



新規ヒトインプリンティング疾患「Kagami-Ogata症候群」の樹立

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学小児科学雑誌編集部 公開日: 2021-03-15 キーワード (Ja): キーワード (En): Kagami-Ogata syndrome, Upd(14)pat, epimutation, microdeletion, phenotype, clinical diagnosis, molecular diagnosis 作成者: 緒方, 勤, 鏡, 雅代 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00003794

総説

新規ヒトインプリンティング疾患「Kagami-Ogata 症候群」の樹立
Kagami-Ogata syndrome: a novel imprinting disorder

*¹ 浜松医科大学小児科 *² 国立成育医療研究センター研究所分子内分泌研究部
緒方勤*¹ 鏡雅代*²

*1 Department of Pediatrics, Hamamatsu University School of Medicine

*2 Department of Molecular Endocrinology, National Research Institute for Child Health
and Development

*1 Tsutomu Ogata *, 2 Masayo Kagami

2020 年 10 月 19 日 受付 2020 年 11 月 2 日 受理

Corresponding Author: 緒方 勤

〒431-3192 浜松市東区半田山 1-20-1

TEL 053-435-2312 FAX 053-435-2311

E-mail: tomogata@hama-med.ac.jp

新規ヒトインプリンティング疾患「Kagami-Ogata 症候群」の樹立 Kagami-Ogata syndrome: a novel imprinting disorder

*¹ 浜松医科大学小児科 *² 国立成育医療研究センター研究所分子内分泌研究部
緒方勤*¹ 鏡雅代*²

*¹ Department of Pediatrics, Hamamatsu University School of Medicine

*² Department of Molecular Endocrinology, National Research Institute for Child Health and Development

¹ Tsutomu Ogata, 2 Masayo Kagami

キーワード: Kagami-Ogata syndrome, Upd(14)pat, epimutation, microdeletion, phenotype, clinical diagnosis, molecular diagnosis

概要

ヒト第14染色体長腕の14q32.2領域には、父性発現遺伝子DLK1やRTL1、ならびに母性発現遺伝子MEG3やRTL1asが存在する。われわれは、このインプリンティング領域の異常によってもたらされる疾患の研究に従事し、以下のことを明らかにした。(1) このインプリンティング領域には、配偶子形成時に樹立されるIG-DMRと受精後に樹立されるMEG3-DMRが存在する。(2) 個体では、2つのDMRは共に父由来のときに高メチル化状態、母由来のときに低メチル化状態で存在するが、胎盤では、IG-DMRのみ個体と同様のDMRとして存在する。(3) IG-DMRとMEG3-DMRは、各々胎盤と個体におけるICとして機能する。(4) IG-DMRは個体におけるMEG3-DMRのメチル化パターンを制御する。(5) 第14染色体父性片親性ダイソミーと同じ症状が、母由来DMRを含む微細欠失や当該DMRのエピ変異（高メチル化）で生じる。(6) 母性発現遺伝子RTL1asにコードされるmicroRNAは、父性発現遺伝子RTL1の発現抑制機能を有する。(7) 第14染色体父性ダイソミーおよび類縁疾患の表現型は、主にRTL1の過剰発現による。(8) 第14染色体父性ダイソミーおよび類縁疾患の診断特異的症状として豊かな頬と突出した人中を呈する顔貌、胸部レントゲン上のcoat hanger angleの増加が、特徴的症状として腹壁異常、羊水過多、胎盤過形成が、非特異的症状として出生時過体重、精神運動発達遅滞、摂食嚥下困難が、その他の症状として肝芽腫、早期死亡が挙げられる。このような成果により第14染色体父性ダイソミーおよびその類縁疾患に対し、「鏡-緒方症候群」(Kagami-Ogata syndrome)という疾患名が、欧州インプリンティング疾患ネットワークから与えられ、これは、世界最大の疾患データベースOnline Mendelian Inheritance in Man (OMIM) に#608149として登録された。

はじめに

遺伝性疾患は、通常遺伝子コード領域あるいはその発現調節領域の構造的変化(変異や欠失など)により発症する。これらはゲノムの構造異常を伴うものであり、その伝達は通常古典的なメンデル遺伝学の法則に従う。また、非メンデル遺伝病である多因子疾患発症に関連する疾患感受性因子多型やハプロタイプも、ゲノムの構造変化に起因する。

エピジェネティクス(エピ:後成的)は、このようなゲノムの構造異常ではなく、その発現パターンを変化させる修飾因子により発症する疾患を対象とする分野である。この分野の進歩は目覚ましく、エピジェネティクスは、先天奇形症候群、環境反応性、発癌など、多くの病態に関連している明らかとなってきている。代表例としてBarker仮説およびそれが発展したDOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) 仮説が挙げられる。England と Wales疫学(統計)調査から、1921~25年における新生児死亡率が高い地域では1969~1978年において成人心血管障害による死亡率が高いことが示され¹⁾、その後の世界的な調査によって、低出生体重児(2500g以下)が虚血性心疾患のリスク因子であることが確認された。この観察に基づき、Barkerらは、子宮内での栄養状態が悪いと、胎児は少ない栄養をより効率よく取り込もうとする体質を獲得し、成人期に高血圧、肥満、糖尿病、高脂血症などのメタボリックシンドロームを介して虚血性心疾患が発症するという仮説(Barker仮説)へと繋がった。その後、多数の疫学的研究によって、様々な成人期慢性疾患の発症基盤が、発達期、とくに胎児期の環境と関連することが明らかにされ、DOHaDという新しい考え方に発展している²⁾。これは、子宮内栄養不良という環境因子がエピジェネティック修飾を介して疾患発症

を招くモデルとなっている。

ゲノムインプリンティングは、エピジェネティクスな現象の一つで、片親性に発現するインプリンティング遺伝子の発現をDNAメチル化、ヒストン修飾など可変的なエピジェネティックマーキング(インプリント)により抑制される現象である。インプリンティング遺伝子の発現異常は、インプリンティング異常症を引き起こす。本論文では、われわれの代表的成果として14番染色体インプリンティング異常症であるKagami-Ogata症候群について述べる。この新規疾患名は、われわれの研究が評価され、European Network for Human Congenital Imprinting Disordersから提唱されたもので、Kagami-Ogata syndromeという名称は、世界最大の疾患データベースであるOMIM に#608149として掲載されている。

インプリンティング遺伝子とメチル化可変領域

遺伝子は、通常、親由来にかかわらず同等に働くが、例外的に、父親由来のときのみ働く遺伝子(父性発現遺伝子PEG: paternally expressed gene)や母親由来のときのみ働く遺伝子(母性発現遺伝子MEG: maternally expressed gene)が存在する(図1)。

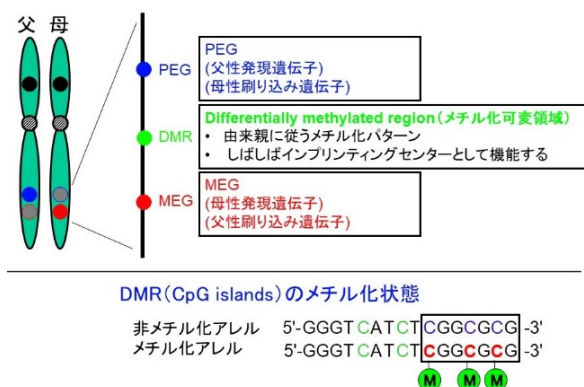


図1 インプリンティング遺伝子と DMR

PEG: paternal expressed gene, MEG: maternal expressed gene, DMR: Differentially methylated region

このPEGとMEGを総称してインプリンティング遺伝子と呼ぶ。インプリントとは、ゲノム配列の変化を伴うことなく生じる遺伝子発現抑制で、可変的な後成的修飾(マーキング)により行われる。その機序として、最も重要な所見は、CpG配列に存在するシトシンCの親由来特異的メチル化である。遺伝子のプロモーター領域には、しばしばCpG配列が繰り返して存在し、このCpG配列群のC(シトシン)のメチル化状態は、その遺伝子の発現状態と密接に関連する。この現象は、通常の遺伝子にも認められるが、インプリンティング遺伝子では、親由来特異的にCpG配列のメチル化あるいは非メチル

化が生じ、このためにメチル化可変領域(DMR: differentially methylated region)と呼ばれる。このDMRのメチル化状態が、当該インプリンティング遺伝子の親由来特異的発現パターンと相関する(図1)。

そのため、インプリンティング遺伝子は、DMR周辺にクラスターを形成してゲノム上に存在する。この可変的な親由来特異的インプリント機序は、配偶子形成過程において消去され、配偶子の性に一致して再度樹立される³⁾。事実、DMRは、配偶子形成過程においてドラスティックな脱メチル化を受け、その後、配偶子の性に一致するメチル化パターンを示す。

このDMRは2つに大別される。第1は、germline-derived primary DMRである。これは、配偶子形成時に確立され、受精後のmassive demethylationの時期においてもメチル化状態は維持される。このDMRは、個体と胎盤の両者においてDMRとして存在する。第2は、postfertilization-derived secondary DMRである。これは、受精後の初期発生時におけるmassive demethylationの後に確立される。このDMRは、個体ではDMRとして振舞うが、対外組織(胎盤)では高度に脱メチル化された状態にある。重要な点として、様々な発現調節関連タンパクは、非メチル化DMRには結合しうるが、メチル化DMRには結合しない。したがって、発現調節の観点から重要な機能を有するものは非メチル化DMRである。

