

201128122B

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

平成22年度～23年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表	
	45
IV. 参考資料	
	47

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公衆衛生学（教授）
	加藤 聖子	順天堂大学医学部産婦人科（准教授）
	秦 健一郎	国立成育医療センター周産期病態研究部（部長）

Ⅱ. 総合研究報告書

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

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
国立成育医療センター周産期病態研究部・部長 秦 健一郎
順天堂大学医学部産婦人科講座・准教授 加藤 聖子
東北大学大学院医学系研究科公衆衛生分野・教授 栗山 進一

研究要旨

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、根本的な治療法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）。推定人数はBWSが444人、ASが949人、PWSが2070人、SRSが326人、TNDMが67人と考えられた。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を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。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、異常が起これ、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。

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～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。

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

本調査は、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・診療科および抽出率：

全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 2007 - 2008 年版」を、大学病院は「医療機関名簿 2007 - 2008」を使用した。診療科・層ごとの対象科数・調査科数・抽出率を表 1 に示した。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」）については別の層とし、全数調査を行った。

2) 調査法：

調査法は郵送法で行った。2009年8月に依頼状・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（2009年9月10日）までに返送のなかった診療科には2009年9月末日に再度依頼を行った。第1次調査で「患者なし」と報告された診療科には礼状を送付し、「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) 解析：

データの解析にあたり、(1)「該当科なし」の回答分削除、(2) 発送時の宛名と第1次調査報告時の診療科名が異なる場合、訂正後の診療科名を適用、(3) 第2次調査回答時などに患者数訂正の連絡があった場合には、訂正後のデータを使用、3つの処理を行った。

【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。

4) 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。

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

1) 第1次調査結果：

表1に第1次調査の結果を示す。調査対象科3158科のうち、1602科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。

2) 第2次調査結果：

第1次調査報告患者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。また、今回の第2次調査（表2）では、患者氏名の記入を求めているため、重複率の算出は行えなかった。

図1と図2に各疾患の疾患別の男女比ピーク、平均値を示した。AS以外の4疾患で、近年増加傾向にあることが示唆されている。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。

表3に発症年齢別症例数を示す。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。表4に家族歴と近親婚の有無を示す。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、ほとんどが孤発例だった。ASにおいてのみ1.6%の症例に近親婚が認められた。

表5に不妊治療を受けたかどうか、また受けた場合はその内容について示す。不妊治療を受けた親は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が判明した。

表6に妊娠中の異常の有無とその内容を示す。妊娠中に異常を認めた割合は25~47%であるが、異常を認めなかった割合も26~42%で、出生後にしか疾患を疑われないことが多いことが判明した。

表7に分娩時の異常の有無とその内容を示す。分娩時に異常を認めなかった割合は12~33%であった。

表8に各疾患の臨床症状を示す。

A.BWS:

(1) 出生平均体重3338gで、体重の増加がみられた。また、胎盤重量も平均948.2gで腫大がみられた。(2) 頭蓋顔面の異常：巨舌症は最も多く(94.3%)以下耳介の溝(50.0%)ギョロ眼

(25.7%)であった。(3) 胸・腹部・四肢の異常：臍帯ヘルニア(44.1%)臍ヘルニア(32.9%)半身肥大(25.7%)腎腫大(22.9%)であった。半身肥大の頻度が高いことが、特徴的であった。

B.AS:

(1) 全身・精神所見では、精神発達遅延は必発で、難治性てんかんや色白の頻度も特徴的である。(2) 発語障害もほぼ必発で、下顎突出、操り人情様歩行、笑い発作は半数以上に認められた。(3) 合併症の中では、胃腸障害(7.3%)が多いが、予想していた程多くはなかった。

C.PWS:

(1) 全身・精神所見では、筋緊張低下、精神発達遅延はほぼ必発で、色白、低身長、過食も半数以上で認められた。(2) 局所症状では、乳幼児の哺乳不良、小さな手足、アーモンド様眼瞼が7割以上認められた。(3) 合併症では、圧倒的に肥満がみられ、糖尿病も17.6%に認められた。

D.SRS:

(1) 全身・精神所見では、低身長はほぼ必発で、身体非対称、成長障害もかなりの頻度でみられた。精神発達遅延が比較的少ない点も特徴である。(2) 局所症状では、相対的大頭を伴う逆三角形の顔貌は、ほぼ必発で指趾の奇形の頻度も高かった。(3) 合併症では、低血糖や心奇形がみられたが、頻度はさほど高くなかった。

