

令和元年6月4日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15772

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いた家族性肥大型心筋症の新たな病態発症メカニズムの解明

研究課題名(英文)Deciphering Novel Disease Mechanism in Familial Hypertrophic Cardiomyopathy

研究代表者

野村 章洋(Nomura, Akihiro)

金沢大学・附属病院・特任助教

研究者番号：30707542

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)：本研究は、これまで原因遺伝子変異が不明であった肥大型心筋症患者に対し、DNAおよびRNAシーケンスを組み合わせることで、新たな肥大型心筋症の疾患発症機序を解明することを目的とした。

本研究において、微小心筋生検検体より効率的にRNAを抽出し発現解析を行う方法を樹立した。肥大型心筋症8名において同方法を用いた解析を行ったが、今回の検討では明らかなスプライス変異・異常に伴う肥大型心筋症発症機序を証明できなかった。今後、解析対象となる肥大型心筋症患者を数十から数百に増やして、同様の検討を続けたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、臨床的に行われている心筋生検の検体から、効率的にメッセンジャーRNAを抽出し、解析ができるスキームを樹立できた。本研究で用いた8名の肥大型心筋症の検討のみでは、当初期待していたスプライス変異を機序とした肥大型心筋症の発症の証明には至らなかった。しかし、今後はその解析対象および人数を増やすことで、将来的には同機序を発症原因とした心筋症を見つけうるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate a novel pathogenesis mechanism of hypertrophic cardiomyopathy (HCM) by omics analyses combining DNA- and RNA-sequences in patients whose causal genetic mutations had not yet detected.

In this study, we established a method to extract messenger RNAs from micro myocardial biopsy specimens. I applied this method with omics approach (combining DNA and RNA sequencing data together) to eight patients with HCM. However, we could not prove the novel mechanism of HCM with regard to splice variants that altered the targeted gene expression. I will increase the number of HCM participants applying this method to detect the splice altering variant-induced HCM.

研究分野：循環器内科学

キーワード：肥大型心筋症 次世代シーケンサー ゲノム オミックス解析

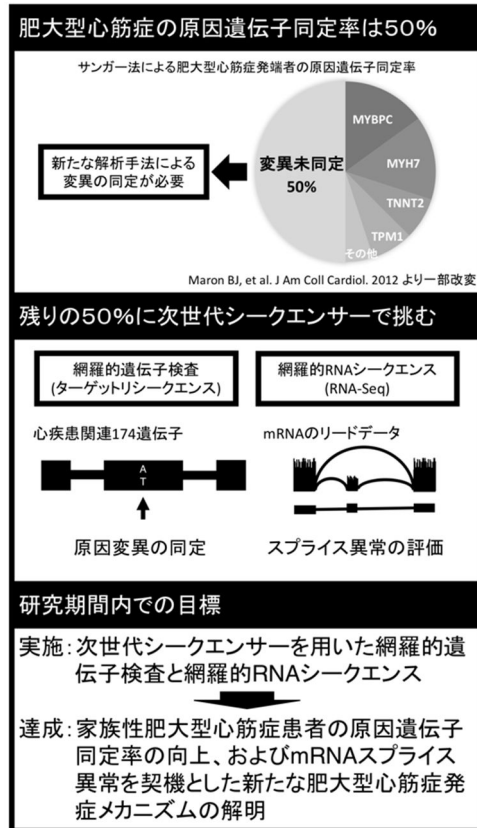
1. 研究開始当初の背景

肥大型心筋症は、幼小児期より心臓突然死を発症しうる特発性心疾患であり、若年者突然死の原因として最も頻度が高い。そのため、早期発見・早期治療は突然死を予防する上で重要な課題である。1990年に最初の肥大型心筋症の原因遺伝子(心筋βミオシン重鎖遺伝子, MYH7)が報告されて以来、世界中で原因遺伝子が検索され、心筋サルコメアをコードする遺伝子を中心に10種類以上の遺伝子領域が肥大型心筋症の原因遺伝子として報告されてきた。申請者の研究グループでも以前より肥大型心筋症の遺伝子検査および原因変異の同定を積極的に行い、心筋トロポニンI遺伝子、心筋トロポニンT遺伝子など肥大型心筋症の発症に重要な原因遺伝子の変異と表現型との関係を詳細に検討してきた。また、刺激伝導系障害を伴う心筋症の原因遺伝子を特定し、変異保因者に対して早期にペースメーカーまたは植込型除細動器(ICD)治療を行うことにより、心臓突然死を予防できる可能性を示した。さらに、肥大型心筋症の発症に最も寄与する遺伝子のひとつであるミオシン結合蛋白C遺伝子に関して、非ミオシン結合蛋白C遺伝子変異保因者は左室収縮不全合併の危険性が高いことを予測できることを示した。このような申請者の研究グループ内研究成果に基づき、肥大型心筋症における原因遺伝子変異の同定は、表現系の種類や予後に密接に関係している可能性が示唆され、原因遺伝子変異未同定の肥大型心筋症患者に対する遺伝子変異の同定が急務であると考えた。

