

201024217A

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

ゲノムインプリンティング異常症5疾患の実態把握に  
関する全国多施設共同研究

(H22-難治-一般-162)

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 有馬 隆博(東北大学大学院医学系研究科)

平成23 (2011) 年 5 月

# 目 次

I. 研究組織	1
II. 総括研究報告	
ゲノムインプリンティング異常症5疾患の実態把握に関する全国多施設 共同研究	3
III. 参考資料	

## I. 研究組織

	氏名	所属（職）
主任研究者	有馬 隆博	東北大学大学院医学系研究科 情報遺伝学分野（教授）
分担研究者	松原 洋一	東北大学大学院医学系研究科 臨床遺伝学（教授）
	八重樫伸生	東北大学大学院医学系研究科 発生発達医学講座婦人学（教授）
	栗山進一	東北大学大学院医学系研究科 分子疫学分野（教授）
	加藤 聖子	順天堂大学医学部産婦人科（准教授）

## Ⅱ. 統括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
統括研究報告書

## ゲノムインプリンティング異常症5疾患の実態把握に関する 全国多施設共同研究

課題番号：H22-難治-一般-162

主任研究者： 有馬隆博  
(東北大学大学院医学系研究科 情報遺伝学分野・教授)

研究分担者：東北大学大学院医学系研究科臨床遺伝学・教授 松原 洋一  
東北大学大学院医学系研究科発生・発達医学講座婦人学・教授 八重樫 伸生  
東北大学大学院医学系研究科 分子疫学分野・教授 栗山 進一  
順天堂大学医学部産婦人科講座・准教授 加藤 聖子

先天性ゲノムインプリンティング (GI) 異常症は精神遅滞や発達障害を示し、根本的な治療はないため対症療法により長期介護が必要となるケースが多い。疾患の発症機序、つまり影響を受ける遺伝子効果により、その病態や重症度は異なる。未だ原因不明例も多くみられる。まず、多施設共同（産婦人科、小児科、重症心身障害施設を含めた）の全国調査を行なった。調査対象施設総数 3158 のうち、1602 施設から有効回答があり（有効回答率 56.3%）、報告患者総数は 1818 人であった（BWS が 216 人、AS が 415 人、PWS が 992 人、SRS が 161 人、TNDM が 34 人）。各疾患の年齢別推移では、AS 以外の 4 疾患で、近年増加傾向にあることが示唆され、特に BWS、SRS は最近 5～10 年間に急増している傾向がみられた。一方、生殖補助医療（ART）の普及により、これら疾患の発生頻度の増加が世界中で注目されている。本研究の目的の 1 つは、ゲノムインプリンティング異常症の発生頻度の増加と ART との関連を明らかにする事である。疫学調査の結果、少なくとも PWS、BWS、AS、SRS の疾患のそれぞれ 1.5%、8.6%、1.6%、9.5% が不妊治療を受けていたことが判明した。また、そのほとんどの症例は体外受精（IVF）あるいは顕微授精（ICSI）によるもので、平成 17 年度の IVF+ICSI の出生児は年間約 1 万人で全出生児の 0.86% であることを考慮すると、いずれの 4 疾患も発症率は高く、特に SRS では 11.2 倍、BWS では 10 倍と圧倒的な高リスクである事が判明した。これには、ART が、ゲノムインプリンティングが確立する時期の配偶子进行操作する事が原因であると推察されているが、この実態も全く不明である。さらに、患者の頬粘膜細胞 DNA を用い、原因遺伝子のメチル化の解析を行なった、現在までに、75 名の解析を行ない、そのうち異常を認めた症例は、BWS が 1 人、AS が 5 人、PWS が 8 人、SRS が 4 人で、ART は、SRS の 2 例と関連していた。症例数が圧倒的に少ないため、結論を出すまでに至っていない。今後さらに解析を進め、メチル化異常の頻度、程度との関連性について疾患別に交絡要因を考慮し、正確に評価する必要がある。晩婚化、少子化により今後も ART 出生児が増加すると予想される。ART と先天性ゲノムインプリンティング病との関連性については、早急に実態を把握し、適切な対応をとる必要性があり、次世代社会の最重要な課題であると考えられる。

## A. 研究目的

先天性ゲノムインプリンティング異常症：Beckwith-Wiedemann 症候群（BWS）、Angelman 症候群（AS）、Prader-Willi 症候群（PWS）、Silver-Russell 症候群（SRS）、新生児一過性糖尿病（TNDM）は、いずれも発生頻度 2 ー 数十万人に 1 人で非常に稀な疾患と考えられている。その疾患の発症機序として、責任領域の片親性欠失、変異、重複、メチル化異常が確認されているが原因不明の症例も少なくない。また、影響を受ける遺伝子により、その病態や重症度は多彩である。さらに早期の適切な処置により、生涯長期ケアが必要となる症例が多い点も共通の特徴である。

注目すべき点は、近年の生殖補助医療（ART）の普及率向上により、インプリント病の報告が世界中で増加している点である(Hansen. N Engl J Med. 2002 他)。米国の 5 万人規模の疫学調査では、約 6 倍（一般集団：0.76%, ART 出生児；4.1%）と高く（DeBarn. Am J Hum Genet. 2003）ほとんどが DNA メチル化異常であると報告されている。これには、ART が、インプリンティングが確立する時期の配偶子を操作する事が原因であると推察されている。しかし、我が国では、その実態は明らかではない。少子化、晩婚化の社会情勢により、今後も ART 患者の増加が見込まれるため、インプリント病

との関連性は、次世代社会の最重要な問題として早急な対応が必要である。

ゲノムインプリンティング（遺伝子刷り込み）とは、特定の親由来の遺伝子が選択的に発現する現象である。多くのインプリント遺伝子は胎児、胎盤の発育や乳幼児の身体的、精神的な発達、行動に影響を及ぼす事が知られている。その分子機構には、生殖細胞（精子・卵子）成長過程で獲得・維持される DNA メチル化（メチル化インプリント）が主要な役割を果たし、雌雄間の遺伝子発現の調節に働いている。このメチル化の獲得と維持には、メチル化基質とメチル化酵素（新規型と維持型）も重要な役割を果たすことが変異マウスの解析で明らかとなった。また、次世代の（始原）生殖細胞では、このメチル化は全て消去される。また、この DNA メチル化は、『細胞の記憶』として維持される。

