

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17581

研究課題名（和文）心筋トランスクリプトーム解析による、遺伝性不整脈の新たな病態解明

研究課題名（英文）Transcriptome analysis aimed to elucidate pathophysiological mechanism of inherited arrhythmias

研究代表者

園田 桂子（Sonoda, Keiko）

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・メディカルゲノムセンター・上級研究員

研究者番号：90824417

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：抜去リード心筋検体は剖検検体よりも質が良く、一方当施設のFFPE検体は分解が高度でRNA-Seqは困難だった。2名のBrS症例（1:抜去リード、2:手術）と2名の非BrS症例（1:HCM抜去リード、1:市販右室RNA）のRNA-Seqを施行し、2症例の公共RNA-Seqデータと併せて解析した。クラスタリング解析では公共データと当施設のデータで分かれたため、RNA-Seq方法の影響が大きいと分かった。BrS群vs非BrS群で比較した発現変動解析では、ZFP57がBrS群で低下していた。ランク上位150の発現変動遺伝子を用いたエンリッチメント解析では、心血管発達関連の異常の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回のRNA-SeqではBrS症例の数不足のため正確性に欠ける結果ではあったものの、心血管の発達に関連した何らかの異常がBrSに関連している可能性が示唆された。BrSは遺伝性不整脈疾患でありながら遺伝子変異同定率が20%と低く、いまだに原因が明らかになっていない。本研究の成果は疾患の原因を明らかにする糸口となりうる。リード抜去付着心筋サンプルをさらに集積することで、より正確な結果が得られる可能性が高い。よって、今後はさらに症例を蓄積し、研究を発展させていく予定である。

研究成果の概要（英文）：Myocardial specimens of extraction leads had better quality than autopsy specimens, while our FFPE specimens were highly degraded and difficult to RNA-Seq. RNA-Seq of 2 BrS cases (1: extraction lead, 2: surgery) and 2 non-BrS cases (1: HCM extraction lead, 1: commercial right ventricular RNA) was performed. We analyzed the results and public RNA-Seq data of 2 normal cases together. The clustering analysis showed that the public data and our data were separated, indicating a large influence of the RNA-Seq method. Differential gene expression analysis comparing 2 BrS cases vs. 4 non-BrS cases showed that ZFP57 was decreased in the BrS group. Enrichment analysis using the top 150 ranked differential expressed genes suggested some abnormality related to cardiovascular development.

研究分野：循環器内科

キーワード：遺伝性不整脈 リード抜去 FFPE Brugada症候群 RNAシーケンス

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

遺伝性不整脈は心臓の活動電位を形成するイオンチャネルとこれに関連するタンパクをコードする遺伝子の変異によって発症する疾患の総称であり、若年者突然死の原因として重要である。遺伝子解析技術の進歩により、遺伝子変異の同定率は飛躍的に上昇したが、全症例で原因遺伝子を特定できるわけではない。その理由の一つとして、DNAの転写からタンパク発現までの過程の異常が疾患の発症に関与している可能性が考えられる。しかし遺伝性不整脈患者の心筋検体を得る機会は乏しく、ヒト心筋を用いた遺伝子発現の検討は少ない。

2. 研究の目的

本研究は、抜去リード付着心筋やホルマリン固定パラフィン包埋検体など、今まで解析されていなかった心筋検体のトランスクリプトーム解析を行うことにより、遺伝性不整脈疾患の解明されていない原因を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

以下の2種の方法で遺伝性不整脈患者の心筋 RNA を得る。

抜去リード付着心筋からの DNA/RNA 抽出：植込み式除細動器 (Implantable cardioverter defibrillator; ICD) を経静脈的に抜去する際、リードは心筋壁にスクリューで固定されているため、抜去時に少量の心筋組織が付着することがあり、この付着心筋から DNA/RNA を抽出する。

ホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin fixed paraffin embedded; FFPE) 検体からの DNA/RNA 抽出：FFPE 検体は長期間の保存が可能であるので、過去に何らかの目的で心筋生検を施行された遺伝性不整脈患者の FFPE 検体から DNA/RNA を抽出する。

これらの心筋検体を対象に RNA Sequence により網羅的な遺伝子発現解析を行い、正常心筋と比較した発現変動解析を行う。有意に変動した遺伝子群を用いてエンリッチメント解析を行い、遺伝性不整脈患者の心筋ではどのような機能の遺伝子群が変動しているのか確認する。更にそれらの遺伝子群について、ゲノム DNA 上にある variant の有無を確認する。

