

201128120B

---

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～23年度 総合研究報告書

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）	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	19
III. 研究成果の刊行物・別冊 -----	24

# 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）  
総合研究報告書

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。patUPD 症例の中には Genome-wide UPD 症例が含まれることがあるため、SNP アレイ解析などで GWU の有無について検索する必要がある。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 のメチル化異常および patUPD を示す症例の 3~4 割弱で他の刷り込み DMR のメチル化異常を認めた。また、illumina 社 Infinium アッセイによるゲノムワイドメチル化解析を行い、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を見出した。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。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。本研究期間内に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* の変異はシーケ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. 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 モザイクと判明した 24 例を Affymetrix 社 Human SNP array 6.0 を用いて解析した。さらに、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。

### 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 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。

### 5. 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。

### 6. KvDMR1 近傍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・27 PCR 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 法を利用する事のできないより微細な in/del の検出も試みた。

#### 7. ゲノムワイドメチル化解析

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 Bio-COBRA 法を用い、BWS 症例の網羅的 DNA メチル化解析を行った。また、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した。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% と比較的低位頻度であった。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% と高位頻度であった。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	162	102	63.0
低血糖	168	82	48.8
腹腔内臓器腫大	178	80	44.9
片側肥大	166	59	35.5
火焰状母斑	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		
肝血管内皮腫	6	15.8
血管腫	4	10.5
乳腺腫瘍	3	7.9
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. SNP array による UPD 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/H19* ドメイン全体と *CDKN1C/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。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 ( $p = 0.04$ )。

### 4. MALDI-TOF-MS を用いた刷り込み 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 以外の刷り込み 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 カ所で、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、ほぼすべての刷り込み DMR で父性パターン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 カ所 (1.60%) であった。

### 5. 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 カ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 カ所で低メチル化を示し、1 カ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 カ所で低メチル化を示し、1 カ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 カ所が高メチル化を示した。このうち 3 カ所は、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 カ所の刷り込み 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 iPSC4 クローン、H19DMR-GOM 症例から樹立



した iPSC4 クローンを解析した。健常者、患者に関わらず、iPS 化により 10 ヶ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 HH19DMR-GOM は変わらなかった。KvDMR1-LOM 患者由来の iPSC では、特定の 1 ヶ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。

6. KvDMR1 近傍欠失領域部分の塩基配列決定 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 homozygous 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。一方、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かっていない。

## 7. ゲノムワイドメチル化解析

BWS 症例検体 57 例に対し、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 (patUPD11 症例が 5 例、KvDMR1-LOM 症例が 10 例、H19DMR-GOM 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。patUPD11 症例 (5 例) において、H19-DMR 高メチル化と KvDMR1-LOM が検出され、他の DMR におけるメチル化異常はなかった。KvDMR1-LOM 症例 (10 例) については、KvDMR1-LOM 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。H19DMR-GOM 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 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 patUPD14 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) patUPD 4 症例

グループ 2) KvDMR1-LOM 6 症例

グループ 3) H19DMR-GOM 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、KvDMR1-LOM 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、H19DMR-GOM 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. SNP array による UPD 解析

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、雄核発生は胎状奇胎となるが、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、アイソ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。

### 3. 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。

### 4. iPSC の樹立とメチル化解析

マウス iPSC では、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。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。

### 5. KvDMR1 近傍欠失領域部分の塩基配列決定

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。

#### 6. ゲノムワイドメチル化解析

bio-COBRA による複数 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ると共に、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 メチル化解析はより正確な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、KvDMR1-LOM 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 H19DMR-GOM 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

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および patUPD 症例の3-4 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。

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。

メチル化異常をもつ患者1名に 11p の領域に欠失約 130 kb を見つけたため、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っておらず、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。

Bio-COBRA による DNA メチル化スクリーニング系は BWS の診断および解析に有用であった。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。

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、刷り込み機構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) 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. ジェニユワイン・D. ラインバーク共編, 堀越正美監訳. 培風館. 東京. Pp505-528, 2010
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Nagae G, Isagawa T, Shiraki N, Fujita T, Yamamoto S, Tsutsumi S, Nonaka A, Yoshiba 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.
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
  - 15) 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.
  - 16) 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.
  - 17) 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.
  - 18) 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.
  - 19) 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
  - 20) 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.
  - 21) 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.
  - 22) Yamazawa K, Nakabayashi K, Matsuoka K, Masubara K, Hata K, Horikawa R, Ogata T. Androgenetic/biparental mosaicism in a girl with Beckwith-Wiedemann syndrome-like and upd(14)pat-like phenotypes. *J Hum Genet.* 56(1):91-93, 2011
  - 23) Yamazawa K#, Nakabayashi K#, Kagami M, Sato T, Saitoh S, Horikawa R, Hizuka N, Ogata T. Parthenogenetic chimaerism/mosaicism with a Silver-Russell Syndrome-like phenotype. *J. Med. Genet.*

