

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461648

研究課題名(和文)ゲノムワイド父性ダイソミ の分子病態に関する研究

研究課題名(英文)Molecular biological analysis of genome wide paternal uniparental disomy

研究代表者

大塚 泰史(Ohtsuka, Yasufumi)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：50448479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Beckwith-Wiedemann症候群である11番染色体片親性ダイソミー(pUPD)症例より、ゲノムワイド父性ダイソミー(GWPUPD)7例を見出した。GWPUPDはSegmental pUPDと比較し、腫瘍発生、精神発達遅滞、心奇形を高率に合併すること明らかにした。GwpUPD4例について、メチル化解析および全エクソーム解析を行った。11p15.5領域以外に複数のインプリンティング領域にメチル化異常を認め、また複数の劣性遺伝子異常を認め、1例はシスチン尿症を発症していた。GWPUPDは、インプリンティング遺伝子、常染色体劣性遺伝子に影響を及ぼし、表現型が規定される機序を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In uniparental disomy (pUPD) of the 11 chromosome with Beckwith-Wiedemann syndrome, we identified seven cases of genome wide uniparental paternal disomy (GWPUPD). GWPUPD was complicated for tumorigenesis, mental retardation and congenital heart disease. We whole exome analysis and performed methylation analysis about GWPUPD 4 cases. We detected many mutations of autosomal recessive gene, and cystinuria developed in one subject. In addition, methylation abnormality was detected to multiple imprinting locus including 11p15.5. We revealed that GwpUPD influenced both autosomal recessive genes and multiple imprinting genes.

研究分野：遺伝学

キーワード：Beckwith-Wiedemann症候群 片親性ダイソミー ゲノムワイド父性ダイソミー エクソーム解析 メチル化解析

### 1. 研究開始当初の背景

ゲノムワイド父性ダイソミー (GWPUPD; Genome-Wide paternal uniparental disomy) はこれまで 14 症例が報告されている稀な病態であり、表現型の類似点から Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) と診断されることが多い。BWS は、巨舌、過成長、腹壁欠損を呈するが、GWPUPD はさらに高率な腫瘍発症、子宮内胎児発育遅延、間葉性異形成胎盤、新生児糖尿病、成長遅滞など BWS と異なる症状を呈する。BWS の 20% は 11 番染色体短腕の片親性父性ダイソミー (UPD) で発症する。GWPUPD は全染色体の UPD であるが、BWS と表現型が異なる機序については不明である。

インプリント遺伝子は片方の親から受け継いだ遺伝子のみが発現する遺伝子で、現在 30 以上が報告されている。GWPUPD において、これら遺伝子の DMR (differentially methylated region) は父アレルのメチル化状態だけを受け継ぐため、DMR 異常を多く有していることが予想される。またその他エピゲノムが関与する遺伝子についても同様で、エピゲノムの影響は否定できない。

GWPUPD 表現型は、BWS の 11p15.5 における細胞増殖遺伝子の高発現、腫瘍抑制遺伝子の低発現があり、さらに全染色体における劣性遺伝子の関与が予想される。また全染色体においてインプリント DMR 異常が生じている可能性がある。

### 2. 研究の目的

GWPUPD の遺伝学的機序として劣性遺伝子異常の可能性や、全ゲノムにおける DMR のメチル化異常を解析し、GWPUPD の分子生物学的解析を行う。

### 3. 研究の方法

我々はこれまで BWS90 例以上から 36 例の UPD を見出し、その遺伝学的解析を進め、既報よりも高率 (7 例、19%) に GWPUPD が存在することを見出した。

#### エクソーム解析

解析が可能であった 7 例中 4 例の患者末梢血 DNA に対して、次世代シーケンサーによるエクソーム解析を行い、常染色体劣性遺伝子異常のある候補遺伝子を抽出する。Direct Sequence で遺伝子異常を確認する。

#### インプリント DMR のマルチローカスメチル化解析

30 カ所のインプリント DMR について、定量的メチル化解析 (MassARRAY®) を実施した。当初 450 K メチル化アレイを予定していたが、検体に問題があり変更した。

### 4. 研究成果

4 例すべて GWPUPD であり、性別は女性であった。モザイク率は 31 ~ 99% であり、3 例に

腫瘍病変を合併していた (表 1)。

表 1. 対象の情報

患者	性別	モザイク率	腫瘍
BWS045	F	99	乳腺 (Fibroadenoma)
bwsh21-002	F	90	肝血管内皮腫 (Infahemangioendothelioma, Type2)
bwsh21-051	F	31-38	肝臓 (hemangioma)、乳腺 (Fibroadenoma)
bwsh21-078	F	70-75	なし

