

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業）
分担研究報告書

インプリンティング異常を主徴とする先天異常症候群
第14番染色体父親性ダイソミーおよびその類縁疾患、シルバーラッセル症候群

研究分担者 緒方 勤
国立大学法人浜松医科大学小児科 医学部医学科 小児科学講座 教授

研究要旨

本研究班の目的は、先天異常症候群領域の指定難病等のQOL向上を目指すもので、われわれはヒトインプリンティング疾患について検討を進めている。

本年度にかけては、Silver-Russell症候群における第16染色体母性ダイソミー (UPD(16)mat)の同定、Temple症候群患者におけるMEG3:TSS-DMRに局限するエピ変異の同定、Silver-Russell症候群の主要原因の1つであるUPD(7)matの鏡像であるUPD(7)patの世界初例の同定などを行った。これらの所見は、間違いなく、インプリンティング疾患の発症機序の解明や遺伝学的診断法の確立、ならびに原因ごとの合併症や長期予後の把握に有用であると期待される。

A. 研究目的

本研究班の目的は、先天異常症候群領域の指定難病等のQOL向上を目指すもので、われわれはヒトインプリンティング疾患について検討を進めている。

本年度においては、Silver-Russell症候群における第16染色体母性ダイソミー (UPD(16)mat)の同定、Temple症候群患者におけるMEG3:TSS-DMRに局限するエピ変異の同定、Silver-Russell症候群の主要原因の1つであるUPD(7)matの鏡像であるUPD(7)patの世界初例の同定などを行った。

B. 研究方法

既にわれわれが開発した遺伝子診断法と詳細なデータシートを用いた包括的臨床解析を行った。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

Silver-Russell症候群における第16染色体母性ダイソミー (UPD(16)mat)の同定

われわれは原因不明のSilver-Russell症候群患者94例において、網羅的メチル化解析ならびにマイクロサテライト解析を行い、UPD(16)matを2例（男児1例と女児1例）において同定した（図1）。この2例におけるUPD(16)matは、trisomy rescueにより形成されていた。2名ともに、重度の成長障害と発達遅滞を呈し、男児例は尿道下裂を呈した。UPD(16)matは、現在までにほとんど報告がない極めて稀なものであるが、原因不明のSilver-Russell症候群においては、解析すべきものである。事実、Silver-Russell症候群の国際コンセンサスガイドラインにおいても、解析を推奨されているものである。そして、今回のデータは、われわれが昨年度報告したUPD(20)matと共に、ほぼすべての染色体の母性ダイソミーがSilver-Russell症候群を発症しうることを示すものである。

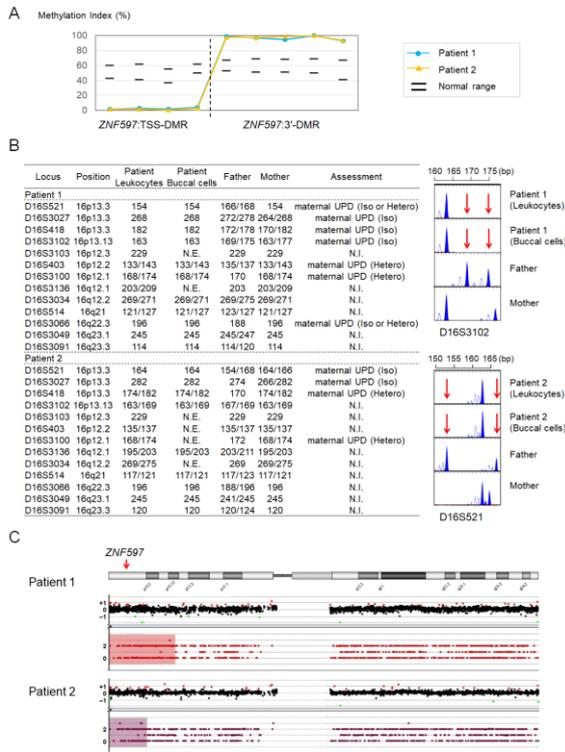


図1. 遺伝的解析結果。(A) 第16染色体の2つのメチル化可変領域 (DMR) の異常メチル化パターン。(B) UPD(16)matを示すマイクロサテライト解析結果。(C) Trisomy rescueを示すSNP chipデータ。

