

博士論文

原因不明の Silver-Russell 症候群患者における
遺伝学的原因の解明

井 上 毅 信

原因不明の Silver-Russell 症候群患者における
遺伝学的原因の解明

東京大学大学院 医学系研究科 生殖・発達・加齢医学専攻 小児医学講座

指導教員: 岡 明 教授

井上 毅信

目次

略語一覧	4
要旨	5
序文	6
Silver-Russell 症候群について	6
Silver-Russell 症候群と病的なコピー数異常	7
Silver-Russell 症候群と 16 番染色体母性片親性ダイソミー	8
目的-1	11
方法-1	11
結果-1	14
考察-1	19
小括-1	23
目的-2	25
方法-2	25
結果-2	33
考察-2	39
小括-2	42
全体の考察	43
謝辞	44

引用文献 ······ 45

略語一覽

aCGH: array comparative genomic hybridization

BMI: body mass index

DMR: differentially methylated region

H19-hypo: hypomethylation of the *H19*-differentially methylated region at the 11p15 imprinted region

NH-CSS: Netchine-Harbison clinical scoring system

SD: standard deviation

SGA: small for gestational age

SNP: single nucleotide polymorphism

SRS: Silver-Russell syndrome

UPD(7)mat: maternal uniparental disomy of chromosome 7

UPD(16)mat: maternal uniparental disomy of chromosome 16

要旨

Silver-Russell 症候群 (SRS) は出生前後の成長障害などを特徴とするが、遺伝学的原因が不明な患者も多い。我々は、原因不明 SRS 患者 82 人を array comparative genomic hybridization 法を用いて解析し、5 人 (6.1%) に病的なコピー数異常 (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 人) を同定した。また、原因不明 SRS 患者 94 人に対してマイクロサテライトマーカー解析などを行い、2 人 (2.1%) に 16 番染色体母性片親性ダイソミーを同定した。さらに、同定した患者の臨床像の特徴を明らかにした。

序文

Silver-Russell 症候群について

Silver-Russell 症候群 (SRS) は出生前後の成長障害や特徴的な身体所見を呈するまれな症候群である [1]。SRS は臨床症状の組み合わせで診断される。現在までに複数の臨床診断基準が提唱されてきた [2-8] が、その中で Netchine-Harbison clinical scoring system (NH-CSS) が、SRS の主要な遺伝学的原因を推定する上で最も感度と陰性的中率が高かった [8]。NH-CSS には以下に示すような 6 項目の臨床症状が含まれる。すなわち (1) small for gestational age (SGA): 出生体重および/もしくは出生身長が在胎週数の標準値の -2 standard deviation (SD) スコア以下 (2) 出生後の成長障害: 24 \pm 1 か月時の身長が -2 SD スコア以下または身長が mid-parental target height の -2 SD スコア以下 (3) 出生時の相対的大頭症: 出生時の頭囲の SD スコアが出生体重および/もしくは出生身長の SD スコアより 1.5 SD スコア以上大きい (4) 前額突出 (5) 左右非対称: 0.5 cm 以上の脚長差あるいは腕の非対称もしくは脚長差が 0.5 cm 未満で他の体のパーツの 2 か所以上 (1 か所は顔以外) の非対称 (6) 摂食障害および/もしくは body mass index (BMI) 低値: 24 か月時の BMI が -2 SD スコア以下あるいは経管栄養の必要性、もしくは食欲増強目的の cyproheptadine 投与、である。以上 6 項目のうち 4 項目以上を満たした場合に臨床的に SRS と診断される。さらには、逆三角形の顔貌や、第 5 指の内彎・短縮も SRS 患者では頻繁に認められる臨床症状であり [9]、実際に多くの臨床医はこれらの所見をもとに SRS を疑う場合が多いと思われる。SRS の診断・治

療に関する国際的な consensus statement によると、NH-CSS を 4 項目以上満たした患者に加え、3 項目しか満たさないがそれ以外の臨床症状から SRS が疑わしい患者も、SRS の遺伝学的検査を行うことが望ましいとされている [1]。

SRS の主要な遺伝学的原因は、11p15 上に存在する *H19*-differentially methylated region (DMR) の低メチル化 (*H19*-hypo) と 7 番染色体母性片親性ダイソミー (UPD(7)mat) である [1]。また、まれな遺伝学的原因としては、11p15 領域の染色体構造異常・*IGF2* 変異・*CDKN1C* 変異が挙げられる [1]。近年、Azzi らは NH-CSS を 4 項目以上満たした患者の中で、*H19*-hypo と UPD(7)mat の割合がそれぞれ、58.3%・18.3%であったと報告した [8]。それらの遺伝学的原因をともに認めない SRS 表現型患者の一部において、SRS 以外のインプリンティング異常症 (Temple 症候群、20 番染色体母性片親性ダイソミー) や病的なコピー数異常などがまれに同定される [1]。*H19*-hypo と UPD(7)mat をともに認めない SRS 表現型患者の中に SRS 以外のインプリンティング異常症や遺伝性疾患が同定される理由は、SRS の臨床像は非特異的であるため他の疾患の一部と臨床像がオーバーラップするためである。臨床像から SRS と診断されても遺伝学的に異なる疾患と診断された場合は、その患者の診断は遺伝学的に診断された疾患となる。

Silver-Russell 症候群と病的なコピー数異常

SRS の表現型を有する患者において病的なコピー数異常を検索した報告は複数あり、1q21 欠失・5q35 重複・12q14 欠失・17p13 欠失・15q26 欠失・22q11 欠失・22q13

重複などが同定された。しかし、これらの報告には、(1) 患者の臨床情報が不十分 (2) 検索するコホートから SRS 以外のインプリンティング異常症が除外されていない (3) コホートが小規模といった問題点があった [6, 8, 10–12]。

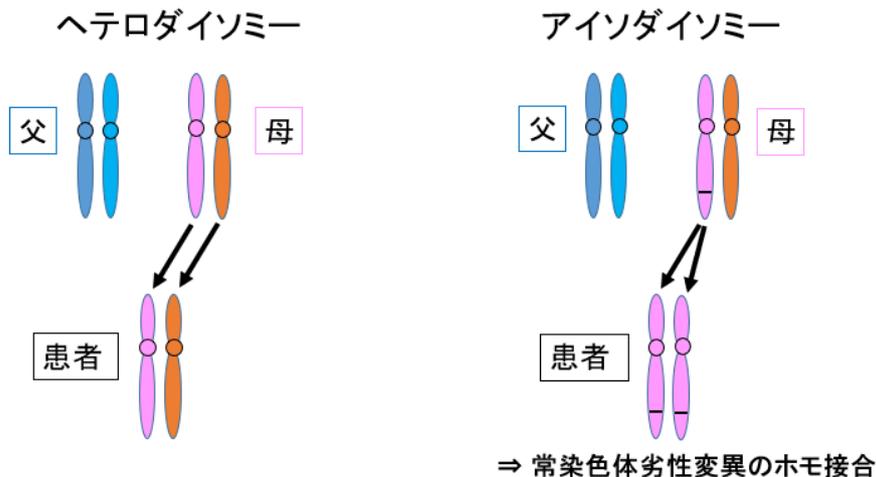


図 1: 母性片親性ダイソミーの分類

母性片親性ダイソミーは母性片親性ヘテロダイソミーと母性片親性アイソダイソミーに分類される。アイソダイソミーは常染色体劣性変異のホモ接合を引き起こす場合がある。

Silver-Russell 症候群と 16 番染色体母性片親性ダイソミー

母性片親性ダイソミーは相同染色体を母のみから受け継ぐ [13]。これにより該当する染色体上のインプリンティング遺伝子の発現異常が生じる。すなわち、母性発現遺伝子の発現は過剰となり父性発現遺伝子の発現は消失する [13]。片親性ダイソミーはヘテロダイソミーとアイソダイソミーに分類される。母性片親性ダイソミーにおいて、ヘテロダイソミーは母の相同染色体を 2 本とも受け継ぎ、アイソダイソミーは母の相同染色体のうちの 1 本を 2 コピー受け継ぐ。アイソダイソミーは常染色体劣性変異の

ホモ接合を引き起こす場合がある [13] (図 1)。片親性ダイソミー患者の多くは、ヘテロダイソミーとアイソダイソミーが混在する [13]。

16 番染色体母性片親性ダイソミー (UPD(16)mat) により、16 番染色体上のインプリンティング遺伝子の発現異常が生じる。16 番染色体上には *SOX8*・*ZNF597*・*NAA60*・*SALL1*・*C16orf57*・*ACD*・*FOXF1* の 7 個のインプリンティング遺伝子が同定あるいは想定されている [14] が、それらの遺伝子の機能は十分には解明されていない。我々が渉猟しえた限り、16 番染色体以外に染色体構造異常を認めない生産の UPD(16)mat 患者は現在までに 49 人報告されている [15–17]。UPD(16)mat が生じる機序のひとつとして 16 トリソミーのトリソミーレスキューが挙げられる [13]。UPD(16)mat の既報 49 人の中で 63.3%は出生前検査や胎盤の検索を行った際に 16 トリソミー細胞を認めたことを契機に診断され、26.5%は常染色体劣性遺伝病の精査の過程で診断された [15–17]。UPD(16)mat 患者は早産・成長障害・先天性心疾患・尿道下裂・母体の妊娠高血圧症候群といった、非特異的な特徴を呈することが知られており [15–17]、その特徴のいくつかは SRS 患者とオーバーラップする。UPD(16)mat の表現型は、(1) 16 番染色体上のインプリンティング遺伝子の発現異常 (2) アイソダイソミーにより顕在化した常染色体劣性遺伝病 (3) 胎盤に 16 トリソミー細胞が存在することによる胎盤機能不全 (4) UPD(16)mat 細胞とともに体内に存在する 16 トリソミー細胞の影響によって生じうる [18] が、それらの要因を詳細に検討した報告は存在しなかった。

近年、SRS 表現型患者において UPD(16)mat を検索した小規模な研究が 3 報発表さ

れた [8, 15, 19] が、原因不明の SRS 患者における UPD(16)mat の頻度や UPD(16)mat と SRS 患者の表現型の違いを十分に検討した報告はなかった。

我々は遺伝学的原因が不明の多数の SRS 患者を対象とし、病的なコピー数異常と UPD(16)mat を検索し、それぞれの頻度と臨床像の特徴を明らかにした。

目的-1

原因不明の SRS 患者における病的なコピー数異常を持つ患者の頻度と、その臨床像の特徴を明らかにする。

方法-1

倫理面への配慮

本研究は国立成育医療研究センターの倫理委員会で承認済みである (受付番号: 518、研究課題名: 先天奇形症候群における遺伝的原因の探索)。また、患者本人あるいは親権者から書面での研究参加の同意を取得した上で、研究を行った。病的なコピー数異常を認めた患者の顔写真は、書面で同意を取得した上で掲載した。

患者

図 2 に示す通り、我々は 2002 年から 2016 年に SRS を疑われて紹介された 292 人のうち、82 人を解析の対象とした。82 人の患者はすべて、*H19-hypo*・*UPD(7)mat* が除外されており、かつ既知のインプリンティング異常症に関係する 6 か所の DMR (*PLAGL1*:alt-TSS-DMR・*KCNQ1OT1*:TSS-DMR・*MEG3/DLK1*:IG-DMR・*MEG3*:TSS-DMR・*SNURF*:TSS-DMR・*GNAS A/B*:TSS-DMR) のメチル化係数が全て正常範囲内であった。メチル化解析は既報の通りに、combined bisulfite restriction analysis 法またはパイロシークエンス法を用いて行った [9,20]。82 人中 55 人の患者は我々が解析する前に染色体検査を施行され、染色体構造異常を認めなかった。82 人の中にカナダ人と

