

201128122A

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23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 24 (2012) 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

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）
研究協力者	副島英伸	佐賀大学医学部分子生命科学講座（教授）
	緒方 勤	浜松医科大学医学部小児科（教授）
	仲井 邦彦	東北大学大学院医学系研究科発達環境医学分野（教授）
	樋浦 仁	東北大学大学院医学系研究科情報遺伝学分野（助教）
	岡江 寛明	東北大学大学院医学系研究科情報遺伝学分野（助教）
	宮内 尚子	東北大学大学院医学系研究科情報遺伝学分野（技術補佐員）
	佐藤 芙美	東北大学大学院医学系研究科情報遺伝学分野（技術補佐員）

II. 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-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）

研究要旨

ゲノムインプリンティング異常症 5 疾患：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）を対象とした全国多施設調査により、SRSとBWS は生殖補助医療（ART）との関連が強く示唆された。いずれの疾患でも、ART出生児においてDNAメチル化の異常を原因とする（エピ変異）の症例が多い傾向にあった。我々は全てのヒトインプリント領域を同定し、ARTにより発症したインプリント異常症の患者について、全領域のメチル化インプリントの分子機構について解析し、異常のパターン分析を行った。その結果、ART出生児では、（1）同一症例で、複数のインプリント領域の異常（2）同一症例で、精子型と卵子型DMRの両方に異常（3）同一症例で、高メチル化と低メチル化を示す（4）メチル化異常の程度は、モザイク型の特徴を示した。症例数が少ないため、正確な評価はできないが、これらの結果から、ARTにより発症したインプリント異常症（SRSとBWS）の場合は、受精以降のメチル化の維持に原因が多いと推測される。つまり、受精以降のプロセス（受精卵培養、凍結胚操作など）で、異常が起こり、疾患発症を導いた可能性が推察される。ARTにより発症したインプリント異常症と自然に発症した場合と比較し、その臨床症状に決定的な差はみられなかった。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改めて認識した。

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
座婦人学・教授 八重樫 伸生

研究協力者：

佐賀大学医学部分子生命科学講座・教授 副島
英伸

浜松医科大学医学部小児科・教授 緒方 勤

東北大学大学院医学系研究科発達環境医学分
野・教授 仲井 邦彦

東北大学大学院医学系研究科情報遺伝学分野・
助教 樋浦 仁

東北大学大学院医学系研究科情報遺伝学分野・
助教 岡江 寛明、宮内 尚子、佐藤 芙美

A. 研究目的

インプリント病（TNDM、BWS、AS、PWS、SRS）は、いずれも数万人に1人で非常に稀な疾患である。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。早期の適切な対応により、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。

注目すべきは、ARTの普及率向上により、インプリント異常症の報告が世界中で増加している点である。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进行操作する事が原因であると推察されている。申請者

は、当該5疾患の全国規模の実態調査（3158施設）を行い、これら疾患が増加傾向にあり、ARTと関連する事を明らかにした。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課題の一つである。

最終年度は、1) 収集した患者情報と患者検体を用い、遺伝子型と臨床型の関連を明らかにする。特に、DNAメチル化に着目し、異常の頻度、程度、影響を受けやすい遺伝子領域を同定する。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。

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

初年度に引き続き、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なった。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。今回は、さらに偽性副甲状腺機能低下症タイプIb、クロム親和性パラガングリオーマ、網膜芽細胞腫の3疾患も加えて調査を行った。

(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し、プライバシー保護に万全の配慮を施した。

【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。キットを説明書と伴に送付した。

(2) 責任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、責任インプリント遺伝子領域のメチル化解析を行った。これには、DNA多型を含めたBisulphite PCR Sequence法を用い、正確に評価した。また、結果については、医療機関の主治医に郵送で報告した。

