

令和 2 年 5 月 10 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15782

研究課題名(和文) 難病疾患肺動脈性肺高血圧症の発症原因遺伝子の新規同定と機能解析

研究課題名(英文) Novel identification and functional analysis of the causative genes in pulmonary arterial hypertension

研究代表者

百瀬 裕一 (Momose, Yuichi)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：60795798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：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クソームデータを精査し、患者4名と未発症家族1名に新規の肺動脈性肺高血圧症(PAH)の原因遺伝子変異としてSOX17変異を見出した。これら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。また先天性心疾患の合併も示唆された。さらに、RNF213遺伝子の多型変異R4910Kが、特発性PAH患者の10%の高頻度で見出される事、これらの患者は治療不応性で予後不良な集団に一致することを確認した。これらの成果は、日本人PAH患者における個別化医療へ繋がる成果として評価される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難病循環器疾患PAHにおいて、ゲノム情報と臨床情報とを丁寧に解析することによって、治療反応性や予後と相關する重要な知見を得ることが出来た。欧米を中心として、患者サンプルを収集したドライビク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、統一プロトコー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精密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。

研究成果の概要(英文)：We performed all exome sequencing including 140 Japanese PAH patients and their healthy families, and found that 4 patients and 1 unaffected family had SOX17 mutations as a novel causative gene mutation of pulmonary arterial hypertension (PAH). These patients were poorly responsive to multidrug therapy of pulmonary vasodilators, and autopsy revealed severe PAH with Heath-Edwards 5 degrees. In addition, the relationship with congenital heart disease and SOX17 mutation was also suggested. In addition, the RNF213 gene mutation, R4910K, was found in a high frequency in about 10% of patients with idiopathic PAH, confirming that these patients are consistent with a refractory and poor prognosis population. These results are evaluated as outcomes leading to personalized medicine specialized in Japanese PAH patients.

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 発症原因遺伝子 発症感受性遺伝子

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 (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。

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

未知の発症原因の究明に全力で取り組むことが長期的な展望において患者医療への貢献および医療費削減につながる。本研究では、PAH で最も頻度の高い原因遺伝子である BMPR2 変異解析を日本人 PAH 患者の大規模集団において丁寧を実施し、日本人患者の遺伝子学的背景を詳細に調査すること、及び、未解明の PAH 発症原因遺伝子の同定を目標に BMPR2 遺伝子異常を有しない患者検体を用いて全エキソーム解析を実施し、BMPR2 遺伝子とは異なる新規の発症原因遺伝子の有力候補を見出すことを目的とする。さらに、その有力候補遺伝子に関して臨床情報との相関解析、患者における変異頻度の解明を含めて、その意義を詳細に解明することを目的とする。

## 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 IPAH75 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

### (1) 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%」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、IPAHA が HPAHA 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 HPAHA 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 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。

## (2) その他の遺伝子変異

2018 年、Gräf 他が Nature Communication 誌に約 1000 名の欧米患者集団を対象とし次世代型シーケンシング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。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 (SRV-related HMG-box 17) は胎児期の形態形成や血管新生に関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、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を見出した。

我々は、この RNF213 R4910K 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。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。

この RNF213 R4910K 変異は、日本人もややもや病患者の 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。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) が保有している(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 R4910K 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。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。また、PAH の発症や予後には原因遺伝子 BMPR2 の変異と生理的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)を示唆するものと思われる。

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精密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。

難病循環器疾患 PAH において、ゲノム情報と臨床情報とを丁寧に解析することによって、治療反応性や予後と関連する重要な知見を得ることが出来た。現在、RNF213 R4910K 変異マウスおよび BMPR R899X マウスを CRISPR/Cas9 システムを用いて創出することに成功しており、これらの変異マウスを用いた原因・感受性遺伝子の相互作用による発症メカニズムの検証を、in vivo 実験と in vitro 実験によって集学的に進めている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Suzuki Hisato, Kataoka Masaharu, Hiraide Takahiro, Aimi Yuki, Yamada Yoshitake, Katsumata Yoshinori, Chiba Tomohiro, Kanekura Kohsuke, Isobe Sarasa, Sato Yasunori, Satoh Toru, Gamou Shinobu, Fukuda Keiichi, Kosaki Kenjiro	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 e002317
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 Hiraide Takahiro, Kataoka Masaharu, Suzuki Hisato, Aimi Yuki, Chiba Tomohiro, Kanekura Kohsuke, Satoh Toru, Fukuda Keiichi, Gamou Shinobu, Kosaki Kenjiro	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 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 Gamou S, Kataoka M, Aimi Y, Chiba T, Momose Y, Isobe S, Hirayama T, Yoshino H, Fukuda K, Satoh T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Genetics in pulmonary arterial hypertension in a large homogeneous Japanese population.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clinical Genetics	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) 10.1111/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 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 J Heart Lung Transplant	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 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----