

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
佐賀大学医学部・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・ウィードマン症候群（BWS）疑い症例とソトス症候群（SS）症例のエピゲノム・ゲノム解析を行った。令和元年度中に解析した BWS 症例数は 21 例で、これまでの解析総数は 282 例となった。BWS の有償遺伝子解析に対する患児・家族のニーズは引き続き増加傾向にあり、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。また、H19DMR 内に変異を持つ BWS 家系において、変異が母から子に伝わる際、世代を経るに従い DNA メチル化異常がより高度かつ広範囲になる「DNA メチル化促進現象」を見いだした。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。また、SS の解析から NSD1 ハプロ不全による DNA メチル化異常の標的部位を同定し、病態との関連性を明らかにした。

研究協力者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

東元 健 佐賀大学医学部・講師（特定）
八木ひとみ 佐賀大学医学部・技術専門職員

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・ウィードマン症候群（BWS）とソトス症候群（SS）を対象とし、典型例および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。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/KCNQ1OT1 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。

一方、BWS 親の会が実施したアンケート調査の一部データの提供を受け、患者における診断後の症状の変化等について明らかにする。

ソトス症候群（SS）は、エピゲノム修飾因子であるヒストン H3K36 メチル化酵素（モノメチル化、ジメチル化; H3K36me1/2）をコードする NSD1 遺伝子のハプロ不全によって発症し、精神発達遅滞、過成長、大頭、骨年齢促進、痙攣、心疾患、尿路異常、側彎などを呈する先天異常症候群である。NSD1 によって生じた H3K36me2 は、SETD2 によりトリメチル化され H3K36me3 となる。H3K36me2 と H3K36me3 は新規 DNA

メチル化酵素 (DNMT3A, DNMT3B) によって認識され、ゲノムの DNA メチル化を制御している。これらは、NSD1 と DNA メチル化の強い関連性を示しているため、DNA メチル化の具体的な標的遺伝子を同定することを試みた。

当研究室では、2012 年より有償でインプリンティング疾患の遺伝子解析を行っている。

B. 研究方法

1. BWS のエピゲノム・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、BWS 症状について統計学的に解析した。

3. SS のエピゲノム・ゲノム解析

NSD1 と DNA メチル化に関連性があることから、DNA メチル化で遺伝子発現が制御されているインプリンティング領域を対象にメチル化解析を行った。31 名の SS 患者末梢血 DNA を用いてゲノム中の 28 カ所のインプリント DMR を MALDI-TOF-MS および bisulfite-pyrosequencing にて解析した。

(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 のエピゲノム・ゲノム解析

令和元年度に解析した症例数は 21 例で、KvDMR1-LOM 7 例、H19DMR-GOM 3 例、patUPD モザイク 4 例、CDKN1C 機能喪失変異 1 例を見いだした。これら既知の異常を認めない症例は 6 例であった。2020 年 3 月 31 日現在の解析総数は 282 例となった。遺伝子解析の結果を表 1 に示す。

| 発症原因 | 症例数 | 頻度 | ART 出生児 |
|-------------|-----|-------|---------|
| KvDMR1-LOM | 97 | 34.4% | 15 |
| H19DMR-GOM | 20 | 7.1% | 0 |
| patUPD モザイク | 57 | 20.2% | 2 |
| CDKN1C 変異 | 17 | 6.0% | 0 |
| 11p15 父性重複 | 9 | 3.2% | 0 |
| 既知の異常なし | 82 | 29.1% | 5 |

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 22 名で、このうち 15 名が KvDMR1-LOM を呈しており、ART 出生 BWS 児は有意に低メチル化異常を呈していた (χ^2 検定、 $p = 0.0222$)。

H19DMR-GOM の約 20% は H19DMR 内にある OCT4 結合部位 (OBS) の変異に起因する。OBS 変異が母由来で子に伝わった際、H19DMR が高メチル化し、BWS が発症する。OBS に変異を持つ BWS 家系を解析したところ、変異が母から子に伝わると、世代を経るに従い H19DMR がより高度かつ広範囲にメチル化する「DNA メチル化促進現象」が生じることを見いだした (図 1。図中 ICR1 は H19DMR を示す)。

図 1 DNA メチル化促進現象

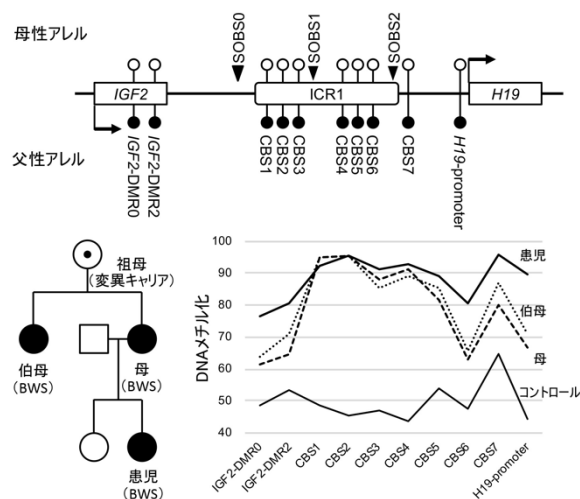


表 1 発症原因別頻度 (n = 282)

