

平成 21 年 6 月 22 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790752
 研究課題名 (和文) シルバーラッセル症候群および子宮内発育遅延に関する分子遺伝学的解析
 研究課題名 (英文) Molecular genetic analysis of Silver-Russell syndrome and intrauterine growth retardation
 研究代表者
 山澤 一樹 (KAZUKI YAMAZAWA)
 国立成育医療センター (研究所)・小児思春期発育研究部・共同研究員
 研究者番号：10338113

研究成果の概要：出生前後の成長障害を主症状とするシルバーラッセル症候群患者 60 例において、末梢血および胎盤のメチル化解析および遺伝子発現解析を行った。メチル化異常例では IGF2 が成長決定因子であり、その発現低下が胎盤と胎児の発育に悪影響を及ぼすこと、メチル化正常例は環境因子によるものと他の胎児・胎盤発育に関与する未知の遺伝子異常に起因するものと大別されること、胎盤にはメチル化非依存性のインプリンティング調節機構が存在すること、が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	330,000	3,330,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：遺伝学、成長障害、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

シルバーラッセル症候群 (SRS) は出生前後の成長障害に加えて、相対的な頭囲拡大、逆三角形の顔貌、骨格の左右非対称、第5指の内彎などの奇形徴候を伴う先天奇形症候群である。11p15.5 領域に存在するインプリンティング調節領域である *H19* メチル化可変領域 (*H19*-DMR) における低メチル化のエピ変異が、SRS の 30–65% に認められることが近年報告されている。父性発現インプリンティングを示す胎児成長因子 *Insulin-like growth factor 2 (IGF2)* と、母性発現インプ

リンティングを示すガン抑制遺伝子 *H19* とは、共通のエンハンサーの支配を受けており、その発現は *H19*-DMR のメチル化状態によって規定される。CTCF はインスレーターとして機能し、母親由来の非メチル化 *H19*-DMR にもみ結合し、父親由来のメチル化 *H19*-DMR には結合しない。この結果、エンハンサーは父親由来アレルでは *IGF2* に、母親由来アレルでは *H19* に作用し、*H19*-DMR のメチル化の有無により *IGF2* と *H19* とは相補的な発現を示す。この父親由来のメチル化 *H19*-DMR に低メチル化のエピ

変異が起こると、このドメインが母親由来のように機能し、胎児成長因子 *IGF2* の発現低下に伴い SRS の表現型を呈すると考えられる。実際にこのエピ変異を呈する SRS 症例の皮膚線維芽細胞では *IGF2* 遺伝子の発現が低下することが示されている。こうした知見に加えて、SRS の 7-10% に第 7 番染色体の母性片親性ダイソミー (matUPD7) が合併することから、SRS は主にインプリンティング異常による疾患であると考えられる。この観点では、*H19*-DMR に隣接するもう一つのインプリンティング調節領域 *KvDMR1* の高メチル化のエピ変異も、細胞増殖抑制因子である *CDKN1C* の過剰発現などのメカニズムを介して SRS を発症する可能性があるが、そのような報告はこれまでなされていない。

2. 研究の目的

ゲノムインプリンティングは胎盤を持つ哺乳類にのみ進化的に認められる現象であり、ほぼ全てのインプリンティング遺伝子は胎盤で強く発現し、胎盤の成長発達に重要な役割を果たすことが知られている。しかしながら、我々の matUPD7 での胎盤低形成の報告以外に SRS の胎盤に関する報告はなく、また、インプリンティング異常と SRS の表現型に関する知見も不十分である。そこで本研究では、SRS 症例を集積し、個体と胎盤におけるインプリンティング遺伝子の分子遺伝学的解析と、エピ遺伝子型-表現型の関係の検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 対象

対象は日本人 SRS 患者 60 例と正常対照 40 例である。全ての SRS 患者は、①出生前の成長障害 (出生時体重・身長が $-2.0SD$ 以下) に加えて、生後の成長障害、相対的頭圍拡大、逆三角形の顔貌、骨格の左右非対称、第 5 指の内彎、の 5 項目のうち 3 項目以上を満たす、②内分泌、骨系統疾患なし、③核型正常、④ matUPD7 および 14 の除外、という選出基準を満足した。本研究は、全ての患者から文書での同意を得て、国立成育医療センター倫理委員会の承認の下で行われた。

