

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
総合分担研究報告書

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、診断基準をまとめることができた。さらに、IMAGe症候群におけるCDKN1C変異の同定、CDKN1C軽度機能亢進変異やコピー数増加がシルバーラッセル症候群のサブタイプを形成することを見いだした。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得ら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な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、シークエンス解析、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、現在なしてい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、現在実施してい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）。

第14染色体父性・母性ダイソミー症候群

インプリンティング遺伝子が胎盤形成に重要な役割を演じていることから、第14染色体父性ダイソミー患者の胎盤組織を検討した。その結果、患者胎盤では、末梢絨毛の過形成、血管内皮細胞とpericytesの過形成、RTL1の過剰発現が認められた（図1）。これは、胎盤組織の異常を同定した初めての成果である。

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。

IMAGe症候群

最近IMAGe症候群（子宮内発育遅滞、骨幹端異形成、副腎低形成、男児外性器異常）の原因が、イン

プリンティング遺伝子(母性発現遺伝子)CDKN1Cの機能亢進変異であることが示された。われわれは、本邦におけるIMAGe症候群3例を解析し、2例においてCDKN1Cの機能亢進変異を同定した(図2)。そして、(1) IMAGe症候群表現型がシルバーラッセル症候群の表現型を含むこと、(2) 相対的頭囲拡大が存在し、これはCDKN1Cが脳においてのみ両親性発現を示すことに一致すること、(3) 副腎低形成が糖質ステロイドのみの欠乏症状を伴うこと、(4) 外性器異常が、胎盤低形成に起因する胎盤ゴナドトロピン分泌低下に起因することを、世界で初めて見出した。さらに、その後の文献データから、CDKN1Cの高度機能亢進変異がIMAGe症候群を、軽度機能亢進変異がシルバーラッセル症候群を生じることを見出した。

シルバーラッセル症候群サブタイプの提唱

われわれは、IMAGe症候群患者がシルバーラッセル症候群表現型を呈するものの、左右非対称を欠くこと、また、相対的頭囲拡大の程度が軽度であることを見いだした(表2)。さらに、2例において、11p15遠位部のCDKN1Cを含む母由来染色体過剰が、まさしくシルバーラッセル症候群表現型を呈するものの、左右非対称を欠くことや相対的頭囲拡大の程度が軽度であることを見いだした。この母由来染色体過剰は、CDKN1C発現過剰以外の遺伝子発現増かを伴わないことから、CDKN1Cの軽度機能亢進変異とコピー数増加が、Nechineらにより提唱されたシルバーラッセル症候群診断基準を満足するものの、左右非対称の欠落や相対的頭囲拡大により特徴づけられるシルバーラッセル症候群のサブタイプを構築することを世界で初めて見いだした。

インプリンティング疾患における原因別発症頻度の解析

インプリンティング疾患は、ダイソミー、エピ変異、インプリンティング領域の欠失、インプリンティング遺伝子内変異によって発症する。われわれは、自験例と文献例を解析し、その原因別発症頻度を解析した。その結果は表3に示す通りである。プラダーウイリ症候群とアンジェルマン症候群において欠失が多いことは、インプリンティング領域の両側に low-copy repeat が存在することで説明される。また、単一遺伝子疾患としてのインプリンティング疾患も存在し、これらのことは、包括的な解析の必要性を示唆する。

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ているものである。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ているものである。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

論文発表

1. Kato F, Hamajima T, Hasegawa T, Amano N, Horikawa R, Nishimura G, Nakashima S, Fuke T, Sano S, Fukami M, Ogata T: IMAGe syndrome: clinical and genetic implications based on investigations in three Japanese patients. *Clin Endocrinol* (in press)
2. Higashimoto K, Jozaki K, Kosho T, Matsubara K, Sato T, Yamada D, Yatsuki H, Maeda T, Ohtsuka Y, Nishioka K, Joh K, Koseki H, Ogata T, Soejima H: A novel *de novo* point mutation of OCT-binding site in the *IGF2/H19*-imprinting control region in a patient with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Clin Genet* (in press).
3. Tsuchiya T, Shibata M, Numabe H, Jinnno T, Nakabayashi K, Nishimura G, Nagai T, Ogata T, Fukami M: Compound heterozygous deletions in pseudoautosomal region 1 in an infant with mild manifestations of Langer mesomelic dysplasia. *Am J Med Genet A* (in press).
4. Nakashima S, Watanabe Y, Okada J, Ono H, Nagata E, Fukami M, Ogata T: Critical role of Yp inversion in *PRKY/PRKY*-mediated Xp;Yp translocation in a patient with 45,X testicular disorder of sex development. *Endocr J* 2013 Oct 3. [Epub ahead of print].
5. Shihara D, Miyado M, Nakabayashi K, Shozu M, Nagasaki K, Ogata T, Fukami M: Aromatase excess syndrome in a family with upstream deletion of *CYP19A1*. *Clin Endocrinol* 2013 Sep 18. doi: 10.1111/cen.12329. [Epub ahead of print].
6. Fujisawa Y, Yamaguchi R, Satake E, Ohtaka K, Nakanishi T, Ozono K, Ogata T: Identification of *AP2S1* Mutation and Effects of Low Calcium Formula in an Infant with Hypercalcemia and Hypercalciuria. *J Clin Endocrinol Metab* 98 (12): E2022–2027.
7. Fukami M, Suzuki J, Nakabayashi K, Tsunashima R, Ogata T, Shozu M, Noguchi S: Lack of genomic rearrangements involving the aromatase gene *CYP19A1* in breast cancer. *Breast Cancer* 2013 Apr 30. [Epub ahead of print].

8. Fukami M, Tsuchiya T, Vollbach H, Brown KA, Abe S, Ohtsu S, Wabitsch M, Gurger H, Sompson ER, Emezawa A, Nakabayashi K, Bulun SE, Shozu M, Ogata T: Genomic basis of aromatase excess syndrome: recombination- and replication-mediated rearrangements leading to *CYP19A1* overexpression. *J Clin Endocrinol Metab* 98 (12): E2013–2021, 2013.
9. Igarashi M, Dung VC, Suzuki E, Ida S, Nakacho M, Nakabayashi K, Mizuno K, Hayashi Y, Kohri K, Kojima Y, Ogata T, Fukami M: Cryptic genomic rearrangements in three patients with 46,XY disorders of sex development. *PLoS One* 8 (7): e68194, 2013.
10. Fukami M, Iso M, Sato N, Igarashi M, Seo M, Kazukawa I, Kinoshita E, Dateki S, Ogata T: Submicroscopic deletion involving the fibroblast growth factor receptor 1 gene in a patient with combined pituitary hormone deficiency. *Endocr J* 60 (8): 1013–1020, 2013.
11. 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* 60 (7): 855–859, 2013.
12. 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, Yamazawa K, Ogata T: Molecular and clinical studies in 138 Japanese patients with Silver-Russell syndrome. *PLoS One* 8 (3): e60405, 2013.

学会発表

1. 緒方勤: インプリンティング疾患の遺伝子診断: 第14染色体父性ダイソミー表現型をモデルとして. シンポジウム: 単因子疾患の遺伝子診療. 第20回日本遺伝子診療学会. 2013年7月18–20日, 浜松.
2. 緒方勤: 生殖補助医療とインプリンティング疾患発症. シンポジウム: 疾患から見た ART とエピゲノム. 第31回日本受精着床学会学術集会. 2013年8月8–9日, 別府.
3. 緒方勤: 性染色体異常症における精神運動発達遅滞の発症機序. 第14回ターナー症候群西日本ネットワーク学術講演会. 2013年2月23日, 大阪.
4. 緒方勤: Prader-Willi 症候群: 厚生労働科学研究の成果から. 竹の子の会総会講演会. 2013年4月28日, 静岡.

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

- 特許取得
該当なし
実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

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 (<i>H19</i> -DMR) (Ch.11)	0	98
Prader-Willi 症候群	192 (0)	39 (Ch.15)	3 (<i>SNRPN</i> -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

表5. IMAGE 症候群患者と軽度 CDKN1C 機能亢進変異を有する患者におけるシルバーラッセル症候群表現型

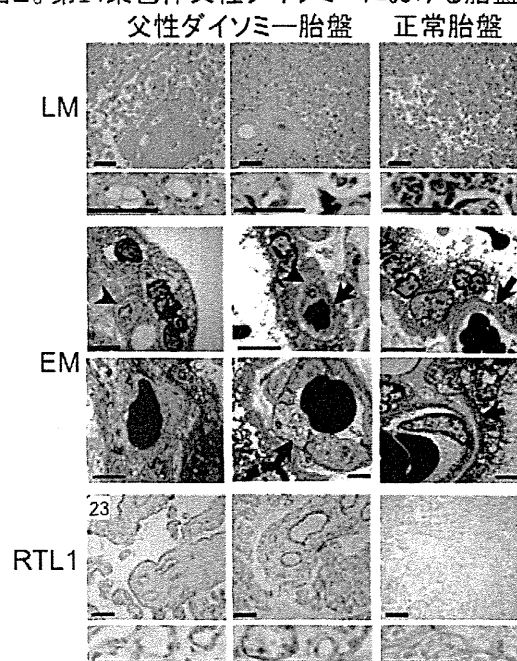
	Case 1	Case 2	Case 3	Brioude et al. ²
Mandatory criteria				
IUGR ^a	Yes	Yes	Yes	4/4
Scoring system criteria				
Postnatal short stature (≤ -2 SDS)	Yes	Yes	Yes	4/4
Relative macrocephaly ^b	Yes	Yes	Yes	4/4 ^c
Prominent forehead during early childhood	Yes	Yes	Yes	4/4
Body asymmetry	No	No	No	0/4
Feeding difficulties during early childhood and/or low BMI (≤ -2.0 SDS) around 2 years of age	Yes	Yes	Unknown	3/4 (1/4 & 2/4) ^d

表 3. インプリンティング疾患における原因別発症頻度

Relative frequency of genetic mechanisms in imprinting disorders					
	UPD(14)pat-like phenotype	BWS	SRS	AS	PWS
Uniparental disomy	65.4%	16%	10%	3–5%	25% (25%)
	UPD(14)pat	UPD(11)pat (mosaic)	UPD(7)mat	UPD(15)pat	UPD(15)mat
Cryptic deletion	19.2%	Rare	...	70%	70% (72%)
Cryptic duplication	Rare
Epimutation					
Hypermethylation	15.4%	9%	2–5% (2%)
Affected DMR	IG-DMR/MEG3-DMR	H19-DMR	SNRPN-DMR
Hypomethylation	...	44%	>38%	2–5%	...
Affected DMR	...	KvDMR1	H19-DMR	SNRPN-DMR	...
Gene mutation	...	5%	...	10-15%	...
Mutated gene	...	CDKN1C	...	UBE3A	...
Unknown	...	25%	>40%	10%	...
Reference	This study	17	18	19	8, 19

BWS: Beckwith-Wiedemann syndrome; SRS: Silver-Russell syndrome; AS: Angelman syndrome; and PWS: Prader-Willi syndrome.
 Patients with abnormal karyotypes are included in BWS and AS, and not included in SRS. In PWS, the data including patients with abnormal karyotypes are shown, and those from patients with normal karyotype alone are depicted in parentheses.

