

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K17795

研究課題名（和文）包括的アプローチによる血管型エーラス・ダンロス症候群の分子遺伝学的発症機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of pathomechanism for vascular Ehlers-Danlos syndrome using a comprehensive approach

研究代表者

山口 智美（Yamaguchi, Tomomi）

信州大学・学術研究院医学系（医学部附属病院）・助教

研究者番号：90802835

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）：エーラス・ダンロス症候群（EDS）（全14病型）は組織脆弱性を特徴とする。その中で血管型EDSは、動脈病変、S状結腸破裂などの致命的な合併症を生じうる。本研究では、次世代シーケンス（NGS）を軸とした革新的遺伝子解析を通じて血管型EDSの分子遺伝学的発症機序の包括的解明を目指した。NGSデータを用いたコピー数解析により原因が特定された例を国際誌に発表した。全ゲノムまたはCRISPR/Cas9系産物を用いたロングリードNGS構造解析、イントロン深部等を想定した皮膚線維芽細胞由来mRNAまたはゲノムDNA由来のLong-PCR産物を用いたロングリードNGS解析では原因特定には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原因の特定に至った症例は少なかったが、構築した遺伝子解析基盤は研究代表者が担当するEDSの遺伝学的検査体制およびEDS患者の診療の向上に貢献しうるものと考えられる。また、血管型EDS疑い例の中に、類古典型EDS 1型の診断確定者、保因者をそれぞれ1例見出した。原因遺伝子に両アレル性の病的バリエーションを有する前者、および後者の親は消化器関連症状を示した。NGSでの解析が困難とされてきた類古典型1型において独自のNGS解析法を開発したことにより、類古典型1型においても消化器関連症状のリスクが高いことを示した。これは、血管型EDSの分子遺伝学的機序を考える上で重要な所見となった。

研究成果の概要（英文）：Ehlers-Danlos syndrome (EDS), classified into 14 subtypes, is characterized by tissue fragility. Vascular EDS can cause fatal complications such as arterial lesions and sigmoid colon rupture. The aim of this study is to elucidate pathomechanism comprehensively for vascular EDS through innovative genetic analyses based on next-generation sequencing (NGS). A patient with vascular EDS caused by a pathogenic variant detected by copy number variation analysis using NGS data was published in an international journal. No variant was detected either by long-read NGS structural analysis using whole genome or CRISPR/Cas9-based products, or by long-read NGS analysis using long-PCR products from skin fibroblast-derived mRNA or genomic DNA for detecting deep intron variants as well as variants at regulatory regions.

研究分野：分子生物学

キーワード：血管型エーラス・ダンロス症候群 遺伝性結合組織疾患 次世代シーケンス 分子遺伝学的発症機序

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エーラス・ダンロス症候群 (EDS) は皮膚・関節の過伸展性、各種組織の脆弱性を特徴とする遺伝性結合組織疾患である。その中で、Ⅰ型プロコラーゲン遺伝子 (*COL3A1*) の病的バリエーションに基づく血管型 EDS は、動脈病変、S 状結腸破裂、子宮破裂などの致命的な合併症を生じうる重症病型である。

信州大学医学部附属病院遺伝子医療研究センターでは、次世代シーケンス (NGS) を利用した *COL3A1* を含む遺伝性結合組織疾患・原因遺伝子パネル解析を全国に先駆けて実施してきた。血管型 EDS が疑われた 88 例のうち、7 割弱において病的バリエーションは検出されず、コピー数異常を含む構造異常、イントロン深部・転写調節領域・他の遺伝子における病的バリエーションの存在が想定されている。

2. 研究の目的

本研究では、NGS パネル解析陰性例に対して、NGS を軸とした革新的遺伝子解析技術である、(1) NGS データを用いたコピー数解析、(2) mRNA 解析、(3) ロングリード NGS による全ゲノム解析を通じて、血管型 EDS の分子遺伝学的発症機序の包括的解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) NGS データを用いたコピー数解析: Ion Torrent システム (ThermoFisher Scientific 社) を用いた NGS 解析において産出される、領域ごとの読み取り回数のデータをサンプル間で比較することによって行った。

(2) mRNA 解析: イントロン深部や転写調節領域のバリエーション検出を目的として、皮膚線維芽細胞 (新規培養検体も含む) から RNA を抽出し、逆転写後、Long-PCR を行い、ロングリード NGS で解析した。

(3) ロングリード NGS による全ゲノム解析: 全ゲノムを対象としたロングリード NGS により構造解析を実施した (遺伝子全域でのコピー数異常があった 1 例)。その後、低コストで同時に多数の検体を解析するべく、解析対象を Long-PCR 産物あるいは CRISPR/Cas9 システムで得られた産物に変更した。皮膚線維芽細胞が得られない検体に対してはゲノム DNA からの Long-PCR 産物を用いてイントロン深部や転写調節領域のバリエーション検出を試みた (図 1A)。遺伝子全域でのコピー数異常を認めた別の例に対しては、CRISPR/Cas9 システムで得られた産物により構造異常の解析を試みた (図 1B)。

