

令和元年6月20日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19424

研究課題名(和文)日本最大検体数による難病疾患肺高血圧症原因遺伝子BMP2未解明変異への挑戦

研究課題名(英文)The unidentified mutation of BMP2 gene using large number of Japanese patient with intractable pulmonary hypertension

研究代表者

相見 祐輝(Aimi, Yuki)

杏林大学・医学部・特任助教

研究者番号：60749696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、難病疾患である肺動脈性肺高血圧症(PAH)の病態機序解明の一環として、未解明のBMP2遺伝子変異へ挑戦した。BMP2遺伝子のイントロン構造を決定する方法とスプライシングバリエーションを探索するRT-MLPA法を確立した。確立したRT-MLPA法と全エクソーム解析を実施し、イントロン3内に潜在的なエクソンを見出した。また低発現ではあるが、潜在的なエクソンを有したスプライシングバリエーションを見出した。見出したスプライシングバリエーションが機能的な意義は不明であるが、潜在的なエクソン領域の変異解析を行うことで新たな知見を得る可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

他の多くの遺伝性疾患において遺伝子からタンパク質が作られる際に生じる異常が多数報告されているが、肺動脈性肺高血圧症(PAH)では少数報告されているに留まる。本研究は、PAH発症に関わる原因遺伝子BMP2の潜在的な異常を明らかにするのみならず、より正確で早期の診断や予後予測への発展が期待でき、未知の発症原因の究明に取り組むことが長期的な展望において医療への貢献および医療費削減につながる。

研究成果の概要(英文)：Using large number of samples of Japanese patient with pulmonary arterial hypertension (PAH), I established a method both to define intron structure with restriction digest after amplify the full length with Long PCR in BMP2 gene and to search for splicing variants with RT-MLPA. By both of established RT-MLPA method and whole exome sequencing, a hidden exon in intron 3 region was identified. Splicing variants including hidden exon was identified by RT-PCR, although it expressed in low level. Although the function of identified splicing variant is unknown, there is a possibility to gain new knowledge by analyzing hidden exon region using more large number of samples.

研究分野：循環器病学

キーワード：肺動脈性肺高血圧症 スプライシング変異

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、肺動脈内膜や中膜の肥厚を原因に肺動脈圧の上昇、右心不全を起こす生命予後不良の難治性疾患である。PAH は病因などにより、膠原病や先天性心疾患に伴うもの、HIV 感染や薬物誘発性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)」等に分類される。PAH では 2000 年に染色体 2q33 に存在する "2 型骨形成タンパク受容体 (Bone Morphogenetic Protein Receptor 2、以下 BMPR2) 遺伝子" の変異が家族性 PAH (Familial PAH、以下 FPAH) 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。

杏林大学病院循環器内科では 2009 年より PAH 遺伝子解析プロジェクトを発足させ、以下の幾つかの成果を報告した。

(1) 約 230 名の同意を得て BMPR2 全エクソンを PCR ダイレクトシーケンス解析、MLPA 解析を行い、FPAH の約 80%、IPAH の約 25% に BMPR2 変異を見出した。

(2) Exon 欠失では Alu 配列介在非対立遺伝子間相同組換と非相同組換の機構を明らかにした。さらに、Alu 配列非介在相同組換機構が存在することを見出した。

(3) 集積した患者および家族検体から BMPR2 全変異のうち 3 例が de novo 変異であることを明らかにした。

これまでの解析成果は、BMPR2 以外の原因遺伝子の存在の可能性に加え、BMPR2 エクソンに変異を認めないにもかかわらず、その発現量が末梢リンパ球で低下している多くの症例が存在する。エクソン-イントロン接合部、イントロン内 splicing 制御部の変異による Splicing 異常はナンセンス変異に帰着し、その mRNA は Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD) により迅速に分解される (Annu Rev Genet. 2013;47:139)。大半の splicing 変異 mRNA が NMD で分解され、正常の受容体タンパクの半減が発症の十分条件 (Haplo Insufficient, HI 効果) と示唆される。他の多くの遺伝性疾患においてイントロン内の変異に起因する splicing 変異が多数報告されているが、PAH では我々の二症例を含めエクソン-イントロン接合部での変異が少数報告されているに留まる。

2. 研究の目的

PAH ではその患者の約三分の一に BMPR2 遺伝子のエクソン点突然変異や欠失が検出される事を示してきたが、BMPR2 変異陰性にもかかわらず末梢リンパ球 mRNA 量の減少がしばしば観察される。これは BMPR2 に未だに未解明の変異が残されている可能性を示している。他の多くの遺伝性疾患に見られるようにイントロン内の点変異/欠失/重複/転座に起因する splicing 変異、または Epigenetic な変化による splice variant の増加により NMD が発動していると推測する。本研究では PAH での Splicing 変異 NMD 仮説を、進行中の全ゲノム解析の結果を踏まえ、欠失/重複/転座を検出する解析法等を確立し、未解明変異制御機構に迫ることを目指した。本研究により PAH 発症に関わる潜在する BMPR2 変異を明らかにするのみならず、より正確で早期の診断や予後予測への発展が期待できる。

