

201231178A

間葉性異形成胎盤の臨床的・分子遺伝学的診断法の
開発を目指した基盤研究

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)

平成24年度 総括・分担研究報告書

平成 25(2013)年 5月

研究代表者：副 島 英 伸

佐賀大学医学部分子生命科学講座・教授

目 次

I. 総括研究報告書-----	1
間葉性異形成胎盤の臨床的・分子遺伝学的診断法の 開発を目指した基盤研究-----	2
副島英伸（佐賀大学医学部・分子生命科学講座・教授）	
II. 分担研究報告書-----	8
間葉性異形成胎盤の臨床的・病理学的解析-----	9
片渕 秀隆（熊本大学大学院生命科学研究部・産科婦人科学・教授）	
大場 隆（熊本大学大学院生命科学研究部・産科婦人科学・准教授）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	13
IV. 研究成果の刊行物・別冊 -----	16

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
総括研究報告書

間葉性異形成胎盤の臨床的・分子遺伝学的診断法の開発を目指した基盤研究

研究代表者：副島英伸
佐賀大学医学部分子生命科学講座
分子遺伝学・エピジェネティクス分野 教授

研究要旨

間葉性異形成胎盤(placental mesenchymal dysplasia, PMD)は、原因不明の胎盤形態異常で、妊娠中の超音波断層法にて部分胞状奇胎や胎児共存奇胎と類似した囊胞状変化を呈する。誤診されると無用の人工流産を招くこと、高率に妊娠高血圧症候群・早産・胎児発育不全(FGR)・胎児死亡(IUFD)を合併することが問題である。本研究では、PMDの臨床診断基準を確立し、原因遺伝子の同定による病因・病態の解明および遺伝子診断の開発基盤を整え、臨床的ケア・治療法の開発を目指す。エピゲノム解析で preliminary ながらメチル化異常を示す候補遺伝子(低メチル化3遺伝子、高メチル化7遺伝子)を見いだすことができた。また、KvDMR1脱メチル化を示すPMD症例を初めて同定した。ゲノム解析では、各染色体に分布する部分片親性ダイソミーを同定した。現在進行中のエクソーム解析の結果をあわせることにより、PMD原因遺伝子同定の可能性が期待できる。

研究分担者

1. 片渕 秀隆
熊本大学大学院生命科学研究部・産科
婦人科学・教授
2. 大場 隆
熊本大学大学院生命科学研究部・産科
婦人科学・准教授

A. 研究目的

間葉性異形成胎盤(placental mesenchymal dysplasia, PMD)は、原因不明の胎盤形態異常で、妊娠中の超音波断層法にて部分胞状奇胎や胎児共存奇胎と類似した囊胞状変化を呈する。誤診されると無用の人工流産を招くこと、高率に妊娠高血圧症候群・早産・胎児発育不全(FGR)・胎児死亡(IUFD)を

合併することが問題である。しかし、鑑別のための臨床診断基準や臨床的ケア・治療法は確立していない。本研究では、PMDの臨床診断基準を確立し、原因遺伝子の同定による病因・病態の解明および遺伝子診断の開発基盤を整え、臨床的ケア・治療法の開発を目指す。また、日本胎盤学会および日本産科婦人科学会の支援を受けて絨毛性疾患取り扱い規約に掲載されることを目指す。

B. 研究方法

今年度は7例の新規症例を得、症例数は臨床情報31例と解析可能検体22例(凍結保存組織およびホルマリン固定切片)となった。このうち、解析可能なDNAを抽出で

きた症例について以下の解析を行った。

1. エピゲノム解析

凍結組織 4 例を用いた。東京大学先端科学技術研究センター油谷浩幸教授の協力の下、正常胎盤 3 例をコントロールとして、HumanMethylation450 BeadChip を用いて RefSeq に登録されている遺伝子の 99% をカバーする約 45 万個の CpG 部位のメチル化を定量的に解析した。PMD 組織で特異的に異常メチル化を示す 15 個の候補遺伝子を見出した（高メチル化遺伝子 11 個、低メチル化遺伝子 4 個）。これらの遺伝子について、残りの全症例のメチル化状態をパイロシーケンス法で解析したところ、一部で再現性が得られなかった。これは、PMD 検体と正常検体の妊娠週数の違いによるメチル化の差異が原因であることが判明した。そのため、妊娠週数をあわせた正常胎盤 5 例を追加で解析した。