E.TNDM:

(1) 全身・精神所見では、生直後の高血糖が多く、精神発達遅延や発熱もみられたが、脱水、嘔吐の症状は見られなかった。(2) 局所症状では、巨舌症がみられ、BWSとの鑑別が必要である。(3) 合併症では、胃腸障害がみられた。

表9に小児癌との関連を示す。BWSは8例(11.4%)に小児癌が認められ、PWS、SRSにも1例認められた。

表10に各疾患の診断方法を示す。各疾患の診断に臨床症状に加え、染色体およびDNA検査全てを行っている割合は3.8%~4.7%で、PWSとSRSにしか認められなかった。染色体およびDNA検査を行っていない割合は6~80%で、特にBWSでは高率であった。また、遺伝子診断

の希望者は医師側で37%~70%、家族側は12%~50%にみられた。(表2)

表11にこれまでに受けた治療と最近1年間の受療状況を示す。「主に通院」が過半数を占めていた。死亡例はBWSに2例みられた。

表12に現在の日常生活関連動作と介助指導を示す。

【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13)。

一方、非ART群においては、SRSでは10例中3例、BWSでは6例中わずかに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14)。

D. 考察

(1) ART治療との関連:インプリント遺伝子のDNAメチル化は、エピジェネティックな修飾として変化を受けやすい特徴があり、先天性疾患に限らず、小児期の性格、行動異常や癌、生活習慣病などの成人性疾患の原因にもなる事で、注目を集めている。配偶子操作を行うARTは不妊症患者に多大な恩恵をもたらすが、インプリントが獲得・維持される時期の配偶子を操作するため、その影響について懸念されている。BWSやAS等の先天性疾患の発症頻度が増加しているとの報告が数多くみられるが、今回の解析した症例数はこれまでの報告例では最も多く、PWSの報告は世界ではじめてである。これら疾患が増加傾向に有り、ART治療と関連する事が示唆される。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喫緊の課題である。

新規メチル化解析システムの開発:我々は独自にゲノムインプリンティングを標的としたDNAメチル化解析システムとして、インプリンティング異常の実態を正確に評価するPCR-Luminex法を用いた新規メチル化解析システムを開発している。東北大学より特許出願(特願:代表者)。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レミネックス法を用いた技術でこれまでに、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 のまま置換しない事を応用した方法である。臨床の現場に応用するためには、簡便・迅速・信頼性のある安価な診断システムの構築の必然性が要求され、本法は有効である。

(2) 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。

(3) 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事から、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。

(4) 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。

(5) 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。

(6) 今後の展望について

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。

(7) 研究内容の効率性について：

アンケートの回収：倫理委員会の申請を2回に分けて行なった。効率よく手順を踏んでほぼ計画通りに進んだ。

遺伝子解析：遺伝子診断が行われていない症例がおおよそ半数で、担当医・家族は正確な診断や予後に関する情報を希望（254/454）している。最近の調査でも希望が多い。遺伝子解析には、既に実績があり、解析には長期間はかからない。

他の研究班との交流：一部情報交換は行なえたが、さらにインプリント異常疾患に限らず、

特に ART 治療との関連について広く情報交換ができれば、さらに深い研究成果が挙げられると予想される。

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. 研究発表

1) 論文発表

1. Hiura H, Sugawara A, Ogawa H, John RM, Miyauchi N, Miyanari Y, Horiike T, Li Y, 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. Maeda T, Oyama J, Higuchi Y, Arima T, Mimori K, Makino N. The correlation between the telomeric parameters and the clinical laboratory data in the patients with brain infarct and metabolic disorders. *The Journal of Nutrition, Health and Aging (JNHA)*. 14: 793-7 2010.
3. Wood MD, Hiura H, Tunster SJ, Arima T, Shin J-Y, Higgins MJ and John RM. Silencing of the imprinted *Cdkn1c* gene in stem cells. *Epigenetics*. 22: 214-221 2010.
4. Watanabe T, Tomizawa S, Mitsuya K, Totoki Y, Yamamoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Iida N, Hoki Y, Murphy PJ, Toyoda A, Gotoh K, Hiura H, Arima T, Fujiyama A, Sado T, Shibata T, Nakano T, Lin H, Ichiyangi K, Soloway P.D. & Sasaki H. Role for piRNAs and non-coding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse *Rasgr1* locus. *Science*. 332: 848-852.2011.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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: 7-12 2012
13. 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)
14. 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におけるエピジェティクス異常」産婦人科の実際 金原出版株式会社, 741-750, 2011
15. 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・胚のエピジェティクス」卵子学京都大学学術出版会, 122-131, 2011
16. 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

