

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業）  
分担研究報告書

九州地区、成育医療施設としての支援機能、補助診断としての遺伝子診断  
ヒストンアセチル化・メチル化異常症による先天異常症候群－歌舞伎症候群－

研究分担者 吉浦 孝一郎  
医学部医学科長崎大学 原爆後障害医療研究所・教授

### 研究要旨

歌舞伎症候群を代表とするヒストンアセチル化・メチル化異常症による先天異常症候群の診断支援を行う。本年度は、病院から紹介された歌舞伎症候群6例の診断を実施した。加えて、既知のDNAメチル化異常症部位が検出できるような、DNAメチル化検出法を立ち上げた。

### A. 研究目的

歌舞伎症候群（KS）を代表とするヒストンアセチル化・メチル化異常症による先天異常症候群の診断支援を行う。

遺伝子診断による変異陽性例と変異陰性例について臨床症状の比較検討を行い、患者診断・管理について臨床診断側と遺伝子診断側から互いに補完できるような診断体制、診断基準の改定に寄与していく。

2018年度は、歌舞伎症候群の診断支援と変異と臨床症状の関連、ターゲット部位のメチル化割合算出法の開発を行った。

### B. 研究方法

歌舞伎症候群は、主要症状である1) 下眼瞼外側 1/3 の外反を含む特徴的顔貌 2) 指尖部の隆起 3) 精神発達遅滞 が診断を疑う根拠となるが、症状がそろっている変異陰性例が 15～20%程度、症状がそろっていないが KMT2D 変異例が存在するなど、歌舞伎症候群の今後の蓄積すべき症例が多く存在することが示唆されている。そのため、非典型例を遺伝子診断解析対処としつつ、病態解析、病態と遺伝子変異との対応の検討をおこなう基礎データ蓄積を図った。

歌舞伎症候群診断は、本年度は KMT2D 遺伝子または KDM6A 遺伝子についての 6 例の解析依頼があった。解析対象が明確な、いわゆるターゲット・再シーケンスは、個別遺伝子の capture オリゴヌクレオチドによってターゲット部位の濃縮後に次世代シーケンサーにて塩基配列を決定した。

メチル化解析に関しては、メチル化異常部位が検出される既知疾患のターゲット部位を定めて、DNA 亜硫酸処理後に特異的プライマーによって増幅し、次世代シーケンサーにて塩基配列を決定して CpG 部位のメチル化シトシンの割合算出方法を開発した。HCT116 DKO 細胞由来の非メチル化 DNA と 同細胞由来メチル化 DNA を適切量混合して、メチル化割合の算定が可能かを検討した。

（倫理面への配慮）

解析を依頼された症例は、全ゲノムシーケンスおよび全ゲノムエピゲノムシーケンス解析が可能となるようにインフォームド・コンセントを得て解析を実施している。試料は、今後の解析のために DNA を保管している。解析に関するヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査は、長崎大学で受け許可の元で実施している。

### C. 研究結果

歌舞伎症候群の6例解析にて、3例（50%）の KMT2D 遺伝子と KDM6A 遺伝子の変異陰性であった。2例は、タンパク truncation 型変異で原因変異としては確実であった。1例は、KMT2D 遺伝子の 3' UTR に新生変異が認められた。本例は、タンパク翻訳に直接関係しない遺伝子部分の変異であるので、なぜ歌舞伎症候群の原因であるかは不明である。

ターゲット部位を設定して、特異的プライマーを使った DNAメチル化割合の算出は、十分に

可能で、PCR サイクルを増やしても安定した割合が得られるプライマーセットが得られた。

#### D. 考察

紹介時の臨床診断は、特異的顔貌によって歌舞伎症候群が疑われることが多く、「下眼瞼外側1/3の外反を含む特徴的顔貌」と「精神発達遅滞」が診断根拠になっていることが多い。「指尖部の隆起」は、診断過程で診ていない、無い、途中から明瞭でないなど様々であるが、「指尖部の隆起」の有無によって、遺伝子変異陽性率が変わるか否かは、まだ明瞭でない。3主徴そろっても遺伝子変異陰性のことも多い。ただし、3主徴と他の小奇形を診断根拠とすることが、最も広く歌舞伎症候群を取り逃がさない方法であることには間違いない。昨年度報告の通り、成人の場合には、軽度な精神発達遅滞と免疫異常症をもつ症例からKMT2Dの変異が認められる事もあり、成人には遺伝子診断が極めて有効である。

