ら (Clini Genet, 1994)、Weksberg ら (Hum Mol Genet, 2001)、DeBaun ら (J Pediatr, 1998)) を基に本邦 BWS 症例を分類し、かつ臨床症状の特徴を解析した。

### 2. ゲノム・エピゲノム解析

上述の 3 種類の診断基準のいずれかに合致する 107 症例について、既知のゲノ

ム・エピゲノム変異解析を施行した。KvDMR1 脱メチル化 (KvDMR1-LOM) と H19DMR 高メチル化 (H19DMR-GOM) に関しては原則としてメチル化感受性サザンプロットで解析し、必要に応じて hot-stop COBRA 法あるいは MLPA 法を用いた 11p15.5 父性ダイソミー (patUPD モザイク) モザイクはマイクロサテライトおよび SNP の多型解析によるアレル間の差異で、*CDKN1C* の変異はシーケンス法で解析した。

また、Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA) 法を用いて、11p15.5 領域のコピー数異常および KvDMR1-LOM と H19DMR-GOM の検出について検討した。

### 3. SNP array による UPD 解析

UPD の範囲を明らかにする目的で、マイクロサテライト解析により patUPD モザイクモザイクと判明した 18 例を Affymetrix 社 Human SNP array 6.0 を用いて解析した。

### 4. MALDI-TOF-MS を用いた刷り込み DMR のメチル化解析

ゲノム上には BWS の責任領域以外にも多数の刷り込み DMR が存在する。BWS では 11 p 15.5 の刷り込み異常 (=刷り込み DMR のメチル化異常) がみられるため、他の刷り込み DMR においてもメチル化異常をおこしている可能性がある。そこで、MALDI-TOF-MS (Sequenom 社 MassARRAY) を用いて、ゲノム中のすべての刷り込み DMR のメチル化を解析できる系を確立した。バイサルファイト処理したゲノム DNA

の標的領域を PCR で増幅する。このとき一方のプライマーに T7 プロモーター配列を付加しておく。PCR 産物を T7 RNA ポリメラーゼで *in vitro* 転写を行い、その後 RNase A で転写物を消化する。この反応の結果、メチル化 CpG は GC となり、非メチル化 CpG は AC となるため、断片化した RNA を MALDI-TOF-MS で解析すると分子量の違いからメチル化を定量的に計測できる。

#### 5. iPSC の樹立とメチル化解析

マウス iPSC については、多型を用いて親由来を区別するため B6 を母に JF1 を父に持つ F1 線維芽細胞を用いて iPSC を作製した。センダイウイルスを用いた 3 ファクター (Sox, Klf4, Oct) および 4 ファクター (Sox, Klf4, Oct, Myc) による誘導法と、レトロウイルスによる 4 ファクター (Sox, Klf4, Oct, Myc) 誘導法を用いた。また、BWS 患児 3 例 (KvDMR1-LOM: 1 例、H19DMR-GOM: 1 例、patUPD モザイク: 1 例) と健常コントロール 2 名の末梢血から iPSC を作成中である。なお、iPSC 作製は、横浜理研 RCAI の古関明彦博士との共同研究である。

#### 6. 新生児期低血糖症例の候補遺伝子変異解析

難治性疾患克服研究事業「日本人における新生児糖尿病発症原因遺伝子異常の実態把握および遺伝子変異部位による薬効変化に関する検討」班 (代表: 稲垣暢也 京都大学教授) との共同研究で、新生児期低血糖を呈する BWS 症例 33 例について、新生児糖尿病発症原因遺伝子 *KCNJ11*、

*ABCC8*、*INS* の変異解析を行った。

### C. 研究結果

#### 1. 本邦 BWS 症例の臨床像解析

231 例の BWS 症例および BWS 関連疾患症例を 3 種類の診断基準に従って分類した。3 種類の診断基準のうち、Elliot ら (Clini Genet, 1994) の基準がもっとも厳格で、DeBaun ら (J Pediatr, 1998) の基準がもっとも緩やかである。その結果、Elliot 基準 100 例、Weksberg 基準 168 例、DeBaun 基準 181 例となり、いずれかの基準を満たすのは計 184 例であった。この 184 例について、臨床情報を解析した。

男女比は 1:1 であった。生殖補助医療に関する情報は 82 例で得られ、顕微授精 2 例 (2.4%)、人工授精 1 例 (1.2%) であった。臨床的診断時期を主な症状と頻度を表 1 に示す。

表 1 臨床診断時期 (n = 121)

妊娠中	11.6%
出生 3 日以内	55.4%
出生 1 ヶ月以内	10.7%
出生 6 ヶ月以内	5.8%
出生 12 ヶ月以内	5.0%
出生 1 年以降	11.6%

臨床症状と頻度を表 2 に示す。BWS に特徴的をいわれる三主徴はそれぞれ 71% 以上にみられるが、三主徴すべてを呈する頻度は 46.7% と比較的低頻度であった。腹腔内臓器腫大では、腎腫大と肝腫大が

50%以上を占めていた(表3)。低血糖で脾腫大を合併した症例は75例中6例(8.0%)で、肝脾腫は13例であった。

外性器・内性器異常は22例中20例が男児で停留睪丸が13例を占めた。心臓異常では動脈管開存が11例で最多であった。

臨床診断時期(新生児期～乳児期)と12才以上の時期における臨床情報を得られた症例は8例であった。三主徴のうち、臍ヘルニア等の腹壁症状と過成長が自然消退した症例はそれぞれ7例中4例であったが、巨舌が自然消退した症例は8例中2例であった。耳奇形は4例中1例で自然消退した。

腫瘍の合併は32例(17.4%)で見られ(表4)、そのうち3例(9.4%)は複数の腫瘍が異時性に発生していた。このため腫瘍の総数は36となった。従来BWSに高率に発生するといわれていたウィルムス腫瘍は2例(5.6%)のみで、肝原発腫瘍が計15例(41.7%)で最も多かった。また、血管腫が計9例(25.0%)と比較的多かった。腫瘍発見年齢について情報のある腫瘍は26で、1才未満15、1～5才6、6～10才2、10才以上3(11才乳腺線維腺腫、13才副腎腺腫、17才皮膚腫瘍)であった。73%(19例)が2才までに発症していた。

表2 臨床症状と頻度 (n = 184)

臨床症状	症例数	頻度
巨舌	165	89.7%

腹壁欠損	131	71.2%
過成長	131	71.2%
三主徴すべてあり	86	46.7%
耳垂線状溝	89	48.4%
耳輪後縁小窩	89	48.4%
低血糖	75	40.8%
腹腔内臓器腫大	75	40.8%
片側肥大	54	29.3%
火焰状母斑	42	22.8%
腫瘍	32	17.4%
精神運動発達異常	24	13.0%
外性器・内性器異常	22	12.0%
心臓異常	21	11.4%
鼠径ヘルニア	16	8.7%
腎奇形	12	6.5%
骨年齢亢進	4	2.2%

表3 臓器別腫大頻度 (n = 75)

臓器	症例数	頻度
腎腫大	43	57.3%
肝腫大	39	52.0%
脾腫大	20	26.7%
副腎腫大	11	14.7%
膀胱腫大	9	12.0%
腸管腫大	1	1.3%

表4 腫瘍の種類と頻度 (n = 36)

腫瘍の種類	症例数	頻度
肝芽腫	9	25.0%
肝血管腫	5	13.9%
肝血管内皮腫	5	13.9%
血管腫	4	11.1%
副腎腫瘍	2	5.6%

乳腺腫瘍	3	8.3%
急性骨髄性白血病	2	5.6%
横紋筋肉腫	2	5.6%
ウィルムス腫瘍	2	5.6%
膀胱腫瘍	2	5.6%
腹部上皮腫	1	2.8%
肛門脂肪腫	1	2.8%
心房腫瘍	1	2.8%
肝細胞癌	1	2.8%
皮膚腫瘍	1	2.8%

## 2. ゲノム・エピゲノム解析

3種類の診断基準のいずれかを満たす107症例について、既知のゲノム・エピゲノム変異解析を施行した。解析結果を表5に示す。KvDMR1 脱メチル化 (KvDMR1-LOM)、H19DMR 高メチル化 (H19DMR-GOM) および patUPD モザイクは、KvDMR1 あるいは H19DMR のメチル化異常を示す。これらメチル化異常を示す症例は全体の64.5%となる。CDKN1C 遺伝子変異は9例 (8.4%)であった。このうち1例は、両親に遺伝子変異を認めなかったため *de novo* 変異であることが示唆された。11p15.5 領域の構造異常は全例が父由来2コピー、母由来1コピーの部分トリソミーであった。なお、顕微授精1例と人工授精1例は KvDMR1-LOM を示した。既知の異常を認めない症例が23.4%を占めた。既知のゲノム・エピゲノム異常を認めた症例では三主徴すべてを示す割合が59.8%であるのに対し、既知の異常を認めない症例では20.0%と低かった。以上のタイプ別に症状

の頻度も異なり、H19DMR-GOM では腎奇形、腹腔内臓器腫大、心臓異常が多く、patUPD モザイクでは低血糖、片側肥大、内・外性器異常、心臓異常が多かった。CDKN1C 遺伝子変異では三主徴すべてを示す頻度、耳垂線状溝・耳輪後縁小窩、火焰状母斑が多く、trisomy 11 では精神運動発達遅延が多かった。

腫瘍合併については H19DMR-GOM、patUPD モザイク、trisomy 11 が高リスク因子であることが示唆された。異常タイプ別の腫瘍の内訳は、KvDMR1-LOM (横紋筋肉腫1、肝芽腫1、肝以外の血管腫2)、H19DMR-GOM (ウィルムス腫瘍1、膀胱良性腫瘍1、肝血管腫1)、patUPD モザイク (肝芽腫2、肝血管腫2、乳腺線維腺腫2)、CDKN1C 変異 (心房腫瘍1)、既知の異常なし (肝芽腫1、急性骨髄性白血病1、上皮腫1、手背血管腫1) であった。

表5 既知の異常と頻度 (n = 107)

異常のタイプ	症例数	頻度	腫瘍合併例数	腫瘍合併頻度
KvDMR1-LOM	32	29.9%	4	12.5%
H19DMR-GOM	11	10.3%	3	27.3%
patUPD モザイク	26	24.3%	5	19.2%
CDKN1C 変異	9	8.4%	1	11.1%
Trisomy 11	4	3.7%	1	25.0%
既知の異常なし	25	23.4%	4	16.0%

