

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860688

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いたI型・V型脂質異常症の新規責任遺伝子探索

研究課題名(英文) Exploratory study to identify genetic defects of type I/V hyperlipoproteinemia using Next-Generation Sequencing

研究代表者

高瀬 暁 (Takase, Satoru)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80508094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Whole genome sequence解析により、自験例のhypoapoC-IIではAPOC4 ex1～APOC2 ex1の重複が示唆され、サザンブロット解析、breakpoint解析からtandem duplicationと示唆された。Rearrangementスクリーニングを目的にarray CGHによる糖・脂質代謝関連遺伝子の網羅的解析系を樹立した。後に追加されたhypoapoC-II症例は、これらの解析から自験例と同一の構造変異を持つ事が示され、両者の高密度SNPタイピング解析により創始者ハプロタイプが認められた。hypoapoC-IIの原因として新規の構造変異を見出した。

研究成果の概要(英文)：Previously we reported a case of hypoapoC-II with severe hypertriglyceridemia (HTG) phenotype without any mutation in the coding region of the APOC2 gene (Case 1). Whole genome sequencing revealed a rearrangement around the APOC2 gene. Southern blot hybridization analysis, array CGH analysis, and breakpoint analysis supported the result. Other 2 cases of severe HTG with decreased levels of plasma apoC-II proteins were also analyzed (Case 2 and Case 3). Surprisingly, Case 2 showed the same result as Case 1 by array CGH analysis and breakpoint analysis, indicating they have the same rearrangements. We further genotyped tag SNPs of these 2 patients by microarray and detected a founder haplotype. We propose a new disease entity “hypoapoC-II” that is derived from a structural abnormality around APOC2 gene and results in massive HTG.

研究分野：糖尿病学、脂質代謝学

キーワード：hypertriglyceridemia APOC2 whole genome sequencing

1. 研究開始当初の背景

I型/V型脂質異常症の責任遺伝子として *LPL*、*APOC2*、*APOA5*、*GPIHBP1*、*LMF1* が報告されているが、I型の34%、V型の75%はこれらに変異を認めない(R.P.Surendran et.al., *Journal of Internal Medicine*, 2012)。我々が報告した apoC-II低下症(hypoapoC-II)も上記5遺伝子に変異を認めなかった(Takase S, et al., 2013)。本研究の目的はこれら原因不明のI型/V型脂質異常症症例に対する次世代シーケンサーを用いた変異同定および機能解析にある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、原因不明のI型/V型脂質異常症に対する次世代シーケンサーを用いた変異同定および機能解析である。

3. 研究の方法

(1) 症例リクルート：

東京大学倫理審査委員会の承認を得て実施した。当院加療中または共同研究施設より紹介されたI型/V型脂質異常症患者に対し、TG \geq 1000mg/dl をリクルート基準として、所定の書式を用いてインフォームドコンセントを行い同意書を取得した。

(2) 血液採取、genomic DNA抽出：

通常診療時の採血検体(EDTA採血)を用いた。採血予定の無い方は別途採血を施行した。個人情報情報を削除し、連結可能匿名化検体として保存した。Genomic DNA抽出は市販キットを用いて常法に従い施行した。

(3) whole genome /exome sequence 解析：

Genomic DNAを超音波により細断し、次世代シーケンサー用のライブラリを調整し、HiSeq2000を用いて解析した。whole exome sequence 解析については exon 領域のみキャプチャーして解析を施行した。

(4) サザンブロット解析：

制限酵素 BamHI を用いて genomic DNA を切断した。*APOC2* cDNA または *APOC4* cDNA を probe に用いて hybridization を行った。

(5) Breakpoint 解析：

breakpoint と推定された配列の前後に primer を設定し PCR を施行し、アガロースゲル電気泳動にて band を確認した。PCR product の direct sequence、更に subcloning 後の直接塩基配列決定法により breakpoint の塩基配列を確認した。

(6) array CGH 解析：

対象領域に probe を設定し、microarray によりコピー数解析を施行した。repeat 領域等の非特異的配列については、データベース検索を用いて probe 設定対象から除外した。*APOE/APOC1/APOC4/APOC2* gene cluster 領域を含めた糖・脂質代謝関連遺伝子の計118遺伝子に対し probe を設定し、網羅的解析系を樹立した。