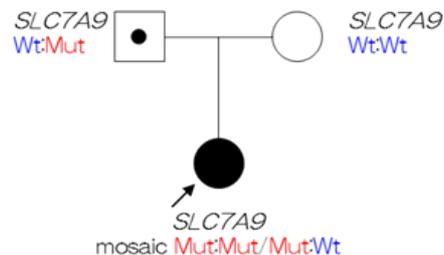
#### エクソーム解析

変異が検出された遺伝子は多数認められ、その中から常染色体劣性遺伝子異常を抽出した。常染色体劣性遺伝子数/変異が疑われた遺伝子数では、BWS045 は 53/244、bwsh21-002 は 21/247、bwsh21-051 は 0/349、bwsh21-078 は 4/405 であった。抽出した劣性遺伝子異常において、OMIM に登録されている劣性遺伝子疾患をまとめた (表 2)。血液においてモザイク率が高い症例では検出率が良好であった。病原性が疑われる遺伝子異常のある常染色体劣性遺伝子疾患は、BWS045 が 6 疾患、bwsh21-002 および-078 では 1 疾患ずつを検出し、bwsh21-051 では認めなかった。

BWS045 においては、シスチン尿症の原因遺伝子 *SLC7A9* に 1 塩基欠失による Frameshift を認め、病原性が疑われた。また臨床情報より尿路結石からシスチン尿症と診断されていた。家系内の c.1017delA 解析から、GWPUPD 患者は、父由来の *SLC7A9* 変異のホモ接合であった。つまり父性ゲノムが倍加した GWPUPD 細胞が生じ、*SLC7A9* 変異のホモ接合となったと結論した。GWPUPD における常染色体劣性遺伝子疾患の発症は、GWPUPD で重要な病態であり、世界で初めて報告した (2)。

表 2 病原性が疑われる常染色体劣性遺伝子疾患と、3 症例の臨床情報を照会した。症状登録時には発症が明らかな疾患は、シスチン尿症以外に明らかではなかった。しかし、症例毎の眼科検査や骨検査など精査を行うことや、長期経過観察で発症する可能性もあり、慎重に確認する必要性が考えられた。

図 1. BWS045 家系における *SLC7A9* 遺伝子異常 (c.1017delA, p.V340fsX21) の解析



#### インプリント DMR のマルチローカスメチル化解析

4 例中 3 例で解析した (表 3)。BWS のインプリンティング領域である 11p15.5 をはじめ、30 カ所のほぼ全域でメチル化異常を認めた。Bwsh21-051 はモザイク率が 30% と低く、

表 2. エクソーム解析より得た常染色体劣性遺伝子異常と変異予測

gene	chromosome	OMIM	Autosomal recessive disorders	mutation	Predicted on by mutation on tasting	
SLC7A9	19	220100	CYSTINURIA	ENST00000587772.1:exon10:c.1017delA;p.K339fs	disease causing	
RAB3GAP2	1	609275	Martsof syndrome	ENST00000358951.2:exon6:c.C448T;p.R150C	disease causing	
		614225	Warburg micro syndrome			
CAD	2	616457	Congenital disorder of glycosylation, type IZ	ENST00000403525.1:exon34:c.C5376G;p.I1792M	disease causing	
CEP135	4	614673	Microcephaly 8	ENST00000422247.2:exon6:c.A730T;p.I244F	polymorphism	
SLC39A4	8	201100	Acrodermatitis enteropathica	ENST00000301305.3:exon7:c.C1204T;p.R402C	disease causing	
BWS045	8	218600	Baller-Gerold syndrome			
		266280	RAPADILINO syndrome	ENST00000428558.2:exon5:c.G796A;p.E266K	polymorphism	
		268400	Rothmund-Thomson syndrome			
FANK1	10	601493	Cardiomyopathy, dilated, 1C, with or without LVN			
		601493	Cardiomyopathy, hypertrophic	ENST00000368695.1:exon8:c.A812G;p.N271S	polymorphism	
		601493	Left ventricular noncompaction 3			
		609452	Myopathy, myofibrillar			
ALG11	13	613666	Congenital disorder of glycosylation, type IIP	ENST00000521508.1:exon3:c.G1034A;p.C345Y	disease causing	
ARNT2	15	615926	Webb-Dattani syndrome	ENST00000533983.1:exon11:c.G946A;p.D316N	disease causing	
MRAP	21	607398	Glucocorticoid deficiency 2	ENST00000303645.5:exon3:c.C284T;p.P95L;MRAP	polymorphism	
bwsh21-002	MID1	X	300000	Opitz GBBB syndrome	ENST00000380785.1:exon3:c.C191T;p.T64I;MID1	disease causing
bwsh21-051	none					
bwsh21-078	NCF2	1	233710	Chronic granulomatous disease due to deficiency of NCF-2	ENST00000418089.1:exon4:c.G367A;p.V123I;NCF2	disease causing