これまで、サンガー法(直接法)による網羅的な原因遺伝子変異解析を行うことで、家族性肥大型心筋症家系の約50%において既知原因遺伝子内に変異が同定され、肥大型心筋症の診断に貢献してきた。しかし、残りの50%においては既知原因遺伝子内に変異が認められず、その肥大型心筋症発症を説明できる遺伝子変異およびメカニズムは未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究では、これまで原因遺伝子変異が不明であった肥大型心筋症患者に対し、血液(白血球)から抽出したDNAシーケンスの結果に加え、心筋生検から取得した心筋試料を用いたRNAシーケンスを併用することで、新たな肥大型心筋症の遺伝子変異およびスプライス変異・異常を呈する肥大型心筋症の疾患発症機序を解明することを目的とした。



さらに、肥大型心筋症の発症に最も寄与する遺伝子のひとつであるミオシン結合蛋白C遺伝子に関して、非ミオシン結合蛋白C遺伝子変異保因者は左室収縮不全合併の危険性が高いことを予測できることを示した。このような申請者の研究グループ内研究成果に基づき、肥大型心筋症における原因遺伝子変異の同定は、表現系の種類や予後に密接に関係している可能性が示唆され、原因遺伝子変異未同定の肥大型心筋症患者に対する遺伝子変異の同定が急務であると考えた。

3. 研究の方法

これまで遺伝子解析にて原因変異が同定されなかった家族性肥大型心筋症発端者 8 名に対し、心筋生検標本を用いた網羅的 RNA シークエンス(トランスクリプトーム解析)を行う。RNA シークエンスは、心筋生検の検体量が少量(約 1mm × 1mm)であることを考慮し、少量でもシークエンスが可能な NuGEN 社の Ovation® SoLo RNA-Seq システムを用いる。なお、生物学的反復(biological replication)を担保し解析の精度を上げるために、最低 8 検体の解析が必要である。発端者から採取した心筋生検検体を用い、mRNA を精製したのち PCR にて増幅を行う。標的となる遺伝子領域の mRNA を捕捉し、最終的に RNA ライブラリを作成する。完成した RNA ライブラリはイルミナ社 HiSeq で解析を行う。

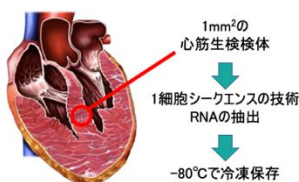
・原因遺伝子変異の解析方法

シークエンスにより得られた DNA リードデータのアライメントは、Burrows-Wheeler Aligner、Picard および Genome Analysis Toolkit (GATK)を用い標準的プロトコールに沿って行う。変異コールは GATK HaplotypeCaller を用いる。各変異のクオリティは Variant Quality Score Recalibration(VQSR)を用いて評価し、一塩基変異は 99.6%、挿入・欠失変異は 95%をカットオフ値とする。クオリティコントロールを通過後、人種毎のエクソーム解析データ・変異頻度を一般公開している gnomAD のデータをもとに、東アジア人における変異の頻度が 0.1%未満のものを疾患候補変異として抽出する。これは、肥大型心筋症の一般人口に対する発症頻度が 0.1~0.5%であることを考慮している。候補遺伝子変異が既知かどうかの評価は Human Gene Mutation Database および ClinVar を用いる。

・スプライス変異の評価方法

mRNAリードデータのアライメントは、STAR (2-pass)を用いGATK推奨プロトコールに沿って行う。アライメントされた RNA リードの冗長度(カバレッジ)を解析・評価、および公的データベースである dbGaP に保存されている左室心筋 RNA シークエンスリードデータをコントロールとして用いることで、肥大型心筋症発端者の心疾患関連遺伝子におけるスプライス変異を同定する。また、GATK を用いることで RNA リードデータからも変異コールを行い、前述の DNA リードデータとともに GATK HaplotypeCaller にて joint calling を行い、双方の変異データを比較する。この行程により変異コールの精度がさらに上昇する。さらに、スプライス変異が同定された遺伝子領域とその周辺の遺伝子変異を評価することで、エクソン領域だけでなくイントロン領域の変異とスプライス変異との関係を見出すことが可能となる。

