

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461139

研究課題名(和文) 肺動脈性肺高血圧症患者試料を用いたBMP2遺伝子のエピジェネティクス制御の解明

研究課題名(英文) Elucidation of epigenetic regulation of BMP2 gene in pulmonary arterial hypertension

研究代表者

佐藤 徹 (Sato, Toru)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：20170764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、難病疾患であるPAHの病態機序解明の一環として、BMP2遺伝子変異を日本人最大規模のサンプル数にて検証した。BMP2遺伝子の解析を、PCR-ダイレクトシーケンシング法と、MLPA法を組み合わせる方法にて実施し、新生変異3種を含め41変異を見出した。今回認められたBMP2遺伝子変異の結果を過去文献でのdatabaseとの比較も実施した。また、エキソン欠失が生じる機序として、Alu配列が介在する可能性を示した。臨床データとの関連性の検討を行い、PGI2製剤持続投与導入後の生命予後を比較したところ、BMP2遺伝子変異を有する患者群で有意差をもって予後が良好、という結果を見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the mutation of BMP2 gene using large number of samples of Japanese patient with pulmonary arterial hypertension (PAH). BMP2 gene mutations were checked by both of PCR direct sequencing and MLPA method. As a result, 41 BMP2 gene mutations including 3 de-novo mutations were identified. Based on the results in this study, database analysis was performed. In addition, the mechanism of exon deletion was investigated, resulting in the possibility of Alu-mediated deletion. Furthermore, we analyzed the relationship between BMP2 gene mutation and clinical prognosis, demonstrating that the prognosis of patients with BMP2 mutation was better than those without mutation.

研究分野：循環器病学

キーワード：肺動脈性肺高血圧症 病態医学

1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧症 Pulmonary Arterial Hypertension(PAH)は肺動脈の内膜や中膜が肥厚して肺動脈圧が上昇し、右心不全を起こす生命予後不良の指定難病である。臨床的には膠原病や先天性心疾患に伴う PAH、HIV 感染や薬物誘発性 PAH 等の発症要因を特定できる PAH に加えて、原因を特定できない「特発性 PAH(以下 iPAH)」に鑑別される。PAH 難病登録患者数は約 3500 名で、そのうち約 3/4 が iPAH と鑑別される。小児期から思春期の発症は少ないが、若年に発症する場合は極めて予後不良である。女性に多く発症し、妊娠を契機にすることが多いが、60 歳代まで発症の可能性はある。

iPAH の中で遺伝的な背景が示唆される家族性症例から、2000 年に染色体 2q33 に存在する "2 型骨形成タンパク受容体(以下 BMPR2)遺伝子"の変異が発見され、両親の一方から変異により機能を喪失した受け継ぐこと、そのため BMPR2 が半量となりその増殖制御作用の不足が原因 (Haplo-insufficiency) とされた(International PPH Consortium, Nat Genet. 2010)。しかし、BMPR2 遺伝子異常は iPAH の約 25%、家族性 PAH (FPAH) の中でも 70%程度である。

我々は PAH の遺伝子解析に基づく個別化診療を目的に、BMPR2 遺伝子解析に 2009 年に着手し、現在までの総解析数は 410 名、発端者数は兄弟例の CTEPH (Kataoka 2016) 等を含めて 402 名 (402 家系) 即ち医療受給者証保持者数を持つ患者の 11%強にのぼり、少なくとも首都圏の過半の症例と推測する。その多くを研究代表者佐藤が在籍する杏林大学と連携研究者片岡が在籍する慶応義塾大学において継続的に診療を実施しており現在本邦で最大の診療センターである。

2. 研究の目的

本研究では、難病疾患である PAH の病態機序全容解明の一環として、BMPR2 遺伝子変異を日本人最大規模のサンプル数にて検証し、さらに未解明発症原因の解明につながる可能性を丁寧に模索する。

我々のチームは、臨床と基礎の密接な共同研究の組織であり、国内では最大規模の症例を持ち、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。我々は PAH の最大のサンプルバンク、最大の診療施設、最新の分子生物学的解析技術を有しており、発症病態とその進行機序を臨床と基礎研究を統合し丁寧に検証する基盤を有している。本研究は、これまで何年にもわたって国内で最大規模の患者検体を丁寧に収集してきた研究代表者らのチームにのみ実現可能な独創的で重要な研究といえる。本研究により PAH 発症に関わるより正確で早期の診断や臨機応変な個別化医療の実現が期待できる。

