

201128120A

---

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23年度 総括・分担研究報告書

平成 24 (2012) 年 3 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-----	10
1. SNP アレイによる Beckwith-Wiedemann 症候群父性ダイソミー症例の解析-----	11
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-----	15
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 -----	18
IV. 研究成果の刊行物・別冊 -----	21

# 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・エピエ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・エピエジェネティクス分野 助教

研究協力者：前田 寿幸、大塚 泰史

佐賀大学医学部分子生命科学講座分子遺伝学・エピエジェネティクス分野 大学院生

**研究要旨**

ゲノム刷り込み関連疾患 Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) 本邦 201 例の臨床情報解析を行い、臨床像を明らかにした。また、124 例のゲノム・エピゲノム解析を行い、既知のゲノム・エピゲノム異常の頻度と異常タイプ別の特徴を明らかにした。ゲノム中の 38 カ所の刷り込み DMR のメチル化を解析したところ、11p15 のメチル化異常を示す症例の 4 割弱で他の刷り込み DMR のメチル化異常を認めた。iPSC についても解析したところ、マウスでは iPSC 化すると大半の刷り込み DMR は低メチル化を生じること、一部の刷り込み DMR は RA 処理により正常メチル化に回復することがわかった。ヒト iPSC では、健常者、患者に関わらず共通の刷り込み DMR が高メチル化すること、KvDMR1-LOM 患者由来の iPSC では他の特定の刷り込み DMR が低メチル化することが明らかとなった。メチル化の変化と分化能との関連性が注目される。本研究において、いくつかの新しい知見と疑問点が浮かび上がった。今後も研究を推し進め、刷り込み機序および発症機構の全容を明らかにしたい。

**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・エピエ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

## 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。疾患遺伝子座は 11 番染色体短腕 15 領域 (11p15) の刷り込み領域で、これまでに本領域において 5 種類のゲノム・エピゲノム変異が見出されている (KvDMR1 脱メチル化 (KvDMR1-LOM)、H19DMR 高メチル化 (H19DMR-GOM)、父性片親性ダイソミーモザイク (patUPD モザイク)、*CDKN1C* 遺伝子変異、11p15 領域を含む染色体異常)。しかし、これら既知のゲノム・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。本研究では、本邦 BWS 症例について、既知のゲノム・エピゲノム変異のタイプ別に臨床症状を明らかにすること、網羅的ゲノム・エピゲノム解析を行い未知のゲノム・エピゲノム変異を見出すこと、さらにマウス 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

### 1. 本邦 BWS 症例の臨床像解析

BWS の診断については、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)) を用いた。H21 年度から始まった本研究で収集された症例のうち、3 種類の診断基準のいずれかに合致する症例は 201 例で、これらの臨床症状について解析した。

### 2. 11p15 の既知 5 種類のゲノム・エピゲノム解析

上述の診断基準合致例 201 例のうち、検体の提供を受け既知のゲノム・エピゲノム解析を施行したのは 124 例であった。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 COBRA 法を用いた。父性片親性ダイソミーモザイク (patUPD モザイク) については、11p15 の Short tandem repeat (STR) マーカー (*D11S1997*, *D11S2362*, *HUMTH01*, *D11S1984*) および SNPs を用いて解析した。*CDKN1C* の変異はシークエンス法にて解析した。染色体異常は、染色体検査の結果を用いた。

### 3. 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 11p15.5 の刷り込み DMR のメチル化異常がみられるが、ゲノム上のすべての刷り込み DMR を網羅的に解析した研究はない。そこで、バイサルファイト変換後のメチル化 CpG と非メチル化 CpG の質量差を MALDI-TOF-MS (Sequenom 社 MassARRAY) で検出することで、ゲノム中のすべての刷り込み DMR (ヒト 38 カ所、マウス 28 カ所) のメチル化を解析できる系を確立し、BWS 症例および iPSC を解析した。

### 4. iPSC の樹立とメチル化解析

横浜理研 RCAI の古関明彦博士との共同研究で iPSC を樹立した。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 8 クロンの iPSC を作製した。また、BWS 患児 2 例 (KvDMR1-LOM: 1 例、H19DMR-GOM: 1 例) と健常コントロール 2 名の末梢血からそれぞれ 4 クローンずつ合計 16 クロンの iPSC を作成した。これらの iPSC について、MassARRAY を用いて DMR のメチル化解析を行った。

(倫理面への配慮)

佐賀大学医学部倫理委員会および遺伝子・ゲノム解析研究倫理委員会の承認を受けて実施した。

## C. 研究結果

### 1. 本邦 BWS 症例の臨床像解析

201 例の BWS 症例を 3 種類の診断基準に従っ

て分類したところ、Elliot 基準 104 例、Weksberg 基準 179 例、DeBaun 基準 192 例であった。男女比は 1:1 であった。生殖補助医療に関する情報は 95 例で得られ、顕微授精 2 例 (2.1%)、体外受精 (1.1%)、人工授精 1 例 (1.1%) であった。臨床的診断時期を主な症状と頻度を表 1-1 に示す。

表 1-1 臨床診断時期 (n = 139)

臨床診断時期	症例数	頻度 (%)
妊娠中	15	10.8
出生 3 日以内	71	51.1
出生 1 ヶ月以内	14	10.1
出生 6 ヶ月以内	11	7.9
出生 12 ヶ月以内	8	5.8
出生 1 年以降	20	14.3

臨床症状と頻度を表 1-2 に示す。BWS に特徴的な三主徴はそれぞれ 75% 以上にみられるが、三主徴すべてを呈する頻度は 51% 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 1-3)。BWS では精神運動発達遅滞は少ないとされていたが、20.8% と高頻度であった。外・内性器異常は、大半が男児で停留睾丸がほとんどを占めた。

