

Cobb 角  $45^\circ$  以上の側彎症は 7.9% (10 例) であった。

## 2 側彎症の分類とその経過

側彎症の中で最も頻度の高い特発性側彎症では、従来 King らによる分類<sup>9)</sup>(図 1) が頻用されていたが、最近ではカーブの可塑性を bending film で評価し、より整合性が高く矢状面アライメントや腰椎因子を考慮して外科的治療法の選択がわかりやすい Lenke 分類<sup>9)</sup>(図 2) が使用されるようになってきた。しかし、Lenke 分類は非常に煩雑であり、脊柱変形を専門とする整形外科医以外が日常診療で使用するのは困難である。また Holm ら<sup>7)</sup>が推奨するように、PWS 患者に脊椎 X 線検査を施行することは重要であるが、Lenke 分類では評価のために X 線撮影を複数枚行う必要があり、患児の被曝が問題となる。

筆者らは、PWS に脊柱側彎症を合併した 39 例の検討から、簡易的に側彎をシングルカーブとダブルカーブに分けて、腰椎・胸腰椎カーブ (type 1)、ダブルカーブ (type 2)、胸椎カーブ (type 3) の三つに大別した分類法を用いている<sup>10)</sup>(図 3)。筆者がこの分類を用いるようになったのは、PWS に伴う側彎症は大きく 3 群に分けられ、bending film や多くの因子を要する Lenke 分類などと比較すると、この分類法は実際に PWS の経過観察を行っている小児科医や脊椎外科を専門としない整形外科医にもわかりやすく、1 枚の X 線で判断できるという利点があるからである。また各タイプにおける頻度は、腰椎・胸腰椎カーブ (type 1): 56%、ダブルカーブ (type 2): 33%、胸椎カーブ (type 3): 10%であった。この分類で重要なことは、①PWS では左が凸側の腰椎カーブ (type 1) が全体の 44%と最も多く認められたこと、②ダブルカーブ (type 2) は側彎症が悪化しやすい、ということである。①については、特発性側彎症では右が凸側の胸椎側彎症が多いことを考えると、PWS に伴う脊柱側彎症の特徴といえる。また②については、側彎症の経過観察中に側彎症が悪化する可能性があることを患者やその家族へ説明し、ダブルカーブ (type 2) については半年に 1 回程度の全脊柱 X 線写真による厳重な観察をつぶさに行

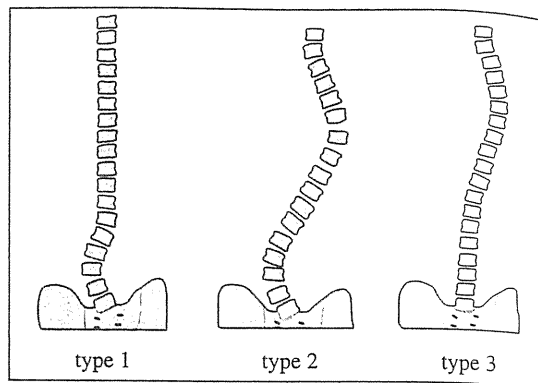


図 3 PWS の側彎症分類

type 1: 腰椎・胸腰椎カーブ、type 2: ダブルカーブ、type 3: 胸椎カーブ

うことが必要である。

PWS の側彎症の自然経過については、十分に解明されているとはいえない。通常の特発性側彎症の自然経過では、基本的に成長の過程におけるカーブの進行は、より若年で、大きなカーブほど進行する危険が大きい。成長の指標として骨年齢、初経年齢、Risser sign などを用いているが、Lonstein, Carson<sup>11)</sup>らは側彎症の経過観察において、カーブが  $20\sim 29^\circ$  までの Risser 0~1 の患者では、その 68%でカーブが進行し、一方で同じ角度の Risser 2 以上のものは 23%しか進行しなかったとしている。さらに、 $19^\circ$  以下のカーブで Risser 2 以上の患者では 1.6%のみしか進行を認めなかったとしている。また、成長終了後の側彎変形については Weinstein ら<sup>12)</sup>が、 $50\sim 75^\circ$  の胸椎カーブでは年に  $0.75\sim 1^\circ$  進行し、胸椎の  $100^\circ$  以上のカーブでは肺性心、右心不全で死亡するリスクが高まるとしている。さらに富田ら<sup>13)</sup>が述べるように、PWS でも側彎症に加えて前彎症や後彎症など複数の変形を伴っているものは増悪の可能性が高いことにも留意されたい。

## 3 手術適応

PWS に伴う側彎症の手術適応については、PWS では通常の成長曲線に従わないため、側彎変形の増悪の時期や程度も特発性側彎症のものとは異なることが予想されるが、特発性側彎症の自然経過を参考にして手術適応を決めている。特発性

側彎症の手術適応は原則、胸腰椎部は側彎度 (Cobb 角) 45° 以上、腰椎部は 35° 以上としている。手術の適応は側彎度だけではなく、骨成熟度、骨幹オフバランス彎曲の部位、家族の意向、精神遅滞の程度、呼吸器合併症なども十分に考慮する必要がある。

#### 4 手術方法

手術方法は特に PWS に特有なものではなく、通常の特発性側彎症の手術方法に準じて行っている。側彎症治療の歴史的背景は、Harrington (1962 年)<sup>14)</sup> が後方の脊椎インストゥルメンテーションであるフックとロッドを開発したことからはじまる。その後は、脊椎インストゥルメンテーションの著しい進歩に伴い脊柱側彎症の手術方法も著しく進歩し、椎弓根スクリュー、フック、椎弓下ワヤリングを使用した、いわゆる hybrid 法が確立した。また、Roy-Camille<sup>15)</sup>、Steffee<sup>16)</sup> (1986 年) によりペディクルスクリューも発展し、矢状面バランスも含めたカーブの矯正率が飛躍的に向上した。また近年では、Lenke<sup>17)</sup> らが示しているように multiple pedicle screw 法により回旋の矯正も含めた真に 3-dimensional な矯正へと発展してきている。また前方法においても、Dwyer<sup>18)</sup> (1969 年) や Zielke<sup>19)</sup> (1976 年) により前方スクリューやロッドの開発がなされ、さらに、わが国における Kaneda<sup>20)</sup> (1996 年) の開発したデュアルロッドの前方用インプラントにより手術成績は著明に改善した。当科でも、ペディクルスクリューやフックなどの脊椎インストゥルメンテーションを使用した後方矯正固定術や脊椎前方固定術を行っている。原則として、胸椎カーブについては後方矯正固定術を選択し、胸腰椎・腰椎カーブ (一部胸椎カーブ) は前方矯正固定術を選択する。ダブルカーブでは前方法と後方法の二期的手術を選択する場合もある。ただし、前方法を選択する際には PWS 特有の呼吸器疾患の合併症の有無が重要で、過去に前方法を施行した PWS の肥満や呼吸器疾患の術後管理に難渋する報告が散見<sup>21,22)</sup> されており、十分に配慮しなければならない。また、10 歳以下で発症し治療に難渋する小児重度脊椎変形には、拘束性肺障害を回避することで早期

より成長を維持することができる growing rod 法<sup>23)</sup> を選択している。growing rod 法は成長終了後に行う最終的な固定術までの time saving 手術で、患児の成長とともに半年に 1 回ロッドを延長していく。この方法は近年、小児専用の脊椎インストゥルメンテーションの進歩に伴い、low profile で強固な claw technique が可能となり、さらに小児用のタンダムコネクターが開発されたことにより実現された。またアンカー部のみに骨移植を行い、より強固なアンカーを作製する工夫<sup>24)</sup> を行うことにより安定した成績をあげることに成功した。この手術法は、以前には必ずしも成績がよくなかった spinal instrumentation without fusion 法<sup>25,26)</sup> を発展させた。また、フックの脱転やインプラント折損による instrument failure を少なくし、長期の外固定や多数回手術を軽減し、成長の温存、crankshaft 現象の予防を可能とした。筆者らは、側彎度 (Cobb 角) 30° 以上を目安に、まず装具療法を試みるが、精神遅滞のために装具を嫌がる患児も多い。短期間に増悪し手術適応の側彎度に達する側彎症については、むやみに保存的治療を引き伸ばさずに growing rod 法を選択している。

#### 5 術前の GH 補充療法の重要性

PWS における GH の有用性を示す報告は多く、成長加速による身長獲得、体組成改善、筋力向上などの効果が世界的に認められてきた。最近では早期からの使用が推奨されるようになり、長期間使用されるようになってきた。比較的早期から食事制限や GH 補充療法を行うことが重要で、高度の肥満が解消されれば、それに伴う呼吸機能の改善も期待できる。前方矯正固定術を行う際の前方からのアプローチは、肥満による呼吸機能低下が存在する症例ではリスクが大きいため、この方法を避けて後方法を行わざるを得ないが、肥満をコントロールできることになれば手術の選択肢も多くなる。

#### 6 筆者らの施設における手術治療成績<sup>6)</sup>

2002 年 11 月～2007 年 12 月に当院小児科に来院した Cobb 角 45° 以上の側彎症は 10 例で、手術

を拒否した2例を除き、側彎症に対し手術を行ったのは8例(男4例,女4例)であった。手術時平均年齢は11歳(4~20歳),遺伝形式は染色体15q11-13欠失5例,片親性ダイソミー(uniparental disomy:UPD)3例であり,平均経過観察期間は6年10ヶ月(9~153ヶ月)であった。これらの症例に対し,①body mass index(BMI)による体型分類,精神発達遅滞の有無,GH補充療法の有無とその術前の治療期間,装具療法の可否,②術式,出血量,平均手術時間,Cobb角の推移(術前,術後,経過観察時)および合併症と追加手術,を調査した。結果は,まずBMIは平均21.6であり,体型はやせ(BMI<19.8)4例,標準(18.5~25.0)2例,肥満(25.0~30.0)1例,高度肥満(>30.0)1例であった。過度の肥満症例である1例を除き,7例は幼少期からGH補充療法を受けており,BMIは低値で肥満症例は少なかった。また精神発達遅滞は全例(8/8)に認めた。術前のGH投与期間は平均5年0ヶ月(39~83ヶ月)であった。また,装具を嫌がる患児が多く,装具療法は2例にしか行われていなかった。術式は脊椎矯正固定術5例(前方法2例,後方法3例)およびgrowing rod法3例であった。矯正手術例の出血量は平均533mL(229~900mL),平均手術時間はロッド延長手術を除き4時間13分(234~319分)であった。矯正手術例の平均Cobb角の推移は,初回術前67.5°(44~88°),術後34.8°(26~55°),経過観察時40.7°(27~53°)と良好な結果であった。合併症については,表在感染1例とgrowing rod法の症例にて術後早期にフックの脱転が1例あったが,幸い深部感染,神経障害,血管損傷などの重篤な合併症はなかった。追加手術は2例に行い,1例は8歳の女子で,Th10-L2前方矯正固定を行い11年経過後,固定上位の後側彎の進行のためTh1-L1後方矯正固定術を追加した。もう1例は15歳の男子で,Th3-L3後方矯正固定後,1年で下位スクリューのpull outのために下位のL4まで固定術を追加した。

