

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

過成長を主徴とする先天異常症候群

研究分担者 副島 英伸
国立大学法人佐賀大学 医学部分子生命科学講座 教授

研究要旨

過成長を主徴とする先天異常症候群としてベックウィズ・ウィーデマン症候群（BWS）疑い症例のエピゲノム・ゲノム解析を行った。平成30年度中に解析したBWS症例数は19例で、これまでの解析総数は250例となった。生殖補助医療で出生したBWSの主要な原因は*KvDMR1*-LOMであること、*patUPD*症例ではモザイク率上昇に伴う*IGF2*発現増加が組織肥大の原因であることがわかった。BWSでは、遺伝子解析結果に応じた医学的管理を行うことで、それぞれの患児のQOLの向上に貢献できると考えられた。有償遺伝子解析に対する患児・家族のニーズは増加傾向にあることから、今後も継続する予定である。一方、家族会のアンケート調査から臨床診断確定後も成長とともに追加症状が出現することが示唆された。成人症例の追跡調査が必要と考えられる。

A. 研究目的

過成長を主徴とする先天異常症候群としてベックウィズ・ウィーデマン症候群（BWS）を対象とし、非典型例の患者検体を用いてゲノム解析・エピゲノム解析を行うことで、ゲノム・エピゲノム異常と病態の関連性について解明する。加えて、BWSと臨床的及び分子遺伝学的に鏡面像を呈するシルバー・ラッセル症候群（SRS）およびBWS関連疾患についても解析を行う。これらの結果を通して、疾患概念の拡張、臨床診断基準の拡張と修正を行い、感度・特異度の向上を図る。

BWSは、過成長症候群の一つで、巨舌、臍帯ヘルニアのほかに多様な症状を呈することに加え、Wilms腫瘍、肝芽腫、神経芽腫などの胎児性腫瘍を発生する。疾患座位11p15.5には*CDKN1C/KCNQ10T1*と*IGF2/H19*の二つのインプリンティングドメインがあり、それぞれのドメイン内の遺伝子発現は、*KvDMR1*、*H19DMR*と呼ばれるインプリンティング制御領域（imprinting control region: ICR）により制御されている。BWSの主要な原因は、*KvDMR1*低メチル化（*KvDMR1*-LOM）、*H19DMR*高メチル化（*H19DMR*-GOM）、父性片親性ダイソミー（paternal uniparental disomy: *patUPD*）モザイク、*CDKN1C*の機能喪失変異、11p15の染色体構造異常であるが、およそ30%の症例ではこれらの異常を認めない。腫瘍の種類と発生頻度は発症原因のタイプ別に異なり、*H19DMR*-GOMと

*patUPD*ではWilms腫瘍と肝芽腫が多く、発生頻度は25%以上である。*KvDMR1*-LOMでは、基本的にWilms腫瘍は生じず、肝芽腫、横紋筋肉腫、性腺芽細胞腫が5%程度の頻度で生じる。*CDKN1C*変異では、神経芽腫が多く、頻度は5%以下である。胎児性腫瘍のリスクを判定し、腫瘍の早期発見を診療に反映させるためには、個々の症例の遺伝子解析を行い発症原因のタイプを確定することが重要である。

シルバー・ラッセル症候群（SRS）は、出生前後の成長障害と相対的頭囲拡大、前額部突出、左右非対称、摂食障害またはBMI低値という特徴的な身体所見を呈する。臨床症状はBWSの鏡面像となるような成長障害であり、発症原因もBWSの鏡面像となる*H19DMR*の低メチル化が30-60%を占める。また、7番染色体母性片親性ダイソミー（*upd(7)mat*）が5-10%を占め、その他のまれな原因として11p15.5の母性重複、*CDKN1C*の機能獲得変異、*IGF2*の機能喪失変異がある。

当研究室では、2012年より有償で症例の遺伝子解析を行っている（トリオ解析で5万円）。

B. 研究方法

1. エピゲノム・ゲノム解析

臨床的にBWS疑いと診断された非典型症例、および臨床的にSRS疑いと診断された非典型的の末梢血由来ゲノムDNAを用いた。エピゲノム解析は、bisulfite-pyrosequencing法を用いた。ゲノ

ム解析は、Short tandem repeat (STR) マーカーによる UPD 解析、サンガー法による *CDKN1C* の変異解析、MLPA による 11p15 のコピー数解析を行った。また、インプリント遺伝子の発現を定量 RT-PCR で解析した。

2. 家族会アンケート調査

家族会である BWS 親の会（山口素直代表）で行ったアンケート調査の一部を提供していただき、13 才以降における新たな症状の出現について検討した。

（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の承認を受けて実施した。人権擁護上の配慮、不利益・危険性の排除などの詳細な説明を行い、書面により同意を得たうえで検体収集を行った。

C. 研究結果

1. BWS

平成 30 年度中に解析した症例数は 19 例で、*KvDMR1*-LOM 11 例、*H19DMR*-GOM 1 例、patUPD モザイク 1 例、*CDKN1C* 機能喪失変異 2 例を見いだした。これら既知の異常を認めない症例は 4 例であった。2019 年 3 月 31 日現在の解析総数は 250 例となった。遺伝子解析の結果を表 1 に示す。