アメリカ人がそれぞれ 1 人ずつ含まれていたが、それ以外は日本人であった。

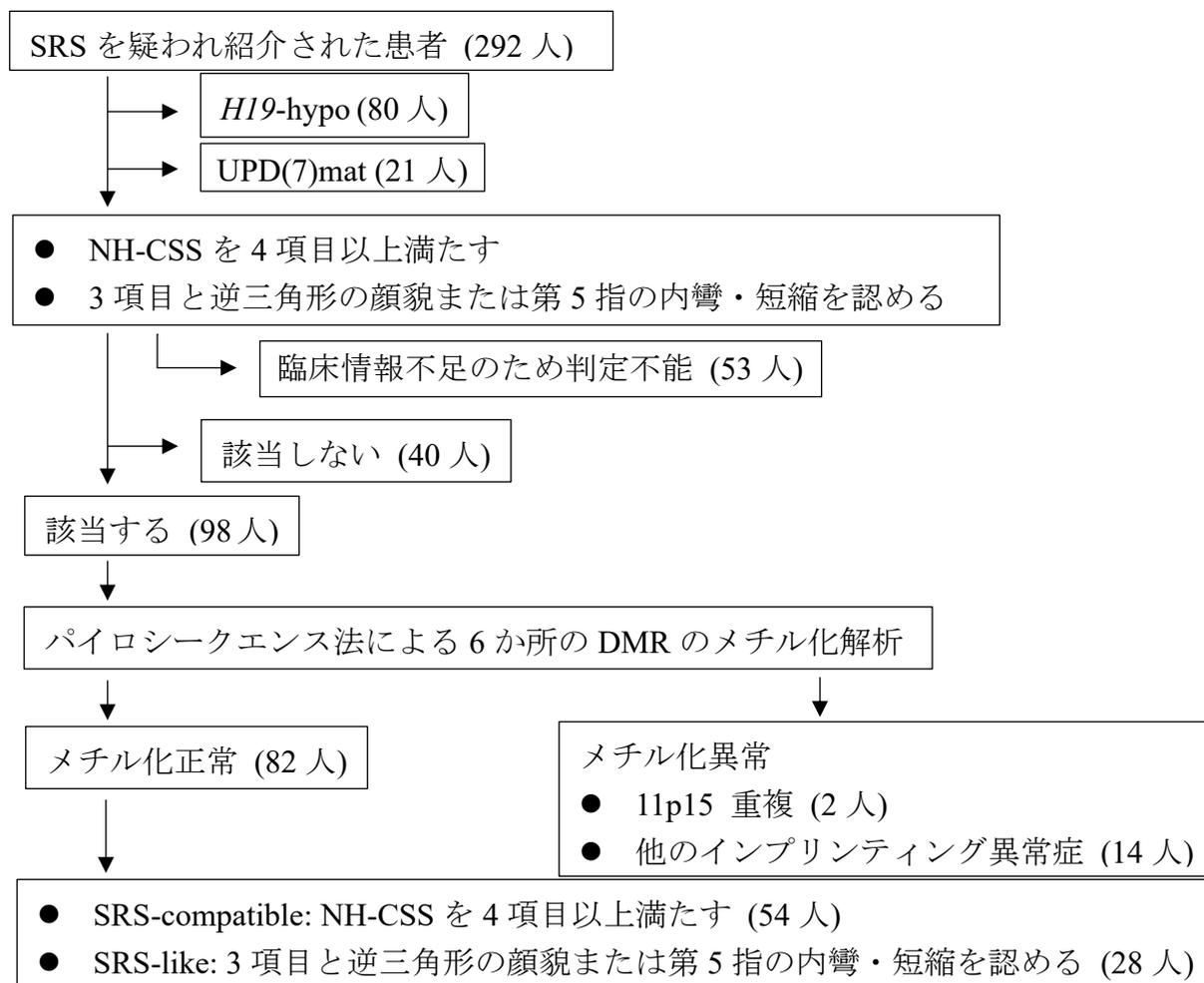


図 2: 病的なコピー数異常の検索の対象とした患者の組み入れ基準

2002 年から 2016 年に 292 人の患者が SRS を疑われて紹介された。我々は、SRS の表現型を認め、*H19-hypo*・*UPD(7)mat*、既知のインプリンティング異常症に関係する 6 か所の DMR のメチル化異常が否定された 82 人の患者を解析の対象とした。

SRS: Silver-Russell 症候群; *H19-hypo*: *H19*-differentially methylated region の低メチル化; *UPD(7)mat*: 7 番染色体母性片親性ダイソミー; NH-CSS: Netchine-Harbison clinical scoring system; DMR: differentially methylated region

患者の臨床情報は、質問紙を用いて主治医から収集した。NH-CSS を 4 項目以上満たした患者 (SRS-compatible) 54 人と、NH-CSS は 3 項目しか満たさなかったが逆三角形の顔貌または第 5 指の内彎・短縮を認めた患者 (SRS-like) 28 人が解析の対象に含

まれた。生後 23 か月未満の患者に関しては、「出生後の成長障害」の項目は判定不能であるため NH-CSS の項目から除外した。すなわち、生後 23 か月未満の患者が「出生後の成長障害」以外の NH-CSS の項目を 4 項目あるいは 5 項目満たした場合に SRS-compatible とし、3 項目に加えて逆三角形の顔貌または第 5 指の内彎・短縮を認めた場合に SRS-like とした。

分子遺伝学的解析

82 人のメチル化異常を認めない患者の白血球由来の DNA を Agilent Technologies 社のカタログアレイ (SurePrint G3 Human CGH Array Kit 8×60K [カタログ番号: G4450A]) を用いて、array comparative genomic hybridization (aCGH) 法で解析した。病的なコピー数異常を検出するために、最初に、3 つ以上の連続したプローブが異常なシグナル値を示した領域を抽出した。次に、それらの領域が病的なコピー数異常であるか否かを評価した。本研究では、Database of Genomic Variants [21] で良性のバリエーションとされているコピー数異常は病的ではないとし、既知の症候群を引き起こすと報告されているコピー数異常は病的とした。過去に報告されていないコピー数異常に関しては、コピー数異常の部分に含まれる遺伝子が SRS の表現型に関係するかを検討した。必要に応じて染色体検査も行った。

表現型の解析

我々は、本研究で病的なコピー数異常が同定された患者と、同じ病的なコピー数異常によって引き起こされる症候群の患者の表現型を比較した。さらに、病的なコピー

数異常が同定された患者における、先天性心疾患・運動発達遅滞・言語発達遅滞の頻度をそれぞれ算出した。

統計学的解析

病的なコピー数異常・*H19*-hypo・UPD(7)mat を認めた患者の臨床的特徴の頻度を、Fisher の正確検定を用いて比較した。P<0.05 であった場合に統計学的に有意であるとした。

結果-1

分子遺伝学的解析

我々は、54 人の SRS-compatible 群で 3 人 (5.6%: 患者 1-3)、28 人の SRS-like 群で 2 人 (7.1%: 患者 4、5) の病的なコピー数異常をもつ患者を同定した (表 1)。患者 1 は 4p16.3 領域に 4p 欠失症候群の責任領域 [22] を含む 3.5Mb の欠失 (図 3A) を、患者 2 は 18 トリソミー (図 3B) を、患者 3 は 19q13.11-12 領域に 19q13.11 欠失症候群の smallest region of overlap [23] を含む 3.77–4.00Mb の欠失 (図 3C) を認めた。患者 2 はその後に行った末梢血を用いた染色体検査で 18 トリソミーモザイク (46,XY [14]/47,XY,+18 [6]) であることが示された。患者 4 と 5 はともに 7q11.23 領域に Williams 症候群の責任領域 [24] を含む 1.41–1.97Mb の欠失を認めた (図 3D、E)。患者 1、3、4、5 の両親のコピー数解析では患者で同定された病的なコピー数異常を認めなかった。

表 1: 病的なコピー数異常を認めた 5 人の患者の臨床像

患者	SRS-compatible			SRS-like	
	患者 1	患者 2	患者 3	患者 4	患者 5
遺伝学的原因	4p16.3 欠失	18トリソミー モザイク	19q13.11-12 欠失	7q11.23 欠失	
核型	46,XX	46,XY [14] /47,XY,+18 [6]	46,XX	46,XY	未検査
性別	女性	男性	女性	男性	女性
年齢	9 歳	1 歳 9 か月	4 歳	19 歳	7 歳
在胎週数	34 週 1 日	40 週 4 日	34 週 3 日	40 週 0 日	40 週 5 日
出生身長	38 cm	41 cm	37.5 cm	45 cm	45 cm
(SD スコア) ^a	(-2.37)	(-4.60)	(-2.62)	(-2.36)	(-2.61)
出生体重	1246 g	1700 g	1156 g	2734 g	2276 g
(SD スコア) ^a	(-3.13)	(-4.80)	(-3.67)	(-1.45)	(-2.91)
出生時頭囲	27.0 cm	31.0 cm	24.0 cm	32.5 cm	32.4 cm
(SD スコア) ^a	(-2.17)	(-1.96)	(-3.79)	(-0.69)	(-0.92)
24 か月時の身長	70 cm		74.8 cm	85.2 cm	72.3 cm
(SD スコア) ^{b,c}	(-4.87)		(-3.63)	(-3.06)	(-3.66)
24 か月時の BMI の SD スコア ^{b,c}	-3.34		-4.18	+0.27	+1.00
身長	104.5 cm	73.3 cm	86.1 cm	156.4 cm	106.0 cm
(SD スコア) ^b	(-3.82)	(-3.38)	(-3.28)	(-2.38)	(-2.64)
	(8 歳)		(3 歳 10 か月)	(16 歳)	
体重	11.6 kg	8.77 kg	8.9 kg	50.8 kg	20.3 kg
(SD スコア) ^b	(-7.86)	(-2.28)	(-5.06)	(-1.25)	(-0.58)
	(8 歳)		(3 歳)	(16 歳)	
頭囲	46.1 cm	47.8 cm	42.5 cm	不明	不明
(SD スコア) ^b	(-4.29)	(+0.20)	(-3.96)		
	(8 歳)	(1 歳 7 か月)	(2 歳)		
成長ホルモン投与	-	-	3 歳 1 か月~	5~16 歳	-
SGA ^d	+	+	+	+	+
出生後の成長障害 ^{c,e}	+		+	+	+
相対的大頭症 ^f	-	+	-	+	+
前額突出	+	+	+	-	-
左右非対称	-	+	-	-	-

摂食障害/BMI 低値	+	+	+	-	-
NH-CSS	4/6	5/5	4/6	3/6	3/6
逆三角形の顔貌	+	+	+	+	+
第 5 指内彎	-	-	-	-	+
第 5 指短縮	-	-	+	+	+
先天性心疾患	心房中隔 欠損症	心室中隔 欠損症	-	-	-
発達					
運動発達遅滞	+	-	+	+	+
定頸獲得	不明	4 か月	7 か月	不明	3 か月
独座獲得	-	6 か月	9 か月	不明	10 か月
独歩獲得	-	14 か月	26 か月	不明	24 か月
言語発達遅滞	+	+	+	+	+
知能指数/発達指数	10	78	50	50	50
(検査年齢)	(9 歳)	(1 歳 9 か月)	(2 歳 10 か月)	(8 歳)	(5 歳)

SRS: Silver-Russell 症候群; SD: standard deviation; SGA: small for gestational age; BMI: body mass index; NH-CSS: Netchine-Harbison clinical scoring system

^a 出生身長・出生体重・出生時頭囲は性別・在胎週数を一致させた日本人の標準値で評価した (http://jspe.umin.jp/medical/chart_dl.html)。

^b 出生後の身長・BMI・体重・頭囲は性別・年齢を一致させた日本人の標準値で評価した (http://jspe.umin.jp/medical/chart_dl.html)。

^c 24±1 か月時の体格の情報が得られない場合は、25 か月より大きく 24 か月に一番近い時点の体格を用いた。

^d 出生身長および/もしくは出生体重が在胎週数の標準値の-2 SD スコア以下。

^e 24±1 か月時の身長が標準値の-2 SD スコア以下または、mid-parental target height の-2 SD スコア以下。mid-parental target height は以下のように算出した。男性: [(父の身長+母の身長)/2] +6.5cm、女性: [(父の身長+母の身長)/2]-6.5cm。

