

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
国立大学法人長崎大学 原爆後障害医療研究所 教授

研究要旨

歌舞伎症候群において、*KMT2D*と*KDM6A*遺伝子の変異解析だけでは、遺伝学的解析による確定診断は不可能で、やはり患者症状による臨床診断が基本である。しかし、歌舞伎症候群において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をDNA変異解析と組み合わせることで、遺伝学的解析によって診断確定の可能性を広げることができ

る。
メチル化解析による診断は、多領域のメチル化状態の組みあわせが必要なため、ターゲット領域の酵素的変換後シーケンス解析により行われる。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。過去に歌舞伎症候群と診断された症例に対して、新規に同定した患者特異的な変化 CpG アイランド部位の解析を実施し、その有用性を検討した。

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。

本年度は、歌舞伎症候群診断に有用なメチル化部位について、ターゲット領域のハイブリダーゼーション濃縮と酵素的変換後シーケンス解析によって、診断有用性と歌舞伎症候群のサブグループ化の可能性を検討した。

B. 研究方法

診断に有用なメチル化部位は、2トリオと3患者の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。診断は、患者特異的に変化している部位（診断有用部位）を選択した後に、その有用部100ヶ所程度を同時解析しなければならないため、ターゲット領域のハイブリダーゼーション濃縮と酵素変換法によって診断有用性とサブグループ化の可能性を検討した。

全ゲノム亜硫酸変換後シーケンス解析によって歌舞伎症候群5名に特異的に変化している診断に有用なメチル化部位、118領域を診断

有用部位として酵素変換法により解析した。解析対象は、これまでに当教室で収集された臨床診断が歌舞伎症候群31人と非罹患者34名を対象とした。

(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。非罹患者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

酵素変換法は、比較的新しい技術であるが、昨年までに、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等以上の安定性をもった解析法であることを確認した。

118領域を用いてメチル化率を算出し、メチル化率によってクラスタ分類することで、歌舞伎症候群だけが集まるクラスを分類することができた。その中には、1例の*KMT2D*と*KDM6A*遺伝子ともに変異が見つかっていない症例が認め

られた。変異が確定している19症例についても、必ずしも患者特異的クラスタに集まっている訳ではなく、7/19は、非罹患者クラスタに分類された。

変異陰性症例は、非罹子どもとクラスタを形成する傾向があった。

D. 考察

今回は、既に発表されている歌舞伎症候群特異的 CpG 部位ではなく、自ら探索した CpG 部位を使って、歌舞伎症候群クラスタを分類することができた。ただし、変異があっても非罹患者や非罹患者大人に近く分類されることもあり、歌舞伎症候群の病態には多様性があることが強く推定される。クラスタ形成した歌舞伎症候群、またはクラスタに分類されなかった歌舞伎症候群に特徴的な症状や重症度は、臨床医の診断のもとで遺伝子診断を実施・収集した試料であり、記載されておらず、今回の CpG 部位の意味については、不明である。

KMT2D と *KDM6A* 遺伝子 ともに変異がみつからない症例が、歌舞伎クラスタに含まれていることから、“臨床診断”歌舞伎症候群の原因となっている症例から、歌舞伎症候群の新規遺伝子を見つけることができる可能性がある。あるいは、臨床診断が歌舞伎症候群の中に既知の症候群と臨床的に重なるスペクトラムに分類される可能性がある。

E. 結論

メチル化状態の解析を実施することで歌舞伎症候群の遺伝子変異解析に代用することが可能であると思われる。既知 (Aref et al. による報告) の CpG 部位と我々が見付けた CpG 部位両方を用いれば、ほぼ見逃しはないであろうと考えられる。

加えて、我々のプローブセットで見られたように、歌舞伎症候群もサブグループに分類することが可能であろうと思われる。患者レジストリに知的障害、運動障害等の数値的評価を加えて登録することにより患者を層別化し、メチル化で重症度の分類が可能となるかも知れない。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hamaguchi Y, Mishima H, Kawai T, Saitoh S, Hata K, Kinoshita A, Yoshiura KI. Identification of unique DNA methylation sites in Kabuki syndrome using whole genome bisulfite sequencing and targeted hybridization capture followed by enzymatic methylation sequencing. *J Hum Genet.* 2022;67(12):711-20.

- 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

なし

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