

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) 遺伝子診断に基づいたインプリンティング異常症 3 疾患の臨床像および治療法の評価に関する研究
(英語) Study on evaluation of clinical features and treatment of three imprinting disorders
- 研究開発担当者 (日本語) 鏡 雅代
所属 役職 氏名 : (英語) Masayo Kagami, Chief of Clinical Endocrine Research Division,
Department of Molecular Endocrinology, National Research Institute for Child Health and Development
- 実施期間 : 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) 患者集積、患者臨床情報の集積、臨床情報の解析および診断基準・治療指針の作成もしくは改定
開発課題名 : (英語) Accumulation of patients and patients' clinical information, analysis of the clinical information, and creation or revision of diagnostic criteria and/or treatment guideline
- 研究開発分担者 (日本語) 緒方 勤
所属 役職 氏名 : (英語) Tsutomu Ogata, Professor of Department of Pediatrics, Hamamatsu University School of Medicine
- 分担研究 (日本語) 患者集積、患者臨床情報の集積、臨床情報の解析および診断基準・治療指針の作成もしくは改定
開発課題名 : (英語) Accumulation of patients and patients' clinical information, analysis of the clinical information, and creation or revision of diagnostic criteria and/or treatment guideline
- 研究開発分担者 (日本語) 小崎 健次郎
所属 役職 氏名 : (英語) Kenjiro Kosaki, Professor of Center for Medical Genetics, Keio University School of Medicine

II. 成果の概要（総括研究報告）

和文

本研究の目的はインプリンティング異常症 (ID)である Silver-Russell 症候群 (SRS), Temple 症候群 (TS14), Kagami-Ogata 症候群 (KOS14) の遺伝型に基づく詳細な診療ガイドラインにつながるエビデンスをまとめることである。先行研究から ID 間での臨床像のオーバーラップや非典型的な症例の同定が可能な IDs 包括的遺伝子診断システムを開発し、SRS 臨床診断基準を満たす症例のなかに TS14 を同定し、SRS の臨床像の多様性と遺伝子診断の重要性を認め、本研究を着想した。研究方法は、患者血液由来 DNA を用いてパイロシーケンス法による 8 インプリンティング領域責任 DMR に対する包括的メチル化解析にてインプリンティング異常症を同定し、メチル化異常例に対しては、異常に一致する ID に対する遺伝学的原因検索のための解析（マイクロサテライトマーカー解析, aCGH, MLPA）を行い ID それぞれの遺伝学的原因を明らかとする。臨床像、治療法の臨床情報収集は主治医に対する質問紙法で行う。研究は順調に進展している。検体集積については、KOS 40 名、TS14 35 名、SRS は 300 名以上遺伝子解析を行い、119 名で遺伝学的原因を同定した。KOS については、診断および治療の指針を提案した総説は本年度に発表した (Ogata T and Kagami M, *J Hum Genet.* 2016)。TS14 に関しては、我々が同定した TS14 症例の詳細な臨床像データの解析から、TS14 の臨床診断基準および治療の注意点についてまとめた (Kagami et al. *Genetics in Medicine* in press)。SRS については SRS の新しい国際的な合意に基づく診断および治療のガイドラインの作成に鏡と緒方が参加し、その成果は先日発表された (Wakeling EL, et al. *Nat Rev Endocrinol.* 2016)。また、SRS の臨床診断基準である Netchine-Harbison Clinical scoring system (N-H CSS)を満たすが、SRS の既知の遺伝学的原因である *H19*-DMR の低メチル化および 7 番染色体母親性ダイソミーを否定された 82 名に対する aCGH 法を用いたコピー数異常検索において、5 名の染色体構造異常を同定し、SRS が heterogeneous な疾患でありことを示した。それぞれの構造異常は、4p-欠失症候群、18 トリソミーモザイク、19q13.11 欠失症候群、Williams 症候群 (2 名) であった。これらの 5 名は全例に中等度から重度の発達遅延を認め、高頻度に心疾患の合併を認めた (Inoue et al. *Clinical Epigenetics*, 2017)。

