

201231095A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患克服研究事業)

致死性骨異形成症の診断と予後に
関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 澤井英明

平成25(2013)年3月

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患克服研究事業)

致死性骨異形成症の診断と予後に
関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 澤井英明

平成25(2013)年3月

厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

I. 総括研究報告

- 致死性骨異形成症の診断と予後に関する研究 2
研究代表者 澤井英明

II. 分担研究報告

1. 重度胸郭形成不全を伴う第 14 染色体父性ダイソミー症候群の発症機序解明 10
研究分担者 緒方 勤
2. 致死性骨異形成症の診断と予後に関する研究 15
研究分担者 池川志郎
3. 胎児超音波計測による長管骨長の基準値作成 19
研究分担者 室月淳、澤井英明、山田崇弘、堤誠司、佐藤秀平
篠塚憲男、高橋雄一郎、佐世正勝
4. 致死性骨異形成症の iPS 細胞作成に関する研究 26
研究分担者 妻木範行
5. 致死性骨異形成症の診断と予後に関する研究～
2010年骨系統疾患国際分類の和訳に関する検討 28
研究分担者 芳賀信彦
6. 症例の収集と診断の支援システム構築 32
研究分担者 室月 淳、澤井英明、山田崇弘、堤 誠司、
佐藤秀平、林 聡、篠塚憲男、高橋雄一郎、佐世正勝、鬼頭浩史、
沼部博直、宮崎 治、緒方 勤、池川志郎、妻木範行、芳賀信彦
研究協力者 西村 玄

7. 胎児骨系統疾患の出生前診断と周産期ケアのガイドライン
作成に関する小委員会 平成24年度活動報告 34
研究分担者 室月 淳、篠塚憲男、佐世正勝、林 聡、山田崇弘
研究代表者 澤井英明、
8. 致死性骨異形成症の発達調査 40
研究代表者 澤井英明 研究協力者 潮田まり子 守井見奈

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

. 50

Ⅳ. 研究成果の刊行物・別冊

. 55

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
総括研究報告書

致死性骨異形成症の診断と予後に関する研究

研究代表者 澤井英明 兵庫医科大学産科婦人科准教授

研究要旨 致死性骨異形成症(疾患区分(17)奇形症候群)は稀な先天性骨系統疾患で、2人/10万分娩程度とされるが、正確な統計はなく、日本の症例数の概略も不明であった。本研究事業のH22年度 feasibility study で、全国1次調査として症例数と概要を明らかにし、73例(うち生産51例、死産4例、流産15例)を把握した。結果は致死性という名称にもかかわらず、周産期死亡率は56%であった。周産期死亡を起こさなかった24例のうち16例は1年以上生存しており、これは生産児の31%にあたる。H23年度は長期生存例の発達や経過を明らかにする2次調査を開始し平成24年度にデータ収集を終了した。この結果によると致死性骨異形成症はその名称とは異なり、周産期致死性とは必ずしも言えず、またこの疾患名が患児を育てている家族にとって違和感のある名称であることが明らかとなった。平成23年度に致死性骨異形成症という名称が実情に合わないとして名称の変更を提起し、平成24年度にタナトフォリック骨異形成症への変更が日本整形外科学会において承認された。本疾患は妊娠中の胎児の四肢長幹骨の著明な短縮が特徴で、早期診断は妊娠管理や分娩形式の決定など周産期管理に重要である。しかし現在は四肢長幹骨の正常値のデータがないため、超音波検査での四肢長幹骨の標準値作成プロジェクトを開始し、データ収集を完了し、平成24年度に一部の超音波断層装置に装備できる状態にすることができた。診断方法として近年は3次元胎児ヘリカルCTが導入されたが、胎児被爆、撮影条件、確定診断で重視すべき所見など、未解決の問題が山積しているため、放射線科医と技師による胎児CTサブグループを結成し、撮影条件や症例数などの全国で調査し、2次調査として、適応や撮影ガイドラインの作成を開始した。胎児骨系統疾患に詳しい各領域専門医の集まり「胎児骨系統疾患フォーラム」を基盤として、効率的な疾患の診断・登録を行い、臨床医を支援する仕組みを開始した。また平成24年度には文部科学省と厚生労働省の共同プロジェクトである「疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究」に研究班として参画することで、今後の治療に貢献すべく、倫理的な課題を克服し、骨の再生医療や細胞バンクへの取組を開始した。すでに致死性骨異形成症やII型コラーゲン異常症の検体の提供を行った。

研究分担者氏名 所属機関名及び所属機関における職名

室月 淳 宮城県立こども病院産科・部長
山田崇弘 北海道大学病院産科・助教
堤 誠司 山形大学医学部産科婦人科・講師
佐藤秀平 青森県立中央病院総合周産期母子医療センター産科・センター長
林 聡 東京マザークリニック・院長
篠塚憲男 胎児医学研究所臨床研究・代表
高橋雄一郎 独立行政法人国立病院機構長良医療センター産科・医長
佐世正勝 山口県立総合医療センター総合周産期母子医療センター・センター長
沼部博直 京都大学大学院医学研究科社会健康医学系専攻医療倫理学・准教授
鬼頭浩史 名古屋大学医学部附属病院整形外科・講師
宮寄 治 国立成育医療研究センター放射線診療部・医長
緒方 勤 国立成育医療研究センター研究所小児思春期発育研究部臨床・分子遺伝学・部長
池川志郎 理化学研究所ゲノム医科学研究センター・チームリーダー
妻木範行 京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)・教授
芳賀信彦 東京大学医学部附属病院リハビリテーション科・教授

A. 研究目的

致死性骨異形成症 thanatophoric dysplasia: TD は線維芽細胞増殖因子受容体 3 (Fibroblast growth factor receptor 3: FGFR3) 遺伝子変異によって生じる先天性骨系統疾患で、胎児は出生後早期に死亡するとされている。周産期致死性とされる骨系統疾患ではもっとも頻度が高いとされているが、日本では実際の患者数や出生頻度は不明である。また、その名称にもかかわらず実際には長期生存例の症例報告も散見される。

(1) 全国調査による致死性骨異形成症の出生後の経過についてのデータの収集：

全国の医療機関の産科、小児科、整形外科のうち骨系統疾患の管理が可能と考えられる施設を対象に、全国調査（一次調査）として症例数とその予後についての概要の調査を実施し、患者数、周産期死亡率や出生後の児の生存の状況、そして長期生存の可能性を把握した。ついで二次調査として、児の身体的および精神的な発達の状況を把握する目的で、これらの調査を一次調査で協力を取り付けた施設に依頼して実施する。

