

201238001A

厚生労働科学研究費補助金  
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業  
(難病関係研究分野)

次世代シーケンサーを駆使した希少遺伝性  
難病の原因解明と治療法開発の研究  
(H23-実用化(難治)-一般-001)

平成24年度 総括・分担研究報告書  
研究代表者 松原 洋一

平成25年(2013)3月

# ■ 目 次

---

## I. 総括研究報告

次世代シーケンサーを駆使した希少遺伝性難病の原因解明と治療法開発の研究

松原 洋一 ..... 1

## II. 分担研究報告

1. 次世代シーケンサーを用いた希少遺伝性難病病因遺伝子の探索

松原 洋一 ..... 7

2. 次世代シーケンサーを用いたcytoplasmic body myopathyにおける

新たな原因遺伝子の探索に関する研究

青木 正志 ..... 11

3. 東北大学関連の臨床検体の遺伝子解析に関する研究

有馬 隆博 ..... 15

4. 次世代シーケンサーによる希少遺伝性疾患の遺伝子解析研究

—特異な体型・顔貌、腎低形成、網膜症を合併した兄妹例—

遠藤 文夫 ..... 19

5. 次世代シーケンス法を用いたミトコンドリア呼吸鎖異常症の解析

—酵素診断から遺伝子解析に至る系統的病因探索システムの構築—

大竹 明 ..... 23

6. 小児内分泌疾患関連の症例収集と解析

緒方 勤 ..... 27

7. 次世代シーケンサーを駆使した希少遺伝性難病の原因解明と治療法開発の研究

小原 収 ..... 31

8. 次世代シーケンサーを用いた遺伝性小児疾患家系の解析

呉 繁夫 ..... 35

9. 次世代シーケンサーを用いた新規肺炎関連遺伝子異常の探索

下瀬川 徹 ..... 37

10. 遺伝性疾患症例の収集とマイクロアレイ染色体解析

福嶋 義光 ..... 41

11. 先天代謝異常・遺伝性疾患の症例収集に関する研究

山口 清次 ..... 45

---

12. 希少遺伝性難病の精神発達に関する病態解明のための網羅的分子遺伝学的研究 富田 博秋	53
13. 次世代シーケンサーを駆使した希少遺伝性難病の原因解明と治療法開発の研究 布施 昇男	57
14. 次世代シーケンサーを用いた遺伝子情報解析パイプラインの確立 長嶋 剛史	61
15. 次世代シーケンサーを用いたRAS/MAPK症候群における病因遺伝子の探索 新堀 哲也	65
16. 希少遺伝性難病の原因解明と治療法開発のための遺伝子解析パイプラインの構築 舟山 亮	69
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表	73
Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷	79

# I . 総括研究報告

## 次世代シーケンサーを駆使した希少遺伝性難病の原因解明と治療法開発の研究

研究代表者 松原洋一 東北大学大学院医学系研究科 教授

### 研究要旨

次世代シーケンサーの導入によって、欧米の研究室を中心に希少遺伝性難病の原因遺伝子が次々と解明されつつある。日本国内の研究体制を整備し解析拠点を構築することが急務である。本研究の目的は、東北大学の次世代遺伝子解析コア施設を活用した希少遺伝性疾患解明の拠点施設を構成し、国内の一般研究班と連携して病因遺伝子同定を行うことにある。すでに昨年までの研究によって次世代遺伝子解析のパイプラインが整備され、そのシステムを用いて種々の病因遺伝子探索が進行中である。これまでに神経器疾患、先天奇形、呼吸器疾患、消化器疾患、先天代謝異常症、皮膚疾患、眼疾患、血液疾患などを有する患者より得られた検体 155 についてのエクソーム解析を実施した。そのうちの数疾患において新規病因遺伝子を同定することができた。また、既知の病因遺伝子が同定されたものも存在した。現在、これらについて機能解析を行うとともに、論文として発表を予定している。

### 研究協力者

青木正志(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)  
有馬隆博(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)  
富田博秋(東北大学大学院医学系研究科)  
長嶋剛史(東北大学大学院医学系研究科)  
舟山 亮(東北大学大学院医学系研究科)  
布施昇男(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)  
中山啓子(東北大学大学院医学系研究科)  
下瀬川徹(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)  
遠藤文夫(熊本大学大学院生命科学研究部)  
大竹 明(埼玉医科大学)  
山口清次(島根大学)  
福嶋義光(信州大学)  
緒方 勤(浜松医科大学)  
小原 収(かずさDNA研究所)

室を中心に希少遺伝性難病の原因遺伝子が次々と解明されつつある。日本国内の研究体制を整備し解析拠点を構築することが急務である。

東北大学では、代表研究者の研究室を中心に過去 30 年にわたり一貫して希少遺伝性難病の原因遺伝子の同定、病態解明、治療法開発に成果を挙げてきた。また、難治性疾患克服研究事業の支援を得た研究の成果を患者家族に還元してきた。このような背景を元に、東北大学医学部では次世代遺伝子解析コア施設を計画し、専任のバイオインフォマティクス研究者と技術補佐員とともに整備をすすめてきた。

本研究の目的は、これまでに蓄積してきた希少遺伝性疾患の原因遺伝子探索のノウハウをもとに、東北大学の次世代遺伝子解析コア施設を活用した希少遺伝性疾患解明の拠点施設を構成することにある。すでに昨年までの研究によって次世代遺伝子解析のパイプラインが整備され、東北大学関連の検体について解析を実施した。本年度は、分担研究者を増やすとともに全国の研究施設から寄せられた検体について解析を実施した。

### A. 研究目的

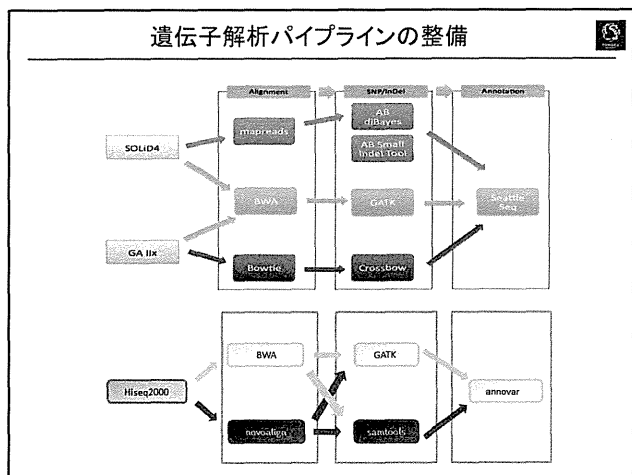
次世代シーケンサーの導入によって、欧米の研究

### B. 研究方法

## 1) 次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析システム

東北大学に設置された SoLiD4, GAIIX, HiSeq2000, MiSeq の機器を用いて次世代遺伝子解析を実施した。得られたデータの情報解析は図 1 のようなプロトコールに従って実施した。