今回見つけた、KMT2D遺伝子の3' UTR部位のde novo(新生)変異は、患者のみの遺伝子診断では、原因変異である結論付けることは不可能である。今後、どのような機序で疾患になっているのかを解明する必要があるが、厚生行政の観点からは、先天異常一遺伝子疾患の遺伝子診断は、判断に困る症例では最終的には必ずトリオで確認すべきであるということがいえる。また、可能な限りUTR領域も解析対象に含めるべきであると考えられる。

DNAメチル化解析法は、既知の部位が判っている(疾患との対応が付いている)場合には、メチル化割合を算出して診断が可能であると考えられる。既知の疾患でメチル化DNAの割合が変化しているものに関しては、診断可能名システムを立ち上げることが出来た。

#### E. 結論

歌舞伎症候群は、臨床診断と遺伝子診断の2段階で診断していく必要があり、最終的には、親子トリオの解析が必要となる場合がある。また、遺伝子のUTR領域も解析対象とすべきであると考えられる。3主徴がそろった場合の変異陽性率と、そろわない場合の変異陽性率の違いは、解析数が少ないこともあり明瞭ではない。

DNAメチル化解析法は、既知の疾患領域検索であれば、診断可能なレベルにある。対象疾患の数は多くはないが、Beckwith-Wiedemann症候群やRussel-Silver症候群など、既知のDNAメチル化異常症であれば、診断提供が可能である。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Koga T, Migita K, Sato T, Sato S, Umeda M, Nonaka F, Fukui S, Kawashiri SY, Iwamoto N, Ichinose K, Tamai M, Nakamura H, Origuchi T, Ueki Y, Masumoto J, Agematsu K, Yachie A, Yoshiura KI, Eguchi K, Kawakami A. MicroRNA-204-3p inhibits lipopolysaccharide-induced cytokines in familial Mediterranean fever via the phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  pathway. *Rheumatology* (Oxford). 2018, 57(4), 718-726, doi: 10.1093/rheumatology/kex451.
- 2) Shirakawa T, Nakashima Y, Watanabe S, Harada S, Kinoshita M, Kihara T, Hamasaki Y, Shishido S, Yoshiura KI, Moriuchi H, Dateki S. A novel heterozygous GLI2 mutation in a patient with congenital urethral stricture and renal hypoplasia/dysplasia leading to end-stage renal failure. *CEN Case Rep*. 2018, 7(1), 94-97, doi: 10.1007/s13730-018-0302-9.
- 3) Murakami Y, Miura K, Sato S, Higashijima A, Hasegawa Y, Miura S, Yoshiura KI, Masuzaki H. Reference values for circulating pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma and their clinical usefulness in uncomplicated pregnancy and hypertensive disorder of pregnancy. *J Obstet Gynaecol Res*. 2018, 44(5), 840-851, doi: 10.1111/jog.13610.
- 4) Sato S, Itonaga H, Taguchi M, Sawayama Y, Imanishi D, Tsushima H, Hata T, Moriuchi Y, Mishima H, Kinoshita A, Yoshiura KI, Miyazaki Y. Clonal dynamics in a case of acute monoblastic leukemia that later developed myeloproliferative neoplasm. *Int J Hematol*. 2018, 108(2), 213-217, doi: 10.1007/s12185-018-2419-1.
- 5) Hori YS, Yamada A, Matsuda N, Ono Y, Starenki D, Sosonkina N, Yoshiura KI, Niikawa N, Ohta T. A Novel Association between the 27-bp Deletion and 538G>A Mutation in the ABCC11 Gene. *Hum Biol*. 2017, 89(4), 305-307.
- 6) Kiyota K, Yoshiura KI, Houbara R, Miyahara H, Korematsu S, Ihara K. Auto-immune disorders in a child with PIK3CD variant and 22q13 deletion. *Eur J Med Genet*. 2018, 61(10), 631-633. doi: 10.1016/j.ejmg.2018.04.008.
- 7) Kikuri T, Mishima H, Imura H, Suzuki S, Matsuzawa Y, Nakamura T, Fukumoto S, Yoshimura Y, Watanabe S, Kinoshita A, Yamada T, Shindoh M, Sugita Y, Maeda H, Yawaka Y, Mikoya T, Natsume N, Yoshiura KI. Patients with SATB2-associated syndrome exhibiting multiple odontomas. *Am J Med Genet A*. 2018, 176(12), 2614-2622. doi: 10.1002/ajmg.a.40670.
- 8) Hidaka H, Higashimoto K, Aoki S, Mishima H, Hayashida C, Maeda T, Koga Y, Yatsuki H, Joh K, Noshiro H, Iwakiri R, Kawaguchi A, Yoshiura KI, Fujimoto K, Soejima H. Comprehensive

methylation analysis of imprinting-associated differentially methylated regions in colorectal cancer. *Clin Epigenetics*. 2018, 4;10(1), 150. doi: 10.1186/s13148-018-0578-9.