致死性骨異形成症の分娩形式を決定するための正確な出生前診断の手法の確立と新生児管理に重要な予後の実際の情報の取得を目的として、以下の研究も行う。

(2) インターネット利用による胎児の骨系統疾患を診断支援するための症例検討システムの構築：

セキュリティの充実したウェブ閲覧型システムを構築して臨床医の診断の支援を行う。

(3) 過去の症例検討のとりまとめ：

胎児骨系統疾患に詳しい各領域横断の専門医のグループ「胎児骨系統疾患フォーラム」でメールによる検討を行った骨系統疾患症例の整理と分析を行い、診断の指針の作成に役立つようにとりまとめる。

(4) 妊娠期間中の胎児の診断指針の作成：

致死性骨異形成症の診断は出生後については、レントゲン所見と遺伝子診断による診断がほぼ確立している。したがって妊娠期間中に判明した骨格異常の胎児診断としてどのような所見に注目してどのような検査を行うべきかという指針の作成を行うために下記の事業を行う。

(ア) 超音波検査：正常の胎児の四肢長幹骨の標準値作成プロジェクトを行って、日本人での標準値を得る。

(イ) 胎児CT：全国調査を行って、胎児CTの症例数の把握と、標準的な撮影方法と見方の指

針の作成を行う。

(ウ) 遺伝子診断：遺伝子診断により確定診断をできる体制づくりを支援する。

(5) 地域診断支援システムの構築：

日本全国を一定地域ごとに分担して胎児骨系統疾患の妊娠例に遭遇した産婦人科医から相談を受けられるような体制づくりを行い、臨床医療に成果を還元する。

(6) 臨床医への情報提供：

所定の研究報告書を作成するのみならず、胎児骨系統疾患をまとめた書物を発刊して、臨床医に情報提供を行う。

(7) 社会への還元：

公開シンポジウムの開催や致死性骨異形成症についてホームページによる情報発信を行って成果を社会に還元する。

(8) 再生医療と細胞バンク：

現在は致死性骨異形成症の治療は呼吸管理以外にはほとんど方法がない。また一般に骨系統疾患には根治的治療法はなく、骨延長術などの対症療法に限られる。そこで平成 24 年度には文部科学省と厚生労働省の共同プロジェクトである「疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究」に研究班として参画することで、根治的治療を目的として iPS 細胞をはじめとした再生医療の実現のために患者細胞を提供することとした。

B. 研究方法

(1) 全国調査による患者数等の疾患に関する基本的なデータの収集：

骨系統疾患の診断、児や母の管理が可能と考えられる施設として、総合周産期母子センターと地域周産期母子センター、大学病院の産科 381 施設、小児科 394 施設、整形外科 381 施設を対象にアンケート調査を行った。産科に対しては人工妊娠中絶を含めて、周産期の死産や生産の患児の状況を調査した。小児科に対しては出生児の予後の調査を重視して、出生直後の呼吸管理を中心とした介

入的な処置により、その後の生命予後が改善されるかどうかも検討するために、より詳細な記録をとることとした。そして小児科については 1 年以上の長期生存例を経験している医師についてはインタビュー調査のための 2 次調査の依頼を行った。また整形外科については、本疾患が整形外科的管理を必要とするまで成長するかどうかを調査した。

(2) (3) (5) (6) (7) (8) 詳細は C. 研究結果に記載した。

(4) 妊娠期間中の胎児の診断指針の作成：

(ア) 超音波検査：正常の胎児の四肢長幹骨の標準値作成プロジェクトとして研究分担者の産科医の所属する施設が中心となって、超音波検査の際に胎児の大腿骨、脛骨・腓骨、上腕骨、橈骨・尺骨の測定を行い、標準値を算出する。

(イ) 胎児 CT：全国調査として胎児 CT の撮影経験のある 3 施設の放射線科医・技師を中心に胎児 CT サブグループを結成し、撮影条件の調査用紙を作成し、全国の施設でこれまで胎児 CT の学会報告のある施設に対して、症例数の把握と撮影条件の調査を行う。

(ウ) 遺伝子診断：関西と関東に各 1 施設の遺伝子診断が実施可能な施設を整備する。

(倫理面への配慮)

本研究においては、全体の研究計画について、研究代表者の所属する兵庫医科大学において倫理委員会の承認を得ている。また個別の研究分担者が行う研究については、診断指針の作成など全体の研究計画に承認されたことで十分と見なされる研究を除いて、各施設において倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

(1) 全国調査による患者数等の疾患に関する基本的なデータの収集：

産科 127 施設 (33.2%)、小児科 186 施設 (47.2%)、整形外科 115 施設 (30.2%) より回答

を得た。報告された TD の症例数は合計 85 例で、うち産科から 53 例、小児科から 30 例、整形外科から 2 例であった。重複しない 73 例についてデータの解析を行った。このうち流産が 15 例、死産が 4 例、生産が 51 例、不明が 3 例であった。生産児 51 例中 27 例は 7 日以内に死亡しており、周産期死亡率は 56%であった。一方で周産期死亡を起さなかった 24 例中には 1 年以上の生存も 16 例あり、生産児 51 例の 31%に達した。なお、生産児のうち呼吸管理実施例 (24 例) では全例周産期死亡を起さなかった。一方で呼吸管理非実施例 (25 例) では全例 2 日以内に死亡していた。

これらの情報を提供していただいた施設に対して、さらに詳しい身体的・精神的な発達のデータを依頼すべく現在調査用紙を作成中である。

(2) インターネット利用による胎児の骨系統疾患を診断支援するための症例登録・検討システムの構築：

システムは兵庫医科大学の協力により同大学にサーバーを設置して、運営することとし、システムの構築をすでに完了し、ウェブ上に匿名化して症例の経過と画像をアップして、専門家グループで討議して症例を登録して、診断を支援するシステムを構築した。

(3) 過去の症例検討のとりまとめ：

上記のウェブ上のシステム構築までの段階で全国の症例を検討した 3,500 通のメールの内容の解析と症例 (108 症例以上) の分析を行っている。

(4) 妊娠期間中の胎児の診断指針の作成：

(ア) 超音波検査については胎児の四肢長幹骨の標準値作成のためのデータ収集を目的として、宮城県立こども病院を中心に 9 施設で実施し 700 例以上の症例を集めて分析中した。