- 47(11):782-785, 2010 (#equal contribution)
- 24) 秦健一郎 (2010) 「胎児発育とゲノムインプリンティング」HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY 17, 43-48
- 25) 秦健一郎 (2010) 「産科とエピジェネティクス」産婦人科の実際 第9巻 第12号、2051-2057
- 26) Kobayashi H, Sakurai T, Takahashi N, Fukuda A, Obata Y, Sato S, Nakabayashi K, Hata K, Sotomaru Y, Suzuki Y, Kono T. Mouse gametic DNA methylomes show the role of intragenic DNA methylation in the establishment of oocyte-specific heritable marks. PLoS Genet, 8(1): e1002440, 2012
- 27) 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
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 Ash1l 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 (O-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, 秦健一郎, 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.
  - 17) 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
  - 18) 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
  - 19) 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
  - 20) 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
  - 21) 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
  - 22) 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
  - 23) 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
  - 24) 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
- 25) 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
- 26) 岡田純一郎、東元 健、八木ひとみ、芳野信、副島英伸、渡邊順子.  $p57^{KIP2}$  (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
- 27) 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
- 28) 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
- 29) 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
- 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.
- 30) 3P-0812: 日本人におけるヒト耳垢遺伝子 ABCC11 の  $\Delta 27$  アリルの新たな見解. 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
- 31) 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
- 32) 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
- 33) 4P-1141: ホールエクソンキャプチャーによる歌舞伎メーキャップ症候群の解析. 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)**
- 34) 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.
- 35) 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

- 36) 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
- 37) 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
- 38) OP11-056: 歌舞伎メーカーキャップ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
- 39) 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
- 40) 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
- 41) 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,
- 42) 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
- 43) 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
- 44) P-020: ウィ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
- 45) 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
- 46) 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
- 47) 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
- 48) 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

49) 2-1: アレイCGHを用いたヒバクサ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, 中島正洋

第48回日本婦人科腫瘍学会(つくば国際会議場、茨城) 2010年7月8-10日

50) 妊娠中の子宮頸部細胞診における日母分類、ベセスダシステムおよびHPVスクリーニングの比較. 三浦清徳、山崎健太郎、池本理恵、三浦生子、嶋田貴子、濱口大輔、小寺宏平、藤下晃、鮫島哲郎、村上誠、中山大介、吉浦孝一郎、増崎英明

第34回日本口蓋裂学会総会・学術集会 2010年5月27日(木)~28日(金), 北とぴあ, 東京

51) シンポジウムI テーマ: 口唇裂・口蓋裂の分子遺伝学研究-これまでの研究成果とこれからの原因追求-SI-基調講演: 比較的ありふれた病気(sub-common disease)としての口唇列・口蓋裂. 吉浦孝一郎

第106回 日本精神神経学会学術総会 2010年5月20日(木)~22日(土) 広島国際会議場, 広島

52) 2-F-18: 統合失調症および自閉症一卵性双生児不一致例におけるゲノム構造変化の検証. 小野慎治, 今村 明, 橋田あおい, 黒滝直弘, 田崎真也, 小澤 寛樹, 吉浦孝一郎

第110回日本外科学会総会 2010年4月8日(木)~10日(土), 名古屋国際会議場, 名古屋

53) PD-9-1: 乳腺乳頭状腫瘍の臨床病理学的特徴と細胞遺伝学的プロファイル. 及川将弘, 吉浦孝一郎, 矢野 洋, 安倍邦子, 林徳真吉, 永安 武

2010/10/10-14 20<sup>th</sup> ISUOG World Congress: (Prague, Czech Republic)

54) A case of mesenchymal diaplusia. Miura K, Yamasaki K, Miura S, Nakayama D, Yoshiura K, Nakayama M, Masuzaki H

The American Society of Human Genetics, 59<sup>th</sup> Annual Meeting, Washigton D.C., Baltimore, November 2-6, 2010

55) 1147/T: Frequency of 27-bp deletion mutation, another earwax determinant, in ABCC11 among the Japanese population.(1447) (5:00PM-6:00PM on Thu)

Author(s): A. Yamada, Y. Hori, Y. Ono, N. Matsuda, D. Starenki, N. Sosonkina, K. Yoshiura, T. Ohta, N. Niikawa

56) 2219/F: Re-sequencing analysis of candidate region for a neurodegenerative disorder by massively parallel sequencing. T. Kaname, A. Tsujino, K. Yanagi, K. Hayashi, M. Tsukahara, K. Fujimori, I. Kikuzato, M. Teruya, Y. Imada, M. Nezu, S. Yano, Y. Sato, Y. Miwa, T. Niikawa, K. Yoshiura, K. Naritomi

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.

57) 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

58) 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

59) 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

60) 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

61) 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

62) 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, 鶴崎美德, 土井 宏, 三宅紀子, 古川貴久, 松本直通, 才津浩智

63) 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

64) 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

65) 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**

66) 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-2011年6月4日(土), 場所: 広島大学霞キャンパス, 広島**

67) 2-4: microarray CGH 解析によるヒパクシヤ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

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

68) 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.

69) 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.

70) 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

71) 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

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