3. 研究の方法

BMPR2 遺伝子の解析を、PCR-ダイレクトシーケンス法と、MLPA 法を組み合わせた方法にて実施した。また、その解析結果を、変異についての過去の文献報告と比較した database 解析を実施した。エキソン欠失が生じる機序について、欠失部の前後にプライマーを設計することによりどの部位での欠失が生じているのかを詳細に検討した。さらに、次世代シーケンサーやマイクロアレイによる解析によって、未解明発症原因領域の解明にも取り組み始めている。

4. 研究成果

(1) BMPR2 の変異

解析した 400PAH 家系中 iPAH は約 300 家系、BMPR2 の変異を確定しているものは 41 家系で、変異の内訳は以下の通りである。25 種は以前に記載されていない新規の変異である。同じ変異が Exon 5 と 13 以外に分布している。

我々が 15 家系で変異の由来を分析したところ変異遺伝子は 6 家系で父親から由来しそのうち 4 名の父親は未発症であること、4 家系では変異遺伝子は母親から由来しその母親は全てが発症していた (Momose 2015)。PAH の発症が思春期以降の女性に偏ることは良く知られているが、BMPR2 変異を原因とする PAH では特に顕著である。また、BMPR2 遺伝子内と近傍には顕著な繰返しトリプレット構造は知られていないが、父親から由来する症例も含めて世代が下がる毎に発症年齢が下る表現促進 Genetic Anticipation の傾向も見られる。女性に発症が偏ること、表現促進の機構共にさらに遺伝的解析が必要である。

さらに少なくとも 3 家系では両親に変異が見られない新生突然変異であることを証明した。新生変異は全体では 20%を超えると推測され、その存在を正確に証明したのは我々の報告 (Momose 2015) が始めてである。

Mutation	Present Study	PAH Database ^a
5UTR	0	9
Missense	8	113
Nonsense	11	78
Frameshift	9	123
Splicing Site	2	49
Large Deletion	10	35
Rearrange Duplication	1	9
Total	41	416
(# Unique Mutation)	(25)	(311)

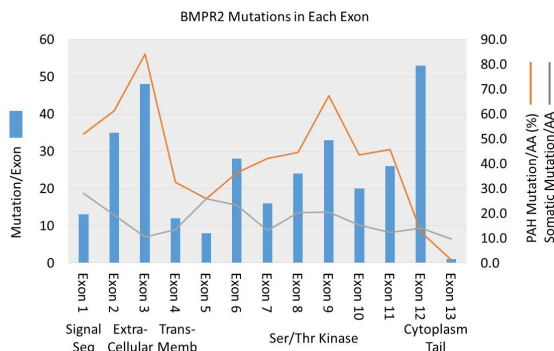
^a Machado et al (2001), (2006), (2009), (2015) etc

(2) Database 解析

現在までの報告されている文献を中心とし我々の 41 症例も含めた Database を作成したところ病原性が無く多型と判断できる変異を含め文献上報告された変異の総数は 450 種を超える。Database の解析からも変異は Exon 13 を除く Exon 1 から 12 までに幅広く

分布している。リガンド結合の中心部位をコードする Exon 3 では 57 アミノ酸中の大半の 48 アミノ酸 (84%) に変異が報告されている。また、キナーゼの触媒部位の中心をコードする Exon 9 でも変異率は 66% (33/49 アミノ酸) で、これらの Exon の各アミノ酸が均等な重要性を持つことが示唆される。細胞内の膜隣接領域をコードする Exon 5 の変異は少なく変異率も低い。細胞内尾部ドメインの Exon 12 は変異の数は多い 427 アミノ酸をコードするためアミノ酸当たりの変異率は低い。また細胞内際末端をコードする Exon 13 には中性疎水性のロイシンから塩基性のアルギニンへの変異 (L982R) が報告されているのみである。アミノ酸変異率が低い Exon でも、膜貫通ドメインの R147 (Exon 4)、セリン・トレオニンキナーゼドメインの R491 (Exon 11)、細胞内尾部ドメインの R899 (Exon12) には、我々の症例 (R147*, R499Q, R899*) を含め諸外国でも多くの変異症例が反復して報告されている。BMP2 の機能上重要な部位を担っていると推測できる。

従って、我々が検出した変異を含め Exon 12 と 13 を除き Nonsense 変異、Frameshift 変異については Haplo-insufficiency が成立し、病原性については疑いが無い。また Splicing site の変異についても異常な長さの mRNA が検出される等の傍証があれば



