

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10569

研究課題名(和文) DNAメチル化を中心とした心臓突然死診断への多角的アプローチ

研究課題名(英文) A multilateral approach to the diagnosis of sudden cardiac death centering on DNA methylation

研究代表者

橋谷田 真樹 (HASHIYADA, Masaki)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40374938

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)：突然死例の心筋を試料として、ゲノムワイドなメチル化解析、および心疾患関連遺伝子変異解析、薬剤代謝系遺伝子変異解析を行い、他の死因の試料と比較した。さらに、同一個体の心筋と血液のミトコンドリアDNA解析を行い、その全塩基配列を比較した。メチル化解析の結果ではATP10遺伝子のメチル化に突然死独特の変異が見られ、心疾患関連遺伝子の変異も複数例において確認された。ミトコンドリアDNAでは、血液と心筋で配列が異なるヘテロプラスミーが観察され、心筋での変異が突然死に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓突然死例は剖検所見のみからでは死因の判断に苦慮することが多い。そこで、先天的要因である心疾患系遺伝子解析に加え、薬剤代謝系遺伝子変異解析、さらには後天的な外的要因となる心筋のメチル化、およびミトコンドリアDNA解析を行うことで多方面からの死因究明が可能となった。死因を正確に判断することで、法律の公正な適用、あるいは公衆衛生の向上に資するという法医学の社会的要請に応えることができる。

研究成果の概要(英文)：Genome-wide methylation analysis, cardiac disease-related gene mutation analysis, and drug metabolism gene mutation analysis were performed on myocardial samples from sudden death cases, and compared with samples from other causes of death. In addition, mitochondrial DNA analyses were performed on the myocardium and blood of the same individuals, and their complete sequences were compared. Methylation analysis revealed mutations unique to sudden death in methylation of the ATP10 gene, and mutations in cardiac disease-related genes were also identified in several cases. In mitochondrial DNA, heteroplasmy was observed between blood and myocardium, suggesting that mutations in myocardium may be involved in sudden death.

研究分野：法医遺伝学

キーワード：DNAメチル化解析 心臓突然死 ゲノム変異解析 ミトコンドリアDNA 次世代シーケンサー

### 1. 研究開始当初の背景

死因を正確に判断することは、法律の公正な適用、あるいは公衆衛生の向上に資するという法医学の社会的要請に応えるためには必要不可欠である。しかし、剖検所見からのみではその判断に苦慮する事例が稀ならず存在する。その場合「精神的や身体的なストレスが契機となり、交感神経系の異常興奮が生じ、その結果、血圧や心拍の上昇による心負荷の亢進などにより、重篤なポンプ不全や不整脈が生じ、突然死がもたれられた可能性がある」と説明されることが多い。つまり外的ストレスが重要な要因であるとされ、剖検所見のみから因果関係に関する判断は困難であると言える。このように形態的なエビデンスが乏しいケースでは、死因究明のために molecular autopsy を行うのが望ましいとされる。Molecular autopsy とは、剖検で得られたゲノム DNA を用いて網羅的に変異解析を行うことである。しかしながら、これらはあくまでも単なる「リスクファクター」でしかない。他のマーカーを探しても、タンパク質や mRNA は死後すぐに変性・分解することから、法医学の分野では用いることができない。そこで新たに注目したのがエピジェネティクスと加齢によるミトコンドリア DNA 変異である。これらはゲノム変異による先天的疾患とは別に後天的に変化することから、死亡直前のストレスの影響を確実に反映していると思われる。最終的にはゲノム変異解析、DNA メチル化解析、そしてミトコンドリア DNA 解析のデータから多角的に心臓突然死の判断基準を構築しようとするものである。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、突然死の剖検例において心筋のゲノムの変異情報と、メチル化情報、ミトコンドリア DNA 情報を統合して、多角的なアプローチから診断方法を構築することである。つまり、ゲノム変異のような先天的な遺伝的要因と DNA メチル化やミトコンドリア DNA 変異のような後天的な外的要因を統合し、診断へのアプローチを行うわけである。これまでに心臓突然死に関連するゲノム変異の研究は数多くなされておられ、表現系と変異の関係をまとめたデータベースも複数存在している。また、心疾患と DNA メチル化に関する研究も同様に循環器系の分野で盛んに行われている。特にミトコンドリア DNA は、心筋において老化と共に変異が蓄積され、ある閾値を超えるとミトコンドリア病を発症することが知られている。これらの解析には主にキャピラリー電気泳動装置が用いられてきたが、本研究では「次世代シーケンサーを用いて行う点が大きな特徴であり、他の研究と大きく違う点である。ゲノム変異は一人当たり 1 万を超える single nucleotide polymorphism (SNP) の解析が可能であり、ミトコンドリア DNA も全領域が解析可能である。特に DNA メチル化解析に関しては、キャピラリーではメチル化されているか否かの判断しかできないが、次世代シーケンサーを用いることで、どの程度メチル化されているかのメチル化率を算出することが可能である。ミトコンドリア DNA 解析も同じように、血液由来の配列と、心筋由来の配列の変異率が算出できる。それら結果の非常に細やかなデータを用いることで、表現系との関連を考察することができる。