2. 全ゲノム SNP 解析

PMD では 11 番染色体の父性片親性ダイソミー (patUPD11) が関連することがあるため、全染色体における片親性ダイソミー (GWpUPD) の有無を SNP アレイで解析した。凍結組織計 6 例の DNA を用いて Affymetrix 社 SNP アレイ 6.0 で全ゲノムの SNP 解析を行った。

3. エクソーム解析

「難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業」の一般研究班長崎大学吉浦教授との共同研究で、凍結組織 5 例についてエクソーム解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、佐賀大学医学部倫理委員会、佐賀大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会、熊本大学大学院生命科学研究部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の承認を受けて実施した。

C. 研究結果

1. エピゲノム解析

妊娠週数をあわせた正常胎盤 5 例の HumanMethylation450 BeadChip データを取得し、PMD 症例のデータと比較解析しているところである。Preliminary であるが、メチル化異常を示す新たな遺伝子（低メチル化 3 遺伝子、高メチル化 7 遺伝子）を見出している。一方、PMD は BWS を高率に合併すること、BWS 責任座位 11p15 の patUPD11 が高頻度にみられることから、11p15 に存在するインプリンティング制御領域 (KvDMR1) のメチル化について解析した。その結果、1 例において KvDMR1 のほぼ完全な脱メチルを認めた。

2. 全ゲノム SNP 解析

凍結組織から DNA を抽出できた 6 例（このうち BWS 合併例 1 例）を SNP アレイ 6.0 で解析した。2 例は、PMD 部においてゲノムワイド父性片親性ダイソミー（全染色体が父性片親性ダイソミー）のモザイクを示し、うち 1 例の正常胎盤で全染色体が biparental であった。別の 2 例では、逆に正常胎盤でゲノムワイド父性片親性ダイソミーモザイクを示し、PMD 部は全染色体で biparental を示した。他の 1 例では、PMD 部で全染色体に分布する部分父性片親性ダイソミー（少なくとも 29 領域）と 8 番染色体短腕部分トリソミーを認め、8 番染色体短腕部分トリソミーは正常部でも認めた。BWS 合併例の患児末梢血では 11 番短腕と長腕の一部が父性片親性ダイソミーであったが、PMD 部位では biparental であった。

3. エクソーム解析

シーケンスデータは取得できたので、現在 *in silico* 解析中である。

D. 考察

HumanMethylation450 BeadChip データから、preliminary であるがメチル化異常を示す新たな遺伝子（低メチル化 3 遺伝子、高メチル化 7 遺伝子）を見出した。現在、詳細な解析を進めており、データ上メチル

化異常が確定できれば、他の PMD 検体を用いて確認する。また、メチル化異常を示した遺伝子を培養細胞系でノックダウンあるいは過剰発現させることにより、細胞増殖、形態などへの影響を解析する。また、biparental な PMD 1 例で KvDMR1 の脱メチルを認めた。KvDMR1 脱メチル化は BWS 患児において最も高頻度に認められるエピジェネティックな異常であるが、これまで PMD では、父性片親性ダイソミーに伴うメチル化異常しか認められていない。この症例は、11p が biparental であることをマイクロサテライトマーカーの解析で確認しているため、この結果は KvDMR1 の脱メチル化が単独で生じていることを示している。BWS や癌組織において、KvDMR1 の脱メチル化は *CDKN1C* の発現を低下させることが知られているため、11p のエピジェネティックな異常が PMD に関与する傍証と考えられる。今後、さらなる解析が必要である。

SNP アレイ解析を行った症例ではゲノムワイド父性片親性ダイソミーモザイクを見出したが、必ずしも PMD 部位で認められるわけではない。しかしながら、今年度開始した 1 例で少なくとも 29 領域の部分片親性ダイソミーを見出した。この結果は、全染色体の父性片親性ダイソミーから候補領域を大幅に縮小できることを意味しており、これら領域のゲノム異常あるいはエピゲノム異常が関与している可能性を示唆している。

エクソーム解析については、in silico の解析が進行中であるが、部分片親性ダイソミーの結果を反映させ、ダイソミー領域に存在する遺伝子を解析することで原因となる塩基配列変化を同定できる可能性がある。

原因遺伝子を同定できれば、妊娠中の生体サンプルを用いた遺伝子診断法の開発が可能となり、疾患概念も周知できる。その結果、人工流産の回避、胎児発育のリスクを考慮した妊娠管理が可能になり、ひいては