^f 出生時の頭囲の SD スコアが出生身長および/もしくは出生体重の SD スコアより 1.5 SD スコア以上大きい。

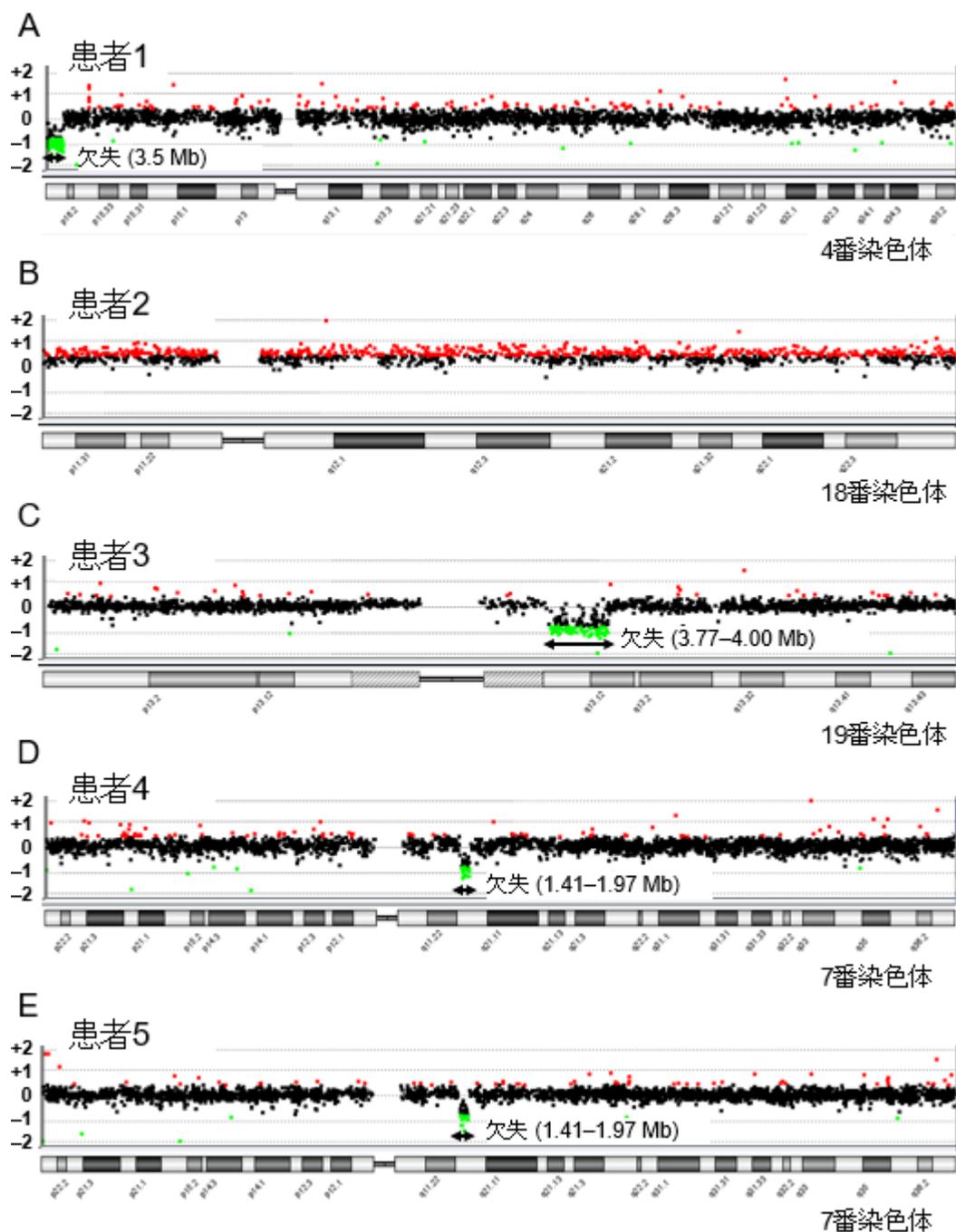


図3: 病的なコピー数異常を認めた5人の患者の aCGH 法による解析結果

A: 患者1 (SRS-compatible、4p16.3 欠失); B: 患者2 (SRS-compatible、18 トリソミーモザイク); C: 患者3 (SRS-compatible、19q13.11-12 欠失); D: 患者4 (SRS-like、7q11.23 欠失); E: 患者5 (SRS-like、7q11.23 欠失)。黒色・赤色・緑色の点はそれぞれ、コピー数正常・増加 (>+0.4)・減少 (<-0.8) を示す。

aCGH: array comparative genomic hybridization; SRS: Silver-Russell 症候群

A 患者3 (3歳)



B 患者4 (19歳)



図 4: 病的なコピー数異常を認めた患者の写真

A: 患者 3 (SRS-compatible、19q13.11 欠失症候群)。本患者は 19q13.11 欠失症候群に特徴的な所見である後頭部の皮膚欠損を認めた。B: 患者 4 (SRS-like、Williams 症候群)。

SRS: Silver-Russell 症候群

表現型の解析

表 1 に病的なコピー数異常を持つ 5 人の患者の臨床像を示す。4p16.3 に 3.5Mb の欠失を認めた患者 1 は、在胎 34 週で出生し、重症新生児仮死と脳室周囲白質軟化症を合併していた。患者 1 は 4p 欠失症候群患者でも認められる NH-CSS の中の 4 項目の所見を認めており、かつ前頭部に連続する幅広い鼻稜・重度の発達遅滞・心房中隔欠

損症・てんかん・難聴といった、4p 欠失症候群に特徴的な所見も伴っていた [22]。18 トリソミーモザイクであることが判明した患者 2 は、まだ 2 歳に達していなかったために、NH-CSS における「出生後の成長障害」の項目は評価できなかった。しかしそれ以外の NH-CSS の 5 項目の所見に加え、心室中隔欠損症を認めたが、18 トリソミーに特徴的な所見である、折り重なり指や揺り椅子状の足底を認めなかった [25]。

19q13.11-12 欠失が同定された患者 3 は、NH-CSS の 4 項目に加えて、後頭部の皮膚欠損といった 19q13.11 欠失症候群に特徴的な所見も認めた [23] (図 4A)。本患者は中等度の発達遅滞を認めた。患者 4 と 5 は NH-CSS 3 項目と逆三角形の顔貌、第 5 指の内彎・短縮に加えて、中等度の発達遅滞も来していた。しかし、この 2 人の患者は、Williams 症候群に特徴的な、心血管疾患・高カルシウム血症・関節の過可動性・眼窩周囲の膨らみを認めなかった [26] (図 4B)。

病的なコピー数異常を認めた 5 人の患者の臨床的特徴の頻度を表 2 に示す。先天性心疾患は 2 人に同定された。運動発達遅滞・言語発達遅滞は 5 人の患者のうち患者 2 以外の全例に認められた。

考察-1

我々は、インプリンティング異常症に関連する DMR にメチル化異常を認めない 54 人の SRS-compatible 患者と 28 人の SRS-like 患者を対象として、最も大規模なゲノムワイドなコピー数解析を行った。その結果、病的なコピー数異常を SRS-compatible 患

者の 5.6%、SRS-like 患者の 7.1%に同定した。NH-CSS を用いて SRS と臨床診断した患者に対してゲノムワイドなコピー数解析をした報告は現在までに 2 報存在する。

Azzi らは NH-CSS を 4 項目以上満たし、*H19-hypo*・*UPD(7)mat*・*CDKN1C* 変異・他のインプリンティング異常症や片親性ダイソミーが除外された患者 11 人を検索し、病的なコピー数異常 (1q21 欠失) を 1 人 (9%) に同定した [8]。Sachwitz らは NH-CSS を満たし、*H19-hypo*・*UPD(7)mat*・*IGF2* 変異・*CDKN1C* 変異・6q24、14q32、20q13 領域のメチル化異常を認めなかった患者 17 人の中で、2 人 (12%) の病的なコピー数異常 (5q35 重複・4p16.3 欠失と 7q36 重複を合併) を持つ患者を同定した [12]。我々の研究と既報とでは解析方法やコホートに含まれる患者数が異なるが、*H19-hypo*・*UPD(7)mat* や他のインプリンティング異常症を認めず、SRS の表現型を持つ患者における病的なコピー数異常の頻度は同程度であった。

本研究で同定した病的なコピー数異常は全て、過去に 4p 欠失症候群・18 トリソミー・19q13.11 欠失症候群・Williams 症候群の原因として報告されているものであった。検索しえた限りで、4p 欠失症候群・19q13.11 欠失症候群・Williams 症候群患者で、臨床的に SRS を疑われた報告はない。SRS を疑われたが実際には 18 トリソミーモザイクであった患者は 1 人報告がある [27]。その患者は、逆三角形の顔貌や第 5 指の短縮に加えて、出生前後の成長障害・哺乳不良・体重増加不良・頭囲拡大・胸部と四肢の非対称を呈していた。SGA や摂食障害といった NH-CSS の項目は 18 トリソミーの患者でも認められる [25]。さらに、18 トリソミーモザイクの患者の表現型は典型的な

18 トリソミーの表現型からほぼ正常まで様々である [28]。実際に患者 2 の表現型は 18 トリソミーとしては典型的ではなかったが、SRS と 18 トリソミーに共通する特徴のいくつかを認めた。このように、18 トリソミーモザイク患者は SRS の臨床像を示す可能性がある。4p 欠失症候群の臨床症状のいくつかは SRS とオーバーラップする。SRS も 4p 欠失症候群もともに出生前後の成長障害を呈し、前額突出といった顔貌の特徴も認める [22]。重度の発達遅滞・てんかん・難聴は 4p 欠失症候群の特徴である [22]。患者 1 は重症新生児仮死や脳室周囲白質軟化症の既往があったため、発達遅滞やてんかんは、4p 欠失症候群の症状としてではなく、SRS に合併した神経学的後遺症として認識されていた。神経学的後遺症の存在が原疾患の診断を困難とし、非特異的臨床像をもつ SRS と臨床診断されたことを示す。我々が検索しえた限り患者 3 の遺伝学的診断である 19q13.11 欠失症候群の既報は 25 人のみであり、出生前後の成長障害・細い体形・重度の摂食障害・小頭症・精神運動発達遅滞・尿道下裂・後頭部の皮膚欠損を認める [23, 29–31]。19q13.11 欠失症候群と SRS は表現型がオーバーラップするため、19q13.11 欠失症候群を SRS の鑑別診断として考慮する必要がある。患者 4、5 は Williams 症候群としては非典型的な表現型を呈していた。加えて、患者 4、5 で認められた出生前後の成長障害や第 5 指の内彎は Williams 症候群と SRS で共通する臨床的特徴である [26]。このように、臨床像が非典型的な Williams 症候群は SRS と診断されることがある。

我々は病的なコピー数異常を認めた患者の臨床的特徴の頻度を、過去に報告された

H19-hypo・*UPD(7)mat* 患者と比較した [9, 32] (表 2)。病的なコピー数異常を持つ患者における先天性心疾患の頻度は、*H19-hypo*・*UPD(7)mat* 患者と比較して有意に高かった。運動発達遅滞の頻度は、病的なコピー数異常を認めた患者と *H19-hypo* 患者との比較・病的なコピー数異常を認めた患者と *UPD(7)mat* 患者との比較でともに有意な差はなかった。言語発達遅滞の頻度は、病的なコピー数異常を持つ患者は *H19-hypo* 患者と比較して有意に高かったが、*UPD(7)mat* 患者と比較して有意差はなかった。

UPD(7)mat 患者では、7 番染色体上に存在する言語発達に關与する *FOXP2* 遺伝子の発現異常により言語発達遅滞が引き起こされる可能性が考えられている [33]。患者 2 以外の病的なコピー数異常を認めた患者は全例、中等度から重度の発達遅滞を来した一方で、既報の *H19-hypo*・*UPD(7)mat* 患者のほとんどは発達遅滞を認めないか、認めたととしても軽度であった [34]。本検討により、病的なコピー数異常を持つ患者において、先天性心疾患や明らかな発達遅滞を合併する頻度が高いことが示された。より良い医学管理や遺伝カウンセリングを提供するために、先天性心疾患や明らかな発達遅滞を認める SRS 表現型患者に対しては、コピー数解析を考慮すべきだと考えられる。

表 2: 病的なコピー数異常を認めた患者と既報の SRS 患者の表現型の比較

	病的なコピー数		既報の SRS 患者		P 値	
	異常の患者	<i>H19</i> -hypo	UPD(7)mat	vs. <i>H19</i> -hypo	vs.UPD(7)mat	
SGA ^a	5/5	43/43	9/9	1.0000	1.0000	
出生後の成長障害 ^{b,c}	4/4	29/35	8/9	0.6020	1.0000	
相対的大頭症 ^d	3/5	29/29	7/9	0.0178	0.5804	
前額突出	3/5	31/37	7/9	0.2368	0.5804	
左右非対称	1/5	30/37	3/9	0.0126	1.0000	
摂食障害/BMI 低値	3/5	16/34	6/9	0.6614	1.0000	
先天性心疾患	2/5	8/145	0/17	0.0361	0.0433	
運動発達遅滞	4/5	18/37	6/9	0.3465	1.0000	
言語発達遅滞	5/5	8/31	6/9	0.0034	0.2582	
引用文献		[9, 32]	[9, 32]			

SRS: Silver-Russell 症候群; *H19*-hypo: *H19*-differentially methylated region の低メチル化; UPD(7)mat: 7 番染色体母性片親性ダイソミー; SGA: small for gestational age; BMI: body mass index

^a 出生身長および/もしくは出生体重が性別・在胎週数を一致させた日本人の標準値 (http://jspe.umin.jp/medical/chart_dl.html) の-2 standard deviation (SD) スコア以下。

^b24±1 か月時の身長が性別・年齢を一致させた日本人の標準値 (http://jspe.umin.jp/medical/chart_dl.html) の-2 SD スコア以下。

^c24±1 か月時の体格の情報が得られない場合は、25 か月より大きく 24 か月に一番近い時点の体格を用いた。

^d 出生時の頭囲の SD スコアが出生身長および/もしくは出生体重の SD スコアより 1.5 SD スコア以上大きい。

P < 0.05 を太字とした。

小括-1

我々は、SRS-compatible 群の 5.6%、SRS-like 群の 7.1%に病的なコピー数異常を同定した。本検討により、神経学的後遺症の存在が原疾患の診断を困難とし、非特異的臨床像をもつ SRS と臨床診断されうること、18 トリソミーモザイク・19q13.11 欠失症候群・非典型的な Williams 症候群を SRS の鑑別診断として考慮する必要性が示さ

れた。また、先天性心疾患や明らかな発達遅滞を認める SRS 表現型患者に対しては、
コピー数解析を考慮すべきである。

目的-2

原因不明の SRS 患者における UPD(16)mat の頻度・UPD(16)mat 患者の表現型の特徴・UPD(16)mat の表現型を引き起こす要因を明らかにする。

