

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
分担研究報告書

「歌舞伎症候群の疾患レジストリ作成と
診療ガイドライン・重症度分類の改定へむけてのデータ取得」

研究分担者 吉浦孝一郎
原爆後障害医療研究所・教授

研究要旨

歌舞伎症候群において、KMT2DとKDM6A遺伝子の変異解析だけでは確定診断は不可能である。しかし、歌舞伎症候群で特異的に変化が認められるCpGアイランドのメチル化状態の変化を捉えることによって、変異解析と組み合わせでどちらか一方で、診断を下すことで見逃しが少なくなる。

メチル化解析の方法は、多領域の確認が必要なため、酵素的変換後のシーケンス解析によるが、本法がこれまでのゴールドスタンダードと思われてきた 亜硫酸による化学変換後シーケンス法と比較して信頼出来るのか否かの確認を行った。酵素的変換後シーケンス解析法は、十分に安定して結果を出すことが可能で、亜硫酸変換後シーケンス法と同等あるいはそれ以上の安定性をもって診断に応用可能であると結論づけることができる。

A. 研究目的

ヒストンメチル化異常症による先天異常症候群の一つである歌舞伎症候群について、九州地区の成育医療施設としての支援機能、診療ガイドライン・重症度分類の改定、疾患レジストリ作成を行う。昨年度確立した診断に有用なメチル化解析法について、これまでゴールドスタンダードとされていた亜硫酸変換後シーケンス解析法との比較検討をおこなった。

B. 研究方法

診断に有用なメチル化部位は、全ゲノム亜硫酸変換後シーケンス解析法により同定した。しかし、診断時は多数の部位を解析しなければならないため、酵素変換法によって診断を実施する。酵素変換法は、比較的新しい技術であり、これまでのゴールドスタンダード法である亜硫酸変換後シーケンス解析法と同一結果を返すのかを検証しておく必要がある。

全ゲノム亜硫酸変換後シーケンス解析を実施した歌舞伎症候群5名は、診断に有用なメチル化部位 119 領域を対象として酵素変換法により解析しているため、対象 119 領域については、亜硫酸変換法と酵素変換法とによる両データがある。両法によるメチル化率の比較を行い、酵素変換法の有用性を確認した。

目的領域 119 領域に存在して、充分量の depth が確保されている CpG サイトについて EM-Seq によるメチル化%を昇順に並べ、横軸にその%をとった。同部位の Bisulfite Seq データから得られた%を縦軸として、点プロットを作成した。

(倫理面への配慮)

歌舞伎症候群患者試料は、KMT2DとKDM6A 遺伝子解析および全てゲノム解析およびエピゲノム解析について同意を得た試料である。非罹患 DNA は、他の遺伝解析研究参加者で研究参加時に健常対照として、全てゲノム解析およびエピゲノム解析について同意を得た試料である

C. 研究結果

Bisulfite-SeqとEM-Seq のデータが完全に一致すれば、0を通る傾き1の直線 ($y=x$) となるはずである。5サンプル中2サンプルは、おおよそそのような直線に沿っているが、他3サンプルは、Bisulfite-Seq でメチル化率が高く描画された。

D. 考察

点プロットの結果は、Bisulfite 処理による非メチル化 C のウラシルへの変換が完全には

進行しない場合がある可能性と EM-Seq 反応が不安定でメチル化 C も変換してしまう可能性がある。しかし、EM-Seq の診断において、一定した結果がえられていたことから、Bisulfite-Seq 実験においては、非メチル化シトシンのウラシルへの変換が不安定で、変換されていない場合があると結論づけている。

E. 結論

ヒストン修飾酵素異常症の診断は、原因遺伝子そのものの変異解析と当該疾患特異的に変化する CpG 部位をターゲットとしてメチル化率を非罹患者と比較することで診断の補助となる。メチル化状態は診断バイオマーカーとなり得ること、DNA 診断とメチル化診断によって歌舞伎症候群が多くの亜系に分類できることが明かである。目的部位のメチル化率を測定するには、EMzymatic-Methy Sequence 法が優れており、有用と考える。これまでゴールドスタンダード法と考えられていた Bisulfite Sequence 法は、実験（診断）の際に、変換効率等のモニターを決めて利用しないと間違った結果を導く可能性がある。検査方法としては、適当ではないと考察する。

全ゲノムを対象としたメチル化率の解析も、TET/APOBEC の酵素による非メチル化シトシンの変換後に、全ゲノムシーケンス法を実施することが安定した結果を得るのには適していると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Mushino T, Hiroi T, Yamashita Y, Suzaki N, Mishima H, Ueno M, Kinoshita A, Minami K, Imai K, Yoshiura KI, Sonoki T, Tamura S. Progressive Massive Splenomegaly in an Adult Patient with Kabuki Syndrome Complicated with Immune Thrombocytopenic Purpura. Intern Med. 2021;60(12):1927-33.
2. Tamura S, Kosako H, Furuya Y, Yamashita Y, Mushino T, Mishima H, Kinoshita A, Nishikawa A, Yoshiura KI, Sonoki T. A Patient with Kabuki Syndrome Mutation Presenting with Very Severe Aplastic Anemia. Acta Haematol. 2022;145(1):89-96.

2. 学会発表

1. 濱口 陽, 三嶋博之, 河合智子, 斎藤伸治, 秦 健一郎, 木下 晃, 吉浦孝一郎, 次世代シーケンサーを用いた歌舞伎症候群の新規 DNA メチル化サイトの検索, 日本人類遺伝学会第 66 回大会/第 28 回日本遺伝

子診療学会大会 合同開催,パシフィコ横浜,2021,Oct,13~16,国内

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし