

P-12: 全胎状奇胎特異的microRNAの同定とその臨床応用に関する検討. 長谷川ゆり, 三浦清徳, 東嶋 愛, 城 大空, 阿部修平, 三浦生子, 三嶋博之, 木下 晃, 吉浦孝一郎, 増崎英明

P-130: ホルモン非抵抗性先端異骨症のエクソーム解析. 要 匡, 柳 久美子, 小口良子, 成富研二, 當間隆也, 近藤達郎, 二井英二, 外木秀文, 西村 玄, 吉浦孝一郎, 太田 亨, 新川詔夫, 松浦信夫, Dong-Kyu Jin

- 14) 第24回日本小児口腔外科学会総会・学術大会, 2012年11月24日(土), 名古屋市愛知学院大学 教育講演6: 次世代シーケンサーを用いたDisease Gene Hunting. 三嶋博之
- 15) 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月11日(火)~14日(金), 福岡市福岡国際会議場・マリンメッセ福岡, 福岡 3W2III-6 (口演): ヒトゲノム変異解析ワークフローにおける公共データベース活用. 三嶋博之, 吉浦孝一郎 3P-0053 (ポスター): ヒトゲノム変異解析ワークフローにおける公共データベース活用. 三嶋博之, 吉浦孝一郎

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
分担研究報告書

コステロ症候群・CFC症候群類縁疾患に関する研究

分担研究者 松原洋一
東北大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

コステロ症候群およびCFC (cardio-facio-cutaneous) 症候群は、特異的顔貌・心疾患・骨格異常・精神遅滞・皮膚症状・易発がん性を示す常染色体優性遺伝性疾患である。2005年にコステロ症候群の病因遺伝子がHRASであることが、さらに2006年にはCFC症候群の原因遺伝子がKRAS, BRAF, MEK1/2であることが明らかとなり、遺伝子解析による分子診断が可能となった。それ以降、国内外で相次いで患者が発見されるようになった。本分担研究では、全国調査によって両疾患の日本における罹患数の算出を行い、その病態や合併症について解析を行った。これらの調査で18-32歳の成人患者15人の生活状況・合併症が明らかにされた。

研究協力者

緒方 勤 (国立成育医療研究センター・研究所)
黒澤健司 (神奈川県立こども医療センター・遺伝科)
川目 裕 (お茶の水女子大学・大学院)
岡本伸彦 (大阪府立母子保健総合医療センター・遺伝診療科)
大橋博文 (埼玉県立小児医療センター・遺伝科)
水野誠司 (愛知県心身障害者コロニー中央病院)
栗山進一 (東北大学・大学院医学系研究科)
呉 繁夫 (東北大学・大学院医学系研究科)
青木洋子 (東北大学・大学院医学系研究科)
新堀哲也 (東北大学・大学院医学系研究科)
井上晋一 (東北大学・大学院医学系研究科)
阿部 裕 (東北大学・大学院医学系研究科)
斎藤由佳 (東北大学・大学院医学系研究科)
井泉瑠美子 (東北大学・大学院医学系研究科)

A. 研究目的

コステロ症候群およびCFC (cardio-facio-cutaneous) 症候群は、中等度～重度の精神遅滞や発達障害を示し、そのなかには経口摂取や歩行を獲得できず生涯介護が必要なケースも知られている。いずれの疾患についても遺伝子診断が導入され他の類似疾患との明確な鑑別が可能となっただけから、まだ日が浅い。そのため、各疾患の自然歴や長期予後は不明である。さらに、患児（患者）の育児・教育・療育・介護における問題点や課題についても不明な点が多く、患者家族の戸惑いが大きい。本分担研究では、両症候群の診断基準の作成、患者数の把握、臨床症状及び合併症の把握をおこなった。

私たちは、これまでに、図1に示すような暫定診断基準を作成し、それをもとに全国調査を実施した。

図 1

コステロ症候群の暫定的な診断基準

下記の臨床症状を有し、かつHRAS遺伝子変異が同定されること。

<臨床症状とその合併頻度>

- | | |
|--|---------------------|
| • 特徴的な顔貌 (92%) | • 出生後の哺乳障害 (88%) |
| • 手足の深いしわ (88%) | • 精神遅滞 (81%) |
| • 相対的大頭症 (85%) | • カールしていて疎な毛髪 (77%) |
| • 柔らかく緩い皮膚 (77%) | • 短頸 (58%) |
| • 指関節の可動性亢進 (58%) | |
| • 心疾患 (73%) ~ 肥大型心筋症 (58%)、不整脈 (30%) | |
| • 患者の約15%に悪性腫瘍 (膀胱癌、神経芽細胞腫、横紋筋肉腫などを合併) | |

(注) 成人の患者は日本で同定されていないため、本診断基準は未成年にのみ適用される。

CFC症候群の暫定的な診断基準

下記の臨床症状をもつ患者で、遺伝子解析にてKRAS・BRAF・MEK1・MEK2の遺伝子変異が同定された場合は、CFC症候群と確定診断される。しかしながら、CFC症候群の約40%では原因遺伝子が不明のため、遺伝子変異が同定されない場合でも本症を否定することはできない。

<臨床症状とその合併頻度>

- ・特徴的な顔貌(>92%)
- ・精神遅滞(100%)
- ・言葉の遅れ(96%)
- ・カールした毛髪(96%)
- ・相対的大頭症(92%)
- ・短頸(88%)
- ・低身長(76%)
- ・心疾患(84%): 肥大型心筋症(44%)、肺動脈狭窄症(36%)、不整脈(12%)
- ・多彩な皮膚症状: 毛孔角化症(60%)、角化症(56%)、色素沈着症(40%)

(注) 成人の患者は日本で同定されていないため、本診断基準は未成年にのみ適用される。

B. 研究方法

本分担研究に先行して実施したコストロ症候群・CFC症候群の全国一次調査をもとに、患者を現在フォローしている医療機関を対象に調査用紙を送付して情報を取得した。医療機関からの要請があった場合には、患者家族の同意を得て遺伝子診断を提供した。

(倫理面への配慮)

本研究における遺伝子解析研究は3省庁の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に沿って行った。本研究は、すでに東北大学医学部倫理委員会の承認を得ている(承認番号2006-233)。また疫学研究に関しては疫学研究に関する倫理指針に沿って行った。疫学研究に関しては、東北大学医学部倫理委員会の承認を得ている(承認番号2009-256)。

C. 研究結果

1) わが国におけるコストロ症候群・CFC症候群の実態解析

現時点での日本におけるコストロ症候群・CFC症候群の患者数は、それぞれ123人(95%信頼区間, 50-202)、177人(95%信頼区間, 58-295)で、有病率はそれぞれ1.0、1.4(人口100万人対)と推定された。調査対象患者における臨床所見と合併症は表1のような頻度で観察された。

表1

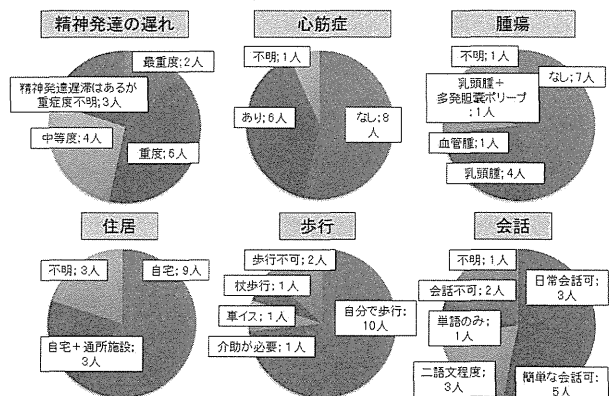
| | コストロ症候群 (n=35) | CFC症候群 (n=48) |
|---------|-------------------|------------------|
| 悪性腫瘍 | | |
| 腫瘍合併の有無 | 3% | 4% |
| 循環器 | | |
| 肥大型心筋症 | 51% | 29% |
| 肺動脈狭窄 | 9% | 33% |
| 先天性心奇形 | 11% | 25% |
| 不整脈 | 46% | 19% |

またこれまで日本におけるコストロ症候群・CFC症候群の成人症例は明らかでなかったが、全国調査より18-32歳の成人が15人いることが明らかになった(コストロ症候群:6人、CFC症候群9人)(表2)。成人例における症状、これまでの腫瘍合併や、現在の生活拠点・QOL(quality of life)を調査したところ、成人例の多くは中等度から重

度の精神遅滞があるものの、歩行や摂食はある程度可能で、持続的な入院はしておらず自宅で暮らしていることが明らかになった。ただBRAF遺伝子変異を持つCFC症候群2人においては寝たきりで摂食に対しても介助が必要であった。また成人例では悪性腫瘍を合併した既往を持つ罹患者はいなかった。本研究により初めてコストロ症候群・CFC症候群成人例の生活状況が明らかになった。

表2

成人15人(18~32歳)の臨床像



また、研究協力者によって以下のような臨床症状の詳細な検討がおこなわれた。

大橋は、コストロ症候群の歯科口腔所見の特徴を明らかにするためにMDCTを用いた検討を試みた。頭蓋顔面・歯科口腔所見の標準的評価法としては、側貌頭部X線規格撮影、パノラマX線撮影、歯型模型解析が用いられる。しかし知的障害をもつ年少時期の患児ではこれらの本人の協力を要する検査は困難であるため、その代替法としてMDCTの応用を考えた。まず6例のヒト頭蓋骨を用いた比較検討で、MDCTはこれらの代替法として信頼性があることを確認した。次に本法を用いて本症患児4名(男2名、女2名;年齢は5~7歳)を対象に検討した。その結果、頭蓋骨に対する顔面骨の矮小化、突出傾向のある顔貌、狭窄歯列弓、歯の矮小化などの特徴をもつ傾向を認めた。