英文

The purpose of this study is the accumulation of the evidence for making or revision of the guidelines for three imprinting disorders (IDs), Silver-Russell syndrome (SRS), Temple syndrome (TS14), and Kagami-Ogata syndrome, (KOS), whose diagnosis are based on genetic testing. Recently, overlapping of the clinical features among IDs has been reported. Thus, in the preceding study, we developed the system for the comprehensive genetic testing of IDs. Using this system, we identified patients with TS14 who satisfied SRS clinical diagnostic criteria, and noticed the importance of the comprehensive genetic testing of IDs. In this comprehensive genetic testing, we first perform methylation analysis using pyrosequencing for differential methylated region (DMR) related to eight known imprinting disorders. If we detected abnormal methylation levels in the patients suspected with ID, we performed structural analysis using microsatellite analysis with parental samples, microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH) and MS-MLPA. We subsequently obtained clinical information of these patients,

diagnosed by genetic testing, from their attending physicians using a questionnaire. This year, we performed genetic testing in 40 patients with KOS-like phenotypes, 135 patients with TS14-like phenotypes, and over 300 patients with SRS-like phenotype, and we genetically diagnosed 119 patients with IDs. Using the data of clinical features in the patients diagnosed with KOS, we made the guideline for clinical diagnosis and treatment of KOS (Kagami et al, *Eur J Hum Genet.* 2015, Ogata T and Kagami M, *J Hum Genet.* 2016). In addition, we detected 32 patients genetically diagnosed with TS14, and collected their clinical information. We suggested the guideline for clinical diagnosis of TS14 (Kagami et al. *Genetics in Medicine* in press). In 2015, Kagami and Ogata attended the meeting for expert consensus statement on the diagnosis and management of Silver-Russell syndrome. In this meeting, we discussed about the diagnosis and management of SRS. The outcome of this meeting was published this year (Wakeling EL, et al. *Nat Rev Endocrinol.* 2016) . Furthermore, because patients with SRS-like phenotypes has genetic heterogeneity, to clarify the frequency and clinical features of patients with SRS phenotype caused by pathogenic copy number variants (PCNVs), we performed the copy number analysis for 82 patients satisfying Netchine-Harbison Clinical scoring system (N-H CSS). These 82 patients did not have known SRS etiology such as hypomethylation of the *H19*-DMR or maternal uniparental disomy chromosome 7. The genetic syndrome which was detected in five patients satisfying NH-CSS were 4p- deletion syndrome, 19q13.11 deletion syndrome, and Williams syndrome. Congenital heart diseases (CHDs) were identified in two patients, and moderate to severe global developmental delay was observed in four patients. These results suggest patients with PCNVs, who have a phenotype resembling SRS, show a high tendency towards CHDs and/or apparent developmental delay (Inoue et al. *Clinical Epigenetics* in press).

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 1 件、国際誌 15 件)

1. Inoue T, Nakamura A, Fuke T, Yamazawa K, Sano S, Matsubara K, Mizuno S, Matsukura Y, Harashima C, Hasegawa T, Nakajima H, Tsumura K, Kizaki Z, Oka A, Ogata T, Fukami M, Kagami M. Genetic heterogeneity of patients with suspected Silver-Russell syndrome: genome-wide copy number analysis in 82 patients without imprinting defects. *Clin Epigenetics.* 2017 9:52.
2. Kagami M, Nagasaki K, Kosaki R, Horikawa R, Naiki Y, Saitoh S, Tajima T, Yorifuji T, Numakura C, Mizuno S, MD, PhD, Nakamura A, Matsubara K, Fukami M, Ogata T. Temple syndrome: comprehensive molecular and clinical findings in 32 Japanese patients. *Genet Med.* (accepted)
3. Goto M, Yamamoto Y, Ishii M, Nakamura A, Sano S, Kagami M, Fukami M, Saito R, Araki S, Kubo K, Kawagoe R, Kawada Y, Kusuhara K. Sporadic pseudohypoparathyroidism type-1b with asymptomatic hypocalcemia. *Pediatr Int.* 2016. 58(11):1229–1231.

