

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 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791022

研究課題名（和文）

日本人プラダーウィリー症候群患者における病因構成比率の変化とその要因

研究課題名（英文）

The changing frequency of genetic causes for Prader-Willi syndrome in Japan.

研究代表者

松原 圭子（Keiko Matsubara）

独立行政法人 国立成育医療研究センター・分子内分泌研究部・研究員

研究者番号：90542952

研究成果の概要（和文）：

本研究では、PWS 患者約 140 名の分子遺伝学的解析を通じ、高齢出産が第一減数分裂不分離後の trisomy rescue を介した 15 番染色体母性片親性ダイソミー (upd(15)mat) 発症のリスク因子であることと、日本において、高齢出産傾向の進行に伴い、upd(15)mat の相対的頻度が増加していることを明らかとした。また、PWS 患者集団において何らかの不妊治療により出生した児の頻度は一般集団のそれに比較し有意に高いものの、不妊治療群の患者母親の高年齢が最も影響を及ぼしていると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We performed molecular analysis on 140 patients with Prader-Willi syndrome. Here, we report that advanced maternal age was a risk factor for the development of PWS due to upd(15)mat resulting from meiosis I error, and that relative frequency of upd(15)mat due to trisomy rescue after non-disjunction during meiosis I was increased since 2003 when advanced maternal age became obvious in Japan. We also report that the frequency of births after ART was significantly higher in PWS patients than in the general population. These results showed that ART and/or ART-related parental factors (maternal age etc.) can be a risk factor for PWS in general.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
平成 23 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：臨床医学、人類遺伝学

キーワード：遺伝学、先天異常

1. 研究開始当初の背景

プラダーウィリー症候群（PWS：Prader-Willi syndrome）は約 15,000 人に 1 人の頻度で発症し、新生児期から乳児期における著明な筋緊張低下、皮膚の色素低形成、外性器異常、幼児期以降の過食・肥満、精神

遅滞を主症状とする疾患である。15 番染色体長腕に PWS の責任遺伝子座が存在し、PWS 患者の 70% で父性アレルの 15q11-q13 領域の欠失、25% で 15 番染色体の母性片親性ダイソミー (UPD; uniparental disomy)、5% 前後でこの領域に存在するインプリント調節

領域 (ICR ; imprint control region) の異常が認められる。ICR の異常が認められるものの中には、この領域の微細な欠失によるものと、ICR のエピ変異によるものが含まれる。また、2008年 Sahoo らにより、ICR の構造・機能は正常に保たれているものの、SNRPN 下流に存在する snoRNA(HBII-85)を含む領域のみが欠失して PWS 表現形を呈する症例が報告されている。

PWS-ICR は、SNURF-SNRPN 遺伝子のエクソン1を含む領域で母性メチル化を示す DMR (differentially methylated region、メチル化可変領域) となっている。父性アレルの PWS-ICR はメチル化されておらず、SNURF-SNRPN から始まる長大な転写物を発現させる。これは UBE3A のアンチセンス転写物を含み、父性アレル上の UBE3A の発現を抑制している。また、父性アレルの PWS-ICR は周辺の父性発現遺伝子を発現させる機能も持っている。一方、母性アレルでは、PWS-IC はメチル化されているため SNURF-SNRPN は発現せず、結果、UBE3A が母性発現する。

2007年 Whittington により、イギリスの5歳以下の PWS 児においては、44%で父性アレルの 15q11-q13 領域の欠失、50%で15番染色体の母性片親性ダイソミー、6%前後で ICR の異常が認められ、従来の病因構成に比し、母性片親性ダイソミーの頻度が増加しているとの報告がなされた。この原因として、母体の高齢化、古い症例の解析の不備、配偶子の異数性をきたすような外的要因 (環境化学物質、生殖補助医療など) などが挙げられ、この中で母体年齢の上昇が最も重要な因子であると推測された。

