

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460687

研究課題名(和文) 家族性大動脈瘤・大動脈解離の遺伝的背景と長鎖非コードRNAによる制御機構

研究課題名(英文) Genetics of familial aortic aneurysm and aortic dissection and regulatory mechanisms by long non-coding RNA

研究代表者

吉野 秀朗 (Yoshino, Hideaki)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：90129734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：大動脈瘤・大動脈解離は大動脈中膜部に血液が流入し、仮性動脈瘤を形成し層構造が解離する疾患である。従来困難であった原因遺伝子の全域塩基配列解析、発症に関与することが報告されている ANRIL の配列解析とエピジェネティック制御の関連性を検討することが求められている。本研究では、最も高頻度に変異が観察され全コーディングエクソン8領域を含め全長20kbと小さいACTA2遺伝子では、全長をLongPCRで増幅し、エクソン毎に塩基配列を決定する方法を確立した。この方法は従来のPCR-ダイレクトシーケンス法よりもはるかに少ない検体量で解析可能であり、大動脈解離に限らず多くの遺伝性疾患の解析に有効である。

研究成果の概要(英文)：Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection (TAAD) is a disease in which blood flows into the aortic media and forms a pseudoaneurysm and the layer structure dissociates. It is required to perform the sequence analysis of the entire causative gene which has been difficult in the past and to investigate the correlation between sequence analysis of ANRIL reported to be involved in the onset and Epigenetic regulation in the onset of TAAD. In this study, we established a method to amplify the full length with Long PCR in the ACTA2 gene with the maximum length of 20 kb including the entire coding exon 8 region, in which the most frequent mutation observed in TAAD, and to define base sequence for each exon. This method can analyze with much smaller sample volume than the conventional exon-to-exon PCR-direct sequencing method, and is effective not only for aortic dissection but also for analysis of many hereditary diseases.

研究分野：循環器病学

キーワード：大動脈瘤 大動脈解離 長鎖非コーディングRNA

1. 研究開始当初の背景

大動脈瘤・大動脈解離 Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection (TAAD)は大動脈中膜部に血液が流入し、仮性動脈瘤を形成し層構造が解離する疾患である。大動脈起始部から心臓にかけて解離が進めば、冠動脈の血流を阻害して心筋梗塞の原因となる。大動脈弁閉鎖不全症、心タンポナーデ等を合併すると死に至る危険な疾患である。日本のTAADの頻度は超高齢社会が進行する中での高頻度の動脈硬化により高い値を示している。従来、1万に0.3~0.5人の発症頻度とされていたが、東京都下で虱潰しに調査した結果、急性心筋梗塞の3分の1から4分の1の頻度でTAADが原因であり、これを勘案するとその頻度は従来の倍、即ち人口1万に1人の高い頻度で発生している事が判明した。

Ehles-Danlos 症候群や Marfan 症候群に合併する TAAD と区別される非症候群性の TAAD が多数存在する。非症候群性 TAAD の約 20%に家族歴があると報告され、その遺伝的背景の解明が期待されていた。ゲノム医学の進展に伴い、細胞外マトリックスタンパクの一つで Marfan 症候群原因遺伝子フィブリリン 1 FBN1 はじめ、平滑筋特異的 α アクチン ACTA2 とミオシン MYH11 等の細胞骨格タンパクを含め多数の遺伝子の関与が明らかにされた。家族性 TADD (fTADD) の原因遺伝子は今までに 7 種が報告されている。fTADD の原因遺伝子の一つ FBN-1 は 65 エクソンからなる。従って全エクソンを総て従来のサンガー法で解析する事には困難が伴う。

fTADD関連遺伝子							
	遺伝子名	染色体	Genome(kb)	Exon	mRNA(kb)	頻度	
fTADD (Gene identified)	TGFBR2/AAT3	3p24.1		88	11	4.6	4%
	MYH11/AAT4	16q13.11		154	41	3.9	>1%
	TGFBR1/AAT5	9q22.33		49	9	6.2	1%
	ACTA2/AAT6	10q23.3		58	9	1.8	10-14%
	SMAD3	15q22.33		129	9	6.3	2%
	MYLK	3q21		272	34	7.9	1%
	FBN1	15q21.1		237	65	11.7	?
	Total		987	178	42.4	19-23%	
fTADD (Locus identified)	AAT1	11q23.3-q24		16Mb			
	AAT2	5q13-14q		26Mb			
Marfan, Type I	FBN1						
Loeys-Dietz, Type 1A/2A	TGFBR1/AAT5						
Loeys-Dietz, Type 2B	TGFBR2/AAT3						

