

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

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。また、第14染色体父性ダイソミー症候群表現型陽性患者の皮膚繊維芽細胞を用いてiPS細胞を作成中である。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ているものである。

### 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ださ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にて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、シーケンス解析、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、現在なしう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

39例の第14染色体父性ダイソミー症候群表現型陽性患者の遺伝的原因は図1のように診断された。これにより遺伝子診断フローチャートが完成した。また、これらの患者の解析から父性ダイソミー症候群の診断基準案は表2のように、第14染色体母性ダイソミー症候群の診断基準案は表3のようにまとめられた。

さらに、これらの患者の解析から、以下のことが判明した。(1) 配偶子形成時に樹立されるIG-DMRは胎盤におけるインプリンティングセンター(IC)である。(2) 受精後に樹立されるMEG3-DMRは個体にお

けるICである。(3) IG-DMRは個体におけるMEG3-DMRのメチル化パターン制御機能を有する。(4) MEG3-DMRにはCTCFタンパク結合部位が存在する。(5) Upd(14)pat症候群の表現型は主に父性発現遺伝子RTL1の過剰発現による。(6) Upd(14)mat症候群の表現型は主に父性発現遺伝子DLK1およびRTL1の発現低下に起因する。(7) 母性発現遺伝子RTL1asにコードされるmicroRNAはRTL1の発現抑制機能を有する。

次に、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2)。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単独エピソード変異症例、ならびに世界で数例しか報告されていないIG-DMRとMEG3-DMRの両者のエピソード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。

### シルバーラッセル症候群

138例のシルバーラッセル症候群表現型陽性患者の遺伝的原因は図3のように診断された。また、その診断基準案は表4のようにまとめられた。さらに、以下のことが判明した。(1)日本人シルバーラッセル症候群の31.2%はH19-DMRの低メチル化を、6.5%は第7染色体母性ダイソミーを有する。H19-DMRの低メチル化患者は、出生時の相対的頭囲拡大、身長・体重の重度の低下、半身低形成などを高頻度に伴い、第7染色体母性ダイソミー患者は、言語発育遅滞を高頻度に伴う。(2)IGF2が脳では例外的に両親性発現を示すことに一致して、H19-DMRの低メチル化患者では、IGF2の発現量を反映するメチル化係数が、修正時の身長・体重・胎盤重量と良く相関し、頭囲とは相関しなかった。(3)その母性ダイソミーがSRSを生じる第7染色体長腕には、胎盤特異的DMRが存在する。(4)第17染色体長腕の微小欠失は、SRS発症原因の一つであり、この領域には候補遺伝子が存在する。(5)エピソード変異例の2.4%において、複数のメチル化異常(低メチル化と高メチル化の両者)が認められ、これは、エピソード変異を有する患者の一部においてメチル化の開始・維持に異常が存在する可能性を示唆する。

### プラダーウィリ症候群

209例のプラダーウィリ症候群表現型陽性患者の遺伝的原因は図4のように診断された。さらに、以下のことが判明した。(1)PWSと診断された患者の一部は、upd(14)mat症候群を有する。(2)PWS-IC周辺の配列は、極微細欠失(約75 kb)患者におけるAngelman症候群(AS)発症に關与する(AS発症最少領域が母由来第15染色体から欠失するとASを発症するが、AS発症最少領域とPWS-IC周辺配列が同時に欠失するとASを生じない)。(3)PWS-ICにはCTCF結合配列が存在する。

### 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(表5)。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いうること、(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5)。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、エピソード変異、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6に示す通りである。プラダーウィ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うるものである。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 *PRKX/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.
13. Ogata T, Sano S, Nagata E, kato F, Fumaki M: *MAMLD1* and 46,XY disorders of sex development. *Semi Reprod Med* 30 (5): 410–416, 2012.
14. Miyado M, Nakamura M, Miyado K, Morohashi K, Sano S, Nagata E, Fukami M, Ogata T: *Mamld1* deficiency significantly reduces mRNA expression levels of multiple genes expressed in mouse fetal Leydig cells but permits normal genital and reproductive development. *Endocrinology* 153 (12): 6033–6040, 2012.
15. Ogata T, Fukami M, Yoshida R, Nagata E, Fujisawa Y, Yoshida A, Yoshimura Y: Haplotype analysis of *ESR2* in Japanese patients with spermatogenic failure. *J Hum Genet* 57 (7): 449–452, 2012.

