

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 14 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791186

研究課題名（和文） ベックウィズ・ビーデマン症候群の父性ダイソミー多様性と腎泌尿器症状の関連性の解明

研究課題名（英文） The relationship between paternal uniparental disomy and renal-urological features in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome

研究代表者

大塚 泰史 (YASUFUMI OHTSUKA)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：50448479

研究成果の概要（和文）：

ベックウィズ・ビーデマン症候群において片親性父性ダイソミー（父性 UPD）の遺伝学多様性と表現型の関連性を研究した。モザイク率や父性 UPD 範囲は多彩であり、高度では在胎週数を短縮させる可能性が示唆された。また異なる病態であるゲノムワイド父性 UPD 症例が含まれたことで表現型が修飾されている可能性がある。さらに父性ダイソミーの Breakpoint を検討することで、体細胞組み換えに関係する可能性のある 6 モチーフを抽出した。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the relationship between paternal uniparental disomy and characteristic features in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. It was suggested the sever genetic variability of mosaic ratio and the extent of UPD might shorten gestational period. Four cases (13%) of genome-wide UPD might alter the phenotypes. We extracted 6 motifs which might be associated with somatic recombination by investigating the breakpoint of the paternal disomy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：小児科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：ベックウィズ・ビーデマン症候群、父性ダイソミー、SNP アレイ

1. 研究開始当初の背景

ベックウィズ・ビーデマン症候群（BWS）は代表的なエピゲノム（ゲノム刷り込み）疾患で、3 徴候（巨舌、過成長、臍ヘルニア）のほか、腎腫大、腎奇形、Wilms 腫瘍など多彩な症状を呈する。本疾患の 20% は 11p15.5 に存在する刷り込み領域の父性ダイソミー（父性 UPD）モザイクという染色体異常で発症し、特に腎泌尿器症状と腫瘍合併が特徴とされる。父性 UPD は、UPD の範囲とモザイク率という遺伝学的多様性を有しており、腎泌尿器症状などの臨床像との関連が疑われているが解明に至っていない。

2. 研究の目的

本研究では父性 UPD で発症した BWS 症例を対象に、父性 UPD のモザイク率や UPD 範囲と症状や重症度との関連性を分析し、遺伝学的多様性が表現型に及ぼす機序や影響因子を明らかにする。また症状に関与すると考えられる、エピジェネティック変化をゲノムワイドに検討する。父性 UPD の発症原因である体細胞組み換えについて、ヒト検体を用いて発症機構を検討する。

3. 研究の方法

① BWS 患者にに対して末梢血由来 DNA を用いて、マイクロサテライトマーカーによる父性 UPD 発症例のスクリーニングを行った。結果

父性 UPD 症例 31 例を抽出し、UPD モザイク率を解析した。

②父性 UPD 患者の末梢血 DNA を用いて SNP アレイによる UPD 範囲の解析を行った。SNP アレイ結果は、Nexus Copy Number™ software 6.0 (BioDiscovery, Hawthorne, CA, USA) を用いて、父性 UPD の breakpoint における SNP 位置まで同定した。

③父性 UPD 患者の末梢血 DNA を用いて matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) を用いて、30 のインプリント遺伝子のメチル化解析を行った。

④父性 UPD 範囲・モザイク率と腎泌尿器を含めた臨床データとの関連を、二変量解析、多変量ロジスティック法を用いて解析した。

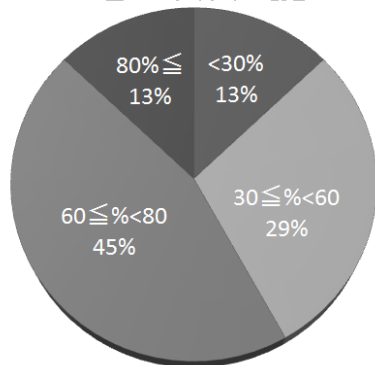
⑤CLC Genomics Workbench 5.1 software (CLC bio, Denmark) を用いて、breakpoint における体細胞組み換えに関連する共通配列を抽出した。

