

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591146

研究課題名（和文） ラッセル・シルバー症候群におけるエピジェネティック機構の解明

研究課題名（英文） The high resolution oligonucleotide microarray for the chromosomal and epigenetic alterations in Russell-Silver syndrome

研究代表者

吉橋 博史 (YOSHIHASHI HIROSHI)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：60286531

研究成果の概要（和文）：ラッセル・シルバー症候群は、出生前後の成長障害、相対的大頭症、逆三角形の顔、左右非対称、第5指内彎などを主徴とする先天異常である。近年、エピジェネティック異常による発症が約40%の症例で示されているが、残り約60%の症例では発症機序は未解明である。ラッセル・シルバー症候群30例に対し、独自に作製したカスタムオリゴアレイを用いて、エピジェネティック機構の解明をめざした。7番染色体母性片親性ダイソミーと考えられた症例以外に、有意な微細構造異常をもつ症例は同定されなかった。

研究成果の概要（英文）：Russell-Silver syndrome (RSS) is a congenital disorder characterized by pre- and postnatal growth failure, relative macrocephaly, triangular face, hemihypertrophy, and clinodactyly of the fifth finger. As the etiology of RSS, epigenetic aberrations have been shown in the 40% of the patients with RSS, but the other pathogenic mechanism of RSS has not been indicated in the remaining 60% of those. We performed the custom-build high density oligoarray CGH in the 30 patients with RSS. No microscopic chromosomal aberrations were detected, except uniparental partial disomy of chromosome 7.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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・先天異常学

## 1. 研究開始当初の背景

ラッセル・シルバー症候群は、子宮内発育遅延、出生後も続く低身長、相対的大頭症を伴う逆三角形の顔貌を特徴とする症候群である。成長障害を主徴とする症候群のうち、比較的頻度の高い疾患（5-10万出生に1人）であり、一般に発達遅滞や知的障害を伴わない。先行研究において染色体異常や遺伝子異常を認める症例が複数報告されていること

から、その発症機序に何らかの遺伝学的背景があるものと想定されるが、多くの症例を一元的に説明できる決定的な発症機序は明らかではなく、臨床のおよび遺伝的に異質性の高い疾患と考えられている。

現在まで知られているラッセル・シルバー症候群の発症機序は、主にインプリンティング遺伝子の発現パターンの違いによる、エピジェネティック異常に起因するものである。

(1) エピジェネティック異常による発症：  
エピジェネティック異常に基づく発症機序は、以下の2種類に大別される。

①一つは、11p15 領域に存在する *H19*-DMR (differentially methylated region: メチル化可変領域)の低メチル化 (エピ変異) によるものである。同領域には共通のエンハンサーで調節される父性発現インプリンティング遺伝子 *IGF2* と母性発現インプリンティング遺伝子 *H19* が存在し、それぞれ *H19*-DMR のメチル化状態に依存した発現パターンを示す。約 30% の症例では、この *IGF2*-*H19* インプリンティングドメインで、通常とは異なる両遺伝子の発現パターンを来たした場合、ラッセル・シルバー症候群を発症する。*H19* は胎児期の主要な成長促進遺伝子である *IGF2* の発現を抑制し、その発現はプロモーター部位のメチル化により抑制されている。*H19* のプロモーター部位に脱メチル化が起こると、*H19* の発現亢進により *IGF2* の発現低下が生じ、ラッセル・シルバー症候群の特徴をもつ表現型を呈するものと考えられている。

②もう一つは、7 番染色体を 2 コピーとも母親から受け継ぐ、7 番染色体母性片親性ダイソミー (maternal uniparental disomy 7: mUPD7) によるものである。片親性ダイソミーとは、相同染色体のすべて、あるいは一部が 2 コピーとも父親あるいは母親に由来している染色体異常の状態を意味する。ラッセル・シルバー症候群の約 10% の症例では、7 番染色体が 2 コピーとも母由来 (mUPD7) となっており、7 番染色体上に存在するインプリンティング遺伝子の発現パターンの異常が、ラッセル・シルバー症候群を引き起こしている可能性が示唆される。現在までに、7 番染色体上のインプリンティング遺伝子のうちラッセル・シルバー症候群の決定的な原因遺伝子として特定されているものはない。