17. 有馬隆博, 樋浦仁, 岡江寛明, 宮内尚子, 佐藤 芙美 「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
18. 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」有馬隆博 2010.5.28 米子市
2. 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」有馬隆博 2010.6.7 宮城県松島
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ネティクス」有馬隆博 2010.9.4 仙台市
4. 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
5. 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
6. 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
7. 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

国際招待講演

1. Asia Pacific Initiative on Reproduction (ASPIRE 2010) 「Epigenetics in reproduction」 Arima T. 2010.4.9

Pattaya, Thailand.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
『ZDBF2のメチル化領域とその検出方法』(特願2010-116634) 有馬隆博 2010.5.20
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

参考文献

- 1) Michael R. DeBaun, Emily L. Niemitz and Andrew P. Feinberg. Association of In Vitro Fertilization with Beckwith-Wiedemann Syndrome and Epigenetic Alterations of LIT1 and H19. *Am. J. Hum. Genet.* 2003, 72: 156–160.
- 2) E R Maher, L A Brueton, S C Bowdin, A Luharia, W Cooper, T R Cole, F Macdonald, J R Sampson, C L Barratt, W Reik and M M Hawkins. Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART). *J. Med. Genet.* 2003, 40: 62-64, 304.
- 3) Christine Gicquel, Véronique Gaston, Jacqueline Mandelbaum, Jean-Pierre Siffroi, Antoine Flahault, and Yves Le Bouc. In Vitro Fertilization May Increase the Risk of Beckwith-Wiedemann Syndrome Related to the Abnormal Imprinting of the KCNQ1OT Gene. *Am. J. Hum. Genet.* 2003, 72:1338–1341.
- 4) S Rossignol, V Steunou, C Chalas, A Kerjean, M Rigolet, E Viegas-Pequignot, P Jouannet, Y Le Bouc, C Gicquel. The epigenetic imprinting defect of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome born after assisted reproductive technology is not restricted to the 11p15 region. *J Med Genet* 2006, 43: 902–907.
- 5) Sarah Bowdin, Cathy Allen, Gail Kirby, Louise Brueton, Masoud Afnan, Christopher Barratt, Jackson Kirkman-Brown, Robert Harrison, Eamonn R. Maher and William Reardon. A survey of assisted reproductive technology births and imprinting disorders. *Hum Reprod.* 2007 Dec, 22 (12) : 3237-3340.
- 6) Gerald F. Cox, Joachim Bürger, Va Lip, Ulrike A. Mau, Karl Sperling, Bai-Lin Wu, and Bernhard Horsthemke. Intracytoplasmic Sperm Injection May Increase the Risk of Imprinting Defects. *Am. J. Hum. Genet.* 2002, 71: 162-164.
- 7) Ørstavik KH, Eiklid K, van der Hagen CB, Spetalen S, Kierulf K, Skjeldal O, Buiting K. Another Case of Imprinting Defect in a Girl with Angelman Syndrome Who Was Conceived by Intracytoplasmic Sperm Injection. *Am. J. Hum. Genet.* 2003, 72: 218–219.
- 8) M Ludwig, A Katalinic, S Groß, A Sutcliffe, R Varon, and B Horsthemke. Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples. *J Med Genet* 2005, 42: 289-291.
- 9) Masayo Kagami, Toshiro Nagai, Maki Fukami, Kazuki Yamazawa and Tsutomu Ogata. Silver-Russell syndrome in a girl born after in vitro fertilization:partial hypermethylation at the differentially methylatedregion of PEG1/MEST. *J Assist Reprod Genet*, 2007, 24: 131-136.
- 10) Annette C Moll, Saskia M Imhof, Johannes R M Cruysberg, Antoinette Y N Schouten-van Meeteren, Maarten Boers and Flora E van Leeuwen. Incidence of retinoblastoma in children born after in-vitro fertilization. *Lancet* 2003, 361: 309-310.
- 11) Michael Goldman, Cheryl Shuman, Rosannaweksberg, and Norman D. Rosenblum. Hypercalciuria in Beckwith-Wiedemann Syndrome. *J Pediatr* 2003, 142: 206-208.
- 12) Kette D. Valente, Célia P. Koiffmann, Cíntia Fridman, Mónica Varela, Fernando Kok, Joaquina Queiroz Andrade, Rosi M. Grossmann, and Maria Joaquina Marques-Dias. Epilepsy in Patients With Angelman Syndrome Caused by Deletion of the Chromosome 15q11-13. *Arch Neurol*, Jan 2006, 63:122-128.
- 13) Charlotte Höybye, Agneta Hilding, Hans Jacobsson, and Marja Thorén. Metabolic Profile and Body Composition in Adults with Prader-Willi Syndrome and Severe Obesity. *J Clin Endocrinol*

