

201442038A

厚生労働科学研究委託費
難治性疾患等実用化研究事業

インプリンティング異常症および合併症発症メカニズムの解明：
患者由来iPS細胞を用いての研究に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 鏡 雅代

平成27（2015）年 3月

本報告書は、厚生労働省の難治性疾患等実用化研究事業委託事業による委託業務として、鏡雅代が実施した平成26年度「インプリンティング異常症および合併症発症メカニズムの解明：患者由来iPS細胞を用いての研究」成果を取りまとめたものです。

目次

I. 総括研究報告

インプリンティング異常症発症および合併症発症メカニズムの解明：患者由来iPS細胞を用いての研究

(独)国立成育医療研究センター研究所 鏡 雅代 ----- 1

II. 分担研究報告

1. iPS細胞作成および分化誘導

(独)国立成育医療研究センター研究所 阿久津 英憲 ----- 5

2. ゲノム・エピゲノム解析

(独)国立成育医療研究センター研究所 中林 一彦 ----- 8

3. UPD(14)pat 症候群神経症状病態解明のための研究

慶應義塾大学医学部小児科学教室 山澤 一樹 ----- 11

4. 検体収集、遺伝子診断

浜松医科大学 緒方 勤 ----- 13

5. 研究統括、検体収集、遺伝子診断、患者検体・iPS細胞・分化誘導細胞の解析

(独)国立成育医療研究センター研究所 鏡 雅代 ----- 19

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 23

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 31

インプリンティング異常症発症および合併症発症メカニズムの解明： 患者由来 iPS 細胞を用いての研究

研究代表者 鏡雅代 国立成育医療研究センター研究所分子内分泌研究部室長

研究要旨

希少疾患であるインプリンティング異常症の病態解明を目的に、患者皮膚細胞由来 iPS 細胞を樹立し、この細胞を分化させ解析に用いる。研究初年度である本年は Kagami-Ogata Syndrome (KOS14) 患者由来 iPS 細胞を 4 症例より樹立し、特性解析も進めた。KOS14 患者由来 iPS 細胞でのメチル化解析を終了し、親細胞と同様の 14 番染色体インプリンティング領域内のメチル化異常を同定した

A. 研究目的

希少疾患であるインプリンティング異常症は代表的な疾患として 8 疾患がある。8 インプリンティング異常症にはそれぞれ責任インプリンティング領域が存在し、責任インプリンティング領域が存在する染色体がどちらかの親に由来する片親性ダイソミー、インプリンティング領域を含む欠失、インプリンティング領域を制御しているメチル化可変領域 (DMR) のメチル化異常を認めるエピ変異、そして責任遺伝子が判明しているものとしては責任遺伝子の変異により責任インプリンティング領域内のインプリンティング遺伝子発現異常により発症する。インプリンティング遺伝子の発現状態は動物種によりことなることから、これまでヒトインプリンティング異常症の研究においてモデル動物を使った検討が不可能であったことから、インプリンティング異常症患者 iPS 細胞を用いた研究を着想した。インプリンティング異常症疾患モデル iPS 細胞を用いた研究テーマは以下の通りである。

研究目的①インプリンティング異常症エピ変異発症機序の解明：エピ変異はメチル化可変領域 (DMR) のメチル化異常を認め、ゲノム構造異常が否定された病態だが、epigenetic な異常か、未

知の genetic な異常なのか不明である。我々はエピ変異患者由来 iPS 細胞を作成し、メチル化および発現異常が体細胞初期化を経る iPS 細胞で再現されるか否かを検討する。

研究目的②KOS14 の病態および合併症の発症機構の解明：先行研究から Kagami-Ogata 症候群 (KOS14) (本年度我々の UPD(14)pat 症候群の研究への貢献が認められ Kagami-Ogata syndrome の疾患名が EUCID.net により認められた) 患者の全例に発達遅延、8.5%に肝芽腫合併が判明したことから、その発症機序を KOS14 患者由来 iPS 細胞を神経幹細胞、肝細胞に分化誘導これを用いて検討する。

B. 研究方法

1. 患者の集積、遺伝子診断(鏡、緒方)

鏡らは、8 インプリンティング異常症の包括的遺伝子診断システムをすでに開発しており、これまで 700 症例以上の遺伝子解析を施行している。遺伝子診断にて確定診断された症例のうち、皮膚片の採取が可能である手術予定症例の主治医に対し、iPS 細胞作成用皮膚片の採取を依頼し、採取施設での倫理申請および患者もしくは親の同意ののち、皮膚片を採取し、iPS 細胞樹立用に皮膚繊維芽細胞を保存する。

2. iPS 細胞の作製および分化誘導(阿久津、研究

協力者：三浦巧）

患者由来皮膚繊維芽細胞よりインプリンティング異常症患者由来 iPS 細胞を作成する。樹立した iPS 細胞については、免疫染色、テラトーマ形成試験といった特性解析を進める。特性解析にて、多能性、分化能が確認された iPS 細胞について、神経幹細胞、肝細胞に分化誘導する。

3. iPS 細胞、分化誘導した神経幹細胞、肝細胞の解析

研究テーマ①インプリンティング異常症エピ変異発症機序の解明（鏡、阿久津、中林、研究協力者：高田修治、松原圭子、佐野伸一郎、中村明枝）
エピ変異患者におけるメチル化異常、遺伝子発現異常が iPS 細胞で再現されるか否かの検討：樹立した iPS 細胞の DMR メチル化状態をパイロシーケンス法、ビーズアレイ法で検討する。エピ変異患者由来 iPS 細胞において親細胞と同様のメチル化異常を認めた場合は、メチル化異常の原因となる未知の構造異常の存在を推定し、エピ変異症例のエクソーム解析からエピ変異責任遺伝子の候補遺伝子を抽出し、機能解析実験、動物実験から責任遺伝子同定を試みる。

研究テーマ② KOS14 の病態および合併症の発症機構の解明（鏡、阿久津、山澤、研究協力者：高田修治、松原圭子、佐野伸一郎、中村明枝）

山澤らは、マウス脳の IG-DMR において 5mC の脱メチル化中間代謝産物である 5hmC が特徴的な分布を示すことを同定している。KOS14 患者では IG-DMR は高メチル化を示すことから、疾患モデル神経細胞 IG-DMR での 5mC および 5hmC の挙動を明らかにし、5mC→5hmC 変換酵素の TET タンパク投与でメチル化異常が改善するかを検討する。肝芽腫発症機序の解明は、KOS 疾患モデル iPS 細胞および正常コントロール iPS 細胞を肝細胞へ分化誘導し、KOS14 合併肝芽腫、非合併肝芽腫とともに網羅的遺伝子発現解析を行い、共通して変動する遺伝子を抽出し、候補遺

伝子に対しマウスモデルを作成し機能解析する。
（倫理面への配慮）

ヒト iPS 細胞樹立にあたっては、機関内倫理委員会で承認をうけた書面を用いて本人および家族に対しインフォームドコンセントを行う。採取した体細胞については、ゲノム・エピゲノム解析を行うので「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基いた書面によるインフォームドコンセントを同時に行う。ヒト iPS 細胞樹立のための体細胞採取施設においても設置されている倫理委員会の審査、承認を得たうえでそれを行う。国立成育医療研究センターにおいては、ヒト間葉系細胞の培養、肝芽腫検体の使用に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている（国立成育医療研究センター受付番号 518（平成 24 年 8 月 21 日承認）、同受付番号 538（平成 24 年 2 月 3 日承認））。実験動物を用いる研究については、国立成育医療研究センター動物実験指針に準拠して研究を実施する（承認番号 2003-002, 2005-003）。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。実験動物の管理については、施設契約において（株）JAC の技官が常駐し、SPF 区域の清浄度を保ちつつ動物飼育に専念している。

C. 研究結果

1. 患者の集積、遺伝子診断（鏡、緒方）

鏡らは、年間 200 症例以上のインプリンティング異常症表現型を示す患者の遺伝子解析を施行し、iPS 細胞樹立に必要な皮膚繊維芽細胞保存が可能である手術予定のある患者の主治医に対し、皮膚片採取の依頼を行い、KOS14 欠失症例 3 例、エピ変異 3 例で iPS 細胞において同意を得られ皮膚片を採取できた。

2. iPS 細胞の作製および分化誘導（阿久津、研究協力者：三浦巧）

iPS 細胞樹立はホストゲノムに外来遺伝子が挿入されないエピソーマルベクター法での樹立法を確立した。KOS14 欠失患者 2 名からそれぞれ 6 ライン、エピ変異患者 2 名からそれぞれ 4 ライン、iPS 細胞を樹立した。現在、エピ変異症例、欠失症例それぞれ 1 例で樹立中である。樹立した iPS 細胞は、テラトーマ形成実験、分化マーカーの免疫染色などの特性解析で三胚葉への分化能は確認され、神経幹細胞への分化誘導中である。