インプリンティング遺伝子の存在理由

インプリンティング遺伝子は、構造的には2個(1対)存在するが、機能的には1個しか存在しない。このため、インプリンティング疾患は、1個の発現している遺伝子障害で発症する。このような遺伝学的脆弱性に曝されてまで、インプリンティング遺伝子が存在する理由として、いくつかの可能性が推測されているが、以下の2つが重要と思われる。第1は胎盤の進化である。インプリンティング遺伝子は胎盤を有する生物から認められ、ほぼ全てのインプリンティング遺伝子が胎盤で発現している⁴⁾。インプリンティング遺伝子の獲得が胎盤形成と進化を可能にしたと考えられる。そして、個体と胎盤の両者の発育は、PEGにより促進され、MEGにより抑制される(これをconflict theoryと呼ぶ)⁵⁾。インプリンティング遺伝子は、この胎児と胎盤の発育バランスを保つ上で決定的な役割を果たすと推測される。第2は、単為発生の防止である。有性生殖は、種の多様性を獲得する上で極めて有効なシステムであり、インプリンティング遺伝子の存在は、このシステムを保証するものとなる。

インプリンティング遺伝子異常による先天疾患発

症機序

インプリンティング疾患発症機序は、インプリンティング遺伝子変異、片親性ダイソミー、エピ

変異、インプリンティングドメイン欠失・重複に大別される (図2)。

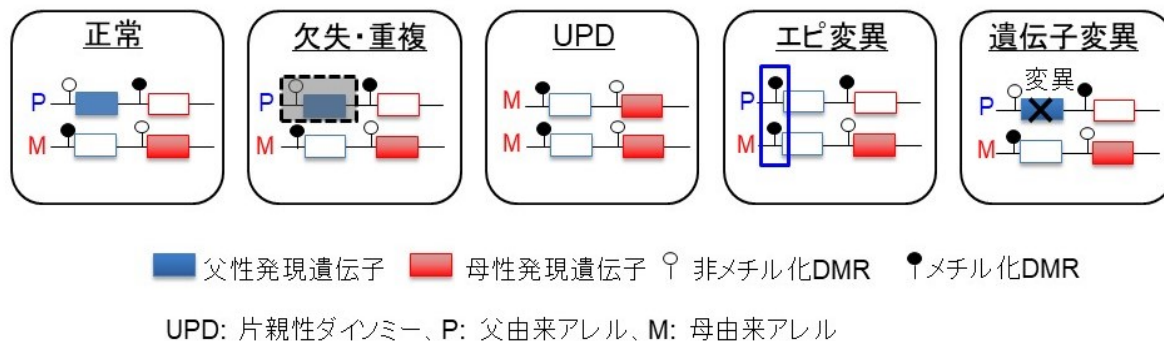


図2 インプリンティング異常症の遺伝学的原因

インプリンティング遺伝子内変異は、通常の遺伝子変異と同じ機序によるが、その変異の効果が由来する親に依存することは強調されるべきである (図3)。

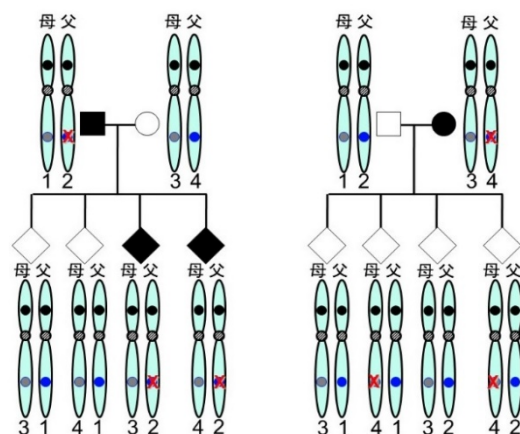


図3 インプリンティング異常症の遺伝形式

左: 父由来アレルから発現する父性発現遺伝子変異により発症する疾患の場合、変異が父由来アレルにあると疾患を発症する。

右: 父由来アレルから発現する父性発現遺伝子変異により発症する疾患の場合、変異が母由来アレルにある場合は、父性発現遺伝子の発現には影響はなく、発症せず、保因者となる。

例えば、PEGは、父から子供に伝達されたときには、その子供の性別を問わず発現し、その後、その子供が男児であるときには孫でも働き、一方、その子供が女児であるときには孫では作用しない。MEGは、父から子供に伝達されたときには、その子供

の性別を問わず休眠し、その後、その子供が男児であるときには孫でも休眠し、一方、女児であるときには孫において発現する。したがって、PEGの変異は父親に由来するときには疾患発症を招くが、母親に由来するときには臨床的效果を生じない。同様に、MEGの変異は母親に由来するときには疾患発症を招くが、父親に由来するときには臨床的效果を生じない。したがって、非メンデル遺伝形式を示す疾患となる。したがって、家系観察はインプリンティング疾患を同定する上で重要である。

片親性ダイソミーは相同染色体の全てあるいは一部分が共に父親あるいは母親に由来する状態である。父親性ダイソミーではPEGの発現過剰とMEGの発現喪失が、母親性ダイソミーではMEGの発現過剰とPEGの発現喪失が、疾患発症を招く。片親性ダイソミーの発症機序は、下記に大別される (図4)。第1は、trisomy rescueである。第21染色体と性染色体以外のトリソミーは致死性であるが、過剰染色体が脱落すると生存可能となる。例えば、KOSを招く第14番染色体父性ダイソミーでは、受精卵において父由来第14番染色体が2本と母由来第14番染色体が1本存在するトリソミー状態は致死性であるが、1つの第14番染色体が脱落すると第14番染色体は2本となり生存可能となる。このとき、3分の1の確率で母由来第14番染色体が脱落し、その結果、第14番染色体父性片親性ダイソミーが発症する。そして、この場合、heterodisomyとisodisomyの領域が通常混在する (図では全染色体がheterodisomyとして示されている)。また、トリソミー細胞は胎盤では生存できるため、しばしば胎盤限局のトリソミー (confined placental trisomy) が検出される。第2は、gamete complementationである。これは、ダイソミーとヌリソミーの配偶子が受精することで生じるが、卵

子、精子ともに異数性をもつことを前提とするため、発症頻度は非常に低いと予想される。この場合もheterodisomyとisodisomyの領域が通常混在する。

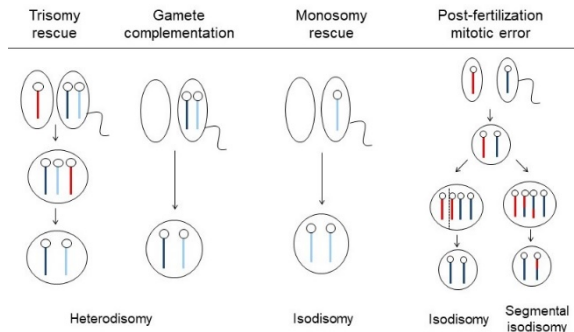


図4 父性片親性ダイソミーの発症機構

Trisomy rescue と Gamete comprimentation は heterodisomy を示す。Monosomy rescue は 14 番染色体全領域が isodisomy を示す。Post-fertilization mitotic error は組み換えがない場合は isodisomy を示し、組み換えがある場合は、セントロメア側は両親性、テロメア側が父性片親性ダイソミーを示す Segmental isodisomy を示す。

第3は、monosomy rescueである。モノソミー細胞は45, X以外致命的であるが、当該染色体が複製されたときには生存可能となる。例えば、KOSを招く第14番染色体父性ダイソミーでは、受精卵において父由来第14番染色体が1本のみで存在するモノソミー状態は致命的であるが、父由来第14番染色体が複製されると第14番染色体は2本となり生存可能となる。この場合、1コピーの染色体が複製されることから、全ての染色体領域がisodisomyとなる。第4は、postfertilization errorである。正常受精卵における有糸分裂時の異常に起因し、full/segmental isodisomyとなり、正常細胞とのモザイクあるいは均衡型組換え細胞として検出される。なお、片親性isodisomyでは、劣性変異の顕在化が疾患発症を招くことがあること念頭に置かねばならない。事実、多くの片親性ダイソミーは、劣性変異の顕在化を契機として同定されている。この場合、isodisomyとなった染色体の由来親においてヘテロの変異が存在し、患者はその変異のホモ接合体である。

エピ変異は、メチル化可変領域 (DMR) のメチル化異常と定義される。このエピ変異には、通常メチル化される領域が低メチル化状態となる場合と、通常メチル化されない領域が高メチル化状態となる場合の2つのパターンがある。いずれもインプリンティング遺伝子の発現に影響を及ぼし、イン

プリンティングドメインの父性化 (paternalization) あるいは母性化 (maternalization) を招き、ダイソミーと同様の発現パターンおよび臨床症状を生じる。エピ変異の発症機序は現在不明である。

インプリンティングドメインの欠失は、非メチル化DMRを含むとき、インプリンティングドメインの父性化 (paternalization) あるいは母性化 (maternalization) を招き、ダイソミーと同様の症状を生じる。また、インプリンティングドメインの重複もインプリンティング疾患を生じることがある。事実、11p15上の*CDKN1C*遺伝子 (MEG) を含む重複がSilver-Russell症候群を生じることが報告されている。しかし、重複によるインプリンティング疾患発症は比較的稀であり、後述のKagami-Ogata症候群では、14番染色体インプリンティングドメインの重複症例は報告されていない。

Kagami-Ogata症候群

ヒト第14番染色体にはインプリンティング領域が存在する (図5)。

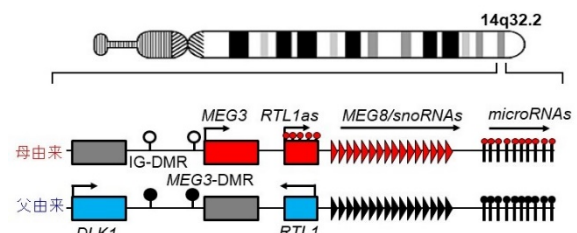


図5 第14番染色体インプリンティング領域
青の長方形：父性発現遺伝子、赤の長方形：母性発現遺伝子、灰色の長方形：発現していない遺伝子、大きい白丸：メチル化を受けていない DMR。大きい黒丸：メチル化を受けている DMR、赤い三角形：母性発現している snoRNA、黒い三角形：発現していない snoRNA、小さい赤丸：母性発現している miRNA を、小さい黒丸：発現していない miRNA