(イ) 胎児 CT については全国で胎児 CT を実施している施設 17 施設を対象に、詳細な胎児 CT の撮影条件とこれまでの撮影対象疾患を調査して胎児 CT の撮影条件特に被曝量との関係から我が国の現状を把握した。

(ウ) 遺伝子診断は慶応大学と大阪市立総合医療センターにて FGFR3 遺伝子診断が実施できるような体制を構築した。また全国規模で遺伝子診断のできるラボや研究施設のリストアップをおこなった。

(5) 地域診断支援システムの構築：

研究班の研究分担者の属する施設を中心に、北海道、東北、東京、神奈川、東海、近畿、中国、四国、九州において中心的なセンター施設を選定した。

(6) 臨床医への情報提供：

研究班でホームページ www.thanatophoric.com を作成し骨系統疾患の情報を提供し、診断や治療に取り組む産科医や小児科医などからの問い合わせを受け付ける体制を作った。すでに地域の病院や患者家族から数件の問い合わせがあり、上記の地域診断支援システムに紹介して対応した。また平成 24 年 12 月 2 日 (日) に本研究班会議と共催して、これらの医師を対象に第 5 回胎児骨系統疾患フォーラムを開催し、致死性骨異形成症を含めた胎児骨系統疾患の新生児管理について集中的な情報提供と討議を行った。

(7) 社会への還元：

上記ホームページに患者家族向けの情報を提供している。

(8) 致死性骨異形成症の 2 名の患者から線維芽細胞を埼玉県立小児医療センターの細胞バンクに寄贈し、ここを通じて細胞株を樹立し京都大学 iPS 細胞研究所に送付することとした。また II 型コラーゲン異常症についても提供した。

D. 考察

(1) 全国調査による患者数等の疾患に関する基本的なデータの収集：現在研究実施中である。

(2) インターネット利用による胎児の骨系統疾患を診断支援するための症例登録・検討システムの構築：従来から行っているメーリングリストによる症例検討システムに加えて、日本産科婦人科

学会周産期委員会の胎児骨系統疾患小委員会と協力して、全国の拠点となる県を選定して、症例登録事業を開始している。

(3) 過去の症例検討のとりまとめ：前記の症例検討の結果をとりまとめる作業を並行して実施している。

(4) 妊娠期間中の胎児の診断指針の作成：

(ア) 超音波のデータについては解析が終了しており、結果がまとまっている。現在投稿論文を作成中であるが、データはすでに一部の超音波機器メーカーのプログラムに組み込んでもらっている。

(イ) 胎児CTについては各施設の標準的な照射線量についてのデータが揃ったため、今後は胎児CTの標準的な撮影条件の提示を行うと同時に、今後は撮影条件だけではなくて、どのような疾患が疑われる場合やどのような週数で実施するかを含めたガイドラインを作成したい。

(ウ) 遺伝子診断については全国規模の遺伝子検査解析ラボ一覧を積極的に活用していきたい。

(5) 地域診断支援システムの構築：

日本産科婦人科学会の胎児骨系統疾患小委員会とも協力して体制整備を進めている。

(6) 臨床医への情報提供 (7) 社会への還元：

ホームページの利用と講演会等を通じてこうした機会を提供していることが必要である。

E. 結論

平成24年度は日本で初めての致死性骨異形成症の全国調査を行い、引き続き二次調査として出生後の身体的および精神的な発達の状態を調べてデータを収集した。他のプロジェクトについても上記のように概ね完了した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tsutsumi S, Maekawa A, Obata M, Morgan T, Robertson SP, Kurachi H. A Case of Boomerang Dysplasia with a Novel Causative Mutation in Filamin B: Identification of Typical Imaging Findings on Ultrasonography and 3D-CT Imaging. *Fetal Diagn Ther.* 2012

Yamada T, Takagi M, Nishimura G, Akaishi R, Furuta I, Morikawa M, Yamada T, Cho K, Sawai H, Ikegawa S, Hasegawa T, Minakami H. Recurrence of osteogenesis imperfecta due to maternal mosaicism of a novel COL1A1 mutation. *Am J Med Genet A.* 2012 Nov;158A(11):2969-71.

Wada R, Sawai H, Nishimura G, Isono K, Minagawa K, Takenobu T, Harada K, Tanaka H, Ishikura R, Komori S. Prenatal diagnosis of Kniest dysplasia with three-dimensional helical computed tomography. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 24:1181-1184. 2011

Numabe H, Sawai H, Yamagata Z, Muto K, Kosaki R, Yuki K, Kosaki K. Reproductive success in patients with Hallermann-Streifff syndrome. *Am J Med Genet A.* 2011 Sep;155A(9):2311-3.

Watanabe A, Karasugi T, Sawai H, Naing BT, Ikegawa S, Orimo H, Shimada T. Prevalence of c.1559delT in ALPL, a common mutation resulting in the perinatal (lethal) form of hypophosphatasia in Japanese and effects of the mutation on heterozygous carriers. *J Hum Genet.* 2011 56:166-168

Yamada T, Nishimura G, Nishida K, Sawai H,

Omatsu T, Kimura T, Nishihara H, Shono R, Shimada S, Morikawa M, Mizushima M, Yamada T, Cho K, Tanaka S, Shirato H, Minakami H. Prenatal diagnosis of short-rib polydactyly syndrome type 3 (Verma-Naumoff type) by three-dimensional helical computed tomography. J Obstet Gynaecol Res. 2011 37:151-155

Daniel PB, Morgan T, Alanay Y, Bijlsma E, Cho TJ, Cole T, Collins F, David A, Devriendt K, Faivre L, Ikegawa S, Jacquemont S, Jesic M, Krakow D, Liebrecht D, Maitz S, Marlin S, Morin G, Nishikubo T, Nishimura G, Prescott T, Scarano G, Shafeghati Y, Skovby F, Tsutsumi S, Whiteford M, Zenker M, Robertson SP. Disease-associated mutations in the actin-binding domain of filamin B cause cytoplasmic focal accumulations correlating with disease severity. Hum Mutat. 2011 [Epub ahead of print]

Sasaki A, Sawai H, Masuzaki H, Hirahara F, Sago H. Low prevalence of genetic prenatal diagnosis in Japan. Prenat Diagn. 2011 Oct;31(10):1007-9.

