

【試薬】

主要な試薬を以下に示す。

名称	メーカー	Cat.No.
QIAamp DNA mini kit	QIAGEN	51304
Ampitaq Gold 360 Master Mix	Applied Biosystems (by life technologies)	439881
Distilled Water, Deionized, Sterile (以下 DDW と略)	ニッポンジーン	316-90101
QIAquick PCR Purification kit	QIAGEN	28104
Agencourt AMPure XP	BECKMAN COULTER	A63881
BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit	Applied Biosystems (by life technologies)	4337455
BigDye XTerminator 精製キット	Applied Biosystems (by life technologies)	4376486
3130 POP-7 ポリマー	Applied Biosystems (by life technologies)	4352759
10× Genetic Analysis Buffer with EDTA	Applied Biosystems (by life technologies)	402824

【機器】

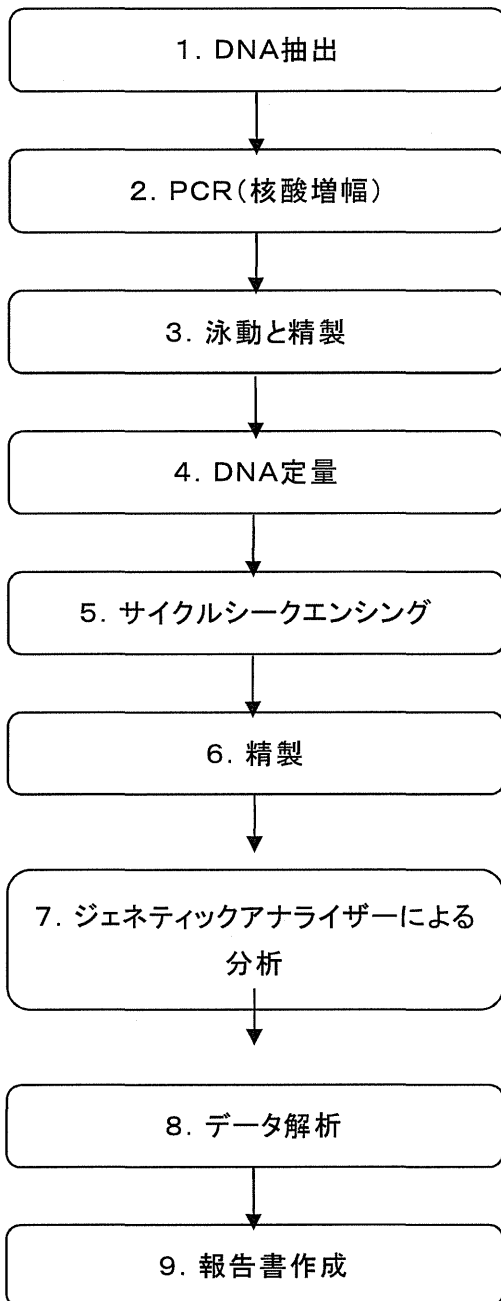
主要な機器を以下に示す。

一般名称	機器名称・モデル	メーカー
サーマルサイクラー	Veriti 96-well サーマルサイクラー,0.2ml (以下 Veriti200 と略)	Applied Biosystems (by life technologies)
ボルテックスミキサー	Vortex GENIE 2	MS機器
キャピラリー電気泳動	3130 ジェネティックアナライザ	Applied Biosystems (by life technologies)

【分析手順】

以下に操作の流れ(概略)を示す。
また、各操作の詳細は次項から記載する。

－ 操作の流れ －



1. DNA抽出

EDTA 採血管により採血した全血を、QIAamp DNA mini kit によりDNA抽出を行う。詳細は試薬添付マニュアルにしたがい、Elution は 100 μ l の Buffer AE にて実施。

2. PCR

試薬は Ampitaq Gold 360 Master Mix を用い、各エクソンの Primer は SIGMA GENOSYS などのメーカーにて作成してもらい、Primer 一覧は次項に示す。試薬、サンプルの調整は以下のとおりとする。PCR は Veriti200 にて以下のとおりサイクル反応をおこなう

