

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業）  
総合研究報告書

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、先天異常症候群等

研究分担者 緒方 勤  
国立大学法人浜松医科大学 医学部 特命研究教授

### 研究要旨

本研究班の目的は、Reverse phenotypingを包含したアプローチにより先天異常症候群のライフステージ全体の自然歴と合併症を把握することである。そして、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。本研究期間の成果には、多くのインプリンティング疾患患者の集積、第14 番染色体父親性ダイソミー症候群（Kagami-Ogata症候群）の新規発症機序同定、Silver-Russell症候群の新規発症機序同定、Prader-Willi症候群コンセンサスガイドラインの作成と公開、エピ変異患者における多座位低メチル化（MLID）発症機序の解明、世界初となるSVAレトロトランスポソンのインプリンティングドメイン内挿入による偽性副甲状腺機能低下症IB型の同定、KCNQ1OT1:TSS-DMRの低メチル化エピ変異によるBeckwith-Wiedemann症候群患者86例中7例における多座位低メチル化（MLID）の同定、MLID患者における世界初のZNH445ならびにTLE6変異を含む複数のメチル化DMR維持タンパク構造遺伝子変異の同定が挙げられる。われわれは、これらの成果をもとに、Kagami-Ogata症候群、Temple症候群、Silver-Russell症候群の臨床診断基準や遺伝学的アプローチと共に、自然歴や合併症のデータベースを作成する予定である。

### 研究協力者

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

### A. 研究目的

本研究班の目的は、Reverse phenotypingを包含したアプローチにより、第14 番染色体父親性ダイソミー症候群（Kagami-Ogata症候群）やTemple症候群、Silver-Russell症候群を主とする先天異常症候群のライフステージ全体の自然歴と合併症を把握し当該疾患のガイドライン作成に結実させることである。

### B. 研究方法

インプリンティング疾患が想定される患者を国内外から集積し、遺伝学的解析を行い、その原因に基づいて表現型を再検討する。すなわち、通常の臨床診断から遺伝子診断という通常の流れと共に、reverse phenotyping の手法を駆使した自然歴と合併症の把握を実施する。

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

### C. 研究結果

#### <インプリンティング疾患患者の集積>

われわれは、国内外からインプリンティング疾患患者の集積を長年に亘って行っている。現在までに、約 60 例の第 14 番染色体父親性ダイソミー症候群（Kagami-Ogata 症候群）患者、約 40 例の Temple 症候群患者、約 400 例の Silver-Russell 症候群患者を集積している。このような大規模のインプリンティング疾患患者の集積は

### （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

世界的にも稀であり、国際共同研究も含めて、研究の基盤となっている。

### ＜第14 番染色体父親性ダイソミー症候群

（Kagami-Ogata症候群）の新規発症機序同定＞  
本症候群は、多くのインプリンティング疾患と同様、インプリンティング領域を含む片親性ダイソミー、エピ変異、微細欠失に起因することが知られている。本年度、われわれは、世界で初めて第14染色体インプリンティング領域を含む均衡型転座によるKagami-Ogata症候群患者を同定した。