図2。第14染色体父性ダイソミーにおける胎盤解析:



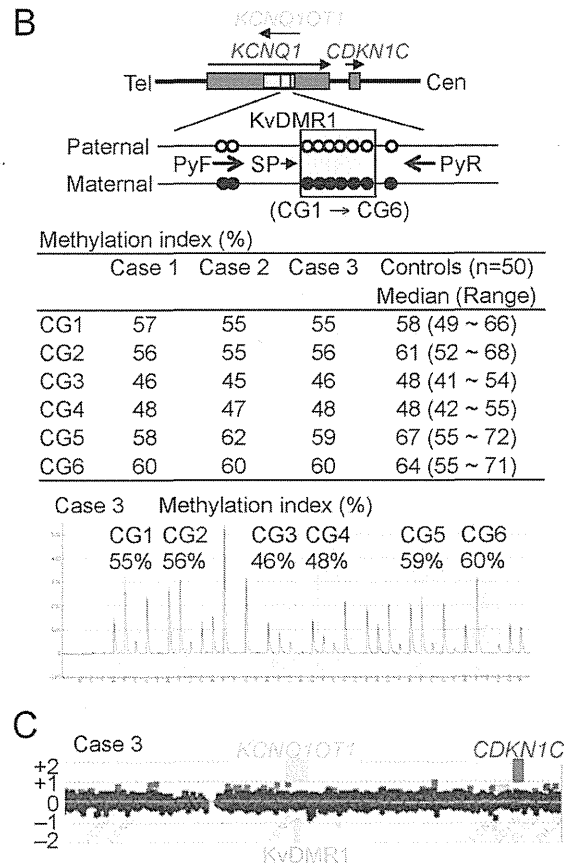
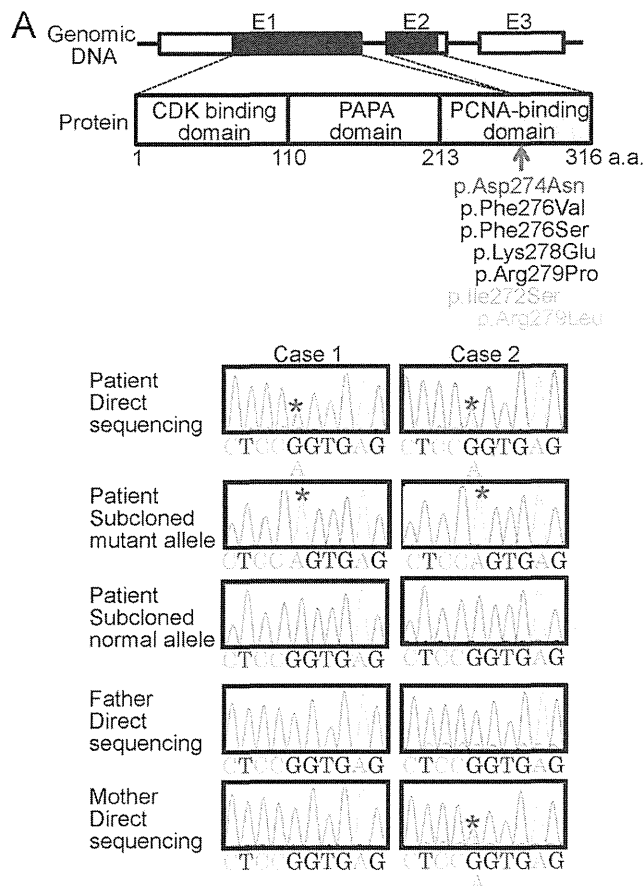


図 2. IMAGE 症候群における CDKN1C 変異

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。昨年度は、欧米で用いられている診断基準を基に、本邦における診断基準（案）を作成した。本年度は、適切な診断を受けた後の健康チェックの手引きおよび年齢別診療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健康チェックの手引きおよび年齢別診療の手引きの有用性の検討が求められる。

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である。昨年度本研究に置いて、欧米の診断基準に基づき、本邦における診断基準（案）の作成を行った。その結果、標準的な診断が可能になった。そこで、本年度は、適切な診断の後に求められる、年齢別診療の手引きの作成を目的とした。

B. 研究方法

年齢別診療の手引き作成にあたっては、Cassidy and Allanson. Management of Genetic Syndrome. 第3版およびWilson and Cooley. Preventive Management of Children with Congenital Anomalies and Syndromes. Cambridge University Press, 2000を参考にした。
日本語版作成にあたり、本邦の実情を踏まえて、適宜修正を行った。

C. 研究結果

PWS および AS 年齢別診療の手引きを作成した（添付資料、表1および表2）。年齢別として、0-3歳、4-18歳と分けて作成した。0-3歳においては

新生児期、3か月、6か月、12か月、18か月、2歳、3歳における評価項目と連携が必要な項目を記載した。本年齢においては、早期からの遺伝学的診断、早期からの家族支援や患者会の紹介を明記した。それぞれの年齢においては、定期フォローアップにおける留意点を示し、また、小児科以外の専門科への紹介時期がわかるように心がけた。4-18歳においては4-6歳、7-9歳、10-12歳、中学生、高校生、成人と分けて記載した。それぞれの年齢での目標として、学童前では身の自立の確立を目指すことを示し、思春期の心理的評価と対応の重要性を指摘した。中学生以上では精神科・心理との連携を重視した。
ASにおいても0-3歳と4-18歳と分けて記載した。それぞれの項目での月齢、年齢の分け方はPWSと共通している。0-3歳ではPWSと同様に早期の遺伝学的診断を重視して記載した。また、家族支援、患者会の紹介の重要性を記載している。ASでは乳児期からけいれんやてんかんの発症が問題となる。そこで、6か月から脳波や頭部MRI検査の必要性を記載している。また、1歳6か月から療育への紹介を記載した。4-18歳では就学や学校との連携について記している。それぞれの年齢における評価では、あまり気付かれない合併症としての滲出性中耳炎や側彎、肥満について記載することで、もれのないように注意した。成人においては社会参加の支援と成人医療機関との連携、いわゆるトランジションについて記載した。

D. 考察

PWSとASとは遺伝学的診断法により大多数の例の診断が可能である。そして、近年では遺伝学的診断は早期に行われるようになり、新生児期に実施されることも稀ではない。そのため、未だに症状が揃っていないうちに診断を得ることが一般的になっている。そのため、家族および主治医は疾患の自然歴を知り、見通しをもった診療を行うことが求められている。

欧米ではこのような必要性の高まりにより、遺伝性疾患の診療の手引きの作成が進んでいる。PWSとASとにおいても、複数の試みが示されている。しかし、本邦においては、このような診療の手引きは十分に完備されているとは言えない。

本研究においては、上記の問題を解決するために、本邦における診療の手引きの作成を行った。そして、その成果を日本小児遺伝学会のホームページを通して会員に公開した。そうすることで、本邦におけるPWSおよびAS診療の標準化と均てん化に寄与することが期待される。

PWSは特に、年齢による症状の変化が著しい。そして、それぞれの年齢ごとにもっとも気をつけない症状が変化する。そのため、PWSの診療においては、今現在存在する症状のみでなく、今後出現することが予想される症状に対して備えておく必要がある。本診療の手引きはそのような意味で重要な役割を果たすことができると考える。

ASにおける診療の手引きもPWSと同様に、見通しを持って診療を進めるために有益である。特に、けいれんやてんかんに対して発症前から注意を行うことができると、家族は慌てることなく、対応ができるようになる。また、稀な合併症を知ることによって、適切な時期に、他の専門科を受診することができる。

このようにこれらの診療の手引きは臨床的に有用と考えられる。しかし、広く使用されるためには、アクセス良く、入手できることが重要である。本診療の手引きは日本小児遺伝学会のホームページから、ダウンロードが可能である。このような有用性は研究班と関連学会との連携の重要性を示していると考えられる。

E. 結論

本邦におけるPWSとASとの年齢別診療の手引きを作成し、日本小児遺伝学会ホームページに公開した。これら診療の手引きはPWSとASとの診療における標準化と均てん化に重要な役割を果たすと考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ueda H, et al. Combination of Miller-Dieker syndrome and VACTERL association causes extremely severe clinical presentation. *Eur J Pediatr* (in press)
2. Suzumori N, et al. Prenatal diagnosis of X-linked recessive Lenz microphthalmia syndrome. *J Obstet Gynaecol Res* 2013;39:1545-7.
3. Hamajima N, et al. Increased protein stability of CDKN1C causes a gain-of-function phenotype in patients with IMAGE syndrome. *PLoS One* 2013;8:e75137.
4. Yoneda Y, et al. Phenotypic spectrum of *COL4A1* mutations: porencephaly to schizencephaly. *Ann Neurol* 2013;73:48-57.

