

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461623

研究課題名(和文) 小児の肺動脈性肺高血圧症における新規原因遺伝子の探索と同定

研究課題名(英文) Novel gene mutations in the pediatric patients with pulmonary arterial hypertension

研究代表者

稲井 慶 (Inai, Kei)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：80318063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：小児肺動脈性肺高血圧症を対象に、新規病原遺伝子の探索を行った。以前報告した smad8 の変異は患者数を増やしたが、やはり1例でしか検出できなかった。smad8 変異の頻度は BMPR2 や ALK1 と比較すると非常に低いものと考えられた。さらに、smad 遺伝子について1から5まで解析の幅を広げたものの、これまでに変異を検出できなかった。

そこで、HIVEP1 について変異を検討全症例に対して解析を行い、2人の患者において、HIVEP1 の変異を検出した。この変異の病原性を確認するため、機能解析を行ったが、ウェスタンブロット法とルシフェラーゼアッセイで検出された変異の病原性を証明することはできなかった。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a progressive, fatal disease even in the pediatric patients. Genetic mutations in the BMPR2 gene, ALK1 gene, and SMAD8 gene etc. have been detected in PAH so far. But, about 60% of PAH patients have no mutations. This fact indicates that there remain unidentified genes associated with PAH.

We detected novel mutations in HIVEP gene, which is in the BMP/TGFβ signal cascade in two idiopathic PAH patients. However, in protein functional analysis, we have not yet shown the evidence of disease causality of these mutations.

研究分野：循環器小児科学

キーワード：遺伝子変異 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) は進行性かつ難治性で重篤な予後不良疾患である。近年徐々に予後の改善は認められつつあるものの、的確な予防法や、病気の進行を阻止し治療する方法は現時点では残念ながら確立されたとはいえない。全体の約 25% が小児例で、病態に成人例と異なる部分があることが報告されている。本研究の目的は、小児の PAH 症例で既知の疾患遺伝子に変異を認めない症例を対象に、新たな疾患遺伝子の探索と同定を行うことである。新規疾患遺伝子の同定や変異の機能解析により、分子病態レベルで PAH の発症機序が明らかになれば、発症予防や治療方法の開発につながる可能性がある。

われわれは、肺動脈性肺高血圧 (以後 PAH) の遺伝子変異の検出に長年取り組んできた。しかし、未だ PAH 患者の多くはその原因遺伝子を特定できないものが多いのが現状である。家族性 PAH の約 30%、散発性 PAH の約 60% では BMPR2、ALK1 遺伝子の異常が認められていない。その理由のひとつは、エクソンレベルの大きな欠失はダイレクトシーケンスで検出できない可能性があることが考えられる。さらにもうひとつは、未知の原因遺伝子が隠されていることが考えられる。

現時点では PAH の病態に最も深く関与すると考えられているのは、TGF- β /BMP シグナル系である。TGF- β /BMP シグナルは細胞増殖、細胞分化、アポトーシス等の幅広い生理活性を有し、重要な役割を果たしている。BMPR2 や ALK1 遺伝子の変異により TGF- β /BMP シグナルバランスに不均衡が生じることにより肺血管内皮細胞及び平滑筋細胞の増殖異常が PAH の肺血管病変が生じるのではないかと考えられているが、未だ不明な点も多い。

2. 研究の目的

PAH は 100 万人に 1 - 2 人の割合で発症する稀な疾患で、且つ小児例は全体の 4 分の 1 であ

ることから、小児 PAH を対象に既知の疾患遺伝子を含めて BMP/TGF- β シグナル伝達関連遺伝子を徹底的に解析している研究グループは日本国内外を含め少ない。

そこで今回、小児 PAH (73 例) を対象に、BMPR2、ALK1、ALK6、SMAD 遺伝子の異常の有無を直接シーケンス法及び MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) 法で解析するとともに、新規原因遺伝子の探求を行った。

3. 研究の方法

我々の既報 (Shintani M. et al (2009)) に従い、採取した患者の DNA を用い、まず初めに既知の PAH 疾患遺伝子である BMPR2、ALK1、ALK6、SMAD8/9、CAD 遺伝子の各エクソンを増幅するためのプライマーを用いて、PCR 法にて増幅後、直接シーケンス法を用いて解析する (ABI 3130xl Genetic Analyzer)。BMPR2、ALK1 遺伝子については直接シーケンス法では検出できない large deletion や duplication を検出する為の MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) キットを用いた遺伝子解析も同時に施行した。

