

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 10 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25253023

研究課題名(和文) ヒトインプリンティング疾患発症を招く(エピ)遺伝学的機序の解明

研究課題名(英文) Clarification of (epi)genetic mechanisms involved in the development of human imprinting disorders

研究代表者

緒方 勤(Ogata, Tsutomu)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：40169173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトインプリンティング疾患発症を招く(エピ)遺伝学的機序の解明を目的として研究を行った。その結果、シルバーラッセル症候群では、発症機序の同定と遺伝子型-表現型解析、第11染色体短腕遠位部重複の同定、第11染色体母性ダイソミーモザイクの同定が、テンプル症候群では、第14染色体インプリンティング領域のエピ変異の同定、発症機序と臨床像の解明が、鏡・緒方症候群では、詳細な臨床像の決定、臨床診断基準と遺伝子診断法の確定がなされた。さらに、鏡・緒方症候群患者とテンプル症候群患者におけるメチル化解析から、全ての患者のエピ変異領域がほぼ等しいことを見出すと共に、鏡・緒方症候群患者からiPS細胞を作成した。

研究成果の概要(英文)：We have attempted to clarify underlying (epi)genetic mechanisms involved in the development of human imprinting disorders. Representative results include: (1) identification of the underlying factors, (epi)genotype-phenotype correlations in Silver-Russell syndrome, and detection of mosaic upd(11)mat, (2) identification of epimutations and clarification of (epi)genetic mechanisms and clinical features in Temple syndrome, and (3) determination of detailed clinical features, establishment of clinical diagnostic guideline and molecular diagnostic approach in Kagami-Ogata syndrome. Furthermore, we identified that the boundary of the epimutations in Temple syndrome patients, Kagami-Ogata syndrome patients, and control subjects are virtually identical. This implies that epimutations take place at the region flanked by insulators. We also established iPS cell from Kagami-Ogata syndrome patients.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：インプリンティング疾患 エピジェネティクス 発症機序 エピ変異 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒトインプリンティング疾患の発症原因として、インプリンティングドメインを含む片親性ダイソミー、微小欠失、エピ変異やインプリンティング遺伝子内変異が見出されている。しかし、(1) インプリンティング成立機構が、多くの領域においてほとんど解明されていないこと、(2) 発症機序不明のインプリンティング疾患表現型陽性患者が多数残されていること、(3) 個々のインプリンティング遺伝子の疾患表現型への寄与がほとんど解明されていないこと、などの多くの課題が残されている。

2. 研究の目的

本研究では、われわれが集積し、その発症原因の解明を進めてきた約 500 の患者検体、および、間もなく完成予定の患者細胞由来 iPS 細胞を用いて、次世代シーケンサーやゲノムワイドアレイ CGH などの最新技術を駆使した解析を行う。これにより、ヒトインプリンティング疾患発症を招く遺伝学およびエピ遺伝学的機序を解明し、医学ならびに医療の向上に貢献する。

3. 研究の方法

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、検体の収集を含めた研究計画については、浜松医科大学、国立成育医療センターおよび検体収集施設において予め倫理委員会の承認を得ている。検体は、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。

4. 研究成果

Silver-Russell 症候群

1) Silver-Russell 症候群発症機序の同定と遺伝子型-表現型解析：われわれは、Netchine らのクライテリアを満足する Silver-Russell 症候群患者を 138 例集積し、既知の原因について解析した。その結果、H19-DMR のエピ変異が 43 例 (31.2%) で、第 7 染色体母親性ダイソミー (upd(7)mat) が 9 例 (6.5%) で同定された。エピ変異群と upd(7)mat 群の比較では、出生児身長と体重はエピ変異陽性例で有意に小さく、頭囲はエピ変異陽性例で有意に大きいこと、エピ変異群では、IGF2 発現量を反映するメチル化係数が、身長・体重・胎盤重量と良く相関し、頭囲とは相関しないことが明確となった。これは、IGF2 が脳において両親性発現を示すことに一致すると思われる。また、原因不明のグループから、第 17 染色体長腕の約 3.86 Mb の欠失など、様々なゲノム異常が少数例ではあるが見いだされている。

