

201128210A

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

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

(H23-難治-一般-054)

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		
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	.....	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	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

## 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

課題番号：H23-難治-054

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

生殖補助医療（ART）の普及により、特定の一部のゲノムインプリント異常疾患の発生頻度の増加が世界中で注目されている。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进行操作する事が原因であると推察されているためである。先天性ゲノムインプリンティング（GI）異常症には、以下の疾患が含まれる。Beckwith-Wiedemann 症候群（BWS）、Angelman 症候群（AS）、Prader-Willi 症候群（PWS）、Silver-Russell 症候群（SRS）、偽性副甲状腺機能低下症タイプIb（PHP1b）、クロム親和性パラガングリオーマ（PGL）、網膜芽細胞腫（Rb）。

本研究では、多施設共同（産婦人科、小児科、重症心身障害施設を含めた）の全国調査として、これら8疾患の頻度と臨床症状について医師質問票による疫学調査を施行し、同時にARTとの関連性について検索した。現在（12月）までの集計では、調査対象施設総数3153施設のうち、1376施設から有効回答があり（有効回答率43.6%）、報告患者総数は2837人であった（BWS：288人、AS：576人、PWS：1536人、SRS：213人、TNDM：42人、PHP1b：15人、Rb：167人）。各疾患の年齢別推移では、BWS、SRSは最近増加傾向にある事が判明した。疫学調査の結果、BWS、SRSの疾患は、それぞれ8.6%、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、BWS、SRSでは約10倍にリスクが高まる事が判明した。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い、メチル化異常（エピ変異）の頻度について解析した。その結果、ART出生児でも、エピ変異の頻度が高い傾向がみられた。晩婚化、少子化により今後もART出生児が増加すると予想される。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。

### 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  
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・  
岡江 寛明、宮内 尚子、佐藤 芙美

### A. 研究目的

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。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。我々は、これまでの調査によりGI 異常症のうち、SRSとBWSの患者では、ART と関連性が深い事を明らかにした。これには、ART が、GI 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、実態は全く不明である。また、PHP1b、PGL、Rbの3疾患も、インプリント異常で発症する疾患で、ART との因果関係が報告されている。8領域のメチル化異常の判定法（Luminex 法）を、特許出願している。

本研究では、1) 療育センターや重症心身障害者施設を含む全国多施設の協力下、GI 病に関する疫学調査（臨床像、治療内容、治療経過、合併症等）に加え、遺伝子診断を行う。その結果を基に、発症機序と病態、治療実態について疾患毎に評価する。2) メチル化異常の頻度、程度とART 治療内容との関連性について疾患別に交絡要因を考慮し、正確に評価し、関連がある場合は、そのリスク要因を明らかにする事を目的とする。

本研究の成果により、稀なインプリント病の遺伝子解析と診断手順の作成を行い、発症機序分類の基づいた病態、予後について明らかにする。GI 病とART の因果関係を認めた場合は、次世代社会の問題として早急な対応が必要とされ、リスク要因を特定し、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8疾患に関する全国多施設質問票調査

昨年度より、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ている。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3疾患を加えて追加質問票調査を行った。

#### (1) 対象施設・診療科：

昨年度同様に、施設と診療科を抽出した。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：

調査法は全て郵送法で行った。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。

## 【2】DNAの回収とメチル化インプリントの解析、報告

### (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) 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、インプリント遺伝子8領域のメチル化解析を行った。これには、DNA多型を利用した Bisulphite PCR シークエンス法を用い、正確に評価し、結果は医療機関の主治医に郵送で報告した。

### (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行った。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。ゲノム解析では、担当医師から説明、同意を得て行い、匿名化し、東北大学で解析した。結果は、担当医から、患者および家族に口頭で説明することとした。