## 7

### 代表症例の供覧

#### a. 症例1:後方矯正固定術の症例

15歳男子。新生児期にフロッピーインファント

があり,遺伝形式UPDのPWSと診断された。4歳時から側彎を指摘され装具治療も行われたが,精神運動発達遅滞があり装具の装着はできなかった。11歳時に当院小児科を紹介受診し,GH補充療法(6mg/週)を開始した。整形外科には12歳時に後彎の進行のため紹介受診となった。初診時側彎はCobb角T4-T12:42°であったが,15歳時にCobb角T3-T12:69°,T12-L4:53°のダブルカーブ(type2)で,側面像でT3-T12:12°前彎,T12-L4:16°後彎に進行したため手術を予定した。術前にGH補充療法を3年6ヶ月行った。手術時現症は,身長147.5cm,体重37.0kg,BMI17とやせ型で,神経学および血液学的検査で異常所見は認められなかった。その他,CT,MRIにおいて脊椎,脊髄の先天奇形を含む異常所見は認められなかった。術前に自己血600mL貯血を行い,T3-L3後方矯正固定を行った。術後Cobb角は,T3-T12:35°,T12-L4:35°,側面像にてT3-T12:29°後彎,T12-L4:2°前彎に改善し,経過は良好であった。

術後1年でL3のスクリューが緩んだためL4まで固定を延長したが,これはPWSに特有の合併症ではなく,術後2年の経過観察時T3-T12:40°,T12-L4:47°,側面像にてT3-T12:21°後彎,T12-L4:1°前彎と経過は良好である(図4)。

#### b. 症例2:前方固定術の症例

5歳女児。1歳時に当院小児科にて遺伝形式欠失型のPWSと診断され,2歳6ヶ月からGH補充療法を開始し1.8mg/週を投与されていた。3歳時に側彎を指摘され当科を受診した。初診時の胸腰椎カーブ(type1)T10-L4はCobb角29°,後彎角19°がCobb角T10-L4:80°のカーブに進行した。また後彎角はT8-L2:43°であった。装具療法を試みたが,精神発達遅滞をもつこともあり,嫌がって装着できなかった。術前にはGH補充療法を3年3ヶ月行い,手術時現症は身長96.0cm,体重14.8kg,BMI16.1で,神経学および血液学的検査に異常所見は認められなかった。この側彎症は胸腰椎カーブが主であり,T11-L3前方矯正固定術を行った。出血量は229mL,手術時間は3時間54分で,術後はCobb角T10-L4:22°まで矯正された。また後彎角はT8-L2:29°であった。術後4年の最終経過観察時もCobb角T3-T10:

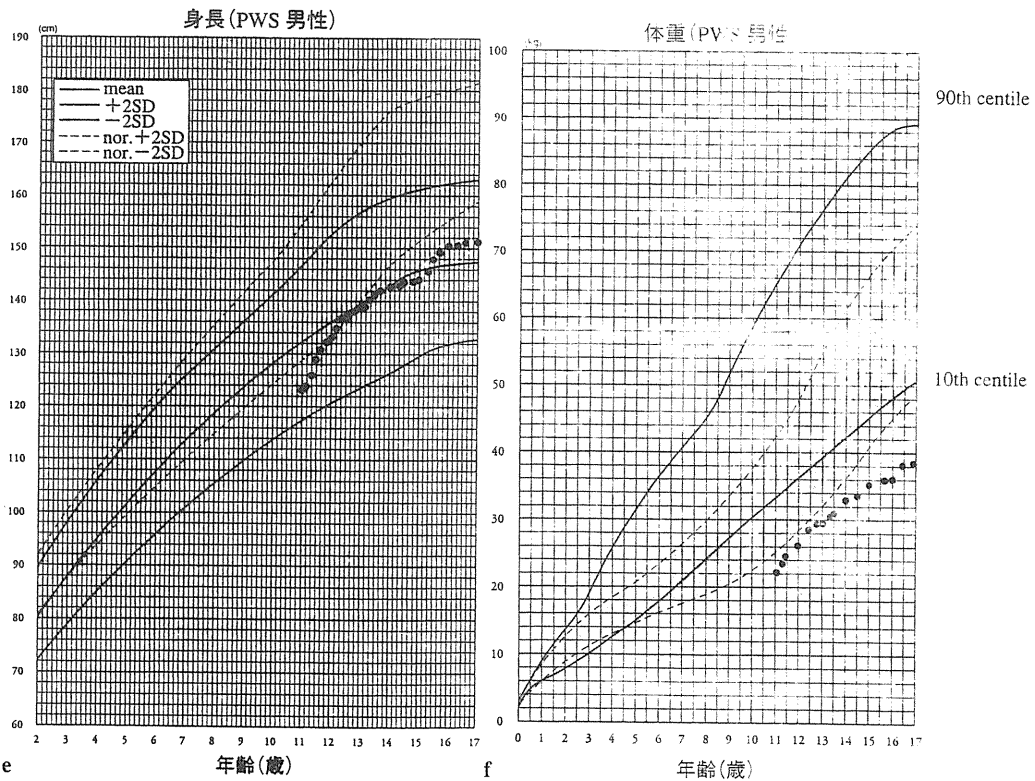
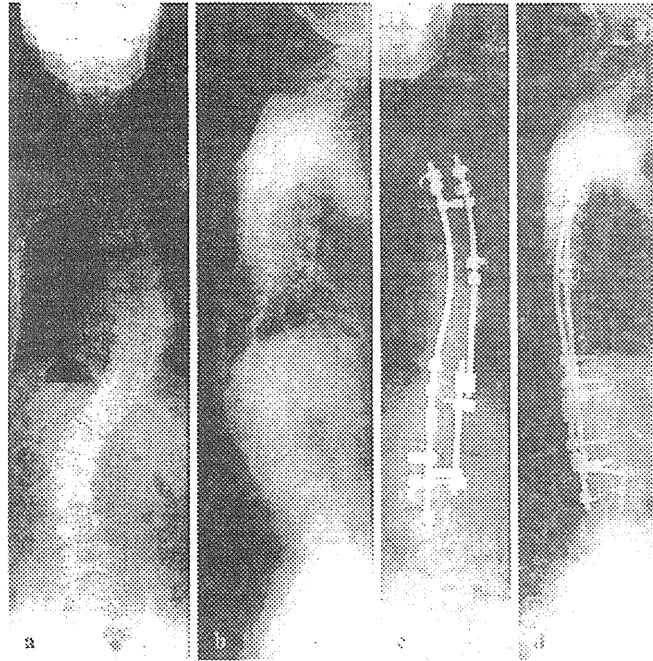


図4 後方法

a: 術前正面, b: 術前側面, c: 術後正面, d: 術後側面, e: 成長曲線, f: 体重曲線  
 (中村 豊, 他: Prader-Willi syndrome における手術療法, *J Spine Res* 1: 1968-1972, 2010/Nagai T, et al.: Standard growth curves for Japanese patients with Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet* 95: 130-134, 2000)

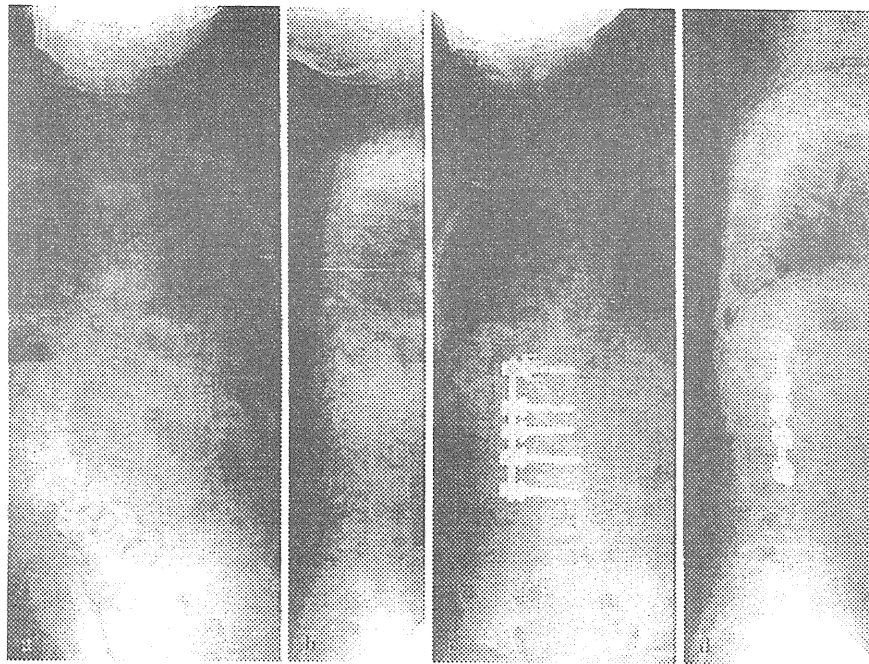


図5 前方法  
a: 術前正面, b: 術前側面, c: 術後正面, d: 術後側面

35°と、矯正損失なく経過は良好であった(図5)。

### c. 症例3: growing rod法の症例

11歳男子。生後まもなく、遺伝形式が欠失型のPWSと診断された。その後5歳11ヶ月からGH補充療法(4mg/週)と食事療法を行い、7歳時に側彎を指摘され当科を受診した。7歳の初診時におけるT6-L1はCobb角37°であったが、11歳時にはCobb角T2-L3:55°、側面像にてT2-L3:55°前彎と進行したため手術を予定した。経過観察中に装具療法を試みたが、精神発達遅滞のため装具を嫌がり装着できなかった。手術時現症は身長138.5cm、体重29.2kg、BMI15.2とやせ型で、神経学的および血液学的検査に異常所見は認められなかった。術前にはGH補充療法を5年6ヶ月行っていた。骨が脆弱であることを考慮し、二期的に強固なアンカーを作製し、成長を温存することができるgrowing rod法を計画した。まず固定上位端と下位端にフックとスクリューを入れ、アンカー部のみ骨移植を行い、半年後に骨癒合が得られていることを確認して脊椎インストゥルメンテーションを用いた後方矯正固定術を行った。出血量は120mL、手術時間は2時間20分であり、術後Cobb角はT2-L3:27°、側面像にてT2-L3:

