

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2021
課題番号：18K15889
研究課題名(和文) トランスクリプトーム解析とエクソーム解析を融合した遺伝性心疾患の新規原因変異探索

研究課題名(英文) Search for novel mutation of inherited cardiovascular disease with combination of RNA-seq and WES

研究代表者
多久和 綾子 (Takuwa, Ayako)
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任研究員

研究者番号：50779791
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：研究期間の前半では、トランスクリプトーム解析とDNA変異解析を組み合わせることで、スプライシング異常を引き起こす変異の探索を行った。遺伝性循環器疾患患者の内、既知の病原性変異が同定されず、生検検体が得られる心移植例を対象に、WESとRNA-seqを実施し、そのリードマッピングの比較から複数のスプライシング異常原因変異候補を見出した。一方、研究期間の後半では研究対象が血液腫瘍となり、体細胞変異解析とロングリードRNA-seqを組み合わせた迅速な診断システムの構築を試み、30%程度の症例について病原変異の同定が可能となっているほか、解析パイプラインの改善を進め解析日数の大幅な短縮にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
希少な遺伝性疾患は単一変異を原因としたものが多く、その病原変異の特定のためには、全エクソーム解析(WES)を含むNGSを用いた網羅的な遺伝子解析が有効である。しかしながら、遺伝子異常が強く疑われる症例であっても、WESでその原因変異を同定できる症例は50%程度にとどまっている。未解決の症例の中には、一見してアミノ酸変異を引き起こす変異はないものの、コピー数異常や構造異常、スプライシング異常を引き起こしているパターンが含まれていると想定されており、その解決は、治療方針の決定や遺伝カウンセリングに役立てることができるほか、高精度のスプライシング異常予測プログラムの開発に向けた情報を提供しうる。

研究成果の概要(英文)：In the first half of this study period, mutations causing splicing abnormalities were searched for by combining RNA-seq and WES. We performed WES and RNA-seq on heart transplant patients with inherited cardiovascular disease in whom no known pathogenic mutations were identified. Based on the comparison of their read mapping results, I found multiple candidates splicing aberration-causing mutations. On the other hand, in the second half of this study period, due to a change in research institutions, my research focus became hematologic tumors, and I attempted to construct a rapid diagnostic system combining WES or targeted DNA sequencing with long-read RNA-seq, focusing on somatic mutations. As a result, pathogenic mutations could be identified in about 30% of the cases analyzed, and the analysis pipeline has been improved resulting in a significant reduction in the number of analysis days.

研究分野：臨床遺伝子解析

キーワード：遺伝子解析 循環器疾患 スプライシング異常

1. 研究開始当初の背景

心筋症は心機能障害を伴う心筋疾患である。近年の遺伝子解析技術の発展により、原因が明確な二次性心筋症だけではなく、未だ原因不明とされる特発性心筋症においても、その原因のかなりの部分が遺伝子異常であることが明らかになった。実際に、拡張型心筋症(DCM)の30%程度、肥大型心筋症(HCM)の半数以上に家族歴が認められ、少なくともこれらの症例はなんらかの疾患原因変異を有すると想定されている[Kimura et al. J. Hum. Genet. (2016)]。

申請時点までに、心筋症を含む難治性循環器疾患の発端者とその家族 368 例について全エクソンシーケンス(WES)を用いた遺伝子解析を行い、心血管疾患変異データベースの構築を行った。このデータベースの登録症例のうち、心筋症発端者 183 名における心筋症原因として既知の変異保有率を解析してみると以下のような結果が得られた。

- ・全体の既知変異保有率(原因変異同定率)は33.9%であった。
- ・家族性に発祥している症例に限っても45.0%の症例でしか既知変異は検出されなかった。
- ・若年発症例や心臓移植適応のある重症例での原因変異同定率が低下傾向にあった。