(2) メチル化解析

ゲノム DNA は重亜硫酸塩で処理すると、非メチル化シトシンはウラシルに変換されるが、CpG 配列のメチル化シトシンは変換されない。これを利用して、Combined bisulfite restriction analysis (COBRA) 法や重亜硫酸塩シーケンシング法でメチル化解析を行った。

COBRA 法では、CpG 配列を含まず、メチル化アレルと非メチル化アレルの両方に同等に結合するプライマーを用いて、対象患者の重

亜硫酸塩処理ゲノム DNA における *H19*-DMR と *KvDMR1* をそれぞれ PCR 増幅した後、メチル化アレルのみを選択的に切断する制限酵素で処理した (図 1a)。この産物を電気泳動し、切断されるメチル化バンドと、切断されない非メチル化バンドの濃度比からメチル化係数を算出した。正常対照 40 例も同様に解析することでメチル化係数の正常値を決定し、この範囲を上回るものを高メチル化、下回るものを低メチル化と判定した。重亜硫酸塩シーケンシング法では、PCR 産物をサブクローニングし、直接シーケンシング法により約 30 クローンの塩基配列を解析した。また親由来を判定するために *H19*-DMR 内の SNP の塩基配列を解析した (図 1a)。

(3) 発現解析

白血球と胎盤のサンプルを用いて *IGF2* および *H19* の発現を解析した。白血球および胎盤 RNA を用いて RT-PCR を行い、*GAPDH* 濃度をサンプル間で調節したあと、PCR 産物を電気泳動しバンド濃度から発現レベルを比較した。また白血球および胎盤の cDNA とゲノム DNA、両親のゲノム DNA におけるエクソン内 SNP を直接シーケンシング法で解析し、発現パターンを調べた。

(4) 表現型解析、相関解析

個体および胎盤の表現型をエピ変異の有無に分けて比較検討した。またメチル化係数と体格値、胎盤重量の相関について解析した。

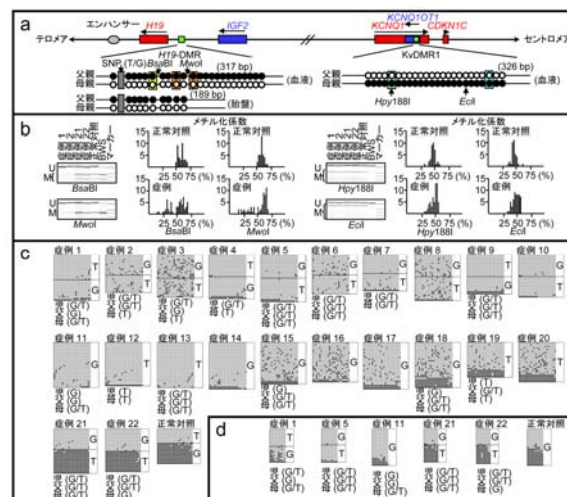


図 1 白血球および胎盤のメチル化解析

4. 研究成果

(1) 白血球のメチル化解析

COBRA 法の結果、SRS 症例 60 例中 20 例で *H19*-DMR のメチル化係数は正常値を下回り (症例 1-20: グループ 1)、残り 40 例は正常範囲内であった (症例 21-60: グループ 2)。一方、*KvDMR1* のメチル化係数は全例で正常対照と同等であった (図 1b)。次に重亜硫酸塩

シーケンシング法でグループ 1 における *H19*-DMR の低メチル化を確認した (図 1c)。ヘテロ接合性の SNP の解析により、父親由来のアレルが母親由来のアレルと同様に低メチル化状態であることが示された。対照的にグループ 2 では、正常コントロールと同様に親由来依存性のメチル化パターンが保たれていた。

(2) 胎盤のメチル化解析

在胎週数がほぼ等しい 5 名の SRS 患者 (症例 1、5、11、21、22)、および正常対照 1 名のホルマリン固定パラフィン包埋胎盤病理標本から DNA を抽出し *H19*-DMR のメチル化状態を調べた (図 1a)。胎盤のメチル化パターンは白血球と類似しており、*H19*-DMR は胎盤においても親由来にメチル化を受ける DMR であることが判明した (図 1d)。