(図 1)



最終的な結果は図 2 に示すようなエクセル形式で一覧できるようにし、臨床家にとっても解析がしやすいフォーマットとした。

(図 2)

## 2) 全国の難治性疾患克服研究事業研究班からの検体収集と東北大学における遺伝子解析

拠点施設として、全国の研究班からの臨床検体を受託して解析をおこなった。検体依頼があった施設を日本地図上にプロットしたものを図 3 に示す。北海道から九州までの広範囲の地域から臨床検体が寄せられた。これらの症例や家系について、臨床的な評価、これまでの遺伝子解析状況を検討し、必要に応じてマイクロアレイ解析による遺伝子欠失・重複の検索、SNP

を用いた連鎖解析をおこなったうえで、次世代遺伝子解析を実施した。

(図 3)



## 3) デスクトップ型次世代シーケンサーを用いた遺伝子診断システムの構築

Agilent 社 Haloplex と Illumina 社の次世代シーケンサー Miseq を用いておこなった。

## 4) 各分担研究班独自のプロジェクトの遂行

各分担研究班では、次世代遺伝子解析に適した症例や家系の収集を行うとともに、それぞれ独自の研究を展開した。

(倫理面への配慮)

本研究は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。

## C. 研究結果

### 1) 次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析 (松原、舟山、長嶋、新堀、中山、青木 (洋))

種々の疾患を有する患者より得られた検体 155 についてエクソーム解析を実施した。疾患群の分類とその内訳を図 4 に示す。

(図 4)

東北大学拠点班でのエクソーム解析	
エクソーム解析数	155
健常人	40
神経筋疾患	8
呼吸器疾患	24
消化器疾患	15
血液疾患	4
先天奇形	44
先天代謝異常	5
眼疾患	5
皮膚疾患	10

また、解析対象となった疾患名と検体数、解析の進捗状況を図5に示す。

(図5)

東北大学拠点班でのエクソーム解析		
<疾患名>	<検体数>	<進捗状況>
Ras/MAPK症候群(ヌーナン症候群類縁疾患)	30	新規病因遺伝子 + 既知
ピオチン代謝異常	3	解析準備中
家族性肺癌	15	新規病因遺伝子
Cytoplasmic body myopathy	8	既知病因遺伝子
Macrocephaly-capillary malformation	2	既知病因遺伝子(1)
遺伝性肺炎	7	既知病因遺伝子(1)
発達遅延	9	解析中
家族性血小板減少症	5	解析終了
腕尺骨癒合を伴う先天性無巨核球性血小板減少症	3	解析終了
Hyperphosphatasia with mental retardation	5	新規病因遺伝子
Zimmernann-Laband syndrome	3	新規病因遺伝子
Syringomas	21	解析中
Lenz microphthalmia症候群	5	解析終了
低Ca血症および顔貌異常	8	既知病因遺伝子
胆汁うっ滞	4	既知病因遺伝子
成人発症中枢性低換気症候群	3	解析終了
ROHHAD症候群	5	解析終了
周期性発熱	4	解析準備中
背髄小脳変性症	7	解析準備中
随伴症状を伴う背髄小脳変性症	6	解析準備中

これまでに報告されていない新規病因遺伝子が同定されたものは5疾患、既知の病因遺伝子が同定されたものが6疾患、解析を終了したものが5疾患、解析中のものが2疾患、解析準備中のものが4疾患となっている。

### 3) 遺伝子診断のためのデスクトップ型次世代シーケンサーを用いたターゲットリシーケンスシステムの構築 (新堀、井泉、青木(洋)、松原)

対象とした疾患群とそれぞれの遺伝子数は、Ras/MAPK 症候群(24 遺伝子)、成人発症型ミオパチー(44 遺伝子)、遺伝性肺炎(69 遺伝子)、筋萎縮性側索硬化症(35 遺伝子)であった。それぞれのシステム構築と検証を行った。

### 4) 各分担研究班独自のプロジェクトの遂行 (青木、新堀、有馬、呉、富田、長嶋、舟山、布施、下瀬川、遠藤、大竹、山口、福嶋、緒方、小原)

大竹は、ミトコンドリア呼吸鎖異常症 104 症例について核遺伝子についてのエクソーム解析を実施し、うち 27 症例について、既知の原因遺伝子として報告がなくミトコンドリア局在タンパク質をコードしている遺伝子に劣性遺伝形式での変異を、別の 18 症例で既知の原因遺伝子における新規変異を同定した。

下瀬川は、キモトリプシン C 遺伝子異常の日本人慢性肺炎患者における変異解析を行い、新規のミスセンス変異を 5 個同定した。

緒方は、常染色体優性の腎尿細管水再吸収増加(低 Na 血症) 疾患を呈する家系、常染色体優性の若年発症糖尿病(MODY)を呈する家系、t(5;8)(q35.1;p21.1)

と連鎖する常染色体優性のKlippel-Feil 症候群家系それぞれにおけるエクソーム解析を実施し現在データ解析中である。

呉は、膜性増殖性糸球体腎炎家系に関してエクソーム解析を開始した。

小原は、免疫不全症などの疾患をもつ 97 検体についてエクソーム配列解析を実施し、疾患原因候補のリストを得た。また、複数の既知遺伝子の遺伝子検査を安価に実現するために、均等化マルチプレックス PCR 法について条件検討をおこなった。

長嶋は、次世代シーケンスによって得られる大量の配列情報から対象とする疾患との関連が想定される変異を抽出するための遺伝子情報解析パイプラインについての詳細な検討・改良をおこなった。

舟山は、原発性胆汁性肝硬変の病態解明と新しい診断方法の開発を目的として、次世代シーケンサーを用いた血清中 microRNA の発現解析を実施し、PBC 罹患患者で特異的に発現が低下している 4 種類の microRNA を同定するとともにその標的遺伝子を見出した。

新堀は、上述のように RAS/MAPK 症候群におけるエクソーム解析と、既知病因遺伝子のスクリーニングを目的としてデスクトップ型次世代シーケンサーを用いたターゲットリシーケンスを行った。