(3) インプリント22領域の網羅的解析：

マウスで報告されている全てのインプリント領域情報をもとに、ヒトインプリント領域の検索を行い、22領域を同定し、PCRプライマーを設計した。この際、DNA多型を含むようにし、条件検討を行った。(2)でメチル化異常（エピ変異）を示した症例のうち、ARTと非ARTの症例について、その発症機序をメチル化異常のパターンを比較する事を目的に、22領域（父由来アレルのメチル化領域：精子型DMR3、母由来アレルのメチル化領域：卵子型DMR19）のメチル化インプリント状態について解析した。また、それぞれの症例毎に、臨床症状について比較した。結果を基に、リスク要因についても検討した。

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

今回の調査は、「先天性ゲノムインプリント異常症8疾患と生殖補助医療の影響に関する研究」と併せて行った。該当疾患の推定患者数などの詳細は、別に報告する。

【2】疾患患者のメチル化インプリントの解析

(1) サンプル収集：

メチル化インプリントの異常（エピ変異）症例に着目した。これまでの報告では、ARTと関連するインプリント異常症の発症原因が圧倒的にエピ変異の頻度が高いからである。また、これまでに収集したサンプル、副島教授（佐賀医大）、緒方教授（浜松医大）も合わせ、ARTを受けた疾患患者（SRS:5名、BWS:1名）、自然発症の患者（SRS:10名、BWS:6名）について解析した。

(2) 疾患患者のインプリント遺伝子の

DNAメチル化の解析とARTとの関連：

22領域のメチル化インプリントの解析を、DNA多型を含むBisulphite PCR Sequence法を用いて、正確に行い、メチル化異常のパターンについて分析し、発症機序を推測した。また、インプリントを受けない領域に関して、2領域についても同様の解析を行った。

SRSの場合、ART治療を受けた患者では、6例中5例において、複数のインプリント領域で異常を認めた。これらの症例は全例、精子型と卵子型DMRの両方に異常を認めた。また、同一症例で、高メチル化と低メチル化を示し、またその程度は、完全型ではなく、モザイク型を示す事が特徴にみられた。

BWSは1例しかART後の症例は解析出来なかったが、SRSの場合と同様の傾向が見られた（表1）。

一方、非ART群においては、SRSでは10例中3例、BWSでは6例中わずか1例に複数領域にメチル化異常を示すことが判明した。

(3) 臨床症状の比較：

メチル化解析を行った症例について、ART群と非ART群で臨床症状について比較した。その結果は、特徴的に差はみられなかったが、解析を行っていない症例を併せて分析した場合、ART症例では疾患毎にいくつかの臨床症状に特徴が認められた（表2）。

D. 考察

これまでの全国多施設共同コホート調査やDNAメチル化の解析により、ARTとの関連が示されたインプリント異常症は、SRSとBWSで、いずれもDNAメチル化の異常を原因とする（エピ変異）の症例が多く、ART出生児においてもエピ変異の症例が多い傾向にあった。本年度は、この異常がART出生児の場合、どのような分子機構を原因として起こっているのか、つまり発症時期を特定し、そのリスク要因を同定する事を試みた。

(1) ARTにより発症したインプリント異常症の分子機構の解明：

特徴としては、(1)責任領域以外の複数のインプリント領域で異常を認めた(2)同一症例で、精子型と卵子型DMRの両方に異常を認めた(3)同一症例で、高メチル化と低メチル化を示す症例が多い(4)メチル化異常の程度は、完全型ではなく、モザイク型を示す。症例数が少ないため、正確な評価はできないが、これらの結果から、ARTにより発症したインプリント異常症の場合は、受精以降のメチル化の維持に原因があると推測される。また、非インプリント遺伝子では、全く影響を受けていない。このことから、ゲノム全体では影響を受けず、インプリント遺伝子特有の現象で、インプリント遺伝子領域は影響を受けやすい事が示唆された。

(2) ARTにより発症したインプリント異常症の臨床症状：

ART群と非ART群で、臨床症状に決定的な

有意差はみられなかった。しかし、複数のインプリント領域でメチル化異常がみられることから、臨床症状は多彩になる事が予想される。また、最近 ART 出生児で SRS や BWS に類似する疾患の報告、全く新しい症候群の報告がみられる。これら疾患では、これまで解析されていないが、我々が同定した 2 領域について解析する必要があると考える。