ヒト14番染色体インプリンティング領域の存在は、高度の相同性を示すマウス12番染色体領域がインプリンティング領域であることや14番染色体父性片親性ダイソミーをもつ患者が、特徴的顔貌、胸郭変形、腹壁異常、胎盤過形成、羊水過多などの特徴的所見を呈することから想定されていた。

われわれは、かつて「第14染色体父性ダイソミー症候群」と称されたKagami-Ogata症候群 (KOS) 患者34例を解析し (これは、現在までに世界中で報告された患者60例の半数以上を占める)、この疾患単位の発症機序を明らかにし、臨床診断基準ならびに遺伝子診断法を樹立した。以下、その要諦について概説する。

ヒト第14番染色体インプリンティング遺伝子

われわれは、まずこの領域の遺伝子がインプリンティングを受けることを胎盤と母親のgenomic DNA (gDNA) ならびに胎盤cDNAを用いて明らかにした (図6) ⁶⁾。

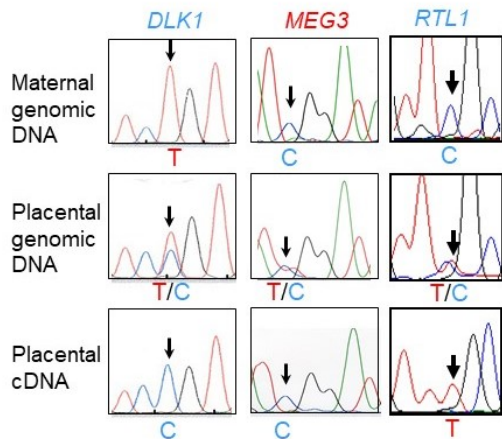


図6 ヒト胎盤における *DLK1*、*MEG3*、*RTL1* の発現パターン (文献 ⁶⁾ より改変転載)
正常コントロール胎盤において、*DLK1*、*RTL1* は父由来アレルからの発現、*MEG3* は母由来アレルからの発現を確認した。

すなわち、*DLK1*、*RTL1*がPEGであること、*MEG3*がMEGであることを見出した。*DLK1*、*RTL1*はタンパクをコードする遺伝子で、各々のプロモーターの作用により逆方向に転写され、一方、*MEG3*、*RTL1as* (antisense)、*MEG8*や多数存在するsnoRNA群ならびにmiRNA群はnon-coding RNAであり、*MEG3*プロモーターの作用により一群の遺伝子として同じ方向に転写される (図5)。

DMRの同定

次にわれわれは、このインプリンティング遺伝子周辺に存在すると想定されるDMRの同定に取り組んだ (図7) ⁶⁾。まず、CpG配列に富むセグメントを *in silico*解析により9つ抽出し、そのメチル化パターンを健常者、第14染色体父性ダイソミー、第14染色体母性ダイソミーにおいて検討した。その結果、血液では、*DLK1*と*MEG3*の間に位置するCG4とCG6、ならびに*MEG3*プロモーター領域に存在するCG7が、父由来のときにメチル化状態、母由来のときに非メチル化状態と、DMRに合致するメチル化パターンを示すことが判明した。さらに、新鮮胎盤組織を用いた解析で、CG4とCG6は胎盤においてもDMRとして振舞い、一方、CG7は胎盤では高度に低メチル化状態であった。したがって、CG4とCG6はgermline-derived primary DMRと推測され、intergenic (IG)-DMRと命名された。一方、CG7はpostfertilization-derived secondary DMRと想定され、*MEG3*-DMRと命名された。

個体および胎盤インプリンティングセンター(IC)の同定

IG-DMRと*MEG3*-DMRが領域内のインプリンティング遺伝子の発現を制御するICの機能を有するかどうかを明らかにするには、様々な調節タンパクが結合しうる母由来非メチル化IG-DMRあるいは*MEG3*-DMRのいずれか一方のみの微細欠失あるいはエピソード変異 (過剰メチル化) を有する患者の解析が必須である。われわれは、幸運にもそのような患者に遭遇する機会に恵まれた。一人は母由来非メチル化*MEG3*-DMR (および*MEG3*の一部) のみを欠失した患者で (図8)、もう一人は母由来非メチル化IG-DMRのみを欠失した患者である (図9) ⁷⁾。*MEG3*-DMRのみを欠失した症例1は特徴的顔貌、胸郭変形、腹壁異常を示したが、胎盤の異常は指摘されていなかった。一方、IG-DMRのみを欠失した症例2は特徴的顔貌、胸郭変形、腹壁異常に加え、羊水過多、胎盤過形成も呈した。初めに、両患者の血液、胎盤より抽出したDNAを用いて、メチル化解析を施行した。血液の解析において、症例1は母由来アレルの*MEG3*-DMRの欠失に一致し、*MEG3*-DMRの高メチル化を示し、欠失領域に含まれないIG-DMRのメチル化は正常パターンを示した (図10)。一方、母由来アレルIG-DMRを欠失している症例2はIG-DMRと*MEG3*-DMRともに高メチル化を示した。症例2の胎盤の解析では、血液と同様にIG-DMRは高メチル化を示したが、*MEG3*-DMRは高メチル化を示さなかった。以上の結果は、IG-DMRがgermline-derived primary DMRであること、ならびに、*MEG3*-DMRがpostfertilization-derived secondary DMRであることに一致するのみならず、体 (血液) において、IG-DMRが階層的に*MEG3*-DMRのメチル化パターンを制御することを示すものである。すなわち、*MEG3*-DMRは、IG-DMRが非メチル化状態で存在するときのみ非メチル化状態として存在でき、IG-DMRがメチル化状態で存在するときにはメチル化を受けることを明らかにする世界初のデータである。

次に、両患者の生体試料を用いて遺伝子発現を検討した。症例1は新生児期に死亡したため、全身の様々な組織の検討が可能であった。その結果、皮膚線維芽細胞からRNAを用いた解析によりコントロールでは検出される*MEG3*を含むMEG遺伝子群の発現していないこと、また、下垂体および副腎から抽出したRNAを用いた解析により*DLK1*が両親性発現を示すことが確認された (図11)。これは、母由来非メチル化*MEG3*-DMRの欠失が母由来染色体を父由来染色体の性質に変える epigenotypic alterationを招くことを示すデータで、母由来非メチル化*MEG3*-DMRが個体におけるインプリンティングセンターとして機能していることを示す。そして、*MEG3*-DMRは胎盤ではDMRとして存在しないことから、この発現解析データは、なぜ症例1が個

体症状を呈し、一方、胎盤表現型を伴わないかを説明する。さらに、症例2の胎盤を用いた同様の解析において、*MEG3*を含むMEG遺伝子群がすべて発現

していないこと、また、*RTL1*が両親性発現を示すことが確認された (図12)。

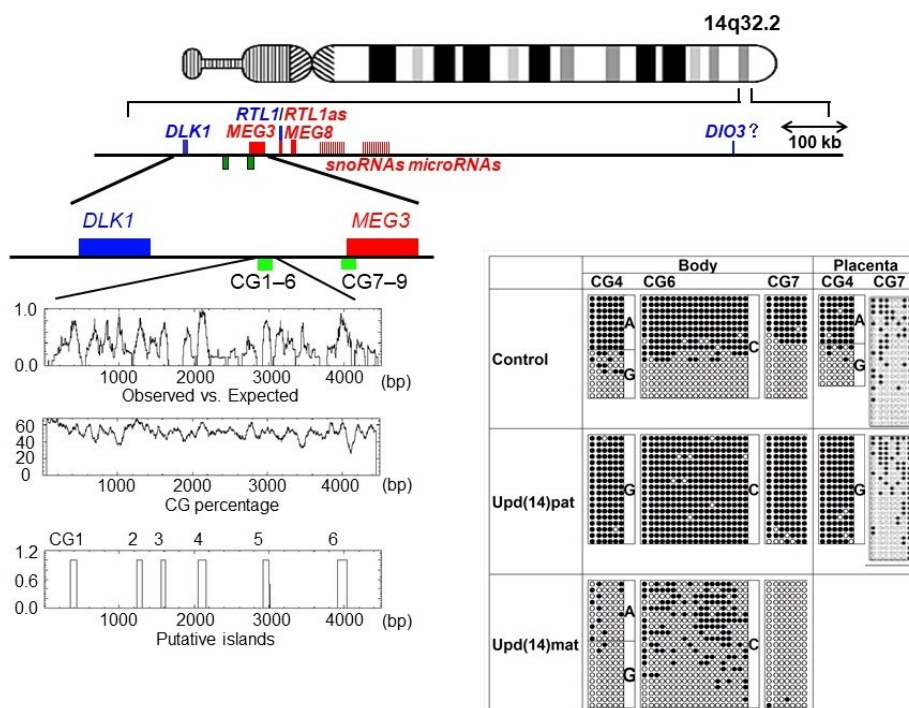


図7 ヒト IG-DMR、*MEG3*-DMR の同定 (文献⁶⁾ より改変転載)

Upd(14)pat: Paternal uniparental disomy of chromosome 14 (14 番染色体父性片親性ダイソミー)、Upd(14)mat: Maternal uniparental disomy of chromosome 14 (14 番染色体母性片親性ダイソミー)

