

# 肺動脈性肺高血圧症日本人患者の大規模遺伝子解析と Alu配列の組み換えシステムによるBMP2遺伝子エクソン欠失機序の解明

片岡 雅 晴

慶應義塾大学医学部循環器内科

今回の杏林医学会研究奨励賞の受賞対象論文は、Alu-mediated nonallelic homologous and nonhomologous recombination in the BMP2 gene in heritable pulmonary arterial hypertension. *Genetics in Medicine*. 2013; 15: 941-947. になります。

2009年4月から2014年3月まで杏林大学医学部内科学(Ⅱ)助教として杏林学園に在籍させていただき(うち、2012年4月から2014年3月は海外留学)、本受賞対象論文となった遺伝子解析研究を施行させていただきました。ご指導いただいた杏林大学医学部内科学(Ⅱ)の吉野秀朗教授と佐藤徹教授、杏林大学保健学部分子生物学教室の蒲生忍教授(現杏林大学CCRC研究所所長)をはじめ、杏林学園内での本遺伝子解析プロジェクトの遂行にあたり、強固なチーム体制を確立して共に力を合わせて取り組んできた関係各位へ深く感謝御礼申し上げます。

## 1. はじめに：肺動脈性肺高血圧症 (Pulmonary arterial hypertension: PAH)

肺動脈性肺高血圧症(以下、PAH)は、肺動脈の内膜や中膜の肥厚を原因として肺動脈圧が上昇し、右心不全を起こす生命予後不良の難治性疾患です。発症の機序は不明な点が多く、1997年に家族性のPAHの原因遺伝子が2番染色体上にあることが同定され、その後の国際的な共同研究等で2型骨形成タンパク受容体Bone Morphogenetic Protein Receptor type II (BMP2) 遺伝子の変異が発見され、遺伝的背景の重要性が指摘されてきました。しかしながら、これまでに、日本人PAH患者におけるpoint mutationだけでなくエクソン欠失まで含めたBMP2遺伝子変異についての大規模調査は施行されていませんでした。杏林大学病院は、佐藤徹教授を中心としてPAH診療を日本における最大規模の拠点病院の一つとして行っています。そこで、杏林大学医学部倫理委員会の承認を得た上で、遺伝子診断のカウンセリング体制も整え、杏林学園内

の競争的研究資金さらに平成23年度科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金；若手研究 (B)；課題名：個別化医療を目指した難治性循環器疾患である肺動脈性肺高血圧症の遺伝子解析，課題番号：23790628)により、PAH遺伝子解析プロジェクトチームを発足し、日本人最大規模のPAH患者検体を用いた遺伝子解析研究を行うことと致しました。

## 2. 方法と結果：BMP2遺伝子解析およびAlu配列によるエクソン欠失機序の解明

PAHの原因遺伝子BMP2のmRNAは12,086塩基対、1,149番目の塩基からの3,117塩基対で1,038個のアミノ酸をコードします。ゲノム上では約200,000塩基対の範囲に13個のエクソンに分かれて存在し、第1エクソンは非翻訳領域に続き25アミノ酸からなるシグナル配列、最後の第13エクソンは約80個のアミノ酸をコードする領域と約9,000塩基対に及ぶ長い非翻訳領域を含みます。

この遺伝子のコード領域の変異を検出するために、PAHの診断にて通院または入院加療を行った患者200名以上からゲノムDNAを抽出しました。ゲノムDNAは全身で共通のため末梢血リンパ球よりDNAを抽出し、数百塩基対毎にPolymerase Chain Reaction(PCR)法で増幅し、その増幅断片をPCRに用いたプライマーを用いてジデオキシヌクレオチド法により直接決定しました(PCR-ダイレクトシーケンシング法)。この方法では一つの反応系で決定できる配列は最大で800塩基であり、各エクソンは概ね数百塩基なので、エクソンの外側にプライマーを設定しエクソン毎に塩基配列を決定しました。配列解析用のいわゆる従来型の配列決定装置シーケンサーの処理能力には差があり、我々は16増幅断片の配列を同時に決定できる装置を用いて行いました。我々は、この方法でBMP2遺伝子の解析を進め、塩基置換を4種類と塩基の欠失や挿入を6種類、合計10種類、そのうち過去に文献的に同じ変異の報告が無いもの8種類を新規に見出しました。