本研究では、1) 療育センターや重症心身障害者施設含む多施設の産科・小児科医の協力下に、全国規模の疫学調査を行い、インプリント病の発生頻度、病態、治療実態の把握を行う。さらに、試料の収集と遺伝子診断を行い、発症機序と影響を受ける遺伝子の解析を行う。2) ART 治療法やメチル化異常との関連について実態を把握し、リスク要因について評価する事を目的とする。

これらの評価に基づき、臨床の現場には、各疾患の診断手順の作成と病態、予後に関

する情報の提供を行う。また、簡易メチル化解析システムと遺伝子解析の結果を、迅速に報告出来る体制を構築する。さらに治療指針と ART 治療の見直しを行う。

## B. 研究方法

### (1) 先天性ゲノムインプリンティング病

#### 5 疾患に関する全国調査

昨年度より、先天性ゲノムインプリンティング病 5 疾患に関する全国調査を行った。その方法は、受療患者数推計のための第 1 次調査と、臨床疫学像実態把握のための第 2 次調査に分けて実施した。

#### 1) 調査対象施設・診療科

全国病院の小児科および産婦人科を対象として、大学病院／一般病院の別、病院の病床数で層別化した層化無作為抽出による抽出調査を実施した。全病院のリストは「病院要覧」を、大学病院は「医療機関名簿」を使用した。患者が特に集中すると予想される重症心身障害者施設（以下「特別病院」）については、全数調査を行った。

#### 2) 調査法

調査法は郵送法で行った。依頼状・診断基準・調査票を対象科に送付し、受療患者数（新患および再来）の報告を依頼した。期限までに返送のなかった診療科には再度依頼を行った。第 1 次調査で「患者あり」と報告された診療科には依頼状・診断基準とともに第 2 次調査票（患者個人用）を随時送付した。

### 3) 倫理面への配慮

本調査は、東北大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を得ている。第 1 次調査の記入は受療患者数のみであり、第 2 次調査の集計解析は連結不可能匿名化された状況下で行い、プライバシー保護に万全の配慮を施している。

### (2) 疾患患者のメチル化インプリントの解析

#### 1) 検体送付の依頼

第 2 次調査で、遺伝子解析の「希望あり」と報告させた機関に、第 3 次調査として、頬粘膜から細胞を塗抹、送付するように依頼した。キットを説明書と共に送付。また、倫理面への配慮もおこなった。

#### 2) メチル化インプリントの解析

先天性ゲノムインプリンティング病患者の頬粘膜細胞から DNA を抽出し、インプリント遺伝子 8 領域のメチル化解析を行った。これには、ハイスループット系の新規 Bisulphite PCR メチル化定量測定システムを応用した。

このシステムは、開発段階にあるため、性能評価をプラスミドあるいは、実際の生体試料（血液、精子細胞）を用いて、行なった。さらに確認には、それぞれ Bisulphite PCR シークエンス法を用い、正確に評価し、医療機関の主治医に報告した。

## C. 研究結果

### (1) 先天性ゲノムインプリンティング病5疾患に関する全国調査

調査対象施設総数 3158 のうち、1602 施設から有効回答があり（有効回答率 56.3%）、報告患者総数は 1818 人であった。その内訳は、BWS が 216 人、AS が 415 人、PWS が 992 人、SRS が 161 人、TNDM が 34 人である。1818 例のうち 27.7%にあたる 504 例の第 2 次調査票が回収された。このうち不適格率はなかった。

図 1 には、各疾患の症例数と年齢別推移を示した。総括すると、AS 以外の 4 疾患で、近年増加傾向にあることが示唆される。特に BWS、SRS は最近 5~10 年間に急増していることが疑われる。また、性比には、有意な差は見られなかった。また、BWS において 9 割近くの症例が 2000 年以降に発症していた。AS において 4 割近くの症例が 15 年以上前に発症していた。一方、発症 10 年未満の症例も 3 割を超えていた。PWS において 3 割近くの症例が 15 年以上前に発症していた。一方、発症 10 年未満の症例も 4 割を超えていた。SRS においての 8 割以上の症例が 1995 年以降に発症していた。TNDM においては全ての症例が 1995 年以降に発症していた。また、家族歴と近親婚の有無では、PWS において 1.5%、BWS において 1.4%、AS において 0.8%、SRS において 1.4%、TNDM において 25%の症例に家族歴が認められた。しかし、ほとんどが孤発例であった。AS においてのみ 1.6%の症例に

近親婚が認められた。

不妊治療を受けたかどうか、また受けた場合はその治療内容（図 2、表 1）について示した。全体に、不妊治療を受けたかどうか分からない患者が多いことが特徴で、十分な情報が得られていないことが判明した。何らかの不妊治療を受けた事が判明している親は 0~9.5%で、一般に不妊治療を受けている割合が 10%前後なので、多いとはいえない。しかし、実際少なくとも PWS、BWS、AS、SRS の疾患のそれぞれ 1.5%、8.6%、1.6%、9.5%が不妊治療を受けていた。またほとんどの症例は体外受精 (IVF) あるいは顕微授精 (ICSI) によるものであった（図 3）。平成 17 年度の IVF+ICSI の出生児は年間 10338 人で前出生児の 0.86%となる。いずれの 4 疾患も発症率は高く、特に SRS では 11.2 倍、BWS では 10 倍と圧倒的な高リスクである事が判明した。さらに小児癌との関連を示した（図 4）。BWS ではおよそ 3 割に癌の発症がみられ、PWS、SRS でも 1 例ずつ癌発生がみられた。

### (2) 疾患患者のインプリント遺伝子の DNA メチル化の解析

患者登録が行なわれた 1818 人の先天性ゲノムインプリンティング病患者のうち、頬粘膜細胞 DNA を提供して頂いた症例は、本年 2 月までで 75 名であった。その内訳は、BWS が 6 人、AS が 37 人、PWS が 22 人、SRS が 10 人、TNDM が 0 人であった。我々は、これまでに、これら疾患の原因と



