

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05665

研究課題名(和文)日本最大検体ライブラリーを通じた肺高血圧症のエピジェネティクス病態機構の解明

研究課題名(英文)Clarification of epigenetic pathological mechanisms in pulmonary hypertension through Japanese high-volume sample library

研究代表者

片岡 雅晴(KATAOKA, Masaharu)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：20445208

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 16,700,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、肺動脈性肺高血圧症(PAH)の日本人患者サンプル収集を通じて、PAHの新規原因遺伝子を探索すること、及び、PAHにおけるlong non-coding RNAの役割を解明することを目的とした。日本人PAH患者DNA検体を用いた全エクソーム解析によって、SOX17やRNF213をPAHの新規原因遺伝子として同定した。さらに、PAH患者RNA検体を用いたlong non-coding RNA(lncRNA)のアレイ解析を含めた集学的解析によって、PAHの病態形成のためにエピジェネティックに重要な役割を有していると考えられるlncRNAを絞り込むことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

欧米を中心として、患者サンプルを収集したドライビングデータは既に存在しており、数々のエビデンスも報告されている。しかしながら、海外からのエビデンスをそのまま日本人患者へ応用することはリスクを伴う。多人種による異質性が高い海外の解析結果に比べ、統一プロトコールで収集した均質性の高い日本人患者の臨床検体から得られた本研究での知見は、日本人患者の病態に最適化した個別化医療の実現にとって非常に重要な基盤になると考える。海外の報告例は、必ずしも本邦の患者病態を反映していることは限らないことから、日本人患者に最適化された医療を提供することが極めて重要であり、我々の研究の意義は大きい。

研究成果の概要(英文): In this study, we aimed to search for novel causative genes of pulmonary arterial hypertension (PAH) and to elucidate the roles of long non-coding RNA in PAH by collecting large samples from Japanese PAH patients. SOX17 and RNF213 were identified as novel causative genes of PAH by whole exome sequencing. Furthermore, we succeeded in narrowing down long non-coding RNAs (lncRNAs), which are thought to have the important epigenetic roles for the pathogenesis of PAH through multidisciplinary analysis including lncRNA array.

研究分野：循環器病学

キーワード：肺動脈性肺高血圧症 全エクソーム解析 long non-coding RNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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の肥厚を原因と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難治性疾患である。膠原病や先天性心疾患に伴う PAH に加えて、特発性 PAH や家族性 PAH は比較的若年に発症し極めて予後不良である。原因はいまだ一部の遺伝子異常が明らかになっているものの、そのみでは説明がつかず、他の遺伝子異常の存在、また、epigenetic 制御の可能性、何らかの外的因子の重要性、など未だ病態解明には疑問点が残されている。

PAH 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" の変異が発見され原因遺伝子とされた(1)。しかしながら、BMPR2 遺伝子異常は特発性 PAH の約 25%、家族性 PAH の中でも 70%程度である。近年はゲノムワイド関連解析や次世代シーケンサー(以下、NGS)での変異解析や miRNA を含めた発現解析が普及しつつあるが、我々も含めて未だに有力な新規発症関連遺伝子や epigenetic な制御は発見に至っていない。即ち、特発性 PAH の過半では原因を特定出来ていない。そのため、根本的な発症概念は確立されておらず、肺動脈肥厚に至る分子機構は不明で、治療方法も確立していない。

PAH は難病指定の希少疾患であるが故に、個々の施設が診療に全力を尽くすのみでなく、我が国として共通の PAH サンプルバンクや PAH データバンクの設立、および、それに基づく効率的な病態解明や臨床情報収集からの治療方針の改善も、近い将来の目標として、我が国の総力を挙げて取り組んでいく必要がある。現実的に、米国や欧州などでは大規模な臨床研究が遂行され、ガイドラインへの反映に結びつくような研究成果が数多く発表されているが、我が国から発信した PAH に関する分子遺伝学的大規模エビデンスは未だ存在しない。そのような状況を打開し、日本から世界へ発信し、世界中の PAH 患者医療への貢献を高いレベルで実現可能な目標として目指していく必要がある。そのために、本研究では、日本最大規模患者サンプル及びデータネットワーク構築を掲げて取り組んできた。