### 3. 研究の方法

心筋のメチル化解析は、ホールエクソンに近い数のメチル化部位を測定し、心臓突然死群と対照群との比較を行い、死因によって違いのあるメチル化部位を特定した。これは高性能な次世代シーケンサーが必要となるため、外注とした。解析した試料は、当講座にて解剖に付された突然死例のうち、3 例の乳幼児突然死例 (SID) (4 M 男児, 4 M 女児, 20 M 男児) と心筋炎 1 例 (2 M)、窒息 1 例 (1 M)、ダウン症候群 1 例 (2 M)、そして若年性突然死 (SUD) 1 例 (15 歳) の 7 例に加え、比較対象として脳内出血 1 例 (57 歳) の解析を行った。これらの心筋から抽出したゲノム DNA を用いて、MethylationEPIC BeadChip Kit and iSCAN system で反応を行い、そのチップを iSCAN System、および GenomeStudio software (以上全て illumina) を用いて解析を行った。このチップは 85 万ヶ所のメチル化部位の解析が可能であり、それぞれの部位にて「メチル化率」を算出した後、心臓突然死群と対照群とでメチル化率の増減を判断した。なお、病態とメチル化された遺伝子との関連については、メチル化データベース「EWAS Atlas」(<https://bigd.big.ac.cn/ewas/index>)にて検索した。

心臓疾患系遺伝子変異解析は、プライマーキットである Ion AmpliSeq Cardiovascular Research Panel を用いて増幅した。このキットは心臓血管疾患 404 遺伝子の coding region をカバーし、10,430 の SNP を一度に解析することができる。また、薬剤代謝系遺伝子変異解析は、Ion AmpliSeq Pharmacogenomics Panel による 119 遺伝子、137 SNP を解析するプライマーセットを用いた。増幅したのち、Ion AmpliSeq Library Kit でライブラリを調整後、Ion Chef System でテンプレート作製し、Ion Gene Studio S5 にてシーケンスを行い、付属の解析ソフト (Plug-in) で変異解析を行った。

ミトコンドリア DNA 解析は、新たに別の試料から DNA を抽出し、試料とした。1 歳以下の乳幼児突然死 9 例、19~90 歳の突然死を含む成人 6 例である。それぞれ、剖検時に血液と心筋中隔部位を採取し、それぞれ DNA を抽出した。Precision ID mtDNA Whole Genome Panel を用いて mtDNA 全領域の増幅を行い、上記と同じ方法でデータを取得した。得られたシーケンスデータは、

Converge ソフトウェアで参照配列(rCRS)との変異解析を行った。なお、この研究は関西医大の倫理委員会の承認を得ており、ゲノム変異解析に使用した試薬・機器はすべて Thermo Fisher Scientific 社製である。

#### 4. 研究成果

##### (1) 心筋のメチル化解析

3例のSIDと心筋炎例におけるメチル化の違いを比較すると、心筋炎例ではHLA遺伝子関連部位が高度にメチル化されており、心筋炎との関連性が疑われた。SID3例と窒息例では、メチル化レベルが著しく変化した部位は見られなかった。SID3例とダウン症候群例では、IQGAP2, LMX1B, MSRA, PTPRN2, および DENND3 などのダウン症候群関連遺伝子においてメチル化レベルの大幅な増加または減少が見られた。SIDとSUDでは、メチル化レベルが大きく変化したすべての遺伝子は加齢に関連しているものであり、年齢差を反映している結果であると思われる。これら結果の中で最も注目されたのがATP10A遺伝子のメチル化の違いである。SIDとSUDの比較を除くすべての比較結果で検出された。ATP10A遺伝子はATPaseクラスVタイプ10A酵素をコードし、喘息や慢性閉塞性肺疾患などのいくつかの疾患に関連しているとされている。ATP10A遺伝子におけるメチル化レベルの変化は突然死と何らかの関連があるのでないだろうかとの推察される。したがってこの部位のメチル化の変化は突然死の生体マーカーとなる可能性を秘めている。