PMD 合併妊娠の出生率ならびに児の長期神経学的予後の向上が期待できる。

E. 結論

preliminary なエピゲノム解析でメチル化異常を示す候補遺伝子を見いだすことができた。また、KvDMR1 脱メチル化を示す PMD 症例を初めて同定した。ゲノム解析では、各染色体に分布する部分片親性ダイソミーを同定した。現在進行中のエクソーム解析の結果をあわせることにより、PMD 原因遺伝子同定の可能性が期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Misago N, Joh K, Soejima H, Narisawa Y. Multiple mucocutaneous (palisaded encapsulated) neuromas may be a distinct entity. Arch Dermatol, in press
- 2) 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, online publication, 13 March 2013 ([†] equal contribution)
- 3) 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, 35(2):141-147, 2013
- 4) 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.* 60(4):403-408, 2013
- 5) 副島英伸. Beckwith-Wiedemann 症候群, Sotos 症候群. *周産期医学* 43(3):377-382, 2013
 - 6) 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
 - 7) 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. 学会発表
招待講演
- 1) 副島英伸. ゲノムインプリンティングとヒト疾患—ベックウィズ・ビーデマン症候群と間葉性異形成胎盤の解析を中心に. 第 8 回 遺伝医学セミナー 2012.7.10. 西別府病院
 - 2) 副島英伸. ゲノム・エピゲノム解析による間葉性異形成胎盤の原因遺伝子探索の現状. 熊本大学医学部産婦人科セミナー 2012. 6. 6. 熊本大学医学部一般発表
 - 1) 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)
 - 2) 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)
 - 3) Janette M. Rumbajan, Toshiyuki Maeda, Tatsuro Tajiri, Ken Higashimoto, Ryota Souzaki, Tomoaki Taguchi, Hidenobu Soejima, Keiichiro Joh. Genome-wide Screening of Aberrant Methylations of Imprinted DMRs in Hepatoblastomas. 第 35 回日本分子生物学会年会 2012.12.11-14. 福岡 (2P-0454 プログラム p342)
 - 4) 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
 - 5) 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
- 6) 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
 - 7) 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)
 - 8) 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)
 - 9) 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)
 - 10) 前田寿幸、城崎幸介、八木ひとみ、東元 健、副島英伸. Beckwith-Wiedemann 症候群エピソード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)
 - 11) 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)
 - 12) 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)
 - 13) 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. パイロシーケ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)
 - 14) 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)
 - 15) 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
 - 16) 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)

- 17) 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)
- 18) 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)
- 19) 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)
- 20) 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)

G. 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. 分担研究報告書

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

間葉性異形成胎盤の臨床的・病理学的解析

研究分担者：片淵秀隆
熊本大学大学院医学薬学研究部産婦人科学 教授

研究分担者：大場 隆
熊本大学大学院医学薬学研究部産婦人科学 准教授

研究要旨

間葉性異形成胎盤の臨床像を明らかにし、適切な周産期管理方針を模索するために国内症例を集積し検討した。PMD は女兒に好発し、早産、胎児発育不全や胎児死亡の危険が高かった。胎盤における PMD の病変は肉眼的にも組織学的にも均質ではなく、HE 所見あるいは p57^{KIP2} 発現正常を呈する領域が混在することは PMD としての病態が比較的軽いことと関連していた。

A. 研究目的

間葉性異形成胎盤(placental mesenchymal dysplasia, PMD)は胎盤の嚢胞状変化を呈する胎盤の形態異常である。発症機序は不明だが、高齢妊娠や生殖補助医療技術との関連が指摘されてきた。臨床的診断基準は確立されておらず、誤って胞状奇胎と診断されると無用の人工流産を招く恐れがある。さらに妊娠継続例は胎児の発育不全や機能不全を高率に合併するハイリスク妊娠となる。このため、臨床診断基準の確立と分子遺伝学的診断法の確立は極めて重要なテーマである。

本分担研究では本邦における PMD の臨床像を明らかにするとともに、系統的臨床病理学的解析を行うことにより、臨床的診断と分子遺伝学的診断開発のための基盤確立を目的とする。本研究により、人工流産の回避と胎児発育のリスクを考慮した周産期管理が可能になり、PMD 合併妊娠の無病出

生率を向上させることが期待できる。このことは少子高齢化社会において重要な社会的意義をもつ。

B. 研究方法

1) 症例の集積

当大学医学部附属病院周産母子センターあるいは協力医療機関で出産した症例で、巨大胎盤あるいは児が Beckwith-Wiedemann 症候群(BWS)を疑われた症例について患者の同意を得たうえで胎盤を提供していただき、肉眼的観察ならびに臨床病理学的検討を行って PMD 症例を抽出する。また論文発表あるいは各種関連学会で報告された PMD あるいは BWS 症例について情報提供ならびに組織標本の提供を依頼する。