福嶋は、難治性疾患克服研究事業の既存班と協同で、患者支援団体、臨床診断支援グループ、遺伝子医療部門、遺伝学的検査部門、次世代シーケンサー解析部門、等とのネットワークを構築した。

## D. 考察

昨年度から本年度にかけての研究により、東北大学での次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析体制が整備・運用された。バイオインフォマティクスを含めた遺伝子解析パイプラインの確立と HiSeq2000 の導入によるスループットの飛躍的な増強により、全国の一般研究班との連携、検体受入を行った。

これまでに 155 検体のエクソーム解析が終了し、新規病因遺伝子が同定されたものが 5 疾患、既知の病因遺伝子が同定されたものが 6 疾患、解析を終了したものが 5 疾患、解析中のものが 2 疾患、解析準備中のものが 4 疾患となった。

このうち、早期の呼吸不全を伴う cytoplasmic body

myopathy の大家系では titin の遺伝子変異が同定され、すでに論文として発表した。他に同定された病因遺伝子とその遺伝子変異については、現在機能解析をすすめるとともに論文を準備中である。

今後、さらに一般研究班との連携を増やし、より多くの疾患・症例・家系について次世代遺伝子解析を実施する予定である。

## E. 結論

東北大学における次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析体制の運用を開始し、一般研究班との連携をおこないながらエクソーム解析を実施した。その結果、新規および既知の病因遺伝子を同定することができた。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Izumi R, Niihori T, Aoki Y, Suzuki N, Kato M, Warita H, Takahashi T, Tateyama M, Nagashima T, Funayama R, Abe K, Nakayama K, Aoki M, Matsubara Y. Exome sequencing identifies a novel TTN mutation in a family with hereditary myopathy with early respiratory failure. *J Hum Genet* (in press)

2) Izawa K, Hijikata A, Tanaka N, Kawai T, Saito MK, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, Yasumi T, Nakahata T, Heike T, Nishikomori R, Ohara O. Detection of base substitution-type somatic mosaicism of the NLRP3 gene with >99.9% statistical confidence by massively parallel sequencing. *DNA Res.* 19(2):143-52, 2012

3) Mizuno T, Sakai H, Nishikomori R, Oshima K, Ohara O, Hata I, Shigematsu Y, Ishige T, Tamura K, Arakawa H. Novel mutations of MVK gene in Japanese family members affected with hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome. *Rheumatol Int.* 32(12):3761-4, 2012.

4) 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.

5) Nagasaki K, Iida T, Sato H, Ogawa Y, Kikuchi T, Saitoh A, Ogata T, Fukami M: PRKAR1A 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.

6) 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):112-20, 2013.

7) 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* (in press).

8) Yanagi K, Kaname T, Wakui K, Hashimoto O, Fukushima Y, Naritomi K. Identification of Four Novel Synonymous Substitutions in the X-Linked Genes Neurologin 3 and Neurologin 4X in Japanese Patients with Autistic Spectrum Disorder. *Autism Res Treat.* 2012;2012:724072. Epub 2012 Jul 16.

9) Shimizu A, Takano Y, Shi D, Yokokura S, Yokoyama Y, Zheng X, Shiraishi A, Ohashi Y, Nakazawa T, Fuse N. Evaluation of CNTNAP2 gene polymorphisms for exfoliation syndrome in Japanese. *Mol Vis.* 18:1395-1401, 2012.

10) Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Van De Pette M, John R M, Kagami M, Nakai K, Soejima H, Ogata T, Arima T. Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproductive technologies. *Human Reproduction.* 27(8): 2541-2548, 2012.

11) Okae H, Hiura H, Nishida Y, Funayama R, Tanaka S, Chiba H, Yaegashi N, Nakayama K, Sasaki H, Arima



- T. Re-investigation and RNA sequencing-based identification of genes with placenta-specific imprinted expression. *Hum Mol Genet.* 21(3): 548-558, 2012.
- 12) Narisawa A, Komatsuzaki S, Kikuchi A, Niihori T, Aoki Y, Fujiwara K, Tanemura M, Hata A, Suzuki Y, Relton CL, Stanier P, Grinham J, Leung KY, Partridge D, Robinson A, Stone V, Gustavsson P, Copp AJ, Greene NDE, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S. Mutations in genes encoding the glycine cleavage system predispose to neural tube defects. *Hum Mol Genet*, 21:1496-503, 2012
- 13) Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saitsu H, M.D., 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, and Matsumoto N. Homozygous c.14576G>A variant in RNF213 is the strong predictor for early-onset and severe form of Moyamoya disease. *Neurology*, 78:803-10, 2012
- 14) Arakawa C, Endo A, Kohira R, Fujita Y, Fuchigami T, Mugishima H, Ohtake A, Murayama K, Mori M, Miyata R, Hatai Y: Liver-specific mitochondrial respiratory chain complex I deficiency in fatal influenza encephalopathy. *Brain Dev* 34(2): 115-7, 2012.
- 15) Tanigawa J, Kaneko K, Honda M, Harashima H, Murayama K, Wada T, Takano K, Iai M, Yamashita S, Shimbo H, Aida N, Ohtake A, Osaka H: Two Japanese patients with Leigh syndrome caused by novel SURF1 mutations. *Brain Dev* 34(10): 861-5, 2012.
- 16) Seki Y, Mizuochi T, Kimura A, Takahashi T, Ohtake A, Hayashi S, Morimura T, Ohno Y, Hoshina T, Ihara K, Takei H, Nittono H, Kurosawa T, Homma K, Hasegawa T, Matsuishi T: Two neonatal cholestasis patients with mutations in the SRD5B1(AKR1D1) gene: diagnosis and bile acid profiles during chenodeoxycholic acid treatment. *J Inherit Metab Dis.* 2012 Nov 16. [Epub ahead of print]
- 17) Yoneda Y, Saitsu H, Touyama M, Makita Y, Miyamoto A, Hamada K, Kurotaki N, Tomita H, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Ogata K, Naritomi K, Matsumoto N. Missense mutations in the DNA-binding/dimerization domain of NFIX cause Sotos-like features. *J Hum Genet.* 57(3):207-11. 2012.
- 18) Ono S, Yoshiura K, Kinoshita A, Kikuchi T, Nakane Y, Kato N, Sadamatsu M, Konishi T, Nagamitsu S, Matsuura M, Yasuda A, Komine M, Kanai K, Inoue T, Osamura T, Saito K, Hirose S, Koide H, Tomita H, Ozawa H, Niikawa N, Kurotaki N. Mutations in PRRT2 responsible for paroxysmal kinesigenic dyskinesias also cause benign familial infantile convulsions. *J Hum Genet.* 57(6):399. 2012.
- 19) Kada T, Hashimoto R, Yamamori H, Umeda-Yano S, Yasuda Y, Ohi K, Fukumoto M, Ikemoto K, Kunii Y, Tomita H, Ito A, Takeda M. Expression analysis of a novel mRNA variant of the schizophrenia risk gene ZNF804A. *Schizophr Res.* 141(2-3):277-8, 2012.
- 20) 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, Rimoind; International Confederation of Countries Advisory Council. Human Variome Project country nodes: documenting genetic information within a country. *Hum Mutat.* 33:1513-9, 2012.
- 21) Masamune A, Nakano E, Kume K, Kakuta Y, Ariga H, Shimosegawa T. Identification of novel missense CTSC variants in Japanese patients with chronic pancreatitis. *Gut* 2012. [Epub ahead of print]
- 22) Kawasaki Y, Toyoda H, Otsuki S, Iwasa T, Iwamoto S, Azuma E, Itoh-Habe N, Wada H, Fujimura Y, Morio T, Imai K, Mitsuiki N, Ohara O, Komada Y. A novel Wiskott-Aldrich syndrome protein mutation