2. 学会発表

- Togawa T, et al. Comprehensive mutation analysis by next generation sequencing in patients with neonatal intrahepatic cholestasis. 63rd Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Boston, USA, 10/22-26/2013
- Hosoki K, Saitoh S. Molecular and clinical study of 30 Angelman syndrome patients with *UBE3A* mutations. 63rd Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Boston, USA, 10/22-26/2013
- Negishi Y, et al. Homoplasmy of a mitochondrial 3697G>A mutation causes Leigh syndrome. 63rd Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Boston, USA, 10/22-26/2013
- 青山幸平ら. Greig cephalopolysyndactyly 症候群と *MODY2* を伴う隣接遺伝子症候群の1例. 第36回日本小児遺伝学会学術集会 平成25年4月18日
- 根岸豊ら. ミトコンドリア DNA 3697G>A ホモプラスミー変異は Leigh 脳症の原因となる. 第58回日本人類遺伝学会 平成25年11月20-23日(仙台)

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

アンジェルマン症候群 年齢別 診療の手引き (0-3歳)

年齢	評価	必要により連携	注記
新生児期	<input type="checkbox"/> 成長：身長・体重（低体重）・頭圍（小頭症は目立たない） <input type="checkbox"/> 発達： <input type="checkbox"/> 聴覚／聴覚検査 <input type="checkbox"/> 栄養：哺乳 <input type="checkbox"/> 両親の疾患の受け入れ <input type="checkbox"/> 染色体検査（第15番染色体AS領域FISH検査、DNAメチル化テスト）	<input type="checkbox"/> 耳鼻咽喉科 <input type="checkbox"/> 摂食・栄養指導 <input type="checkbox"/> 家族支援（ソーシャルワーカー等の紹介）	
3か月	<input type="checkbox"/> 成長：身長・体重・頭圍 <input type="checkbox"/> 発達： <input type="checkbox"/> 視覚： <input type="checkbox"/> 聴覚： <input type="checkbox"/> 栄養：哺乳 <input type="checkbox"/> 両親の疾患の受け入れ	<input type="checkbox"/> 眼科 <input type="checkbox"/> 耳鼻咽喉科 <input type="checkbox"/> 摂食・栄養指導	
6か月	<input type="checkbox"/> 成長：身長・体重・頭圍 <input type="checkbox"/> 発達： <input type="checkbox"/> 栄養：哺乳・摂食 <input type="checkbox"/> 視覚：斜視 <input type="checkbox"/> 聴覚： <input type="checkbox"/> 脳波・頭部MRI <input type="checkbox"/> 遺伝相談／（必要に応じて）遺伝学的検査	<input type="checkbox"/> 眼科 <input type="checkbox"/> 耳鼻咽喉科 <input type="checkbox"/> 摂食・栄養指導 <input type="checkbox"/> リハビリ科等 <input type="checkbox"/> 家族支援	
12か月	<input type="checkbox"/> 成長：身長・体重・頭圍（小頭症） <input type="checkbox"/> 発達： <input type="checkbox"/> 栄養：哺乳・摂食 <input type="checkbox"/> 視覚：斜視 <input type="checkbox"/> 聴覚： <input type="checkbox"/> 痙攣（1歳までに25%が発症）／脳波 <input type="checkbox"/> 睡眠 <input type="checkbox"/> 胃食道逆流 <input type="checkbox"/> 不十分な咀嚼	<input type="checkbox"/> 摂食・栄養指導 <input type="checkbox"/> 家族支援	
18か月	<input type="checkbox"/> 成長：身長・体重・頭圍 <input type="checkbox"/> 発達： <input type="checkbox"/> 栄養：哺乳・摂食 <input type="checkbox"/> 痙攣／脳波 <input type="checkbox"/> 睡眠	<input type="checkbox"/> 摂食・栄養指導 <input type="checkbox"/> 療育等への紹介 <input type="checkbox"/> 家族支援	
2歳	<input type="checkbox"/> 成長：身長・体重・頭圍 <input type="checkbox"/> 発達： <input type="checkbox"/> 栄養：哺乳・摂食 <input type="checkbox"/> 視覚：斜視 <input type="checkbox"/> 聴覚： <input type="checkbox"/> 痙攣／脳波 <input type="checkbox"/> 睡眠	<input type="checkbox"/> 眼科 <input type="checkbox"/> 耳鼻咽喉科 <input type="checkbox"/> 摂食・栄養指導 <input type="checkbox"/> 療育 <input type="checkbox"/> 家族支援	
3歳	<input type="checkbox"/> 成長：身長・体重・頭圍 <input type="checkbox"/> 発達： <input type="checkbox"/> 視覚：屈折検査（斜視）、視反応・視力の評価 <input type="checkbox"/> 聴覚／聴力検査 <input type="checkbox"/> 栄養：哺乳・摂食（過食） <input type="checkbox"/> 痙攣（3歳までに90%が発症）／脳波 <input type="checkbox"/> 睡眠	<input type="checkbox"/> 眼科 <input type="checkbox"/> 摂食・栄養指導 <input type="checkbox"/> 家族支援 <input type="checkbox"/> 状況により、幼稚園・保育園等への通園準備	発達の加速 移動能力の評価は重要

*小児遺伝学会 <http://plaza.unin.ac.jp/o-genet/>

※どの年齢においても診療の際に遺伝に関する両親からの相談を受け、必要に応じて遺伝カウンセリングを行う。

本手引きは、疾患における全ての合併症を網羅しているわけではないため、必要に応じて他の評価や検査を加える。一方で、各年齢において、チェックリストの全ての合併症が出現するものではない。

各年齢において、必ずしも全ての検査を実施する必要はなく、主治医の判断において診療を進めることが推奨される。

アンジェルマン症候群 年齢別 診療の手引き (4-18歳)

年齢	特徴	必要により連携	注記
4歳 ↓ 6歳	<input type="checkbox"/> 成長：身長・体重 (BMI)・頭囲 <input type="checkbox"/> 発達：発達検査・知能検査等、歩行開始は3～4歳 <input type="checkbox"/> 栄養：摂食 (過食) <input type="checkbox"/> 視覚：斜視 <input type="checkbox"/> 聴覚：滲出性中耳炎、聴力 <input type="checkbox"/> 骨格：側弯/背椎X線 <input type="checkbox"/> 多動傾向 <input type="checkbox"/> 痙攣 <input type="checkbox"/> 睡眠障害	<input type="checkbox"/> 栄養・摂食の専門家 <input type="checkbox"/> 眼科 <input type="checkbox"/> 耳鼻咽喉科 <input type="checkbox"/> 整形外科 <input type="checkbox"/> 療育 <input type="checkbox"/> 家族支援 <input type="checkbox"/> 就学相談	
7歳 ↓ 9歳	<input type="checkbox"/> 学校での状況 <input type="checkbox"/> 成長：身長・体重 (BMI)・頭囲 <input type="checkbox"/> 発達： <input type="checkbox"/> 栄養：摂食 (過食) <input type="checkbox"/> 視覚：斜視 <input type="checkbox"/> 聴覚：滲出性中耳炎、聴力 <input type="checkbox"/> 背椎X線 <input type="checkbox"/> 痙攣 <input type="checkbox"/> 睡眠障害 <input type="checkbox"/> 肥満	<input type="checkbox"/> 眼科 <input type="checkbox"/> 耳鼻咽喉科 <input type="checkbox"/> 家族支援 <input type="checkbox"/> 学校との連携	
10歳 ↓ 12歳	<input type="checkbox"/> 学校での状況 <input type="checkbox"/> 成長：身長・体重 (BMI)・頭囲 <input type="checkbox"/> 発達：発達検査・知能検査等 <input type="checkbox"/> 栄養：摂食 (過食) <input type="checkbox"/> 肥満： <input type="checkbox"/> 性成熟：思春期発達の遅れ (1～2年前後) <input type="checkbox"/> 側弯 <input type="checkbox"/> 睡眠時無呼吸	<input type="checkbox"/> 眼科 <input type="checkbox"/> 耳鼻咽喉科 <input type="checkbox"/> 整形外科 <input type="checkbox"/> 家族支援 <input type="checkbox"/> 学校との連携 <input type="checkbox"/> 道徳相談	
中学生	<input type="checkbox"/> 学校での状況 <input type="checkbox"/> 成長：身長・体重 (BMI)・頭囲 <input type="checkbox"/> 発達： <input type="checkbox"/> 視覚： <input type="checkbox"/> 聴覚： <input type="checkbox"/> 骨格：側弯/背椎X線 <input type="checkbox"/> 栄養：摂食 (過食) <input type="checkbox"/> 肥満： <input type="checkbox"/> 性成熟 <input type="checkbox"/> 睡眠障害 <input type="checkbox"/> 痙攣	<input type="checkbox"/> 眼科 <input type="checkbox"/> 耳鼻咽喉科 <input type="checkbox"/> 家族支援 <input type="checkbox"/> 学校との連携 <input type="checkbox"/> 道徳相談	
高校生	<input type="checkbox"/> 学校での状況 <input type="checkbox"/> 成長：身長・体重 (BMI)・頭囲 <input type="checkbox"/> 発達： <input type="checkbox"/> 視覚： <input type="checkbox"/> 聴覚： <input type="checkbox"/> 栄養：摂食 (過食) <input type="checkbox"/> 性成熟：成人の二次性徴は正常 <input type="checkbox"/> 骨格：側弯/背椎X線 <input type="checkbox"/> 睡眠障害 <input type="checkbox"/> 痙攣	<input type="checkbox"/> 眼科 <input type="checkbox"/> 耳鼻咽喉科 <input type="checkbox"/> 家族支援 <input type="checkbox"/> 学校との連携 <input type="checkbox"/> 職業訓練等	
成人	<input type="checkbox"/> 身長・体重 (BMI)・頭囲 <input type="checkbox"/> 低身長 (軽度～正常)、肥満に留意 <input type="checkbox"/> 視覚： <input type="checkbox"/> 聴覚： <input type="checkbox"/> 骨格：側弯/背椎X線 <input type="checkbox"/> 睡眠障害 <input type="checkbox"/> 痙攣 <input type="checkbox"/> 精神症状の増悪がある時は胃食道逆流を考慮 <input type="checkbox"/> 就労 <input type="checkbox"/> 居住環境	<input type="checkbox"/> 眼科 <input type="checkbox"/> 耳鼻咽喉科 <input type="checkbox"/> 家族支援 <input type="checkbox"/> 社会参加支援 <input type="checkbox"/> 成人医療機関との連携	