西村玄、室月淳、澤井英明 編 骨系統疾患 出生前診断と周産期管理 メジカルレビュー

2. 学会発表

澤井英明 致死性骨異形成症の全国調査から 第56回日本人類遺伝学会 平成23年11月9日～12日 幕張

西山深雪、澤井英明、小杉眞司 羊水染色体分析の検査前後の妊婦への情報提供に関する調査 第56回日本人類遺伝学会 平成23年11月9日～12日 幕張

山田崇弘、高木優樹、西村玄、赤石理奈、古田伊都子、小嶋崇史、石川聡司、武田真光、西田竜太郎、森川守、山田俊、長和俊、澤井英明、池川志郎、長谷川奉延、水上尚典 COL1A1 のモザイク変異による II 型骨形成不全症の再発例

胎児骨系統疾患における II 型コラーゲン異常症の遺伝子変異の解析 澤井英明、和田龍、武信尚史、原田佳世子、岡本陽子、三村博子、菅原由恵 第56回日本人類遺伝学会 平成23年11月9日～12日 幕張

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告

致死性骨異形成症の診断と予後に関する研究
重度胸郭形成不全を伴う第 14 染色体父性ダイソミー症候群の発症機序解明

研究分担者 緒方勤
浜松医科大学 小児科 教授

研究要旨

本年度は、昨年度に引き続き、周産期致死性骨系統疾患の 1 つである第 14 染色体父親性ダイソミー症候群について以下研究を行い、(1) 母性発現遺伝子 RTL1as が microRNA として RTL1 発現を抑制すること、(2) ヒト DIO3 がインプリンティングされないこと、(3) 胎盤組織の特徴が遺伝子発現パターンを反映すること、(4) 出産年齢解析が第一減数分裂時の不分離を介する R/PE type-upd(14)pat 発症のリスクファクターであることが示された。これらのデータは、microRNA を用いた本症候群の治療や、高齢出産を避けることで upd(14)pat 発症を予防しうることを示唆するものである。

A. 研究目的

第 14 染色体父親性ダイソミー症候群は、ベル型・コートハンガー型と形容される胸郭形成不全、臍帯ヘルニア・腹筋離開などの腹壁異常、前額部突出・長い人中などの特徴的顔貌などの個体症状と共に、羊水過多、胎盤過形成などの胎盤症状を示す稀な疾患である。本症候群は、胸郭形成不全が重度の呼吸障害を生じる新生児期の致死性骨系統疾患の一つである。

本症候群の存在は、まず第 14 染色体父性ダイソミー(upd(14)pat)の同定に由来する。すなわち、第 14 染色体長腕遠位部にはインプリンティング領域が存在し、父親由来アレルからのみ発現する父性発現遺伝子、母親由来アレルからのみ発現する母性発現遺伝子が存在し、これらのインプリンティング遺伝子の発現異常が本症候群を招くことが判明した。われわれは、このインプリンティング領域について、世界で初めて以下のことを明らかとしている。(1) このインプリンティング領域にはメチル化可変領域 (Differentially Methylated Region: DMR)が存在すること、(2) 生殖細胞形成期に確立される IG-DMR が胎盤におけるインプリンティングセンターとして機能すること、(3) 受精後初期発生段階に確立される MEG3-DMR が個体におけるインプリンティングセンターとして機能すること、(4) IG-DMR の

メチル化パターンが MEG3-DMR のメチル化パターンを制御すること、(5) 臨床症状を招く主因が、父性発現遺伝子 RTL1 の過剰発現である。これらの成果は、世界的に高く評価されている。

そして、昨年度、われわれは、この(upd(14)pat)について、(1) レントゲン画像診断基準の作成、(2) 胎児診断の可能性とそれに基づく適切な早期申請時からの治療介入、(3) 現在までに遺伝子診断された患者 26 例の分子遺伝学的データに基づく遺伝子診断法フローチャートの構築、という成果を挙げた。この研究過程において、われわれは本邦において 35 例の同様の症状を呈する患者を集積している。そして、同様の表現型が、upd(14)pat のみならず、インプリンティング領域の微小欠失やエピ変異でも生じることを見出し、このような表現型を第 14 染色体父親性ダイソミー症候群と命名した。

本研究年度においては、この第 14 染色体父親性ダイソミー症候群において、(1) 母性発現遺伝子 RTL1as が microRNA として RTL1 発現を抑制するか否か、(2) DIO3 がインプリンティング遺伝子であるか否か、(3) 胎盤組織像の特徴、(4) 高齢出産が upd(14)pat の発症リスクとなるか否か、という未解明の課題について取り組んだ。

B. 研究方法

出生前診断により新鮮な胎盤を入手できた本症候群の2例と、既に胎便を集積されている症例を主に解析した。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守し、検体の収集を含めた研究計画については、国立成育医療センター、および各検体の収集施設において予め倫理委員会の承認を得ている。検体は、書面によるインフォームド・コンセントを取得後に収集している。

C. 研究結果

(1) 母性発現遺伝子 RTL1as が microRNA として RTL1 発現を抑制するか否か

Upd(14)pat 患者2例とコントロール3例の新鮮胎盤を用いて定量的発現解析を行った。生データでは、父性発現遺伝子 DLK1 と RTL1 はコントロール胎盤よりも過剰発現を示し、母性発現遺伝子は RTL1as にコードされる miR433 と miR127 を含めて発現消失を示した (図 1A)。そして、DLK1 発現量と組織所見に基づき、各遺伝子発現細胞あたりの父性発現遺伝子を補正して算出した結果、DLK1 は父性ダイソミー状態に一致して2倍の発現量を呈したが、RTL1 は父性ダイソミー状態では説明できない約5倍の発現量を示した。

(2) DIO3 がインプリンティング遺伝子であるか否か

上記の解析において、父性発現遺伝子 DIO3 発現量は、生データではコントロール胎盤よりも過剰であったが、補正後はコントロール胎盤と同じく1倍であった (図 1A, B)。

(3) 胎盤組織像の特徴

Upd(14)pat 患者2例の新鮮胎盤、既報のインプリンティング領域の欠失による第14染色体父親性ダイソミー症候群患者のフルマリン処理胎盤、コントロールの新鮮胎盤を用いて検討した。光顕と電顕では末梢絨毛の血管内皮細胞の腫大と血管壁細胞の肥大化が、免疫染色では末梢絨毛の血管内皮細胞の腫大と血管壁細胞に限る DLK1、RTL1、DIO3 タンパク発現と遺伝子発現量に比例した DLK1 と

