

令和元年6月14日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05303

研究課題名(和文) 全国患者サンプルネットワーク構築を通じた肺高血圧症の病態解明と個別化医療の実現

研究課題名(英文) Elucidation of pathophysiology and realization of personalized medicine through construction of national patient sample network in pulmonary 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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：肺高血圧症について国内最大のサンプル収集を行い、サンガー法のみでなく、全エクソーム解析を含めて、詳細な遺伝子解析を実施した。その結果、BMP2に代表される肺高血圧症原因遺伝子の網羅的な解析、RNF213変異による日本人固有の病態集団の存在、日本人肺高血圧症原因遺伝子としてのSOX17変異の存在確認と先天性心疾患合併との関連性の確認、を行った。また、BMP2変異の有無による治療反応性や予後の相違については、肺高血圧症領域における個別化医療の実現に向けた大きな成果となった。研究期間内に5本の学術英文論文をまとめることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺高血圧症という難病希少疾患において国内最大のサンプル収集を達成したことは学術的な意義が高いと考える。また、従来は学術的に認識されていなかった、遺伝子変異の有無を背景とした治療応答性や予後の相違を論文報告したことは、この難病希少疾患における個別化医療の実現に向けた大きな成果と考える。また、本研究を通じて、欧米人患者では認めない、日本人患者に特徴的な遺伝学的背景による病態が存在することも解明できた。このことは、肺高血圧症に限らず、日本人患者の病態を解明するためには、日本人患者の検体を丁寧に収集することに高い意義があることを実証する成果であり、我が国における社会的意義も高いと考える。

研究成果の概要(英文)：We performed the largest sample collection in Japan for pulmonary hypertension, and conducted detailed genetic analysis including not only Sanger method but also whole exome analysis. In our study, comprehensive analysis for the pulmonary hypertension causative genes represented by BMP2 could be performed, the existence of the Japanese unique disease group by RNF213 mutation was confirmed, and the existence of SOX17 mutation as the Japanese pulmonary hypertension causative gene were identified. In addition, the difference in treatment response and prognosis depending on the presence or absence of the BMP2 mutation was a major achievement toward the realization of personalized medicine in pulmonary hypertension. We could publish 5 academic English papers within the study period.

研究分野：循環器病学

キーワード：肺高血圧症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

肺動脈性肺高血圧 (Pulmonary Arterial Hypertension、以下 PAH) は肺高血圧症 (Pulmonary Hypertension、以下 PH) の中でもっとも典型的な臨床像を呈する疾患群である。主に思春期以降の女性、妊娠出産を契機として発症し予後不良、国内認定患者約 3,500 人の希少疾患であり、指定難病でもある。PAH は病因などにより、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、「特に原因となる疾患の存在を指摘することができない特発性 PAH (idiopathic PAH、以下 IPAH)」等に細分類される。

2000 年に染色体 2q33 に存在する<sup>2</sup>型骨形成タンパク受容体 (Bone Morphogenetic Protein Receptor 2、以下 BMPR2) 遺伝子<sup>2</sup>の変異が家族性 PAH 症例で発見され、これを端緒に BMPR2 遺伝子の変異の検索が広汎に進められた。また 2001 年には BMPR2 遺伝子と同じ TGFβ スーパーファミリーに属する ACVRL1 遺伝子や ENG 遺伝子、さらに幾つかの遺伝子にも変異が存在する例も発見された。これらの成果を踏まえて「遺伝性 PAH (heritable PAH、以下 HPAH)」という呼称が提唱された。現在、HPAH は IPAH と臨床診断された例で BMPR2 遺伝子に変異を持つことが確認された例(1.2.1) (「肺高血圧症治療ガイドライン (2017 年改訂版)」9 頁表 4「再改定版肺高血圧症臨床分類 (ニース分類[2013 年])」の分類項目番号) ACVRL1・ENG・SMAD9・CAV1・KCNK3 遺伝子に変異を持つことが確認された例(1.2.2)、または家族性だが原因となると遺伝子の変異が未確認の PAH 例(1.2.3)と定義されており、その原因遺伝子の究明が喫緊の課題であった。