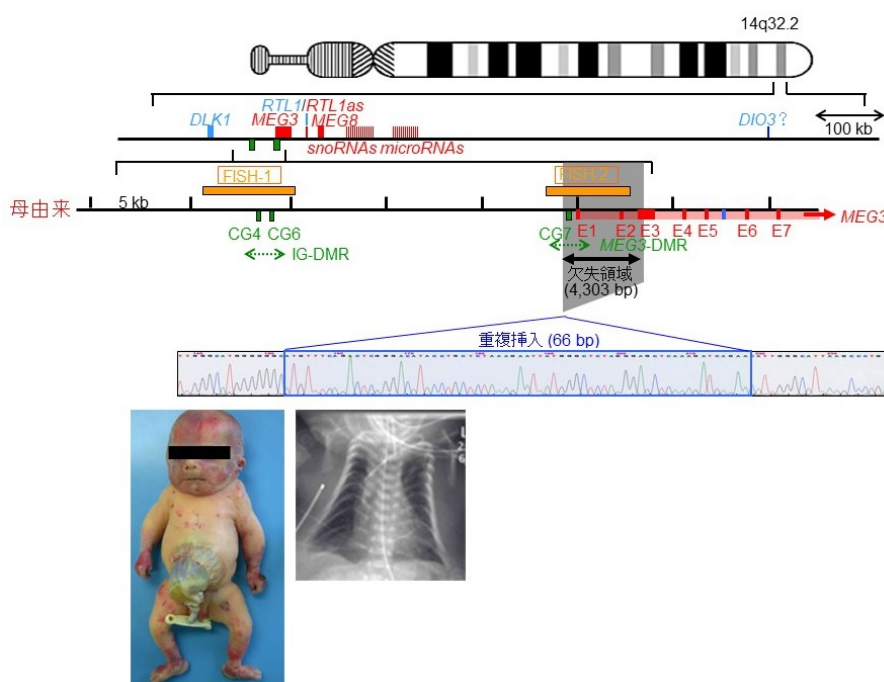


図8 症例1の欠失領域と臨床像 (文献⁷⁾ より改変転載)

MEG3-DMR を含む 4303 bp の欠失と *MEG3* のイントロン 5 の 66bp の配列の重複挿入を認めた。ベル型胸郭、腹壁異常など KOS 臨床像を示したが、胎盤過形成は認めなかった。

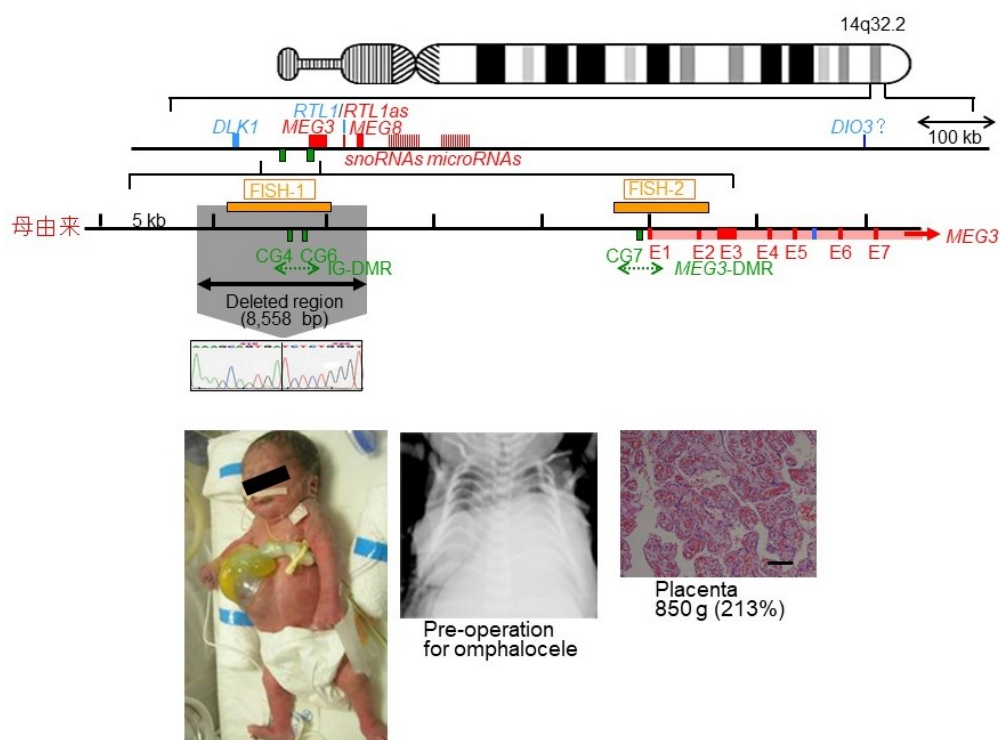


図9 症例2の欠失領域と臨床像（文献⁷⁾より改変転載）

IG-DMRを含む8558 bpの欠失を認めた。ベル型胸郭、腹壁異常、胎盤過形成など典型的なKOSの臨床像を示した。

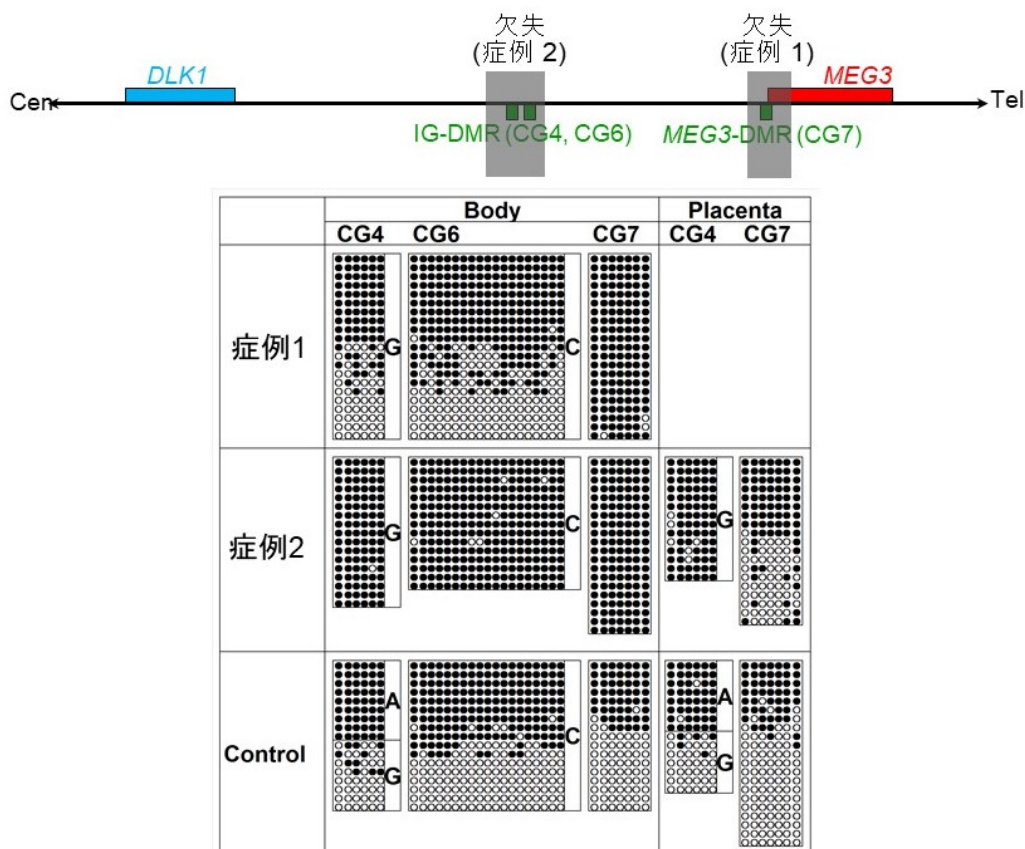


図10 症例1および2のメチル化解析結果（文献⁷⁾より改変転載）

横一列は一つのクローンを示す。黒丸はメチル化されたCpG、白丸はメチル化されていないCpGを示す。

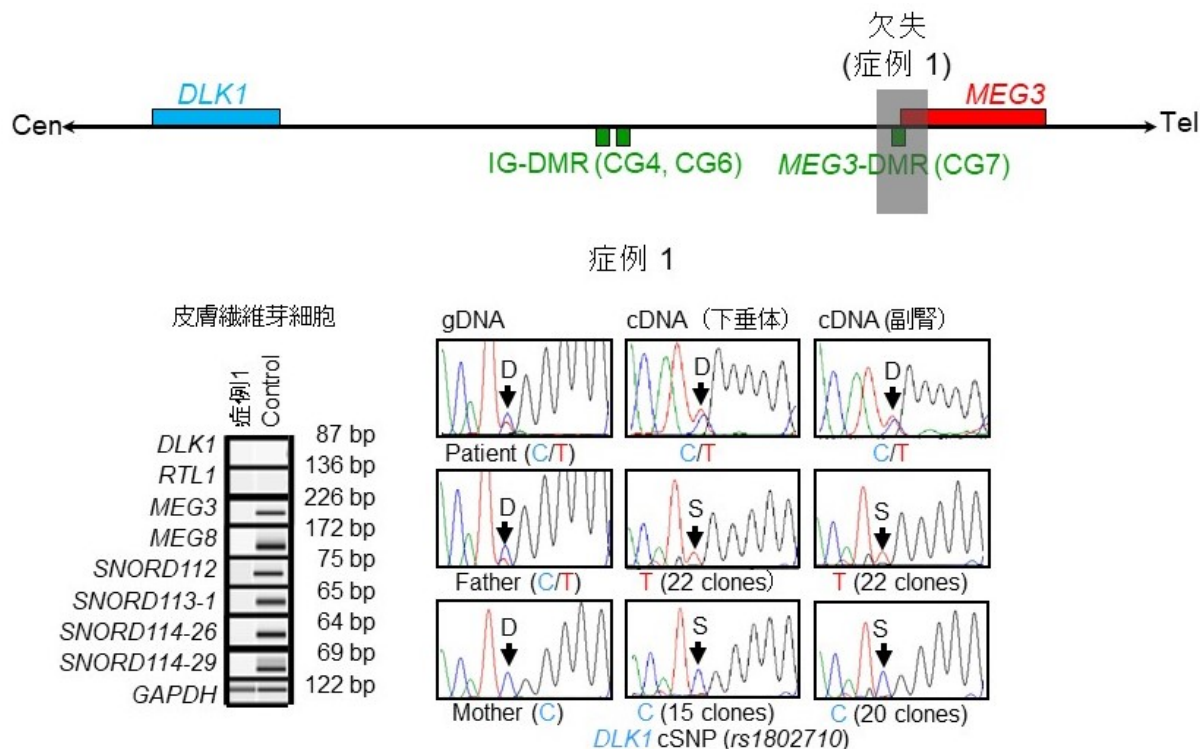


図 11 症例 1 および症例 2 での発現解析結果（文献⁷⁾より改変転載）

症例 1 の皮膚繊維芽細胞を用いた RT-PCR 解析にて、MEGs の発現消失が確認された。下垂体、副腎を用いた *DLK1* の発現パターンの検討において、両親性の発現を検討した。