RTL1、特に RTL1 タンパクの発現増加が認められた (図 2)。

(4) 高齢出産が upd(14)pat の発症リスクとなるか否か

● Upd(14)pat は、trisomy rescue (TR)、monosomy rescue (MR)、gamete complementation (GC)、post-zygotic mitotic error (PE) により発症し、このうち高齢出産は、減数第一分裂時の不分離により産生される nullisomic oocyte を介する MR と GC に影響すると考えられる (図 3)。すなわち、父性ダイソミーのうち、MR/PE type-upd(14)pat の発症に高齢出産が関わりうると考えられる。このため、われわれは、既に遺伝的発症原因を明らかとした26例中、IG-DMR と MEG3-DMR を含む微小欠失患者3例、IG-DMR のみの欠失患者1例、MEG3-DMR のみの欠失患者1例、TR/GC type-upd(14)pat 患者5例、MR/PE type-upd(14)pat 患者11例、PE 特異的部分的ホモダイソミー患者1例、エピ変異患者4例において、出産年齢を比較した。その結果、35歳以上の高齢出産は、MR/PE type-upd(14)pat に集中して認められた (図 4)。さらに、高齢出産の頻度は、MR/PE type-upd(14)pat で6/11、それ以外の原因で2/15と、MR/PE type-upd(14)pat において有意に高く ($P=0.034$)、出産年齢中央値は、MR/PE type-upd(14)pat で36.0、それ以外の原因で29.5と、MR/PE type-upd(14)pat において有意に高かった ($P=0.045$)。

D. 考察

本研究の遺伝子発現解析と組織学的解析データは、以下のことを示唆する。(1) 母性発現遺伝子 RTL1as が microRNA として RTL1 発現を抑制することを示す。(2) マウス Dio3 が部分的にインプリンティングされることと異なり、ヒト DIO3 はインプリンティングされない。(3) 胎盤組織の特徴は遺伝子発現パターンを反映し、絨毛末端に本症候群の異常が存在する。これは、世界で初めてのデータであり、microRNA を用いた本症候群の治療の道を示すものである。

さらに、出産年齢解析は、第一減数分裂時の不分離を伴い易い高齢出産が R/PE type-upd(14)pat 発症のリスクファクターであることを示すものである。これは、既にわれわれが報告した disomic oocyte を介する TR/GC[M1] type-upd(15)mat が、高齢出産により有意に増加していることに一致するものであり、高齢出産を避けることが upd(14)pat 発症の予防

になりうることを示唆するものである。なお、upd(14)pat 症候群では、nullisomic oocyte が第一減数分裂時の不分離と第二減数分裂時の不分離のいずれの時期に形成されたかを鑑別することは不可能である (図 3)。したがって、今回の MR/PE type-upd(14)pat グループには、高齢出産が影響する第一減数分裂時の不分離に起因する upd(14)pat のみならず、高齢出産が影響しない第二減数分裂時の不分離に起因する upd(14)pat や PE による upd(14)pat が含まれていると考えられる。

E. 結論

本研究により、(1) 母性発現遺伝子 RTL1as が microRNA として RTL1 発現を抑制すること、(2) ヒト DIO3 がインプリンティングされないこと、(3) 胎盤組織の特徴が遺伝子発現パターンを反映すること、(4) 出産年齢解析が第一減数分裂時の不分離を介する R/PE type-upd(14)pat 発症のリスクファクターであること示すものである。これらのデータは、microRNA を用いた本症候群の治療や、高齢出産を避けることで upd(14)pat 発症を予防しうることを示唆するものである。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kagami M, Kato F, Matsubara K, Sato T, Nishimura G, Ogata T*: Relative frequency of underlying genetic causes for the development of UPD(14)pat-like phenotype. *Eur J Hum Genet* 20 (9): 928–932, 2012.
2. Fuke-Sato T, Yamazawa K, Nakabayashi K, Matsubara K, Matsuoka K, Hasegawa T, Dobashi K, Ogata T*: Mosaic upd(7)mat in a patient with Silver-Russell syndrome: correlation between phenotype and mosaic ratio in the body and the

placenta. *Am J Med Genet A* 158A (2): 465–468, 2012.

3. Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Van De Pette M, John RM, Kagami M, Nakai K, Soejima H, Ogata T, Arima T*: Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproduction technologies. *Hum Reprod* 27 (8): 2541–2548, 2012.
4. Kagami M, Matsuoka K, Nagai T, Yamanaka M, Kurosawa K, Suzumori N, Sekita Y, Miyado M, Matsubara K, Fuke T, Kato F, Fukami M, Ogata T*: Paternal uniparental disomy 14 and related disorders: placental gene expression analyses and histological examinations. *Epigenetics* 7 (10): 1142–1150, 2012.
5. Nagasaki K*, Tsuchuya S, Saitoh A, Ogata T, Fukami M: Neuromuscular symptoms in a patient with familial pseudohypoparathyroidism type Ib diagnosed by methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification. *Endocr J* (accepted).
6. Fuke T, Mizuno S, Nagai T, Hasegawa T, Horikawa R, Miyoshi Y, Muroya K, Kondoh T, Numakura C, Sato S, Nakabayashi K, Tayama C, Hata K, Sano S, Matsubara K, Kagami M, Tamazawa K, Ogata T*: Molecular and clinical studies in 138 Japanese patients with Silver-Russell syndrome. *PLoS One* (accepted).
7. Ayabe T, Matsubara K, Ogata T, Ayabe A, Murakami N, Nagai T, Fukami M*: Birth seasonality in Prader-Willi syndrome resulting from chromosome 15 microdeletion. *Am J Med Genet A* (accepted).
8. Matsubara K, Ogata T*: Advanced maternal age at childbirth and the development of uniparental disomy. A commentary on the proportion of uniparental disomy is increased in Prader-Willi syndrome due to an advanced maternal childbearing age in Korea. *J Hum Genet.* 2013 Jan 31. doi: 10.1038/jhg.2013.4. [Epub ahead of print]