(3) 白血球と胎盤の発現解析

症例 1、5、11 (エピ変異陽性)、症例 21、22 (陰性)、および正常対照の白血球と胎盤において、*IGF2* と *H19* の発現を解析した。RT-PCR による発現レベル解析の結果、白血球では *IGF2* の発現はごくわずかで *H19* も少量の発現が認められるのみであったが、胎盤では両者で強い発現が認められた (図 2a)。注目すべきことに胎盤の *IGF2* の発現量はエピ変異陽性例で明らかに減少していたのに対し、陰性例では正常対照と同等であった。一方で *H19* の発現量は 6 つの胎盤でほぼ同等であった。

発現パターンに関して、白血球では、*IGF2* のクロマトグラムは発現が弱く得られなかったものの、*H19* は症例 11 においてはインプリンティングが喪失し両親性発現が認められ、一方で正常対照においては母性発現が認められた。これに対して胎盤では、症例 11 と正常対照のいずれにおいても、*IGF2* は父性発現が、*H19* は母性発現が認められた (図 2b)。したがって注目すべきことに、症例 11 において *H19*-DMR は白血球と胎盤とで同じように低メチル化状態にあるにも関わらず、*H19* は白血球と胎盤とで異なる発現パターンを呈した。

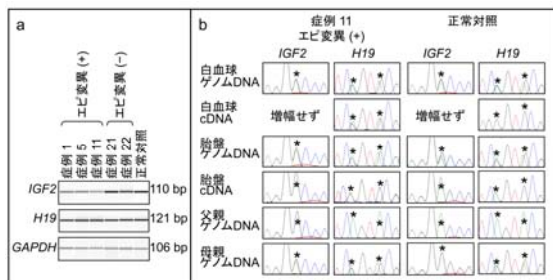


図 2 白血球および胎盤の発現解析

(4) 個体表現型

出生時身長・体重はグループ 1 のほうがより小さく、逆に出生時頭囲はグループ 1 のほうがより大きかった。こうしたグループ間の体格の差は生後には消失していた。出生時と現在の比較において、グループ 1 では身長や体重に有意な改善が認められたが、頭囲には認められず、またグループ 2 ではこれらいずれにも有意な改善は認められなかった。相対的頭囲拡大、骨格の左右非対称、口角下垂、筋緊張低下といった身体徴候はグループ 1 でグループ 2 より有意に頻度が高かった。血清 IGF2 値は両グループで差がなく、ほぼ正常から若干高値であった。症例 13 は父親の乏精子症のため顕微授精により出生していた。

(5) 胎盤表現型

胎盤低形成はグループ 1、2 両者に認められたが、グループ 1 でより重度であった。組織学的には症例 1、5、11 (エピ変異陽性) および症例 22 (陰性) で絨毛低形成が、症例 21 (陰性) で合体体結節の増加を伴う梗塞象が認められた (図 3)。

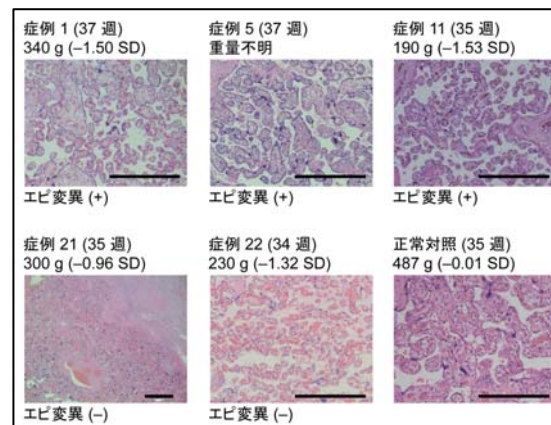


図 3 胎盤の組織学的所見 (HE 染色)

(6) 相関解析

グループ 1 における相関解析の結果、*H19*-DMR のメチル化係数は、出生時および現在の体重・身長、胎盤重量と相関が認められた。出生時および現在の頭囲とは相関が認められなかった。さらに胎盤重量は出生時体重・身長と相関が認められたが、出生時頭囲とは相関が認められなかった。こうした相関はグループ 2 では認められなかった。