2) 臨床情報解析

PMD 症例の妊娠経過、胎児発育経過、および新生児経過等を経時的に解析し、PMD の臨床的特徴を明らかにする。

3) 病理学的解析

既報の候補因子および共同研究者によるゲノム・エピゲノム解析で同定あるいは推定された候補遺伝子の産物について免疫組織化学染色を行うとともに、組織学的分布を明らかにする。

(倫理面への配慮)

研究責任者・担当者、ならびに各主治医は、強制の下での同意にならないよう留意し、研究対象者には自らの意志にて研究に参加する事ができる権利、同意した後も参加を撤回できる権利があることを説明する。研究の目的、方法、個人の秘密厳守を文章および口頭で説明し十分に理解していただき、自由意思により同意した対象のみを研究対象者とする。

臨床病理学的解析は流産または出産によって得られた絨毛および胎盤のみを対象とするので研究対象者にとっての危険はない。生児を出産し、胎盤が PMD と診断された場合には引き続き児についての解析を予定しているが、解析のための検体は末梢血のみでよく最小限の侵襲でこと足りる。また解析は研究費を以て行い、患者家族に金銭的負担はない。この解析は児のインプリンティング異常について診断するためのもので児の診療上有用な情報を提供することができる。

個人情報ならびに出産症例における同意文書は紙データに記載し研究責任者が鍵のかかる保管庫で管理する。研究責任者は研究対象者を連結可能匿名化し、その後に研究責任者・担当者が紙データの情報を電子化するので、電子媒体に研究対象者の名前、連絡先、カルテ番号等が登録されることはない。今回の検討で得られた情報は今回の研究目的以外には使用しない。研究成果を公表する場合には研究対象者はすべて匿名とする。

C. 研究結果

1) 症例収集ならびに臨床情報解析

今年度あらたに組織標本まで収集し得た症例は7例で、これまでに31例の国内症例を集積し、本邦における過去最大規模のPMDの症例集積となった。31例のうち、臨床情報のみの症例は11例、臨床情報に加えて組織標本の提供を受けたものは20例であった。

症例の平均年齢は 30.3 ± 5.0 歳、中央値は31歳であった。生殖補助医療を受けた症例は2例で、いずれも人工授精周期の妊娠であった。

1例が妊娠14週で人工流産を選択されていた。31例中7例は児にBWSが認められた。妊娠を継続した30例中27例が女児であった。PMDでは83.3%(25/30)が早産となり、30.0%(9/30)が胎児発育不全、16.7%(5/30)が胎児死亡に至った。生児を得た25例のうち80.0%(20/25)が低出生体重児で、うち11例が出生体重1500g未満の極低出生体重児であった。出生した25例中3例に貧血、2例に胎児水腫あるいは全身浮腫、2例に低血糖が認められた。

2) PMDにおける p57^{KIP2} の発現と臨床像との関連

PMDでは、cyclin-dependent kinase inhibitor の一種で父性インプリンティングを受ける p57 遺伝子の発現が絨毛内間質や血管を構築する細胞において消失することが報告されている。我々が集積した PMD 症例においても、細胞性栄養膜細胞に p57^{KIP2} の発現が認められるのに対して、絨毛内間質や血管を構築する細胞における p57^{KIP2} の発現が消失していた。

PMDにおける p57^{KIP2} 発現異常には複数のパターンがみられた。組織標本の提供を受けた20例のうち、1例は組織の状態が不良で評価が困難であった。病理組織学的な評価を行い得た19例のうち14例はHE標本にて明らかにPMDと診断でき、p57^{KIP2} の免

疫組織化学にて上述した PMD 型の発現パターンを示した。いっぽう、HE 標本で正常とはいえないが PMD としての所見が軽度である部位に、PMD 型の p57^{KIP2} 発現パターンと正常パターンをとる領域が混在する症例が 4 例あった。また 1 症例については HE で明らかに PMD と診断できる部位に p57^{KIP2} 発現が正常パターンをとる領域が認められた。この 5 症例では、1 例を除いて胎盤重量が児出生体重の 50% 以下であった。また 5 症例中 3 症例は 36 週以降に分娩となっており、残る 2 症例も 31 週まで妊娠が継続されていた。HE 標本にて正常胎盤と診断できる領域で p57^{KIP2} 発現の異常を認めた例はなかった。

