

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

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

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

表 2. 14番染色体父親性ダイソミーおよび類縁疾患  
診断基準(案)

主症状

- ・ 羊水過多
- ・ 胎盤過形成
- ・ 特徴的な小胸郭(コートハンガー型、ベル型)と呼吸障害
- ・ 腹壁の異常(臍帯ヘルニア、腹直筋離開)
- ・ 特徴的顔貌(まんまるな頬、前額部突出、眼瞼裂狭小、平坦な鼻梁、小顎、前向き鼻孔、突出した人中)

副症状

- ・ 発達遅延
- ・ 摂食障害
- ・ 翼状頸・短頸
- ・ 喉頭軟化症
- ・ 関節拘縮
- ・ 側弯症
- ・ 鼠径ヘルニア

表 3. 14番染色体母親性ダイソミーおよび類縁疾患  
診断基準(案)

主症状

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

副症状

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

表 4. シルバーラッセル症候群

診断基準(案)

- 必須条件: 生下時身長あるいは体重が-2SD以下  
これに加えて、下記5つのマイナークライテリア中の  
3つ以上を満足するもの
- [1] 生後の成長障害(2歳以降の身長が-2SD以下)
  - [2] 生下時の相対的頭圍拡大(身長あるいは体重  
SDSと頭圍SDSの差が1.5以上)
  - [3] 早期の前頭部突出
  - [4] 左右非対称
  - [5] 早期摂食障害

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. <sup>1</sup>
Mandatory criteria				
IUGR <sup>a</sup>	Yes	Yes	Yes	4/4
Scoring system criteria				
Postnatal short stature (z < -2 SDS)	Yes	Yes	Yes	4/4
Relative macrocephaly <sup>b</sup>	Yes	Yes	Yes	4/4 <sup>c</sup>
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 (z < -2.0 SDS) around 2 years of age	Yes	Yes	Unknown	3/4 (1/4 & 2/4) <sup>d</sup>

表 6. 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.

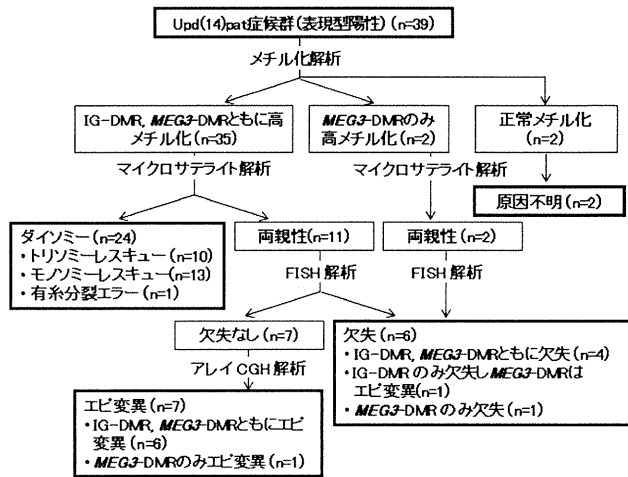
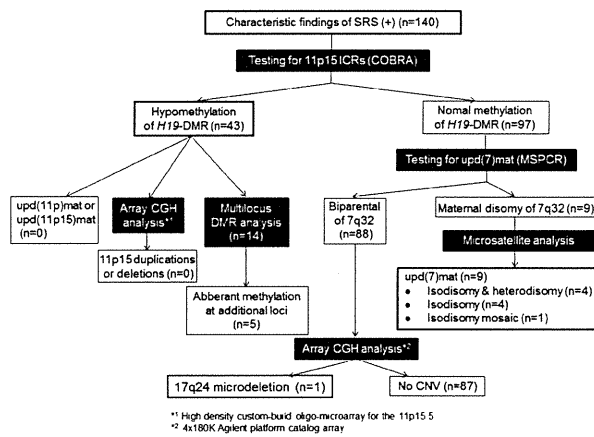
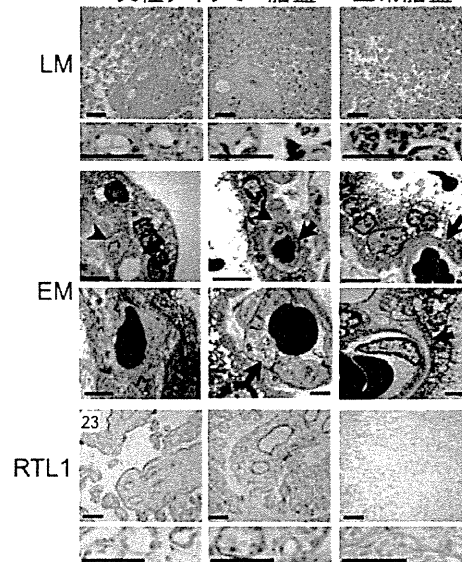
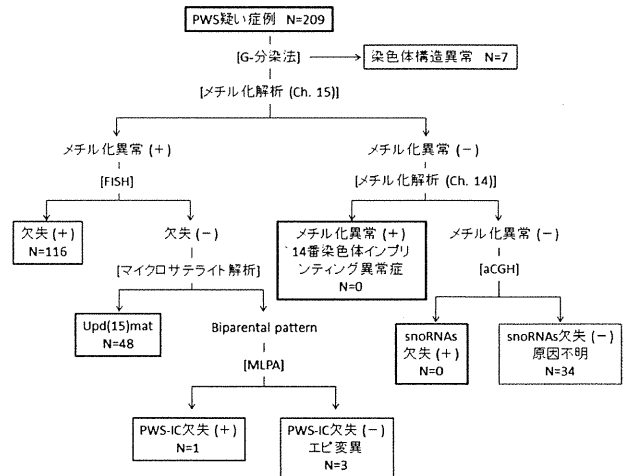


図2. 第14染色体父性ダイソミーにおける胎盤解析:  
父性ダイソミー胎盤 正常胎盤



\*\* High density custom-built oligo-microarray for the 11p15.5

\*\* 4x180K Agilent platform catalog array



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）  
総合研究報告書

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

研究分担者 齋藤伸治  
名古屋市立大学大学院医学研究科新生児・小児医学分野・教授

研究要旨

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

健康チェックの手引き作成にあたっては、Cassidy and Allanson. Management of Genetic Syndrome. 第3版およびWilson and Cooley. Preventive Management of Children with Congenital Anomalies and Syndromes. Cambridge University Press, 2000を参考にした。

