

# 難病疾患-肺動脈性肺高血圧症の新規原因遺伝子同定を含めた 発症機序全容解明研究 中間報告

佐藤 徹<sup>1)</sup> 千葉 知宏<sup>2)</sup> 相見 祐輝<sup>1)</sup>  
伊波 巧<sup>1)</sup> 蒲生 忍<sup>3)</sup>

1) 杏林大学医学部第二内科学教室

2) 杏林大学医学部病理学教室

3) 杏林大学 名誉教授

肺動脈性肺高血圧 (Pulmonary Arterial Hypertension, 以下PAH) は病因などにより、膠原病や先天性心疾患に伴うPAH, HIV感染や薬物誘発性PAH等の発症要因を特定できるPAHに加えて、「特に原因となる疾患の存在を指摘することができない特発性PAH (idiopathic PAH, 以下IPAH)」等に細分類される。IPAHの中には家族性の症例が含まれ、2000年に染色体2q33に存在する2型骨形成タンパク受容体 (Bone Morphogenetic Protein Receptor 2, 以下BMPR2) 遺伝子の変異が家族性PAH症例で発見され、これを端緒にBMPR2遺伝子の変異の検索が広汎に進められた。2008年米国ダナポイントで開催されたシンポジウムで「遺伝性PAH (heritable PAH, 以下HPAH)」のカテゴリーが設けられ、BMPR2遺伝子に変異を持つことが確認された例 (1.2.1), ACVRL1, ENG, SMAD9, CAV1, KCNK3遺伝子に変異を持つことが確認された例 (1.2.2), または家族性だが原因となる遺伝子の変異が未確認のPAH例 (1.2.3) と定義されている。

我々は2009年より、PAHとCTEPHを対象として、BMPR2遺伝子等のアミノ酸コード領域 (エクソン) の変異検出を目的とし、従来型のサンガー法による解析を進めてきた。我々が用いていた従来型のシーケンス機器は、同時に8検体のシーケンスを行い各5-800塩基程度、96検体まで連続解析、すなわち約5-80,000塩基の情報を約一日で取得できた。しかし、近年では次世代型シーケンサーが普及し、その利用コストも減少し従来型に近づいている。次世代シーケンサーを用いた解析はエクソン、イントロンを問わずに解析する全ゲノム解析とヒトゲノム中の転写領域のみをハイブリダイゼーションにより選択的に濃縮し

解析するエクソーム解析が代表的である。主にイルミナ社のシーケンサーが用いられる。次世代型の解析は一括して遺伝的な情報を入手できるが、全ゲノム解析では90GB、エクソーム解析でも7.5GBの膨大なデータを取得する。このデータは大量の~150塩基対ほどの短い配列情報であり、これをヒトの参照配列上にマッピングし、変異の有無を明らかにし比較可能な状態にする工程が必要である。さらに一定の仮説に適合する変異を選別する。次世代型シーケンスの普及により新規の原因遺伝子の検索にも大きな進展が見られ、PAHがさまざまな原因遺伝子と非遺伝的な要因による極めて複雑な疾患の集合体であると推測されるに至っている。

## BMPR2 遺伝子の変異

我々は、2009年より倫理委員会の承認を得て、BMPR2遺伝子のアミノ酸コード領域 (エクソン) の変異検出を目的に従来型のサンガー法による解析、及びエクソン欠失・重複の検出を目的とし、Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)法による解析を進めている。2018年4月末までに解析を終了したPAHは概ね240症例<sup>1)</sup>で、英国のPAH研究グループに次ぐ集積である。そのうち83症例がIPAH (1.1), 45家系51例がBMPR2遺伝子変異を持ちHPAH (1.2.1) と分類できる。家族性であるが既報の原因遺伝子に変異が観察されないHPAH (1.2.3) は3家系6例である。

英国のPAH研究グループは欧米を中心にコンソーシアムを形成し、彼らが得たBMPR2遺伝子上の変異の最新の状況を定期的に総説論文<sup>2)</sup>として報告している。症例数、

BMPR2遺伝子の変異の数は報告毎に増加する。またClin Var Databaseを初めとしたWeb上の幾つかのサイトでは、PAHコンソーシアムや我々の報告を含めた変異を検索可能である。Clin Var databaseにはBMPR2遺伝子に関し約550種の変異が登録されているが、病理性PathogenicまたはLikely Pathogenicと分類される変異は約400種である。変異の病原性はWebツールであるCADD (Combined Annotation Dependent Depletion)の数値を参考にすることができる。またWeb上の分析ツールPolyPhen-2等も併用するのが一般的である。