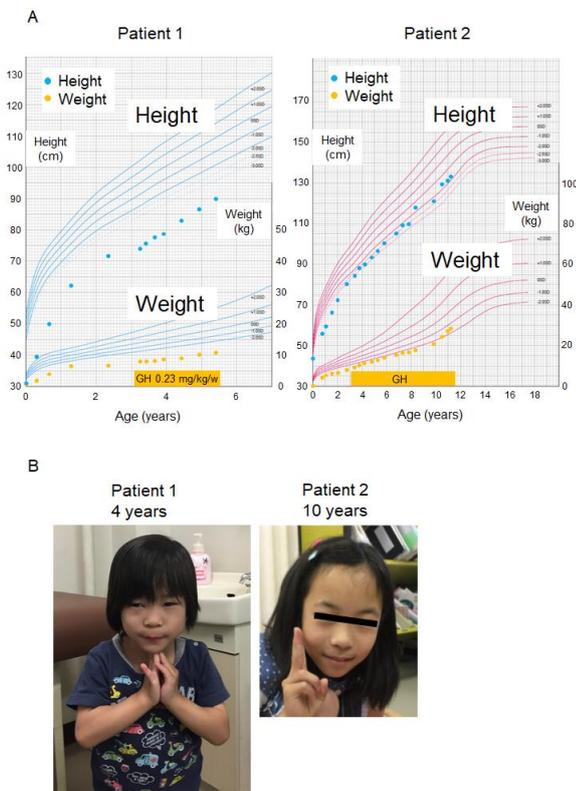


図2. 臨床所見。(A) 成長障害を示すデータ。(B) Silver-Russell症候群様の顔貌。

Temple症候群患者におけるMEG3:TSS-DMRに局限するエピ変異の同定

Temple症候群は、第14染色体インプリンティング領域の異常に起因するSilver-Russell症候群ならびにPrader-Willi症候群の類縁疾患である。現在までの知見では、第14染色体インプリンティング領域において体のインプリンティングセンターとして機能するMEG3:TSS-DMRは、胎盤においてインプリンティングセンターとして機能するMEG3/DLK1:IG-DMRが低メチル化であるときのみ、そのメチル化制御作用により、低メチル化状態で存在できるとされてきた。したがって、この2つのDMRは、エピ変異によるTemple症候群では、常に同時に低メチル化として存在している。

われわれは、図3のTemple症候群患者において世界で初めてMEG3:TSS-DMRのみの単独低メチル化と胎盤におけるMEG3/DLK1:IG-DMRの正常メチル化を同定した(図4)。これらは、一度低メチル化となったDMRsが、インプリンティング維持の障害により、二次的にメチル化状態が変動した結果として説明されるものである。また、このような稀な病態解析におけるbisulfiteシーケンスならびにパイロシーケンスの有用性を確認した。