2. 家族会アンケート調査

家族会アンケート調査は、65名の回答があった。平均年齢 10.3 ± 7.5 (0~32歳)、性比は男:女 = 32:33 であった。主な症状について表2にまとめた。

表2 主な症状

| 症状 | あり | 総数 | 症状ありの頻度 |
|---------|----|----|---------|
| 過成長 | 42 | 65 | 64.6% |
| 臍帯ヘルニア | 25 | 65 | 38.5% |
| 腹直筋離開 | 9 | 65 | 13.8% |
| 臍ヘルニア | 22 | 65 | 33.8% |
| 巨舌 | 63 | 64 | 98.4% |
| 耳の奇形 | 35 | 65 | 53.8% |
| 低血糖 | 29 | 65 | 44.6% |
| 腹腔内臓器腫大 | 19 | 64 | 29.7% |
| 片側肥大 | 32 | 65 | 49.2% |
| 火焰状母斑 | 20 | 64 | 31.3% |
| 心疾患 | 6 | 65 | 9.2% |

腫瘍は9例(13.8%)に認め、Wilms腫瘍4例、肝臓腫瘍3例、神経芽腫4例であった。このうち2例は、肝芽腫と神経芽腫を合併していた。また、女児のうち乳腺腫瘍を発症したのは3例(9.1%)で、発症年齢の中央値は16.5歳であった。

興味深いことに尿路結石と側彎症については、有症状患者と無症状患者の平均年齢に統計学的な有意差があり、これらの症状は少なくとも学童期以降に発症することが示唆された(表3)。

表3 尿路結石・側彎症

| | あり | なし | 頻度 or p 値 |
|------|----------------|---------------|--------------|
| 腎結石 | 6 | 59 | 9.2% |
| 平均年齢 | 21.5 ± 2.7 | 9.2 ± 0.9 | $p = 0.0017$ |
| 尿管結石 | 4 | 61 | 6.2% |
| 平均年齢 | 22.3 ± 3.5 | 9.5 ± 0.9 | $p = 0.0030$ |
| 側彎症 | 11 | 54 | 16.9% |
| 平均年齢 | 18.2 ± 2.0 | 8.7 ± 0.9 | $p = 0.0004$ |

3. SSのエピゲノム解析

約半数のSS症例でIGF2-DMR0とIG-DMRの低メチル化が生じていることを見いだした。培養細胞を用いた実験から、IGF2-DMR0がIGF2のP0プロモーター特異的エンハンサーであること、IGF2-DMR0の低メチル化によりP0プロモーター特異的IGF2転写物の発現が上昇することを証明した。IGF2-DMR0の低メチル化によ

るP0プロモーター特異的IGF2の発現上昇がソトス症候群の症状の一つである過成長に関連することを強く示唆する結果であった。

D. 考察

昨年度に引き続きBWS症例解析を行い、本邦BWSの発症原因別頻度を明らかにした。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、ART出生児におけるBWSでは、KvDMR1-LOMが多いことを昨年度に引き続き確認した。

H19DMRにおける「DNAメチル化促進現象」を見いだした。H19DMRのDNAメチル化は、男性では、PGCで消去、精子形成過程でメチル化、受精後はメチル化が維持される。一方、女性では、PGCで消去され、卵成熟過程および受精後は非メチル化が維持される。このことから、女性においてPGCでの消去が不十分であること、卵成熟過程あるいは受精後の非メチル化維持が不十分であること(新規メチル化からのプロテクションが不十分であること)が、「DNAメチル化促進現象」の原因として考えられた。

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尿路結石と側彎症が学童期以降に発症することが示唆された。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。

SSでは、NSD1ハプロ不全によるDNAメチル化異常の標的部位としてIGF2-DMR0を同定し、インプリント遺伝子IGF2の発現調節に関わることを明らかにした。SSとBWSはどちらも過成長症候群であり、臨床症状のオーバーラップが知られている。IGF2の過剰発現は、BWSの発症原因の一つであることから、臨床症状のオーバーラップはIGF2過剰発現に関連することが推測された。

E. 結論

過成長を主徴とする先天異常症候群として、BWSとSSのエピゲノム・ゲノム解析を行った。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、母性アレルのOBS変異が世代を経て伝わるとDNAメチル化促進現象が生じることを明らかにした。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。