水野は、MEK2変異を持つCFC症候群患児の臨床所見を詳細に検討するとともに、遺伝子診断の結果をもとに行う遺伝カウンセリングのあり方について検討した。またBRAF変異を有するCFC症候群の1例において生後約5年間の摂食障害を示した。口腔から上部消化管において解剖学的な異常はなくまた誤嚥や流涎もないことから機能的な異常の存在も推定されず、味覚や触覚の過敏性がその原因の一つであると考えられた。

黒澤は、BRAF遺伝子変異CFC症候群3例、HRAS変異Costello症候群3例の自然歴をまとめた。CFC症候群では、1)就学後の環境の変化に敏感で、小学校後半から周期性嘔吐症や自傷行動などが目立ち始める、2)小学校高学年から中学ころからてんかん発作が増悪傾向にある、といった点が特徴としてあげられた。こうした行動特性は、CFC症候群のMEK1/2変異症例や、他の

RAS/MAPK 疾患と異なる。Costello 症候群では、思春期以降の心理変化も重要と考えられた。今後、より長期の医療管理に基づいた自然歴研究が必要と考えられる。

岡本は、CFC 症候群としてフォローしていた 2 例において、SHOC2 遺伝子変異が判明し、臨床像を詳細に分析した。また血管系病変をもつ類縁疾患である Macrocephaly-cutis marmorata teleangiectasia congenita⁴ 例について臨床像を分析した。

川目は、コストロ症候群の治療と健康管理の解明のために、摂食障害についての文献的検索を実施し、摂食障害の状況、経管栄養または胃瘻の利用状況、経口摂取の状況を検討した。

緒方は、文献解析により、コストロ症候群では、ヌーナン症候群に比し、粗な顔貌、幅広い鼻根部、弛緩性皮膚、加齢に伴う色素沈着増加、深い手掌・足底皮線、顔面または肛門周囲の乳頭腫、早期老化および脱毛、多源性心房性頻脈、中等度の精神遅滞、手首および指の尺骨偏位が特徴的であること、一方、CFC 症候群では、ヌーナン症候群に比しより粗な顔貌、重度の哺乳障害、毛孔性角化症、薄い眉毛と睫毛、魚鱗癬、眉毛癩痕性紅斑、高度の精神発達遅滞が特徴的であることを明らかにした。

3) 遺伝子解析と新規遺伝子の探索

青木・松原は、全国調査時に遺伝子診断の希望のあった 42 例について遺伝子解析を行い、既知の遺伝子の変異を 25 例に同定した。遺伝子変異が同定されていない患者についてはエクソーム解析を実施し、現在データを解析中である。

D. 考察

本研究にてコストロ症候群・CFC 症候群の成人における生活状況が明らかになった。成人においては、BRAF 遺伝子変異を持つ 2 人以外は、精神遅滞があるものの、持続的な医療的ケアを必要とすることなく自宅で生活していた。また成人例においては悪性腫瘍の合併がなかった。しかしながら、32 歳以上の患者がどのような生活を送っているか、あるいはどのような合併症を持っているかはいまだ明らかでなく、今後成人罹患者の自然歴・合併症・腫瘍の合併頻度などが明らかにするための長期フォローアップシステムの構築が重要と考えられた。

また本研究にて、歯科的・整形外科的な合併症や摂食・睡眠障害といった患者家族に密接な問題が明らかになったが、これらの問題については患者ネットワークを活用した調査を行い、コストロ症候群および CFC 症候群患者の診療とケアの指針を提言することが重要であると考えられた。

遺伝子解析については、現在、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析が進行中である。

E. 結論

コストロ症候群・CFC 症候群のわが国における患者数の推定を行うとともに、臨床症状と合併症を詳細に検討した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Abe Y, Aoki Y, Kuriyama S, Kawame H, Okamoto N, Kurosawa K, Ohashi H, Mizuno S, Ogata T, Kure S, Niihori T, Matsubara Y; Costello and CFC syndrome study group in Japan. Prevalence and clinical features of Costello syndrome and cardio-facio-cutaneous syndrome in Japan: findings from a nationwide epidemiological survey. *Am J Med Genet A*. 158A(5):1083-94, 2012.
- 2) Komatsuzaki S, Sakamoto O, Fuse N, Uematsu M, Matsubara Y, Ohura T. Clinical Reasoning: A young man with progressive subcortical lesions and optic nerve atrophy. *Neurology*. 79(7):e63-8, 2012.
- 3) Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saitsu H, Shimojima K, Yamamoto T, Higurashi M, Kawahara N, Kawauchi H, Nagasaka K, Okamoto N, Mori T, Koyano S, Kuroiwa Y, Taguri M, Morita S, Matsubara Y, Kure S, Matsumoto N. Homozygous c.14576G>A variant of RNF213 predicts early-onset and severe form of moyamoya disease. *Neurology*. 78(11):803-10, 2012.
- 4) Kikuchi A, Arai-Ichinoi N, Sakamoto O, Matsubara Y, Saheki T, Kobayashi K, Ohura T, Kure S. Simple and rapid genetic testing for citrin deficiency by screening 11 prevalent mutations in SLC25A13. *Mol Genet Metab*. 105(4):553-8, 2012.
- 5) Asano M, Fujimura T, Wakusawa C, Aoki Y, Matsubara Y, Aiba S. A Case of Almost Unilateral Focal Dermal Hypoplasia Resulting From a Novel Mutation in the Gene. *Acta Derm Venereol*. 93(1):120-121, 2012.
- 6) Patrinos GP, Smith TD, Howard H, Al-Mulla F, Chouchane L, Hadjisavvas A, Hamed SA, Li XT, Marafie M, Ramesar RS, Ramos FJ, de Ravel T, El-Ruby MO, Shrestha TR, Sobrido MJ, Tadmouri G, Witsch-Baumgartner M, Zilfalil BA, Auerbach AD, Carpenter K, Cutting GR, Dung VC, Grody W, Hasler J, Jorde L, Kaput J, Macek M, Matsubara Y, Padilla C, Robinson H, Rojas-Martinez A, Taylor GR, Vihinen M, Weber T, Burn J, Qi M, Cotton RG, Rimoin D; (International Confederation of Countries Advisory Council). Human variome project country nodes: Documenting genetic information within a country. *Hum Mutat*. 33(11):1513-9, 2012.
- 7) Narisawa A, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Niihori T, Aoki Y, Fujiwara K, Tanemura M, Hata A, Suzuki Y, Relton CL, Grinham J, Leung KY, Partridge D, Robinson A, Stone V, Gustavsson P, Stanier P, Copp AJ, Greene ND, Tominaga T,

Matsubara Y, Kure S. Mutations in genes encoding the glycine cleavage system predispose to neural tube defects in mice and humans. *Hum Mol Genet.* 21(7):1496-503, 2012.

- 8) Izumi R, Niihori T, Suzuki N, Kato M, Warita H, Tateyama M, Aoki M, Takahashi T, Nagashima T, Funayama R, Nakayama N, Abe K, Matsubara Y. Exome sequencing identifies a novel TTN mutation in a family with myofibrillar myopathy with early respiratory failure. *J Hum Genet* 2013 Feb 28 [Epub ahead of print]

2. 論文発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
分担研究報告書

先天性異常の疾患群に関する調査研究に関する研究；
インプリンティング異常症

研究分担者 緒方勤 浜松医科大学小児科 教授

研究要旨

本研究班の目的は、患者の表現型（症状）・遺伝子変異・担当医を登録するシステムの確立、そこから得られる患者自然歴にもとづく治療ガイドライン「疾患別母子手帳」の作成、手術時残余検体・皮膚検体を活用した疾患特異的iPS細胞株の作成、既承認薬を用いた候補薬スクリーニング体制の構築である。われわれは、この目的達成のために、インプリンティング異常症、特に、第14染色体父性・母性ダイソミー症候群、シルバーラッセル症候群、プラダーウイリ症候群を主として研究を実施し、患者集積、遺伝子診断フローチャート、診断基準をほぼまとめることができた。また、第14染色体父性ダイソミー症候群表現型陽性患者の皮膚繊維芽細胞を用いてiPS細胞を作成中である。これらの成果は、本研究班の目的達成に直接的に貢献しうるものである。

A. 研究目的

本研究班の目的は、患者の表現型（症状）・遺伝子変異・担当医を登録するシステムの確立、そこから得られる患者自然歴にもとづく治療ガイドライン「疾患別母子手帳」の作成、手術時残余検体・皮膚検体を活用した疾患特異的iPS細胞株の作成、既承認薬を用いた候補薬スクリーニング体制の構築である。このために、現在までに先天性異常疾患群の領域で組織された20余の研究奨励分野研究班からだされた患者概数の把握、原因遺伝子の決定・遺伝子変異解析系の確立などの成果を統合・発展させることが重要である。これには、標準的診療の確立と治療法の研究の発展のため、該当する20余の研究班間で共通の枠組みを適用した、研究活動を展開することが極めて有効と考えられる。具体的には、先天異常を専門としない一般医師および患者家族へのわかりやすい診療ガイドラインを統一的方法で提供する必要がある。また、先天異常については、内科的治療は困難と考えられてきたがマルファン症候群など一部の疾患について内服薬による予後の改善（disease modifying drug）の先鞭がつけられており、疾患特異的iPS細胞の樹立と病変組織に対応する細胞の樹立と、当該細胞もちいた候補薬のスクリーニングが待たれている。

