

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業）  
総合研究報告書

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

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、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ことが班全体としての目標である。本研分担者では、多様な症状や重症度を示す歌舞伎症候群の分類に活用できる方法としてDNAのメチル化解析が利用可能であるかについて検討することが目標である。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、やはり患者症状による臨床診断が基本である。遺伝子変異がない症例もメチル化パターンで歌舞伎症候群と分類でき、診断が可能である。本研究では、このメチル化パターンの違いで、症例の階層化分類ができるのではないかの着想で研究を行った。

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り行った。酵素的変換後シーケンス解析法は、亜硫酸処理法に比べて十分に安定して結果を出すことが可能で、ハイブリダイゼーション濃縮法と組み合わせることが可能となるため、解析目的部位が明瞭なら場合には、安価に正確にメチル化解析を実施する有効な方法である。

独自に選定した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。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。我々独自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、運動障害等の数位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。

### A. 研究目的

研究班としては、さまざまな疾患について、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ことが目標である。本研究では、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が目標となる。

*KMT2D* および *KDM6A* 遺伝子変異の有無、特定領域のDNAメチル化によって症候群が細分化されるか否かの検討を行うことを目的とした。これまでDNAメチル化解析の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酵素的変換後シーケンス解析法の比較検討を行い検討し適切な解析法を確立すること、～200 CpG 部位程度の解析で歌

舞伎症候群を分類・階層化することを、この分  
担研究の目的とした。

### B. 研究方法

分類のための歌舞伎症候群患者で特異的に変化しているメチル化部位の選択には、5名の歌舞伎症候群患者と4名の患者親のゲノムDNAを用いて（2トリオと3人の患者）、亜硫酸処理後全ゲノム塩基配列決定を行い比較検討した。その後、選択した歌舞伎症候群特異的 differentially methylated region (DMR) 119ヶ所について、31名の歌舞伎症候群患者（変異確定：19症例、変異未確定な臨床診断例：12例）、非罹患者子ども11名、非罹患者おとな23名を対象として、ピオチン修飾オリゴヌクレオチドを利用したDNA濃縮法と酵素的メ

チル化解析法を組み合わせることで歌舞伎症候群の層別化・細分化を試みた。DMRの選択は、全ゲノム亜硫酸変換後シーケンス解析法により、患者において対照者とはメチル化%が変化している部位として同定した。

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でも解析しているので、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%をとり、全ゲノム亜硫酸変換後シーケンス解析と酵素変換法とによる両データの実験データ安定性を検討した。

#### (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

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。

ビオチン修飾オリゴヌクレオチドを利用したDNA濃縮法と酵素的メチル化解析法を組み合わせたメチル化解析法は、データ取得について安定していると考えられたため、解析ターゲットとした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ー分類することで、歌舞伎症候群だけが集まるクラス(変異確定例12例と変異未確定1例)を分類することができた。変異が確定している19症例について、必ずしも患者特異的クラスターに集まっている訳ではなく、7/19は、非罹患者クラスターに分類された。変異陰性症例は、非罹患者子どもとクラスターを形成する傾向があり、DNAメチル化解析によって、変異を有する患者群もDNAメチル化解析によって、いくつか亜系に分類できる可能性がある。

### D. 考察

歌舞伎症候群は、原因遺伝子の変異を必須としない臨床診断である。それは、特異的顔貌や知的障害などがそろっても変異が無い症例や、知的障害が極めて軽度であったり、特異的な顔貌が認められなかったりしても原因遺伝子に変異が認められる症例が数多く認められるため妥当である。ただし、そのような多様性に富む患者群を何かのバイオマーカーによって階層化・重症度分類を行うことは、患者の経過観察、予後予想など臨床的には非常に重要である。それらの患者階層化分類のために遺伝子DNA解析とシトシンメチル化の解析を組み合わせた分類法を確立した。

メチル化解析による分類は、分類の特異性が高い(偽陽性がない)く、変異陰性例の11名のうち1名は、歌舞伎クラスターに分類された。この1名は、変異陽性例と同等の分子遺伝学的検査による歌舞伎症候群診断がなされても良いと考える。

一方、変異が陽性でも歌舞伎症候群クラスターに分類されない例も多く、変異陰性歌舞伎症候群とメチル化解析では分類できない。我々が使った119ヶ所のCpGアイランドによる分類がどのような臨床分類と関連しているかは、今後の解析が必要であるが、遺伝子変異による分類とは異なる何らかの臨床症状による亜系分類を示唆しているように思われる。

### 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らかである。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。

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、メチル化解析ターゲットのプローブを使った解析で見られたように、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。既に論文発表されたプローブセットもあることから、多くの亜系分類可能なプローブセットを構築することが可能であろう。ただ、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し、臨床症状を明確に記載したレジストリを構築してメチル化解析と合わせることにより、明確に患者を層別化し、メチル化で重症度の分類が可能となると思われる。

## 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) 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.

- 3) 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) 第44回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, SI—1:新しいゲノム解析技術～メチル化解析～, 吉浦孝一郎, 2020.7.3～5, 沖縄 (online), 国内
- 2) 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, 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, 瀨口陽, 三嶋博之, 河合智子, 斎藤伸治, 秦健一郎, 木下 晃, 吉浦孝一郎, 2021.10.13～16, パシフィコ横浜, 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