なお、ポストゲノム解析の時代に入り、多数のゲノム配列を比較検討することが可能になり、ゲノム上には数千塩基対以上に及ぶ挿入や欠失、即ち Large Rearrangement があることが知られています。これは時には一つの遺伝子の一方の染色体での欠失、また遺伝子内の幾つかのエキソンの欠失となることからエキソン欠失/重複 Exonic Deletion/Duplication と呼ばれます。この変異は定量的 PCR で注意深く増幅産物を検討することで検出可能であるものの、従来の解析では事実上は見落とすことが多いのが実情です。そこで、エキソン欠失の検出を目的に開発されたのが Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法です。PCR を巧妙に利用した方法であり、多数の内部標準と基本的にはすべてのエキソンに対するプローブを一つの反応系に集約し、従来型シーケンサーを用いて被検試料と正常対照試料のパターンを比較しエキソン欠失を検出しようとするものであります。BMPR2 遺伝子に関しては、BMPR2 遺伝子のすべてのエキソンと、ALK1 と ENG のエキソンを検出できるプローブ、対照遺伝子を約 50 個組み合わせさせたキット (P093, HHT/PPH1) が市販されており、我々はこれを用いて解析を行いました。我々は MLPA 法を用いて 2 種類 3 症例のエキソン欠失を見出し、さらにその欠失領域の詳細な構造を解析し、その生成機構を明らかにしました。一例では、エキソン欠失は古典的な地中海貧血の  $\alpha$  グロビン遺伝子や脂質代謝異常症の LDL レセプター遺伝子の変異と同様に、BMPR2 遺伝子に隣接する部位の反復配列 *Alu* 配列と遺伝子内のイントロンに存在する *Alu* 配列での非相同組換えが原因と判明しました。また、もう一例では切断点の一方は BMPR2 遺伝子内の *Alu* 配列、他方は *Alu* 配列が数個連続した領域の中に存在し、こちらは単純な非相同組換えではないが、欠失の形成に同様に *Alu* 配列が関与したと考えられました。

### 3. 本研究の新規性、考察、および今後の展望

今回の研究で我々は、末梢血由来ゲノム DNA を材料に BMPR2 遺伝子のコード領域のエキソンと隣接する領域を PCR-ダイレクトシーケンス法で塩基配列解析を行い、またこの方法では見落とす可能性が高いエキソン欠失を

MLPA 法により解析しました。現在までに我々が文献やオンライン上のデータベースで知りえた範囲では BMPR2 の遺伝的変異は約 300 種に上ります。我々が見出した変異の半数以上はこのデータベースに登録されていない変異であり、遺伝的変異は BMPR2 遺伝子のアミノ酸コード領域のエキソン 1 から 11、即ち 5' 側半分のアミノ酸では 500 番目までに大半が散在するが、突出した部位に集積を示すことはありません。換言すれば、遺伝子の前半はどの部分の変異でも疾患の原因となりうるが、エキソン 12 以降は可変性が許容されていると考察されます。

今回の研究は、日本人の PAH 患者において、大規模な遺伝子解析研究を詳細に施行し、point mutation のみでなくエキソン欠失についても、その頻度や存在を解明したという点で極めて新規性が高い報告となりました。また、*Alu* 配列は、PAH 以外の少数疾患では相同組み換え等のメカニズムに関与することが報告されていますが、PAH においてもエキソン欠失の主要原因となることを解明したことは、世界初の報告となりました。

PAH はその発症原因がいまだ不明な点が多く、BMPR2 遺伝子異常に加え発症に環境要因が関わっている可能性が高いこと、また未知の遺伝子異常の可能性も残されており、様々な原因によって結果的に肺動脈圧が上昇している病態を総称した疾患概念といえます。また、近年開発された治療薬により全体的に生存率は改善傾向にはあるものの、患者個々でみると、治療薬への反応が乏しい患者や全く反応しない患者も存在し、その原因が遺伝子異常によるものなのか他の環境要因によるものかなど、まだまだ不明な点が多いのが現状です。また、現在の解析手法では転写制御領域やスプライシング変異等の解析はほとんど手付かずであり、まだ変異を見落としている可能性や変異の評価についての問題点が残っています。よって、今回の研究を発端として、遺伝子解析についてのデータ蓄積を継続しつつ、次世代型シーケンサー等を利用し、より広い範囲の解析を行い、*in vitro* の実験系で検証し、実用的な診断システムとして確立した上で、患者個々の病態、また原因にそった個別化医療を実現することが、さらなる予後改善に向けての今後の世界的課題と考えられ、今後も患者医療のさらなる改善に向けて全力で取り組んでいきたいと考えます。