3. 研究の方法

(1) イントロン内の点変異/欠失/重複/転座を検出法

イントロン内の点変異/欠失/重複/転座の解析は、Long アンプリコン制限酵素地図解析の確立に取り組んだ。Long アンプリコン用の PCR プライマーは、Primer3 web version 0.4.0 を使用し、プライマーサイズ 24-35mer、プライマー Tm は 68.0 ± 0.5 以内、アンプリコンサイズは約 10kb で設計した。Long アンプリコンは PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase を用いて標準的な反応条件で増幅した。制限酵素地図は 2-3 種の制限酵素でアンプリコンを消化し、アガロースゲル電気泳動で断片の大きさを in silico による断片長予測と比較する。

(2) Splicing variant 探索

Splicing variant を検出する解析は、RT-MLPA 解析に取り組んだ。RT-MLPA 解析は、PrimeScript™ Double Strand cDNA Synthesis Kit で 2 本鎖 cDNA を合成し、2 本鎖 cDNA を鋳型に MLPA 解析を試みた。Splicing variant が疑われるものについては、RT-PCR で増幅を試み、シーケンス解析で同定した。

4. 研究成果

(1) イントロン内の点変異/欠失/重複/転座を検出法

13 領域のコーディングエクソンを含む全長約 20 万塩基の BMPR2 遺伝子のイントロン領域は約 18 万塩基であり BMPR2 遺伝子全長の 90% を占める。またイントロン内には Copy Number Variation として幾つかの報告がある。イントロン内の欠失/重複の有無を検出するために約 10kb でカバーする Long PCR を確立した。2009 年より行っている BMPR2 エクソン変異解析で蓄積した結果からエクソン 12 に一般的に認められる SNP を対象に Long アンプリコン制限酵素地図解析の実証実験を試みた。実証実験から Long アンプリコン内にある多様性は複数の制限酵素を組み合わせることで検出が容易となること、特別な機器を用いなくてもイントロン内に潜在する欠失/重複の解析に有効であることが示された。

(2) スプライシングバリエーション探索

BMP2 遺伝子エクソンに変異を認められた 20 例の末梢血試料から RNA 抽出、RT-PCR を行いシーケンシング解析によりスプライシングバリエーションの有無を検証した。20 例の変異内訳は、ナンセンス変異 8 例、ミスセンス変異 3 例、フレームシフト変異 3 例、エクソン欠失 3 例、エクソンイントロン接合部の変異 3 例である。ナンセンス変異 8 例のうち 3 例で変異を有するバリエーションが検出困難であり NMD により mRNA が分解されたと考えられる。解析した残り 17 例では変異を有するバリエーションが検出された。またエクソンがスキップするバリエーションが生じると考えられるエクソンイントロン接合部およびエクソン欠失症例では 1 例を除きスプライシングバリエーションを認めた。以上のことから、遺伝学的な変異を有する症例の多くはその末梢血試料で異常な mRNA が検出できると考えられる。

スプライシング変異により生じるバリエーションは一般的にエクソンがスキップする。イントロン内の点変異/欠失/重複/転座に起因するスプライシング変異が生じると隣接するエクソンがスキップすると考えられる。しかし、各エクソンを対象にそれぞれ定性・定量解析を行うのは可能ではあるが効率的ではない。エクソンの欠失/重複を解析する MLPA 法を cDNA に用いることで全エクソンの発現定量が可能な RT-MLPA 解析を確立した。上記の検討に用いたエクソン欠失 3 例とエクソンイントロン接合部の変異 2 例、PAH 非疾病 4 例で検証し、RT-PCR と再現性のある結果を得た。この方法は qRT-PCR 定量解析よりもはるかに少ない検体量で解析可能であり、PAH に限らず、他の疾患での発現解析に有効である。また興味深いことに意義は明らかではないがエクソン 1 からエクソン 3 までが他のエクソンよりも発現量が高い結果を得ており、イントロン 3 内に潜在的なエクソンの存在が示唆された。

潜在的なエクソンの探索は次世代シーケンサー (NGS) による全エクソーム解析結果からエクソンを推定してプライマーを設計し RT-PCR により検証した。その結果、低発現ながらイントロン 3 内に潜在的なエクソンを有したスプライシングバリエーションを見出した。見出したスプライシングバリエーションが機能的にどのような意義があるかは不明であるが、潜在的なエクソン領域の変異解析を行うことで病態解明に新たな知見を得る可能性がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

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 Jul;94(1):70-80.(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)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。