残り約 60% の症例では、発症機序が未解明である。このことは、エピジェネティック異常以外の発症原因も含めた、遺伝学的検討の必要性を示しているものと考えられる。

(2) エピジェネティック異常で発症する症候群における微細構造異常：同じエピジェネティック異常で発症するプラダー・ウィリー症候群では、通常の染色体検査 (G 分染法) で検出できない大きさの微細構造異常が 15q11 領域に検出され、発症の一因となっている。また、ラッセル・シルバー症候群とは対照的な臨床像 (出生前後の過成長、巨舌症) をもつ、ベックウィズ・ウィードマン症候群では、11p15.5 領域のエピジェネティック異常が発症の一因として知られているが、自検例において同部位の微細欠失が同定されている。これらの知見は、ラッセル・シルバー症候群の一部でも、11p15.5 領域および近傍

のゲノム構造異常が存在しエピジェネティック異常の制御に関与している可能性や、その他のゲノム上に存在する微細な構造異常に含まれる遺伝子群が、成長障害および身体的特徴の形成に影響を及ぼしている可能性を示すものと考えられる。

(3) マイクロアレイ染色体検査による微細構造異常の網羅的解析技術の進歩：

G 分染法などの既存の染色体分析法よりも、解像度の高い BAC (bacterial artificial chromosome) アレイ CGH (comparative genomic hybridization) が、成長障害、発達遅滞、多発奇形などの不均衡型染色体異常症でよくみられる諸症状をもつ症例で、原因検索に用いられてきた。近年、BAC アレイ CGH よりさらに解像度がおよそ 10-20 倍高いオリゴアレイ CGH が、染色体微細構造異常を疑う症例の原因検索に多用されている。この解析法では、ゲノム DNA 断片が基盤上に高密度に搭載されたアレイ上で、蛍光色素をつけた患者ゲノム DNA 断片と、別色の蛍光色素をつけた正常対照ゲノム DNA 断片とを、競合的にハイブリダイズさせる。その後、患者あるいは正常対照とハイブリダイズした各アレイ上のゲノム DNA 断片から発するシグナル強度を検出器で測定し、両者の蛍光強度比を算出することで、アレイ化された個々の当該領域に対応する染色体上のゲノムコピー数異常の有無を評価する。さらに、ゲノム上の標的領域に関する詳細な解析が必要な場合は、その部位に対応するプローブを優先的に搭載できるカスタムオリゴアレイの設計も可能となっており、解析技術はめざましく進歩している。

## 2. 研究の目的

本研究では、ラッセル・シルバー症候群と関連性の高い染色体上の標的領域におけるゲノム構造異常の有無を重点的に評価するため、疾患特異的カスタムオリゴアレイを独自に設計し、今まで検出不可能であった、より微細なゲノム構造異常をもつラッセル・シルバー症候群患者の同定を試みる。ゲノム構造異常領域が同定されれば、その領域に含まれる遺伝子群の詳細な解析を通じて、エピジェネティック異常とラッセル・シルバー症候群の発症機構の解明をめざす。

## 3. 研究の方法

(1) 対象 Price ら (1999 年) が示した暫定的な診断基準、「①子宮内発育遅延、②診断時低身長、③逆三角形の顔貌、④第 5 指内彎、⑤左右非対称を主要徴候とし、うち 3 項目以上を満たす。」にもとづき、臨床的にラッセル・シルバー症候群と診断された 30 例 (男児：女児=12：18) を対象とした。

## (2) 方法

①サンプル：各患者の末梢血リンパ球細胞由来のゲノム DNA を対象とした。アレイ CGH に用いるリファレンスサンプルには、NA18579 (chinese female) を用いた。