この患者は、NICU入院時にKagami-Ogata症候群に特徴的なレントゲン像であるコートハンガー様肋骨とベル型胸郭を呈した。（図1）。

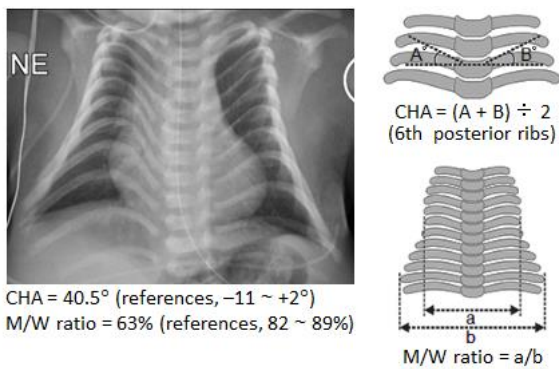
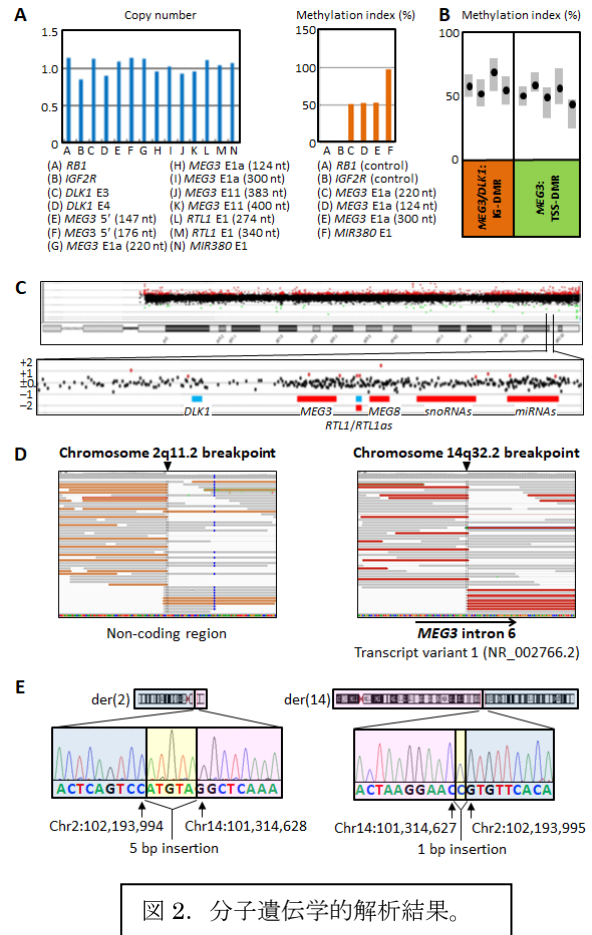


図1. Kagami-Ogata 症候群に特徴的なレントゲン像

しかし、既知の父性ダイソミー、*MEG3/DLK1:IG-DMR*と*MEG3:TSS-DMR*のエピ変異、微細欠失は除外された（図2A, B, C）。そして、染色体検査で母由来の46,XX,t(2;14)(q11.2;q32.2)が検出された。そこで、全ゲノム解析を行い、正確な欠失点が*MEG3*上に存在することを明らかとした（図2D, E）。

この結果は、第14染色体インプリンティング領域の母性発現遺伝子群が、*MEG3*のプロモーターで発現する1塊の遺伝子であり、*MEG3*の破断により全ての母性発現遺伝子群の作用が消失したことで説明される。すなわち、*RTL1as*の発現低下により、父性発現遺伝子*RTL1*が過剰発現しKagami-Ogata症候群を招いたと推測される（図3）。母の正常表現型は、この切断点は父由来の第14染色体に存在したと仮定することで説明される。



### ＜Silver-Russell症候群の新規発症機序同定＞

われわれは、Netchine-HarbisonのSilver-Russell症候群診断基準6つを全て満足する患者において全染色体母性ダイソミーモザイク（末梢血白血球において全染色体母性ダイソミー細胞70%と正常細胞30%のモザイク）という極めて稀な状態を同定した。すなわち、全ての解析した染色体のメチル化可変領域が母由来パターン優位のメチル化状態を呈し（図4）、SNP array解析（図5）およびマイクロサテライト解析（図6）で第2極体のretentionを介して産生されたことが判明した（図7）。この第2極体のretentionを介するparthenogenetic mosaicism形成の同定は世界初の成果である。