2. 研究の目的

PAH の発症原因としては、遺伝子変異だけで病態を全て説明することはできず、epigenetic な修飾による制御が関与することを強く示唆する。近年では epigenetic 制御機能を持つ long non-coding RNA (lncRNA)が注目されている(2)。ヒト遺伝子のうち、蛋白質をコードする遺伝子は、全染色体 DNA の 2%を占めるに過ぎない。しかし、全染色体 DNA の半分以上は RNA へと転写されており、蛋白質をコードしない non-coding RNA が大量に存在する。Non-coding RNA のうち、約 30 塩基以下の microRNAs については、数年前より研究が活発に行われ、その機能がある程度解明されつつあるが、一方で、約 200 塩基以上の長さを有する lncRNA については、その存在や機能について、いまだほとんど解明されていない。特に、循環器領域においては、ES 細胞や iPS 細胞の心筋細胞への分化誘導過程における特定の lncRNA の機能が、ごく近年に解明されつつあるが(3,4)、いまだ PAH を含めた成体期の肺循環における lncRNA の役割は全く解明されていない。そこで本研究では、PAH の新規原因遺伝子を検索すること、及び、lncRNA の肺循環領域における役割の世界初の解明を目的とした。PAH 患者検体を用いて全エクソーム解析による原因遺伝子の検索、及び、lncRNA の発現量の解析から epigenetic 制御の可能性の検討を行い、個別化医療の実現を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PAH 患者臨床検体の収集

協力施設間での倫理手続きの上で、患者臨床検体の収集を行った。臨床検体は、剖検試料も含めて、DNA/RNA/血清/血漿へ抽出分離し、専用フリーザーで保管した。

(2) 全エクソーム解析による PAH 発症関連遺伝子の同定と相関解析

DNA 検体を用いて NGS による全エクソーム解析を実施した。網羅的な変異抽出を行い、PAH 患者における新規原因または感受性遺伝子候補を抽出した。また、それらの変異を有する患者群における臨床的意義を臨床指標との相関解析から検証した。

(3) 患者 RNA 検体からの lncRNA 発現量の解析

RNA 検体を用いて lncRNA アレイを行った。その後、解析ソフトウェア(Agilent 社 GeneSpring)を用いて lncRNA の発現量を解析し、PAH 患者で発現量が大きく変動する lncRNA を精査した。また、Heat-map 解析や GO analysis 等を併用し、多角的に lncRNA 発現量について精査した。さらに、アレイの結果から大きく発現量が変動する lncRNA を重要候補として、それらのプライマーを設計して定量的 qPCR にて発現量を確認した。

4. 研究成果

従来、先天性心疾患、特に、頻度の多い心房中隔欠損症や動脈管開存症の原因遺伝子変異は明らかに同定されていなかったが、我々は、SOX17 遺伝子変異が、心房中隔欠損症や PAH の共通した原因遺伝子変異として、日本人 PAH 患者の 4%程度で認めることを見出した(5)。この SOX17 遺伝子によってコードされる蛋白の分子動力学計算による構造解析を実施したところ、SOX17 変異により蛋白構造の不安定性を示す結果が得られた。この SOX17 変異を有する PAH 患者では、肺病理学的に血管内腔の著明な線維化をきたしており、肺血管拡張剤に対して治療不応性で

あった。このような SOX17 変異を原因として発症している PAH 患者では、肺血管拡張剤で粘るよりも、より早期に肺移植登録を検討すべき可能性が示唆された。

また、日本人 PAH 患者での全エクソーム解析データを用いた検証から、基礎疾患を有しない特発性 PAH 患者の 1 割程度に RNF213 p.Arg4810Lys 変異が存在することを見出した(6)。この RNF213 p.Arg4810Lys 変異は、日本人もやもや病患者の 7-8 割、および、末梢性肺動脈狭窄症患者の多くでも認められる(7)。この変異は東アジア圏の人種が多く有する変異であり、現代の日本人一般集団の 0.8%(全国約 100 万人)も保有している(東北メディカルメガバンク 3.5K データベースより)。よって、日本人に保有者の多い RNF213 p.Arg4810Lys 変異によって、浸透率は低いものの、発症した場合には、もやもや病・PAH・末梢性肺動脈狭窄症のいずれか(または、それらの組み合わせ)の難治性血管病を発症することが示唆された。我々は、この RNF213 p.Arg4810Lys 変異を有する日本人 PAH 患者集団は、現在のガイドライン上の治療アルゴリズムに従った肺血管拡張剤の治療法では治療不応性で、極めて予後不良な集団に一致することを確認した(7)。これらの患者では、心不全が進行して手遅れになる前に肺移植を早期から検討すべきと考えられる。