表 1-2 臨床症状と頻度

臨床症状	対象数	症例数	頻度 (%)
巨舌	197	177	89.8
腹壁欠損	193	145	75.1
過成長	185	139	75.1
三主徴すべてあり	182	93	51.1
耳垂線状溝	162	102	63.0
耳輪後縁小窩	168	82	48.8
低血糖	178	80	44.9
腹腔内臓器腫大	166	59	35.5
片側肥大	146	47	32.2
腫瘍 (異時性多発性: 3 例)	148	36	24.3

精神運動発達遅滞	130	27	20.8
外・内性器異常	150	24	16.0
心臓異常	144	24	16.7
鼠径ヘルニア	200	19	9.5
腎奇形	165	14	8.5
骨年齢亢進	68	5	7.4

表 1-3 臓器別腫大頻度 (n = 80)

臓器	症例数	頻度 (%)
腎腫大	46	57.5
肝腫大	41	51.3
脾腫大	21	26.3
副腎腫大	12	15.0
膵腫大	10	12.5
腸管腫大	1	1.3

腫瘍の合併は 36 例 (24.3%) で見られ (表 1-2)、そのうち 3 例 (7.8%) 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 38 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 (5.3%) のみで、肝原発腫瘍が計 17 例 (44.7%) で最も多かった (表 1-4)。また、血管腫が計 10 例 (26.3%) と比較的多かった。腫瘍発見年齢に関する情報がある腫瘍は 26 例で、1 才未満 15 例、1~5 才 6 例、6~10 才 2 例、10 才以上 3 例 (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 1-4 腫瘍の種類と頻度 (n = 38)

腫瘍の種類	症例数	頻度 (%)
肝芽腫	10	26.3
肝血管腫	6	15.8
肝血管内皮腫	4	10.5
血管腫	3	7.9
乳腺腫瘍	2	5.3
副腎腫瘍	2	5.3
急性骨髄性白血病	2	5.3
横紋筋肉腫	2	5.3
ウィルムス腫瘍	2	5.3
膀胱腫瘍	2	5.3

腹部上皮腫	1	2.6
肛門脂肪腫	1	2.6
肝細胞癌	1	2.6
心房腫瘍	1	2.6
皮膚腫瘍	1	2.6

## 2. 11p15の既知5種類のゲノム・エピゲノム解析

3種類の診断基準のいずれかを満たす124症例について、11p15のゲノム・エピゲノム変異解析を施行し、それぞれの変異のタイプ別に臨床症状を解析した(表2-1)。KvDMR1-LOMが最多で36例(29.0%)、H19DMR-GOM 12例(9.7%) patUPDモザイク 28例(22.6%)、*CDKN1C* 遺伝子変異 9例(7.3%)、11p部分トリソミー 5例(4.0%)であった。*CDKN1C* 遺伝子変異の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。11p部分トリソミーは、全例が父由来2コピー、母由来1コピーであることを、STRおよびSNPsで確認した。顕微授精1例、体外受精1例、人工授精1例はすべてKvDMR1-LOMを示した。既知の異常を認めない症例が34例(27.4%)を占めた。

表2-1 既知の異常と頻度 (n = 124)

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	36	29.0%	5	13.9%
H19DMR-GOM	12	9.7%	4	33.3%
patUPDモザイク	28	22.6%	6	21.4%
<i>CDKN1C</i> 変異	9	7.3%	1	11.1%
Trisomy 11	5	4.0%	1	20.0%
既知の異常なし	34	27.4%	5	14.7%

何らかの既知のゲノム・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57.8%であるのに対し、異常を認めない症例では29.0%と低かった。過成長、三主徴、耳の

奇形、臓器腫大は、ゲノム・エピゲノム変異のタイプ別でその頻度が異なる傾向がみられた。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。

## 3. MALDI-TOF-MSを用いた刷子込みDMRのメチル化解析

BWS 症例 60例 (KvDMR1-LOM: 31例、H19DMR-GOM: 8例、patUPD: 21例) を解析した。健常コントロールと比べて15%以上のメチル化の差異を認めた場合を異常メチル化とした。KvDMR1-LOM 症例 31例中、12例(38.7%)でKvDMR1以外の刷子込みDMRのメチル化異常を認めた。内訳は、低メチル化だけを示した症例5例、高メチル化だけを示した症例3例、低メチル化と高メチル化を示した症例4例であった。3例以上で低メチル化を示すDMRは4カ所、3例以上で高メチル化を示すDMRが1カ所あった。KvDMR1を除く計1178のDMR中34カ所(2.89%)で異常メチル化を認めた。一方、H19DMR-GOM 症例では、全例でH19プロモーターの高メチル化を認め、さらにIGF2-DMR0の高メチル化を4例、IGF2-DMR2の高メチル化を3例で認めた。8例中3例(37.5%)で、これら *IGF2/H19* ドメインのDMR以外のメチル化異常を認めた。内訳は、低メチル化だけを示した症例2例、高メチル化だけを示した症例1例であった。低メチル化を示した症例2例は同じDMRの低メチル化であった。*IGF2/H19* ドメインを除く計304のDMR中3カ所(0.99%)で異常メチル化を認めた。patUPD 症例では、ほぼ全例でKvDMR1-LOMとH19DMR-GOMを認め、11p15の父性ダイソミーを確認した。21例中9例に11p15以外のメチル化異常を認めた。このうち、4例はSNPアレイ解析でGWUと判明した症例であり、ほぼすべての刷子込みDMRで父性パターンのメチル化異常を呈しており、GWUが父性ダイソミーであることを裏付けていた。GWUを除いたpatUPD 症例 17例中5例において11p15以外のメチル化異常を認め、異常メチル化DMR数