Metab 2002, 87: 3590–3597.

14) Harriette R. Mogul, Phillip D. K. Lee, Barbara Y. Whitman, William B. Zipf, Michael Frey, Susan Myers, Mindy Cahan, Belinda Pinyerd, and A. Louis Southren. Growth Hormone Treatment of Adults with Prader-Willi Syndrome and Growth Hormone Deficiency Improves Lean Body Mass, Fractional Body Fat, and Serum Triiodothyronine without Glucose Impairment: Results from the United States Multicenter Trial. Clin Endocrinol Metab 2008, 93: 1238–1245.

15) S M Price, R Stanhope, C Garrett, M A Preece, and R C Trembath. The spectrum of Silver-Russell syndrome: a clinical and molecular genetic study and new diagnostic criteria. J Med Genet 1999, 36: 837–842.

16) Jeff Anderson, David Viskochil, Molly O’Gorman, and Chad Gonzales. Gastrointestinal Complications of Russell-Silver Syndrome: A Pilot Study. Am J Med Genet 2002, 113: 15-19.

17) Shigeru Suzuki, Yoshio Makita, Tokuo Mukai, Kumihiro Matsuo, Osamu Ueda, and Kenji Fujieda. Molecular Basis of Neonatal Diabetes in Japanese Patients. J Clin Endocrinol Metab 2007, 92 (10) : 3979-3985.

18) Julian P.H. Shield. Neonatal Diabetes: New Insights into Aetiology and Implications. Horm Res 2000, 53 (suppl 1): 7-11.

表1 ゲノムインプリンティング異常症全国調査 過去5年間における患者数 第一次調査結果

層	対象機関数	有効回答機 関数	有効回答率 (%)	報告患者数					
				BWS	AS	PWS	SRS	TNDM	
小児科	大学病院	131	59	45	43	39	310	43	7
	500床～	227	158	69.6	50	66	213	45	8
	400～499床	215	126	58.6	24	39	127	27	3
	300～399床	389	225	57.8	29	100	85	8	3
	200～299床	348	175	50.3	12	23	63	10	0
	100～199床	698	341	48.9	17	73	83	13	0
	99床以下	819	345	42.1	14	40	60	9	9
	小計	2827	1429	53.2	189	380	941	155	30
産婦人科	大学病院	126	72	57.1	16	6	11	3	4
	不妊専門 機関	21	18	85.7	0	0	1	0	0
	小計	147	90	71.4	16	6	12	3	4
重症障害者 施設		187	83	44.4	11	29	39	3	0
小計		187	83	44.4	11	29	39	3	0
計		3161	1602	56.3	216	415	992	161	34

表2 ゲノムインプリンティング異常症全国調査 過去5年間における患者数 第二次調査結果

層	対象機関数	有効回答機 関数	有効回答率 (%)	報告患者数					
				BWS	AS	PWS	SRS	TNDM	
小児科	大学病院	29	14	48.3	20	23	70	17	20
	500床～	60	30	50	16	22	60	12	3
	400～499床	79	47	59.5	4	18	32	2	1
	300～399床	56	26	46.4	10	11	24	0	0
	200～299床	27	12	44.4	4	8	13	0	0
	100～199床	46	23	50	5	20	35	4	0
	99床以下	44	16	36.4	2	6	10	3	1
	小計	341	168	47.9	61	108	244	38	25
産婦人科	大学病院	11	5	45.5	9	4	5	1	0
	不妊専門 機関	1	1	100	0	0	1	0	0
	小計	12	6	72.7	9	4	6	1	0
重症障害者 施設		27	14	51.9	0	11	11	3	0
小計		27	14	51.9	0	11	11	3	0
合計		380	188	49.5	70	123	261	42	25