##### (2) 心臓疾患系遺伝子変異解析

上記メチル化解析を行った8例において心疾患関連遺伝子解析を行ったところ、多数の変異が見られた。それらのSNPを疾患とSNPのデータベースであるClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>)で検索したところ、病原性と判断されたものが複数確認された。それらを表1に示す。このように、剖検例において多数のSNPを解析することをmolecular autopsyと呼ぶが、このような変異解析はあくまでもリスクファクターとして捉えられるものであり、確実な診断を行うための根拠とするには難しい。

表1. ClinVarによるSID例の病原性変異

Case	Genes	Type	Coding	Amino Acid Change
Sudden infant death (SID) 4M,	CFH	Homo	c.1204C>T	p.His402Tyr
	KCNIP1	Hetero	c.193G>A	p.Glu65Lys
	STOX1	Hetero	c.1494A>C	p.Glu498Asp
	CST3	Hetero	c.73G>A	p.Ala25Thr
Sudden infant death (SID) 4M,	CFH	Homo	c.1204C>T	p.His402Tyr
	STOX1	Hetero	c.1494A>C	p.Glu498Asp
	ADRB1	Hetero	c.145A>G	p.Ser49Gly
Sudden infant death (SID) 20M,	TBX1	Hetero	c.928G>A	p.Gly310Ser
	CFH	Hetero	c.1204C>T	p.His402Tyr
	CETP	Hetero	c.1376A>G	p.Asp459Gly

さらに、ホルマリン固定された臓器からの解析を試みた。ホルマリン固定された臓器を試料として、次世代シーケンサーによるゲノム変異解析を試みた。症例は60歳代男性で、特に既往歴・家族歴はなく、就寝中に心肺停止となり救急搬送されたが回復せず、死因究明のため剖検となった事例である。心筋中隔、腎臓、および肝臓の一部をホルマリン固定した後、市販のキットにてDNA抽出を行なった。上記と同じようにIon GeneStudio S5 Systemを用い、心臓血管疾患404遺伝子変異解析を行ったところ、ClinVerによると9個の心疾患と関連がある変異が確認された。そのうちSCN5A遺伝子の変異は病原性があるものであり、死因となった致死性不整脈との関連が疑われた。このようにホルマリン固定された臓器からの次世代シーケンサーによるゲノム解析が可能であることが確認された。

##### (3) 薬物代謝系遺伝子変異解析

新たに、死因が心臓突然死と思われる15例からDNAを採取した。年齢は0歳から90歳であり、男性11例、女性4例、2歳以下の乳幼児9例を含んでいる。薬剤代謝関連遺伝子の解析にはIon Ampliseq Pharmacogenomics Panelによる119遺伝子、137SNPを解析するプライマーセットを用いた。増幅後、上記と同じS5 Systemによる次世代シーケンサーを用いて塩基配列のデータを収集し、Plug-inソフトウェアおよびクラウドのIon Reporterを用いて多型解析を行なった。薬剤代謝関連遺伝子の解析では137SNPタイプ

ゲ結果が得られているが、中でも特に CYP1A, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 遺伝子は薬物代謝に重要な役割を担っており、この部分の SNP に関しては、それぞれの処方された薬物と照らし合わせて判断する必要が感じられた。