②カスタムマイクロアレイ：微細なゲノム構造異常の検出には、CGH プローブと SNP

(single nucleotide polymorphism) 領域用プローブの両方を搭載した CGH+SNP マイクロアレイを選択した。CGH プローブにより染色体全体のゲノムコピー数変化を、SNP プローブにより片親性ダイソミーや LOH (loss of heterozygosity) を、両方同時に検出可能なラッセル・シルバー症候群の特異的カスタムマイクロアレイを、eArray (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) を用いて作製した。

③アレイデザイン：CGH プローブの配置は、ラッセル・シルバー症候群との関連が疑われる領域を重点的に解析するため、既報告および成長と関係する遺伝子を含む領域を中心に、オリゴ DNA プローブを優先的に搭載した。同時に、60 塩基程度の合成 DNA プローブを、テロメア・サブテロメア領域、RefSeq 遺伝子領域を含み、ゲノム全領域をカバーするように、計 6 万個程度配置し、ゲノム構造異常の評価が網羅的にできるよう設計した。フォーマットには、SurePrint G3 CGH+SNP 4x180K を選択した。

【プローブを重点的に配置した領域】

17q23q24 (Dorr S *et al.* Genomics 2001)、17q22q24.1 (IGF1 deficiency 関連) Maternal UPD7 (Eggerding *et al.* Am J Hum Genet 1994)、7p14 (Nakabayashi K *et al.* Genomics 2002)、1q32.1q42.1 (van Haelst MM *et al.* J Med Genet 2002)、7p12.2 *GRB10* (Joyce CA *et al.* Hum Genet 1999)、7p13 *IGFBP1* (Joyce CA *et al.* Hum Genet 1999)、7p13 *IGFBP3* (Wakeling *et al.* J Med Genet 2000)、7p13-p11.2 imprinted region (Monk D *et al.* Am J Hum Genet 2000)、7q31-qter imprinted region (Hannula *et al.* J Med Genet 2001)、11p15.5 *H19*, *IGF2* imprinted region (Gicquel *et al.* Nat Genet 2005)、11p15.4 *CDKN1C* (Schonherr *et al.* J Med Genet 2007)。

④ダイレクトシーケンス：遺伝子解析を要す症例では、翻訳領域および周辺の塩基配列を決定するために、ダイレクトシーケンス法により、当該遺伝子の変異解析をおこなった。

## 4. 研究成果

### (1) ゲノムコピー数異常の検索

診断基準を満たしたラッセル・シルバー症候群 30 例由来のゲノム DNA に対し、カスタムオリゴアレイを用いてゲノム構造異常の網羅的解析をおこなった。有意なゲノムコピ

一異常は検出されず、新たに疾患との関連が疑われるようなゲノム構造異常を同定することはできなかった。SNP 領域用プローブによる解析結果との比較から、部分的な 7 番染色体母性片親性ダイソミーを示唆する特徴的なシグナル変化を 1 例で検出した (図 1)。ラッセル・シルバー症候群に特異的な CGH+SNP マイクロアレイを作製し、7 番染色体母性片親性ダイソミーの描出が可能であることを確認した。

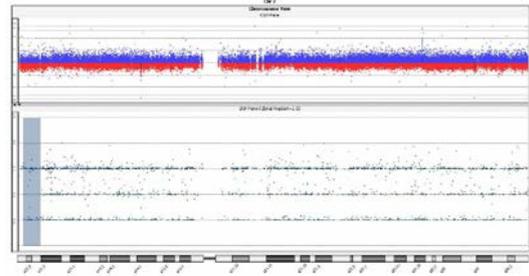


図 1 CGH+SNP マイクロアレイ解析結果  
7 番染色体短腕において部分 mUPD7 と考えられる LOH (水色部分) が描出された。

(2) 有意なゲノム構造異常が検出されなかったことに関する考察

### ① マイクロアレイ解析原理に基づく限界：

CGH+SNP マイクロアレイの SNP 領域プローブによる解析原理は、AluI と RsaI 制限酵素認識配列に位置する SNP のアレル特異的なコピー数をカウントし、SNP 部位に uncut allele があるとシグナル強度が増強し、cut allele があると、シグナル強度が低下するアルゴリズムに基づいている。Test サンプルと Reference サンプルの Log2 比より、Test サンプルの uncut allele コピー数を検出することで、UPD や LOH を同定することが可能とされている。

しかし、この解析原理では、アイソダイソミーの検出は可能であるが、母体高齢などで高頻度に観察される配偶子形成時における第 1 減数分裂の不分離が起点となるヘテロダイソミーの検出は不可能である。本研究において、7 番染色体母性片親性ダイソミーが通常の検出率 (10%) より低かった (3.3%) 理由は、この解析アルゴリズムの影響を受けている可能性が考えられた。また、染色体断片に過不足を生じない変化 (均衡型相互転座、挿入、逆位) や低頻度モザイクの状態にある染色体異常の検出は、アレイ CGH では困難であり、CGH+SNP マイクロアレイを用いた網羅的解析には一定の検出限界が存在することを考慮する必要がある。

### ② CGH プローブ配置の偏りによる影響

さらに、ラッセル・シルバー症候群と関連性の高い領域に特化して重点的に CGH プローブを配置したため、その他のゲノム領域に配置できる CGH プローブ数が、より微細なゲノ

ム構造異常を検出するには十分とは言えず、相対的に解像度が低下した可能性も考えられる。搭載できる総プローブ数を増やすことが可能なマイクロアレイフォーマットを選択できれば、ゲノム構造異常が検出された可能性がある。

### (3) 微細なゲノム構造異常をもつ症例報告

研究開始以降、アレイ CGH を用いた詳細な解析により、多彩なゲノム構造異常をもつラッセル・シルバー症候群の報告が相次いでいる。現在のところ、ラッセル・シルバー症候群の約 3 分の 1 の症例で、エピ変異が認められる 11p15 領域および近傍に微細なゲノム構造異常が同定された報告は認められない。Fuke ら (2013) は、日本人ラッセル・シルバー症候群 138 人における分子遺伝学的検討により、1 名に 17q24 領域の微細欠失を、Blyth ら (2008) は、ラッセル・シルバー症候群様の徴候を示す Carney complex をもつ患者で 17q24.2-q24.3 領域の微細欠失を報告している。これらの共通領域に含まれる *KPN12* は責任遺伝子として注目されたが、ラッセル・シルバー症候群患者で点変異は同定されなかった。また、Spengler ら (2010) も、骨斑紋症と発達遅滞を伴うラッセル・シルバー症候群患者で 12q14 領域の微細欠失を報告し、同領域に含まれ成長障害と関連する *HMG12* が責任遺伝子として注目されたが、ラッセル・シルバー症候群の患者で点変異は同定されなかった。さらに、Coutton ら (2012) は、17p13 領域に微細重複をもつラッセル・シルバー症候群を報告している。

これらの報告と本研究結果は、ラッセル・シルバー症候群の発症機構を解明する上で重視すべき方向性を示している。その一つは、微細なゲノム構造異常が何らかのメカニズムにより、ラッセル・シルバー症候群の発症機序に関わっている可能性は残るが、現時点において、エピジェネティック異常による発症機序に比べれば、ゲノム構造異常が発症機序の主因となる可能性は低い、と想定される。本研究においてもこれを支持する結果が得られたものと考えられる。もう一つは、微細なゲノム構造異常が検出された近年のラッセル・シルバー症候群報告例の臨床像では、典型的な症状に加え、非典型的な所見を伴っている傾向がみられている。遺伝的異質性の高いラッセル・シルバー症候群の対象を選定する場合、診断基準をどのように設定するかは、検討すべき重要事項と思われた。