我々は杏林大学において PAH の臨床に一貫して従事し、東日本における最大の PAH 治療拠点病院として、PAH 患者 300 人以上の加療を行っていた。2009 年より、倫理委員会の承認を得て、学内の競争的研究資金さらに文部科学省科学研究費により PAH 遺伝子解析プロジェクトを発足させ、BMPR2 遺伝子のコーディングエキソンを PCR 増幅しサンガー法によるダイレクトシーケンスを行う方法(PCR-DS 法)による遺伝子変異解析系、またエキソン欠失に注目して、Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法による解析を進めてきた。

## 2. 研究の目的

上述のように IPAH の全例を BMPR2 遺伝子の変異で説明することは困難である。PAH の臨床、極めて重要な課題として、BMPR2 遺伝子変異が存在しても発症しない人がおり、その発症は遺伝的要因のみならず妊娠・出産を含む生活史、喫煙等の嗜好を含む生活習慣や感染等の外的要因にも大きく依存する事も知られている。血縁親族に PAH 患者が存在し自身が BMPR2 遺伝子変異を持つが PAH を発症していない人では、今後自身が発症する可能性があるのか、なぜ発症していないのか、等の疑問が生じる。PAH 発症は結婚や子供などの人生設計へも強く影響する。BMPR2 遺伝子変異の有無を検査することはそれほど困難ではないが、それゆえ患者およびその家族は、遺伝子変異の検査結果に左右され、精神的にも人生設計の面でも、多くの影響を受ける可能性がある。

現在次世代シーケンサーによるより広範囲に遺伝子変異の検索が急速に普及しつつある。我々は今までの蓄積により、10 例以上の FPAH を解析してきた。これらの家系試料のゲノム解析により、さらに多くの新知見が期待でき、その遺伝的要因とさらに発症に至る背景要因の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

主に患者末梢血を材料に BMPR2 遺伝子のコーディングエキソンを PCR 増幅しサンガー法によるダイレクトシーケンスを行う方法(PCR-DS 法)による遺伝子変異解析、エキソン欠失と重複に注目した Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法による解析を実施した。

また、次世代シーケンサーによる全エキソーム解析を実施した。これは SureSelectXT Human All Exon Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)を用いてエキソン抽出と増幅を行い、HiSeq2500 で解析した。

PCR-DS 法による解析に用いた試料は IPA75 症例を含む約 350 症例である。このうち PH の I 群 200 症例を中心に全エキソーム解析を実施した。

### 4. 研究成果

#### BMPR2 遺伝子の変異

PCR-DS 法で解析した約 350 症例中、BMPR2 遺伝子に変異を見出したのは 39 症例である。海外では「BMPR2 遺伝子の変異は家族歴のある PAH のうち 80%以上、孤発性 sporadic の症例の約 20%」<sup>3)</sup>と記載されることが多く、I 群中の頻度(約 200 症例中 39 例)としてよく一致する。

また、IPA75 が HPAH の約 2 倍程度存在する点、BMPR2 に変異が観察できない遺伝性症例が HPAH の 1 割程度存在する点も一致している。我々の場合は第 1 群と診断され家族歴が無い孤発例で、同意が得られた場合に上記の遺伝子解析を実施し分類を確定させた。

BMPR2 遺伝子の変異の中には、エキソンの欠失や重複に至る数百塩基対から数十万塩基対に及ぶ欠失や重複が含まれる。エキソン欠失や重複は BMPR2 遺伝子変異全体の約 2 割程度(42 例中 9 例)で、この頻度も海外の報告とよく一致する。その切断・再結合(組換え)部位の解析から *Alu* 反復配列が関与する非相同組換え *Alu*-mediated Nonhomologous Recombination が多いが、*Alu* 配列が関与しない非相同組換えも存在する事、少なくとも我々の症例ではその組換え部位がすべて異なる事を明らかにし、エキソン欠失・重複がそれぞれの症例にユニークである事を強く示唆した。この欠失・重複はコピー数変異 Copy Number Variation (CNV) とも呼ばれ、検出するためには MLPA 法が有効である。

