

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09734

研究課題名(和文)筋緊張低下をきたす新生児・乳児におけるインプリンティング異常症の頻度

研究課題名(英文)The frequency of cases with imprinting disorders in hypotonic neonates and infants

研究代表者

松原 圭子(Matsubara, Keiko)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・分子内分泌研究部・上級研究員

研究者番号：90542952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、「新生児集中治療部および小児神経科の医師より筋緊張低下を有すると判断された0-2歳の新生児・乳児」を対象に末梢血由来DNAを収集し、パイロシーケンス法によるインプリンティング疾患およびaCGH法による微細染色体構造異常のスクリーニングを行った。70名の筋緊張低下を有する新生児・乳児症例の血液および臨床情報の解析を行い、全解析症例中、IDsは10症例(14.3%) (Silver-Russell症候群1名、Temple症候群1名、Prader-Willi症候群7名、Angelman症候群1名)、染色体微細構造異常症例は9名(12.9%、臨床症状との関連が不明な例も含む)であった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the genetic background among hypotonic neonates and infants. We performed molecular analyses, such as pyrosequencing and aCGH for a screening of human imprinting disorders (IDs) and chromosomal rearrangement (CR) respectively. Among 70 cases showing hypotonia during their neonatal or infantile period, we identified 10 cases with IDs (14.3%, 1 with Silver-Russell syndrome; SRS, 1 with Temple syndrome; TS14, 7 with Prader-Willi syndrome; PWS and 1 with Angelman syndrome) and 9 with CR (12.9%). Our study indicated that IDs and CR should be considered as possible diagnoses for hypotonic children. Besides, this result suggested the usefulness of methylation screening targeting not only Prader-Willi syndrome but also other IDs (SRS, TS14, etc.) in hypotonic children.

研究分野：臨床遺伝学

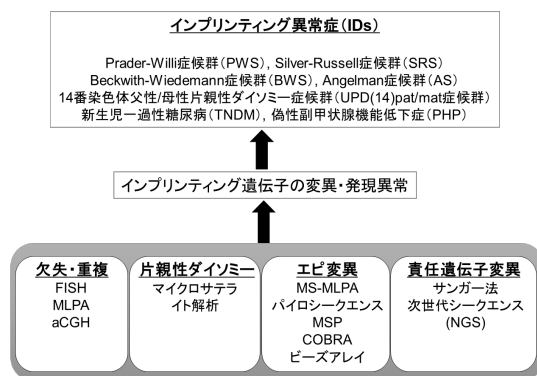
キーワード：インプリンティング疾患 筋緊張低下 染色体微細構造異常

1. 研究開始当初の背景

「筋緊張低下」は、新生児や乳児においてしばしば認められる症状であり、その原因として、神経原性疾患、筋原性疾患、中枢神経系疾患、trisomy 21 などの遺伝学的先天異常に起因するものが挙げられる。早期に原疾患を確定診断することは、疾患特異的な治療や療育を行う上で非常に重要である。随伴する所見、各種検査所見、家族歴の有無、染色体検査などから原疾患の確定診断が可能である一方で、筋緊張低下以外の特徴的な所見に欠くために確定診断が困難な症例も少なくない。また、遺伝学的先天異常による筋緊張低下症例の一部には、同胞や次世代の発症リスクを考慮すべきものが存在することから、遺伝学的な発症原因の同定は遺伝カウンセリングの観点からも重要である。近年、アレイCGH、次世代シーケンサーなどの臨床応用により、遺伝学的先天異常症の診断において分子遺伝学的アプローチが可能となった。その結果、筋緊張低下を示す新生児・乳児の10-50%が遺伝学的な原因を有することが報告された。

新生児・乳児の筋緊張低下の原因として、Prader-Willi 症候群 (PWS) は重要な鑑別疾患である。PWS 患者の約 85%が新生児・乳児期に筋緊張低下を示し、筋緊張低下を示す新生児・乳児のうち 10 - 40%が PWS であったという報告も存在する。PWS は、親由来特異的発現を示すインプリティング遺伝子の変異や発現異常により引き起こされるヒトインプリティング異常症 (IDs) の一つである。IDs の発症原因には、疾患責任領域の欠失、片親性ダイソミー、DNA 配列ではなくその化学修飾状態の異常であるエピ変異、疾患責任遺伝子変異が存在する (図 1)。

図1 インプリティング異常症 (IDs) 発症機序と解析法



また、これらの発症原因は、図 1 に示すような分子遺伝学的手法により解析可能である。筋緊張低下をきたす新生児・乳児の原因疾患の中で、PWS 以外の IDs が占める割合は明らかではない。しかし、SRS の約半数、UPD(14)mat 症候群の約 90%の症例で、新生児・乳児期に中枢性筋緊張低下を呈することが報告されている。SRS は出生前後の成長障害、相対的頭囲拡大、体格の左右差などを、UPD(14)mat 症候群は、成長障害、肥満、思