欧米を中心として、患者サンプルを収集したドライビングデータは既に存在しており、数々のエビデンスも報告されている。しかしながら、海外からのエビデンスをそのまま日本人患者へ応用することはリスクを伴う。異質性(heterogeneity)が高い海外の解析結果に比べ、統一プロトコルで収集した均質性の高い(homogeneous)日本人患者の臨床検体から得られた本研究での知見は、日本人患者の病態に最適化した個別化医療の実現にとって非常に重要な基盤になると考える。海外の報告例は、必ずしも本邦の患者病態を反映していることは限らないことから、日本人患者に最適化された医療を提供することが極めて重要であり、我々の研究の意義は大きい。

さらに、PAH 患者の RNA 検体を用いて、lncRNA アレイ解析を実施した。その結果、健常者コントロール RNA 検体と比較して、PAH 患者 RNA 検体では一部の lncRNA の発現量が大きく異なっていることが明らかとなった。Heat-map 解析・PCA 解析等も施行し、多角的に lncRNA 発現量について精査した。発現量がコントロールと比較して大きく異なる lncRNA 複数を絞りこんだ。定量的 RT-PCR 法を併用することによって、アレイ解析結果との相関性を調べ、最終的に PAH 病態制御に重要な役割を果たしていることが予想される候補 lncRNA を絞り込むことに成功した。

今後は、絞り込んだ候補 lncRNA について、発現量と臨床指標との相関解析をさらに詳細に進めていく予定である。いまだ循環器領域においてほとんど解明されていない lncRNA 患者検体発現量と臨床指標が相関することを実証すれば、臨床重症度を反映する非侵襲的指標としての lncRNA の可能性を実証することにもつながり価値が高いと思われる。

さらに、候補となる lncRNA に対してウイルスベクター等を用いることによって、in vivo 動物モデルでの gain- and/or loss-of-function study や、ヒト肺血管内皮細胞やヒト肺血管平滑筋細胞を用いた in vitro 培養系での増殖能やシグナル経路を含めた詳細なメカニズム解析を進めており、lncRNA がどのように PAH 病態制御に関与しているかを解明するため研究を継続している。

< 引用文献 >

1. International PPH Consortium, Lane KB, Machado RD, Pauciulo MW, Thomson JR, Phillips JA 3rd, Loyd JE, Nichols WC, Trembath RC. Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. *Nat Genet.* 2000;26:81-84.
2. Kataoka M, Wang DZ. Non-coding RNAs including miRNAs and lncRNAs in cardiovascular biology and disease. *Cells.* 2014;3:883-98.
3. Klattnerhoff CA, Scheuermann JC, Surface LE, Bradley RK, Fields PA, Steinhilber ML, Ding H, Butty VL, Torrey L, Haas S, Abo R, Tabebordbar M, Lee RT, Burge CB, Boyer LA. Braveheart, a long noncoding RNA required for cardiovascular lineage commitment. *Cell.* 2013;152:570-583.
4. Grote P, Wittler L, Hendrix D, Koch F, Währisch S, Beisaw A, Macura K, Bläss G, Kellis M, Werber M, Herrmann BG. The tissue-specific lncRNA Fendrr is an essential regulator of heart and body wall development in the mouse. *Dev Cell.* 2013;24:206-214.
5. Hiraide T, Kataoka M, Suzuki H, Aimi Y, Chiba T, Kanekura K, Satoh T, Fukuda K, Gamou S, Kosaki K. SOX17 mutations in Japanese patients with pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018;198:1231-1233.
6. Suzuki H, Kataoka M, Hiraide T, Aimi Y, Yamada Y, Katsumata Y, Chiba T, Kanekura K, Isobe S, Sato Y, Satoh T, Gamou S, Fukuda K, Kosaki K. Genomic comparison with supercentenarians identifies RNF213 as a risk gene for pulmonary arterial hypertension. *Circ Genom Precis Med.* 2018;11:e002317.
7. Hiraide T, Kataoka M, Suzuki H, Aimi Y, Chiba T, Isobe S, Katsumata Y, Goto S, Kanekura K, Yamada Y, Moriyama H, Kitakata H, Endo J, Yuasa S, Arai Y, Hirose N, Satoh T, Hakamata Y, Sano M, Gamou S, Kosaki K, Fukuda K. Poor outcomes in carriers of the RNF213 variant (p.Arg4810Lys) with pulmonary arterial hypertension. *J Heart Lung Transplant.* 2020;39:103-112.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hiraide T, Kataoka M, Suzuki H, Aimi Y, Chiba T, Isobe S, Katsumata Y, Goto S, Kanekura K, Yamada Y, Moriyama H, Kitakata H, Endo J, Yuasa S, Arai Y, Hirose N, Satoh T, Hakamata Y, Sano M, Gamou S, Kosaki K, Fukuda K.	4. 巻 39
2. 論文標題 Poor outcomes in carriers of the RNF213 variant (p.Arg4810Lys) with pulmonary arterial hypertension.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Heart and Lung Transplantation	6. 最初と最後の頁 103-112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.healun.2019.08.022	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 -