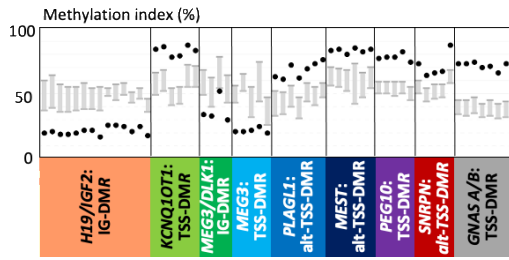


図 4. 母由来アレル優位の DMR メチル化解析結果。

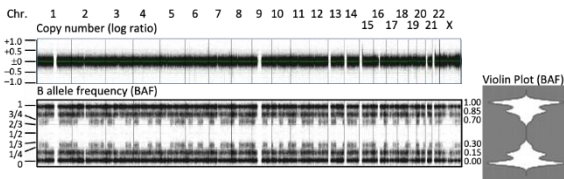


図 5. 4 および 6 BAF bands の存在を示す SNP array 解析

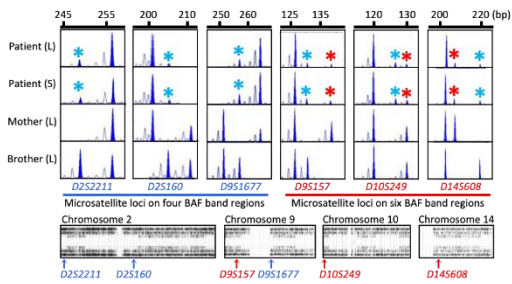


図 6. マイクロサテライト解析結果。4 BAF バンド領域上のマイクロサテライト座位は、1 個の maternal isodisomy を示す大きなピークと 1 個の父由来マイナーピークを伴う。一方、6 BAF バンド領域上のマイクロサテライト座位は、1 個の maternal isodisomy を示す大きなピークと 1 個の父由来マイナーピークと 1 個の母由来マイナーピークを伴う。

この患者は、成長障害を主徴とする典型的なシルバーラッセル症候群の表現型を呈し、これは、 $upd(7)mat$ ,  $upd(11)mat$ ,  $upd(1)mat$ ,  $upd(20)mat$  がシルバーラッセル症候群を呈することに一致する。

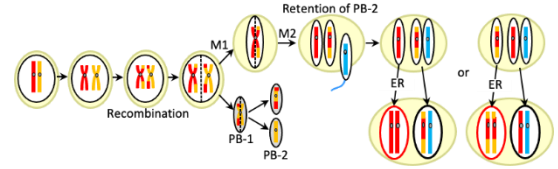


図 7. 第 2 極体の retention を介する parthenogenetic mosaicism 形成機序

### <Prader-Willi 症候群コンセンサスガイドラインの作成と公開>

われわれは、厚生労働科研費「性分化・性成熟異常を伴う内分泌症候群(プラダーウイリ症候群・ヌーナン症候群を含む)の診療水準向上を目指す調査研究」と連携し、31項目に及ぶCQ/Qを網羅した「プラダーウイリ症候群コンセンサスガイドライン」を作成し、それを日本小児内分泌学会ホームページから公開した (<http://jspe.umin.jp/medical/gui.html>)。これにより、プラダーウイリ症候群の診断・治療の向上や医療の均てん化が促進されると期待される。

### <エピ変異患者における多座位低メチル化 (MLID) 発症機序ならびに臨床像修飾効果の解明>

#### 1. 国際共同研究論文の公表

エピ変異とは、インプリンティング疾患発症機序の代表であり、メチル化可変領域 (DMR) が高メチル化あるいは低メチル化を示す状態を示す。これについては、しばしばモザイクが検出されること、同胞発症がほぼ見られないことから、受精後の異常であり孤発性とされてきたが、最近、低メチル化エピ変異症例において、MLID (multilocus imprinting disturbance、多座位メチル化異常) と称される比較的軽度の低メチル化が複数存在しうることが判明し、これらの症例において、卵母細胞や受精後体細胞の DMR メチル化維持を担うタンパク複合体をコードする遺伝子群に変異が同定されてきた。これについて、われわれは、世界中のインプリンティング疾患研究者と共同で現在までのデータをまとめ、この MLID を伴う低メチル化型エピ変異が、主に卵母細胞あるいは初期接合体における DMR のメチル化を維持するタンパク複合体コード遺伝子の変異に起因することを明らかとした (図 8)。