(反応液の調整)

	Exon2	その他の exon
Ampitaq Gold 360 Master Mix	12.5 μ l	12.5 μ l
360 GC enhancer	2.5 μ l	—
50pmol/ μ l Forward primer	0.25 μ l	0.25 μ l
50pmol/ μ l Reverse primer	0.25 μ l	0.25 μ l
Template DNA (final concentration 50ng)	Variable (0.5~2 μ l)	Variable (0.5~2 μ l)
DDW	Variable (to 25 μ l)	Variable (to 25 μ l)
Total volume	25 μ l	25 μ l

(PCRの反応条件 全 exon 共通)

Step	Pre heat	PCR(35cycle)			1st hold	2nd hold
		Denature	Anneal	Extend		
Temp(°C)	95	95	60	72	72	4
Time	10min	15sec	30sec	1min	7min	∞

(各 exon の PCR 及びシーケンス primer)

対象 Exon	Primer 名称	配列	PCR Product 長
Exon2	FGFR3 2Fwd	TCTAACGAGCTGCCTTCCT	577bp
	FGFR3 2Rvs	CGAATAACAACAGCGGGAATC	
Exon3, 4	FGFR3 3-4Fwd	ACTGCTGTGTCTGTAAACGG	806bp
	FGFR3 3-4Rvs	GGCATCTAGAGCCATGTCAG	
Exon5~7	FGFR3 5-7Fwd	TACACAGGACGGGAAACTGA	875bp
	FGFR3 5-7Rvs	CCCTAGACCCAAATCCTCAC	
Exon9	FGFR3 9Fwd	GTAACGACTCTGTCCCATGC	872bp
	FGFR3 9Rvs	CCGTAAGTCACAGGATTCCC	
Exon10	FGFR3 10Fwd	CTCTAGACTCACTGGCGTTA	572bp
	FGFR3 10Rvs	GTTCTGACTTCCACCAGCAT	
Exon11	FGFR3 11Fwd	ATGCTGGTGGAAAGTCAGAAC	498bp
	FGFR3 11Rvs	CGTAAGGACGAAGAGTGTCA	
Exon12~14	FGFR3 12-14Fwd	CTCTTCGTCCTTACGAGCAG	914bp
	FGFR3 12-14Rvs	TCTTCATCACGTTGTCCTCG	
Exon15	FGFR3 15Fwd	CTGGACTACTCCTTCGACAC	509bp
	FGFR3 15Rvs	GACACGTACACGTCACTCTG	
Exon16, 17	FGFR3 16-17Fwd	GACAACGTGATGAAGATCGCAG	834bp
	FGFR3 16-17Rvs	GTGGACGTCACGGTAAGGA	
Exon18, 19	FGFR3 18-19Fwd	CAGGCTGTTCCCGAATAAGG	587bp
	FGFR3 18-19Rvs	ATCTGCACTGAGTCTCATGC	

3. 泳動と精製

PCR が正常に完了していたかを、3 μ l を用いて、2%アガロースゲル電気泳動でチェックする。チェック後、PCR 後反応液を精製する。反応数が少ない(8 個以内なら)場合は、QIAquick PCR Purification kit(QIAGEN)を使用。反応数が多い場合は、Agencourt AMPure XP(BECKMAN COULTER)を用いて精製を行う。操作法は各キットの取り扱い説明に従う、最後のエルーションは DDW で行う。

4. DNA定量

精製終了後の PCR 産物を 260nm にて吸光度測定、 $\times 50$ ng で DNA 定量。
10~20ng/ μ l になるよう必要におおじ DDW で希釈する。これを DNA template とする。

5. サイクルシーケンシング

サイクルシーケンシングは、機器は Veriti200 サーマルサイクラーを使用し、試薬は BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit(Applied Biosystems)を用いる。反応液調整と反応条件は以下のとおり。

(反応液の調整、 $\times 8$ BigDye 法)