(3) リスク要因について

ART 出生児のインプリント異常について、まだ結論が出ていない。しかし、これまでの結果から不妊症患者の配偶子（卵子、精子）が影響する以上に、受精以降のプロセス（受精卵培養、凍結胚操作など）に注意を払わなければならないと考えられる。また、患者自身にエピゲノムの維持に不安定さをもつ可能性も考えられる。いずれにしても、今後継続してモニタリングを行う必要があると考える。

(4) 新規メチル化診断法の開発

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) の開発を行った。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ズ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。

E. 結論

全国多施設共同調査により、ART との関連が示されたインプリント異常症は、SRS と BWS である事が判明した。いずれも DNA メ

チル化の異常を原因とする (エピ変異) の症例が多く、ART 出生児においてもエピ変異の症例に多い傾向にあった。ART により発症したインプリント異常症の分子機構について異常のパターン分析を行った。その結果、(1) 複数のインプリント領域の異常 (2) 同一症例で、精子型と卵子型 DMR の両方に異常 (3) 同一症例で、高メチル化と低メチル化を示す (4) メチル化異常の程度は、モザイク型の特徴を示した。症例数が少ないため、正確な評価はできないが、これらの結果から、ART により発症したインプリント異常症の場合は、受精以降のメチル化の維持に原因があると推測される。つまり、受精以降のプロセス (受精卵培養、凍結胚操作など) に注意を払わなければならないと考えられる。しかし、臨床症状に決定的な有意差はみられなかった。今後は、ART 操作毎に安全性について、モニタリングを続けなければならない。同時に、臨床現場で測定可能となる診断装置の開発が早急に必要であると考えられる。

F. 健康危険情報

現時点では、危険情報に関して正確な評価はできていない。

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Watanabe T, Tomizawa S, Mitsuya K, Totoki Y, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Iida N, Hoki Y, Murphy P.J, Toyoda A, Gotoh K, Hiura H, **Arima T**, Fujiyama A, Sado T, Shibata T, Nakano T, Lin H, Ichianagi K, Soloway P.D. & Sasaki H. Role for piRNAs and non-coding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse Rasgrfl locus. *Science*. 332: 848-852.2011.
2. Sato A, Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Abe Y, Utsunomiya T, Yaegashi N, **Arima T**. Assessing loss of imprint methylation in