金沢大学ヒト心筋生検検体レポジトリ(2017年~)

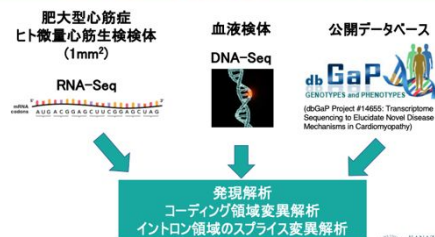


ヒト心筋生検検体: 48検体 (2018.5.末)
・肥大型心筋症
・拡張型心筋症
・心臓サルコイドシス
…
RNA抽出済: 37検体
Library作成済: 16検体
血液由来のDNAも同時採取・保存

野村豊洋 平成29~30年度 科学研究費若手B
"次世代シークエンサーを用いた家族性肥大型心筋症の新たな病態発症メカニズムの解明"

KANAZAWA UNIVERSITY
Graduate School of Medicine
Department of
Cardiovascular and Internal Medicine

トランスクリプトームシークエンスを利用した HCMの原因変異の機能解析 (2017年~)



野村豊洋 平成29~30年度 科学研究費若手B
"次世代シークエンサーを用いた家族性肥大型心筋症の新たな病態発症メカニズムの解明"

KANAZAWA UNIVERSITY
Graduate School of Medicine
Department of
Cardiovascular and Internal Medicine

4. 研究成果

まず、これまで遺伝子解析にて原因変異が同定されなかった肥大型心筋症発端者 8 名より、心筋生検検体を取得した。検体が少量(約 1mm × 1mm)であることを考慮し、少量でもシーケンスライブラリーの作成が可能な NuGEN 社の Ovation® SoLo RNA-Seq システムを用いた。この方法を用いることで、少量の検体であっても効率的にシーケンスに必要なライブラリーの作成に成功した。その後、イルミナ社の HiSeq によりシーケンスを行い、良好なリードデータが得られた。また、この 8 名においては同時に血液検体(白血球)より DNA の抽出も行い、HiSeq を用いて DNA の全ゲノムシーケンスを行った。

次に、この方法で得られた RNA シーケンスリードデータ、および DNA シーケンスリードデータを用いて、肥大型心筋症発端者 8 名の主にエクソン領域を対象に変異解析を行った。全ゲノムシーケンスを行った 8 名のうち、4 名において肥大型心筋症の原因候補遺伝子変異がみられた。このうち、病原性(pathogenicity)が強く疑われたのは 1 名のみ(HCM-25、TNNI3、p.Lys183del)で、残りは 1 名がこれまで報告のない MYH7 のミスセンス変異、2 名が ClinVar において相反する病原性の報告(conflict interpretations of pathogenicity)があるミスセンス変異の保因者であった (Table)。

Table. 肥大型心筋症発端者 8 名の変異解析結果

ID	chr	pos (b37)	rsID	gene	consequence	Nucleotide change	AA change	comments
HCM-20	14	23888459	-	MYH7	missense	c.3899A>G	p.Gln1300Arg	novel
HCM-23	-	-	-	-	-	-	-	-
HCM-24	-	-	-	-	-	-	-	-
HCM-25	19	55665397	-	TNNI3	inframe_deletion	c.547_549del	p.Lys183del	reported
HCM-26	-	-	-	-	-	-	-	-
HCM-30	11	47357494	rs727504418	MYBPC3	missense	c.2671C>T	p.Arg891Trp	ClinVar: conflicting interpretations
HCM-41	15	63336299	rs199476306	TPM1	missense	c.188C>T	p.Ala63Val	ClinVar: conflicting interpretations
HCM-47	-	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations (略語):