われわれは、本年度、先天異常疾患のうち、インプリンティング異常症について、患者集積、遺伝子診断フローチャート、診断基準についてまとめた。

B. 研究方法

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を遵守して行い、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た。なお、下記の研究課題が、浜松医科大学倫理委員会で承認されていることを付記する。

- 成長障害における遺伝的原因の探索
- 先天性奇形症候群における遺伝的原因の探索
- 胎児・胎盤の成長・発達における遺伝および環境因子の検討

分子生物学的解析では、シーケンス解析、メチル化解析、マイクロサテライト解析、アレイCGH解析、MLPA解析など、現在なしうる解析をほぼ全て行った。

C. 研究結果

患者検体の集積

既に本研究の対象となるインプリンティング疾患表現型陽性患者約400例から臨床症状と末梢血検体を集積し、その全例において、現在実施しうる発症原因の解析を終了した。また、比較的少数例ではあるが胎盤集積もなされている。さらに、DMR 同定に有用である全染色体父性ダイソミーモザイク症例や全染色体母性ダイソミーキメラ症例も見出した（表1）。

遺伝子診断フローチャートの作成

- 第14染色体父性・母性ダイソミー症候群
39例の第14染色体父性ダイソミー症候群表現型陽性患者の遺伝的原因は図1のように診断された。これにより遺伝子診断フローチャートが完成した。また、これらの患者の解析から父性ダイソミー症候群の診断基準案は表2のように、第14染色体母性ダイソミー症候群の診断基準案は表3のようにまとめられた。

さらに、これらの患者の解析から、以下のことが判明した。(1) 配偶子形成時に樹立されるIG-DMRは胎盤におけるインプリンティングセンター(IC)である。(2) 受精後に樹立されるMEG3-DMRは個体におけるICである。(3) IG-DMRは個体におけるMEG3-DMRのメチル化パターン制御機能を有する。(4) MEG3-DMRにはCTCFタンパク結合部位が存在する。(5)

Upd(14)pat 症候群の表現型は主に父性発現遺伝子 *RTL1* の過剰発現による。(6) Upd(14)mat 症候群の表現型は主に父性発現遺伝子 *DLKI* および *RTL1* の発現低下に起因する。(7) 母性発現遺伝子 *RTL1as* にコードされる *microRNA* は *RTL1* の発現抑制機能を有する。

また、われわれは、第14染色体父性ダイソミー症候群表現型陽性患者のうち、世界で唯一のIG-DMR 単独欠失症例と *MEG3*-DMR 単独エピ変異症例、ならびに世界で数例しか報告されていないIG-DMR と *MEG3*-DMR の両者のエピ変異症例の皮膚繊維芽細胞を用いて iPS 細胞を作成中である。

● シルバーラッセル症候群

140 例のシルバーラッセル症候群表現型陽性患者の遺伝的原因は図2のように診断された。また、その診断基準案は表4のようにまとめられた。さらに、以下のことが判明した。(1) 日本人シルバーラッセル症候群の31.2%はH19-DMRの低メチル化を、6.5%は第7染色体母性ダイソミーを有する。H19-DMRの低メチル化患者は、出生時の相対的頭囲拡大、身長・体重の重度の低下、半身低形成などを高頻度に伴い、第7染色体母性ダイソミー患者は、言語発育遅滞を高頻度に伴う。(2) IGF2 が脳では例外的に両親性発現を示すことに一致して、H19-DMRの低メチル化患者では、IGF2の発現量を反映するメチル化係数が、修正時の身長・体重・胎盤重量と良く相関し、頭囲とは相関しなかった。(3) その母性ダイソミーがSRSを生じる第7染色体長腕には、胎盤特異的DMRが存在する。(4) 第17染色体長腕の微小欠失は、SRS発症原因の一つであり、この領域には候補遺伝子が存在する。

● プラダーウイリ症候群

209 例のシルバーラッセル症候群表現型陽性患者の遺伝的原因は図3のように診断された。さらに、以下のことが判明した。(1) PWSと診断された患者の一部は、upd(14)mat 症候群を有する。(2) PWS-IC 周辺の配列は、極微細欠失(約75 kb)患者における Angelman 症候群(AS)発症に関与する(AS 発症最少領域が母由来第15染色体から欠失するとASを発症するが、AS 発症最少領域とPWS-IC 周辺配列が同時に欠失するとASを生じない)。(3) PWS-IC には CTCF 結合配列が存在する。

● 個々のインプリンティング遺伝子変異解析

66 個のインプリンティング遺伝子を含む成長関連遺伝子を対象としてTarget Enrichment解析を行い、成長障害患者の2例において父親由来発現遺伝子 *RTL1* 遺伝子にミスセンス置換を見出し、また、同時に複数の遺伝子変異を同定している。

D. 考察

以上の成果は、本研究班の目的である患者の表現型(症状)・遺伝子変異・担当医を登録するシステムの確立、そこから得られる患者自然歴にもとづく治療ガイドライン「疾患別母子手帳」

の作成、手術時残余検体・皮膚検体を活用した疾患特異的iPS細胞株の作成、既承認薬を用いた候補薬スクリーニング体制の構築の全てに直接的に貢献しうるものである。さらに、インプリンティング疾患診断の普及に応用できるものである。

E. 結論

以上の成果は、本研究班の目的である患者の表現型(症状)・遺伝子変異・担当医を登録するシステムの確立、そこから得られる患者自然歴にもとづく治療ガイドライン「疾患別母子手帳」の作成、手術時残余検体・皮膚検体を活用した疾患特異的iPS細胞株の作成、既承認薬を用いた候補薬スクリーニング体制の構築の全てに直接的に貢献しうるものである。さらに、インプリンティング疾患診断の普及に応用できるものである。

F. 研究発表

- 1) Inoue H, Mukai T, Sakamoto Y, Kimura C, Kangawa N, Itakura M, Ogata T, Ito Y, Fujieda K: Identification of a novel mutation in the exon 2 splice donor site of the POU1F1/PIT-1 gene in Japanese identical twins with mild combined pituitary hormone deficiency. *Clin Endocrinol* 76 (1): 78–87, 2012.
- 2) Sugihara S*, Ogata T, Kawamura T, Urakami T, Takemoto K, Kikuchi N, Takubo N, Tsubouchi K, Horikawa R, Kobayashi K, Kasahara Y, Kikuchi T, Koike A, Mochizuki T, Minamitani K, Takaya R, Mochizuki H, Nishii A, Yokota I, Kizaki Y, Mori T, Shimura N, Mukai T, Matsuura N, Fujisawa T, Ihara K, Kosaka K, Kizu R, Takahashi T, Matsuo S, Hanaki K, Igarashi Y, Sasaki G, Soneda S, Teno S, Kanzaki S, Saji H, Tokunaga K, Amemiya S, The Japanese Study Group of Insulin Therapy for Childhood and Adolescent Diabetes (JSGIT): Genetic characteristics on HLA-class II and class I among Japanese type 1A and type 1B diabetic children and their families. *Pediatr Diabetes* 13 (1): 33–44, 2012.
- 3) 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.
- 4) Oto Y*, Obata K, Matsubara K, Kozu Y, Tsuchiya T, Sakazume S, Yoshino A, Murakami N, Ogata T, Nagai T: Growth hormone secretion and its effect on height in pediatric patients with different genotypes of Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet A* 158A (6): 1477–1480, 2012.
- 5) 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.
- 6) Stoppa-Vaucher S, Ayabe T, Paquette J, Patey N, Francoeur D, Vuissoz J-M, Deladoëy J, Samuels ME, Ogata T, Deal CL*: 46, XY gonadal dysgenesis: new *SRY* point mutation in two siblings with paternal germ line mosaicism. *Clin Genet* 82 (6): 505–513, 2012.
 - 7) Abe Y, Aoki Y*, Kuriyama S, Kawame H, Okamoto N, Kurosawa K, Ohashi H, Mizuno S, Ogata T, Kure S, Niihori T, Matsubara Y: Prevalence and clinical features of Costello syndrome and cardio-facio-cutaneous syndrome in Japan: Findings from a nationwide epidemiological survey. *Am J Med Genet A* 158A (5): 1083–1094, 2012.
 - 8) Koyama Y*, Homma K, Fukami M, Miwa M, Ikeda K, Ogata T, Hasegawa T, Murata M: Two-step biochemical differential diagnosis of classical 21-hydroxylase deficiency and cytochrome P450 oxidoreductase deficiency in Japanese infants using uUrinary Pregnanetriolone / Tetrahydrocortisone Ratio and 11 β -hydroxyandosterone by Gas chromatography - mass spectrometry. *Clin Chem* 58 (4): 741–747, 2012.
 - 9) Sekii K*, Itoh H, Ogata T, Iwashima S: Deterioration of myocardial tissue Doppler indices in a case of fetal hydrothorax as a promising indication for clinical intervention before the development of nonimmune hydrops fetalis. *Arch Gynecol Obstet* 286 (4): 1079–1080, 2012.
 - 10) Kalfa N, Fukami M, Philibert P, Audran F, Pienkowski C, Weill G, Pinto C, Manouvrier S, Polak M, Ogata T, C Sultan C*: Screening of *MAMLD1* mutations in 70 Children with 46,XY DSD: Identification and functional analysis of two new mutations. *PLoS One* 7 (3): e32505, 2012.
 - 11) Qin X-Y, Miyado M, Kojima Y, Zaha H, Akanuma H, Zeng Q, Yoshinaga J, Yonemoto J, Fukami M, Ogata T, Sone H*: Identification of novel low-dose bisphenol A targets in human foreskin fibroblast cells derived from hypospadias patients. *PLoS ONE* 7 (5): e36711, 2012.
 - 12) Sekii K*, Ishikawa T, Ogata T, Itoh H, Iwashima S: Fetal myocardial tissue Doppler indices before birth physiologically change in proportion to body size adjusted for gestational
 - 20) Moritani M, Yokota I, Tsubouchi K, Takaya R, Takemoto K, Minamitani K, Urakami T, Kawamura T, Kikuchi N, Itakura M, Ogata T, Sugihara S, Amemiya S: Identification of *INS* and *KCNJ11* gene mutations in type 1B diabetes in Japanese children with onset of diabetes before 5 yr of age. *Pediatr Diabetes* 14 (2): 112–120, 2012.
 - age in low-risk term pregnancies. *Early Hum Dev* 88 (7): 517–523, 2012.
 - 13) Fukami M*, Tsuchiya T, Takada S, Kanbara A, Asahara H, Igarashi A, Kamiyama Y, Nishimura G, Ogata T: Complex genomic rearrangements in the *SOX9* 5' region in a patient with Pierre Robin sequence and hypoplastic left scapula. *Am J Med Genet A* 158A (7): 1529–1534, 2012.
 - 14) Ogata T*, Fukami M, Yoshida R, Nagata E, Fujisawa Y, Yoshida A, Yoshimura Y: Haplotype analysis of *ESR2* in Japanese patients with spermatogenic failure. *J Hum Genet* 57 (7): 449–452, 2012.
 - 15) Qin XY, Kojima Y, Mizuno K, Ueoka K, Massart F, Spinelli C, Zaha H, Okura M, Yoshinaga J, Yonemoto J, Kohri K, Hayashi Y, Ogata T, Sone H*: Association of variants in genes involved in environmental chemical metabolism and risk of cryptorchidism and hypospadias. *J Hum Genet* 57 (7): 434–441, 2012.
 - 16) 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.
 - 17) Nagasaki K, Iida T, Sato H, Ogawa Y, Kikuchi T, Saitoh A, Ogata T*, Fukami M: *PRKARIA* mutation affecting cAMP-mediated G-protein-coupled receptor signaling in a patient with acrodysostosis and hormone resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 97 (9): E1808–1813, 2012.
 - 18) 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.
 - 19) Qin XY, Sone H*, Kojima Y, Ueoka K, Muroya K, Miyado M, Zaha H, Fukuda T, Yoshinaga J, Yonemoto J, Fukami M, Ogata T: Individual variation of the genetic response to low-dose bisphenol A in human foreskin fibroblast cells derived from cryptorchidism and hypospadias patients. *PLoS One* 7 (12): e52756, 2012.
 - 21) Suzuki-Suwanai A, Ishii T, Haruna H, Yamataka A, Narumi S, Fukuzawa R, Ogata T, Hasegawa T*: A report of two novel *NR5A1* mutation families: possible clinical phenotype of psychiatric symptoms of anxiety and/or depression. *Clin Endocrinol* (accepted).
 - 22) Miyado M, Nakamura M, Miyado K, Morohashi K, Sano S, Nagata E, Fukami M, , Ogata T*: *Mamld1* deficiency significantly reduces mRNA

