

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 に合併することの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（*Kv*DMR1脱メチル化（*Kv*DMR1-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。*Kv*DMR1-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*Bam*HIの組合せ、*H19*DMR-GOMについては、メチル化感受性制限酵素*Mlu*Iとメチル化非感受性制限酵素*Pst*I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。*Kv*DMR1-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 二乗検定）。

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 (孤発例 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。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る。

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

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) Higashimoto K<sup>†</sup>, Maeda T<sup>†</sup>, Okada J<sup>†</sup>, 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 (<sup>†</sup> equal contribution)
- 7) Miyazaki H<sup>†</sup>, Higashimoto K<sup>†</sup>, Yada Y<sup>†</sup>, A. Endo T<sup>¶</sup>, Sharif J<sup>¶</sup>, 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 (<sup>†</sup> <sup>¶</sup> equal contribution)
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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

- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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

- 1) 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
- 2) 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

- 1) 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
- 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 . 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)
- 3) 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)
- 4) 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)

- 5) 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)
- 6) 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、片瀨秀隆 . 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)
- 7) 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、片瀨秀隆 . 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)
- 8) 青木早織、大場隆、岡島翠、坂口勲、東元健、副島英伸、福永真治、片瀨秀隆 . 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)
- 9) 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)
- 10) 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 2013.11.1-4. 筑波 (Y-1 抄録集 p43)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 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)
- 14) 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)
- 15) 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、片淵秀隆。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)
- 16) 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)
- 17) 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)

#### 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