

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08875

研究課題名(和文) 第三世代シーケンサーを用いた血栓症の遺伝的背景の解明と診断・治療への活用

研究課題名(英文) Genetic background of thrombophilia using third generation DNA sequencing

研究代表者

宮田 敏行 (MIYATA, Toshiyuki)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・客員研究員

研究者番号：90183970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：静脈血栓塞栓症の中でも特発性血栓症は、家系内多発、若年性発症、繰り返す再発、まれな発症部位の血栓という特徴を示し、遺伝性血栓性素因を有する場合が比較的高い。静脈血栓塞栓症のパネルの候補遺伝子として9遺伝子を選定し、次世代シーケンサー(NGS)法と第三世代シーケンサー(Third generation sequencer, TGS)法を用いて解析した。NGS法とTGS法で得られた配列を標準配列に照らし合わせるとわずかに一致しない塩基が見られた。なかでも、TGS法で解析したPROS1遺伝子に一致しない塩基が比較的多く見られ、これらはmiss callと思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

次世代DNAシーケンス(NGS)法はヒト遺伝子解析に広く使用されているが、構造バリエーションなどの大きなバリエーションの同定は困難である。本研究では、静脈血栓塞栓症の遺伝子解析に、長いDNA配列を決定できるlong readの第3世代DNAシーケンス(TGS)法を導入した。結果として、NGSでは同定できず、TGS法で同定できるバリエーションがあった。一方で、偽遺伝子をもつPROS1遺伝子では標準配列に一致しない塩基が見られたことから、さらに検討を加える必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Unprovoked venous thromboembolism (VTE) is characterized by thrombosis at a relatively young age, a strong family history, recurrent episodes, and involvement of unusual sites. In this study, we conducted a genetic analysis of unprovoked VTE using next-generation sequencing (NGS) and third-generation sequencing (TGS), utilizing a candidate gene approach including three coagulation regulators and six clotting factors. When the sequences obtained by NGS and TGS were compared with the reference sequence, there were a small number of nucleotides that did not match. Among them, the PROS1 gene analyzed by the TGS method had a relatively large number of unmatched nucleotides, and these were judged to be miscalls.

研究分野：血栓止血学

キーワード：静脈血栓塞栓症 血栓性素因 凝固制御因子 特発性血栓症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト遺伝子解析では、サンガー法に代わって次世代シーケンサー(next generation sequencer, NGS)法が登場し、多数の検体について広域の塩基配列決定が可能となり、ヒトゲノム解析に広く用いられている。NGS法はDNAを断片化した後、各断片について比較的短い塩基配列(short read)を決定し、これを標準配列(reference sequence)に貼り付ける(alignment)ことで、解析対象のゲノム配列を決定する。こうした short read の特性から、NGS法は一塩基置換(single nucleotide polymorphism, SNP)や短い挿入/欠失(short insertion/deletion, insdel)のような小さなバリエーションは決定できるが、構造バリエーション(structural variations, SVs: 50 bp から数 10 kb の挿入/欠失/逆位/転座/重複)や新規に獲得した配列などの同定は困難である。ただし、原因未知であった多くの遺伝性疾患の原因が未知であった時代は、short read シーケンサー技術は原因探索に極めて有効な手段であり、特にエクソーム解析から多くの原因遺伝子(座)の同定に貢献した。

### 2. 研究の目的

静脈血栓塞栓症の遺伝子解析に、10 kb-50 kb の DNA 断片を決定できる long read の第三世代のシーケンサーを導入し、小さなバリエーションの同定に加え、次世代 DNA シークエンサーでは見逃してしまう構造バリエーションの同定も行えるシステムの確立を目指す。アンチトロンビン遺伝子は 20 kb 以下であり、プロテイン S 遺伝子は 100 kb 程度である。本研究では、国立循環器病研究センターの静脈血栓塞栓症患者より、特発性血栓症患者を選び出し、静脈血栓塞栓症の候補遺伝子解析を NGS 法と TGS 法を用いて行い、TGS 法の結果を標準配列と NGS 法で確認する。

### 3. 研究の方法

1) 国立循環器病研究センター・心臓血管内科部門・肺循環科では、静脈血栓塞栓症患者の登録研究を進めている。静脈血栓塞栓症の中でも特発性血栓症は、家系内多発、若年性発症、繰り返す再発、まれな発症部位の血栓という特徴を示し、遺伝性の血栓性素因を有する場合は比較的高い。そこで、遺伝性血栓性素因の遺伝子解析を行うため、肺循環科の登録研究より特発性血栓症患者を選ぶ。

2) 静脈血栓塞栓症のパネルの候補遺伝子として 9 遺伝子を選定し、次世代シーケンサー(next generation sequencer, NGS)法と第三世代シーケンサー(Third generation sequencer, TGS)法を用いて、特発性血栓症患者の遺伝子解析を行う。9 遺伝子は 3 種の凝固制御因子(アンチトロンビン、プロテイン C、プロテイン S)およびプロトロンビンなどの 6 種の凝固因子である。NGS 法は MiSeq (Illumina, Tokyo, Japan)、TGS 法は PacBio RS II (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, USA)を用いる。PacBio シークエンサーでは、各候補遺伝子のプロモーター領域、エクソン領域、非翻訳領域(イントロンの全領域を含む)の DNA シークエンスを行う。

