

# 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

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

## はじめに

肺動脈性肺高血圧 (Pulmonary Arterial Hypertension、以下PAH) は肺高血圧症 (Pulmonary Hypertension、以下PH) の中で最も典型的な臨床像を呈する疾患群である。国内認定患者約3,500人の希少疾患であり、予後不良の指定難病でもある。PAHは病因により、膠原病や先天性心疾患に伴うPAH (ニース分類I.4.1、I.4.3)、HIV感染や薬物誘発性PAH等の発症要因を特定できるPAH (I.4.2、I.3)、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) (I.1) 等に細分類される (表1)。

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*) 遺伝子の優性/単アレル性変異が家族性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。また2001年には*BMPR2*遺伝子と同じTGFβスーパーファミリーに属する*ACVRL1*遺伝子や*ENG*遺伝子、さらに幾つかの遺伝子にも優性/単アレル性変異が存在する例も発見された。さらに*BMPR2*タンパクの細胞内情報伝達因子の*SMAD1*、*SMAD4*、*SMAD9*の遺伝子、また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*の遺伝子等がHPAHの原因遺伝子として報告されてきた。*ACVRL1*遺伝子と*ENG*遺伝子はそれぞれオスラー病 (遺伝性出血性末梢血管拡張症) の原因遺伝子としても知られている。

これらの成果を踏まえて遺伝性PAH (Heritable PAH、以下HPAH) という概念が提唱された。現在、HPAHはIPAHと臨床診断された例で*BMPR2*遺伝子に変異を持つ

ことが確認される症例 (I.2.1)、*ACVRL1*・*ENG*・*SMAD9*・*CAV1*・*KCNK3*遺伝子に変異を持つことが確認される症例 (I.2.2)、または家族性だが原因となる遺伝子の変異が未確定の症例 (I.2.3) に分類できる。さらにPAHの発症は遺伝的要因のみならず妊娠・出産等を含む生活史、喫煙等の嗜好を含む生活習慣や感染等の外的要因にも大きく依存する事が知られており、特に最後のI.2.3群に何らかの原因遺伝子が存在するか、それとも何らかの外的要因によるかという疑問の究明は喫緊の課題であった。

我々は杏林大学においてPAHの臨床に一貫して従事し、東日本における最大のPAH治療拠点病院として、PAH患者300人以上の加療を行っていた。2009年より、倫理委員会の承認を得て、学内の競争的研究資金さらに文部科学省科学研究費によりPAH遺伝子解析プロジェクトを発足させ、*BMPR2*遺伝子のコーディングエキソンをPCR増幅しサンガー法によるダイレクトシーケンス (PCR-DS法) による遺伝子変異解析系、またエキソン欠失に注目し Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法による解析を進めてきた。

我々は今までの蓄積によりPAHと関連疾患や対照を含め400症例以上の*BMPR2*遺伝子の解析を進めた。13個のエキソンからなる*BMPR2*遺伝子単独の変異をPCR-DS法で解析すること自体は困難ではない。しかし原因遺伝子とされる*ACVRL1*遺伝子以下の全てを解析すると100以上の反応を必要とし手技的にも効率的にも困難が伴う。一方で次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子変異の検索が急速に普及した。本研究では従来のサンガー法とMLPA法に加え、次世代シーケンサー解析によりIPAHの遺伝的要因とさらに発症に至る背景要因の解明を目指した。

## 研究方法

主に患者末梢血を材料に*BMPR2*遺伝子のコーディングエキソンのPCR-DS法による遺伝子変異解析、エキソン欠失と重複に注目したMLPA法による解析を実施した。また、次世代シーケンサーによる全エキソーム解析を実施した。これにはSureSelectXT Human All Exon Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)を用いてエキソン抽出と増幅を行い、HiSeq2500で解析した。

## 研究成果と考察

### 1. *BMPR2*遺伝子の変異：PCR-DS法による解析

PCR-DS法で解析した約350症例中、*BMPR2*遺伝子に変異を見出したのは39症例である(表1)。海外では「*BMPR2*遺伝子の変異は家族歴のあるPAHのうち80%以上、孤発性症例の約20%」と記載されることが多く、I群中の*BMPR2*遺伝子の変異の頻度(約200症例中39例)はよく一致する。