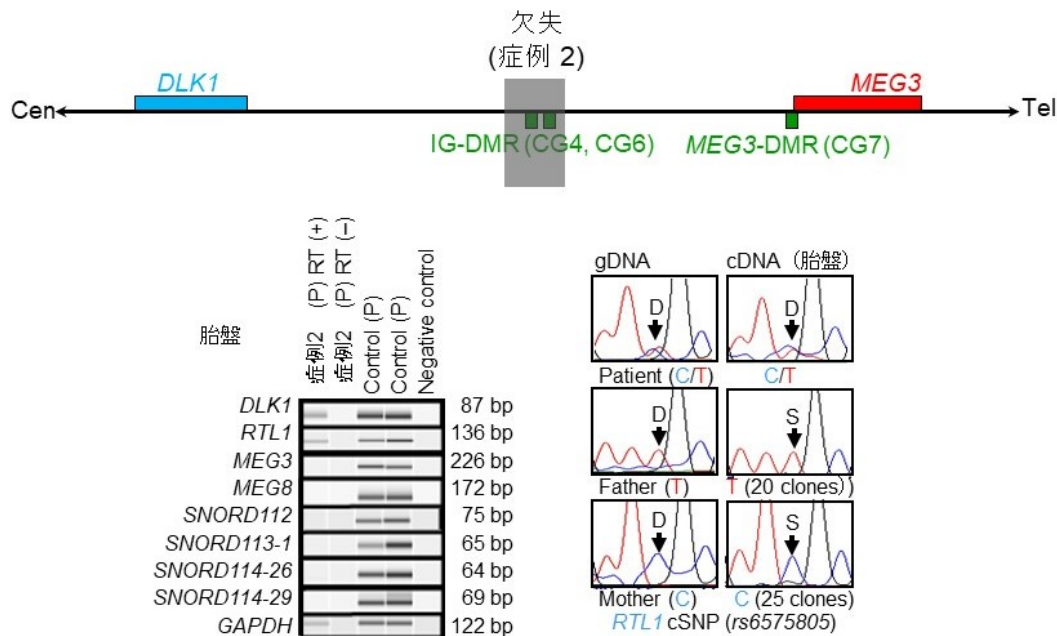


図 12 症例 2 での発現解析結果（文献⁷⁾より改変転載）

症例 2 の胎盤を用いた RT-PCR 解析にて、MEGs の発現消失が確認された。*RTL1* の発現パターンの検討において、両親性の発現を確認した。

これは、母由来非メチル化IG-DMRの欠失が母由来染色体を父由来染色体の性質に変える epigenotypic alterationを招くことを示すデータで、母由来非メチル化IG-DMRが胎盤におけるイ

ンプリンティングセンターとして機能していることを示す。そして、母由来MEG3-DMRが、非メチル化IG-DMRの欠失によりメチル化状態になることで、個体においても胎盤同様の epigenotypic

alterationが生じていると推測され、この発現解析データは、なぜ症例2が個体症状と胎盤表現型の両者を生じるかを説明する。以上から、胎盤では、母由来非メチル化IG-DMRが、個体では母由来非メ

チル化MEG3-DMRがICとして機能し、さらに、個体では、母由来非メチル化IG-DMRがMEG3-DMRのメチル化パターンを支配する階層的メチル化樹立関係を構築していると結論づけられる (図13)。

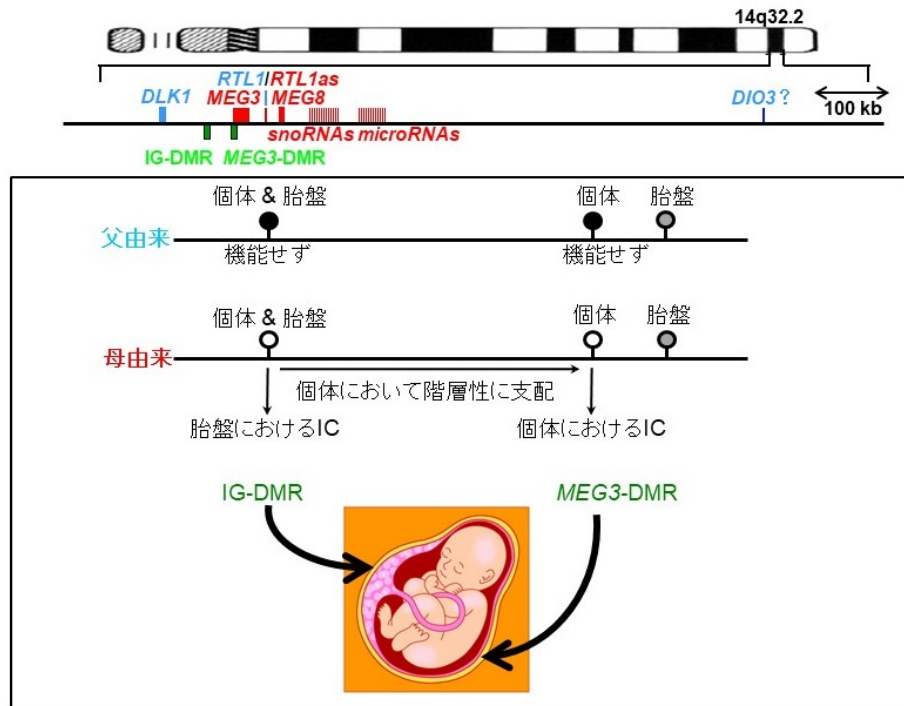


図 13 個体および胎盤のインプリンティングセンターの同定

IC：インプリンティングセンター、黒丸：メチル化された DMR、白丸：メチル化されない DMR、灰色の丸：DMR ではない

RTL1asによるRTL1発現抑制 (microRNA効果)

上記のように、母由来IG-DMR欠失マウスは、母由来染色体が父由来染色体のような発現パターン (epigenotypic alteration) を示す⁸⁾。このマウスでは、*Dlk1*発現量は予想通り正常コントロールの2倍であり、*Megs*の発現は消失していたが、*Rtl1*発現量は4.5倍であった (図14)。また、母親由来アレルの*Rtl1as*を欠失させたマウスでは、*Rtl1*の発現量が2.5倍となる (図14)⁹⁾。これらの結果より、*Rtl1as*上のmicroRNAが*Rtl1*の発現をトランスに抑制していると推測されていたが、このような*Rtl1as*による*Rtl1*発現抑制機構はヒトでは明らかとなっていなかった。

われわれは、この発現量を胎児診断されたKOS (Upd(14)pat) の2症例の新鮮凍結胎盤を用いて行った¹⁰⁾。2症例の胎盤において、父性発現遺伝子である*DLK1*発現量は正常コントロールに比較し約2倍であったのに対し、*RTL1*発現量は約5倍の発現増加を示した (図15)。これは*RTL1as*内のmicroRNAsの発現消失により、*RTL1*発現が増加したことを示唆し、マウス同様、母性発現遺伝子*RTL1as*内のmicroRNAsによる*RTL1*抑制作用がヒトでも存在することを示す。

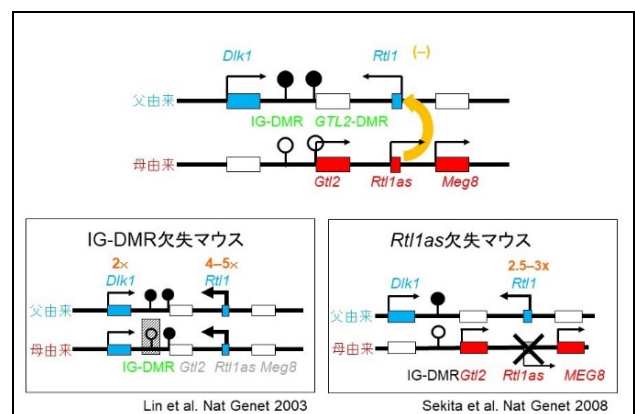


図 14 *Rtl1* の発現制御に関するマウスの先行研究

*Rtl1as*内のmicroRNAがトランスに*Rtl1*の発現を抑制を制御するという報告があった²²⁾。母由来IG-DMR欠失マウスは母アレルが父アレルと同様の挙動を示す。*Dlk1*は正常コントロールに比較し、2倍の発現量を示すが、*Rtl1*は4-5倍の発現増加を示した⁸⁾。*Rtl1as*のみを欠失したマウスでは*Rtl1*は父由来アレルからのみの発現だが、2.5-3倍の発現増加を認めた⁹⁾。

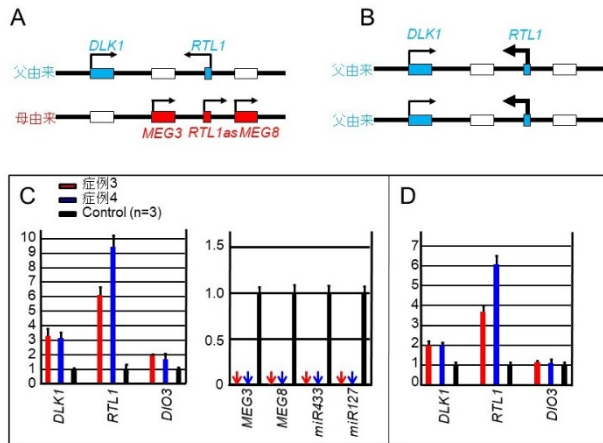


図 15 Upd(14)pat によって引き起こされた KOS 症例の新鮮凍結胎盤を用いた発現解析結果 (文献¹⁰⁾より改変転載)