C. 研究結果

1) PWS 診断基準（案）

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

## 2) AS 診断基準 (案)

### A. 常に存在 (100%)

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

### B. しばしば存在 (80%)

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

### C. 時に出現 (20-80%)

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

### 3) PWS の健康チェックの手引き 別紙添付 (表 1)

### 4) AS の健康チェックの手引き 別紙添付 (表 2)

### 5) PWS 年齢別診療の手引き (表 3)

### 6) AS 年齢別診療の手引き (表 4)

## D. 考察

PWSはほとんどの診断が遺伝学的に可能である。そのため、診断基準の役割は、いかに早期に適切な遺伝学的診断に結びつくかが重視されている。今回の検討では、2001年のGunay-Augunらの報告に基づき、診断基準 (案) を作成した。この基準では、確実な診断である遺伝学的診断が遅滞なく実施されることを目的としているため、一般的な臨床診断基準よりは甘い基準である。たとえば、2歳までの基準は筋緊張低下のみとなっている。その意味で、PWSは遺伝学的診断が可能である以上、見逃してはいけない疾患として位置づけられる。実際、私たちがこれまでに遺伝学的診断を依頼された200名を超える患者においては、全例でこの基準を満たしていた。しかし、実際にPWSと遺伝学的に診断された例は半数程度に過ぎない。残りの患者の中に、PWS以外の染色体微細コピー数異常などが少なからず存在することを報告してきている。このように、今回の診断基準 (案) を満たすなかには、PWS以外の患者が多く含まれることを理解することが重要である。

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

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

PWSおよびASでは適切な遺伝学的診断が行われることで、1歳前に確定診断を得ることができると。早期診断を健康管理に生かすためには、年齢に応じた健康チェックが欠かせない。そこで、それぞれの疾患についての健康チェックの手引きの作成を行った。いずれの疾患も症状の幅が広く、また、年齢における重要な症状が変化する。健康チェックの手引きについては、多くの関係者との

意見交換を行い、アップデートすることで充実した内容にすることが重要である。

さらに、年齢別診療の手引きの作成を行った。この年齢別診療の手引きは、各年齢における診療のうえでの重点を示すことで、必ずしも遺伝専門医でなくとも一定レベルの診療ができることを目指した。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診療の標準か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、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

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

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Hayashi S, et al. Clinical application of array-based comparative genomic hybridization by two-stage screening for 536 patients with mental retardation and multiple congenital anomalies. *J Hum Genet* 56:110-124, 2011.
2. Sato K, et al. Genetic analysis of two Japanese families with progressive external ophthalmoplegia and parkinsonism. *J Neurol* 258:1327-1332, 2011.
3. Takahashi Y, et al. A loss-of-function mutation in the SLC9A6 gene causes X-linked mental retardation resembling Angelman syndrome. *Am*

*J Med Genet Part B: Neuropsychiatric Genetics* 156:799-807, 2011.

4. Tohyama J, et al. West Syndrome Associated with Mosaic Duplication of FOXP1 in a Patient with Maternal Uniparental Disomy of Chromosome 14. *Am J Med Genet Part A* 155A:2584-2588, 2011.
5. Sudo A, et al. Successful cochlear implantation in a patient with mitochondrial hearing loss and m.625G > A transition. *J Laryngol Otol* 125:1282-1285, 2011.
6. Hosoki K et al. Hand-foot-genital syndrome with a 7p15 deletion demonstrates a clinically recognizable syndrome. *Pediatr Int* 54:e22-25, 2012.
7. Hosoki K et al. Clinical Phenotype and Candidate Genes for the 5q31.3 Microdeletion Syndrome. *Am J Med Genet A* 158A:1891-1896, 2012.
8. Kawamura R et al. Visualization of the spatial positioning of the *SNRPN*, *UBE3A*, and *GABRB3* genes in the normal human nucleus by three-color 3D-fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Res* 20:659-672, 2012.
9. Tsurusaki Y et al. A *DYNCH1* mutation causes a dominant spinal muscular atrophy with lower extremity predominance. *Neurogenetics* 13:327-332, 2012.
10. Takenouchi T et al. Tissue-limited ring chromosome 18 mosaicism as a cause of Pitt-Hopkins syndrome. *Am J Med Genet A* 158A:2621-3, 2012.
11. Egawa K et al. Decreased tonic inhibition in cerebellar granule cells causes motor dysfunction in a mouse model of Angelman syndrome. *Sci Transl Med* 4:163ra157, 2012.
12. Ueda H, et al. Combination of Miller-Dieker syndrome and VACTERL association causes extremely severe clinical presentation. *Eur J Pediatr* (in press)
13. Suzumori N, et al. Prenatal diagnosis of X-linked recessive Lenz microphthalmia syndrome. *J Obstet Gynaecol Res* 39:1545-7, 2013.
14. Hamajima N, et al. Increased protein stability of CDKN1C causes a gain-of-function phenotype in patients with IMAGE syndrome. *PLoS One* 8:e75137, 2013.
15. Yoneda Y, et al. Phenotypic spectrum of *COL4A1* mutations: porencephaly to schizencephaly. *Ann Neurol* 73:48-57, 2013.