は KvDMR1 と *IGF2/H19* ドメインを除く計 561 中 9 ヲ所 (1.60%) であった。

#### 4. iPSC の樹立とメチル化解析

親株となるマウス F1 線維芽細胞 (1 株)、未分化 iPSC (8 クローン)、レチノイン酸 (RA) で分化誘導した iPSC (8 クローン) の三者について、MassARRAY を用いて刷り込み DMR 28 ヲ所のメチル化解析を行い比較した。未分化 iPSC は線維芽細胞に比べ、20 ヲ所で低メチル化を示し、1 ヲ所が高メチル化を示した。RA 処理 iPSC は線維芽細胞に比べ、13 ヲ所で低メチル化を示し、1 ヲ所が高メチル化を示した。また、RA 処理 iPSC は未分化 iPSC に比べ、4 ヲ所で高メチル化を示した。このうち 3 ヲ所は、RA 処理 iPSC と線維芽細胞でメチル化の差異がない領域であり、RA 処理により正常メチル化に回復したことを示す。これらの結果から、線維芽細胞を iPSC 化すると大半の刷り込み DMR は低メチル化を生じること、一部の刷り込み DMR は RA 処理により正常メチル化に回復することがわかった。次に、ヒト iPSC についても 38 ヲ所の刷り込み DMR を MassARRAY を用いて定量的に解析した。2 名の健常人末梢血由来 iPSC それぞれ 4 クローンずつ計 8 クローン、KvDMR1-LOM 症例から樹立した iPSC 4 クローン、H19DMR-GOM 症例から樹立した iPSC 4 クローンを解析した。健常者、患者に関わらず、iPSC 化により 10 ヲ所で高メチル化となった。また、患者由来の iPSC では、それぞれ KvDMR1-LOM と H19DMR-GOM は変わらなかった。KvDMR1-LOM 患者由来の iPSC では、特定の 1 ヲ所が低メチル化していた。ヒト末梢血から iPSC を樹立した場合、健常者、患者に関わらず共通の刷り込み DMR が高メチル化すること、KvDMR1-LOM 患者由来の iPSC では他の特定の刷り込み DMR が低メチル化することが明らかとなった。

#### 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

H21 年度から症例を収集し、数が増えたことで本邦 BWS 症例の特徴を明らかにできた。三主徴すべてを呈する頻度が、既知のゲノム・エピゲノム異常を示す症例で高く、異常を認めない症例で低いことは、BWS に類似した臨床症状をもつ他疾患の混入が考えられる。正確な診断には、異常を認めない症例における新規原因遺伝子の同定が必要である。生殖補助医療で出生した患児は、4.2% 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ついては今後も解析が必要である。

腫瘍については発生頻度が比較的高く、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、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。

これらの結果については、学会発表以外に「BWS 親の会」で講演し、患者家族および関連医師へ直接成果を還元している。

#### 2. MALDI-TOF-MS によるメチル化解析

KvDMR1-LOM 症例、H19DMR-GOM 症例、patUPD 症例のいずれでも 3 割~4 割弱に 11p15 以外の DMR のメチル化異常を認め、刷り込み疾患では責任領域以外の刷り込み DMR のメチル化異常がおこりやすいことを示唆している。これらの異常が臨床症状にどのように影響を与えるか今後の解析が重要と思われる。H19DMR-GOM 症例では、H19DMR とともに H19 プロモーター、*IGF2-DMR0*、*IGF2-DMR2* の高メチル化が同時に生じており、これらが協同して *IGF2* を両アレル発現させることで BWS が発症すると考えられる。一方、大腸癌などでは、*IGF2-DMR0*、*IGF2-DMR2* は低メチル化になるこ



とから、BWS と癌ではメチル化異常の機序が異なると考えられる。また、H19DMR-GOM 症例よりも KvDMR1-LOM 症例のほうが、1 症例あたり複数の DMR のメチル化異常をしめすことから、KvDMR1 が低メチル化を起こす際には他のいくつかの DMR のメチル化も不安定になると考えられる。興味深いことに、低メチル化だけでなく高メチル化も生じており、メチル化が不安定になった場合、それぞれの DMR によってメチル化状態が異なる方向に変化するようである。このメカニズムの解明はゲノム刷り込み全体の理解につながると考えられる。

### 3. iPSC の樹立とメチル化解析

マウス iPSC では、線維芽細胞を iPS 化すると大半の刷り込み DMR は低メチル化を生じること、一部の刷り込み DMR は RA 処理により正常メチル化に回復することがわかった。この違いが、iPSC の多分化能とどのように関連するかをキメラマウス法で検証中である。一方、ヒト末梢血から iPSC を樹立した場合、健常者、患者に関わらず共通の刷り込み DMR が高メチル化すること、KvDMR1-LOM 患者由来の iPSC では他の特定の刷り込み DMR が低メチル化することが明らかとなった。今後、*in vitro* 分化およびヌードマウス接種による奇形種形成実験などを行い、メチル化の変化が分化能に及ぼす影響を明らかにしたい。

## E. 結論

本邦 BWS 症例の臨床像とゲノム・エピゲノム異常の頻度と特徴を明らかにした。全刷り込み DMR のメチル化解析により、11p15 のメチル化異常症例の 4 割弱で他の DMR のメチル化異常を認めた。マウスおよびヒト iPSC で、刷り込み DMR のメチル化状態を明らかにした。多分化能との関連性が必要である。