(7) 考察

白血球に対する解析の結果、日本人 SRS 患者のおよそ 1/3 に *H19*-DMR の低メチル化が認められたが、KvDMR1 のメチル化異常は認められなかった。胎盤の解析結果は、白血球の解析結果と併せて、以下の重要な知見を示唆する。第一に、*H19*-DMR のエピ変異陽性例で胎盤の *IGF2* の

発現が低下していたことから、胎盤 *IGF2* の発現は主に *H19*-DMR のメチル化状態に依存すると考えられる。第二に、*H19*-DMR のエピ変異陽性例では白血球の *H19* は両親性に発現し、父親由来の *IGF2*-*H19* ドメインが母親由来のように機能していると推測される。第三に、胎盤では *H19* はエピ変異の有無によらず母性発現を示し発現量にも差がないことから、胎盤における *H19* の発現は例えばクロマチン凝集などの *H19*-DMR のメチル化パターン以外の何らかの機構により制御を受けている可能性がある。

SRS 患者の表現型は、エピ変異を伴う症例が典型的な SRS の表現型を呈し成長障害も重度であり、これまでの報告と合致する。

胎盤の表現型の検討でも特徴的な所見が得られた。グループ 1 での絨毛低形成を伴う小胎盤は、胎盤での *IGF2* の発現低下によると思われる。実際に *IGF2* は絨毛に発現し、また胎盤特異的 *IGF2* プロモーターを欠失させたマウスでは絨毛低形成を示唆する物質交換能の低下した小胎盤を呈する。また、絨毛低形成を伴う小胎盤を呈した症例 22 (エピ変異陰性) は SRS の表現型を招く未知の (エピ) 遺伝子異常が存在することを示唆し、梗塞を伴う小胎盤を呈した症例 21 (エピ変異陰性) は環境要因が胎盤機能に影響を及ぼし SRS の表現型とりわけ成長障害の原因となることを示唆する。

相関解析の結果から、エピ変異陽性例において、*H19*-DMR のメチル化係数に反映される *IGF2* の発現量は個体や胎盤の成長決定に重要な役割を果たし、その異常が疾患を引き起こす根本的な要因であると推察される。

(8) 結論

以上の成績は、①エピ変異陽性例の胎盤は *IGF2* の発現が低下し特徴的な表現型を呈すること、② *IGF2*-*H19* ドメインのインプリンティング制御に関して白血球と胎盤とで類似点と相違点とが存在すること、③ *IGF2* の発現量はエピ変異陽性例での個体や胎盤の成長決定において重要な役割を果たすこと、④胎盤機能不全が出生前の成長障害に関与すること、⑤エピ変異陰性例においては未知の (エピ) 遺伝子異常や環境因子の影響が SRS の原因となり得ること、を示唆する。特に胎盤に関して多くの症例を集積し解析することで、病態機序の解明や診断治療法の開発に結びつくことが期待される。

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)

[雑誌論文] (計 5 件)

① Yamazawa K, Kagami M, Fukami M, Matsubara K, Ogata T. Monozygotic female twins discordant for Silver-Russell syndrome and hypomethylation of the *H19*-DMR. *Journal of Human Genetics*, 2008;53(10):950-955 査読有

② Kagami M, Yamazawa K, Matsubara K, Matsuo N, Ogata T. Placentomegaly in paternal uniparental disomy for human chromosome 14. *Placenta*, 2008;29(8):760-761 査読有

③ Yamazawa K, Kagami M, Nagai Y, Kondoh T, Onigata K, Maeyama K, Hasegawa T, Hasegawa Y, Yamazaki T, Mizuno S, Miyoshi Y, Miyagawa S, Horikawa R, Matsuoka K, Ogata T. Molecular and clinical findings and their correlations in Silver-Russell syndrome: implications for a positive role of IGF2 in growth determination and differential imprinting regulation of the *IGF2*-*H19* domain in bodies and placentas. *Journal of Molecular Medicine*, 2008;86(10):1171-1181 査読有

④ Yamazawa K, Kagami M, Ogawa M, Horikawa R, Ogata T. Placental hypoplasia in maternal uniparental disomy for chromosome 7. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 2008;146A(4):514-516 査読有

⑤ Kagami M, Nagai T, Fukami M, Yamazawa K, Ogata T. Silver-Russell syndrome in a girl born after in vitro fertilization: partial hypermethylation at the differentially methylated region of *PEG1/MEST*. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2007;24(4):131-136 査読有