D. 考察

高度生殖補助医療によって出生した児ではインプリンティング異常症の危険が高まることが報告されており、その理由として培養操作が胚 DNA の異常なメチル化を惹起する可能性が示唆されている。PMD もまたその発症機序にインプリンティング異常が関与していることが示唆されているが、今回検討した国内症例では、PMD の発症と高齢妊娠、あるいは高度生殖補助医療との関連は見いだせなかった。

PMD は圧倒的に女兒に好発し、また早産、胎児発育不全や胎児死亡の危険が高いことが確認された。新生児のうち 3 例に貧血が認められ、胎児母体間輸血を示唆する所見を伴う症例があったが、貧血の発症機序は今後解明すべき課題である。

これまでに集積した症例のうち、胞状奇胎との鑑別が困難で流産を選択された症例は 1 例のみであったが、今回の調査はパブリケーションベースの調査であり、胞状奇胎として流産を選択され、報告されることのなかった症例も少なくないと推定される。

5 例の胎児死亡は妊娠 31 週から 36 週の間に生じていた。先行研究 (Pham et al., Am J Clin Pathol. 2006, 126:67-78) と比較

すると、胎児死亡率は先行研究の 35.6% に比してより低く、とくに妊娠 31 週までの胎児死亡が回避されていた。このような症例のほとんどは胎児発育不全を本邦の高次産科医療機関において高リスク妊娠に対して行われていると推定される。本邦の周産期医療体制は、PMD の管理にも有効であることが示唆された。妊娠 33 週以降の胎児死亡を回避することは今後の課題である。

胎盤における PMD の病変は肉眼的にも組織学的にも均質ではなかった。PMD に HE 所見あるいは p57^{KIP2} 発現が正常を呈する領域が混在することは PMD としての病態が比較的軽いことと関連していることが示唆された。

E. 結論

PMD の適切な周産期管理方針の確立は今後の課題だが、本邦の高次産科医療機関において高リスク妊娠に対して行われている周産期医療体制は、PMD の管理にも有効であると推定される。妊娠 33 週以降の胎児死亡を回避すること、新生児合併症を予測することは今後の課題である。胎盤における PMD の病変は肉眼的にも組織学的にも均質ではなく、病変の肉眼的、組織学的重症度と臨床像は相関していると推定された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamaguchi M, Ohba T, Tashiro H, Yamada G, Katabuchi H

Human chorionic gonadotropin induces human macrophages to form intracytoplasmic vacuoles mimicking Hofbauer cells in human chorionic villi. Cells Tissues Organs 2013, 97:127-135

大場 隆、三好潤也、片渕秀隆

胞状奇胎の画像診断

日本臨牀. 2012, 70:704-706

2. 学会発表

Ohba T, Chiga M, Okajima M, Sakaguchi I,
Katabuchi H

Clinical aspects of placental
mesenchymal dysplasia

3rd Asan-Kumamoto Joint Symposium
(2012.9.8) Asan Medical Center, Seoul,
Korea

Ohba T, Miyoshi J, Fukunaga M, Katabuchi
H

Clinical features of histologically
confirmed early molar pregnancies

International Federation of Placental
Associations (IFPA) 2012. Workshop 4;
Gestational Trophoblastic Disease (GTD)
(2012.9.18-20) International
Conference Center Hiroshima, Hiroshima,
Japan

Okajima M, Sakaguchi I, Ohba T,
Higashimoto K, Soejima H, Fukunaga M,
Katabuchi H

Placental mesenchymal dysplasia:
Clinical features, histopathological
findings and diagnosis

International Federation of Placenta
Associations_(IFPA) 2012
(2012.9.18-20) International Conference
Center Hiroshima, Hiroshima, Japan

Yamaguchi M, Ohba T, Yoshizato(Sonoda) N,
Tashiro H, Katabuchi H.

Human macrophages regulate chorionic
gonadotropin with truncated LH/CG
receptor

International Federation of Placenta
Associations_(IFPA) 2012
(2012.9.18-20) International Conference
Center Hiroshima, Hiroshima, Japan

G. 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

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Misago N, Joh K, Soejima H, Narisawa Y.	Multiple mucocutaneous (palisaded encapsulated) neuromas may be a distinct entity.	<i>Arch Dermatol</i>			in press
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. ([†] equal contribution)	Homozygous deletion of <i>DIS3L2</i> exon 9 due to non-allelic homologous recombination between LINE-1s in a Japanese patient with Perlman syndrome.	<i>Eur J Hum Genet</i>			online publication, 13 March 2013
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.	<i>Genes & Genomics</i>	35(2)	141-147	2013
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.	<i>Endocr J</i>	60(4)	403-408	2013
副島英伸	Beckwith-Wiedemann症候群, Sotos症候群	<i>周産期医学</i>	43(3)	377-382	2013
Hiura H, Okae H, Miyachi N, Sato F, Sato A, Van De Pette M, John RM, Kagami M, Nakai K, Soejima H, Ogata T, Ariama T.	Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproduction technologies.	<i>Hum Reprod</i>	27(8)	2541-2548	2012