※どの年齢においても診療の際に遺伝に関する両親からの相談を受け、必要に応じて遺伝カウンセリングを行う。

本手引きは、疾患における全ての合併症を網羅しているわけではないため、必要に応じて他の評価や検査を加える。一方で、各年齢において、チェックリストの全ての合併症が出現するものではない。

各年齢において、必ずしも全ての検査を実施する必要はなく、主治医の判断において診療を進めることが推奨される。

・小児遺伝学会 <http://plaza.unin.ac.jp/d-genet/>

ブラダーウィリー症候群 年齢別 診療の手引き (0-3 歳)

年齢	評価	処置により評価	注記
新生児期	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 成長：身長・体重・頭囲 <input type="checkbox"/> 発達： <input type="checkbox"/> 聴覚／聴覚検査 <input type="checkbox"/> 栄養：哺乳 <input type="checkbox"/> 血液検査：血糖値、Ca <input type="checkbox"/> 気道 <input type="checkbox"/> 無呼吸 <input type="checkbox"/> 停留精巣・睾丸陰萎 <input type="checkbox"/> 筋緊張低下 <input type="checkbox"/> 染色体検査（第 15 番染色体 PWS 領域 FISH 検査、DNA メチル化テスト） <input type="checkbox"/> 両親の疾患の受け入れ 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 耳鼻咽喉科 <input type="checkbox"/> 摂食・栄養指導 <input type="checkbox"/> 家族支援（ソーシャルワーカー等の紹介） <input type="checkbox"/> 患者会の紹介 	
3 か月	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 成長：身長・体重・頭囲 <input type="checkbox"/> 発達： <input type="checkbox"/> 視覚：斜視 <input type="checkbox"/> 聴覚／聴覚検査 <input type="checkbox"/> 栄養：哺乳 <input type="checkbox"/> 血液検査：血糖値、Ca <input type="checkbox"/> 心臓：心エコー <input type="checkbox"/> 気道 <input type="checkbox"/> 無呼吸 <input type="checkbox"/> 胃食道逆流 <input type="checkbox"/> 股関節脱臼 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 眼科 <input type="checkbox"/> 耳鼻咽喉科 <input type="checkbox"/> 摂食・栄養指導 <input type="checkbox"/> 家族支援（保健師訪問） 	
6 か月	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 成長：身長・体重・頭囲 <input type="checkbox"/> 発達： <input type="checkbox"/> 栄養：哺乳 <input type="checkbox"/> 視覚：斜視 <input type="checkbox"/> 聴覚： <input type="checkbox"/> 気道 <input type="checkbox"/> 無呼吸 <input type="checkbox"/> 筋緊張低下 <input type="checkbox"/> 停留精巣・睾丸陰萎 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 眼科 <input type="checkbox"/> 耳鼻咽喉科 <input type="checkbox"/> 口腔外科 <input type="checkbox"/> 摂食・栄養指導 <input type="checkbox"/> リハビリ科等 家族支援 	
12 か月	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 成長：身長・体重・頭囲 <input type="checkbox"/> 発達： <input type="checkbox"/> 栄養：哺乳、摂食 <input type="checkbox"/> 視覚：斜視 <input type="checkbox"/> 聴覚： <input type="checkbox"/> 気道 <input type="checkbox"/> 無呼吸 <input type="checkbox"/> 側弯 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 摂食・栄養指導 <input type="checkbox"/> 家族支援 	
18 か月	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 成長：身長・体重 (BMI)・頭囲 <input type="checkbox"/> 発達： <input type="checkbox"/> 栄養：哺乳、摂食 <input type="checkbox"/> 気道 <input type="checkbox"/> 側弯 <input type="checkbox"/> 無呼吸 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 摂食・栄養指導 <input type="checkbox"/> 療育等への紹介 <input type="checkbox"/> 家族支援 	
2 歳	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 成長：身長・体重 (BMI)・頭囲 <input type="checkbox"/> 発達： <input type="checkbox"/> 栄養：哺乳、摂食 <input type="checkbox"/> 視覚：斜視 <input type="checkbox"/> 聴覚：中耳炎、聴力 <input type="checkbox"/> 睡眠時無呼吸 <input type="checkbox"/> 停留精巣／手術 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 摂食・栄養指導 <input type="checkbox"/> 耳鼻咽喉科 <input type="checkbox"/> 歯科 <input type="checkbox"/> 療育 <input type="checkbox"/> 家族支援 	
3 歳	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 成長：身長・体重 (BMI)・頭囲 <input type="checkbox"/> 発達： <input type="checkbox"/> 視覚：屈折検査（斜視）、視反応・視力の評価 <input type="checkbox"/> 聴覚／聴力検査 <input type="checkbox"/> 栄養：摂食（過食） <input type="checkbox"/> 肥満 <input type="checkbox"/> 内分泌：成長ホルモン <input type="checkbox"/> 血液検査：T₄ 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 眼科 <input type="checkbox"/> 内分泌科 <input type="checkbox"/> 摂食・栄養指導 <input type="checkbox"/> 家族支援 <input type="checkbox"/> 状況により、幼稚園・保育園等への通園準備 	

※どの年齢においても診療の際に遺伝に関する両親からの相談を受け、必要に応じて遺伝カウンセリングを行う。

本手引きは、疾患における全ての合併症を網羅しているわけではないため、必要に応じて他の評価や検査を加える。一方で、各年齢において、チェックリストの全ての合併症が出現するものではない。

各年齢において、必ずしも全ての検査を実施する必要はなく、主治医の判断において診療を進めることが推奨される。

* 小児遺伝学会 <http://plaza.unin.ac.jp/o-genet/>

ブリーダーウィリー症候群 年齢別 診療の手引き (4-18歳)

年齢	評価	必要により診療	注記
4歳 ↓ 6歳	<input type="checkbox"/> 成長：身長／低身長・体重 (BMI)・頭囲 <input type="checkbox"/> 発達：発達検査、知能検査等 <input type="checkbox"/> 栄養：摂食 (過食) <input type="checkbox"/> 肥満： <input type="checkbox"/> 視覚：斜視 <input type="checkbox"/> 聴覚：中耳炎、聴力 <input type="checkbox"/> 検査 <input type="checkbox"/> 血圧 <input type="checkbox"/> 側弯 <input type="checkbox"/> 不登校症	<input type="checkbox"/> 摂食・栄養指導 <input type="checkbox"/> 眼科 <input type="checkbox"/> 耳鼻咽喉科 <input type="checkbox"/> 矯正歯科 <input type="checkbox"/> 療育 <input type="checkbox"/> 家族支援 <input type="checkbox"/> 就学相談	発達自立の確立を目指す。
7歳 ↓ 9歳	<input type="checkbox"/> 成長：身長／低身長・体重 (BMI)・頭囲 <input type="checkbox"/> 発達：(自己肯定感の形成) <input type="checkbox"/> 栄養：摂食 (過食) <input type="checkbox"/> 肥満： <input type="checkbox"/> 検査 <input type="checkbox"/> 血圧	<input type="checkbox"/> 眼科 <input type="checkbox"/> 耳鼻咽喉科 <input type="checkbox"/> 家族支援 <input type="checkbox"/> 学校との連携	
10歳 ↓ 12歳	<input type="checkbox"/> 学校での状況 <input type="checkbox"/> 成長：身長・体重 (BMI)・頭囲 <input type="checkbox"/> 発達：(自己肯定感の形成) <input type="checkbox"/> 栄養：摂食 (過食) <input type="checkbox"/> 肥満： <input type="checkbox"/> 性成熟：二次性徴、月経の発来 <input type="checkbox"/> 側弯 <input type="checkbox"/> 睡眠時無呼吸 <input type="checkbox"/> 検査 <input type="checkbox"/> 血圧 <input type="checkbox"/> 血液検査：血糖、脂質等 <input type="checkbox"/> 生活習慣病 <input type="checkbox"/> 腸炎	<input type="checkbox"/> 家族支援 <input type="checkbox"/> 学校との連携 <input type="checkbox"/> 進路相談	思春期の心理的評価と対応が重要。児童精神科の介入も考慮。
中学生	<input type="checkbox"/> 学校での状況 <input type="checkbox"/> 成長：身長・体重 (BMI)・頭囲 <input type="checkbox"/> 発達： <input type="checkbox"/> 栄養：摂食 (過食) <input type="checkbox"/> 肥満： <input type="checkbox"/> 性成熟 <input type="checkbox"/> 側弯 <input type="checkbox"/> 睡眠時無呼吸 <input type="checkbox"/> 行動異常 <input type="checkbox"/> 検査 <input type="checkbox"/> 血圧 <input type="checkbox"/> 血液検査：血糖、脂質等 <input type="checkbox"/> 生活習慣病 <input type="checkbox"/> 腸炎	<input type="checkbox"/> 精神科・心理 (必要に応じて) <input type="checkbox"/> 家族支援 <input type="checkbox"/> 学校との連携 <input type="checkbox"/> 進路相談	思春期の心理的評価と対応が重要。児童精神科の介入も考慮。
高校生	<input type="checkbox"/> 学校での状況 <input type="checkbox"/> 成長：身長・体重 (BMI)・頭囲 <input type="checkbox"/> 発達： <input type="checkbox"/> 栄養：摂食 (過食) <input type="checkbox"/> 肥満： <input type="checkbox"/> 性成熟 <input type="checkbox"/> 側弯 <input type="checkbox"/> 睡眠時無呼吸 <input type="checkbox"/> 行動異常 <input type="checkbox"/> 検査 <input type="checkbox"/> 血圧 <input type="checkbox"/> 血液検査：血糖、脂質等 <input type="checkbox"/> 生活習慣病 <input type="checkbox"/> 腸炎	<input type="checkbox"/> 精神科・心理 (必要に応じて) <input type="checkbox"/> 家族支援 <input type="checkbox"/> 学校との連携 <input type="checkbox"/> 職業訓練等	
成人	<input type="checkbox"/> 身長・体重 (BMI)・頭囲 <input type="checkbox"/> 生涯にわたる栄養管理 <input type="checkbox"/> 心不全 (病的肥満がある場合) <input type="checkbox"/> 睡眠時無呼吸 <input type="checkbox"/> 行動異常 <input type="checkbox"/> 検査 <input type="checkbox"/> 血圧 <input type="checkbox"/> 血液検査：血糖、脂質等 <input type="checkbox"/> 生活習慣病 <input type="checkbox"/> 腸炎 <input type="checkbox"/> 就労 <input type="checkbox"/> 居住環境 <input type="checkbox"/> 成長ホルモン療法中止によるリバウンド <input type="checkbox"/> 性ホルモン補充療法 <input type="checkbox"/> 側弯 <input type="checkbox"/> 骨粗鬆症	<input type="checkbox"/> 精神科 (抑うつや強い衝動性が出現した際) <input type="checkbox"/> 家族支援 <input type="checkbox"/> 社会参加支援 <input type="checkbox"/> 就労施設との連携 <input type="checkbox"/> 成人居療環境との連携	

