

令和元年6月14日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09557

研究課題名(和文) 網羅的エクソーム解析を利用した稀少肺疾患の責任遺伝子同定に向けて

研究課題名(英文) Genetic exploration in the cause of developing rare lung diseases using whole exome sequence analyses

研究代表者

瀬戸口 靖弘 (SETOGUCHI, Yasuhiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任教授

研究者番号：90206649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：特発性間質性肺炎の中でも稀少間質性肺炎であるPPFE(pleuroparenchymal fibroelastosis)は9症例のゲノムを調べた結果、8症例にテロメア関連遺伝子と細胞接着関連遺伝子の病的変異を認め、残り1症例でもテロメア関連遺伝子の機能性RNA(ncRNA)の変異を同定した。家族性間質性肺炎では約半数以上にサーファクタント関連遺伝子とテロメア関連遺伝子の病的変異を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

稀少間質性肺炎PPFEを除く家族性間質性肺炎のほとんどは、サーファクタント関連遺伝子変異が、またPPFEにおいては、テロメア関連遺伝子変異或いはその遺伝子の転写後制御に関わるRNA変異が病態形成に関わっている可能性を明らかにした。これまで有効な治療もなく予後不良な間質性肺炎の一部であるが成因に関わる遺伝子を特定したことは、今後の治療方開発や予防への大きな糸口となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Pleuroparenchymal fibroelastosis (PPFE) is a rare pulmonary fibrosis that is clinically characterized by upper lobe predominant fibrosis. The etiology remains unknown as well as other idiopathic interstitial pneumonias. To explore causative genes in developing PPFE as well as familial interstitial pneumonia (FIP), whole exome analyses or DNA sequence analyses with sanger method were performed in genome from 9 cases with adult-onset PPFE and 47 cases with adult-onset FIP. Deleterious variant in telomere-associated genes or cell adhesion factor associated genes were identified in all PPFE cases. Of FIP without PPFE, 57% was found to carry deleterious variants in surfactant-associated genes.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：特発性間質性肺炎 PPFE ゲノム エクソーム解析 遺伝子 サーファクタント テロメア 細胞接着因子

1. 研究開始当初の背景

発症要因が十分解明されておらず、また予後不良な呼吸器疾患である特発性間質性肺炎の遺伝的背景の研究は、全ゲノム関連解析 (GWAS) による複数の感受性遺伝子の SNP が報告されてきているが原因の本体には届いていない状況である。一方、家族性の小児新生児間質性肺炎では連鎖解析により Surfactant protein C 遺伝子 (*SFTPC*) と ATP-binding cassette transporter A3 遺伝子 (*ABC-A3*) などのサーファクタント関連遺伝子の deleterious rare variants が当該報告者を含め各国から報告されてきた。しかし、同定された変異は、20%程度に過ぎず大部分は明らかになっていない。また、成人発症の特発性間質性肺炎については、GWAS のデータのみで責任遺伝子の同定についての十分な検討はなされていない状況である。次世代高速シーケンサーの開発により全ゲノムの蛋白質のコーディング領域 (エクソン領域) を中心とした塩基配列の解析が可能となっていることから疾患責任遺伝子特定とその rare variant 同定をメンデル遺伝形式が推定される家族性間質性肺炎、遺伝形式は特定できないが発症年齢が 50 歳未満の若年性間質性肺炎、特発性間質性肺炎の中で特徴的な臨床像をとる稀少間質性肺炎 PPFE (pulmonary pleuroparenchymal fibroelastosis) について実施した。

2. 研究の目的

予後不良で有効な治療法のない特発性間質性肺炎の線維化機序や治療法開発の糸口を探索する目的でメンデル遺伝形式が推定される家族性間質性肺炎 (遺伝性間質性肺炎)、メンデル遺伝形式は明らかでないが発症年齢が若い進行性間質性肺炎、臨床的かつ病理学的に特徴的な所見を有する稀少特発性間質性肺炎 PPFE に焦点をあて発症責任遺伝子の同定を高速次世代シーケンサーによる全ゲノムエクソーム解析で試みる。同定された責任遺伝子の肺線維化へつながる機能解析の準備を行う。

