

## 遺伝性不整脈のゲノム解析

研究分担者 関根 章博 国立循環器病研究センター 客員部長

### 研究要旨

Brugada症候群は重篤な不整脈から死に至る可能性の高い疾患であり、原因究明することで、予測診断や新規医療の実現に寄与するものと考えられる。申請者らは当該疾患を罹患した多くの家系を所持している。分担者はこの家系検体を中心に当該疾患の遺伝的発症原因遺伝子（座位）を同定するために次世代シーケンサー（NGS）を用いた全exon解析に着手した。H24年度はNGSデータの取得と解析（bioinformatics）法を確立を目指し、4家系を用いてシステム構築を実施し、広域exon塩基配列の決定ならびにshort variations(配列の短い多型および変異)の抽出を実現し、計画を達成した。少ない家系数の解析では原因は絞り込めないことは当初より推察していたが、予想通り100座を超える座位が候補となった。平成25年度に別の家系および個々の罹患者、さらにコントロール検体の解析を行い、原因遺伝子の同定を実施する計画である。

### A．研究目的

Brugada症候群の遺伝的発症原因遺伝子（座位）を同定するために当該疾患の家系および個々の検体を用いて次世代シーケンサーによる全exon解析を実施する。本年度（平成24年度）は本アプローチが可能となるよう次世代シーケンサーの遂行および解析システムを構築すると共に、可能な限り多くの解析検体を追加することを目標とする。なお、解析実施に伴い原因が同定されれば、予測診断や早期治療を目指し当該疾患の個別化医療の実現を目指す。

### B．研究方法

Brugada症候群と診断された患者さんおよびそのご家族の同意が得られた後、血液からゲノムDNAを抽出し、covarisによるDNA断片化を行い、exonキャプチャーにて広域exon領域を抽出する。これを試料として次世代シーケンサー（Illumina社HiSEQ1000;以下NGS)による広域exon配列決定をpair-end法により実施する。配列決定はbioinformaticsにより行うが、この際、raw dataはCASAVAにてFastqデータに、さらにBWA/bowtieにてマッピングを、Picardにて重複除去を、GATK/Samtoolsにて多型検出を、Pindelにてゲノム構造異常を検出し、さらに配列の決定できない領域はPindelにてアノテーションを実施するととも

に独自開発プログラムにてホローアップする。得られた多型や構造異常から当該疾患と関連するものを抽出するために、家系検体ではノンパラメトリック解析を、個々の検体では家系解析から得られた多数の候補座位の確認ならびに相関解析にて原因座位を同定する。

（倫理面への配慮）

すでに当該研究における倫理申請・承認を得ると共に、患者さんには十分な説明を行った上で同意を得て研究に活用している。また、常時「撤回」の機会があり、研究に賛同できない場合には以降の情報を削除する。また、NGSから得られる情報は個人の身体的特徴ともなるため、解析に用いる試料は匿名化の上、解析に用いる機器および解析計算機は立入りの制限のかかった管理室内に設置し、インターネット非接続下で実施している。連結は個人情報管理者のみが実施できる体制で取組んでいる。

### C．研究結果

本年度はBrugada症候群を罹患した患者さんを含む4家系について全exon解析を実施した。この4家系の罹患者を中心として、exon配列の決定ならびに多型（short variations）の抽出は研究方法に従い実現し、計画通りに進んだと判断している。ところで、Brugada症候群はいずれの家系ともに優性遺伝継承（両親のいずれかが罹患しているとそのお子

さんの一部に罹患する)によって発症することが強く疑われるが、保因者x罹患患者から劣性遺伝型で発症する可能性も疑って解析を実施している。解析対象者の塩基配列および多型(short variations)情報は全て取得できたが、現状4家系の解析では100座を超える候補座位が浮上している。このことは試験開始前からすでに予測していたことで、本年度に研究協力をお願いしていた別の家系および個々の患者さんの検体の解析を組合わせて平成25年度に原因究明を行う予定でいる。

#### D . 考察

平成24年度までに報告されたshort variations(配列の短い多型と変異)数は約5,500万にのぼり、これにstructure variations(配列の長い多型)が追加される。この中からBrugada症候群となる原因を同定することになるので、擬陽性を掴む可能性がある。これを回避するには、解析に耐えうる症例数とコントロール検体の確保が重要となる。申請者らはこれまでに多くのBrugada症候群の検体を整備するとともに、5000例を超すコントロールサンプルを所持している。原因座位の信憑性を高めるには、家系間で共有する座位、個々Brugada症候群に多くみられる配列、Brugada症候群を含まないコントロール群の中に同定されない配列を決定する必要があるが、これらの準備が整ったといえ、H25年度にこれらの解析を進めることで原因が究明されるものと推察している。

#### E . 結論

平成24年度は当初の目的であったNGSによる全exon解析のシステムを完成させ、同時に検出力を確保するための検体の収集を実現でき、計画通りに進んでいると判断している。すでにH25年度に実施する解析検体やスケジュールも決定しており、本年度構築したNGSによる解析によって原因座位がexon上に存在すれば同定できる見込みとなった、但し、万が一、原因がexon上に存在しない可能性もあるので、解析については、exon領域のみならず、NGSによる全ゲノム解析からのゲノム構造異常による発症原因へのアプローチならびに迅速なゲノム広域へのアプローチであるGWAS(Genome-Wide Association Study)のシステムも構築し、全exon解析で原因が究明されな場合の対応策も確保した。

#### F .健康危険情報

該当なし

#### G . 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yoshimura K et al (3<sup>rd</sup> author) : B-type natriuretic peptide as an independent correlate of nocturnal voiding in Japanese women. *Neurourol Urodyn* , 2012 (PMID: 22532404)
2. Hotta K et al (last author) : Association between type 2 diabetes genetic susceptibility loci and visceral and subcutaneous fat area as determined by computed tomography. *J Hum Genet.* 57:305-310, 2012
3. Li H. et al. (13<sup>th</sup> author) : Association of genetic variation in FTO with risk of obesity and type 2 diabetes with data from 96,551 East and South Asians. *Diabetologia.* 55:981-995, 2012
4. Hotta K et al (last author) : Genetic variations in the CYP17A1 and NT5C2 genes are associated with a reduction in visceral and subcutaneous fat areas in Japanese women *J Hum Genet.* 57:46-51, 2012
5. Hotta K et al (last author) : Computed tomography analysis of the association between the SH2B1 rs7498665 single-nucleotide polymorphism and visceral fat area *J Hum Genet.* 56:716-719, 2011
6. Hotta K et al (last author) : Association of variations in the FTO, SCG3 and MTMR9 genes with metabolic syndrome in a Japanese population. *J Hum Genet.* 56:647-651, 2011

##### 2. 学会発表

なし

#### H . 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

原因が同定されれば予測診断のための特許を申請する予定でいる。

##### 2. 実用新案登録

##### 3. その他

Brugada症候群の原因座位が明らかになれば、当該領域専門医と連携し、国立循環器病研究センターにてリスク遺伝子型を所持するかを調査できる体制としたい。