

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21051

研究課題名(和文)シルバースラッセル症構群発症機序の解明と(エピ)遺伝子型 表現型解析

研究課題名(英文) Epigenotype-phenotype analysis of Silver-Russell syndrome pathogenesis mechanism

研究代表者

加藤 芙弥子 (Kato, Fumiko)

浜松医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号：10462798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：シルバースラッセル症候群(SRS)患者は、子宮内発育遅延、相対的頭囲拡大、逆三角形の顔貌、骨格左右非対称などを呈する先天奇形症候群であるが、患者の半数においては、発症機序不明である。われわれはSRS患者とその家族検体において、第11番染色体短腕末端に位置するICR1(IGF2-H19DMR)およびICR2(CDKN1C-KvDMR)等の領域について、メチル化状態の判定のためエピ変異解析を実施し、その結果、ICR1の低メチル化が同定され、確定診断に至った。シルバースラッセル症候群患者の解析から、疾患成立機序の解明、臨床評価への応用に貢献することを目的としている研究である。

研究成果の概要(英文)：Silver-Russell syndrome (SRS) is a congenital developmental disorder characterized by pre- and postnatal growth failure, relative macrocephaly, triangular face, hemihypotrophy, and fifth finger clinodactyly. SRS have a two major pathogenic factors. Previous studies have shown that epimutation(hypomethylation) of the paternally derived differentially methylated region(DMR) in the upstem of imprinting control region 1 (ICR1) located on the chr.11p15.5 and maternal uniparental disomy chr.7(upd(7)mat) account for around 45% and 5-10% of SRS patients, respectively. We performed methylation analysis for the of the 11p15 loci by pyrosequencing. As a result the SRS patients hypomethylations of ICR1 and was able to the definitive diagnosis. It is a study intended to elucidation of the disease establishment mechanism, the application to a clinical evaluation, improvement of the genetic counseling from the analysis of the SRS patient.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：シルバースラッセル症候群(SRS) 胎盤低形成 成長障害 インプリンティング疾患 エピ変異 第11番染色体 ICR1(H19DMR) ICR2(KvDMR)

1. 研究開始当初の背景

シルバーラッセル症候群は、胎児期および生後の成長障害と、相対的頭圍拡大や左右非対称などの特徴的な身体所見により特徴づけられる疾患である。われわれは、現在までにシルバーラッセル症候群患者約 150 例を集積し、第 11 染色体短腕遠位部に存在する ICR1 (imprinting control region 1) (図 1) のメチル化可変領域 (DMR: differentially methylated region) である H19-DMR のエピ変異 (低メチル化) を 43 例の患者で、第 7 染色体母性片親性ダイソミーを 9 例の患者で同定すると共に、全染色体母性片親性キメラや第 17 番染色体微細欠失を各 1 例において同定した。しかし、残る約 90 例の患者において、その発症原因は不明である。

2. 研究の目的

新規に集積されたシルバーラッセル症候群患者とその家族において、ICR1 とその近位部に位置するに存在する ICR2 (imprinting control region 2) (図 1) と第 7 染色体長腕遠位部においてわれわれが見いだした胎盤特異的 DMR を主とする解析を行い、シルバーラッセル症候群の疾患成立機序の解明、新規治療法の開発、遺伝カウンセリングの向上に貢献することである。

われわれは、Netchine らのクライテリア (J Clin Endocrinol Metab 2007;92: 3148 - 3154) を満たすシルバーラッセル症候群およびシルバーラッセル症候群類縁の表現型を呈する症例を集積した。

【Netchine らのクライテリア】

生下時身長あるいは体重が -2SD 以下であることを必須条件とし、下記の から までの 5 項目のうち、3 項目を満たす症例について、シルバーラッセル症候群と診断するというものである。

- 生後の成長障害 (2 歳以降の身長が -2 SD 以下)
- 生下時の相対的頭圍拡大 (身長あるいは体重 SDS と頭圍 SDS の差が 1.5 以上)
- 早期の前頭部突出
- 左右非対称
- 早期摂食障害

また、シルバーラッセル症候群の表現型と類似した症状を呈する IMAGE 症候群がある。IMAGE 症候群は、子宮内発育遅滞、骨幹端異形成、副腎機能障害、男児外性器低形成を伴う症候群であり、これらの英頭文字をとり症候群名となっている。

近年、シルバーラッセル症候群と IMAGE 症候群において、ICR2 に存在する母性発現遺伝子 CDKN1C の変異が報告された (Nat Genet 2012;44:788-792; J Med Genet 2013)。