本邦においては、PWS 症例全体では従来の病因構成と同様の傾向を示すものの、2000年以降出生の新しい症例についての詳細な検討はなされていない。母体年齢の上昇や生殖補助医療の広がりに伴い、イギリスと同様の病因構成の変化が見出される可能性がある。

近年、生殖補助医療は不妊症に対する標準的な治療法となり、生殖補助医療により出生した児の劇的な増加に伴い、生殖補助医療の潜在的なリスクについての関心が高まりつつある。生殖補助医療は配偶子の異数性およびエピジェネティックな異常を惹起する可能性があり、インプリティング異常症の一つである Angelman Syndrome と Beckwith-Weidemann Syndrome については生殖補助医療によりその発症頻度が増すという統計学的有意差が証明されている。し

かし PWS においては、一般集団と生殖補助医療により出生した児で、その発症頻度に有意差は見出されていない。

9例の生殖補助医療による出生児を含む PWS163例の解析では、2例で deletion が認められ、4例の生殖補助医療出生児を含む PWS86例の解析では、4例とも deletion であった。しかし、現状では PWS と生殖補助医療の因果関係を検討するのに十分な症例数が集積していない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、以下の2点である。

- 1) PWS 発症に影響を与える外的要因 (高齢出産、不妊治療など) のリスクを評価する
- 2) 高齢出産傾向、生殖補助医療による出生児の増加という背景を有する日本における PWS 発症原因の変化を検討する。

3. 研究の方法

PWS 患者とその両親の末梢血や唾液の検体を集積し、この検体から得られるリンパ球や類粘膜細胞のゲノム DNA を用いて、FISH 解析、マイクロサテライト解析を行った。これらの方法で異常が認められない場合、MLPA(Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)キットにより既知の微小欠失の有無を確認した。これらで異常を認めない場合、COBRA 法とバイサルファイトシーケンシング法により PWS-IC のメチル化解析を行った。いずれの方法でも異常が認められない症例では、アレイ CGH にて新規の微小欠失の有無を確認した。

これらの方法により、各症例の発症原因を特定した。さらに upd(15)mat 患者を、マイクロサテライト解析結果から推測される発症機序により、減数第一分裂の不分離による Trisomy rescue/Gamete complementation type(TR/GC[M1])、減数第二分裂の不分離による Trisomy rescue/Gamete complementation type(TR/GC[M2])、Monosomy rescue/Postzygotic mitotic error type(MR/PE)に分類した。

患者両親年齢、生殖補助医療の有無などにより患者を分類し、各発症原因における両親年齢の比較、相対的発症頻度の変化、生殖補助医療が PWS 発症に与える影響について、検討を行った。

また、統計で用いた出生児数、母親年齢は人口動態調査、生殖補助医療関連データは日本産婦人科学会による ART データを参照した。

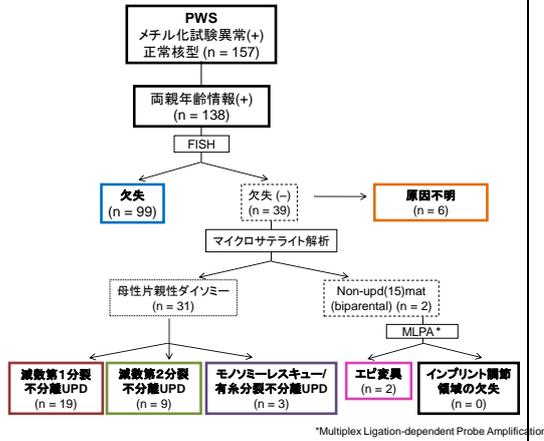
4. 研究成果

・高齢出産と PWS

欠失が 99 例、TR/GC[M1] が 19 例、TR/GC[M2]

が9例、MR/PEが3例、エピソード変異が2例において同定された。6例では、FISHのみ行い、欠失は認められなかった (non-deletion) (図1)。

図1



各発症原因による PWS 患者の両親年齢の分布を図2に、年齢データを表1に示した。出産年齢は、TR/GC[M1]群で、欠失患者群に比し、有意に上昇していた ($P=1.0 \times 10^{-7}$)。父親の年齢も、同様の傾向を認めた ($P=0.00023$)。また、母親の年齢が上昇するにつれ、欠失患者の頻度が減少し、TR/GC[M1]群の頻度が上昇していた。

