

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業  
(英語) Practical Research Project for Rare / Intractable Diseases

研究開発課題名： (日本語) 先天性インプリント異常症の診断と生殖補助医療の安全性評価  
(英語) Molecular diagnosis of congenital imprinting disorders and associated with assisted reproductive technology (ART)

研究開発担当者 (日本語) 東北大学大学院医学系研究科・教授・有馬隆博  
所属 役職 氏名： (英語) Tohoku University School of Medicine・Professor・Takahiro Arima

実施期間： 平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

## II. 成果の概要（総括研究報告）

### 和文

**目的：**本研究では、1) 療育センターや重症心身障害者施設含む多施設の産科・小児科医の協力下に、全国規模の疫学調査を行い、インプリント病の発生頻度、病態、治療実態の把握を行う。さらに、試料の収集と遺伝子診断を行い、発症機序と影響を受ける遺伝子の解析を行う。最終年度は、2) ART 治療法やメチル化異常との関連について実態を把握し、リスク要因について比較検討する。

### 成果：

#### (1) 疫学調査の実施率・回答率

調査対象機関 2777 機関のうち、1957 機関から有効回答あり（有効回答率 70.5%）。報告患者総数は 2056 人。その内訳は、BWS が 224 人、AS が 437 人、PWS が 1169 人、SRS が 184 人、TNDM が 42 人登録された。

#### (2) 不妊治療との関連性

ART による出生は、BWS が 2.2 倍、SRS が 3.7 倍発症頻度が高いことが判明した。また、PWS も増加傾向にあった。

#### (3) メチル化異常の割合

BWS のメチル化異常の割合は 17.1%、SRS のメチル化異常の割合は 25.7%と高率であった。

#### (4) 臨床症状の特徴

(A) BWS：巨舌症が最も多く、以下耳介の溝、ギョロ眼であった。胸・腹部・四肢の異常では、半身肥大の頻度が高いことが特徴的であった。

(B) AS：精神発達遅延は必発で、色白や難治性てんかんの頻度も特徴的である。発語障害もほぼ必発で、操り人形様歩行、笑い発作、下顎突出は半数以上に認められた。

(C) PWS：筋緊張低下、精神発達遅延はほぼ必発で、色白、低身長も半数以上で認められた。また、乳児期の哺乳不良、アーモンド様眼瞼が 7 割以上認められた。

(D) SRS：低身長と成長障害はほぼ必発で、身体非対称もかなりの頻度でみられた。精神発達遅延が比較的少ない点も特徴であった。

#### (5) 小児癌との関連性

小児癌は、BWS で 10～17%の頻度で認められた。また、AS に 2 例、PWS、SRS に 1 例認められた。

#### (6) 診断方法と遺伝子検査の希望

各疾患の臨床症状に加え、染色体および DNA 検査全てを行っている割合は、3.1%～12%認められた。染色体および DNA 検査を行っていない割合は 12.8%～60%で、特に BWS と SRS、TNDM では高率であった。また、遺伝子診断の希望者は医師側で 6.7%～37.1%にみられた。

## 英文

**Aim:** To address these questions in this study, we engaged in a nationwide epidemiological study of the Japanese population to determine the frequency of four imprinting disorders after natural conception and after ART. We then analyzed the DNA methylation status of 22 gDMRs in imprinting disorders patients conceived by the two routes.

### Methods:

#### (1) Nationwide investigation of imprinting disorders

The protocol was established by the Research Committee on the Epidemiology of Intractable Diseases. The protocol consisted of a two-stage postal survey. The first-stage survey was used to estimate the number of individuals with any of the four imprinting diseases: BWS, SRS, PWS and AS. The second-stage survey was used to identify the clinico-epidemiological features of these syndromes. In the first-stage survey, the pediatric departments of all hospitals were identified based on a listing of hospitals.

The second questionnaires were forwarded to the departments that had reported patients with the imprinting disorders on the first questionnaires. Detailed clinical information for the patients with these imprinting disorders was collected, including the age, gender, growth and development pattern, the methods of the diagnosis, the presence of infertility treatment and the methods of ART where applicable.

#### (2) Bisulfite-treatment (BS) PCR including the SNPs

We first searched for single nucleotide polymorphisms (SNPs) within 22 previously reported human gDMRs. BS-PCR products were purified and cloned into the pGEM-T vector (Promega, Madison, WI, USA). Individual clones were sequenced using M13 reverse primer and an automated ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer. On average, 20 clones were sequenced for each sample.

### Results:

(1) Frequency of four imprinting disorders of a total of 2777 departments contacted, 1957 responded to the first-stage survey questionnaire (70.5%). The total number of cases was calculated using a second-stage survey ensuring the exclusion of duplicates. We ascertained the frequency of ART procedures in the cases of BWS, AS, PWS and SRS via the questionnaire sent to doctors. The numbers of patients with PWS and AS we identified was low; however, the frequency of ART in these cases was not dissimilar to that expected, based on the population rate of ART use, with 4/227 (1.8%) cases of AS and 24/520 (4.6%) cases of PWS born after ART. In contrast, for BWS and SRS the frequency of ART was nearly 3-fold higher than anticipated with 7/117(6.0%) BWS and 7/70 (10.0%) SRS patients born after ART.

(2) Using polymorphic bisulfite-PCR sequencing, we examined the methylation status of gDMRs within these samples at the imprinted regions implicated in these syndromes. For BWS we assayed *H19* and *KCNQ1OT1 (LIT1)* gDMRs, for SRS we assayed the *H19* gDMR and for PWS and AS we assayed the *SNRPN* gDMR. For all patients (conceived naturally and with ART), the frequencies of DNA methylation errors (epimutations) corrected were 1/3(33.3%) for BWS, 5/12 (41.7%) for SRS.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 4件、国際誌 0件）

1. 有馬隆博、樋浦仁、岡江寛明、佐藤晶子、ARTとエピジェネシス、生殖補助医療(ART)「胚培養の理論と実際」、近代出版、2017, 293-97.
2. 濱田裕貴、高橋聡太、服部裕充、有馬隆博、生殖医療の安全性評価、先端医療シリーズ48「臨床医のための最新産科婦人科」先端医療技術研究所, 2017.
3. 有馬隆博、インプリンティング疾患の解析と診断、産科と婦人科、診断と治療社 2016, 84(1).
4. 有馬隆博、宮内尚子、北村茜、樋浦仁、岡江寛明、千葉初音、生殖補助医療とインプリンティング異常の予防、Pharma Medica、メディカルレビュー社 2016, 34(4)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 有馬隆博、体外受精児の追跡調査に壁、信濃毎日新聞、2016/12/11.
2. 有馬隆博、体外受精の追跡調査に課題、中国新聞、2016/12/11.

(4) 特許出願

なし