SSでは、NSD1ハプロ不全によるDNAメチル化異常の標的部位を同定し、病態との関連性を明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Acharya G, Bartolomei M, Carter AM, Chamley L, Cotton CF, Hasegawa J, Hasegawa Y, Hayakawa S, Kawaguchi M, Konwar C, Magawa S, Miura K, Nishi H, Salomon C, Sato K, Soejima H, Soma H, Sørensen A, Takahashi H, Tomita T, Whittington CM, Yuan V, O'Tierney-Ginn P. IFPA meeting 2018 workshop report I: Reproduction and placentation among ocean-living species; placental imaging; epigenetics and extracellular vesicles in pregnancy. *Placenta*. 84:4-8, 2019
- 2) Sun F, Higashimoto K, Awaji A, Ohishi K, Nishizaki N, Tanoue Y, Aoki S, Watanabe H, Yatsuki H, Soejima H. The extent of DNA methylation anticipation due to a genetic defect in ICR1 in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Hum Genet*, 64(9):937-943, 2019
- 3) Nishida Y, Hara M, Higaki Y, Taguchi N, Nakamura K, Nanri H, Horita M, Shimano C, Yasukata J, Miyoshi N, Yamada Y, Higashimoto K, Soejima H, Tanaka K. Habitual light-intensity physical activity and ASC methylation in a middle-aged population. *Int J Sports Med*, 40(10):670-677, 2019
- 4) Tomiga Y, Ito A, Sudo M, Ando S, Eshima H, Sakai K, Nakashima S, Uehara Y, Tanaka H, Soejima H, Higaki Y. One-week, but not 12-hours, cast immobilization alters promoter DNA methylation patterns in the nNOS gene in mouse skeletal muscle. *J Physiol*, 597(21):5145-5159, 2019
- 5) Watanabe H, Higashimoto K, Miyake N, Morita S, Horii T, Kimura M, Suzuki T, Maeda T, Hidaka H, Aoki S, Yatsuki H, Okamoto N, Uemura T, Hatada I, Matsumoto N, Soejima H. DNA methylation analysis of multiple imprinted DMRs in Sotos syndrome reveals IGF2-DMR0 as a DNA methylation-dependent, P0 promoter-specific enhancer. *FASEB J* 34(1):960-973, 2020
2. 学会発表
 - 1) 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. 西岡憲一、宮崎仁美、副島英伸. 第13回日本エピジェネティクス研究会年会 2019.5.28-29. 国内、ポスター
 - 2) The extended DNA methylation anticipation due to ICR1 mutation in familial Beckwith-Wiedemann syndrome patients. Sun F, Higashimoto K, Soejima H. 第13回日本エピジェネティクス研究会年会 2019.5.28-29. 国内、ポスター
 - 3) Methylation anticipation extends to the outside of ICR1 in familial Beckwith-Wiedemann syndrome patients with ICR1 mutation. Sun F, Higashimoto K, Soejima H. European Society of Human Genetics Conference 2019. 2019.6.15-18. 海外、ポスター
 - 4) IGF2 overexpression due to IGF2-DMR0 hypomethylation in Sotos syndrome. Higashimoto K, Watanabe H, Miyake N, Morita S, Horii T, Maeda T, Hidaka H, Aoki S, Yatsuki H, Okamoto N, Hatada I, Matsumoto N, Soejima H. The 59th Annual Meeting of The Japanese Teratology Society, The 13th World Congress of The International Cleft Lip and Palate Foundation 2019.7.26-29. 国内、口頭
 - 5) 本邦の間葉性異形成胎盤症例における妊娠高血圧症候群の発症に関する検討—PMD 全国調査の副次的解析—. 小寺千聡、大場隆、副島英伸、片渕秀隆. 第40回日本妊娠高血圧学会学術集会 2019.9.21-22 国内、ポスター
 - 6) ヒト疾患のエピゲノム. 副島英伸. 日本人類遺伝学会第64回大会 2019.11.6-9 国内、口頭 (教育セッション)
 - 7) 先天異常症候群のエピゲノム異常. 副島英伸. 日本人類遺伝学会第64回大会 2019.11.6-9 国内、口頭 (シンポジウム)
 - 8) The extent of DNA methylation anticipation due to a genetic defect in ICR1 in Beckwith-Wiedemann syndrome. Sun F, Higashimoto K, Soejima H. 日本人類遺伝学会第64回大会 2019.11.6-9 国内、口頭
 - 9) 乳癌と卵巣癌を合併する症例の検討. 大隈恵美、橋口真理子、山本徒子、西山哲、光貴子、中尾佳史、副島英伸、横山正俊. 日本人類遺伝学会第64回大会 2019.11.6-9 国内、ポスター
 - 10) Atypical DNA methylation defects of ICR1 cause two opposite imprinting disorders, Beckwith-Wiedemann syndrome and Silver-Russell syndrome. Soejima H, Sun F, Tanoue Y, Yatsuki H, Higashimoto K. 第42回

日本分子生物学会年会 2019.12.3-6 国内、
ポスター

- 11)IGF2-DMR0はDNAメチル化依存的なIGF2
P0プロモーター特異的エンハンサーである
-ソトス症候群のインプリントDMRのD
NAメチル化解析から-東元健、渡邊英孝、
三宅紀子、森田純代、堀居拓郎、畑田出穂、
松本直通、副島英伸、第42回日本分子生物
学会年会 2019.12.3-6 国内、ポスター

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）