2. 学会発表 省略

H. 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

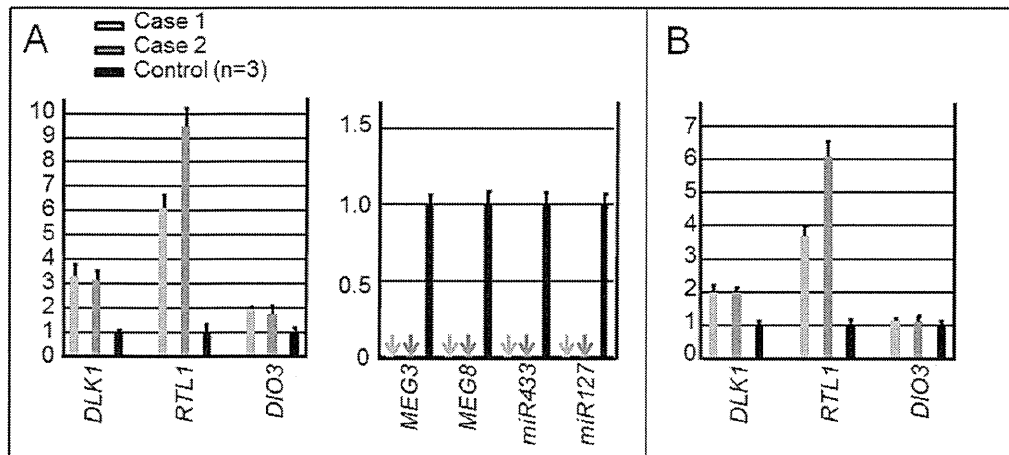


図 1. 胎盤を用いた遺伝子発現量解析

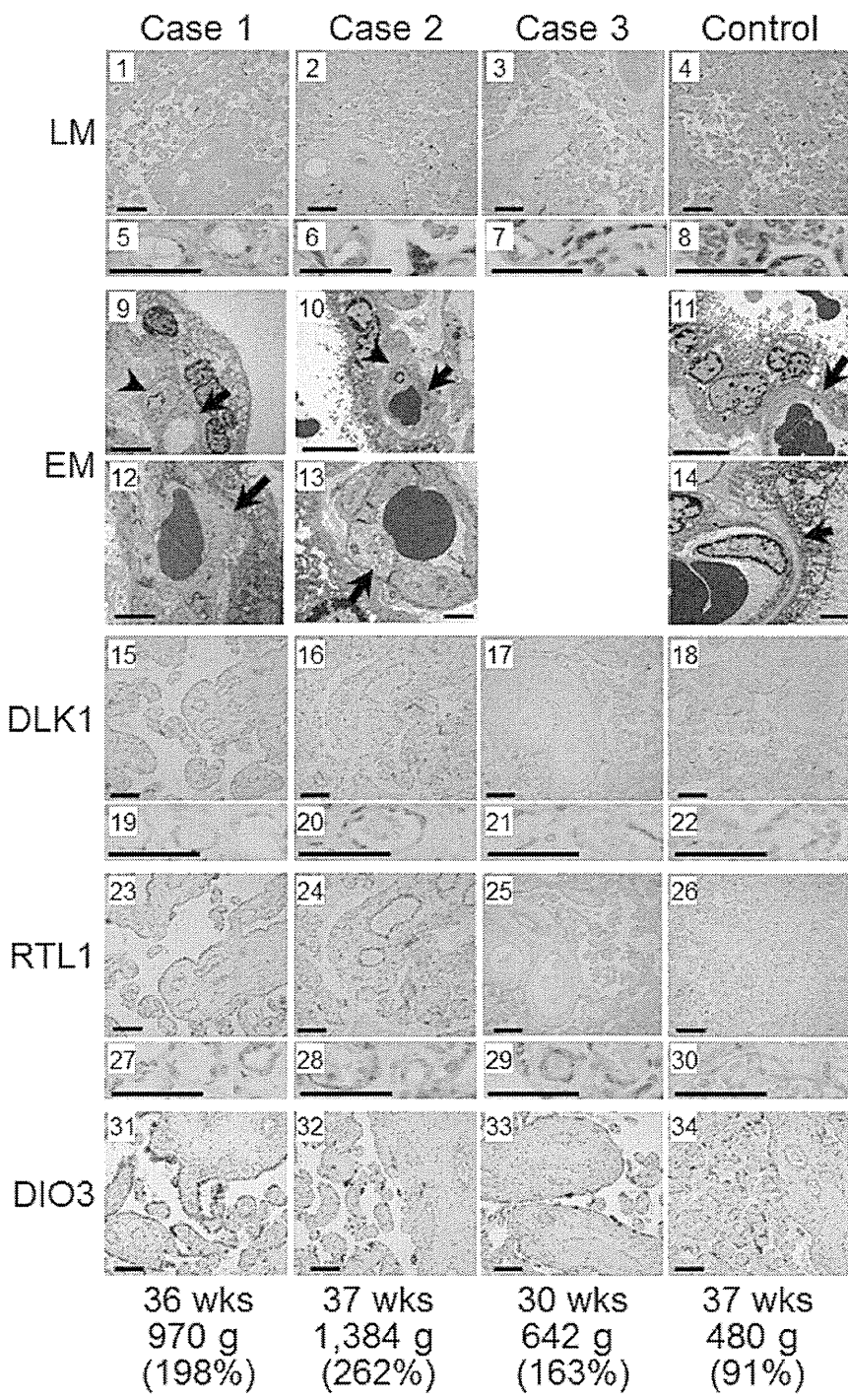


図 2. 胎盤を用いた組織学的解析

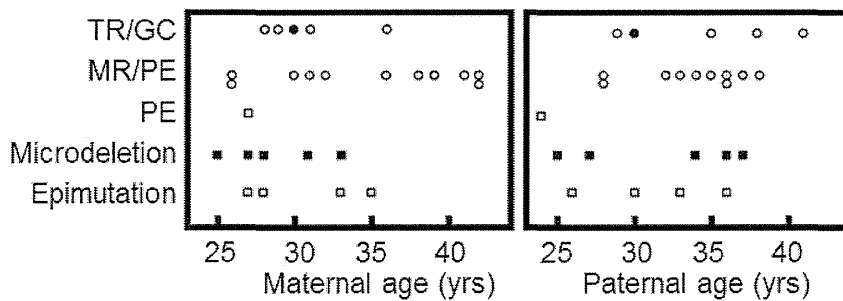
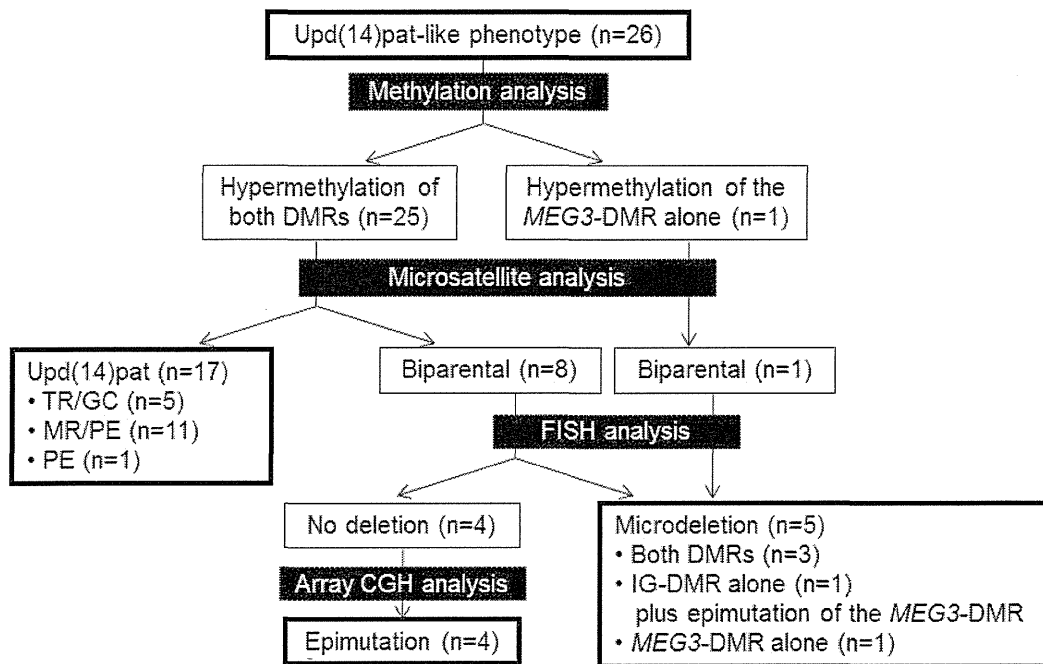
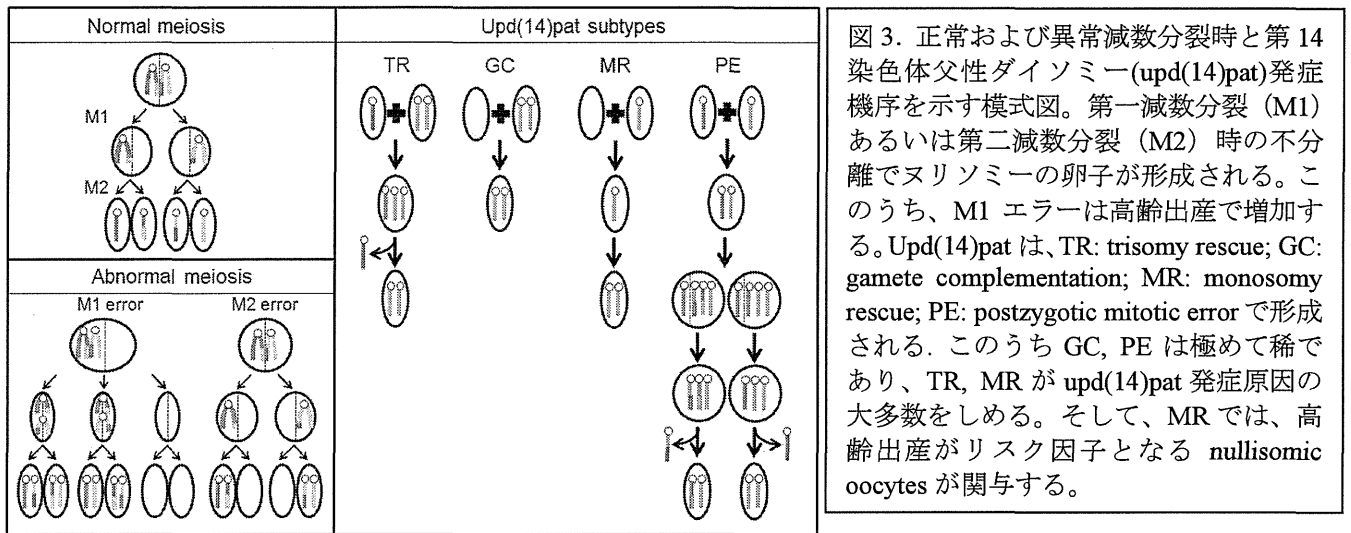


図 4. 第 14 染色体父性ダイソミー症候群患者 26 例における発症原因の分類 (上) と出生時両親年齢の分布 (下)。

致死性骨異形成症の診断と予後に関する研究

研究分担者 池川 志郎
理化学研究所・ゲノム医科学研究センター
骨関節疾患研究チーム・チームリーダー

研究要旨

致死性骨異形成症は頻度の高い骨系統疾患で、その正確な診断と、それに基づく確かな治療は、新生時期の遺伝性骨関節疾患の医療上の大きな課題である。しかし、致死性骨異形成症には多くの類似疾患が存在し、従来の臨床所見、X線所見に頼った方法では、診断は非常に困難である。診断能の向上のためには、類似疾患を含めた包括的な遺伝子レベルでの診断システムを確立する必要がある。そのような遺伝子診断システムの構築のために、致死性骨異形成症、及びその類似疾患のDNA解析を行なった。