4. 研究成果

a) 心筋検体 RNA の質的評価

抜去リード検体は、採取した心筋組織を RNA later に浸透させた後、冷却下でホモジナイズし、スピнкаラム法によって RNA を抽出した。FFPE 検体はスピнкаラム法または磁性ビーズ法を用いて RNA を抽出した。RNA の分解度を評価するため、Tapestation4200 を用いて RIN 値を算出し、冷凍心筋切片 (手術中・剖検) から抽出した RNA と比較した (図 1)。抜去リード心筋は手術中に採取した心筋に比べると RIN 値は低かったが、FFPE 検体や剖検心から抽出した RNA と比較すると RIN 値が高く分解されていない状態であった。FFPE 検体は全体的に RIN 値が低かったが、DV200 で評価すると、磁性ビーズ法で抽出した RNAの方がスピнкаラム法に比べ分解されていない (図 2)。

これらの結果から、抜去リード心筋からは RNA シークエンス (RNA-Seq) も可能 (RIN>6) な質の RNA が抽出できることが分かった。

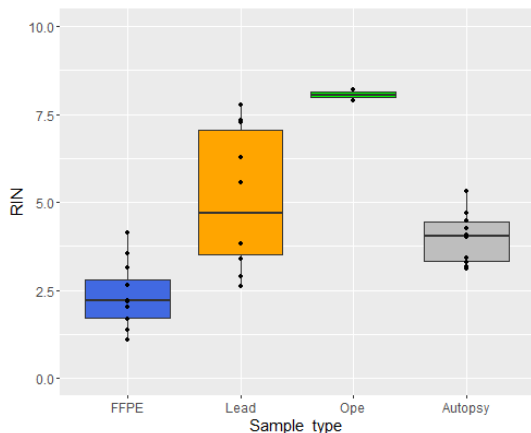


図 1: サンプルタイプ別 RIN 値

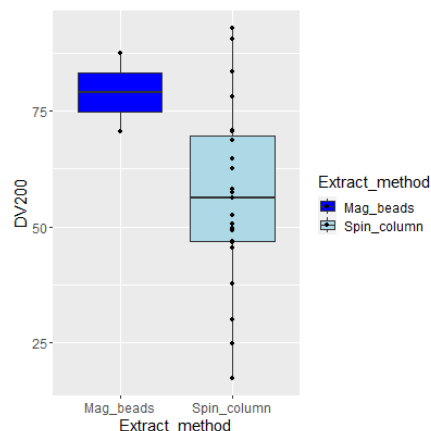


図 2: FFPE 検体の抽出法別 DV200

b) FFPE 検体の RNA シークエンス解析

前述したように、当施設の FFPE 検体は非常に分解が進んでおり RIN<4 の検体しかなく、FFPE 用にカスタマイズした RNA シークエンスでも難しいと予想された。他の研究で心筋症患者の FFPE 検体で RNA-Seq を施行したが、十分なリード数が得られず解析が困難であったため、本研究では FFPE 検体を用いた RNA-Seq は中止した。FFPE から抽出した RNA の分解が極度に生じている理由として、当施設の病理部が検体を室温保存していたことが原因と考えられた。

c) リード付着心筋の RNA シークエンス解析

抽出した RNA の RIN 値>6 を基準に、Brugada 症候群 2 例 (CM4:手術, CM15:リード抜去)、肥大型心筋症 (心室頻拍合併) 1 例 (CM13:リード抜去)、市販の正常右室心筋 1 例 (NormalRV) を RNA-Seq のサンプルとして選択した。NextSeq を使用し 75bp の Paired-end で RNA-Seq 施行、1 サンプル当たり 40-50M リードが得られた。

RNA-Seq の解析は WSL2 (Ubuntu) を使用しコマンドベースで施行した。データの Quality を fastqc で確認し、Poly G を fastp (ver0.23.2) で除去した。star (ver2.7.10) を使用して hg38 ヘマッピングした。Unique mapped lead が 94-95%、Multi mapped lead が 4-5%であった。

続いて rsem (ver.1.3.1) を用いてカウントデータを作成した後、R (4.2.2) を使用し、TCC version 1.38.0 を用いてクラスター解析を施行した (図 3)。Normal RV と BrS2 症例の方が CM13 (HCM) より性質が類似していた。

Normal RV 心筋のデータを公共データ (DBCLS SRA) から 2 症例分取得し (SRR6308641, SRR6308642) star で hg38 ヘマッピング後 rsem でカウントデータを取得した。この公共データを用いて再度クラスタリング解析を行ったところ、図 4 のように自データと公共データで分かれてしまった。やはり同じ RNA-Seq 法で Normal RV のデータを得たほうが良いと考えられた。