in an infant with thrombotic thrombocytopenic purpura. Eur J Haematol. 2012 [Epub ahead of print]

23) Hori T, Ohnishi H, Teramoto T, Tsubouchi K, Naiki T, Hirose Y, Ohara O, Seishima M, Kaneko H, Fukao T, Kondo N. Autosomal-Dominant Chronic Mucocutaneous Candidiasis with STAT1-Mutation can be Complicated with Chronic Active Hepatitis and Hypothyroidism. J Clin Immunol. 32(6):1213-20, 2012.

## 2. 学会発表

なし

## 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

### 3. その他

なし

## II. 分担研究報告

## 次世代シーケンサーを用いた希少遺伝性難病病因遺伝子の探索

研究代表者 松原 洋一 東北大学大学院医学系研究科 教授

### 研究要旨

本研究者は、過去 30 年にわたり一貫して希少遺伝性難病の原因遺伝子の同定、病態解明、治療法開発に成果を上げてきた。また、難治性疾患克服研究事業の支援を得た研究成果を患者家族に還元してきた。このような背景を基に、新技術としての次世代シーケンサーに注目し、東北大学の全面的な支援を得て遺伝子解析装置を導入し、専任のバイオインフォマティクス研究者と技術補佐員とともに運用体制をすすめてきた。本研究の目的は、これまでに蓄積してきた希少難病の原因遺伝子探索のノウハウをもとに、東北大学の次世代遺伝子解析コア施設を活用した希少遺伝性疾患解明の拠点施設を構成することにある。今年度は昨年度に引き続き臨床検体の収集と次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析および倫理的側面に関する指針の検討を行った。

### 研究協力者

青木正志(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)  
有馬隆弘(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)  
富田博秋(東北大学大学院医学系研究科)  
長嶋剛史(東北大学大学院医学系研究科)  
舟山 亮(東北大学大学院医学系研究科)  
布施昇男(東北大学大学院医学系研究科)  
下瀬川徹(東北大学大学院医学系研究科)  
遠藤文夫(熊本大学生命科学研究部)  
大竹 明(埼玉医科大学医学研究科)  
緒方 勤(浜松医科大学医学系研究科)  
福島義光(信州大学医学系研究科)  
山口清次(島根大学医学部)  
小原 収(かずさDNA 研究所)  
青木洋子(東北大学大学院医学系研究科)  
中山啓子(東北大学大学院医学系研究科)

### A. 研究目的

本研究者は、過去 30 年にわたり一貫して希少遺伝性難病の原因遺伝子の同定、病態解明、治療法開発に成果を上げてきた。また、難治性疾患克服研究事業

の支援を得た研究成果を患者家族に還元してきた。このような背景を基に、新技術としての次世代シーケンサーに注目し、東北大学の全面的な支援を得て遺伝子解析装置を導入し、専任のバイオインフォマティクス研究者と技術補佐員とともに運用体制をすすめてきた。

本研究の目的は、これまでに蓄積してきた希少難病の原因遺伝子探索のノウハウをもとに、東北大学の次世代遺伝子解析コア施設を活用した希少遺伝性疾患解明の拠点施設を構成することにある。昨年度は次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析体制の構築、拠点施設としての臨床検体解析プロトコールと倫理的側面に関する指針の検討、東北大学関連の臨床検体の収集と遺伝子解析を行った。今年度は引き続き臨床検体の収集と次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析および倫理的側面に関する指針の検討を行った。

### B. 研究方法

#### 1) 臨床検体の収集

東北大学関連の次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析にふさわしい症例や家系を収集した。

#### 2) 次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析

昨年度整備された次世代遺伝子解析拠点としての

体制を活用し次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析を行った。

### 3) 倫理的側面に関する指針の検討

新しい「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を踏まえたうえで、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析の倫理的指針を検討した。

#### (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。

## C. 研究結果

### 1) 臨床検体の収集

今年度は解析の対象として新たに13疾患の臨床検体を収集した。その内訳は本研究班員からが3疾患、それ以外からが10疾患であった。また疾患種類別では呼吸器疾患3、消化器疾患2、神経疾患1、血液疾患2、眼科的疾患1、皮膚疾患1、先天異常3であった。それぞれの疾患ごとの検体数は1~15であった。エクソーム解析ではゲノムのコピー数変化の評価は困難であることから、一部のサンプルにおいてはSNPアレイを用いてコピー数変化や Loss of heterozygosity 領域の有無を確認した。

### 2) 次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析

次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析を昨年引き続き行った。そのうち、分担研究者との共同研究である Cytoplasmic body myopathy (Myofibrillar myopathy または hereditary myopathy with early respiratory failure) 家系の解析において、SNPアレイを用いた連鎖解析との併用によって病因変異の同定に成功した (Izumi et al. in press)。また、分担研究者との共同研究である早発型発達緑内障の解析においては、患者5人の解析で候補変異を500以下に絞りこみ、さらに解析を継続している。さらに分担研究者との共同研究である低カルシウム血症の家系では病因と考えられる遺伝子変異を同定している。分担研究者以外との共同研究においても先天奇形症候群の解析で病因遺伝子変異の同定に成功し投稿準備中である。さらに別な先天異常でも新生突然変異に着目する戦略で病因変異候補を2つにまで絞り込むことに成功している。