CDKN1C は細胞増殖抑制機能を有する機能亢変異をもたらすため、シルバーラッセル症候群と IMAGE 症候群における成長障害の表現型を招くと考えられる。

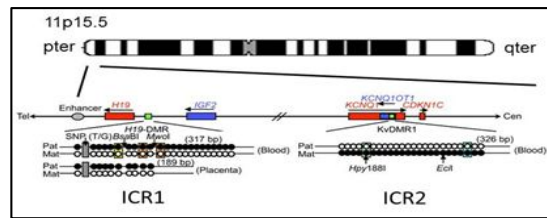


図 1. 第 11 番染色体短腕遠位部に位置する ICR1 と ICR2 領域

また、われわれは、半身低形成のないシルバーラッセル症候群患者において、CDKN1C を含む母親由来第 11 番染色体短腕重複を同定した (図 2) (Silver-Russell syndrome without body asymmetry in three patients with duplications of maternally derived chromosome 11p15 involving CDKN1C. J Hum Genet.60(2):91-95. 2015)。これらの CDKN1C 変異や重複は、半身低形成を伴わず、シルバーラッセル症候群のサブタイプを構成すると考えられる。さらに、これらのデータは、CDKN1C の軽度機能亢進や重複と共に、CDKN1C が ICR2 に存在する KvDMR1 がメチル化されたときに発現することから、KvDMR1 のエピ変異 (高メチル化) がシルバーラッセル症候群を招く可能性を示唆する。

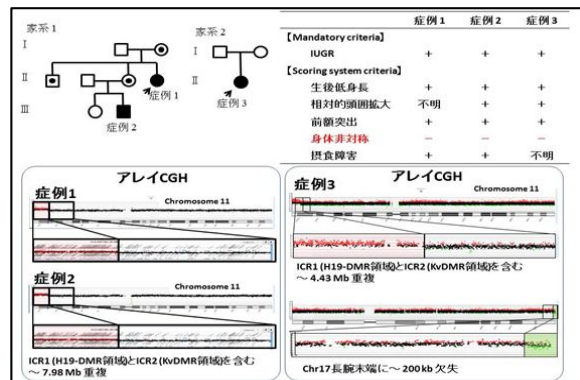


図 2. 第 11 番染色体短腕末端に重複をみとめたシルバーラッセル症候群患者

【左上】家系図、【右上】症例 1-3 の臨床像、身体非対称は呈していない。【下段】アレイ CGH 解析結果。第 11 染色体短腕末端重複が同定された。

なお、IMAGE 症候群患者において、ICR1 と ICR2 を含む第 11 番染色体短腕末端のコピー数異常に関する報告はない。

シルバーラッセル症候群の発症機序として、ICR1 のエピ変異 (メチル化異常) とともに第 7 番染色体母性片親性ダイソミー (UPD(7)mat) が関与する報告があるが、詳細な解析はまだなされていない現状がある。

われわれは、シルバーラッセル症候群患者と IMAGE 症候群を含むシルバーラッセル症候群類縁の表現型を呈する症例において解析し、その結果と表現型との比較から疾患発症機序、新しい治療法の開発、遺伝カウンセリングに貢献することを目的としている。

### 3. 研究の方法

シルバーラッセル症候群患者とシルバーラッセル症候群類縁の表現型を呈する患者、またその家族について、下記の項目について順次、解析を実施した。

3-1) ICR1 解析: シルバーラッセル症候群およびシルバーラッセル症候群様の表現型を呈する患者において、ICR1 に存在する IGF2-H19DMR のメチル化解析と高密度アレイ CGH を用いたコピー数解析を行う。

3-2) ICR2 解析: 発症原因不明のシルバーラッセル症候群患者において、直接塩基配列決定法による ICR2 に存在する CDKN1C 変異解析、pyrosequencing を用いた KvDMR1 メチル化解析、高密度アレイ CGH を用いたコピー数解析を行う。

さらに、発症機序不明の患者については、下記の解析を実施する。

3-3) 第7染色体長腕遠位部における胎盤特異的 DMR および周辺遺伝子の解析: 上記の解析で結果同定されなかった症例を含め、さらに、発症原因不明のシルバーラッセル症候群患者の胎盤を用いて、候補ドメインの pyrosequencing を用いたメチル化解析を行う。また、正常胎盤を用いてこの DMR 周辺からインプリンティング遺伝子を同定しその変異解析を行うと共に、この領域のコピー数変化を検討する。

### 4. 研究成果

シルバーラッセル症候群およびシルバーラッセル症候群様の表現型を呈する患者検体において、下記の解析を行った。

ICR1 および ICR2 のエピ変異解析: ICR1 (IGF2-H19DMR) および ICR2 (CDKN1C-KvDMR) (図3) 領域について、パイロシークエンス法によりエピ変異解析を行ったところ、大部分の症例とその家族検体において、ICR1 の H19DMR の低メチル化を同定(図4)し、確定診断に至った。

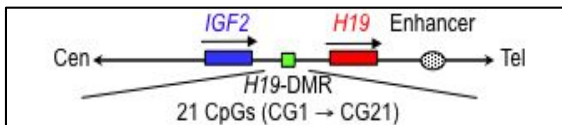


図3. ICR1 領域のメチル化

Pyrosequencing を用いた H19-DMR の CTCF6 に位置する P1 から P6 まで、計6箇所における CpG 配列のメチル化状態を解析した。

