

201324115A

間葉性異形成胎盤の臨床的・分子遺伝学的診断法の
開発を目指した基盤研究

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患克服研究事業)

平成25年度 総括・分担研究報告書

平成 26 (2014) 年 5 月

研究代表者：副 島 英 伸

佐賀大学医学部分子生命科学講座・教授

目 次

I. 総括研究報告書 -----	1
間葉性異形成胎盤の臨床的・分子遺伝学的診断法の 開発を目指した基盤研究-----	2
副島英伸（佐賀大学医学部・分子生命科学講座・教授）	
II. 分担研究報告書 -----	9
間葉性異形成胎盤の臨床的・病理学的解析 -----	10
片渕 秀隆（熊本大学大学院生命科学研究部・産科婦人科学・教授）	
大場 隆（熊本大学大学院生命科学研究部・産科婦人科学・准教授）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	14
IV. 研究成果の刊行物・別冊 -----	17

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
総括研究報告書

間葉性異形成胎盤の臨床的・分子遺伝学的診断法の開発を目指した基盤研究

研究代表者：副島英伸
佐賀大学医学部分子生命科学講座
分子遺伝学・エピジェネティクス分野 教授

研究要旨

間葉性異形成胎盤(placental mesenchymal dysplasia, PMD)は、原因不明の胎盤形態異常で、妊娠中の超音波断層法にて部分胞状奇胎や胎児共存奇胎と類似した嚢胞状変化を呈する。誤診されると無用の人工流産を招くこと、高率に妊娠高血圧症候群・早産・胎児発育不全(FGR)・胎児死亡(IUFD)を合併することが問題である。本研究では、PMDの臨床診断基準を確立し、原因遺伝子の同定による病因・病態の解明および遺伝子診断の開発基盤を整え、臨床的ケア・治療法の開発を目指す。全ゲノムSNP解析を行った症例の91%に11p15領域のpatUPDのモザイクを認め、SNPアレイで解析できた6例全例がandrogenetic/biparentalモザイクであった。このことから、PMDの大半の症例はandrogenetic/biparentalモザイクであることが示唆される。HumanMethylation450BeadChipによるエピゲノム解析では、PMDで異常メチル化を示す遺伝子を5同定した。胎盤におけるメチル化は、妊娠週数による違い、個体差による違い、同一胎盤内での部位による違いが存在することから、今後これらの遺伝子については詳細且つ慎重に解析していく必要がある。

研究分担者

1. 片渕 秀隆
熊本大学大学院生命科学研究部・産科
婦人科学・教授
2. 大場 隆
熊本大学大学院生命科学研究部・産科
婦人科学・准教授

A. 研究目的

間葉性異形成胎盤(Placental mesenchymal dysplasia: PMD)は、胞状奇胎と類似した嚢胞状変化を呈するが、組織学的にはトロホプラストの異常増殖を認めない胎盤形態異常である。その頻度は分娩例の0.02%と

まれな病態とされてきたが、2007年以降、国内外での報告が急増しており、臨床診断基準の必要性が高まっている。この胎盤は超音波断層法にて嚢胞状変化を呈するため、部分胞状奇胎や胎児共存奇胎との鑑別を要し、誤診されると無用の人工流産を招く。また高率に早産、胎児発育不全(FGR)、胎児死亡(IUFD)を合併し、現時点でIUFDを予知する方法はない。そのため、鑑別ならびに適切な臨床的ケアのための臨床診断基準が必要かつ重要であるが、未だ確立されていない。本研究では、病理組織学的に診断された症例を収集し、レトロスペクティブに臨床情報を解析することで、臨床診断

基準の確立、病態の解明を行うことを目的とした。また、これらの検体を用いて原因遺伝子の同定、遺伝子診断の基盤開発を行い、最終的には臨床的ケア・治療法の開発を目指す。本研究の成果は、無用の人工流産を避け、適切な妊娠管理により生児獲得を可能にすることから、少子高齢化社会において重要な意義を持つと考えられる。

B. 研究方法

1. 症例の集積

今年度は 8 例の新規症例を得、合計症例数（凍結保存組織およびホルマリン固定切片など遺伝子解析可能症例）は 34 例となった。解析可能な DNA を抽出できた症例について以下の解析を行った。