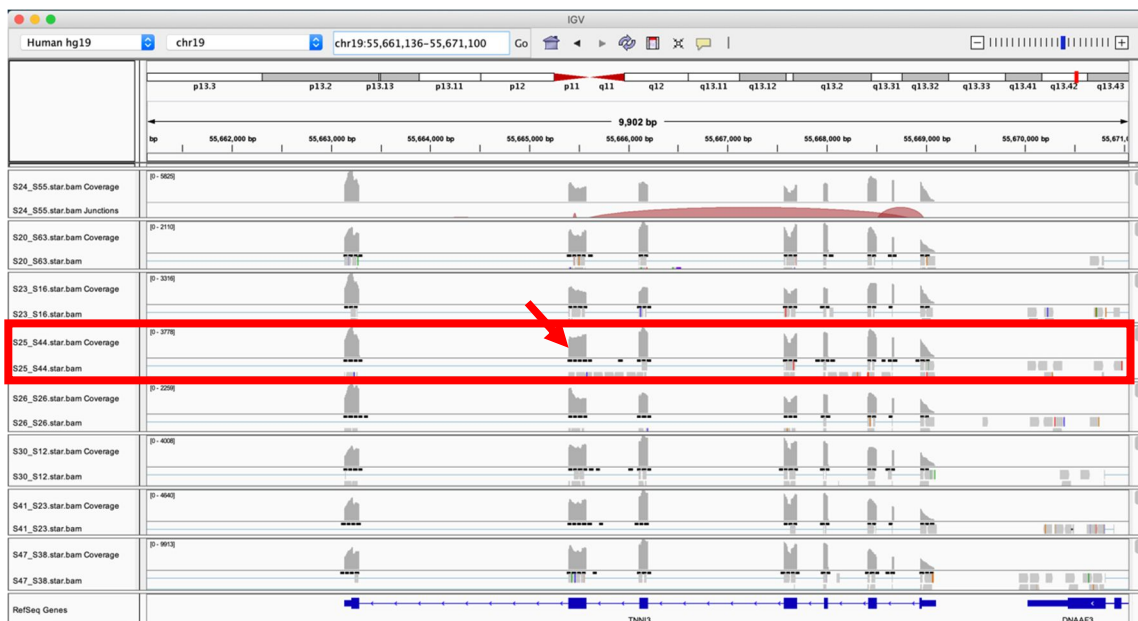
AA, amino acid

chr, chromosome

pos, genomic position

さらに、この肥大型心筋症発端者 8 名の RNA シークエンスリードデータを用いて、スプライス異常を発症機序とする肥大型心筋症の同定を試みた。肥大型心筋症に関係する 17 遺伝子(MYH7, TNNT2, TPM1, MYBPC3, MYL3, MYL2, TNNI3, ACTC1, CSRP3, TNNC1, CAV3, TCAP, CRYAB, VCL, OBSCN, ANKRD1, TTN)について各遺伝子領域を確認し、スプライスパターンの変化によるリード発現領域の変化の有無を評価した。しかし、今回の 8 名の検討では、いずれの遺伝子領域においてもスプライスパターンの変化を確認することはできなかった。なお、HCM-25 が有する TNNI3 p.Lys183del 変異は、同遺伝子のエクソン 7 の最終アミノ酸であり、同部位の欠失はスプライスパターンの変化を引き起こしうることが期待されたが、今回の研究においては同欠失が存在しても、明らかなスプライス変化には寄与していなかった(Figure)。

Figure. 肥大型心筋症発端者 8 名のトロポニン I 遺伝子(TNNI3)領域における RNA リードデータ



赤線で囲まれた部分が、TNNI3 領域における HCM-25 の RNA リードデータをアライメントしたものである。矢印の部分が Lys183del の部分であるが、同欠失があっても明らかなスプライス変化は認められなかった。

以上、今回の研究において、微小心筋生検検体より、効果的に mRNA を抽出し、ライブラリーを作成し、RNA シークエンスを行う一連の系を樹立した。この系をもとに、これまで原因遺伝子変異が未同定の肥大型心筋症発端者 8 名を対象に、全ゲノムシークエンスおよび微量心筋生検検体から得られた網羅的 RNA シークエンスのデータをもとに、スプライス変化に伴う肥大型心筋症発症メカニズムの解明を試みた。しかし、本研究での 8 名の肥大型心筋症患者の中には、スプライス変化を発症機序とする肥大型心筋症は認められず、スプライス異常をきたしうる遺伝子変異を同定することはできなかった。今後、網羅的遺伝子変異解析で原因変異が同定されていない肥大型心筋症発端者をさらに集め、同様の検討を継続していきたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Nomura A, Yoshida S, Hosomichi K, Tajima A, Tada H.

Deciphering Novel Disease Mechanism in Cardiomyopathy by Transcriptome Sequencing.

Impact. 2019 April, 2019(4):10-12(3). DOI: <https://doi.org/10.21820/23987073.2019.4.10> (査読無)

[学会発表](計 1 件)

野村 章洋

シンポジウム3: ゲノム情報を心筋症診療に活かす

肥大型心筋症における High Throughput Sequencing の応用と展望

第4回心筋症研究会 2018年6月2日 (奈良)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし (若手研究のため)

(2)研究協力者

研究協力者 氏名:吉田 昌平

ローマ字氏名: Shohei Yoshida

研究協力者 氏名:細道 一善

ローマ字氏名: Kazuyoshi Hosomichi

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。