なるヒトインプリント遺伝子の DNA メチル化領域を同定し、報告した(図5、図6、表2)。

また、解析には臨床現場で測定可能な、ハイスループット系の新規 Bisulphite PCR メチル化定量測定システム (PCR-Luminex 法) を応用した。PCR-Luminex 法はフローサイトメトリーを利用したマイクロビースアレイ技術である蛍光ルミネックス法を用いた技術である。これまでに、一塩基置換を検出可能なことから SNP 検査等に応用されてきた。この技術を用い、本法ではバイサルファイト (BS:亜硫酸水素塩) 処理で塩基置換した非メチル化をメチル化アレルと区別し、定量化を行う。BS は DNA の非メチル化 CpG 部位は TpG に置換し、非メチル化 CpG 部位は CpG のまま置換しない。労力とコストの削減が可能となり、96 検体の測定が約 1 時間と短時間で処理可能である。効率良く増幅可能なプライマーの設計は、特許申請している。

さらに確認には、それぞれ Bisulphite PCR シークエンス法を用い、正確に評価した。異常を認めた症例の結果は、BWS が 1 人、AS が 5 人、PWS が 8 人、SRS が 4 人であった (表3)。そのうち、ART 出生児から抽出された DNA は、SRS の 2 例のみであった (図7)。現在、症例登録継続中であり、最終年度で全測定結果がそろってから発生リスクについて評価する。

## D 考察

### ■先天性インプリント異常症と頻度と ART との関連性

全国 3158 施設の実態調査を行い、1602 施設 (有効回収率 56.2%) より回答を得た。次に対象 5 疾患を治療している 380 施設のうち 171 施設より、臨床像や治療法等 14 項目についての回答を得た (総患者数は 454 名)。不妊治療を受けた患者は 0~9.5% で、一般に不妊治療を受けている割合が 10~15% なので、多いとはいえない。しかし、PWS、BWS、AS、SRS の疾患のそれぞれ 1.5%、8.6%、1.6%、9.5% が不妊治療を受けていた。またほとんどの症例は体外受精 (IVF) あるいは顕微授精 (ICSI) によるものであった。平成 17 年度の IVF+ICSI の出生児は年間 1 万人以上で、全出生児の 0.86% となる。4 疾患の発症率は高く、特に SRS では 11.2 倍、BWS では 10 倍と圧倒的な高リスクが予想される。しかし、症例数も少なく、母親の年齢も考慮しなければ正確な評価は出来ない。さらに、これら疾患の発症率は、年齢が低い程高く、増加傾向に有る事が予想される。長期的な調査研究も重要と考えられる。全国医療機関では、独自の倫理委員会と倫理審査が行なわれている。また、倫理委員会開催時期も、年に数回の機関も存在する。東北大学では、倫理委員会を委託するシステムが存在する。広く周知することで、検体の収集は、増加する事が予想される。また、コントロールとして、ART 治療を受けた児の DNA

が必要である。東北大学関連不妊医療機関（クリニック）に依頼し、協力体制を確立していく計画である。

#### ■疾患と DNA メチル化異常の頻度

ART との関連を評価する上で、正確な診断が必要である。つまり患者試料を用い、遺伝子診断を行い、発症機序と影響を受ける遺伝子の解析を行い、病型との関連性を見出す事である。そのためできるだけ多くの症例に関し、遺伝子解析を行なう必要がある。現時点で、75 名の患者の遺伝子解析を行っており、その結果評価し、最終結果として報告する予定である。各疾患の主な臨床症状の特徴と ART 児における特異な症状は見られなかった。症例数が少ない事も原因と考えられた。最終年度では、DNA メチル化異常の頻度と症状との関連、ART との関連性について評価する。

#### ■新規 DNA メチル化解析（PCR-Luminex 法）の開発

臨床の現場に役立つ、ハイスループットで正確な測定系の開発を行なっている。以下の過程において作業し、独自の新規メチル化解析法の開発を行なっている。

（プロセス1.）DNAのバイサルファイト処理：バイサルファイト処理工程の安定化と供試検体中の必要DNA量及び供試精子量の決定

（プロセス2.）ピオチン化プライマーによる Multiplex PCR 検討：プライマー設計、反応液組成、反応温度、反応時間及び増

幅サイクル数の観点から検討

(1)データベース (DNA Data Bank of Japan) で相同性検索(2) プライマー(3) 反応溶液組成・デオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTP) 濃度・Mg<sup>2+</sup>濃度(4) アニールリング温度(5) 時間、サイクル数

（プロセス3.）ハイブリダイゼーション検討：対象遺伝子領域のメチル化識別、メチル化率の測定をLuminex法により実施するため、検出プローブ設計、反応液組成、反応条件の検討を行い、適正化を図る。(1)検出プローブの設計(2)反応溶液検討(3)反応条件の検討

（プロセス4.）SA-PE 反応（ラベル反応）

（プロセス5.）Luminexシステムによる蛍光値測定検討：蛍光強度により、メチル化の有無および率の測定が可能な測定系を目指す。(1) 開発した測定系の蛍光値の妥当性確認(2) 別法との比較検証  
従来法（バイサルファイトシーケンス法/COBRA法）のデータを比較検証し、結果に乖離がないことを確認。

さらに、新たな領域を追加、開発し、商品化することも計画している。

#### ■調査体制と連携

先天性インプリント異常症と関連する疾患を含む合同班会議を実施し、互いに発表、質疑を行なった。ゲノムインプリント関連疾患合同班会議を開き、4分野  
『刷り込み疾患 BWS の診断基準作成と治療法開発基盤の確立』、『PWS の診断・治療指針の作成』、『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』、『14 番染色体ダイソミーおよび類縁疾患の診断・治療指針作成』と連携し、情報の交換を行なった。今後も継続して、班会議を行ない、情報交換の場にしたい。

#### ■今後の計画と展望

遺伝子解析と病型との関連性：患者検体の遺伝子診断を行い、発症機序と影響を受ける遺伝子の解析を行い、遺伝子型と臨床型の関連を明らかにする必要がある。その結果を基に新規メチル化解析システムの構築と診断手順を作成する必要がある。