2. 臨床情報解析・病理学的解析

分担研究報告書（研究分担者：片渕秀隆、大場隆）を参照。

3. エピゲノム解析

凍結 PMD 検体 5 例と妊娠週数を可能な限りあわせた正常胎盤 7 例より DNA を抽出し、HumanMethylation450 BeadChip (Illumina 社) を用いて、全ゲノムの DNA メチル化解析（ゲノム中の 47 万カ所の CpG のメチル化を解析）を行った。

4. 全ゲノム多型解析

全染色体に分布する 4 塩基反復配列マーカー (Short tandem repeat: STR) あるいは Genome-Wide Human SNP array 6.0 (Affymetrix 社) を用いて全ゲノムの多型解析を行った。一部の症例では、インプリント遺伝子 *p57^{KIP2}* と *PHLDA2* の遺伝子発現を定量リアルタイム RT-PCR で解析した。遺伝子発現量は *GAPDH* を内部コントロールとし補正した。

(倫理面への配慮)

本研究は、佐賀大学医学部倫理委員会、佐賀大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会、熊本大学大学院生命科学研究部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会

の承認を受けて実施した。

C. 研究結果

1. エピゲノム解析

凍結 PMD 検体 5 例と妊娠週数を可能な限りあわせた正常胎盤 7 例より DNA を抽出し、HumanMethylation450 BeadChip を用いて、全ゲノムの DNA メチル化解析を行った。得られたメチル化データに基づいたクラスター解析結果を図 1 に示す。

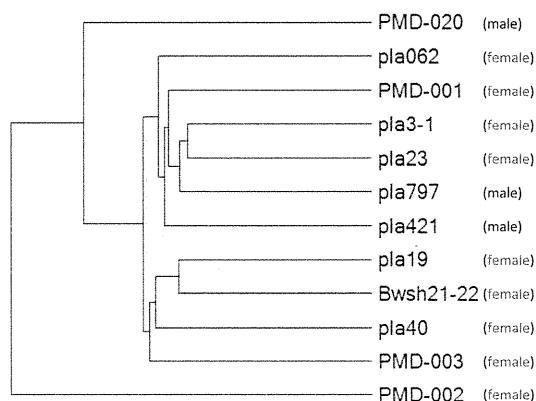


図 1 DNA メチル化に基づいたクラスター解析
凍結 PMD 検体 5 例と正常胎盤 7 例より DNA を抽出し、HumanMethylation450 BeadChip を用いて行った DNA メチル化データに基づくクラスター解析を示す。PMD と正常胎盤が入り交じっている。Pla: 正常胎盤、Bwsh21-22: BWS 合併 PMD

クラスター解析では、図のように PMD と正常胎盤が入り交じっており、PMD 特異的なクラスター形成は認められない。このことは、PMD 特異的なメチル化異常の存在の可能性が低いことを示す。しかし、HumanMethylation450 BeadChip は男女間でデータが異なるプローブが存在することが報告されている (Chen YA, et al., Epigenetics, 8(2):203-209, 2013)。このため、男女別に以下の条件で解析した。まず、女兒 PMD 群と女兒正常群を比較し、PMD 群でメチル化が 20% 以上変化している CpG サイトを選別した。男児群についても同様

に CpG サイトを選別し、女兒群で選択した CpG サイトと共通する CpG サイトを抽出した。次に、抽出した CpG サイトのうち、複数の CpG サイトが連続して異常値を示し、かつその部位がプロモーター近傍であるような遺伝子を絞り込んだ。この結果、PMD で高メチル化を示す遺伝子 2 個と低メチル化を示す遺伝子を 5 個同定した。

2. 全ゲノム SNP 解析

主に BWS の遺伝子座である 11p15 領域の STR を用いて解析した。解析できた 22 例中 20 例 (91%) に父性片親性ダイソミー (patUPD) のモザイクを認めた。このうち、17 例が isodisomy で 3 例が heterodisomy であった。また、20 例のうち 6 例について Genome-Wide Human SNP array 6.0 (Affymetrix 社) で解析したところ、全例全染色体 patUPD モザイク、つまり androgenetic/biparental モザイクであった。モザイク率は、10%程度～60%程度であった。一方、22 例中 2 例 (9%) は patUPD を認めず、このうち 1 例ではインプリント遺伝子の発現を制御する *KvDMR1* 領域の異常低メチル化を認めた。さらに、*KvDMR1* によって制御されるインプリント遺伝子である *p57^{KIP2}* (*CDKN1C*) と *PHLDA2* の遺伝子発現を定量リアルタイム RT-PCR で解析したところ、遺伝子発現量が低下していた (図 2)。

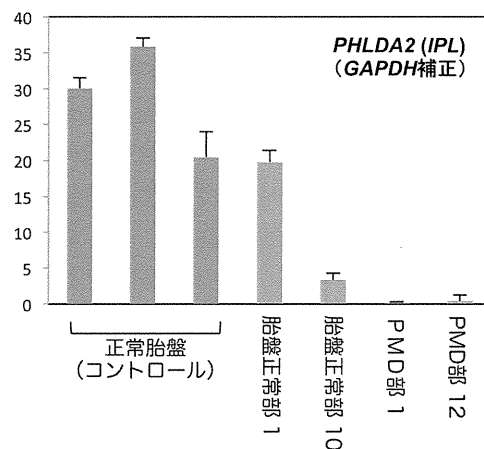
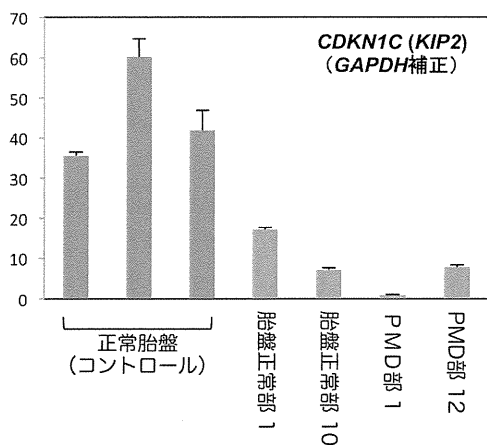


図 2 インプリント遺伝子発現解析

patUPD を認めず *KvDMR1* の異常低メチル化を示した PMD 胎盤での *p57^{KIP2}* (*CDKN1C*) と *PHLDA2* の遺伝子発現を定量リアルタイム RT-PCR で解析した。遺伝子発現量は内部コントロール *GAPDH* で補正した。正常コントロールに比べ肉眼的正常胎盤部でも肉眼的 PMD 部でも、両遺伝子ともに発現量の低下を認めた。

D. 考察

全ゲノム SNP 解析を行った症例の 91% に 11p15 領域の patUPD のモザイクを認め、SNP アレイで解析できた 6 例全例が androgenetic/biparental モザイクであった。このことから、PMD の大半の症例は androgenetic/biparental モザイクであることが示唆される。従って、臨床的に PMD を疑う場合は、絨毛生検を行い SNP アレイで解析することで診断できる可能性がある。androgenetic/biparental モザイクにおける androgenetic 細胞では、すべてのインプリント遺伝子が父型になっているため、ゲノム・インプリンティングの異常が関与している可能性がある。実際、1 例のみではあるが、正常 biparental 細胞で構成されている PMD 検体で *KvDMR1* 領域の異常低メチル化とそれに伴うインプリント遺伝子 *p57^{KIP2}* と *PHLDA2* の発現量低下を認めた。この結果は、*p57^{KIP2}* の免疫染色の結果ともよく合致していることから、11p15 のゲノム・

インプリンティング異常が PMD 発症に関与している可能性を示す。一方で、androgenetic/biparental モザイクの存在は、他のインプリント遺伝子の関与の可能性も示しているため、ゲノム中のインプリント DMR のメチル化を網羅的に解析する必要があると思われる。我々は、MALDI-TOF-MS および pyrosequence を用いたインプリント DMR の網羅的メチル化解析法を確立しているため、この方法を応用して解析を進めていきたい。

また、HumanMethylation450 BeadChip によるエピゲノム解析に基づくクラスター解析からは PMD 特異的なメチル化異常の存在の可能性が低いことが示唆された。しかしながら、男女別に解析し直したところ、PMD で高メチル化を示す遺伝子 2 個と低メチル化を示す遺伝子を 5 個同定した。胎盤におけるメチル化は、妊娠週数による違い、個体差による違い、同一胎盤内での部位による違いが存在することから、今後これらの遺伝子については詳細且つ慎重に解析していく必要がある。