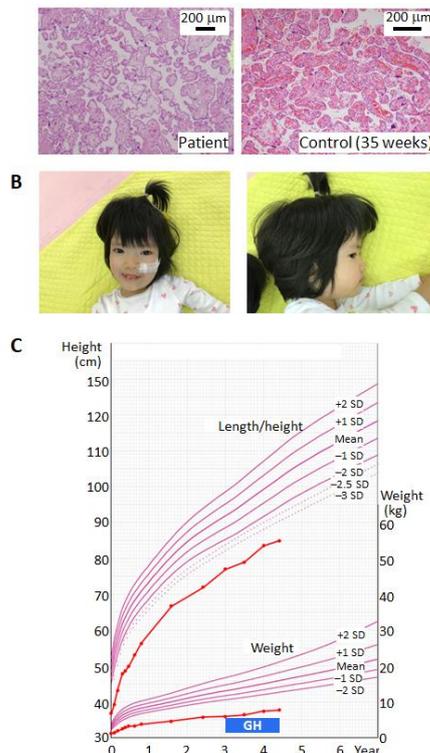


図3. 臨床所見。(A) 胎盤組織。(B) 顔貌。(C) 成長パターン。

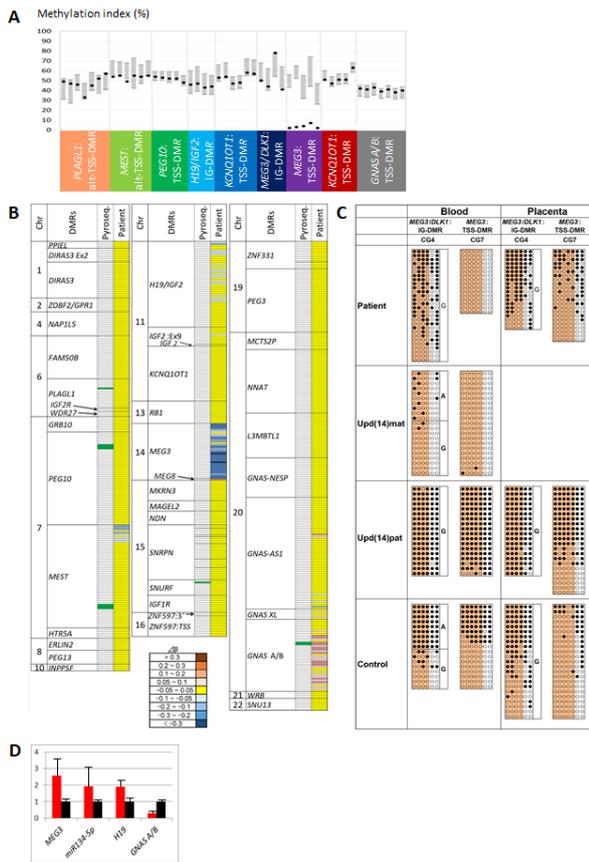


図4. 分子遺伝学的解析。(A)代表的DMRに対するパイロシーケンス解析。MEG3:TSS-DMRは低メチル化であるが、MEG3/DLK1:IG-DMRは正常メチル化パターンを示す。(B) BeadChip解析。MEG3:TSS-DMRの他に、いくつかのメチル化パターンの異常が認められる。(C) bisulfiteシーケンス解析。MEG3/DLK1:IG-DMRは、体では differential methylation として存在しておらず、胎盤では一見パターンを示す。(D) Bのメチル化異常に合致する発現パターン。

UPD(7)patの同定

UPD(7)patは、UPD(7)matがSilver-Russell症候群の原因として高頻度に同定されることと対照的に、現在まで、報告されていない。

われわれは、5歳の高身長を呈する男児において、網羅的メチル化解析とマイクロサテライト解析により、世界初のUPD(7)patを同定した(図5)。これは、UPD(7)matが、成長障害を伴うSilver-Russell症候群を生じることと併せて、UPD(7)patが過成長を招くことを明らかとするものである。

D. 考察

われわれは、今年度、UPD(16)matという稀なSilver-Russell症候群原因の同定、Temple症候群におけるMEG3:TSS-DMRの単独低メチル化の

同定、世界初のUPD(7)patの発見という成果を得た。このような成果は、インプリンティング疾患の発症機序の解明や遺伝学的診断法の確立、ならびに原因ごとの合併症や長期予後の把握に有用であると期待される。

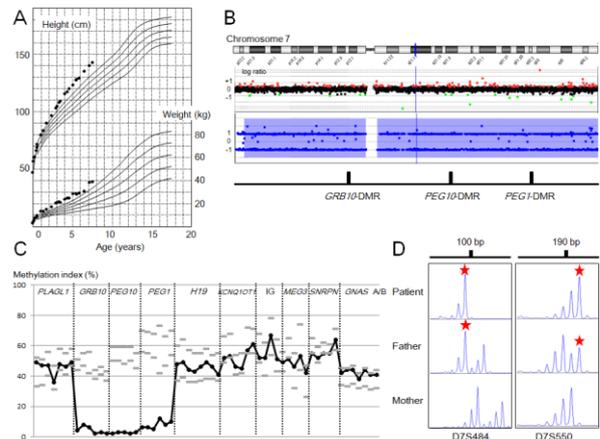


図5. UPD(7)patを有する男児。(A) 過成長を示す成長パターン。(B) コピー数以上を否定するアレイCGHとアイソダイソミーを示すSNPアレイ所見。(C) 第7染色体に限定されるメチル化異常。(D) UPD(7)patを示すマイクロサテライト解析。