Haplo-insufficiency はほぼ疑いが無い。Exon 1 から 11 までほぼ半数近いアミノ酸に変異が見られ、416 変異中で 311 変異は二次報告が無いユニークな変異であること、20%を超えると推測される新生突然変異率等から、常に新しい変異の発生と表現促進による消失で一定の平衡状態が保たれていると推測される。

また、一塩基多型 SNP の database 上では BMP2 遺伝子の Intron を含めた全長に 40000 個の多型、Missense 変異で 500 種以上ある。そのうち、病原性あり pathogenic と確認されているものは 15 種に留まる。これを含めて Missense 変異の病原性については慎重な検討が必要である。その一助とするため、COSMIC 等の腫瘍細胞での BMP2 遺伝子の Somatic Mutation Database で Missense 変異について検索した所、アミノ酸の変異に至らない中立変異 33 種を含め 163 種が登録されている。Exon 毎のアミノ酸変異率は Exon 1 の 28% から Exon 13 の 9%

の範囲で変異率は低く一定の傾向を示す。機能予測アプリケーションにより多くが病原性を予測 (Probably damaging) しているが、PAH で報告されている変異との重複は多くない。PAH ではより機能的な選択が働くことが示唆される。

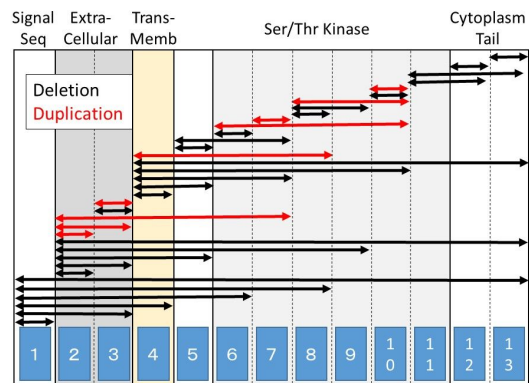
BMP2 Somatic Mutation ^b		PAH related	Others
Missense	Neutral		31
	Benign		33
	Probably damaging	5	73
Nonsense		11	10
Total		16	147
		163	

^b Cosmic, ICTG, TCGA, IntOGen

(3) エキソン欠失と重複

エキソン欠失また重複は Intron 内に多数存在する Alu 配列が介在する非相同組換えにより生じるものが多数を占めるが、一方にしか Alu 配列が見出されないものもある (Aimi 2013)。BMP2 遺伝子内にも相当数の Alu 配列とその類似配列が存在し、そのいずれもが組換えの部位となりうるが、その詳細を決定した報告は我々のみである。

Database の症例も併せて Intron 3 に最も組換え点が多いが、その有意性についてはより多くの症例を蓄積し Alu 配列の頻度等と併せて検討する必要がある。



(4) 次世代シーケンサー-NGS 等による新たな解析

上述したように iPAH 約 300 家系中、BMP2 の変異を確定できたものは 41 家系に留まる。BMP2 遺伝子の解析対象は各 Exon とその近傍に限られ、Copy Number Variation の検出は MLPA 法で実施してきた。いずれも Splicing や発現制御に影響を与える Intron 内の欠失や逆位等の検出には万全ではない。

また、それと男性の浸透率が低いこと等を加味したとしても iPAH の過半は BMP2 遺伝子以外に原因を求めざるをえない。BMP2 以外の原因遺伝子の探求や、BMP2 下流の遺伝的負荷はより多くの特発性 PAH の次世

代シーケンサー(NGS)による解析で解明できる可能性がある。そこでBMPR2 遺伝子変異を有していないiPAH患者とその家族のDNA検体を用いた全ゲノム解析及び全エクソーム解析を進行中である。

さらに、BMPR2 遺伝子に変異を有しながらも発症していない症例、剖検症例を含め、Microarrayによる遺伝子発現パターンの解析を試みている。

(5) 臨床データとの関連性の検討

上記までに得られた解析結果に基づき、臨床データとの関連性を検討した。特に、従来は、BMPR2 遺伝子変異の有無による臨床的治療反応性や予後に相違は無い、とされていたが、我々の解析結果に基づき、最新の治療における日本人での予後について検討した(Isobe, et al. AJRCCM. 2016)。