MassARRAY の感度が低かったが、多くのインプリンティング領域が異常であった。

これらインプリンティング領域のメチル化異常は、様々なインプリンティング疾患を発症させる可能性がある。11番染色体 UPD による BWS、11番染色体 UPD による Angelmandsff 症候群、6番染色体 UPD による一過性新生児糖尿、20番染色体 UPD による偽性副甲状腺機能低下症、14番染色体 UPD による羊水過多、肋骨異常を伴う小さいベル型胸郭などが発症することが予想された。今回の対象について考察をすると、GWPUPD ではほぼ全例に腫瘍を合併することなど BWS 症状が特徴的であることから、多くのインプリンティング領域の異常のなかで、11p15.5 の KvDMR や H19DMR が key factor である可能性が示唆された。

我々は 36 例の UPD を解析し、29 例の Segmental UPD と 7 例の GWPUPD を見出した。これまで報告された GWPUPD14 例を加えて、Segmental UPD と表現型を比較した結果、腫瘍(p=0.0000)、心奇形(p= 0.0014)、精神運動発達遅滞 (p= 0.0017) が GWPUPD で合併しやすいことを明らかにした(1)。今回の研究より、全ゲノムにわたる UPD モザ

イクが、常染色体劣性遺伝子異常やメチル化異常を引き起こし、表現型に影響していることを、初めて複数例で証明した。

表 3. GWPUPD におけるインプリント DMR のマルチローカスメチル化解析

chromosome	1	2	4	6	7	10	11	13	14	15	19	20															
patient ID	sex	ARHI-CG1	ARHI-CG3	ARHI-CG2	ZAC	NAP1L5	ZDBF2	IGF2R	FAM80B	PEG10	KNDMR	H19DMR	H19DMR	IGF2	RBI	DLK1	MEG3-MEG3-	SNRNB	IG-DMR	PEG3	NNAT	LMB1L	GNAS1A	NESP	NESPAS	GNASL	MCTS2
BWS045	F																										
bwsh21-002	F																										
bwsh21-051	F																										

(灰色：低メチル化、黒：高メチル化)

### 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 5 件)

- (1) Ohtsuka Y, Higashimoto K, Oka T, Yatsuki H, Jozaki K, Maeda T, Kawahara K, Hamasaki Y, Matsuo M, Nishioka K, Joh K, Mukai T, Soejima H. Identification of consensus motifs associated with mitotic recombination and clinical characteristics in patients with paternal uniparental isodisomy of chromosome 11. Hum Mol Genet. 2016 Apr 1;25(7):1406-19
- (2) Ohtsuka Y, Higashimoto K, Sasaki K, Jozaki K, Yoshinaga H, Okamoto N, Takama Y, Kubota A, Nakayama M, Yatsuki H, Nishioka K, Joh K, Mukai T, Yoshiura KI, Soejima H. Autosomal recessive cystinuria caused by genome-wide paternal uniparental isodisomy in a patient with Beckwith-Wiedemann syndrome. Clin Genet. 2014 Aug 29.

- (3) Maeda T, Higashimoto K, Jozaki K, Yatsuki 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 to aberrant methylation in Beckwith-Wiedemann syndrome with epimutations. Genet Med. 2014 May 8.

- (4) Higashimoto K, Jozaki K, Kosho T, Matsubara K, Fuke 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 the OCT-binding site in the IGF2/H19-imprinting control region in a Beckwith-Wiedemann syndrome

patient. Clin Genet. 2013 Nov 8. doi: 10.1111/cge.12318. [Epub ahead of print] (5) Higashimoto K, Maeda T, Okada J, Ohtsuka Y, Sasaki K, Hirose A, Nomiyama M, Takayanagi T, Fukuzawa R, Yatsuki H, Koide K, Nishioka K, Joh K, Watanabe Y, Yoshiura K, Soejima H. 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 Nov;21(11):1316-9.

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 大塚泰史、岡岳彦、川原弘三、八木ひとみ、東元健、副島英伸. Beckwith-Wiedemann 症候群の原因となる片親性父性ダイソミーの切断点領域の解析. 日本人類遺伝学会 第 60 回大会 (東京). 2015.10.14-17

(2) 大塚泰史、佐々木健作、城崎幸介、東元健、岡本伸彦、高間 勇一、窪田 昭男、松本富美中山 雅弘、吉浦孝一郎、副島英伸. シスチン尿症を伴うゲノムワイド父性片親性ダイソミー症例の遺伝子解析. 第 58 回日本人類遺伝学会. 2013.11.20-23. 抄録集 p38(仙台)

(3) 大塚泰史、佐々木健作、城崎幸介、東元健、岡本伸彦、高間 勇一、窪田 昭男、松本富美中山 雅弘、吉浦孝一郎、副島英伸. シスチン尿症を伴うゲノムワイド父性片親性ダイソミー症例の遺伝子解析. 第 48 回日本小児腎臓病学会学術集会. 2013.06.28-29. 抄録集 p112.

〔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・医学部小児科助教  
研究者番号：50448479

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

副島 英伸 (Soejima Hidenobu)  
佐賀大学医学部分子遺伝学エビジェネテ  
イクス分野・教授  
研究者番号：30304885

吉浦 孝一郎 (Yoshiura Koh-ichiro)  
原爆後障害医療研究所・教授  
研究者番号：00304931