図2

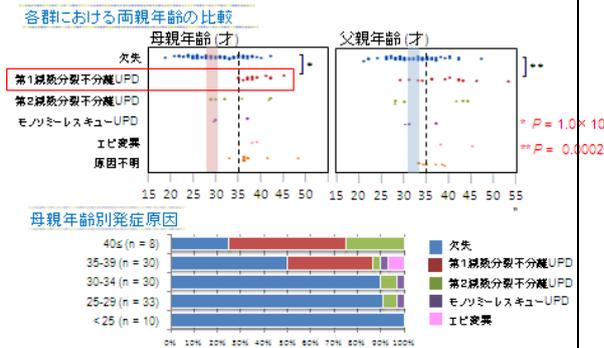


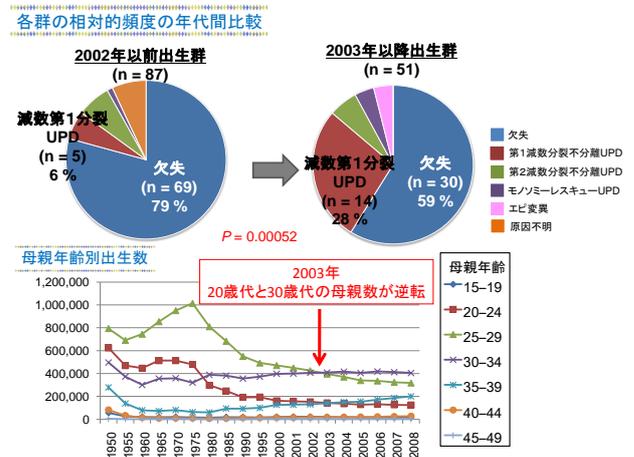
表1 各発症原因の両親年齢

各群	Deletion	TR/GC [M1]		TR/GC [M2]		MR/PE		Epi-mutation		Non-Deletion		All patients		一般集団
		N	中央値	N	中央値	N	中央値	N	中央値	N	中央値	N	中央値	
母親年齢		中央値	30	37	31	30	38.5	36	32	27.5-30.9				
全体	範囲	19-42	35-45	29-42	29-37	38-39	30-48	19-48						
	N	84	15	7	3	2	6	117						
2002年以前	範囲	19-42	35-37	29-42	-	-	30-48	19-48						
	N	60	3	5	1	0	6	75						
2003年以降	範囲	23-39	35-45	30-41	30-37	38-39	-	23-45						
	N	24	15	2	2	2	0	42						
父親年齢	中央値	32.5	40	35.5	31	41.5	36	33	30.6-33.0					
	範囲	21-47	29-53	28-44	28-37	38-45	33-39	21-53						
全体	中央値	32.5	43	35.5	28	41.5	36	33						
	N	82*	15	6*	3	2	6	114						
2002年以前	範囲	21-47	33-43	28-44	-	-	33-39	21-47						
	N	58*	3	4*	1	0	6	72						
2003年以降	範囲	22-40	29-53	30-41	31-37	38-45	-	22-53						
	N	24	12	2	2	2	0	42						

* P = 0.00017

2003年に、20歳代と30歳代の母親の数が逆転しており、高齢出産傾向がより顕著となった(図3)。欠失とTR/GC[M1]群の相対的頻度は、2002年以前(欠失79.3%、TR/GC[M1]5.7%)と2003年以降(欠失58.8%、TR/GC[M1]27.5%)の間で有意に変化していた ($P=0.00052$)。2002年以前出生群に non-deletion 症例6例が含まれるが、これらがすべてTR/GC[M1]であると仮定した場合にも、2003年前後においてTR/GC[M1]の頻度は、欠失群に比し有意に増加していた ($P=0.016$)。