## C. 研究結果

### 【1】先天性ゲノムインプリンティング病8疾患に関する全国調査

調査対象施設総数 3153 のうち、1376 施設から有効回答があり（有効回答率 43.6%）、報告患者総数は 2837 人であった。その内訳は、BWS が 288 人、AS が 576 人、PWS が 1536 人、SRS が 213 人、TNDM が 42 人、PHP1b が 15 人、PGL が 0 人、Rb が 167 人である。2837 例のうち 21.2%にあたる 601 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。

図 1 には、各疾患の症例数と年齢別推移を示した。総括すると、特に BWS、SRS は最近急増していることが疑われた。また、性別には、全ての疾患で有意な差は見られなかった。また、家族歴と近親婚の有無では、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、ほとんどが孤発例であった。AS においてのみ 1.6%の症例に近親婚が認められた。

不妊治療を受けたかどうか、また受けた場合はその治療内容（表 1）について示した。全体に、不妊治療を受けたかどうか分からない患者が多いことが特徴で、十分な情報が得られていないことが判明した。全体では、何らかの不妊治療を受けた事が判明している親は 10%程度で、一般に不妊治療を受けている割合と比較し、多いとはいえない。しかし、個々の疾患別で比較した場合、BWS、SRS の疾患は、それぞれ 8.6%、9.5%が不妊治療を受けていた。平成 17 年度の IVF+ICSI の出生児は年間 10338 人で全出生児の 0.86%であることから、SRS と BWS では約 10 倍リスクが高い事が判明した。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。

### 【2】疾患患者のインプリント遺伝子の DNA メチル化の解析

「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」で収集したサンプルとあわせて DNA メチル化異常（エピ変異）の発症頻度について解析した。血液および頬粘膜細胞 DNA を提供して頂いた症例は、81 名であった。その内訳は、BWS が 7 人、AS が 38 人、PWS が 25 人、SRS が 11 人であった。我々は、これまでに、これら疾患の原因となるヒトインプリント遺伝子の DNA メチル化領域を同定し、報告した。DNA メチル化の解析は、DNA 多型を含む Bisulphite PCR シークエンス法を用い、正確に評価した。エピ変異を認めた症例の結果は、BWS が 1 人、AS が 6 人、PWS が 12 人、SRS が 5 人であった（表 2）。現在、症例登録継続中であり、全測定結果がそろってから発生リスクについて再評価する。

## D. 考察

### ■先天性インプリント異常症と頻度と ART との関連性

全国 3153 施設の実態調査を行い、1376 施設（有効回収率 43.6%）より回答を得た。次に対象 8 疾患を治療している 380 施設のうち 171 施設より、臨床像や治療法等 14 項目についての回答を得た（総患者数は 593 名）。不妊治療を受けた患者は BWS、SRS で多くみられ、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 1 万人以上で、全出生児の 0.86%となり、SRS では 11.2 倍、BWS では 10 倍と圧倒的な高リスクが予想される。しかし、症例数も少なく、母親の年齢も考慮しなければ正確な評価は出来ない。さらに、これら疾患の発症率は、年齢が低い程高く、増加傾向に有る事が予想される。長期的な調査研究も重要と考えられる。全国医療機関では、独自の倫理委員会と倫理審査が行なわれている。また、倫理委員会開催時期も、年に数回の機関も存在する。東北大学では、倫理委員会を委託するシステムが存在する。広く周知することで、検体の収集

は、増加する事が予想される。また、コントロールとして、ART 治療を受けた児の DNA が必要である。東北大学関連不妊医療機関(クリニック)に依頼し、協力体制を確立していく。

#### ■疾患と DNA メチル化異常の頻度

ART との関連を評価する上で、正確な診断が必要である。つまり患者試料を用い、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、病型との関連性を見出す事である。そのためできるだけ多くの症例に関し、遺伝子解析を行なう必要がある。現時点で、81 名の患者の遺伝子解析を行っており、その結果評価し、最終結果として報告する予定である。各疾患の主な臨床症状の特徴と ART 児における特異な症状は見られなかった。症例数が少ない事も原因と考えられた。今後、DNA メチル化異常の頻度と症状との関連、ART との関連性について評価する。