3. iPS 細胞、分化誘導した神経幹細胞、肝細胞の解析

研究テーマ①インプリンティング異常症エピ変異発症機序の解明（鏡、阿久津、中林、研究協力者：高田修治、松原圭子、佐野伸一郎、中村明枝）

パイロシーケンス法により 14 番染色体インプリンティング領域 IG-DMR, *MEG3*-DMR のメチル化状態を、ビーズアレイ法により全染色体の DMR についてメチル化解析を行った。KOS14 エピ変異患者由来 iPS 細胞において親細胞で認められる IG-DMR, *MEG3*-DMR の高メチル化は再現されたが、患者親細胞で正常だった 14 番染色体以外の DMR のメチル化異常を認めた。これは、親細胞でのメチル化異常が iPS 細胞で再現されたのか、iPS 細胞することにより 14 番染色体インプリンティング領域 DMR のメチル化が変化したのかの判断ができないことから、正常コントロール iPS 細胞におけるこれらの DMR のメチル化状態を検討する必要性が明らかとなった。

エピ変異が未知の genetic な異常である可能性も考え我々は、KOS14 エピ変異 6 症例、KOS14 と鏡像関係となる Temple 症候群（旧 UPD(14)mat 症候群）エピ変異 5 症例のエクソーム解析は両親とともに初年度に終了した（担当中林、鏡）。

研究テーマ② KOS14 の病態および合併症の発症

機構の解明（鏡、阿久津、山澤、研究協力者：高田修治、松原圭子、佐野伸一郎、中村明枝）

平成 26 年度は iPS 細胞から分化させた神経幹細胞における 5hmC 分布を検討するための解析法を確立した。酸化バイサルファイト法を導入したキット（日本では未販売）を用いて DNA を処理し、パイロシーケンス法、ビーズアレイ法で、5hmC と 5mC を区別して検出できることを、血液検体、購入した脳 DNA 検体で確認した。その結果、血液サンプルでは KOS14 エピ変異症例でもほ飛んで 5hmC は IG-DMR, *MEG3*-DMR には存在しないことが判明し、脳は血液に比較し 5hmC が多く分布することが判明した。肝芽腫合併の病態解明についての研究については、本年度は KOS14 非合併肝芽腫サンプル、生体肝移植余剰肝を採取した。

D. 考察

研究テーマ①インプリンティング異常症エピ変異発症機序の解明

KOS14 のエピ変異症例由来 iPS 細胞における網羅的メチル化解析の結果、14 番染色体インプリンティング領域内の IG-DMR, *MEG3*-DMR はともに高メチル化を示した。これは親細胞と同じものであるが、同時に、他のインプリンティング領域 DMR のメチル化異常を同定した。この領域は親細胞では正常であり、iPS 細胞化にあたりメチル化状態が変化した可能性がある。ヒト 14 番染色体インプリンティング相同領域において IG-DMR, *Gtl2* (= *Meg3*)-DMR のメチル化状態は iPS 細胞の品質（分化能）と関連があることが報告されていた。これは、ヒトにおいても相同領域の DMR が iPS 細胞化においてメチル化異常を受けやすい領域であることを示唆している。ヒトにおける正常コントロール iPS 細胞で、IG-DMR, *MEG3*-DMR のメチル化状態を詳細に検討した報告はこれまでに我々の知る限りではなく、正常コントロール

iPS 細胞におけるビーズアレイ法を用いた包括的メチル化状態の検討が必要と考えられる。	なし
研究テーマ② KOS14 の病態および合併症の発症機構の解明	なし
	2. 実用新案登録
	3. その他

5hmC の分布状態を明らかとするための酸化バイサルファイト法を用いたメチル化解析法を開発した。このキットを用いたメチル化解析の報告は一例認めるが、DMR のメチル化状態は検討しておらず、今回初めて DMR におけるメチル化状態を検討した。IG-DMR, *MEG3*-DMR の高メチル化を示す KOS14 エピ変異において、血液サンプルでは 5hmC はほとんど存在せず、コントロール脳の gDNA で 5hmC は比較的多く同定されることより、脳と血液では脱メチル化に差異が存在する可能性がある。

E. 結論

KOS14 エピ変異疾患モデル iPS 細胞、KOS14 欠失モデル iPS 細胞を樹立、特性解析を行った。KOS14 エピ変異疾患モデル iPS 細胞のメチル化解析で IG-DMR, *MEG3*-DMR の高メチル化を認めたが、親細胞で正常メチル化を示した DMR において異常メチル化を示しており、正常コントロール iPS 細胞での同様の解析が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

別表 4 を参考

2. 学会発表

各研究分担報告書に記載

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

iPS 細胞作成および分化誘導

研究分担者 阿久津英憲 国立成育医療研究センター研究所生殖医療研究部 部長

研究要旨

インプリンティング異常症エピ変異発症である UPD(14)pat 症候群の病態および合併症の発症機構解明へ向け、エピ変異患者由来 iPS 細胞樹立しその特性解析からエピ変異患者由来 iPS 細胞の性質評価を目指した。今年度は、複数の UPD(14)pat 症候群患者組織から iPS 細胞の樹立に成功し、その特性評価から多能性幹細胞の特性である未分化性と分化多能性を有していた。分子レベルでの疾患研究へ提供整備を整えるとともに、エピ変異の病態と関連する神経系および肝細胞組織への分化動態検証系を構築した。

A. 研究目的

インプリンティング異常症エピ変異発症機序の解明のため UPD(14)pat 症候群患者組織から iPS 細胞の樹立を行い、その特性を評価することを目指す。疾患研究への応用のため iPS 細胞試料提供系を整備し、エピ変異病態研究の促進へ貢献する。

B. 研究方法

UPD(14)pat 症候群患者組織から初代細胞を作製し iPS 細胞樹立へ応用する。iPS 細胞樹立は、ゲノム挿入されないエピソーマルプラスミドベクターによる初期化を行う。樹立された iPS 細胞に対しては、未分化マーカー (OCT4,SOX2,NANOG,TRA1-60 等) の発現解析を免疫組織染色法とアルカリフォスファターゼ染色法により行う。分化多能性評価については、in vitro 系と in vivo 系において行う。in vitro 系では、胚様体 (EB) を作製し三胚葉 (外胚葉: TUJ1, 中胚葉: α -smooth muscle actin; SMA, 内胚葉: SOX17) 分化を免疫組織染色法により行う。in vivo 系では、免疫不全マウスへの移植による奇形腫形成能試験を行い、組織解析を行う。樹立した細胞については、染色体ヒト核型解析を行う。

(倫理面への配慮)

ヒト iPS 細胞樹立は、機関内倫理委員会で承認

をうけた書面を用いて本人および家族に対しインフォームドコンセントを行う。ヒト iPS 細胞樹立のための体細胞採取施設においても設置されている倫理委員会の審査、承認を得たうえでそれを行う。国立成育医療研究センターにおいては、ヒト間葉系細胞の培養、肝芽腫検体の使用に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている (国立成育医療研究センター受付番号 518 (平成 24 年 8 月 21 日承認)、同受付番号 538 (平成 24 年 2 月 3 日承認)) また、最新の社会的な影響を十分に考慮する。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないように常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行う予定である。実験動物を用いる研究については、国立成育医療研究センター動物実験指針に準拠して研究を実施する(承認番号 2003-002, 2005-003)。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。実験動物の管理については、施設契約において (株) JAC の技官が常駐し、SPF 区域の清浄度を保ちつつ動物飼育に専念している。

C. 研究結果

Upd(14)pat : paternal uniparental disomy14 (14 番染色体父親性ダイソミー) 症候群の 3 患者組織からそれぞれ iPS 細胞の樹立に成功した。エピ変異患者由来 iPS 細胞株は未分化マーカー陽性であり、三胚葉組織への分化能も認められた。染色体核型解析では、正常ヒト染色体核型を有していた。

D. 考察

Upd(14)pat 症候群の疾患責任領域 DNA メチル化異常は、実験動物マウスで分化多能性の階層性に関わる重要領域であることが報告されている (Stadtfield, et al. Nature 2010)。今回、DNA メチル化変異が認められる細胞から多能性が獲得できることが初めて実証された。エピ変異患者由来 iPS 細胞では、通常の iPS 細胞同様に未分化マーカーの発現が認められ、自己複製能への影響も認められなかった。分化多能性については、三胚葉組織への分化が認められ、ヒト多能性幹細胞の特性を有していることが示された。今後は、疾患に関連する組織への分化誘導を行い疾患の臨床病態と関連した解析への展開を行う。

E. 結論

世界で初めて Upd(14)pat 症候群組織から複数のヒト iPS 細胞株を樹立することに成功した。エピ変異疾患研究の貴重なバイオツールとなり、この分野の疾患研究促進へ大いに貢献できる基盤が整備された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

英文

1) Fukuda A, Tomikawa J, Miura T, Hata

K, Nakabayashi K, Eggan K, ○Akutsu H*, Umezawa

A. The role of maternal-specific H3K9me3 modification in establishing imprinted X-chromosome inactivation and embryogenesis in mice. *Nature commun* 5:5464, 2014.