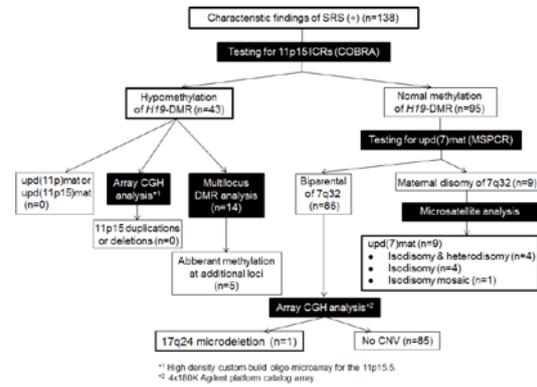


図 1. 日本人 Silver-Russell 症候群の発症原因

2) Silver-Russell 症候群における CDKN1C を含む第 11 染色体短腕遠位部重複の同定：われわれは、Netchine らが提唱した Silver-Russell 症候群の診断基準を満足するが、骨格の左右非対称のない 3 例において、CDKN1C を含む第 11 染色体短腕遠位部の重複を同定した。これは、CDKN1C の重複が、既に報告されている CDKN1C の軽度機能亢進変異同様、骨格の左右非対称のない Silver-Russell 症候群のサブタイプを招くことを示唆する。

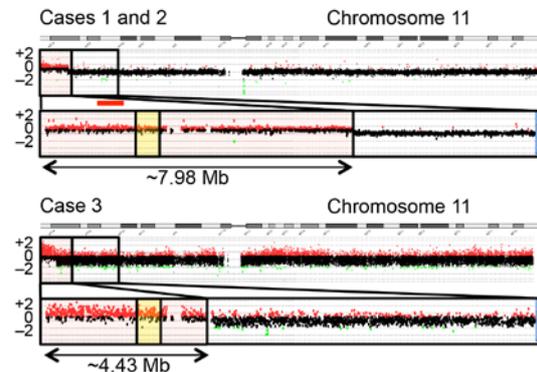


図 2. 3 例における CDKN1C を含む第 11 染色体短腕遠位部の重複

3) Silver-Russell 症候群における第 11 染色体母性ダイソミー (upd(11)mat) モザイクの同定：われわれは、典型的な Silver-Russell 症候群患者において、末梢血では検出されず、頬粘膜細胞のみで検出された (upd(11)mat) を見いだした。

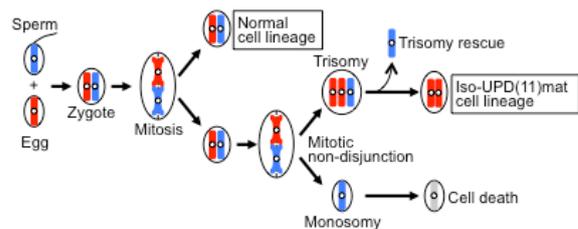


図 3. 体細胞分裂時に生じた upd(11)mat モザイクの形成機序

- 4) **IMAge 症候群における CDKN1C 変異の同定と Silver-Russell 症候群との表現型類似性**: IMAge 症候群は、子宮内発育不全、骨幹端異形成、副腎低形成、男児における外性器異常を伴う症候群で、本年度 2 例において CDKN1C の機能亢進変異を同定した。そして、IMAge 症候群患者が、左右非対称を欠くもののシルバーラッセル症候群表現型を呈することを見いだした。