#### ■調査体制と連携

先天性インプリント異常症と関連する疾患を含む合同班会議を実施し、互いに発表、質疑を行なった。合同班会議に参加したメンバーは、副島教授(佐賀大)、緒方教授(浜松医大)、斉藤教授(名古屋市立大)、鏡研究員(成育医療センター)で(千葉、11月11日)今後も継続して、班会議を行ない、情報交換の場にした。

#### ■今後の計画と展望

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、遺伝子診断の受託解析を行う。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。

#### E. 結論

全国 3153 施設の実態調査を行い、対象 8 疾患を治療している 380 施設のうち 171 施設より、臨床像や治療法等 14 項目についての特徴や実態が明らかとなった。現在のところ、報告患者総数は 2837 人で、その内訳は、BWS が 288 人、AS が 576 人、PWS が 1536 人、SRS が 213 人、TNDM が 42 人、PHP1b が 15 人、PGL が 0 人、Rb が 167 人である。ART との関連が深い疾患は BWS と SRS で、いずれもエピ変異の異常を示す症例が多いことが判明



した。今後、さらに症例を増やし、ARTによる疾患発症リスクについて評価し、結論付けたい。

## 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)   | 2. 実用新案登録 |
| 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におけるエピジェティクス異常」産婦人科の実際. 金原出版株式会社, 741-750, 2011 | なし        |
| 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・胚のエピジェティクス」卵子学. 京都大学学術出版会, 122-131, 2011              | 3. その他    |
| 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                           | なし        |
| 14. 有馬隆博, 樋浦仁, 岡江寛明, 宮内尚子, 佐藤英美. 「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」

BWS	年齢	性別	治療歴	
Case1	4	女性	排卵誘発、夫リンパ球免疫治療法	
Case2	4	男性	体外受精(IVF-ET)、人工授精(AIH)	
Case3	4	男性	体外受精(IVF-ET)	ARTによる出生率: 8.6%(6/70)
Case4	3	女性	体外受精(IVF-ET)	
Case5	2	男性	体外受精(IVF-ET)	
Case6	2	女性	顕微授精(ICSI)	
AS	年齢	性別	治療歴	
Case1	11	女性	排卵誘発のみ	ARTによる出生率: 1.6%(2/123)
Case2	2	女性	排卵誘発、人工授精(AIH)	
PWS	年齢	性別	治療歴	
Case1	15	女性	排卵誘発、人工授精(AIH)*凍結精子	ARTによる出生率: 1.5%(4/261)
Case2	6	女性	顕微授精(ICSI)	
Case3	3	女性	顕微授精(ICSI)	
Case4	1	男性	顕微授精(ICSI)	
Case5	3	男性	顕微授精(ICSI)	
Case6	0	男性	顕微授精(ICSI)	
Case7	1	女性	排卵誘発	
SRS	年齢	性別	治療歴	
Case1	4	女性	体外受精(IVF-ET)	ARTによる出生率: 9.5%(4/42)
Case2	2	男性	体外受精(IVF-ET)	
Case3	8	男性	顕微授精(ICSI)	
Case4	5	男性	体外受精(IVF-ET)*凍結卵	

■ARTによる出生率(ART出生児数/総出生児数) 0.86%(平成17年度)  
(厚生労働省報告)

表1 ゲノムインプリンティング異常症と不妊治療の関連

症例	ART治療後の患者数 / 患者総数	ART治療後の患者でエピソードの変異の症例数 / エピソードの変異症例数
BWS	6/71(8.6%)	7/15(36.8%)
AS	2/123(1.6%)	2/7(28.5%)
PWS	4/261(1.5%)	0/2(0.0%)
SRS	4/21(9.5%)	9/23(39.1%)