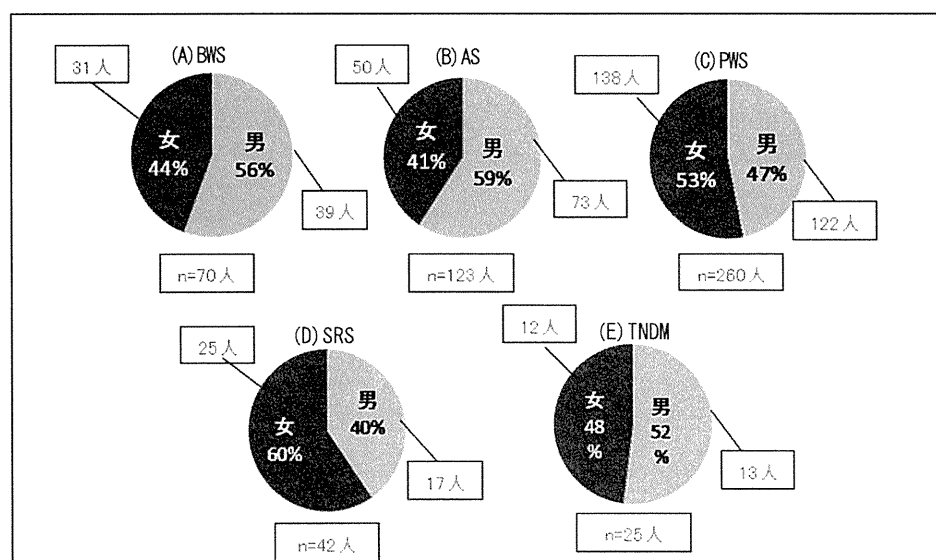


図1 ゲノムインプリンティング異常症の性比（男女の割合）

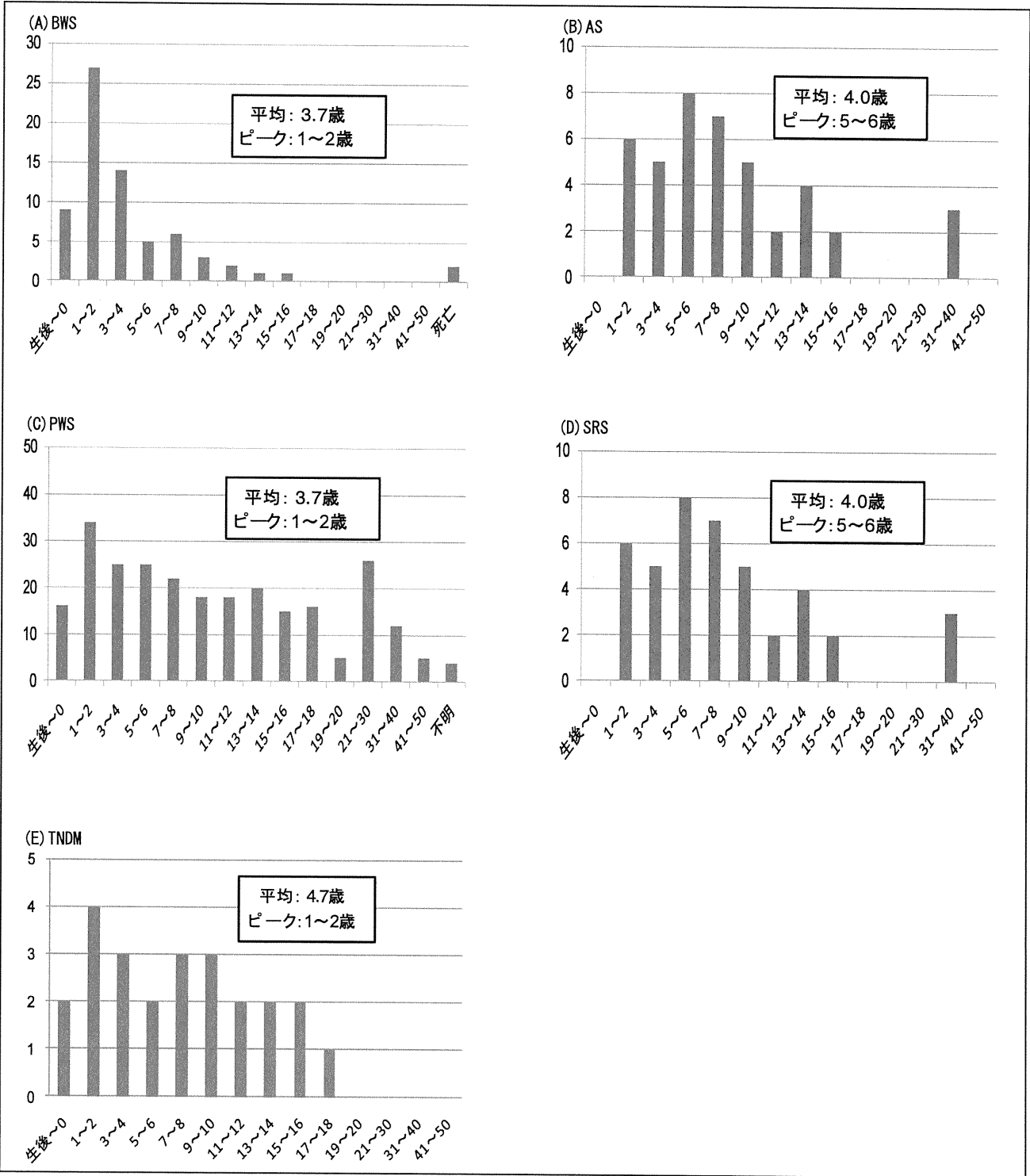


図2 年齢推移

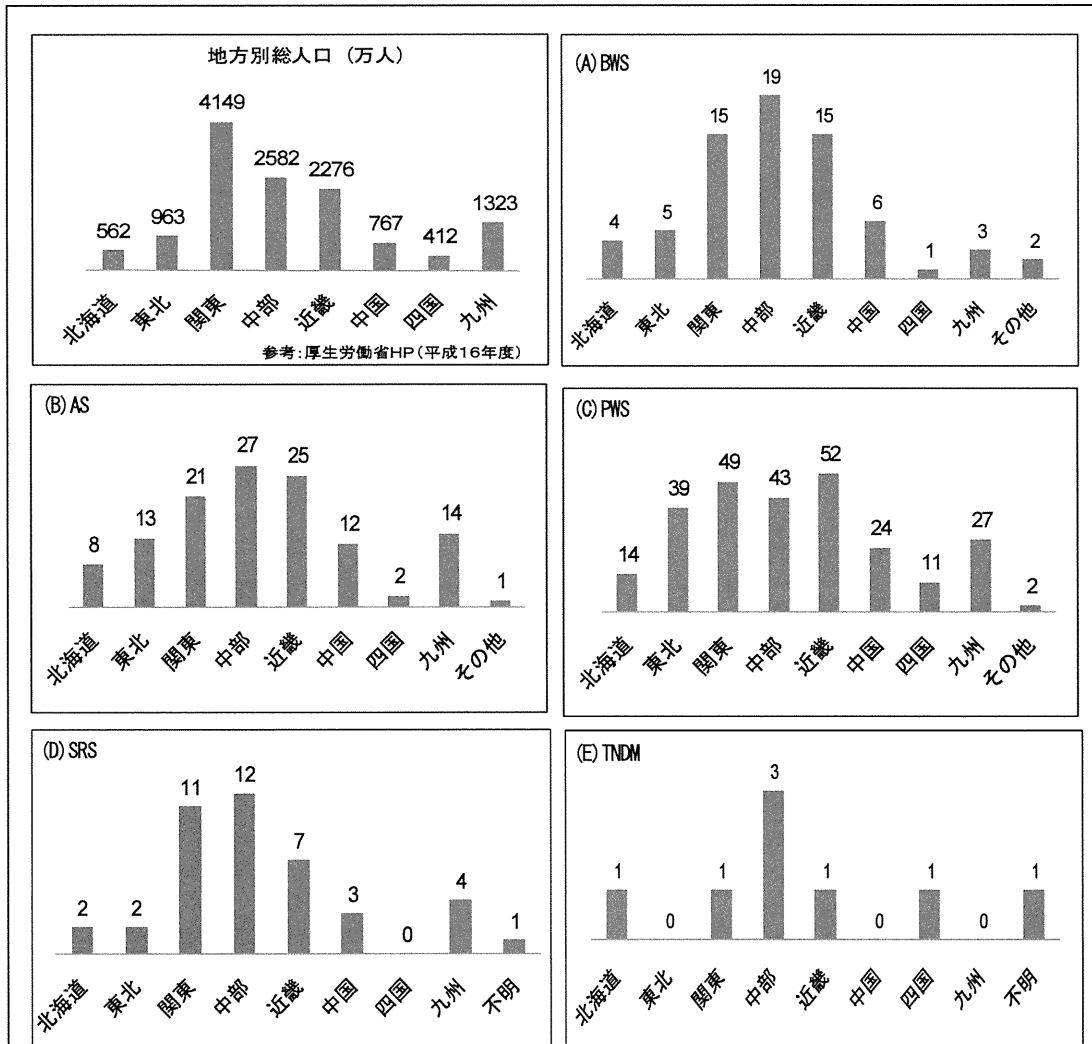


図3 地域別疾患数

表3 疾患の発症年齢

発症年	～1979	～1989	1990～1995	1996～2000	2001～2005	2006～	不明	死亡
(A) BWS	男		1人(1.4%)	1人(1.4%)	10人(14.3%)	25人(35.7%)		2人(2.9%)
	女			5人(7.1%)	8人(11.4%)	18人(25.7%)		
(B) AS	男	7人(5.7%)	15人(12.2%)	15人(12.2%)	10人(8.1%)	20人(16.3%)	6人(4.9%)	
