

令和元年6月4日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15982

研究課題名(和文)慢性血栓塞栓性肺高血圧症における新規病因遺伝子の検討

研究課題名(英文) Novel variants in chronic thromboembolic pulmonary hypertension

研究代表者

矢尾板 信裕 (Yaoita, Nobuhiro)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：00735368

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)：慢性血栓塞栓性肺高血圧症(CTEPH)は肺動脈内に器質化血栓が生じ、肺高血圧症を来す致死的な疾患である。今回、CTEPHの遺伝的背景が急性肺塞栓症や特発性肺高血圧症の遺伝的背景と類似しているかどうか検討するために、51名のCTEPH患者の全エクソーム解析を行った。CTEPH患者には特発性肺動脈性肺高血圧症に關与する有意な一塩基変異多形(SNPs)は認めなかった。一方、急性肺塞栓症に關わるSNPsでは、F5、MTHFR、THBDの有意なSNPsを認めた。このことから、CTEPH患者の遺伝的背景は特発性肺動脈性肺高血圧症の遺伝的背景よりも急性肺塞栓症の遺伝的背景に類似していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺動脈内に生じた器質化血栓により生じる慢性血栓塞栓性肺高血圧症(CTEPH)は予後の悪い難病である。急性肺塞栓症(APE)の合併症と考えられるが、APEの既往のないCTEPH患者も多い。このためCTEPHの病態がAPEと似ているのか不明であった。本研究では、世界で初めてCTEPH患者の遺伝的背景を解析し、CTEPH患者にはAPEの危険因子となる遺伝的背景があることがわかった。また、APEの既往のないCTEPH患者もAPEの危険因子となる遺伝的背景があることがわかった。このことからCTEPHとAPEが類似した病態である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) is a fatal disease entity of pulmonary hypertension (PH) characterized by obstruction of the major pulmonary arteries by organized thrombus and pulmonary vascular remodeling. The genetic background of CTEPH was not revealed so far. We checked the single nucleotide polymorphisms(SNPs) in CTEPH patients, which was related to idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH) or acute pulmonary embolism (APE). it was revealed that CTEPH patients did not have any non-synonymous SNPs related to IPAH, but they had non-synonymous SNPs related with APE such as F5, MTHFR and THBD. Moreover, in CTEPH patients who did not have a history of APE, SNPs of THBD was significantly higher than in healthy subjects. Furthermore, thrombin-activated fibrinolysis inhibitor was activated in CTEPH patients who had the SNPs of THBDs. Taken together, CTEPH patients had SNPs related to APE, even though CTEPH patients did not have history of APE.

研究分野：循環器内科

キーワード：慢性血栓塞栓性肺高血圧症 急性肺塞栓症 一塩基変異多型

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

1. 研究開始当初の背景

慢性血栓塞栓性肺高血圧症(CTEPH)は肺動脈内に器質化血栓を生じ、肺動脈を閉塞することで肺高血圧症をきたす致死的な疾患である。CTEPHは肺動脈内に器質化血栓を認めることから、急性肺塞栓症(APE)の重大な合併症として報告されているが、CTEPH患者の多くはAPEの既往歴を認めない。また、CTEPH患者では特発性肺高血圧症(IPAH)と類似した肺組織像を呈することから、CTEPH患者の遺伝的背景がIPAH患者の遺伝的背景と似ている可能性も考えられている。今までCTEPH患者の遺伝的背景(一塩基変異多形(SNPs))を調べた報告はないため、CTEPH患者の遺伝的背景は全く不明である。

2. 研究の目的

- (1) CTEPH患者の遺伝的背景にAPEまたはIPAHに関与するSNPsを認めるか明らかにする。
- (2) CTEPH患者特有のSNPsを解析し、その機能を検討する

3. 研究の方法

当院に通院中でCTEPHと診断された患者のうちインフォードコンセントを行い、同意を得られた51名のCTEPH患者を対象にした。51名のCTEPH患者の心臓カテーテル検査時に採血を行い、DNAを抽出し、SureSelectXT Target Enrichment Systemにてエクソーム解析を行った。また、同時に患者の血漿サンプルを保存した。