expression levels of multiple genes expressed in mouse fetal Leydig cells but permits normal genital and reproductive development.

Endocrinology (accepted).

- 23) Sekii K*, Itoh H, Ogata T, Iwashima S*: Possible contribution of fetal size and gestational age to myocardial tissue Doppler velocities in preterm fetuses. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* (accepted).
- 24) Nagasaki K*, Tsuchuya S, Saitoh A, Ogata T, Fukami M: Neuromuscular symptoms in a patient with familial pseudohypoparathyroidism type 1b diagnosed by methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification. *Endocr J* (accepted).
- 25) Ohishi A*, Ueno D, Matsuoka, H, Kawamoto, F, Ogata T: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and adrenal hemorrhage in a Filipino neonate with hyperbilirubinemia. *Am J Perinatol Reports* (in press).
- 26) 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).
- 27) 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).
- 28) Fukami M*, Iso M, Sato N, Igarashi M, Seo M, Kazukawa I, Kinoshita E, Dateki S, Ogata T: Mutation and deletion of fibroblast growth factor receptor 1 gene in two patients with combined pituitary hormone deficiency. *Endocr J* (accepted).
- 29) Yamaguchi R, Kato F, Hasegawa T, Katsumata N, Fukami M, Matsui T, Nagasaki K, Ogata T: A novel homozygous mutation of the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene in a Japanese patient with familial glucocorticoid deficiency. *Endocr J* 2013 Mar 9. [Epub ahead of print]
- 30) Fukami M*, Shozu M, Ogata T: Molecular bases and phenotypic determinants of aromatase excess syndrome. *Int J Endocrinol* 2012: 584807, 2012.
- 31) Ogata T*, Sano S, Nagata E, kato F, Fumaki M: *MAMLD1* and 46,XY disorders of sex development. *Semi Reprod Med* 30 (5): 410–416, 2012.
- 32) Fukami M, Homma K, Hasegawa T, Ogata T*: Backdoor pathway for dihydrotestosterone biosynthesis: implications for normal and abnormal human sex development. *Dev Dyn* 2012 Oct 16. doi: 10.1002/dvdy.23892. [Epub ahead of print].
- 33) 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]

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表 1. 現在までに検体が集積されたインプリンティング疾患患者とその発症原因の概要(遺伝子解析で除外された症例は除く)

| 疾患 | 検体数 (胎盤数) | ダイソミー | エピ変異 | 欠失 | その他・ 原因不明 |
|--------------------|--------------|------------|----------------------------|-----|--------------|
| Upd(14)pat 症候群 | 39 (13) | 24 (Ch.14) | 7 (IG- & MEG3-DMR) (Ch.14) | 6 | 2 |
| Upd(14)mat 症候群 | 12 (0) | 6 (Ch.14) | 2 (IG- & MEG3-DMR) (Ch.14) | 4 | 0 |
| Silver-Russell 症候群 | 150 (8) | 9 (Ch.7) | 43 (H19-DMR) (Ch.11) | 0 | 98 |
| Prader-Willi 症候群 | 192 (0) | 39 (Ch.15) | 3 (SNRPN-DMR) (Ch.15) | 117 | 33 |

Upd(14)pat/mat 症候群：第 14 染色体父性/母性ダイソミー表現型陽性症候群

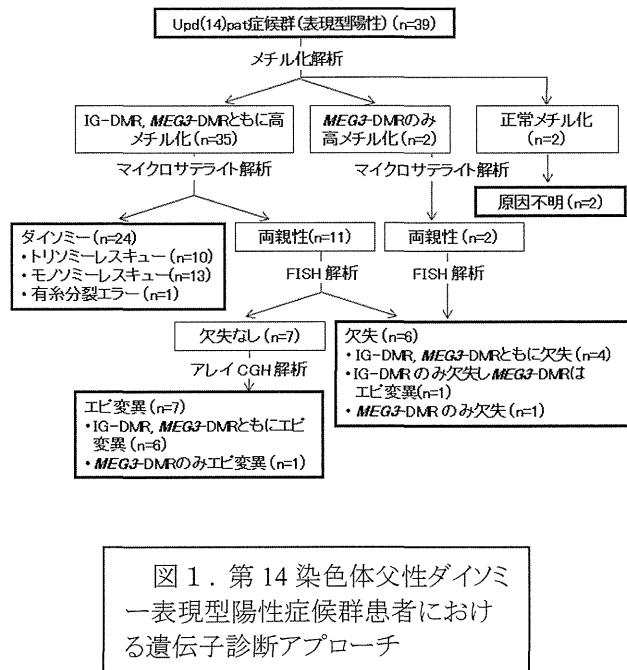


図 1. 第 14 染色体父性ダイソミー表現型陽性症候群患者における遺伝子診断アプローチ

表 2. 14番染色体父親性ダイソミーおよび類縁疾患診断基準(案)

- 主症状**
- ・ 羊水過多
 - ・ 胎盤過形成
 - ・ 特徴的な小胸郭(コートハンガー型、ベル型)と呼吸障害
 - ・ 腹壁の異常(臍帯ヘルニア、腹直筋離開)
 - ・ 特徴的顔貌(まんまるな頬、前額部突出、眼瞼裂狭小、平坦な鼻梁、小顎、前向き鼻孔、突出した人中)
- 副症状**
- ・ 発達遅延
 - ・ 摂食障害
 - ・ 翼状頸・短頸
 - ・ 喉頭軟化症
 - ・ 関節拘縮
 - ・ 側弯症
 - ・ 鼠径ヘルニア

表 3. 14番染色体母親性ダイソミーおよび類縁疾患診断基準(案)

主症状

- ・ 低出生体重
- ・ 低身長
- ・ 新生児期、乳幼児期の筋緊張低下
- ・ 小さな手

副症状

- ・ 哺乳障害
- ・ 運動発達障害(軽度)
- ・ 思春期早発傾向
- ・ くりかえす中耳炎
- ・ 前額突出
- ・ 小顎
- ・ 関節過伸展
- ・ 肥満