ART 治療との関連性：ART 治療法やメチル化異常との関連について実態を把握し、リスク要因について評価する必要がある。その結果を基に臨床の現場に役立つ遺伝子診断と発症機序の頻度に基づいたフローチャートを作成する。また遺伝子型と臨床型の病態や重症度との関連性について明らかにし、患者により良い医療とケアのため、治療実態や合併症に関する情報を提供する。ART とインプリント病の関連性、それに基づくリスク要因の特定は、今後の ART 技術の向上に繋がり、比較的高額な不妊治療に加え、児の健康問題に不安を抱える患者に高度な医療を提供し、身体的・精神的負担の軽減となる等社会的にも意義は大きい。また研究終了後は、疾患の予防、早期診断に応用できる新規メチル化解析システム

(特許出願)を活用し、遺伝子診断を受託解析を行う。貴重な試料情報は、今後正常なインプリントの分子機構やその破綻の解明、また新規薬剤の開発に活用する。特にメチル化は可塑性を有し、メチル化基質の投与等で治療できる可能性が十分ある。

本調査では、追跡調査も行いうる基盤整備と同時に、両親のカウンセリング体制基盤の強化にも繋がり、長期的に見極める事が出来る体制を構築する。東北大学ではカウンセリング活動に取り組んでおり、今回の調査への参加に際し、患者家族に、正しい情報を提供し、社会から孤立することなく健全な子育ての環境を提供することを可能にする。医師や看護師を加えた活動の活性化と心理カウンセラーの人材養成に積極的に協力し、子育て支援の行政の取り組みにも貢献する。

#### E 結論

全国 3158 施設の実態調査を行い、対象 5 疾患を治療している 380 施設のうち 171 施設より、臨床像や治療法等 14 項目についての特徴や実態が明らかとなった。現在報告患者総数は 1818 人で、その内訳は、BWS が 216 人、AS が 415 人、PWS が 992 人、SRS が 161 人、TNDM が 34 人である。頬粘膜細胞から抽出した DNA の提供者は、本年 2 月までで 75 名であった (BWS が 6 人、AS が 37 人、PWS が 22 人、SRS が 10 人、TNDM が 0 人)。現在

まで、異常を認めた症例の結果は、BWSが1人、ASが5人、PWSが8人、SRSが4人でそのうち、ART出生児から抽出されたDNAは、SRSの2例のみであった。現在、症例登録継続中であり、最終年度で全測定結果がそろってから発生リスクについて評価し、結論付けたい。

#### F 研究発表

##### ■学術研究論文

1. Hiura H, Sugawara A, Yaegashi N, Sasaki H, Kono T, Arima T. A tripartite paternally methylated region within the *Gpr1-Zdbf2* imprinted domain on mouse chromosome 1 identified by meDIP-on-chip. *Nucleic Acids Research*. 38. 4929-45. (2010)
2. Sato A, Hiura H, Okae H, Yaegashi N, Arima T. Assessing loss of imprint methylation in sperm from subfertile men using novel methylation PCR-Luminex analysis. *Fertility Sterility*. 95. 129-134. (2011)

##### ■学会発表

###### 学会発表

###### 国内招待講演

1. 第28回日本医学会総会シンポジウム『生殖医療の現状と未来』(4/9/2011) 東京
2. 日本生殖医学会シンポジウム『エピゲノムの異常と流産』(3/13/2011) 東京

3. 第5回東北ART研究会 特別講演『生殖補助医療とエピジェティクス』(9/4/2010) 仙台市
4. 日本分子生物学会第10回春季シンポジウムエピジェネティックな制御を介した発生・分化のメカニズム『DNAメチル化制御によるゲノムインプリンティングと生殖医療』(6/7/2010) 仙台市
5. 第4回日本エピジェネティック研究会『新規DNAメチル化解析システムの開発と臨床への応用』(5/28/2010) 米子市

###### 国際招待講演

6. Asia Pacific Initiative on Reproduction (ASPIRE 2010) 「Epigenetics in reproduction」Arima T. Pattaya. Thailand. (4/9/2010)

###### 学術研究著書

7. 『生殖補助医療（ART）とエピジェティクスの異常』有馬隆博、樋浦仁、岡江寛明、佐藤晶子 生命の誕生に向けて（第2版）臨床と微生物 近代出版 281-285. 2010.
8. 『胎盤とエピジェネティクス』岡江寛明、樋浦仁、有馬隆博 HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY. 17. 349-354. 2010.

###### G 知的財産権の出願

『ZDBF2のメチル化領域とその検出方法』(特願2010-116634) 有馬隆博(5/20/2010)