4. 研究成果

①父性 UPD の検討数

119 例の BWS から父性 UPD を原因とする BWS 症例スクリーニングにて 31 例を同定した。本疾患の国内最大の検討数である。モザイク率は 17-99% と多彩であり、60% 以上が全体の 58% を占めていた (図 1)

図1 モザイク率の割合



②父性 UPD の範囲

父性 UPD 範囲を図 2 に示す。灰色バーは各症例で、長さが父性 UPD 範囲を示す。UPD 範囲は、症例毎に 11 番染色体短腕から長腕方向まで Breakpoint は存在していた。25 例 (81%) は短腕内であり、2 例が長腕内、また驚くべきことに 4 例 (13%) に Genome-wide 父性 UPD (以下 GWU) を認めた (最下 4 例)。GWU を除いた以上より 27 例のそれぞれの父性 UPD と heterozygosis の境界 SNP の位置まで決定することができた。

③全染色体における包括的メチル化解析

全染色体において 30 のインプリント遺伝子のメチル化解析を、検討可能であった 17 症

例について行った (図 3)。黒は低メチル化を示し、灰色は高メチル化を示す。GWU はほぼすべてのインプリント遺伝子でメチル化異常を示していた。しかし Segmental 父性 UPD では 11p15.5 領域以外ではメチル化異常を認めなかった。つまり Segmental UPD では他インプリント異常を伴っていない。

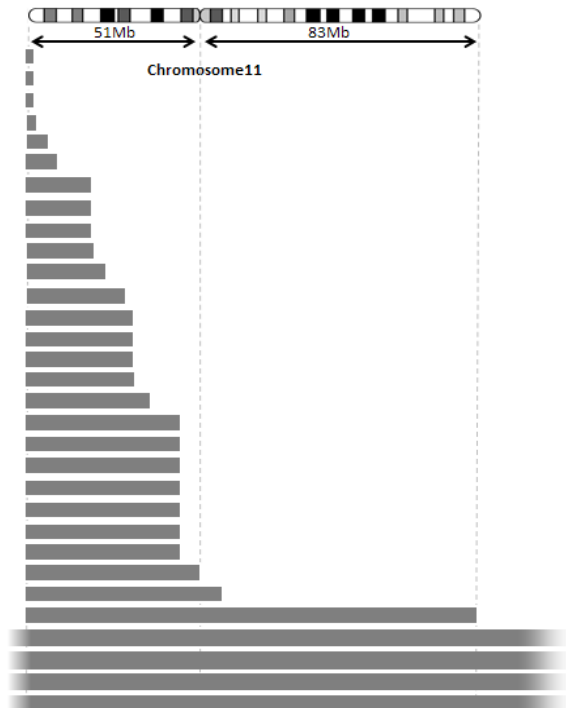


図2 父性 UPD 範囲

④父性 UPD 範囲・モザイク率と臨床情報の統計解析

Segmental UPD 27 例について検討した。父性 UPD 範囲は、heterozygosis の境界 SNP 位置を Log 変換し、モザイク率と父性 UPD 範囲の混合指標として、それぞれの積を使用した。第一にモザイク率と父性 UPD 範囲に相関はみられない (図 4a)。出生時情報 (在胎週数、身長体重、胎盤重量) では、在胎週数は父性 UPD 範囲とは負の相関傾向がみられ、モザイク率×父性 UPD 範囲とは負の相関 ($P < 0.05$) を認めた (図 4b)。

13 症状についてロジスティック解析を行ったが、モザイク率、父性 UPD 範囲と関連する症状はなかった。

GWU については腫瘍合併が高く、BWS の表現型を修飾している可能性が示唆された。

⑤体細胞組み換えに関する配列の検索

解析可能であった 20 例の Segmental UPD Breakpoint における SNP の上下流 10kb 配列を Blastn を用いて解析した。解析ソフトを用いて 17 の候補配列を見出し、既報の 7 配列を加えて、Breakpoint 領域での出現頻度を

Fisher 検定、ポアソン分布を用いて解析した (図 5)。結果 6 つの有意な配列を抽出し、さらに CTNNCTCCC、GCNGGG、CCCCACCCC は 50% 以上の症例に含まれる有力な配列の可能性がある。