	ICR1 H19DMR					
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
対照群	59	59	59	59	59	59
平均	57	56	52	51	49	47
最小値	51	45	43	43	38	37

最大値	67	64	61	58	57	55
SRS 症例	40	38	38	37	35	34

図4. ICR1 のエピ変異解析

Pyrosequencing 解析の結果、計6箇所の CpG 配列がコントロール群平均のメチル化数値よりも SRS 症例においては数値が低く、低メチル化状態と同定された。

	ICR2 KvDMR					
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
対照群	53	53	53	53	53	53
平均	58	61	48	48	67	64
最小値	49	52	41	42	55	55
最大値	66	68	54	55	72	71
SRS 症例	50	52	49	49	54	54

図5. ICR2 のエピ変異解析

Pyrosequencing 解析の結果、計6箇所の CpG 配列がコントロール群平均のメチル化数値と比較し変化なく、エピ変異はみとめられなかった。

ICR1 および ICR2 のエピ変異解析は、どちらも pyrosequencing 法による解析を実施しているが、両者の他、いくつかの DMR についても解析可能なパネルを作成しており、1 ランで複数の DMR 領域のエピ変異解析が可能である。また、シルバーラッセル症候群のうち、ICR1 のエピ変異(低メチル化)が同定された症例については、マイクロサテライト解析を実施し、第11番染色体の親由来を確認し、遺伝カウンセリングに結果を用いることができた。

既知の報告から、シルバーラッセル症候群の発症原因は ICR1 のエピ変異が約 31.2%、第7番染色体母性片親性ダイゾミー (UPD(7)mat) が約 6.5%、原因不明とされる症例が半数以上という現状がある。われわれが集積したシルバーラッセル症候群患者における解析結果は、ICR1 のエピ変異にすべて含まれ確定診断に至ったが、原因不明のシルバーラッセル症候群症例について、追加の解析を実施し発症機序を明らかにすることを今後の課題としている。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線) Mutation analysis of FGFR1-3 in 11 Japanese patients with syndromic craniosynostoses.

Ohishi A, Nishimura G, Kato F, Ono H, Maruwaka K, Ago M, Suzumura H, Hirose E, Uchida Y, Fukami M, Ogata T.

Am J Med Genet A. 173(1):157-162. 2017.

2.Silver-Russell syndrome without body asymmetry in three patients with duplications of maternally derived chromosome 11p15 involving CDKN1C. Nakashima S, Kato F, Kosho T, Nagasaki K, Kikuchi T, Kagami M, Fukami M, Ogata T. J Hum Genet. 60(2):91-95. 2015.

3.IMAGe syndrome: clinical and genetic implications based on investigations in three Japanese patients. Kato F, Hamajima T, Hasegawa T, Amano N, Horikawa R, Nishimura G, Nakashima S, Fuke T, Sano S, Fukami M, Ogata T. Clin Endocrinol (Oxf). 80(5):706-713. 2014.

4.Paternal uniparental disomy 14 and related disorders: placental gene expression analyses and histological examinations. Kagami M, Matsuoka K, Nagai T, Yamanaka M, Kurosawa K, Suzumori N, Sekita Y, Miyado M, Matsubara K, Fuke T, Kato F, Fukami M, Ogata T.

5.Epigenetics. 7(10):1142-1150. 2012  
Relative frequency of underlying genetic causes for the development of UPD(14)pat-like phenotype. Kagami M, Kato F, Matsubara K, Sato T, Nishimura G, Ogata T. Eur J Hum Genet. 20(9):928-932. 2012

〔雑誌論文〕(計 1 件)  
加藤芙弥子、濱島崇、緒方勤、「見て学ぶ、小児内分泌疾患」、FUJIFUJILM、No.6、IMAGe症候群、2016、pp.3-4

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www2.hama-med.ac.jp/w1b/pediatr/>

6. 研究組織

(1)研究代表者  
加藤芙弥子 (KATO, Fumiko)  
浜松医科大学・医学部・特任研究員  
研究者番号：1 0 4 6 2 7 9 8

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
緒方 勤 (OGATA, Tsutomu)  
浜松医科大学・医学部・教授  
研究者番号：4 0 1 6 9 1 7 3

深見 真紀 (FUKAMI, Maki)  
国立成育医療研究センター研究所・分子内分  
泌研究部・部長  
研究者番号：4 0 2 6 5 8 7 2

鏡 雅代 (KAGAMI, Masayo)  
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  
研究者番号：7 0 3 9 9 4 8 4

澤木 はま子 (SAWAKI, Hamako)  
浜松医科大学・医学部・秘書

武田 有里子 (TAKEDA, Yuriko)  
浜松医科大学・医学部・秘書