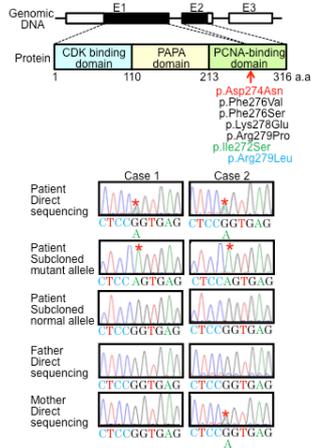


図 4. IMAge 症候群患者における CDKN1C 変異

Temple 症候群

- 1) **Silver-Russell 症候群における第 14 染色体インプリンティング領域のエピ変異の同定**: われわれは、Silver-Russell 症候群と臨床診断された患者の包括的メチル化解析を行い、世界で初めて 2 例において第 14 染色体インプリンティング領域のエピ変異を同定した。これは、Silver-Russell 症候群と第 14 染色体母性ダイソミー関連疾患である Temple 症候群が臨床的にオーバーラップすることを示す新しいデータである。

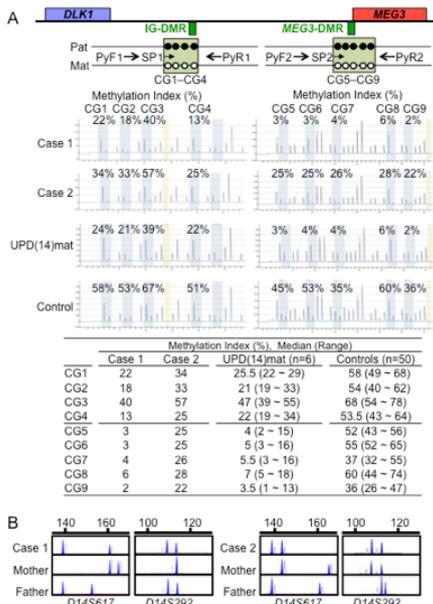


図 5. 第 14 染色体インプリンティング領域の低メチル化

- 2) **Temple 症候群の発症機序と臨床像の解明**: われわれは、Silver-Russell 症候群や Prader-Willi 症候群と臨床診断された患者において、Temple 症候群を約 20 例において同定し、その発症機序と臨床像を明らかとした。この患者数は世界最大であり、Temple 症候群の疾患概念確立に大きく貢献すると考えられる。

Kagami-Ogata 症候群

- 1) **Kagami-Ogata 症候群における詳細な臨床像の決定**: われわれは、第 14 染色体父性ダイソミー関連疾患である Kagami-Ogata 症候群と診断された日本人患者 34 例の包括的な臨床像解析を行い、以下のことを世界で初めて明らかとした。疾患特異的症状: すべての症状のうち、豊満な頬と口唇の突出を伴う特徴的顔貌と、coat hanger angle の増加を伴う胸郭低形成は本疾患に特異的かつ長期 (10 歳以上) 観察される所見であった。(1) 成長パターン: 胎児期成長は、身長 $-1.7\sim+3.0$ SD、体重 $+0.1\sim+8.8$ SD とよく保たれていた。特に、過体重は、マウスのデータから筋肉量の増加を反映すると推測される。(2) 顔貌: きわめて特徴的であり、特に、満な頬と口唇の突出は、本疾患に特異的であった。(3) 胸郭低形成: これは、顔貌と並んで、本疾患に特異的である。特に、coat-hanger angle (CHA) と mid to widest thorax diameter ratio (M/W ratio) が客観的指標になることが判明した。



図 6. 胸部レントゲン像。胸椎から上方に向かう肋骨とベル型胸郭が認められる。

- 2) **Kagami-Ogata 症候群の臨床診断基準と遺伝子診断法の確定**: われわれは、第 14 染色体父性ダイソミー関連疾患である KOS14 に関する現在までの臨床的および基礎的知見をまとめ、本症候群の臨床診断基準と遺伝子診断法を確立した。