結論

1. BWS の父性 UPD の遺伝学的多様性は、モザイク率、父性 UPD 範囲ともに様々であった。また 13% に GWU を認め、稀と考えられている病態を含むことが判明した。
2. Segmental UPD は、11p15.5 以外にメチル

- 化異常はなかった。
3. 父性 UPD 範囲とモザイク率は、妊娠期間が短縮することが示唆された。しかし腎泌尿器症状を含め、BWS の症状と相関はなかった。
4. 体細胞組み換えと関連すると示唆される 6 つの共通モチーフを同定した。

chromosome			1	2	4	6	7	10	11	13	14	15	19	20																					
mosaic ratio (%)	UPD extent (Mb)	Chromosome position of UPD	ARH-CG1	ARH-CG2	ARH-CG3	ZDPF2	NAP115	ZAC	IGF2R-DMR2	FAM50B	PEG10	PEG1	INP15F-V2	KODMR	H1 promoter	H19DMR	IGF2-DMR0	IGF2-DMR2	RBI	DLKI	MIR3-CG7-2	MIR3-CG7-3	IG-DMR	SNRPN	PEG3	NNAT	LMBTL	GNAS1A	NESP	NESPAS	GNASXL	MCT52			
62	2.72	11p15.5																																	
86	2.78	11p15.5			X																														
17	4.35	11p15.4																																	
49	9.73	11p15.4																																	
35	12.1	11p15.3																																	
58	17.8	11p15.1																																	
70	18.2	11p15.1																																	
44	19.8	11p15.1																																	
74	30.6	11p14.1																																	
70	32	11p13																																	
43	32.7	11p13																																	
54	33	11p13																																	
51	41.3	11p12																																	
88	43.6	11p11.2																																	
37	44.9	11p11.2																																	
28	45.8	11p11.2																																	
62	47.6	11p11.2																																	
74	56.2	11q12.1																																	
90	134	Whole 11 chromosome																																	
98		Genome-Wide																																	
91		Genome-Wide																																	
34		Genome-Wide											X																						

図 3 MALDI -TOF MS 法による包括的メチル化解析

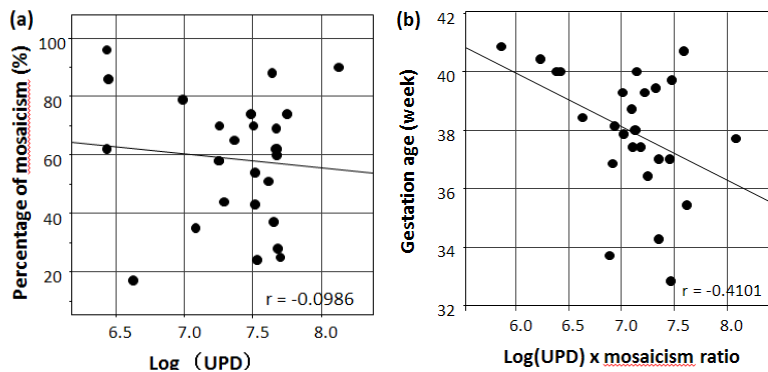


図 4 遺伝学的多様性とパラメーターの関係

No	Sequence	size	Fisher's exact test		Poisson distribution	20例中の配列割合	
			p value	FDR	全症例に含まれる配列数	配列を含有する症例数	割合
1	CTCNCCTCCC	11mer	1.059E-03	1.80E-02	38	13	65%
2	GCNGGG	6mer	3.09E-12	8.03E-11	20	12	60%
3	CCCCACCCC	9mer	2.85E-02	3.71E-01	24	10	50%
4	GAGNCNGAG	9mer	3.85E-05	8.86E-04	26	9	45%
5	TACTGTTC	8mer	1.63E-02	2.28E-01	10	8	40%
6	CCACGTGG	8mer	3.88E-02	4.27E-01	9	7	35%

図5 UPDにおける組み換え関連モチーフ

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4件) 全て査読有

(1) Ken Higashimoto, Toshiyuki Maeda, Junichiro Okada, Yasufumi Ohtsuka, Kensaku Sasaki, Akiko Hirose, Makoto Nomiya, Toshimitsu Takayanagi, Ryuji Fukuzawa, Hitomi Yatsuki, Kayoko Koide, Kenichi Nishioka, Keiichiro Joh, Yoriko Watanabe, Koh-ichiro Yoshiura and Hidenobu Soejima. Homozygous deletion of DIS3L2 exon 9 due to non-allelic homologous recombination between LINE-1s in a Japanese patient with Perlman syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2013 Mar 13, 1-4.