E. 結論

PMD は新しい疾患概念で、頻度が極めて低いことから、病態の認知度が低かった。しかし、2007 年以降、論文数・症例報告数が急増していることから、国内外での認知が進んでいることがうかがえる。本研究において、本邦 PMD 症例に関する遺伝学的特徴および候補遺伝子を見出すことができた。今後、更なる症例を集積し、臨床情報解析および遺伝子解析を進めることで遺伝子診断も含めた診断基準確立や診療ガイドラインを策定することが肝要と思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.* 24(4):554-69, 2014

- 2) 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
- 3) Higashimoto K, Jozaki K, Kosho T, Matsubara 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
- 4) 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

- 5) 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
- 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) 大場隆、片渕秀隆、副島英伸. 間葉性異形成胎盤Placental mesenchymal dysplasia (PMD)の診断と原因遺伝子. *病理と臨床* 32(5):535-540, 2014
- 8) 東元健、副島英伸. Beckwith-Wiedemann症候群と小児腫瘍. *遺伝子医学MOOK25 エピジェネティクスと病気 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
- 9) 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
2. 学会発表
招待講演
- 1) 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
- 2) 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 一般発表
- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 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. 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)
- 5) 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)

- 6) 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)
- 7) 中山真悠子、岡陽一郎、近藤剛、村守克己、岩田はるか、城賀本敏宏、石田也寸志、東元健、副島英伸。経過観察中に Wilms 腫瘍を発症した父性ダイソミー型 Beckwith-Wiedemann 症候群の1例。第88回日本小児外科学会愛媛地方会 2013.11.17.
- 8) 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)
- 9) 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 2013.11.1-4. 筑波 (A-28 抄録集 p57)
- 10) 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)
- 11) 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、相馬賞受賞)
- 12) 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)
- 13) 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)
- 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。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)
- 15) 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)
- 16) 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)

- 17) 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

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

間葉性異形成胎盤の間葉性異形成胎盤の臨床的・病理学的解析

研究分担者：片渕秀隆

熊本大学大学院医学薬学研究部産婦人科学 教授

研究分担者：大場 隆

熊本大学大学院医学薬学研究部産婦人科学 准教授

研究要旨

間葉性異形成胎盤の臨床像を明らかにし、適切な周産期管理方針を模索するために国内症例を集積し検討した。PMDは女兒、および Beckwith-Wiedemann 症候群(BWS)との関連が強く、早産、胎児発育不全(FGR)や胎児死亡の危険が高かった。同一胎盤においても PMD の病変は均質ではなく、p57^{KIP2} の発現異常は診断の十分条件ではなかった。PMD を評価するためには標本を採取する段階から何らかの基準を設ける必要があると考えられた。

A. 研究目的

間葉性異形成胎盤(placental mesenchymal dysplasia, PMD)は胎盤の嚢胞状変化を呈する胎盤の形態異常である。発症機序は不明だが、高齢妊娠や生殖補助医療技術との関連が指摘されてきた。臨床的診断基準は確立されておらず、誤って胞状奇胎と診断されると無用の人工流産を招く恐れがある。さらに妊娠継続例は胎児発育不全(FGR)や機能不全を高率に合併するハイリスク妊娠となる。このため、臨床診断基準の確立と分子遺伝学的診断法の確立は極めて重要なテーマである。

本分担研究では本邦における PMD の臨床像を明らかにするとともに、系統的臨床病理学的解析を行うことにより、臨床的診断と分子遺伝学的診断開発のための基盤確立を目的とする。本研究により、人工流産の回避と胎児発育のリスクを考慮した周産期管理が可能になり、PMD 合併妊娠の無病出生率を向上させることが期待できる。このことは少子高齢化社会において重要な社会的意義をもつ。

B. 研究方法

1. 症例の集積

熊本大学医学部附属病院総合周産期母子医療センターあるいは協力医療機関で出産した症例で、巨大胎盤を呈した症例、あるいは児が Beckwith-Wiedemann 症候群(BWS)を疑われた症例について患者の同意を得たうえで胎盤を提供していただき、肉眼的観察ならびに臨床病理学的検討を行ってPMD症例を抽出した。また論文発表あるいは各種関連学会で報告されたPMDあるいはBWS症例について情報提供ならびに組織標本の提供を依頼した。