16°前彎と矯正された。手術前後には小児科の医師も立ち会いメンタルのサポートも同時に行い、精神的にも安定していた。現在も半年に1回1~1.5cmのロッド延長を行っている(図6)。

### ◎おわりに

PWSの側彎症に対する手術の成績については、Yamadaら<sup>27)</sup>や野原ら<sup>22)</sup>も良好な手術成績を示しているが、一方でAccadbled<sup>1)</sup>(2008年)らは、手術の危険性について報告している。その報告によると、1997~2004年に手術が行われた16例について、9例に大きな合併症があり、その内訳は固定上位の重度後彎4例、深部感染2例、一過性の四肢麻痺が1例であった。さらに、固定上位の重度後彎の4例については再手術を行い、うち3例が恒久的な四肢麻痺になったと述べている。このように、側彎症手術の際には十分に合併症を考慮しなくてはならず、Weiss<sup>28)</sup>らが指摘するようにまだ手術の是非についてcontroversialな点もある。しかし従来、PWS患者の側彎症の手術は合併症が多いとされてきたものの、近年、GH補充療法などの術前の全身状態の改善もたらす効果は大きく、手術のリスクを軽減し治療成績が飛躍的

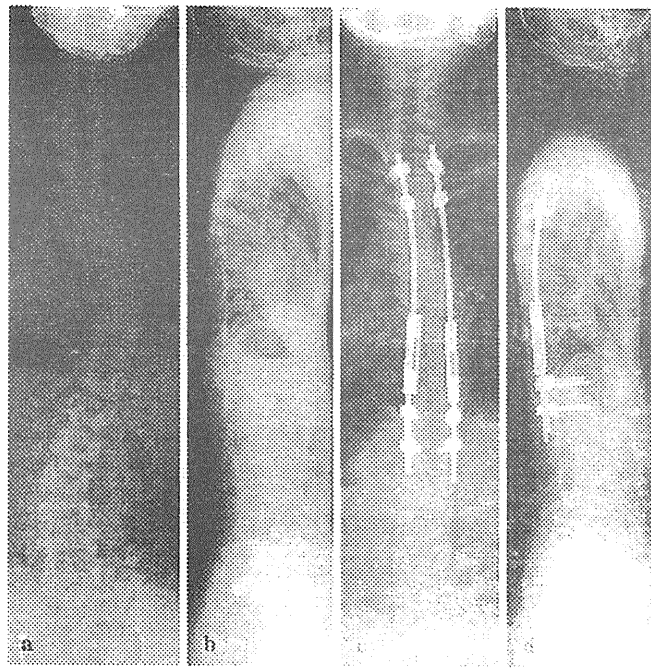


図6 growing rod 法

a: 術前正面, b: 術前側面, c: 術後正面, d: 術後側面

(中村 豊, 他: Prader-Willi syndrome における手術療法. *J Spine Res* 1: 1968-1972, 2010)

に向上してきているのも事実である。この疾患をもつすべての患者にあてはまる明確な手術適応の決定や保存的治療と手術的治療の選択法を決めることは難しいが、個々の症例で十分に検討し、重度側彎症例については手術を選択できる時代に入ってきたといえる。また手術を計画するうえで、整形外科医のみでは、性格、行動障害やその増悪のため、術後に患者の協力が得られず術後管理に難渋することをしばしば経験する。手術に際し、家族の同伴や PWS の治療に経験豊富な小児科医との連携によるサポートが円滑に行われることも重要で、手術を成功させるためにはこのような包括的な医療体制が必要である。

#### 文献

- 1) Accadbled F, *et al.*: Complication of scoliosis surgery in Prader-Willi syndrome. *Spine* (Phila Pa 1976) 33: 394-401, 2008
- 2) Obata K, *et al.*: Effect of 5 years growth hormone treatment in patients with Prader-Willi Syndrome. *J Pediatric Endocrinol Metab* 16: 155-162, 2003
- 3) Ree D: Scoliosis surgery in the Prader-Willi syndrome. *J Bone Joint Surg Br* 71: 685-688, 1989
- 4) Butler J, *et al.*: Prevalence of, and risk factors for, physical ill-health in people with prader-willi syndrome: A population based study. *Dev Med Child Neurol* 44: 248-255, 2002
- 5) Holm VA, *et al.*: Prader-Willi syndrome and scoliosis. *Dev Med Child Neurol* 23: 192-201, 1981
- 6) 中村 豊, 他: Prader-Willi syndrome における手術療法. *J Spine Res* 1: 1968-1972, 2010
- 7) Holm VA, *et al.*: Prader-Willi Syndrome and Scoliosis. *Dev Med Child Neurol* 23: 192-201, 1981
- 8) King HA, *et al.*: The selection of fusion levels in thoracic idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg Am* 65: 1302-1313, 1983
- 9) Lenke LG, *et al.*: Adolescent idiopathic scoliosis: A new classification to determine extent of spinal arthodesis. *J Bone Joint Surg Am* 83: 1169-1181, 2001
- 10) Nakamura Y, *et al.*: Epidemiological aspects of scoliosis in a cohort of Japanese patients with Prader-Willi syndrome. *Spine J* 9: 809-816, 2009
- 11) Lonstein JE *et al.*: The prediction of curve progression in untreated idiopathic scoliosis during growth. *J Bone Joint Surg Am* 66: 1061-1071, 1984
- 12) Weinstein SL, *et al.*: Curve progression in idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg Am* 65: 447-455, 1983
- 13) Nagai T, *et al.*: Growth hormone therapy and scoliosis in

- patient with Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet A* 140 : 1623-1627, 2006
- 14) Harrington PR : Treatment of scoliosis. Correction and internal fixation by spine instrumentation. *J Bone Joint Surg Am* 44 : 591-610, 1962
  - 15) Roy-Camille R, *et al.* : Internal fixation of the lumbar spine with pedicle screw plating. *Clin Orthop Relat Res* 203 : 7-17, 1986
  - 16) Steffee AD, *et al.* : Segmental spine plates with pedicle screw fixation. A new internal fixation device for disorders of the lumbar and thoracolumbar spine. *Clin Orthop Relat Res* 203 : 45-53, 1986
  - 17) Kim YJ, *et al.* : Free hand pedicle screw placement in the thoracic spine : is it safe? *Spine* 29 : 333-342, 2004
  - 18) Dwyer AF, *et al.* : An anterior approach to scoliosis. A preliminary report. *Clin Orthop Relat Res* 62 : 192-202, 1969
  - 19) Zielke K, *et al.* : Ventral derotation-spondylodes. *Arch Orthop Unfall-Chir* 58 : 257-277, 1976
  - 20) Kaneda K, *et al.* : New anterior instrumentation for the management of thoracolumbar and lumbar scoliosis. Application of the Kaneda two-rod system. *Spine*(Phila Pa 1976)21 : 1250-1261 ; discussion 1261-1262, 1996
  - 21) 角谷賢一朗, 他 : Prader-Willi 症候群に合併した側弯症の 2 手術例. *脊柱変形* 21 : 64-67, 2006
  - 22) 野原亜也斗, 他 : Prader-Willi 症候群に伴う後側弯の治療 経験-2 例報告-. *脊柱変形* 23 : 41-44, 2008
  - 23) Akbarnia BA, *et al.* : Instrumentation with limited arthrodesis for the treatment of progressive early-onset scoliosis *Spine* 14 : 181-189, 2000
  - 24) Akbarnia BA, *et al.* : Dual growing rod technique for the treatment of progressive early-onset scoliosis : a multicenter study. *Spine* 30 : 46-57, 2005
  - 25) Harrington P : The treatment of scoliosis. *J Bone Joint Surg* 44 : 591-610, 1962
  - 26) Moe JH, *et al.* : Harrington instrumentation without fusion plus external orthotic support for the treatment of difficult curvature problems in young children. *Clin Orthop Relat Res* (185) : 35-45, 1984
  - 27) Yamada K, *et al.* : Scoliosis associated with Prader-Willi syndrome. *The Spine J* 7 : 345-348, 2007
  - 28) Weiss HR, *et al.* : Scoliosis in patients with Prader-Willi syndrome comparisons of conservation and surgical treatment. *Scoliosis* 4 : 10, 2009



## IX 最近のトピックス

## 1 高齢出産に伴う Prader-Willi 症候群病因の変化

国立成育医療研究センター研究所分子内分泌研究部 松原圭子  
 浜松医科大学医学部小児科 緒方 勤

## 1 PWS の病因

Prader-Willi 症候群 (PWS) は代表的なゲノム刷り込み疾患であり, 15 番染色体長腕近位部に存在する刷り込み遺伝子群の発現異常により発症する。そして, 刷り込み異常症を招く病因として, 父親由来刷り込み領域の欠失が約 70%, 15 番染色体母性片親性ダイソミー [maternal uniparental disomy 15: upd(15)mat] が約 25% を占め, 残りはエピソード変異や snoRNA の欠失などによる。片親性ダイソミー (uniparental disomy: UPD) とは, 相同染色体の全部または一部を片親から受け継ぐ状態を指し, upd(15)mat では一対の 15 番染色体がともに母親から由来する。そして, 相同染色体のある領域や座位が二つの異なる相同染色体に由来するときをヘテロダイソミー, 一つの染色体に由来するときをアイソダイソミーとよぶ。これらのヘテロダイソミーやアイソダイソミーの領域は全染色体に及ぶこともあるが, 減数分裂過程における組み換えにより相同染色体において混在することもある。

## 2 upd(15)mat を引き起こすメカニズム

upd(15)mat を引き起こすメカニズムとして, trisomy rescue (TR), monosomy rescue (MR), gamete complementation (GC), post-zygotic mitotic error (PE) の四つが考えられている<sup>1)</sup>。TR では, 減数分裂時の不分離 (図 1-a) により生じた 2 倍体の卵子 (disomic oocyte) が正常な精子と受精し, その後の過程で父親由来の染色体が消去された結

果, UPD 細胞が形成される (図 1-b)。GC においても disomic oocyte が受精に関与しており, disomic oocyte と nullisomic sperm が受精することで UPD 細胞が形成される (したがって, GC は二つのまれな現象が同時に生じることを前提とする, 図 1-c)。MR では, nullisomic sperm と正常な卵子の受精により 1 倍体の接合子が形成されたのち, 母親由来の染色体が複製されて UPD 細胞が形成される (図 1-d)。PE では, 受精までは正常に起こるものの, その後の体細胞分裂の過程で染色体不分離が生じ, trisomy rescue を介して UPD 細胞が形成される (図 1-e)。