- sperm from subfertile men using novel methylation PCR-Luminex analysis. **Fertility and Sterility**. 95: 129-34 2011.
3. Maeda T, Oyama J, Higuchi Y, Nishiyama Y, Kudo Y, Yamori Y, Nakazono T, **Arima T**, Mimori K, Makino N. The physical ability of Japanese female elderly with cerebrovascular disease correlates to the telomere length and subtelomeric methylation status in their peripheral blood leukocytes. **Gerontology**. 57:137-43. 2011.
 4. Maeda T, Oyama J, Sasaki M, **Arima T**, Makino N. The correlation between the clinical laboratory data and the telomere length in peripheral blood leukocytes of Japanese female patients with hypertension. **The Journal of Nutrition, Health and Aging (JNHA)**. 15:240-4. 2011.
 5. Maeda T, Oyama J, Sasaki M, Nishiyama Y, Kudo Y, Yamori T, Nakazono T, **Arima T**, Makino N. The physical ability of elderly female Japanese patients with cerebrovascular disease correlates with the telomere length in their peripheral blood leukocytes. **Aging Clinical and Experimental Research**. 57: 137-43 2011.
 6. Okae H, Hiura H, Nishida Y, Funayama R, Tanaka S, Chiba H, Yaegashi N, Nakayama K, Sasaki H, **Arima T**. Re-investigation and RNA sequencing-based identification of genes with placenta-specific imprinted expression. **Human Molecular Genetics** 10: 1-11 2012.
 7. **Arima T**, Okae H, Hiura H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Hayashi C. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in male and female germ cells of infertile couples. **INTECH** 9: 183-192 2012.
 8. Sakurai M, Ohtake J, Ishikawa T, Tanemura K, Hoshino Y, **Arima T**, Sato E. Distribution and Y397 phosphorylation of focal adhesion kinase on follicular development in the mouse ovary. **Cell and Tissue Research** 347: 457-465 2012.
 9. Hiura H, Okae H, Kobayashi H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Suzuki F, Nagase S, Junichi Sugawara J, Nakai K, Yaegashi N, **Arima T**. High-throughput detection of imprint methylation errors in the ovarian cancer by the bisulphite PCR-Luminex method. **BMC Medical Genomics** 5: 8-17 2012.
 10. Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Van De Pette M, John R M, Kagami M, Nakai K, Soejima H, Ogata T, **Arima T**. Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproductive technologies. **Human Reproduction** (under revision)
 11. 有馬隆博, 樋浦仁, 岡江寛明, 佐藤晶子, 宮内尚子, 阿部千鶴, 林千賀. 「ARTにおけるエピジェネティクス異常」産婦人科の実際. 金原出版株式会社, 741-750, 2011
 12. 有馬隆博, 樋浦仁, 岡江寛明, 佐藤晶子, 宮内尚子. 「ヒト卵子・精子・胚のエピジェネティクス」卵子学. 京都大学学術出版会, 122-131, 2011
 13. 有馬隆博, 樋浦仁, 岡江寛明, 佐藤晶子, 宮内尚子. 「母子の健康と環境影響」助産雑誌. 医学書院, 62, 11, 2011
 14. 有馬隆博, 樋浦仁, 岡江寛明, 宮内尚子, 佐藤美美. 「ゲノムインプリンティングと発がん」癌と化学療法. 癌と化学療法社, 1745-1749, 2011
 15. 有馬隆博. 「トピックス」日本生殖内分泌学会雑誌 **Japanese Journal of Reproductive Endocrinology** NO.17 2012 印刷中

2) 学会発表

1. 第 28 回日本医学会総会 「生殖補助医療とインプリンティング異常」有馬隆博
2011.4.8 東京
2. 熊本大学セミナー「インプリント遺伝子の分子間相互機構の解明」有馬隆博
2012.2.10 熊本
3. 卵巣に関する国際カンファレンス
2012 「ART and Epigenetic Errors - Abnormal DNA methylation in imprinting disorders after ART 」有馬隆博
2012.3.17 東京
4. 日本生殖再生医学会・第7回学術集会
「ART におけるエピジェネティック機構」
有馬隆博 2012.3.25 東京

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

PCT 準備中 「ヒト精子の質的機能評価システムに応用する DNA メチル化解析技術」
有馬隆博

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

SRS				
Case	ART	Abnormal methylation		
S-Case1	IVF-ET	H19 partial-LOM (15.6%)		
S-Case2	IVF-ET	PEG1 GOM (99.6%)	PEG10 GOM (67.8%)	GRB10 GOM (97.1%) ZNF597 LOM (0.0%)
S-Case3	IVF-ET	H19 partial-LOM (33.7%)		
S-Case4	IVF-ET	H19 LOM (0.3%)	GRB10 GOM (95.9%)	
S-Case5	IVF-ET	H19 normal (55.6%)	INPP5F GOM (97.3%)	
S-Case6	-	H19 LOM (2.1%)	PEG1 partial-GOM (82.7%)	
S-Case7	-	H19 LOM (3.5%)	ZNF597 partial-GOM (75.7%)	ZNF331 partial-LOM (18.8%)
S-Case8	-	H19 partial-LOM (20.3%)		
S-Case9	-	H19 partial-LOM (25.3%)		
S-Case10	-	H19 LOM (0.4%)	PEG1 GOM (92.0%)	
S-Case11	-	H19 partial-LOM (16.3%)	PEG1 GOM (95.2%)	
S-Case12	-	H19 LOM (6.0%)		
S-Case13	-	H19 normal (34.1%)	FAM50B LOM (0.4%)	
S-Case14	-	H19 partial-LOM (12.5%)		
S-Case15	-	H19 partial-LOM (13.3%)		
BWS				
B-Case1	ICSI	LIT1 LOM (0.0%)	ZDBF2 GOM (93.3%)	PEG1 GOM (97.8%) NESPAS partial-LOM (11.3%)
B-Case2	-	LIT1 LOM (0.0%)		
B-Case3	-	LIT1 LOM (0.0%)		
B-Case4	-	LIT1 LOM (0.7%)		
B-Case5	-	LIT1 LOM (0.0%)		
B-Case6	-	LIT1 LOM (1.3%)	ZDBF2 GOM (95.2%)	ZNF331 partial-LOM (16.8%)
B-Case7	-	LIT1 LOM (0.0%)		