PAHのような決して頻度が高くない疾患の場合、多くの変異のデータが病原性の判断に必須である。データを集積するには共同が必須であり、我々も現在、本学と慶應義塾大学、千葉大学等との連携体制を構築した。近い将来にさらに多くの医療機関との連携を模索しており、さらに国際的な連携も視野に入れている。

#### BMPR2遺伝子以外の遺伝子

BMPR2遺伝子に続き同じTGF $\beta$ スーパーファミリーに属するACVRL1遺伝子(ALK1)やENG遺伝子, BMPR2タンパクの細胞内情報伝達因子のSMAD1, SMAD4, SMAD9, さらに細胞膜陥入構造カベオラの構造タンパク

であるCAV1, K<sup>+</sup>チャネルの一つであるKCNK3遺伝子等がHPAHの原因遺伝子として報告されてきた。現在その総数は20遺伝子に上る (Fig. 1)。BMPR2遺伝子以外は低頻度ではあるがHPAHの診断に無視する事はできない。しかし、これら遺伝子のエクソンの総数は96個を超える。即ち従来法シーケンサーでは一人分の解析を行なうのに一回のランでは不足し、費用、労力の両面で効率的でも現実的でもない。そのため我々は網羅的な解析が可能な次世代型シーケンサーによるエクソーム解析に2016年より着手し、その解析を進行中である。

今年になりPAHコンソーシアムのHadinnapola他がCirculation誌<sup>3)</sup>に、同じくGräf他がNature Communication誌<sup>4)</sup>に次世代型シーケンスによる興味深い研究成果を報告した。いずれもほぼ同じ患者集団を対象とした全ゲノム解析のデータを用いている。

Hadinnapola他の論文では16名の肺静脈閉塞性疾患Pulmonary veno-occlusive disease (PVOD)/肺毛細血管腫症Pulmonary Capillary Haemangiomatosis (PCH)患者と864名のIPAH/HPAHを対象とし全ゲノム解析を行い、PVOD/PCH群でEIF2AK4遺伝子に両対立遺伝子性Biallelic変異5例(複合異型接合型Compound Heterozygote 3例と同型接合型Homozygote 2例)、その他の群で9例の