### 3) 倫理的側面に関する指針の検討

ヒトゲノム・遺伝子解析研究の三省指針の改正案が公表された。それによれば現行同様に遺伝情報は希望があれば原則開示しなくてはならないが、「当該研究を行う機関の研究業務の適正な実施に著しい支障を及ぼすおそれがあり、かつ、開示しないことについて提供者のインフォームド・コンセントを受けている場合には」開示しないことができることが加えられた。また、「遺伝情報の開示に関する方針を定める際に、得られた遺伝情報の精度や不確実性等について考慮すること等を明確化」している。次世代シーケンサーのから得られるデータは膨大であり、これらの結果をすべて解釈し提供者に返却することは事実上困難であることやエクソーム解析などにおいても結果には偽陽性偽陰性が含まれることが問題となっていたが、これらの点を念頭においた改正案となっている。三省指針との整合性を考慮の上、倫理的な指針の検討を継続することとした。

## D. 考察

昨年度整備された次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析体制を運用し、病因遺伝子の同定に成功した。複数のプロジェクトが並行して行われており、今後もこれに引き続き新規病因遺伝子が同定されていくことが期待される。

倫理的側面については三省指針の改正案が公表されたことにより、その方向性は確認できた。改正が確定した後に向け、さらなる検討が必要と考えられた。

## E. 結論

次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析体制を運用し、病因遺伝子の同定に成功した。今後も新規病因遺伝子の同定が期待される。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1、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.* 2012;105:553-8.

2、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*. 2012;158A:1083-94

2、Metoki H, Ohkubo T, Obara T, Akutsu K, Yamamoto M, Ishikuro M, Sakurai K, Iwama N, Katagiri M, Sugawara J, Hirose T, Sato M, Kikuya M, Yagihashi K, Matsubara Y, Yaegashi N, Mori S, Suzuki M, Imai Y; BOSHI Study Group. Daily serial hemodynamic data during pregnancy and seasonal variation: the BOSHI study. *Clin Exp Hypertens*. 2012;34:290-6.

3、Saito Y, Aoki Y, Muramatsu H, Makishima H, Maciejewski JP, Imaizumi M, Rikiishi T, Sasahara Y, Kure S, Niihori T, Tsuchiya S, Kojima S, Matsubara Y. Casitas B-cell lymphoma mutation in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 2012;36:1009-15

4、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*. 2013;93:120-121.

5、Patrinou 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, Rimo D; International Confederation of Countries Advisory Council. Human Variome Project country nodes: documenting genetic information within a

country. *Hum Mutat*. 2012;33:1513-9.

6、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*. 2012;79:e63-8.

7、Aoki Y, Matsubara Y. Ras/MAPK syndromes and childhood hemato-oncological diseases. *Int J Hematol*. 2013;97:30-6.

8、Izumi R, Niihori T, Aoki Y, Suzuki N, Kato M, Warita H, Takahashi T, Tateyama M, Nagashima T, Funayama R, Abe K, Nakayama K, Aoki M, Matsubara Y. Exome sequencing identifies a novel TTN mutation in a family with hereditary myopathy with early respiratory failure. *J Hum Genet* (in press)

## 2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

- 2012年10月25-27日 日本人類遺伝学会第57回大会(東京) 齋藤 由佳、青木 洋子、村松 秀樹、今泉 益栄、力石 健、笹原 洋二、呉 繁夫、新堀 哲也、小島 勢二、松原 洋一 Noonan 症候群類縁疾患と小児血液腫瘍における CBL の分子遺伝学的解析
- 2012年10月25-27日 日本人類遺伝学会第57回大会(東京) 飯倉 立夏、青木 洋子、新堀 哲也、小松崎 匠子、松原 洋一 東北大学病院遺伝科の現状

## H. 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

## 次世代シーケンサーを用いた cytoplasmic body myopathy における 新たな原因遺伝子の探索に関する研究

研究分担者 青木 正志  
東北大学 大学院医学系研究科 神経内科 教授

### 研究要旨

Myofibrillar myopathy (MFM) の原因遺伝子およびその表現型は現在まで国外を中心として幾つかが報告されているが、これらの既知の原因遺伝子に変異を見出すことが出来ない群も多く、依然詳細な病態は明らかとなっていない。当科で診療を続ける常染色体優性遺伝形式をとる MFM の家系では、現在まで 5 世代に渡り約 20 名の罹患者が出ている (Abe K et al 1993)。下垂足を初発症状とし、遠位筋、胸郭、肩甲帯を主体とした慢性進行性の筋萎縮と筋力低下を呈するが、比較的早期 (発症から平均 3.8 年) に呼吸不全を合併する点に特徴がある。本家系の原因遺伝子は未だ不明であることから、新たな原因遺伝子およびその機能を解明することを目標に本研究に着手した。エクソーム解析と連鎖解析を併用することで、TTN 遺伝子に新規の原因変異 (c.90263G>T, p.W30088L) を同定することに成功した。

### 研究協力者

井泉瑠美子

(東北大学神経内科、遺伝病学分野)

鈴木直輝 (東北大学神経内科)

加藤昌昭 (東北大学神経内科)

割田 仁 (東北大学神経内科)

豎山真規 (東北大学神経内科)

高橋俊明 (国立西多賀病院神経内科)

舟山亮 (東北大学細胞増殖制御分野)

西田有一郎 (東北大学細胞増殖制御分野)

長嶋剛史 (東北大学細胞増殖制御分野)

中山啓子 (東北大学細胞増殖制御分野)

新堀哲也 (東北大学遺伝病学分野)

青木洋子 (東北大学遺伝病学分野)

松原洋一 (東北大学遺伝病学分野)

### A. 研究目的

東北大学神経内科にて 20 年以上前より診療を続けている常染色体優性遺伝形式をとるミオパチーの大家系があり、5 世代に渡り約

20 名の罹患者が出ている (図 1)。このミオパチーは、病理形態学的に骨格筋線維内に無構造、円形の cytoplasmic body と呼ばれる封入体を多数、びまん性に認める点に特徴があり (図 2)、筋原線維性ミオパチー (Myofibrillar Myopathy : MFM) の範疇に含まれる。下垂足を初発症状とし、遠位筋、胸郭、肩甲帯を主体とした慢性進行性の筋萎縮と筋力低下を呈するが、比較的早期 (発症から平均 3.8 年) に呼吸不全を合併する点に特徴がある。