E. 結論

種々のインプリンティング疾患において、新しい発症機序を同定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ushijima K, Fukami M, Ayabe T, Narumi S, Okuno M, Nakamura A, Takahashi T, Ihara K, Ohkubo K, Tachikawa E, Nakayama S, Arai J, Kikuchi N, Kikuch T, Kawamura T, Urakami T, Hata K, Nakabayashi K, Matsubara Y, Amemiya S, **Ogata T**, Yokota I, Sugihara S, The Japanese Study Group of Insulin Therapy for Childhood and Adolescent Diabetes. Comprehensive screening for monogenic diabetes in 89 Japanese children with insulin-requiring antibody-negative type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 19 (2): 243–250, 2018. doi: 10.1111/pedi.12544. [Epub ahead of print]
- 2) Ohsako S*, Aiba T, Miyado M, Fukami M, **Ogata T**, Hayashi Y, Mizuno K, Kojima Y: Expression of Xenobiotic Biomarkers CYP1 Family in Preputial Tissue of Patients with Hypospadias and Phimosis and Its Association with DNA Methylation Level of SRD5A2 Minimal Promoter. *Arch Environ Contam Toxicol* 74 (2): 240–247, 2018. doi: 10.1007/s00244-017-0466-x. Epub 2017 Oct 27.

- 3) Ozono K, **Ogata T**, Horikawa R, Matsubara Y, Ogata Y, Nishijima K, Yokoya S: Efficacy and safety of two doses of Norditropin® (somatropin) in short stature due to Noonan syndrome: a 2-year randomized, double-blind, multicenter trial in Japanese patients. *Endocr J* (accepted) 65 (2): 159–174, 2018. doi: 10.1507/endocrj.EJ17-0313. Epub 2017 Nov 7.
- 4) Yamoto K, Okamoto S, Fujisawa Y, Fukami M, Saitsu H, **Ogata T***: *FGFR1* Disruption Identified by Whole Genome Sequencing in a Male With a Complex Chromosomal Rearrangement and Hypogonadotropic Hypogonadism. *Am J Med Genet A* 176 (1): 139–143, 2018. doi: 10.1002/ajmg.a.38535. Epub 2017 Nov 21.
- 5) Shima H, MD*, Koehler K*, Nomura Y, Sugimoto K, Satoh A, **Ogata T**, Fukami M, Schuelke M, Huebner A, Narum S: Two patients with MIRAGE syndrome lacking haematological features: role of somatic second-site reversion SAMD9 mutations. *J Med Genet* 55 (2): 81–85, 2018. doi: 10.1136/jmedgenet-2017-105020. Epub 2017 Nov 24.
- 6) Okuno M, Ayabe T, Yokota I, Musya I, Shiga K, Kikuchi T, Kikuchi N, Ohtake A, Nakamura A, Nakabayashi K, Okamura K, Momozawa Y, Suzuki J, Urakami T, Kawamura T, Amemiya S, **Ogata T**, Sugihara S, Fukami M*, The Japanese Study Group of Insulin Therapy for Childhood and Adolescent Diabetes. Protein-Altering Variants of PTPN2 in Childhood-onset Type 1A Diabetes. *Diabet Med* 35 (3): 376–380, 2018. doi: 10.1111/dme.13566. Epub 2018 Jan 3.
- 7) Ono H, Numakura C, Homma K, Hasegwa T, Tsutsumi S, Kato F, Fujisawa Y, Fukami M, **Ogata T***: Longitudinal Serum and Urine Steroid Metabolite Profiling in a 46,XY Infant with Prenatally Identified POR Deficiency. *J Steroid Biochem Mol Biol* 178: 177–184, 2018. doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.12.008. Epub 2017 Dec 28.
- 8) Nakashima M, Hiraide T, Yamoto K, Fukuda T, Kato M, Ikeda H, Sugie Y, Aoto K, Kaname T, Nakabayashi K, **Ogata T**, Matsumoto N, Saitsu H*: *De novo* variants in SETD1B are associated with intellectual disability, epilepsy and autism. *Hum Genet* 137 (1): 95–104, 2018. doi: 10.1007/s00439-017-1863-y. Epub 2018 Jan 10.