4. Kagami M, Matsubara K, Nakabayashi K, Nakamura A, Sano S, Okamura K, Hata K, Fukami M, Ogata T. Genome-wide multilocus imprinting disturbance analysis in Temple syndrome and Kagami-Ogata syndrome. *Genet Med*. Sep 15. doi: 10.1038/gim.2016.123. [Epub ahead of print]
5. Wakeling EL, Brioude F, Lokulo-Sodipe O, O'Connell SM, Salem J, Bliet J, Canton AP, Chrzanowska KH, Davies JH, Dias RP, Dubern B, Elbracht M, Giabicani E, Grimberg A, Grønskov K, Hokken-Koelega AC, Jorge AA, Kagami M, Linglart A, Maghnie M, Mohnike K, Monk D, Moore GE, Murray PG, Ogata T, Petit IO, Russo S, Said E, Toumba M, Tümer Z, Binder G, Eggermann T, Harbison MD, Temple IK, Mackay DJ, Netchine I. Diagnosis and management of Silver-Russell syndrome: First international consensus statement. *Nat Rev Endocrinol*. 2017. 13(2):105–124.
6. Okuno M, Yorifuji T, Kagami M, Ayabe T, Urakami T, Kawamura T, Kikuchi N, Yokota I, Kikuchi T, Amemiya S, Suzuki J, Ogata T, Sugihara S, Fukami M; Japanese Study Group of Insulin Therapy for Childhood and Adolescent Diabetes (JSGIT). Chromosome 6q24 methylation defects are uncommon in childhood-onset non-autoimmune diabetes mellitus patients born appropriate- or large-for-gestational age. *Clin Pediatr Endocrinol*. 2016. 25(3):99–102.
7. Goto M, Kagami M, Nishimura G, Yamagata T. A patient with Temple syndrome satisfying the clinical diagnostic criteria of Silver-Russell syndrome. *Am J Med Genet A*. 2016.170(9):2483-2485.
8. Nakamura A, Hamaguchi E, Horikawa R, Nishimura Y, Matsubara K, Sano S, Nagasaki K, Matsubara Y, Umezawa A, Tajima T, Ogata T, Kagami M, Okamura K, Fukami M. Complex Genomic Rearrangement within the GNAS Region Associated with Familial Pseudohypoparathyroidism Type 1b. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016.101(7):2623–2627.
9. Luk HM, Ivan Lo FM, Sano S, Matsubara K, Nakamura A, Ogata T, Kagami M. Silver-Russell syndrome in a patient with somatic mosaicism for upd(11)mat identified by buccal cell analysis. *Am J Med Genet A*. 2016. 170(7):1938–1941.
10. Sano S, Matsubara K, Nagasaki K, Kikuchi T, Nakabayashi K, Hata K, Fukami M, Kagami M, Ogata T. Beckwith-Wiedemann syndrome and pseudohypoparathyroidism type Ib in a patient with multilocus imprinting disturbance: a female-dominant phenomenon? *J Hum Genet*. 2016. 61(8):765–769.
11. Fujisawa Y, Sakaguchi K, Ono H, Yamaguchi R, Kato F, Kagami M, Fukami M, Ogata T. Combined steroidogenic characters of fetal adrenal and Leydig cells in childhood adrenocortical carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016. 159:86–93.
12. Ogata T, Kagami M. Kagami-Ogata syndrome: a clinically recognizable upd(14)pat and related disorder affecting the chromosome 14q32.2 imprinted region. *J Hum Genet*. 2016. 61(2):87–94.
13. Eggermann T, Brioude F, Russo S, Lombardi MP, Bliet J, Maher ER, Larizza L, Prawitt D, Netchine I, Gonzales M, Grønskov K, Tümer Z, Monk D, Mannens M, Chrzanowska K, Walasek MK, Begemann M, Soellner L, Eggermann K, Tenorio J, Nevado J, Moore GE, Mackay DJ, Temple K, Gillessen-Kaesbach G, Ogata T, Weksberg R, Algar E, Lapunzina P. Prenatal molecular testing for Beckwith-Wiedemann and Silver-Russell syndromes: a challenge for molecular analysis and genetic counseling. *Eur J Hum Genet*. 2016. 24(6):784–793.

14. Okuno H, Nakabayashi K, Abe K, Ando T, Sanosaka T, Kohyama J, Akamatsu W, Ohyama M, Takahashi T, Kosaki K, Okano H. Changeability of the fully methylated status of the 15q11.2 region in induced pluripotent stem cells derived from a patient with Prader-Willi syndrome. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2016 [Epub ahead of print].
15. Sato C, Ogawa T, Tsuge R, Shiga M, Tsuji M, Baba Y, Kosaki K, Moriyama K. Systemic and maxillofacial characteristics of 11 Japanese children with Russell-Silver syndrome. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2016. 56(5):217–252.
16. 鏡 雅代 Kagami-Ogata 症候群 小児科診療 2016. 81(12):1771-1781.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

招待講演

1. 緒方勤: ARTと先天異常症発症の関連について. 第12回日本生殖再生医学会特別講演. 2017.3.19, 東京.
2. 鏡 雅代: Kagami-Ogata 症候群: 疾患概念の確立とその病態. 第39回日本小児遺伝学会学術集会. 2016. 12.9. 東京.
3. 緒方勤: ヒトインプリンティング疾患発症機序. 内分泌最先端セミナー～内分泌学の現在と未来を語る. 2016.11.5, 静岡.
4. 鏡雅代: シルバーラッセル症候群 診療ガイドライン. 第50回日本小児内分泌学会学術集会・第9回アジア太平洋小児内分泌学会プレカンファレンスシンポジウム, 2016年11月16日, 東京
5. 鏡雅代: 胎児期発育異常を示すインプリンティング異常症, 新生児科指導医養成事業 第5回教育セミナー, 教育講演, 2016.5.2, 仙台.
6. Masayo Kagami. Kagami-Ogata syndrome: Clinically recognizable imprinting disorder caused by upd(14)pat and related condition, 2016 ICHG (The 13th International Congress of Human Genetics), シンポジウム, 2016.4.6. 京都.