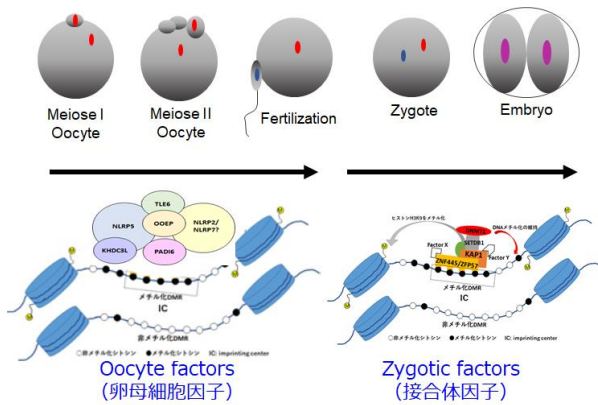


図 8. DMR メチル化維持を担う卵母細胞因子と接合体因子

＜世界初となるTemple症候群とMLIDを呈する女児における接合体因子ZNF445の両アレル変異の同定＞

現在接合体因子としては、マウスの実験からはZFP57とZNF445が知られており、これらはほとんどのDMRにおいて強調して働いている。しかし、新生児一過性糖尿病発症責任DMRであるPLAGL1: alt-TSS DMRのメチル化はZFP57のみが、そして、とTemple症候群発症責任DMRであるMEG3/DLK1:IG-DMRのメチル化はZNF445のみが担うことが知られている。これに一致して、ZFP57変異は、PLAGL1: alt-TSS DMRの低メチル化エピ変異による新生児一過性糖尿病と共にMLIDを招くことが知られている。

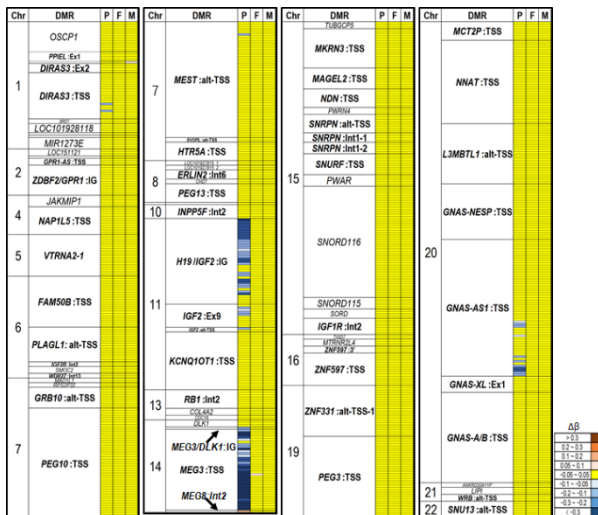


図 9. Temple 症候群発症 MEG3/DLK1:IG-DMR の高度低メチル化と MLID が認められる患者

われわれは、上記に一致してTemple症候群と共に、図9に示すMLIDを伴う患者において、ZNF445のホモのtruncation variantを世界で初めて同定した (図10)。

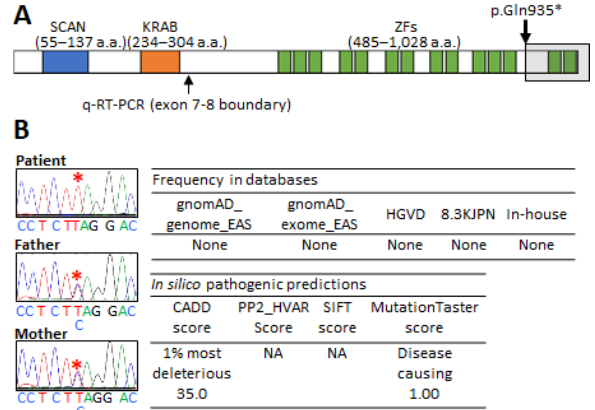


図 10. 上記患者で同定された変異

＜非典型的シルバーラッセル症候群とMLIDを呈する女児における卵母細胞因子NLRP2の片アレル変異の同定＞

われわれは、非典型的シルバーラッセル症候群患者においてシルバーラッセル症候群発症に関連するH19/IGF2:IG-DMRの低メチル化とMLIDを呈する患者において (図11)、卵母細胞因子NLRP2の片アレル変異を同定した (図12)。

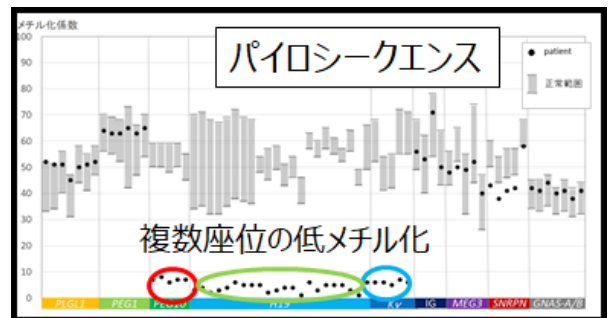


図 11. 上記患者で同定された MLID.