原因変異同定率が低く臨床情報との乖離が見られる現象は多くの遺伝性疾患における遺伝子解析で問題となっており、おおよそ30%程度の症例しか原因変異の同定に至らず、各分野で未解決のまま残る70%の解決法が模索されていた[Yang et al. JAMA (2014), Chong et al. Am. J. Hum. Genet. (2015)]。また、心筋症の発症には遺伝的要因の他に環境要因も強く関わっているとされているが、若年発症例の方が遺伝的要因の寄与が大きいと考えることができ、現状での解析結果はこの点でも現実にそぐわない。そこで、本研究で、遺伝性心血管疾患の原因変異同定率を向上させ、現状の遺伝子解析と現実との乖離を解消することを目的に、トランスクリプトーム解析と全エクソーム解析を組み合わせた、異常スプライシングに関わる変異の検出法開発を行うこととした。

従来 WES を用いた遺伝子解析では、タンパク質構造や機能に影響を与えると考えられるアミノ酸配列を変える変異を対象に病原性の評価が行われてきた。しかしながら、アミノ酸配列には影響を与えないにもかかわらず、スプライシング異常を引き起こす変異が存在することも認識されており、現在の解析手法ではこうした変異の検出が不十分だと考えられている。スプライシングが起こりうる配列自体は各遺伝子上に無数に存在するが、周辺配列やイントロン内のブランチ部位と呼ばれる配列との距離、発現臓器の違いによって高度に制御されて、正常なスプライシングが行われている。ところが、遺伝子上に変異が起こると、それがたとえアミノ酸変異を伴わない変異であっても、スプライシングの制御に影響を与え、エクソンの延長、短縮やエクソンスkipといった、影響の大きい遺伝子構造異常を引き起こす可能性がある。この異常は通常スプライシングが起こるエクソンの両端だけでなく、エクソン内部やイントロンへの変異でも起こりうる。この複雑さから、現状では遺伝子配列から100%予測することは難しく、WESや全ゲノムシーケンス(WGS)によって得られるDNA配列情報のみから実際のスプライシングの起こり方を確定することはできない。そうした中でも、WESまたはWGSを用いたスプライシング異常の推定は、次世代シーケンスが盛んに行われるようになって以来国内外の多くのグループが取り組んでいる。日本国内においても、心筋症をターゲットに伊藤らのグループにて行われており、申請者も共同研究としてその手法の利用を試みていた。

一方、mRNAはスプライシング後の遺伝子配列を反映しているため、病因組織のmRNAシーケンス(RNA-seq)を行い、健常検体の結果と比較することで直接的にスプライシング異常を検出することができる。RNA-seqを用いたスプライシング異常の検出は、MacArthurらが筋疾患を対象に行っているが、その対象遺伝子は限られており、心筋関連疾患、特に心筋症にそのまま利用できるものではない。心筋のRNA-seq自体は、世界で数例報告があり、利用可能な公開データも存在する。心不全群と正常群での遺伝子発現差を解析した例もあるが、心不全の発症メカニズムとの関連や新規治療法につながる成果は得られていないのが申請時点での状況であった。このことから、本研究では異常スプライシングの検出にRNA-seqを用いたトランスクリプトーム解析を用い、既にエクソーム解析で得られている変異情報と統合する手法を採ることとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、心筋症をはじめとした遺伝性心疾患の原因遺伝子同定率を向上させることとした。これを解決する手法として、本研究では、WESデータとRNA-seqデータの両者を用いてスプライシング異常を引き起こす変異を探索した。特定の疾患では、RNA-seqとWESを組み合わせたスプライシング異常の検出により原因変異同定率が2倍程度に向上するという報告もあり、循環器難病においても同定率改善が期待できた。また、若年発症例・心臓移植適応症例で遺伝子同定率が特に低下するという結果から、従来法ではより病原性の高い変異を見落としている可能性が示唆され、見落とされている中にスプライシング異常を含む大きな構造変化が含まれると想定された。心筋組織が保存しておりRNA-seqが可能なのはすなわち心臓移植症例であり、未解決症例が多い最重症例について解析が可能という点で効率的な研究が可能であ

