

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17162

研究課題名（和文）超長寿者を比較対象とした肺高血圧患者の遺伝子構造異常解析とリスク評価

研究課題名（英文）The analysis of genetic structural abnormality in patient with plumonary hypertension in comparison with centenerian and risk assesesment

研究代表者

鈴木 寿人（Suzuki, Hisato）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：80783042

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）：遺伝性背景が不明の肺高血圧症患者に対して全ゲノムシーケンスを実施し、発症の病態の探索を行った。単一遺伝性疾患と多因子遺伝性疾患を想定し、単一遺伝性疾患としては、GWASやエクソームシーケンスでは検出困難な遺伝子構造異常の検出を試みた。多因子遺伝性疾患としては、血管の緊張度、血管壁の弾力性の異常、脂質代謝異常、凝固異常を引き起こしうる希なバリエーションに絞り込み、その相互作用を検証した。11家系の患者に全ゲノムシーケンスを実施し、単一遺伝性疾患モデルの原因となりうる遺伝子構造異常は検出されず、多因子遺伝性疾患モデルの原因となりうる遺伝子バリエーションは3件検出されたが、病的意義の確立には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では肺高血圧症患者に対する全ゲノムシーケンスを実施し、これまで多く実施されてきたGWASやエクソームシーケンスでは検出困難な遺伝子構造異常、コピー数多型を検出し、それらを臨床医が評価しやすいパイプラインを構築することができた。この成果は肺高血圧症のみならず他の疾患でも役立てることが可能である。本研究を通じて、肺高血圧症の原因として3つの遺伝子の関与を検出し、それぞれの意義について検討したが、疾患との関連性の確立には至らなかった。今後、機能解析を通じてその病的意義を確立することで疾患の病態解明に役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Whole genome sequencing was performed on pulmonary hypertension patients with unknown genetic background to explore the pathogenesis of the disease. We assumed a monogenetic disease and a polygenetic disease for pulmonary hypertension. For the monogenetic disease, we attempted to detect abnormalities in gene structure, which are difficult to detect by GWAS and exome sequencing. Whole genome sequencing was performed on patients from 11 families, and no gene structural abnormalities were detected. For polygenetic disease approach, we focused on rare variants that can cause abnormalities in vascular tone, vascular wall elasticity, lipid metabolism, and coagulation, and examined their interactions. Three rare variants were detected in patients from 11 families, but their pathological significance could not be established.

研究分野：遺伝学

キーワード：肺高血圧症 全ゲノム解析 遺伝子構造異常 血管内皮細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肺高血圧症は原因遺伝子として *BMP2*, *ENG*, *ACVRL1*, *RNF213* などの疾患と強く関連する遺伝子が知られている。しかし、疾患関連遺伝子が特定されるのは患者の 3-4 割程度であると推定され、残りの原因はわかっていない。我々は、原因遺伝子が検出できない理由について 2 つの仮説を立てた。(1)従来 of Genome Wide Association Study やエクソーム解析では検出困難な遺伝子異常である可能性、(2)複数の遺伝子変異により複合的に発症している可能性、である。(1)については、全ゲノムシーケンスによって遺伝子構造異常やコピー数多型について検討を行う。(2)については、血管の緊張度、血管壁の弾力性の異常、脂質代謝異常、凝固異常などの要因が関与していることを想定し、これらの複合的な要素による発症の検討を行う。これらの原因を特定することで、肺高血圧症をより良く理解し、医学管理に活用することができる。

### 2. 研究の目的

本研究の最終的な目的としては、肺高血圧症の病態を突き止め、医学的管理(使用薬剤ごとの治療反応性、肺移植の適否、予後予測など)に役立てることが目的とされる。その病態理解のためには、原因を把握することが重要であり、本研究を計画した。