表 1 発症原因別頻度 (n = 250)

発症原因	症例数	頻度	ART 出生児
<i>KvDMR1</i> -LOM	85	34.0%	12
<i>H19DMR</i> -GOM	15	6.0%	0
patUPD モザイク	52	20.8%	1
<i>CDKN1C</i> 変異	16	6.4%	0
11p15 父性重複	9	3.6%	0
既知の異常なし	73	29.2%	4

生殖補助医療（Assisted Reproductive Technology: ART、具体的には ICSI と IVF）で出生した患児は計 17 名で、このうち 12 名が *KvDMR1*-LOM を呈しており（ χ^2 検定、 $p = 0.0315$ ）、ART 出生 BWS 児は低メチル化異常を呈することが明らかとなった。

右側片側肥大と巨舌を呈した patUPD モザイクの 1 例では、片側肥大に伴い舌も右側が肥大していた。病理学的には、肥大側の筋繊維が密に存在しており、非肥大側ではほぼ正常であった。舌縮小手術で得られた舌組織を解析したと

ころ、肥大側（右側）のモザイク率は 48%、非肥大側（左側）のモザイク率は 17%であった。末梢血のモザイク率は 52%であった。*IGF2*、*H19*、*CDKN1C* の遺伝子発現量を解析したところ、非肥大側に比べて肥大側で *IGF2* の発現が 17 倍以上増加していたが、*H19* と *CDKN1C* の発現量は 2 倍以内であった。

家族会アンケート調査は、回答のあった 65 名のうち、調査時で 13 才以上の患者は 26 名（男女比 10:16、平均年齢 18.0 ± 5.0 才（13~32 才））であった。このうち 9 例で尿路結石を発症しており、このうち 7 例が 13 才以上で発症していた。また、10 例で側湾症を、3 例で乳腺良性腫瘍を認めた。

2. SRS

H30 年度中に解析した症例数は 1 例で、既知の異常を認めなかった。2019 年 3 月 31 日現在の解析総数は 12 例となり、*H19DMR*-LOM: 4 例（33.3%）、*upd(7)mat*: 1 例（8.3%）、既知の異常なし: 7 例（58.3%）であった。

3. BWS 関連疾患

Temple 症候群（14 番染色体母性ダイソミー症候群）疑いの 1 症例を解析したが、14 番染色体母性ダイソミーは認められず、BWS/SRS で見られる 11p の異常も認められなかった。

D. 考察

本邦最大数の BWS 症例解析を行い、本邦 BWS の発症原因別頻度が明らかとなった。研究目的の項目で述べたように、発症原因のタイプ別に腫瘍の種類と発生頻度が異なることから、遺伝子解析の結果に応じて腫瘍のスクリーニングを行うことで、患児の QOL の向上につながる。また、生殖補助医療で BWS、SRS、Angelman 症候群の出生頻度が高くなることが知られている。これまでの解析で ART 出生児の総数が 17 例となり、このうち 12 例が *KvDMR1*-LOM であった。ART 出生児では、*KvDMR1*-LOM で BWS が発症することが裏付けられた。一方、片側肥大・巨舌を呈した patUPD モザイク症例の解析から、モザイク率が *IGF2* の発現量に関連していた。*IGF2* は父性発現インプリント遺伝子であることから、11p の patUPD モザイク率が高くなればその発現量も増加すると考えられる。解析結果は推測通りであり、*IGF2* の過剰発現が密な筋繊維を惹起し、片側肥大を引き起こすことが明らかとなった。BWS においては、遺伝子診断を行うことで臨床診断基準の拡張・修正、感度・特異度の向上につながり、患児の QOL 向上に貢献できると考えられる。

また、家族会アンケート調査からは 13 才以降も尿路結石、側湾症の症状が新たに出現する

こと、女性では乳腺良性腫瘍が発症することが明らかとなった。BWS では、臨床診断確定後も成長とともに追加症状が出現することを示唆しており、長期的な診療が必要である可能性を示している。

SRS および Temple 症候群疑いの解析に関しては、今年度は原因となる異常を見いだすことができなかった。しかしながら、whole exome sequencing 解析や whole genome sequencing 解析等を行うことで原因を明らかにできる可能性がある。