## 3 女性の年齢と upd(15)mat

異数性を有する卵子は減数分裂における不分離により生じるものであり, 特に第 1 減数分裂における不分離は女性の年齢の影響を強く受けることが知られている<sup>2)</sup>。卵細胞の成熟過程において, 卵細胞は胎生期に第 1 減数分裂中期まで分裂進行したのち, 排卵までの数十年の間, 休止状態にある。高齢女性では, この休止期間が長期に及ぶことで正常な染色体分離を阻害する内外因子の影響を長く受けるため, 第 1 減数分裂時の染色体不分離が起りやすくなると考えられている。したがって, 高齢出産は第 1 減数分裂不分離に端を発する TR または GC による upd(15)mat のリスク因子であると考えられる。この概念は, ①患者出生時の母親年齢が欠失患者に比し upd(15)mat 患者で有意に高いこと<sup>3)</sup>, ②upd(15)mat の相対的頻度が, 出生時の母親年齢が 35 歳以下の群に比し



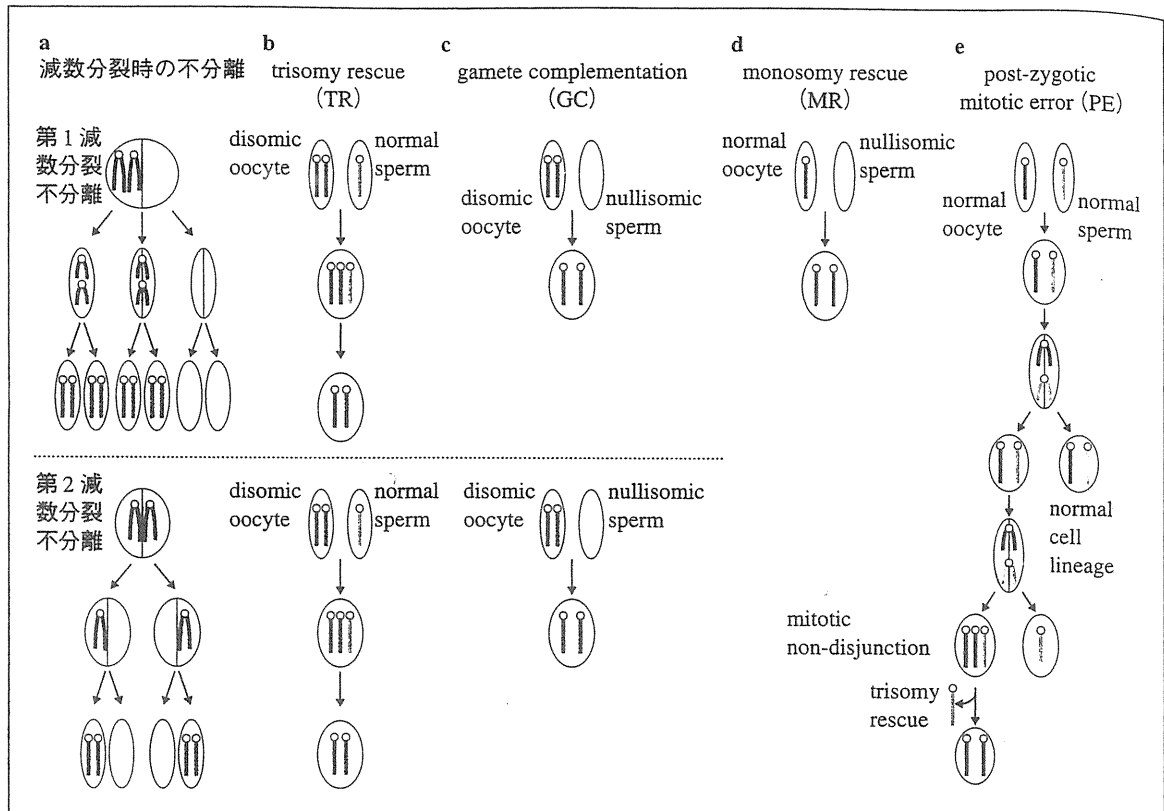


図1 upd(15)mat 形成のメカニズム

35 歳以上の群で有意に高いこと<sup>4)</sup>, ③英国の 5 歳以下の PWS 患者において, 近年の出産年齢の上昇を反映して upd(15)mat の相対的頻度が有意に増加していること<sup>5)</sup>, により支持される. しかし, これらの研究では upd(15)mat 全体の相対的頻度の上昇は示されているが, その発症メカニズムについての詳細な検討がなされていないため, この相対的頻度の上昇が第 1 減数分裂不分離に関連する TR あるいは GC の増加によるものか否かという点は明らかになっていない.

#### 4 日本における高齢出産と PWS 発症原因の変化

日本においても, 女性の出産年齢は上昇し続けており, 2003 年には 20 歳代と 30 歳代の母親から出生した児の数が逆転した (図 2, ⇒). そのため, われわれは日本人 PWS 患者の分子遺伝学的解析を通じ, 高齢出産が第 1 減数分裂不分離後の TR あるいは GC を介した upd(15)mat 発症リス

クか否かについて検討を行った<sup>6)</sup>. 対象は, 染色体 G-band 法で正常核型を示し, メチル化特異的 PCR (polymerase chain reaction) により PWS-刷り込み中心 (PWS-imprinting center: PWS-IC) の高メチル化が認められ, 母親の年齢情報を入手可能であった日本人 PWS 患者 117 名 (男性 72 名, 女性 45 名) である.

#### a. 発症病因の分類

発症病因は以下の方法で分類した.

①SNRPN 遺伝子とそのプロモータに存在するメチル化可変領域を含む領域の FISH (fluorescence in situ hybridization) 解析により欠失が見出されたとき, 「欠失群」とした.

②FISH 解析で欠失が認められなかった症例に対し, 患者, 両親の DNA を用いて 15 番染色体長腕上の 13 座位におけるマイクロサテライト解析を行い<sup>7)</sup>, 母性 UPD が認められたものを「upd(15)mat 群」とした.

③マイクロサテライト解析により母性 UPD が認められなかった症例に対し, MLPA (multiplex

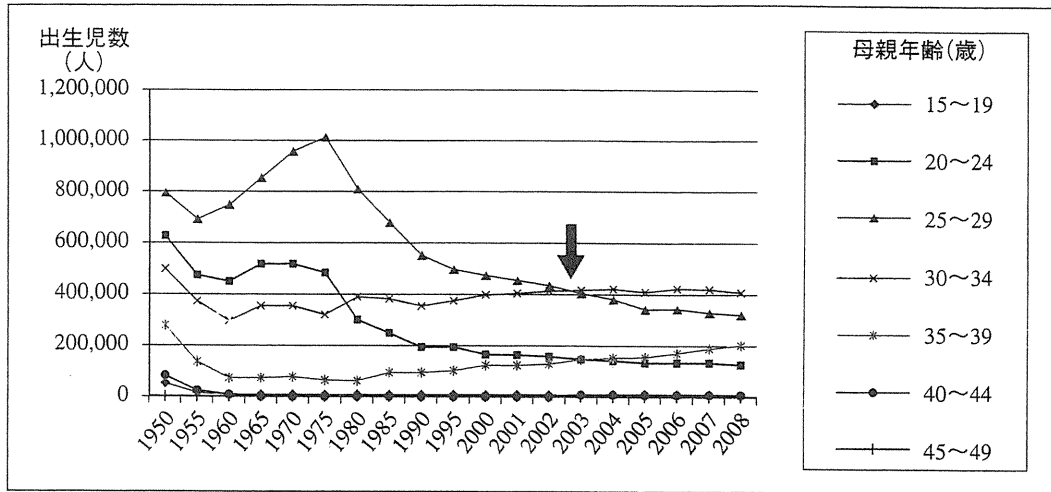


図2 母親年齢別出生児数の変化

表1 マイクロサテライト解析結果による upd(15)mat の分類

座位	位置	解析結果
D15S541	q11.2	
D15S542	q11.2	ヘテロダイソミー
D15S1035	q11.2	アイソダイソミー
D15S11	q11.2	アイソダイソミー
D15S128	q11.2	ヘテロダイソミー
D15S1048	q11.2	1 座位以上で または ヘテロダイソミー
D15S1007	q11.2	アイソダイソミー
D15S117	q21.1	 UPD by TR/GC (Meiosis 1)
D15S151	q21.1	
D15S205	q21.1	
D15S127	q26	 UPD by TR/GC (Meiosis 2)
D15S120	q26.3	
D15S642	q26.3	 UPD by MR/PE

(Robinson WP, et al. : Maternal meiosis I non-disjunction of chromosome 15 : dependence of the maternal age effect on level of recombination. *Hum Mol Genet* 7 : 1011-1019, 1998)

ligation-dependent probe amplification) 法を行い、PWS-IC を含む微小欠失が認められたものを「IC 微小欠失群」、認められなかったものを「エピ変異群」とした。

さらに、マイクロサテライト解析結果により、upd(15)mat を下記のサブタイプに分類した(表 1)。

①動原体近傍の 3 座位 (D15S541, D15S542, D15S1035) のうち 1 座位以上でヘテロダイソミーが認められた場合、第 1 減数分裂不分離後の

TR または GC による upd(15)mat (「TR/GC [M1] 群」とした。これは図 1 に示すように、第 1 減数分裂不分離が生じると、動原体周辺がヘテロダイソミー状態になるためである (なお、遠位部は組み換えが奇数回であればアイソダイソミーとなり、偶数回であればヘテロダイソミーとなるため、これを指標にすることはできない)。

②動原体近傍の 3 座位がアイソダイソミーを示し、それ以外の 1 座位以上でヘテロダイソミーが認められた場合、第 2 減数分裂不分離後の TR

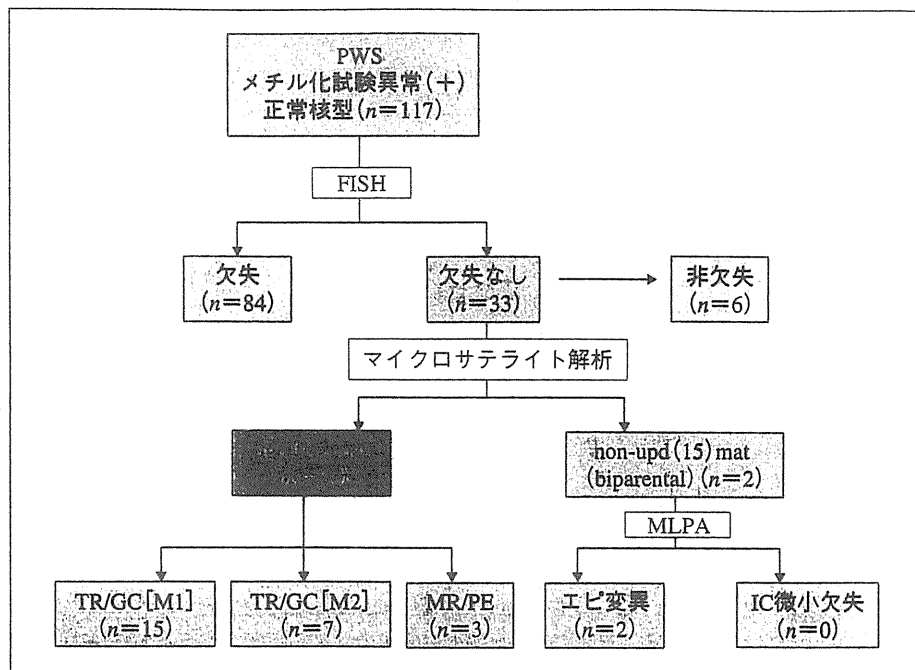


図3 日本人 PWS 117 名の分子遺伝学的解析結果

または GC による upd(15)mat (「TR/GC [M2] 群」) とした。これは図 1 に示すように、第 2 減数分裂不分離が生じると、動原体周辺がアイソダイソミー状態になるためである (なお、遠位部は組み換えが奇数回であればヘテロダイソミーとなり、偶数回であればアイソダイソミーとなるため、③に示す MR との鑑別には中部から遠位部にヘテロダイソミーが存在するか否かが重要である)。