最近長鎖非コード領域 RNA (long non-coding RNA、lnc RNA) の遺伝子 CDKN2BAS (一般的に ANRIL と呼ばれる。以下 ANRIL) の変異が冠症候群や腹部大動脈瘤に關与することが報告された(Hinterseher I, et al. Ann Vasc Surg. 2011. 25:388)。ANRIL は natural antisense transcript に分類される lnc RNA であり、細胞の増殖や生存を調整する CDK inhibitor の制御を司り、血管細胞への影響から冠動脈疾患や大動脈瘤発症との関連が従来報告されている。一方、大動脈瘤は真性大動脈瘤・仮性大動脈瘤・解離性大動脈瘤に大別され、ANRIL が腹部大動脈瘤の発症に關連することは報告されているものの、解離性大動脈瘤の原因である大動脈解離の発症との直接の關連性についての報告はいまだ存在しない。

脈瘤の原因である大動脈解離の発症との直接の關連性についての報告はいまだ存在しない。

従って、大動脈解離発症と、従来困難であった原因遺伝子の全域の塩基配列解析、ANRIL の配列解析と Epigenetic 制御の關連性を検討することが求められている。fTADD のみならず TADD の発生実態の把握は不十分で、発症機序も不明である。近年、上記の原因遺伝子が同定されたが日本では系統的な解析はなされていない。

2. 研究の目的

本研究の代表者吉野は杏林大学において循環器の責任者として救急診療体制を確立、急性冠症候群(急性心筋梗塞、不安定狭心症)、急性大動脈解離、重症不整脈、急性肺塞栓症などの急性疾患に対してCCUで24時間体制の対応をしてきた。その中で、来院時心肺停止例を含めて年間100例近くを救急対応し、20-30例ほどの救命例を継続的にフォローアップしている。その中には、家族性の症例も相当数存在する。本研究ではこれまでの臨床でのTAADの経験と肺動脈性肺高血圧症の原因遺伝子解析の経験を生かし、従来は困難と思われていた fTADD 原因遺伝子の全域解析を目指した。さらに、これらを踏まえ in vitro の系を用いて発症の機序に迫ることを目指した。

3. 研究の方法

PCR 用プライマーは、Primer3 web version 0.4.0 を使用し、プライマーサイズ 23-25mer、プライマーの位置をターゲット領域から 75 塩基上流および下流に、プライマー Tm は 60±1 以内、で設計した。マルチプレックスでは PCR Product size は 300bp から 2000bp、各 Product Size に 50bp 以上の差をつけ、設計したプライマーは、Primer Blast で特異性を確認した。PCR は PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase を用い、標準的な反応条件下で増幅した。PCR Product は、アガロースゲル電気泳動で確認した。シーケンス反応には BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit を用い、Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer で解析した。遺伝子の解析系の確立にはヒト由来培養細胞由来の DNA を材料に、また培養細胞で確立した方法の検証には JCRB より入手した日本人一般集団 DNA(96 名分)を用いた。

4. 研究成果

最も高頻度に変異が觀察され全コーディングエクソン 8 領域を含め全長 20kb と小さい ACTA2 遺伝子では、全長を Long PCR で増幅し、エクソン毎に塩基配列を決定する方法を確立した。この解析系を用い JCRB 試料