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.	<i>Am J Med Genet Part A</i>	158A	1670-1675	2012
Yamaguchi M, Ohba T, Tashiro H, Yamada G, Katabuchi H	Human chorionic gonadotropin induces human macrophages to form intracytoplasmic vacuoles mimicking Hofbauer cells in human chorionic villi.	<i>Cells Tissues Organs</i>	97(2)	127-135	2013
大場 隆, 三好潤也, 片瀬秀隆.	胞状奇胎の画像診断	<i>日本臨床</i>	70	704-706	2012

IV. 研究成果の刊行物・別冊

SHORT REPORT

Homozygous deletion of *DIS3L2* exon 9 due to non-allelic homologous recombination between LINE-1s in a Japanese patient with Perlman syndrome

Ken Higashimoto^{1,7}, Toshiyuki Maeda^{1,7}, Junichiro Okada^{2,7}, Yasufumi Ohtsuka¹, Kensaku Sasaki³, Akiko Hirose², Makoto Nomiyama⁴, Toshimitsu Takayanagi⁵, Ryuji Fukuzawa⁶, Hitomi Yatsuki¹, Kayoko Koide¹, Kenichi Nishioka¹, Keiichiro Joh¹, Yoriko Watanabe², Koh-ichiro Yoshiura³ and Hidenobu Soejima^{*,1}

Perlman syndrome is a rare, autosomal recessive overgrowth disorder. Recently, the deletion of exon 9 and other mutations of the *DIS3L2* gene have been reported in patients; however, the mechanism behind this deletion is still unknown. We report the homozygous deletion of exon 9 of *DIS3L2* in a Japanese patient with Perlman syndrome. We identified the deletion junction, and implicate a non-allelic homologous recombination (NAHR) between two LINE-1 (L1) elements as the causative mechanism. Furthermore, the deletion junctions were different between the paternal and maternal mutant alleles, suggesting the occurrence of two independent NAHR events in the ancestors of each parent. The data suggest that the region around exon 9 might be a hot spot of L1-mediated NAHR.

European Journal of Human Genetics advance online publication, 13 March 2013; doi:10.1038/ejhg.2013.45

Keywords: LINE-1; non-allelic homologous recombination; Perlman syndrome; exon deletion

INTRODUCTION

Perlman syndrome (OMIM #267000) is a rare, autosomal recessive overgrowth disorder characterized by polyhydramnios with neonatal macrosomia, nephromegaly, distinctive facies, renal dysplasia, nephroblastomatosis and a predisposition to Wilms tumor. The clinical features are reminiscent of Beckwith–Wiedemann syndrome; however, genetic and epigenetic alterations at 11p15.5 have been excluded from the etiology.¹ Recently, *DIS3L2* at 2q37.1 was reported as a causative gene, showing homozygous deletions of exon 6 or exon 9 (82.8 and ~22 kb, respectively) and compound heterozygous mutations in such patients.² However, the mechanisms behind these deletions are still unknown. In this report, we explore a parentally transmitted homozygous deletion of exon 9 in *DIS3L2* responsible for Perlman syndrome in a Japanese patient. We detected the sequence of the deletion junction and found that a rare, non-allelic homologous recombination (NAHR) between two collinear LINE-1 (L1) elements was the causative mechanism of the deletion. To our knowledge, this is the fourth NAHR event to be documented as causing a human disease. Furthermore, the deletion junctions were different between the paternal and maternal mutant alleles, suggesting the occurrence of two independent NAHR events in the ancestors of each parent. Our data suggest that the region around exon 9 of *DIS3L2* is a hot spot of L1-mediated NAHR.