表2 ARTとエピソードの変異異常の関連

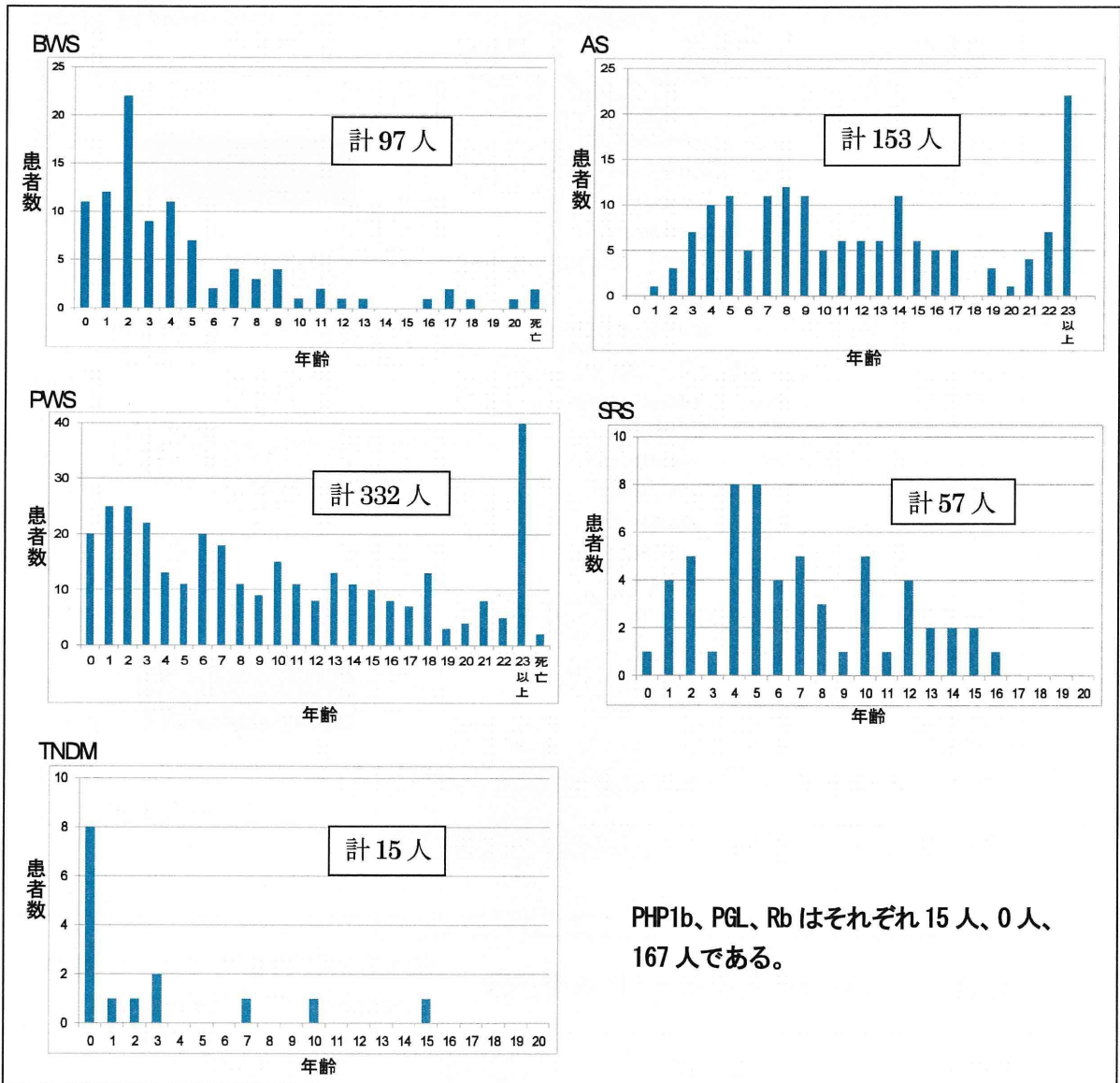


図1 ゲノムインプリンティング異常症の年齢推移