2. 臨床情報解析

PMD症例の妊娠経過、胎児発育経過、および新生児経過等を経時的に解析し、PMDの臨床的特徴を明らかにした。

3. 病理学的解析

既報の候補因子および共同研究者によるゲノム・エピゲノム解析で同定あるいは推定された候補遺伝子の産物について免疫組織化学染色を行うとともに、個々の胎盤におけるPMD病変の組織学的分布を精査した。

(倫理面への配慮)

研究責任者・担当者、ならびに各主治医は、

強制の下での同意にならないよう留意し、研究対象者には自らの意志にて研究に参加する事ができる権利、同意した後でも参加を撤回できる権利があることを説明した。研究の目的、方法、個人の秘密厳守を文章および口頭で説明し十分に理解していただき、自由意思により同意した対象のみを研究対象者とした。

臨床病理学的解析は流産または出産によって得られた絨毛および胎盤のみを対象とするので研究対象者にとっての危険はない。生児を出産し、胎盤がPMDと診断された場合には引き続き児についての解析を予定しているが、解析のための検体は末梢血のみでよく最小限の侵襲でこと足りる。また解析は研究費を以て行い、患者家族に金銭的負担はない。この解析は児のインプリンティング異常について診断するためのもので児の診療上有用な情報を提供することができる。

個人情報ならびに出産症例における同意文書は紙データに記載し研究責任者が鍵のかかる保管庫で管理した。研究責任者は研究対象者を連結可能匿名化し、その後に研究責任者・担当者が紙データの情報を電子化するので、電子媒体に研究対象者の名前、連絡先、カルテ番号等が登録されることはない。今回の検討で得られた情報は今回の研究目的以外には使用しない。研究成果を公表する場合には研究対象者はすべて匿名とする。

C. 研究結果

1. 症例収集ならびに臨床情報解析

今年度あらたに組織標本まで収集し得た症例は10例で、これまでに集積した31例の国内症例と併せて本邦における過去最大規模のPMDの症例集積となった。10例のうち、臨床情報のみの症例は3例、臨床情報に加えて組織標本の提供を受けたものは7例であった。10症例の平均年齢は 31.6 ± 4.2 歳、中央値は30.5歳であった。生殖補助医療を受けた症例は1例で、タイミング法で妊娠成立していた。

1例が妊娠16週で人工流産を選択していた。10例中6例が女児であった。妊娠を継続した9例のうち1例が妊娠20週で子宮内胎児死亡に至り、2例がFGRを呈した。生児を得た8例のうち

75.0%(6/8)が低出生体重児で、うち2例が出生体重1500g未満の極低出生体重児であった。出生した8例中3例に新生児DIC、1例に肝腫大および低血糖、1例に低アルブミン血症および胸腹水、1例に肝過誤腫が認められた。2例はBWSと診断された。

胎盤重量は分娩週数に関わらず正常胎盤重量と比較して大きい傾向にあった。胎盤重量(胎盤/胎児重量比)が大きいことは、分娩週数、出生時体重、BWSの合併と相関していなかった。2.PMDにおける $p57^{KIP2}$ の発現と臨床像との関連

PMDでは、cyclin-dependent kinase inhibitorの一種で父性インプリンティングを受ける $p57^{KIP2}$ 遺伝子の発現が絨毛内間質や血管を構築する細胞において消失することが報告されている。

準備的な検討により、同一胎盤におけるPMDの病変は肉眼的にも組織学的にも均一ではなく、また $p57^{KIP2}$ の発現消失も同一胎盤内で正常発現と混在することが示唆されていた。このため提供された組織標本を2名の病理専門医により病理組織学的に再評価し、PMDの診断を確定し得た16例についてPMD病変の分布を検討した。

13例は、複数の箇所から採取された検体全てについてヘマトキシリン-エオシン染色(HE)標本にてPMDと診断し得る領域が認められるとともに、正常胎盤の構築が様々な割合で混在していた。残る3例においてはPMDの所見が全く認められず、正常胎盤と評価される標本があった。