3) TGS 法の結果を標準配列と比較検討する。

### 4. 研究成果

1) 肺循環科の静脈血栓塞栓症患者データベースより、特発性血栓症患者を選定した。

2) PacBio シークエンサーによる候補 9 遺伝子の解析

遺伝性血栓塞栓症の大部分はアンチトロンビン、プロテイン C、プロテイン S の機能喪失バリエーション

アントが病因であると報告されている。そこで、これら3つの遺伝子を中心に PacBio シークエンサーの結果を解析した。

3) TGS 法は遺伝子のエクソン領域に加え、プロモータ領域やイントロン領域も解析したので、NGS 法よりも多くの遺伝子バリエーションが同定された。また、TGS 法により複数の構造バリエーションも同定された。しかし、これらの構造バリエーションはイントロン中にあり、それらの意義は現在のところ不明である。NGS 法と TGS 法で得られた配列を標準配列に照らし合わせると一致しない塩基が見られた。なかでも、TGS 法で解析した PROS1 遺伝子に一致しない塩基が比較的多く見られ、これらは miss call と思われた。PROS1 遺伝子は塩基配列の同一性が極めて高い偽遺伝子 PROSP があるので、偽遺伝子が妨害しているのかもしれない。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 16件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Miyata, T	4. 巻 137
2. 論文標題 Autoantibody-resistant ADAMTS13 variant	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 2575-2576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2021011147	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi T, Morishita E, Tsuda H, Neki R, Kojima T, Ohga S, Ochiai M, Adachi T, Miyata T.	4. 巻 49
2. 論文標題 Clinical guidance for peripartum management of patients with hereditary thrombophilia.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Obstet Gynaecol Res	6. 最初と最後の頁 3008-3033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.14879	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Akuta K, Kiyomizu K, Kashiwagi H, Kunishima S, Nishiura N, Banno F, Kokame K, Kato H, Kanakura Y, Miyata T, Tomiyama Y	4. 巻 18
2. 論文標題 Knock-in mice bearing constitutively active IIb(R990W) mutation develop macrothrombocytopenia with severe platelet dysfunction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Thromb Haemost	6. 最初と最後の頁 497-509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jth.14678	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tsuji A, Miyata T, Sekine A, Neki R, Kokame K, Tomita T, Kashima Y, Asano R, Ueda J, Aoki T, Ogo T.	4. 巻 62
2. 論文標題 Three cases of unprovoked venous thromboembolism with prothrombin p.Arg596Gln variant and literature review of antithrombin resistance	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Intern Med	6. 最初と最後の頁 885-888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.9718-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyata T, Horiuchi T.	4. 巻 72
2. 論文標題 Biochemistry, molecular genetics, and clinical aspects of hereditary angioedema with and without C1 inhibitor deficiency	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Allergol Int	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) 10.1016/j.alit.2023.04.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 宮田敏行
2. 発表標題 補体系の血栓・凝固異常症への関わり
3. 学会等名 第57回日本補体学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻明宏、関根章博、浅野遼太郎、上田仁、青木竜男、保山美由紀、根木玲子、小亀浩市、宮田敏行、大郷剛
2. 発表標題 アンチトロンビン抵抗性を示すプロトロンビン変異を伴う3症例の検討
3. 学会等名 第43回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三好剛一、丸山慶子、根木玲子、吉松 淳、浅原彩子、奥久人、小亀浩市、宮田敏行
2. 発表標題 プロテインS(PS)比活性検査およびPS-K196E変異検出ELISAのPS-K196E変異予測精度に関する検討
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 辻明宏、和田英夫、森下英理子、野上恵嗣、荻原義人、松下正、小嶋哲人、大郷剛、根木玲子、小亀浩市、安田聡、関根章博、宮田敏行
2. 発表標題 特発性血栓症患者のゲノム情報を用いた層別化による病態解明研究
3. 学会等名 第42回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tsuji A, Sekine A, Wada H, Morishita E, Ogihara Y, Nogami K, Kojima T, Matsushita T, Yamada N, Ogo T, Neki R, Kokame K, Yasuda S, Miyata T
2. 発表標題 Genetic study for idiopathic venous thromboembolism in Japanese using short-read and long read sequencers, a pilot study of Japanese Group of Idiopathic Thromboembolism
3. 学会等名 The 28th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Toshiyuki Miyata
2. 発表標題 Venous thromboembolism and TTP, aHUS
3. 学会等名 The 41th Congress of the Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Miyoshi, H. Oku, S. Asahara, A. Okamoto, K. Kokame, M. Nakai, K. Nishimura, F. Otsuka, A. Higashiyama, J. Yoshimatsu, T. Miyata
2. 発表標題 Effects of Low-dose Combined Oral Contraceptives and Protein S K196E Mutation on Anticoagulation Factors: A Prospective Observational Study
3. 学会等名 The 27th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮田敏行
2. 発表標題 静脈血栓塞栓症と血液凝固制御能
3. 学会等名 第71回日本産婦人科学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計3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	根木 玲子 (NEKI Reiko) (90600594)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・室長  (84404)	
研究分担者	辻 明宏 (TSUJI Akihiro) (70598367)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・医師  (84404)	
研究分担者	関根 章博 (SEKINE Akihiro) (30425631)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・オープンイノベーションセンター・客員部長  (84404)	
研究分担者	小亀 浩市 (KOKAME Koichi) (40270730)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長  (84404)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------