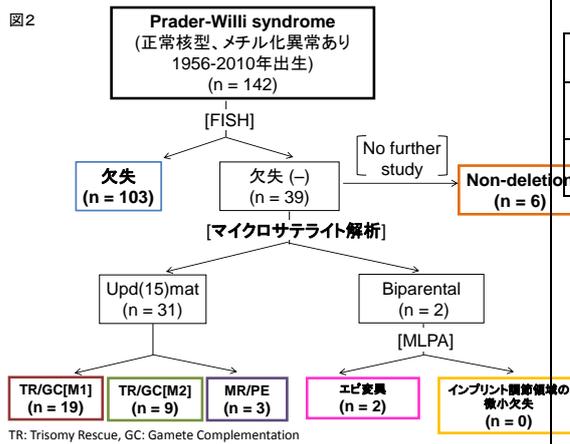
図3



・生殖補助医療と PWS

欠失が103例、TR/GC[M1]が19例、TR/GC[M2]が9例、MR/PEが3例、エピソード変異が2例において同定された。6例では、FISHのみ行い、欠失は認められなかった (non-deletion) (図2)。

図2



解析対象患者 142 名中、6 名の ICSI、1 名の IVF、1 名の AID、6 名の COS による出生児が含まれていた (表 1)。このうち、欠失が 5 例、TR/GC[M1] が 5 例、TR/GC[M2] が 3 例、エピ変異が 1 例で認められた。MR/PE は認められなかった。

表 1 IVF/ICSI, AID, COS による出生児

	ART	出生年	性別	発症原因	父年齢	母年齢
Pt1	COS	1980	M	TR/GC[M2]	43	32
Pt2	COS	1984	M	欠失	34	34
Pt3	COS	1993	F	TR/GC[M1]	28	29
Pt4	AID	1996	F	TR/GC[M2]		36
Pt5	ICSI	1998	F	TR/GC[M2]	44	42
Pt6	ICSI	1998	F	欠失	42	38
Pt7	COS	2002	M	欠失	27	26
Pt8	IVF	2004	M	TR/GC[M1]	42	41
Pt9	ICSI	2007	M	欠失	37	36
Pt10	ICSI	2007	M	TR/GC[M1]	42	39
Pt11	ICSI	2007	F	TR/GC[M1]	53	45
Pt12	ICSI	2008	M	TR/GC[M1]	40	38
Pt13	COS	2008	M	Epi変異	38	39
Pt14	COS	2010	F	欠失	40	38

COS: Controlled ovarian stimulation
 AID: Artificial Insemination by Donor's sperm
 IVF: In Vitro Fertilization, ICSI: Intracytoplasmic Sperm Injection

一年あたりの IVF/ICSI, AID による出生児数データが入手可能であった 1998 年-2009 年に出生した PWS を抽出し、IVF/ICSI と AID による出生児の頻度の比較を行った。1998 年-2009 年に出生した IVF/ICSI および AID により出生した PWS 患者頻度は、同時期に出生した一般集団のそれと比較し、PWS 患者集団で有意に高頻度であった (PWS 群 8/83、9.2% VS. 一般集団 206,235/13,333,0192、1.5%、 $P=8.4 \times 10^{-10}$ 、表 2)。

表 2

	IVF/ICSI, AID	自然妊娠
PWS (1998-2009 年出生)	8 (9.2%)	73
一般集団 (1998-2009 年出生)	206,235 (1.5%)	13,330,192

IVF/ICSI, AID および COS により出生した PWS 患者集団内において、TR/GC[M1] の頻度は、自然妊娠群のそれと比し、有意に高頻度であった (PWS 群 5/14、36% VS. 自然妊娠群 14/128、11%、 $P=0.023$ 、表 3A)。しかし、IVF/ICSI, AID および COS 出生群の患者の母親年齢は、自然妊娠群の母親に比し、有意に高年齢であった (ART 群、中央値 38 才、範囲 26-45 才 VS. 自然妊娠群 中央値 31 才、範囲 19-48 才、 $P=0.0013$)。そこで、35 才以上の出生した PWS 患者集団を用いて同様の解析を行ったところ、IVF/ICSI, AID および COS 群と自然妊娠群とでは、TR/GC[M1] の頻度に有意な差を認めなかった (PWS 群 4/10、40% VS. 自然妊娠群 14/27、34%、 $P=0.50$ 、表 3B)。

