

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860898

研究課題名(和文) プラダーウィリー症候群責任領域のインプリンティング成立機構と新規発症原因の解明

研究課題名(英文) The role of imprinting control region in regulating imprinting status in 15q11-13 among patients with Prader-Willi syndrome

研究代表者

松原 圭子 (MATSUBARA, KEIKO)

独立行政法人国立成育医療研究センター・その他部局等・研究員

研究者番号：90542952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Prader-Willi症候群(PWS)患者の臨床データの分析および分子遺伝学的解析を行い、以下の点を明らかとした。分子遺伝学的解析には、PWSと鏡像的なメチル化異常を示すAngelman症候群(AS)患者サンプルも使用した。

1)視床下部・下垂体・副腎系の内分泌学的評価を目的としたインスリン負荷試験で、PWS患者では負荷後のコルチゾル分泌が遷延パターンを示した。2)エピ変異や疾患責任領域内の微細欠失を有するPWS・AS症例に対する網羅的メチル化解析により、疾患責任領域内の詳細なメチル化パターンを明らかとした。3)既知の発症原因の認められないPWS患者60名中1名でTemple症候群が認められた。

研究成果の概要(英文)：We performed analysis of endocrinological information and molecular genetic tests on patients with Prader-Willi syndrome (PWS). For molecular analyses, we also utilized samples taken from patients with Angelman syndrome (AS).

First, we performed insulin tolerant test to clarify the feature of hypothalamus, pituitary and adrenal gland axis of PWS patients. Although basal and peak values of ACTH and cortisol were within normal range, cortisol showed prolonged secretion pattern. Secondly, we performed genome wide methylation analysis to reveal DNA methylation pattern among the PWS patients with epimutation or atypical tiny deletion involving PWS-SRO (shortest region of overlapping) and AS-SRO in imprinting control region, and revealed detailed pattern of DNA methylation in 15q11-13 of these patients. Lastly, we detected one patient with Temple syndrome among patients without any of known causes resulting in PWS phenotype.

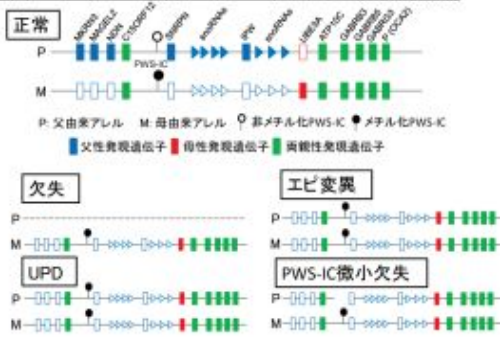
研究分野：臨床遺伝、先天異常症、小児内分泌、インプリンティング異常症

キーワード：Prader-Willi症候群 インプリンティング異常症 DNAメチル化 エピ変異

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトインプリンティング疾患である Prader-Willi 症候群 (PWS) は約 15,000 人に 1 人の頻度で発症し、特徴的な顔貌、神経・精神的、内分泌学的な症状を呈する先天疾患である。PWS 患者の約 75% で父性由来 15q11-q13 領域の欠失、約 25% で 15 番染色体母性片親性ダイソミー (UPD(15)mat)、2% 前後でインプリント調節領域 (ICR: imprint control region) の異常が認められ、ICR 異常には、エピ変異と PWS-IC の極微細欠失によるものが含まれる (図 1)。近年、snoRNA (SNORD116) の欠失により PWS 表現型を呈する症例も報告された。

図1 15q11-13領域のインプリンティング制御機構



PWS の内分泌学的な phenotype

-(epi)genotype correlation の解明

年間約 3% の PWS 患者が死亡し、その多くは原因不明の突然死である。PWS では視床下部障害を呈するため、潜在する Central Adrenal Insufficiency (CAI) と突然死が関連している可能性も想定されている。PWS 患者の副腎機能については、メチラポン試験により約 60% の患者で CAI が認められたという報告が存在する一方、インスリン負荷試験 (Insulin tolerance test: ITT) により全例が正常反応を示したという報告も存在し、PWS 患者の副腎機能の特徴は明らかでなく、その評価方法も定まっていない。