A. 遺伝子発現パターン、B. Upd(14)patの遺伝子発現パターン、C. qPCR解析結果、D. *DLK1*と*RTL1*の相対的発現量を比較するために、*DLK1*の発現量を2と定義して補正

胎盤における*RTL1*の役割

インプリンティング遺伝子は胎盤発育に重要な役割を果たすと考えられており、14番染色体インプリンティング遺伝子の*DLK1*、*RTL1*、多数の*MEGs*も胎盤において強く発現している。*DLK1*、*RTL1*の過剰発現および*MEGs*の発現消失を示すKOSでは胎盤過形成を示す。Upd(14)patによるKOS患者2例および、IG-DMR、*MEG3*-DMR、*MEG3*を欠失した症例の胎盤の組織学的検討を行ったところ、絨毛血管内腔の拡大と胎盤絨毛血管内皮および周皮細胞の肥厚が共通して認められた (図16)¹⁰⁾。また、免疫

染色では3症例に共通して、*RTL1*の発現増加が認められたが、*DLK1*の発現増加はUpd(14)patの2症例のみに認められた (図16)¹⁰⁾。3症例とも胎盤過形成を認めており、*MEGs*発現消失の影響は否定できないが、*RTL1*の過剰発現がKOSの胎盤過形成の主要な原因であると考えられる。この結果は、*Rtl1as* ノックアウトマウス (*Rtl1*発現量2.5倍)で胎盤重量の増加を認めた結果に一致し、*RTL1*発現亢進が胎盤過形成とその結果としての羊水過多の主因であることを示唆する。

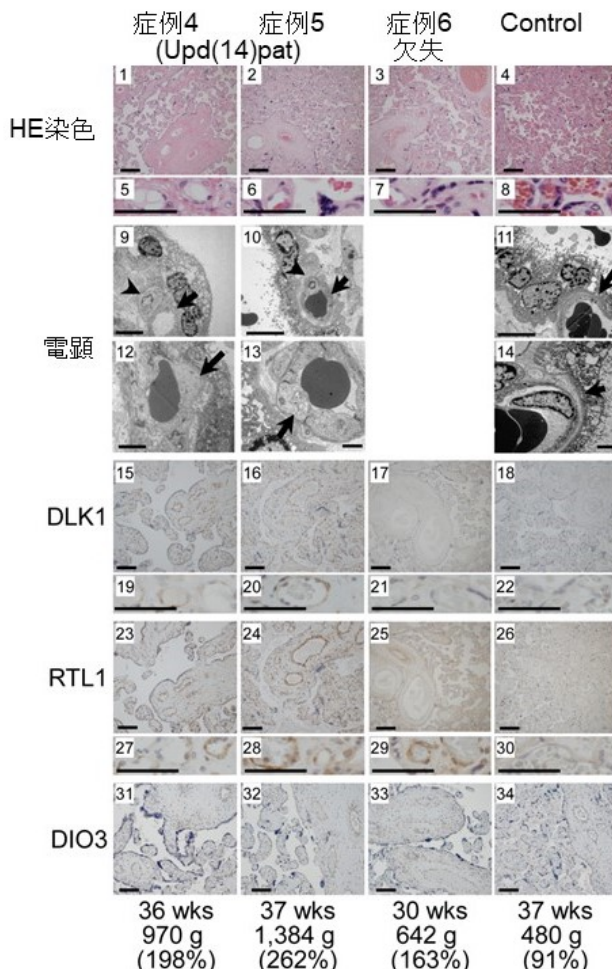


図 16 KOS 症例胎盤の組織学的検討 (文献¹⁰⁾より改変転載)

症例 3 および 4 は Upd(14)pat による KOS 症例、症例 5 は母由来アレル IG-DMR、*MEG3*-DMR、*MEG3*を含む 109 kb を欠失した KOS 症例 (図 23 参照)。

1-4: 胎盤組織像 (弱拡大)、5-8: 胎盤絨毛血管周囲 (強拡大)、9-14: 電顕像。矢印は絨毛血管内皮細胞、矢頭は周皮細胞を示す。15-22: *DLK1* 免疫染色、23-30: *RTL1* 免疫染色、31-34: *DIO3* 免疫染色

臨床像

われわれは、現在までに報告されている55名のKOS患者のうち35名を報告している。これらの患者を対象とする詳細な検討を行った(表1)¹¹⁾。そして、診断特異的症候として、豊かな頬と突出した人中を呈する顔貌(乳児期から小児期を通じて全例)、ならびに胸部レントゲン上のcoat hanger angleの増加(乳児期から小児期を通じて全例)とベル型胸郭(乳児期のみ全例)を、特徴的症候として、腹壁異常(臍帯ヘルニアなど全例)、羊水過多(頻度:33/34)、胎盤過形成(頻度:23/27)を、ありふれているが重要な症候として、出生時過体重(頻度:全例平均以上)、精神運動発達遅滞(頻度:全例)、摂食嚥下困難(頻度:31/33)を、そして、

その他の重要な症候として、肝芽腫(頻度:3/34)、早期死亡(頻度:8/34)を提唱している。

診断特異的症候は特に重要である。特徴的な顔貌を図17に示す。3症例ともに、豊かな頬、突出した人中、前額部突出、眼瞼裂狭小、平坦な鼻梁、小顎といった特徴的な顔貌を示す。また、患者の胸部レントゲン写真を図18に示す。ベル型胸郭は新生児期に明らかであるが、成長とともに目立たなくなる。一方、コートハンガー型変形(coat hanger angleの増加)は年長児においても認められ、画像診断上重要である。上記の特徴的症候、ありふれているが重要な症候に加え、出生直後より出現する呼吸障害を高頻度に認め、人工呼吸管理、酸素投与を必要とする症例が多い。



図 17 KOS 患者臨床像 (文献¹¹⁾ ¹²⁾ より改変転載)

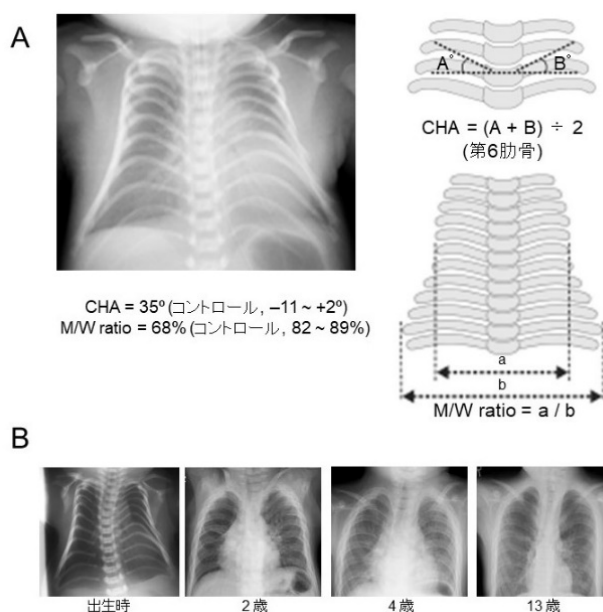


図 18 ベル型、コートハンガー型胸郭変形 (文献¹¹⁾ ¹²⁾ より改変転載)

A. ベル型、コートハンガー型胸郭変形、CHA: Coat hanger angle、M/W ratio: 第6肋骨径の肋骨最大径に対する比
B. 胸郭変形の経時的な変化

表1. Kagami-Ogata症候群34症例の臨床像				
	Upd(14)pat (n=23)	エビ変異 (n=5)	欠失 (n=6)	計 (n=34)
現在の年齢(歳)	2.9 (0.0-15.0)	2.0 (0.8-5.5)	3.3 (0.0-8.9)	2.8 (0.0-15.0)
性別(男:女)	9:14	3:2	1:5	13:21
<妊娠出生歴>				
羊水過多	23/23	5/5	5/6	33/34
羊水穿刺施行症例	18/20	4/5	3/6	25/31
在胎週数 中央値 (range)	34.5 (24-38)	35 (30-37)	30 (27-35)	34 (24-38)
早産 (<37週)	17/23	4/5	6/6	27/34
生殖補助医療	1/18	0/1	0/2	1/21
<成長>				
胎児期過成長	13/23	3/5	4/6	20/34
出生後成長障害	7/20	2/5	2/5	11/30
出生後過成長	1/20	1/5	0/5	2/30
<顔貌、頸部>				
前額突出	17/22	4/5	4/6	25/33
毛深い額	18/22	1/5	4/6	23/33
眼瞼裂狭小	18/22	3/5	3/6	24/33
小さい耳	8/21	2/5	2/6	12/32
平坦な鼻梁	23/23	5/5	4/6	32/34
上向きの鼻孔	19/22	4/5	5/6	28/33
豊かな頬	20/21	4/4	3/4	27/29
突出した人中	23/23	5/5	5/6	33/34
しわの多い唇	11/21	3/5	3/6	17/32
小顎	20/21	5/5	5/6	30/32
短い翼状頸	22/22	5/5	6/6	33/33
<胸郭>				
新生児期のベル型小胸郭	23/23	5/5	6/6	34/34
新生児期のコートハンガー型肋骨変形	23/23	5/5	6/6	34/34
喉頭軟化症	8/20	2/5	2/4	12/29
気管切開	7/21	1/4	2/4	10/29
人工呼吸管理	21/23	5/5	6/6	32/34
人工呼吸管理期間(月) 中央値 (range)	1.2 (0.1-17)	0.7 (0.1-0.9)	2 (0.2-10)	1.0 (0.1-17)
<腹壁異常>				
臍帯ヘルニア	7/23	2/5	2/6	11/34
腹直筋離開	16/23	3/5	4/6	23/34
<発達>				
発達遅延	21/21	5/5	5/5	31/31
IQもしくはDQ 中央値 (range)	55 (29-70)	52 (48-56)	...	55 (29-70)
定頭の遅れ (> 4 か月)	14/16	4/4	2/2	20/22
定頭時期 (月齢) 中央値 (range)	7 (3-36)	7 (6-11)	6 (6)	7 (3-36)
座位の確立の遅れ (> 7 か月)	16/16	4/4	3/3	23/23
座位確立の時期 (月齢) 中央値 (range)	12 (8-25)	11.5 (10-20)	18 (18-27)	12 (8-27)
独歩開始の遅れ (>14か月)	17/17	3/3	4/4	24/24
独歩開始 (月齢) 中央値 (range)	25.5 (20-49)	25 (22-39)	30 (24-90)	25.5 (20-90)
<その他>				
哺乳不良	20/21	5/5	5/5	30/31
経管栄養期間(月) 中央値 (range)	6 (0.1-72)	8.5 (0.5-17)	51 (30-89)	7.5 (0.1-89)
関節拘縮	14/22	3/5	3/6	20/33
便秘	12/20	3/4	1/4	16/28
亀背	9/21	3/5	1/4	13/30
外反股	6/21	1/5	4/6	11/32
先天性心疾患	5/22	1/5	2/6	8/33
鼠径ヘルニア	5/22	1/5	2/6	8/33
痙攣	1/21	0/5	0/6	1/32
肝芽腫	3/23	0/5	0/6	3/34
<出生後5年の生存率>				
生存:死亡	18:5	5:0	3:3	26:8
<両親>				
出生時の父親の年齢(歳) 中央値 (range)	35 (24-47)	30 (26-36)	35 (25-39)	34 (24-47)
出生時の母親の年齢(歳) 中央値 (range)	31 (25-43)	28 (25-35)	29.5 (25-36)	31 (25-43)
高齢出産(35歳以上)	8/23	1/5	1/6	8/34
文献11 のTable 1改変. 分母は臨床情報がある症例数, 分子は所見陽性症例数				

