

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08554

研究課題名(和文) ヒト心筋生検検体を用いたRNA-Seqによる心臓サルコイドーシスの病態解明

研究課題名(英文) Discovering Novel Disease Mechanisms of Cardiac Sarcoidosis Using Transcriptome Sequencing Derived from Human Cardiac Biopsy Sample

研究代表者

吉田 昌平 (Yoshida, Shohei)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：30623657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：サルコイドーシス症例を、心臓病変がある群とない群に分け、RNA-seqを行なった。心臓病変をもつ症例において心臓発生に関するBMPシグナルとJAK-STATを介したIL-5シグナルに関するパスウェイの活性化が認められた。本パスウェイは心臓サルコイドーシスの病態を説明付ける経路である可能性があると考えられたが、パラフィン切片でのBMP、JAK-STAT経路の免疫染色では有意差を認めなかった。HLA領域を中心として全ゲノム解析を大阪大学と共同して行い、心臓サルコイドーシス症例に有意に多いHLA領域を同定した現在論文投稿中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においては、心臓病変をもつサルコイドーシスにおいて、BMPやJAK-STAT系の経路が関与している可能性が示唆された。しかしながら本研究では心筋生検検体をすべてRNA解析に回しているため(いわゆるバルクでの解析)、解析にばらつきが大きく、更に心筋組織内の細胞種毎の遺伝子発現は評価できていない。そのため、免疫染色においては有意な変化が認められなかった可能性がある。特にサルコイドーシスなど心筋組織内での環境に個体差が大きい疾患においては、心筋細胞や免疫に関連する細胞などそれぞれの細胞腫ごとにシングルセルでの解析が望ましいことを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Sarcoidosis cases were divided into two groups, with and without cardiac lesions, and RNA-seq was performed. In patients with cardiac lesions, activation of pathways related to BMP signaling for cardiac development and IL-5 signaling via JAK-STAT was observed. This pathway may explain the pathogenesis of cardiac sarcoidosis, but immunostaining of the BMP and JAK-STAT pathways in paraffin sections showed no significant differences. Whole genome analysis focusing on the HLA region was performed in collaboration with Osaka University, and the HLA region significantly more common in cardiac sarcoidosis cases was identified, which is currently being submitted for publication.

研究分野：心筋症

キーワード：心サルコイドーシス RNA-seq 心筋生検

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

サルコイドーシスは原因不明の全身性疾患であり、多臓器にわたる肉芽腫形成を特徴とする。日本でのサルコイドーシスの有病率は10万人中7.5~9.3名程度と言われる[日サ会誌 2007; 27: 103-108]。近年、サルコイドーシスの原因として *Propionibacterium acnes*(アクネ菌)の関与が示唆されているが、真の起因体か否かは未確定である。またサルコイドーシスの遺伝的素因は以前から提唱されているが、これも確実なものは未だ同定されておらず、サルコイドーシスの発症を明確に説明しうる機序は明らかではない。

サルコイドーシスを有する患者のうち、5~10%程度が心病変を有する心臓サルコイドーシスと推測される[Acta Pathol Jpn 1993; 43: 372-376.]。心臓サルコイドーシスは、左室収縮不全による重症心不全、刺激伝導系障害、および致死性不整脈を引き起こし、患者の予後に大きく関係する。しかしながら、現時点で心臓サルコイドーシスに対する根治治療は存在しない。対症療法として肉芽腫性炎症を抑えるために副腎皮質ステロイド薬が第一選択として使用されるが、ステロイド薬の投与でも病勢を抑えきれない難治例や再発例、またステロイドによる副作用で治療が困難な症例が多く、確実な臨床的治療効果を示すまでには至っていない[Intern Med 2014; 53: 2761.]

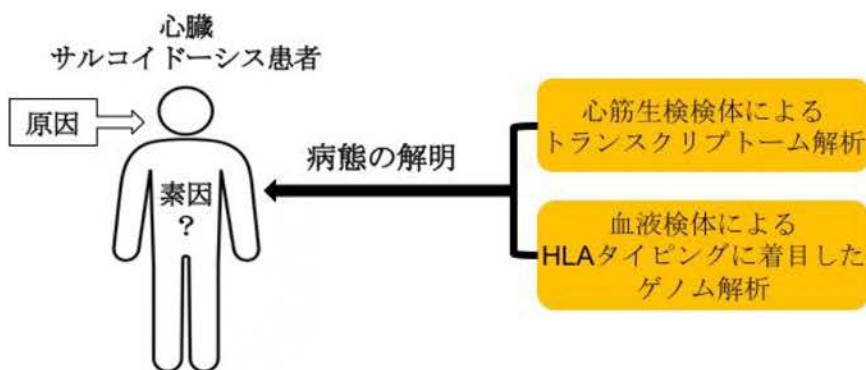
2016年、心臓サルコイドーシスの診療ガイドラインが作成され、新規の画像診断技術が組み込まれたことから、心臓サルコイドーシスが多くの患者でより早期に疑われる機会が増えており[Guidelines for Diagnosis and Treatment of Cardiac Sarcoidosis(JCS 2016)]、その病態の詳細な解明と、確実な治療法の確立は喫緊の課題である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、心臓サルコイドーシス患者の心筋生検検体を用いて行う網羅的トランスクリプトームシーケンス(RNA-Seq)と、HLAに着目したゲノムシーケンスとを併せて心臓サルコイドーシスの病態をDNA、RNA双方の観点から解明することである。