方法-2

倫理面への配慮

本研究は国立成育医療研究センターの倫理委員会で承認済みである (受付番号: 518、研究課題名: 先天奇形症候群における遺伝的原因の探索)。また、患者本人あるいは親権者から書面での研究参加の同意を取得した上で、研究を行った。UPD(16)mat を認めた患者の顔写真は、書面で同意を取得した上で掲載した。

患者

図 5 に研究の対象を示す。我々は前半の研究からさらに患者を集積した結果、2002 年から 2017 年に SRS を疑われて紹介された患者は 330 人となった。そのうち 94 人を今回の研究の対象とした。94 人の患者は *H19*-hypo・UPD(7)mat が除外されており、かつ既知のインプリンティング異常症に関係する 6 か所の DMR (*PLAGL1*:alt-TSS-DMR・*KCNQ1OT1*:TSS-DMR・*MEG3/DLK1*:IG-DMR・*MEG3*:TSS-DMR・*SNURF*:TSS-DMR・*GNAS A/B*:TSS-DMR) のメチル化係数が正常範囲内であり、さらに aCGH 法による検索でも病的なコピー数異常を認めなかった。患者の臨床情報は、質問紙を用いて主治医から収集した。94 人中 NH-CSS を 4 項目以上満たした患者 (SRS-compatible)

は 63 人、NH-CSS を 3 項目しか満たさないが逆三角形の顔貌または第 5 指の内彎・短縮を認めた患者 (SRS-like) は 31 人であった。我々が解析の対象とした 94 人の患者はカナダ人 1 人とアメリカ人 1 人以外は日本人であった。

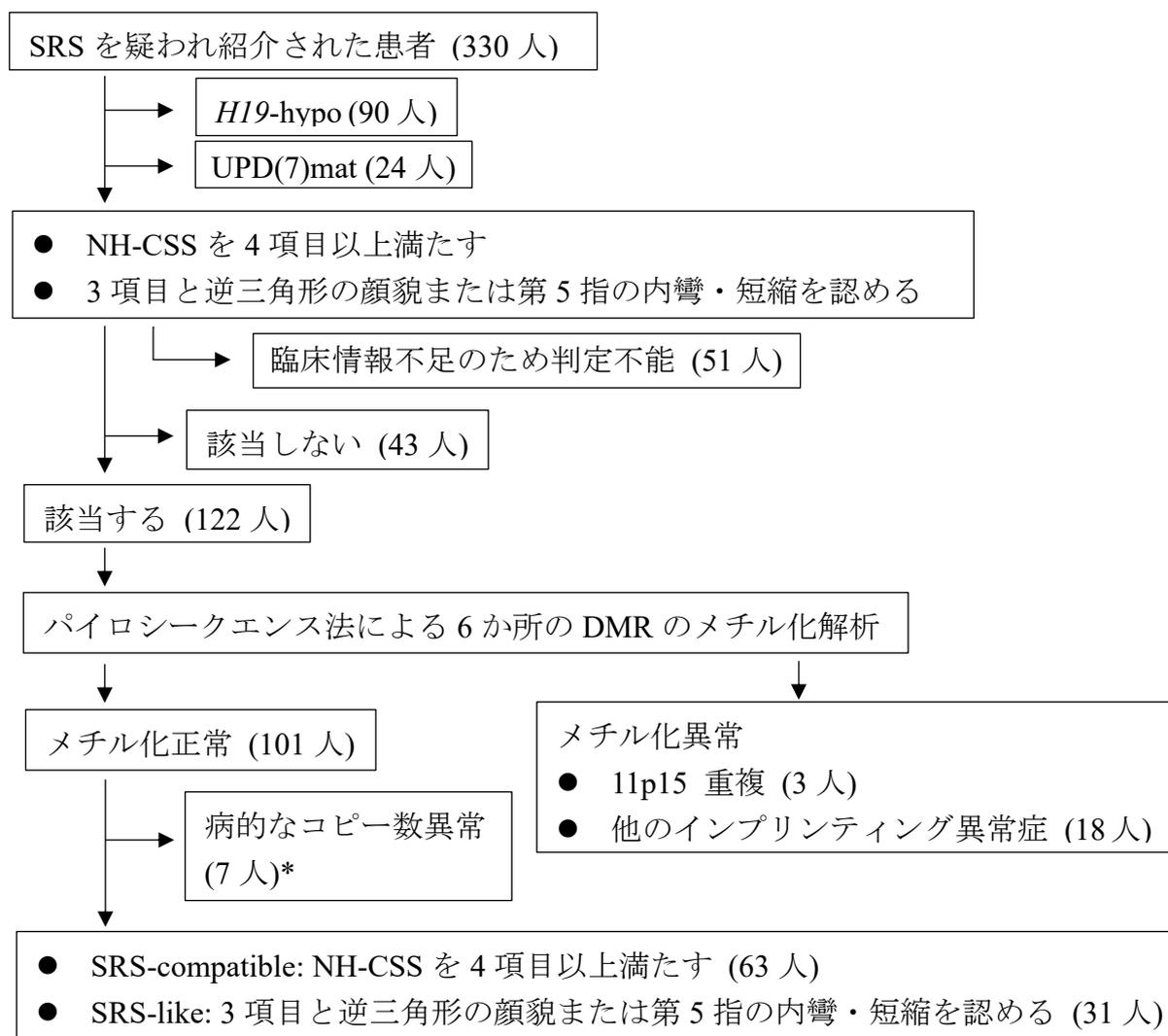


図 5: UPD(16)mat の検索の対象とした患者の組み入れ基準

2002 年から 2017 年に 330 人の患者が SRS の遺伝学的解析のために紹介された。我々は、SRS の表現型を持ち、かつ *H19-hypo*・UPD(7)mat、既知のインプリンティング異常症に関する 6 か所の DMR のメチル化異常が否定され、さらに病的なコピー数異常を認めなかった 94 人の患者を解析の対象とした。

SRS: Silver-Russell 症候群; *H19-hypo*: *H19-differentially methylated region* の低メチル化; UPD(7)mat: 7 番染色体母性片親性ダイソミー; NH-CSS: Netchine-Harbison clinical

scoring system; DMR: differentially methylated region; UPD(16)mat: 16番染色体母性片親性ダイソミー

*前半の研究で同定した患者 5 人に加えて、1q24-25 欠失・12q14-15 欠失を持つ患者をそれぞれ 1 人ずつ同定した。

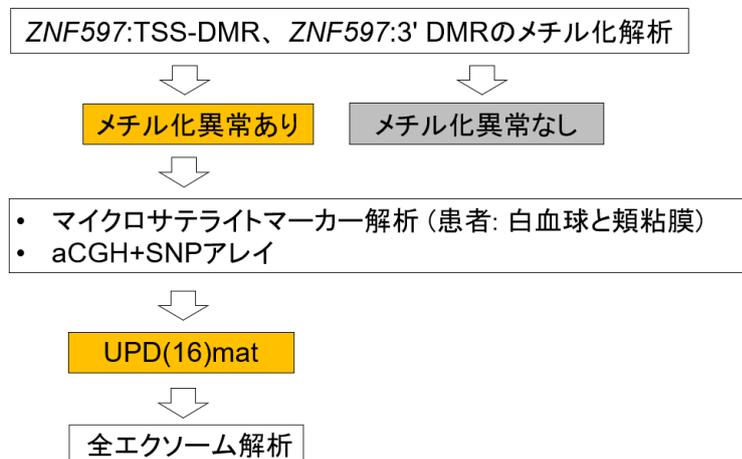


図 6: UPD(16)mat の検索のために行った解析の手順

16 番染色体上の 2 つの DMR のメチル化解析で異常を認めた患者に対して、マイクロサテライトマーカー解析と aCGH+SNP アレイを行った。マイクロサテライトマーカー解析は組織間モザイクの可能性も考慮し、患者の白血球・頬粘膜両方の由来の DNA を用いて行った。UPD(16)mat と診断した患者に対しては全エクソーム解析を行った。DMR: differentially methylated region; aCGH: array comparative genomic hybridization; SNP: single nucleotide polymorphism; UPD(16)mat: 16 番染色体母性片親性ダイソミー

分子遺伝学的解析

図 6 に分子遺伝学的解析の手順を示す。最初に既報 [20, 35] の通りに、父由来アレルでメチル化されている 16 番染色体上の *ZNF597*:TSS-DMR に対して、対象の患者の白血球由来のバイサルファイト処理した DNA を用いて、パイロシークエンス法でメチル化解析を行った。*ZNF597*:TSS-DMR に関しては 4 か所の CpG ポジションでメチル化係数を評価した。正常コントロール 50 検体のメチル化係数を取得し、その最大値と最小値を正常上限、正常下限と設定した。患者検体の 4 か所の CpG ポジションメチル化係数が正常範囲内かを評価し、CpG ポジションの過半数が正常範囲内であっ

た場合はメチル化正常、過半数が最大値を上回っていた場合は高メチル化、過半数が最小値を下回っていた場合は低メチル化と判定した。次に、*ZNF597*:TSS-DMR が低メチル化の患者に対して、母由来アレルでメチル化をされている *ZNF597*:3' DMR のメチル化解析を行った。*ZNF597*:3' DMR に関しては 5 か所の CpG ポジションでメチル化係数を評価した。メチル化正常、高メチル化、低メチル化の判定は上記と同様の方法で行った。これらの DMR でメチル化異常を認めた患者とその両親の白血球由来の DNA を用いて、16 番染色体のマイクロサテライトマーカー解析を行った。マイクロサテライトマーカー解析は組織間モザイクの可能性も考慮し、患者の白血球・頬粘膜両方の由来の DNA を用いて行った。プライマーの配列は表 3 に示す通りである。さらに、Agilent Technologies 社の aCGH+single nucleotide polymorphism (SNP) アレイ (SurePrint G3 Human CGH+SNP 4×180K Kit [カタログ番号: G4890A]) による解析を行った。最後に、患者とその両親に対して、表現型に関連する遺伝子変異の検索を全エクソーム解析で行った。患者 1 の母は重度の低身長を認めたため、遺伝子変異の検索の対象とした。Agilent Technologies 社の SureSelect Human All ExonV6 kit を用いてライブラリ調整し、患者 1 は 150bp のペアエンドモードで Illumina 社の HiSeq 4000 を用いて、患者 2 は 101bp のペアエンドモードで Illumina 社の HiSeq 2500 を用いて、それぞれシーケンスを行った。シーケンスしたリードは既報の通りに解析した [36]。

Burrows-Wheeler Aligner 0.7.13 を用いてヒト参照ゲノム配列 (hg19/GRCh37) に対してマッピングし、Picard 2.1.1 を用いて重複リードを除去し、Genome Analysis Toolkit 3.5

を用いてバリエーションの検出を行った。さらに、1000 ゲノムプロジェクト・Exome Aggregation Consortium・Human Genetic Variation Database・in-house のコントロールデータに基づき、レアバリエーションの絞り込みを行った。本研究では非同義塩基置換とエクソン・イントロン境界部の塩基置換に注目した。一般集団でアレル頻度が1%以上であったバリエーション、in-house の8検体のコントロールデータのいずれかで認められたバリエーションを除外した。絞り込まれたレアバリエーションから、成長障害に関連する356個の遺伝子 [37]、非症候群性の尿道下裂に関連する25個の遺伝子 [38] (表4)、Online Mendelian Inheritance in Man [39] に既知の症候群の原因として報告されている遺伝子のレアバリエーションを抽出し、患者の表現型と合致するかを検討した。

表 3: 本解析で用いたプライマーの配列

	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')	Sequence primer
<パイロシーケンス法>			
ZNF597:TSS-	GAAGAAGGATAGAAAGAAG	biotin-CCCRCCCTCTCAATCA	AAAGAAGATTG
DMR	ATTGGGAGAT	CCTTACTC	GGAGATA
ZNF597:3'	GGATATGGTTAGGTATATGG	biotin-TCAAAAAAATCCTAA	GGGTATYGGAA
DMR	TTAAATTT	ATCTCCAACCTAAC	GTGGT
<マイクロサテライトマーカー解析>			
D16S521	GAGCGAGACTCCGTCTAAA	CAGCAGCCTCAGGGTT	
D16S3027	ATATTTGGCATCTGGGG	CCAGCATGAGTTGCTT	
D16S418	TGTNAGGTATGAGACACTGC	CACCTTCTTGCCTTTCATTC	
D16S3102	CATGGGGACTCTGGCTAAC	ATCGTGTAATGACTGCCACA	
		A	
D16S3103	GCTTTGAGTCTCCACATCTA	GGCCAGCAGGTCTTCCTA	
	TGA		
D16S403	GTTTTCTCCCTGGGACATTT	TATTCATTTGTGTGGGCATG	
D16S3100	CTTTTGCCTGGATGCTG	TTAATGAAGTGTAACACATA	
		TGCAC	
D16S3136	ATTGCCCTCAAGAACAGC	GTGCTATGCCATCCCAG	
D16S3034	TAATCTAGTTAAAGATGCAA	GCTCAGAAGTTTTGATGCC	
	CTGCC		
D16S514	CTATCCACTCACTTCCAGG	TCCCAGTATCATCTTCTC	
D16S3066	AGTCAGGACACGATGGTTTG	CCCAGTTCCAATGGCAC	
D16S3049	GCAATGAAGGCAACAAAGT	TTAAAAGACCTGGGGGAAT	
D16S3091	GGGAGATAGCCTTAAACTTT	TGTTGCTAATAACACTAGGC	
	CTTAC	CA	