2) Nishi M, ○Akutsu H, Kudoh A, Kimura H, Yamamoto N, Umezawa A, Lee SW, Ryo A. Induced cancer stem-like cells as a model for biological screening and discovery of agents targeting phenotypic traits of cancer stem cell. *Oncotarget*. 5(18):8665-8680, 2014.

3) Okamoto N, Aoto T, Uhara H, Yamazaki S, ○Akutsu H, Umezawa A, Nakauchi H, Miyachi Y, Saida T, Nishimura EK. A melanocyte-melanoma precursor niche in sweat glands of volar skin. *Pigment Cell Melanoma Res*. 27(6):1039-1050, 2014.

4) Igawa K, Kokubu C, Yusa K, Horie K, Yoshimura Y, Yamauchi K, Suemori H, Yokozeki H, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, ○Akutsu H, Umezawa A, Katayama I, Takeda J. Removal of reprogramming transgenes improves the tissue reconstitution potential of keratinocytes generated from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med*. 3(9):992-1001, 2014.

5) Ichida JK, T C W J, Williams LA, Carter AC, Shi Y, Moura MT, Ziller M, Singh S, Amabile G, Bock C, Umezawa A, Rubin LL, Bradner JE, ○Akutsu H*, Meissner A*, Eggan K*. (*;corresponding author) Notch inhibition allows oncogene-independent generation of iPS cells. *Nat Chem Biol*. 10(8):632-639, 2014.

6) Sugawara K, Hamatani T, Yamada M, Ogawa S, Kamijo S, Kuji N, ○Akutsu H, Miyado K, Yoshimura Y, Umezawa A. Derivation of human decidua-like cells from amnion and menstrual blood. *Sci Rep* 4:4599, 2014.

7) Nishi M, Sakai Y, ○Akutsu H, Nagashima Y,

Quinn G, Masui S, Kimura H, Perrem K, Umezawa A,
Yamamoto N, Lee SW, Ryo A. Induction of cells with
cancer stem cell properties from nontumorigenic
human mammary epithelial cells by defined
reprogramming factors. *Oncogene* 33(5):643-652,
2014.

邦文

- 1) 阿久津英憲・川崎友之, 「ES細胞とiPS細胞,
どこが違うの？」 *Medical Technology*, 42
(9), 920-926; 2014.
- 2) 阿久津英憲・川崎友之, 「ES細胞, iPS細胞で
何ができるの? 何が変わるの？」 *Medical
Technology*, 42 (10), 1037-; 2014.
- 3) 阿久津英憲・川崎友之, 「ES細胞, iPS細胞研
究のこれから—再生医療の実用化に向けたルー
ルを学ぼう」 *Medical Technology*, 42 (11),
1156-; 2014.

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

インプリンティング異常症発症および合併症発症メカニズムの解明

分担課題：ゲノム・エピゲノム解析

研究分担者 中林一彦（国立成育医療研究センター研究所・周産期病態研究部）

研究要旨

本課題は、インプリンティング異常症患者由来のiPS細胞の樹立・解析を通じて、①エピ変異発生機序の解明、②病態および合併症発症機構の解明、を推進することを研究目的としている。その中で、本分担研究においては、樹立されたiPS細胞のゲノム・エピゲノム解析を担当する。本年度は、Kagami-Ogata syndrome(KOS14)患者由来細胞とそこから樹立されたiPS細胞についてアレイ法によりゲノムワイドDNAメチル化データを取得した。更にインプリント制御領域のDNAメチル化データを迅速に抽出・可視化する解析系を整備した。

A. 研究目的

Kagami-Ogata syndrome(KOS14)患者由来細胞とそこから樹立された iPS 細胞についてゲノムワイド DNA メチル化プロファイルを取得し、インプリント制御領域のメチル化様式を明らかにする。

B. 研究方法

解析対象細胞由来のゲノム DNA を bisulfite 処理・精製・濃度測定した。各検体につき 1500ng の bisulfite DNA をアレイ解析(Illumina 社 Infinium HumanMethylation450 BeadChip 法)に供した。この方法では 45 万箇所の CpG サイトの DNA メチル化レベルが測定できる。

本研究分担者らが網羅的解析(Court, Tayama et al. Genome Research 2014) で同定した合計 57 箇所のインプリント制御領域 (differentially methylated region, DMR) に対応する 889 個の CpG サイトを上記アレイでの測定対象 CpG サイト (45 万箇所) から選抜した。

KOS14 患者 4 例の皮膚ならびに血液、皮膚由来繊維芽細胞を親細胞として得られた iPS 細胞 (合計 7 クローン) について Infinium HumanMethylation450 データを取得し、DMR の DNA メチル化データを抽出・可視化した。

(倫理面への配慮)

ヒトゲノム遺伝子解析研究の倫理指針をはじめとした関連する法令・指針を遵守し、倫理審査委員会の審査を受け、施設の長の承認を得て研究を遂行した(国立成育医療研究センター受付番号 518 (平成 24 年 8 月 21 日承認)、同受付番号 538 (平成 24 年 2 月 3 日承認))。

C. 研究結果

① データ品質管理方法の検討：

今後解析するデータは取得時期や施設が異なる可能性を考慮し、実験バッチ間データ補正法として quantile normalization 法ならびにより強力な補正法である ComBat 法 (経験ベイズ法) を採用した。

② ゲノムワイド DNA プロファイルの取得

KOS14 患者 4 例の皮膚ならびに血液、iPS 細胞 (合計 7 クローン) について Infinium HumanMethylation450 データを取得した。階層クラスタリング結果を図 1 に示した。

③ インプリント DMR のメチル化測定プローブ選別とデータ可視化

表 1 に示したインプリント DMR に対応する 889 プローブ (CpG sites) を選別し、上記の Infinium HumanMethylation450 データから、抽出した。各検体における個々の DMR のメチル化レベルが視覚的に把握しやすいように heatmap 表示した(図 2)。

D. 考察

親細胞のメチル化状態が維持される DMR も存在する一方で、iPS 化による DMR メチル状態の攪乱が複数の DMR で観察された。同じ細胞由来の独立なクローンで異なるメチル化様式が観察される場合もあったことから、メチル化攪乱はランダムに起こると考えられる。但し、これが周辺ゲノム配列変化を伴うか否かについては現時点では不明である。iPS 細胞をインプリンティング疾患モデルとして用いる際は、対象解析領域の DMR メチル化状態が期待された様式に保たれていることを予め判定しておく必要があることが明確となった。

E. 結論

今年度は、Infinium HumanMethylation450 データ (>450,000 プローブ) から 889 個の DMR プローブのメチル化データを抽出・可視化する体制を整えた。来年度により多くの細胞クローンについて同様の解析を行うことが予想されるが、この解析系により迅速な対応が可能である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyata K, Miyata T, Nakabayashi K, Okamura K, Naito M, Kawai T, Takada S, Kato K, Miyamoto S, Hata K, Asahara H (2015) DNA methylation analysis of human myoblasts during in vitro myogenic differentiation: de novo methylation of promoters of muscle-related genes and its involvement in transcriptional down-regulation. *Hum Mol Genet* 24:410-23
- 2) Maeda T, Higashimoto K, Jozaki K, Yatsuki H, Nakabayashi K, Makita Y, Tonoki H, Okamoto N, Takada F, Ohashi H, Migita M, Kosaki R, Matsubara K, Ogata T, Matsuo M, Hamasaki Y, Ohtsuka Y, Nishioka K, Joh K, Mukai T, Hata K, Soejima H (2014) Comprehensive and quantitative multilocus methylation analysis reveals the susceptibility of specific imprinted differentially methylated regions to

- aberrant methylation in Beckwith-Wiedemann syndrome with epimutations. *Genet Med* 16:903-12
- 3) Fukuda A, Tomikawa J, Miura T, Hata K, Nakabayashi K, Eggan K, Akutsu H, Umezawa A (2014) The role of maternal-specific H3K9me3 modification in establishing imprinted X-chromosome inactivation and embryogenesis in mice. *Nat Commun* 5:5464
 - 4) Kagami M, Mizuno S, Matsubara K, Nakabayashi K, Sano S, Fuke T, Fukami M, Ogata T (2014) Epimutations of the IG-DMR and the MEG3-DMR at the 14q32.2 imprinted region in two patients with Silver-Russell syndrome-compatible phenotype. *Eur J Hum Genet* Nov 5 [Epub ahead of print]
 - 5) Romanelli V, Nakabayashi K, Vizoso M, Moran S, Iglesias-Platas I, Sugahara N, Simón C, Hata K, Esteller M, Court F, Monk D (2014) Variable maternal methylation overlapping the nc886/vtRNA2-1 locus is locked between hypermethylated repeats and is frequently altered in cancer. *Epigenetics* 9:783-90