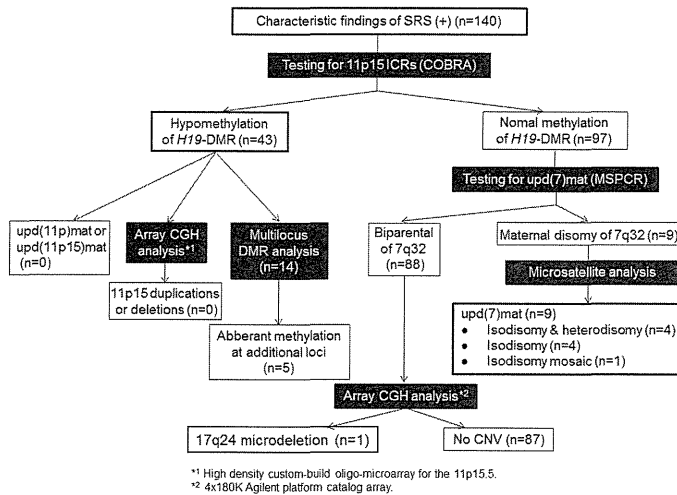
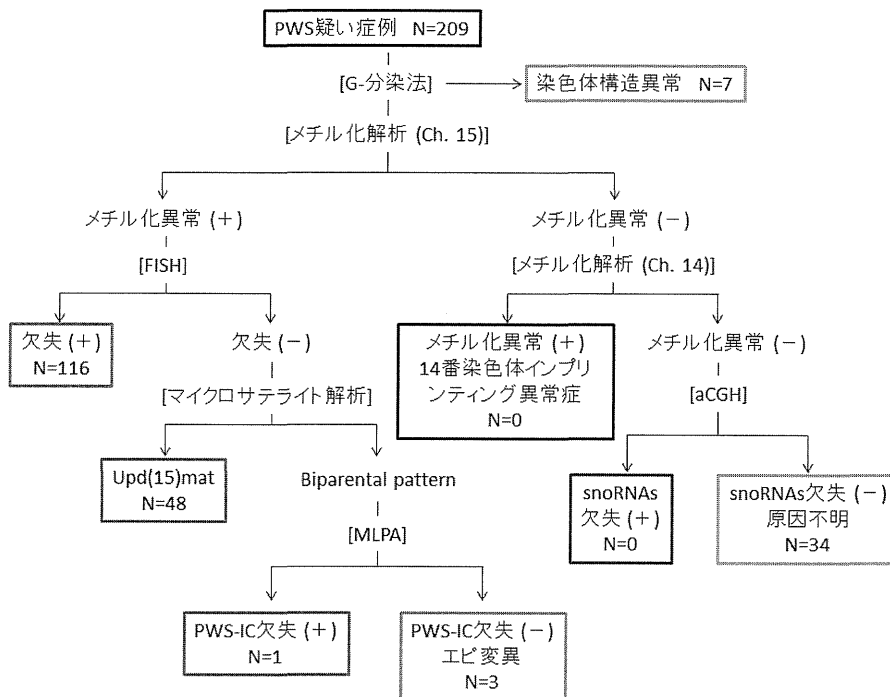


図 2. シルバーラッセル症候群表現型陽性症候群患者における遺伝子診断アプローチ

表 4. シルバーラッセル症候群診断基準(案)

必須条件: 生下時身長あるいは体重が-2SD以下
これに加えて、下記5つのマイナークライテリア中の3つ以上を満足するもの

- [1] 生後の成長障害(2歳以降の身長が-2 SD以下)
- [2] 生下時の相対的頭囲拡大(身長あるいは体重SDSと頭囲SDSの差が1.5以上)
- [3] 早期の前頭部突出
- [4] 左右非対称
- [5] 早期摂食障害



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
分担研究報告書

Prader-Willi 症候群と Angelman 症候群との診断基準と
健康チェックの手引き作成に関する研究

研究分担者 齋藤伸治

名古屋市立大学大学院医学研究科新生児・小児医学分野・教授

研究要旨

Prader-Willi症候群（PWS）とAngelman症候群（AS）とはゲノム刷り込み現象に関連し、中枢神経症状を主体とする疾患である。いずれも遺伝学的診断によりそれぞれ98%、90%の診断が可能である。しかし、適切に遺伝学的診断を実施するためには、臨床的な診断基準が必要である。さらに、遺伝学的診断法の導入により、早期診断が可能になったため、見通しをもった健康管理を示すことが望まれる。本研究では、欧米で用いられている診断基準をもとに本邦におけるPWSとASとの診断基準（案）を作成した。さらに、それぞれの健康チェックの手引きの作成を行った。今後の研究において、本邦におけるこれらのガイドライン（案）および健康チェックの手引きの有用性の検討が課題である。

A. 研究目的

Prader-Willi症候群（PWS）とAngelman症候群（AS）とはゲノム刷り込み現象に関連する代表的な疾患である。ともに中枢神経症状を主要な症状とし、発達の遅れなどにより新生児期から乳児期に疑われる。発生頻度は両疾患ともに、出生15,000に1人と比較的頻度が高い。いずれも遺伝学的診断により確定診断が可能であり、PWSでは98%とほぼ全例の診断が可能である。ASでは90%が遺伝学的に確定診断が可能と考えられている。しかし、適切に遺伝学的診断を実施するためには、臨床的な診断基準が必要である。また、遺伝学的診断法の導入により、早期診断が可能となったため、長期にわたる見通しをもった健康管理を行うことが重要である。そこで、本研究においては、欧米で用いられている診断基準をもとに本邦におけるPWSとASとの診断基準（案）の作成と、それぞれの疾患における健康チェックの手引きの作成を目的とした。

B. 研究方法

診断基準（案）の作成においては、欧米で広く使用されている診断基準を参考にした。具体的には、PWSではGunay-Augun et al. *Pediatrics* 2001;108:e92のDNA診断の適応基準を参考にした。ASではWilliams et al. *Am J Med Genet* 2006;140A:413-418.を参考にした。PWSは原則として遺伝学的に診断が可能な疾患であるので、遺伝学的診断の適応基準をもって、診断基準（案）とした。

健康チェックの手引き作成にあたっては、Cassidy and Allanson. *Management of Genetic Syndrome*. 第3版を参考にした。

C. 研究結果

1) PWS 診断基準（案）

| 診断時年齢 | DNA 診断の適応基準 |
|---------|--|
| 出生～2 歳 | 1. 哺乳障害を伴う筋緊張低下 |
| 2～6 歳 | 1. 哺乳障害の既往と筋緊張低下 2. 全般的な発達遅延 |
| 6～12 歳 | 1. 筋緊張低下と哺乳障害の既往 （筋緊張低下はしばしば持続） 2. 全般的な発達遅延 3. 過食（食欲亢進、食べ物への異常なこだわり）と中心性肥満 （適切な管理がなされない場合） |
| 13 歳～成人 | 1. 知的障害、通常は軽度精神遅滞 2. 過食（食欲亢進、食べ物への異常なこだわり）と中心性肥満 （適切な管理がなされない場合） 3. 視床下部性腺機能低下、そして／もしくは、典型的な行動の問題（易怒性や強迫症状など） |

2) AS 診断基準 (案)

B. 常に存在 (100%)

- ・発達遅滞、重度
- ・運動もしくはバランスの障害、通常は失調性歩行、もしくは四肢の振戦運動、時に短い急速な動きや鈍い運動
- ・特徴的な行動、容易に引き起こされる笑い、易興奮制、上肢の常動運動
- ・言語遅滞、有意語はほとんど存在しない、表出性言語は言語理解や非言語性コミュニケーションより劣る。

B. しばしば存在 (80%)

- ・頭囲の成長障害、一般的には2歳までに-2SD以下となる。小頭症は15q11-q13欠失例に多い。
- ・てんかん発作、一般的に3歳未満で発症する。てんかん発作の程度は年齢とともに減少するが、生涯持続する。
- ・脳波異常、特徴的なパターンを示す。脳波異常は2歳前から出現し、臨床的な発作に先行し、時に発作の有無と関連しない。

C. 時に出現 (20-80%)

- ・平坦な後頭部
- ・後頭部の溝
- ・舌の突出
- ・舌の突出；哺乳／嚥下障害
- ・哺乳障害、乳児期の体幹の筋緊張低下
- ・下顎突出
- ・大きな口、歯間のすきま
- ・流涎
- ・口にもものを入れる動作
- ・斜視
- ・家族と比べて皮膚の低色素症、薄い色の髪の毛、薄い色の虹彩 (欠失型の患者のみ)
- ・下肢の腱反射亢進
- ・歩行時に上肢を挙上し屈曲する
- ・歩行時に足を開き、足首を外転する
- ・熱に感受性が高い
- ・睡眠障害、睡眠時間が短い
- ・水が好き、ある種の紙やプラスチックのような縮れた感触を好む。
- ・食行動の異常
- ・肥満 (年長児)
- ・側彎
- ・便秘

3) PWS の健康チェックの手引き 別紙添付 (表 1)

4) AS の健康チェックの手引き 別紙添付 (表 2)

D. 考察

PWSはほとんどの診断が遺伝学的に可能である。そのため、診断基準の役割は、いかに早期に適切な遺伝学的診断に結びつくかが重視されている。今回の検討では、2001年のGunay-Augunらの報告に基づき、診断基準 (案) を作成した。この基準では、確実な診断である遺伝学的診断が遅滞なく実施されることを目的としているため、一

般的な臨床診断基準よりは甘い基準である。たとえば、2歳までの基準は筋緊張低下のみとなっている。その意味で、PWSは遺伝学的診断が可能である以上、見逃してはいけない疾患として位置づけられる。実際、私たちがこれまでに遺伝学的診断を依頼された200名を超える患者においては、全例でこの基準を満たしていた。しかし、実際にPWSと遺伝学的に診断された例は半数程度に過ぎない。残りの患者の中に、PWS以外の染色体微細コピー数異常などが少なからず存在することを報告してきている。このように、今回の診断基準 (案) を満たすなかには、PWS以外の患者が多く含まれることを理解することが重要である。