また、IPAHがHPAHの約2倍程度存在する点、*BMPR2*遺伝子に変異が観察できない家族性/遺伝性症例がHPAHの1割程度存在する点も一致している。

PAHと*BMPR2*遺伝子変異の関連を見出した英国のグループは欧米を中心にPAHコンソーシアムを組織し彼らが経験した*BMPR2*遺伝子上の変異の最新の状況を定期的に総説論文として報告している。報告毎に症例数、*BMPR2*遺伝子の変異の数は増加する。世界中で繰り返し見出されるが機能ドメイン外で作用機序不明のHot Spot変異R899Xに代表されるような再発性変異と単独の論文でしか報告されていないユニーク変異がほぼ同数を占める。我々の場合も同様で、*BMPR2*遺伝子変異の約半数は以前に報告されていないユニークな変異である。

*BMPR2*遺伝子変異の中には新生突然変異(患者には変異が存在するが両親には変異が見られない例)が、13家系中3家系に見られた。この頻度は他の遺伝性疾患における既知の新生突然変異率の範囲内と考える。

*BMPR2*遺伝子の変異の中にはイントロンを含む数百塩基対から数十万塩基対に及ぶ欠失や重複が含まれ、エキソンの欠失や重複に至る。エキソン欠失や重複は*BMPR2*遺伝子変異全体の約2割程度(42例中9例)で、この頻度も海外の報告とよく一致する(表2)。その切断・再結合(組換え)部位の解析から*Alu*反復配列が関与する非相同組換えが多いが、*Alu*配列が関与しない非相同組換えも存在する事、少なくとも我々の症例ではその組換え部位がすべて異なる事を明らかにし、エキソン欠失・重複がそれぞれの症例にユニークである事を強く示唆した。この欠失・重複はコピー数変異とも呼ばれ、検出するためにはMLPA法が有効である。

我々の症例の半数がユニーク変異であり年々ユニークな変異が増加する事、エキソン欠失はほぼユニークな変異である事、*BMPR2*遺伝子の変異には両親の配偶子レベルで生じた新生変異が相当の頻度で含まれる事等、*BMPR2*遺伝子の変異が数世代での消失と新生を繰り返す事を示唆している。

また、日本人患者においては、特に重症化しプロスタグランジン(PGI<sub>2</sub>)製剤の持続投与が必要となった患者で、*BMPR2*遺伝子変異を有する患者のほうが予後良好であることを報告した。*BMPR2*遺伝子変異の有無を判定することは、HPAHかIPAHかの診断のみでなく、PGI<sub>2</sub>製剤をどのような患者群ではより積極的に考慮すべきかを示唆する一助となると思われる。

### 2. その他の遺伝子変異：エキソーム解析

2017年にHadinnapola他、2018年にGräf他が英国を中心とするPAHコンソーシアムの約1000名のPH患者集団を対象とした次世代型シーケンスによる全ゲノム解析の研究成果を報告した(Circulation. 2017;136(21):2022-33. Nature Communication 2018;9(1):1416)。Hadinnapola論文ではPVOD/PCH群で*EIF2AK4*遺伝子に劣性/両アレル性変異を報告し、Gräf論文ではPAHを中心に*BMPR2*遺伝子を含め既報の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。これに加えGräf論文は、*GDF2*、*ATPI3A3*、*AQP1*、*SOX17*の4遺伝子をPAHの優性/単アレル性の新規原因遺伝子として追加した。