2000年以降にPAHと診断された特発性PAH(51名)または家族性PAH(8名)の計59名の日本人PAH患者について、2015年までの生命予後についての解析を行った。BMPR2 遺伝子変異の有無による生存率を2群間で比較したところ、2000年以降に診断された患者59名全体では、BMPR2 遺伝子変異の有無による生存率は統計学的有意差がなかった。一方、この最近10年以内に次々とPAH特異的治療薬が開発され、PGI₂製剤のみでなく、エンドセリン受容体拮抗薬、PDE5阻害剤、等の多剤併用が可能時代となっている。よって、2005年以降に診断された患者のみを抽出した際には、2000年以降に診断された患者群全体とは、特に予後の結果が異なってくる可能性があるのではないかと考えた。患者59名全体のうち、2005年以降に診断された患者は46名であり、この中でBMPR2 遺伝子変異を有する患者群と残りの患者群にて予後を比較したところ、やはり統計学的有意差は認めなかった。しかしながら、我々の臨床現場での経験を振り返ると、内服加療のみでは治療困難のためPGI₂製剤の持続投与(エポプロステノールの持続静注、あるいは、トレプロステニルの持続皮下注または持続静注)が必要となった患者においては、BMPR2 遺伝子変異を有する患者の方が、PGI₂製剤持続投与導入後の血行動態の改善が速やかである症例が多いように感じていた。そこで、2005年以降に診断された患者46名を、さらにPGI₂製剤持続投与が必要となった36名に絞りこみ、うちBMPR2 遺伝子変異を有する15名と変異のない21名の2群間において、PGI₂製剤持続投与導入後の生命予後を比較したところ、BMPR2 遺伝子変異を有する患者群で統計学的有意差をもって予後が良好、という結果であった。

この結果については、海外患者でも同様の有意差を認めるか否かの検討など、さらに詳細な検討の蓄積が必要ではあるものの、遺伝子変異の有無による予後の違いを初めて実証した結果であり、遺伝子変異の有無に基づ

く個別化医療の実現に向けての大きな一歩となったと考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

Kataoka M, Momose Y, Aimi Y, Fukuda K, Gamou S, Satoh T. Familial chronic thromboembolic pulmonary hypertension in a pair of Japanese brothers. *Chest*. 2016;150:748-749. (査読有)

Isobe S, Kataoka M, Aimi Y, Gamou S, Satoh T, Fukuda K. Improved survival of patients with pulmonary arterial hypertension with BMPR2 mutations in the last decade. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;193:1310-1314. (査読有)

Momose Y, Aimi Y, Hirayama T, Kataoka M, Ono M, Yoshino H, Satoh T, Gamou S. De novo mutations in the BMPR2 gene in patients with heritable pulmonary arterial hypertension. *Ann Hum Genet*. 2015;79:85-91. (査読有)

Aimi Y, Hirayama T, Kataoka M, Momose Y, Nishimaki S, Matsushita K, Yoshino H, Satoh T, Gamou S. A novel breakpoint of the BMPR2 gene exonic deletion in a patient with pulmonary arterial hypertension. *J Hum Genet*. 2013;58:815-818. (査読有)

Kataoka M, Aimi Y, Yanagisawa R, Ono M, Oka A, Fukuda K, Yoshino H, Satoh T, Gamou S. Alu-mediated non-allelic homologous and non-homologous recombination in the BMPR2 gene in heritable pulmonary arterial hypertension. *Genet Med*. 2013;15:941-947. (査読有)

Aimi Y, Hirayama T, Kataoka M, Inami T, Momose Y, Nishimaki S, Matsushita K, Yoshino H, Satoh T, Gamou S. Single nucleotide polymorphisms of the ALK1 and ENG genes in patients with pulmonary arterial hypertension. *J Kyorin Med Soc*. 2013;44:137-142. (査読有)

[学会発表](計1件)

Yuki Aimi, Yuichi Momose, Tomomi Hirayama, Masaharu Kataoka, Masae Ono, Hideaki Yoshino, Toru Satoh, Shinobu Gamou. Mutations in the BMPR2 Gene in Patients with Heritable Pulmonary Arterial Hypertension. 2016年4月4日, The 13th International Congress of Human Genetics, ポスター発表, Kyoto International Conference Center, Kyoto, JAPAN

[図書](計0件)

無し

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 徹 (SATO, Toru)
杏林大学・医学部・教授
研究者番号：20170764

(2) 研究分担者

吉野 秀朗 (YOSHINO, Hideaki)
杏林大学・医学部・教授
研究者番号：90129734

(3) 研究分担者

蒲生 忍 (GAMOU, Shinobu)
杏林大学・CCRC 研究所・所長
研究者番号：90122308

(4) 連携研究者

片岡 雅晴 (KATAOKA, Masaharu)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：20445208