### 2. 学会発表

- 1) 齋藤伸治ら. 5q31 微細欠失は乳児期の筋緊張低下と重度精神遅滞を示す新しい症候群である、第 53 回日本小児神経学会総会 平成 23 年 5 月 26-28 日 (東京)
- 2) 高野亨子ら. Prader-Willi 症候群の摂食の改善について 第 53 回日本小児神経学会総会、平

- 成 23 年 5 月 26-28 日 (東京)
- 3) 細木華奈ら. PWS 様表現型を示す微細染色体異常、第 56 回日本人類遺伝学会 平成 23 年 11 月 10-12 日 (幕張)
  - 4) Hosoki K, et al. 5q31.3 microdeletion syndrome is a clinically discernible new syndrome characterized by severe neonatal hypotonia, feeding difficulties, respiratory distress, and severe developmental delay. 61th Annual Meeting of American Society of Human Genetics, Montreal, Canada, 10/12-15/2011
  - 5) 根岸豊ら. Three siblings of Leigh syndrome associated with a mitochondrial m.3697G>A mutation. 第 54 回日本小児神経学会 平成 24 年 5 月 17-19 日 (札幌)
  - 6) 齋藤伸治ら. *DYNC1H1* 変異は特異な大腿四頭筋優位神経原性筋萎縮症の原因となる、第 57 回日本人類遺伝学会 平成 24 年 10 月 25-27 日 (東京)
  - 7) Hosoki K et al. Submicroscopic chromosomal rearrangements in patients with an Angelman syndrome-like phenotype. 62th Annual Meeting of American Society of Human Genetics, San Francisco, USA, 11/7-10/2012
  - 8) Saitoh S et al. A *DYNC1H1* mutation causes a quadriceps-dominant neurogenic muscular atrophy. 62th Annual Meeting of American Society of Human Genetics, San Francisco, USA, 11/7-10/2012
  - 9) Saitoh S et al. Molecular genetic investigation on patients with Angelman syndrome in Japan: experience on 168 deletion-negative cases. 2012 Meeting of Angelman syndrome Foundation. Washington DC, USA, 6/26-17, 2012.
  - 10) 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
  - 11) 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
  - 12) 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
  - 13) 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
  - 14) 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

表 1. Prader-Willi 症候群の健康チェックの手引き

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

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

表 2. Angelman 症候群の健康チェックの手引き

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

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



表 3. Prader-Willi 症候群 健康チェックの手引き

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	項目	必須により追加	注記
新生児期	<ul style="list-style-type: none"> <li>成長：身長・体重・頭囲</li> <li>発達</li> <li>聴覚・聴覚検査</li> <li>栄養：母乳</li> <li>血液検査：血糖値、Ca</li> <li>気道</li> <li>解呼吸</li> <li>呼吸機・呼吸器</li> <li>泌尿器系</li> <li>染色体検査 (第15番染色体 FISH 検査、DNAメチル化テスト)</li> <li>両親の疾患の受け入れ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>耳鼻咽喉科</li> <li>皮膚・栄養指導</li> <li>家族支援 (ソーシャルワーカー等の紹介)</li> <li>患者会の紹介</li> </ul>	
3か月	<ul style="list-style-type: none"> <li>成長：身長・体重・頭囲</li> <li>発達</li> <li>視覚：斜視</li> <li>聴覚・聴覚検査</li> <li>栄養：母乳</li> <li>血液検査：血糖値、Ca</li> <li>心臓：心エコー</li> <li>気道</li> <li>解呼吸</li> <li>胃腸道定式</li> <li>脳機能評価</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>眼科</li> <li>耳鼻咽喉科</li> <li>皮膚・栄養指導</li> <li>家族支援 (保健師訪問)</li> </ul>	
6か月	<ul style="list-style-type: none"> <li>成長：身長・体重・頭囲</li> <li>発達</li> <li>栄養：母乳</li> <li>視覚：斜視</li> <li>聴覚</li> <li>気道</li> <li>解呼吸</li> <li>泌尿器系</li> <li>呼吸機・呼吸器</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>眼科</li> <li>耳鼻咽喉科</li> <li>整形外科</li> <li>家族支援</li> <li>リハビリ科等 家族支援</li> </ul>	
12か月	<ul style="list-style-type: none"> <li>成長：身長・体重・頭囲</li> <li>発達</li> <li>栄養：母乳・固食</li> <li>視覚：斜視</li> <li>聴覚</li> <li>気道</li> <li>解呼吸</li> <li>創傷</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>皮膚・栄養指導</li> <li>家族支援</li> </ul>	
18か月	<ul style="list-style-type: none"> <li>成長：身長・体重 (BMI)、頭囲</li> <li>発達</li> <li>栄養：母乳・固食</li> <li>気道</li> <li>創傷</li> <li>解呼吸</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>皮膚・栄養指導</li> <li>療育等への紹介</li> <li>家族支援</li> </ul>	
2歳	<ul style="list-style-type: none"> <li>成長：身長・体重 (BMI)、頭囲</li> <li>発達</li> <li>栄養：母乳・固食</li> <li>視覚：斜視</li> <li>聴覚：中耳炎、聴力</li> <li>睡眠時無呼吸</li> <li>呼吸機・呼吸器</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>皮膚・栄養指導</li> <li>耳鼻咽喉科</li> <li>歯科</li> <li>療育</li> <li>家族支援</li> </ul>	
3歳	<ul style="list-style-type: none"> <li>成長：身長・体重 (BMI)、頭囲</li> <li>発達</li> <li>視覚：屈折検査 (軸視)、視反応、視力の評価</li> <li>聴覚・聴覚検査</li> <li>栄養 (過食)</li> <li>肥満</li> <li>内分泌：成長ホルモン</li> <li>血液検査：T<sub>4</sub></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>眼科</li> <li>内分泌科</li> <li>皮膚・栄養指導</li> <li>家族支援</li> <li>状況により、幼稚園・保育園等への通園準備</li> </ul>	

※どの年齢においても診療の際に遠征に関する両親からの相談を受け、必要に応じて遠征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.unir.ac.jp/genes/>

ブラダーウィリー症候群 年齢別 診療の手引き (4-18歳)