	Volume
DDW	Variable (to 20 μ l)
5 \times sequencing buffer	3.5 μ l
1.6 μ mol Fwd or Rvs primer	2 μ l
V3.1 BigDye	1 μ l
DNA template (final concentration 10~20ng)	Variable (0.5~3 μ l)
Total	20 μ l

(サイクルシーケンシング反応条件)

Step	Pre heat	Cycle sequencing (25cycle)			hold
		Denature	Anneal	Anneal/Extend	
Temp ($^{\circ}$ C)	94	96	50	60	4
Time	2min	10sec	5sec	2min30sec	∞

6. 精製

BigDye X Terminator 精製キットを用いて実施。

- 1) Xterminator を室温に戻し、十分ボルテックスする。
- 2) 先端をハサミで切り落としたチップで、Xterminator 7 μ l を 8 連 PCR チューブにとる。
- 3) 更に SAM 溶液 30 μ l を加える。
- 4) サイクルシーケンス反応液 1.5~2 μ l を加える
- 5) PCR チューブの蓋をしっかりと閉じ、プレート用アダプターを取りつけた Vortex GENIE2で

最大パワー

で 15 分間ボルテックスする。

- 6) 2500rpm、2min 遠心
- 7) 上澄み 17 μ l をとりジェネティックアナライザー-sample 用 PCR プレートに移す。

7. ジェネティックアナライザーによる分析

ジェネティックアナライザー3130 (Applied Biosystems)を用い、ポリマーは、POP-7にて分析を開始する。

8. データ解析

データ解析用市販ソフト(日立 DNASIS)を用い、NCBI ホームページより得られた、Reference Sequence:

NG_12632.1 を対照とし、変異の有無を確認する。

9. 報告書作成

パソコン用ワープロ Word を用いて報告書を作成。患者の名前を記載せず、匿名番号によって、作成すること。また、FAX による送信は禁止する。

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・腹直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