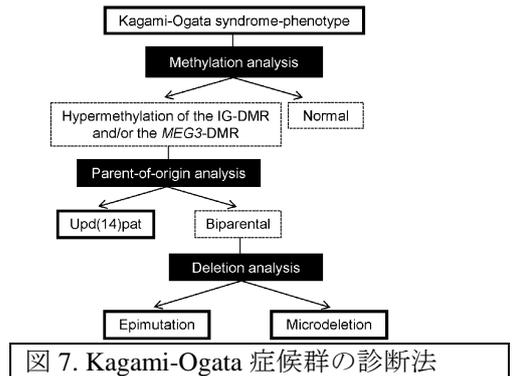


図 7. Kagami-Ogata 症候群の診断法

- 3) **Kagami-Ogata 症候群**という疾患名の国際的認知: 第 14 染色体父性ダイソミー関連疾患 (ダイソミー、エピ変異、微細欠失) 上記の成果を含む現在までのわれわれの成果にたいして、European Network for Human Congenital Imprinting Disorders というインプリンティング疾患研究グループから、Kagami-Ogata 症候群という疾患名が提唱され、世界最大の疾患データベースである Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) に登録された (#608149)。

エピ変異発症機序

- 1) **エピ変異範囲の決定**: エピ変異は、多くのインプリンティング領域で見いだされているが、その原因は判明していない。われわれは、エピ変異で発症した Kagami-Ogata 症候群患者と Temple 症候群患者、ならびに健常者の末梢血におけるメチル化解析から、全ての患者のエピ変異領域と健常者の DMR 領域がほぼ等しいことを見出した (MEG3-DMR がより明瞭な DMR として存在する)。これは、エピ変異が IG-DMR および MEG3-DMR の両端における insulator 構築の異常に起因する可能性を示唆する。

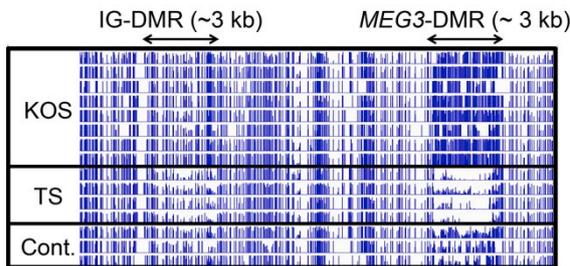


図 8. 末梢血における第 14 番染色体インプリンティング領域のメチル化解析。各々のバーの高さはメチル化係数を表す。

- 2) **エピ変異発症の性差**: エピ変異発症の性差は、一方のみが低メチル化タイプのインプリンティング疾患 (主に Beckwith-Wiedemann 症候群) を発症した一卵性双生児が、圧倒的な女兒優位を示すことから示唆されている。われわれは、高度の低メチル化エピ変異による Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) と偽性副甲状腺機能低下症を有する女兒を見出し、さらに徹底的な文献検索から、このような患者がほぼ女兒に限定されることを見いだした。これらの 2 つの所見は、女兒における X 染色体不活化に伴うメチル化維持酵素の消費のために、低メチル化エピ変異が女兒に有意発症することを示唆するものである。

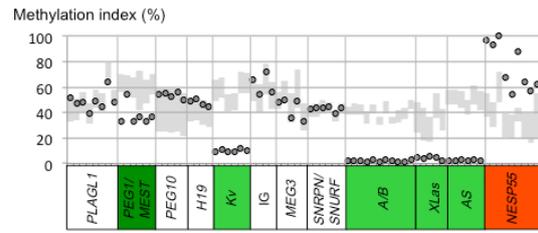


図 9. Beckwith-Wiedemann 症候群と偽性副甲状腺機能低下症を有する女兒における Kv-DMR と GNAS-DMRs のエピ変異

iPS 細胞の作成

- 1) **Kagami-Ogata 症候群患者からの iPS 細胞作成**: われわれは、欠失とエピ変異症例 3 例の Kagami-Ogata 症候群患者由来 iPS 細胞、ならびに正常ヒト由来 iPS 細胞を樹立し、そのメチル化パターンを解析している。そして、この領域のメチル化が他の領域のメチル化と異なることを見だし、解析を進めている。