③有意な情報の得られたすべての座位でアイソダイソミーが認められた場合、MR または PE による upd(15)mat (「MR/PE 群」) とした。これは図 1 に示すように、MR ではすべての座位がアイソダイソミーとなり、PE では体細胞分裂過程における姉妹染色分体間の組み換えがない限りすべての座位がアイソダイソミーとなるためである (なお、正常細胞とのモザイクの存在や部分的アイソダイソミーの存在は PE に特徴的である)。

ここで、TR と GC を区別することは不可能であるが、いずれも 2 倍体の卵子により介在される点で共通しており、高齢出産の影響は同等であると考えられる。一方、MR と PE は卵形成過程には異常がみられない現象であり、高齢出産の影響を受けない。

解析の結果、84 名の「欠失群」、15 名の「TR/GC [M1] 群」、7 名の「TR/GC [M2] 群」、3 名の「MR/PE 群」、2 名の「エピ変異群」が同定された (図 3)。また、FISH 解析で欠失が認められなかった症例のうち、6 名で両親によるマイクロサテライト解析の同意を得られなかったため、この 6 症例を「非欠失群」と分類した。PE を示唆するような部分的なアイソダイソミーや正常細胞とのモザイクを呈した症例は同定されなかった。

#### b. 出産年齢と病因

図 4-a に、各発症原因別の患者出生時における両親の年齢の分布を示す。「TR/GC [M1] 群」における患者出生時母親年齢はすべて 35 歳以上 (中央値 37 歳、範囲 35~45 歳) であり、「欠失群」の母親年齢 (中央値 30 歳、範囲 19~42 歳) に比較して有意に高齢であった ( $p=1.0 \times 10^{-7}$ )。また、一般集団において高齢出産傾向が顕著となった 2003 年以降に出生した PWS 患者の患者出生時母親年齢は、2002 年以前出生群のそれと比し有意に上昇しており ( $p=0.00017$ )、PWS 患者集団においても 2003 年以降の高齢出産傾向は明らかであった (表 2)。

次に、2002 年以前と 2003 年以降に出生した患

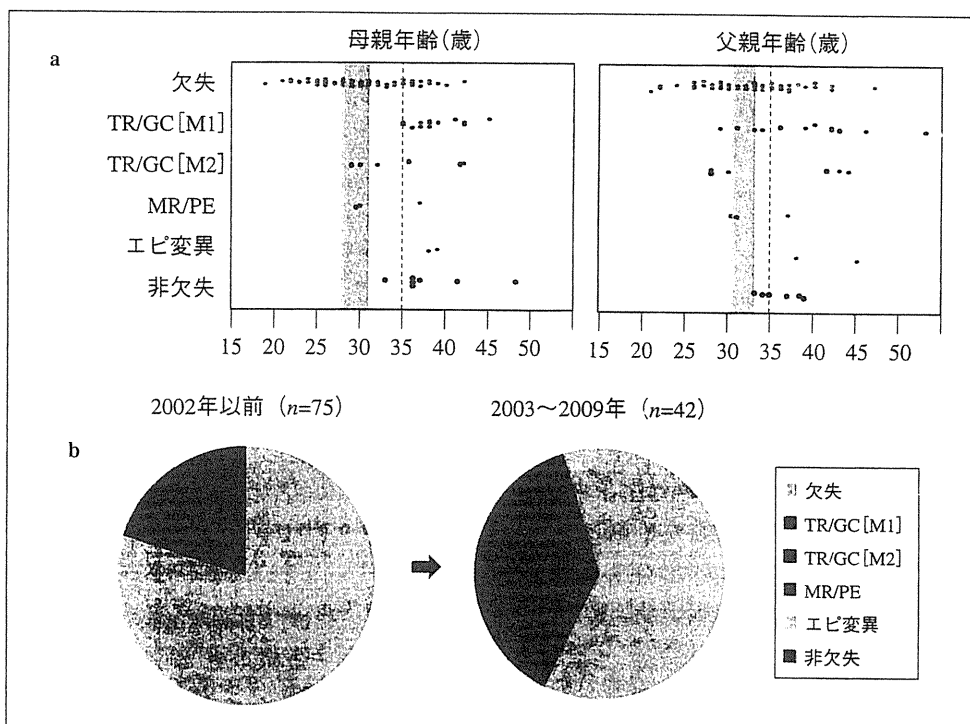


図4 各群の両親年齢，相対的頻度の比較

a: 各発症原因別の患者出生時の両親年齢の分布を示した。図中のグレーのバーで示された範囲は1970～2008年に出生した児の両親年齢の平均値である

b: 2002年以前と2003年以降に出生した患者群におけるPWS病因の相対的頻度の比較

表2 患者出生時の両親年齢

発症原因	中央値	2002年以前	2003年以降
		出生群	出生群
母親年齢	中央値	30 <sup>*1</sup>	35 <sup>*1</sup>
	範囲	19～48	23～45
	人数	75	42
父親年齢	中央値	33 <sup>*2</sup>	34.5 <sup>*2</sup>
	範囲	21～47	22～53
	人数	72	42

\*<sup>1</sup>:  $p=0.00017$ , \*<sup>2</sup>:  $p=0.12$

者群において，各発症原因の相対的頻度を比較した(図4-b)。2002年以前に出生した患者75名中，「欠失群」が60名，「TR/GC [M1]群」が3名，「TR/GC [M2]群」が5名，「MR/PE群」が1名，「非欠失群」が6名であった。一方，2003年以降に出生した患者42名では，「欠失群」が24名，「TR/GC [M1]群」が12名，「TR/GC [M2]群」が2名，「MR/PE群」が2名，「エピソード群」が2名であり，2003年以降出生群において「TR/

GC [M1]群」の相対的頻度は有意に上昇していた( $p=1.8 \times 10^{-7}$ )。2002年以前出生群に含まれる6名の「非欠失群」の患者すべてが「TR/GC [M1]群」であったと仮定しても，2003年前後において「TR/GC [M1]群」の相対的頻度は有意に増加していた( $p=0.025$ )。

上記の解析結果は，患者出生時の母親の高年齢が「TR/GC [M1]群」によるupd(15)mat発症のリスク因子であることを示唆するものである。なお，男性の加齢に伴い精子内の染色体の微小欠失や数的異常が生じる可能性が示唆されていることから<sup>8)</sup>，父親の高年齢が染色体の微小欠失を有する精子やnullisomic spermの形成を介して欠失あるいはGCやMRによるupd(15)matの発症リスクとなる可能性がある。しかしPWS患者集団において，2002年以前出生群と2003年以降出生群の間で患者出生時父親年齢の違いは認められず(表2)，「欠失群」や「MR/PE群」の相対的頻度も変化していなかった(図4-b)。また，GCの過程におけるnullisomic spermとdisomic oocyteの

同時発生は非常にまれであり、「TR/GC [M1] 群」の中で GC を介した upd(15)mat の頻度は低いと推測される。したがって、この解析結果からは、PWS 病因の変化における父親年齢の関与は大きくないと考えられる。

#### ◎おわりに

高齢出産に伴う PWS 病因の相対的比率の変化について述べた。PWS 病因の相対的比率に変化を及ぼしうる高齢出産以外の因子として、環境因子なども考慮する必要がある。女性の加齢に伴って、環境物質に対する曝露期間が長くなることで卵子の減数分裂の異常が起こりやすくなる可能性が示唆されている<sup>9)</sup>。また、父親の hydrocarbon に対する曝露が PWS 発症のリスク因子であるという報告も存在する<sup>10)</sup>。これらの因子単独で PWS 発症原因の相対的頻度の変化を説明することは難しいが、高齢出産以外の因子が PWS 発症に与える影響については今後の検討課題である。

#### 参考文献

- 1) Shaffer LG, *et al.* : American college of medical genetics statement on diagnostic testing for uniparental disomy. *Genet Med* 3 : 206-211, 2001
- 2) Jones KT : Meiosis in oocytes : predisposition to aneuploidy and its increased incidence with age. *Hum Reprod Update* 14 : 143-158, 2008
- 3) Cassidy SB, *et al.* : Comparison of phenotype between patients with Prader-Willi syndrome due to deletion 15q and uniparental disomy 15. *Am J Med Genet* 68 : 433-440, 1997
- 4) Ginsburg C, *et al.* : The comparison of uniparental disomy to congenital development defects in children born to mothers at advanced childbearing age. *Am J Med Genet* 95 : 454-460, 2000
- 5) Whittington JE, *et al.* : Changing rates of genetic subtypes of Prader-Willi syndrome in the UK. *Eur J Hum Genet* 15 : 127-130, 2007
- 6) Matsubara K, *et al.* : Maternal age effect on the development of Prader-Willi syndrome resulting from upd(15)mat through meiosis I errors. *J Hum Genet* 56 : 566-571, 2011
- 7) Robinson WP, *et al.* : Maternal meiosis I non-disjunction of chromosome 15 : dependence of the maternal age effect on level of recombination. *Hum Mol Genet* 7 : 1011-1019, 1998
- 8) Slotter E, *et al.* : Effects of male age on the frequencies of germinal and heritable chromosomal abnormalities in humans and rodents. *Fertil Steril* 81 : 925-943, 2004
- 9) Pacchierotti F, *et al.* : Gender effects on the incidence of aneuploidy in mammalian germ cells. *Environ Res* 104 : 46-69, 2007
- 10) Cassidy S, *et al.* : Occupational hydrocarbon exposure among fathers of Prader-Willi syndrome patients with or without deletions of 15q. *Am J Hum Genet* 44 : 806-810, 1989