HE標本にて正常胎盤の構築を示す領域では、 $p57^{KIP2}$ の発現も正常であり、 $p57^{KIP2}$ 発現の異常を認めた例はなかった。いっぽうHE標本にてPMDの構築を示す領域では、 $p57^{KIP2}$ が正常発現を示す部位と、PMD型の発現を示す部位が混在していた。病変の重症度と臨床像には関連がみられた。

D. 考察

高度生殖補助医療によって出生した児ではインプリンティング異常症の危険が高まることが報告されており、その理由として培養操作

が胚DNAの異常なメチル化を惹起する可能性が示唆されている。PMDもまたその発症機序にインプリンティング異常が関与していることが示唆されているが、今回検討した国内症例では、PMDの発症と高齢妊娠、あるいは生殖補助医療との関連は見いだせなかった。

PMDは女兒に好発し、早産、FGRや胎児死亡の危険が高いことはこれまでの検討の通りであった。子宮内胎児死亡はBWSを合併しないPMD症例でのみ認められた。

本年度に集積した症例のうち、人工流産を選択された1例は妊娠15週で羊水穿刺を施行された数日後に破水したため、terminationが選択されており、胞状奇胎との鑑別を目的とした侵襲的な検査が流産の契機となった可能性は否定できない。

胎児死亡例の1例を含む4例においては、妊娠中からPMDが鑑別診断に挙がっており、子宮内胎児死亡および児の合併症の危険性について予め説明された上で、妊娠管理が継続されていた。

これまで集積した41症例における胎児死亡率は15.4%と、先行研究(Pham et al., Am J Clin Pathol. 2006, 126:67-78)の35.6%に比して低い値であったが、本年度は10.0%とさらに低い結果であり、22週以降に胎児死亡に至った症例はなかった。先行研究における胎児死亡は妊娠16週から36週で起こっていた。いっぽう本研究で集積した症例では、妊娠26-36週の間 termination が施行され、児の救命に至っていた。緊急帝王切開は3例で施行されており、適応はそれぞれ妊娠高血圧腎症の増悪、妊娠33週での前期破水、胎児機能不全であった。またPMDが妊娠中より疑われていた2例において計画的な誘導分娩が施行されていた。

胎盤におけるPMDの病変は肉眼的にも組織学的にも均質ではなく、病変の肉眼的、組織学的重症度と臨床像は相関していると推定された。絨毛内間質や血管を構築する細胞におけるp57^{KIP2}遺伝子の発現消失は、PMD診断の十分条件ではあるが必要条件ではないことが示唆された。

E. 結論

PMDの適切な周産期管理方針の確立は今後の課題だが、本邦の高次産科医療機関において高リスク妊娠に対して行われている周産期医療体制は、PMDの管理にも有効であると推定される。胎児死亡を回避すること、新生児合併症を予測することは今後の課題である。胎盤におけるPMDの病変は肉眼的にも組織学的にも均質ではなく、統一された評価方法の確立が必要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamaguchi M, Tashiro H, Motohara K, Ohba T, Katabuchi H. Primary strumal carcinoid tumor of the ovary: A pregnant patient exhibiting severe constipation and CEA elevation. *Gynecol Oncol*, 4:9-12, 2013

2) 大場 隆、坂口 勲、片渕秀隆. 「プロメテウス 婦人科がん最新医療」 絨毛性疾患 3. 絨毛性疾患の診断 (2) 画像診断、産婦人科の実際、62(12):2027-2031, 2013

2. 学会発表

1) 副島英伸、東元 健、八木ひとみ、青木早織、鮫島 梓、斉藤 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) 鹿児島県医師会館、鹿児島市

2) 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. 26) ウィンクあいち、名古屋市 (相馬賞受賞)

3) Ohba T, Miyoshi J, Fukunaga M, Katabuchi H. Clinical manifestations of early stage hydatidiform mole. The 3rd Biennial Meeting of Asian Society of Gynecologic Oncology / The 55th Meeting of Japan Society of Gynecologic Oncology. (2013.12.13-15) The Westin Miyako Kyoko, Japan