本研究により心臓サルコイドーシスの病態解明がなされ、解析から得られた心臓サルコイドーシス関連遺伝子・転写産物が同定できれば、診断に苦慮した症例における新たな診断ツールとなる可能性がある。また、同遺伝子・転写産物を標的とした新たな創薬、あるいはドラッグリポジショニングの手がかりとなる。さらに本研究の結果は、心臓サルコイドーシスのみならず、難治性の全身性サルコイドーシスにも応用できる。

本研究概念図



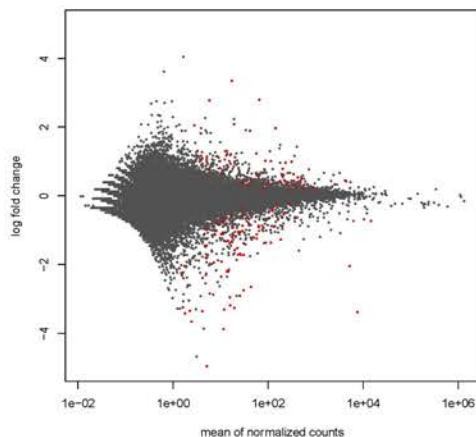
3. 研究の方法

- (1) 既にRNA抽出用として採取してある心臓サルコイドーシス患者の心筋生検検体10検体よりRNAを抽出し、RNA-Seqを行う。
- (2) RNA-Seqのデータをパブリックデータベース(National Center for Biotechnology Information (NCBI) Genotype-Tissue Expression(GTEX))と照らし合わせ、転写因子発現解析、及びパスウェイ解析を行う。
- (3) 特にHLAに着目して血液検体から抽出したゲノムシーケンスとの統合解析を行う。

4. 研究成果

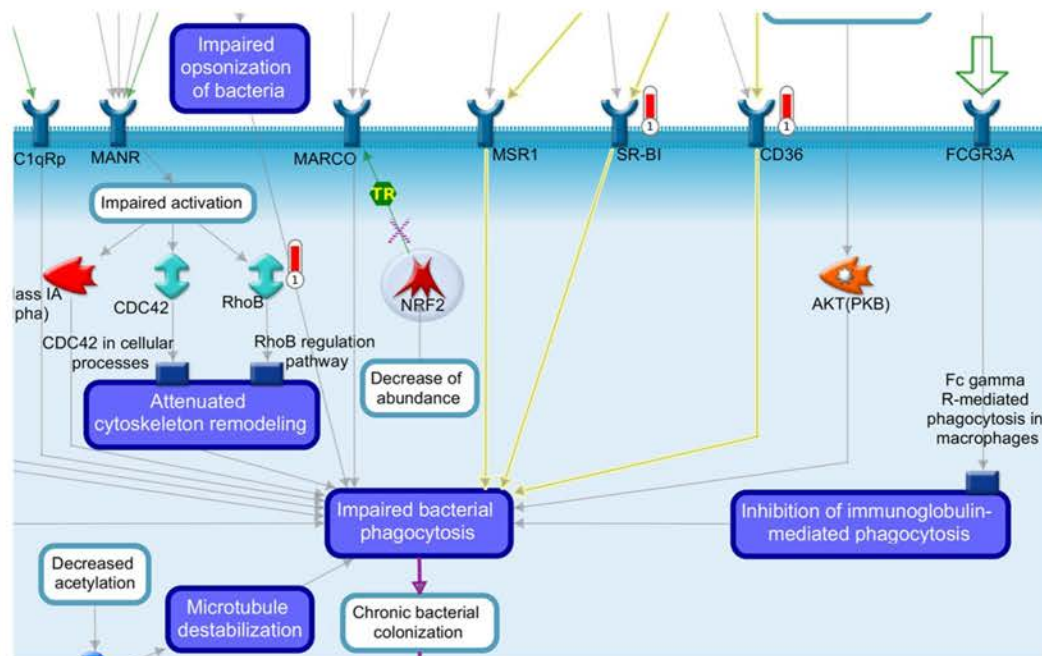
- (1) まず最初にRNA抽出用としていた心臓サルコイドーシス心筋生検検体7検体(CS群)からRNA抽出を行った。コントロール群として肥大型心筋症症例9症例、拡張型心筋症症例14症例(non-CS群)からも心筋生検検体からRNAを抽出し、RNA-Seqを行う方針とした。ライブラリの作成にはOvation SoLo RNA-Seq Systemを使用することで、Lin値6~7程度の質の担保されたRNAライブラリを作成できることが確認できた。