エクソーム解析より得られたデータの中で、CTEPH患者のSNPsのうち、今までIPAHで報告されているSNPs (*BMP2*, *ENG*, *SMAD9*, *ACVRL1*, *CAV1*, *KCNK3*, *CBLN2*) に関してCTEPH患者と東北メディカル・メガバンク機構で行っている健常人コホートである integrative Japanese Genome Variation Database 3.5KJPN のSNPsの保有頻度(Alelle frequency)を比較した。続いてAPEで報告されているSNPs (*SRPINC1*, *THBD*, *F5*, *F2*, *RGS7*, *KNG1*, *MTHFR*, *VWF*, *PROCR*) に関して、CTEPH患者と東北メディカル・メガバンク機構で行っている健常人コホートである integrative Japanese Genome Variation Database 3.5KJPN のSNPsのAllele frequencyを比較した。さらにCTEPH患者の中でAPEの既往の有無にて特異的なSNPsがあるか検討した。また、これらのSNPsが、我々がCTEPHの病態の原因として発見したThrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI)の機能に影響を与えないか検討した。

最後にCTEPHに特異的なSNPsがないかどうか検討した。エクソーム解析で得られたSNPsの中で、in silicoでSNPsがそのコーディング蛋白の機能に影響を与えると推定されたSNPs (ANNOVAR-SIFT Score <0.05, LJSIFT Score >0.95, Polyphen2 Score >0.85, Mutation Taster Score >0.5)を抽出した。さらにその中でCTEPH患者においてSNPsの頻度が10%以上認められるもので、かつ3.5KJPNでSNPsの頻度が1%未満のものを抽出した。

4. 研究成果

(1) エクソーム解析のデータの解析

エクソーム解析により得られたSNPsのうち深度30以上のSNPsを精度の高いエクソーム解析データとして抽出した。CTEPH患者51名においてSNPsは32941個認められた。そのうちアミノ酸変異をきたすnon-synonymous変異16793個を抽出し、これらのSNPsを解析することにした。

(2) CTEPH患者におけるIPAH患者に特有のSNPsの解析
CTEPH患者で認められたSNPsのうちIPAH患者に報告されているSNPsを抽出した(Table 1)。その結果、5個のSNPsを認めた。しかしながら c.G2811A, c.C1029T, c.C1098T, c.G327A は

Table 1. Variants Associated with Pulmonary Hypertension in CTEPH Patients

Gene	Variation, cDNA	Mutation type	Allele frequency in CTEPH (%)	Allele frequency in general population (%)	P value
<i>BMP2</i>	c.G2811A	Synonymous	4.9	5.4	1.0
<i>ENG</i>	c.C1029T	Synonymous	1.9	3.0	0.77
<i>ENG</i>	c.C1098T	Synonymous	1.9	0	<0.01
<i>ENG</i>	c.G1096C	Non-synonymous	4.9	6.2	0.83
<i>SMAD9</i>	c.G327A	Synonymous	1.0	1.1	1.0

CTEPH, chronic thromboembolic pulmonary hypertension

Table 2. Non-synonymous Variants Associated with APE in CTEPH Patients

Gene	Variation, cDNA	Allele frequency in general population (%)	Allele frequency in CTEPH (%)	P-value (vs. general population)
<i>THBD</i>	c.C1418T	27.6	35.2	0.09
<i>F2</i>	c.C494T	62.0	67.6	0.25
<i>F5</i>	c.A6665G	8.5	13.7	0.07
<i>F5</i>	c.A3980G	6.2	13.7	0.005
<i>F5</i>	c.A2450C	8.6	13.7	0.08
<i>KNG1</i>	c.G1925C	4.2	1.0	0.13
<i>KNG1</i>	c.A1657G	0.1	1.0	0.14
<i>KNG1</i>	c.T533C	31.0	35.3	0.39
<i>MTHFR</i>	c.A1286C	20.0	28.4	0.05
<i>MTHFR</i>	c.T1742C	0	1.0	0.05
<i>MTHFR</i>	c.G1781A	9.3	18.6	0.003
<i>VWF</i>	c.G4585C	0.1	1.0	0.14
<i>VWF</i>	c.G4201A	0.2	1.0	0.23
<i>PROCR</i>	c.A655G	4.0	5.9	0.31
<i>PROCR</i>	c.C434T	0.8	2.0	0.21

APE, acute pulmonary embolism; CTEPH, chronic thromboembolic pulmonary hypertension.