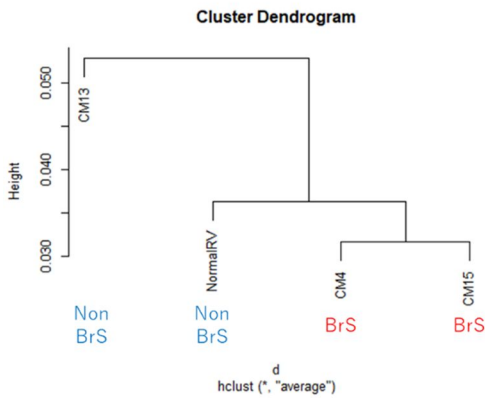


図3: BrS2症例とBrS以外の2症例のクラスタリング解析

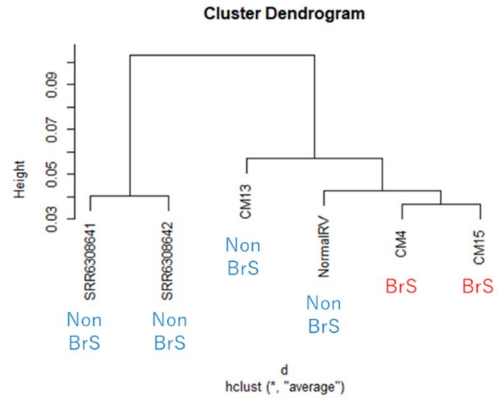


図4: BrS2症例とBrS以外の4症例のクラスタリング解析

次に DEG の算出であるが、まず BrS が 2 症例しかないため分散が正確に求められない。よって正確性は乏しいが、非 BrS4 症例 (NormalRV1 症例+SRR2 症例+HCM1 症例) と比較して発現変動解析を施行してみた。発現変動遺伝子 (DEG) は偽発見率 (FDR)<0.1 では検出できず FDR<0.2 で 1 個検出された。MA plot で視覚化したものを図 5 に示す。またランク上位 20 個の遺伝子をヒートマップで示したものを図 6 に示す。

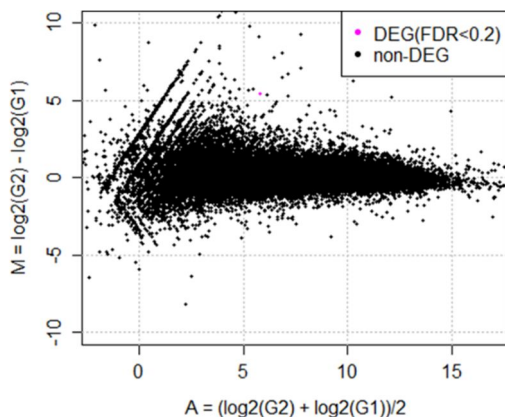


図5: BrS2症例と非BrS4症例のDEGを表したMA Plot

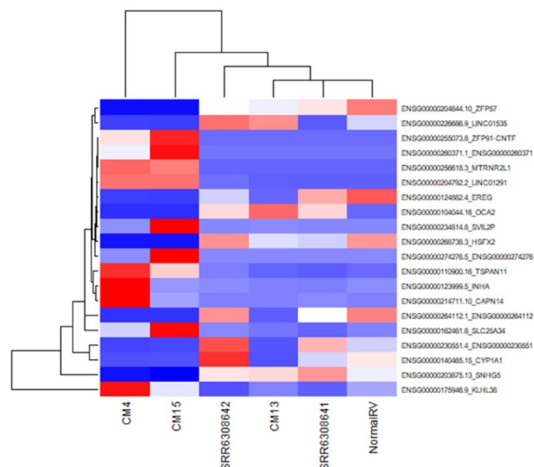


図6: BrS2症例と非BrS4症例の上位20個のDEGを示したヒートマップ

FDR < 0.2 で同定された遺伝子は ZFP57 のみであった。各群における ZFP57 の正規化した発現量 (TPM) を図 7 に示す。BrS 症例では ZFP57 の発現が低い。ZFP57 は心血管形成の異常 (心室中隔欠損・心房中隔欠損など) への関与が報告されている (Shamis Y et.al Ploc Natl Acad Sci USA 2015 Apr 21;122(16))。BrS はイオンチャネル異常による心外膜側と心内膜側の電位差が原因といわれているが、その背景に心臓形成段階での何らかの異常が関与している可能性が考えられる。

DEG 検出の結果、ランク上位となった遺伝子 150 個を用いて Metascape (<https://metascape.org/>) によるエンリッチメント解析を施行した。結果を図 8 に示す。発達関連の遺伝子が多く検出されていた。