※どの年齢においても診療の際に遺伝に関する両親からの相談を受け、必要に応じて遺伝カウンセリングを行う。

本手引きは、疾患における全ての合併症を網羅しているわけではないため、必要に応じて他の評価や検査を加える。一方で、各年齢において、チェックリストの全ての合併症が出現するものではない。

各年齢において、必ずしも全ての検査を実施する必要はなく、主治医の判断において診療を進めることが推奨される。

*小児遺伝学会 <http://plaza.unin.ac.jp/g-genet/>

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を明らかにすることを目的とした。解析の結果、165 症例の発症原因別の頻度が明らかとなった。ART 出生児の頻度を発症原因別に集計したが、有意差を認めなかった。また、既知の発症原因の遺伝子解析については、有償化を実施し、問題なく解析が進んでいる。一方、*H19*DMR 高メチル化の一因として、*H19*DMR 内の A2 リピートに存在する OCT 結合サイトの変異を見出し、その分子機構の一端が明らかになった。BWS に合併することが多い肝芽腫についてゲノム刷り込みに関連する 33 ヲ所の DMR のメチル化を包括的に解析し、そのエピゲノム・ゲノム異常の特徴を見出した。

A. 研究目的

過成長、巨舌、臍帯（臍）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）、*H19*DMR 高メチル化（*H19*DMR-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を明らかにすることを目的とした。また、BWSに合併することが多い胎児性腫瘍として知られる肝芽腫とインプリンティング異常との関連性を明らかにするため、33カ所のインプリントDMRのメチル化状態を解析した。

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）、DeBaunetら（*J Pediatr*, 1998）、Elliotら（*Clin Genet*, 1994）の診断基準のうちいずれかに合致する165症例について既知のゲノム・エピゲノム解析を施行した（2014年3月10日現在）。解析には、主に末梢血由来のゲノムDNAを用いた。*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、*H19*DMR-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を消化しサザンブロ

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。*H19*DMR-GOM症例については、*H19*DMR自身の塩基配列をシークエンス法にて解析した。また、*CDKN1C*の変異についても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。肝芽腫の解析については、弧発例11例とBWS合併例1例の腫瘍組織、隣接肝組織からゲノムDNAを抽出し、33カ所のインプリントDMRのメチル化状態をMALDI-TOF-MSおよびbisulfite-pyrosequencing法で解析した。正常コントロールとして、3例の肝臓組織（他疾患で死亡した小児肝2例、先天性胆道閉鎖症の小児肝1例）を用いた。また、STRマーカーを用いて、コピー数異常、UPDの有無について解析した。

C. 研究結果

1. 発症原因別頻度

発症原因別の頻度を表1に示す。既知の異常なし症例が47例（28%）を占めたことから、未同定の原因の存在が示唆された。*KvDMR1*-LOMでART出生児7例を認めたが、発症原因別のARTの頻度については有意差を認めなかった（2x6表 χ^2 乗検定）。

表1 発症原因別頻度 (n = 165)

発症原因	症例数	頻度	生殖補助医療
KvDMR1-LOM	50	30%	7 (顕微授精1、体外受精2、人工授精2、排卵誘発2)
H19DMR-GOM	12	7%	1 (排卵誘発)
patUPD モザイク	37	23%	1 (人工授精)
CDKN1C 変異	12	7%	0
Trisomy 11	7	4%	0
既知の異常なし	47	29%	3 (排卵誘発)

2. 発症原因 (5種類) の解析費用の有償化

発症原因 (5種類) の解析費用の実費相当分 (5万円) を患者負担あるいは医療機関負担とした。これ以外の詳細な解析 (H19DMR の変異解析や 11p15 以外のインプリント DMR のメチル化解析など) については、無償とした。有償化に当たっては、佐賀大学医学部倫理委員会での審議・承認を経て、佐賀大学内の規則を改定し、患者負担用と医療機関負担用の2種類の書式を準備した。解析依頼の際に、患者負担か医療機関負担のどちらかを選択して、該当する書式で申し込む形式を取った。有償化以降 35 例の解析を行った。

3. H19DMR-GOM の原因の検討

H19DMR-GOM の一因として本領域の微小欠失・点変異が報告されているが、本邦例の解析報告はない。そこで、H19DMR にメチル化異常を認めた本邦の BWS 12 例と Silver-Russell 症候群 (SRS; SRS では 40-60% の患者で H19DMR-LOM を示す; 計 13 例) について、H19DMR の変異解析を行った。SRS では、全ての症例で異常を認めなかったが、1 例の BWS において、H19DMR 内に存在する A2 リピートの OCT 結合サイトに de novo の一塩基変異を認めた (GRCh37/hg19, chr11:2,023,018C>T)。この変異は母性アレルに生じており、EMSA 解析により OCT4 の結合を阻害することが明らかとなった。

4. 肝芽腫におけるインプリント DMR のメチル化解析

BWS は、Wilms 腫瘍や肝芽腫などの胎児性腫瘍を併発するリスクが高く、これらの腫瘍では 11p15 のインプリント異常が関連することが知られている。そこで、肝芽腫 12 例 (弧発例 11 例と BWS 合併例 1 例) について、ゲノム中の 33 カ所のインプリント DMR のメチル化状態を解析した (図 1)。正常コントロール肝臓、腫瘍隣接肝臓、腫瘍組織をそれぞれ比較したところ、18 カ所のインプリント DMR のメチル化が少なくとも 1 例以上の腫瘍で異常になっており、メチル化異常頻度はインプリント DMR 間で大きく異なっていた。KvDMR1 と IGF2-DMR0 がもっと

も高頻度に低メチル化を示し、INPP5Fv2-DMR と RBI-DMR が高頻度に高メチル化を示した。特定のインプリント DMR が腫瘍組織だけでなく隣接肝臓で低メチル化が生じていること、高メチル化は腫瘍組織特異的に生じていることが判明した。また、LINE-1 のメチル化を調べたところ、3 つの検体間で大きな差はないことから、ゲノム全体のメチル化に変化はないことが示唆された。11p15.5 と 20q13.3 では片親性ダイソミーやコピー数異常が見られた。

D. 考察

発症原因 (5種類) の頻度については、表 1 の通りであるが、ここでは解析費用の有償化について若干の考察を加える。これまでの解析の経験から、BWS をはじめとするインプリンティング疾患の遺伝子解析のニーズが存在することは確実である。一方で、解析費用の全額を研究費で充当した場合は、研究期間が終了すれば遺伝子解析を継続することはできない。そこで、基本的な既知の発症原因 (5種類) の解析に限って、実費相当分を有償化した。このことにより、患者および医療現場には、遺伝子異常により予測されるリスク等を還元することができ、且つより詳細な研究に研究費を充当できるようになると考えられる。これまでに特に問題なく、遺伝子解析を進めることができています。

H19DMR は、非メチル化母性アレルに CTCF 蛋白が結合することによって、メチル化感受性インシュレーターとして機能し、IGF2/H19 ドメインの刷り込み遺伝子の発現を制御している。この領域のメチル化異常は、IGF2 と H19 の発現異常を引き起こし、表現型が相反する 2 つの成長障害疾患 BWS と SRS の原因となる。これまでに、OCT 結合サイトに点変異・微小欠失を認めた数例の BWS 症例が欧米より報告されている。マウスでは、OCT に隣接する SOX 配列も含んだ SOX-OCT モチーフが母性アレルの非メチル化の維持に重要であることが *in vitro* でも、*in vivo* でも報告されている。さらに、ヒトで認められた変異部位は全て A2 リピート内の OCT 結合サイトに存在し、このサイトはマウスに 1 カ所しかないマウス OCT 結合サイトに相当する。従って、ヒトにおいて A2 リピート内に存在する OCT 結合サイトに変異が生じると、OCT が結合できずその結果高メチル化となり、CTCF が遊離し IGF2 と H19 の発現異常を誘導することが示唆された。H19DMR-GOM の一因を明らかにすることができた。

肝芽腫の解析から、肝芽腫ではゲノム全体のメチル化が比較的保たれているが、一部の DMR のメチル化は腫瘍化に先立って起こる可能性が示唆された。高頻度にエピゲノム・ゲノム異常を示す DMR の存在は、刷り込み遺伝子の発現異常が肝芽腫発生に関連することを示唆している。特に、11p15 領域は 12 例中 10 例にエピゲノム・ゲノム異常が見られたことから、腫瘍発生に重要な役割を果たしていることが示唆された。

E. 結論

3つの診断基準のいずれかに合致する165症例のBWSについて既知の発症原因別頻度を明らかにした。ARTと発症原因の間に相関関係は認められなかった。また、既知の発症原因の遺伝子解析については、有償化を実施し、問題なく解析が進んでいる。

*H19*DMRメチル化異常の一因として、A2リピート内に存在するOCT結合サイトの変異を見出し、その分子機構の一端が明らかになった。肝芽腫についてゲノム刷り込みに関連するDMRのメチル化を包括的に解析し、そのエピゲノム・ゲノム異常の特徴を見出した。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