本研究において、BWS 症例を詳細に解析した結果、いくつかの新しい知見と疑問点が浮かび上がった。さらに研究を推し進め、刷り込み機序および発症機構の全容を明らかにしたい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Higashimoto K, Nakabayashi K, Yatsuki H, Yoshinaga H, Jozaki K, Okada J, Watanabe Y, Aoki A, Shiozaki A, Saito S, Koide K, Mukai T, Hata K, Soejima H. Aberrant methylation of H19-DMR acquired after implantation was dissimilar in soma versus placenta of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet Part A*, in press
- 2) Aoki A, Shiozaki A, Sameshima A, Higashimoto K, Soejima H, Saito S. Beckwith-Wiedemann Syndrome with Placental Chorangioma due to H19-DMR Hypermethylation: A Case Report. *J Obstet Gynaecol Res*, 37(12):1872-1876, 2011
- 3) Sato S, Yoshida W, Soejima H, Nakabayashi K, Hata K. Methylation dynamics of IG-DMR and Gtl2-DMR during murine embryonic and placental development. *Genomics*, 2011, 98(2):120-127.
- 4) Nakabayashi K, Trujillo AM, Tayama C, Camprubi C, Yoshida W, Lapunzina P, Sanchez A, Soejima H, Aburatani H, Nagae G, Ogata T, Hata K, Monk D. Methylation screening of reciprocal genome-wide UPDs identifies novel human specific imprinted genes. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(16):3188-3197.
- 5) Nagae G, Isagawa T, Shiraki N, Fujita T, Yamamoto S, Tsutsumi S, Nonaka A, Yoshida S, Matsusaka K, Midorikawa Y, Ishikawa S, Soejima H, Fukayama M, Suemori H, Nakatsuji N, Kume S, Aburatani H. Tissue-specific demethylation in CpG-poor promoters during cellular differentiation. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(14):2710-2721.

- 6) 副島英伸. ベックウイズ・ヴィーデマン症候群 第 XIV 章 先天異常・奇形 症候群ハンドブック. 井村裕夫総編集, 福井次矢・辻省次編集. 中山書店. 東京. P679, 2011
- 7) 副島英伸. シルバー・ラッセル症候群 第 XIV 章 先天異常・奇形 症候群ハンドブック. 井村裕夫総編集, 福井次矢・辻省次編集. 中山書店. 東京. P685, 2011
2. 学会発表
- 1) 副島英伸. Beckwith-Wiedemann 症候群の臨床像と遺伝子解析. BWS 親の会勉強会 2011. 7. 30. 旭川市
- 2) 副島英伸. Beckwith-Wiedemann 症候群の臨床像と遺伝子解析. BWS 親の会勉強会 2011. 4. 9. 鹿児島市
- 3) Soejima H. Clinical features and genome/epigenome analyses of Japanese patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. The 9th Korean PWS Symposium. 2011.9.27. Seoul, Korea
- 4) Tayama C, Trujillo AM, Lapunzina P, Ogata T, Soejima H, Hata K, Monk D, Nakabayashi K. Methylation screening of reciprocal genome-wide UPDs identifies novel human specific imprinted genes. 第 34 回日本分子生物学会年会 2011.12.13-16. 横浜
- 5) Higashimoto K, Miyazaki H, Yada Y, Komori T, Matsuda M, Koseki Y, Nakayama M, Soejima H, Handa H, Koseki H, Hirose S, Nishioka K. Role of Histone H3 Lys36 methylation by Ash1l triggers a regulatory cascade of the chromatin reprogramming that counteracts Polycomb silencing. 第 34 回日本分子生物学会年会 2011.12.13-16. 横浜
- 6) Soejima H, Nakabayashi K, Yatsuki H, Jozaki K, Hata K, Higashimoto K. Aberrant methylation of H19-DMR acquired after implantation was dissimilar in soma versus placenta of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. 第 34 回日本分子生物学会年会 2011.12.13-16. 横浜
- 7) 岡島 翠、大場 隆、片渕秀隆、東元健、副島英伸. 本邦における間葉性異形成胎盤の臨床像. 第 18 回遺伝性疾患に関する出生前診断研究会 2010.10.1. 佐賀
- 8) Soejima H, Nakabayashi K, Yatsuki H, Jozaki K, Hata K, Higashimoto K. Acquisition of aberrant hypermethylation after implantation induces discordant hypermethylation at H19-DMR between bodies and placentas in Beckwith-Wiedemann syndrome patients. Idibell Cancer Conferences on Imprinting and Beyond; "Mono-allelic expression in Health and Disease", 2011.9.21-23, Barcelona, Spain
- 9) Tayama C, Trujillo AM, Lapunzina P, Hata K, Monk D, Nakabayashi K. Methylation screening of reciprocal genome-wide UPDs identifies novel human-specific imprinted genes. Idibell Cancer Conferences on Imprinting and Beyond; "Mono-allelic expression in Health and Disease", 2011.9.21-23, Barcelona, Spain
- 10) 岡田純一郎、東元 健、八木ひとみ、芳野信、副島英伸、渡邊順子. *p57<sup>KIP2</sup>* (KIP2) の遺伝子変異を認めた Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) の一例. 第 34 回日本小児遺伝学会学術集会 2011.8.11. 横浜
- 11) 三好潤也、岡島 翠、松尾勇児、坂口勲、大場 隆、片渕秀隆、東元 健、副島英伸. Beckwith-Wiedemann 症候群に間葉性異形成胎盤を合併し、両者のインプリンティング異常に乖離を呈し

- た1例. 第19回日本胎盤学会学術集会.  
2011.9.30-10.1. 東京
- 12) 副島英伸、城崎幸介、八木ひとみ、前田寿幸、大塚泰史、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. 遺伝医学合同学術集会 2011. 2011.6.16-19. 京都
- 13) 三好潤也、坂口 勲、大場 隆、片渕秀隆、副島英伸、東元 健. Beckwith-Wiedemann 症候群に間葉性異