3. 研究の方法

対象症例は、PPFE 9 症例 (家族性 1 例)、家族性間質性肺炎 45 症例、若年孤発例 1 症例について末梢血より DNA 抽出を行い、最初にサンガー法にてサーファクタント関連遺伝子 *SFTPC*, *ABCA3* のスクリーニングをかけいずれの遺伝子の rare variant の同定できなかった症例について次世代高速シーケンサー (Illumina HiSeq) にてシーケンスを実施した。約 6 千万から 7 千万リード数で参照配列へのマッピングし、低品質リードや Duplicates リードを除去し再アライメント処理をおこなった。その後、再アライメント済みのマッピング結果を用いて参照配列と異なる塩基配列一覧を作成し SnpEff または vcftools を用いてアノテーション情報を加え解析を行った。最終的に絞り込まれた rare variant については更にサンガー法にてシーケンスを行い rare variant の確認を行った。疾患との関連性を調べるために変異を有する責任遺伝子のノックインマウスを用い線維化の機序を探った (徳島大学、理研との共同研究)。また、京都大学との共同研究で変異責任遺伝子を有する iPS 細

胞を間質性肺炎末梢血白血球から作成し、肺胞上皮細胞等へ分化させ線維化の機序について分子生物学的に評価（次の研究）への準備を行った。

4. 研究の成果

(1) PPFE (Pleuroparenchymal fibroelastosis) の全エクソーム解析結果

稀少間質性肺炎のため当初 7 症例の解析を予定し、本研究を申請したが、その後家族性症例も集まり末梢血 DNA を抽出し、はじめにサーファクタント関連遺伝子の *SFTPC* と *ABCA3* についてサンガー法で変異の有無をスクリーニングしたが、rare variant は同定されなかった。次に次世代高速シーケンサーで全エクソーム解析を行った結果、SNP は、平均 14 万箇所、挿入変位数 平均 8000、欠失変位数 平均 8500 であった。驚くべきことに全例に rare variant が同定され、9 例中 7 例（78%）は、テロメア関連分子の遺伝子 *RTEL1* の変異であった。内 4 例は sporadic であった。

残り 2 例は細胞接着関連分子の遺伝子 *DSP* と細胞死や inflammasome の制御に関連の分子の遺伝子 *DPP9* の rare variant であった。

(2) 家族性間質性肺炎の遺伝子解析結果

家族性間質性肺炎 45 症例について PPFE 同様、*SFTPC*, *ABCA3* についてサンガー法で rare variant の解析を行った結果、19 症例について rare variant を同定することができた。残り 26 例について全エクソーム解析を実施した。5 症例では DNA の状態が悪く解析に至らなかったが、現在までのところ 21 症例中 5 症例で rare variant を同定した。サーファクタント関連遺伝子 *SFTPA1*, *SFTPA2*, とテロメア関連遺伝子 *TERT* の rare variant とであった。サーファクタント関連遺伝子の deleterious rare variant が家族性間質性肺炎 45 例中 23 例（51%）に同定されたことは、これまで報告がなく、サーファクタント関連遺伝子変異は、小児間質性肺炎がほとんどであると海外からの報告であったのみで本邦の成人発症の家族性間質性肺炎の半数に認められたことは、驚くべきことである。

(3) 若年発症孤発性間質性肺炎の全エクソーム解析結果

今回 25 歳発症間質性肺炎症例 1 例についてサンガー法ではサーファクタント関連遺伝子変異は同定できず、全エクソーム解析を実施した。その結果、テロメア関連遺伝子 *RTEL1* の rare variant を同定した。他の症例同様 in silico の解析では deleterious rare variant であった。

(4) 遺伝子変異同定から病態機序への取り組み

これまで少ない報告からは、間質性肺炎の機序に肺胞 II 型細胞の autophagy 異常、小胞体ストレスが引き金となる可能性が実験動物のデータで示されてきたが ヒトに於けるデータは、血液疾患と異なり肺検体を得られにくい状況からないに等しい。今回の deleterious rare variant を同定した症例で necroptosis による間質性肺炎が存在することをヒトの肺の病理検体と実験動物で明らかにした（徳島大学、理研との共同研究）。この機序についてもこれ

まで大きな報告はなく最初のものである。現在、同定した rare variant を有する症例の生きた肺細胞での肺線維化の機序をあきらかにするため京都大学との共同研究で iPS 細胞作成を計画進行中で一部肺細胞への分化も試みている。次期の研究の準備として進行中である。

(5) まとめ

これまで成因の明らかでなかった特発性間質性肺炎の中で特異な臨床像を呈する PPFE 全例また家族性間質性肺炎の責任遺伝子を多く特定できた。これを基にこれらの症例の iPS 作成と肺細胞への分化を通じて治療法開発、新しい診断法開発に次期研究ですすめていきたいと考える。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文等] (計7件)