BMPR2 遺伝子変異の中には新生突然変異(患者には変異が存在するが両親には変異が見られない例)が、13 家系中 3 家系に見られた。この頻度は他の遺伝性疾患における既知の新生突然変異率の範囲内と考える。

また我々が見出した BMPR2 遺伝子変異の約半数は以前に報告されて

いないユニークな変異である。PAH と BMPR2 の関連を見出した英国のグループは欧米を中心に PAH コンソーシアムを形成し彼らが経験した BMPR2 遺伝子上の変異の最新の状況を定期的に総説論文として報告している。報告毎に症例数、BMPR2 遺伝子の変異の数は増加する。世界中で繰り返し見出されるが機能ドメイン外で作用機序不明の Hot Spot

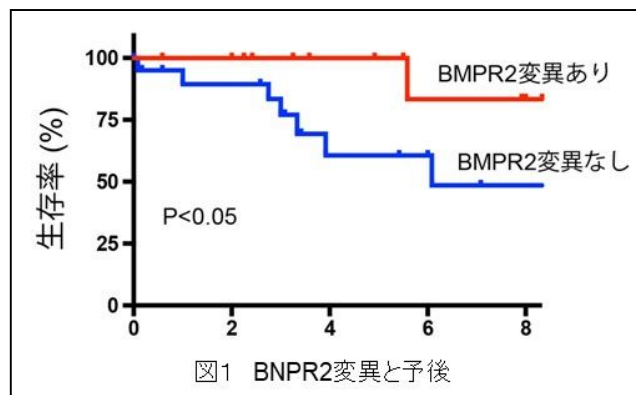


図1 BMPR2変異と予後

変異 R899X に代表されるような再発性 recurrent 変異と単独の論文でしか報告されていないユニーク変異に分類すると、全体としてユニーク変異が多い。

エキソン欠失はほぼユニークな変異である事、BMPR2 遺伝子の変異には両親の配偶子レベルで生じた新生変異 de novo mutation が相当の頻度で含まれる事、我々の症例の半数がユニーク変異であり年々ユニークな変異が増加する事等、BMPR2 遺伝子の変異が数世代での消失と新生を繰り返す事を示唆している。

また、我々は、日本人患者においては、特に重症化しプロスタグランジン(PGI<sub>2</sub>)製剤の持続投与が必要となった患者で、BMPR2 変異を有する患者のほうが予後良好であることを報告した。BMPR2 変異の有無を判定することは、HPAH か IPAH かの診断のみでなく、PGI<sub>2</sub> 製剤をどのような患者群ではより積極的に考慮すべきかを示唆する一助となると思われる(図1)。

### その他に遺伝子変異

BMPR2 遺伝子に続き同じ TGFβ スーパーファミリーに属する ACVRL1 遺伝子や ENG 遺伝子、BMPR2 タンパクの細胞内情報伝達因子の SMAD1、SMAD4、SMAD9、さらに細胞膜陥入構造カベオラの構造タンパクである CAV1、K<sup>+</sup>チャネルの一つである