形成胎盤を合併し、両者のインプリンティング異常に乖離を呈した1例. 遺伝医学合同学術集会 2011. 2011.6.16-19. 京都

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：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 症候群父性ダイソミー症例の解析

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

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 大学院生

研究協力者：大塚 泰史

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 大学院生

#### 研究要旨

11 番染色体短腕の父性片親性ダイソミー（patUPD）により発症した Beckwith-Wiedemann 症候群（BWS）症例 24 例について、patUPD 細胞のモザイク率と patUPD の範囲について解析した。さらに、これらの因子と臨床症状との肝錬成について検討した。patUPD モザイク率は、14%–99%で（平均 60.8% ±25.2%）、17 例で 50%以上であった。patUPD 範囲は、75%で 11 番染色体短腕内にとどまっていたが、4 例で全染色体におよぶ Genome-Wide patUPD（GWU）を認めた。モザイク率と臨床症状の関連はなかったが、patUPD 範囲の拡大は妊娠期間短縮と過成長軽減と関連する傾向が見られた。また、patUPD 症例では、SNP アレイ解析で GWU の有無について検索する必要があると考えられた。

#### A. 研究目的

Beckwith-Wiedemann 症候群（BWS）の原因として、KvDMR1 低メチル化、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（patUPD）、*CDKN1C* 変異、11 番染色体短腕構造異常が知られている。このうち

patUPD は、約 1/4 の患者で認められ、KvDMR1 低メチル化症例について頻度が高い。また、patUPD 症例は、patUPD 細胞と正常細胞のモザイクであり、症例間でモザイク率や patUPD 範囲に多様性がみられる。そこで、patUPD の範囲とモザイク率を明らかにし、patUPD の多

様性と臨床症状との関連について検討することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. モザイク率の解析

BWS 症例と両親の末梢血から抽出したゲノム DNA を用いて、11p15 領域に存在するマイクロサテライトマーカー (*DIIS1997*, *DIIS2362*, *HUMTH01*, *DIIS1984*) を解析し、patUPD をスクリーニングした。父性アレルと母性アレルの PCR 産物のピーク値からモザイク率を算出した。モザイク率は以下の式にて算出した。モザイク率 (%) =  $(k-1) / (k+1) \times 100$  ( $k = (\text{父性アレルのピーク値}) / (\text{母性アレルのピーク値})$ )。PCR 増幅のバイアスを可能な限り除外するため、マイクロサテライトマーカーは 4 塩基リピートを用いた (*DIIS2362* のみ 3 塩基リピート)。

### 2. patUPD 範囲の解析

Affymetrix® Human SNP array 6.0 にて patUPD 範囲を解析した。各種解析ソフト (Affymetrix® Genotyping Console™ Software、Chromosome Analysis Suite (ChAS) Software1.2、Nexus copy number 6.0、CLC Main Workbench 6) を用いて、コピー数変化、allelic imbalance の検討により、UPD 領域を決定した。

### 3. 臨床症状との関連解析

parUPD 症例の臨床症状とモザイク率および patUPD 範囲との関連性について統計的に解析した。

## C. 研究結果

### 1. モザイク率の解析

BWS 症例 124 例をマイクロサテライトマーカーでスクリーニングしたところ、28 例 (22.6%) が patUPD であった。モザイク率は、最も低いもので 14%、もっとも高いもので 99% であった (平均  $60.8\% \pm 25.2\%$ )。17 例で 50% 以上であった。

### 2. patUPD 範囲の解析

24 例について Affymetrix® Human SNP array

6.0 にて patUPD 範囲を解析した。patUPD 範囲は、18 例 (75%) で 11 番染色体短腕内にとどまっていたが、2 例で長腕までおよんでいた。最小領域は 11p のテロメアから 2.7 Mb であり、これは *IGF2/HI9* ドメイン全体と *KIP2/LIT1* ドメインの KvDMR1 までを含み、*KCNQ1* 遺伝子の 3' 側の一部と *KIP2* 遺伝子は含まれていなかった。最長領域は 11 番染色体全体であった。興味深いことに 4 例 (17%) では全染色体におよぶ Genome-Wide patUPD (GWU) を認めた。

### 3. 臨床症状との関連解析

モザイク率と臨床症状の関連はなかった。しかし、patUPD 範囲の拡大により妊娠期間は短縮し、過成長が軽減する傾向が見られた。また、GWU 症例では 11 番染色体に局限した patUPD 症例に比べ腫瘍合併が有意に高かった ( $p=0.04$ )。

## D. 考察

patUPD 症例 28 例のうち最も低いモザイク率は 14% であったことから、15% 程度以上のモザイク率があると BWS が発症すると考えられる。臨床症状とモザイク率の関連性を検出できなかったと理由としては、組織によりモザイク率が異なるため末梢血の結果だけではデータが不十分であること、60% 以上の症例でモザイク率が 50% 以上であったことから、モザイク率の多様性が予想より低かったことが考えられる。patUPD の範囲については、最小範囲の結果から *KvDMR1* と *KIP2* の間に切断点がある場合でも、patUPD によって生じた非メチル化 *KvDMR1* の影響で母性アレルの *KIP2* (本来発現しているアレル) の発現が抑制されると考えられる。このことから、*KvDMR1* のメチル化が *KIP2* の発現 (インプリンティング) に重要であることがあらためて示された。また、興味深いことに patUPD 症例において、17% という比較的高い頻度で GWU を見出した。通常、雄核発生は胞状奇胎となるが、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、すべての刷り込み座位で父性パターンのみを示すため、11p以外の刷り込み遺伝子の異常が症状に反映されるはずだが、BWSの臨床症状が前面に出ていることから、11p15刷り込み領域が表現型に強く影響することが示唆される。また、BWSのpatUPDは、GWUも含め、アイトダイソミーであるため、父親が常染色体劣性遺伝病のキャリアである場合、その変異を受け継いで常染色体劣性遺伝病を発症する可能性がある。実際、1例では常染色体劣性遺伝のシスチン尿症を発症しているため、原因遺伝子 SLC3A1 と SLC7A9 の変異解析を行っているところである。GWUは11pに限局したpatUPDに比べると、その可能性が格段に高くなる。このため、patUPD症例では、SNPアレイ解析でGWUの有無について検索し、GWUの場合は、様々な染色体劣性遺伝病の症状の有無について詳細に臨床症状を観察すべきである。