### (4) 対象の選択に関する問題点

ラッセル・シルバー症候群に関する様々な診断基準の作成が試みられてきた (Preece ら 1999, Netchine ら 2007, Bartholdi ら 2009)。本研究では、Price らの暫定診断基準に基づ

きラッセル・シルバー症候群の表現型をもつ症例を対象として解析を進めた。この診断基準では、主観的な評価項目が多く、染色体異常症でよくみられる非特異的な徴候も含まれている。Netcline ら (2007) の診断基準では、「出生時の身長または体重が -2SD 以下」を必須条件とし、加えて①出生時の相対的大頭症 (身長または体重の SDS と、頭囲の SDS の間に 1.5 以上の差がある)、②出生後の成長障害 (2 歳以上の身長が -2SD 以下である)、③左右非対称、④早期の前額突出、⑤摂食障害のうち 3 項目以上を満たすものが、ラッセル・シルバー症候群と診断されている。数値化された基準が設定され、客観性を担保できる評価項目が少なくない。以上を考慮すると、本研究では「ラッセル・シルバー症候群様」の徴候を示す症例が多く取り込まれた可能性があり、微細なゲノム構造異常の検索において、ラッセル・シルバー症候群を標的とした疾患特異的 CGH+SNP マイクロアレイが有効に機能しなかった可能性がある。

### (5) 臨床像が酷似する症候群の存在

実際に、本研究の対象となった症例では、臨床像を改めて評価した結果、既知の症候群が疑われる症例が一部含まれていた。診断的価値の高い特徴的な骨所見や心臓の器質的異常が存在することから、臨床像がラッセル・シルバー症候群と酷似するものの、3M 症候群 (6p21.1:*CULL*) や Mulibrey nanism (17q22q23:*TRIM37*) などが強く疑われ、当該責任遺伝子の解析を行った結果、遺伝子変異が同定されている (*TRIM37* 変異: Arg292GlnfsX18 および Ser339Cys)。また、著明な成長障害を主徴とし、表現度の多様性と遺伝的異質性が知られている Meier-Gorlin 症候群 (責任遺伝子群: *ORC1, ORC4, ORC6, CDT1, CDC6*) や、Seckel 症候群 (*ATR, RBBP8, CEP152, CENPJ, NIN, CEP63*) なども、特に年少児では、ラッセル・シルバー症候群様の外観を呈する可能性がある。高い遺伝的異質性を示すラッセル・シルバー症候群で、主たる発症機序を解明するには、臨床像が酷似する「成長障害を主徴とする症候群」における診断的価値の高い特徴的な画像検査所見を加味し、遺伝学的検査などで可能な限り鑑別疾患を除外するなど、解析対象を慎重に選択することが重要と考えられた。

### (6) 今後の展望

成長障害を主徴とするラッセル・シルバー症候群様の疾患では、1 つあるいは複数の責任遺伝子が報告されているものが少なくない。ラッセル・シルバー症候群で、近年報告された責任遺伝子が存在し得る候補領域を、さらに解像度の高いカスタムオリゴアレイの標的領域として盛り込むと共に、臨床像が

ラッセル・シルバー症候群と酷似する種々の症候群の責任遺伝子を網羅的に遺伝子変異検索するため、次世代シーケンサーによるターゲットシーケンス解析などを併用するなど、対象症例の質的な絞り込みを検討する必要があるものとする。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

①Two sibs with mulibrey nanism reported from Japan. Yoshihashi H, Oomori S, Satoh S, Torii C, Kosaki K. The 61th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics 12th International Congress of Human Genetics, Montreal, Canada, 11th to 15th October 2011

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉橋 博史 (YOSHIHASHI HIROSHI)  
慶應義塾大学・医学部・共同研究員  
研究者番号：60286531

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者

小崎 健次郎 (KOSAKI KENJIRO)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号：30234743