年齢	項目	必須により追加	注記	
4歳 1 6歳	<ul style="list-style-type: none"> <li>成長：身長・体重・BMI、頭囲</li> <li>発達</li> <li>聴覚・聴覚検査</li> <li>栄養：母乳</li> <li>血液検査：血糖値、Ca</li> <li>気道</li> <li>解呼吸</li> <li>呼吸機・呼吸器</li> <li>泌尿器系</li> <li>染色体検査 (第15番染色体 FISH 検査、DNAメチル化テスト)</li> <li>両親の疾患の受け入れ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>耳鼻咽喉科</li> <li>皮膚・栄養指導</li> <li>家族支援 (ソーシャルワーカー等の紹介)</li> <li>患者会の紹介</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>皮膚・栄養指導</li> <li>眼科</li> <li>耳鼻咽喉科</li> <li>矯正歯科</li> <li>療育</li> <li>家族支援</li> <li>学校支援</li> <li>学校との連携</li> </ul>	発達自立の状況を目指す。
7歳 1 9歳	<ul style="list-style-type: none"> <li>成長：身長・体重・BMI、頭囲</li> <li>発達</li> <li>視覚：斜視</li> <li>聴覚・聴覚検査</li> <li>栄養：母乳</li> <li>血液検査：血糖値、Ca</li> <li>心臓：心エコー</li> <li>気道</li> <li>解呼吸</li> <li>胃腸道定式</li> <li>脳機能評価</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>眼科</li> <li>耳鼻咽喉科</li> <li>皮膚・栄養指導</li> <li>家族支援</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>眼科</li> <li>耳鼻咽喉科</li> <li>家族支援</li> <li>学校との連携</li> </ul>	
10歳 1 12歳	<ul style="list-style-type: none"> <li>学校での状況</li> <li>成長：身長・体重 (BMI)、頭囲</li> <li>発達</li> <li>聴覚 (自己報告の基盤)</li> <li>栄養 (過食)</li> <li>肥満</li> <li>解呼吸</li> <li>呼吸機・呼吸器</li> <li>泌尿器系</li> <li>血液検査：血糖、尿酸等</li> <li>生体組織検査</li> <li>睡眠時無呼吸</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>眼科</li> <li>耳鼻咽喉科</li> <li>皮膚・栄養指導</li> <li>家族支援</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>家族支援</li> <li>学校との連携</li> <li>通院指導</li> </ul>	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	<ul style="list-style-type: none"> <li>学校での状況</li> <li>成長：身長・体重 (BMI)、頭囲</li> <li>発達</li> <li>聴覚 (過食)</li> <li>肥満</li> <li>解呼吸</li> <li>呼吸機・呼吸器</li> <li>泌尿器系</li> <li>血液検査：血糖、尿酸等</li> <li>生体組織検査</li> <li>睡眠時無呼吸</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>眼科</li> <li>耳鼻咽喉科</li> <li>皮膚・栄養指導</li> <li>家族支援</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>精神科・心療 (必要に応じて)</li> <li>家族支援</li> <li>学校との連携</li> <li>通院指導</li> </ul>	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	<ul style="list-style-type: none"> <li>学校での状況</li> <li>成長：身長・体重 (BMI)、頭囲</li> <li>発達</li> <li>聴覚 (過食)</li> <li>肥満</li> <li>解呼吸</li> <li>呼吸機・呼吸器</li> <li>泌尿器系</li> <li>血液検査：血糖、尿酸等</li> <li>生体組織検査</li> <li>睡眠時無呼吸</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>眼科</li> <li>耳鼻咽喉科</li> <li>皮膚・栄養指導</li> <li>家族支援</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>精神科・心療 (必要に応じて)</li> <li>家族支援</li> <li>学校との連携</li> <li>通院指導</li> </ul>	
成人	<ul style="list-style-type: none"> <li>身長・体重 (BMI)、頭囲</li> <li>発達</li> <li>視覚 (屈折検査)</li> <li>聴覚 (過食)</li> <li>肥満</li> <li>解呼吸</li> <li>呼吸機・呼吸器</li> <li>泌尿器系</li> <li>血液検査：血糖、尿酸等</li> <li>生体組織検査</li> <li>睡眠時無呼吸</li> <li>内分泌：成長ホルモン</li> <li>血液検査：T<sub>4</sub></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>眼科</li> <li>内分泌科</li> <li>皮膚・栄養指導</li> <li>家族支援</li> <li>状況により、幼稚園・保育園等への通園準備</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>精神科 (うつや強い衝動性が出た際)</li> <li>家族支援</li> <li>作業療法</li> <li>学校との連携</li> <li>成人医療機関との連携</li> </ul>	

※どの年齢においても診療の際に遠征に関する両親からの相談を受け、必要に応じて遠征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.unir.ac.jp/genes/>

表 4. Angelman 症候群 健康チェック手引き

アンジェルマン症候群 年齢別 診療の手引き (0-3 歳)