経過・治療・合併症

生児期から乳児期にかけて問題となるのは、呼吸障害と哺乳不良である。呼吸障害は、出生直後より出現し、94%の患者で人工呼吸管理が必要とされ、人工呼吸管理期間の中央値は1か月であった。数日で抜管できる症例から、1年以上人工呼吸管理を必要とする症例までさまざまである。哺乳不良については、96.7%に認められ、経管栄養期間の中央値は7.5か月であった。

中長期的に問題となるのは、精神運動発達遅延である。発達は全例で遅れ、運動発達の中央値は、頸定7か月、座位の確立12か月、独歩確立25.5か月であった（年長児では全例独歩が達成されている）。

遺伝子診断フローチャートと遺伝学的原因

KOSの確定診断は遺伝子診断による。われわれは、DMRのメチル化解析からスタートする遺伝子診断フローチャートを作成した（図19）¹²⁾。

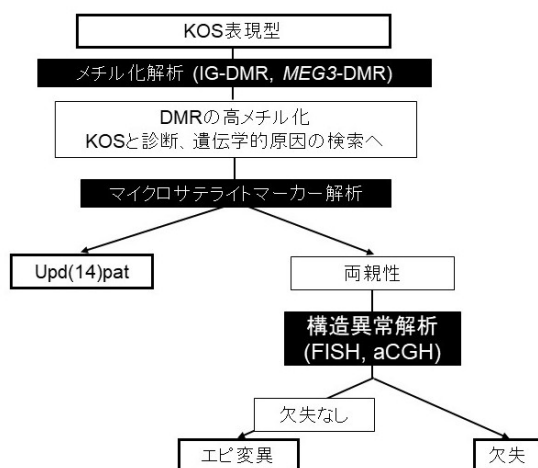


図19 遺伝子診断フローチャート

FISH: fluorescent in situ hybridization,
aCGH: array-based comparative genomic hybridization

スクリーニング検査として行うDMRのメチル化解析はCombined Bisulfite Restriction Analysis法、Methylation Specific PCR法、Methylation specific MLPA法などがあるが、われわれは、パイロシーケンス法を採用している。IG-DMR、MEG3-DMRの異常高メチル化を示した症例はKOSと遺伝子診断される。異常高メチル化を示した症例に対しては、第14番染色体の親由来を明らかにするためにマイクロサテライトマーカー解析、IG-DMR/MEG3-DMRを含む欠失の検索のためにFISH解析やアレイCGH解析を施行する。Upd(14)patおよび欠失を認めず、DMRの高メチル化を示す症例はエピソード変異に分類される。これまで報告された60例の遺伝学的原因は、Upd(14)patが63.3%、欠失が28.3%、エピソード変異が8.3%であった。

DQ/IQの中央値は55であった。注意すべき合併症として肝芽腫を8.8%に認めた。生存率は73.5%であった。遺伝学的原因による予後の違いは認めなかった。全例4歳未満での死亡であり、特に、30週未満で出生した早産児での生存率は25%と低く、羊水過多に対する羊水除去、子宮収縮抑制剤の投与など早産予防の治療により満期に近い時期での出生が生命予後の改善に寄与すると考えられる。肝芽腫合併例は全例死亡しており、肝芽腫に対する定期的なスクリーニングが重要と考えられた。人工呼吸器離脱後に再入院を繰り返す症例は少なく、呼吸障害が問題となる新生児期から乳児期を乗り切ると、生命予後は良好と考えられる。

異が8.3%である（図20）。発症頻度は本邦において、年間3~4名新規患者を同定していることから、本邦における新生児出生数を100万人と仮定すると、100万出生に3~4人の発症頻度と予想される。

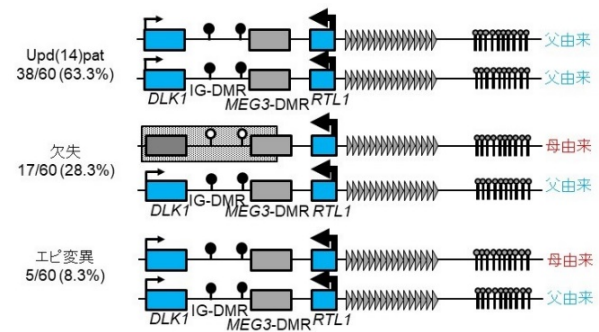


図20 KOSの遺伝学的原因および頻度

青の長方形：父性遺伝子、灰色の長方形：発現していない遺伝子、大きい白丸：メチル化を受けていないDMR、大きい黒丸：メチル化を受けているDMR、灰色の三角形：発現しないsnoRNA、小さい灰色の丸：発現していないmiRNA、点線で囲まれた長方形：欠失領域

UPD発症と母親出産年齢

われわれは、遺伝学的原因別に両親の出生時の年齢を検討した¹³⁾。その結果、Upd(14)patのうちisodisomyを呈するmonosomy rescue/postzygotic error群で母親の年齢が他の群（欠失群、エピソード変異群、trisomy rescue/gamete complementation群、Upd(postzygotic error群)に比較し高く、35歳以上で出産した母親の割合が優位に高いことが明らかとなった（図21）。IsodisomyによるUpd(14)patはnullisomyの卵子と正常精子の受精後のmonosomy rescueにより成立する。母体年齢の高齢化は、相同染色体間の不分離や姉妹染色体の早期分離のリスクが高くなることが報告されており（図22）¹⁴⁾¹⁵⁾、母体高齢化は、nullisomy卵子の高頻度産生を介して、Upd発症リスクの一つとなると推測される。

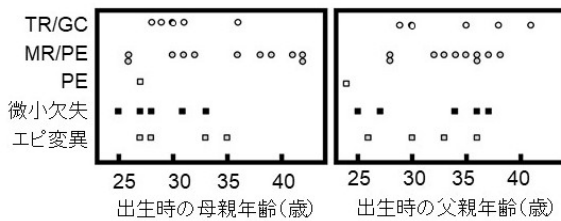


図 21 KOS 症例の両親の年齢の分布 (文献¹³⁾より改変転載)

TR: trisomy rescue、GC: gamete complementation、MR: monosomy rescue、PE: postzygotic error

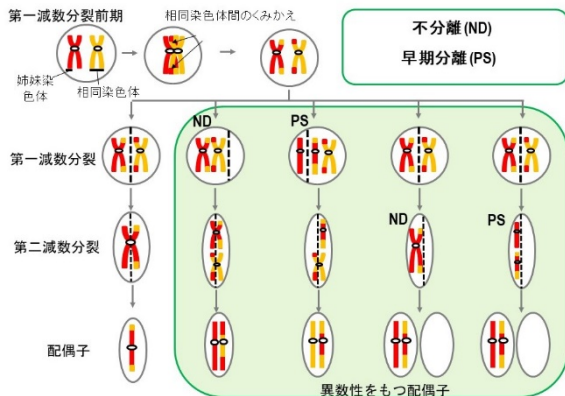


図 22 配偶子の異数性発症メカニズム
ND: non-disjunction (不分離)、PS: premature separation (早期分離)

Kagami-Ogata症候群発症主要遺伝子

これを解明するには、母由来の第14染色体インプリンティング領域の様々なサイズの欠失を有するKOS患者において欠失サイズと表現型関連を検討することが有用である (図23)⁶⁾⁷⁾¹⁶⁻²⁰⁾。ほとんどの患者は、母由来非メチル化IG-DMRおよび/あるいはMEG3-DMRの欠失を伴い、これにより母由来インプリンティング領域の発現パターンの父性化 (epigenetic alteration = paternalization) を生じている。そして、DLK1は、ベル型・コートハンガー型胸郭変形、特徴的顔貌、腹壁異常、胎盤過形成、羊水過多といったKOS主要症状発症に関与しないと推測される。これは、DLK1が欠失範囲に含まれるために1コピーとして存在する患者 (DLK1発現量正常)、および、DLK1が欠失範囲に含まれないために2コピーとして存在する患者 (DLK1発現量2倍) が、どちらも典型的なKOS表現型を呈することに基づく。一方、RTL1は、KOS発症に密接に関与すると推測される。これは、RTL1発現量が、RTL1asの欠失により、RTL1が欠失範囲に含まれるために1コピーとして存在する患者 (RTL1発現量はRTL1asの欠失により2.5倍)、および、RTL1が欠失範囲に含まれないために2コピーとして存在する患者 (RTL1発現量はRTL1asの欠失により5倍) が、明瞭なKOS症状を有することに基づく。おそらくRTL1発現量が2.5倍になるとKOSが発症すると考えられる。興味深いことに、母由来非メチル化IG-DMRやMEG3-DMRの欠失を伴わないKOS患者が3例報告されている。これらの3症例は、全てRTL1asを共通して欠失しており、したがって、これらの患者におけるRTL1発

