

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03670

研究課題名（和文）新規遺伝子異常検出法を用いた難病疾患肺高血圧症遺伝子診断カタログ作成と臨床的発展

研究課題名（英文）Creation of genetic diagnosis catalog and clinical development for pulmonary arterial hypertension

研究代表者

佐藤 徹（Sato, Toru）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・共同研究員

研究者番号：20170764

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：全エクソーム解析ならびにトランスクリプトーム解析を実施した。また、同時進行にて患者外的要因も含めた遺伝診断カタログ作成を進めた。日本人PAH患者検体でのゲノム解析の結果、TNFRSF13B遺伝子、TET2遺伝子、RNF213遺伝子等、新規のPAH原因遺伝子変異を見出すことに成功した。また、RNF213 R4810Kバリエーションは、PAH以外にも、もやもや病や末梢性肺動脈狭窄症など、複数の難治性血管病においても発症関連遺伝子として報告されており、RNF213関連血管病という新規疾患概念が提唱されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、難病疾患であるPAHにおける新規遺伝子を同定し、新しい発症病態を解明したものである。この成果は、治療反応性の相違や治療介入分子の同定を含んでおり、PAHにおける個別化医療への展開を加速させる重要な成果となった。また、本研究をモデルケースとして、難病疾患におけるゲノム解析と遺伝子診断カタログ作成による臨床への貢献が他疾患へも応用されることが期待され、社会的貢献度も高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Whole exome analysis and transcriptome analysis were performed. At the same time, we created a genetic diagnosis catalog that included external factors. Genomic analysis using samples of Japanese PAH patients, we identified novel PAH-causing genes, such as TNFRSF13B, TET2, and RNF213 genes. In addition, the RNF213 R4810K variant is associated with the onset of multiple intractable vascular diseases such as moyamoya disease and peripheral pulmonary artery stenosis, as well as PAH. Thus, we proposed a new disease concept called RNF213-associated vascular disease.

研究分野：循環器内科学

キーワード：肺動脈性肺高血圧症

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症(pulmonary arterial hypertension: PAH)は主に思春期以降の女性に発症する指定難病であり、国内認定患者数約 4300 人の希少疾患である。PAH の一部は結合組織病や先天性心疾患を基礎疾患とするが、基礎疾患が明瞭でない特発性症例(IPAH)がある。2000 年に遺伝性を示す PAH の解析から、代表的な原因遺伝子として BMPR2 遺伝子の変異が見出された。我々が保有するバイオバンクを用いた集計では、BMPR2 遺伝子の変異は基礎疾患を有しない PAH の約 30-40%であり(1)、その他の原因遺伝子の変異は各約 1%程度であることが判明しており、我々の最新の上記知見に基づく新規の感受性遺伝子を合わせると、PAH 全体の半数以上が遺伝的背景による発症であると考えられる。しかし、このことはすなわち、未だ半数の特発性 PAH 患者での発症原因は未解明であることを示唆する。

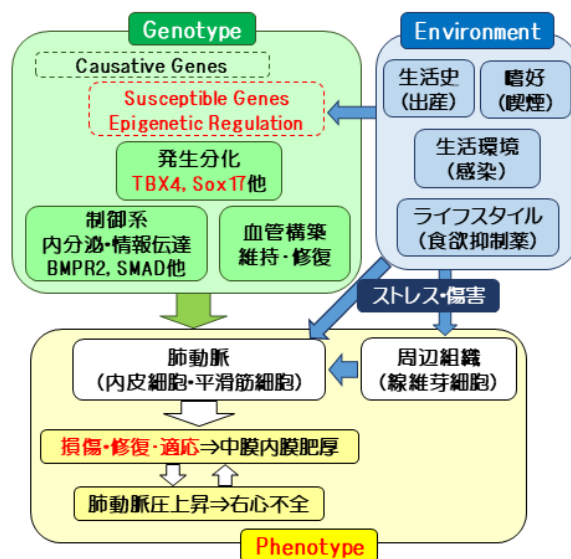
2. 研究の目的

本研究の目的は、最新の遺伝子変異検出法を用いて原因不明の IPAH や結合組織病/先天性心疾患合併 PAH の遺伝的背景の全容を解明することである。

我々の研究チームは、臨床と基礎の密接な共同研究組織であり、患者とご遺族から寄託された貴重な剖検試料を含むバイオバンクを有しており、論文数に代表される研究実績において国際的にも評価される稀有の研究組織である。最新の遺伝子変異検出法をいち早く PAH の遺伝的背景の解析に取り入れることは、PAH のゲノム解析研究で我が国を先導してきた本研究チームのみ可能な研究である。