我々も次世代シーケンサーによるエキソーム解析を実施しそのデータの解析中であったが、*BMPR2*遺伝子変異の発見者でPAHコンソーシアムの創立者の一人である英国King's College LondonのDr. Trembathから発表前に当該論文の概要の情報提供を受け、直ちに日本人PAH患者140名と患者の健常家族を含めた全エキソームデータを精査した。その結果、患者4名と未発症家族1名に*SOX17*遺伝子の変異を見出した。この5名にはPAHの発症原因遺伝子として報告されている*BMPR2*他の変異はいずれも認めない。*SOX17*(SRY-related HMG-box 17)は胎児期の形態形成や血管新生に関与する転写因子である。4名の患者は肺血管拡張薬の多剤併用療法への治療反応性が乏しく、剖検例ではHeath-Edwards 5度の重症PAHを認めた。また3名の患者には心房中隔欠損または卵円孔開存を認め、*SOX17*遺伝子変異と先天性心疾患との関連性も示唆された。PAH患者に認める*SOX17*遺伝子変異の多くは、*SOX17*のDNA結合部位であるhigh-morbidity group box領域に集積している。これもGräf論文とよく一致し、PAH発症のhot-spotと考えられた。この4名のうち2名は親子(母と息子)の家族性発症例である。

Table 1 Classification of PH in proband case\*

Class	Diagnosis	Male	Female	Total
I	1 Idiopathic PAH	19	56	75 (35%)
	2.1 Heritable PAH w BMPR2 mutation	10	29	39 (19%)
	2.2 Heritable PAH w Other mutation	-	-	-
	2.3 Heritable PAH w/o BMPR2 mutation	2	1	3
	3 Drug-induced PAH	2	3	5
	4.1 Connective tissue diseases	4	54	58
	4.2 HIV-infection	1	0	1
	4.4 Congenital heart diseases	5	15	20
I'	PVOD	4	5	9
Subtotal		47	163	210
IV	CTEPH	31	83	114
V	Others	6	26	32
		84	272	356

\*This table is based on the PCR-DS analysis.

Table 2 Number of proband cases according to mutation type of BMPR2 gene\*

	BMPR2+		BMPR2-		Total
	Male	Female	Male	Female	
HPAH (Proband)	10	29	2	1	42
Exonic deletion	2	6			8
Exonic duplication	0	1			1
Frameshift	2	6			8
Missense	2	6			8
Nonsense	4	8			12
Splice	0	2			2
(Secondary)	1	7	1	2	11
(Mutation Carrier)	7	9			16
CTEPH (missense)	1		1		2
	19	45	4	3	71

\*This table is based on the PCR-DS analysis and MLPA analysis.

さらに、我々は、全エクソームデータを精査する中で、日本人で多型的頻度の約1%に見出され脳血管疾患のモヤモヤ病患者の80-90%に見出される*RNF213*遺伝子の多型変異R4910KがIPAH患者の10%の高頻度で見出される事、加えて*RNF213*遺伝子の病原性が予測される変異8種を含め15種の変異が見出される事、*RNF213*遺伝子と*BMPR2*遺伝子の変異の重複症例も存在する事、これらの変異を持つPAHの一群は重症である事を見出した。この発見はPAHの発症や予後には原因遺伝子*BMPR2*の変異と生理的要因に加えて血管疾患共通の感受性遺伝子が存在

する可能性を示唆している。*RNF213*遺伝子変異は日本人を含む東アジア人に頻度が多いが欧米では頻度も少ないためにGräf論文では報告されていないものと思われる。我々は、*RNF213*遺伝子変異を有する親子で母がPAHで次女がモヤモヤ病という家系も経験した。*RNF213*遺伝子変異によって肺や脳という異なる臓器に難治性血管病を発症するメカニズムや日本人患者での浸透率の解明が今後の課題である。

現在、エクソーム解析の症例をさらに追加し、*BMPR2*はじめ既知の原因遺伝子の詳細な解析、網羅的な原因遺伝

子解析、さらに感受性遺伝子という視点からの解析を進めている。

### 今後の展望

本研究ではPAH症例の国内最大規模の*BMP2*遺伝子解析、さらに全エクソーム解析を行い、欧米の1000人規模のPAHコンソーシアムの結果と遜色のない結果を得ることができ、さらに均一な集団という特性を活かし感受性遺伝子の存在を見出した。今後次世代シーケンサーによるエクソーム解析、さらに全ゲノム解析は今後の病因遺伝子解析の主流となると予想されるが、コピー数変異や転座や逆位等の構造的な変異、イントロン内の変異に起因するスプライシング変異の検出には万全ではない。今回変異を検出しえなかった症例の中に未だに若干数の変異が潜在している可能性は否定できない。