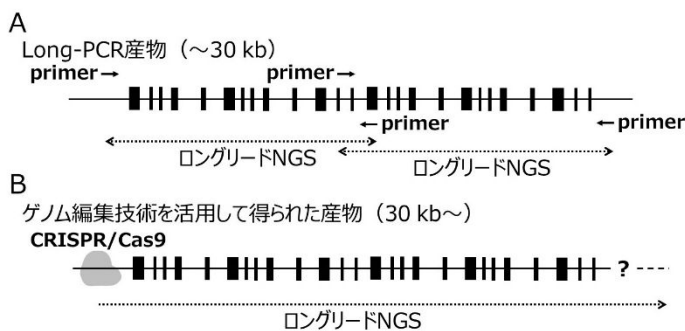


図1. イントロン深部・転写調節領域・大規模構造異常の探索

4. 研究成果

NGS データを用いたコピー数解析は全 491 例に対して実施した。8 例において EDS 関連遺伝子にコピー数異常を認めた (一部エクソンに増減を認めた 4 例と遺伝子全域で増減を認めた 4 例)。MLPA 法による検証を行い、コピー数異常を確定した。血管型 EDS における NGS パネル解析結果 (NGS データを用いたコピー数解析結果を含む) についてまとめた論文を国際誌に発表した (図 2)。

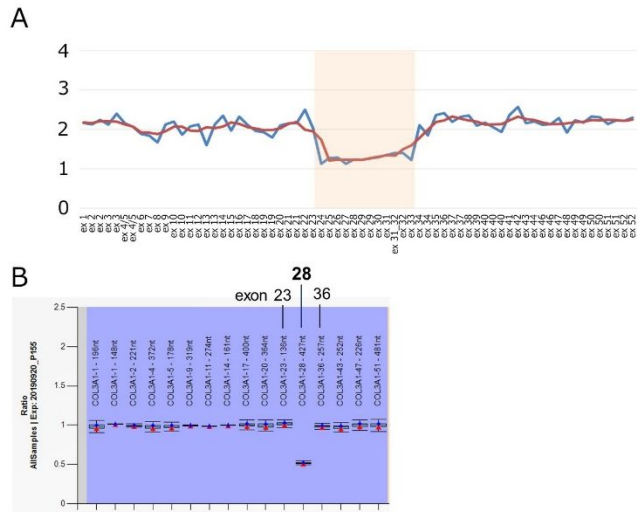


図2. コピー数異常
A) NGSデータを用いたコピー数解析、B) MLPA法による確認

全ゲノムまたは CRISPR/Cas9 系産物を用いたロングリード NGS 構造解析、イントロン深部等を想定した皮膚線維芽細胞由来 mRNA またはゲノム DNA 由来の Long-PCR 産物を用いたロングリード NGS 解析で遺伝学的に診断確定した例はなかった。しかし、構築した遺伝子解析基盤は研究代表者が担当する EDS の遺伝学的検査体制および EDS 患者の診療の向上に貢献しうるものと考えられた。今後も引き続き解明に取り組みたい。

また、血管型 EDS が疑われていた症例の中に、類古典型 EDS 1 型の診断確定者、保因者をそれぞれ 1 例見出した。原因遺伝子に両アレル性の病的バリエントを有する前者、および後者の親は消化器関連症状を示した。血管型 EDS の診断基準には大基準として S 状結腸破裂が含まれており、EDS の中でも消化器合併症を有する印象が強い。NGS での解析が困難とされてきた類古典型 1 型において独自の NGS 解析法を開発したことにより、類古典型 1 型においても消化器関連症状のリスクが高いことを示した。これは、血管型 EDS の分子遺伝学的機序を考える上で重要な所見となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamaguchi T, Hayashi S, Hayashi D, Matsuyama T, Koitabashi N, Ogiwara, Noda M, Nakada C, Fujiki S, Furutachi A, Tanabe Y, Yamanaka M, Ishikawa A, Mizukami M, Mizuguchi A, Sugiura K, Sumi M, Yamazawa H, Izawa A, Wada Y, Fujikawa T, Takiguchi Y, Wakui K, Takano K, Nishio S Y, Kosho T	4. 巻 191
2. 論文標題 Comprehensive genetic screening for vascular Ehlers-Danlos syndrome through an amplification based next generation sequencing system	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 American Journal of Medical Genetics Part A	6. 最初と最後の頁 37-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ajmg.a.62982	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 Yamaguchi T, Yamada K, Nagai S, Nishikubo T, Koitabashi N, Minami-Hori M, Matsushima M, Shibata Y, Ishiguro H, Sanai H, Fujikawa T, Takiguchi Y, Matsumoto KI, Kosho T.	4. 巻 14
2. 論文標題 Clinical and molecular delineation of classical-like Ehlers-Danlos syndrome through a comprehensive next-generation sequencing-based screening system.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 1234804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fgene.2023.1234804	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山口智美
2. 発表標題 Ion Torrentシステムにおけるコピー数異常検出法の有用性：遺伝性結合組織疾患関連遺伝子カスタムパネルに注目して
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第65回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口智美
2. 発表標題 Clinical Sequencing for Vascular Ehlers-Danlos Syndrome Using Panel-Based Next-Generation Sequencing
3. 学会等名 Scientific Meeting Rarer types of EDS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口智美
2. 発表標題 古典型様エーラス・ダンロス症候群9症例の臨床的・分子遺伝学的特徴
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第67回大会
4. 発表年 2022年

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

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
---------	---------