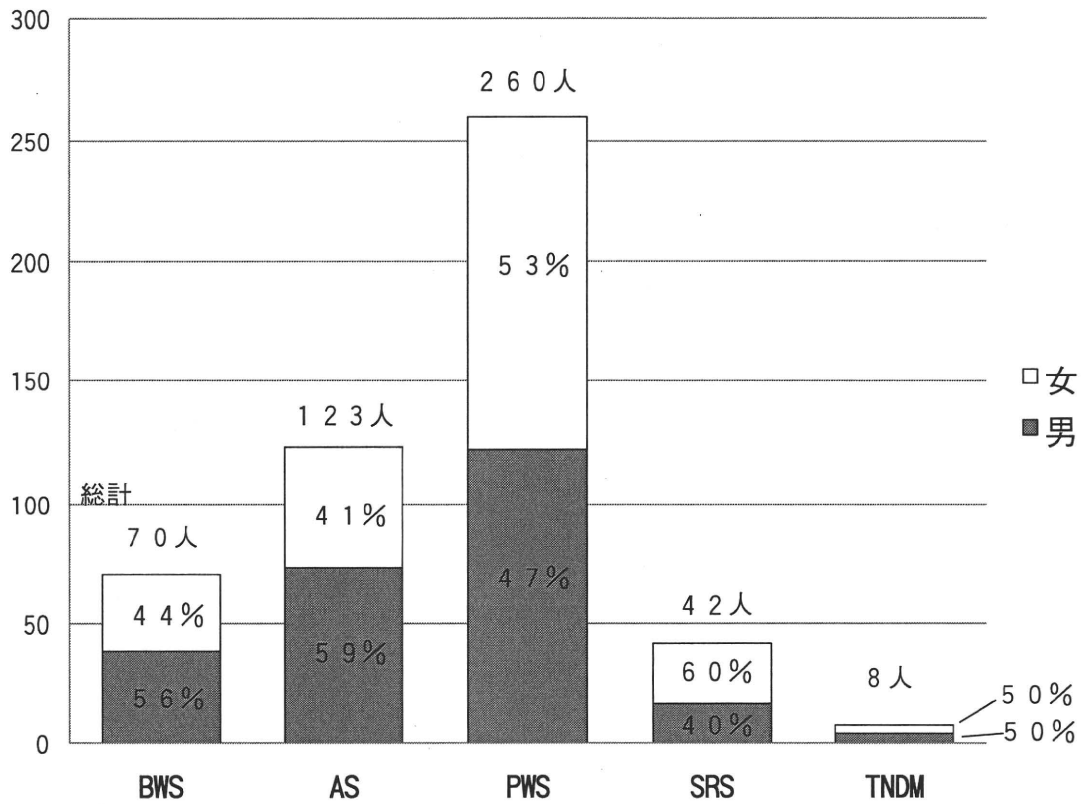


図1 インプリンティング異常症の症例数と男女比

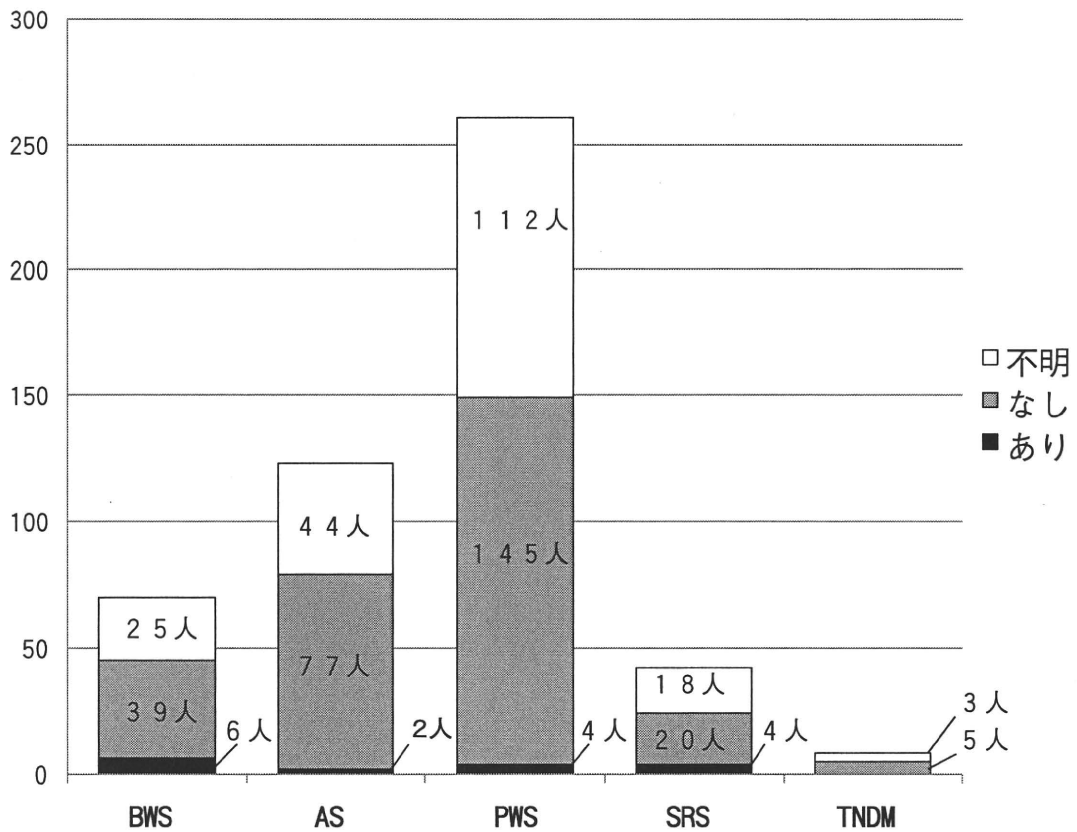


図2 不妊治療の有無について

表1 不妊治療との関連

疾患名	症例	年齢	性別	治療歴
(A)BWS	Case1	4	女性	夫リンパ球免疫治療法
	Case2	4	男性	体外受精 (IVF-ET)、人工授精 (AIH)、排卵誘発
	Case3	4	男性	体外受精 (IVF-ET)
	Case4	3	女性	体外受精 (IVF-ET)
	Case5	2	男性	体外受精 (IVF-ET)
	Case6	2	女性	顕微授精 (ICSI)
(B)AS	Case1	11	女性	排卵誘発のみ
	Case2	2	女性	人工授精 (AIH)
(C)PWS	Case1	15	女性	人工授精 (AIH) *凍結精子
	Case2	6	女性	顕微授精 (ICSI)
	Case3	2	女性	顕微授精 (ICSI)
	Case4	1	男性	顕微授精 (ICSI)
	Case5	3	女性	体外受精 (IVF-ET) 顕微授精 (ICSI)
	Case6	4	女性	排卵誘発のみ
	Case7	1	男性	排卵誘発のみ
(D)SRS	Case1	4	女性	体外受精 (IVF-ET)
	Case2	2	男性	体外受精 (IVF-ET)
	Case3	8	男性	顕微授精 (ICSI)
	Case4	5	男性	体外受精 (IVF-ET) *凍結卵