R: A または G (purine); Y: C または T (pyrimidine); DMR: differentially methylated region

表 4: 全エクソーム解析で検索した遺伝子

成長障害						尿道下裂
<i>ACAN</i>	<i>COL5A2</i>	<i>FUCA1</i>	<i>KISS1</i>	<i>PEX7</i>	<i>SMARCAL1</i>	<i>AR</i>
<i>ACVR1</i>	<i>COL9A1</i>	<i>G6PC</i>	<i>KISS1R</i>	<i>PHEX</i>	<i>SMC1A</i>	<i>ATF3</i>
<i>ADA</i>	<i>COL9A2</i>	<i>GALNS</i>	<i>KRAS</i>	<i>PHF6</i>	<i>SMC3</i>	<i>BMP4</i>
<i>ADAMTS10</i>	<i>COL9A3</i>	<i>GDF5</i>	<i>LBR</i>	<i>PITX2</i>	<i>SMO</i>	<i>BMP7</i>
<i>ADAMTS2</i>	<i>COMP</i>	<i>GH1</i>	<i>LEMD3</i>	<i>PLAGL1</i>	<i>SMPD1</i>	<i>BNC2</i>
<i>ADAMTSL2</i>	<i>CREBBP</i>	<i>GH2</i>	<i>LEPRE1</i>	<i>PLOD2</i>	<i>SNAP47</i>	<i>CTGF</i>
<i>AGPS</i>	<i>CRTAP</i>	<i>GHR</i>	<i>LFNG</i>	<i>POR</i>	<i>SOCS3</i>	<i>CYP11A1</i>
<i>ALG12</i>	<i>CTDP1</i>	<i>GHRH</i>	<i>LHX3</i>	<i>POU1F1</i>	<i>SOS1</i>	<i>CYR61</i>
<i>ALMS1</i>	<i>CTSK</i>	<i>GHRHR</i>	<i>LHX4</i>	<i>PQBP1</i>	<i>SOST</i>	<i>DGKK</i>
<i>ALPL</i>	<i>CUL4B</i>	<i>GHRL</i>	<i>LIFR</i>	<i>PRG4</i>	<i>SOX2</i>	<i>EGF</i>
<i>ALX4</i>	<i>CUL7</i>	<i>GHSR</i>	<i>LIG4</i>	<i>PROKR2</i>	<i>SOX3</i>	<i>ESR1</i>
<i>ANKH</i>	<i>CYP11B1</i>	<i>GJA1</i>	<i>LMBR1</i>	<i>PROP1</i>	<i>SOX5</i>	<i>ESR2</i>
<i>ANO5</i>	<i>CYP19A1</i>	<i>GLB1</i>	<i>LMNA</i>	<i>PTCH1</i>	<i>SOX6</i>	<i>FGF8</i>
<i>ANTXR2</i>	<i>CYP21A2</i>	<i>GLI2</i>	<i>LMX1B</i>	<i>PTCH2</i>	<i>SOX9</i>	<i>FGFR2</i>
<i>ARL6</i>	<i>CYP27B1</i>	<i>GLI3</i>	<i>LRP5</i>	<i>PTEN</i>	<i>SPG20</i>	<i>GSTM1</i>
<i>ARSB</i>	<i>DHCR24</i>	<i>GNAS</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>PTH</i>	<i>SRY</i>	<i>GSTT1</i>
<i>ARSE</i>	<i>DHCR7</i>	<i>GNPAT</i>	<i>MAP2K2</i>	<i>PTH1R</i>	<i>SST</i>	<i>HOXA4</i>
<i>ATP6V0A2</i>	<i>DLL3</i>	<i>GNPTAB</i>	<i>MAPK1</i>	<i>PTHLH</i>	<i>STAT3</i>	<i>HOXB6</i>
<i>ATP7A</i>	<i>DLX3</i>	<i>GNRH1</i>	<i>MAPK3</i>	<i>PTPN11</i>	<i>STAT5B</i>	<i>HSD3B2</i>
<i>ATP8B1</i>	<i>DYM</i>	<i>GNRHR</i>	<i>MATN3</i>	<i>PXMP3</i>	<i>TAC3</i>	<i>HSD17B3</i>
<i>ATR</i>	<i>EBP</i>	<i>GPC3</i>	<i>MC4R</i>	<i>RAB23</i>	<i>TACR3</i>	<i>MAMLD1</i>
<i>ATRX</i>	<i>EFNB1</i>	<i>GUSB</i>	<i>MECP2</i>	<i>RAB3GAP1</i>	<i>TAZ</i>	<i>MIDI</i>
<i>B3GALTL</i>	<i>EIF2AK3</i>	<i>HCCS</i>	<i>MESP2</i>	<i>RAB3GAP2</i>	<i>TBCE</i>	<i>NR5A1</i>
<i>B4GALT7</i>	<i>EP300</i>	<i>HESX1</i>	<i>MEST</i>	<i>RAF1</i>	<i>TBX1</i>	<i>SRD5A2</i>
<i>BBS1</i>	<i>ERCC2</i>	<i>HIF1A</i>	<i>MGP</i>	<i>RAI1</i>	<i>TBX15</i>	<i>WT1</i>
<i>BBS10</i>	<i>ERCC3</i>	<i>HMGA2</i>	<i>MKKS</i>	<i>RBM28</i>	<i>TBX3</i>	
<i>BBS12</i>	<i>ESCO2</i>	<i>HOXA11</i>	<i>MKS1</i>	<i>RECQL4</i>	<i>TBX4</i>	
<i>BBS2</i>	<i>ESR1</i>	<i>HOXA13</i>	<i>MMP13</i>	<i>RNF135</i>	<i>TBX5</i>	
<i>BBS4</i>	<i>ESR2</i>	<i>HOXD13</i>	<i>MMP2</i>	<i>ROR2</i>	<i>TCF4</i>	
<i>BBS5</i>	<i>EVC</i>	<i>HPRT1</i>	<i>MMP9</i>	<i>RPL11</i>	<i>TCOF1</i>	
<i>BBS7</i>	<i>EVC2</i>	<i>HRAS</i>	<i>MNX1</i>	<i>RPL35A</i>	<i>TGFB1</i>	
<i>BBS9</i>	<i>EXT1</i>	<i>HSPG2</i>	<i>MRPS16</i>	<i>RPL5</i>	<i>TGFB2</i>	
<i>BMP2</i>	<i>EXT2</i>	<i>HYAL1</i>	<i>MSX2</i>	<i>RPS17</i>	<i>TGFBR1</i>	
<i>BMP4</i>	<i>FANCA</i>	<i>ICK</i>	<i>MYCN</i>	<i>RPS19</i>	<i>TGFBR2</i>	
<i>BMP5</i>	<i>FANCB</i>	<i>IDUA</i>	<i>NBN</i>	<i>RPS24</i>	<i>THRA</i>	
<i>BMP6</i>	<i>FANCC</i>	<i>IFT80</i>	<i>NEU1</i>	<i>RPS6KA3</i>	<i>THRB</i>	

<i>BMP7</i>	<i>FANCD2</i>	<i>IGBP1</i>	<i>NF1</i>	<i>RPS7</i>	<i>TNFRSF11A</i>
<i>BMPRI1A</i>	<i>FANCE</i>	<i>IGF1</i>	<i>NFKB1A</i>	<i>RUNX2</i>	<i>TNFRSF11B</i>
<i>BMPRI1B</i>	<i>FANCF</i>	<i>IGF1R</i>	<i>NIPBL</i>	<i>SALL1</i>	<i>TNFSF11</i>
<i>BMPR2</i>	<i>FANCG</i>	<i>IGF2</i>	<i>NLRP3</i>	<i>SALL4</i>	<i>TP63</i>
<i>BRAF</i>	<i>FANCI</i>	<i>IGF2R</i>	<i>NOG</i>	<i>SBDS</i>	<i>TRAPPC2</i>
<i>BRCA2</i>	<i>FANCL</i>	<i>IGFALS</i>	<i>NPPC</i>	<i>SDHA</i>	<i>TRIM32</i>
<i>BTK</i>	<i>FANCM</i>	<i>IGFBP1</i>	<i>NPR2</i>	<i>SECISBP2</i>	<i>TRIM37</i>
<i>BUB1B</i>	<i>FBLN1</i>	<i>IGFBP2</i>	<i>NSD1</i>	<i>SEMA3E</i>	<i>TRIP11</i>
<i>C7orf11</i>	<i>FBN1</i>	<i>IGFBP3</i>	<i>NSDHL</i>	<i>SH3BP2</i>	<i>TRPS1</i>
<i>CA2</i>	<i>FBN2</i>	<i>IGFBP4</i>	<i>OBSL1</i>	<i>SHH</i>	<i>TRPV4</i>
<i>CCDC28B</i>	<i>FBXW4</i>	<i>IGFBP5</i>	<i>OCRL</i>	<i>SHOX</i>	<i>TWIST1</i>
<i>CDH3</i>	<i>FGD1</i>	<i>IGFBP6</i>	<i>OFD1</i>	<i>SHOX2</i>	<i>UBR1</i>
<i>CEP290</i>	<i>FGF1</i>	<i>IHH</i>	<i>OTX2</i>	<i>SHROOM4</i>	<i>VDR</i>
<i>CHD7</i>	<i>FGF10</i>	<i>IKBKKG</i>	<i>PAPPA</i>	<i>SIL1</i>	<i>VEGFA</i>
<i>CHRNA3</i>	<i>FGF18</i>	<i>INS</i>	<i>PAPSS2</i>	<i>SLC26A2</i>	<i>WISP3</i>
<i>CHST3</i>	<i>FGF2</i>	<i>INSR</i>	<i>PAX3</i>	<i>SLC29A3</i>	<i>WNT3</i>
<i>CLCN5</i>	<i>FGF21</i>	<i>IRS1</i>	<i>PAX8</i>	<i>SLC2A2</i>	<i>WNT7A</i>
<i>COL10A1</i>	<i>FGF23</i>	<i>IRS2</i>	<i>PCNT</i>	<i>SLC34A3</i>	<i>WRN</i>
<i>COL11A1</i>	<i>FGFR1</i>	<i>JAG1</i>	<i>PEG3</i>	<i>SLC35C1</i>	<i>ZBTB16</i>
<i>COL11A2</i>	<i>FGFR2</i>	<i>JAK2</i>	<i>PEX1</i>	<i>SLC35D1</i>	<i>ZMPSTE24</i>
<i>COL1A1</i>	<i>FGFR3</i>	<i>KAL1</i>	<i>PEX12</i>	<i>SLC37A4</i>	
<i>COL1A2</i>	<i>FLNA</i>	<i>KCNJ2</i>	<i>PEX3</i>	<i>SLC39A13</i>	
<i>COL2A1</i>	<i>FLNB</i>	<i>KDM5C</i>	<i>PEX5</i>	<i>SLC4A4</i>	
<i>COL5A1</i>	<i>FOXC1</i>	<i>KIAA1279</i>	<i>PEX6</i>	<i>SLC6A8</i>	

統計学的解析

UPD(16)mat・H19-hypo・UPD(7)mat 患者の表現型の特徴の頻度を、Fisher の正確検定を用いて比較した。P < 0.05 の場合に統計学的に有意であるとした。

表 5: メチル化異常を認めた 2 人の患者のメチル化係数

	ZNF597:TSS-DMR			
	CpG1	CpG2	CpG3	CpG4
患者 1 (%)	2	3	2	4
患者 2 (%)	2	2	1	3
コントロール (n=50) 中央値 (%)	55	53	48	58
(最小値-最大値) (%)	(43-60)	(41-62)	(37-55)	(50-62)

	ZNF597:3'-DMR				
	CpG1	CpG2	CpG3	CpG4	CpG5
患者 1 (%)	99	97	95	100	93
患者 2 (%)	98	98	99	100	94
コントロール (n=50) 中央値 (%)	59	58	59	61	54
(最小値-最大値) (%)	(53-67)	(51-69)	(51-68)	(50-69)	(41-67)

DMR: differentially methylated region

結果-2

分子遺伝学的解析

我々は、SRS-compatible 群で 2 人 (3.2%) に ZNF597:TSS-DMR 低メチル化・ZNF597:3' DMR 高メチル化を同定した (表 5)。一方、SRS-like 群では同 DMR にメチル化異常は同定されなかった。メチル化異常を認めた 2 人の患者の白血球・頬粘膜由来の DNA を用いたマイクロサテライトマーカー解析の結果を、表 6・図 7 に示す。患者 2 人とも、アイソダイソミーとヘテロダイソミーが混在する 16 番染色体母性片親性ダイソミーで、父由来のピークが存在しないことが示された。aCGH+SNP アレイでは、患者 2 人とも 16 番染色体に病的なコピー数異常がなく、16 番染色体短腕のテロメア側の領域にヘテロ接合性の消失を認めた (図 8)。全エクソーム解析では患者 1、2、患者 1 の母に、表現型に関連する遺伝子変異を認めなかった。患者 1 の母は ZNF597:TSS-