[学会発表] (計 12 件)

① 山澤一樹, 鏡雅代, 松原圭子, 中林一彦, 秦健一郎, 肥塚直美, 堀川玲子, 緒方勤. Silver-Russell症候群を呈する雌性単為生殖キメラおよびBeckwith-Wiedemann症候群を呈する雄性単為生殖キメラ, 第 32 回日本小児遺伝学会, No. 6, 奈良, 4 月, 2009 年

② 山澤一樹, 鏡雅代, 緒方勤. シルバーラッセル症候群における分子遺伝学のおよび臨床学的所見とその相関, 第 42 回日本小児内分泌学会, Sp0-03, 米子, 10 月, 2008 年

③ Yamazawa K, Kagami M, Ogata T. Silver-Russell syndrome and the *IGF2*-*H19* domain: molecular and clinical studies in

bodies and placentas. EMBO Workshop on Genomic Imprinting, No. 44, Singapore, September, 2008

- ④ 山澤一樹, 鏡雅代, 緒方勤. シルバーラッセル症候群における分子遺伝学および臨床学的所見とその相関, 第53回日本人類遺伝学会, 横浜, 9月, 2008年
- ⑤ 和田友香, 山澤一樹, 鏡雅代, 吉形真由美, 埴田卓志, 澤井英明, 宮河真一郎. Campomelic dysplasia患者14例におけるSOX9変異の有無と臨床像の関連性, 第44回日本周産期・新生児医学会, 横浜, 7月, 2008年
- ⑥ 山澤一樹, 鏡雅代, 和田友香. シルバーラッセル症候群の個体と胎盤におけるIGF2-H19ドメインの解析, 第44回日本周産期・新生児医学会, 横浜, 7月, 2008年
- ⑦ 山澤一樹, 鏡雅代, 和田友香. シルバーラッセル症候群の個体と胎盤におけるIGF2-H19ドメインの解析, 第12回小児分子内分泌研究会, 小樽, 7月, 2008年
- ⑧ 山澤一樹, 鏡雅代, 緒方勤. シルバーラッセル症候群の個体と胎盤におけるIGF2-H19ドメインの解析, 第2回日本エピジェネティクス研究会, P29, 三島, 5月, 2008年
- ⑨ 山澤一樹, 鏡雅代, 緒方勤. シルバーラッセル症候群におけるH19-DMRのエピ変異と個体および胎盤表現型の検討, 第111回日本小児科学会, 0-145, 東京, 4月, 2008年
- ⑩ 山澤一樹, 鏡雅代, 緒方勤. シルバーラッセル症候群におけるH19メチル化可変領域のエピ変異と個体および胎盤表現型の検討, 第41回日本小児内分泌学会, 横浜, 11月, 2007年
- ⑪ 山澤一樹, 和田友香, 笹川五十次, 上岡克彦, 緒方勤. 停留精巣患者62例における精巣導体形成遺伝子INSL3とGREATの変異および多型解析, 第52回日本人類遺伝学会大会, P-078, 東京, 9月, 2007年
- ⑫ 山澤一樹, 鏡雅代, 和田友香. シルバーラッセル症候群およびIUGRにおける第7, 11番染色体のメチル化解析, 第43回日本周産期・新生児医学会, 東京, 7月, 2007年

[図書] (計1件)

緒方勤, 伊達木澄人, 山澤一樹. IUGRの遺伝学的要因. SGA性低身長症のマネジメント

(藤枝憲二, 板橋家頭夫 監修), メディカルレビュー社, 東京, 2009, pp57-68

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山澤一樹 (Kazuki Yamazawa)
国立成育医療センター (研究所)・小児思春期発育研究部・共同研究員
研究者番号: 10338113

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

鏡雅代 (Masayo Kagami)
国立成育医療センター (研究所)・小児思春期発育研究部・流動研究員
研究者番号: 70399484

松原 圭子 (Keiko Matsubara)
国立成育医療センター (研究所)・小児思春期発育研究部・共同研究員
研究者番号: なし

緒方 勤 (Tsutomu Ogata)
国立成育医療センター (研究所)・小児思春期発育研究部・部長
研究者番号: 40169173