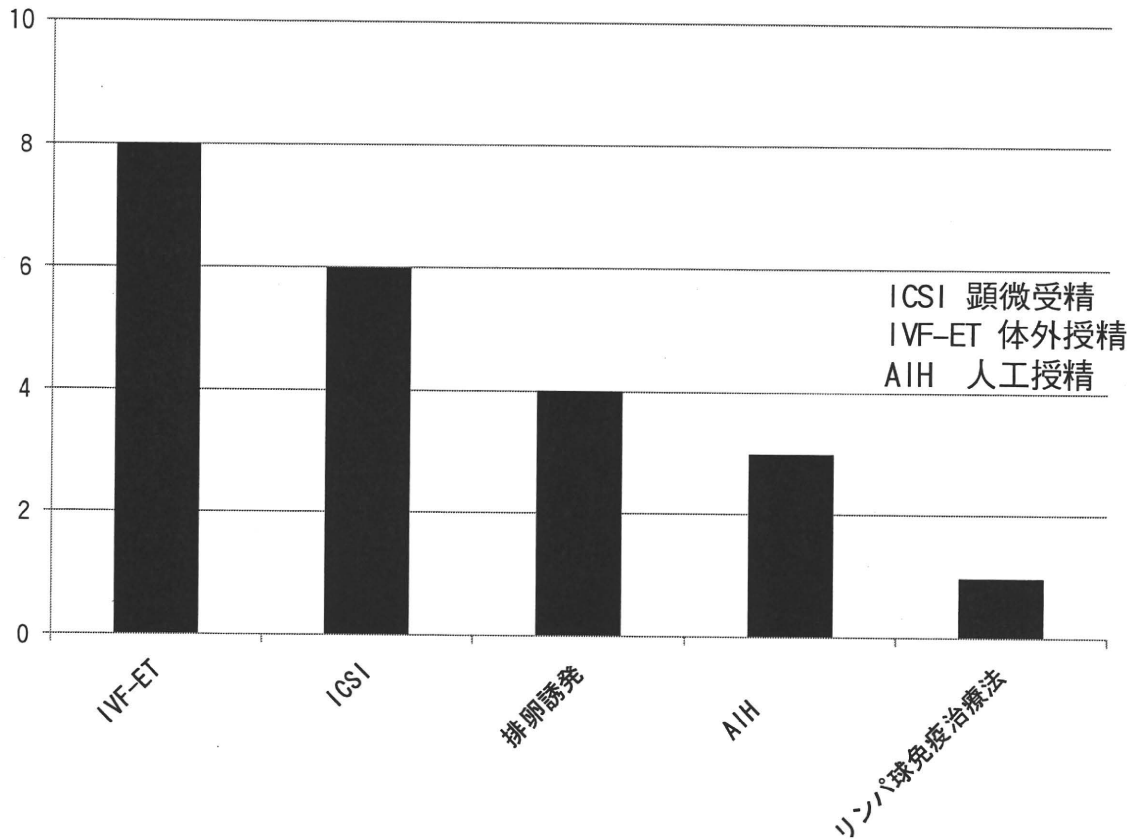


図3 不妊治療別の症例数

疾患名	症例	年齢	性別	癌腫
(A) BWS	Case1	5	男性	肝芽腫 (well differentiated type) JPLT-2による化学療法。腫瘍主検のみ。再発、化学療法と手術を施行。二次性白血病。
	Case2	8	女性	右Wilms腫瘍、2歳で化学療法と手術を施行。
	Case3	死亡	男性	急性骨髄性白血病 (M7)
	Case4	3	男性	腎腫瘍
	Case5	3	男性	腎腫瘍
	Case6	2	女性	詳細不明
	Case7	13	女性	肝芽腫 (stage IV、s3-s4領域、5.7×6.0cm) AFP37万
	Case8	3	女性	肝芽腫、肝移植
(B) PWS	Case1	13	女性	前胸部腫瘍
(C) SRS	Case1	8	男性	悪性腹部腫瘍