年齢	問題	対応により連携	注記
新生児期	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 成長：身長・体重（低体重）・頭圍（小頭症は目立たない）</li> <li><input type="checkbox"/> 発達：</li> <li><input type="checkbox"/> 聴覚／聴覚検査</li> <li><input type="checkbox"/> 栄養：哺乳</li> <li><input type="checkbox"/> 両親の疾患の受け入れ</li> <li><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）</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 耳鼻咽喉科</li> <li><input type="checkbox"/> 摂食・栄養指導</li> <li><input type="checkbox"/> 家族支援（ソーシャルワーカー等の紹介）</li> </ul>	
3 か月	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 成長：身長・体重・頭圍</li> <li><input type="checkbox"/> 発達：</li> <li><input type="checkbox"/> 聴覚：</li> <li><input type="checkbox"/> 聴覚：</li> <li><input type="checkbox"/> 栄養：哺乳</li> <li><input type="checkbox"/> 両親の疾患の受け入れ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 眼科</li> <li><input type="checkbox"/> 耳鼻咽喉科</li> <li><input type="checkbox"/> 摂食・栄養指導</li> </ul>	
6 か月	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 成長：身長・体重・頭圍</li> <li><input type="checkbox"/> 発達：</li> <li><input type="checkbox"/> 栄養：哺乳・摂食</li> <li><input type="checkbox"/> 聴覚：斜視</li> <li><input type="checkbox"/> 聴覚：</li> <li><input type="checkbox"/> 脳波・脳動脈 MRI</li> <li><input type="checkbox"/> 遺伝相談／（必要に応じて）遺伝学的検査</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 眼科</li> <li><input type="checkbox"/> 耳鼻咽喉科</li> <li><input type="checkbox"/> 摂食・栄養指導</li> <li><input type="checkbox"/> リハビリ科等</li> <li><input type="checkbox"/> 家族支援</li> </ul>	
12 か月	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 成長：身長・体重・頭圍（小頭症）</li> <li><input type="checkbox"/> 発達：</li> <li><input type="checkbox"/> 栄養：哺乳・摂食</li> <li><input type="checkbox"/> 聴覚：斜視</li> <li><input type="checkbox"/> 聴覚：</li> <li><input type="checkbox"/> 症察（1 歳までに 25% が発症）／脳波</li> <li><input type="checkbox"/> 睡眠</li> <li><input type="checkbox"/> 胃食道逆流</li> <li><input type="checkbox"/> 不十分な咀嚼</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 摂食・栄養指導</li> <li><input type="checkbox"/> 家族支援</li> </ul>	
18 か月	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 成長：身長・体重・頭圍</li> <li><input type="checkbox"/> 発達：</li> <li><input type="checkbox"/> 栄養：哺乳・摂食</li> <li><input type="checkbox"/> 症察／脳波</li> <li><input type="checkbox"/> 睡眠</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 摂食・栄養指導</li> <li><input type="checkbox"/> 療育等への紹介</li> <li><input type="checkbox"/> 家族支援</li> </ul>	
2 歳	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 成長：身長・体重・頭圍</li> <li><input type="checkbox"/> 発達：</li> <li><input type="checkbox"/> 栄養：哺乳・摂食</li> <li><input type="checkbox"/> 聴覚：斜視</li> <li><input type="checkbox"/> 聴覚：</li> <li><input type="checkbox"/> 症察／脳波</li> <li><input type="checkbox"/> 睡眠</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 眼科</li> <li><input type="checkbox"/> 耳鼻咽喉科</li> <li><input type="checkbox"/> 摂食・栄養指導</li> <li><input type="checkbox"/> 療育</li> <li><input type="checkbox"/> 家族支援</li> </ul>	
3 歳	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 成長：身長・体重・頭圍</li> <li><input type="checkbox"/> 発達：</li> <li><input type="checkbox"/> 聴覚：屈折検査（斜視）、視反応・視力の評価</li> <li><input type="checkbox"/> 聴覚／聴力検査</li> <li><input type="checkbox"/> 栄養：哺乳・摂食（過食）</li> <li><input type="checkbox"/> 症察（3 歳までに 90% が発症）／脳波</li> <li><input type="checkbox"/> 睡眠</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 眼科</li> <li><input type="checkbox"/> 摂食・栄養指導</li> <li><input type="checkbox"/> 家族支援</li> <li><input type="checkbox"/> 状況により、幼稚園、保育園等への通園準備</li> </ul>	発達の加速 移動能力の評価は重要

• 小児遺伝学会 <http://plaza.univ.ac.jp/ogenet/>

※どの年齢においても診療の際に遺伝に関する問題からの相談を受け、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	問題	対応により連携	注記
4 歳   6 歳	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 成長：身長・体重（BMI）・頭圍</li> <li><input type="checkbox"/> 発達：発達検査・知能検査等、歩行開始は 3~4 歳</li> <li><input type="checkbox"/> 栄養：摂食（過食）</li> <li><input type="checkbox"/> 聴覚：斜視</li> <li><input type="checkbox"/> 聴覚：滲出性中耳炎、聴力</li> <li><input type="checkbox"/> 情緒／情緒不安</li> <li><input type="checkbox"/> 多動傾向</li> <li><input type="checkbox"/> 症察</li> <li><input type="checkbox"/> 睡眠障害</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 眼科</li> <li><input type="checkbox"/> 耳鼻咽喉科</li> <li><input type="checkbox"/> 整形外科</li> <li><input type="checkbox"/> 療育</li> <li><input type="checkbox"/> 家族支援</li> <li><input type="checkbox"/> 就学相談</li> </ul>	
7 歳   9 歳	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 学校での状況</li> <li><input type="checkbox"/> 成長：身長・体重（BMI）・頭圍</li> <li><input type="checkbox"/> 発達：</li> <li><input type="checkbox"/> 栄養：摂食（過食）</li> <li><input type="checkbox"/> 聴覚：斜視</li> <li><input type="checkbox"/> 聴覚：滲出性中耳炎、聴力</li> <li><input type="checkbox"/> 情緒不安</li> <li><input type="checkbox"/> 睡眠障害</li> <li><input type="checkbox"/> 肥満</li> <li><input type="checkbox"/> 便秘</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 眼科</li> <li><input type="checkbox"/> 耳鼻咽喉科</li> <li><input type="checkbox"/> 家族支援</li> <li><input type="checkbox"/> 学校との連携</li> </ul>	
10 歳   12 歳	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 学校での状況</li> <li><input type="checkbox"/> 成長：身長・体重（BMI）・頭圍</li> <li><input type="checkbox"/> 発達：発達検査・知能検査等</li> <li><input type="checkbox"/> 栄養：摂食（過食）</li> <li><input type="checkbox"/> 肥満：</li> <li><input type="checkbox"/> 性成熟：思春期発達の遅れ（1~2 年前後）</li> <li><input type="checkbox"/> 情緒</li> <li><input type="checkbox"/> 睡眠障害呼吸</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 眼科</li> <li><input type="checkbox"/> 耳鼻咽喉科</li> <li><input type="checkbox"/> 整形外科</li> <li><input type="checkbox"/> 家族支援</li> <li><input type="checkbox"/> 学校との連携</li> <li><input type="checkbox"/> 通院相談</li> </ul>	
中学生	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 学校での状況</li> <li><input type="checkbox"/> 成長：身長・体重（BMI）・頭圍</li> <li><input type="checkbox"/> 発達：</li> <li><input type="checkbox"/> 聴覚：</li> <li><input type="checkbox"/> 情緒：鬱病／情緒不安</li> <li><input type="checkbox"/> 栄養：摂食（過食）</li> <li><input type="checkbox"/> 肥満</li> <li><input type="checkbox"/> 性成熟</li> <li><input type="checkbox"/> 睡眠障害</li> <li><input type="checkbox"/> 症察</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 眼科</li> <li><input type="checkbox"/> 耳鼻咽喉科</li> <li><input type="checkbox"/> 家族支援</li> <li><input type="checkbox"/> 学校との連携</li> <li><input type="checkbox"/> 通院相談</li> </ul>	
高校生	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 学校での状況</li> <li><input type="checkbox"/> 成長：身長・体重（BMI）・頭圍</li> <li><input type="checkbox"/> 発達：</li> <li><input type="checkbox"/> 聴覚：</li> <li><input type="checkbox"/> 栄養：摂食（過食）</li> <li><input type="checkbox"/> 性成熟：成人の二次性徴は正常</li> <li><input type="checkbox"/> 情緒：鬱病／情緒不安</li> <li><input type="checkbox"/> 睡眠障害</li> <li><input type="checkbox"/> 症察</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 眼科</li> <li><input type="checkbox"/> 耳鼻咽喉科</li> <li><input type="checkbox"/> 家族支援</li> <li><input type="checkbox"/> 学校との連携</li> <li><input type="checkbox"/> 職業訓練等</li> </ul>	
成人	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 身長・体重（BMI）・頭圍</li> <li><input type="checkbox"/> 低身長（軽度～正常）、肥満に留意</li> <li><input type="checkbox"/> 聴覚：</li> <li><input type="checkbox"/> 聴覚：</li> <li><input type="checkbox"/> 情緒：鬱病／情緒不安</li> <li><input type="checkbox"/> 睡眠障害</li> <li><input type="checkbox"/> 症察</li> <li><input type="checkbox"/> 精神症状の増悪がある時は胃食道逆流を考慮</li> <li><input type="checkbox"/> 就労</li> <li><input type="checkbox"/> 居住環境</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> 眼科</li> <li><input type="checkbox"/> 耳鼻咽喉科</li> <li><input type="checkbox"/> 家族支援</li> <li><input type="checkbox"/> 社会参加支援</li> <li><input type="checkbox"/> 成人医療機関との連携</li> </ul>	