PAH は個々の成長・老化という時間軸内で変化する遺伝子発現や、妊娠・出産という生活史の中で変化する内分泌等の内的要因にも影響される。さらに嗜好やライフスタイルや感染等の生活環境に由来する傷害やストレス等の外的要因が付加されることによって、組織特異的に発症すると考えうる。その発症機構の解明には遺伝子変異の情報のみならず臨床情報、生活環境情報等も必須である。研究チームが管理保有するバイオバンクは試料とそれら情報を連結しており、そこから遺伝的背景と相互作用する発症促進要因を抽出評価することは、本研究チームのみ実現可能である。

今後、ゲノム医療をさらに発展させ、癌および難病の各コア領域における個別化医療を実現していくためには、遺伝子情報に加えてその発現に影響する因子を含めた統合的な遺伝子診断カタログの作成と、それに照らし合わせた遺伝子異常の意義や治療法の検討が必須であり、一般臨床への啓発普及に不可欠となる。本研究は、難病指定の循環器疾患において基盤となるモデルを構築する研究であり、発展性と創造性が極めて高い研究と考える。



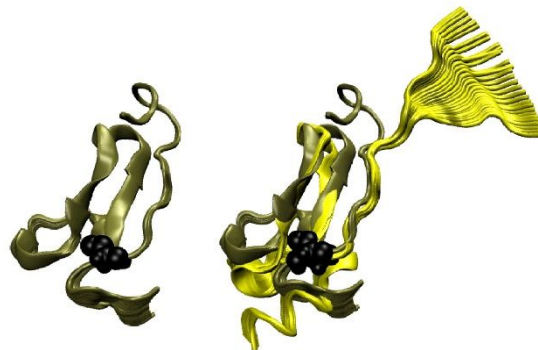
3. 研究の方法

バイオバンク検体を用いて全エクソーム・トランスクリプトーム解析を実施し、スプライシング及び発現異常の原因となる遺伝子変異を網羅的に検出するよう試みた。PAH の発症に関与する原因/感受性遺伝子の発現は成長成熟の時間軸の中で変化する、内分泌等の内的要因や生活環境に由来するストレス等の外的要因も発現に epigenetic に影響すると考えられる(右上図)。発症の基盤となる遺伝子の変異情報とその病原性情報、さらに内的・外的な要因を整理した遺伝子診断カタログを作成することが、一般臨床にも利用可能な遺伝子診断システムの将来的な構築のために必須である。よって、本研究では PAH 遺伝子診断カタログの作成を行った。この PAH 関連遺伝子診断カタログと、治療経過と治療応答性、転帰予後等の臨床情報、家族歴、環境・生活情報を精細に収集して統合可視化し再評価することで、発症の予防と早期診断、治療選択肢の拡大、創薬を含めた新規治療の開拓等の臨床的な貢献を実現させる。

さらに、上記の過程によって見出された重要な発症原因/感受性遺伝子がどのように PAH 発症に寄与するか、分子病態機序を解明し、発症予防と創薬に繋げる必要がある。よって、見出された遺伝子について、患者が実際に保有する遺伝子変異の状態を CRISPR-Cas9 システムによってマウスで再現し、シングルセル解析・マルチオミクス解析を駆使して発症機序の全容解明と新規治療標的の同定を実現するための研究を実施した。遺伝学的要因に応じた外的環境調整や同定した治療標的経路への介入による新規予防法や治療法の開発を行う。

4. 研究成果

全エクソーム解析ならびにトランスクリプトーム解析を実施した。また、同時進行にて患者外的要因も含めた遺伝診断カタログ作成を進めた。日本人 PAH 患者検体でのゲノム解析の結果、新規の PAH 原因遺伝子変異を世界に先駆けて発見することに成功した。この研究成果は、従来報告されている PAH 関連遺伝子変異を有しない家族性 PAH 発症家系のサンプルを用いた全エクソーム解析データの詳細な検証によって、炎症性サイトカイン TNF- α の血管細胞表面受容体遺伝子ファミリーの一つである TNFRSF13B 遺伝子の変異が家系発症の原因であること、特にその Hot-spot 部位は c.226G>A (p.Gly76Ser) であること、を発見したものである(2)。我々は、変異遺伝子による蛋白構造シミュレーション解析も実施し、病原性を確認した(右図)。さらに、新規の PAH 関連遺伝子として TET2 遺伝子を確認し、そのバリエーションを保有する日本人患者の頻度等を検証して論文報告した(3)。