一方、MLPA 法を用いて、BWS 8例と健常コントロール 3例を解析した。BWS 8例は他の解析で解析済みで、KvDMR1-LOM 1例、



H19DMR H19DMR-GOM 2 例、patUPD モザイク 3 例、trisomy11 1 例、既知の異常なし 1 例とわかっている症例である。他の解析法と MLPA 法の結果は一致したが、メチル化率や patUPD のモザイク率の定量的計測はやや不正確と思われた。また、実験手技は比較的簡便であったが、データ解析がやや煩雑であった。

### 3. SNP array による UPD 解析

patUPD モザイクと判明した症例のうち今年度は 18 例を SNP アレイにて UPD 領域の範囲について解析した。マイクロサテライトおよび SNP 解析の結果から patUPD のモザイク率は、30% から 90% と症例によって異なっていた。SNP アレイによる UPD 領域の検出は、モザイク率が高いと容易であるが、低いと困難であることが判明した。UPD 領域の最小範囲は 11 番染色体短腕テロメアから約 3Mb で、最大は 11 番染色体全体であった。また、全染色体において patUPD モザイクを示す症例を 3 例見出した。

### 4. MALDI-TOF-MS を用いた刷子込み DMR のメチル化解析

ヒトの刷子込み DMR38 カ所とマウスの刷子込み DMR29 カ所について、メチル化状態を定量的に計測する実験系を確立した。この系を用いて、BWS 症例 67 例 (KvDMR1-LOM: 30 例、H19DMR-GOM: 9 例、patUPD モザイク: 24 例、既知の異常なし: 2 例、染色体構造異常: 2 例) を解析した。現在、解析結果を検討中であるが、11p15.5 以外の刷子込み DMR のメチル化

異常を示す症例が複数あることを示唆するデータを得ている。

### 5. iPSC の樹立とメチル化解析

マウス F1 線維芽細胞から合計 8 クローンの iPSC を得た。内訳は、センダイウイルスを用いた 3 ファクターで 3 クローン、センダイウイルス 4 ファクターで 1 クローン、レトロウイルス 4 ファクターで 4 クローンである。これらのクローンと親株である F1 線維芽細胞から DNA を抽出し MassARRAY にてマウスの刷子込み DMR 29 カ所についてメチル化解析を行った。こちらも解析結果を検討中であるが、iPSC の各クローン間で刷子込み DMR のメチル化状態が異なるというデータが出ている。

一方、BWS 患児 3 例 (KvDMR1-LOM: 1 例、H19DMR-GOM: 1 例、patUPD モザイク: 1 例) と健常コントロール 2 名の末梢血から iPSC を作成中である。

### 6. 新生児期低血糖症例の候補遺伝子変異解析

新生児期低血糖を呈する BWS 症例 33 例について、新生児糖尿病発症原因遺伝子 *KCNJ11*、*ABCC8*、*INS* の変異解析を行ったところ、1 例で *ABCC8* のミスセンス変異 p.R275Q を認めた。この変異は、糖尿病として報告されているものと同じであった (Diabetes, 47:476-481, 1998)。

## D. 考察

### 1. 本邦 BWS 症例の臨床像およびゲノム・エピゲノム解析

昨年度から症例数が増えたこと (特に臨

床情報とゲノム・エピゲノム解析情報が同時に得られた症例)により、本邦 BWS 症例の特徴が明らかにできた。三主徴すべてを呈する頻度は 46.7%と比較的低頻度であった。これは、ゲノム・エピゲノム異常を示す症例では 59.8%であるのに対し、既知の異常を認めない症例では 20.0%と低いことに起因すると考えられる。生殖補助医療で出生した患児は、顕微授精 2 例(2.4%)、人工授精 1 例(1.2%)であった。この値は欧米での報告とほぼ同じであるが、例数が少ないこともあり、生殖補助医療が BWS 罹患性に関与するかに関しては今後も解析が必要である。8 例ではあるが、新生児・乳児期と 12 才以上の時期における臨床情報を比較できた。臍ヘルニアと過成長は、自然消退し、巨舌は成長後も残存する傾向が示唆された。できるだけ症例を増やして、長期経過に関する情報を取得してゆきたい。

腫瘍合併については発生頻度が 17.4%と比較的高く、肝原発腫瘍が 4 割を占めること、ウィルムス腫瘍の頻度は低いことが特徴的である。腫瘍の大半は 2 才までに発症しているが、10 才以上での発症も 11%程度あるため、少なくとも小学校卒業時まで、可能であれば中学校卒業までフォローする必要がある。また、H19DMR-GOM、patUPD モザイク、trisomy 11 が高リスク因子であることが示唆された。これらに共通することとして *IGF2* の高発現が考えられることから、*IGF2* が腫瘍発生に影響していることが伺える。

MLPA 法による既知のゲノム・エピゲノム異常の検出については、実験手技は比較的簡便であるが、得られたデータの解析に予想外に手間がかかることが判明した。データ解析方法を工夫する必要があると考えられる。