## E. 結論

BWSのpatUPD症例について、モザイク率およびpatUPD範囲を明らかにし、臨床症状との関連性について検討した。モザイク率と臨床症状の関連はなかったが、patUPD範囲の拡大は妊娠期間短縮と過成長軽減と関連する傾向が見られた。また、patUPD症例では、SNPアレイ解析でGWUの有無について検索する必要がある。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

1. Kurotaki N, Tasaki S, Mishima H, Ono S, Imamura A, Kikuchi T, Nishida N, Tokunaga K, Yoshiura K, Hiroki Ozawa H. Identification of Novel Schizophrenia Loci by Homozygosity Mapping Using DNA

Microarray Analysis. *PLoS One* May 2011;6(5):e20589

2. Oikawa M, Nagayasu T, Yano H, Hayashi T, Abe K, Kinoshita A, Yoshiura KI. Intracystic Papillary Carcinoma of Breast Harbors Significant Genomic Alteration Compared with Intracystic Papilloma: Genome-wide Copy Number and LOH Analysis Using High-Density Single-Nucleotide Polymorphism Microarrays. *Breast J* 2011 Jul-Aug;17(4):427-430.
3. Hannibal MC, Buckingham KJ, Ng SB, Ming JE, Beck AE, McMillin MJ, Gildersleeve HI, Bigham AW, Tabor HK, Mefford HC, Cook J, Yoshiura K, Matsumoto T, Matsumoto N, Miyake N, Tonoki H, Naritomi K, Kaname T, Nagai T, Ohashi H, Kurosawa K, Hou JW, Ohta T, Liang D, Sudo A, Morris CA, Banka S, Black GC, Clayton-Smith J, Nickerson DA, Zackai EH, Shaikh TH, Donnai D, Niikawa N, Shendure J, Bamshad MJ. Spectrum of MLL2 (ALR) mutations in 110 cases of Kabuki syndrome. *Am J Med Genet A*. 2011 Jul;155A(7):1511-1516.

### 2) 学会発表

国内学会

第34回日本分子生物学会年会 2011年12月13日(火)～16日(金), パシフィコ横浜, 横浜.

2P-0182: The Ruby UCSC SPI: accessing the UCSC Genoe Database using Ruby. Hiroyuki Mishima, Jan Aerts, Koh-ichiro Yoshiura

第56回日本人類遺伝学会2011年11月9日(水)～12日(土), 幕張メッセ, 千葉

O-010: 免疫プロテアソームの形成以上と活性低下により自己炎症疾患中條-西村症候群が発症する。木下 晃, 三嶋博之, 有馬和彦, 金澤伸雄, 村田茂穂, 井田弘明, 吉浦孝一郎

O-070: SNPマイクロアレイを用いたホモザイ

ゴシティーマッピング. 三嶋博之, 黒滝直弘, 木下 晃, 金澤伸雄, 井田弘明, 吉浦孝一郎

O-103: 子宮体癌特異的microRNAの同定とその有用性に関する検討. 城 大空, 三浦清徳, 平木宏一, 東嶋 愛, 阿部修平, 長谷川ゆり, 三浦生子, 嶋田貴子, 山崎健太郎, 三嶋博之, 木下 晃, 吉浦孝一郎, 増崎英明

O-104: HPV-DNA型別による持続感染と子宮頸部細胞診の変化. 山崎健太郎, 三浦清徳, 池本理恵, 三浦生子, 嶋田貴子, 小寺宏平, 藤下 晃, 鮫島哲郎, 村上 誠, 木下 晃, 吉浦孝一郎, 増崎英明

O-113: SMOCは眼球・四肢発症に重要である. 浜之上はるか, 岡田一平, 寺田晃士, 當間隆也, Megarbane Andre, Cogulu Ozgur, 堀江恭二, 竹田潤二, 古市達哉, 池川志郎, 新川詔夫, 平原史樹, 要 匡, 吉浦孝一郎, 鶴崎美徳, 土井 宏, 三宅紀子, 古川貴久, 松本直通, 才津浩智

P-008: アレイ染色体検査で同定したJoubert症候群の一例. 松井 健, 齋藤和正, 近藤達郎, 木下 晃, 吉浦孝一郎, 原田直樹

P-023: ホモ接合マッピングによる統合失調症の感受性遺伝子の同定. 黒滝直弘, 田崎真也, 三嶋博之, 小野慎治, 今村 明, 菊池妙子, 西田奈央, 徳永勝士, 吉浦孝一郎, 小澤寛樹

P-070: OpitzC様症候群 (Bohring-Opitz症候群) におけるASXL1遺伝子変異. 要 匡, 柳 久美子, 福嶋義光, 水野誠司, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 成富研二

第18回出生前診断研究会2011年10月1日 (土), 佐賀大学医学部臨床大講堂, 佐賀

O-6: Lenz小眼球症候群を呈する一家系の原因遺伝子解析. 要 匡, 柳 久美子, 當間隆

也, 村松友佳子, 森田この美, 池松真也, 板垣裕輔, 水野誠司, 吉浦孝一郎, 成富研二

第7回広島大学・長崎大学連携研究事業カンファレンス -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- 2011年6月4日 (土), 場所: 広島大学霞キャンパス, 広島