The variants of which frequency was significantly higher in CTEPH patients compared with those of general population were shown in bold.

アミノ酸配列が保存された synonymous 変異であった。c.G1096C は non-synonymous 変異であったが、その SNPs の Allele frequency は健常人コホートと同等であった。このことから CTEPH 患者の遺伝背景は IPAH 患者の遺伝的背景とは異なっていることが示唆された。

(3) CTEPH 患者における APE 患者に特有の SNPs の解析

CTEPH 患者で認められた SNPs のうち APE 患者に報告されている SNPs を抽出した (Table 2)。SRPINC1, RGS7 の遺伝子には non-synonymous 変異は認めなかったが、THBD, F2, F5, KNG1, MTHFR, VWF, PROCRC の遺伝子には non-synonymous 変異を認めた。この中で健常人コホートと比較して、F5 (c.A3980G), MTHFR (c.A1286C, c.T1742C, c.G1781A) は CTEPH 患者に有意に多かった。これらのことから CTEPH 患者の遺伝的背景には APE の危険因子である SNPs を認めることがわかった。

(4) APE の既往の有無による CTEPH 患者の遺伝的背景の違い

CTEPH は APE に引き続いて生じると考えられている一方で、APE の既往を認めない CTEPH 患者も多く認められる¹⁾。そこで、APE の既往を認めない CTEPH 患者においても APE の危険因子となる SNPs があるか検討した。今回登録した CTEPH 患者 51 名のうち、APE の既往のない CTEPH 患者は 28 名であった。そこで、APE 既往のある CTEPH 患者と APE 既往のない CTEPH 患者に分けて、APE の危険因子となる SNPs を認めるか解析した (Table 3)。その結果 APE の既往のある CTEPH 患者では F5 (c.A6665G, c.A3980G, c.A2450C) 及び MTHFR (c.G1781A) が健常人コホートに比べ、有意に多かった。さらに、これらの SNPs は APE 既往のない CTEPH 患者では健常人コホートと同等であった。

一方、APE 既往のない CTEPH 患者では THBD (c.C1418T) の Allele frequency が健常人コホートよりも有意に高かった。一方、この SNPs は APE 既往のある CTEPH 患者では健常人コホートと同様であった。

このことから APE 既往のない CTEPH 患者においても APE の危険因子となる SNPs を認めることがわかったが、一方で、APE の既往のある CTEPH 患者と APE 既往のない CTEPH 患者ではその遺伝的背景が異なる可能性が示唆された。

(5) CTEPH 患者における THBD (c.C1418T) の機能解析

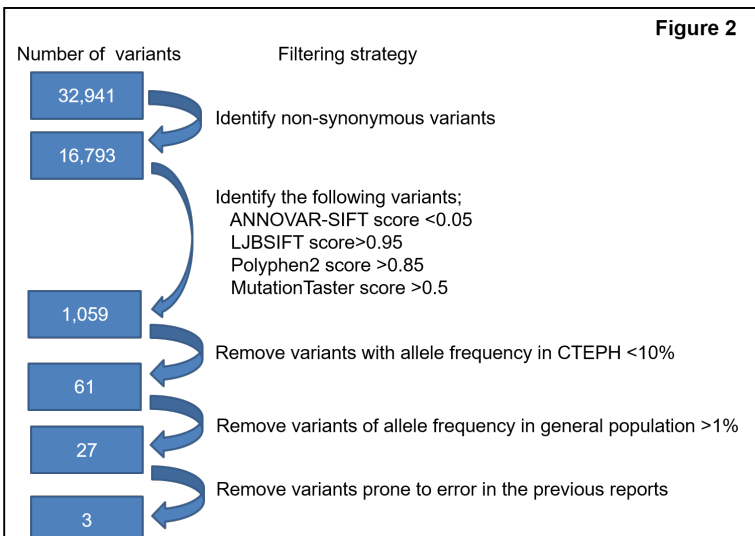
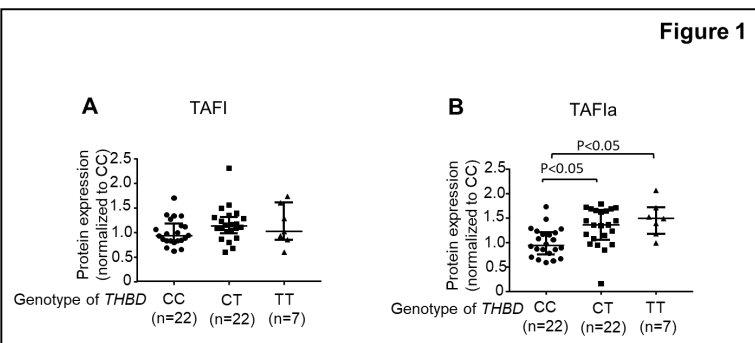
THBD がコードするトロンボモジュリンは我々が CTEPH の病因として報告した TAFI を活性化させるため^{2,3)}、c.C1418T が TAFI に影響を与えるか検討した。凍結保存した血漿サンプルを使用して、TAFI のウェスタンブロットを施行