※どの年齢においても診療の際に遺伝に関する問題からの相談を受け、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.univ.ac.jp/ogenet/>

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 高メチル化は受精後、特に着床後に生じ、モザイクになることが示唆された。その原因の 1 つとして、*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を明らかにした。*CDKN1C* 変異は、CKI ドメインのミスセンス変異と QT ドメインの欠失に集約されることから、変異による不十分な細胞周期抑制が BWS 表現型の原因と判明した。さらに、メチル異常に比べ、*CDKN1C* 変異はモザイクでないため特徴的な症状がそろって出現すると考えられた。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 カ所の 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。さらに、BWS の鑑別診断の 1 つである Perlman 症候群において、LINE-1 を介した non-allelic homologous recombination (NAHR) に起因する *DIS3L2* エキソン 9 のホモ欠失を認めた。本領域は、LINE-1 による NAHR のホットスポットであることが示唆された。

A. 研究目的

過成長、巨舌、臍帯（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を消化しサザンプロットを行った。メチル化インデックス（%）は、FLA-7000 fluoro-image analyzerを用いて測定した。patUPDについては、11p15のShort tandem repeat (STR) マーカー（*DIIS1997*, *HUMTH01*, *DIIS1984*）をPCRで増幅したのち、Applied Biosystems 3130 genetic analyzerで電気泳動し、GeneMapper softwareで各アレル由来PCR産物のピーク高を計測してモザイク率を算出した。*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。

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

## C. 研究結果

### 1. 発症原因別頻度

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 $\chi^2$ 二乗検定)。また、染色体異常はすべて11p15領域の部分トリソミーであった。

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の発生時期と原因に関する検討

H19DMR-GOMがいつ生じるのか不明であった。H19DMR-GOM症例のうち2例(BWS047、bwsh21-015)で胎盤組織も収集できたため、末梢血と胎盤のH19DMRのDNAメチル化状態について解析した。末梢血(患児組織)と胎盤(胚体外組織)でメチル化状態が異なることがわかった。具体的には、BWS047では、末梢血で100%メチル化、胎盤で70%メチル化を示し、bwsh21-015では、末梢血で90%メチル化、胎盤で71%メチル化を示した。H19DMR内のSNPを用いて親由来アレルを区別した上で、母由来アレルに異常メチル化が生じていることを確認した。また、STR解析で11p15.5領域が2コピーであること、サザンプロットとシーケンス解析でH19DMR内に欠失や変異がないことを確認した。これらの結果から、本来50%で維持されているはずのH19DMRのDNAメチル化が、着床後のde novoメチル化に巻き込まれたため

にH19DMR-GOMが生じると考えられた(論文1)。

また、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BWS12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、全ての症例で変異を認めなかったが、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。これらの結果から、母性アレルH19DMRにOCT4の結合することにより、着床後のde novoメチル化からH19DMRをプロテクトしていると考えられた(論文11)。

### 3. CDKN1C変異症例の解析

CDKN1C変異症例は12例であったが、このうち二組の同胞例が含まれていたため、変異の種類としては10種類であった。このうち3種類は既に論文発表されているので(Hatada et al., Nat Genet, 1996; Hatada et al., Hum Genet, 1997; Li et al., Genomics, 2001)、新規変異例6例についての解析結果を示す(表2)。

表2 CDKN1C変異(論文3より改変)

Patient	Amino Acid Change	Protein Domain	Inheritance
BWS059	p.G234fsX36	QT	maternal (grandfather)
bwsh21-055A &055B	p.L154fsX117	PAPA	maternal
bwsh21-073	p.W61R	CKI	maternal
bwsh21-098	p.Y91H	CKI	maternal (grandmother)
bwsh21-129	p.P106fsX20	CKI直下	maternal

bwsh21-055Aとbwsh21-055Bは同胞

bwsh21-055Aとbwsh21-055Bは同胞であったため、新規変異の種類は5種類でフレームシフト3種類(p.G234fsX36、p.L154fsX117、p.P106fsX20)、ミスセンス変異2種類(p.W61R、p.Y91H)であった。ナンセンス変異とミスセンス変異については、健常人100名に認められないことを確認した。CDKN1Cタンパクは、N末よりCKIドメイン、PAPAリピートドメイン、QTドメインがあり、CDKインヒビターとして細胞周期を負に制御する。新規5種類の変異はCKIドメインのミスセンス変異とQTドメインの欠失に集約された。これらの症例では、いわゆる三主徴(過成長、巨舌、臍(臍帯)ヘルニア)がみられ、片側肥大、腹腔内臓器腫大および奇形、外性器異常は見られなかった。1例(bwsh21-098)において、心臓横紋筋腫がみら

れたが、この症例は結節性硬化症を合併しており、そのために腫瘍が発生したと考えられた(論文3)。

#### 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 ヲ所のインプリント 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 ヲ所のインプリント 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(論文 10)。