#### (4) ミトコンドリア DNA 解析

mtDNA に変異が存在すると極めて重篤となる臨床症状を示し、これらはミトコンドリア病と呼ばれている。先天性で持つと乳幼児から症状が見られるが、十分成長した後にミトコンドリア病を発症することもある。これは時間が経過すると共に変異を持つ mtDNA の数が増加し、ある閾値を超えると臨床症状が出ると考えられているからである。特に心臓でこれが起きると心筋症の症状が出現し、突然死に至ることもあり得る。今回の試料では、心筋と血液で全く同じ配列を示したのは 15 例中 3 例のみであり、心筋に生じた mtDNA の変異は蓄積されることが確認された。病原性変異は観察されなかったが、ATP8 遺伝子エクソン中に塩基置換があるものが 1 例 (4M, 就寝中の突然死) で観察された。また、5 例において、NADH dehydrogenase, subunit 4 遺伝子の 11038 部位に変異が観察された。これらの変異と死因との関連はまだ不明であるが、心筋と血液間でのヘテロプラスミーや心筋内でのヘテロプラスミーの存在が複数例で観察されており、心臓突然死には心筋のゲノム変異のみならず、mtDNA 変異が関与している可能性が示唆された。

## 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 X.Guan, T.Ohuchi, M.Hashiyada, M.Funayama.	4. 巻 53
2. 論文標題 3.Age-related DNA methylation analysis for forensic age estimation using post-mortem blood samples from Japanese individuals.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Legal Medicine	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.legalmed.2021.101917	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 Sho Manabe, Koji Fujii, Takashi Fukagawa, Natsuko Mizuno, Kazumasa Sekiguchi, Kana Inoue, Masaki Hashiyada, Atsushi Akane, Keiji Tamaki.	4. 巻 52
2. 論文標題 4.Evaluation of probability distribution models for stutter ratios in the typing system of GlobalFiler and 3500xL Genetic Analyzer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Legal Medicine	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.legalmed.2021.101906	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 Sohsaku Yamanouchi, Takahisa Kimata, Masaki Hashiyada, Atsushi Akane, Shoji Tsuji, Kazunari Kaneko.	4. 巻 76
2. 論文標題 2.Decreased butyric acid producing bacteria in gut microbiota of children with eggs.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergy	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/all.14795	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 Tadashi Yamaguchi, Shoji Tsuji, Shohei Akagawa, Yuko Akagawa, Jiro Kino, Sohsaku Yamanouchi, Takahisa Kimata, Masaki Hashiyada, Atsushi Akane and Kazunari Kaneko.	4. 巻 13
2. 論文標題 1.Clinical Significance of Probiotics for Children with IdiopathicNephrotic Syndrome.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 365
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu13020365	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 1.Haitian Nan, Kensho Okamoto, Lihua Gao, Yuto Morishima, Yuta Ichinose, Kishin Koh , Masaki Hashiyada , Noboru Adachi and Yoshihisa Takiyama.	4. 巻 59
2. 論文標題 A Japanese SPG4 Patient with a Confirmed De Novo Mutation of the SPAST Gene.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Intern Med Advance Publication	6. 最初と最後の頁 2311-2315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.4599-20	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 橋谷田真樹, 中西宏明, 大澤資樹, 眞鍋 翔, 松本智寛, 大林将弘, 赤根 敦
2. 発表標題 プラズマ滅菌によるDNAコンタミネーション除去効果 EOG滅菌との比較
3. 学会等名 第105次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹森杏梨, 眞鍋 翔, 橋谷田真樹, 大内 司, 関 セツテイ, 舟山真人, 赤根 敦
2. 発表標題 74マイクロハプロタイプマーカーを用いた日本人における多型解析
3. 学会等名 DNA多型学会第30回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 眞鍋 翔, 橋谷田真樹, 大林将弘, 榎本祐子, 松本智寛, 赤根 敦
2. 発表標題 3人の関与が疑われるDNA混合試料の鑑定例
3. 学会等名 第68回日本法医学会学術近畿地方集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本智寛, 榎本祐子, 橋谷田真樹, 眞鍋 翔, 大林将弘, 赤根 敦
2. 発表標題 薬物スクリーニングキットIVex-screenの交差反応性等に関する検討
3. 学会等名 第68回日本法医学会学術近畿地方集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋谷田真樹, 大林将弘, 松本智寛, 赤根 敦
2. 発表標題 DNAメチル化解析を中心とした心臓突然死診断への多角的アプローチ
3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋谷田真樹, 眞鍋 翔, 大林将弘, 松本智寛, 赤根 敦
2. 発表標題 ある親子鑑定例に見られたD19S433座位におけるサイレントアレル
3. 学会等名 第67回日本法医学会学術近畿地方集会.
4. 発表年 2020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
---------	---------