2. 学会発表

- 1) 中林一彦, Court Franck, 田山千春, Romanelli Valeria, 副島英伸, 和氣徳夫, Esteller Manel, 緒方勤, 秦健一郎, Monk David (2014) Genome-wide parent-of-origin DNA methylation analysis reveals the intricacies of the human imprintome and suggests a germline methylation independent control of imprinting in the placenta 日本エピジェネティックス研究会第 8 回年会 (東京)
- 2) 河合智子, 安部晃生, 嘉村浩美, 山田崇弘, 赤石理奈, 水上尚典, 中林一彦, 秦健一郎 (2014) 「妊婦の妊娠期体重増加量と胎盤エピゲノム変化」 日本エピジェネティックス研究会第 8 回年会 (東京)

平成 26 年度厚生労働科学研究委託費（難治性疾患等克服研究事業
（難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業））
分担研究報告書

Known Imprinted DMRs (n=36)							Novel DMRs (n=29)						
Locus	Chr	Extent (WGBS, hg19) Start End	# Infinium probes	GC Content	# CpG	Methylation origin	Locus	Chr	Extent (WGBS, hg19) Start Finish	# Infinium probes	GC Content	# CpG	Methylation origin
<i>DIRAS3</i>	1	88515433 88517545	1	0.5	88	M	Novel DMRs near known Imprinted Loci (n=8)						
<i>ZDF2</i>	2	207114583 207138544	8	0.43	430	P	<i>DIRAS3 Ex2</i>	1	88512505 88513486	8	0.52	39	M
<i>NAP1L5</i>	4	86610164 86619237	15	0.57	57	M	<i>MEOB</i>	14	101373741 101371410	1	0.86	43	M
<i>FAM60B</i>	6	3890302 3890359	26	0.63	90	M	<i>SNRPB intragenic CpG32</i>	15	24345736 24347142	1	0.59	30	M
<i>PLAGL1</i>	6	144309378 144326898	16	0.51	143	M	<i>SNRPB intragenic CpG28</i>	15	24671872 24672870	1	0.59	30	M
<i>IGFBP2</i>	8	100426558 100427551	2	0.7	74	M	<i>SNRPB intragenic CpG30</i>	15	24727553 25018586	1	0.66	29	M
<i>GRB10</i>	7	50848726 50851312	9	0.6	171	M	<i>SNRPB intragenic CpG40</i>	15	25017824 25018586	4	0.51	67	M
<i>PEG10</i>	7	94285537 94287990	53	0.6	116	M	<i>ZNF597</i>	16	3481801 3482388	2	0.54	29	M
<i>MEST</i>	7	130130122 130134388	56	0.64	226	M	<i>ZNF131</i>	19	54057086 54058425	4	0.86	102	M
<i>PEG15/TRAPP3</i>	8	141108147 141111081	8	0.82	105	M	Novel DMRs (n=6)						
<i>INPP5F2</i>	10	121678046 12167827	4	0.59	52	M	<i>LOC728448/PPEL</i>	1	40024826 40025540	4	0.54	30	M
<i>H19</i>	11	2010312 2024740	46	0.6	250	P	<i>WDR27</i>	6	170054504 170055618	2	0.56	58	M
<i>IGF2 DMR2</i>	11	2153091 2155112	9	0.65	63	P	<i>HTR5A</i>	7	154862719 154863382	6	0.82	55	M
<i>IGF2 DMR0</i>	11	2198333 2199768	1	0.62	33	P	<i>IGF2BP2/ERLIN2</i>	8	37604092 37606088	7	0.45	37	M
<i>Kv-DMR1</i>	11	2719948 2722259	30	0.67	192	M	<i>WRE</i>	21	40757510 40758276	4	0.81	43	M
<i>RB1</i>	13	40892341 40895763	12	0.53	196	M	<i>NHP2L1</i>	22	42677774 42678673	0	0.54	63	M
<i>IG-DMR</i>	14	101275127 101278658	0	0.62	64	P	Placental-specific DMRs (n=17)						
<i>MEG3</i>	14	101290521 10129378	33	0.6	186	P	Known imprinted DMRs (n=2) & novel DMRs (n=15)						
<i>MEFN3/mR 400</i>	15	23007306 23012495	12	0.44	106	M	<i>GPR1-A5</i>	2	207669067 207689445	3	0.49	86	M
<i>MACEL2</i>	15	23092425 23094029	6	0.55	51	M	<i>MCC1</i>	3	162815725 162817627	13	0.54	94	M
<i>NDN</i>	15	25031451 25032759	8	0.65	106	M	<i>PDE4D</i>	5	58333774 58336564	7	0.54	145	M
<i>SNRPB</i>	15	25068594 25069481	8	0.47	19	M	<i>LIN28B</i>	8	105402631 105402559	8	0.46	62	M
<i>SNRPB</i>	15	25093308 25093829	4	0.49	44	M	<i>AIM1</i>	6	106957945 106961974	19	0.54	203	M
<i>SNRPB</i>	15	25123027 25123906	5	0.47	45	M	<i>AOBL3</i>	7	154671024 154672011	12	0.59	74	M
<i>SNURF</i>	15	25290304 25291676	7	0.6	115	M	<i>ZFAT</i>	8	136707227 136710114	69	0.6	111	M
<i>IGFBP2</i>	16	96108196 96109650	7	0.51	66	M	<i>GLIS3</i>	9	4292779 4300182	9	0.83	235	M
<i>ZNF587/NAT15</i>	16	5492328 3494463	11	0.54	76	P	<i>DCAF10</i>	9	37800140 37802937	5	0.56	157	M
<i>ZNF131</i>	19	54040510 54042112	11	0.64	125	M	<i>FAM195A/DOCK1</i>	10	128993405 128995242	10	0.72	198	M
<i>PEG3</i>	19	57348493 57353271	36	0.59	221	M	<i>ZC3H12C</i>	11	108952727 108964784	9	0.86	198	M
<i>MCTS2/MIM1</i>	20	36134993 36135633	9	0.48	47	M	<i>KOHL1</i>	13	33030994 33030440	13	0.66	136	M
<i>BLCAP/PNAT</i>	20	36140304 36150526	35	0.55	135	M	<i>ROM1</i>	15	93614998 93616855	8	0.81	134	M
<i>L3MBTL</i>	20	42142365 42144040	25	0.85	84	M	<i>FAM60A</i>	17	66501855 66507643	4	0.72	162	M
<i>NESP</i>	20	57414130 57418612	25	0.57	257	P	<i>ZNF196</i>	18	32952610 32957580	9	0.84	85	M
<i>NESP4/SONAS4/S1</i>	20	57425540 57428333	62	0.61	426	M	<i>MIR612-1 cluster (CTNMC)</i>	19	54152615 54155660	6	0.53	216	M
<i>GNASXL</i>	20	57493805 57493463	6	0.65	200	M	<i>DIMP1</i>	19	10303306 10306411	10	0.66	129	M
<i>GNASEx1A</i>	20	57493385 57495201	36	0.07	196	M							

表 1: ヒトゲノムにおける 57 箇所の DMR 領域

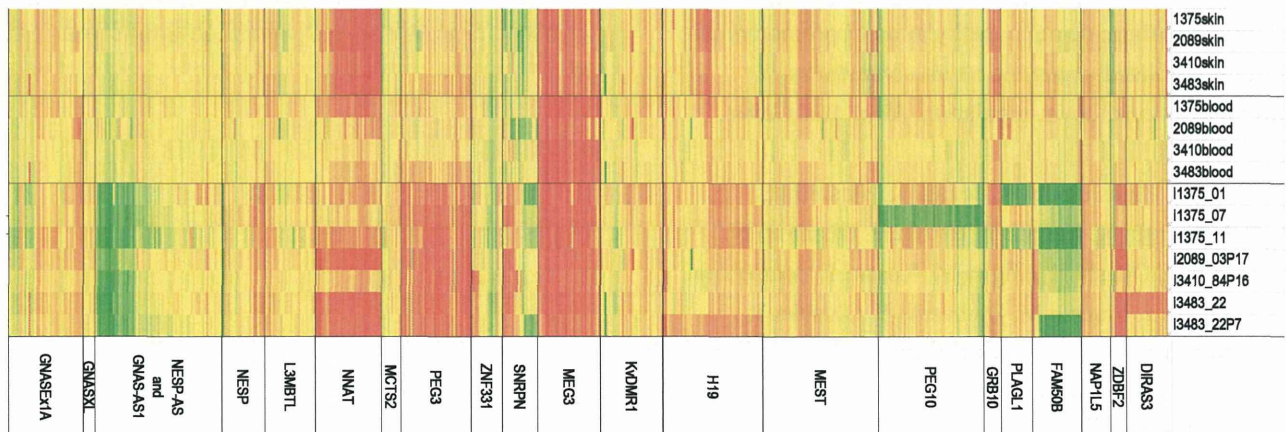
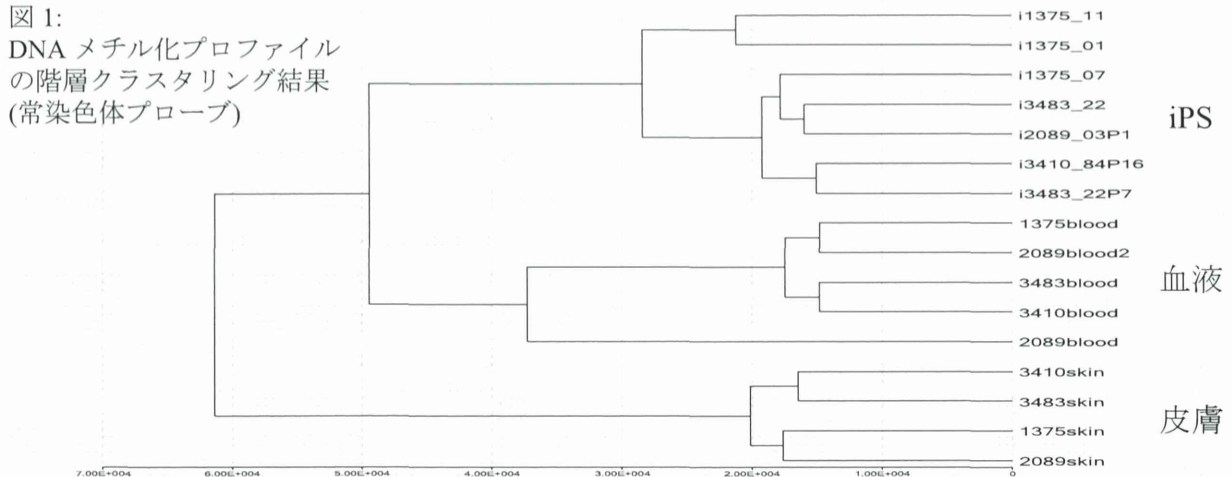