#### 5. Perlman 症候群の原因遺伝子解析

BWS の鑑別診断の 1 つに常染色体劣性遺伝病の Perlman 症候群がある。症例 BWS055 は、妊娠中に羊水過多、両側腎腫大を認め、出生後には過成長を認めたため、当初 BWS を疑い、11p15.5 の遺伝子解析を行ったが異常を認めなかった。染色体検査も正常であった。児は 175 日齢で敗血症のため死亡し、剖検の結果、Perlman 症候群と診断された。2012 年に Astuti らにより、2q37.1 の DIS3L2 遺伝子変異が Perlman 症候群の原因であることが報告されたため、DIS3L2 の変異解析を行った(Astuti et al., Nat Genet, 2012)。解析の結果、患児においてエキソン 9 のホモ欠失を認めた。両親を解析したところ、エキソン 9 のヘテロ欠失であり、患児は両親から欠失アレルを受け継いで発症したと考えられた。エキソン 9 の上流と下流には LINE-1 が存在することから、欠失の切断端を詳細に解析したところ、欠失は LINE-1 を介した non-allelic homologous recombination (NAHR) で生じたことが示唆された。さらに、父由来の欠失断端と母由来の欠失断端では配列が異なることがわかった(論文 8)。

#### D. 考察

発症原因(5種類)の頻度については、国内最大級の症例数を解析することで、その頻度を明らかにした。また、発症原因と ART との関連性については有意差を認めなかった。BWS の症状に関する解析については、これまでの厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

の研究でおこなっているため、ここでは症状に関する考察は割愛し、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おり、今後の遺伝子解析のモデルケースになると考えられる。

一般に、受精後にはゲノム全体の脱メチル化が生じ、着床以降に *de novo* の再メチル化がおこる。着床以降は、個体では再メチル化が高率に生じるが、胎盤組織では再メチル化は緩やかに生じる。この間、インプリント DMR のメチル化は 50% に維持されている。今回の H19DMR-GOM 症例の DNA メチル化解析から、末梢血(患児組織)と胎盤(胚体外組織)ではメチル化状態が異なり、末梢血でより高いメチル化状態(末梢血で 90-100%、胎盤で 70%)であることがわかった。このことは、本来 50% で維持されているはずの H19DMR の DNA メチル化が、着床後の再メチル化に巻き込まれたことを意味する。一方、bwsh21-015 の末梢血は 90% メチル化を示した。加えて他の H19DMR-GOM 症例も 66-90% と様々な程度のメチル化異常を示すことが明らかとなっている。これは、メチル化異常が受精後に起こりモザイクとなっていることを示している。これらの結果から、H19DMR の高メチル化は受精後、特に着床後に生じることが強く示唆された。

一方、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 ヲ所しかないマウス 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。

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

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。

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

## E. 結論

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。

BWSにおける*H19*DMR-GOMは受精後、特に着床後に生じ、モザイクになることが強く示唆された。*H19*DMR-GOM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。

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

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。

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

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Higashimoto K, Nakabayashi K, Yatsuki H, Yoshinaga H, Jozaki K, Okada J, Watanabe Y, Aoki A, Shiozaki A, Saito S, Koide K, Mukai T, Hata K, Soejima H. Aberrant methylation of H19-DMR acquired after implantation was dissimilar in soma versus placenta of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet Part A*, 158A:1670–1675, 2012
- 2) Hiura H, Okae H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Van De Pette M, John RM, Kagami M, Nakai K, Soejima H, Ogata T, Arima T. Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproduction technologies. *Hum Reprod*, 27(8):2541-2548, 2012
- 3) 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) 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
- 6) 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

- 7) Fukuda K, Ichiyanagi K, Yamada Y, Go Y, Usono 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
- 8) 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)
- 9) 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> equal contribution)
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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 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) Janette M. Rumbajan, 前田寿幸、田尻達郎、東元 健、宗崎良太、田口智章、副島英伸、城 圭一郎. 肝芽腫におけるインプリント DMR 異常メチル化のゲノムワイド検索. 第 6 回日本エピジェネティクス研究会年会 2012.5.14-15. 東京 (抄録集 p78, ポスターPA-44)
- 2) 田山千春、Alejandro Martin Trujillo, 緒方勤、副島英伸、David Monk、秦健一郎、中林一彦. 全ゲノム片親性ダイソミー症例の DNA メチル化解析によるヒトインプリント遺伝子座位の網羅的解析. 第 6 回日本エピジェネティクス研究会年会 2012.5.14-15. 東京 (抄録集 p84, ポスターPA-56)
- 3) 前田寿幸、城崎幸介、八木ひとみ、東元 健、副島英伸. Beckwith-Wiedemann 症候群エピ変異症例のゲノム網羅的 DNA メチル化解析. 第 6 回日本エピジェネティクス研究会年会 2012.5.14-15. 東京 (抄録集 p85, ポスターPA-58)
- 4) 大塚泰史、前田寿幸、城崎幸介、八木ひとみ、東元 健、副島英伸. Beckwith-Wiedemann 症候群における片親性父性ダイソミーの多様性と臨床症状との関連. 第 6 回日本エピジェネティクス研究会年会 2012.5.14-15. 東京 (抄録集 p128, ポスターPA-64)