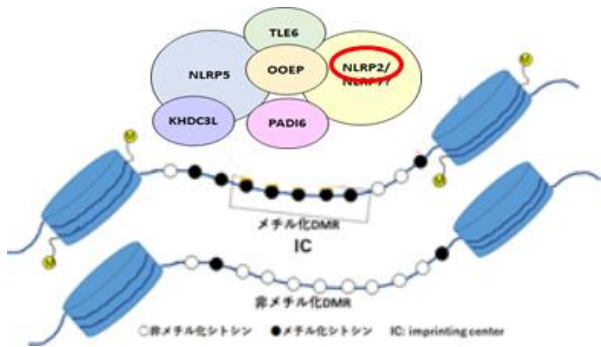


図 12. 変異が同定された NLRP2 は、卵母細胞における DMR のメチル化維持を担うタンパク複合体を形成する

＜SVAレトロトランスポゾンのインプリンティングドメイン内挿入による偽性副甲状腺機能低下症IB型の同定＞

偽性副甲状腺機能低下症IB型は、STX16遺伝子内の微細欠失とAB-DMRの低メチル化により発症することが知られている。われわれは、STX16遺伝子内の微細欠失を伴うことなく発症したAB-DMRの低メチル化に起因する偽性副甲状腺機能低下症IB型の家系例を見出した(図13,14)。

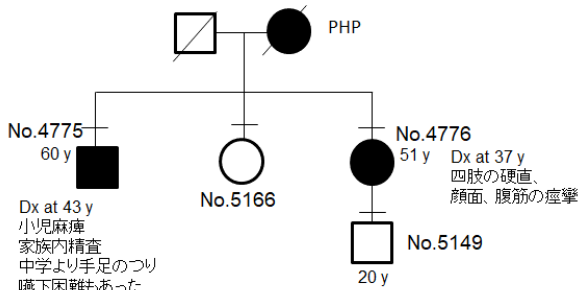


図 13. 偽性副甲状腺機能低下症 IB 型家系図

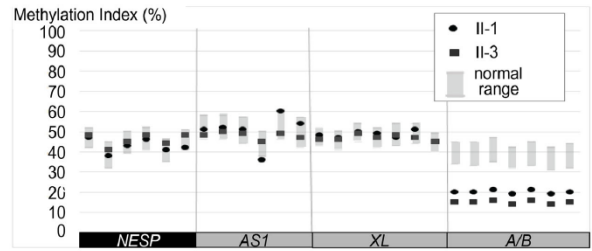


図 14. AB-DMR の低メチル化

この家系では、一般的な異常が同定されなかったため、全ゲノム解析を行い、GNASインプリンティングドメインの詳細な構造を解析した。その結果、A/B上流にSVAレトロトランスポゾンの挿入が同定され、また、NESP55の低発現も同定された(図-15)。

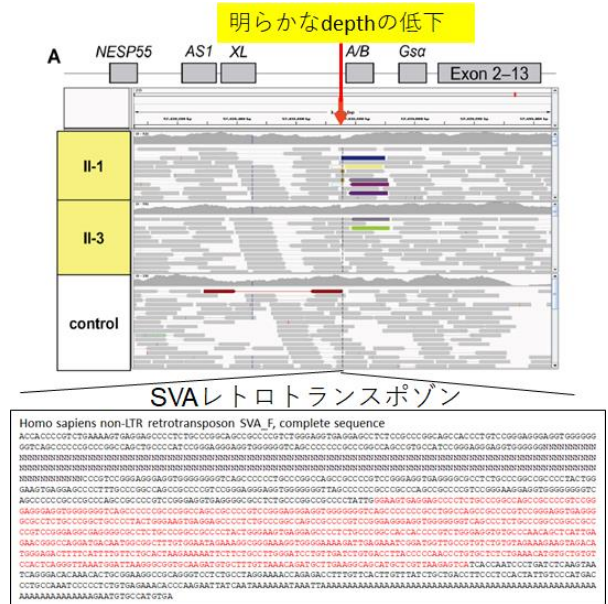


図 15. A/B 上流への SVA レトロトランスポゾンの挿入

この成果は、レトロトランスポゾン挿入が発現異常を招く機序は明確ではないが、世界初のSVAレトロトランスポゾンのインプリンティングドメイン内挿入による偽性副甲状腺機能低下症IB型として受理された。