春期早発などを呈する IDs である。PWS、SRS および UPD(14)mat 症候群患者は、筋緊張低下や成長障害、ときに運動発達遅滞を示し、新生児・乳児期の臨床像が類似する。また、これらの臨床症状は非特異的であるため、早期の臨床診断が困難な症例が少なくない。筋緊張低下を示す新生児・乳児において、PWS、SRS および UPD(14)mat 症候群など IDs の頻度は稀ではないと考えられるが、筋緊張低下以外の特徴的な所見に乏しいため確定診断に至らない症例も潜在していることが想定される。

2. 研究の目的

本研究では、筋緊張低下を有する新生児・乳児における IDs 患者の頻度を明らかにする。

3. 研究の方法

解析対象症例の収集

本研究では、PWS に対する先行研究にならない「新生児集中治療部および小児神経科の医師より筋緊張低下を有すると判断された 0 - 2 歳の新生児・乳児」を対象とし、前方視的に対象症例を臨床情報とともに収集する。

Pyrosequencing 法によるメチル化状態スクリーニング

末梢血白血球由来 DNA を Bisulfite 処理後、Pyrosequencing 法により 9 か所のメチル化可変領域 (DMR) メチル化状態を解析し、IDs 全疾患のスクリーニングを行う (表 1)。

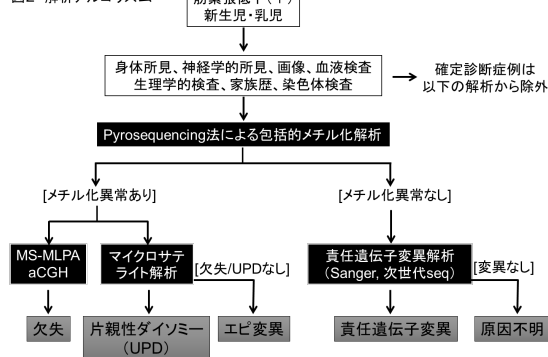
表1 IDsとメチル化異常をきたすDMR

DMR	高メチル化	低メチル化
PLAGL1	—	新生児一過性糖尿病
PEG1	Silver-Russell症候群 (7番染色体母性片親性ダイソミー)	
PEG10	—	
H19	Beckwith-Wiedemann症候群	Silver-Russell症候群(エピ変異)
Kv	—	Beckwith-Wiedemann症候群
IG	UPD(14)pat症候群	
MEG3	UPD(14)pat症候群	UPD(14)mat症候群
SNRPN	Prader-Willi症候群	Angelman症候群
GNAS A/B	—	偽性副甲状腺機能低下症

各解析対象症例に対する IDs 発症原因の同定

図 2 に示す分子遺伝学的手法を用いて、対象症例の IDs 発症原因を同定する。これらの方法を組み合わせることにより、IDs における既知の発症原因すべてを同定することが可能である。

図2 解析アルゴリズム



4. 研究成果

われわれは、研究開始から研究終了年度までの3年間で、123症例の筋緊張低下を有する症例に対して遺伝学的解析を行った。この中で、筋緊張低下が新生児期または乳児期早期に認められた5歳以下の70症例について、詳細な解析を行った。

その結果、70症例中、IDsは10症例(14.3%) (Silver-Russell症候群1名、Temple症候群1名、Prader-Willi症候群7名、Angelman症候群1名)、染色体微細構造異常症例は9名(12.9%、臨床症状との関連が不明な例も含む)であった。

また、15q24微細欠失症候群、22q13.3欠失症候群、Potocki-Lupski症候群、10q26 monosomy、digynic triploidy、69,XXX、17p13.3重複と22q11.23重複の合併症例

が1名ずつ同定された。これらの染色体構造異常は、過去の症例報告などから筋緊張低下との因果関係が明らかであり、筋緊張低下をきたす新生児・乳児における遺伝学的診断における染色体微細構造異常解析の有用性を示唆するものである。また、臨床的意義が明らかでないものの、11q25重複、2q35重複を有する症例が1例ずつ同定された。このような微細構造異常の臨床的意義については、今後の症例の蓄積が望まれる。

本研究の結果の要点は以下の2点である。新生児期または乳児期早期から筋緊張低下を示す小児の遺伝学的背景として、

1. PWSだけでなくSRS、TS14、ASなどが存在していた。

2. IDs全体の頻度は14.3%、染色体微細構造異常の頻度は12.9%と、ほぼ同等であった。これらの結果からは、筋緊張低下をきたす小児に対する遺伝学的背景の探索を行う場合、積極的にメチル化スクリーニング及び染色体微細構造異常解析を考慮する必要があることが示唆された。

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19件)

1. Nakamura A, Muroya K, Ogata-Kawata H, Nakabayashi K, Matsubara K, Ogata T, Kurosawa K, Fukami M, Kagami M. A case of paternal uniparental isodisomy for chromosome 7 associated with overgrowth. *J Med Genet*. 2018 Feb 17 doi: 10.1136/jmedgenet-2017-104986.