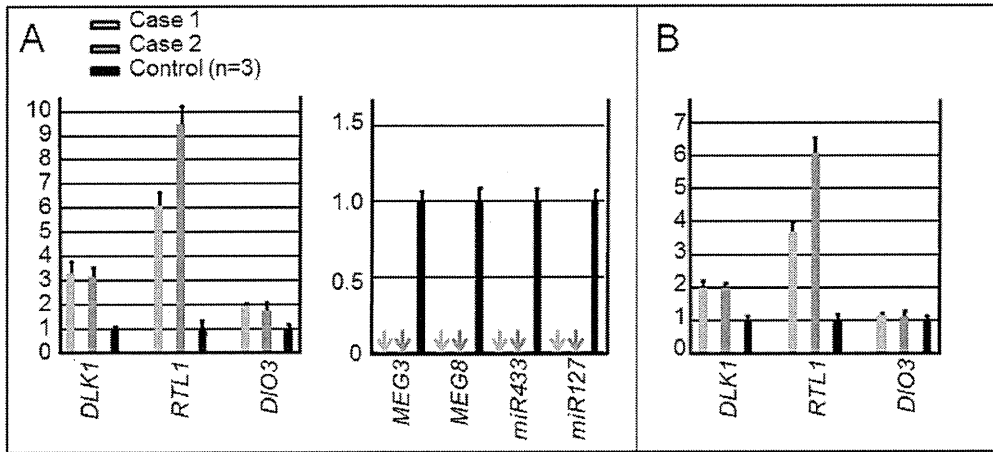


図 1. 胎盤を用いた
遺伝子発現量解析

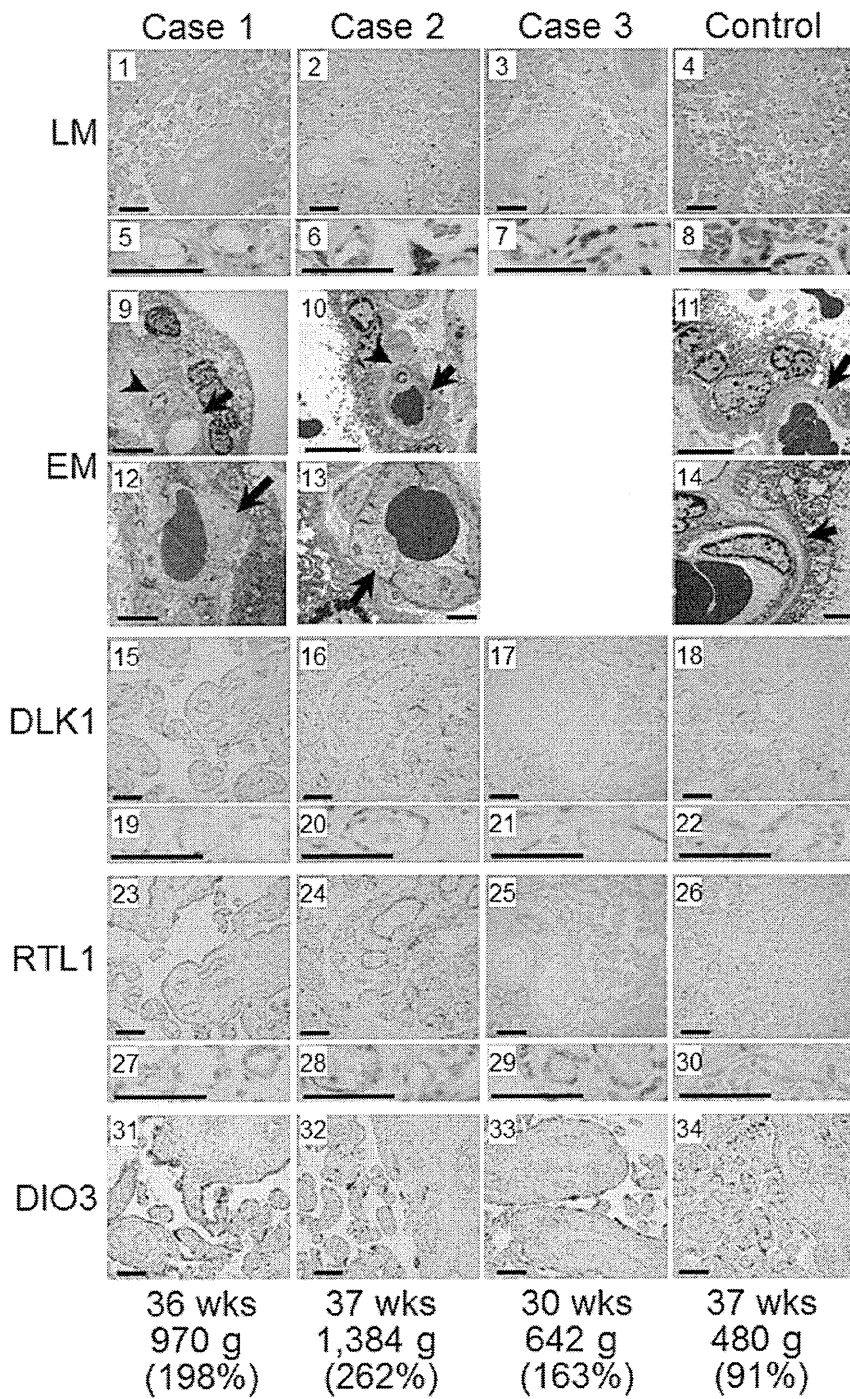


図 2. 胎盤を用いた
組織学的解析

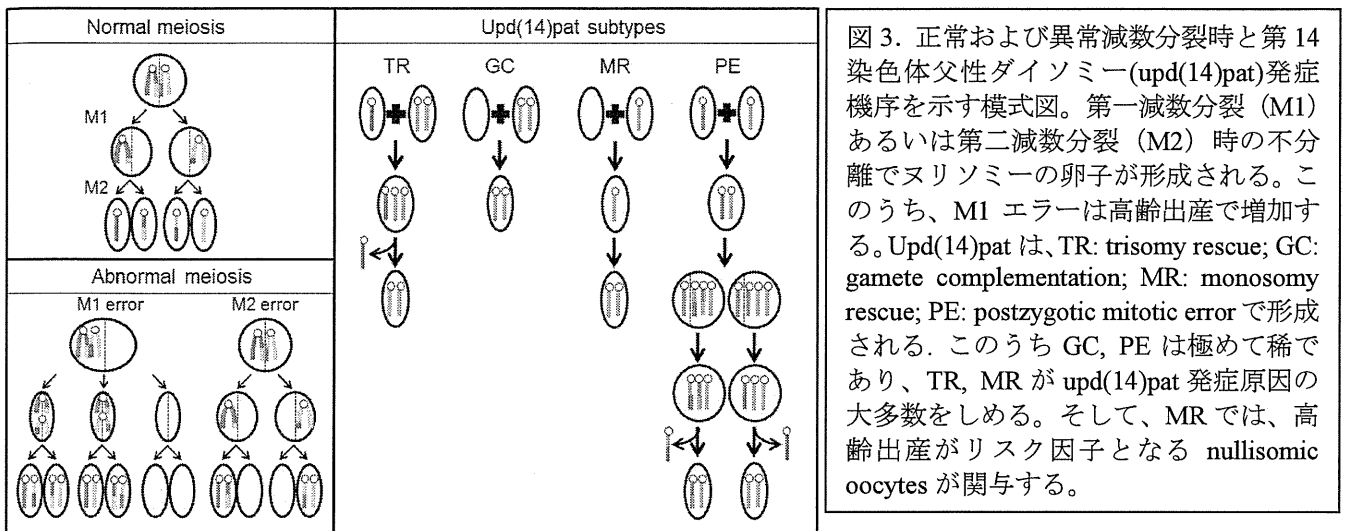


図3. 正常および異常減数分裂時と第14染色体父性ダイソミー(upd(14)pat)発症機序を示す模式図。第一減数分裂(M1)あるいは第二減数分裂(M2)時の不分離でヌリソミーの卵子が形成される。このうち、M1エラーは高齢出産で増加する。