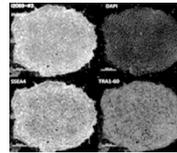


図 10. Kagami-Ogata 症候群欠失症例から樹立した iPS 細胞

Prader-Willi 症候群

- 1) **Prader-Willi 症候群と生殖補助医療の関連性の検討**: 本症候群患者 117 例の検討により、第 15 染色体母性ダイソミーによる PWS は、生殖補助医療出生児において自然妊娠出生児よりも有意に高頻度であるが、これは、高齢出産という交絡因子で説明され、生殖補助医療特有の因子の関与は見いだされないことを示した。

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 78 件) 代表的英文論文のみ記載

- Nagasaki K*, Tsuchuya S, Saitoh A, **Ogata T**, Fukami M: Neuromuscular symptoms in a patient with familial pseudohypoparathyroidism type Ib diagnosed by methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification. *Endocr J* 60 (2): 231–236, 2013.
- Fuke T, Mizuno S, Nagai T, Hasegawa T, Horikawa R, Miyoshi Y, Muroya K, Kondoh T, Numakura C, Sato S, Nakabayashi K, Tayama C, Hata K, Sano S, Matsubara K, **Kagami M**, Yamazawa K, **Ogata T***: Molecular and clinical studies in 138 Japanese patients with