2. Sano S, Nakamura A, Matsubara K, Nagasaki K, Fukami M, Kagami M, Ogata T. (Epi)genotype-Phenotype Analysis in 69 Japanese Patients With Pseudohypoparathyroidism Type I. *J Endocr Soc*. 2017, 21;2(1):9-23. doi: 10.1210/js.2017-00293.

3. Inoue T, Nakamura A, Matsubara K, Nyuzuki H, Nagasaki K, Oka A, Fukami M, Kagami M. Continuous hypomethylation of the KCNQ10T1:TSS-DMR in monozygotic twins discordant for Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet A*. 173(10):2847-2850. 2017. doi: 10.1002/ajmg.a.38419.

4. Kagami M, Nagasaki K, Kosaki R, Horikawa R, Naiki Y, Saitoh S, Tajima T, Yorifuji T, Numakura C, Mizuno S, Nakamura A, Matsubara K, Fukami M, Ogata T. Temple syndrome: comprehensive molecular and clinical findings in 32 Japanese patients. *Genet Med*. 2017, doi: 10.1038/gim.2017.53.

5. Dateki S, Kagami M, Matsubara K, Izumi K, Watanabe S, Nakatomi A, Kondoh T, Fukami M, Moriuchi H. Maternally derived 15q11.2-q13.1 duplication and H19-DMR hypomethylation in a patient with Silver-Russell syndrome. *J Hum Genet*. 62(10):919-922. 2017. doi: 10.1038/jhg.2017.62.

6. Inoue T, Nakamura A, Fuke T, Yamazawa K, Sano S, Matsubara K, Mizuno S, Matsukura Y, Harashina C, Hasegawa T, Nakajima H, Tsumura K, Kizaki Z, Oka A, Ogata T, Fukami M, Kagami M. Genetic heterogeneity of patients with suspected Silver-Russell syndrome: genome-wide copy number analysis in 82 patients without imprinting defects. *Clin Epigenetics*. 9 2017 May 15;9:52. doi: 10.1186/s13148-017-0350-6.

7. Kagami M, Matsubara K, Nakabayashi K, Nakamura A, Sano S, Okamura K, Hata K, Fukami M, Ogata T. Genome-wide multilocus imprinting disturbance analysis in Temple syndrome and Kagami-Ogata syndrome. *Genet Med*. 19(4):476-482. 2017. doi: 10.1038/gim.2016.123.

8. 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*. 2016 May;89(5):614-9. doi: 10.1111/cge.12691.

9. Kagami M, Matsubara K, Nakabayashi K, Nakamura A, Sano S, Okamura K, Hata K, Fukami M, Ogata T. Genome-wide multilocus imprinting disturbance analysis in Temple syndrome and Kagami-Ogata syndrome. *Genet Med*. 2017 Apr;19(4):476-482, doi: 10.1038/gim.2016.123.

10. Nakamura A, Hamaguchi E, Horikawa R, Nishimura Y, Matsubara K, Sano S, Nagasaki K, Matsubara Y, Umezawa A, Tajima T, Ogata T, Kagami M, Okamura K, Fukami M. Complex

Genomic Rearrangement Within the GNAS Region Associated With Familial Pseudohypoparathyroidism Type 1b. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016 Jul;101(7):2623-7. doi: 10.1210/jc.2016-1725.

11. Luk HM, Ivan Lo FM, 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.* 2016 Jul;170(7):1938-41. doi: 10.1002/ajmg.a.37679.

12. Sano S, Matsubara K, Nagasaki K, Kikuchi T, Nakabayashi K, Hata K, Fukami M, Kagami M, Ogata T. Beckwith-Wiedemann syndrome and pseudohypoparathyroidism type 1b in a patient with multilocus imprinting disturbance: a female-dominant phenomenon? *J Hum Genet.* 2016 Aug;61(8):765-9. doi: 10.1038/jhg.2016.45

13. Fukami M, Shima H, Suzuki E, Ogata T, Matsubara K, Kamimaki T. Catastrophic cellular events leading to complex chromosomal rearrangements in the germline. *Clin Genet.* 2016 2017 May;91(5):653-660. doi: 10.1111/cge.12928.

14. Suzuki E, Shima H, Toki M, Hanew K, Matsubara K, Kurahashi H, Narumi S, Ogata T, Kamimaki T, Fukami M. Complex X-Chromosomal Rearrangements in Two Women with Ovarian Dysfunction: Implications of Chromothripsis/Chromoanaysynthesis-Dependent and -Independent Origins of Complex Genomic Alterations. *Cytogenet Genome Res.* 2016;150(2):86-92. doi: 10.1159/000455026.