Upd(14)patは、TR: trisomy rescue; GC: gamete complementation; MR: monosomy rescue; PE: postzygotic mitotic errorで形成される。このうちGC、PEは極めて稀であり、TR、MRがupd(14)pat発症原因の大多数をしめる。そして、MRでは、高齢出産がリスク因子となる nullisomic oocytes が関与する。

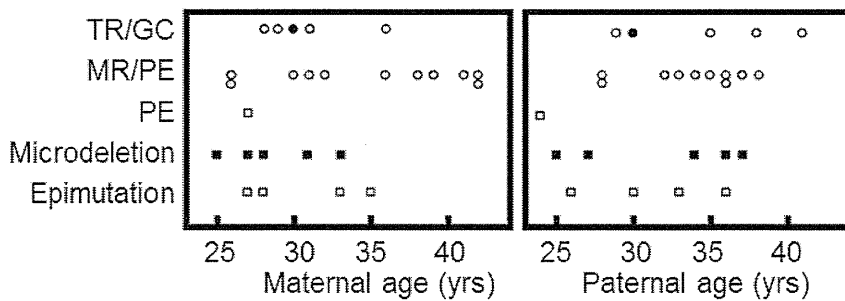
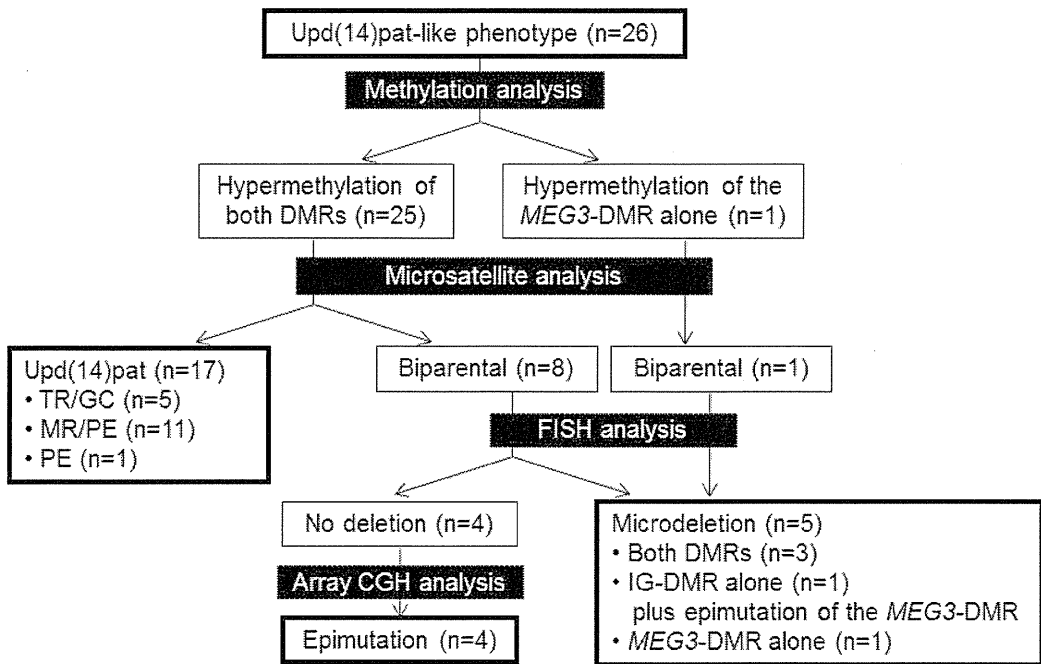