図4 小児癌との関連

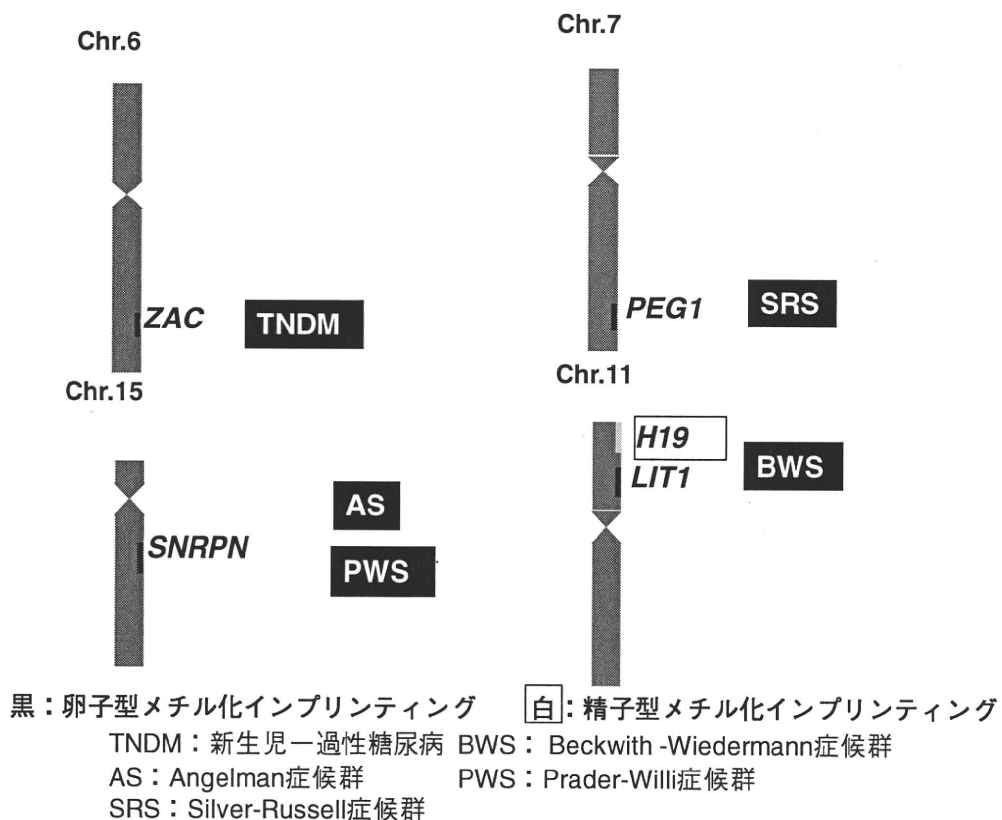


図5 先天性（若年性）疾患を標的としたインプリンティング領域

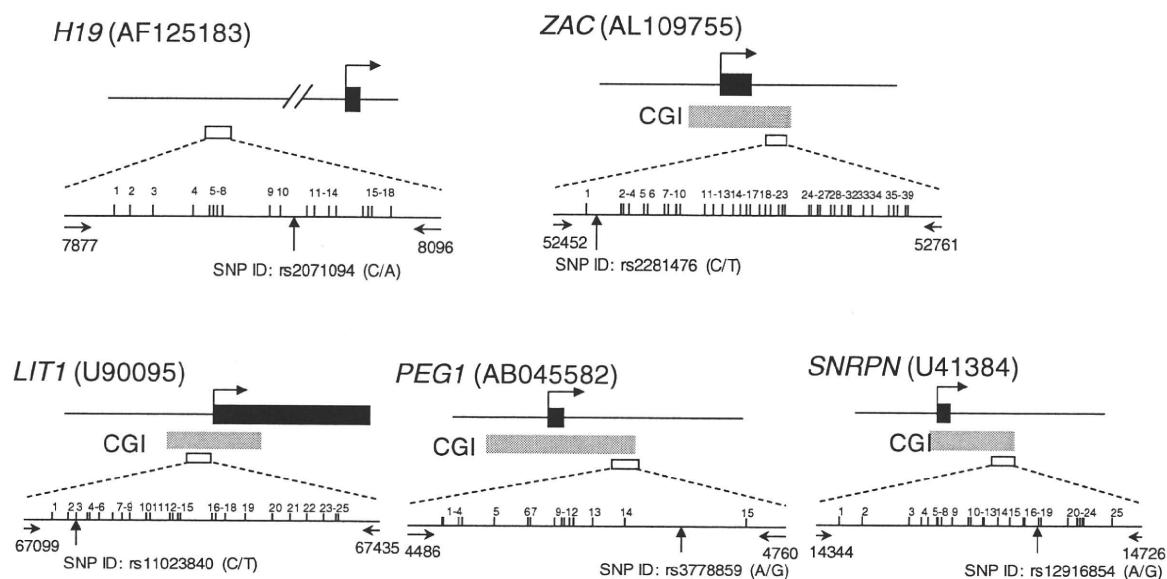


図6 解析した遺伝子領域 (マップ)

インプリント遺伝子	プライマー配列	サイズ (bp)	CpG数	引用文献
<i>H19</i> *	F: 5' -TATATGGGTATTTTTGGAGGTTTTT-3' R: 5' -ATAAATATCCTATTCCTCAAATAACCCC-3'	220	18	
<i>PEG1</i>	F: 5' -AATTTTAATTATTTGATGAGTTATGAG-3' R: 5' -ATATTTTTCAAATTTCAATAACAAAC-3'	275	15	
<i>LIT1</i>	F: 5' -TTTTGGTAGGATTTTGTTGAGGAGT-3' R: 5' -CCTCACACCCAACCAATACCTC-3'	307	26	
<i>ZAC</i>	F: 5' -GGGTTAGTYGTGTTTATAGTTTAGTA-3' R: 5' -CRAACACCCAACACCTACCTA-3'	152	19	Kamikihara et al., 2005
<i>SNRPN</i> *	F1: 5' -AGGAGGTTATGGTAGTGGATTAGG-3' R1: 5' -CACCACAATAAACAAACCAATAAC-3'	383	25	

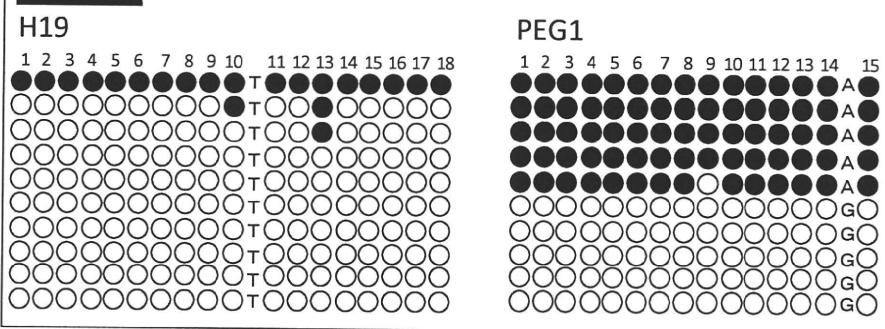
表2 バイサルファイトPCR法で用いたプライマー配列



表3 メチル化の解析結果

疾患名	解析した遺伝子名(CpG数)	症例No	性別	年齢	メチル化率(%)	判定
BWS	H19(18)	1	男	5	11.6	異常
		2	男	4	50.0	
		3	不明	不明	90.0	
		4	不明	不明	30.5	
		5	男	2	51.1	
		6	不明	不明	51.1	
AS	SNRPN(25)	1	女	21	48.8	
		2	男	5	50.0	
		3	女	13	40.0	
		4	男	28	50.4	
		5	男	32	61.6	
		6	女	3	51.2	
		7	男	4	30.0	
		8	男	37	60.0	
		9	男	26	69.6	
		10	女	36	30.0	
		11	女	14	20.0	異常疑い
		12	男	21	20.0	異常疑い
		13	男	14	79.2	異常疑い
		14	男	15	60.8	
		15	女	9	70.8	
		16	男	5	40.8	
		17	女	38	39.2	
		18	男	5	50.4	
		19	女	8	40.8	
		20	不明	不明	30.4	
		21	男	12	10.4	異常
		22	女	9	29.2	
		23	不明	不明	50.8	
		24	不明	不明	60.0	
		25	不明	不明	70.4	
		26	不明	不明	40.4	
		27	男	23	50.4	
		28	男	14	49.2	
		29	女	7	30.8	
		30	男	10	30.0	
		31	男	7		
		32	不明	不明	59.2	
		33	男	15	0.4	異常
		34	女	12	49.6	
		35	女	3	30.8	
		36	不明	不明	40.4	
		37	女	11	30.4	
PWS	SNRPN(25)	1	男	2	21.2	異常疑い
		2	男	17	20.0	異常疑い
		3	女	8	51.2	
		4	女	45	80.0	異常疑い
		5	男	28	60.0	
		6	男	36	79.2	異常疑い
		7	男	17	80.4	
		8	女	43	80.4	異常疑い
		9	男	0	20.0	異常疑い
		10	女	0	30.0	
		11	男	2	40.8	
		12	女	15	50.0	
		13	男	4	20.0	異常疑い
		14	男	18	30.0	
		15	女	13	41.2	
		16	女	3	41.2	
		17	不明	不明	70.8	
		18	男	41	32.4	
		19	男	18	50.8	
		20	男	4	40.8	
		21	男	0	49.6	
		22	男	12	10.8	異常
SRS	PEG1(15),H19(18)	1	男	5	PEG1 49.3 ,H19 11.6	異常
		2	男	2	PEG1 70.0 ,H19 18.8	異常疑い
		3	女	14	PEG1 10.0 ,H19 50.0	
		4	男	0	PEG1 40.0 ,H19 50.0	
		5	女	4	PEG1 11.3 ,H19 90.5	異常
		6	女	1	PEG1 30.0 ,H19 31.6	
		7	不明	不明	PEG1 52.0 ,H19 38.8	
		8	男	9	PEG1 32.6 ,H19 50.0	
		9	男	1	PEG1 98.2 ,H19 88.8	異常
		10	不明	不明	PEG1 50.0 ,H19 50.0	