Table 3. Non-synonymous Variants Associated with APE in CTEPH Patients with no History of APE

Gene	Variation, cDNA	Allele frequency in general population (%)	Allele frequency in CTEPH with APE (%)	P-value (vs. general population)	Allele frequency in CTEPH without APE (%)	P-value (vs. general population)
THBD	c.C1418T	27.6	17.3	0.14	50.0	0.0004
F2	c.C494T	62.0	70.8	0.13	62.5	1
F5	c.A6665G	8.5	21.7	0.005	7.1	1
F5	c.A3980G	6.2	21.7	0.0004	7.1	0.78
F5	c.A2450C	8.6	21.7	0.005	7.1	1
KNG1	c.A1657G	0.1	0	1	1.7	0.08
KNG1	c.T533C	31.0	37.0	0.42	33.9	0.66
MTHFR	c.A1286C	20.0	30.4	0.09	26.8	0.24
MTHFR	c.T1742C	0	0	1	1.7	0.03
MTHFR	c.G1781A	9.3	26.1	0.0008	12.5	0.36
VWF	c.G4585C	0.1	2.1	0.07	0	1
VWF	c.G4201A	0.2	4.3	0.007	1.7	0.13
PROCR	c.A655G	4.0	6.5	0.44	5.4	0.50
PROCR	c.C434T	0.8	4.3	0.06	0	1

APE, acute pulmonary embolism; CTEPH, chronic thromboembolic pulmonary hypertension.

The variants of which frequency was significantly higher in CTEPH patients with or without a history of APE compared with those of general population were shown in bold.



THBD がコードするトロンボモジュリンは我々が CTEPH の病因として報告した TAFI を活性化させるため^{2,3)}、c.C1418T が TAFI に影響を与えるか検討した。凍結保存した血漿サンプルを使用して、TAFI のウェスタンブロットを施行

した。その結果 TAFI の抗原量は SNPs の CC, CT, TT の間では有意差は認めなかったが、活性化 TAFI は CT, TT では CC に比べ有意に活性化していることがわかった(Figure 1)。

(6)CTEPH 患者に認められる新規の特異的な SNPs の検索

最後に CTEPH 患者において特異的な SNPs があるか検討した。上記(1)で抽出された SNPs 16793 個を対象とした。さらにアミノ酸異常がコードする蛋白の機能に影響を与えると推測される SNPs を抽出した。ANNOVAR-SIFT Score <0.05, LJB SIFT Score>0.95, Polyphen2 Score >0.85, Mutation Taster Score >0.5 を満たす SNPs が蛋白機能に影響を与える可能性が高いと考えられた。これを満たす SNPs は 1059 個であった。次に CTEPH 患者における Allele frequency が 10%以上のもので、かつ健康人コホートにおける Allele frequency が 1%未満である SNPs 27 個を抽出した。さらに過去の報告において、エクソーム解析で偽陽性となる可能性が高い SNPs⁴⁾を除き 3 個の SNPs (*WDR89* (c.T259C, c.T294A)と *THEG* (c.G728A))が抽出され、この 3 個の SNPs は CTEPH 患者に特有の SNPs と考えられた(Figure 2)。

引用文献

Ribeiro A, Lindmarker P, Johnsson H, et al. Pulmonary embolism: One-year follow-up with echocardiography doppler and five-year survival analysis. *Circulation*. 1999;99:1325-1330.