## 2. SNP array による UPD 解析

SNP アレイ解析からは、UPD 領域を同定することが可能であることが判明した。部分トリソミー 11 症例の切断点配列の解析も加え、それぞれの境界配列を同定・解析することにより、体細胞組換えによる UPD 発生機構および部分トリソミー発生機構の解明につながると期待する。また、3 例の全染色体 patUPD モザイクを見出した。通常雄核発生は胞状奇胎となり個体は発生しないが、これらの症例はモザイクであるため発生可能であったと思われる。このような症例は、臨床症状がさらに多彩であることから、patUPD 細胞でのホモ接合になっている劣性遺伝子変異の数とモザイク率が関与していると考えられる。BWS の patUPD モザイク症例については、11 番染色体だけでなく全染色体についての解析が必要であろう。また、全染色体が patUPD であることから、正常細胞や単為発生(卵巣奇形種)と比較メチル化解析を行うことにより、新規の刷り込み座位の同定が可能であると推測される。

## 3. MALDI-TOF-MS を用いた刷り込み DMR のメチル化解析

解析結果を検討中であるが、11p15.5 以

外の刷り込み DMR のメチル化異常を示す症例が複数あることが示唆される。このような症例を確認し、臨床症状の違いやメチル化異常のおこりやすさについての知見を得たい。

#### 4. iPSC の樹立とメチル化解析

マウス iPSC については、今後は、レチノイン酸で分化誘導した iPSC のメチル化解析をすすめる。また、刷り込み DMR のメチル化状態と多分化能の関連について、キメラ法あるいはテトラプロイドレスキュー法で検証していく予定である。一方、BWS 患児由来の iPSC も作製中であるので、メチル化解析と多分化能解析を進める。

#### 5. 新生児期低血糖症例の候補遺伝子変異解析

*KCNJ11*、*ABCC8*、*INS* の各遺伝子は、BWS における新生児期低血糖の原因としては否定的であった。低血糖症例で臍腫大を伴う頻度も 8.0% と低く、腫大との因果関係も認められなかった。しかし、臍腫大があれば低血糖は 33% でみられるため、臍腫大そのものは低血糖のリスクファクターであると考えられた。

#### E. 結論

本邦 BWS 症例 184 例の臨床情報解析、107 例のゲノム・エピゲノム解析を行い、臨床像とゲノム・エピゲノム異常の頻度と特徴を明らかにした。SNP array による UPD 解析、MALDI-TOF-MS による刷り込み DMR のメチル化解析の手法を確立した。引き続き次年度に症例解析を進める。

マウス iPSC の刷り込み DMR のメチル化解析を行い、メチル化状態が異なるクローンが存在することを見いだした。多分化能との関連性を調べる。また、患児由来 iPSC の作製中で、今後解析を進める。

新生児期低血糖の原因としては、*KCNJ11*、*ABCC8*、*INS* の変異は否定的であった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yamamoto S, Toyama D, Yatsuki H, Higashimoto K, Soejima H, Isoyama K. Acute megakaryocytic leukemia (AMKL, FAB;M7) with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Pediatr Blood Cancer*. 55(4):733-735, 2010
- 2) Uchihashi K, Aoki S, Shigematsu M, Kamochi N, Sonoda Emiko, Soejima H, Fukudome K, Sugihara H, Hotokebuchi T, Toda S. Organotypic culture of human bone marrow adipose tissue for analyzing its biological roles. *Pathol Int*, 60(4):259-267, 2010
- 3) 副島英伸, 城圭一郎, 中尾光善. 23 章 エピジェネティクスとヒト疾患 **エピジェネティクス**. D. アリス・T. ジェニューワイン・D. ラインバーク共編, 堀越正美監訳. 培風館. 東京.

Pp505-528, 2010

2. 学会発表

- 1) 副島英伸. 腫瘍細胞におけるエピジェネティックな遺伝子発現異常の分子機構. 第 49 回日本婦人科腫瘍学会学術集会 (特別講演) 2010. 12. 4-5. 佐賀
- 2) 副島英伸. インプリンティング異常と疾患. ヒューマンサイエンス振興財団ポストゲノム医薬品開発 WG 勉強会. 2010. 10. 29. 東京
- 3) Hidenobu Soejima. Genome and epigenome analyses of an imprinting disease Beckwith-Wiedemann syndrome. The 4<sup>th</sup> Asian Chromosome Colloquium (invited speaker, ABSTRACT p169). 2010.10.11-14. Beijing, China
- 4) 副島英伸. ゲノム刷り込み疾患 Beckwith-Wiedemann 症候群および Placental mesenchymal dysplasia のゲノム・エピゲノム解析. 第 18 回日本胎盤学会学術集会 (ワークショップ基調講演, プログラム・抄録集 p54) 2010. 9. 30-10.1. 熊本
- 5) 副島英伸. Beckwith-Wiedemann 症候群のインプリンティング機構と患者解析. 九州大学母子総合研究リサーチコアカンファレンス. 福岡. 2010.3.19
- 6) 副島英伸. ゲノムインプリンティングと発育異常. 医学部附属先端医学研究推進支援センター研究推進部門セミナー「エピジェネティクス-疾患と病態-」佐賀大学医学部. 2010. 2. 16.
- 7) Higashimoto K, Yada Y, Komori T, Matsuda M, Koseki Y, Nakayama M, Soejima H, Handa H, Koseki H, Hirose S, Nishioka K. Role of Ash11 for transcriptional pause release. 第 33 回日本分子生物学会年会第 83 回日本生化学会大会合同大会 2010.12.7-10. 神戸 (3T2-1 プログラム p144, 3P-0747 プログラム p348)
- 8) Yoshinaga H, Higashimoto K, Yatsuki H, Maeda T, Ohtsuka Y, Jozaki K, Nakabayashi K, Hata K, Yoshiura KI, Soejima H. Clinical features and genome/epigenome analyses of Japanese patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. 第 33 回日本分子生物学会年会第 83 回日本生化学会大会合同大会 2010.12.7-10. 神戸 (4P-1117 プログラム p438)
- 9) 副島英伸, 吉永北斗, 城崎幸介, 大塚泰史, 前田寿幸, 八木ひとみ, 東元健. 本邦 Beckwith-Wiedemann 症候群の臨床像とゲノム・エピゲノム解析. 第 17 回遺伝性疾患に関する出生前診断研究会 2010.11.20. 那覇 (0-8)
- 10) 副島英伸, 吉永北斗, 東元健, 八木ひとみ, 前田寿幸, 大塚泰史, 中林