	女	2人(1.6%)	8人(6.5%)	5人(4.1%)	17人(13.8%)	13人(10.6%)	5人(4.1%)	
(C) PWS	男	7人(2.7%)	19人(7.3%)	22人(8.4%)	22人(8.4%)	24人(9.2%)	26人(10.0%)	2人(0.8%)
	女	11人(4.2%)	10人(3.8%)	18人(6.9%)	25人(9.6%)	34人(13.0%)	38人(14.6%)	2人(0.8%)
(D) SRS	男		2人(4.8%)	3人(7.1%)	11人(26.2%)	1人(2.4%)		
	女	3人(7.1%)		2人(4.8%)	5人(11.9%)	10人(23.8%)	5人(11.9%)	
(E) TNDM	男			1人(12.5%)		3人(37.5%)		
	女			1人(12.5%)	1人(12.5%)	2人(25.0%)		

表4 家族歴と近親婚について

家族歴	あり	なし	不明	近親婚	あり	なし	不明
(A)BWS	1人(1.4%)	63人(90.0%)	6人(8.6%)	(A)BWS	0人(0%)	62人(88.6%)	8人(11.4%)
(B)AS	1人(0.8%)	116人(94.3%)	6人(4.9%)	(B)AS	2人(1.6%)	108人(87.8%)	13人(10.6%)
(C)PWS	4人(1.5%)	231人(88.9%)	25人(9.6%)	(C)PWS	0人(0%)	211人(80.8%)	50人(19.2%)
(D)SRS	1人(2.4%)	38人(90.5%)	3人(7.1%)	(D)SRS	0人(0%)	33人(78.6%)	9人(21.4%)
(E)TNDM	2人(8.0%)	4人(16.0%)	19人(76.0%)	(E)TNDM	0人(0%)	6人(24.0%)	19人(76.0%)