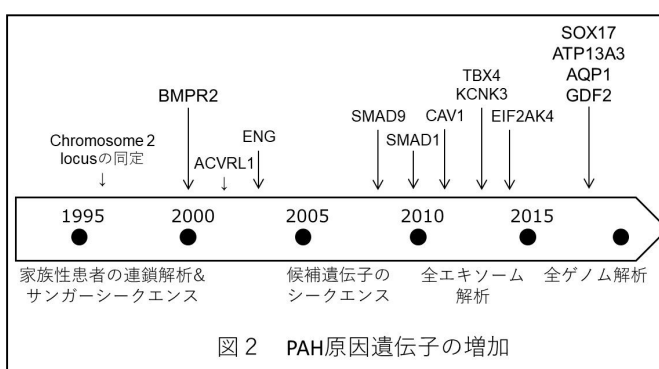


図2 PAH原因遺伝子の増加

KCNK3 遺伝子等が HPAH の原因遺伝子として報告されてきた。ACVRL1 遺伝子と ENG 遺伝子はそれぞれオスラー病(Osler-Weber- Rendu 症候群: 遺伝性出血性末梢血管拡張症)の原因遺伝子としても知られている(図2)。これらは確かに PAH 症例で少数に検出されるが、BMPR2 変異に比べその頻度は低い。我々は当初、BMPR2 に加え ACVRL1 と ENG の PCR-DS 法により解析してきたが、少なくとも 200 症例解析の時点で有意な変異を見出しえなかった為に中断し、またその時点で原因遺伝子は少なくとも 9 個、その中の EIF2AK4 は 38 エキソンに跨る遺伝子でその全てのエキソンの変異解析を従来の PCR-DS 法で行なうのは非効率的である為、BMPR2 変異の有無にかかわらず HPAH と IPAH の約 200 症例の全エキソーム解析による網羅的な解析に変換した。

2018 年、Gräf 他が Nature Communication 誌<sup>3)</sup>に約 1000 名の欧米患者集団を対象とし次世代型シーケンスによる全ゲノム解析の研究成果を報告した。英国を中心とする PAH コンソーシアムによる報告である。我々は BMPR2 遺伝子変異の発見者で PAH コンソーシアムの創立者の一人である英国 King's College London の Dr. Trembath から Gräf 論文の発表前に情報提供を受け、その結果を我々の試料において検証した。

Gräf 論文では、BMPR2 遺伝子に関し従来の方法による成果とよく一致する。また、既報の PAH 関連の遺伝子の変異も従来の報告とよく一致する頻度で検出している。これに加え Gräf 論文は、GDF2、ATP13A3、AQP1、SOX17 の 4 遺伝子を PAH の新規原因遺伝子として追加した。

我々は日本人 PAH 患者 140 名と患者の健常家族を含めた全エキソームデータを精査し、患者 4 名と未発症家族 1 名に SOX17 変異を見出した。この 5 名には PAH の発症原因遺伝子として報告されている BMPR2 や ACVRL1、ENG、CAV-1、KCNK3、EIF2AK4、

AQP1、SMADs の変異はいずれも認めない。SOX17 (SRY-related HMG-box 17)は胎児期の形態形成や血管新生に關与する転写因子である。4 名の患者は肺血管拡張薬の多剤併用療法への治療反応性が乏しく、剖検例では Heath-Edwards 5 度の重症 PAH を認めた。また 3 名の患者には心房中隔欠損または卵円孔開存を認め、SOX17 遺伝子変異と先天性心疾患との関連性も示唆された。PAH 患者に認める SOX17 遺伝子変異の多くは、SOX17 の DNA 結合部位である high-morbidity group box 領域に集積しており、これは Gräf 論文とよく一致し、PAH 発症の hot-spot と考えられた。この 4 名のうち 2 名は親子(母と息子)の家族性発症例である。

さらに、我々は、エキソームデータを精査する中で、日本人の約 1%に見出されまた脳血管疾患のモヤモヤ病患者の 80-90%に見出される RNF213 遺伝子の多型変異 R4910K が、IPAH 患者の 10%の高頻度で見出される事、加えて RNF213 の病原性が予測される変異 8 種を含め 15 種の変異が見出される事、RNF213 遺伝子と BMPR2 遺伝子の変異の重複症例も存在する事、これらの変異を持つ PAH の一群は重症である事を見出した。この発見は PAH の発症や予後には原因遺伝子 BMPR2 の変異と生理的要因

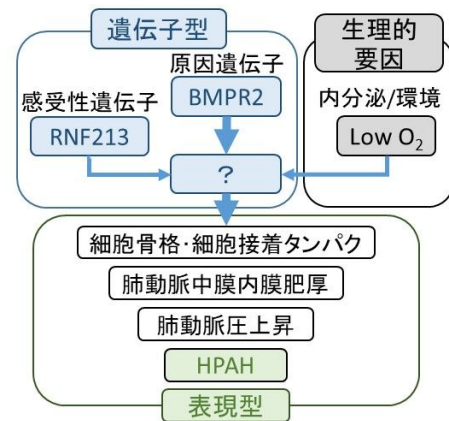


図3 PAH発症の三要因

に加えて血管疾患共通の感受性遺伝子が存在する可能性(感受性遺伝子仮説)を示唆している(図3)。RNF213 変異は、日本人を含む東アジア人に頻度が多いが欧米では頻度も少ないために Gräf 論文では報告されていないものと思われる。我々は、RNF213 変異を有する親子で母が PAH で次女がもやもや病という家系も経験した。RNF213 変異によって肺や脳という異なる臓器に難治性血管病を発症するメカニズムや日本人患者での浸透率の解明が今後の課題である。

ヒトゲノム解析以降、遺伝性疾患の多くで原因遺伝子が特定され、また従来は遺伝性が明瞭でなかった疾患においても多くの「原因遺伝子」が特定されてきた。しかしながら、新生児期や小児期に発症する古典的なメンデル遺伝病とは異なり、PAH を含めて成人期に発症する疾患においては、遺伝子内の変異も多様であること、多くの原因遺伝子があることを含めて疾患原因の遺伝的多様性 genetic heterogeneity が明らかにされつつある。さらに日常のライフスタイルと生活習慣、生活環境、生育環境を含めた長期的な生活史等の環境要因が遺伝的背景と複雑に相互作用する。治療応答性については BMPR2 とそれ以降の分子機構の多岐性・重層性に加えて薬物代謝系を含めた遺伝的・生理的な個人差を考慮する必要がある。また、原因遺伝子 pathogenic/causative gene に加えて感受性遺伝子 susceptible gene や素因遺伝子 predisposition gene と呼ばれる群の遺伝子が現実の解析の対象となりつつある。遺伝子の変異を根底には持つが様々な要因により発症率が変化する疾患とし捉える必要がある。原因遺伝子とされているものは複雑な疾病発症機構の一部にしか過ぎず、発症に至る過程を詳細に解き明かしていくことで新しい発症抑制や治療の戦略が見出せるであろう。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. 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. (査読有)
2. Hiraide T, Kataoka M, Suzuki H, Aimi Y, Chiba T, Kanekura K, Satoh T, Fukuda K, Gamou S, Kosaki K. Pulmonary arterial hypertension with *SOX17* mutations in Japanese. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;198:1231-1233. (査読有)
  3. Gamou S, Kataoka M, Aimi Y, Chiba T, Momose Y, Isobe S, Hirayama T, Yoshino H, Fukuda K, Satoh T. Genetics in pulmonary arterial hypertension in a large homogeneous Japanese population. *Clin Genet*. 2018;94:70-80. (査読有)
  4. 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)
  5. Isobe S, Kataoka M, Aimi Y, Gamou S, Satoh T, Fukuda K. Improved survival of patients with pulmonary arterial hypertension with *BMP2* mutations in the last decade. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;193:1310-1314. (査読有)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：蒲生 忍

ローマ字氏名：Shinobu Gamou

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：医学部

職名：訪問教授

研究者番号(8桁)：90122308

研究分担者氏名：吉野 秀朗

ローマ字氏名：Hideaki Yoshino

所属研究機関名：杏林大学

部局名：医学部

職名：特任教授

研究者番号(8桁)：90129734

研究分担者氏名：片岡 雅晴

ローマ字氏名：Masaharu Kataoka

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：20445208

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：福田 恵一

ローマ字氏名：Keiichi Fukuda

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。