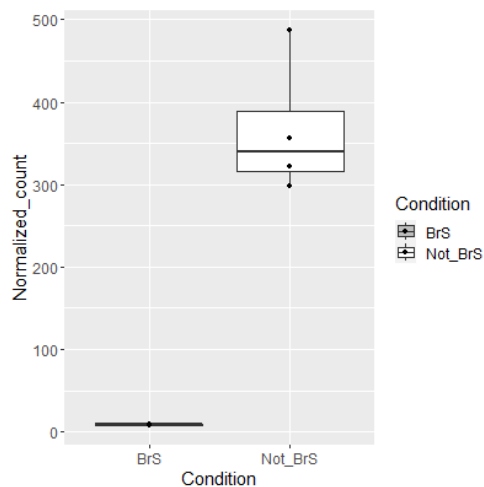
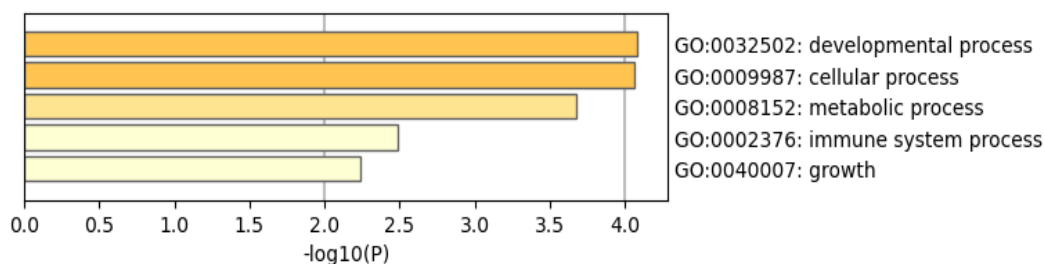


図 7: BrS 群と非 BrS における ZFP57 発現量の比較

図 8: The top-level Gene Ontology biological processes



今回の RNA-Seq では BrS 症例の数不足のため正確性に欠ける結果ではあったものの、心血管の発達に関連した何らかの異常が BrS に関連している可能性が示唆された。BrS は遺伝性不整脈疾患でありながら遺伝子変異同定率が 20% と低く、いまだに原因が明らかになっていない。本研究の成果は疾患の原因を明らかにする糸口となりうる。リード除去付着心筋サンプルをさらに集積することで、より正確な結果が得られる可能性が高い。よって、今後はさらに症例を蓄積し、研究を進展させていく予定である。

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Suzuki Keisuke, Sonoda Keiko, Aoki Hisaaki, Nakamura Yuko, Watanabe Seiichi, Yoshida Yoko, Hoshino Kenji, Ozawa Junichi, Imamura Tomohiko, Aiba Takeshi, Kato Koichi, Makiyama Takeru, Kusano Kengo, Horie Minoru, Ohno Seiko	4. 巻 8
2. 論文標題 Association Between Deleterious SCN5A Variants and Ventricular Septal Defect in Young Patients With Brugada Syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JACC: Clinical Electrophysiology	6. 最初と最後の頁 297 ~ 305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacep.2022.01.007	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 -

1. 著者名 Kato Koichi, Ohno Seiko, Sonoda Keiko, Fukuyama Megumi, Makiyama Takeru, Ozawa Tomoya, Horie Minoru	4. 巻 13
2. 論文標題 LMNA Missense Mutation Causes Nonsense-Mediated mRNA Decay and Severe Dilated Cardiomyopathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circulation: Genomic and Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 435 ~ 443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCGEN.119.002853	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 該当する

1. 著者名 Sonoda Keiko, Ohno Seiko, Shimizu Yukiko, Kaitani Kazuaki, Makiyama Takeru, Nakagawa Yoshihisa, Horie Minoru	4. 巻 -
2. 論文標題 SCN5A mutation identified in a patient with short-coupled variant of torsades de pointes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pacing and Clinical Electrophysiology	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) 10.1111/pace.13924	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Keiko Sonoda, Seiko Ohno, Minoru Horie
2. 発表標題 Long-read sequence confirmed a large deletion of MYH6 and MYH7 in a family with atrial septal defect
3. 学会等名 ESC Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keiko Sonoda, Hisaaki Aoki, Koichiro Takayama, Wang Qi, Dimitar P Zankov, Yoshihide Nakamura, Minoru Horie, Seiko Ohno
2. 発表標題 Copy Number Variation of SCN5A in Sick Sinus Syndrome
3. 学会等名 第84回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keiko Sonoda, Tetsuhisa Hattori, Minoru Horie, Seiko Ohno
2. 発表標題 De novo RYR2 mutations are associated with severe phenotype of CPVT more strongly than inherited ones
3. 学会等名 The American Society of Human Genetics 2019 (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
---------------------------	-----------------------	----

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