ASの診断基準として欧米において一般的に用いられているWilliamsの基準は、PWSと比較するとより一般的な臨床診断基準といえる。しかし、ASにおいても90%が遺伝学的に確定診断されるために、臨床のみの診断基準の意味は必ずしも高くない。PWS同様にどのような場合に遺伝学的診断を行うかの判断が重要である。そのため、欧米においても、臨床のみから確定診断するための診断基準の作成を行う方向性は示されていない。実際、Williamsの基準を満たした症例のなかに、TCF4やSLC9A6などのASとは異なる遺伝子異常が存在することは明らかである。

このようにPWSとASとにおける診断基準は遺伝学的診断の実施を前提とする状況となっている。PWSとASとの遺伝学的背景は複雑であり、確定診断のためには体系的な遺伝学的解析が必要である。しかし、日本においては、欠失を同定するFISH法のみが保険収載されており、その他の解析は保険診療で行うことはできない。私たちの研究室で未だに多くの症例の確定診断を行っている状況である。DNAメチル化テストは欠失以外の片親性ダイソミーや刷り込み変異を同定することができ、PWSでは98%の検出率であるため、早急な保険収載が望まれる。

PWSおよびASでは適切な遺伝学的診断が行われることで、1歳前に確定診断を得ることができる。早期診断を健康管理に生かすためには、年齢に応じた健康チェックが欠かせない。そこで、それぞれの疾患についての健康チェックの手引き (案) の作成を行った。いずれの疾患も症状の幅が広く、また、年齢における重要な症状が変化する。健康チェックの手引き (案) については、多くの関係者との意見交換を行い、充実した内容にすることが重要であり、今後の研究における検討課題である。

E. 結論

PWSとASとの診断基準 (案) の作成を行った。両疾患とも遺伝学的診断の占める位置が高いため、早期に遺伝学的診断に結びつける役割が診断基準の主要な働きである。さらに、健康チェックの手引き (案) の作成を行った。広く意見を求め、完成版の作成を目指している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hosoki K et al. Hand-foot-genital syndrome with a 7p15 deletion demonstrates a clinically recognizable syndrome. *Pediatr Int* 54:e22-25, 2012.
- 2) Hosoki K et al. Clinical Phenotype and Candidate Genes for the 5q31.3 Microdeletion Syndrome. *Am J Med Genet A* 158A:1891-1896, 2012.
- 3) Kawamura R et al. Visualization of the spatial positioning of the *SNRPN*, *UBE3A*, and *GABRB3* genes in the normal human nucleus by three-color 3D-fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Res* 20:659-672, 2012.
- 4) Tsurusaki Y et al. A *DYNC1H1* mutation causes a dominant spinal muscular atrophy with lower extremity predominance. *Neurogenetics* 13:327-332, 2012.
- 5) Takenouchi T et al. Tissue-limited ring chromosome 18 mosaicism as a cause of Pitt-Hopkins syndrome. *Am J Med Genet A* 158A:2621-3, 2012.
- 6) Egawa K et al. Decreased tonic inhibition in cerebellar granule cells causes motor dysfunction in a mouse model of Angelman syndrome. *Sci Transl Med* 4:163ra157, 2012.

2. 論文発表

- 1) 根岸豊ら. Three siblings of Leigh syndrome associated with a mitochondrial m.3697G>A mutation. 第54回日本小児神経学会 平成24年5月17-19日(札幌)
- 2) 齋藤伸治ら. *DYNC1H1* 変異は特異な大腿四頭筋優位神経原性筋萎縮症の原因となる、第57回日本人類遺伝学会 平成24年10月25-27日(東京)
- 3) Hosoki K et al. Submicroscopic chromosomal rearrangements in patients with an Angelman syndrome-like phenotype. 62th Annual Meeting of American Society of Human Genetics, San Francisco, USA, 11/7-10/2012
- 4) Saitoh S et al. A *DYNC1H1* mutation causes a quadriceps-dominant neurogenic muscular atrophy. 62th Annual Meeting of American Society of Human Genetics, San Francisco, USA, 11/7-10/2012
- 5) Saitoh S et al. Molecular genetic investigation on patients with Angelman syndrome in Japan: experience on 168 deletion-negative cases. 2012 Meeting of Angelman syndrome Foundation. Washington DC, USA, 6/26-17, 2012.

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1. Prader-Willi 症候群 健康チェック手引き (案)

| | 新生児期・乳児期 | 幼児期 |
|-------|---|-----------------------------|
| 総合的 | 遺伝学的診断 (DNA メチル化テスト・FISH 法) 遺伝カウンセリング 家族支援 (患者会の紹介) | 栄養指導・肥満防止 成長ホルモン適応の検討 |
| 成長 | 経管栄養により栄養の保障 | PWS 成長曲線での評価 成長ホルモン適応の検討 |
| 発達と行動 | 適切な療育に繋げる | 知的発達評価 適切な療育 |
| 肥満 | | 栄養指導による肥満の予防 |
| 内分泌 | 停留精巣の評価 (男児) 甲状腺ホルモンの評価 | 成長ホルモンの評価 甲状腺ホルモンの評価 |
| 筋骨格 | 筋緊張低下の評価 | 側彎の評価 |
| その他 | 斜視の評価 | |

| | 学童期 | 成人期 |
|-------|-----------------------------|-------------------------------------|
| 総合的 | 肥満の予防と self esteem の確立。 | 適切な生活の場の確保 精神症状の出現に注意する。 |
| 成長 | 成長の評価。 | |
| 発達と行動 | 発達に応じた教育。 | 精神症状 (抑うつや強い衝動性) が出現する場合は精神科相談。 |
| 肥満 | 栄養管理と GH 療法。 | 生涯にわたる栄養管理。 GH 療法の中止によるリバウンドに注意。 |
| 内分泌 | 二次性徴評価。 性ホルモン評価と補充療法の検討。 | 性ホルモン補充療法の検討。 |
| 筋骨格 | 側彎の出現に注意。 | 側彎と骨粗しょう症の管理 |
| その他 | 肥満合併症 (糖尿病、閉塞性無呼吸) に注意。 | 肥満合併症 (糖尿病、閉塞性無呼吸) に注意。 |

表 2. Angelman 症候群 健康チェック手引き (案)

| | 乳児期 | 幼児期 |
|-----------|--|--|
| 総合的 | 遺伝学的診断と遺伝カウンセリング (80%以上は診断できる)。 家族支援 (患者会の紹介) | 発達支援とてんかんの管理。 |
| 発達 | 4 か月健診では気づかれないことが多いが、10 か月健診は通過しない。 適切な療育を考慮。 | 歩行開始の平均は5歳であるが、歩行を獲得しない場合もある。 有意語の獲得は困難。 適切な療育環境の整備。 |
| けいれん・てんかん | 発熱時のけいれんに注意。 てんかんの評価と抗てんかん薬の適応評価。 | 抗てんかん薬の適応評価。 |
| 行動 | 睡眠障害の評価と対応。 | 多動、自閉傾向に対する理解と対応。 睡眠障害の評価と対応。 |
| その他 | 斜視の評価 | |

| | 学童期 | 成人期 |
|-----------|--------------------------------------|----------------------------|
| 総合的 | 適切な支援教育。 継続的なリハビリテーション。 | 生活の場の確保。 継続的なリハビリテーション。 |
| 発達 | 言語理解より言語表出が強く障害される。 病態を熟知した療育・教育。 | 能力の退行に注意。 |
| けいれん・てんかん | 抗てんかん薬の継続。 振戦の評価と対応。 | 抗てんかん薬の継続。 振戦の評価と対応。 |
| 行動 | 多動、自閉傾向に対する理解と対応。 睡眠障害の評価と対応。 | 加齢に伴う運動能力の減退に注意。 |
| その他 | | 肥満に注意。 |

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
分担研究報告書

インプリンティング異常症ベックウィズ・ビーデマン症候群に関する研究

研究分担者 副島英伸
佐賀大学医学部分子生命科学講座 教授

研究要旨

ベックウィズ・ビーデマン症候群（BWS）はゲノムインプリンティング異常症であるが、インプリンティング機構の本態は不明な点が多い。本研究では、本邦BWS症例についてゲノム・エピゲノム解析を行い、発症原因の分子機構と発症原因別の特徴的臨床症状を明らかにすることを目的とした。解析の結果、137症例の発症原因別の頻度が明らかとなった。また、BWSにおけるH19DMRの高メチル化は受精後、特に着床後に生じ、モザイクになることが示唆された。CDKN1C変異は、CKIドメインのミスセンス変異とQTドメインの欠失に集約されることから、変異による不十分な細胞周期抑制がBWS表現型の原因と判明した。さらに、メチル異常に比べ、CDKN1C変異はモザイクでないため特徴的な症状がそろって出現すると考えられた。加えて、BWSの鑑別診断の1つであるPerlman症候群において、LINE-1を介したnon-allelic homologous recombination (NAHR)に起因するDIS3L2エキソン9のホモ欠失を認めた。本領域は、LINE-1によるNAHRのホットスポットであることが示唆された。