2-4: microarray CGH 解析によるヒパクシャ乳癌におけるゲノム不安定性の同定. 及川将弘, 吉浦孝一郎, 近藤久義, 三浦史郎, 永安 武, 中島正洋

国際学会

12<sup>th</sup> International Congress of Human Genetics and The American Society of Human Genetics, 61<sup>st</sup> Annual Meeting, Montreal, Canada, October 11-15, 2011

556T: Identification of novel schizophrenia loci by homozygosity mapping using DNA microarray analysis. N. Kurotaki, H. Mishima, S. Ono, A. Imamura, S. Tasaki, T. Kikuchi, N. Nishida, K. Tokunaga, K. Yoshiura, H. Ozawa.  
1095T: Detection of a mutation in Lents microphthalmia family by exome sequencing. T. Kaname, K. Yanagi, Y. Muramatsu, T. Tohma, H. Hanafusa, K. Morita, S. Ikematsu, Y. Itagaki, S. Mizuno, K. Yoshiura, K. Naritomi.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



Beckwith-Wiedemann 症候群のゲノムワイドメチル化解析

分担研究者 秦健一郎

国立成育医療センター研究所 周産期病態研究部 部長

**研究要旨**

本研究計画では、Beckwith-Wiedemann 症候群を、エピゲノム異常の観点から網羅的に精査し、エピフェノタイプ（エピジェネティックな状態）と症状との関連を抽出し、今後の診断基準等に役立てる事を目的とする。解析は、研究者らが独自に確立したヒトインプリンティング遺伝子の制御領域を含む 32 箇所の DNA メチル化状態を網羅的に解析する系と、illumina 社 infinium アッセイによるゲノムワイドメチル化解析を行った。

Beckwith-Wiedemann 症候群の診断および解析に、我々が独自に確立した DMR の DNA メチル化スクリーニング系は有用であった。全ゲノム網羅的な DNA メチル化異常のスクリーニングを行ったところ、正常対照群と比較して顕著な DNA メチル化異常は存在しなかったが、病態との関連を示唆する様々な特徴が見出され、今後更なる検討による分子病態解明が期待される。

**A. 研究目的**

本研究計画では、研究代表者副島らの収集した Beckwith-Wiedemann 症候群（BWS）患者検体および病歴等の臨床情報を用い、これらの疾患をエピゲノム異常の観点から、従来必ずしも解析されていなかった領域も含めて網羅して精査し、エピフェノタイプ（エピジェネティックな状態）と症状との関連を抽出し、今後の診断基準等に役立てる事を目的とする。

**B. 研究方法**

本研究で解析対象とする症例は、ゲノムインプリンティングの破綻が疑われ、その直接の原因として、遺伝子変異あるいは DNA メチル化異常が疑われる。研究代表者らは、すでにヒトインプリンティング遺伝子の制御領域を含む 32 箇所の DNA メチル化状態を網羅的に解析する系を確立している。この解析系を用い、反復胎状奇胎絨毛組織の網羅的 DNA メチル化解析を行う。また、これらの独自に開発した解析系に加えて、BWS 発症のエピゲノム要因の更なる解明、ならびにエピゲノムの観点からの病態解明を目的

としたゲノムワイド DNA メチル化解析を実施する。およそ 15,000 遺伝子のプロモーター領域（およそ 27,000 個の CpG サイト）の DNA メチル化レベルを網羅的かつ定量的に測定できる方法であるイルミナ 27K HumanMethylation BeadChip アレイ法を用いる。

**C. 研究結果**

昨年度も報告したように、初年度に BWS 症例検体 57 例に対し、上記の Bio-COBRA 法を用い、ヒト DMR23 か所の網羅的解析を行った。その結果、末梢血ゲノム DNA を解析した 27 例のうち 20 例については既知 BWS 変異が同定されており（pUPD11 症例が 5 例、LIT-DMR 低メチル化症例が 10 例、H19-DMR 高メチル化症例が 2 例、KIP2 変異症例が 3 例）、今回実施した bio-COBRA 解析の結果は既知の分子診断結果と一致した。pUPD11 症例（5 例）において、H19-DMR 高メチル化と LIT1-DMR 低メチル化が検出され、他の DMR におけるメチル化異常はなかった。LIT-DMR 低メチル化症例（10 例）については、LIT1-DMR 低メチル化に加えて、

1例でMCTS2-DMR低メチル化、別の一例でMEG3-DMR高メチル化傾向が検出された。H19-DMR高メチル化症例(2例)については、H19-DMR高メチル化に加えてH19-DMRの制御下にあることが知られているIGF2遺伝子座のDMR(DMR0, DMR2)における高メチル化傾向も検出されたが、それら以外のDMRではメチル化異常は無かった。原因未同定の7症例のうちの1症例で、14番染色体上のIG-DMRおよびMEG3-DMRにおける顕著な高メチル化傾向(メチル化レベル>90%)が見られBWS診断規準およびpUPD14症候群診断規準(胸郭低形成(ベル型)、ロート胸など)の両方を満たしていることが判明した。

これらの解析結果をさらに詳細に展開するために、illumina社infiniumアッセイによるゲノムワイドメチル化解析により、プロモーター領域を中心とした27,000か所のDNAメチル化レベルを定量的に測定した。測定したのは、以下の3群である。

グループ1) 片親性ダイソミー4症例

グループ2) LIT1-DMR領域の低DNAメチル化を呈する6症例

グループ3) H19-DMRの高DNAメチル化を呈する2症例

上記の3群に対し、原因不明のBWS症例5例と、コントロール検体4例について、上述の27K HumanMethylation BeadChipアレイデータを取得した。解析には、各症例の末梢血由来ゲノムDNAを用いた。