- Silver-Russell syndrome. *PLoS One* 8 (3): e60405, 2013.
3. Nakashima S, Watanabe Y, Okada J, Ono H, Nagata E, Fukami M, **Ogata T***: Critical role of Yp inversion in *PRKX/PRKY*-mediated Xp;Yp translocation in a patient with 45,X testicular disorder of sex development. *Endocr J* 60 (12): 1329–1334, 2013.
 4. Sasaki A, Sumie M, Eada S, Kosaki R, Kurosawa K, Fukami M, Sago H, **Ogata T**, **Kagami M***: Prenatal Genetic testing for a microdeletion at chromosome 14q32.2 imprinted region leading to upd(14)pat-like phenotype. *Am J Med Genet A* 164A (1): 264–266, 2014.
 5. Kato F, Hamajima T, Hasegawa T, Amano N, Horikawa R, Nishimura G, Nakashima S, Fuke T, Sano S, Fukami M, **Ogata T***: IMAGE syndrome: clinical and genetic implications based on investigations in three Japanese patients. *Clin Endocrinol* 80 (5): 706–713, 2014.
 6. Matsubara K, Kataoka N, Ogita S, Sano S, **Ogata T**, Fukami M*, Katsumata N: Uniparental disomy of chromosome 8 leading to homozygosity of a *CYP11B1* mutation in a patient with congenital adrenal hyperplasia: Implication for a rare etiology of an autosomal recessive disorder. *Endocr J* 61 (6): 629–633, 2014.
 7. Higashimoto K, Jozaki K, Kosho T, Matsubara K, Sato T, Yamada D, Yatsuki H, Maeda T, Ohtsuka Y, Nishioka K, Joh K, Koseki H, **Ogata T**, Soejima H*: A novel *de novo* point mutation of OCT-binding site in the *IGF2/H19*-imprinting control region in a patient with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Clin Genet* 86 (6): 539–544, 2014.
 8. Maeda T, Higashimoto K, Jozaki K, Hitomi H, Nakabayashi K, Makita Y, Tonoki H, Okamoto N, Takada F, Ohashi H, Migita M, Kosaki R, Matsubara K, **Ogata T**, Matsuo M, Hamasaki Y, Ohtsuka Y, Nishioka K, Joh K, Mukai T, Hata K, Soejima H*: Comprehensive and quantitative multilocus methylation analysis reveals the susceptibility of specific imprinted differentially methylated regions (DMRs) to aberrant methylation in Beckwith-Wiedemann syndrome with epimutations. *Genet Med* 16 (12): 903–912, 2014.
 9. Nakashima S, Kato F, Kosho T, Nagasaki K, Kikuchi T, Kagami M, Fukami M, **Ogata T***: 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. doi: 10.1038/jhg.2014.100.
 10. **Kagami M**, Kurosawa K, Miyazaki O, Ishino F, Matsuoka K, **Ogata T***: Comprehensive clinical studies in 34 patients with molecularly defined UPD(14)pat and related conditions (Kagami-Ogata syndrome). *Eur J Hum Genet* 23 (11): 1488–1498, 2015. doi: 10.1038/ejhg.2015.13.
 11. Sano S, Iwata H, Matsubara K, Fukami M, **Kagami M**, **Ogata T***: Growth hormone deficiency in monozygotic twins with autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type Ib. *Endocr J* 62 (6): 523–529, 2015. doi: 10.1507/endocrj.EJ15-0033.
 12. **Ogata T***, **Kagami M**: Kagami-Ogata syndrome: a clinically recognizable upd(14)pat and related disorder affecting the chromosome 14q32.2 imprinted region. *J Hum Genet* 61 (2): 87–94, 2016. doi: 10.1038/jhg.2015.113.
 13. Matsubara K, **Kagami M**, Nakabayashi K, Hata K, Fukami M, **Ogata T**, Yamazawa K*: Exploration of hydroxymethylation in Kagami-Ogata syndrome caused by hypermethylation of imprinting control regions. *Clin Epigenet* 7(1): 90. 2015. doi:10.1186/s13148-015-0124-y
 14. Matsubara K, Murakami N, Fukami M, **Kagami M**, Nagai T, **Ogata T***: Risk assessment of medically assisted reproduction and advanced maternal ages in the development of Prader-Willi syndrome due to UPD(15)mat. *Clin Genet* 89 (5): 614–619, 2016 doi: 10.1111/cge.12691. 2015.
 15. Fujisawa Y, Sakaguchi K, Ono H, Yamaguchi R, Kato F, Kagami M, Fukami M, **Ogata T***: Combined steroidogenic characters of fetal adrenal and Leydig cells in childhood adrenocortical carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol* 159: 86–93, 2016. doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.02.031.
 16. Luk H-M, Lo F-M I, Sano S, Matsubara K, Nakamura A, **Ogata T***, **Kagami M***: Silver-Russell syndrome in a patient with somatic mosaicism for upd(11)mat identified by buccal cell analysis. *Am J Med Genet A* (accepted).
 17. Sano S, Nagasaki K, Kikuchi T, Nakabayashi K, Hata K, Fukami M, **Kagami M**, **Ogata T***: Beckwith-Wiedemann syndrome and pseudohypoparathyroidism type Ib in a patient with multilocus methylation defects: a female-dominant phenomenon? *J Hum Genet* (accepted).
- [学会発表] (代表的招待講演のみ記載 計 45 件)
1. **Ogata T**: Genetics of Combined Pituitary Hormone Deficiency. In: Symposium, Neuroendocrinology, Novel Players in Pituitary Disorders. 2013 Seoul