### 学会発表

1. Ogata T: Cytochrome P450 Oxidoreductase Deficiency: A Unique Disease Leading to Disorders of Sex Development in Both 46,XY and 46,XX Patients. Invited Lecture. In: The 6th International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination. April 23–27, 2012. Kona Hawaii, USA.
2. Ogata T: Genetics of DSD (Disorders of sex development). In: Disorders of sex development. The 15<sup>th</sup> International and 14<sup>th</sup> European Congress of Endocrinology (ICE/ECE). May 5–9, 2012, Florence, Italy.
3. 緒方勤: エピジェネティクスと小児成長発達. 第115回日本小児科学会学術集会教育講演. 2012年4月20–22日, 福岡.

## G . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
該当なし
2. 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 (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-2 SD以下)
  - [2] 生下時の相対的頭囲拡大(身長あるいは体重 SDSと頭囲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>2</sup>
Mandatory criteria				
ILGR <sup>+</sup>	Yes	Yes	Yes	4/4
Scoring system criteria				
Postnatal short stature ( $\leq -2$ SDS)	Yes	Yes	Yes	4/4
Relative macrocephaly <sup>†</sup>	Yes	Yes	Yes	4/4 <sup>†</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 ( $\leq -2.0$ SDS) around 2 years of age	Yes	Yes	Unknown	3/4 (1/4 & 2/4) <sup>‡</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 1

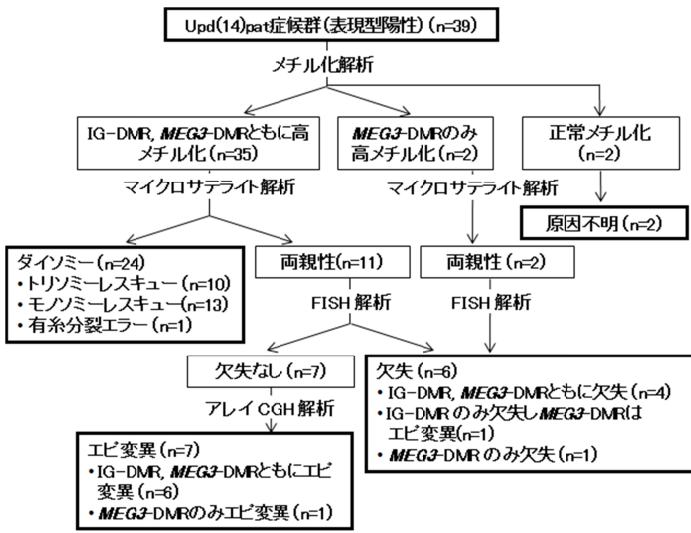


図2。第14染色体父性ダイソミーにおける胎盤解析：  
父性ダイソミー胎盤 正常胎盤

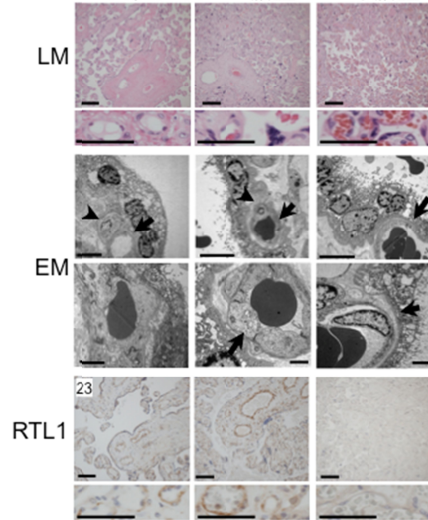


図 3

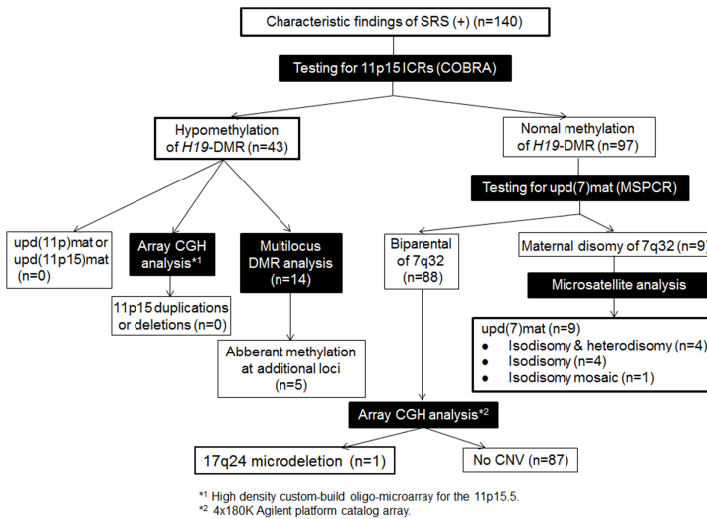


図 4