## IX 最近のトピックス

## 2 Prader-Willi 症候群と生殖補助医療

国立成育医療研究センター研究所分子内分泌研究部 松原圭子  
 浜松医科大学医学部小児科 緒方 勤

## 1 生殖補助医療

## a. 生殖補助医療のあゆみ

1978年, Edwards と Steptoe による世界初の体外受精 (in vitro fertilization: IVF)・胚移植 (embryo transfer: ET) による子どもの誕生以来, 生殖補助医療 (assisted reproductive technologies: ART) は目覚ましい進歩を遂げ, 1992年代はじめには Palermo らが, 男性不妊に対する卵細胞質内精子注入法 (intracytoplasmic sperm injection: ICSI) による妊娠・出産に成功した。その後も, 精子採取法の開発, 胚培養・胚凍結技術の進歩, 卵巣刺激法の個別化などにより ART の成功率は向上し, ART 出生児数は世界的に増加しつつある<sup>1)</sup>。

## b. ART の定義

ART には, IVF, ICSI, 配偶子卵管内移植 (gamete intra-fallopian transfer: GIFT), 接合子卵管内移植 (zygote intra-fallopian transfer: ZIFT), tubular embryo transfer, 配偶子/胚凍結保存, 卵子/胚提供, 代理懐胎などが含まれる。一方, 配偶者および非配偶者間人工授精 (artificial insemination with husbands' semen: AIH, artificial insemination with donor's semen: AID) や排卵誘発剤使用のみ (controlled ovarian stimulation: COS) は含まれない<sup>2)</sup>。

## c. 日本における ART の普及

母親の出産年齢は徐々に上昇し, 2008年には35歳以上の母親による出生児数が全出生児の約20%を占めるようになった (図1)<sup>3~5)</sup>。また, 1983年の鈴木らによる IVF 出生児, 1994年の片寄らによる ICSI 出生児の誕生以降, わが国におけ

る ART 出生児は飛躍的に増加し, ART 出生児の頻度は1997年には全出生児の約0.8%であったのに対し, 2008年には全出生児の約1.9%となった。

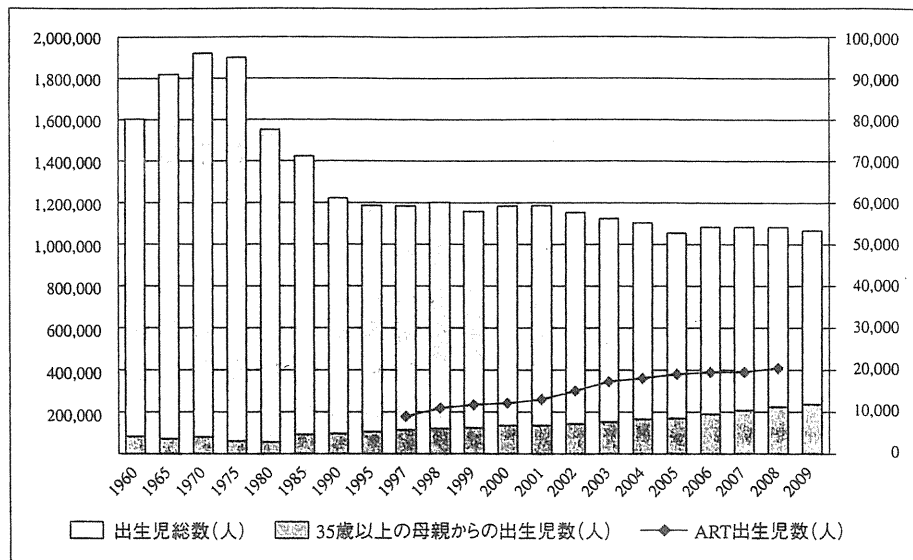
## 2 ART とゲノム刷り込み疾患発症の関連

ゲノム刷り込み疾患を発症させる機序として, 刷り込み領域の構造異常 (重複や欠失), 刷り込み遺伝子内変異, 片親性ダイソミー (uniparental disomy: UPD), エピ変異の四つがある。このうち ART との関連が示唆されているのは, UPD とエピ変異である。

## a. ART と UPD

UPD とは, 相同染色体のすべて, あるいは一部をとともに片親から由来する状態である。刷り込み領域を含む UPD は刷り込み遺伝子の発現異常を招き, 刷り込み疾患発症の原因となる。

Prader-Willi 症候群 (PWS) における15番染色体母性 UPD [maternal uniparental disomy 15: upd (15)mat] では, 一对の15番染色体が母親からのみ受け継がれる。15番染色体 q11-13 領域にはいくつかの父性発現刷り込み遺伝子が存在し, これらの発現喪失により PWS 表現型が発症すると考えられている。また, 重度精神遅滞, 難治性てんかん, 失調歩行, 笑い発作, 特異的顔貌などを呈する Angelman 症候群 (AS) の約7%では, 15番染色体父性片親性ダイソミー [paternal uniparental disomy 15: upd (15)pat] が認められる。upd (15)pat では一对の15番染色体がともに父親から受け継がれており, 15q11-13 領域に存在する母性発現刷り込み遺伝子である *UBE3A* の脳内にお



**図1** わが国における高齢出産傾向と ART 出生児の増加  
(日本産婦人科学会：ART 臨床実施成績 (2005～2008 年分), 日本産婦人科学会倫理委員会：倫理委員会・登録・調査小委員会報告, 厚生労働省：人口動態調査をもとに作成)

ける発現低下により AS の臨床症状が引き起こされると考えられている<sup>6)</sup>(UBE3A は脳においてのみ刷り込みを受ける)。

女性の高齢出産は、Down 症候群の発症率から知られるように、第 1 減数分裂における不分離発症のリスク因子である。そして、減数分裂の不分離から生じたダイソミー卵子は trisomy rescue や gamete complementation を介した母性 UPD の、モノソミー卵子は monosomy rescue を介した父性 UPD の発症リスク因子であると考えられる [UPD の発症機序については「高齢出産に伴う Prader-Willi 症候群病因の変化」(p.133) を参照]。ART は通常、高年齢の夫婦を対象としているため、ART の手技それ自体ではなく、高齢出産という因子が UPD を介した刷り込み疾患発症に影響を及ぼす可能性がある (PWS では upd (15) mat 発症の増加に参与する)。一方で、排卵誘発剤投与量の異なる 2 群で IVF 後胚の異数性を検討した randomized controlled trial によると、排卵誘発剤投与量の少ない群で異数性を有する胚の頻度が低かった<sup>7)</sup>。この結果は、排卵誘発剤投与により異数性を有する卵子の形成を介した UPD の発症が惹起される可能性を示唆するものである。しかし、その後の追試は行われておらず、排卵誘発剤使用と UPD 発症の関連についての最終的な結論

は得られていない。

#### b. ART とエピ変異

刷り込み領域には通常、父親由来と母親由来で異なるメチル化状態を示すメチル化可変領域 (differentially methylated region : DMR) が存在する。DMR のメチル化状態は親由来特異的に決定され、この DMR のメチル化状態 (メチル化、非メチル化) により、刷り込み遺伝子の親由来特異的発現パターンが制御されている。生殖細胞系列における親由来特異的 DMR のメチル化状態は、胎生期の始原生殖細胞で一度消去されたのち、胎児の性に応じたメチル化パターンが確立する<sup>8)</sup>。配偶子に由来し、初期胚に起こる大規模な脱メチル化を免れる DMR は primary DMR とよばれ、primary DMR の親由来メチル化パターンは胚発生の全過程において維持される (図 2-a)。一方、初期胚において受精後の脱メチル化を受けた部位は、発生の過程で新たな分化を開始するのに必要な再メチル化を受ける (図 2-b)。このとき、胚外組織のメチル化の程度は、胚組織のメチル化の程度と比較し低メチル化の傾向にあることが知られている。

エピ変異とは、この DMR が異常な高メチル化あるいは低メチル化を示す状態と定義される。このエピ変異は刷り込み遺伝子の発現に影響を及ぼ



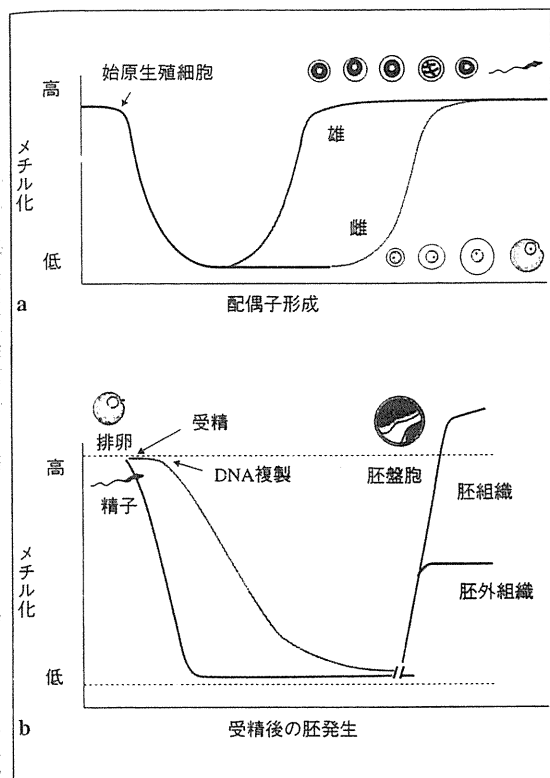


図2 生殖細胞系列と初期胚におけるメチル化の変化

(Reik W, et al.: Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293: 1089-1093, 2001 より引用, 一部改変)

し、ダイソミーと同様の症状を生じ、刷り込み疾患の発症原因となる。これに関し、Cox らにより、ART がエピ変異を介した Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) 発症リスクとなりうることが報告された<sup>9)</sup>。BWS とは、過成長、巨舌、臍ヘルニアを 3 主徴とする先天異常で、5~10%に胎児性腫瘍を合併する疾患である。BWS の 50~60%は、11 番染色体上の刷り込み領域の異常により発症する。中でも、Kv-DMR の低メチル化による BWS 発症リスクは、ART により 4~9 倍増加することが示された<sup>10~14)</sup>。また同様に、15q11-13 領域内の刷り込み遺伝子である *UBE3A* の異常に起因する AS においても、ART により責任領域の DMR の低メチル化が約 6 倍増加することが報告された<sup>9,15,16)</sup>。さらに、複数の DMR でメチル化異常が認められる maternal hypomethylation 症候群症例が ART 出生児 3 例で同定され、これらの症例の存在からも ART とメチル化異常の関連が示唆さ

れる<sup>17)</sup>。しかし、その後の ART 出生児を対象としたフォローアップ研究において、ART と刷り込み疾患発症の関連は必ずしも認められず、これらの関連について最終的な結論は得られていない。