図4. 第14染色体父性ダイソミー症候群患者26例における発症原因の分類(上)と出生時両親年齢の分布(下)。

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日文科科学省・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 PAPS2 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.

10. 池川志郎. 日常の臨床の現場で遭遇する関節の遺伝病:家族歴、聞いていますか? 第12回 久留米関節セミナー. 久留米. 2013年2月10日.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

B3GALT6 異常症の遺伝子診断(出願)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総合研究報告書

致死性骨異形成症の診断と予後に関する研究

胎児超音波計測による長管骨長の基準値作成

（多施設共同観察研究）

研究分担者	室月 淳	宮城県立こども病院 部長
	澤井英明	兵庫医科大学 准教授
	山田崇弘	北海道大学 助教
	堤 誠司	山形大学 講師
	佐藤秀平	青森県立中央病院 センター長
	篠塚憲男	胎児医学研究所 代表
	高橋雄一郎	長良医療センター 医長
	佐世正勝	山口県立総合医療センター センター長

研究要旨 超音波断層法による胎児の長管骨（すなわち大腿骨 femur、脛骨 tibia、腓骨 fibula、上腕骨 humerus、尺骨 ulna、橈骨 radius）の長さについての日本人の基準値をつくり、胎児骨系統疾患などの骨病変の診断に有用な基礎資料を作成する多施設共同研究である。なお大腿骨長については日本超音波医学会によりすでに基準値がつくられているが、それ以外の胎児の脛骨、腓骨、上腕骨、尺骨、橈骨の長さの基準値は、過去に海外では発表されており、本邦ではそれらが参考にされている。しかし長管骨の発達には人種差があり、日本人で決められた大腿骨長と欧米のそれを比べると、妊娠末期となると 10mm 近い差が認められている。

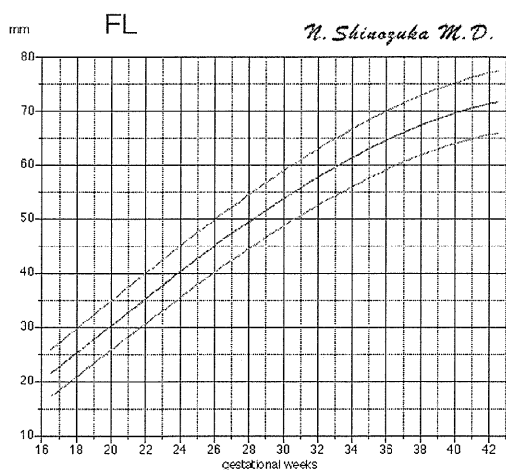
胎児骨系統疾患は骨の全身の発達成熟に何らかの異常を呈する遺伝子病である。胎児骨系統疾患は、ほとんどが子宮内か出生直後に死亡する生命予後がきわめて悪いものから、成長後の低身長が唯一の症状である予後良好のものまで非常に多彩である。胎児期に骨短縮を認める疾患は 100 種類以上あるといわれているが、ひとつひとつの疾患の発症頻度が低いため、胎児期に長管骨の短縮を認める場合、その診断に難渋することが多い。日本人胎児の長管骨の基準値を作成することにより、骨系統疾患の正確な診断の一助とする。