Takezaki A , Tsukumo S , Setoguchi Y, Ledford J , Goto H, Hosomichi K, Uehara H, Nishioka Y, Yasutomo K Human type II alveolar epithelial cells with a mutation in *SFTPA1* drive necroptosis in pulmonary fibrosis. J Exp Med 査読有
(Under revision) 2019

片柳真司 瀬戸口靖弘 間質性肺炎の疾患遺伝子と過敏性肺炎 アレルギー
ー・免疫 査読有 25:94-103,2018

瀬戸口靖弘 Hermansky-Pudlak 症候群：肺線維症への分子機序 呼吸器内科
査読無 31:88-94, 2017

Ohbayashi H, Setoguchi Y, Fukuchi Y, Shibata K, Sakata Y, Arai T
Pharmacological effects of lysozyme on COPD and bronchial asthma with
sputum: A randomized, placebo-controlled, small cohort, cross-over study
Pulm Pharmacol Ther. 査読有 37:73-80,2016 doi: 10.1016/j.pupt.2016

Yamakoshi S, Kasai T, Tomita Y, Takaya H, Kasagi S, Kawabata M, Narui K,
Setoguchi Y. Comparison of clinical features and polysomnographic findings

between men and women with sleep apnea. J Thorac Dis. 査読有 8:145-

151,2016 doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2016

Yanagihara M, Tsuiki S, Setoguchi Y, Inoue Y. Treatment of Obstructive Sleep

Apnea with a Tongue-Stabilizing Device at a Single Multidisciplinary Sleep

Center J Dental Sleep Med 査読有 3:43-47,2016 doi. ogr/10.15331/jdsm.5716

瀬戸口靖弘 間質性肺炎の発症要因に関わる遺伝子 最新医学 査読無 1249-

1258,2016

[学会発表] (計 8 件)

Setoguchi Y, Ishiwari M Clinical, Pulmonary Physiological and Genetic

Characteristics in Adult-Onset Familial Interstitial Pneumonia (FIP) ATS 2018

Inoue Y, Yamaguchi E, Setoguchi Y, et al. Fatal cases of pulmonary alveolar

proteinosis: a nationwide surveillance in Japan ERS 2018

瀬戸口靖弘 特発性間質性肺炎の成因に関する責任遺伝子同定から遺伝性間質性

肺炎へ 第 58 回日本呼吸器学会学術講演会 2018

瀬戸口靖弘 成人発症特発性間質性肺炎における発症責任遺伝子同定と臨床

的、画像的、呼吸生理学的特徴 第 58 回日本呼吸器学会学術講演会 2018

Setoguchi Y, Kawagoe S, Kitagawa S Characteristics of Age at Onset in

Adult-Onset Hereditary Interstitial Pneumonia (HIP) ATS 2017

Inoue Y, Arai T, Akira M, Nakata K, Yamaguchi E, Setoguchi Y, et al.
Comorbid interstitial lung diseases and collagen vascular diseases in
pulmonary alveolar proteinosis: a nationwide surveillance in Japan ERS
2017

瀬戸口靖弘 特発性間質性肺炎（IIP）の線維化進行に関連する分子動態の検
討 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会 2017

Kasagi S, Narui K, Kawagoe J, Fujiwara A, Sugiyama S, Togashi Y, Yamakoshi
S, Nakayama H, Setoguchi Y. Relationship between sleep breathing disorders
and impairment of pulmonary function in interstitial pneumonia. APSR 2016

[図書] (計 3 件)

瀬戸口靖弘 克誠堂出版 画像から学ぶびまん性肺疾患、2018、310 (分担部
位 家族性間質性肺炎 104-111)

瀬戸口靖弘 メディカルドゥ 最新多因子遺伝性疾患研究と遺伝カウンセリング
遺伝子医学 MOOK、2018、292 (担当部位 慢性閉塞性肺疾患、間質性肺炎
158-164)

瀬戸口靖弘 片柳真司 中山書店 間質性肺炎・肺線維症と類縁疾患 呼吸器
疾患診断治療アプローチ、2018、374 (分担部位 肺サーファクタント蛋白
の病態生理 26-35)

[産業財産権]

出願状況 (なし)

取得状況 (なし)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

(2) 研究協力者

研究協力者：中島 利博

ローマ字氏名：(NAKAJIMA Toshihiro)