(7) SNP array 解析：

全 genome 配列の tag SNP に対し、microarray による genotyping を施行した。

4. 研究成果

TG \geq 1000mg/dl をリクルート基準とし同意の得られた28人について、まずは hypoapoC-II 症例の解析から着手した。自験例(Case 1)に続き、新たに追加された症例(Case 2, Case 3)を含めた解析から興味深い知見を得るに至った。

(1) 【Case 1 の解析】

(1)-① whole genome sequence 解析：

APOC2 遺伝子は第19番染色体上の *APOE/APOC1/APOC4/APOC2* gene cluster 内に位置し、共通の enhancer 制御下にある事が知られている。

自験例の hypoapoC-II 症例は末梢血単球由来 macrophage において *APOC2* mRNA 発現の減少が示されたが、*APOE* および *APOC4* の減少は認めなかった。*APOC2* のみを制御し得る未知の転写因子が macrophage で障害されている可能性、または *APOC2* 制御に直結し得る何らかの異常が cis-element に存在する可能性が推察された。

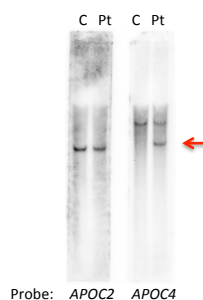
APOC2 遺伝子を含む周辺領域 (*APOC4* の3'端から *CLPTM1* の5'端まで)には、sanger sequence 法により common SNP のみが指摘されていたが、転写調節領域を含めたより広範な領域の解析を目的として、whole genome sequence 解析を施行した。

APOC2 遺伝子領域に rare variant は認めなかったが、*APOC4* ex1 5'側から *APOC2* ex1 3'側の約 6kbp にわたり read depth が他の領域より約2倍増加している事が示された。また、同領域の両端に paired end が逆向きに map された split read が検出された。以上から、同領域が tandem に重複されている可能性が示唆された。

(1)-② サザンブロット解析：

whole genome sequence 解析により示唆された major rearrangement を確認すべく、サザンブロット解析を施行した。制限酵素には BamHI を用いた。

APOC2 cDNA の probe に対しては患者と健常者は同等の位置に band が検出されたが、*APOC4* cDNA を probe に用いた解析では、患者において extra band が検出された。whole genome sequence 解析から得られた知見と矛盾しない結果であった。



(1)-③ Breakpoint 解析：

tandem duplication の breakpoint と推定された配列の前後に primer を設定し PCR を施行したところ、患者のみに band を認め、健常者では認めなかった。PCR product の sequence により、同領域は alu 配列を介在した tandem duplication であると示唆された。

更に、正脂血症である親族（長男、母、父方叔母、父方叔父）を同様に解析したところ、長男、母、父方叔父では PCR band が認められ carrier (heterozygous) である可能性が示唆され、父方叔母には PCR band を認めず wild type であると示唆された。

今後、tandem duplication 領域の外側に primer を設定した long PCR により、homozygous、heterozygous、wild type の判別を行い、更にサザンブロット解析による確認を行う予定である。

(2) 【Case 2, Case 3 を含めた解析】

Case 2 および Case 3 は、著明高 TG 血症と血清 apoC-II 蛋白濃度の低下を認めたことから、hypoapoC-II 疑いとして紹介された。

Case 1 の知見から major rearrangement、特に large insertion / deletion の可能性を考慮し、array CGH 解析による重複・欠失変異の解析を行うこととした。

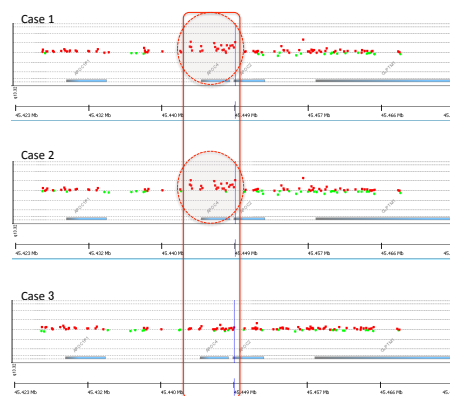
同時に、array CGH 解析による糖・脂質代謝関連遺伝子の計 118 遺伝子の網羅的解析系を樹立し、原発性脂質異常症原因遺伝子に点変異を認めない症例に対するスクリーニングを開始した。