A. 研究目的

胎児の長管骨、すなわち大腿骨 femur、脛骨 tibia、腓骨 fibula、上腕骨 humerus、尺骨 ulna、橈骨 radius の長さについての日本人

の基準値をつくり、胎児骨系統疾患などの骨病変の診断の基礎資料を作成する。

大腿骨長（以下の図 FL）については日本超音波医学会によりすでに基準値がつくら



れている。

それ以外の胎児の脛骨、腓骨、上腕骨、尺骨、橈骨の長さの基準値は、過去に Queenan (1980)、Farrant (1981)、Jeanty (1984)、Merz (1987)などが発表しており、本邦では今でも Jeanty や Merz の値が用いられている。しかし長管骨の発達には人種差があるのは自然であり、日本人で決められた大腿骨長と欧米のそれを比べると、妊娠末期となると 10mm 近い差が認められている。実際に Jeanty や Merz の基準値は、臨床上の印象よりかけ離れた評価が出てくることがしばしばである。

胎児骨系統疾患は骨の全身の発達成熟に何らかの異常を呈する遺伝子病である。胎児骨系統疾患は、ほとんどが子宮内か出生直後に死亡する生命予後がきわめて悪いものから、成長後の低身長が唯一の症状である予後良好のものまで非常に多彩である。胎児期に骨短縮を認める疾患は 100 種類以上あるといわれているが、ひとつひとつの疾患の発症頻度が低いため、胎児期に長管骨の短縮を認める場合、その診断に難渋することが多い。日本人胎児の長管骨の基準値を作成することにより、骨系統疾患の正確な診断の一助とする。

B. 研究方法

試験タイプ：多施設共同観察試験

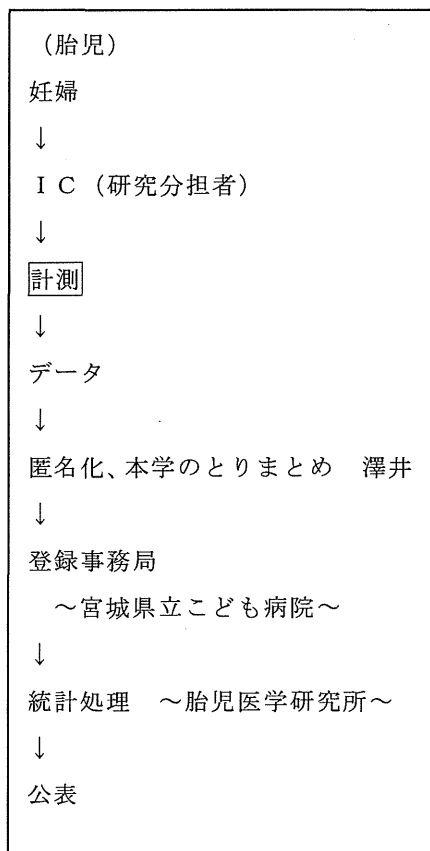
【対象】

1. 妊娠16週0日より妊娠40週6日まで
2. 16歳以上45歳未満
3. 単胎である
4. 妊娠初期にCRL計測により分娩予定日が決められている
5. 明らかな胎児奇形や発育遅延を認めない
6. 妊娠高血圧症や妊娠糖尿病などの母体合併症を認めない
7. 試験参加について本人から文書で同意が得られている