図 2: 代表的な DMR 領域 20 箇所における DNA メチル化レベルのヒートマップ表示 (緑 0% ⇔ 赤 100%)

UPD(14)pat 症候群神経症状病態解明のための研究

研究分担者 山澤一樹 慶應義塾大学医学部小児科学教室 助教

研究要旨

5-hydroxymethylcytosine (5hmC) の分布を一塩基レベルの解像度でゲノムワイドに解析する実験系を確立した。エピ変異により鏡-緒方症候群 (Kagami-Ogata syndrome: KOS14) を発症した症例の末梢血由来DNAサンプルにおいては、5hmC含有量が少なく、特徴的な5hmCの分布は確認できなかった。脳サンプルには5hmCが多く含まれることから、KOS14患者由来のiPS細胞から分化した神経細胞を用いて同様の解析を行う予定である。

A. 研究目的

鏡-緒方症候群 (Kagami-Ogata syndrome: KOS14) は胎児期より羊水過多、胎盤過成長を呈し、出生後はベル型と形容される小胸郭、臍帯ヘルニアなどの腹壁の異常、特徴的な顔貌などを示すインプリンティング異常症である。先行研究から KOS14 患者の全例に発達遅延を認め、8.5%に肝芽腫を合併したことが明らかとなり、これらの病態の解明は患者の予後向上に必要である。本研究は KOS14 患者由来 iPS 細胞を作成し分化誘導した神経細胞、肝細胞を用いて行う。特に本研究分担者（山澤）は疾患モデル神経細胞を用い、脱メチル化にかかわる 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) の挙動に注目し、KOS14 患者の発達予後の改善に寄与する治療法を開発することを目的とする。

B. 研究方法

KOS14 患者全例に認められる精神運動発達遅延の病態を解明するため、患者由来 iPS 細胞から分化させた神経細胞を用いて 5hmC の挙動を検討する。本年度は予備実験として、5hmC と 5mC を区別してメチル化状態を評価する実験系を構築した。従来のバイサルファイト法では、5hmC と 5mC とを識別することは不可能であったが、最近

開発された酸化バイサルファイト法により、一塩基の解像度で C、5mC、5hmC の同定が可能となった。本研究では、エピ変異による KOS14 患者 4 例の末梢血ゲノム DNA および購入した成人脳由来ゲノム DNA を、酸化バイサルファイト処理あるいは通常のバイサルファイト処理をしたのち、メチル解析用ビーズチップを用いて DNA のメチル化およびヒドロキシメチル化状態をゲノムワイドに解析した。

（倫理面への配慮）

本研究は（独）国立成育医療研究センター倫理委員会の承認を得たうえで行われている。遺伝子解析は匿名化のうえで、十分なインフォームドコンセントを文書により得たのちに行われている。

C. 研究結果

解析の結果、既に報告されている通り、5hmC は脳に多く含まれることが確認された。一方で KOS14 患者末梢血 DNA に特徴的な 5hmC の分布パターンは認められず、エピ変異を生じた IG-DMR やその他のインプリンティングセンターにおいても 5hmC はほとんど検出されなかった。ゲノムワイドにみると末梢血 DNA でも 5hmC 含有量の多い領域が複数認められた。

D. 考察

酸化バイサルファイト法とビーズチップを用いた（ヒドロキシ）メチル化解析を行い、エピ変異により KOS14 を発症した症例の血液由来 DNA サンプルにおける 5hmC の分布を解析した。実験系の構築に成功し、脳に 5hmC が多く含まれることを確認できたが、一方で既に報告されている通り末梢血中にはそもそもの 5hmC 含有量が少なく、エピ変異症例で特徴的な 5hmC の分布パターンは末梢血 DNA では確認できなかった。我々はマウスの脳組織の IG-DMR において 5hmC が特異な分布パターンを示すことを見出しており（投稿準備中）、また脳には 5hmC が多く含まれることから、KOS14 症例の神経細胞において 5hmC が重要な役割を果たしている可能性がある。来年度以降は計画通り、KOS14 患者由来の iPS 細胞を神経細胞に分化し、今回構築したヒドロキシメチル化を分析する実験系による解析を行う予定である。

E. 結論

エピ変異により KOS14 を発症した症例の末梢血由来 DNA サンプルにおいては、5hmC 含有量が少なく特徴的な 5hmC の分布は確認できなかった。引き続き、KOS14 患者由来の iPS 細胞から分化した神経細胞を用いて同様の解析を行う予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Radford EJ, Ito M, Shi H, Corish JA, Yamazawa K, Isganaitis E, Seisenberger S, Hore TA, Reik W, Erkek S, Peters AH, Patti ME, Ferguson-Smith AC. In utero undernourishment perturbs the adult sperm methylome and intergenerational metabolism.

Science 345(6198):1255903, 2014.

- 2) Yamada M, Yamazawa K*, Sekiguchi S, Shinjoh M, Tomita K, Takenouchi T, Takahashi T. A pediatric case of antibiotic-associated hemorrhagic colitis caused by *Klebsiella Oxytoca*. *Glob Pediatr Health* 2014
doi: 10.1177/2333794X14550525.

2. 学会発表

- 1) 山澤一樹、鏡雅代、松原圭子、中村明枝、深見真紀. メチル化異常に起因するヒトインプリンティング異常症においてヒドロキシメチル化の果たす役割の解明、第 48 回小児内分泌学会、浜松、2014 年 9 月.
- 2) Kazuki Yamazawa, Anne C Ferguson-Smith. Allele-specific distribution of 5-hydroxymethylcytosine at imprinting control regions, The 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, October 2014.
- 3) 山澤一樹、鏡雅代、松原圭子、中村明枝、深見真紀. メチル化異常に起因するヒトインプリンティング異常症においてヒドロキシメチル化の果たす役割の解明、日本人類遺伝学会第 59 回大会、東京、2014 年 11 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

インプリンティング異常症発症および合併症発症メカニズムの解明：
患者由来 iPS 細胞を用いての研究
検体収集、遺伝子診断

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、本研究の目的はインプリンティング異常症発症機序の解明と、iPS細胞を用いたゲノム・エピゲノム解析である。研究分担者は、この中で、症例収集と遺伝子診断を担当している。

本年度の成果には以下のものが含まれる。(1) Silver-Russell 症候群が Temple 症候群発症機序である第 14 染色体インプリンティング領域のエピ変異や CDKN1C を含む第 11 染色体短腕遠位部の重複により生じることを明らかとした。(2) Silver-Russell 症候群類縁疾患である IMAGE 症候群患者において CDKN1C 変異を同定した。(3) Kagami-Ogata 症候群の詳細な臨床像を決定した。

これらの成果は、インプリンティング疾患の臨床像や発症機序を明確とするものであり、それに基づく治療法の開発に繋がるものと期待される。

A. 研究目的

本研究班の目的は、本研究の目的はインプリンティング異常症発症機序の解明と、iPS細胞を用いたゲノム・エピゲノム解析である。研究分担者は、この中で、症例収集と遺伝子診断を担当している。

研究分担者は、本年度、Silver-Russell 症候群およびその関連疾患である IMAGE 症候群の発症機序の解明と、Kagami-Ogata 症候群の詳細な臨床像を決定した。

B. 研究方法

対象：臨床的に Silver-Russell 症候群と診断された 5 例と IMAGE 症候群と診断された 3 例、ならびに、臨床的および分子遺伝学的に Kagami-Ogata 症候群 Kagami-Ogata syndrome (KOS14) と診断された日本人患者 34 例である。

(倫理面への配慮)

遺伝学的解析：本研究の遂行にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子解析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で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、シーケンズ解析、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全て行った。