MATERIALS AND METHODS

Patient

The male infant was the first child of non-consanguineous, healthy, Japanese parents. Prenatal ultrasound examination showed polyhydramnios and bilateral nephromegaly. He was delivered at 29 weeks and 4 days of gestation. He weighed 2267 g (+6.4 SD) and measured 45.5 cm (+4.3 SD) in length. Low-set ears, large fontanels, micrognathia, a depressed nasal bridge, an everted upper lip, prominent forehead, flexed digits, a micropenis and cryptorchidism were observed. He suffered from cholestasis with coagulation disorder and recurrent adrenal crisis, and died at 175 days of life due to a sepsis. Autopsy revealed visceromegaly and nephroblastomatosis, and he was diagnosed with Perlman syndrome. His karyotype was normal (46,XY). Causative alterations of Beckwith–Wiedemann syndrome, such as loss of methylation at KvDMR1, gain of methylation at H19DMR, paternal uniparental disomy of chromosome 11 and *CDKN1C* mutations, were ruled out (data not shown). This study was approved by the ethics committee for Human Genome and Gene Analyses of the Faculty of Medicine, Saga University, Japan.

Polymerase chain reaction and sequencing

Genomic DNA was extracted from cord blood, placenta and amniotic fluid of the patient and peripheral blood of his parents. All coding exons, from exon 2 to exon 21, of *DIS3L2* were amplified by PCR using primer pairs described previously.² The copy number of *DIS3L2* exon 9 was analyzed by quantitative real-time PCR (qPCR) based on SYBR-Green I. Normalization was performed against *GAPDH* and *TAT*.^{3,4}

¹Division of Molecular Genetics and Epigenetics, Department of Biomolecular Sciences, Faculty of Medicine, Saga University, Saga, Japan; ²Department of Pediatrics and Child Health, Kurume University School of Medicine, Kurume, Japan; ³Department of Human Genetics, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Japan; ⁴Department of Obstetrics and Gynecology, Perinatal Center, National Hospital Organization Saga National Hospital, Saga, Japan; ⁵Department of Pediatrics, Perinatal Center, National Hospital Organization Saga National Hospital, Saga, Japan; ⁶Department of Pathology and Laboratory Medicine, Tokyo Metropolitan Children's Medical Center, Tokyo, Japan

⁷These authors contributed equally to this work.

*Correspondence: Professor H Soejima, Division of Molecular Genetics and Epigenetics, Department of Biomolecular Sciences, Faculty of Medicine, Saga University, 5-1-1 Nabeshima, Saga 849-8501 Japan. Tel: +81 952 34 2260; Fax: +81 952 34 2067; E-mail: soejimah@med.saga-u.ac.jp

Received 2 November 2012; revised 6 February 2013; accepted 14 February 2013

L1-A and L1-B, which were located collinearly upstream and downstream of exon 9, were amplified with primer pairs 1a/2, and 3/4 and 5/6, respectively (Figure 1d). The paternal and maternal mutant alleles containing the deletion junctions were amplified with primer pair 1b/6. All PCR products were directly sequenced.

Total RNA was also extracted from placenta and amniotic fluid and cDNA was synthesized with random primers. RT-PCR was performed with a forward primer in exon 8 and a reverse primer in exon 11. The RT-PCR product was sequenced directly. The novel primers used in this study are shown in Table 1.

RESULTS

We first examined whether all coding exons of *DIS3L2* were amplified by PCR for the patient. In all patient samples, exon 9 could not be amplified whereas all exons were amplified in the patient's parents and normal control individuals (Figure 1a, data not shown). This result indicated a homozygous deletion of exon 9 in the patient, one that has been previously reported.² qPCR showed that the copy number of exon 9 in the parents was approximately half that of controls, indicating heterozygosity for the deletion (Figure 1b). No PCR amplification was observed in the patient's samples, supporting

homozygosity for the deletion. Therefore, the parents were carriers of the deletion and one deleted allele was transmitted to the patient by each parent.

Next, the expression of the mutant allele was investigated by RT-PCR using primers on exons 8 and 11 (Figure 1c). In normal placentas, RT-PCR products matched the estimated normal size and contained the 174-bp exon 9 sequence. In contrast, the product size of the patient's placenta and amniotic fluid was smaller than normal. Sequencing revealed a missing exon 9 sequence and the existence of a junction at exons 8 and 10, indicating the expression of the mutant allele (Figure 1c). The expressed mutant allele would be translated to a mutant protein harboring an in-frame deletion of 58 amino acids, resulting in an abolished RNA-binding domain. Wild-type *DIS3L2* has ribonuclease activity, but the mutant lacking exon 9 loses it. Accordingly, it has been speculated that alterations in mRNA turnover might be responsible for the phenotypes of Perlman syndrome.²

Finally, we tried to identify the deletion junction to clarify the deletion mechanism. Two L1 sequences, L1-A and L1-B, were located directly upstream and downstream of exon 9. The directions of the two L1 sequences were opposite to *DIS3L2* (Figure 1d). L1-A and