表 3

A. 患者全体の比較

	TR/GC[M1]	その他
不妊治療群 (1956-2010 年出生)	5 (36%)	9
自然妊娠群 (1956-2010 年出生)	14 (11%)	114

B. 35 才以上の母親からの出生群における比較

	TR/GC[M1]	その他
不妊治療群 (1956-2010 年出生)	4 (40%)	6
自然妊娠群 (1956-2010 年出生)	14 (34%)	27

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 7 件)

- Oto Y, Obata K, Matsubara K, Kozu Y, Tsuchiya T, Sakazume S, Yoshino A, Murakami N, Ogata T, Nagai T. Growth Hormone Secretion and its Effect on Height in Pediatric Patients with Different Genotypes of Prader-Willi Syndrome. Am J Med Genet A, 158A(6):1477-80
- Fuke-Sato T, Yamazawa K, Nakabayashi K, Matsubara K, Matsuoka K, Hasegawa T, Dobashi K, Ogata T. Mosaic upd(7)mat in a

- patient with Silver-Russell syndrome. 2012, *Am J Med Genet A*, 158A(2): 465-8
3. Kagami M, Kato F, **Matsubara K**, Sato T, Nishimura G, Ogata T. Relative frequency of underlying genetic causes for the development of UPD(14)pat-like phenotype. 2012, *Eur J Hum Genet*. Epub ahead of print.
 4. **Matsubara K**, Murakami N, Nagai T, Ogata T. Maternal age effect on the development of Prader-Willi syndrome resulting from upd(15)mat through meiosis 1 errors. 2011, *J Hum Genet* 56(8):566-571
 5. Yamazawa K, Nakabayashi K, Matsuoka K, **Matsubara K**, Hata K, **Horikawa R**, **Ogata T** Androgenetic/biparental mosaicism in a girl with Beckwith-Wiedemann syndrome-like and upd(14)pat-like phenotypes. 2011, *J Hum Genet*, 56(1):91-3
 6. Suzumori N, **Ogata T**, Mizutani E, Hattori Y, **Matsubara K**, Kagami M, Sugiura-Ogasawara M. Prenatal findings of paternal uniparental disomy 14: Delineation of further patient. 2010, *Am J Med Genet A* 152A(12): 3189-92
 7. Kagami M, O'Sullivan MJ, Green AJ, Watabe Y, Arisaka O, Masawa N, Matsuoka K, Fukami M, **Matsubara K**, Kato F, Ferguson-Smith AC, Ogata T. The IG-DMR and the MEG3-DMR at human chromosome 14q32.2: hierarchical interaction and distinct functional properties as imprinting control centers. 2010, *PLoS Genet*, 6,e1000992

[学会発表] (計 14 件)