臨床家の協力の下に、致死性骨異形成症、及びその類似疾患の表現型の詳細なデータ（臨床像、X線像）とDNAを収集した。*FGFR3*を含む既知の疾患遺伝子に変異が疑われる場合は、それらの変異解析を行ない、変異が同定された患者については、表現型データとの対応を検討した。その結果、1) 致死性骨異形成症類似疾患のひとつ *opsismodysplasia* の原因遺伝子が *INPPL1* であることを明らかにした。2) 短体幹症の原因遺伝子の *PAPSS2* であることを明らかにした。これらの新規の疾患遺伝子を加えた致死性骨異形成症の遺伝子診断システムを構築中である。

共同研究者

Dai Jin (理化学研究所・ゲノム医科学研究センター・骨関節疾患研究チーム)

A. 研究目的

致死性骨異形成症は多くの類似疾患が存在するため、正確な診断が困難である。その確定診断のためには、遺伝子レベルでの診断システムを構築する必要がある。致死性骨異形成症の遺伝子診断法の確立のために、致死性骨異形成症、及びその類似疾患のDNA解析を行う。

B. 研究方法

胎児骨系統疾患フォーラムを中心とする臨床家の協力の下に、致死性骨異形成症、及びその類似疾患の表現型の詳細なデータ（臨床像、X線像）と genomic DNA を収集した。*FGFR3* を含む既知の疾患遺伝子に変異が疑われる場合は、DNA sequence 解析をはじめとする遺伝子解析を行ない、変異の同定を試みた。変異が同定された