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

Misago N, Joh K, Soejima H, Narisawa Y. Multiple mucocutaneous (palisaded encapsulated) neuromas may be a distinct entity. *JAMA Dermatol*, 149(4):498-500, 2013

Soejima H, Higashimoto K. Epigenetic and genetic alterations of the imprinting disorder Beckwith-Wiedemann syndrome and related disorders. *J Hum Genet*, 58(7): 402-409, 2013

Fukuda K, Ichiyangi K, Yamada Y, Go Y, Udono T, Wada S, Maeda T, Soejima H, Saitou N, Ito T, Sasaki H. Regional DNA methylation differences between humans and chimpanzees are associated with genetic changes, transcriptional divergence and disease genes. *J Hum Genet*, 58(7):446-454, 2013

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*, 21(11):1316-1319, 2013 († equal contribution)

Miyazaki H[†], Higashimoto K[†], Yada Y[†], A. Endo T[‡], Sharif J[‡], Komori T, Matsuda M, Koseki Y, Nakayama M, Soejima H, Handa H, Koseki H,

Hirose S, Nishioka K. Ash11 methylates Lys36 of histone H3 independently of transcriptional elongation to counteract Polycomb silencing. *PLoS Genet*, 9(11):e1003897, 2013 († ‡ equal contribution)

Rumbajan JM, Maeda T, Souzaki R, Mitsui K, Higashimoto K, Nakabayashi K, Yatsuki H, Nishioka K, Harada R, Aoki S, Kohashi K, Oda Y, Hata K, Saji T, Taguchi T, Tajiri T, Soejima H, Joh K. Comprehensive analyses of imprinted differentially methylated regions reveal epigenetic and genetic characteristics in hepatoblastoma. *BMC Cancer*, 13:608, 2013

Higashimoto K, Jozaki K, Kosho T, Matsu bara K, Fuke T, Yamada D, Yatsuki H, Maeda T, Ohtsuka Y, Nishioka K, Joh K, Koseki H, Ogata T, Soejima H. A novel de novo point mutation of the OCT-binding site in the *IGF2/H19*-imprinting control region in a Beckwith-Wiedemann syndrome patient. *Clin Genet*, published online: 4 December 2013

Ohnishi K, Semi K, Yamamoto T, Shimizu M, Tanaka A, Mitsunaga K, Okita K, Osafune K, Arioka Y, Maeda T, Soejima H, Moriwaki H, Yamanaka S, Woltjen K, Yamada Y. Premature termination of reprogramming *in vivo* leads to cancer development through altered epigenetic regulation. *Cell*, 156(4), 663-677, 2014

Court F, Tayama C, Romanelli V, Martin-Trujillo A, Iglesias-Platas I, Okamura K, Sugahara N, Simón C, Moore H, Harness JV, Keirstead H, Sanchez-Mut JV, Kaneki E, Lapunzina P, Soejima H, Wake N, Esteller M, Ogata T, Hata K, Nakabayashi K, Monk D. Genome-wide parent-of-origin DNA methylation analysis reveals the intricacies of the human imprintome and suggests a germline methylation independent establishment of imprinting. *Genome Res*. Published in Advance January 8, 2014

東元健、副島英伸. Beckwith-Wiedemann 症候群と小児腫瘍. 遺伝子医学 MOOK25 第2章 エピジェネティクスと病気 4. 不妊・先天異常 監修: 佐々木裕之、編集: 中尾光善、中島欽一、メディカルドゥ、大阪、pp195-201, 2013
前田寿幸、東元健、副島英伸. Beckwith-Wiedemann 症候群と Silver-Russell 症候群. 小児科臨床 66(増刊号):1308-1314, 2013
副島英伸. Beckwith-Wiedemann 症候群, Sotos 症候群. 周産期医学 43(3):377-382, 2013

2. 学会発表

招待講演

副島英伸. インプリンティング疾患 Beckwith-Wiedemann 症候群と類縁疾患におけるエピゲノム・ゲノム異常. 第5回金沢大学学際科学実験センターシンポジウム「深遠なる疾患エピジェネティクス」2013.7.5. 金沢大学
副島英伸. ゲノム・インプリンティングとヒト疾患-間葉性異形成胎盤の分子遺伝学的解析

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点セミナー 2013.9.20. 群馬大学

一般発表

長嶋一昭、田中大祐、東元 健、八木ひとみ、杉崎 和、田原 裕美子、小倉かさね、佐藤広規、佐藤雄一、山野 言、副島英伸、稲垣暢也。新生児期低血糖合併 Beckwith-Wiedemann 症候群患者における病態形成機序の検討。第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 2013.5.16-18. 熊本

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。H19DMR メチル化異常で発症するインプリント疾患における H19DMR の変異解析。第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会 2013.5.30-31. 奈良(抄録集 p60, ポスターP-36)

前田寿幸、東元健、中林一彦、城崎幸介、八木ひとみ、緒方勤、秦健一郎、副島英伸。Beckwith-Wiedemann 症候群におけるインプリント DMR のマルチローカスメチル化解析。第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会 2013.5.30-31. 奈良(抄録集 p61, ポスターP-38)

大塚泰史、佐々木健作、城崎幸介、東元健、岡本信彦、高間勇一、窪田昭男、松本富美、中山雅弘、吉浦孝一郎、副島英伸。シスチン尿症を伴うゲノムワイド父性片親性ダイソミー症例の遺伝子解析。第 48 回日本小児腎臓病学会 2013.6.28-29. 徳島(抄録集 p110, 口演 O-05, 優秀演題奨励賞受賞)

Takamatsu Y, Maeda T, Matsuo M, Higashimoto K, Kawashima M, Matsushima T, Soejima H. Practical use of pyrosequencing analysis to detect Moyamoya disease susceptible gene RNF213 variant c.14576G>A. 3rd International Moyamoya Meeting. 2013.7.12-13. Sapporo (Workshop IV, invited oral speaker)

副島英伸、東元健、八木ひとみ、青木早織、鮫島梓、齋藤滋、夫律子、中山雅弘、坂口勲、大場隆、片渕秀隆。11p15 インプリントドメインのメチル化異常を認めた間葉性異形成胎盤の 1 例。第 20 回遺伝性疾患に関する出生前診断研究会 2013.9.28. 鹿児島(一般演題 3, 抄録集 p10)

副島英伸、東元健、城崎幸介、八木ひとみ、大塚泰史、前田寿幸、青木早織、岡島翠、坂口勲、大場隆、片渕秀隆。間葉性異形成胎盤における 11p15 インプリント領域の分子遺伝学的解析。第 21 回日本胎盤学会学術集会 2013.10.25-26. 名古屋市(一般演題 2-1, プログラム・抄録集 p55)

青木早織、大場隆、岡島翠、坂口 勲、東元健、副島英伸、福永真治、片渕秀隆。本邦における間葉性異形成胎盤の臨床像。第 21 回日本胎盤学会学術集会 2013.10.25-26. 名古屋市(一般演題 2-2, プログラム・抄録集 p55)

鮫島梓、米田徳子、森尻昌人、米澤理可、米田哲、塩崎有宏、夫律子、中山雅弘、副島英伸、齋藤滋。母体血中 sFlt-1 が異常高値を示した

Placental Mesenchymal Dysplasia の一例。第 21 回日本胎盤学会学術集会 2013.10.25-26. 名古屋市(一般演題 2-3, プログラム・抄録集 p56)

秋山辰穂、勝村啓史、埴原恒彦、太田博樹、中込滋樹、藤本一真、副島英伸、城圭一郎、木村亮介、石田肇、安河内朗、樋口重和。時計遺伝子 PERIOD2 の多型と光刺激応答の生理的多様性の関係及びその人類学的考察。第 67 回日本人類学会大会 203.11.1-4. 筑波 (Y-1 抄録集 p43)

小金淵佳江、中込滋樹、間野修平、石崎直也、河村正二、木村亮介、石田肇、城圭一郎、副島英伸、藤本一真、佐藤公俊、湯澤泉、安井美江、隈部俊宏、藤井清孝、秋山辰穂、埴原恒彦、太田博樹。モヤモヤ病原因遺伝子 RNF213 の琉球諸島・北部九州ヒト集団における遺伝的多型。第 67 回日本人類学会大会 203.11.1-4. 筑波 (A-28 抄録集 p57)

副島英伸。Beckwith-Wiedemann 症候群と関連疾患におけるゲノム・エピゲノム異常。日本人類遺伝学会第 58 回大会「シンポジウム 8 先天異常とゲノム・エピゲノム」203.11.20-23. 仙台 (S8-3 プログラム・抄録集 p108)

中林一彦、Trujillo Alex Martin、田山千春、兼城英輔、和氣徳夫、副島英伸、緒方勤、Monk David、秦健一郎。ゲノムワイド 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 58 回大会 203.11.20-23. 仙台 (O27 プログラム・抄録集 p126)

大塚泰史、佐々木健作、城崎幸介、東元健、岡本信彦、高間勇一、窪田昭男、松本富美、中山雅弘、吉浦孝一郎、副島英伸。シスチン尿症を伴うゲノムワイド父性片親性ダイソミー症例の遺伝子解析。日本人類遺伝学会第 58 回大会 203.11.20-23. 仙台 (O32 プログラム・抄録集 p127)

副島英伸、東元健、城崎幸介、八木ひとみ、大塚泰史、前田寿幸、青木早織、岡島翠、坂口勲、大場隆、片渕秀隆。間葉性異形成胎盤における 11p15 刷り込み領域の分子遺伝学的解析。日本人類遺伝学会第 58 回大会 203.11.20-23. 仙台 (O70 プログラム・抄録集 p137)

佐々木かりん、右田王介、中林一彦、東元健、前田寿幸、橋本和法、松井英雄、副島英伸、高田史男、秦健一郎。胎児発育異常症例の網羅的ゲノム・エピゲノム解析。日本人類遺伝学会第 58 回大会 203.11.20-23. 仙台 (O111 プログラム・抄録集 p147)