- 一彦、泰健一郎、吉浦孝一郎。本邦 Beckwith-Wiedemann 症候群の臨床像とゲノム・エピゲノム解析。日本人類遺伝学会第 55 回大会 2010.10.27-30. 大宮 (OP18-100 プログラム・抄録集 p175)
- 11) 青木藍子, 塩崎有広, 鮫島梓, 米田徳子, 山中美樹子, 米田哲, 齋藤滋, 渡辺祐紀, 吉田文俊, 東元健, 副島英伸. 巨大絨毛血管腫を合併した臨床的 Beckwith-Wiedemann 症候群の一例. 第 18 回日本胎盤学会学術集会 (ワークショップ, プログラム・抄録集 p53) 2010. 9. 30-10.1. 熊本
- 12) 副島英伸, 東元健. インプリンティング疾患 Beckwith-Wiedemann 症候群本邦例の臨床像とゲノム・エピゲノム解析. 第 69 回日本癌学会学術総会 (poster P-0807, proceedings p346) 2010. 9. 22-24. 大阪
- 13) 副島英伸. ゲノム・エピゲノム解析に基づく刷り込み疾患 Beckwith-Wiedemann 症候群の診断基準作成と治療法開発基盤の確立. 第 1 回 厚生省難治性疾患事業合同班会議 東京 (成育医療研究センター) 2010.7.26.
- 14) 吉永北斗、東元 健、八木ひとみ、中林一彦、泰健一郎、吉浦孝一郎、副島英伸. 本邦 Beckwith-Wiedemann 症候群の臨床像とゲノム・エピゲノム解析. 第 4 回日本エピジェネティクス研究会年会. 米子. 2010, 5, 28-29. (要旨集 p.91, ポスター P082-A).
- 15) Higashimoto K, Yada Y, Komori T, Matsuda M, Koseki Y, Nakayama M, Soejima H, Handa H, Koseki H, Hirose S, Nishioka K. A role of histone methylation by Ash1L in the establishment of transcriptional memory. 2010 Cold Spring Harbor Asia Conference "Epigenetics, Chromatin & Transcription", Suzhou, China, 2010, 5, 17-21. (Abstracts p.113, Poster 113).
- 16) 副島英伸. ゲノム刷り込み疾患 Beckwith-Wiedemann 症候群の全国調査と遺伝子解析に基づく診断基準の作成. 平成 21 年度難治性疾患克服研究成果発表会. 東京. 2010. 3. 12.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

SNP アレイによる Beckwith-Wiedemann 症候群のゲノム構造異常の解析

研究分担者：吉浦 孝一郎

研究協力者：佐々木 健作

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

原爆後障害医療研究施設分子医療部門人類遺伝学分野 教授

#### 研究要旨

昨年度 Genome-Wide Human SNP Array 6.0 よる解析の結果、1名の KvDMR1 脱メチル化患者に KvDMR1 近傍の母由来の約 130 kb 欠失を認めた。本領域内に、メチル化の確立に重要なゲノム領域が含まれているのではないかと考え、他の KvDMR1 脱メチル化症例について次世代シーケンサーによる 130 kb 全領域塩基配列決定を行い、BWS 患者に共通に認められるゲノム変化がないか探索した。しかしながら、欠失領域に含まれる KCNQ1 の coding 領域では病的な変異は認められず、数百 bp レベルの insertion/deletion も見いだせなかった。今後は、数十 bp レベルのより細かい insertion/deletion の有無を探索し、新たなインプリンティング制御領域の同定とインプリンティング制御、DNA メチル化の制御の解明を目指す。

#### A. 研究目的

Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) の原因として、KvDMR1 脱メチル化、H19-DMR 高メチル化、11 番染色体短腕の父性片親性ダイソミー (upd(11)pat)、*CDKN1C* 変異、11 番染色体短腕構造異常が知られているが、約 30% の症例ではこれらの異常が検出できない。昨年度 Genome-Wide Human SNP Array 6.0 よる解析の結果、1名の KvDMR1 脱メチル化患者に KvDMR1 近傍の母由来の約 130 kb 欠失を認めた。本領域

内に、メチル化の確立に重要なゲノム領域が含まれているのではないかと考え、他の KvDMR1 脱メチル化症例について次世代シーケンサーによる 130 kb 全領域塩基配列決定を行い、BWS 患者に共通に認められゲノム変化がないか探索することを目的とした。

#### B. 研究方法

欠失領域部分の塩基配列決定

コピー数解析により、KvDMR1 脱メチル

化患者1名に約130kbの欠失が見られたので、その領域のゲノムシーケンスを行った。対象患者は、欠失をもった1名を除く26名のKvDMR1脱メチル化を持った患者のうち、DNAが比較的多く解析に使用できるもの22名とした。目的の130kbを約5kb毎・27PCR ampliconに分割して増幅し、Illumina社の次世代シーケンサーGenome Analyzer IIによりターゲット領域シーケンス解析・depth 30を予定し、塩基配列決定を進めた。方法は、まず130kbの目的領域を27 ampliconに分割しPCR増幅した。その後、個人毎に130kb領域としてまとめてIllumina社のインデックスリードを含めたリンカー連結後にlibrary作成し、マルチプレックスシーケンス法を行った。その結果、得られた75bp paired-end reads (平均 library insert size: 500bp) データから Single nucleotide variant (SNV) および  $\geq 100$  bp insertion and deletion (in/del)を、それぞれBurrows-Wheeler Aligner (BWA)とGenome Analysis Toolkit (GATK)、BreakDancerを使用して解析した。特に、in/del(s)に関しては次世代シーケンスのpaired-end法を利用する事で、マイクロアレイでは検出する事のできないより微細なin/delの検出も試みた。

## C. 研究結果

### 1) CoverageとSNVs解析

multiplex NGSを行った結果、longPCRによって独自に作成した library

interval (hr11:2,685,971-2,819,931)において、平均252.87 coverageを得られた。少なくとも $\geq 8$  depthでカバーされた割合は平均で99.58%に達する。

BWAによりmappingを行い、GATKを用いてSNVsを検出した結果、longPCR library intervalにおいて499個のSNVsを検出した。平均すると、1検体あたりheterozygousとhomozugous SNVsでそれぞれ113.6個、91.7個が検出された。1検体あたりに検出されたSNVsのうち、dbSNP130に登録のあった割合は、heterozygousとhomozygous SNVsでそれぞれ83.62%と98.82%であった。この事は、我々の得たデータはhomozygous SNVsのみならずheterozygous SNVsまで高精度に検出できている事を示唆している。しかしながら、1例のKvDMR1-LOM患者において検出された欠失領域内にはKCNQ1のcodingも含まれていたが、22症例いずれにおいても病的な変異(dbSNP130に登録がなく、アミノ酸の変化、splicingの異常などを引き起こすようなSNVs)は認められなかった。

### 2) コピー数解析 (欠失・重複探索)

BreakDancerにより数百bpレベルのindelの解析を行った。約130kbの領域から構成されるlongPCR libraryから正確なstructural variant (SV)の検出はできなかった。現在の所、確定的にBWSのメチル化制御に関わるゲノム領域は見つっていない。



## D. 考察

### 塩基変異およびコピー数解析

既知の DNA 異常がない BWS 症例において BWS の原因となるような共通する構造異常は認められなかったことから、BWS の原因となりうる新規のゲノム構造異常の存在については可能性が低いと考えられる。ゲノム構造異常以外のファクター、つまり未知の原因遺伝子の変異や未知のメチル化異常等の可能性が考えられる。現在、Detection of indels (Dindel) による数百 bp 以下のより微細な indels の解析を実施中である。

一方、KvDMR1 脱メチル化患者に KvDMR1 近傍に約 130 kb の欠失を認めたことは重要な発見と考えられる。本欠失内にメチル化を制御するエレメントが存在する可能性があるからである。これまでに報告されている欠失は 250 kb と 900 kb であり、本症例の欠失がもっとも小さい。さらに、母由来の欠失であることから、本欠失領域内に CDKN1C/LIT1 刷り込みドメインの刷り込み調節領域 KvDMR1 の母性メチル化を制御するエレメントが含まれる可能性が高い。つまり、本来卵形成時に KvDMR1 はメチル化されるが、本症例では、卵ゲノムにおいてメチル化制御エレメントが欠失しているため正常なメチル化が起こらず、受精後も脱メチル化まま発生が進んだと考えられる。目的領域の塩基配列決定自体は終了して、22 名の KvDMR1 脱メチル化 BWS 患者のゲノムシーケンス

解析を進めている。この新たなインプリンティング制御部の存在の可能性のある領域において、何らかの機能を持つ塩基配列部分でかつ複数の試料に共通した変異は見つからなかった。現在は、単純な塩基配列変化ではなく数十 bp の insertion/deletion がないかを探しているところである。

新たなインプリンティング制御部が存在しているなら、塩基配列決定により、KvDMR1 脱メチル化患者で塩基変異が見つかるであろうし、今後の診断ツールとして有益である。また、インプリンティング制御、DNA メチル化の制御という生物学的な新発見につながる。