(2) Ohtsuka Y, Kanaji T, Nishi M, Sakai N, Sato T, Aoki S, Wakayama K, Nakazato S, Hisano S, Sado Y, Kawachi H, Izuhara K, Hamasaki Y. A notable case report of May-Hegglin anomaly with immune-complex-related nephropathy: a genetic and histological analysis. *Clin Nephrol.* 2011 Mar;75(3):255-62.

(3) 飯島一誠, 佐古まゆみ, 木村利美, 服部元史, 亀井宏一, 野津寛大, 宍戸清一郎, 相川厚, 森田研, 後藤芳充, 和田尚弘, 大塚泰史, 長田道夫, 斉藤真梨, 本田雅敬, 土田尚, 中村秀文: 小児腎移植におけるミコフェノール酸モフェチルの多施設共同オープンラベル臨床試験 有効性・安全性、薬物動態の評価. *日本小児腎臓病学会雑誌.* 24巻1号 Page36-46(2011)

(4) 石松菜那, 大塚泰史, 岡政史, 佐藤忠司, 濱崎雄平, 青木茂久, 杉本圭相, 竹村司. MALL-NPHP1 遺伝子欠失を認めた Senior-Löken 症候群の一例. *日本小児腎臓病学会雑誌* 24巻2号 Page62-66(2011.11)

〔学会発表〕(計7件)

(1) Yasufumi Ohtsuka, Kosuke Jozaki, Toshiyuki Maeda, Hitomi Yatsuki, Ken Higashimoto, Hidenobu Soejima. The relationship between paternal uniparental disomy and clinical features in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. *American Society of Human Genetics Annual Meeting.* 抄録 256. 2012. 11. 6-10. San Francisco.

(2) 大塚泰史, 前田寿幸, 城崎幸介, 八木ひとみ, 東元健, 副島英伸. Beckwith-Wiedemann 症候群における片親性父性ダイソミーの多様性と臨床症状との関連. 第57回日本人類遺伝学会. 抄録 p140. 2012. 10. 24-27. 東京

(3) 大塚泰史, 岡政史, 稲田由紀子, 石松菜那, 佐藤忠司, 濱崎雄平. 抗 Factor H 抗体にて発症した atypical HUS(aHUS) の一例. 長崎佐賀合同地方会. 抄録 p10. 2012. 8. 12. 長崎

(4) 大塚泰史, 前田寿幸, 城崎幸介, 八木ひとみ, 東元健, 副島英伸: Beckwith-Wiedemann 症候群における片親性父性ダイソミーの多様性と臨床症状との関連. 第6回日本エピジェネティック研究会. 抄録 p128. 2012. 05. 14. 東京.

(5) Ohtsuka Yasufumi, Oka Masafumi, Sakai Nana, Egashira Masakazu, Yamaguchi Tomona, Hamasaki Yuhei. A case of Pseudo-Bartter syndrome in a low birth weight infant caused by the mother's eating disorder. *日本小児腎臓病学会雑誌.* 24巻1Suppl. PageE-187(2011. 06. 02)福岡

(6) Ohtsuka Yasufumi, Oka Masafumi, Sakai Nana, Aoki Shigehisa, Hamasaki Yuhei. An Asian case of Schinzel-Giedion Syndrome with an SETBP1 mutation. *日本小児腎臓病学会雑誌* 24巻1Suppl. PageE-142(2011. 06. 02)福岡

(7) Sakai Nana, Ohtsuka Yasufumi, Oka Masafumi, Hamasaki Yuhei, Aoki Shigehisa, Sugimoto Keisuke, Takemura Tsukasa. A case of Senior Loken syndrome with a mutation of NPHP1. 日本小児腎臓病学会雑誌. 24 巻 1Suppl. PageE-137 (2011.06.02) 福岡

[図書] (計 0 件)

[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

大塚 泰史 (YASUFUMI OHTSUKA)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：50448479