宮崎仁美、東元 健、矢田有加里、遠藤高帆、Sharif Jafar、小森敏治、松田正史、古関庸子、中山学、副島英伸、半田宏、古関明彦、広瀬進、西岡憲一。Ash11 methylates Lys36 of histone H3 independently of transcriptional elongation to counteract Polycomb silencing. 第 36 回日本分子生物学会年会 2013.12.3-6. 神戸 (1P-0177)

平成 25 年度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

マルファン症候群類縁疾患の患者レジストリー

研究分担者 森崎裕子

国立循環器病研究センター研究所 分子生物学部室長

研究要旨

マルファン症候群は、*FBNI* 遺伝子の変異により結合組織の主要成分のひとつであるフィブリリンの質的あるいは量的異常をきたし、クモ状指・側弯・胸郭異常・扁平足などの骨格症状、水晶体偏位・近視・乱視などの眼症状、大動脈瘤/解離・僧帽弁異常などの心血管症状など全身性に多彩な表現型を呈する遺伝性疾患である。また2004年、従来マルファン症候群2型と呼ばれていた一群の疾患群が、*TGF- β* 受容体遺伝子の機能異常により発症することが示され、2005年新たにロイス・ディーツ症候群と命名された。さらに、近年、その他の*TGF- β* シグナル伝達系の遺伝子の機能異常により骨格系・心血管系にマルファン症候群類似の所見を呈するものがあることが明らかにされている。

当研究室は、2002年より診断を目的としてマルファン症候群の遺伝子解析を施行しているが、今年度より、「先天性異常の疾患群の診療指針と治療法開発をめざした情報・検体共有のフレームワークの確立」研究の一環として、マルファン症候群類縁疾患の患者レジストリーを作ることを目指し、国内関連医療機関より依頼された患者の遺伝子診断を行うとともに、国立循環器病研究センター受診患者については、同院結合織病外来にて患者の診断及び治療・管理をおこなっている。2013年12月末の時点において、当研究室で遺伝子解析により遺伝子変異が同定されているのは、*FBNI* 遺伝子変異385例、*TGFBR1* 遺伝子変異34例、*TGFBR2* 遺伝子変異33例、*SMAD3* 遺伝子変異16例、*TGFBR2* 遺伝子変異2例、その他の遺伝子の変異11例、計481例であり、うち今年度は新たに74例について遺伝子変異を同定している。

また、2010年7月に創設された当院結合織病外来では、遺伝子診断により確定したマルファン症候群 (*FBNI* 遺伝子変異) 150名、ロイス・ディーツ症候群 (*TGFBR1*, *TGFBR2*, *SMAD3*, *TGFBR2* 遺伝子変異) 42名をはじめとして、関連疾患の疑われる患者485名について、定期検査・投薬治療・歯周病チェック・遺伝カウンセリング等の遺伝診療を進めているが、今年度は、マルファン症候群類縁疾患を疑われて受診した新規患者104名のうち41名が遺伝学的にマルファン症候群あるいはロイス・ディーツ症候群と確定診断され、うち38例については遺伝子変異も確定した。さらに、遺伝子検査により診断確定した当該疾患患者については、手術時の血管組織検体の保存、および将来に向けて患者由来線維芽細胞を作成し凍結保存を行った。

その他、「先天性異常の疾患群の診療指針と治療法開発をめざした情報・検体共有のフレームワークの確立」研究の一環として、「マルファン症候群」「ロイス・ディーツ症候群」の小児期における疾患特異的成長手帳を作成した。

A. 研究目的

マルファン症候群は、*FBNI* 遺伝子の変異により結合組織の主要成分のひとつであるフィブリリンの質的あるいは量的異常をきたし、クモ状指・側弯・胸郭異常・扁平足などの骨格症状、水晶体偏位・近視・乱視などの眼症状、大動脈瘤/解離・僧帽弁異常などの心血管症状など全身性に多彩な表現型を呈する遺伝性疾患である。また2004年、従来マルファン症候群2型と呼ばれていた一群の疾患群が、*TGF- β* 受容体遺伝子の機能異常により発症することが示され、翌年新たにロイス・ディーツ症候群と命名され、さらに、近年、その他の*TGF- β* シグナル伝達系の機能異常により骨格系・心血管系にマルファン症候群類似の所見を呈するものがあることが明らかにされてきた。こうした流れの中で、マルファン症候群の診断基準も2010年に改訂されている。その中で、診断においても、遺伝子診断に重きをおかれ、新たな診断基準では、大動脈基部拡大と*FBNI* 遺伝子の病的変異の2者のみでマルファン症候群と診断されることとなった。

国立循環器病研究センターでは、1998年より、研究を目的として、2002年からは診断を目的として、診療の中で遺伝子解析を活用し、患者や家族の診断に役立ててきたが、今回、班研究において、マルファン症候群類縁疾患の患者レジストリーを作ることとなり、今年度は、さらに遺伝子解析を進め、遺伝子診断により診断の確定した患者の収集を行うとともに、将来に向けて、組織検体および患者由来線維芽細胞のストックを行った。また、「先天性異常の疾患群の診療指針と治療法開発をめざした情報・検体共有のフレームワークの確立」研究の一環として「マルファン症候群」「ロイス・ディーツ症候群」の小児期における疾患特異的成長手帳を作成する。

B. 研究方法

1) 遺伝子解析：当院結合織病外来を受診した患者、および他院より解析を依頼された患者について、遺伝子解析の同意を得た上で血液を採取し、末梢血リンパ球より抽出したゲノムDNAを用い

て遺伝子解析を行った。また、手術例については、組織を用いた解析も併用した。解析は、末梢血リンパ球より抽出したゲノム DNA を用い、*FBNI*、*TGFBR1*、*TGFBR2* の各遺伝子については全翻訳領域のエクソン領域、*FBNI* 遺伝子については第 22-36 エクソン領域について PCR 法で増幅したのち直接シークエンス法にて塩基配列を決定し遺伝子変異の解析を行った。さらに、当院にて手術を施行された患者については、術中摘出組織より抽出した RNA およびこれより作成した初代血管組織培養細胞から抽出した RNA を用いた RT-PCR 解析も併用した。また、診断のために皮膚生検を行った患者についても、同様に RT-PCR 解析を行った。上記の方法にて遺伝子変異が同定されなかった症例については、臨床症状に応じて、*COL3A1*、*ACTA2*、*TGFB2*、*SMAD3*、*SKI* 各遺伝子について解析を行った。また、一部の症例についてはエクソーム解析も併用した。

(倫理面への配慮)

本研究における患者検体を用いた遺伝子解析については、既に国立循環器病センター倫理委員会の承認を得ており、施設および国などの指針を遵守し、書面によりインフォームドコンセントを受けて研究を実施するなど、倫理面への配慮を十分に行った。他院から遺伝子解析のみ依頼された患者については、依頼先の医療機関における倫理委員会の承認を得てから解析に臨み、また、臨床情報については、共通の患者情報シートにより情報収集をおこなった。なお、遺伝子解析はすべて連結可能匿名化の上で行われた。

2) 遺伝診療：当院結合織病外来では、マルファン症候群類縁の結合織異常が疑われた患者について、臨床的所見、家族歴、遺伝子検査を含めた総合的な診断システムのもとに確定診断を行い、定期検査・投薬治療・遺伝カウンセリングを含めた全身管理を行っている。診断においては、成人は身体所見・家族歴および遺伝子診断を基本とし、小児は、家族歴と身体所見による診断を基本とし、必要に応じて遺伝子検査を併用しながら、改訂ゲント基準にもとづき確定診断を行った。

3) 患者組織由来細胞の収集

国立循環器病研究センター病院血管外科にて、マルファン症候群および類縁のロイス・ディーツ症候群の診断で大動脈人工血管置換手術を施行された患者のうち、今年度は新たに31症例について、術中摘出組織を中膜および外膜に鈍的に分離し、それぞれ、DMEM (10%FBS加)、5%CO₂、37℃の条件下で組織培養を行い、そこから単離された初代血管組織培養細胞(平滑筋細胞、血管線維芽細胞)について、P1~P2の継代条件のものをTCプロテクターに懸濁して凍結し、-133℃の条件下で凍結保存を行った。

4) 疾患特異的成長手帳の作成

プライマリケア医師・患者家族に対して、年齢に応じた疾患の手引きを提供する目的で「疾患特異的成長手帳」を作成する。具体的には、「Preventive Health Care for Children with Genetic Conditions」を参照し、本邦の実情に合わせて、各年齢ごとのチェックポイントをまとめる。

C. 研究結果

1) 遺伝子解析

2013年3月より2013年12月に当院結合織病外来を受診し新たに遺伝子解析の同意を得た患者41例、および他院より解析を依頼された新規患者43例、計84例における解析では、*FBNI* 遺伝子変異を52例、*TGFBR1* 遺伝子変異を8例、*TGFBR2* 遺伝子変異を3例、*SMAD3* 遺伝子変異を2例で同定しており、計65例(77%)で、原因遺伝子が同定され、マルファン症候群あるいはロイス・ディーツ症候群と確定診断された。また、マルファン症候群あるいはロイス・ディーツ症候群として診断依頼された患者のうち2例において、昨年度新規に類縁の Shprinzen-Goldberg 症候群の原因遺伝子として報告された *SKI* 遺伝子に病原性の明らかなミスセンス変異が同定された。これらの2例は、ともに臨床的にも Shprinzen-Goldberg 症候群の所見に合致しており、遺伝子診断がより適切であることが示された。

その他、上行大動脈拡張に関節過可動性を合併し、マルファン症候群あるいはエーラスダンロス症候群として紹介された患者7例において、エクソーム解析により *FLNA* 遺伝子変異が同定された。*FLNA* 遺伝子は異所性灰白質の原因遺伝子として知られており、一部の症例で、上行大動脈拡張、エーラスダンロス症候群様の皮膚関節所見を認めることが知られており、脳 MRI 検査の結果7例のうち5例において異所性灰白質が確認された。一部の *FLNA* 遺伝子異常に上行大動脈瘤や心臓弁異常の合併を認めることは知られていたが、今回の解析では全例で心臓血管系の異常を認めており、異所性灰白質を認めた場合は、心血管系の精査が必要であると考えられた。