既知の遺伝子異常が特定されていない肺高血圧症患者に対して、(1)従来法の GWAS やエクソームシーケンスでは検出できない遺伝子の変化を有している単一遺伝性疾患を想定したアプローチ法と(2)複数のリスクとなる遺伝子の変化が積み重なって発症している、多因子性疾患を想定したアプローチ法の 2 つを実施し、肺高血圧症の病態に迫ることが目的である。病態の予測が付けられれば、それぞれの遺伝子の変化を有する患者ごとの臨床症状を検索し、どのような臨床症状、治療反応性、予後となっているか調査を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 単一遺伝性疾患を想定した遺伝子の変化の検出

GWAS やエクソーム解析では検出困難な変化として、遺伝子構造異常があげられる。GWAS は個別の一塩基多型 (SNP) のみの検出であり、エクソームシーケンスはエクソン領域をキャプチャーし、PCR 増幅してその部分のみのリードを検出する技術であるため、エクソンごとに増幅しやすい領域、しにくい領域があり、連続性がない。また、イントロン領域や遺伝子間領域に Break point があつた場合には検出することができない。そこで、染色体全体を比較的均一にシーケンスをすることができる全ゲノムシーケンスを実施し、遺伝子構造異常の検出を試みる。遺伝子構造異常を検出するツールとして、比較的高性能と報告されていた Manta, TIDDIT, Breakdancer などのアルゴリズムが知られているが、これらについては出力データ量が多く、解釈が困難となっていた。国内のアルゴリズム開発者である白石友一博士と連携し、確度の高い遺伝子構造異常のみを検出する GenomonSV を用いて検証を行う。また、その他の遺伝子構造異常、コピー数多型検出ツールを併用して検出を行う。

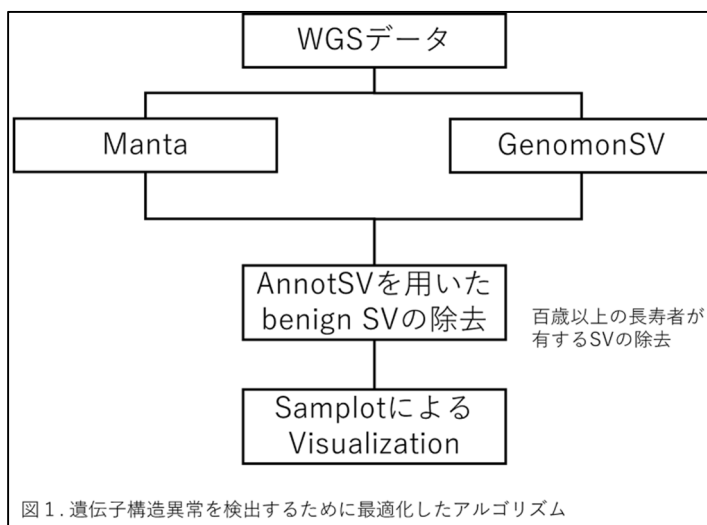
#### (2) 複数のリスクとなる遺伝子の変化の検出

肺高血圧の病態を考えると、血管の緊張度、血管壁の弾力性の異常、脂質代謝異常、凝固異常が原因となっている可能性が高い。肺高血圧症の原因遺伝子としては未確立であるが、症例報告として肺高血圧症が症状として記載のある遺伝子のバリエーションについて検討を行う。