15. 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 Epigenetics*, 2015; 28;7(1):90. doi: 10.1186/s13148-015-0124-y.

16. Suzumori N, Kagami M, Kumagai K, Goto S, Matsubara K, Sano S, Sugiura-Ogasawara M. Clinical and molecular findings in a patient with 46,XX/47,XX,+14 mosaicism caused by postzygotic duplication of a paternally derived chromosome 14. *Am J Med Genet A*, 2015; 167(10):2474-7. doi: 10.1002/ajmg.a.37194.

17. Sano S, Iwata H, Matsubara K, Fukami M, Kagami M, Ogata T. Growth hormone deficiency in monozygotic twins with autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type 1b. *Endocr J*, 2015; 62(6):523-9. doi:

10.1507/endocrj.EJ15-0033.

18. Yorifuji T, Matsubara K, Sakakibara A, Hashimoto Y, Kawakita R, Hosokawa Y, Fujimaru R, Murakami A, Tamagawa N, Hatake K, Nagasaka H, Suzuki J, Urakami T, Izawa M, Kagami M. Abnormalities in chromosome 6q24 as a cause of early-onset, non-obese, non-autoimmune diabetes mellitus without history of neonatal diabetes. *Diabet Med*, 2015; 32(7):963-7. doi: 10.1111/dme.12758.

19. Kagami M, Mizuno S, Matsubara K, Nakabayashi K, Sano S, Fuke T, Fukami M, Ogata T. Epimutations of the IG-DMR and the MEG3-DMR at the 14q32.2 imprinted region in two patients with Silver-Russell Syndrome-compatible phenotype. *Eur J Hum Genet*, 2015; 23(8):1062-7. doi: 10.1038/ejhg.2014.234.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 種々の発症原因を有するインプリンティング疾患患者 127 名における Multilocus Methylation Defects の検討 (ポスター) 松原 圭子、中村 明枝、井上 毅信、川嶋 明香、深見 真紀、鏡 雅代、第 62 回人類遺伝学会、2017.11.26、東京
2. 種々の発症原因を有するインプリンティング疾患患者 127 名における Multilocus Methylation Defects の検討 (口頭、最優秀演題候補) 松原 圭子、中村 明枝、井上 毅信、川嶋 明香、深見 真紀、鏡 雅代、第 51 回日本小児内分泌学会学術集会、2017.9.28、神戸
3. 第 50 回小児内分泌学会 / 第 9 回アジア太平洋小児内分泌学会 The DNA methylation status at imprinted differentially methylated regions in the patients with hypomorphic mutations in INSR or IGF1R gene 東京 2016/11/16-20
4. IPWSO Risk assessment of assisted reproductive technology and advanced maternal ages in the development of uniparental disomy Tronto 2016/7/20-24
- ICHG/第 61 回人類遺伝学会 Risk assessment of assisted reproductive technology and advanced maternal ages in the development of uniparental disomy 京都 2016/4/3-7 招待 口演 Keiko Matsubara
5. 第 39 回日本小児遺伝学会学術集会 INSR または IGF1R 遺伝子機能低下型変異を有する症例の DMR におけるメチル化状態の評価 東京 2016/12/9-10 口演
6. 松原圭子、長崎啓祐、中村明枝、佐野伸一朗、深見真紀、緒方勤、鏡雅代、「顕微授精により出生し Silver-Russell 症候群の表

現型の有無に差のある品胎に対する網羅的メチル化解析」第49回小児内分泌学会
2015/10/8-10 東京

7. 松原圭子、長崎啓祐、中村明枝、佐野伸一朗、深見真紀、緒方勤、鏡雅代、「顕微授精により出生しSilver-Russell症候群の表現型の有無に差のある品胎に対する網羅的メチル化解析」第60回人類遺伝学会
2015/10/15-17 東京

8. 松原圭子、「生殖補助医療と高齢出産が片親性ダイソミー発症に及ぼす影響について考える」第38回分子生物学会
2015/12/1-24 神戸

研究者番号：80399458

(3)連携研究者

柴崎淳 (Shibasaki Jun)

神奈川県立こども医療センター

新生児科 医長

研究者番号：30540471

(4)研究協力者

()

〔図書〕(計 1 件)

1. 松原 圭子. Prader-Willi 症候群発症に影響を与える因子の検討-高齢出産と生殖補助医療 医学の歩み、2017, 263(4), 296-300.

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

松原 圭子 (Keiko Matsubara)

国立研究開発法人

国立成育医療研究センター

分子内分泌研究部・上級研究員

研究者番号：90542952

(2)研究分担者

和田由香 (Yuka Wada)

国立研究開発法人

国立成育医療研究センター

周産期・母性診療センター新生児科医員