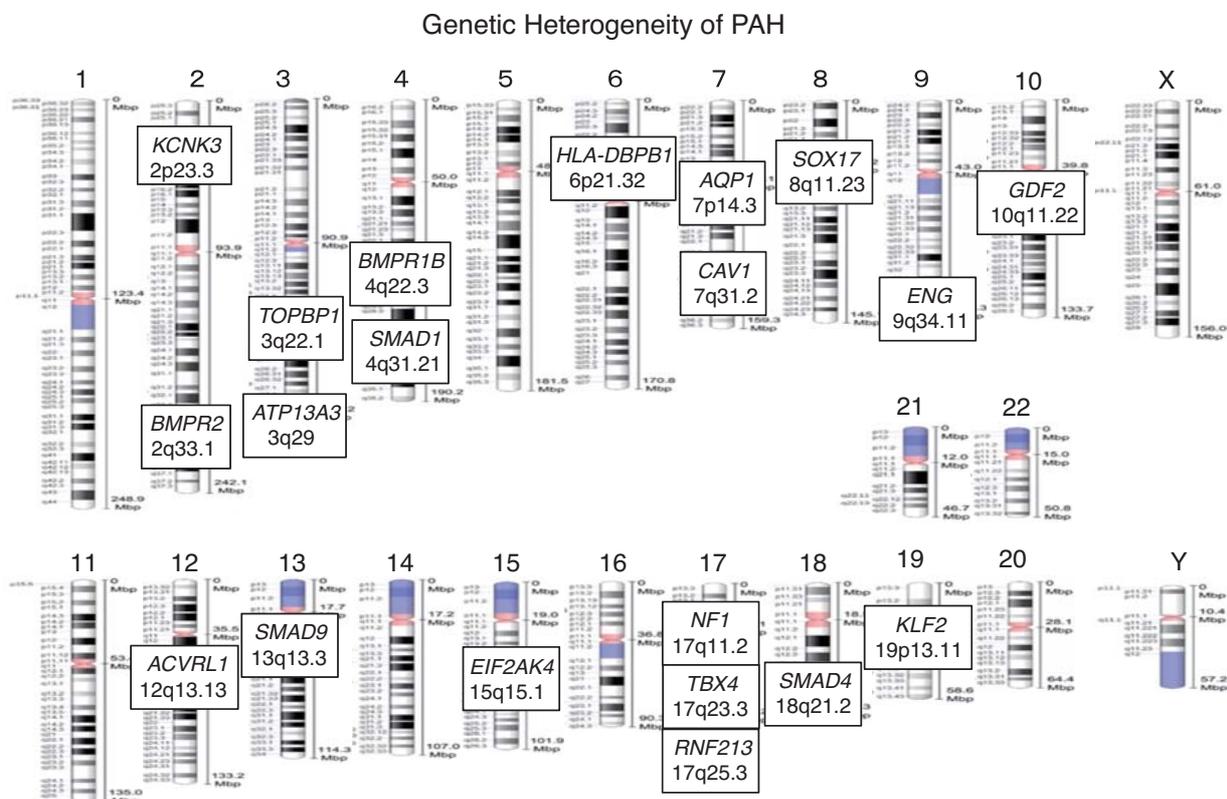


Figure 1

両対立遺伝子性変異（複合異型接合型4例と同型接合型5例）を検出している。この論文では、この14症例の臨床的共通性に基づき、両対立遺伝子性EIF2AK4遺伝子変異を持つ症例をHPAHではなく第1'群PVOD/PCHに分類することを提案している。

続くGräf他の論文では、更に症例数を増やし家族歴のある58例と薬物暴露歴のある60例を含めた1048例のPAH症例を対象に解析している。彼らの記載によると「家族例の75.9%、孤発例の12.2%、薬物anorexigen暴露例の8.3%」で合計160例にBMPR2遺伝子の変異を認め、そのうちの「48%は過去に報告された種類の変異（再発性recurrent）」とし、14%が「5kb以上3.8Mbのコード領域のエクソン欠失CNV」と報告している。BMPR2遺伝子に関する限りは従来の方法による成果とよく一致し、次世代型シーケンサーの信頼性が証明されている。またACVRL1以下既報のPAH関連の遺伝子の変異も従来の報告とよく一致する頻度で検出している。Gräf他はさらに解析を加え、GDF2, ATP13A3, AQP1, SOX17の4遺伝子をPAHの原因遺伝子に追加している。この論文が受理された直後に我々は著者のから一人から情報を得て、直ちに自験例のシーケンスデータを確認し、同様の症例が日本人にも存在する事を報告できた。

両論文により追加された遺伝子を加えてもHPAHとIPAHの比率は大きく変わるものではない。また、それぞれがどのような機序で発症に係わるか、それをどのように解析するのかは今後の研究課題である。また、次世代型ゲノム解析は膨大なシーケンスデータを生み出すが、疾患に関連する遺伝子を見出すには、Monoallelicな変異と仮定するか、Biallelicな変異と仮定するか等の解析の際の仮定

が重要である。不適切な仮定の下では膨大な数の遺伝子変異が候補として出力されたり、候補が皆無となる。相応の知識とトレーニングを必要とする。

次世代シーケンサーによる遺伝子解析により原因遺伝子の探索のみならず、薬物代謝に係わる遺伝子群やその他の代謝系の情報を探索し統合する事が可能になる。いわゆるPrecision Medicineの基盤となりうる技術である。我々も現在、200例を越えるPAHの全エクソームの情報を得て、解析を進めている。その結果を論文投稿中であり本稿に加えることは差控えるが、次世代シーケンサーに代表される技術的革新と普及は急速であり、遺伝子解析の潮流の変換点であり各技術の長所と短所を適切に捉え適時に取り入れる必要を痛感する。

#### 引用文献

- 1) Gamou S, Kataoka M, Aimi Y, Chiba T, Momose Y, Isobe S, Hirayama T, Yoshino H, Fukuda K, Satoh T. Genetics in pulmonary arterial hypertension in a large homogeneous Japanese population. *Clin Genet*. 2017 Oct 10. doi: 10.1111/cge.13154. [Epub ahead of print] Review.
- 2) Machado RD, Southgate L, *et al*. Pulmonary Arterial Hypertension: A Current Perspective on Established and Emerging Molecular Genetic Defects. *Hum Mutat*. 2015 Dec; 36(12): 1113-27. doi: 10.1002/humu.22904. Epub 2015 Oct 12. Review.
- 3) Hadinnapola C, Bleda M, *et al*. Phenotypic Characterization of EIF2AK4 Mutation Carriers in a Large Cohort of Patients Diagnosed Clinically With Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation*. 2017 Nov 21; 136(21): 2022-2033. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028351. Epub 2017 Sep 28.
- 4) Gräf S, Haimel M, *et al*. Identification of rare sequence variation underlying heritable pulmonary arterial hypertension. *Nat Commun*. 2018 Apr 12; 9(1): 1416. doi: 10.1038/s41467-018-03672-4