PWS 責任領域におけるインプリント成立機構の解明

15q11.2 領域に存在する ICR には親由来特異的なメチル化パターンが存在し、このメチル化の違いにより周辺のインプリンティング遺伝子の発現調節がなされている。このような親由来特異的なメチル化パターンを示す領域が DMR (Differentially methylated region) である。PWS においてエピ変異は、PWS-ICR の過剰メチル化により周辺のインプリンティング制御機構に異常が生じ、父性発現遺伝子の発現喪失と母性発現遺伝子の過剰発現を招き、PWS 表現型を呈する機序をさす。また、PWS と鏡像的なメチル化異常により、Angelman 症候群 (AS) が発症する。これら

の疾患におけるエピ変異発症機序は未だ解明されていない。

また、ICR には、PWS-SRO (shortest region of overlapping: 最少欠失領域) および AS-SRO が存在し、これらの欠失により PWS または AS が発症する。PWS-SRO は DMR である一方、AS-SRO は DMR ではなく、その機能は明らかではない。AS-SRO の欠失が母親由来染色体上に存在する場合 AS が発症するが、PWS-SRO と AS-SRO の欠失が母親由来染色体上に存在すると無症状であることから、PWS-SRO と AS-SRO が周辺のメチル化状態に階層的に影響を及ぼしていることが想定されているが、この詳細な機序はわかっていない。

原因不明 PWS 様症例の原因解明

PWS の鑑別診断として、Temple 症候群、染色体微細構造異常 (3p25.3-p26.2、Xq27.2-ter 重複、1p36、6q16.2、10q26 欠失など) が挙げられる。しかし、PWS 様臨床症状を示す症例の中には、これら既知の異常が見いだされない原因不明 PWS 症例が存在すると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、Prader-Willi 症候群 (PWS) 患者の分子遺伝学的解析を通じて、以下の点を解明する。

PWS 患者における内分泌学的な phenotype-(epi)genotype correlation を明らかにする。

エピ変異、PWS インプリント調節領域の微細欠失症例の解析から、PWS 責任領域のインプリント成立機構を明らかにする。

PWS 様表現型を有する発症原因不明症例を対象として、既知および新規インプリント領域や候補遺伝子解析、見出された異常の機能解析を行い、PWS 様表現型の原因を明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究では、以下の研究項目を設定し目標の達成を図った。

PWS 患者の発症原因解析および Phenotype-(epi)genotype correlation 検討  
全症例について、メチル化解析・FISH・マイクロサテライト解析・cGH 解析により発症原因を同定し、臨床症状、内分泌負荷試験などの臨床情報の収集、分析を行う。

PWS 責任領域におけるインプリント成立機構の解明

エピ変異、PWS インプリント調節領域の微

細欠失症例に対し、illumina 社 Human Methylation 450 による網羅的なメチル化解析を行う。これにより、PWS 責任領域内のみならず、他の遺伝子プロモータ、コーディング領域および遺伝子間領域の各 CpG 部位におけるメチル化状態の定量的な評価が可能である。

さらに、疾患責任領域近傍に存在する遺伝子や非コーディング領域の塩基置換や微小欠失・重複により、cis の機構を介して PWS-IC のエピ変異が惹起されている可能性を検討するため、エピ変異症例に対し、次世代シーケンサーによる PWS 責任領域 (15q11-13 領域) のターゲットリシーケンスを実施する。同様に、メチル化パターンの確立や維持に必要な遺伝子 (メチル化 DNA 結合蛋白質遺伝子群など) についても、次世代シーケンサーによる変異解析を行う。

#### PWS 様症状を呈する原因不明症例の発症原因解析

Agilent 社 Human cGH array によるコピー数解析、既知インプリンティング 8 疾患発症に関わる 9 領域 (*PLAGL1*, *PEG1*, *PEG10*, *H19*, *Kv*, *IG*, *MEG3*, *SNRPN*, *GNAS* A/B-DMR) における pyrosequencing 法によるメチル化解析を行う。