2) 遺伝診療

国立循環器病研究センター結合織病外来に登録されている患者のうち、改訂ゲント基準によりマルファン症候群と診断された患者は166名で、うち159名は遺伝子診断により *FBNI* 遺伝子変異を同定されており、7例については、*FBNI* 遺伝子変異陽性の家族歴をもとに診断されている。その他、2名については、水晶体偏位のみで心血管系・骨格系には陽性所見を認めず、Ectopia Lentis 症候群としてフォローされている。

一方、マルファン症候群では、当院受診例では、8例を除く182例(96%)で有意な大動脈基部拡張を認めたが、他院からの紹介例では、大動脈基部拡張を認めないとされた症例が、成人例(16才以上)71例中11例(15%)あった。この傾向は特に小児においてさらに顕著であり、当院結合織病外来受診例では、31例中28例(90%)で有意な大動

脈基部拡張を認めているのに対し、他院からの紹介例では、拡張を認めたのは60例中40例(67%)に過ぎない。これは、当院が循環器病専門病院であり、受診患者の傾向にある程度の偏りがあることは否定できないが、紹介患者を例にとっても、大動脈基部拡張の評価が十分になされていない例も少なからずあることは経験しており、循環器科専門医による評価の必要性が痛感された。

一方、*SMAD3* 遺伝子、*TGF β 2* 遺伝子変異を含む広義のロイス・ディーツ症候群と診断された患者は40名で、全例で大動脈瘤/解離を認めるが、マルファン症候群と異なり、骨格系所見は顕著でない例、大動脈基部ではなく上行～弓部大動脈に拡張を認める例など、臨床所見は多岐にわたり、診断には遺伝子検査がより有効であった。

また、当院結合織病外来受診のマルファン症候群小児(16才以下)37例と、ロイス・ディーツ症候群小児27例において、大動脈拡張傾向を比較したところ、小児における大動脈基部径のZ値(体表面積より算出した平均値からのずれ)は、マルファン症候群で4.1、ロイス・ディーツ症候群は8.8であり、ロイス・ディーツ症候群は小児期よりより強い拡張傾向を認めることが示された。

3) 患者組織由来細胞の収集

今年度は新たに31症例について細胞を保存した。

4) 疾患特異的成長手帳の作成

「マルファン症候群(表1、2)」「ロイス・ディーツ症候群(表3、4)」の小児期における疾患特異的成長手帳を作成した。

D. 考察

マルファン症候群は、*FBNI* 遺伝子の変異により結合組織の主要成分のひとつであるフィブリリンの質的あるいは量的異常をきたし、クモ状指・側弯・胸郭異常・扁平足などの骨格症状、水晶体偏位・近視・乱視などの眼症状、大動脈瘤/解離・僧帽弁異常などの心血管症状など全身性に多様な表現型を呈する遺伝性疾患である。また2004年、従来マルファン症候群2型と呼ばれていた一群の疾患群が、*TGF- β* 受容体遺伝子の機能異常により発症することが示され、2005年新たにロイス・ディーツ症候群と命名された。さらに、近年、その他の*TGF- β* シグナル伝達系の機能異常により骨格系・心血管系にマルファン症候群類似の所見を呈するものがあることが明らかにされ、広義のロイス・ディーツ症候群とする動きもでてきた。こうした流れの中で、マルファン症候群の診断基準も2010年に改訂されている。その中で、診断においても、遺伝子診断に重きをおかれ、新たな診断基準では、大動脈基部拡大と*FBNI* 遺伝子の病的変異の2者のみでマルファン症候群と診断されることとなった。

一方、マルファン症候群の原因遺伝子である*FBNI* 遺伝子は、遺伝子全長230kb、coding領域だけでも8.6kb、65エクソンからなる巨大遺伝子であり、遺伝子解析自体容易でないことから、従来、本邦においては、当センターや一部の研究組織以

外では診断を目的とした遺伝子解析は積極的にはなされてこなかった、という事情がある。国立循環器病研究センターでは、1998年より、研究を目的として、2002年からは診断を目的として、診療の中で遺伝子解析を活用し、患者や家族の診断に役立ててきた。2013年12月末の時点においては、関連するロイス・ディーツ症候群などのマルファン症候群類縁疾患の患者481名において遺伝子変異を同定している。病的*FBNI* 遺伝子変異を有するものは、ほぼ全例で大動脈病変を呈しているが、臨床所見から、3例は、水晶体偏位のみで骨格系症状や心血管系病変に乏しい*Ectopia Lentis* 症候群、1例は、異なる骨格症状を呈する*Geleophysic Dysplasia* と診断された。

2010年に開設された国立循環器病研究センター結合織病外来に新規登録されている患者のうち、改訂ゲント基準によりマルファン症候群と診断された患者は166名で、うち159名は遺伝子診断により*FBNI* 遺伝子変異を同定されており、7例については、*FBNI* 遺伝子変異陽性の家族歴を考慮したうえで新基準に基づいて診断されている。マルファン症候群では、当院受診例では、ほとんどの症例で有意な大動脈基部拡張を認めたが、他院からの紹介例では、認めないとされた症例も多かった。また、この傾向は特に小児においてさらに顕著であった。これは、当院が循環器病専門病院であり、受診患者の傾向にある程度の偏りがあることは否定できないが、紹介患者を例にとっても、大動脈基部拡張の評価が十分になされていない例も少なからずあることは経験しており、循環器科専門医による評価の必要性が痛感された。一方、*SMAD3* 遺伝子、*TGF β 2* 遺伝子変異を含む広義のロイス・ディーツ症候群と診断された患者は40名で、全例で大動脈瘤/解離を認めるが、マルファン症候群と異なり、骨格系所見は顕著でない例、大動脈基部ではなく上行～弓部大動脈に拡張を認める例など、臨床所見は多岐にわたった。以上より、遺伝子診断の併用は、より正確な診断に有効であると考えられた。

また、小児例において、大動脈拡張傾向をマルファン症候群とロイス・ディーツ症候群で比較したところ、ロイス・ディーツ症候群は小児期よりより強い拡張傾向を認めることが示され、ロイス・ディーツ症候群では、小児期より積極的な医療介入の必要性があることが示された。

E. 結論

マルファン症候群類縁疾患の患者レジストリーの作成を目的として、今年度も昨年度に引き続き、日本全国から依頼された検体を含めて遺伝子解析を進め、遺伝子診断により診断の確定した患者の収集を行うとともに、結合織病外来にてより詳細な患者情報を収集し、さらに将来に向けて、組織検体および患者由来線維芽細胞のストックを行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

Komiyama M, Ishiguro T, Yamada O, Morisaki H, Morisaki T: Hereditary hemorrhagic telangiectasia in Japanese patients. *J Hum Genet* (in press)

Kono AK, Higashi M, Morisaki H, Morisaki T, Naito H, Sugimura K: Prevalence of dural ectasia in loeys-dietz syndrome: comparison with marfan syndrome and normal controls. *PLoS One* 8:e75264, 2013.

Hayashi S, Utani A, Iwanaga A, Yagi Y, Morisaki H, Morisaki T, Hamasaki Y, Hatamochi A: Co-existence of mutations in the FBN1 gene and the ABCC6 gene in a patient with Marfan syndrome associated with pseudoxanthoma elasticum. *J Dermatol Sci* 72:325-327, 2013.

Akizu N, Cantagrel V, Schroth J, Cai N, Vaux V, McCloskey D, Naviaux RK, Van Vleet J, Fenstermaker AG, Silhavy JL, Scheliga JS, Toyama K, Morisaki H, Sonmez FM, Celep F, Oraby A, Zaki MS, Al-Baradie R, Faqeih EA, Saleh MAM, Spencer E, Rosti RO, Scott E, Nickerson E, Gabriel S, Morisaki T, Holmes EW, Gleeson JG: AMPD2 regulates GTP synthesis and is mutated in a potentially treatable neurodegenerative brainstem disorder. *Cell* 154:505-517, 2013.

Li P, Ogino K, Hoshikawa Y, Morisaki H, Toyama K, Morisaki T, Morikawa K, Ninomiya H, Yoshida A, Hashimoto K, Shirayoshi Y, Hisatome I: AMP deaminase 3 plays a critical role in remote reperfusion lung injury. *Biochem Biophys Res Commun* 434:131-136, 2013.

Katsuragi S, Neki N, Yoshimatsu J, Ikeda T, Morisaki H, Morisaki T: Acute aortic dissection (Stanford type B) during pregnancy. *J Perinatol* 33:484-485, 2013.

Takahashi Y, Fujii K, Yoshida A, Morisaki H, Kohno Y, Morisaki T: Artery tortuosity syndrome exhibiting early-onset emphysema with novel compound heterozygous *SLC2A10* mutations. *Am J Med Genet A* 161:856-859, 2013.

森崎裕子:「大動脈瘤と遺伝子。」 *Heart View* 17, 60-65 (2013).

森崎裕子、森崎隆幸:「遺伝性大動脈疾患の診断」大動脈外科の要点と盲点 (高本眞一編) p.53-58 (文光堂, 2013).

2. 学会発表

森崎裕子. Marfan 症候群と類縁疾患の原因遺伝子による臨床所見の比較検討. in 第 49 回日本小児循環器学会. (東京) 2013.7.11.

森崎隆幸、森崎裕子. フィラミン異常症による大動脈瘤・解離. in 第 59 回日本人類遺伝学会 (仙台) 2013.11.20.

森崎裕子. 「遺伝性稀少難病に対する国立循環器病研究センターの取り組み」 in 第 1 回難病医療ネットワーク学会 (大阪) シンポジウム 2013.11.9

Morisaki H, Yamanaka I, Yoshida A, Sultana R, Minatoya K, Shiraishi I, Ichikawa H, Kosho T, Sonoda H and Morisaki T. FLNA mutations found in patients with thoracic aortic aneurysm/dissections. in 63rd Annual Meeting of American Society of Human Genetics. (Boston, USA):2013.10.22-25.

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