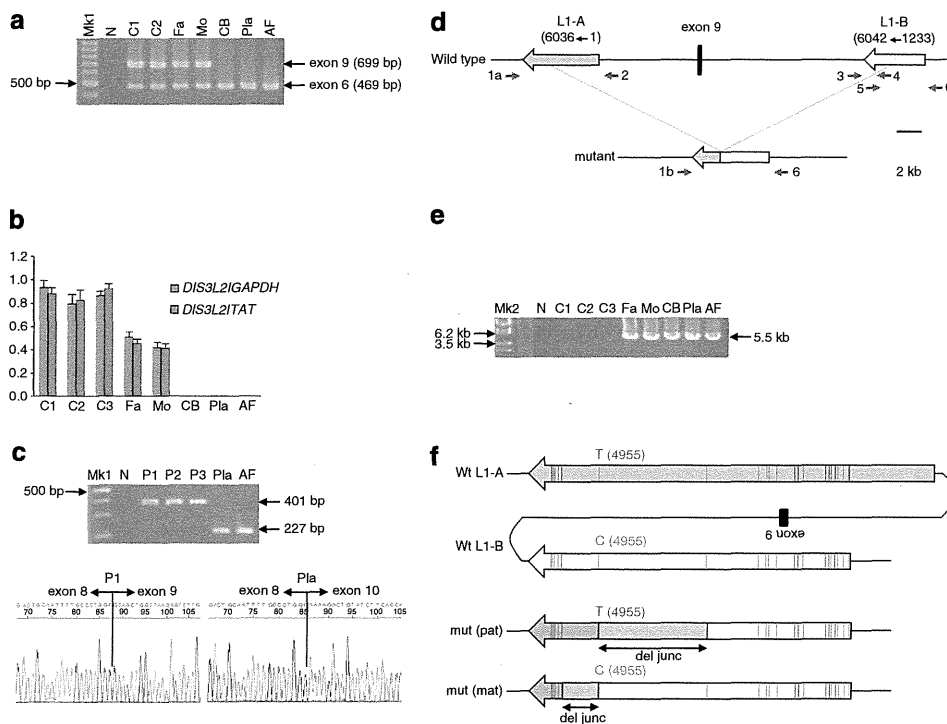


Figure 1 Homozygous deletion of *DIS3L2* exon 9 in a patient with Perlman syndrome. (a) Homozygous deletion of *DIS3L2* exon 9. Duplex PCR of exons 6 and 9 showed no amplification of exon 9 in any patient sample, whereas both exons were amplified in the parents and normal controls. Mk1, 100-bp ladders; N, negative control; C1, unrelated normal control #1; C2, unrelated normal control #2; Fa, father of the patient; Mo, mother of the patient; CB, cord blood of the patient; Pla, placenta of the patient; AF, amniotic fluid of the patient. (b) Copy number analysis of exon 9. qPCR of *DIS3L2* exon 9 normalized with *GAPDH* or *TAT* showed that the copy number of exon 9 in the parents was approximately half that of controls. No PCR product was amplified in any patient sample. The y axis displays arbitrary units. (c) RT-PCR of *DIS3L2*. RT-PCR was performed with a forward primer in exon 8 and a reverse primer in exon 11. The exon 9 deleted products were seen in the patient samples. Sequencing of the PCR products showed a lack of the exon 9 sequence, which was supposed to be 174 bp in length, in the patient's placenta, whereas the exon 9 sequence existed in normal placentas. P1, normal placenta #1; P2, normal placenta #2; P3, normal placenta #3. (d) Map of exon 9. Two L1 sequences, L1-A and L1-B, were located collinearly upstream and downstream of exon 9. The L1s were in the opposite direction to the *DIS3L2* gene. L1-A was full-length, corresponding to nucleotides 1 to 6036 of the reference sequence of L1s from Repbase on the GRI website.⁵ L1-B was a 5' truncated form, corresponding to nucleotides 1233 to 6042 of the reference. Primers for PCR amplification are depicted as blue arrows. (e) PCR products containing the deletion junction. Approximately 5.5-kb products were amplified by PCR with primer pair 1b/6 in the patient and the parents, whereas no product was seen in normal controls. Mk2, lambda DNA digested with *Syl*. (f) The deletion junction. Comparing the sequences among L1-A, L1-B and the PCR products revealed that the deletion junctions of each parental allele were different. Vertical blue or red bars showed the positions of nucleotide differences between L1-A and L1-B. As the patient had two parental mutant alleles, a nucleotide at position 4955 was heterozygous (T/C) in the patient. The deletion junction is shown as a green box.