DMR、インプリンティング異常症に関連する DMR のメチル化異常を認めなかった。

表 6: 同定した 2 人の患者の 16 番染色体のマイクロサテライトマーカー解析結果

マーカー	位置	患者 白血球	患者 頬粘膜	父	母	評価
患者 1						
D16S521	16p13.3	154	154	166/168	154	母性 UPD (Iso or Hetero)
D16S3027	16p13.3	268	268	272/278	264/268	母性 UPD (Iso)
D16S418	16p13.3	182	182	172/178	170/182	母性 UPD (Iso)
D16S3102	16p13.13	163	163	169/175	163/177	母性 UPD (Iso)
D16S3103	16p12.3	229	未検査	229	229	判定不能
D16S403	16p12.2	133/143	133/143	135/137	133/143	母性 UPD (Hetero)
D16S3100	16p12.1	168/174	168/174	170	168/174	母性 UPD (Hetero)
D16S3136	16q12.1	203/209	未検査	203	203/209	判定不能
D16S3034	16q12.2	269/271	269/271	269/275	269/271	判定不能
D16S514	16q21	121/127	121/127	123/127	121/127	判定不能
D16S3066	16q22.3	196	196	188	196	母性 UPD (Iso or Hetero)
D16S3049	16q23.1	245	245	245/247	245	判定不能
D16S3091	16q23.3	114	114	114/120	114	判定不能
患者 2						
D16S521	16p13.3	164	164	154/168	164/166	母性 UPD (Iso)
D16S3027	16p13.3	282	282	274	266/282	母性 UPD (Iso)
D16S418	16p13.3	174/182	174/182	170	174/182	母性 UPD (Hetero)
D16S3102	16p13.13	163/169	163/169	167/169	163/169	判定不能
D16S3103	16p12.3	229	未検査	229	229	判定不能
D16S403	16p12.2	135/137	未検査	135/137	135/137	判定不能
D16S3100	16p12.1	168/174	未検査	172	168/174	母性 UPD (Hetero)
D16S3136	16q12.1	195/203	195/203	203/211	195/203	判定不能
D16S3034	16q12.2	269/275	未検査	269	269/275	判定不能
D16S514	16q21	117/121	117/121	117/123	117/121	判定不能
D16S3066	16q22.3	196	196	188/196	196	判定不能
D16S3049	16q23.1	245	245	241/245	245	判定不能
D16S3091	16q23.3	120	120	120/124	120	判定不能

UPD: 片親性ダイソミー; Iso: アイソダイソミー; Hetero: ヘテロダイソミー
 表中の数字は polymerase chain reaction 産物のサイズ (base pair) を示す。

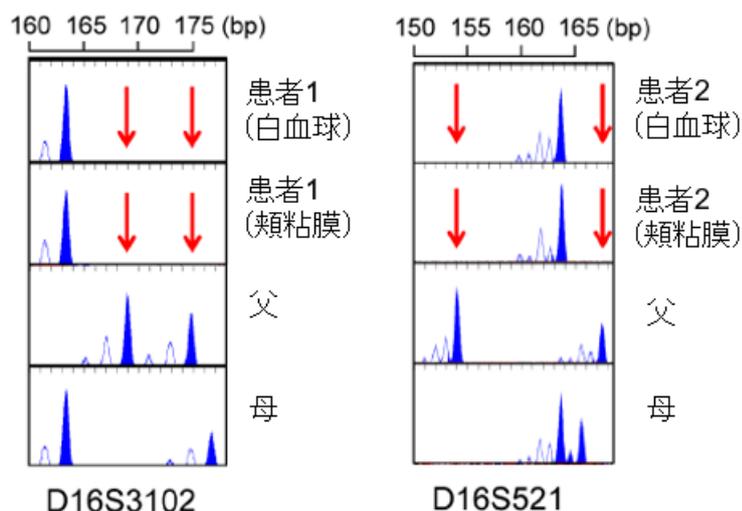


図 7: 16 番染色体のマイクロサテライトマーカー解析の代表的なマーカー
赤い矢印は、患者 1、2 ともに父由来のピークが存在しないことを示す。

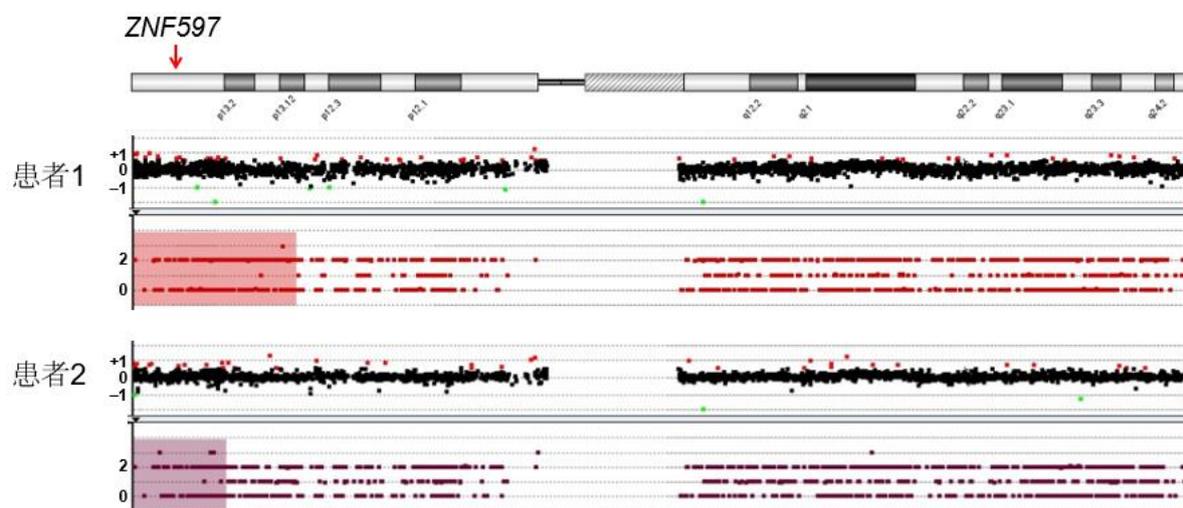


図 8: 同定した 2 人の UPD(16)mat 患者の aCGH+SNP アレイによる解析結果
黒色・赤色・緑色の点はそれぞれ、コピー数正常・増加 (>+0.5)・減少 (<-1.0) を示す。
色がついている長方形の領域はヘテロ接合性の消失の部分を示す。
UPD(16)mat: 16 番染色体母性片親性ダイソミー; aCGH: array comparative genomic hybridization; SNP: single nucleotide polymorphism

患者の臨床像

同定した 2 人の UPD(16)mat 患者の臨床像を表 7 に示す。患者 1 の父に特記すべき既往歴はなかった。母は、身長が 138 cm (-3.83 SD スコア) と低身長であったが、外表奇形は認めなかった。また、妊娠高血圧症候群の既往はなかった。患者 1 は自然妊

娠で、胎児発育不全のために在胎 27 週に帝王切開で出生した。出生時、父は 40 歳、母は 44 歳であった。胎盤病理では軽度の絨毛膜羊膜炎の所見を認めた。染色体検査の結果は 46,XY で、出生身長は 31.0 cm (-1.96 SD スコア)、出生体重は 698 g (-2.38 SD スコア)、出生時頭囲は 23.0 cm (-1.02 SD スコア) であった。心室中隔欠損症・尿道下裂・停留精巣を合併しており、体重増加不良のために経管栄養を要した。5 歳時の身長は 89.9 cm (-4.24 SD スコア)、体重は 11.0 kg (-5.03 SD スコア) であった。NH-CSS は、SGA・出生後成長障害・前額突出・哺乳障害の 4 項目を満たした (図 9)。生化学・内分泌学的検査で異常を認めなかった。3 歳から SGA 性低身長の適応で成長ホルモンを開始した。軽度の運動発達遅滞を認め、3 歳時の発達指数は 51 であった。

表 7: 同定した 2 人の UPD(16)mat 患者の臨床像

	患者 1	患者 2
性別	男性	女性
核型	46,XY	46,XX
年齢	5 歳	11 歳
在胎週数	27 週 2 日	29 週 2 日
出生身長 (SD スコア) ^a	31.0 cm (-1.96)	33.0 cm (-2.38)
出生体重 (SD スコア) ^a	698 g (-2.38)	806 g (-2.60)
出生時頭囲 (SD スコア) ^a	23.0 cm (-1.02)	25.2 cm (-0.84)
24 か月時の身長 (SD スコア) ^{b,c}	71.7 cm (-5.24)	72.6 cm (-3.98)
24 か月時の BMI (SD スコア) ^{b,c}	-2.68	-2.14
身長 (SD スコア) ^b	89.9 cm (-4.24)	133.3 cm (-1.72)
体重 (SD スコア) ^b	11.0 kg (-5.03)	28.4 kg (-1.48)
成長ホルモン投与	3 歳~	3 歳~
SGA ^d	+	+
出生後の成長障害 ^{c,e}	+	+
相対的大頭症 ^f	-	+
前額突出	+	+

左右非対称	-	-
摂食障害/BMI 低値	+	+
NH-CSS	4/6	5/6
逆三角形の顔貌	+	+
第5指内彎	-	+
第5指短縮	-	+
先天性心疾患	心室中隔欠損症	-
発達		
運動発達遅滞	+	-
定頸獲得 [§]	12 か月	4 か月
独座獲得 [§]	17 か月	7 か月
独歩獲得 [§]	21 か月	15 か月
言語発達遅滞	+	-
知能指数/発達指数 (検査年齢)	51 (3 歳)	67 (6 歳)
尿道下裂/停留精巣	+	判定不能
その他の特徴	経管栄養、未熟児網膜症	-
出生時の父の年齢	40 歳	30 歳
出生時の母の年齢	44 歳	36 歳
父の身長 (SD スコア)	166.0 cm (-0.82)	170.0 cm (-0.14)
母の身長 (SD スコア)	138.0 cm (-3.83)	150.0 cm (-1.54)

UPD(16)mat: 16 番染色体母性片親性ダイソミー; SD: standard deviation; SGA: small for gestational age; BMI: body mass index; NH-CSS: Netchine-Harbison clinical scoring system

^a 出生身長・出生体重・出生時頭囲は性別・在胎週数を一致させた日本人の標準値で評価した (http://jspe.umin.jp/medical/chart_dl.html)。

^b 出生後の身長・BMI・体重は性別・年齢を一致させた日本人の標準値で評価した (http://jspe.umin.jp/medical/chart_dl.html)。

^c 24±1 か月時の体格の情報が得られない場合は、25 か月より大きく 24 か月に一番近い時点の体格を用いた。

^d 出生体重および/もしくは出生身長が在胎週数の標準値の-2 SD スコア以下。

^e 24±1 か月時の身長が標準値の-2 SD スコア以下または、mid-parental target height の-2 SD スコア以下。mid-parental target height は以下のように算出した。男性: [(父の身長+母の身長)/2] +6.5 cm、女性: [(父の身長+母の身長)/2]-6.5 cm。