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
東元健、副島英伸	Beckwith-Wiedemann症候群と小児腫瘍	監修：佐々木裕之、編集：中尾光善、中島欽一	遺伝子医学MOOK25 エピジェネティクスと病気	メディカルドゥ	大阪	2013	195-201

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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 Research	24(4)	554-69	2014
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 <i>in vivo</i> leads to cancer development through altered epigenetic regulation.	Cell	156(4)	663-677	2014
Higashimoto K, Jozaki K, Kosho T, Matsubara 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 <i>IGF2/H19</i> -imprinting control region in a Beckwith-Wiedemann syndrome patient.	Clin Genet			published online:4 December, 2013
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

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
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
大場隆、片渕秀隆、副島英伸.	間葉性異形成胎盤Placental mesenchymal dysplasia (PMD)の診断と原因遺伝子	病理と臨床	32(5)	535-540	2014
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
Yamaguchi M, Tashiro H, Motohara K, Ohba T, Katabuchi H.	Primary strumal carcinoid tumor of the ovary: A pregnant patient exhibiting severe constipation and CEA elevation.	Gynecol Oncol	4	9-12	2013
大場隆、坂口勲、片渕秀隆.	「プロメテウス 婦人科がん最新医療」絨毛性疾患 3.絨毛性疾患の診断 (2)画像診断	産婦人科の実際	62(12)	2027-2031	2013

IV. 研究成果の刊行物・別冊

4. 不妊・先天異常

4) Beckwith-Wiedemann 症候群と小児腫瘍

東元 健・副島英伸

Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) は、小児腫瘍を合併しやすい過成長症候群である。原因遺伝子座である 11p15.5 領域には 2 つの刷り込みドメインが存在し、この領域のエピジェネティックあるいはジェネティックな異常によって発症する。発症原因によって小児腫瘍の合併リスクや種類が異なることが知られている。近年、11p15.5 領域に加え、他の刷り込み制御領域にも同時にエピジェネティックな異常を生じている症例が報告されており、エピジェネティック異常の分子機構の点から注目されている。また、BWS をはじめとする刷り込み疾患と生殖補助医療との関わりが示唆されている。

はじめに

Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) は、新生児期の過成長、巨舌、臍ヘルニア・臍帯ヘルニアを 3 主徴とし、その他に耳垂の線状溝・耳輪後縁の小窩、新生児期低血糖、腹腔内臓腫大、腎臓奇形、片側肥大、口蓋裂などの多様な症状を呈する。また報告によって異なるが (4～21%)、総じて約 7.5% の患者に Wilms 腫瘍、肝芽腫、神経芽腫などの小児腫瘍を発生する。発症原因は複数あり、11p15.5 領域のエピジェネティックな異常 (DNA メチル化異常) やジェネティックな異常による刷り込み遺伝子^{用解1}の発現異常あるいは機能喪失によって発症する。また、発症原因の多くを占める DNA メチル化異常と父性片親性ダイソミー (父性 UPD: paternal uniparental disomy)^{用解2}は、正常細胞と異常細胞が混在するモザイク^{用解3}であり、BWS 患者間ならびに同一患者の組織間でも、モ

ザイクの割合が異なることが知られている。このため、BWS 患者の示す症状とその重症度は多様である。

本稿では、BWS の発症メカニズム、発症原因別の代表的な表現型と小児腫瘍の合併リスクならびに腫瘍の種類を示す。また最近の見解として、11p15.5 領域に加え他の刷り込み制御領域 (ICR: imprinting control region)^{用解4}に DNA メチル化異常を伴う BWS ならびに生殖補助医療と BWS の関連について解説する。

I. 11p15.5 領域の刷り込み遺伝子の制御機構

11p15.5 領域には、刷り込み遺伝子がクラスターをなして存在し、ドメインレベルで制御されている。2 つのドメインがあり、テロメア側から *IGF2/H19* ドメイン、*KCNQ1* ドメインと呼ばれている。また各ドメインは、刷り込み遺伝子のアレ

key words

Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS), 小児腫瘍, 刷り込み遺伝子, 刷り込み制御領域 (ICR), メチル化可変領域 (DMR), *IGF2/H19* ドメイン, *KCNQ1* ドメイン, 生殖補助医療 (ART), 父性片親性ダイソミー (父性 UPD), マルチローカスメチル化異常