## 4. 研究成果

### PWS の内分泌学的な phenotype -(epi)genotype correlation の解明

本研究では、PWS 患者 39 症例に対する ITT 結果から、PWS における副腎機能の特徴を明らかとした。

PWS39 名 (M:F= 25:14、年齢中央値 3.0 歳、範囲 7 カ月 - 59 才) を対象とし ITT を実施、負荷前、負荷後 30 分、60 分、90 分、120 分の血糖、ACTH および Cortisol 値を測定した。なお、血糖の最低値が 1/2 以下または 50 mg/dl 以下であれば有意な低下とみなし、ACTH 頂値が 50  $\mu$ g/dl 以上、Cortisol 頂値が 20 pg/ml 以上を示したものを正常反応とした。

その結果、基礎値の中央値(範囲)は、ACTH 12.6 pg/ml (2-507)、Cortisol 17.3  $\mu$ g/dl (5.7-78.9) であり、頂値の中央値(範囲)は、ACTH 187.5 pg/ml (9.8-884)、Cortisol 38  $\mu$ g/dl (23.7-90.9) であった。ACTH では負荷後 30 分で頂値を示した患者が最も頻度が高かったが (39 名中 14 名)、その後に頂値を示す患者の割合も高かった (60 分後 8 名、90 分後 9 名、120 分後 8 名)。なお、5 例で ACTH 頂値が 50  $\mu$ g/dl 以下であったが、いずれの症例も Cortisol 頂値は 20 pg/ml 以上であった。全例で Cortisol 頂値は 20 pg/ml 以上であったが、39 名中 26 名が負荷後 120 分で頂値を示し、

遷延反応を示した。

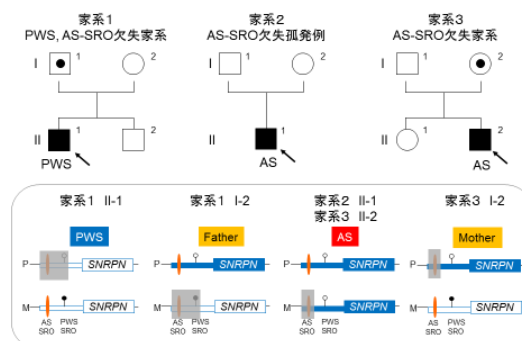
本研究では、PWS 患者を対象とした ITT において、全症例で Cortisol 頂値は正常範囲内であったが Cortisol の遷延反応が認められた。この成績は、本症患者において、ストレス下における Cortisol 分泌制御の異常が存在することを示唆する。本症患者の突然死の発症には、このような潜在性 HPA axis 機能不全が関与している可能性がある。

### PWS 責任領域におけるインプリント成立機構の解明

本研究では、PWS におけるエピ変異発症機序を解明することを目的として、エピ変異や非典型的欠失を有する PWS 症例の分子遺伝学的解析を行い、以下のような成果を得た。

i) PWS 症候群患者 241 名を対象とした分子遺伝学的解析により、エピ変異症例を 4 症例同定した。また、責任領域内のメチル化可変領域 (DMR) のメチル化状態が PWS と鏡像関係にある Angelman 症候群 (AS) 患者群においても、エピ変異 5 症例を同定した。また、PWS-SRO および AS-SRO を欠失した症例、AS-SRO を欠失した症例を同定した(図 2)。

図 2 ICR内欠失5症例



ii) 両親祖父母の検体入手が可能であったエピ変異 PWS 3 家系に対しマイクロサテライト解析により、全患者で父方祖母由来染色体にエピ変異が生じていた。この結果から、エピ変異 PWS 患者では、患者父親の配偶子形成過程において本来消去されるべき父方祖母由来染色体上のメチル化が消去されなかった結果、子でエピ変異が発症した可能性が推測される。

iii) エピ変異 (PWS 4 例、AS 5 例) に対し、網羅的メチル化解析を施行し、全ゲノム中 80 か所の DMR のメチル化状態を評価した。疾患責任領域内の DMR においては、PWS 症例で高メチル化、AS 症例で低メチル化を示していた。また、責任領域以外でメチル化異常を示した DMR は同定されず、エピ変異症例におけるメチル化異常は 15 番染色体上の疾患責任領域内に限局していた。この結果から、