^f 出生時の頭囲の SD スコアが出生身長および/もしくは出生体重の SD スコアより 1.5 SD スコア以上大きい。

[§] 修正月齢。

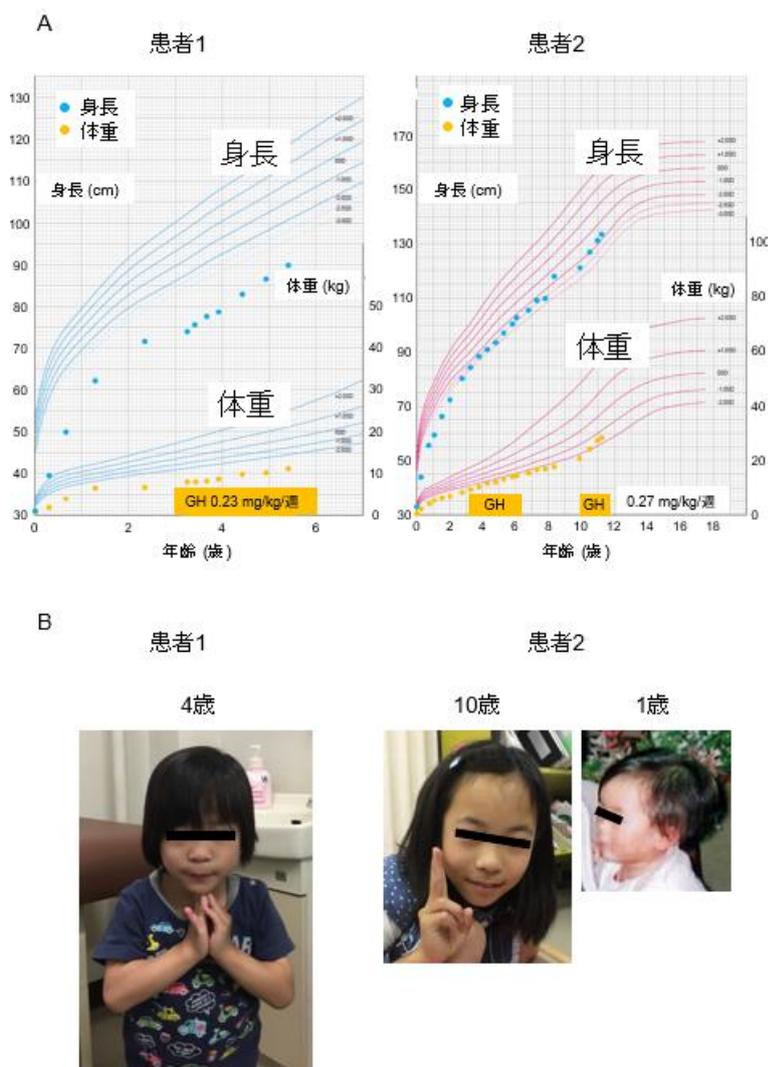


図 9: 同定した 2 人の UPD(16)mat 患者の成長曲線と顔写真

(A) 成長曲線 (B) 顔写真

GH: 成長ホルモン; UPD(16)mat: 16 番染色体母性片親性ダイソミー

患者 2 の父も特記すべき既往歴はなかった。母も健常で妊娠高血圧症候群の既往なく、妊娠 29 週に切迫早産のために帝王切開で児を娩出した。出生時、父は 30 歳、母は 36 歳であった。胎盤の所見に明らかな異常なく、重量は 295 g (-0.25 SD スコア) [40] であった。染色体検査の結果は 46,XX、出生身長は 33.0 cm (-2.38 SD スコア)、出生体重は 806 g (-2.60 SD スコア)、出生時頭囲は 25.2 cm (-0.84 SD スコア) であった。11 歳時の身長は 133.3 cm (-1.72 SD スコア)、体重は 28.4 kg (-1.48 SD スコア) で

あった。NH-CSS は、SGA・出生後成長障害・相対的大頭症・前額突出・BMI 低値の 5 項目を満たした (図 9)。生化学・内分泌学的検査で異常を認めなかった。3 歳から SGA 性低身長に適応で成長ホルモンを開始した。運動発達は正常で、6 歳時の知能指数は 67、11 歳の時点で普通学級に通級していた。

考察-2

我々は 63 人の SRS-compatible 患者で 2 人 (3.2%) のアイソダイソミーとヘテロダイソミーが混在する UPD(16)mat 患者を同定した。一方、31 人の SRS-like 患者には同定されなかった。Azzi らは、NH-CSS の診断基準を満たし、*H19-hypo*・UPD(7)・病的なコピー数異常・*CDKN1C* 変異・インプリンティング異常症に関連する DMR のメチル化異常を認めない 11 人の患者の中で、UPD(16)mat を 1 人 (9.1%) に同定した。しかし、その研究では UPD(16)mat のスクリーニングのために SNP アレイを用いたため、完全なヘテロダイソミーは検索できていない [8]。SRS の表現型を認める患者で UPD(16)mat を検索した他の 2 報の研究では、UPD(16)mat を同定できなかった [15, 19]。逆に、UPD(16)mat 患者の中での SRS の表現型を持つ患者の頻度の報告はない。現在までに報告された 49 人の生産の UPD(16)mat 患者に関して、NH-CSS に関連する臨床的な特徴は詳細には報告されていない [15–17] が、我々の患者を含め 51 人中 3 人 (5.9%) が NH-CSS を満たした。UPD(16)mat 患者の臨床情報をさらに集積することで、UPD(16)mat 患者において SRS 表現型を認める患者の頻度が明らかになることが期待される。

表 8: UPD(16)mat 患者と既報の SRS 患者の表現型の比較

	UPD(16)mat 患者 (本報告と 既報合計)	既報の SRS 患者		P 値 ^a	
		H19-hypo	UPD(7)mat	vs. H19-hypo	vs. UPD(7)mat
在胎週数(週)	35.0 (27.3~40.0) (n=35)	38.0 (34.4~40.0) (n=36)	38.0 (34.6~40.0) (n=9)		
早産	25/38 ^b				
SGA ^c	26/40	43/43	9/9	0.000	0.045
先天性心疾患	11/33	8/145	0/17	0.000	0.009
尿道下裂/ 停留精巣	7/18	12/22	2/7	0.360	1.000
出生時の父の 年齢 (歳)	35.5 (30~40) (n=4)	32 (19~52) (n=24)	35 (27~48) (n=9)		
出生時の母の 年齢 (歳)	34 (21~44) (n=33)	32 (19~43) (n=25)	33 (25~42) (n=9)		
引用文献	[15-17]	[8, 9, 32] ^d	[8, 9, 32] ^d		

UPD(16)mat : 16 番染色体母性片親性ダイソミー; SRS: Silver-Russell 症候群; H19-hypo: H19-differentially methylated region の低メチル化; UPD(7)mat : 7 番染色体母性片親性ダイソミー; SGA: small for gestational age

^aSRS 患者の個別の臨床情報が不明であるため [9]、UPD(16)mat 患者と SRS 患者の臨床像の比較は SGA・先天性心疾患・尿道下裂/停留精巣の頻度に関してのみ、統計学的解析を行った。P < 0.05 を太字とした。

^b既報の UPD(16)mat 患者のうち、33 人は在胎週数の情報があり、3 人は在胎週数が不明だったが満期であった。

^c出生体重および/もしくは出生身長が在胎週数の標準値の-2 standard deviation (SD) スコア以下。既報の UPD(16)mat 患者で SD スコアの情報がなくパーセンタイルの情報だけの患者は、出生体重および/もしくは出生身長が 3 パーセンタイル未満あるいは 5 パーセンタイル未満の場合に SGA と判定した。既報の UPD(16)mat 患者で SDS の情報もパーセンタイルの情報もない患者は、出生体重および/もしくは出生身長が性別・在胎週数を一致させた日本人の標準値 (http://jspe.umin.jp/medical/chart_dl.html) の-2 SD スコア以下であった場合に SGA と判定した。

^d先天性心疾患の頻度は [32] から、尿道下裂/停留精巣の頻度は [8] から引用した。それ以外のデータは [9] から引用した。

我々の患者 2 人も既報の UPD(16)mat 患者も、早産・出生前後の成長障害・先天性

心疾患・尿道下裂・BMI 低値といった非特異的な臨床像を呈していた (表 7、表 8)。

出生前後の成長障害と BMI 低値は SRS の臨床診断基準である NH-CSS の項目に含まれている [1]。そこで我々は本報告と既報を合わせた UPD(16)mat 患者と既報の *H19-hypo*・UPD(7)mat 患者の臨床像の特徴に関して、中央値や頻度を比較した [8, 9, 32](表 8)。既報の患者の個別のデータが不明であるため統計学的解析はできなかったが、UPD(16)mat 患者の在胎週数の中央値は *H19-hypo*・UPD(7)mat 患者よりも早かった。UPD(16)mat 患者の SGA の頻度は *H19-hypo*・UPD(7)mat 患者よりも有意に低く、先天性心疾患の頻度は *H19-hypo*・UPD(7)mat 患者よりも有意に高かった。UPD(16)mat の臨床像の特徴を考慮し、*H19-hypo*・UPD(7)mat ・他のインプリンティング異常症・病的なコピー数異常を認めない原因不明の SRS 表現型患者に対しては、UPD(16)mat の検索を検討すべきである。加えて、患者 1 は軽度の発達遅滞を認めていた。UPD(16)mat が発達遅滞と関連しているかについては未だ解明されていないが、さらなる研究によってこの関連が明らかになることが期待される。

UPD(16)mat の表現型を引き起こしている要因は、過去には十分検討されていない。

我々の 2 人の患者は、全エクソーム解析では表現型に関連する遺伝子変異を認めなかった。患者 1 の母も重度の成長障害を来たしていたが、成長障害に関連する遺伝子変異は同定されなかった。さらにマイクロサテライトマーカー解析では白血球・頬粘膜ともに 16 トリソミー細胞が含まれていることは示されなかった。我々は胎盤を含めこれら以外の組織を検索することはできなかったが、16 番染色体上のインプリンテ

イング遺伝子の発現異常が我々の患者に認められた表現型を引き起こしている可能性が考えられる。16番染色体上のインプリンティング遺伝子の中で、母由来アレルから発現する *ZNF597* は脳・白血球・胎盤に発現している [41]。UPD(16)mat 患者において *ZNF597* が過剰発現することが成長障害・知的障害や他の SRS の表現型を引き起こしている可能性はある。UPD(16)mat の表現型を引き起こしている要因については今後さらなる検討が必要である。

母体の高年齢は、正常な精子と2倍体の卵子が受精した後に起こるトリソミーレスキューによって生じる母性ヘテロダイソミーに関するリスク因子である [42]。我々の2人の患者は母性ヘテロダイソミーであったが、母体の高年齢と関連がある可能性が考えられる。

小括-2

我々は63人のSRS-compatible患者の中で2人(3.2%)のUPD(16)mat患者を同定した。UPD(16)mat患者はSRSの表現型を呈することがあるため、原因不明のSRS表現型患者に対してはUPD(16)matの可能性を考慮すべきである。

全体の考察

我々は臨床診断基準に基づき SRS と診断されていた患者 7 人に、病的なコピー数異常や UPD(16)mat を同定した。その結果、これらの患者の診断はそれぞれの病的なコピー数異常や UPD(16)mat となった。これらの異常は、他施設で原因不明 SRS とされている患者にも存在する可能性があり、このような遺伝学的異常の同定は、当該患者の遺伝カウンセリング・合併症予測・治療法選択に有用と考えられる。本研究により、SRS 発症における *H19*-hypo・UPD(7) mat 以外のゲノム・エピゲノム異常の重要性が明確となった。

本研究の限界を以下に述べる。第 1 に、aCGH 法はコピー数変化を検出する方法として確立しているものではあるが、本研究では同定された欠失領域の fluorescence in situ hybridization 法などでの validation は行っていない。第 2 に、我々は UPD(16)mat を引き起こす要因の検討を行ったが、白血球と頬粘膜しか解析できなかったため、胎盤を含む白血球、頬粘膜以外の組織に 16 トリソミー細胞が含まれている可能性は除外できなかった。第 3 に、我々は主治医から患者の臨床情報を収集したが、主治医には臨床遺伝専門医のみならず多くの一般小児科医も含まれていたため、前額突出・逆三角形の顔貌・第 5 指の内彎・短縮といった主観的に評価される身体所見や、患者の症候群に関する臨床診断の精度が不十分であった可能性がある。理想的には、遺伝学的解析を行う前に臨床遺伝専門医の評価を受けることが望ましいと考えられる。第 4 に、我々のコホートでは *H19*-hypo・UPD(7) mat 患者全員の NH-CSS スコア

は判明していない。そのため、*H19-hypo*・*UPD(7)mat* をともに認めない **SRS** 表現型患者における病的なコピー数異常や *UPD(16)mat* の頻度を明らかにすることはできなかったが、**SRS** 表現型患者全体における病的なコピー数異常や *UPD(16)mat* の頻度は明らかにすることはできなかった。第 5 に、我々のコホートにおいて病的なコピー数異常や *UPD(16)mat* の検索をしても遺伝学的原因が判明しなかった患者も多い。今後は、原因不明患者に対して、*IGF2*・*CDKN1C* といったまれな **SRS** 責任遺伝子や **SRS** と臨床像がオーバーラップする症候群の原因遺伝子の変異の検索を行い、その頻度と臨床像の特徴を解明する予定である。このような原因不明 **SRS** 患者に対して遺伝学的原因を検索する研究の成果が、**SRS** の表現型を持つ患者の遺伝学的診断の方針決定に貢献すると考える。

謝辞

本研究は日本学術振興会科学研究費 (15K15096)、国立成育医療研究センター成育医療研究開発費 (28-6)、日本医療研究開発機構 (AMED) (16ek0109141h0002、16ek0109030h0003、17ek0109141h0003、17ek0109278h0001)、武田科学振興財団、日本小児内分泌学会未来開拓研究助成の支援によって行われた。

本研究に協力して下さいました患者さんとそのご両親に深謝いたします。また、ご指導下さいました国立成育医療研究センター研究所分子内分泌研究部の深見真紀部長・鏡雅代室長・鳴海覚志室長・松原圭子上級研究員・中村明枝先生、同研究所周産

期病態研究部の中林一彦室長、東京大学大学院医学系研究科生殖・発達・加齢医学専攻小児医学講座の岡明教授に深謝申し上げます。患者さんの検体と詳細な臨床情報を提供して下さいました、愛知県医療療育総合センター中央病院小児内科の水野誠司副院長、大津赤十字病院新生児内科の松倉良香医長、御所南はらしまクリニックの原島知恵副院長、京都府立医科大学小児科の長谷川龍志助教、京都府立医科大学附属北部医療センター小児科の中島久和講師、つむらファミリークリニックくみ小児科の津村久美副院長、京都第一赤十字病院小児科の木崎善郎部長、山梨大学医学部小児科の矢ヶ崎英晃助教、久留米大学医学部小児科の西岡淳子助教に深謝いたします。

引用文献

1. 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*. 13:105–24 (2017).
2. Lai KY, Skuse D, Stanhope R, Hindmarsh P. Cognitive abilities associated with the Silver-Russell syndrome. *Arch Dis Child*. 71:490–6 (1994).