Yaoita N, Satoh K, Satoh T, et al. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36:1293-1301.

Satoh T, Satoh K, Yaoita N, et al. Activated TAFI promotes the development of chronic thromboembolic pulmonary hypertension: A possible novel therapeutic target. *Circ Res*. 2017;120:1246-1262.

Kwak SH, Chae J, Choi S, et al. Findings of a 1303 Korean whole-exome sequencing study. *Exp Mol Med*. 2017;49:e356.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

Satoh K, Satoh T, Yaoita N, Shimokawa H. Recent advances in the understanding of thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. (in press) 査読あり DOI 10.1161/ATVBAHA.119.312003

Yaoita N, Shimokawa H. The effect of heart rate reduction in pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol*. 314:H889-H891,2018. 査読あり DOI 10.1152/ajpheart.00705.2017

Satoh K, Kikuchi N, Satoh T, Kurosawa R, Sunamura S, Siddique MAH, Omura J, Yaoita N, Shimokawa H. Identification of novel therapeutic targets for pulmonary arterial hypertension. *Int. J. Mol. Sci*. 19, 4081,2018. 査読あり DOI 10.3390/ijms19124081

Kikuchi N, Satoh K, Kurosawa R, Yaoita N, Elias-Al-Mamun M, Siddique MHA, Omura J, Satoh T, Nogi M, Sunamura S, Miyata S, Saito Y, Hoshikawa Y, Okada Y, Shimokawa H. Selenoprotein P promotes the development of pulmonary arterial hypertension *Circulation*. 138:600-623,2018. 査読あり DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.033113

Kozu K, Sugimura K, Aoki T, Tatebe S, Yamamoto S, Yaoita N, Shimizu T, Nochioka K, Sato H, Konno R, Satoh K, Miyata S, Shimokawa H. Sex differences in hemodynamic responses and long-term survival to optimal medical therapy in patients with pulmonary arterial hypertension. *Heart Vessels*. 33:939-947,2018. 査読あり DOI 10.1007/s00380-018-1140-6

Satoh T, Satoh K, Yaoita N, Kikuchi N, Omura J, Kurosawa R, Numano K, Elias-Al-Mamun M, AbdulHai Siddique MAH, Sunamura S, Nogi M, Suzuki K, Miyata S, John Morser J, Shimokawa H. Activated TAFI promotes the development of chronic thromboembolic pulmonary hypertension - A possible novel therapeutic target - *Circ Res*. 120:1246-1262,2017. 査読あり DOI 10.1161/CIRCRESAHA.117.310640.

Aoki T, Sugimura K, Tatebe S, Miura M, Yamamoto S, Yaoita N, Suzuki H, Sato H, Kozu K, Konno R, Miyata S, Nochioka K, Satoh K, Shimokawa H. Comprehensive evaluation of the effectiveness and safety of balloon pulmonary angioplasty for inoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension -Long-term effects and procedure-related complications- *Eur Heart J*. 38:3152-3159,2017. 査読あり DOI 10.1093/eurheartj/ehx530.

Tatebe S, Sugimura K, Aoki T, Yamamoto S, Yaoita N, Suzuki H, Sato H, Kozu K, Konno R, Satoh K, Fukuda K, Adachi O, Saito R, Nakanishi N, Morisaki H, Oyama K, Saiki Y, Okada Y, Shimokawa H. The Efficacy of a Genetic Analysis of the BMPR2 Gene

in a Patient with Severe Pulmonary Arterial Hypertension and an Atrial Septal Defect Treated with Bilateral Lung Transplantation. *Intern Med.* 56:3193-3197,2017. 査読あり DOI 10.2169/internalmedicine.8686-16.

Ohtsuki T, Satoh K, Omura J, Kikuchi N, Satoh T, Kurosawa R, Nogi M, Sunamura S, Yaoita N, Aoki T, Tatebe S, Sugimura K, Takahashi J, Miyata S, Shimokawa H. Prognostic impacts of plasma levels of cyclophilin A in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 37:685-693,2017. 査読あり DOI 10.1161/ATVBAHA.116.308986.

〔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

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。