C. 研究結果

1) Silver-Russell 症候群における第 14 染色体インプリンティング領域のエピ変異の同定。

われわれは、Silver-Russell 症候群と臨床診断された患者の包括的メチル化解析を行い、2 例において第 14

染色体インプリンティング領域のエピ変異を同定した (表 1、図 1)。

表 1. 2 例の臨床像

	Case 1 46,XY	Case 2 46,XX
Genetic cause	Euploidation	Euploidation
SRS diagnosis criteria ^a		
Mandatory criteria for SRS		
BL and/or BW ≤ -2 SDS	+	+
Scoring system criteria for SRS		
Relative macrocephaly at birth ^b	+	+
PH ≤ -2 SDS at 2 years	+ (-2.2 SD)	+ (-3.6 SD)
Prominent forehead	+	+
Body asymmetry	+	+
Feeding difficulties	-	-
Other findings		
Gestational age (weeks)	41	37
BL cm (SDS)	46.5 (-2.1)	36.5 (-6.0)
BW kg (SDS)	2.2 (-2.7)	1.2 (-4.6)
POFC cm (SDS)	32.5 (-0.7)	30.0 (-2.0)
Present age (years:months)	9:6	9:2
PH cm (SDS)	120.4 (-2.3)	125.5 (-1.0) ^c
PW kg (SDS)	26.5 (-0.7)	22.3 (-1.2)
BMI (kg/m ²) (SDS)	18.3 (+1.0 SD)	18.2 (-1.1)
POFC cm (SDS)	51.5 (-0.9)	50.3 (-1.5)
Relative macrocephaly at present ^d	-	-
Triangular face	+	+
Ear anomalies	-	-
Irregular teeth	+	+
Clinodactyly	+	+
Brachydactyly	+	+
Simian crease	+	+
Muscular hypotonia	+	-
Speech delay	+	-

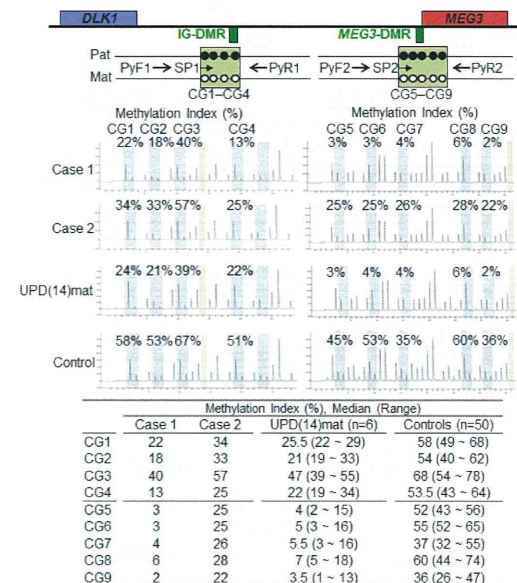


図 1. 第 14 染色体インプリンティング領域の低メチル化 (エピ変異)。

これは、Silver-Russell 症候群と Temple 症候群が臨床的にオーバーラップすることを示す新しいデータである。また、Temple 症候群においても骨格の左右非対称が生じうることを示唆するデータである。

2) Silver-Russell 症候群における CDKN1C を含む第 11 染色体短腕遠位部重複の同定。

われわれは、Netchine らが提唱した Silver-Russell 症候群の診断基準を満足するが、骨格の左右非対称のない 3 例において、CDKN1C を含む第 11 染色体短腕遠位部の重複を同定した。(表 2、図 2)。さらに、文献解析により、類似の重複を有する 15 例中 14 例において骨格の左右非対称が認められないことを見出した。これは、CDKN1C の重複が、既に報告されている CDKN1C の軽度機能亢進変異同様、骨格の左右非対称のない Silver-Russell 症候群のサブタイプを招くことを示唆する。

表 2. Clinical features of case 1-3 and reported cases with duplications of maternally derived chromosome 11p15 involving CDKN1C

	Case 1 Family A Female	Case 2 Family A Male	Case 3 Family B Female	Reported cases (n=16) Ref. 11-19
Silver-Russell syndrome phenotype				
Mandatory criteria for SRS				
BL and/or BW ≤ -2 SDS	+	+	+	16/16
Scoring system criteria for SRS				
Relative macrocephaly at birth ^a	Unknown	+	+	11/11
PH ≤ -2 SDS at ≥ 2 years	+	Unknown	+	14/14
Prominent forehead	+	+	+	8/9
Body asymmetry	+	-	-	1/15
Feeding difficulties	-	-	Unknown	6/6
Other findings				
Gestational age (weeks)	39	32	32	22-38
Oligohydramnios	Unknown	+	+	Unknown
BL cm (SDS)	38.0 (-4.9)	34.0 (-3.3)	32.0 (-3.9)	N.D.*
BW kg (SDS)	1.3 (-5.3)	0.87 (-3.6)	0.82 (-3.7)	N.D.*
BOFC cm (SDS)	29.5 (-2.7)	28.3 (-0.6)	27 (-1.2)	N.D.*
Present age (years:months)	14:00	1:03	3:03	1-31
PH cm (SDS)	130.7 (-4.7)	60.8 (-6.4)	70.7 (-6.7)	N.D.*
PW kg (SDS)	37.5 (-1.2)	4.8 (-5.3)	6.8 (-4.0)	N.D.*
BMI (kg/m ²) (SDS)	22.0 (0.7)	13.1 (-2.8)	13.6 (-1.5)	N.D.*
POFC cm (SDS)	Unknown	45.0 (-0.5)	48.5 (-0.1)	N.D.*
Relative macrocephaly at present ^b	Unknown	+	+	14/15
Triangular face	-	+	+	12/16
Ear anomalies	-	-	+	8/11
Irregular teeth	Unknown	+	+	1/2
Clinodactyly	+	+	+	10/11
Brachydactyly	+	+	-	4/5
Simian crease	+	+	-	1/2
Muscular hypotonia	Unknown	+	+	4/7
Developmental/speech delay	+	+	+	11/15
IMAGe syndrome phenotype				
IUGR	+	+	+	16/16
Metaphyseal dysplasia	-	-	-	Not described
Adrenal hypoplasia	-	-	-	Not described
Genital abnormality	(Female)	-	(Female)	Not described

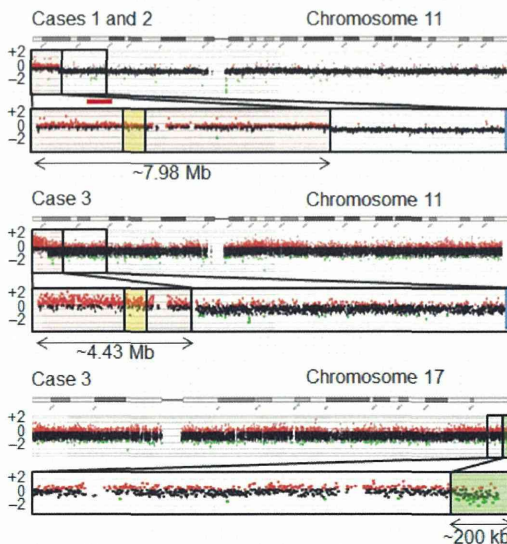


図 2. CDKN1C を含む第 11 染色体短腕遠位部重複を

示すアレイ CGH 結果。

3) IMAGe 症候群患者における CDKN1C 変異の同定

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

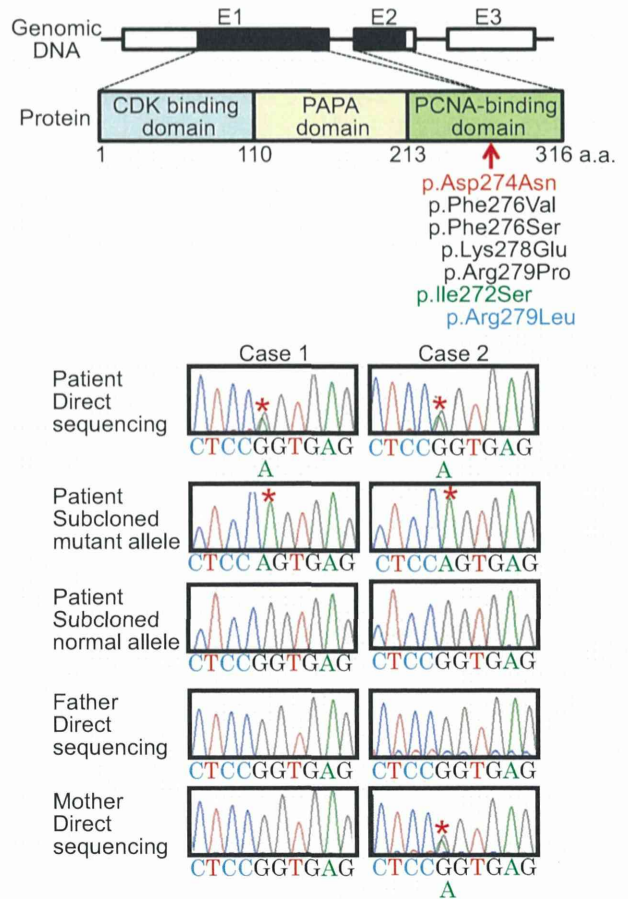


図 3. IMAGe 症候群における CDKN1C 変異。

4) Kagami-Ogata 症候群における詳細な臨床像の決定

われわれは、Kagami-Ogata 症候群 (KOS14) と診断された日本人患者 34 例の包括的な臨床像解析を行い、以下のことを世界で初めて明らかとした。

3 グループの比較： 第 14 染色体父性ダイソミー、エピ変異、微細欠失で同等であり、発症原因の主因はすべてに共通する RTL1 の過剰発現（約 2.5 倍）と考えられる。

疾患特異的の症状： すべての症状のうち、豊富な頬と口唇の突出を伴う特徴的顔貌と、coat hanger angle の増加を伴う胸郭低形成は本疾患に特異的かつ長期（10 歳以上）観察される所見であった。

成長パターン： 胎児期成長は、身長 $-1.7\sim+3.0$ SD、体重 $+0.1\sim+8.8$ SD とよく保たれていた。特に、過耐重は、マウスのデータから筋肉量の増加を反映すると推測される。一方、出生後成長は、約 1/3 の症例で -2 SD 以下の身長あるいは体重が認められ、これは、生後の嚥下困難や呼吸不全を反映すると考えられる。

顔貌： きわめて特徴的であり、特に、満な頬と口唇の突出は、本疾患に特異的であった。

胸郭低形成： これは、顔貌と並んで、本疾患に特異的である（図 4）。特に、coat-hanger angle (CHA) と mid to widest thorax diameter ratio (M/W ratio) が客観的指標になることが判明した。さらに、M/W ratio 乳児期以降正常範囲になることにたいし、CHA は 10 歳以降も増加していた。したがって、CHA は長期にわたる疾患特異的診断指標となることが判明した。また、全例がレスピレーターによる呼吸管理を受けていた（中央値 1 カ月）。

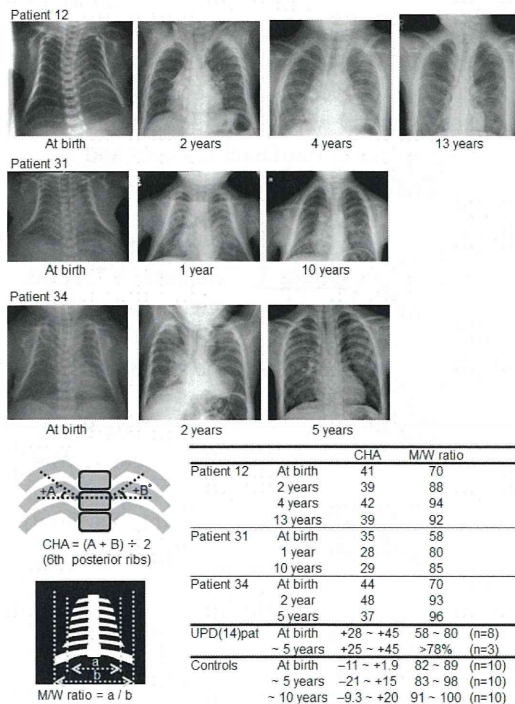


図 4. レントゲン所見

腹壁異常： 臍帯ヘルニアあるいは腹直筋乖離が全例で認められた。

精神運動発達： 全例で低下していた（DQ/IQ 中央値 55）。

その他： 嚥下困難はほぼ全例に認められ、チューブ管理を要した（中央値 6.5 カ月）。

肝芽腫： 3 例において 13 カ月までに認められた（図 5）。2 例では手術が行われたが、化学療法は全身状態不良で試行しえなかった。残る 1 例では手術も試行しえなかった。

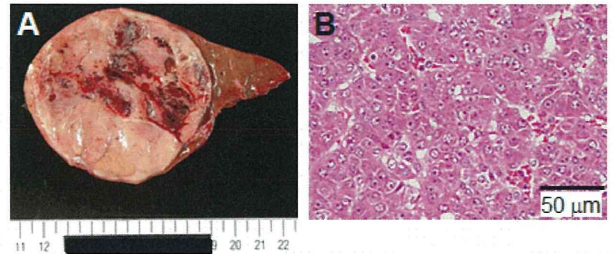
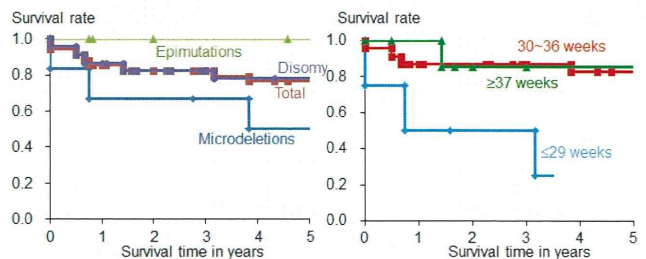


図 5. 肝芽腫の外観と組織像。

死亡例： 34 例中 8 例が 4 歳までに死亡した（図 6）。死亡のリスクとして 29 週以前の出生、および 4 例が呼吸器感染に伴う死亡であったことから、呼吸器感染症が挙げられた



Patient (Epi)genetic cause	GA	Cause of death	Age of death
1 UPD(14)pat (S-1)	34	Respiratory failure	2 hours
8 UPD(14)pat (S-1)	24	Influenza infection	3 2/12 yrs
15 UPD(14)pat (S-3)	34	Necrotizing enterocolitis	6 mos
17 UPD(14)pat (S-3)	32	Hepatoblastoma	8 mos
18 UPD(14)pat (S-3)	37	Hemophagocytic syndrome	1 5/12 yrs
30 Microdeletion (S-1)	27	Sudden death at URI	9 mos
32 Microdeletion (S-2)	28	Intracranial hemorrhage	4 days
33 Microdeletion (S-3)	35	RS virus infection	3 10/12 yrs

図 6. Kaplan-Meier 生存曲線

胎盤過形成と羊水過多： ほぼ必発の所見であり、羊水過多は胎盤過形成による産生増加と嚥下困難による消化管への吸収低下に起因することが判明した。

D. 考察

Silver-Russell 症候群の成果は、本症候群における遺伝的多様性を示すのみならず、CDKN1C 関連の Silver-Russell 症候群が骨格の左右非対称を欠く Silver-Russell 症候群のサブタイプを形成することを示唆するものである。

Silver-Russell 症候群類縁疾患である IMAGe 症候群の成果は、2 つの症候群が同じ CDKN1C の変異に起因し、文献データと合わせて、重度機能亢進が IMAGe 症候群を、軽度機能亢進が Silver-Russell 症候群を招

くことを示唆する。強いときに本疾患の包括的な臨床的解析を行ったものである。

Kagami-Ogata 症候群の成果は、本疾患の診断特異的所見や自然歴を明確とするものであり、本疾患の診療に大きく貢献すると期待される。特に、診断特異的かつ長期的に認められる症状を明確としたことは特筆される。これはホルモン疾患の臨床診断に大きく貢献するものである。また、過去の論文に記載されていなかった成長パターンの特徴、精神発達遅滞の存在と程度、肝芽腫の発症リスク、死亡発症リスクを明らかにしたことは、長期予後や患者支援の体制を考えるうえで有用である。

E. 結論

本年度における主たる成果は以下のとおりである。(1) Silver-Russell 症候群が Temple 症候群発症機序である第 14 染色体インプリンティング領域のエピ変異や CDKN1C を含む第 11 染色体短腕遠位部の重複により生じることを明らかとした。(2) Silver-Russell 症候群類縁疾患である IMAGE 症候群患者において CDKN1C 変異を同定した。(3) Kagami-Ogata 症候群の詳細な臨床像を決定した。

これらの成果は、インプリンティング疾患の臨床像や発症機序を明確とするものであり、それに基づく治療法の開発に繋がるものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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* 21 (3): 382–385, 2014.
2. Nagasaki K*, Asami T, Sato H, Ogawa Y, Kikuchi T, Saitoh A, **Ogata T**, Fukami M: Long term follow up study for a patient with Floating-Harbor syndrome due to a hotspot *SRCAP* mutation. *Am J Med Genet A* 164 (3): 731–735, 2014.
3. 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* 81(2): 314–316, 2014.
4. 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* 164A (2): 505–510, 2014.
5. Yagasaki H*, Nakane T, Saito T, Koizumi K, Kobayashi K, **Ogata T**: Disorder of sex development in an infant with molecularly confirmed 46,XY,+der(10)t(10;21)(q21.1;q21.3), -21. *Am J Med Genet A* 164 (3): 841–843, 2014.
6. Sasaki A, Sumie M, Eada S, Kosaki R, Kurosawa K, Fukami M, Sago H, **Ogata T**, Kagami M*: Prenatal Genetic testing for a microdeletion at chromosome

- 14q32.2 imprinted region leading to upd(14)pat-like phenotype. *Am J Med Genet A* 164A (1): 264–266, 2014.
7. Kitsuda K*, Yamaguchi R, Nagata E, Nakagawa Y, Ohzeki T, **Ogata T**, Ishii M, Nakanishi T: Hypertrophic cells in hypophagic intrauterine growth retarded rats without catch-up growth. *Kitasato Med J* 44 (1): 38–46, 2014.
8. 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* 80 (5): 706–713, 2014.
9. Court F, Tayama C, Romanelli V, Martin-Trujillo A, Iglesias-Platas I, Okamura K, Sugahara N, Simon C, Moore H, Harness J, Keirstead H, Vicente Sanchez-Mut J, 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): 554–569, 2014.
10. Amano N, Mukai T, Ito Y, Narumi S, Tanaka T, Yokoya S, **Ogata T**, Hasegawa T*: Identification and functional characterization of two novel *NPR2* mutations in Japanese patients with short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 99 (4): E13–18, 2014.
11. **Ogata T***, Niihori T, Tanaka N, Kawai M, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, Nakashim S, Kato F, Fukami M, Aoki Y, Matsubara Y: *TBX1* mutation identified by exome sequencing in a Japanese family with 22q11.2 deletion syndrome-like craniofacial features and hypocalcemia. *PLoS One* 9 (3): e91598, 2014.
12. Yamamoto M, Iguchi G, Bando H, Fukuoka H, Suda K, Takahashi M, Nishizawa H, Matsumoto R, Tojo K, Mokubo A, **Ogata T**, Takahashi Y*: A missense single-nucleotide polymorphism in the sialic acid acetyl esterase gene is associated with anti-PIT-1 antibody syndrome. *Endocr J* 61 (6): 641–644, 2014.
13. Suzuki J, Azuma N, Dateki S, Soneda S, Muroya K, Yamamoto Y, Saito R, Sano S, Nagai T, Wada H, Endo A, Urakami T, **Ogata T**, Fukami M*: Mutation Spectrum and Phenotypic Variation in Nine Patients with SOX2 abnormalities. *J Hum Genet* 59 (6): 353–356, 2014.
14. Matsubara K, Kataoka N, Ogata S, Sano S, **Ogata T**, Fukami M*, Katsumata N: Uniparental disomy of chromosome 8 leading to homozygosity of a *CYP11B1* mutation in a patient with congenital adrenal hyperplasia: Implication for a rare etiology of an autosomal recessive disorder. *Endocr J* 61 (6): 629–633, 2014.
15. Ohishi A, Nakashima S, **Ogata T**, Iijima S: Early vitamin K deficiency bleeding in a neonate associated with maternal Crohn's disease. *J Perinatol* 34 (8): 636–639, 2014

16. Suzuki E, Yatsuga S, Igarashi M, Miyado M, Nakabayashi K, Hayashi K, Hata K, Umezawa A, Yamada G, **Ogata T**, Fukami M*: De novo frameshift mutation in fibroblast growth factor 8 in a male patient with gonadotropin deficiency. *Horm Res Paediatr* 81 (2): 139–44, 2014
17. Kawamoto T, Nitta H, Murata K, Toda E, Tsukamoto N, Hasegawa M, Yamagata Z, Kayama F, Kshi R, Ohya Y, Saito H, Sago H, Okuyama M, **Ogata T**, Yokoya S, Koresawa Y, Shibata Y, Nakayama S, Michikawa T, Takeuchi A, Saitoh H: Rationale and study design of the Japan environment and children's study (JECS). *BMC Public Health* 2014 Jan 10;14:25. doi: 10.1186/1471-2458-14-25.
18. 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* 86 (6): 539–544, 2014.
19. Maeda T, Higashimoto K, Jozaki K, Hitomi H, Nakabayashi K, Makita Y, Tonoki H, Okamoto N, Takada F, Ohashi H, Migita M, Kosaki R, Matsubara K, **Ogata T**, Matsuo M, Hamasaki Y, Ohtsuka Y, Nishioka K, Joh K, Mukai T, Hata K, Soejima H*: Comprehensive and quantitative multilocus methylation analysis reveals the susceptibility of specific imprinted differentially methylated regions (DMRs) to aberrant methylation in Beckwith-Wiedemann syndrome with epimutations. *Genet Med* 16 (12): 903–912, 2014.
20. Izumi Y, Suzuki E, Kanzaki S, Yatsuga S, Kinjo S, Igarashi M, Maruyama T, Sano S, Horikawa R, Sato N, Nakabayashi K, Hata K, Umezawa A, Ogata T, Yoshimura Y, Fukami M*: Genome-wide copy number analysis and systematic mutation screening in 58 patients with hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril* 102 (4): 1130–1136, 2014.
21. Ishikawa T*, Takehara Y, Yamashita S, Iwashita S, Sugiyama M, Wakayama T, Johnson K, Wieben O, Sakahara H, **Ogata T**: Hemodynamic assessment in a child with renovascular hypertension using time-resolved three-dimensional cine phase-contrast MRI. *J Magn Reson Imaging* 41 (1): 165–168, 2015.
22. Nakashima S, Oishi A, Takada F, Kawamura H, Igarashi M, Fukami M, **Ogata T***: Clinical and molecular studies in four patients with *SRY*-positive 46,XX testicular disorders of sex development: implications for variable sex development and genomic rearrangements. *J Hum Genet* 59 (10):549-53, 2014.
23. Nagata E, Kano H, Kato F, Yamaguchi R, Nakashima S, Takayama S, Kosaki R, Tonoki H, Mizuno S, Watanabe S, Yoshiura K, Kosho T, Hasegawa T, Kimizuka M, Suzuki A, Shimizu K, Ohashi H, Haga N, Numabe H, Horii E, Nagai T, Yoshihashi H, Nishimura G, Toda T, Takada S, Yokoyama S, Asahara H, Sano S, Fukami M, Ikegawa S, **Ogata T***: Japanese founder duplications/triplications involving *BHLHA9* are associated with split-hand/foot malformation with or without long bone deficiency and Gallop-Wolfgang complex. *Orphanet J Rare Dis* 9 (1): 125, 2014.
24. Kagami M, Mizuno S, Matsubara K, Nakabayashi K, Sano S, Fuke T, Fukami M, **Ogata T***: Epimutations of the IG-DMR and the *MEG3*-DMR at the 14q32.2 imprinted region in two patients with Silver-Russell syndrome-compatible phenotype. *Eur J Hum Genet* (in press).
25. Izumi Y, Musha I, Suzuki E, Iso M, Jinno T, Horikawa R, Amemiya S, **Ogata T**, Fukami M, Ohtake A: Hypogonadotropic hypogonadism in a female patient previously diagnosed as having Waardenburg syndrome due to a *SOX10* mutation. *Endocrine* (in press).
26. Nakashima S, Kato F, Kosho T, Nagasaki K, Kikuchi T, Kagami M, Fukami M, **Ogata T***: Silver-Russell syndrome without body asymmetry in three patients with duplications of maternally derived chromosome 11p15 involving *CDKN1C*. *J Hum Genet* (in press).
27. Miyatake S, Koshimizu E, Fujita A, Fukai R, Imagawa E, Ohba C, Kuki I, Makita Y, **Ogata T**, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito H, **Matsumoto N***: Detecting copy number variations in whole exome sequencing data using exome hidden markov model - an expectation of “exome-first” approach. *J Hum Genet* (in press).
28. Saito K, Miyado M, Kobori Y, Tanaka Y, Ishikawa H, Yoshida A, Katsumi M, Saito H, Kubota T, Okada H, **Ogata T**, Fukami M*: Copy-number variations in Y chromosomal azoospermia factor regions identified by multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Hum Genet* (in press).
29. Kagami M, Kurosawa K, Miyazaki O, Ishino F, Matsuoka K, **Ogata T***: Comprehensive clinical studies in 34 patients with molecularly defined UPD(14)pat and related conditions (Kagami-Ogata syndrome). *Eur J Hum Genet* (in press)
30. Igarashi M, Wada Y, Kojima Y, Miyado M, Nakamura M, Muroya K, Mizuno K, Hayashi Y, Nonomura K, Jofri K, **Ogata T**, Fukami M*: Novel splice site mutation in *MAMLD1* in a patient with hypospadias. *Sex Dev* (in press).
31. Kon M, Suzuki E, Dung VC, Hasegawa Y, Mitsui T, Muroya K, Ueoka K, Igarashi N, Nagasaki K, Oto Y, Hamajima T, Yoshino K, Igarashi M, Kato-Fukui Y, Nakabayashi K, Hayashi K, Hata K, Matsubara Y, Moriya K, **Ogata T**, Nonomura K, Fukami M*: Molecular basis of non-syndromic hypospadias: Systematic mutation screening and genome-wide copy-number analysis of 62 patients. *Hum Reprod* (in press).
32. **Fujisawa Y**, Napoli E, Wong S, Song G, Yamaguchi R, Matsui T, Nagasaki K, **Ogata T**, Giulivi C Impact of a novel homozygous mutation in nicotinamide nucleotide transhydrogenase on mitochondrial DNA integrity in a case of familial