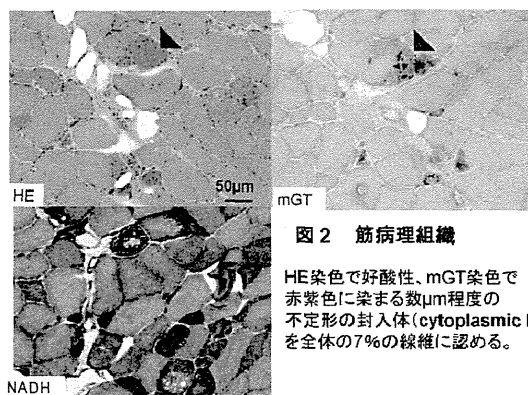
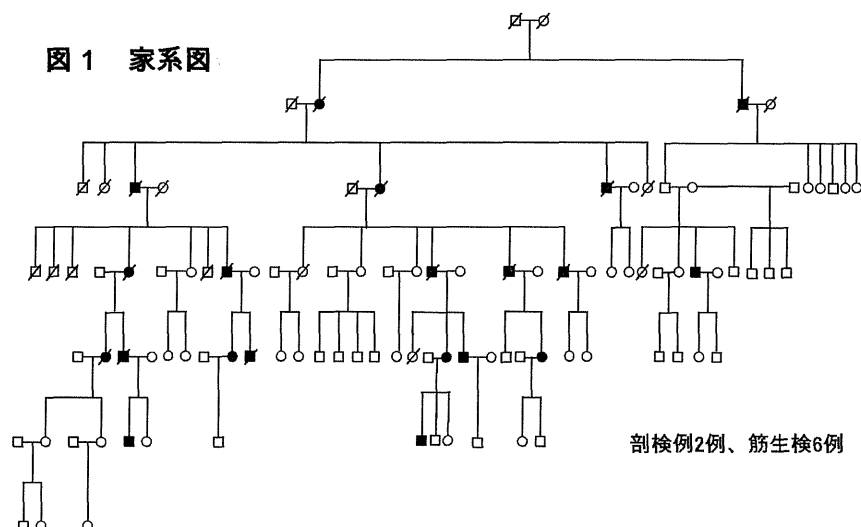


図 2 筋病理組織

HE染色で好酸性、mGT染色で赤紫色に染まる数μm程度の不定形の封入体 (cytoplasmic body) を全体の7%の線維に認める。

図1 家系図



本邦における MFМ の遺伝子スクリーニングで既知の遺伝子 (*DES*, *CRYAB*, *MYOT*, *LDB* (*ZASP*), *FLNC*, *BAG3*) に変異を見出すことができるのは 30%程度であるとされる。MFМ の臨床像は不均一であり、臨床的には肢帯型筋ジストロフィーや遠位型ミオパチーと類似するため、あくまでも診断は病理診断である。しかしながら原因遺伝子の違いによる特徴的な筋病理組織変化や蓄積蛋白質の違いは明らかとなっていない。

本家系は、既知の MFМ 原因遺伝子の表現型として共通して記載のある、拡張型心筋症や伝導ブロックといった心筋障害を合併しない点や、早期に呼吸不全を合併する点に特徴があり、既知の原因遺伝子の表現型とは一線を画する。そこで、我々は本家系において、新たな原因遺伝子およびその機能を解明することを目標に本研究に着手した。本家系において MFМ の新たな原因遺伝子を明らかにすることができれば、既知の分子との関連を含め、骨格筋の Z 線の変性機序や細胞内蛋白質の蓄積過程の解明に繋がると考えられ重要であり、二次性に cytoplasmic body を生じる炎症性筋疾患や筋ジストロフィーの病態解明にも寄与し得ると考えた。

## B. 研究方法

### 1. 対象

本家系の中の罹患者 5 名、非罹患者 5 名の計 10 名について遺伝子解析の同意を得て末梢血から DNA を抽出した。

### 2. 連鎖解析

全ゲノム SNP chip (Illumina Human Omni 2.5 BeadChip) で得られたデータの内、約 17000SNP の情報を用いて、MERLIN で多点解析を行った。

### 3. エクソーム濃縮

患者 DNA を SureSelect Human All Exon kit v2 (Agilent Technologies)を用いてエクソーム濃縮とライブラリ調整を行った。

### 4. エクソーム解析 (exome sequence)

次世代シーケンサー HiSeq 2000 (Illumina) を用いて 101 塩基のペアエンド解析を行った。得られたデータは、BWA でマッピングを行い、GATK v1.5 で変異の一塩基置換や欠失挿入の抽出を行った。変異のアノテーションには、ANNOVAR を使用した。

### (倫理面への配慮)

患者からの臨床情報の取得および DNA の採取に関しては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、最初に東北大学医学部のヒトゲノム委員会および倫理委員会に研究計画書を提出し、承認を得ている。



## C. 研究結果

### 1. 連鎖解析

連鎖解析を罹患者 5 名、非罹患者 5 名の計 10 名について行った結果、LOD score > 2 の領域を 5 箇所にて同定した。

### 2. エクソーム解析 (exome sequence)

罹患者 4 名、非罹患者 3 名の計 7 名について行った。罹患者のみに共通するエクソン・スプライシング領域の変異を 64 個検出した

が、その内新規の機能的変化を起こし得る遺伝子変異は 2 個にまで絞り込まれた (図 3)。

その内 *TTN* の変異 c.90263G>T, p.W30088L

(図 4) のみが上記の連鎖領域内に存在した。この変異を、解析可能な 10 名全てについてサングーシークエンスした結果、segregation に矛盾なく、本変異が原因変異であると結論づけた。健常コントロール 191 例では本変異を認めなかった。

図3 エクソーム解析の結果と変異の絞り込み

Individual	A	B	C	D	E	H	I	segregated in 7 family members
	Morbidity	affected	affected	unaffected	unaffected	affected	affected	
Exonic, splicing	10089	10064	10079	10065	10230	10194	10216	64
Nonsynonymous, splicing, indel, nonsense	4987	5020	5055	5038	5143	5234	5200	32
Allele frequency not available	577	600	536	555	671	794	786	2

## D. 考察

エクソーム解析と連鎖解析を併用することで、MFMDの大家系で*TTN*遺伝子に新規の原因変異を同定することに成功した。*TTN*は、363 exonsで構成される294 kbの巨大な遺伝子であり、38,138 アミノ酸で構成されるtitinをコードしている。titinは筋サルコメア内でZ線とM線に結合し、thin/thick filamentの長さや集合の調節に関わっている。