それぞれのグループをコントロールと比較すると、各グループで、高DNAメチル化状態を示すCpG(プローブ)が400-500ヶ所程度同定された。また、低DNAメチル化状態を示すCpGは100-200ヶ所程度検出される。これら各グループで検出されるDNAメチル化異常を呈するプローブは、グループ間でおおよそ7割が共通している。

グループ2は、LIT1-DMRの低DNAメチル化を呈する症例であるが、その他の領域に特異的な低DNAメチル化異常は同定されない。その反対に、H19-DMRの高DNAメチル化異常を呈するグループ3では、特異的な高DNAメチル化プローブが100個以上検出される。

## D. 考察

初年度に報告したように、我々が独自に確立した複数DMRのDNAメチル化スクリーニングは、既存の手法と矛盾なく診断が可能であった。また、DNAメチル化スクリーニングを端緒として、定型的診断領域以外のDMRにDNAメチル化異常を認め、片親性ダイソミー等の異常を見出す事が稀ならずあった。既知の疾患関連領域に明確なDNAメチル化異常を認めない場合はもちろん、既知の関連領域にDNAメチル化異常を認める場合も、網羅的なDNAメチル化解析を行うことで、より正確な分子病態が把握できることが示された。診断の為に有用であると考えられた。

illumina社のinfiniumアッセイによる解析からこれまでのところ、様々な示唆に富む結果が得られつつある。グループ1は片親性ダイソミー、すなわち染色体異常であり、インプリンティングの破綻をきたすが、DNAメチル化状態は正常に保たれている。一方、グループ2と3は、実際にDNAメチル化異常を来している。正常コントロール群と比較してDNAメチル化状態に変化のあるプローブの7-8割が、グループ1, 2, 3で共通しているという結果からは、これらのプローブでは、病態から二次的にDNAメチル化異常が生じている可能性が最も疑われる。

グループ2は、LIT1-DMR低DNAメチル化異常を来す症例群であるが、その他の領域に特異的な低DNAメチル化異常を認めない事から、accidentalにDNAメチル化を失った、あるいは、未知の配列上の特徴によりDNAメチル化を失いやすい状態であった、等の可能性が推測される。

一方で、グループ3のH19-DMRに高DNAメチル化異常を呈する症例では、グループ3の症例群に共通する高DNAメチル化異常領域が存在する可能性が高く、DNAメチル化機構の異常に伴い、異所性・非生理的DNAメチル化が起きやすくなっている可能性が推測される。

## E. 結論

Beckwith-Wiedemann症候群の診断および解析に、我々が独自に確立したDMRのDNAメチル化スクリーニング系は有用であった。全ゲノム網羅的なDNAメチル化異常のスクリーニングを行ったところ、正常対照群と比較して顕著なDNAメチル化異常は存在しないが、病態解明の糸口

になると期待される DNA メチル化異常が散見される。今後もさらに症例数を増やすと共に厳密な統計的解析を進め、BWS 症例の分子病態の解明と、診断治療に資する研究展開を目指す。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし。

#### G. 研究発表

[原著論文 (欧文)]

1. Kobayashi H, Sakurai T, Takahashi N, Fukuda A, Obata Y, Sato S, Nakabayashi K, Hata K, Sotomaru Y, Suzuki Y, Kono T. Contribution of Intragenic DNA Methylation in Mouse Gametic DNA Methylomes to Establish Oocyte-Specific Heritable Marks. *PLoS Genet*, 8(1): e1002440, 2012
2. Nakanishi M, Hayakawa K, Nakabayashi K, Hata K, Shiota K, Tanaka S. Trophoblast-specific DNA methylation occurs after the segregation of trophectoderm and inner cell mass in mouse periimplantation embryo. *Epigenetics*, 7(2):173-182, 2012
3. Higashimoto K, Nakabayashi K, Yatsuki H, Yoshinaga H, Jozaki K, Okada J, Watanabe Y, Aoki A, Shiozaki A, Saito S, Koide K, Mukai T, Hata K, Soejima H. Acquisition of aberrant methylation after implantation induces discordant hypermethylation at H19-DMR in Beckwith-Wiedemann syndrome patients. *American Journal of Medical Genetics* (in press)
4. Kobayashi H, Sakurai T, Sato S, Nakabayashi K, Hata K, Kono T. A cis-linkage between large-range Gpr1-Zdbf2 intergenic transcription and imprinted DNA methylation at Gpr1 locus during early embryogenesis. *FEBS Letters* (in press)
5. Sato S, Yoshida W, Soejima H, Nakabayashi K, Hata K (2011) Methylation dynamics of IG-DMR and Gtl2-DMR during murine embryonic and placental development. *Genomics* May 18. [Epub ahead of print]
6. Nakabayashi K, Trujillo AM, Tayama C,

Camprubi C, Yoshida W, Lapunzina P, Sanchez A, Soejima H, Aburatani H, Nagae G, Ogata T, Hata K, Monk D (2011) Methylation screening of reciprocal genome-wide UPDs identifies novel human-specific imprinted genes. *Hum Mol Genet* Jun 4. [Epub ahead of print]

[特別講演・シンポジウム]

1. 招待講演 秦健一郎：ジェネティクスを越えてエピジェネティクスへ—周産期のエピジェネティクス— 遺伝医学合同学術集会 (第 35 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会、第 18 回日本遺伝子診療学会大会、第 17 回日本家族性腫瘍学会学術集会)、2011.6.18
2. 招待講演 秦健一郎：ヒト異常妊娠のエピジェネティクス 大阪大学蛋白質研究所セミナー 「疾患におけるエピゲノム異常の分子機構」大阪、2011.11.18

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表