- 9) Montalbano A, Juergensen L, Fukami M, Thiel, CT, Hauer NH, Roeth R, Weiss B, Naiki Y, **Ogata T**, Hassel D, Rappold GA*: Functional missense and splicing variants in the retinoic acid catabolizing enzyme CYP26C1 in idiopathic short stature. *Eur J Hum Genet* 26 (8): 1113–1120, 2018. doi: 10.1038/s41431-018-0148-9. Epub 2018 Apr 30.
- 10) Nakamura A, Muroya K, Ogata-Kawata H, Nakabayashi K, Matsubara K, **Ogata T**, Kurosawa K, Fukami M, Kagami M*: A case of paternal uniparental isodisomy for chromosome 7 associated with overgrowth. *J Med Genet* 55 (8): 567–570, 2018. doi: 10.1136/jmedgenet-2017-104986. Epub 2018 Feb 17.
- 11) Nakamura S, Kobori Y, Ueda Y, Tanaka Y, Ishikawa H, Yoshida A, Katsumi M, Saito K, Nakamura A, **Ogata T**, Okada H, Nakai H, Miyado M, Fukami M*: STX2 is a causative gene for nonobstructive azoospermia. *Hum Mutat* 39 (6): 830–833, 2018. doi: 10.1002/humu.23423. Epub 2018 Apr 10.
- 12) Ono H, Saitsu H, Horikawa R, Nakashima S, Ohkubo Y, Yanagi K, Nakabayashi K, Fukami M, Fujisawa Y, **Ogata T***: Partial androgen insensitivity syndrome caused by a deep intronic mutation creating an alternative splice acceptor site of the AR gene. *Sci Rep* 8 (1): 2287, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-20691-9.
- 13) Kawashima S, Nakamura A, Inoue T, Matsubara K, Horikawa R, Wakui K, Tkano K, Fukushima Y, Tatematsu T, Mizuno S, Tsubaki J, Kure S, Matsubara Y, **Ogata T**, Fukami M, Kagami M*: Maternal uniparental disomy for chromosome 20: physical and endocrinological characteristics of five patients. *J Clin Endocrinol Metab* 103 (6): 2083–2088, 2018. doi: 10.1210/jc.2017-02780.
- 14) Hernandez Mora JR, Tayama C, Sánchez-Delgado M, Monteagudo-Sánchez A, Hata K, **Ogata T**, Medrano J, Poo-Llanillo ME, Simón C, Moran S, Esteller M, Tenorio J, Pablo Lapunzina P, Kagami M, Monk D, Nakabayashi K*: Characterization of parent-of-origin methylation using the Illumina Infinium MethylationEPIC array platform. *Epigenomics* 10 (7): 941–954, 2018. doi: 10.2217/epi-2017-0172. Epub 2018 Jul 2.
- 15) Kurata K, Hosono K, Hikoya A, Kato A, Saitsu H, Minoshima S, **Ogata T**, Hotta Y*: Clinical characteristics of a Japanese patient with Bardet-Biedl syndrome caused by BBS10 mutations. *Jpn J Ophthalmol* 62 (4): 458–466, 2018. doi: 10.1007/s10384-018-0591-8. Epub 2018 Apr 17.
- 16) Mano H, Fujiwara S, Takamura K, Kitoh H, Takayama S, **Ogata T**, Hashimoto S, Haga N*: Congenital limb deficiency in Japan: A cross-sectional nationwide survey on its epidemiology. *BMC Musculoskelet Disord* 2018 Jul 27;19(1):262. doi: 10.1186/s12891-018-2195-3.
- 17) Yoshida T, Matsuzaki T, Miyado M, Saito K, Iwasa T, Matsubara Y, **Ogata T**, Irahara M, Fukami M*: 11-oxygenated C19 steroids as circulating androgens in women with polycystic ovary syndrome. *Endocr J* 65 (10): 979–990, 2018. doi: 10.1507/endocrj.EJ18-0212. [Epub ahead of print]
- 18) Inoue T, Yagasaki H, Nishioka J, Nakamura A, Matsubara K, Narumi S, Nakabayashi K,