ART がエピ変異を介して刷り込み疾患を発症させる機序には不明な点が多いが、以下の因子の関与が推測されている<sup>18)</sup>。

第一は、不妊傾向それ自体である。不妊体質と配偶子のメチル化異常や刷り込み疾患発症との関連は、不妊傾向のある夫婦で ART の有無にかかわらず AS の発症リスクが高いこと<sup>19)</sup>、乏精子症患者の一部で精子のメチル化異常が存在し、ART による生産分娩率が低いこと<sup>20)</sup>から示唆される。

第二は、排卵誘発剤の使用である。排卵誘発により成熟促進された卵子やそれを用いて作製された初期胚において、複数の DMR のメチル化異常が認められたことから<sup>21)</sup>、排卵誘発剤投与により卵子や胚にメチル化異常が起こり、刷り込み疾患が引き起こされる可能性は否定できない。卵子のメチル化パターン確立には長時間を要するが(図 2-a)、排卵誘発により、このメチル化の確立が不十分に終わる可能性がある。

第三は、物理的操作である。IVF/ICSI/ET 操作により卵子や胚に物理的な障害が及び、細胞内の構造異常やゲノム刷り込み機構の障害が引き起こされる可能性が示唆されている<sup>22)</sup>。

第四は、卵子や胚の体外培養である。動物実験から、体外培養された卵子や胚においてメチル化が正常に維持されない可能性が示唆されている<sup>23,24)</sup>。ART における体外培養の過程で、正常な DNA メチル化の獲得が障害され、刷り込みの異常が引き起こされる可能性がある。

### 3 PWS と ART

#### a. 海外の報告

Sutcliffe らの解析した PWS 163 例中、2 例の ICSI 症例および 7 例の fertility drug (詳細不明) 使用後症例が含まれており、発症原因解析が施行された 2 例で欠失が認められた<sup>14)</sup>。オランダの PWS 患者 86 例のうち、2 例の ART 症例、1 例の AIH、1 例の排卵誘発剤使用症例が含まれており、このうち 3 例で欠失が認められた<sup>25)</sup>。また、デン

表1 ARTにより出生したPWS症例

	性別	出生年	ART	発症原因	父親年齢(歳)	母親年齢(歳)
Pt.1	F	1998	ICSI	TR/GC [M2]	44	42
Pt.2	F	1998	ICSI	欠失	42	38
Pt.3	M	2004	IVF	TR/GC [M1]	42	41
Pt.4	M	2007	ICSI	TR/GC [M1]	42	39
Pt.5	F	2007	ICSI	TR/GC [M1]	53	45
Pt.6	M	2007	ICSI	欠失	37	36
Pt.7	M	2008	ICSI	TR/GC [M1]	40	38

TR/GC [M1]: 第1減数分裂不分離後 trisomy rescue または gamete complementation による upd(15)mat 症例  
 TR/GC [M2]: 第2減数分裂不分離後 trisomy rescue または gamete complementation による upd(15)mat 症例

マークで実施された prospective study では, ART 出生児 6,052 例中, PWS 患者は認められず, 逆に自然妊娠による出生児 442,349 例中 3 例の PWS 患者が見出され, この研究からは ART と PWS 発症の関連は見出されなかった<sup>26)</sup>. このように, ART と PWS 発症の関連の有無についてはいまだ明確な結論が得られていないのが現状である.

b. 日本人 PWS と ART

日本産婦人科学会による ART 臨床実施データ (<http://plaza.umin.ac.jp/~jsog-art/>) が存在する 1997~2008 年に出生し, 獨協医科大学越谷病院小児科で経過観察されている PWS 集団と一般集団における ART 出生児頻度を比較した. PWS 患者 74 例中 ART により出生した患者は 7 例 (9.5%) であったのに対し (表 1), 一般集団では同じ期間に出生した児の 1.4% が ART 出生児であり, この頻度は有意に異なった (表 2).

次に, PWS 患者の発症原因を分子遺伝学的解析により分類し, PWS 発症原因の相対的頻度を比較した [解析法および詳細な分類法については「高齢出産に伴う Prader-Willi 症候群病因の変化」(p.133) を参照]. ART 出生 PWS 患者 7 例中, 父親由来刷り込み領域の欠失患者が 2 例 (28.6%) で, 第1減数分裂不分離後の trisomy rescue または gamete complementation を介した upd(15)mat

表2 ART 出生児数の比較

	IVF/ICSI	自然妊娠	頻度
PWS(1997~2008年出生)	7	67	9.5%*
一般(1997~2008年出生)	187,198	1,3470,859	1.4%*

\*:  $p=2.2 \times 10^{-9}$

表3 TR/GC [M1] の相対頻度の比較

a: PWS 患者全体

	母親年齢(歳) 中央値(範囲)	TR/GC [M1]	others
ART(1997~2008年)	39(36~45)* <sup>1</sup>	4* <sup>2</sup>	3
自然妊娠(1997~2008年)	32(19~42)* <sup>1</sup>	11* <sup>2</sup>	56

b: 35歳以上の母親から出生したPWS患者

	母親年齢(歳) 中央値(範囲)	TR/GC [M1]	others
ART(1997~2008年)	39(36~45)* <sup>3</sup>	4* <sup>4</sup>	2
自然妊娠(1997~2008年)	37.5(35~42)* <sup>3</sup>	12* <sup>4</sup>	14

\*<sup>1</sup>:  $p=0.0008$ , \*<sup>2</sup>:  $p=0.028$ , \*<sup>3</sup>:  $p=0.1$ , \*<sup>4</sup>:  $p=0.39$

(TR/GC [M1]) 症例が 4 例 (57.1%) で認められた (表 1). ART により出生した AS や BWS 症例の多くで認められるエピ変異は, 解析を行った PWS 患者集団では同定されなかった. ART 出生 PWS 患者群の upd(15)mat (TR/GC [M1]) の相対的頻度は, 自然妊娠で出生した PWS 群のそれと比較し有意に高頻度であった (表 3-a). しかし, ART 出生群の患者出生時の母親年齢が自然妊娠群の患者出生児母親年齢より高齢であり, 高齢出産が upd(15)mat (TR/GC [M1]) 発症のリスク因子であることから [「高齢出産に伴う Prader-Willi 症候群病因の変化」(p.133) を参照], 出生時の母親年齢を適合させて検討した結果, TR/GC [M1] の相対的頻度は, ART 出生 PWS 患者群と 35 歳以上の母親から自然妊娠で出生した PWS 群患者 TR/GC [M1] の間で同等であった (表 3-b).

PWS 患者集団において ART 出生児の頻度が高かったことは, ART およびその関連因子 (不妊傾向, 環境因子など) が総和として PWS 発症のリスク因子となる可能性を示唆するものである. 一方, ART 出生 PWS 患者群において認められた upd(15)mat (TR/GC [M1]) の相対的頻度の高値には, ART そのものより, ART 関連因子である

高齢出産や不妊傾向、環境因子などが影響を及ぼしていると考えられる。

### ◎おわりに

ART と刷り込み疾患発症の関連について述べた。ART 出生児において、一部の刷り込み疾患の発症頻度が高いという報告は存在する。しかし、これらの研究では ART 以外の交絡因子（患者出生時母親年齢、環境因子、不妊傾向など）は考慮されていない。したがって今後、ART と刷り込み疾患の関連性を検討するためには、これらの交絡因子を加味した研究計画を立案することが重要である。

### 参考文献

- 1) 森 崇英, 他: 図説 ART マニュアル. 改訂第 2 版, 永井書店, 1-6, 2005
- 2) Zegers-Hochschild F, *et al.*: International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertil Steril* 92: 1520-1524, 2009
- 3) 日本産婦人科学会: ART 臨床実施成績 (2005~2008 年分), URL: <http://plaza.umin.ac.jp/~jsog-art/data.htm>
- 4) 日本産婦人科学会倫理委員会: 倫理委員会・登録・調査小委員会報告, URL: <http://www.jsog.or.jp/activity/report.html>
- 5) 厚生労働省: 人口動態調査, URL: <http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/81-1.html>
- 6) Van Buggenhout G, *et al.*: Angelman Syndrome. *Eur J Hum Genet* 17: 1367-1373, 2009
- 7) Barrt E, *et al.*: Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 22: 980-988, 2007
- 8) Reik W, *et al.*: Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293: 1089-1093, 2001
- 9) Cox GF, *et al.*: Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* 71: 162-164, 2002
- 10) DeBaun MR, *et al.*: Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet* 72: 156-160, 2003
- 11) Gicquel C, *et al.*: In vitro fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the *KCN1OT* gene. *Am J Hum Genet* 72: 1338-1341, 2003
- 12) Maher ER, *et al.*: Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART). *J Med Genet* 40: 62-64, 2003
- 13) Halliday J, *et al.*: Beckwith-Wiedemann syndrome and IVF: a case-control study. *Am J Hum Genet* 75: 526-528, 2004
- 14) Sutcliffe AG, *et al.*: Assisted reproductive therapies and imprinting disorders-a preliminary British survey. *Hum Reprod* 21: 1009-1011, 2006
- 15) Orstavik KH, *et al.*: Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection. *Am J Hum Genet* 72: 218-219, 2003
- 16) Ludwig M, *et al.*: Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples. *J Med Genet* 42: 289-291, 2005
- 17) Katari S, *et al.*: DNA methylation and gene expression differences in children conceived *in vitro* or *in vivo*. *Hum Mol Genet* 18: 3769-3778, 2009
- 18) Amor DJ, *et al.*: A review of known imprinting syndromes and their association with assisted reproduction technologies. *Hum Hered* 23: 2826-2834, 2008
- 19) Ludwig M, *et al.*: Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples. *J Med Genet* 42: 289-291, 2005
- 20) Kobayashi H, *et al.*: Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Hum Mol Genet* 16: 2542-2551, 2007
- 21) Market-Velker BA, *et al.*: Dual effects of superovulation: loss of maternal and paternal imprinted methylation in a dose-dependent manner. *Hum Mol Genet* 19: 36-51, 2010
- 22) Rivera RM, *et al.*: Manipulations of mouse embryos prior to implantation result in aberrant expression of imprinted genes on day 9.5 of development. *Hum Mol Genet* 17: 1-14, 2008
- 23) Doherty AS, *et al.*: Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod* 62: 1526-1535, 2000
- 24) Fauque P, *et al.*: Assisted reproductive technology affects developmental kinetics, H19 imprinting control region methylation and H19 gene expression in individual mouse embryos. *BMC Dev Biol* 7: 116, 2007
- 25) Doornbos ME, *et al.*: Infertility, assisted reproduction technologies and imprinting disturbances: a Dutch study. *Hum Reprod* 22: 2476-2480, 2007
- 26) Lidgaard O, *et al.*: Imprinting diseases and IVF: Danish National IVF cohort study. *Hum Reprod* 20: 950-954, 2005

## Maternal Uniparental Disomy 14 Syndrome Demonstrates Prader-Willi Syndrome-Like Phenotype

Kana Hosoki, MS, Masayo Kagami, MD, PhD, Touju Tanaka, MD, PhD, Masaya Kubota, MD, PhD, Kenji Kurosawa, MD, PhD, Mitsuhiro Kato, MD, PhD, Kimiaki Uetake, MD, Jun Tohyama, MD, PhD, Tsutomu Ogata, MD, PhD, and Shinji Saitoh, MD, PhD

**Objective** To delineate the significance of maternal uniparental disomy 14 (upd(14)mat) and related disorders in patients with a Prader-Willi syndrome (PWS)-like phenotype.