- (2) HiSeq2000 を使用し、RNA-Seq を施行。解析に十分なリード数が得られることを確認し、CS 群・non-CS 群の differential expression genes(DEGs)を DESeq2 を使用して解析した。40307 遺伝子のうち、243 遺伝子が false discovery rate(FDR) <10%としたときに DEGs であると判断された。具体的な top hit genes に関しては下図に示す。



Gene Symbol	Log2 Fold Change	FDR adjusted P value
RP11-366M4.8	3.348	3.7x10 ⁻⁶
RELN	2.793	1.8x10 ⁻⁵
S100A6	-0.622	3.0x10 ⁻⁵
WASF3	-0.389	3.2x10 ⁻⁴
UCHL1	-1.585	3.7x10 ⁻⁴
SFRP4	-1.711	9.7x10 ⁻⁴
FREM2	2.781	9.7x10 ⁻⁴
RPL38	0.234	9.7x10 ⁻⁴

- (3) 続いてパスウェイ解析を施行。243 の DEGs から 151 のパスウェイを同定し、FDR <5%として 2つのパスウェイがヒットした。MHC Class I related pathway (FDR 5.85 x 10⁻⁴), Macrophage-mediated bacterial phagocytosis (FDR 2.71 x 10⁻²)。特に MHC Class I related pathway の Upregulation に関しては、MHC class II とサルコイドーシスの関連は今までも研究されてきたが、MHC class I とサルコイドーシスの関連は今までにほとんど検討されておらず、新しい発見であった。心筋の MHC class I による心筋組織内の内因性の抗原提示がサルコイドーシスの発症と関連している可能性が考えられた。また、Macrophage-mediated bacterial phagocytosis の Upregulation に関しては近年サルコイドーシスに関してはアクネ菌感染との関連が謳われており、それによるマクロファージの活性化を示しているとも考えられた。



- (4) しかしながら、上記はサルコイドーシスが免疫と関連した病態であることを考慮すると当然のことであるとも言えた。そこで、コントロールをサルコイドーシスの診断はついていながら、心サルコイドーシスは発症していない群(Systemic Sarcoidosis(SS 群))として再度同様の手法で 3 例の SS 群の RNA-Seq を行った。
- (5) 396 の DEGs を FDR 5%として同定した。Top hit gene としては MICAL2、NPPB、RGS18、PTGFRN、NPPA が同定された。また、パスウェイ解析では BMP signaling in cardiac myogenesis (FDR=6.1x10⁻³)と IL-5 signaling via JAK-STAT (FDR=6.1x10⁻³) pathways が同定された。難治性の皮膚サルコイドーシスに対して JAK2 阻害剤を使用して皮膚症状の改善を認めたという報告があり、本パスウェイは心臓サルコイドーシスの病態にも関与している可能性、ひいては難治性心臓サルコイドーシスの治療に応用できる可

能性があると考えた。

- (6) 次にパラフィン切片に包埋されている検体に対して BMP、JAK-STAT の免疫染色を行った。CD68、pSTAT1、pSTAT3 の心筋生検検体に対する免疫染色を行ったが、リンパ球をはじめとした血球の浸潤が乏しく、免疫蛍光染色では明らかな差が認められなかった。
- (7) DNA に関しては研究の過程で他大学との共同研究が可能となり全ゲノムシーケンスを解析し、HLA typing と臨床症状との比較に関する論文を投稿中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] 計1件 (うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件)

1. 著者名 Yoshida Shohei, Nakata Tomoaki, Naya Masanao, Momose Mitsuru, Taniguchi Yasuyo, Fukushima Yoshimitsu, Moroi Masao, Okizaki Atsutaka, Hashimoto Akiyoshi, Kiko Takatoyo, Hida Satoshi, Takehana Kazuya, Nakajima Kenichi	4. 巻 5
2. 論文標題 Prognostic Implications of Sarcoidosis Granulomas — Insights From the Multicenter Registry, the Japanese Cardiac Sarcoidosis Prognostic Study —	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Circulation Reports	6. 最初と最後の頁 252-259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circrep.CR-23-0031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 —

[学会発表] 計1件 (うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 S. Yoshida, A. Nomura, H. Tada, C. Nakanishi, K. Hayashi, N. Fujino, K. Sakata, K. Hosomichi, A. Tajima, M. Takamura
2. 発表標題 Leveraging transcriptome sequencing for detecting novel disease-related pathways using human cardiac sarcoidosis myocardial biopsies.
3. 学会等名 European Society of Cardiology Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

[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	野村 章洋 (Nomura Akihiro) (30707542)	金沢大学・融合科学系・准教授 (13301)	
研究分担者	細道 一善 (Hosomichi Kazuyoshi) (50420948)	金沢大学・医学系・准教授 (13301)	

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