(2)-① array CGH 解析：

Case 1 において、whole genome sequence 解析で duplication を指摘された領域のコピー数が上昇している事が確認された。

興味深いことに、Case 2 においても全く同一の領域にコピー数の上昇を認めた。Case 3 ではコピー数上昇は認めなかった。

他の遺伝子領域については、患者と健常者間に明らかな差は指摘されなかった。



(2)-② Breakpoint 解析：

(1)-③と同様に解析したところ、Case 1 と同等の位置に Case 2 の PCR band を認めた。Case 3 では認めなかった。

以上から、Case 1 と Case 2 が共通の構造変異を持つ可能性が示唆された。preliminary ながら breakpoint の配列も共通していると示唆される sequence 結果が得られており、解析を進めている。

(2)-③ SNP array 解析：

Case 1 と Case 2 は共通の構造変異を持つ可能性が示唆されたため、創始者効果の有無を検討すべく両家系の高密度 SNP タイピングを施行した。

第 19 番染色体上の *APOC2* 遺伝子周辺で、Case 1 は連続 7.8Mbp、Case 2 は連続 2.4Mbp にわたり tag SNP が homozygous と示され、そのうち 0.68Mbp の tag SNP が両者で一致していた。同領域内に今回指摘された tandem duplication を認めたことから、創始者ハプロタイプであると考えられた。

chromosome 19



以上より、Case 1 と Case 2 で認めた構造変異は同一祖先から派生したと考えられた。

(2)-④ whole exome sequence 解析：

array CGH 解析にて rearrangement 変異が指摘されなかった Case 3 に対し whole exome sequence 解析を施行したところ、*APOC2* ex3 に変異を認め (c.142T>C)、既報の apoC-II-Wakayam と同一の変異である事が示された。

Macrophage 内の *APOC2* 発現低下を Case 1 で既に報告したが、本研究で認めた *cis*-element 異常により、肝臓、小腸においても同様に *APOC2* 発現低下を招いている可能性が考えられた。

更に、異なる 2 家系において、同一祖先から派生した構造変異を homozygous で持つ症例に血清 apoC-II 蛋白濃度低下と著明高 TG 血症が発症している事から、我々が同定した構造変異は causative であり、hypoapoC-II の原因であると考えられた。

両家系に認めた創始者ハプロタイプは比較的短く、日本人において多数の carrier (heterozygous) が存在する可能性が示唆された。血清 apoC-II 蛋白濃度低下が指摘された際は、構造変異も含めた詳細な解析が必要と考えられる。

我々が樹立した網羅的解析系により、hypoapoC-II 以外の I 型/V 型脂質異常症においても未知の変異が見出される可能性が考えられ、更なる解析を進めている。

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)

[学会発表] (計 3 件)

1. 高瀬 暁、石浦浩之、三井純、藤田逸人、原一雄、関谷元博、五十嵐正樹、高梨幹生、泉田欣彦、久保田みどり、升田紫、平美乃、岡崎佐智子、飯塚陽子、矢作直也、大橋健、吉田博、柳内秀勝、多田紀夫、後藤田貴也、大須賀淳一、石橋俊、辻省次、門脇孝、岡崎啓明「whole genome sequence 解析を用いた apoC-II 低下症の原因遺伝子変異同定の試み」第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会 (2014 年 5 月 24 日 大阪)
2. 高瀬 暁、石浦浩之、三井純、藤田逸人、原一雄、高梨幹生、飯塚陽子、吉田博、大須賀淳一、石橋俊、辻省次、門脇孝、岡崎啓明「全ゲノム解析を用いた apoC-II 低下症の原因遺伝子の探索」第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 (2014 年 7 月 10 日 東京)
3. Satoru Takase, Hiroyuki Ishiura, Jun Mitusi, Hayato Fujita, Kazuo Hara, Mikio Takanashi, Jun ichi Osuga, Shun Ishibashi, Shoji Tsuji, Takashi Kadowaki, Hiroaki Okazaki 「Molecular dissection of hypoapoC-II caused by defective apoC-II mRNA transcription」9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress (Kyoto, Japan, 2014.09)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高瀬 暁 (TAKASE, Satoru)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80508094