ヒトゲノム解析以降、遺伝性疾患の多くで原因遺伝子が特定され、また従来は遺伝性が明瞭でなかった疾患においても多くの原因遺伝子が特定されてきた。しかしながら、新生児期や小児期に発症する古典的なメンデル遺伝病とは異なり、PAHを含めて成人期に発症する疾患においては、遺伝子内の変異も多様であること、多くの原因遺伝子があることを含めて疾患原因の遺伝的多様性が明らかにされつつある。PAHにおいても同様で多くの原因遺伝子が指摘され、変異も多様である。

さらにIPAHの全例を*BMP2*遺伝子他の変異では説明できない。PAHの臨床上、極めて重要な課題は*BMP2*遺伝子変異が存在しても発症しない人がおり、その発症には遺伝的な背景に加え、生活習慣、生活環境、生育環境を含めた長期的な生活史等の環境要因が複雑に相互作用すると想定される事で、その詳細な要因解析が必須である。

治療応答性については*BMP2*とそれ以降の分子機構の多岐性・重層性に加えて薬物代謝系を含めた遺伝的・生理的な個人差を考慮する必要がある。また、原因/病因遺伝子に加えて感受性/素因遺伝子と呼ばれる群の遺伝子が現実の解析の対象となりつつある。HPAHは遺伝子の変異を根底には持つが様々な要因により発症率が変化する疾患として捉える必要がある。遺伝的変異を持つPAH患者の血縁者で自身も同じ変異を持つが未発症の場合、今後発症

する可能性、またなぜ発症していないのか等の疑問に答える必要がある。PAHにおいては原因遺伝子とされているものは複雑な疾病発症機構の一部にしか過ぎない。発症に至る要因と過程を詳細に解き明かしていくことで新しい発症抑制や治療の戦略を見出し、さらに患者および家族に寄り添う丁寧な臨床での対応、個別化精細医療の実現が重要であろう。

### List of publications

- 1) Kataoka M, Inami T, Kawakami T, Fukuda K, Satoh T. Balloon pulmonary angioplasty (percutaneous transluminal pulmonary angioplasty) for chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a Japanese perspective. *JACC: Cardiovasc Interv.* 2019. pii: S1936-8798 (19) 30402-9.
- 2) Suzuki H, Kataoka M, Hiraide T, Aimi Y, Yamada Y, Katsumata Y, Chiba T, Kanekura K, Isobe S, Sato Y, Satoh T, Gamou S, Fukuda K, Kosaki K. Genomic comparison with supercentenarians identifies RNF213 as a risk gene for pulmonary arterial hypertension. *Circ Genom Precis Med.* 2018;11:e002317.
- 3) Hiraide T, Kataoka M, Suzuki H, Aimi Y, Chiba T, Kanekura K, Satoh T, Fukuda K, Gamou S, Kosaki K. SOX17 mutations in Japanese Patients with Pulmonary arterial hypertension with. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018;198:1231-1233.
- 4) 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.* 2018;94:70-80.
- 5) Kataoka M, Momose Y, Aimi Y, Fukuda K, Gamou S, Satoh T. Familial chronic thromboembolic pulmonary hypertension in a pair of Japanese brothers. *Chest.* 2016;150:748-749.
- 6) Isobe S, Kataoka M, Aimi Y, Gamou S, Satoh T, Fukuda K. Improved survival of patients with pulmonary arterial hypertension with *BMP2* mutations in the last decade. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;193:1310-1314.

### 口演記録

- 1) Hiraide T, Kataoka M, Suzuki H, Aimi Y, Chiba T, Isobe S, Katsumata Y, Goto S, Kanekura K, Satoh T, Sano M, Gamou S, Kosaki K, Fukuda K. Poor Outcomes in Pulmonary Arterial Hypertension as a Member of RNF213-associated Vascular Diseases. European Society of Cardiology Congress 2019. Paris, France Sep 3, 2019.