疾患責任領域内 DMR のメチル化確立維持には、他染色体上の DMR におけるメチル化確立維持機構と独立したメカニズムが存在する可能性が示唆された。

iv) エピ変異症例に対し、次世代シーケンサーにより、DNA メチル化異常の原因となりえる遺伝子 (*KHDC3L*, *ZFP57*, *NLRP2*, *NLRP7*, *KAP1*) の変異解析を行ったが、変異は同定されなかった。また、エピ変異症例に共通する疾患責任領域近傍に存在する遺伝子や非コーディング領域の塩基置換や微小欠失・重複は同定されなかった。

v) PWS-ICR 内欠失を有する 3 家系 5 症例に対し、illumina 社 Human Methylation 450 による網羅的なメチル化解析を行った。その結果、15q11-13 領域内 13 か所の DMR におけるメチル化状態を検討した結果、既知の DMR では、PWS 患者で高メチル化、AS 患者で低メチル化、欠失保因者である父親では、欠失範囲でのみ欠失保因者の母を認めた。欠失保因者である母親では、いずれの領域においてもメチル化異常は認められなかった。

これらの結果から、母親由来染色体において AS-SRO は PWS-SRO のメチル化確立に必須であること、非メチル化 PWS-SRO が 15 番染色体に父親型メチル化パターンを確立させることが示された。

PWS 様症状を呈する原因不明症例の発症原因解析

研究期間内で、既知の発症原因が認められない原因不明 PWS 様臨床症状を有する 60 症例に対し、アレイ CGH による染色体微細構造異常の有無、パイロシーケンスによる他のインプリンティング異常症の解析を行った。その結果、Temple 症候群症例を 1 例同定した。PWS 表現型の原因となりえる新規の異常は見いだされなかった。

## 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 8 件)

1. Matsubara K, Kataoka N, Ogita S, Sano S, Ogata T, Fukami M, Katsumata N. Uniparental disomy of chromosome 8 leading to homozygosity of a CYP11B1 mutation in a patient with congenital adrenal hyperplasia: Implication for a rare etiology of an autosomal recessive disorder. *Endocr J*, 2014; 61(6):629-33
2. Sano S, Iwata H, Matsubara K, Fukami M, Kagami M, Ogata T. Growth hormone deficiency in monozygotic twins with autosomal dominant

pseudohypoparathyroidism type Ib. *Endocr J*. 2015 Apr 3. [Epub ahead of print]

3. 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 Mar 25. doi: 10.1111/dme.12758.
4. 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*. 2014 Nov 5. doi: 10.1038/ejhg.2014.234.
5. Maeda T, Higashimoto K, Matsubara K ( 13 番目, 他 9 名 ). 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;doi: 10.1038/gim.2014.4.6.
6. Higashimoto K, Jozaki K, Kosho T, Matsubara K ( 4 番目, 他 10 名 ). 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;doi: 10.1111/cge.12318
7. Ayabe T, Matsubara K ( 2 番目, 他 5 名 ). Birth seasonality in Prader-Willi syndrome resulting from chromosome 15 microdeletion. 2013, *Am J Med Genet A*;161A(6):1495-7 )
8. Fuke T, Mizuno S, Nagai T, Matsubara K ( 15 番目, 他 14 名 ). Molecular and clinical studies in 138 Japanese patients with Silver-Russell syndrome. 2013, *PLoS One*;8(3):e60105

[学会発表](計 13 件)

1. 第 116 回小児科学会 ( 広島 ) 2013. 4.19 シンポジウム「生殖補助医療と片親性ダイソミー発症リスク」松原圭子、福家智子、鏡雅代、深見真紀、永井敏郎、緒方勤
2. 第 116 回小児科学会 ( 広島 ) 2013. 4.19 「Prader-Willi 症候群患者における副腎機能」松原圭子、白石昌久、村上信行、土屋貴義、大戸祐二、深見真紀、永井敏郎
3. International Prader Willi syndrome Organization (Cambridge) 2013.7.17-21 「Assessment of adrenal function in patients