1. 第 56 回人類遺伝学会 (千葉) 2011. 11.10
「ART および ART 関連因子は PWS の発症リスクとなるか？」
松原圭子、村上信行、佐藤智子、鏡雅代、永井敏郎、深見真紀、緒方勤
2. 第 45 回小児内分泌学会 (大宮) 2011. 10.6
「ART および ART 関連因子は PWS の発症リスクとなるか？」
松原圭子、村上信行、佐藤智子、鏡雅代、永井敏郎、深見真紀、緒方勤
3. 61st, The American Society of Human Genetics (Montreal), 2011. 10.11
“Risk assessment of ART and its related factors in the development of Prader-Willi syndrome”
Keiko Matsubara, Nobuyuki Murakami, Satoru Sakazume, Yuji Oto, Toshiro Nagai, Tsutomu Ogata.
4. 第 34 回小児遺伝学会 (横浜) 2011.8.11
「ART および ART 関連因子は PWS の発症リスクとなるか？」
松原圭子、村上信行、坂爪悟、大戸祐二、緒方勤、永井敏郎
5. European Human Genetics Conference (Amsterdam) 2011.5.27, “Risk assessment of ART and its related factors in the development of Prader-Willi syndrome”
Keiko Matsubara, Nobuyuki Murakami, Satoru Sakazume, Yuji Oto, Toshiro Nagai, Tsutomu Ogata
6. International Symposium on epigenome network, development and reprogramming of germ cells (Fukuoka) 2010.11.22 “Maternal age effect on the development of Prader-Willi syndrome resulting from upd(15)mat through meiosis 1 errors.” **Matsubara K**, Sato T, Kagami M, Nagai T and Ogata T
7. Annual meeting of American society of human genetics (Washington D.C.) 2010.11.2 “Advanced maternal age increases the UPD proportion of PWS.” Murakami N, **Matsubara K**, Obata K, Sakazume S, Kido Y, Ogata T, Nagai T
8. 14th International Congress of Endocrinology, (Tokyo) 2010.4.1 “MATERNAL AGE EFFECTS ON THE CHANGING PROPORTION OF GENETIC CAUSES OF PRADER-WILLI SYNDROME IN JAPAN”. **Matsubara K**, Kozu Y, Obata K, Murakami N, Saito S, Ogata T, Nagai T
9. 7th International PWS Conference (Taipei) 2010.5.20 “MATERNAL AGE EFFECTS ON THE CHANGING PROPORTION OF GENETIC CAUSES OF PRADER-WILLI SYNDROME IN JAPAN”. **Matsubara K**, Kozu Y, Sakazume S, Murakami N, Ogata T, Nagai T
10. 第 16 回生殖内分泌学会 (大阪) 2010.11.20 「高齢出産は trisomy rescue に起因する母性片親性ダイソミーの発症リスクである : Prader-Willi 症候群 117 例の分子遺伝学的解析」**松原圭子**、村上信行、佐藤智子、鏡雅代、永井敏郎、緒方勤
15. 第 33 回小児遺伝学会 (仙台) 2010.4.22 「女性晩婚化に伴うプラダー・ウィリー症候群の発症病因の変化—片親性ダイソミーの増加—」**松原圭子**、坂爪悟、城戸康宏、緒方勤、永井敏郎
11. 第 55 回人類遺伝学会 (大宮) 2010.10. 7
「高齢出産は trisomy rescue に起因する母性片親性ダイソミーの発症リスクである : Prader-Willi 症候群 154 例の分子遺伝学的解析」**松原圭子**、佐藤智子、鏡雅代、永井敏郎、緒方勤
12. 第 44 回小児内分泌学会 (大阪) 2010. 11.20 「高齢出産は trisomy rescue に起因する母性片親性ダイソミーの発症リ

スクである：Prader-Willi 症候群 154 例の分子遺伝学的解析」松原圭子、佐藤智子、鏡雅代、永井敏郎、緒方勤

13. 第 14 回小児分子内分泌研究会(北海道)、2010.7.3 「高齢出産は trisomy rescue に起因する母性片親性ダイソミーの発症リスクである：Prader-Willi 症候群 154 例の分子遺伝学的解析」松原圭子、佐藤智子、鏡雅代、永井敏郎、緒方勤
14. 第 4 回日本エピジェネティクス研究会(鳥取) 2010.5.28 「日本女性の出産年齢上昇に伴う Prader-Willi 症候群の発症病因の変化」松原圭子、佐藤智子、鏡雅代、永井敏郎、緒方勤

研究者番号：

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

〔図書〕(計 1 件)

1. Prader-Willi 症候群の基礎と臨床、永井敏郎編, 診断と治療社, 2011, 133-144

〔産業財産権〕

該当なし

○出願状況 (計 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◇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

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松原 圭子 (Keiko Matsubara)

独立行政法人 国立成育医療研究センター

・分子内分泌研究部・研究員

研究者番号：90542952