**Case 1** 男性、5歳



**Case 5** 女性、4歳

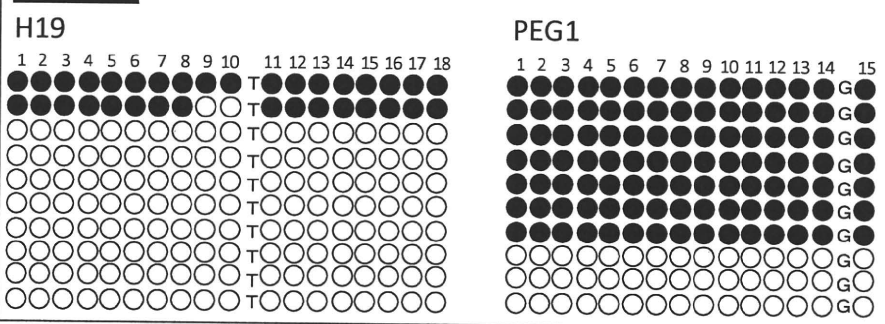


図7 SRSの異常例（2例）

### Ⅲ. 参考資料

# A tripartite paternally methylated region within the *Gpr1-Zdbf2* imprinted domain on mouse chromosome 1 identified by meDIP-on-chip

Hitoshi Hiura<sup>1,2</sup>, Atsushi Sugawara<sup>1</sup>, Hidehiko Ogawa<sup>3</sup>, Rosalind M. John<sup>4</sup>, Naoko Miyauchi<sup>1</sup>, Yusuke Miyanari<sup>5,6</sup>, Tokumasa Horiike<sup>5,6,7</sup>, Yufeng Li<sup>5,6</sup>, Nobuo Yaegashi<sup>2</sup>, Hiroyuki Sasaki<sup>5,6</sup>, Tomohiro Kono<sup>3</sup> and Takahiro Arima<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Innovation of New Biomedical Engineering Center, University of Tohoku, 2-1 Seiryō-cho, Aoba-ku, Sendai, 980-8575, <sup>2</sup>Departments of Obstetrics and Gynecology, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, <sup>3</sup>Department of BioScience, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan <sup>4</sup>Cardiff School of Biosciences, Museum Avenue, Cardiff, UK, <sup>5</sup>Division of Human Genetics, Department of Integrated Genetics, National Institute of Genetics, Research Organization of Information and Systems, Mishima, <sup>6</sup>Department of Genetics, The Graduate University for Advanced Studies (Sokendai), Mishima and <sup>7</sup>Division of Global Research Leaders, Shizuoka University, Shizuoka, Japan

Received November 16, 2009; Revised March 9, 2010; Accepted March 10, 2010

## ABSTRACT

The parent-of-origin specific expression of imprinted genes relies on DNA methylation of CpG-dinucleotides at differentially methylated regions (DMRs) during gametogenesis. To date, four paternally methylated DMRs have been identified in screens based on conventional approaches. These DMRs are linked to the imprinted genes *H19*, *Gtl2* (IG-DMR), *Rasgrf1* and, most recently, *Zdbf2* which encodes zinc finger, DBF-type containing 2. In this study, we applied a novel methylated-DNA immunoprecipitation-on-chip (meDIP-on-chip) method to genomic DNA from mouse parthenogenetic- and androgenetic-derived stem cells and sperm and identified 458 putative DMRs. This included the majority of known DMRs. We further characterized the paternally methylated *Zdbf2/ZDBF2* DMR. In mice, this extensive germ line DMR spanned 16 kb and possessed an unusual tripartite structure. Methylation was dependent on DNA methyltransferase 3a (*Dnmt3a*), similar to *H19* DMR and IG-DMR. In both humans and mice, the adjacent gene, *Gpr1/GPR1*, which encodes a G-protein-coupled receptor 1 protein with transmembrane domain, was also imprinted and paternally expressed. The *Gpr1-Zdbf2* domain was most similar to the *Rasgrf1* domain as both DNA methylation and

the actively expressed allele were in *cis* on the paternal chromosome. This work demonstrates the effectiveness of meDIP-on-chip as a technique for identifying DMRs.

## INTRODUCTION

Genomic imprinting describes the expression of a subset of mammalian genes from one parental chromosome (1). Many imprinted genes play developmentally important roles particularly during embryogenesis and also in the adult animal (2,3). The majority of imprinted genes reside within complex domains. Although the domain itself remains imprinted throughout the life of the organism, individual genes within the domain can be expressed in tissue- and developmentally specific patterns and some also show temporal or spatial differences in their imprinted status.

Imprinted domains are established in the germ line and the epigenetic profile of germ cells changes dynamically during development (4). Most strikingly, the DNA methylation of CpG-dinucleotides at differentially methylated regions (DMRs) is erased as the primordial germ cells migrate from the base of the allantois to the genital ridge and differentially re-established during oogenesis and spermatogenesis (5). In the female neonatal mouse, methylation is acquired asynchronously in a gene-specific manner in oocytes arrested at prophase I and during the transition from primordial to antral follicles in the postnatal growth phase (post-pachytene) (6–8).

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +81 22 717 7844; Fax: +81 22 717 7063; Email: tarima@mail.tains.tohoku.ac.jp

© The Author(s) 2010. Published by Oxford University Press.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.