- with Prader-Willi syndrome」  
**Keiko Matsubara**, Masahisa Shiraiishi, Nobuyuki Murakami, Takayoshi Tsuchiya, Yuji Oto, Masayo Kagami, Maki Fukami, Tsutomu Ogata.
- 4 . European Society Pediatric Endocrinology (Milan) 2013.9.19-22  
「Assessment of adrenal function in patients with Prader-Willi syndrome」  
**Keiko Matsubara**, Masahisa Shiraiishi, Nobuyuki Murakami, Takayoshi Tsuchiya, Yuji Oto, Masayo Kagami, Maki Fukami, Tsutomu Ogata.
- 5 . 第 47 回小児内分泌学会 (東京) 2013.10.10-12.  
「ヒトインプリンティング異常症 498 症例に対する包括的解析」**松原圭子**、福家智子、佐野伸一郎、中林一彦、秦健一郎、緒方勤、深見真紀、鏡雅代
- 6 . 第 57 回日本人類遺伝学会 (仙台) 2013.11.21-23.  
「ヒトインプリンティング異常症 498 症例に対する包括的解析」  
**松原圭子**、福家智子、佐野伸一郎、中林一彦、秦健一郎、緒方勤、深見真紀、鏡雅代
- 7 . 第 37 回日本小児遺伝学会 (名古屋) 2014.4.10.  
「15 番染色体インプリンティング調節領域欠失症例の網羅的メチル化解析」  
**松原圭子**、伊藤順庸、中林一彦、佐野伸一郎、中村明枝、秦健一郎、緒方勤、深見真紀、齋藤伸治、鏡雅代
- 8 . 2014 Pediatric Academic Societies annual meeting. (Vancouver) 2014.5.3-6.  
「Comprehensive analysis for 567 patients with clinical features of human imprinting disorders」  
**Keiko Matsubara**, Tomoko Fuke, Shinichiro Sano, Kazuhiko Nakabayashi, Kenichiro Hata, Tsutomu Ogata, Maki Fukami, Masayo Kagami
- 9 . 第 8 回エピジェネティクス研究会 (東京) 2014.5.25-27  
「15 番染色体インプリンティング調節領域欠失症例の網羅的メチル化解析」  
**松原圭子**、伊藤順庸、中林一彦、佐野伸一郎、中村明枝、秦健一郎、緒方勤、深見真紀、齋藤伸治、鏡雅代
- 10 . 第 48 回小児内分泌学会 (浜松) 2014.9.25-27  
「PWS/AS 責任領域の非典型的な欠失を有する症例に対する網羅的メチル解析」  
**松原圭子**、伊藤順庸、中林一彦、佐野伸一郎、中村明枝、秦健一郎、緒方勤、深見真紀、齋藤伸治、鏡雅代
- 11 . 第 48 回小児内分泌学会 (浜松) 2014.9.25-27

- 「Uniparental disomy of chromosome 8 leading to homozygosity of a CYP11B1 mutation in a patient with congenital adrenal hyperplasia」**Keiko Matsubara**, Naoki Kataoka, Satoko Ogita, Shinichiro Sano, Tsutomu Ogata, Maki Fukami, Noriyuki Katsumata
- 12 . 第 59 回 日本未熟児新生児学会 (愛媛) 2014.11.10-12.  
「新生児・乳児期に成長障害および筋緊張低下を示すインプリンティング異常症」**松原圭子**、水野誠司、鏡雅代
- 13 . 第 59 回日本人類遺伝学会 (東京) 2014.11.19-22.  
「PWS/AS 責任領域の非典型的な欠失を有する症例に対する網羅的メチル解析」**松原圭子**、伊藤順庸、中林一彦、佐野伸一郎、中村明枝、秦健一郎、緒方勤、深見真紀、齋藤伸治、鏡雅代

〔図書〕(計 1 件)

- 1 . 緒方勤, **松原圭子**.  
ART における先天異常と遺伝学的問題点, 臨床婦人科産科, 医学書院, 2014 68(1):90-97.

〔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: なし

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・研究員  
研究者番号: 90542952

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号: