

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09513

研究課題名(和文)次世代シーケンサーによる家族性肺高血圧症の遺伝子解析：特発性肺高血圧症の機序解明

研究課題名(英文)Genetic analysis of familial pulmonary hypertension with the next generation DNA sequencer

研究代表者

窪田 佳代子(Kubota, Kayoko)

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師

研究者番号：50709863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は同意を得られた8名の検体と既に死亡している2名の病理組織を用いて異なる2つのシーケンサーを用いて解析を行なった。

最終的に発症者を含む6名から既存のBMPR2遺伝子が検出された。しかしBMPR2遺伝子は父系から受け継がれたと想定されるなか、母系にも発症者がいることから、BMPR2遺伝子に加え別の病因関連遺伝子が関与していることが推察され、現在ZNF717, MUB5B遺伝子等の絞り込みを行ない関連性を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存の肺高血圧症における疾患関連遺伝子は浸透率が低く、発症には環境因子等複数の要因が関与していると考えられている。本家系は既存のBMPR2遺伝子だけでなく他の遺伝子変異が関与している可能性が高い。また特定に至っていないが、本家系における疾患関連遺伝子が明らかにすることは、特発性肺高血圧症の発症機序や病態の解明に非常に役立つことが予想される。

研究成果の概要(英文)：Proband and families were identified in Kagoshima University Hospital. We have used whole exome sequencing to document known and/or novel mutations in genes that could explain the underlying phenotype.

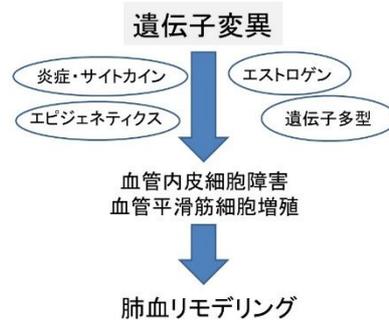
BMPR2 mutations were detected in 6 out of 11 including proband. However, BMPR2 mutations alone could not explain the inheritance of these patients. Therefore, we are investigating the association of other gene mutations.

研究分野：肺循環

キーワード：肺高血圧 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

特発性肺高血圧症は原因不明の難治性疾患であるが、以前より一部に家族歴を認めることから、遺伝的要因が発症に関与していると考えられてきた。BMPR2 や同じ TGF- スーパーファミリーに属する ACVRL-1、Endoglin、Smad-9 が同定されている。しかし家族発症の肺高血圧症は実際遺伝子異常を有していても、浸透率が低く約 20%と報告されていることから (Machado RD, et al. J Am Coll Cardiol 2009)、現在肺高血圧発症には遺伝子異常をベースに何らかの病態修飾遺伝子や環境因子といったいくつかの刺激が加わる “Multiple hits theory” が提唱されている(右図)。我々は高い浸透率で肺高血圧症を発症している一家系を経験した。既存の報告と比較して浸透率が高く、本家系の発症には未知の疾患関連遺伝子が関与している可能性が高いと推察される。既存の報告より浸透率が高い本家系の詳細な遺伝子解析を行うことは、難病かつ稀少疾患である肺高血圧症の病態解明に非常に有用と考える。



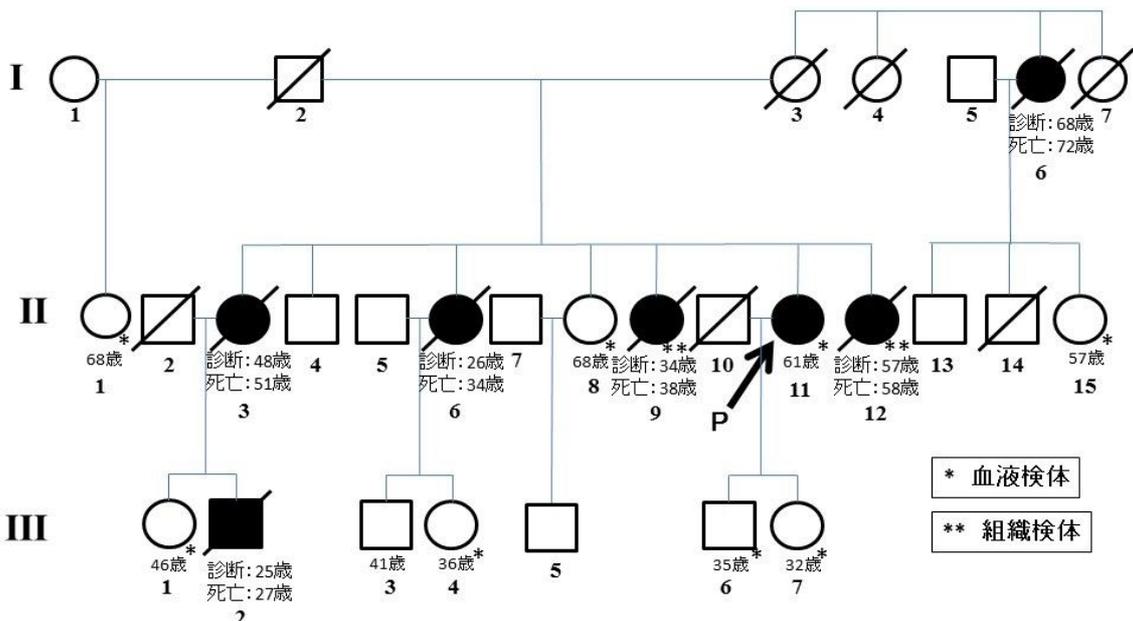
2. 研究の目的

本研究の目的は、明らかに浸透率の高い肺高血圧症の一家系に対し、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を行うことで、肺高血圧症の新規原因遺伝子を解明することである。

3. 研究の方法

同意を得られた 9 名の検体 (-1, -8, -11, -15, -1, -4, -6, -7) と既に死亡している 2 名の病理組織 (-9, -12) を用い、鹿児島大学と大阪大学医学部医化学講座の異なる 2 つの次世代シーケンサーを用いて解析を行なった。鹿児島大学では、PureLink® Genomic DNA Mini Kit を用いて末梢血単核球からゲノム DNA を抽出し Ion Ampliseq Library Kit Plus を用いてエクソーム解析用の DNA ライブラリーを作成し Ion Chef システムを用いてプレート増幅とチップローディングを行い Ion proton を用いてエクソンシーケンスを行なった。Variant caller を通して得られたデータは次世代シーケンサー Web 解析システム Cloud Exome SNV screening system を用いて解析した。大阪大学ではゲノム DNA を数百 bp に物理的に断片化を行い二本鎖 DNA の両末端に異なるタグ配列を有するアダプターを付加した DNA ライブラリーを作製、ターゲット領域の濃縮は SureSelect Human All Exon V6 およびリキッドハンドリングシステム BRAVO 等を用いて行った。タグ付き濃縮 DNA ライブラリーを混合し 1 つのシーケンスライブラリーとして作製したシーケンスライブラリーについて次世代シーケンサー HiSeq を用いて両末端シーケンスを行った。

【家系図】

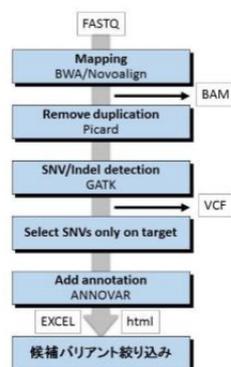


## 【鹿児島大学遺伝子解析】

### 次世代シーケンサ (Ion torrent) ワークフロー



## 【大阪大学遺伝子解析】



発症後死亡者 2 名 ( -9, -12) に関しては、ホルマリン固定パラフィン包埋切片よりゲノム DNA を抽出し、ターゲットシーケンスで validation を行い、絞り込んだ候補遺伝子の更なる絞り込みを行なった。

## 4. 研究成果

病理組織の保存状態が不良であったため、解析に非常に時間を要した。現段階で発症者を含む 5 名 ( -1, -11, -1, -6, -7) と既に死亡している同疾患 1 名 ( -9) から既存の BMPR2 遺伝子が検出された。しかし BMPR2 が父系から受け継がれたと想定されるなか、母系にも発症者がいることや既に死亡している同疾患症例から BMPR2 が検出されなかったことから、BMPR2 に加え別の病因関連遺伝子が関与していると推察された。現在 ZNF717, MUB5B 等病因関連遺伝子の絞り込みを行い関連性を検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	大石 充  (Ohishi Mitsuru)  (50335345)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授   (17701)	
研究分担者	池田 義之  (Ikeda Yoshiyuki)  (00573023)	鹿児島大学・医歯学域医学系・講師   (17701)	
研究分担者	吉満 誠  (Yoshimitsu Makoto)  (70404530)	鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授   (17701)	
研究分担者	朝野 仁裕  (Asano Yoshihiro)  (60527670)	大阪大学・医学系研究科・講師   (14401)	