＜KCNQ10T1:TSS-DMRの低メチル化エピ変異によるBeckwith-Wiedemann症候群患者86例中7例における多座位低メチル化(MLID)の同定＞

MLIDは、その少なくとも一部が、卵母細胞や接合体におけるメチル化DMR維持タンパク複

合体をコードする遺伝子異常に起因することが判明してきた病態である。われわれは、既に多くの患者でMLIDを同定してきたが、本年度はKCNQ1OT1:TSS-DMRの低メチル化エピ変異によるBeckwith-Wiedemann症候群患者86例を、ME034 MLIDというMS-MLPAプローブを用いて集中的に解析した。その結果、7例においてMLIDを同定した(図16)。この結果は、MLIDが一定の頻度で存在することを示すものである。

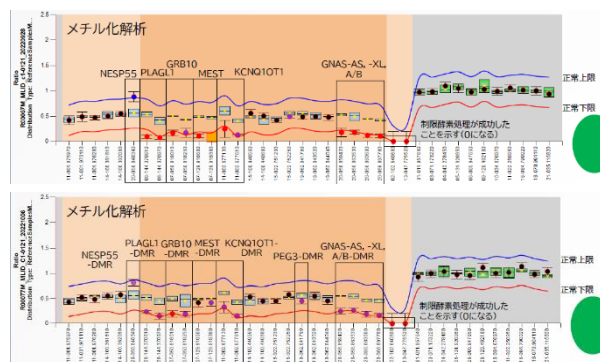


図 16. MLID を示す代表的な 2 例

### <MLID患者における世界初のメチル化DMR維持タンパク構造遺伝子TLE6変異の同定>

われわれは、昨年度ZNF445の両アレル性変異を含め、複数のMLID陽性患者においてメチル化DMR維持タンパク構造遺伝子変異を同定してきた。本年度は、候補とされてきたTLE6変異を同定した(図17)。これは、複数の遺伝子変異がMLIDに関与することを示すデータである。

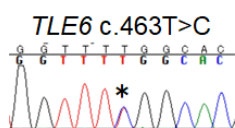


図 17. 同定された TLE6 変異

#### 公共のデータベースと病的予測スコアの詳細

**TLE6: NM\_001143986.2:c.463T>C,p.(Trp155Arg)**

#### Frequency

| gnomAD | HGVD | 14KJPN | In-house |
|--------|------|--------|----------|
| -      | -    | -      | -        |

#### Prediction score

| CADD PHRED           | PP2_HVAR | SIFT      | Mutation Taster |
|----------------------|----------|-----------|-----------------|
| 10% most deleterious | Damaging | Tolerated | Benign          |
| 19.89                | 0.99     | 0.093     |                 |

## D. 考察

本研究期間の成果には、多くのインプリンティング疾患患者の集積、第14番染色体父親性ダイソミー症候群(Kagami-Ogata症候群)の新規発症機序同定、Silver-Russell症候群の新規発症機序同定、Prader-Willi症候群コンセンサスガイドラインの作成と公開、エピ変異患者における多座位低メチル化(MLID)発症機序の解明、世界初となるSVAレトロトランスポゾンによる偽性副甲状腺機能低下症IB型の同定、KCNQ1OT1:TSS-DMRの低メチル化エピ変異によるBeckwith-Wiedemann症候群患者86例中7例における多座位低メチル化(MLID)の同定、MLID患者における世界初のZNF445ならびにTLE6変異を含む複数のメチル化DMR維持タンパク構造遺伝子変異の同定が挙げられる。