患者については、表現型のデータとの対応を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成13年3月29日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）に従っている。検体の収集を含めた研究計画については、理化学研究所、及び各検体の収集施設において予め倫理委員会の承認を得ている。検体は、書面によるインフォームド・コンセントを取得後に収集している。

C. 研究結果

1) 致死性骨異形成症類似疾患のひとつ opsismodysplasia の原因遺伝子が INPPL1(1)であることを明らかにした。新規の遺伝子の欠出変異を同定した。(Iida *et al.* J Hum Genet, 2013)。

2) 常染色体劣性型の短体幹症 (brachyolmia) の原因遺伝子が PAPSS2 であることを明らかにした (Miyake *et al.* J Med Genet, 2012)。この疾患の詳細な臨床像、X線像を明らかにした (Hum Mutat, 投稿中)。

D. 考察

致死性骨異形成症には多くの類似疾患が存在する。変異を同定した例について、表現型の再評価を行ったが、胎児期、新生児時期の表現型の臨床像、X線像のデータからは、それがいかに詳細なものであっても、致死性骨異形成症の診断、鑑別診断には多くの困難が伴い、類似疾患を正確に鑑別する事は困難であると考えられる。包括的な遺伝子診断が、その解決のための最も現実的な方法であると考えられる。

E. 結論

致死性骨異形成症の正確な診断のためには、類似疾患を含めた遺伝子レベルでの診断法を確立する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Iida A, Okamoto N, Miyake N, Nishimura G, Minami S, Sugimoto T, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Shiina M, Ogata K, Watanabe S, Ohashi H, Matsumoto N, Ikegawa S. Exome sequencing identifies a novel INPPL1 mutation in opsismodysplasia. J Hum Genet. 2013 Apr 4. doi: 10.1038/jhg.2013.25. [Epub ahead of print]
2. Semba K, Araki K, Matsumoto K, Suda H, Ando T, Sei A, Mizuta H, Takagi K, Nakahara M, Muta M, Yamada G, Nakagata N, Iida A, Ikegawa S, Nakamura Y, Araki M, Abe K, Yamamura K. Ectopic expression of Ptf1a induces spinal defects, urogenital defects, and anorectal malformations in Danforth's short tail mice. PLoS Genet. 2013 9(2):e1003204
3. Yamada T, Takagi M, Nishimura G, Akaishi R, Furuta I, Morikawa M, Yamada T, Cho K, Sawai H, Ikegawa S, Hasegawa T, Minakami H. Recurrence of osteogenesis imperfecta due to maternal mosaicism of a novel COL1A1 mutation. Am J Med Genet A. 158A(11):2969-71, 2012.
4. Cho TJ, Lee KE, Lee SK, Song SJ, Kim KJ, Jeon D, Lee G, Kim HN, Lee HR, Eom HH, Lee ZH, Kim OH, Park WY, Park SS, Ikegawa S, Yoo WJ, Choi IH, Kim JW. A single recurrent mutation in the 5'-UTR of IFITM5 causes osteogenesis imperfecta Type V. Am J Hum Genet. 91(2):343-8, 2012.

5. Miyake N, Elcioglu NH, Iida A, Isguven P, Dai J, Murakami N, Takamura K, Cho TJ, Kim OH, Hasegawa T, Nagai T, Ohashi H, Nishimura G, Matsumoto N, Ikegawa S. PAPS2 mutations cause autosomal recessive brachyolmia. *J Med Genet.* 49(8):533-8, 2012.
6. Cho TJ, Matsumoto K, Fano V, Dai J, Kim OH, Chae JH, Yoo WJ, Tanaka Y, Matsui Y, Takigami I, Monges S, Zabel B, Shimizu K, Nishimura G, Lausch E, Ikegawa S. TRPV4-pathy manifesting both skeletal dysplasia and peripheral neuropathy: A report of three patients. *Am J Med Genet A.* 158A(4):795-802, 2012.
7. Daniel PB, Morgan T, Alanay Y, Bijlsma E, Cho TJ, Cole T, Collins F, David A, Devriendt K, Faivre L, Ikegawa S, Jacquemont S, Jesic M, Krakow D, Liebrecht D, Maitz S, Marlin S, Morin G, Nishikubo T, Nishimura G, Prescott T, Scarano G, Shafeghati Y, Skovby F, Tsutsumi S, Whiteford M, Zenker M, Robertson SP. Disease-associated mutations in the actin-binding domain of filamin B cause cytoplasmic focal accumulations correlating with disease severity. *Hum Mutat.* 33(4):665-73, 2012.
8. Sasagawa S, Takemori H, Uebi T, Ikegami D, Hiramatsu K, Ikegawa S, Yoshikawa H, Tsumaki N. SIK3 is essential for chondrocyte hypertrophy during skeletal development in mice. *Development.* 139(6):1153-63, 2012.

2. 学会発表

(招待講演のみ)

1. 池川志郎. 遺伝性疾患の原因遺伝子を見つけるには:骨の病気を例に. 遺伝医学研究会協賛セミナー. 東京. 2012年5月10日.
2. Ikegawa S. Genomic study of Bone and joint diseases - Where we were, and where we are going. *Nature Genetics China.* Hangzhou. May 19, 2012
3. Ikegawa S. Rare Diseases and Common Problems: Lessons from One to the other. 6th Annual Introductory Course on Skeletal Dysplasias. Lousanne. Jul. 5, 2012
4. 池川志郎. 股関節疾患と遺伝 - 大腿骨頭壊死症を中心に -. 第4回股関節疾患研究会. 福岡. 2012年8月10日.
5. Ikegawa S. Skeletal Dysplasia in Mice and Human. 22nd Annual Scientific Meeting/1st Asia-Pacific Bone and Mineral Research Meeting. Perth. Sep 3, 2012
6. 池川志郎. 骨・関節疾患のゲノム解析: パーソナルゲノム時代の疾患研究. 日本人類遺伝学会 第57回大会. 東京. 2012年10月26日.
7. 池川志郎. 小児整形外科疾患の遺伝子解析. 第27回日本整形外科学会基礎学術集会. 名古屋. 2012年10月27日.
8. Ikegawa S. Genomic study of bone and joint diseases - where we were, and where we are going. 12th Annual Meeting of East Asian Union of Human Genetics Societies. Seoul. Nov 29, 2012
9. 池川志郎. 運動器疾患のゲノム解析 - 遺伝子から分子病態へ. 京都大学再生医科学研究所・生体分子設計学分野セミナー. 京都. 2013年1月31日.