表1 インプリント異常症の全インプリント領域のメチル化異常のまとめ

BWS

	耳介の溝		眼間開離		巨舌症		ギョ口眼		咬合障害		臍ヘルニア		半身肥大症		停留辜丸	
全体	48/89	53.9	19/89	21.3	81/89	91	24/89	27.0	7/89	7.9	67/89	75.3	22/89	24.7	12/89	13.5
非ART	44/89	49.4	18/89	20.2	74/89	83.1	21/89	23.6	7/89	7.9	61/89	68.5	20/89	22.5	11/89	12.4
ART	4/7	57.1	1/7	14.3	7/7	100	3/7	42.9	0/7	0.0	6/7	85.7	2/7	28.6	1/7	14.3
	腎腫大		肝腫大													
全体	20/89	22.5	8/89	9.0												
非ART	18/89	20.2	7/89	7.9												
ART	2/7	28.6	1/7	14.3												

AS

	精神発達遅滞		難治性てんかん		色白		不眠症		小頭症		発語障害		下顎突出		操り人形様の歩行	
全体	133/146	91	69/146	47.2	101/146	69.1	65/146	44.5	54/146	36.9	129/146	88.3	91/146	62.3	71/146	48.6
非ART	133/146	91	68/146	46.5	101/146	69.1	64/146	43.8	53/146	36.3	127/146	86.9	89/146	60.9	69/146	47.2
ART	0/2	0	1/2	50.0	0/2	0	1/2	50.0	1/2	50.0	2/2	100.0	2/2	100.0	2/2	100.0

PWS

	筋緊張低下		過食症		色白		精神発達遅滞		低身長		性器低形成		哺乳不良		
全体	259/297	87.2	155/297	52.1	215/297	72.3	249/297	84.0	186/297	62.6	125/297	42	236/297	79.4	
非ART	256/297	86.1	153/297	51.5	211/297	71.0	245/297	82.0	183/297	61.6	124/297	41.7	232/297	78.1	
ART	3/7	42.9	2/7	28.6	4/7	57.1	4/7	57.1	3/7	42.9	1/7	14.3	4/7	57.1	
	停留辜丸		小さな手足		特異な顔貌		魚様の三角の口								
全体	100/297	33.6	207/297	69.6	238/297	80.1	192/297	64.4							
非ART	99/297	33.3	204/297	68.6	234/297	78.7	188/297	63.2							
ART	1/7	14.3	3/7	42.9	4/7	57.1	4/7	57.1							

SRS

	身体非対称		成長障害		発汗		低身長		精神発達遅滞		指の奇形		相対的大頭を伴う逆三角形の特異的顔貌	
全体	37/54	68.5	53/54	98.1	11/54	20.3	54/54	100	17/54	31.4	29/54	53.7	54/54	100
非ART	30/54	55.5	49/54	90.7	10/54	18.5	50/54	92.5	17/54	31.4	26/54	48.1	51/54	94.4
ART	7/7	100	4/7	57.1	1/7	14.3	4/7	57.1	0/7	0.0	3/7	42.9	4/7	57.1

表2 ART と非ART 出生児の臨床症状の相違点