## E. 結論

われわれは、これらの成果をもとに、Kagami-Ogata症候群、Temple症候群、Silver-Russell症候群の臨床診断基準や遺伝学的アプローチと共に、自然歴や合併症のデータベースを作成する予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Hara-Isono K, Matsubara K, Fuke T, Yamazawa K, Satou K, Murakami N, Saitoh S, Nakabayashi K, Hata K, Ogata T, Fukami M, Kagami M. Genome-wide methylation analysis in Silver-Russell syndrome, Temple syndrome, and Prader-Willi syndrome. Clin Epigenetics. 2020;12(1):159.
- 2) Hara-Isono K, Matsubara K, Mikami M, Arima T, Ogata T, Fukami M, Kagami M. Assisted reproductive technology represents a possible risk factor for development of epimutation-mediated imprinting disorders for mothers aged >= 30 years. Clin Epigenetics. 2020;12(1):111.
- 3) Masunaga Y, Inoue T, Yamoto K, Fujisawa Y, Sato Y, Kawashima-Sonoyama Y, Morisada N, Iijima K, Ohata Y, Namba N, Suzumura H, Kuribayashi R, Yamaguchi Y, Yoshihashi H, Fukami M, Saitsu H, Kagami M, Ogata T. IGF2 Mutations. J Clin Endocrinol Metab. 2020;105(1).
- 4) 緒方 勤. 【FGR/SGAをめぐるトピックス】産科 FGR/SGAの疫学と発症要因 主な発症要因:SGAを招く遺伝学的異常-Silver-Russell症候群を主に. 周産期医学. 2020;50(11):1816-21.