A. 研究目的

過成長、巨舌、臍（臍帯）ヘルニアを三主徴とするベックウィズ・ビーデマン症候群（BWS）（OMIM #130650）は、ゲノムインプリンティング異常症である。疾患遺伝子座は11番染色体短腕15領域（11p15）の刷り込み領域で、これまでに本領域において5種類のゲノム・エピゲノム変異が見出されている（KvDMR1脱メチル化（KvDMR1-LOM）、H19DMR高メチル化（H19DMR-GOM）、父性片親性ダイソミー（patUPD）、CDKN1C遺伝子変異、11p15領域を含む染色体異常）。しかし、これら既知のゲノム・エピゲノム変異が生じる原因、つまりインプリンティング機構の本態は不明な点が多い。本研究では、本邦BWS症例について、ゲノム・エピゲノム解析を行い発症原因の分子機構と発症原因別の特徴的臨床症状を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

これまでに当研究室で収集した症例のうち、Weksbergら（Eur J Hum Genet, 2010）の診断基準に合致する137症例について既知のゲノム・エピゲノム解析を施行した。KvDMR1-LOMについては、メチル化感受性制限酵素*NotI*とメチル化非感受性制限酵素*BamHI*の組合せ、H19DMR-GOMについては、メチル化感受性制限酵素*MluI*とメチル化非感受性制限酵素*PstI*の組合せでゲノムDNAを消化しサザンプロットを行った。メチル化インデックス（%）は、FLA-7000 fluoro-image analyzerを用いて測定した。patUPDについては、11p15のShort tandem repeat (STR) マーカー（*DIIS1997*, *HUMTH01*, *DIIS1984*）をPCRで増幅したのち、Applied Biosystems 3130 genetic analyzerで電気泳動し、GeneMapper softwareで各

アレル由来PCR産物のピーク高を計測してモザイク率を算出した。CDKN1Cの変異はシークエンス法にて解析した。染色体異常は、染色体検査の結果を用いた。

また、当初BWSと診断され、後にPerlman症候群（OMIM #267000）と確定診断された症例について、原因遺伝子*DIL3L2*の変異解析を行った。

C. 研究結果

1. 発症原因別頻度

137症例の発症原因別の頻度を表1に示す。染色体異常はすべて11p15領域の部分トリソミーであった。KvDMR1-LOM症例の中には、顕微授精1例、体外受精1例、人工授精1例、排卵誘発1例はすべてを示した。patUPDモザイクと異常なしにも排卵誘発剤使用による出生児を認めた。また、異常なし症例が38例（27.7%）を占めたことから、未同定の原因の存在が示唆された。

表1 発症原因別頻度 (n = 137)

| 発症原因 | 症例数 | 頻度 | 生殖補助医療 |
|----------------|-----|-----------|------------------------------------|
| KvDMR1-LO M | 42 | 30.7 % | 4 (顕微授精1、体外受精1、 人工授精1、排卵誘発1) |
| H19DMR-GO M | 8 | 5.8% | 0 |
| patUPDモザイク | 33 | 24.1 % | 1 (排卵誘発) |
| CDKN1C 変 異 | 10 | 7.3% | 0 |
| Trisomy 11 | 6 | 4.4% | 0 |
| 異常なし | 38 | 27.7 % | 3 (排卵誘発) |

2. H19DMR メチル化異常の発生時期の検討

H19DMR メチル化異常がいつ生じるのか不明であった。H19DMR-GOM 症例 8 例のうち 2 例 (BWS047, bwsh21-015) で胎盤組織も収集できたため、末梢血と胎盤の H19DMR の DNA メチル化状態について解析した。末梢血 (患児組織) と胎盤 (胚体外組織) でメチル化状態が異なることがわかった。具体的には、BWS047 では、末梢血で 100%メチル化、胎盤で 70%メチル化を示し、bwsh21-015 では、末梢血で 90%メチル化、胎盤で 71%メチル化を示した。H19-DMR 内の SNP を用いて親由来アレルを区別した上で、母由来アレルに異常メチル化が生じていることを確認した。また、STR 解析で 11p15.5 領域が 2 コピーであること、サザンブロットとシーケンス解析で H19-DMR 内に欠失や変異がないことを確認した (論文 1)。

3. CDKN1C 変異症例の解析

CDKN1C 変異症例は 10 例であったが、このうち二組の同胞例が含まれていたため、変異の種類としては 8 種類であった。4 例は既に論文発表されているので (Hatada et al., Nat Genet, 1996; Hatada et al., Hum Genet, 1997)、新規変異例 6 例についての解析結果を示す (表 2)。

表2 CDKN1C 変異 (論文 4 より改変)

| Patient | Amino Acid Change | Protein Domain | Inheritance |
|-------------|-------------------|----------------|------------------------|
| BWS059 | p.G234fsX36 | QT | maternal (grandfather) |
| bwsh21-055A | p.L154fsX117 | PAPA | maternal |
| bwsh21-055B | p.L154fsX117 | PAPA | maternal |
| bwsh21-068 | p.Q241X | QT | de novo |
| bwsh21-073 | p.W61R | CKI | maternal |
| bwsh21-098 | p.Y91H | CKI | maternal (grandmother) |

bwsh21-055A と bwsh21-055B は同胞

bwsh21-055A と bwsh21-055B は同胞であったため、変異の種類は 5 種類でフレームシフト 2 (p.G234fsX36, p.L154fsX117)、ナンセンス変異 1 (p.Q241X)、ミスセンス変異 2 (p.W61R, p.Y91H) であった。p.Q241X については、両親が正常であったため *de novo* 変異と考えられた。ナンセンス変異とミスセンス変異については、健常人 100 名に認められないことを確認した。CDKN1C タンパクは、N 末より CKI ドメイン、PAPA リピートドメイン、QT ドメインがあり、CDK インヒビターとして細胞周期を負に制御する。新規 6 例の変異は CKI ドメインのミスセンス変異と QT ドメインの欠失に集約された。これらの症例では、いわゆる三主徴 (過成長、巨舌、臍 (臍帯) ヘルニア) がみられ、片側肥大、腹腔内臓器腫大および奇形、外性器異常は見られなかった。1 例 (bwsh21-098) において、心臓横紋筋腫がみられたが、この症例は結節性硬化症を合併しており、そのために腫瘍が発生したと考えられた。

4. Perlman 症候群の原因遺伝子解析

BWS の鑑別診断の 1 つに常染色体劣性遺伝病の Perlman 症候群がある。症例 BWS055 は、妊娠中に羊水過多、両側腎腫大を認め、出生後には過成長を認めたため、当初 BWS を疑い、11p15.5 の遺伝子解析を行ったが異常を認めなかった。染色体検査も正常であった。児は 175 日齢で敗血症のため死亡し、剖検の結果、Perlman 症候群と診断された。2012 年に Astuti らにより、2q37.1 の *DIS3L2* 遺伝子変異が Perlman 症候群の原因であることが報告されたため、*DIS3L2* の変異解析を行った (Astuti et al., Nat Genet, 2012)。解析の結果、患児においてエクソン 9 のホモ欠失を認めた。両親を解析したところ、エクソン 9 のヘテロ欠失であり、患児は両親から欠失アレルを受け継いで発症したと考えられた。エクソン 9 の上流と下流には LINE-1 が存在することから、欠失の切断端を詳細に解析したところ、欠失は LINE-1 を介した non-allelic homologous recombination (NAHR) で生じたことが示唆された。さらに、父由来の欠失断端と母由来の欠失断端では配列が異なることがわかった (論文 6)。

D. 考察

一般に、受精後にはゲノム全体の脱メチル化が生じ、着床以降に再メチル化がおこる。着床以降は、個体では再メチル化が高率に生じるが、胎盤組織では再メチル化は緩やかに生じる。この間、インプリント DMR のメチル化は 50% に維持されている。今回の H19DMR の DNA メチル化解析から、末梢血 (患児組織) と胎盤 (胚体外組織) ではメチル化状態が異なり、末梢血でより高いメチル化状態 (末梢血で 90-100%、胎盤で 70%) であることがわかった。このことは、本来 50% で維持されているはずの H19DMR の DNA メチル化が、着床後の再メチル化に巻き込まれたことを意味する。一方、bwsh21-015 の末梢血は 90% メチル化を示した。加えて他の H19DMR-GOM 症例も 66-90% と様々な程度のメ

チル化異常を示すことが明らかとなっている。これは、メチル化異常が受精後に起こりモザイクとなっていることを示している。これらの結果から、H19DMRの高メチル化は受精後、特に着床後に生じることが強く示唆された。

新規6例の*CDKN1C*変異は、CKIドメインのミスセンス変異とQTドメインの欠失に集約された。両ドメインとも細胞周期を抑制するために重要であることが明らかにされていることから、これらの変異により細胞周期の抑制が不十分となりBWSの表現型が現れたと考えられる。症状としては、いわゆる三主徴（過成長、巨舌、臍（臍帯）ヘルニア）がそろって認められた。一般にBWSの症状は多様である。これは、メチル化異常とpatUPDはモザイクで、組織毎にモザイク率が異なることが理由とされている。しかし、*CDKN1C*変異については、変異は原則母由来なので患児のすべての細胞で変異が存在する。このため特徴的な症状がそろって認められると考えられる。

Perlman症候群は、極めて希な常染色体劣性遺伝病で、BWSの鑑別診断として重要な疾患である。今回解析した症例では、エキソン9のホモ欠失を認めた。この欠失は、LINE-1によるNAHRに起因すると考えられたが、父由来の欠失断端と母由来の欠失断端が異なる配列であることがわかった。*Alu*を介したNAHRが多くの疾患の原因として見出されているのに対し、LINE-1によるNAHRは極めて希で本症例が世界で4例目（疾患としても4つめ）である。さらに、両親は非血族結婚であり、父由来の欠失断端と母由来の欠失断端が異なる配列であることから、それぞれの祖先で独立して欠失が生じたと考えられる。Astutiらは、エキソン9の欠失を異なる人種の3症例で見出していることから（Astuti et al., Nat Genet, 2012）、*DIS3L2*遺伝子のエキソン9はLINE-1によるNAHRのホットスポットであることが示唆される。