現在まで前脛骨筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー (LGMD2J) の原因遺伝子として知られてきたが、次世代シーケンサーの普及に伴い、MFMDの病理像を呈する Hereditary myopathy with early respiratory failure (HMERF #603689) の原因遺伝子として近日国外から数例の報告が続いている。これらの変異は*TTN*のA-bandドメインの特定の領域に集簇しており表現型との強い相関を持つことが示唆される。本研究の結果は、*TTN*をMFMDの新たな原因遺伝子として認識する上で、またHMERFの疾患概念を確立する上で重要な報告と考えられる。

## E. 結論

今回変異を同定した *TTN* のような巨大な遺伝子については、次世代シーケンサーが変異の検出に果たす役割は大きい。

*TTN* の変異が MFMD を起こす詳細なメカニズムについては未だ解明されていない。今後、孤発例も含め、封入体を生じる疾患における *TTN* の変異の有無について次世代シーケンサーによるスクリーニングを行っていく予定である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Exome sequencing identifies a novel *TTN* mutation in a family with hereditary myopathy with early respiratory failure.

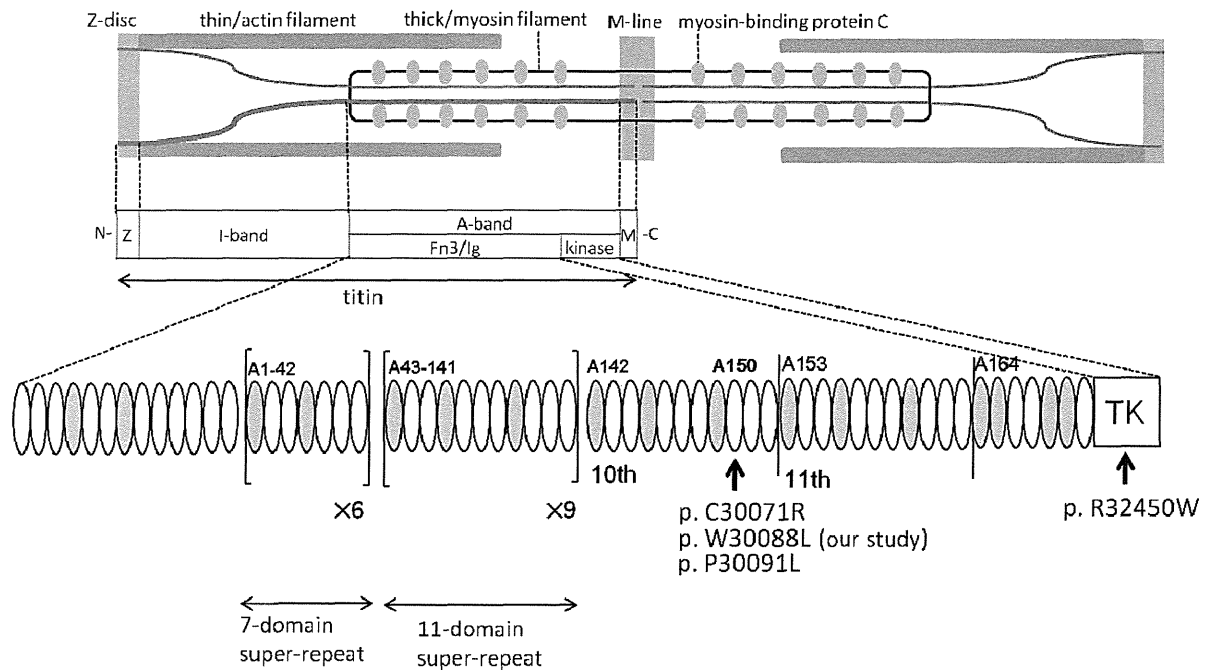
Rumiko Izumi, Tetsuya Nihori, Yoko Aoki,  
Naoki Suzuki, Masaaki Kato, Hitoshi Warita,  
Toshiaki Takahashi, Maki Tateyama, Takeshi  
Nagashima, Ryo Funayama, Koji Abe, Keiko  
Nakayama, Masashi Aoki, Yoichi Matsubara  
Journal of Human Genetics (in press)

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
3. その他  
なし

2. 学会発表  
なし

図4 titinのドメイン構造とHMERFの病因変異部位



## 東北大学関連の臨床検体の遺伝子解析に関する研究

研究分担者 有馬 隆博 東北大学大学院医学系研究科 教授

### 研究要旨

先天性ゲノムインプリンティング異常症5疾患のうち：Beckwith-Wiedemann 症候群（BWS）、Silver-Russell 症候群（SRS）は、体外受精や顕微授精などの生殖補助医療（ART）を受けた児にその発症頻度が高く、DNA メチル化の異常を原因とする（エピゲノム変異）の症例が多い傾向にある事およびエピゲノム異常のパターンや臨床症状に特徴を有することを報告した。つまり1）同一症例で、複数のインプリント領域の異常、2）同一症例で、精子型と卵子型 DMR の両方に異常、3）同一症例で、高メチル化と低メチル化、4）メチル化異常の程度は、モザイク型。これらの複雑なメチル化機構は、ART 出生児では、受精以降のメチル化の維持、受精以降のプロセス（受精卵培養、凍結胚操作など）で異常が起こり、疾患を発症へと導いた可能性が推察された。本年度は、インプリント領域以外で全ゲノムのメチル化解析を行うことを目的とした。そのため、微量の DNA 量で、正確かつ安定なメチローム解析法（PBAT 法）について事前評価を行った。

### 研究協力者

樋浦 仁（東北大学大学院医学系研究科）  
岡江 寛明（東北大学大学院医学系研究科）  
宮内 尚子（東北大学大学院医学系研究科）  
佐藤 英美（東北大学大学院医学系研究科）

### A. 研究目的

生殖補助医療（ART）の普及により、特定の一部のゲノムインプリント異常疾患の発生頻度の増加が世界中で注目されている。ART が、ゲノムインプリンティングが確立する時期の配偶子进行操作する事が原因であると推察されているためである。先天性ゲノムインプリンティング（GI）異常症のうち、Beckwith-Wiedemann 症候群（BWS）Silver-Russell 症候群（SRS）にエピゲノム異常の頻度が高く、ART との関連性が強く疑われた。本年度は、1）患者情報と患者検体を用い、遺伝子型と臨床型の関連を明らかにする。特に、DNA メチル化に着目し、異常の頻度、程度、影響を受けやすい遺伝子領域を同定する。また、ART 治療法やメチル化異常との関連について実態を把握し、リスク要因について評価する事を目的とする。2）ART 児の先天性疾患に見られる複雑なメチル化異常について、インプリント以外の領域を含め、全ゲノム