【方法】

1. 妊婦健康診査時に胎児の長管骨（大腿骨、脛骨、腓骨、上腕骨、尺骨、橈骨）の長さを計測して記録する。
2. 胎児期の長管骨はしばしば骨幹の部分しか骨化していない。その骨化部分を両端まで画面上に描出し、いちばん長いところを計測する。
3. 下腿の脛骨、腓骨、前腕の尺骨、橈骨は、それぞれ混同されて計測されることがあるので注意する。区別するために、最初に同一画面上に両方の骨を一緒に描出する。
4. 下腿では脛骨は腓骨より常に長い。腓骨は脛骨より外側に位置し、脛骨より若干薄く描出される。脛骨がより近位側に位置し、遠位側では脛骨、腓骨ともほぼ同じレベルにある。
5. 前腕では尺骨は橈骨より長い。尺骨はより近位側に位置し、より遠位側にあるのが橈骨である。
6. 長管骨の計測は画像に描出しやすい方で左右どちらでも構わない。胎児がうつ伏せか仰向けでない限り両側の長管骨をすべて描出することは難しいし、また時間的にも無駄である。

7. 胎児の計測データは、出生後に出生児の体重、身長、頭囲、腹囲のデータをあわせて事務局の宮城県立こども病院（室月 淳）に報告する。



8. 統計処理などは共同研究者である胎児医学研究所・篠塚憲男に委託する。

【登録数と研究期間】

登録数：一施設100計測で合計1,000計測を目標とした。

予定研究期間：平成22年年6月（倫理委員会承認後）より平成23年3月31日。

宮城県立こども病院を中心に9施設で実施した。

【問い合わせ先】

適格基準など臨床的判断を要するもの：事務局（宮城県立こども病院 室月 淳）

記録用紙（CRF）記入など：胎児医学研究所（篠塚憲男）。

研究者などの登録など：事務局 宮城県立こども病院（室月 淳）。

C. 研究結果

超音波計測をおこなった正期産正常体重出生児のデータ。

分布の正規性を検討

平均 $f(x)$ \pm 標準偏差 $g(x)$ で 基準化する。

症例

	計測数	AFD	出生	\pm	体重	\pm	症例数	計測/症例
山口医療	183	167	39w2d	8.2	2989	343	89	
久留米大	468	462	39w4d	10	3046	338	108	
瀬戸	289	283	39w1d	7.2	2961	333	264	
春日井市民	107	103	39w6d	9.7	3062	276	103	
北大	99	96	39w0d	9.7	2972	333	32	
長良医療	31	31	37w6d	12.3	2924	428	31	
順天浦安	111	111	38w4d	10.8	2889	247	15	
宮城こども	61	54	39w2d	7.1	3067	278	38	
愛媛県中	328	326	39W3D	13.7	3047	416	51	
全体	1677	1633	39w1d	9.3	2995	344	731	2.29

施設間の計測値の解析

施設間（測定者間のばらつき）FL計測で解析

	25 w	30 w	36 w
愛媛県中	44.4 \pm 2.5	53.9 \pm 2.5	65.8 \pm 2.7
北大		55.0 \pm 3.4	65.6 \pm 2.1
順天浦安	43.3 \pm 2.6	54.8 \pm 1.9	65.2 \pm 1.9
春日井	43.9 \pm 2.5		66.6 \pm 3.4
久留米大	43.9 \pm 1.4	55.1 \pm 2.3	65.7 \pm 2.3
宮城こども	45.5 \pm 0.7	54.3 \pm 2.1	63.0 \pm 3.5
長良	55.0 \pm 1.0	65.3 \pm 3.0	
瀬戸	42.8 \pm 2.21	54.6 \pm 1.7	64.0 \pm 2.6
山口医療	43.7 \pm 2.4	52.8 \pm 3.4	64.1 \pm 2.5

	ulna/HL	tibia/FL
愛媛県中	0.95±0.05	0.89±0.07
北大	0.96±0.06	0.89±0.04
順天浦安	0.95±0.05	0.90±0.04
春日井	0.95±0.05	0.89±0.04
久留米	0.95±0.05	0.89±0.04
宮城こども	0.96±0.04	0.90±0.04
長良医療	0.96±0.03	0.88±0.03
瀬戸	0.94±0.07	0.89±0.05
山口医療	0.95±0.09	0.89±0.03