を対象に ACTA2 遺伝子の全コーディングエクソン 8 領域を含む約 20kb を増幅、エクソン 5, 6, 8 の塩基配列を決定した。JCRB 試料のエクソンには疾患関連変異は見られなかったがイントロン内に 9 種の SNP を検出した。この内 5 種は公開データベースに頻度を含めて登録済みの SNP、2 種は登録済みだが頻度記載がない SNP、2 種は今回の試みで見出した SNP である。この方法は従来のエクソン毎の PCR-ダイレクトシーケンス法よりもはるかに少ない検体量で解析可能であり、大動脈解離に限らず、多数の遺伝子が、また多くのエクソンの遺伝子の関与する疾患の解析に有効である。

全コーディングエクソン 9 領域を含め約 50kb の TGFBR1 遺伝子では各エクソンに対応するプライマーを設計し、全エクソンを一反応で増幅し、各エクソンの配列を解析する方法(マルチプレックス PCR-シーケンス法)を確立し、JCRB 試料を対象に TGFBR1 遺伝子解析の検証を行なった。JCRB 試料中の全 9 エクソンには疾患関連変異は見られなかったが、イントロン内と開始コドン上流 80 塩基目にそれぞれ 1 種ずつ塩基置換(SNP)を検出した。イントロン内 SNP は公開データベースに登録されていたが、開始コドン上流 80 塩基目の SNP は今回の試みで見出された。マルチプレックス PCR-シーケンス法は少ない検体量で変異解析が可能であり、大動脈解離に限らず、多数の遺伝子の関与が示唆される疾患の解析に有効である。

遺伝子全長 237kb・コーディングエクソン 65 領域の FBN1 遺伝子では、上記の Long PCR 法、マルチプレックス PCR 法のいずれも効率的ではない。そのため FBN1 遺伝子開始コドン上流約 10kb から終止コドン下流約 8kb まで約 250kb を開始コドン側から約 20kb の 13 断片(L1~L13)に分け Long PCR で増幅した。次に全ての断片が増幅可能な組み合わせを検討し FBN1 遺伝子全長を 4 反応でカバーする Multiplex-Long PCR 法を確立した。Multiplex-Long PCR 増幅産物は次世代シーケンサーを用いることでエクソン解析のみならず、転写制御・開始領域、潜在的なスプライシング変異、さらに non-coding RNA が結合することで分解促進または翻訳抑制する 3'-非翻訳領域の変異を含めた遺伝子全領域解析が可能である。ゲノム上 154kb で 41 エクソンからなる平滑筋ミオシン重鎖 MYH11 遺伝子の解析系も同様の Multiplex-Long PCR 法を採用した。遺伝子全領域を約 20kb の 9 断片に分け Long PCR で増幅した。さらに、この反応をマルチプレックス Long-PCR とすること、および、培養血管内皮及び平滑筋細胞を用いた in vitro の実験系の確立に努めた。これにより 7 つの原因

遺伝子のうち 4 遺伝子の解析が可能となった。いずれも最少の検体量で変異解析を可能とする事を目指したものである。

現在、次世代型シーケンサーの利用コストが低下しており、各種疾患の原因遺伝子解析での利用へと拡大する事が期待されている。我々も今後、網羅的解析を目指した次世代シーケンサーの利用に発展させていく予定である。最新の次世代型を用いたエクソーム解析では一度の解析で総てのエクソンの情報が、全ゲノム解析では文字通り全ゲノムの配列情報を読み出す事が出来、多くのメリットがある。しかしながら、次世代型の生み出す膨大な配列情報から必要な情報を抽出する作業は、従来とは全く異なる作業であり相応の解析用コンピューターと技能を要する。また倫理的な問題も含めて検討する課題は多く、臨床検査としての普及には数年を要すると推測する。その間、もしくは今後も、本研究で確立した Long PCR とパーソナライズされた次世代型シーケンサーを組合わせた方法が有効と考える。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉野秀朗 (YOSHINO, Hideaki)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：90129734

(2)研究分担者

佐藤徹 (SATO, Toru)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：20170764

蒲生忍 (GAMOU, Shinobu)

杏林大学・CCRC 研究所・特任教授

研究者番号：90122308