3. Price SM, Stanhope R, Garrett C, Preece MA, Trembath RC. The spectrum of Silver-Russell syndrome: a clinical and molecular genetic study and new diagnostic criteria. *J Med Genet.* 36:837–42 (1999).
4. Netchine I, Rossignol S, Dufourg MN, Azzi S, Rousseau A, Perin L, Houang M, Steunou V, Esteva B, Thibaud N, Demay MC, Danton F, Petriczko E, Bertrand AM, Heinrichs C, Carel JC, Loeuille GA, Pinto G, Jacquemont ML, Gicquel C, Cabrol S, Le Bouc Y. 11p15 imprinting center region 1 loss of methylation is a common and specific cause of typical Russell-Silver syndrome: clinical scoring system and epigenetic-phenotypic correlations. *J Clin Endocrinol Metab.* 92:3148–54 (2007).
5. Bartholdi D, Krajewska-Walasek M, Ounap K, Gaspar H, Chrzanowska KH, Ilyana H, Kayserili H, Lurie IW, Schinzel A, Baumer A. Epigenetic mutations of the imprinted IGF2-H19 domain in Silver-Russell syndrome (SRS): results from a large cohort of patients with SRS and SRS-like phenotypes. *J Med Genet.* 46:192–7 (2009).
6. Bruce S, Hannula-Jouppi K, Puoskari M, Fransson I, Simola KO, Lipsanen-Nyman M, Kere J. Submicroscopic genomic alterations in Silver-Russell syndrome and Silver-Russell-like patients. *J Med Genet.* 47:816–22 (2010).
7. Dias RP, Nightingale P, Hardy C, Kirby G, Tee L, Price S, Macdonald F, Barrett TG, Maher ER. Comparison of the clinical scoring systems in Silver-Russell syndrome and development of modified diagnostic criteria to guide molecular genetic testing. *J Med*

- Genet.* 50:635–9 (2013).
8. Azzi S, Salem J, Thibaud N, Chantot-Bastaraud S, Lieber E, Netchine I, Harbison MD. A prospective study validating a clinical scoring system and demonstrating phenotypical-genotypical correlations in Silver-Russell syndrome. *J Med Genet.* 52:446–53 (2015).
 9. Fuke T, Mizuno S, Nagai T, Hasegawa T, Horikawa R, Miyoshi Y, Muroya K, Kondoh T, Numakura C, Sato S, Nakabayashi K, Tayama C, Hata K, Sano S, Matsubara K, Kagami M, Yamazawa K, Ogata T. Molecular and clinical studies in 138 Japanese patients with Silver-Russell syndrome. *PLoS One.* 8:e60105 (2013).
 10. Spengler S, Schönherr N, Binder G, Wollmann HA, Fricke-Otto S, Mühlenberg R, Denecke B, Baudis M, Eggermann T. Submicroscopic chromosomal imbalances in idiopathic Silver-Russell syndrome (SRS): the SRS phenotype overlaps with the 12q14 microdeletion syndrome. *J Med Genet.* 47:356–60 (2010).
 11. Spengler S, Begemann M, Ortiz Brüchle N, Baudis M, Denecke B, Kroisel PM, Oehl-Jaschkowitz B, Schulze B, Raabe-Meyer G, Spaich C, Blümel P, Jauch A, Moog U, Zerres K, Eggermann T. Molecular karyotyping as a relevant diagnostic tool in children with growth retardation with Silver-Russell features. *J Pediatr.* 161:933–42 (2012).
 12. Sachwitz J, Meyer R, Fekete G, Spranger S, Matulevičienė A, Kučinskas V, Bach A, Luczay A, Brüchle NO, Eggermann K, Zerres K, Elbracht M, Eggermann T. NSD1 duplication in Silver-Russell syndrome (SRS): molecular karyotyping in patients with SRS

- features. *Clin Genet*. 91:73–8 (2017).
13. Eggermann T, Soellner L, Buiting K, Kotzot D. Mosaicism and uniparental disomy in prenatal diagnosis. *Trends Mol Med*. 21:77–87 (2015).
 14. Jirtle RL. Geneimprint. <http://www.geneimprint.com/site/genes-by-species>.
 15. Scheuvens R, Begemann M, Soellner L, Meschede D, Raabe-Meyer G, Elbracht M, Schubert R, Eggermann T. Maternal uniparental disomy of chromosome 16 [upd(16)mat]: clinical features are rather caused by (hidden) trisomy 16 mosaicism than by upd(16)mat itself. *Clin Genet* 92:45–51 (2017).
 16. Helm BM, Willer JR, Sadeghpour A, Golzio C, Crouch E, Vergano SS, Katsanis N, Davis EE. Partial uniparental isodisomy of chromosome 16 unmasks a deleterious biallelic mutation in IFT140 that causes Mainzer-Saldino syndrome. *Hum Genomics* 11:16 (2017).
 17. Bravo García-Morato M, Nevado J, González-Granado LI, Sastre Urgelles A, Rodríguez Pena R, Ferreira Cerdán A. Chronic granulomatous disease caused by maternal uniparental isodisomy of chromosome 16. *J Allergy Clin Immunol Pract* 5:1146–8 (2017).
 18. Ceballos-Picot I, Guest G, Moriniere V, Mockel L, Daudon M, Malan V, Antignac C, Heidet L. Maternal uniparental disomy of chromosome 16 in a patient with adenine phosphoribosyltransferase deficiency. *Clin Genet* 80:199–201 (2011).
 19. Sachwitz J, Strobl-Wildemann G, Fekete G, Ambrozaitytė L, Kučinskas V, Soellner L, Begemann M, Eggermann T. Examinations of maternal uniparental disomy and

- epimutations for chromosomes 6, 14, 16 and 20 in Silver-Russell syndrome-like phenotypes. *BMC Med Genet* 17:20 (2016).
20. 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* 23:1062–7 (2015).
21. Database of Genomic Variants. <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>.
22. Battaglia A, Carey JC, South ST. Wolf-Hirschhorn syndrome: A review and update. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 169:216–23 (2015).
23. Melo JB, Estevinho A, Saraiva J, Ramos L, Carreira IM. Cutis Aplasia as a clinical hallmark for the syndrome associated with 19q13.11 deletion: the possible role for UBA2 gene. *Mol Cytogenet*. 8:21 (2015).
24. Wu YQ, Sutton VR, Nickerson E, Lupski JR, Potocki L, Korenberg JR, Greenberg F, Tassabehji M, Shaffer LG. Delineation of the common critical region in Williams syndrome and clinical correlation of growth, heart defects, ethnicity, and parental origin. *Am J Med Genet*. 78:82–9 (1998).
25. Kenneth Lyons Jones, Marilyn Crandall Jones, Miguel del Campo. Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation 7th ed. 14–9 (2013).
26. Kenneth Lyons Jones, Marilyn Crandall Jones, Miguel del Campo. Smith's Recognizable

- Patterns of Human Malformation 7th ed. 160–3 (2013).
27. Chauvel PJ, Moore CM, Haslam RH. Trisomy-18 mosaicism with features of Russel-Silver syndrome. *Dev Med Child Neurol.* 17:220–4 (1975).
 28. Tucker ME, Garringer HJ, Weaver DD. Phenotypic spectrum of mosaic trisomy 18: two new patients, a literature review, and counseling issues. *Am J Med Genet A.* 143:505–17 (2007).
 29. Adalat S, Bockenbauer D, Ledermann SE, Hennekam RC, Woolf AS. Renal malformations associated with mutations of developmental genes: messages from the clinic. *Pediatr Nephrol.* 25:2247–55 (2010).
 30. Venegas-Vega C, Nieto-Martínez K, Martínez-Herrera A, Gómez-Laguna L, Berumen J, Cervantes A, Kofman S, Fernández-Ramírez F. 19q13.11 microdeletion concomitant with ins(2;19)(p25.3;q13.1q13.4)dn in a boy: potential role of UBA2 in the associated phenotype. *Mol Cytogenet.* 7:61 (2014).
 31. Meyer E, Carss KJ, Rankin J, Nichols JM, Grozeva D, Joseph AP, Mencacci NE, Papandreou A, Ng J, Barral S, Ngoh A, Ben-Pazi H, Willemsen MA, Arkadir D, Barnicoat A, Bergman H, Bhate S, Boys A, Darin N, Foulds N, Gutowski N, Hills A, Houlden H, Hurst JA, Israel Z, Kaminska M, Limousin P, Lumsden D, McKee S, Misra S, Mohammed SS, Nakou V, Nicolai J, Nilsson M, Pall H, Peall KJ, Peters GB, Prabhakar P, Reuter MS, Rump P, Segel R, Sinnema M, Smith M, Turnpenny P, White SM, Wiczorek D, Wiethoff

- S, Wilson BT, Winter G, Wragg C, Pope S, Heales SJ, Morrogh D; UK10K Consortium; Deciphering Developmental Disorders Study; NIHR BioResource Rare Diseases Consortium, Pittman A, Carr LJ, Perez-Dueñas B, Lin JP, Reis A, Gahl WA, Toro C, Bhatia KP, Wood NW, Kamsteeg EJ, Chong WK, Gissen P, Topf M, Dale RC, Chubb JR, Raymond FL, Kurian MA. Mutations in the histone methyltransferase gene KMT2B cause complex early-onset dystonia. *Nat Genet.* 49:223–37 (2017).
32. Ghanim M, Rossignol S, Delobel B, Irving M, Miller O, Devisme L, Plennevaux JL, Lucidarme-Rossi S, Manouvrier S, Salah A, Chivu O, Netchine I, Vincent-Delorme C. Possible association between complex congenital heart defects and 11p15 hypomethylation in three patients with severe Silver-Russell syndrome. *Am J Med Genet A.* 161:572–7 (2013).
33. Feuk L, Kalervo A, Lipsanen-Nyman M, Skaug J, Nakabayashi K, Finucane B, Hartung D, Innes M, Kerem B, Nowaczyk MJ, Rivlin J, Roberts W, Senman L, Summers A, Szatmari P, Wong V, Vincent JB, Zeesman S, Osborne LR, Cardy JO, Kere J, Scherer SW, Hannula-Jouppi K. Absence of a paternally inherited FOXP2 gene in developmental verbal dyspraxia. *Am J Hum Genet.* 79:965–72 (2006).
34. Wakeling EL, Amero SA, Alders M, Bliet J, Forsythe E, Kumar S, Lim DH, MacDonald F, Mackay DJ, Maher ER, Moore GE, Poole RL, Price SM, Tangeraas T, Turner CL, Van Haelst MM, Willoughby C, Temple IK, Cobben JM. Epigenotype-phenotype correlations

- in Silver-Russell syndrome. *J Med Genet* 47:760–8 (2010).
35. 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* 19:476–82 (2017).
 36. Fukawatase Y, Toyoda M, Okamura K, Nakamura K, Nakabayashi K, Takada S, Yamazaki-Inoue M, Masuda A, Nasu M, Hata K, Hanaoka K, Higuchi A, Takubo K, Umezawa A. Ataxia telangiectasia derived iPS cells show preserved x-ray sensitivity and decreased chromosomal instability. *Sci Rep* 4:5421 (2014).
 37. Wang SR, Carmichael H, Andrew SF, Miller TC, Moon JE, Derr MA, Hwa V, Hirschhorn JN, Dauber A. Large-scale pooled next-generation sequencing of 1077 genes to identify genetic causes of short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 98:E1428–37 (2013).
 38. van der Zanden LF, van Rooij IA, Feitz WF, Franke B, Knoers NV, Roeleveld N. Aetiology of hypospadias: a systematic review of genes and environment. *Hum Reprod Update* 18:260–83 (2012).
 39. Online Mendelian Inheritance in Man. <https://www.omim.org>.
 40. 中山 雅弘 目でみる胎盤病理 106 (2002).
 41. Nakabayashi K, Trujillo AM, Tayama C, Camprubi C, Yoshida W, Lapunzina P, Sanchez A, Soejima H, Aburatani H, Nagae G, Ogata T, Hata K, Monk D. Methylation screening of reciprocal genome-wide UPDs identifies novel human-specific imprinted genes. *Hum*

Mol Genet 20:3188–97 (2011).

42. Kotzot D. Advanced parental age in maternal uniparental disomy (UPD): implications for the mechanism of formation. *Eur J Hum Genet* 12:343–6 (2004).