一般口演、ポスター

ICHG2016 The 13th International Congress of Human Genetics	3-7 April 2016 (Kyoto)	Kazuki Yamazawa, Keiko Matsubara, <u>Masayo Kagami</u> , Kazuhiko Nakabayashi, Kenichiro Hata, Maki Fukami, <u>Tsutomu Ogata</u>	Exploration of hydroxymethylation in Kagami-Ogata syndrome caused by hypermethylation of imprinting control regions	ポスター
		Shinichiro Sano, Keiko Matsubara, Keisuke Nagasaki, Akie Nakamura, Kazuhiro Nakabayashi, Kenichiro Hata, Maki Fukami, <u>Tsutomu Ogata, Masayo Kagami</u>	Multilocus methylation defects in a patient presenting with both clinical phenotype of pseudohypoparathyroidism type Ib and Beckwith-Wiedemann syndrome	ポスター
		Keiko Matsubara, Nobuyuki Murakami, Maki Fukami, <u>Masayo Kagami</u> , Toshiro Nagai, <u>Tsutomu Ogata</u>	Risk assessment of medically assisted reproduction and advanced maternal ages in the development of Prader-Willi syndrome due to UPD(15)mat	口演
第 89 回日本 内分泌学会 学術総会	2016(平成 28 年)4 月 21 日～23 日 京都市(京 都)	佐野伸一朗、長崎 啓祐、中 村 明枝、松原 圭子、深見 真紀、 <u>緒方 勤、鏡 雅代</u>	偽性副甲状腺機能低下症における分子 遺伝学的分類に基づいた TSH 抵抗性に 関する臨床像の 検討	口演

第50回日本小児内分泌学会学術集会・第9回アジア太平洋小児内分泌学会	2016(平成28年)11月16日-20日 千代田(東京)	<u>Masayo Kagami</u> , Keisuke Nagasaki, Rika Kosaki, Horikawa Reiko, Yasuhiro Naiki, Shinji Saitoh, Toshihiro Tajima, Akie Nakamura, Keiko Matsubara, Maki Fukami, <u>Tsutomu Ogata</u>	Comprehensive clinical studies in 30 patients molecularly diagnosed with Temple syndrome	口演
		Akie Nakamura, Takanobu Inoue, Keiko Matsubara, Shinichiro Sano, Yasuhiro Naiki, Shuichi Yatsuga, Junko Nishioka, Keisuke Nagasaki, Koji Muroya, Sachiko Kitanaka, Toshihiro Tajima, Reiko Horikawa, <u>Tsutomu Ogata</u> , Maki Fukami, <u>Masayo Kagami</u>	DNA methylation defects in short children born small for gestational age	Kaichi-Kida Award 候補演題 口演
		Takanobu Inoue, Akie, Nakamura, Tomoko Fuke, Kazuki, Yamazawa Shinichiro Sano, Keiko Matsubara, Akira Oka, Maki Fukami, <u>Masayo Kagami</u>	Genome-wide copy-number analysis of fifty Silver-Russell syndrome patients without known etiology	若手優秀演題賞候補 口演
第39回日本小児遺伝学会学術集会	2016(平成28年)12月9日-10日 新宿(東京)	Shinichiro Sano, Keiko Matsubara, Keisuke Nagasaki, Toru Kikuchi, Kazuhiko Nakabayashi, Kenichiro Hata, Maki Fukami, <u>Masayo Kagami</u> , <u>Tsutomu Ogata</u>	Beckwith-Wiedemann syndrome and pseudohypoparathyroidism type Ib in a patient with multilocus imprinting disturbance	ポスター
		<u>鏡 雅代</u> 、松原 圭子、中村 明枝、井上 毅信、佐野 伸一朗、 <u>緒方 勤</u> 、深見 真紀	当研究室で同定した132名の片親性ダイゾミーにおける両親の年齢および生殖補助医療についての検討	口演

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
シンポジウムなどは行っておりません

(4) 特許出願
なし