- Yamazawa K, Fuke T, Oka A, **Ogata T**, Fukami M, Kagami M*: Molecular and clinical analyses of two patients with UPD(16)mat detected by screening 94 patients with Silver-Russell syndrome phenotype of unknown etiology. *J Med Genet* 2018 Sep 21. pii: jmedgenet-2018-105463. doi: 10.1136/jmedgenet-2018-105463. [Epub ahead of print].
- 19) Shimizu D, Iwashima S, Sato K, Hayano S, Fukami M, Saitsu H, **Ogata T**: *GATA4* variant identified by whole exome sequencing in a Japanese family with atrial septal defect: implications for male sex development. *Clin Case Rep* 6 (11): 2229–2233, 2018. doi: 10.1002/ccr3.1851. eCollection 2018 Nov.
- 20) Igarashi M, Mizuno K, Kon M, Narumi S, Kojima Y, Hayashi Y, **Ogata T**, Fukami M* *GATA4* mutations are uncommon in patients with 46,XY disorders of sex development without heart anomaly. *Asian J Androl* 20 (6): 629–631, 2018. doi: 10.4103/aja.aja_20_18. [Epub ahead of print]
- 21) Suzuki E, Shima H, Kagami M, Soneda S, Tanaka T, Yatsuga S, Nishioka J, Oto Y, Kamiya T, Naiki Y, **Ogata T**, Fujisawa Y, Nakamura A, Kawashima S, Morikawa S, Horikawa R, Sano S, Fukami M*: (Epi)genetic defects of MKRN3 are rare in Asian patients with central precocious puberty. *Hum Genome Var* 2019 Jan 21;6:7. doi: 10.1038/s41439-019-0039-9. eCollection 2019..
- 22) Nakashima M, Tohyama J, Nakagawa E, Watanabe Y, Siew CG, Kwong CS, Yamoto K, Hiraide T, Fukuda T, Kaname T, Nakabayashi K, Hata K, **Ogata T**, Saitsu H, Matsumoto N*: Identification of de novo CSNK2A1 and CSNK2B variants in cases of global developmental delay with seizures. *J Hum Genet* 64 (4): 313–322, 2019. doi: 10.1038/s10038-018-0559-z. Epub 2019 Jan 17.
- 23) Hiraide T, **Ogata T**, Watanabe S, Nakashima M, Fukuda T, Saitsu H*: Coexistence of a CAV3 mutation and a DMD deletion in a family with complex muscular diseases. *Brain Dev* 41 (?): 474–479, 2019. pii: S0387-7604(18)30594-1. doi: 10.1016/j.braindev.2019.01.005. [Epub ahead of print]
- 24) Hattori H, Hiura H, Kitamura A, Miyauchi N, Kobayashi N, Takahashi S, Okae H, Kyono K, Kagami M, **Ogata T**, Arima T*: Association of four imprinting disorders and ART. *Clin Epigenetics* 11 (1): 21, 2019. doi: 10.1186/s13148-019-0623-3..
- 25) Miyado M, Fukami M, Takada S, Terao M, Nakabayashi K, Hata K, Matsubara Y, Tanaka Y, Sasaki G, Nagasaki K, Shiina M, Ogata K, Masunaga Y, Saitsu H, **Ogata T***: Germline-derived gain-of-function variants of Gs α -coding *GNAS* gene identified in nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis. *J Am Soc Nephrol* (accepted).
- 26) Matsubara K, Itoh M, Shimizu K, Saito S, Enomoto K, Nakabayashi K, Hata K, Kurosawa K, **Ogata T**, Fukami M, Kagami M. Exploring the unique function of imprinting control centers in the PWS/AS-responsible region: finding from array-based methylation analysis in cases with variously sized microdeletions. *Clin Epigenetics* 11 (1): 36, 2019. doi: 10.1186/s13148-019-0633-1.
- 27) Kagami M, Yanagisawa A, Ota M, Matsuoka K, Nakamura A, Matsubara K, Nakabayashi K, Takada S, Fukami M, **Ogata T***: Temple syndrome in a patient with variably methylated CpGs at the primary MEG3/DLK1:IG-DMR and severely hypomethylated CpGs at the secondary MEG3:TSS-DMR. *Clin Epigenetics* 11 (1): 42, 2019. doi: 10.1186/s13148-019-0640-2.
- 28) Matsushita R*, Nagasaki K, Ayabe T, Kinjo S, Haruna H, Ihara K, Hasegawa T, Ogata T, Ozono K, Minamitani K, Thyroid Committee of the Japanese Society for Pediatric Endocrinology: Early Calcitonin Level-Based Thyroidectomy May Reduce Postoperative Complications and Improve Prognosis in MEN2. *J Pediatr Endocrinol Metab* (accepted).
- 29) Hamanaka K, Takata A, Uchiyama Y, Miyatake S, Miyake N, Mitsunashi S, Iwama K, Fujita A, Imagawa E, Alkanaq AN, Koshimizu E, Azuma Y, Nakashima M, Mizuguchi T, Saitsu H, Yuka Wada, Minami S, Katoh-Fukui Y, Masunaga Y, Fukami M, Hasegawa T, **Ogata T**, Matsumoto N*: *MYRF* haploinsufficiency causes 46,XY and 46,XX disorders of sex development. *Hum Mol Genet* (accepted).

2. 学会発表 省略

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