## E. 結論

メチル化異常をもつ患者 1 名に 11p の領域に欠失約 130 kb を見つけた。メチル化異常をもつ 23 名を対象としてその 130 kb について塩基配列を決定した。しかし、患者特異的に見つかる塩基変異あるいは欠失・重複等は現在のところ見つからず、本領域内に母性メチル化制御領域を特定するには至っていない。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

1. Tsuda M, Yamada T, Mikoya T, Sogabe I, Nakashima M, Minakami H, Kishino T,

- Kinoshita A, Niikawa N, Hirano A, Yoshiura K. A type of familial cleft of the soft palate maps to 2p24.2-p24.1 or 2p21-p12. *J Hum Genet.* 2010 Feb;55(2): 124-126.
2. Takahata T, Yamada K, Yamada Y, Ono S, Kinoshita A, Matsuzaka T, Yoshiura KI, Kitaoka T. Novel mutations in the SIL1 gene in a Japanese pedigree with the Marinesco-Sjögren syndrome. *J Hum Genet.* 2010 Mar;55(3): 142-146.
  3. Miura K, Miura S, Yoshiura K, Seminara S, Hamaguchi D, Niikawa N, Masuzaki H. A case of Kallmann syndrome carrying a missense mutation in alternatively spliced exon 8A encoding the immunoglobulin-like domain IIIb of fibroblast growth factor receptor 1. *Hum Reprod.* 2010 Apr;25(4): 1076-1080.
  4. Ng SB, Bigham AW, Buckingham KJ, Hannibal MC, McMillin MJ, Gildersleeve HI, Beck AE, Tabor HK, Cooper GM, Mefford HC, Lee C, Turner EH, Smith JD, Rieder MJ, Yoshiura K, Matsumoto N, Ohta T, Niikawa N, Nickerson DA, Bamshad MJ, Shendure J. Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat Genet* 2010 Sep;42(9): 790-793.
  5. Matsuzawa N, Kondo S, Shimozato K, Nagao T, Nakano M, Tsuda M, Hirano A, Niikawa N, Yoshiura K. Two missense mutations of the IRF6 gene in two Japanese families with popliteal pterygium syndrome. *Am J Med Genet A.* 2010 Sep;152A(9): 2262-2267.
  6. Miura K, Miura S, Yamasaki K, Shimada T, Kinoshita A, Niikawa N, Yoshiura K, Masuzaki H. The possibility of microarray-based analysis using cell-free placental mRNA in maternal plasma. *Prenatal Diagnosis* 2010 Sep; 30:849-861.
  7. Oikawa M, Kuniba H, Kondoh T, Kinoshita A, Nagayasu T, Niikawa N, Yoshiura K. Familial brain arteriovenous malformation maps to 5p13-q14, 15q11-q13 or 18p11: linkage analysis with clipped fingernail DNA on high-density SNP array. *Eur J Med Genet.* 2010 Sep-Oct;53(5): 244-249.
  8. Ono S, Imamura A, Tasaki S, Kurotaki N, Ozawa H, Yoshiura K, Okazaki Y. Failure to Confirm CNVs as of Aetiological Significance in Twin Pairs Discordant for Schizophrenia. *Twin Res Hum Genet.* 2010 Oct;13(5): 455-460.
- 2) 学会発表
- 国内学会
- 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 2010年12月7日(火)～10日(金), 神戸ポートアイランド, 神戸.
- 3P-0812: 日本人におけるヒト耳垢遺伝子 ABCC11のΔ27アレルの新たな見解. 松田律史, 山田愛子, 小野佑輔, 堀 佑輔, スタレンキ ディミトロ, ソソンキ

ナナディア, 吉浦孝一郎, 太田 亨,  
新川詔夫

3P-0813: Key-value storeを用いた大規模ゲ  
ノムデータ処理の高速化. Hiroyuki  
Mishima, 吉浦孝一郎

4P-1117: Clinical feature and  
genome/epigenome analyses of Japanese  
patients with Beckwith-Wiedemann  
syndrome . Hokuto Yoshinaga, Ken  
Higashimoto, Hitomi Yatsukim Toshiyuki  
Maeda, Yasushi Ohtsuka, Kosuke Jozaki,  
Kazuhiko Nakabayashi, Kenichiro Hata,  
Koh-ichiro Yoshiura, Hidenobu Soejima

4P-1141: ホールエクソンキャプチャーに  
よる歌舞伎メーカー症候群の解析.  
要 匡, 塚原正俊, 柳 久美子, 藤森  
一浩, 喜久里育也, 照屋盛実, 今田有  
美, 鼠尾まい子, 矢野修一, 佐藤友紀,  
三輪有希乃, 平野 隆, 吉浦孝一郎,  
太田 亨, 新川詔夫, 成富研二

**The 35th Annual Meeting of the Japanese  
Society for Investigative Dermatology,  
2010/12/3-5, Wakayama Prefectural  
Cultural Hall (和歌山県民文化会館)**

P02-05: A mutation of the  
immunoproteasome subunit gene causes a  
novel autoinflammatory disorder  
Nakajo-Nishimura syndrome (familial  
Japanese fever). Kanazawa Nobuo,  
Takehiko Sugihara, Hiroyuki Mishima,  
Fukumi Furukawa, Hiroaki Ida, and  
Koh-ichiro Yoshiura.