る。

3. 研究の方法

(1)心筋 RNA-seq の実施

心臓移植に由来する患者心筋組織について RNA-seq を実施する。試料については申請者の所属機関内バイオバンクより提供を受け、協力のもと RNA-seq を実施した。

(2)RNA-seq データからの異常スプライシング検出手法開発と、エクソーム解析との融合

得られたシーケンスデータのクオリティコントロールを実施し、ヒト参照配列にマッピングしたのち、スプライシング解析および発現量解析を行う。心筋症関連遺伝子のマッピング状況を WES と RNA-seq で比較することを主な手法とするが、選択的スプライシング検出ソフトウェアの使用も検討した。異常スプライシングを検出した場合、エクソーム解析の結果を照合することでそれを引き起こしうる変異の探索を行った。

4. 研究成果

心筋 RNA-seq を実施した 24 検体について発現解析を行ったところ、心筋特異的な遺伝子の発現が確認でき、適切にシーケンスが行えていると判断された。こうして得られた 24 検体のデータを用いて、心筋症関連遺伝子のマッピング状況を WES および RNA-seq で比較した。その結果複数症例において DSC2 および TPM1 上に、他の症例とマッピング状態の異なる領域を見出し、スプライシングに異常が起きている可能性が強く示唆された。一方で、遺伝子機能と臨床症状との関連に疑問が残る結果でもあり、真に病原変異であるかどうか機能解析による精査が必要であると考えられる。これらの異常スプライシングは一部スプライシング解析ソフトウェアでも検出されたものの、それ以外にも RNA の変化を伴わない領域に数多く検出され、既存のソフトウェアについては精度向上が期待される結果となった。この時点で異動により所属機関が変更となり、成果の発表には至っていない。

一方、研究期間の後半では、所属機関変更に伴い研究対象が血液がん症例に変更になった。がんに関しては原因変異の多くが体細胞変異であり、期間前半に行っていた希少疾患の解析とは一線を画した研究となった。WES およびターゲットシーケンスで得られたデータについて、期間前半で培った情報解析パイプラインの構築技術を生かしながら、解析パイプラインの構築及び最適化を行い、FLT3、NPM1、CEBPA 上のホットスポットについて臨床遺伝子診断として利用可能な速度でのレポートが可能となった。また、血液がんの一部ではハプロタイプがその治療奏効率や予後に関連するとの報告があるが、変異箇所同士に一定以上の距離がある場合ショートリードのシーケンスではハプロタイプの特定ができない場合がある。そこで近年利用が増えているロングリード RNA-seq を用いてそのハプロタイプの特定を試みた。本件はまだ試行段階であり、報告できる成果には至っていないが、予備実験ではロングリードのシーケンスに成功しており、一部症例に関しては臨床利用が可能な速度での解析が実施できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shinomiya Haruki, Takawa Ayako, Asano Yoshihiro et al.	4. 巻 35
2. 論文標題 Aberrant accumulation of TMEM43 accompanied by perturbed transmural gene expression in arrhythmogenic cardiomyopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202100800R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Noriaki, Takawa Ayako, Takashima Seiji et al.	4. 巻 139
2. 論文標題 Mutant <i>KCNJ3</i> and <i>KCNJ5</i> Potassium Channels as Novel Molecular Targets in Bradyarrhythmias and Atrial Fibrillation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation	6. 最初と最後の頁 2157 ~ 2169
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036761	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hakui Hideyuki, Takawa Ayako, Asano Yoshihiro et al.	4. 巻 14
2. 論文標題 Loss-of-function mutations in the co-chaperone protein BAG5 cause dilated cardiomyopathy requiring heart transplantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scitranslmed.abf3274	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------