- 9) 吉浦孝一郎, “全ゲノム関連解析研究(GWAS)の原理と考え方,” 遺伝子医学, vol. 9, no. 1, pp. 114-121, 2019.01, 2019.

## 2. 学会発表

- 1) 第25回分子皮膚科学フォーラム, 2018年4月13-14日, フォーポイントバイシエラトン函館, 北海道. 金澤伸雄, 中谷友美, 原知之, 稲葉豊, 国本佳代, 古川福実, 神人正寿, 金城紀子, 水島恒裕, 三嶋博之, 木下晃, 吉浦孝一郎, 邊見弘明, 改正恒康. 中條-西村症候群からプロテアソーム関連自己炎症/免疫不全症候群へ. 【口演】
- 2) 第3回放射線災害・医科学研究拠点カンファランス, 平成30年6月2日(土), 長崎大学熱帯医学研究所グローバルヘルス研究棟1階大セミナー室, 長崎. 蓬萊真喜子, 三嶋博之, 林田知佐, 木下晃, 中根允文, 松尾辰樹, 鶴田一人, 柳原克紀, 佐藤信也, 今西大介, 今泉芳孝, 波多智子, 宮崎泰司, 吉浦孝一郎. 爆心地周辺被爆者の子孫における新規一塩基変化の検出. 【口演】
- 3) 第3回放射線災害・医科学研究拠点カンファランス, 平成30年6月2日(土), 長崎大学熱帯医学研究所グローバルヘルス研究棟1階大セミナー室, 長崎. 宮崎泰司, 蓬萊真喜子, 鳥山愛生, 松尾真稔, 田口正剛, 糸永英弘, 佐藤信也, 澤山靖, 波多智子, 吉浦孝一郎, 岩永正子. 原爆被爆者および非被爆者の骨髄異形成症候群の研究. 【口演】
- 4) 日本人類遺伝学会第63回大会, 2018年10月10日(水)-13日(土), パシフィコ横浜, 神奈川. 三嶋博之, 吉浦孝一郎. 低depth全ゲノムシーケンシングによるコピー数バリエーション検出の性能評価. (Evaluation of copy-number variation detection techniques using shallow-depth whole genome sequencing) 【English Session Oral: O-91】
- 5) 日本人類遺伝学会第63回大会, 2018年10月10日(水)-13日(土), パシフィコ横浜, 神奈川. 伊達木澄人, 渡辺聡, 吉浦孝一郎, 森内浩幸. ROBO1遺伝子ホモ変異は, 複合型下垂体機能低下症を伴う新たな症候群の原因か? 日本人類遺伝学会第63回大会, 2018年10月10日(水)-13日(土), パシフィコ横浜, 神奈川. 【Poster: P-059】
- 6) 日本人類遺伝学会第63回大会, 2018年10月10日(水)-13日(土), パシフィコ横浜, 神奈川. 長谷川ゆり, 東島愛, 大橋和明, 三浦清徳, 吉浦孝一郎, 増崎英明. 妊娠を契機に深部静脈血栓症を発症し, 原因遺伝子を特定出来たAT-3欠乏症の1例. (Poster: P-204)
- 7) 日本人類遺伝学会第63回大会, 2018年10月10日(水)-13日(土), パシフィコ横浜, 神奈川. 渡辺聡, 伊達木澄人, 里龍晴, 木原敏晴, 濱口陽, 吉浦孝一郎, 森内浩幸. KAT6Bヘテロ接合性変異によるGenitopatellar症候群の2例. 【Poster: P-209】
- 8) 日本人類遺伝学会第63回大会, 2018年10月10日(水)-13日(土), パシフィコ横浜, 神奈川. 森本芳郎, 小野慎治, 吉田真太朗, 三嶋博之, 木下晃, 今村明, 黒滝直弘, 小澤寛樹, 木住野達也, 吉浦孝一郎, 山口尚宏. CFAP43遺伝子の機能喪失性変異は正常圧水頭症のリスク因子の可能性がある. 【Poster: P-212】
- 9) 日本人類遺伝学会第63回大会, 2018年10月10日(水)-13日(土), パシフィコ横浜, 神奈川. 吉田真太朗, 森本芳郎, 小野慎治, 三嶋博之, 木下晃, 今村明, 黒滝直弘, 小澤寛樹, 木住野達也, 吉浦孝一郎. ロングリードシーケンサーのみによるヒトゲノム構造異常の評価. 【Poster: P-268】
- 10) ヤポネシアゲノム新学術領域研究 第一回A01班会議, 2018年9月8日, 長崎大学原爆後障害医療研究所, 長崎. 吉浦孝一郎. 耳あか型遺伝子ハンティングと今後ヤポネシアゲノムでの研究計画. 【口演】
- 11) 第80回日本血液学会学術集会, 2018年10月12日(金)-14日(日), 大阪国際会議場, 大阪. 山下友佑, 田村志宣, 福田有里, 小笹俊哉, 金澤伸雄, 邊見弘明, 吉浦孝一郎, 改正恒康, 園木孝志. 新規LIG4遺伝子変異を導入したLIG4症候群モデルマウス. 【OS1-11A-4: 口演】
- 12) 第72回日本人類学会大会 公開シンポジウム2 DNAからみた人の進化 ~故宝来聡博士の業績を顕彰しつつ~. 2018年10月22日, 国立遺伝学研究所講堂, 三島, 静岡. 吉浦孝一郎. 日本人のなか耳垢型多型. 【口演】
- 13) 日本放射線影響学会 第61回大会, 2018年11月7~9日, 長崎ブリックホール, 長崎. 蓬萊真喜子, 三嶋博之, 林田知佐, 木下晃, 中根充文, 松尾辰樹, 鶴田一人, 柳原克紀, 佐藤信也, 今西大介, 今泉芳孝, 波多智子, 宮崎泰司, 吉浦孝一郎. WS10-4: 次世代シーケンサーを用いた近距離被ばく者世代間での新規突然変異検出. 【口演】
- 14) ヤポネシアゲノム新学術領域研究 第一回全体会議, 2018年11月11日, 青山学院大学青山キャンパス, 創建ビル14号館第16

- 会議室，東京。吉浦孝一郎。A01 班の活動紹介 3。【口演】
- 15) 第 47 回日本免疫学会学術集会，2018 年 12 月 10 日（月）-12 日（水），福岡国際会議場，福岡。3-H-WS37-3-P: Noriko Kinjo, Hiroyuki Mishima, Akira Kinoshita, Koh-Ichiro Yoshiura, Tsunehiro Mizushima, Jun Hamazaki, Shigeo Murata, Nobuo Kanazawa. A case of neonatal-onset proteasome-associated autoinflammatory syndrome resembling but distinct from Nakajo-Nishimura syndrome. 【ポスター】
- 16) 第 47 回日本免疫学会学術集会，2018 年 12 月 10 日（月）-12 日（水），福岡国際会議場，福岡。3-H-WS37-4-O/P: Toshiya Ozasa, Hiroaki Hemmi, Akira Kinoshita, Takashi Kato, Takashi Orimo, Izumi Sasaki, Yuri Fukuda-Ohta, Noriko Kinjo, Koh-Ichiro Yoshiura, Tsunehiro Mizushima, Nobuo Kanazawa, Tsuneyasu Kaisho. Analysis of mice varying a novel mutation in a proteasome subunit gene identified in an autoinflammatory disease - Proteasome-associated autoinflammation and immunodeficiency disease (PRAID)-. 【Workshop 口演】
- 17) 第 47 回日本免疫学会学術集会，2018 年 12 月 10 日（月）-12 日（水），福岡国際会議場，福岡。1-E-WS7-2-O/P: Hiroaki Hemmi, Toshiya Ozasa, Akira Kinoshita, Takashi Kato, Takashi Orimo, Izumi Sasaki, Yuri Fukuda-Ohta, Noriko Kinjo, Koh-Ichiro Yoshiura, Tsunehiro Mizushima, Nobuo Kanazawa, Tsuneyasu Kaisho. Impaired development of dendritic cells in proteasome subunit mutant mice. 【Workshop 口演】
- 18) 日本小児学会長崎地方会，2018 年 12 月 16 日，長崎市長崎大学病院。三嶋博之，近藤達郎，鈴木寿人，吉浦孝一郎，小崎健次郎：患者顔貌画像による先天性形態異常症候群診断補助システム Face2Gene の本邦症例を用いた性能評価。【口演】
- 19) 第 2 回 日本免疫不全・自己炎症学会総会・学術集会，2019 年 2 月 2 日（土）・3 日（日），東京ガーデンテラス紀尾井町紀尾井カンファレンス，東京。小浴秀樹，山下友佑，田志宣，金澤伸雄，大島孝一，三嶋博之，木下晃，吉浦孝一郎，園木孝志。FAS 遺伝子の compound heterozygous frameshift mutation を有する腸管 MALT リンパ腫の若年例。【口演】

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得  
該当無し
2. 実用新案登録  
該当無し
3. その他  
該当無し