E. 結論

過成長を主徴とする先天異常症候群として、BWS の遺伝子解析を行った。本邦 BWS の発症原因別頻度が明らかになるとともに、ART 出生 BWS は KvDMR1-LOM が原因であること、patUPD 症例ではモザイク率上昇に伴う IGF2 発現増加が組織肥大の原因であることがわかった。遺伝子解析結果に応じた医学的管理を行うことで、それぞれの患児の QOL の向上に貢献できる。有償遺伝子解析に対する患児・家族のニーズは増加傾向にあることから、今後も継続する予定である。一方、家族会アンケート調査から臨床診断確定後も成長とともに追加症状が出現することが示唆された。成人症例の追跡調査が必要と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Joh K, Matsuhisa F, Kitajima S, Nishioka K, Higashimoto K, Yatsuki H, Kono T, Koseki H, Soejima H. Growing oocyte specific transcription-dependent *de novo* DNA methylation at the imprinted *Zrsr1*-DMR. *Epigenetics Chromatin*, 11:28, 2018
- 2) Nishioka K, Miyazaki H, Soejima H. Unbiased shRNA screening, using a combination of FACS and high-throughput sequencing, enables identification of novel modifiers of Polycomb silencing. *Scientific Reports*, 8(1):12128, 2018
- 3) Hidaka H, Higashimoto K, Aoki S, Mishima H, Hayashida C, Maeda T, Koga Y, Yatsuki H, Joh K, Noshiro H, Iwakiri R, Kawaguchi A, Yoshiura KI, Fujimoto K, Soejima H. Comprehensive methylation analysis of imprinting-associated differentially methylated regions in colorectal cancer. *Clin Epigenet*, 10:150, 2018
- 4) Yamada T, Sugiyama G, Higashimoto K, Nakashima A, Nakano H, Sumida T, Soejima H, Mori Y. Beckwith-Wiedemann syndrome with asymmetrical mosaic of paternal disomy

causing hemihyperplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 127(3):e84-e88, 2019

- 5) 副島英伸. Beckwith-Wiedemann 症候群. *産科と婦人科*. 85(6):667-672, 2018

2. 学会発表

- 1) 米田堅佑, 川口晃司, 高橋郁子, 小倉妙美, 堀越泰雄, 宮林和紀, 左藤由梨亜, 東元健, 副島英伸, 渡邊健一郎. 眼瞼腫脹を契機に神経芽細胞腫が判明した Beckwith-Wiedemann 症候群の女児. 第 121 回日本小児科学会学術集会 2018.4.20-22 福岡国際会議場 (日本小児科学会雑誌 第 122 巻 第 2 号 S131 ポスター2-P-453)
- 2) 副島英伸. エピジェネティクス-基礎と疾患-. 第 42 回日本産婦人科栄養・代謝研究会 2018.8.30 ホテルニューオータニ幕張 (プログラム抄録集 p20-21、教育講演)
- 3) 副島英伸. Beckwith-Wiedemann 症候群とゲノムインプリンティング. 第 175 回染色体研究会 2018.10.6 東京医科大学病院 (特別講演)
- 4) 香田翼, 三崎真衣子, 柴田暁男, 川本久美, 東元健, 副島英伸, 竹島泰弘. 超早産児で出生した 11p15.5 重複による Beckwith-Wiedemann 症候群の一例. 日本人類遺伝学会第 63 回大会 2018.10.10-13. パシフィコ横浜 (ポスターP-195、プログラム・抄録集 p152/p353)
- 5) 副島英伸. エピゲノム—基礎と疾患— 日本人類遺伝学会第 63 回大会 2018.10.10-13. パシフィコ横浜 (プログラム・抄録集 p30、教育セッション 11 (ES11-1))
- 6) 西岡憲一, 宮崎仁美, 副島英伸. FACS と次世代シーケンサーを用いた shRNA ライブラリースクリーニングによるポリコムサイレンシング制御因子の探索. 第 41 回日本分子生物学会年会 2018.11.28-30. パシフィコ横浜 (プログラム p215, ポスター 1P-0797)
- 7) 副島英伸. 佐賀大学における HBOC の遺伝カウンセリング BRCA 遺伝子変異陽性乳癌診療セミナー in Saga (アストラゼネカ). 2018.11.20 ホテルニューオータニ佐賀
- 8) 副島英伸. HBOC の遺伝カウンセリング. 第 11 回佐賀乳腺フォーラム (日本化薬) 特別講演. 2019.2.22 ガーデンテラス佐賀ホテル&マリトピア
- 9) Watanabe H, Higashimoto K, Nagano Y, Kurokawa M, Uemura T, Soejima H. NSD1 haploinsufficiency evokes DNA hypomethylation at imprinted DMRs and the increased expression of imprinted genes. *EURAPS Research Meeting 2018*. 2018.5.16-17 (Oral, Program p3)
- 10) Soejima H, Matsuhisa F, Kitajima S, Nishioka K, Higashimoto K, Yatsuki H, Kono T, Koseki, H Joh K. Transcription-dependent *de novo* DNA

methylation at the imprinted Zrsr1-DMR occurs in the growing oocyte, but not in early embryonic cells. European Society of Human Genetics Conference 2018. 2018.6.16-19. MiCo Milano Congressi, Milan, Italy (Poster, P17.26B/B)

- 11) Soejima H. Beckwith-Wiedemann syndrome and placental mesenchymal dysplasia. International Federation of Placenta Associations (IFPA 2018 Tokyo Meeting) 2018.9.21-24. The Jikei University School of Medicine, Tokyo (Program, Workshop 8 Epigenetics, p52)

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