ムエピゲノム解析を行う事を第2の目的とした。

### B. 研究方法

#### (1) インプリント異常疾患のメチル化インプリントの網羅的解析：

Beckwith-Wiedemann 症候群（BWS）、Silver-Russell 症候群（SRS）患者の血液から DNA を抽出し、責任インプリント遺伝子領域のメチル化解析を行った。ART 出生児は、それぞれ5例と1例、非 ART 出生児は9例と6例であった。ヒトインプリント領域の検索を行い、22 領域（父由来アレルのメチル化領域：精子型メチル化インプリント領域（DMR）3、母由来アレルのメチル化領域：卵子型 DMR19）を同定し、PCR プライマーを設計した。DNA 多型を含めた Bisulphite PCR Sequence 法を用い、Epimutation（エピゲノム変異）があることを正確に評価した。また、結果については、各医療機関の主治医に郵送で報告した。また、それぞれの症例毎に、リスク要因、表現型についても検討した。

#### (2) 系統的、網羅的全ゲノムのメチル化解析：

MethylC-Seq 法は十分な量の DNA でシーケンスを行えば全シトシンの約 90%は網羅可能で、現在行われているメチローム解析の中でも最も信頼性と解

像度が高いと言われている。このメチローム解析には数億、多くて十億のマッピング可能なリードが必要である。国際エピゲノムコンソーシアム (IHEC) の基準では 5 ug の比較的大量のゲノム DNA からスタートし、20 x のカバー率であることが必要とされている。しかし、貴重な検体で、しかも培養するとメチル化の状態は変化を起こす。また、

MethylC-Seq 法では、ゲノム DNA を sonication で断片化し、メチル化シトシンを含むアダプターを ligation し、ゲル切り出しに依るサイズセレクションを行った後、バイサルファイト処理、PCR 増幅する。しかしバイサルファイト処理によりアダプターが結合した分子も切断されてしまう。また PCR 増幅が必要なため、マッピング効率にバイアスがかかる。一方、Post Bisulfite Adaptor Tagging by random primer extension (PBAT) 法ではアダプター付加の前にバイサルファイト処理による断片化を行い、この後、アダプターを付加してシーケンスを行う。アダプターが結合した分子がバイサルファイト処理により切断されることがないため、非常に効率よくライブラリー調整が可能である。また、PCR 増幅も行わないためマッピングのバイアスが生じにくい特徴がある (図 1)。サンプル DNA 量は約 30ng で、従来法の約 1/20 の量で科一席できる。具体的には、1) ゲノム DNA をバイサルファイト処理と同時に断片化、2) biotin とアダプター配列がついたランダムプライマーで第一鎖合成、3) biotin をストレプトアビジンでキャプチャーし、これに対して第二鎖合成、4) これを溶出し、次世代シーケンサー (Illumina HiSeq2000) で配列を決定する。

#### (倫理面への配慮)

**患者検体を用いる研究：**ヘルシンキ宣言 (エジンバラ改訂)、臨床研究に関する倫理指針 (厚生労働省) に従い、本研究を実施。東北大学医学部倫理委員会より、研究プロトコルの承諾を得た。研究対象者の登録にあたっては、機密保護に十分に配慮した。すなわち研究対象者の同定や照会は研究登録番号、症例イニシャル、生年月日を用いて行うこととし、直接患者を識別できる情報は事務局のデータベースには登録していない。また、本研究に係わる臨床記録、検査データ、同意に関する記録など医療機関において作成されたもの

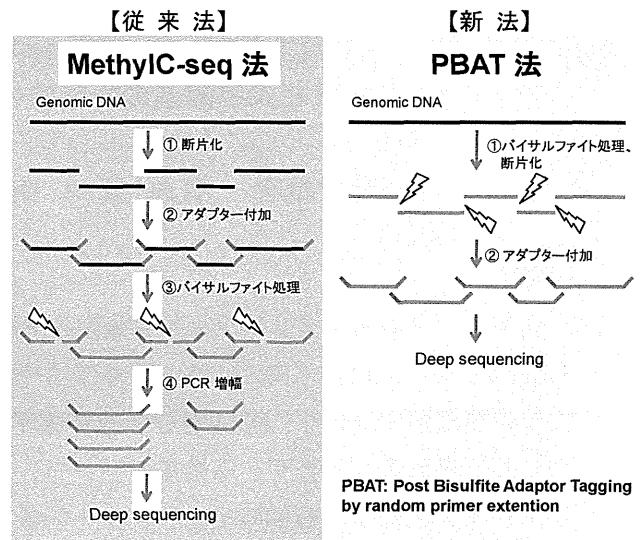


図1 Bisulfite Shotgun sequence: MethylC-seq法とPBAT法

については保管責任者が鍵のかかるキャビネットに保管。その保管期間は本研究終了時までとし、その後廃棄予定。

**組換え DNA 実験：**全ての実験について、遺伝子組み換え実験および動物実験の承認を得ている。参加者は遺伝子組換え実験の教育訓練をうけ「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づき、実験拡散防止措置確認を行っている。

### C. 研究結果

#### (1) インプリント異常症のメチル化インプリント領域の網羅的解析：ART と非 ART 児の比較

DNA 多型を含む 22 領域のメチル化インプリント領域を同定した。Bisulphite PCR Sequence 法を用いて、ヒトメチル化インプリント領域の DNA メチル化の解析を正確に行い、メチル化異常のパターンについて分析した。SRS の場合、ART 治療を受けた患者では、83% (6 例中 5 例) において、複数のインプリント領域で異常を認めた。これらの症例は全例、精子型と卵子型 DMR の両方に異常を認めた。また、同一症例で、高メチル化と低メチル化を示し、またその程度は、完全型ではなく、モザイク型を示す事が特徴にみられた。BWS は 1 例しか ART 後の症例は解析出来なかったが、SRS の場合と同様に複雑なメチル化傾向を示した。一方、非 ART 群においては、SRS では 3 例 (10 例中)、BWS では 1 例 (6 例中) に複数領域にメチル化異常を示すことが判明した。これらの事実より、ART 出生児では、エピゲノム異常の頻度が高く、その関連性が