- 5) Fuke T, Nakamura A, Inoue T, Kawashima S, Hara KI, Matsubara K, Sano S, Yamazawa K, Fukami M, Ogata T, Kagami M. Role of Imprinting Disorders in Short Children Born SGA and Silver-Russell Syndrome Spectrum. *J Clin Endocrinol Metab.* 2021;106(3):802-13.
- 6) Hara-Isono K, Matsubara K, Hamada R, Shimada S, Yamaguchi T, Wakui K, Miyazaki O, Muroya K, Kurosawa K, Fukami M, Ogata T, Kosho T, Kagami M. A patient with Silver-Russell syndrome with multilocus imprinting disturbance, and Schimke immuno-osseous dysplasia unmasked by uniparental isodisomy of chromosome 2. *J Hum Genet.* 2021;66(11):1121-6.
- 7) Kagami M, Hara-Isono K, Matsubara K, Nakabayashi K, Narumi S, Fukami M, Ohkubo Y, Saitsu H, Takada S, Ogata T. ZNF445: a homozygous truncating variant in a patient with Temple syndrome and multilocus imprinting disturbance. *Clin Epigenetics.* 2021;13(1):119.
- 8) Masunaga Y, Fujisawa Y, Muramatsu M, Ono H, Inoue T, Fukami M, Kagami M, Saitsu H, Ogata T. Insulin resistant diabetes mellitus in SHORT syndrome: case report and literature review. *Endocr J.* 2021;68(1):111-7.
- 9) Masunaga Y, Kagami M, Kato F, Usui T, Yonemoto T, Mishima K, Fukami M, Aoto K, Saitsu H, Ogata T. Parthenogenetic mosaicism: generation via second polar body retention and unmasking of a likely causative PER2 variant for hypersomnia. *Clin Epigenetics.* 2021;13(1):73.
- 10) Omark J, Masunaga Y, Hannibal M, Shaw B, Fukami M, Kato F, Saitsu H, Kagami M, Ogata T. Kagami-Ogata syndrome in a patient with 46,XX,t(2;14)(q11.2;q32.2)mat disrupting MEG3. *J Hum Genet.* 2021;66(4):439-43.
- 11) Yamazawa K, Inoue T, Sakemi Y, Nakashima T, Yamashita H, Khono K, Fujita H, Enomoto K, Nakabayashi K, Hata K, Nakashima M, Matsunaga T, Nakamura A, Matsubara K, Ogata T, Kagami M. Loss of imprinting of the human-specific imprinted gene ZNF597 causes prenatal growth retardation and dysmorphic features: implications for phenotypic overlap with Silver-Russell syndrome. *J Med Genet.* 2021;58(6):427-32.
- 12) 緒方 勤, 鏡 雅代. 新規ヒトインプリンティング疾患「Kagami-Ogata 症候群」の樹立. *浜松医科大学小児科学雑誌.* 2021;1(1):4-19.
- 13) 緒方 勤, 村上 信行, 永井 敏郎. 【成長ホルモン(GH)治療を考える】プラダーウイリ症候群と GH 治療. *糖尿病・内分泌代謝科.* 2021;53(2):178-86.
- 14) Eggermann T, Yapici E, Blied J, Pereda A, Begemann M, Russo S, Tannorella P, Calzari L, de Nanclares GP, Lombardi P, Temple IK, Mackay D, Riccio A, Kagami M, Ogata T, Lapunzina P, Monk D, Maher ER, Tumer Z. Trans-acting genetic variants causing multilocus imprinting disturbance (MLID): common mechanisms and consequences *Clin Epigenetics* 14(1):41 2022
- 15) 緒方 勤. 【知っておくべき周産期・新生児領域の遺伝学的検査を展望する】Silver-Russell 症候群とその周辺. *周産期医学.* 2022;52(5):761-4.
- 16) Fuke T, Nakamura A, Inoue T, Kawashima S, Hara-Isono K, Matsubara K, Sano S, Yamazawa K, Fukami M, Ogata T, Kagami M. Frequency and clinical characteristics of distinct etiologies in patients with Silver-Russell syndrome diagnosed based on the Netchine-Harison clinical scoring system *J Hum Genet* 67(10) 607-11 2022
- 17) Hara-Isono K, Nakamura A, Fuke T, Inoue T, Kawashima S, Matsubara K, Sano S, Yamazawa K, Fukami M, Ogata T, Kagami M. Pathogenic Copy Number and Sequence Variants in Children Born SGA With Short Stature Without Imprinting Disorders *J Clin Endocrinol Metab.* 107(8):e3121-e33;2022
- 18) Kawashima S, Yuno A, Sano S, Nakamura A, Ishiwata K, Kawasaki T, Hosomichi K, Nakabayashi K, Akutsu H, Saitsu H, Fukami M, Usui T, Ogata T, Kagami M. Familial Pseudohypoparathyroidism Type IB Associated with an SVA Retrotransposon Insertion in the GNAS Locus. *J Bone Miner Res.* 37(10):1850-9,2022
- 19) Mackay D, Blied J, Kagami M, Tenorio-Castano J, Pereda A, Brioude F, Netchine I, Papingi D, de Franco E, Lever M, Sillibourne J, Lombardi P, Gaston V, Tauber M, Diene G, Bieth E, Fernandez L, Nevado J, Tumer Z, Riccio A, Maher ER, Beygo J, Tannorella P, Russo S, de Nanclares GP, Temple IK, Ogata T, Lapunzina P, Eggermann T. First step towards a consensus strategy for multi-locus diagnostic testing of imprinting disorders. *Clin Epigenetics* 14(1):143,2022
- 20) Tachibana N, Hosono K, Nomura S, Arai S, Torii K, Kurata K, Sato M, Shimakawa S, Azuma N, Ogata T, Wada Y, Okamoto N, Saitsu H, Nishina S, Hotta Y. Maternal Uniparental Isodisomy of Chromosome 4 and 8 in Patients with Retinal Dystrophy: SRD5A3- Congenital Disorders of Glycosylation and RP1-Related Retinitis Pigmentosa. *Genes (Basel)* 13(2):2022
- 21) 緒方 勤. Genetics in CKD, インプリンティング. *腎と透析.* 2023;94(3):339-45.

## 2. 学会発表

- 1) 緒方 勤, 性分化疾患 (プラダーウイリ症候群、ヌーナン症候群を含む) : シンポジウム難治性疾患政策研究事業各研究班報告, 第 93 回日本内分泌学会学術総会, WEB 開催, 2020.7.20-8.31, 国内
- 2) 緒方 勤, 生殖補助医療とインプリント異常 : シンポジウムにより誕生した児の健康, 第 67 回日本生殖医学会学術講演会・総会, 横浜, 2022.11.3-4, 国内
- 3) Ogata T, Plenary Lecture: Genomic imprinting and its clinical relevance: lesson from Kagami-Ogata syndrome and Temple syndrome., 11th International Meeting of Pediatric Endocrinology, Buenos Aires, March 4-7, 2023, 国際

## 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