- International Congress of Endocrinology and Metabolism; In conjunction with the 32nd Annual Meeting of the Korean Endocrine Society. May 2–5, 2013. Seoul, South Korea.
2. **Ogata T:** Genetics of DSD (Disorders of sex development). Plenary Lecture. In: PAS/ASPR (Pediatric Academic Societies and Asian Society for Pediatric Research) 2014. May 3–6, 2014, Vancouver, Canada.
 3. **Ogata T:** Human Imprinting Disorders. Luncheon Education Seminar. In: Joint Meeting of the 11th Congress ASPR (Pediatric Academic Societies and Asian Society for Pediatric Research) and the Japan Pediatric Society 2015. April 16–19, 2015, Osaka, Japan.
 4. **Ogata T:** Environmental Impacts on Male Sexual Differentiation. In: Symposium Global Human Exposure to Endocrine Disrupting Chemicals. In: 16th International Congress of Endocrinology & the Endocrine Society's 96th Annual Meeting & Expo. June 21–24, 2014. Chicago, USA.
 5. **Ogata T:** Genetic advances in DSD. The Joint Summer School for Pediatric Endocrinology. September 22–25, 2013, Lake Maggiore, Italy.
 6. **Ogata T:** Kagami-Ogata syndrome: a clinically recognizable imprinting disorder caused by upd(14)pat and related conditions. The 2nd European Imprinting Disorder School COST Action. May 4–6, 2015, Guermandes, France.
 7. **緒方勤:** インプリンティング疾患発症機序について. 第56回日本小児神経学会学術集会特別講演. 2014年5月29–31日, 浜松.
 8. **緒方勤:** わかりやすい臨床遺伝学. 第9回日本小児耳鼻咽喉科学会学術集会基調講演. 2014年6月6–7日, 浜松.
 9. **緒方勤:** 性とインプリンティング. 新学術領域研究「配偶子幹細胞制御機構」第7回領域会議特別講演. 2013年1月23–24日, 東京.
 10. **緒方勤:** 生殖補助医療と小児医療の接点: オーバービュー. 第116回日本小児科学会学術集会: 生殖補助医療と小児医療の接点. 2013年4月19–21日, 広島.
 11. **緒方勤:** インプリンティング疾患の遺伝子診断: 第14染色体父性ダイソミー表現型をモデルとして. シンポジウム: 単因子疾患の遺伝子診療. 第20回日本遺伝子診療学会. 2013年7月18–20日, 浜松.
 12. **緒方勤:** 生殖補助医療とインプリンティング疾患発症. シンポジウム: 疾患から見たARTとエピゲノム. 第31回日本受精着床学会学術集会. 2013年8月8–9日, 別府.
 13. 福家智子, **緒方勤:** インプリンティング機構と胎児・胎盤の成長. 第87回日本内分泌学会学術総会シンポジウム: 胎児成長の機能と長期予後. 2014年4月24–26日, 福岡.
 14. **緒方勤:** エピジェネティクスと小児内分泌疾患. 第20回小児内分泌専門セミナー. 2015年8月21–23日, 東京.
 15. **緒方勤:** インプリンティング疾患の基礎と臨床. 両毛地区小児科講演会. 2013年1月18日, 足利.
 16. **緒方勤:** Prader-Willi 症候群: 厚生労働科学研究の成果から. 竹の子の会総会講演会. 2013年4月28日, 静岡.
 17. **緒方勤:** ヒトインプリンティング疾患発症機序について. 秋田県小児内分泌診療講演会 2013. 2013年5月31日, 秋田.
 18. **緒方勤:** インプリンティング疾患の基礎と臨床: プラダーウイリ症候群を主として. 第2回 KOBE 内分泌・代謝スキルアップセミナー. 2013年8月24日, 神戸.
 19. **緒方勤:** シルバーラッセル症候群. シルバー・ラッセル症候群ネットワーク医療講演会. 2013年12月1日, 東京.
 20. **緒方勤:** ヒトインプリンティング疾患と成長障害. 第22回岡山成長障害研究会. 2014年3月15日, 岡山.
- [図書] (計 0 件)
[産業財産権] (計 0 件)
- [その他]
ホームページ等
<http://www2.hama-med.ac.jp/w1b/pediatr/patient/index.html>
<http://www.ncchd.go.jp/scholar/research/section/endocrinology/index.html>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
緒方 勤 (OGATA TSUTOMU)
浜松医科大学小児科・教授
研究者番号: 40169173
 - (2) 研究分担者
鏡 雅代 (KAGAMI MASAYO)
(独) 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: 70399484