4. 研究成果

その結果、MLPA 法では直接シーケンス法で検出できていなかった BMPR2 の遺伝子変異が 2 家系で確認することができた。SMAD8 については以前に 1 例報告済みであったが、その後症例を増やして検討しても新たな変異は発見できず、MLPA 法においても新たな発見はなかった。また、同じ smad 蛋白である smad1,2,3,4,5 についても全例検出を試みたが、変異はみられなかった。さらに我々は 2012 年に、ALK6 (BMPR1B) 遺伝子の変異も発見し、報告している (Chida A, Inai K et al Circ J. 2012;76(6):1501-8) が、MLPA 法を用いても新たな変異の検出はできなかった。我々が検出した SMAD8 のナンセンス変異は、

その機能解析により TGF- β /BMP シグナル伝達において機能低下型の異常を引き起こすことを明らかになっている(Shintani M, et al. J Med Genet 2009)。さらにその後、米国の研究グループが Smad8 ノックアウトマウスでは PAH の特徴的病変を持つ肺血管の異常が生じることを報告したことにより、SMAD8 遺伝子が BMPR2、ALK 遺伝子に次ぐ 3 番目の PAH の疾患遺伝子であることが強く支持された。しかし、その頻度は BMPR2 や ALK1 と比較すると非常に低いものと考えられる。

しかし、これらの事実は、BMPR2、ALK 遺伝子異常を認めない小児 PAH の中には BMP/TGF- β シグナル伝達に關与する他の遺伝子の異常が關与している症例が含まれることを強く示唆している。すなわち、既知の疾患遺伝子の異常が認められていない PAH 症例で未だ探索、同定していない遺伝子の異常が小児 PAH の発症に關与している可能性が高いと考えるのが妥当である。

先に述べたように smad 遺伝子は 1 から 5 までで今のところ変異を検出することができず、smad8 についても変異が確認できたのは 1 例のみのため、さらに BMPR/TGFB シグナル系の中で検討範囲をひろげて、次の候補遺伝子に向けて研究を進める必要があると考えられる。

そこで、次のステップとして、BMP/TGF- β シグナル伝達の中で、いまだ未検討の HIVEP1 について変異を検討すべくそのプライマーを作成し、直接シーケンス法で、全症例に対して解析を開始した。その結果、2 人の患者において、HIVEP1 の変異を確認することができた。HIVEP1 Exon9 c.7089 G>T Gln 2363 His と HIVEP1 Exon5 c.6107 T>C Val 2036 Ala の 2 種類の変異が検出された。遺伝子変異を認めた場合は最低 200 検体の正常対照を用い、遺伝子変異が多型でないことを確認された。

さらにこの変異の病原性を確認するため、

蛋白質レベルでの解析を行った。smad8 の病原性を確認したのと同じ方法で、変異箇所を PCR によるミュータジェネシスにより組み込んだコンストラクト(タンパク質の cDNA を組み込んだ発現ベクター)を作成した。そのコンストラクトを、培養した COS1, HEK293 等の細胞にトランスフェクションし、目的のタンパク質を回収して機能解析の試料とする。機能解析は Shintani M. et al (2009) で用いたウェスタンブロット法、免疫共沈法、ルシフェラーゼアッセイ法等を用いて行った。しかし、ウェスタンブロット法による Myc-Smad8 リン酸化を wild type との比較においても、ルシフェラーゼアッセイで転写活性の比較においても、wild type との間には有意な差は認められず、検出された変異の病原性を蛋白質レベルで証明することはできなかった。

今回は HIVEP 遺伝子変異と PAH 病態との関連を証明できなかったが、今後は BMP/TGF- β シグナル伝達経路の中で、さらに検索範囲をひろげて、新規原因遺伝子の発見に努めるとともに、適切な機能解析の方法論についても検討を重ねたいと考えている。

さらに新たに Notch シグナル系も含めた少なくとも 15 個の候補遺伝子について選択、遺伝子解析を行うとともに、PAH 発症にかかわる修飾遺伝子として報告されている 5-HTT のプロモーター領域の遺伝子多型、ACE, eNOS, KCNA5 遺伝子等の遺伝子多型の解析にも着手したい。

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 1 件)

稲井 慶 第 51 回日本小児循環器学会「小児期発症高血圧症の予後とその規定因子」2015 年 7 月 16 日 ホテル日航東京(東京都港区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲井 慶 (Inai Kei)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：80318063

(2) 研究分担者

中西 敏雄 (Nakanishi Toshio)

東京女子医科大学・医学部・特任教授

研究者番号：90120013