**Study design** We examined 78 patients with PWS-like phenotype who lacked molecular defects for PWS. The *MEG3* methylation test followed by microsatellite polymorphism analysis of chromosome 14 was performed to detect upd(14)mat or other related abnormalities affecting the 14q32.2-imprinted region.

**Results** We identified 4 patients with upd(14)mat and 1 patient with an epimutation in the 14q32.2 imprinted region. Of the 4 patients with upd(14)mat, 3 had full upd(14)mat and 1 was mosaic.

**Conclusions** Upd(14)mat and epimutation of 14q32.2 represent clinically discernible phenotypes and should be designated "upd(14)mat syndrome." This syndrome demonstrates a PWS-like phenotype particularly during infancy. The *MEG3* methylation test can detect upd(14)mat syndrome defects and should therefore be performed for all undiagnosed infants with hypotonia. (*J Pediatr* 2009;155:900-3).

Maternal uniparental disomy 14 (upd(14)mat) is characterized by prenatal and postnatal growth retardation, neonatal hypotonia, small hands and feet, feeding difficulty, and precocious puberty.<sup>1</sup> Chromosome 14q32.2 contains several imprinted genes, and loss of expression of paternally expressed genes including *DLK1* and *RTL1* is believed to be responsible for upd(14)mat phenotype.<sup>2</sup> Thus far, 5 patients with epimutations and 4 patients with a microdeletion affecting the 14q32.2 imprinted region have been reported to have upd(14)mat-like phenotype.<sup>2-4</sup> Paternal uniparental disomy 14 (upd(14)pat) shows a distinct and much more severe phenotype characterized by facial abnormality, bell-shaped thorax and abdominal wall defects.<sup>1</sup> Initially, upd(14)mat was identified in patients with Robertsonian translocations involving chromosome 14, but increasing numbers of patients with a normal karyotype have been recognized.<sup>1,5</sup> Because maternal uniparental disomy 15 is responsible for the condition in more than 20% of patients with Prader-Willi syndrome (PWS), of which the overall prevalence is more than 1 in 15000 births,<sup>6</sup> one could suspect that upd(14)mat is underestimated. Phenotype of upd(14)mat is known to resemble that of PWS, which is characterized by neonatal hypotonia, small hands and feet, mental retardation, and hyperphagia resulting in obesity beyond infancy. Mitter et al<sup>7</sup> recently reported that upd(14)mat was detected in 4 of 33 patients who were suspected to have PWS and raised the question that upd(14)mat could be present in patients with PWS-like phenotype. Thus we examined patients who presented with PWS-like phenotype, but in whom PWS had been excluded.

### Methods

The median age of the 78 patients enrolled in the study was 18.5 months, and the range was 1.4 to 324 months. Sex ratio was 1:1. All patients demonstrated PWS-like phenotype including hypotonia during infancy. We initially performed the *SNURF-SNRPN* DNA methylation test, and normal methylation results excluded the diagnosis of PWS.<sup>8</sup>

This study was approved by the Institutional Review Board Committees at Hokkaido University Graduate School of Medicine and National Center for Child Health and Development. The parents of the patients gave written informed consent.

DNA methylation status at the promoter region of imprinted *MEG3*, located in 14q32.2, was examined (Figure 1). Genomic DNA was extracted from leukocytes and treated with sodium bisulfite, and methylated allele- and unmethylated allele-specific primers were used to polymerase chain reaction amplify each allele, as described previously.<sup>9</sup> If aberrant DNA methylation was identified,

PWS	Prader-Willi syndrome
Upd(14)mat	Maternal uniparental disomy 14
Upd(14)pat	Paternal uniparental disomy 14

From the Department of Pediatrics, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo (K.H., S.S.), the Department of Endocrinology and Metabolism (M.Kagami, T.O.), the Division of Clinical Genetics and Molecular Medicine (T.T.), and the Department of Pediatric Neurology (M. Kubota), National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, the Division of Medical Genetics, Kanagawa Children's Medical Center, Yokohama (K.K.), the Department of Pediatrics, Yamagata University School of Medicine, Yamagata (M. Kato), the Department of Pediatrics, Obihiro Kosei Hospital, Obihiro (K.U.), and the Department of Pediatrics, Nishi-Niigata Chuo National Hospital, Niigata (J.T.), Japan

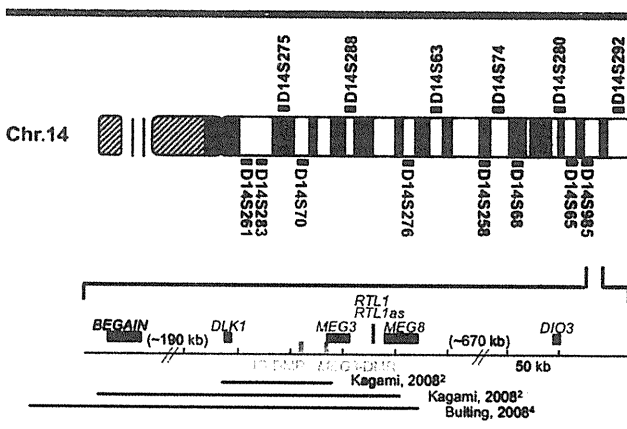
This work was partially supported by a grant from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan. The authors declare no conflicts of interest.

0022-3476/\$ - see front matter. Copyright © 2009 Mosby Inc. All rights reserved. 10.1016/j.jpeds.2009.06.045

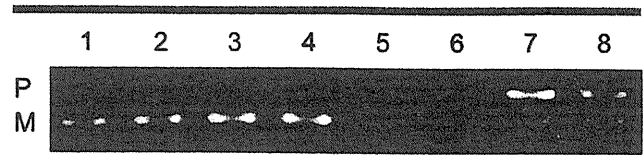
we carried out microsatellite polymorphism analysis for 16 loci on chromosome 14 (ABI PRISM Linkage Mapping Set v2.5; Applied Biosystems, Foster City, California) with DNA from the patients and their parents (Figure 1). Polymerase chain reaction products were analyzed on an ABI310 automatic capillary genetic analyzer and with GeneMapper software (Applied Biosystems). If aberrant DNA methylation was identified but the patient demonstrated biparental origin of the chromosome 14s, we further examined the chromosomes for DNA methylation state, parental origin, and microdeletion in 14q32.2, as described previously.<sup>2,3</sup>

## Results

We identified abnormal hypomethylation at the *MEG3* promoter in 5 of 78 patients (Figure 2). Almost complete lack of methylation was found in 4 patients (case 1 to 4), but 1 patient (case 5) demonstrated faint methylation. Polymorphism studies demonstrated that 3 (cases 2 to 4) of the 4 patients with complete lack of *MEG3* promoter methylation had complete upd(14)mat, but 1 patient (case 1) had inherited both parental alleles (Table I; available at www.jpeds.com). We further examined the DNA methylation state and microdeletion or segmental upd at 14q32.3, and concluded that this patient (case 1) had an epimutation. The detailed data have been reported previously.<sup>3</sup> The patient (case 5) with faint *MEG3* methylation was demonstrated to have 2 maternal alleles, as well as 1 paternal allele with lower signal intensity. This indicated mosaicism of upd(14)mat (80%) and a normal karyotype (20%) (Figure 3; available at www.jpeds.com).



**Figure 1.** Schematic map of the 14q32.2 imprinted region. Loci on chromosome 14 represent markers used for microsatellite polymorphism analysis. Paternally expressed genes are shown in blue, maternally expressed genes in red, and nonimprinted genes are shown in black. Differentially methylated regions (DMRs) are shown in green. IG-DMR, Intergenic DMR. Reported microdeletions are demonstrated as horizontal bars.



**Figure 2.** *MEG3* methylation test. P, Paternal methylated signal; M, maternal unmethylated signal; 1-5, cases 1-5, respectively; 6, paternal uniparental disomy 14; 7, patient with PWS; 8, normal control. Cases 1-4 show only the maternal unmethylated signal, and case 5 shows a faint paternal methylated signal.

The profiles of the patients with upd(14)mat or an epimutation are shown in Table II. We compared clinical features in these patients (Table III). All patients were referred to us during infancy because of hypotonia and motor developmental delay. Small hands and feet were also present in all patients. Prenatal growth retardation was present in all but 1 patient (case 1) who was later shown to have an epimutation. However, this patient had development of postnatal growth retardation, which was present in all patients. Premature onset of puberty was not evaluated in this study because the patients were too young. Apparent intellectual delay was only present in the patient who had upd(14)mat mosaicism (case 5). The clinical features of the patients with epimutation or with mosaic upd(14)mat were not distinct from those of the patients with full upd(14)mat.

## Discussion

We detected 5 patients with upd(14)mat or epimutation at the 14q32.2-imprinted region in 78 subjects who had initially been suspected to have PWS. Mitter et al<sup>7</sup> reported that upd(14)mat was detected in 4 of 33 patients who were suspected to have PWS. However, Cox et al<sup>10</sup> reported that they did not find any upd(14)mat in 35 patients suspected to have PWS. Our study suggests that a significant number of patients with upd(14)mat are suspected to have PWS during infancy. To clarify how upd(14)mat and PWS share clinical features, we examined the clinical manifestations of our patients with upd(14)mat or an epimutation. All patients showed neonatal hypotonia and were referred to us during infancy. Feeding difficulty in the neonatal period and small hands and feet were also common to these patients and resembled features of PWS. It is noteworthy that all patients were referred during infancy, suggesting that upd(14)mat and PWS resemble each other, particularly during this period. Therefore upd(14)mat and related disorders, as well as PWS, should be important differential diagnoses for infants with hypotonia and feeding difficulty. Distinct features for upd(14)mat included less-specific facial characteristics, constant prenatal growth failure, and better intellectual development. Precocious puberty is not present in PWS; however, this was not evaluated in this study because the patients were not