E. 結論

BWSにおけるH19DMRの高メチル化は受精後、特に着床後に生じ、モザイクになることが強く示唆された。

*CDKN1C*変異は、CKIドメインのミスセンス変異とQTドメインの欠失に集約され、変異による不十分な細胞周期抑制がBWS表現型の原因と考えられた。メチル異常に比べ、*CDKN1C*変異についてはモザイクでないため特徴的な症状がそろって出現すると考えられた。

BWSの鑑別診断の1つであるPerlman症候群の1例において、LINE-1によるNAHRに起因する*DIS3L2*エキソン9のホモ欠失を認めた。本領域は、LINE-1によるNAHRのホットスポットであることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Higashimoto K, Nakabayashi K, Yatsuki H, Yoshinaga H, Jozaki K, Okada J, Watanabe Y, Aoki A, Shiozaki A, Saito S, Koide K, Mukai T, Hata K, Soejima H. Aberrant methylation of H19-DMR acquired after implantation was dissimilar in soma versus placenta of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet Part A*, 158A:1670–1675, 2012
- 2) 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
- 3) Adachi H, Takahashi I, Higashimoto K, Tsuchida S, Noguchi A, Tamura H, Arai H, Ito T, Masue M, Nishibori H, Takahashi T, Soejima H. Congenital hyperinsulinism in an infant with paternal uniparental disomy on chromosome 11p15: Few clinical features suggestive of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Endocr J*. [Advance Publication] Released: 2012/11/30
- 4) Yatsuki H, Higashimoto K, Jozaki K, Koide K, Okada J, Watanabe Y, Okamoto N, Tsuno Y, Yoshida Y, Ueda K, Shimizu K, Ohashi H, Mukai T, Soejima H. Novel Mutations of *CDKN1C* in Japanese Patients with Beckwith-Wiedemann Syndrome. *Genes & Genomics*, published online 29 January 2013
- 5) Misago N, Joh K, Soejima H, Narisawa Y. Multiple mucocutaneous (palisaded encapsulated) neuromas may be a distinct entity. *Arch Dermatol*, in press
- 6) Higashimoto K, Maeda T, Okada J, Ohtsuka Y, Sasaki K, Hirose A, Nomiyama M, Takayanagi T, Fukuzawa R, Yatsuki H, Koide K, Nishioka K, Joh K, Watanabe Y, Yoshiura KI, Soejima H. Homozygous deletion of *DIS3L2* exon 9 due to non-allelic homologous recombination between LINE-1s in a Japanese patient with Perlman syndrome. *Eur J Hum Genet*, in press

2. 学会発表

- 1) Janette M. Rumbajan、前田寿幸、田尻達郎、東元 健、宗崎良太、田口智章、副島英伸、城 圭一郎. 肝芽腫におけるインプリントDMR 異常メチル化のゲノムワイド検索. 第6回日本エピジェネティクス研究会年会 2012.5.14-15. 東京（抄録集 p78, ポスターPA-44）
- 2) 田山千春、Alejandro Martin Trujillo、緒方勤、副島英伸、David Monk、秦健一郎、中林一彦. 全ゲノム片親性ダイソミー症例のDNAメチル化解析によるヒトインプリント遺伝子座位の網羅的解析. 第6回日本エピジェネティクス研究会年会

- 2012.5.14-15. 東京 (抄録集 p84, ポスターPA-56)
- 3) 前田寿幸、城崎幸介、八木ひとみ、東元 健、副島英伸. Beckwith-Wiedemann 症候群エピ変異症例のゲノム網羅的DNAメチル化解析. 第6回日本エピジェネティクス研究会年会 2012.5.14-15. 東京 (抄録集 p85, ポスターPA-58)
 - 4) 大塚泰史、前田寿幸、城崎幸介、八木ひとみ、東元 健、副島英伸. Beckwith-Wiedemann 症候群における片親性父性ダイソミーの多様性と臨床症状との関連. 第6回日本エピジェネティクス研究会年会 2012.5.14-15. 東京 (抄録集 p128, ポスターPA-64)
 - 5) 外木秀文、奥原宏治、飯塚進、高橋伸浩、徳富智明、服部司、太田亨、副島英伸. Silver-Russell 症候群の遺伝学的異常の検討. 第35回小児遺伝学会学術集会 2012.4.19. 久留米市 (プログラム・抄録集 p28)
 - 6) 大町和美、三島祐子、松田圭子、副島英伸、岡本伸彦. Beckwith-Wiedemann 症候群の遺伝カウンセリング. 第36回日本遺伝カウンセリング学会学術集会 21012.6.8-10. 信州大学医学部
 - 7) 副島英伸、東元 健、田尻達郎. 肝芽腫におけるメチル化インプリント DMR のゲノムワイド検索. 第71回日本癌学会学術総会 2012.9.19-21. 札幌市 (Proceedings, p256, English oral session, E-2058)
 - 8) 高松裕一郎、前田寿幸、松尾宗明、東元 健、河島雅到、松島俊夫、副島英伸. パイロシークエンス法を用いたもやもや病感受性遺伝子 RNF213 の c.14576G>A 多型解析. 日本脳神経外科学会第71回学術総会 2012.10.17-19. 大阪 (ポスター 3P-08-P107-04)
 - 9) 副島英伸、Janette Rumbajan、前田寿幸、東元 健、宗崎良太、田口智章、田尻達郎. 肝芽腫におけるインプリント DMR メチル化異常のゲノムワイド検索. 日本人類遺伝学会第57回大会 2012.10.24-27. 東京 (O-50 プログラム・抄録集 p139)
 - 10) 中林一彦、田山千春、Trujillo Alex Martin、岡村浩司、緒方勤、副島英伸、Monk David、秦健一郎. 全ゲノム片親性ダイソミー症例のDNAメチル化解析によるヒトインプリントーム解明. 日本人類遺伝学会第57回大会 2012.10.24-27. 東京 (O-52 プログラム・抄録集 p139)
 - 11) 大塚泰史、城崎幸介、前田寿幸、八木ひとみ、東元 健、副島英伸. Beckwith-Wiedemann 症候群における片親性父性ダイソミーの多様性と臨床症状との関連. 日本人類遺伝学会第57回大会 2012.10.24-27. 東京 (O-53 プログラム・抄録集 p140)
 - 12) 前田寿幸、城崎幸介、八木ひとみ、東元 健、副島英伸. Beckwith-Wiedemann 症候群エピ変異症例におけるインプリント DMR の網羅的メチル化解析. 日本人類遺伝学会第57回大会 2012.10.24-27. 東京 (O-54 プログラム・抄録集 p140)
 - 13) 東元 健、城崎幸介、八木ひとみ、古庄知己、松原圭子、山田大輔、前田寿幸、大塚泰史、古関明彦、緒方勤、副島英伸. H19-DMR にメチル化異常を認めたインプリント疾患における H19-DMR の変異解析. 日本人類遺伝学会第57回大会 2012.10.24-27. 東京 (O-55 プログラム・抄録集 p154)
 - 14) 東元 健、前田寿幸、八木ひとみ、岡田純一郎、佐々木健、吉浦孝一郎、渡邊順子、副島英伸. Perlman 症候群における *DIS3L2* のエクソン9の欠失は LINE-1 間の非相同組換えによって生じる. 日本人類遺伝学会第57回大会 2012.10.24-27. 東京 (O-110 プログラム・抄録集 p140)
 - 15) Maeda T, Jozaki K, Yatsuki H, Higashimoto K, Soejima H. Genome-wide quantitative DNA methylation analysis of imprinted DMRs in patients with Beckwith-Wiedemann Syndrome by MALDI-TOF MS technology. The American Society of Human Genetics 62nd Annual Meeting (poster 3432T). 2012. 11. 6-10. San Francisco, California, USA
 - 16) Nakabayashi K, Trujillo AM, Tayama C, Kagami M, Soejima H, Ogata T, Monk D, Hata K. DNA methylation analysis of reciprocal genome-wide UPDs to define imprinted differentially methylated regions in the human genome. The American Society of Human Genetics 62nd Annual Meeting (poster 3499T). 2012. 11. 6-10. San Francisco, California, USA
 - 17) Ohtsuka Y, Jozaki K, Maeda T, Yatsuki H, Higashimoto K, Soejima H. The relationship between paternal uniparental disomy and clinical features in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. The American Society of Human Genetics 62nd Annual Meeting (poster 3519T). 2012. 11. 6-10. San Francisco, California, USA
 - 18) 田山千春、アレックス マーティン、岡村浩司、緒方勤、副島英伸、デビッド モンク、秦健一郎、中林一彦. 全ゲノム片親性ダイソミー症例のDNAメチル化解析によるヒトインプリントーム解明. 第35回日本分子生物学会年会 2012.12.11-14. 福岡 (1W11-7 プログラム p63; 1P-0118 プログラム p195)
 - 19) 東元 健、城崎幸介、八木ひとみ、古庄知己、松原圭子、山田大輔、前田寿幸、大塚泰史、古関明彦、緒方勤、副島英伸. H19-DMR メチル化異常で発症するインプリント疾患における H19-DMR の変異解析. 第35回日本分子生物学会年会 2012.12.11-14. 福岡 (2P-0148 プログラム p300)