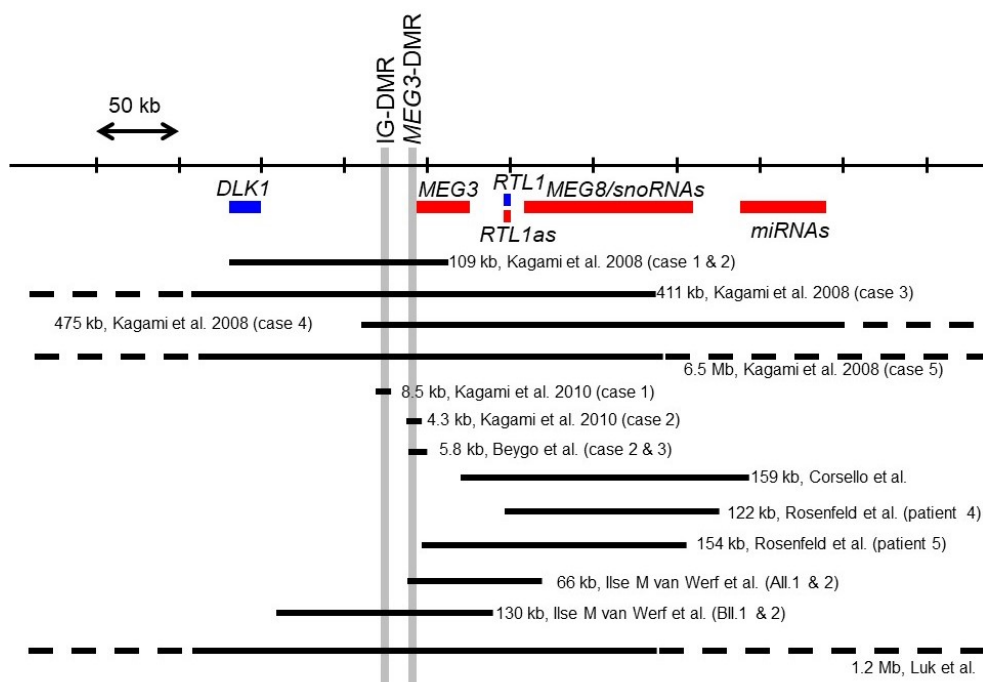


図 23 KOS 欠失症例とその欠失領域

現量は、*RTL1*が欠失範囲に含まれるために1コピーとして存在する患者と同様、2.5倍になっていると思われる。なお、母由来の第14染色体インプリンティング領域を欠失する患者では、欠失範囲のMEGsの発現が消失しているため、これがKOS発症に関与している可能性は否定できない。これについては、近年、PEGsとMEGsの相互作用が報告されており²¹⁾、さらなる研究の進展が望まれる。

今後の課題

われわれは、主に臨床研究として、Kagami-Ogata症候群における発症機序の解明、臨床診断基準の作成、遺伝子診断法の開発を行ってきた。今後、母由来非メチル化IG-DMRや*MEG3*-DMRがICとして機能する機序、母由来非メチル化IG-DMRが*MEG3*-DMRのメチル化パターンを制御する機序、臨床症状発症機序などの解明に進みたいと考えている。

おわりに

近年、ヒトインプリンティング疾患の臨床および研究が急速に進展している。臨床的には、診断・治療ガイドラインを作成するための国際会議が開催されるようになり、Silver-Russell症候群のガイドラインが公表され、現在、偽性副甲状腺機能低下症などの疾患で同様の国際会議が開催されている。そして、Kagami-Ogata症候群をはじめとして、インプリンティング疾患が、小児慢性特定疾病や指定難病制度の対象疾患の中にも含まれるようになってきた。今後、多くのインプリンティング疾患の診断・治療の向上が期待される。

文献

- Barker DJ, Osmond C: Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 327: 1077–1081, 1986.
- Gluckman PD, Hanson MA: Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science*. 305: 1733–1736. 2004.
- Monk D: Germline-derived DNA methylation and early embryo epigenetic reprogramming: The selected survival of imprints. *Int J Biochem Cell Biol* 67: 128–138, 2015.
- Renfree MB, Suzuki S, Kaneko-Ishino T: The origin and evolution of genomic imprinting and viviparity in mammals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368: 20120151, 2013.
- Moore T: Genetic conflict, genomic imprinting and establishment of the epigenotype in relation to growth. *Reproduction* 22: 185–193, 2001.
- Kagami M, Sekita Y, Nishimura G, Irie M, Kato F, Okada M, Yamamori S, Kishimoto H, Nakayama M, Tanaka Y, Matsuoka K, Takahashi T, Noguchi M, Tanaka Y, Masumoto K, Utsunomiya T, Kouzan H, Komatsu Y, Ohashi H, Kurosawa K, Kosaki K, Ferguson-Smith AC, Ishino F, Ogata T: Deletions and epimutations affecting the human 14q32. 2 imprinted region in individuals with paternal and maternal upd(14)-like phenotypes. *Nat Genet* 40: 237–242, 2008.
- Kagami M, O'Sullivan MJ, Green AJ, Watabe Y, Arisaka O, Masawa N, Matsuoka K, Fukami M, Matsubara K, Kato F, Ferguson-Smith AC, Ogata T: The IG-DMR and the MEG3-DMR at human chromosome 14q32. 2: hierarchical interaction and distinct functional properties as imprinting control centers. *PLoS Genet* 6: e1000992, 2010.
- Lin SP, Youngson N, Takada S, Seitz H, Reik W, Paulsen M, Cavaille J, Ferguson-Smith AC: Asymmetric regulation of imprinting on the maternal and paternal chromosomes at the Dlk1-Gtl2 imprinted cluster on mouse chromosome 12. *Nat Genet* 35: 97–102, 2003.
- Sekita Y, Wagatsuma H, Nakamura K, Ono R, Kagami M, Wakisaka N, Hino T, Suzuki-Migishima R, Kohda T, Ogura A, Ogata T, Yokoyama M, Kaneko-Ishino T, Ishino F: Role of retrotransposon-derived imprinted gene, Rtl1, in the feto-maternal interface of mouse placenta. *Nat Genet* 40: 243–248. 2008.
- Kagami M, Matsuoka K, Nagai T, Yamanaka M, Kurosawa K, Suzumori N, Sekita Y, Miyado M, Matsubara K, Fuke T, Kato F, Fukami M, Ogata T: Paternal uniparental disomy 14 and related disorders: placental gene expression analyses and histological examinations. *Epigenetics* 27: 1142–1150. 2012.
- Kagami M, Kurosawa K, Miyazaki O, Ishino F, Matsuoka K, Ogata T: Comprehensive clinical studies in 34 patients with molecularly defined UPD(14)pat and related conditions (Kagami-Ogata syndrome). *Eur J Hum Genet* 23: 1488–1498, 2015.
- 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* 61: 87–94, 2016.
- Kagami M, Kato F, Matsubara K, Sato T, Nishimura G, Ogata T: Relative frequency of underlying genetic causes for the development of UPD(14)pat-like phenotype. *Eur J Hum Genet* 20: 928–932, 2012.
- Jones KT: Meiosis in oocytes: predisposition to aneuploidy and its increased incidence with age. *Hum Reprod Update* 14: 143–158, 2008.
- Webster A, Schuh M: Mechanisms of Aneuploidy in Human Eggs. *Trends Cell Biol* 27: 55–68, 2017.
- Beygo J, Elbracht M, de Groot K, Begemann M, Kanber D, Platzer K, Gillissen-Kaesbach G, Vierzig A, Green A, Heller R, Buiting K, Eggermann T: Novel deletions affecting the

- MEG3-DMR provide further evidence for a hierarchical regulation of imprinting in 14q32. *Eur J Hum Genet* 23: 180–188, 2015.
17. Corsello G, Salzano E, Vecchio D, Antona V, Grasso M, Malacarne M, Carella M, Palumbo P, Piro E, Giuffrè M: Paternal uniparental disomy chromosome 14-like syndrome due a maternal de novo 160 kb deletion at the 14q32. 2 region not encompassing the IG- and the MEG3-DMRs: Patient report and genotype-phenotype correlation. *Am J Med Genet A* 167A: 3130–3138, 2015.
 18. Rosenfeld JA, Fox JE, Descartes M, Brewer F, Stroud T, Gorski JL, Upton SJ, Moeschler JB, Monteleone B, Neill NJ, Lamb AN, Ballif BC, Shaffer LG, Ravnan JB: Clinical features associated with copy number variations of the 14q32 imprinted gene cluster. *Am J Med Genet A* 167A: 345–353, 2015.
 19. van der Werf IM, Buiting K, Czeschik C, Reyniers E, Vandeweyer G, Vanhaesebrouck P, Lüdecke HJ, Wiczorek D, Horsthemke B, Mortier G, Leroy JG, Kooy RF: Novel microdeletions on chromosome 14q32. 2 suggest a potential role for non-coding RNAs in Kagami-Ogata syndrome. *Eur J Hum Genet* 24: 1724–1729, 2016.
 20. Luk HM: Familial Kagami-Ogata syndrome in Chinese. *Clin Dysmorphol.* 26: 124–127, 2017.
 21. Sanli I, Lalevée S, Cammisa M, Perrin A, Rage F, Llères D, Riccio A, Bertrand E, Feil R: Meg3 Non-coding RNA Expression Controls Imprinting by Preventing Transcriptional Upregulation in cis. *Cell Rep* 23: 337–348. 2018.
 22. Seitz H, Youngson N, Lin SP, Dalbert S, Paulsen M, Bachelier JP, Ferguson-Smith AC, Cavaillé J: Imprinted microRNA genes transcribed antisense to a reciprocally imprinted retrotransposon-like gene. *Nat Genet* 34: 261–262. 2003.