表5 不妊治療との関連性について

不妊治療	あり	なし	不明	疾患名	症例	年齢	性別	治療歴
(A)BWS	6人(8.6%)	39人(55.7%)	25人(35.7%)	(A)BWS	Case1	4	女	夫リンパ球免疫治療法、体外受精(IVF-ET)
(B)AS	2人(1.6%)	77人(62.6%)	44人(35.8%)		Case2	4	男	体外受精(IVF-ET)、人工授精(AIH)、排卵誘発
(C)PWS	4人(1.5%)	145人(55.6%)	111人(42.9%)		Case3	4	男	体外受精(IVF-ET)
(D)SRS	4人(9.5%)	20人(47.6%)	18人(42.9%)		Case4	3	女	体外受精(IVF-ET)
(E)TNDM	0人(0%)	5人(20.0%)	20人(80.0%)		Case5	2	男	体外受精(IVF-ET)
					Case6	2	女	顕微授精(ICSI)
				(B)AS	Case1	11	女	排卵誘発
					Case2	2	女	人工授精(AIH)
				(C)PWS	Case1	15	女	人工授精(AIH)、凍結精子使用
					Case2	6	女	顕微授精(ICSI)
					Case3	2	女	顕微授精(ICSI)
					Case4	1	男	顕微授精(ICSI)
				(D)SRS	Case1	4	女	体外受精(IVF-ET)
					Case2	2	男	体外受精(IVF-ET)
					Case3	8	男	顕微授精(ICSI)
					Case4	5	男	体外受精(IVF-ET)、凍結卵使用

疾患名	実患者数	推定患者数 (95% 信頼区間)	推定発症率	ART後の罹患児/患者総数
BWS	70	444 (351-538)	1 in 287,000	6/70 (8.6%)
AS	123	949 (682-1217)	1 in 134,000	2/123 (1.6%)
PWS	261	2,070 (1,504-2,636)	1 in 62,000	4/261 (1.5%)
SRS	42	326 (235-416)	1 in 392,000	4/42 (9.5%)
TNDM	32	67 (41-93)	1 in 1,910,000	-

表6 妊娠中の異常について

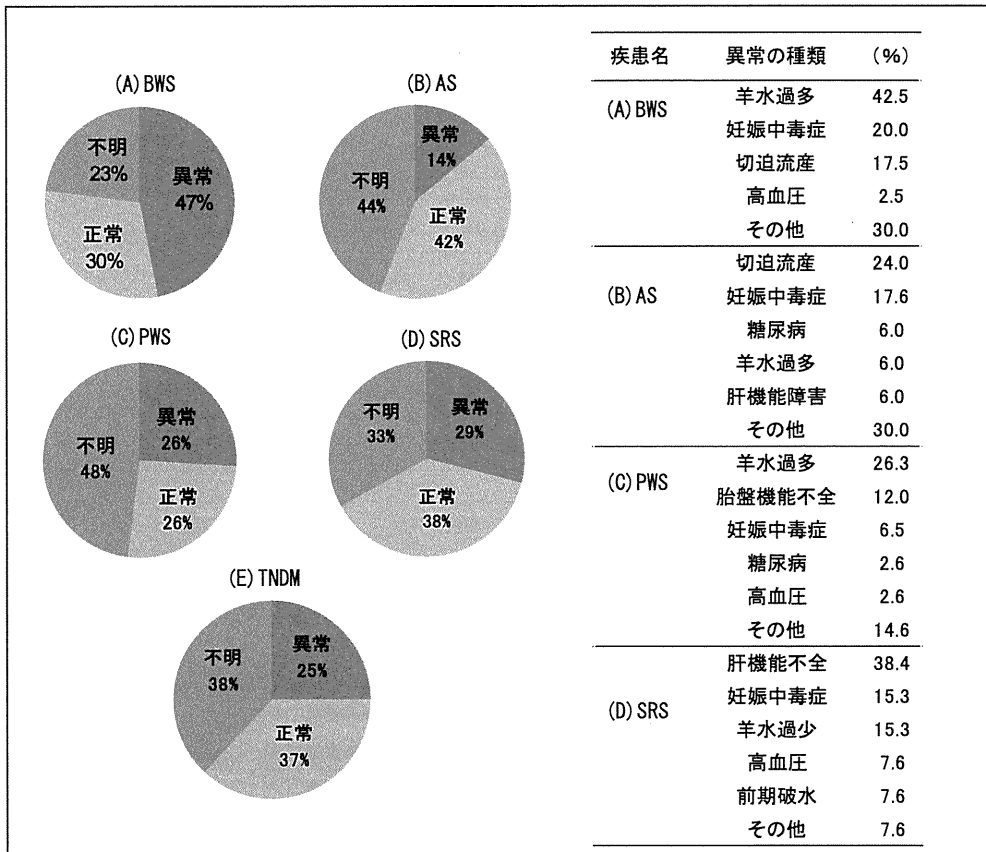


表7 分娩時の異常について