### 4. 研究成果

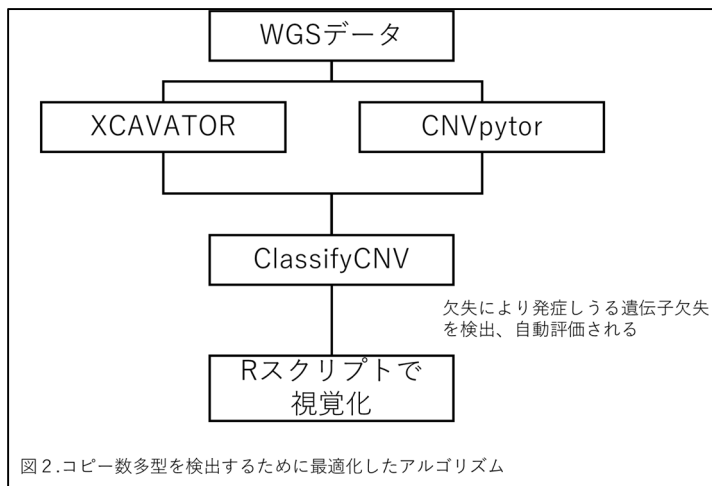
#### (1) 単一遺伝性疾患を想定した遺伝子の変化の検出

11 家系の特発性肺高血圧症患者の全ゲノムシーケンスを実施し、遺伝子構造異常検出ソフトウェアを適応した。



これまでに多くの論文で採用されている Manta、国内で開発された GenomonSV、コピー

数多型を検出するソフトウェア群としては、XCAVATOR, CNVpytor を適応した。GenomonSV, Manta については、100 歳以上の百寿者の全ゲノムシーケンスデータも同様に解析し、百寿者で確認された遺伝子構造異常については、無害なものとして除外フィルターとして用いた。さらに、遺伝子構造異常を示す出力ファイルについて、座標のみを羅列したリストとしての出力は視認性が悪いため、Samplot を用いて、遺伝子構造異常を視覚化し、臨床医でもその遺伝子構造異常がどの遺伝子上に発生したものか、解釈が容易な画像ファイ



ルとしての変換を行った。

本研究で実施した 11 家系の全ゲノムシーケンスでは、肺高血圧症の原因遺伝子として既知の遺伝子構造異常を検出することはできなかった。しかしながら、全ゲノム解析による遺伝子構造異常の検出アルゴリズム、結果の視認性の向上には役立てることができた。

## (2) 複数のリスクとなる遺伝子の変化の検出

血管の緊張度、血管壁の弾力性の異常、脂質代謝異常、凝固異常と関連のある遺伝子のバリエーションの抽出を行ったところ、11 家系のうち 3 家系から候補となりうる遺伝子の稀なバリエーションを検出することができた。

### *KLF2*

*KLF2* は転写因子の 1 つであり、Kruppel-like transcription factor ファミリーのタンパク質の 1 つである。この *KLF2* 遺伝子を欠損させたマウスによる研究では血管形成に必須のタンパク質の 1 つであるとされ、また動脈硬化の好発部位では発現低下が確認されている報告もある。本遺伝子の機能低下により、血管壁の硬化が進行しやすくなっている可能性が示唆された。

### *FLNA*

*FLNA* 遺伝子はフィラミン A をコードしており、X 連鎖性顕性遺伝形式で脳室周囲結節性異所性灰白質や Melnick-Needles syndrome の原因遺伝子として知られている。その働きは、血管発達と心臓の形態形成における細胞と細胞の接着機能に関与していると考えられる。特に Melnick-Needles syndrome の 1 つの症状として、肺高血圧症が希少疾患データベース (OMIM) にも登録されており、関連性が示唆される。

### *TNXB*

*TNXB* 遺伝子 (Tenascin XB) は細胞外マトリックスの糖タンパク質であるテナシン-X をコードする疾患との関連として、常染色体潜性遺伝形式で古典型エーラス・ダンロス症候群、常染色体顕性遺伝形式で Vesicoureteral reflux8 (OMIM# 615963) の原因遺伝子として報告がある。いずれも軟部組織の異常に基づく疾患であり、Vesicoureteral reflux 8 の症状の 1 つに高血圧が挙げられている。コラーゲン繊維の形成を促進することが示唆されており、本遺伝子の異常によって正常な血管形成ができなくなっているのではないかと推測される。

検出された 3 つのバリエーションについては、いずれも The American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) が提唱する Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants に基づいて評価を行うと、Variant of Uncertain Significance に分類される。既報もない遺伝子バリエーションであり、今回検出されたバリエーションが機能喪失型であるか、機能亢進型であるか、あるいは影響を及ぼさないバリエーションかわかっていない。また、今回の目的である異なる遺伝子のバリエーションが相互作用によって疾患を発症している可能性については、複数のバリエーションを検出した患者がおらず、検証することができなかった。

今後の研究課題として、一般健常者集団の頻度情報での除外を 1% 以下から緩和し、検出されるバリエーションを増やし、そこからバリエーション間相互作用を検討していく必要性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

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

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