C01-02: A mutation of the  
immunoproteasome subunit gene causes a  
novel autoinflammatory disorder  
Nakajo-Nishimura syndrome (familial  
Japanese fever). Kanazawa Nobuo,  
Kazuhiro Arima, Hiroyuki Mishima,  
Fukumi Furukawa, Hiroaki Ida, and  
Koh-ichiro Yoshiura.

第55回日本人類遺伝学会2010年10月27日  
(水) ~30日(土), 大宮ソニックシテ  
ィー, 大宮

AL-2: Discovery of a gene for Kabuki  
syndrome by exome sequencing and  
genotype-phenotype relationship in 110  
cases. M.J. Bamshad, M.C. Hannibal, K.J.  
Buckingham, A.E. Beck, S.B. Ng, M.  
McMillin, H. Gildersleeve, A.W. Bigham,  
H.K. Tabor, K. Yoshiura, T. Matsumot, N.  
Matsumoto, H. Tonoki, K. Naritomi, T.  
Kaname, T. Nagai, H. Ohashi, K.  
Kurosawa, J. Hou, T. Ohta, C.A. Morris,  
J.E. Ming, T.H. Shikh, S. Banka, G. Black,  
J. Clayton-Smith, E.H. Zackai, D. Donnai,  
N. Niikawa, D.A. Nickerson, J. Shendure

OP11-051: 日本人におけるヒト耳垢遺伝  
子ABCC11の $\Delta 27$ アレル頻度. 山田愛子,  
堀 佑輔, 小野佑輔, 松田律史, スト  
ランキー デイマ, ソソンキナナディア,  
吉浦孝一郎, 新川詔夫, 太田 亨

OP11-056: 歌舞伎メーカー症候群の  
エクソーム解析. 要 匡, 塚原正俊,  
柳 久美子, 藤森一浩, 喜久里育也,

- 照屋盛実, 今田有美, 鼠尾まい子, 矢野修一, 佐藤友紀, 三輪有希乃, 平野隆, 吉浦孝一郎, 太田 亨, 新川詔夫, 成富研二
- OP14-074: HELLP症候群と関連した胎盤特異的microRNAの網羅的解析. 三浦清徳, 東嶋 愛, 三浦生子, 山崎健太郎, 阿部修平, 城 大空, 長谷川ゆり, 中山大介, 木下 晃, 吉浦孝一郎, 増崎英明
- OP15-075: 唇裂口蓋裂の Genome-wide association study. 引田正宣, 津田雅由, 佐々木健作, 三嶋博之, 吉田和加, 夏目長門, 内山健志, 平野明喜, 木下 晃, 吉浦孝一郎
- OP15-075: SFTPC遺伝子変異を認めた家族性肺線維症の一家系. 小野慎治, 田中健之, 木下 晃, 石田正之, 森本浩之輔, 吉浦孝一郎,
- OP18-100: 本邦Beckwith-Wiedemann症候群の臨床像とゲノム・エピゲノム解析. 副島英伸, 吉永北斗, 東元 健, 八木ひとみ, 前田寿幸, 大塚泰史, 中林一彦, 泰 健一郎, 吉浦孝一郎
- OP31-165: 長崎におけるHPV-DNA型の頻度と細胞診判定に関する報告. 山崎健太郎, 三浦清徳, 三浦生子, 嶋田貴子, 小寺宏平, 藤下 晃, 鮫島哲郎, 村上誠, 池本理恵, 吉浦孝一郎, 増崎英明
- P-020: ウイルス感染防御遺伝子のコピー数多型とHPV持続感染に関する検討. 阿部修平, 三浦清徳, 木下 晃, 山崎健太郎, 三浦生子, 嶋田貴子, 吉浦孝一郎, 増崎英明
- P-024: ABCC11 expression and 538G/A polymorphism in human breast cancer. Sosonkina Nadiya, Starenki Dmytro, 太田 亨, 吉浦孝一郎, 新川詔夫
- P-025: 乳癌 FFPE 標本を用いた Agilent SurePrint G3 microarray によるアレイCGHの最適化. 及川将弘, 蔵重智美, 三浦史郎, 中島正洋, 永安 武, 吉浦孝一郎
- P-028: Genetic polymorphism of human ABCC11 as a determinant of earwax type, axillary osmidrosis, and the risk of breast cancer. 豊田 優, 櫻井亜季, 太田郁子, 坂井靖夫, 五味常明, 中川 大, アレキサンダーレジャバ, 中島正洋, 吉浦孝一郎, 林崎良英, 新川詔夫, 石川智久
- P-123: 母体血中における胎盤特異的microRNA群の網羅的スクリーニング. 東嶋 愛, 三浦清徳, 三浦生子, 山崎健太郎, 阿部修平, 城 大空, 長谷川ゆり, 中山大介, 木下 晃, 吉浦孝一郎, 増崎英明
- 第6回広島大学・長崎大学連携研究事業カンファランス -放射線災害医療の国際教育拠点確立に向けた機関連携事業 - 2010年6月5日(土), 長崎大学医学部ボードインホール, 長崎
- 2-1: アレイCGHを用いたヒパクション乳癌のゲノム不安定性の検討. 及川将弘, 吉浦孝一郎, 蔵重智美, 三浦史郎, 中