1. 著者名 Hiraide T, Kataoka M, Suzuki H, Aimi Y, Chiba T, Kanekura K, Satoh T, Fukuda K, Gamou S, Kosaki K.	4. 巻 198
2. 論文標題 SOX17 Mutations in Japanese Patients with Pulmonary Arterial Hypertension	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine	6. 最初と最後の頁 1231-1233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1164/rccm.201804-0766LE	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 -

1. 著者名 Suzuki H, Kataoka M, Hiraide T, Aimi Y, Yamada Y, Katsumata Y, Chiba T, Kanekura K, Isobe S, Sato Y, Satoh T, Gamou S, Fukuda K, Kosaki K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Genomic Comparison With Supercentenarians Identifies RNF213 as a Risk Gene for Pulmonary Arterial Hypertension	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circulation: Genomic and Precision Medicine	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) 10.1161/CIRCGEN.118.002317	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 -

1. 著者名 Gamou S, Kataoka M, Aimi Y, Chiba T, Momose Y, Isobe S, Hirayama T, Yoshino H, Fukuda K, Satoh T.	4. 巻 94
2. 論文標題 Genetics in pulmonary arterial hypertension in a large homogeneous Japanese population.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Genetics	6. 最初と最後の頁 70-80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cge.13154.	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 -

1. 著者名 Kataoka M, Momose Y, Aimi Y, Fukuda K, Gamou S, Satoh T.	4. 巻 150
2. 論文標題 Familial Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension in a Pair of Japanese Brothers.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Chest	6. 最初と最後の頁 748-749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chest.2016.06.021	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 -

1. 著者名 Isobe S, Kataoka M, Aimi Y, Gamou S, Satoh T, Fukuda K.	4. 巻 193
2. 論文標題 Improved Survival of Patients with Pulmonary Arterial Hypertension with BMPR2 Mutations in the Last Decade.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Am J Respir Crit Care Med	6. 最初と最後の頁 1310-1314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1164/rccm.201601-0158LE	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7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 片岡雅晴
2. 発表標題 発症分子病態から迫る肺動脈性肺高血圧症治療の展望
3. 学会等名 第83回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片岡雅晴
2. 発表標題 肺高血圧症のバイオバンク構築と遺伝子診断体制の確立
3. 学会等名 第82回日本循環器学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片岡雅晴
2. 発表標題 肺高血圧症治療における肺移植の位置づけ-内科的立場から
3. 学会等名 第22回日本心不全学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片岡雅晴
2. 発表標題 成人期の特発性・遺伝性肺動脈性肺高血圧症-保因者家族を含めて
3. 学会等名 第4回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片岡雅晴
2. 発表標題 PAHの診断治療における遺伝子診断の意義
3. 学会等名 第4回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片岡雅晴
2. 発表標題 PH における遺伝子解析と臨床的知見の最前線
3. 学会等名 第2回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 片岡雅晴
2. 発表標題 遺伝学的に迫る肺高血圧症の最新知見
3. 学会等名 第1回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会
4. 発表年 2016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
--	---------------------------	-----------------------	----