TNFRSF13B 蛋白構造シミュレーション解析
左: 野生型、右: p.Gly76Ser 変異 +

また、PAH における遺伝学的な分子病態機序解明のための研究においては、いくつかの重要な知見を得ることに成功した。まず、我々は、日本人 PAH 患者特有の発症原因遺伝子候補として Ring finger Protein 213 遺伝子(RNF213)の病的バリエーションを同定したが(4)、RNF213 R4810K 変化は、日本人肺高血圧症患者の約 1 割に認め、現在使用可能な肺血管拡張薬を複数用いても治療抵抗性を認める患者が多く、PAH の根本的治療法の開発が望まれる患者群であった(5)。また、RNF213 R4810K バリエーションは、PAH 以外にも、もやもや病や末梢性肺動脈狭窄症など、複数の難治性血管病においても発症関連遺伝子として報告されており、RNF213 関連血管病という新規疾患概念が提唱されると考えられる(6)。よって、RNF213 病的バリエーションの疾患発症機序を解明すれば、複数の難治性血管病における根本的治療法の開発及び創薬が期待できる。そこで我々は、RNF213 R4810K バリエーションを CRISPR-Cas9 システムを用いて組み込んだ患者ゲノム再現マウスを作製し、発症分子機序解明研究に取り組んできた。これまでの解析において、RNF213 R4810K バリエーション陽性マウスにおいては、特定のシグナル経路が PAH 誘発マウスにおいて活性化しており、その経路の antagonist を追加投与すると、PAH が軽症になることを確認した。今後は、免疫染色や FACS、シングルセル RNA 解析などの手法を用いて多角的に病態を評価し、新規の治療薬創薬に向けて研究を継続していく。

<引用文献>

1. Gamou S, Kataoka M, Aimi Y, et al. Genetics in pulmonary arterial hypertension in a large homogeneous Japanese population. Clin Genet. 2018;94:70-80.
2. Shinya Y, Hiraide T, Momoi M, et al. TNFRSF13B c.226G>A (p.Gly76Ser) as a novel causative mutation for pulmonary arterial hypertension. J Am Heart Assoc. 2021;10:e019245.
3. Hiraide T, Suzuki H, Shinya Y, et al. TET2 variants in Japanese patients with pulmonary arterial hypertension. CJC Open. 2021;4:416-419.
4. Suzuki H, Kataoka M, Hiraide T, et al. Genomic comparison with supercentenarians identifies RNF213 as a risk gene for pulmonary arterial hypertension. Circ Genom Precis Med. 2018;11:e002317.
5. Hiraide T, Kataoka M, Suzuki H, et al. Poor outcomes in carriers of the RNF213 variant (p.Arg4810Lys) with pulmonary arterial hypertension. J Heart Lung Transplant. 2020;39:103-112.
6. Hiraide T, Suzuki H, Momoi M, et al. RNF213-associated vascular disease: a concept unifying various vasculopathies. Life (Basel). 2022;12:555.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Shinya Y, Hiraide T, Momoi M, Goto S, Suzuki H, Katsumata Y, Kurebayashi Y, Endo J, Sano M, Fukuda K, Kosaki K, Kataoka M.	4. 巻 10
2. 論文標題 TNFRSF13B c.226G>A (p.Gly76Ser) as a Novel Causative Mutation for Pulmonary Arterial Hypertension	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Am Heart Assoc	6. 最初と最後の頁 e019245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/JAHA.120.019245	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 Hiraide Takahiro, Suzuki Hisato, Shinya Yoshiki, Momoi Mizuki, Inami Takumi, Katsumata Yoshinori, Fukuda Keiichi, Kosaki Kenjiro, Kataoka Masaharu	4. 巻 4
2. 論文標題 TET2 Variants in Japanese Patients With Pulmonary Arterial Hypertension	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 CJC Open	6. 最初と最後の頁 416 ~ 419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cjco.2021.11.008	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 Hiraide T, Kataoka M, Suzuki H, Aimi Y, Chiba T, Isobe S, Katsumata Y, Goto S, Kanekura K, Yamada Y, Moriyama H, Kitakata H, Endo J, Yuasa S, Arai Y, Hirose N, Satoh T, Hakamata Y, Sano M, Gamou S, Kosaki K, Fukuda K	4. 巻 39
2. 論文標題 Poor outcomes in carriers of the RNF213 variant (p.Arg4810Lys) with pulmonary arterial hypertension	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Heart and Lung Transplantation	6. 最初と最後の頁 103 ~ 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.healun.2019.08.022	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 Hiraide Takahiro, Suzuki Hisato, Momoi Mizuki, Shinya Yoshiki, Fukuda Keiichi, Kosaki Kenjiro, Kataoka Masaharu	4. 巻 12
2. 論文標題 RNF213-Associated Vascular Disease: A Concept Unifying Various Vasculopathies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 555 ~ 555
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life12040555	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
研究 分 担 者	片岡 雅晴 (Kataoka Masaharu) (20445208)	産業医科大学・医学部・教授 (37116)	
研究 分 担 者	蒲生 忍 (Gamou Shinobu) (90122308)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・訪問教授 (32612)	

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
---------	---------