- 5) 外木秀文、奥原宏治、飯塚進、高橋伸浩、徳富智明、服部司、太田亨、副島英伸. Silver-Russell 症候群の遺伝学的異常の検討. 第 35 回小児遺伝学会学術集会 2012.4.19. 久留米市 (プログラム・抄録集 p28)
- 6) 大町和美、三島祐子、松田圭子、副島英伸、岡本伸彦. Beckwith-Wiedemann 症候群の遺伝カウンセリング. 第 36 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会 21012. 6. 8-10. 信州大学医学部
- 7) 副島英伸、東元 健、田尻達郎. 肝芽腫におけるメチル化インプリント DMR のゲノムワイド検索. 第 71 回日本癌学会学術総会 2012.9.19-21. 札幌市 (Proceedings, p256, English oral session, E-2058)
- 8) 高松裕一郎、前田寿幸、松尾宗明、東元健、河島雅到、松島俊夫、副島英伸. パイロシークエンス法を用いたもやもや病感受性遺伝子 RNF213 の c.14576G>A 多型解析. 日本脳神経外科学会第 71 回学術総会 2012.10.17-19. 大阪 (ポスター 3P-08-P107-04)
- 9) 副島英伸、Janette Rumbajan、前田寿幸、東元 健、宗崎良太、田口智章、田尻達郎. 肝芽腫におけるインプリント DMR メチル化異常のゲノムワイド検索. 日本人類遺伝学会第 57 回大会 2012.10.24-27. 東京 (O-50 プログラム・抄録集 p139)
- 10) 中林一彦、田山千春、Trujillo Alex Martin、岡村浩司、緒方勤、副島英伸、Monk David、秦健一郎. 全ゲノム片親性ダイソミー症例の DNA メチル化解析によるヒトインプリントーム解明. 日本人類遺伝学会第 57 回大会 2012.10.24-27. 東京 (O-52 プログラム・抄録集 p139)
- 11) 大塚泰史、城崎幸介、前田寿幸、八木ひとみ、東元 健、副島英伸. Beckwith-Wiedemann 症候群における片親性父性ダイソミーの多様性と臨床症状との関連. 日本人類遺伝学会第 57 回大会 2012.10.24-27. 東京 (O-53 プログラム・抄録集 p140)
- 12) 前田寿幸、城崎幸介、八木ひとみ、東元 健、副島英伸. Beckwith-Wiedemann 症候群エピ変異症例におけるインプリント DMR の網羅的メチル化解析. 日本人類遺伝学会第 57 回大会 2012.10.24-27. 東京 (O-54 プログラム・抄録集 p140)
- 13) 東元 健、城崎幸介、八木ひとみ、古庄知己、松原圭子、山田大輔、前田寿幸、大塚泰史、古関明彦、緒方勤、副島英伸. H19-DMR にメチル化異常を認めたインプリント疾患における H19-DMR の変異解析. 日本人類遺伝学会第 57 回大会 2012.10.24-27. 東京 (O-55 プログラム・抄録集 p154)
- 14) 東元 健、前田寿幸、八木ひとみ、岡田純一郎、佐々木健、吉浦孝一郎、渡邊順子、副島英伸. Perlman 症候群における *DIS3L2* のエクソン 9 の欠失は LINE-1 間の非相同組換えによって生じる. 日本人類遺伝学会第 57 回大会 2012.10.24-27. 東京 (O-110 プログラム・抄録集 p140)
- 15) Maeda T, Jozaki K, Yatsuki H, Higashimoto K, Soejima H. Genome-wide quantitative DNA methylation analysis of imprinted DMRs in patients with Beckwith-Wiedemann Syndrome by MALDI-TOF MS technology. The American Society of Human Genetics 62nd Annual Meeting (poster 3432T). 2012. 11. 6-10. San Francisco, California, USA
- 16) Nakabayashi K, Trujillo AM, Tayama C, Kagami M, Soejima H, Ogata T, Monk D, Hata K. DNA methylation analysis of reciprocal genome-wide UPDs to define imprinted differentially methylated regions in the human genome. The American Society of Human Genetics 62nd Annual Meeting (poster 3499T). 2012. 11. 6-10. San Francisco, California, USA
- 17) Ohtsuka Y, Jozaki K, Maeda T, Yatsuki H, Higashimoto K, Soejima H. The relationship between paternal uniparental disomy and clinical features in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. The American Society of Human Genetics 62nd Annual Meeting (poster 3519T). 2012. 11. 6-10. San Francisco, California, USA
- 18) 田山千春、アレックス マーティン、岡村浩司、緒方勤、副島英伸、デビッド モンク、秦健一郎、中林一彦. 全ゲノム片親性ダイソミー症例の DNA メチル化解析によるヒトインプリントーム解明. 第 35 回日本分子生物学会年会 2012.12.11-14. 福岡 (1W11-7 プログラム p63; 1P-0118 プログラム p195)
- 19) 東元 健、城崎幸介、八木ひとみ、古庄知己、松原圭子、山田大輔、前田寿幸、大塚泰史、古関明彦、緒方勤、副島英伸. H19-DMR メチル化異常で発症するインプリント疾患における H19-DMR の変異解析. 第 35 回日本分子生物学会年会 2012.12.11-14. 福岡 (2P-0148 プログラム p300)
- 20) 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)
- 21) 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



- 22) 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)
- 23) 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)
- 24) 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)
- 25) 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)
- 26) 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)
- 27) 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)
- 28) 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)
- 29) 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)
- 30) 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)
- 31) 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)
- 32) 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)
- 33) 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)
- 34) 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)
- 35) 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)
- 36) 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)
- 37) 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 24-25 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）  
総合研究報告書

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- $\beta$* 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- $\beta$* 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、同院結合組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、*COL3A1* 遺伝子変異32例、*SKI* 遺伝子変異2例、*CHST* 遺伝子変異9例、*FLNA* 遺伝子変異9例である。うち24-25年度の2年間で新たに138例について遺伝子変異を同定した。

また、2010年7月に創設された当院結合組織病外来では、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）167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511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。平成24-25年度の2年間では、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283名のうち83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77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- $\beta$* 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- $\beta$* 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うることとなった。

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、*FBN2* 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ケ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*、*TGFBR2*、*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、改訂メ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%CO<sub>2</sub>、37°Cの条件下で組織培養を行い、そこより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°C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

2012年4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182例、および他院より解析を依頼された新規患者173例、計355例における解析では、*FBNI* 遺伝子変異を97例、*TGFBR1* 遺伝子変異を13例、*TGFBR2* 遺伝子変異を4例、*SMAD3* 遺伝子変異を4例で同定しており、計118例で、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、その他11例において、その他の関連遺伝子の変異を同定した。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、類縁の Shprnzen-Goldberg 症候群の原因遺伝子として昨年度新規に報告された *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 Shprnzen-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。

これまでの研究の成果も加えると、当院における遺伝子解析により、2013年12月末の時点において、*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、*COL3A1* 遺伝子変異32例、*SKI* 遺伝子変異2例、*CHST* 遺伝子変異9例が同定されている。

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