

遺伝性不整脈のゲノム広域解析アプローチによる原因探索に関する研究

研究分担者 関根章博 国立循環器病研究センター ゲノム遺伝子学 客員部長

研究要旨

Brugada症候群の新規遺伝要因を探索するために、既知原因遺伝子を保有しない16小家系32人のexome解析を、原因不明type1以上の重症度を有する個々80検体 (vs一般集団約2,000例) のGWAS (Omni2.5M) による相関解析を実施し、前者と統合したが、約300座位程度の候補座位に絞れたが、原因の特定に至らなかった。ただ、本試験を通じて、Brugada症候群には多くの原因座位の存在が推察され、これを打開するために、今後は検体数を増加し、大家系を集めての解析が有効であることが判明した。

A. 研究目的

遺伝性の疑いの高い重篤な不整脈、特にBrugada症候群を中心にAF、LQT、SQT、IVF、AVB、ALQTS、CCDの新規原因遺伝子の探索をゲノム広域解析を用いて実施する。

B. 研究方法

本研究事業を通じて収集された検体の中から、既に確立された原因遺伝子診断にて、原因不明と判定された症例についてゲノム広域解析を実施した。家系検体については広域exon解析をIllumina社のexonキャプチャーを用いてpair-end法によるシーケンスをHiSEQ1000にてcoverage 100を目指して実施した、一方、個々の検体については、Illumina社Omni2.5MchipによるGWAS (Genome-Wide Association Study) にて行い、既に所持する約2,000例の一般集団を対照して相関解析を行った。なお、解析対象となった家系は以下の通りである。

Brugada症候群 (6家系、32人)

< + 80例の個々検体 >

AF (5家系、16人)

LQT (1家系、3人)

SQT (4家系、10人)

IVF (2家系、8人)

AVB (2家系、5人)

ALQTS (2家系、5人)

CCD (1家系、3人)

一方、試験開始前から新規原因遺伝子の探索は困難が予想されていたので、解析の戦略は家系と個々検体の解析を統合して行う計画とした(以下)。

家系解析(exon seq.)



個々検体の解析 (Omni2.5M chip)



両者共有する座位の特定



ホームデータベース・公開情報から  
common多型の除去



原因座位の絞り込み

(倫理面への配慮)

ゲノム研究については三省合同指針を遵守した倫理申請ならびに承認を得た上で、患者さんの同意の下、実施した。検体および診療情報等、研究に用いる試料・情報については個人識別情報(氏名、住所、電話番号等)を匿名化の上で研究に用いた。また、次世代シーケンサーおよび計算機・データサーバーについてはインターネット非接続下にて複数の施錠可能な部屋および立入り管理の行える研究室で実施して、限られた研究メンバーによる閲覧のみとしてあるので(複製できない)、盗難・漏洩・紛失に伴う被害は著しく低い環境下で研究を遂行している。

C. 研究結果

Brugada症候群については、type1以上の重症度を有する個々80検体を疾患群とし、既に所持する一般集団(対照群)1,998例との相関解析を実施した結果、 $p$ 値 $>10^{-8}$ 以下の候補遺伝子座が約1,000となり、候補の絞り込みはできなかった。一方、Brugada症候群を有する6家系、32人の全exonシーケンスによるノンパラメトリック家系解析を実施し、前記相関解析の結果と統合した結果、候補座位は約300に絞られたが、特定は困難であった。

一方、同様にAF、LQT、SQT、IVF、AVB、ALQTS、CCDの広域exonシーケンスを用いたノンパラメトリック家系解析も候補座位の絞り込みはできな

かった。

#### D . 考察

Brugada症候群について、原因不明 (SCN5A遺伝子等を原因としない)のtype1以上の重症度を有する個々80検体 (vs 約2,000例の対照群) を用いた相関解析と、家族集積性のある6小家系の解析を併用しても原因座位の特定には繋がらなかった。そこで、Brugada症候群の表現型に沿って相関解析を実施、つまり、「失神あり」あるいは「VFあり」の表現型をCaseとして相関解析を実施し、さらに、家系解析結果を組合わせたが、それでも原因の特定には至らなかった。また、発症には性差が知られ (罹患浸透率に性差が生じる)、特に女性では発症に至らないケースが存在することから、女性を解析から除外したが、原因遺伝子の同定には至らなかった。これらのことから、今後は検出力を向上させるため、検体数を追加し、大家系の集積に取組む必要があると推察された。

#### E . 結論

今回実施した解析から原因遺伝子の絞り込みは出来なかった。本来、遺伝性の高い疾患の場合、原因が速やかに同定できる場合と出来ない場合に分割される。その理由は、同じ疾患でも原因が2~3に限られる場合 (1遺伝子が罹患をほぼ決定付けるが、家系毎で原因が2~3に分かれるという意味) と、家系毎に原因が異なり、より以上の複数の原因が存在する場合であり、後者では原因の同定が難しく、打開するには、検出力を向上させるために検体数を増加させる、より多くの家系内調査対象者を増やして、小家系を大家系にして家系内で解析できる体制にすることで検出力を向上させ、原因が同定する方法がある。本取組み前はこのことすら予想できなかったが、本トライアルを通じて、Brugada症候群では相当数の原因座位が存在することが推察された。今後の取組みにあたっては、          、          を揃えた上で取組む必要があるが、すでに着手した。なお、複数の原因座位が存在することは、これまでの研究でSCN5A遺伝子以外の決定的な遺伝子が同定されないことから肯定され、新たな取組みが必要であることを確信した。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Tabara Y, Sekine A, et al.: Airflow limitation in smokers is associated with arterial stiffness: the Nagahama Study. *Atherosclerosis*. 232:59-64, 2014
2. Nakata I, Sekine A, et al.: Association between the cholesteryl ester transfer protein gene and polypoidal choroidal vasculopathy. *Invest*

*Ophthalmol Vis Sci*. 54:6068-6073, 2013

3. Nakata I, Sekine A, et al.: Prevalence and characteristics of age-related macular degeneration in the Japanese population: the Nagahama study. *Am J Ophthalmol*. 156:1002-1009, 2013
4. Yamazaki T, Sekine A, et al.: Mastication and risk for diabetes in a Japanese population: a cross-sectional study. *PLoS One*.8:e64113, 2013
5. Tabara Y, Sekine A, et al.: Association of Longer QT Interval With Arterial Waveform and Lower Pulse Pressure Amplification: The Nagahama Study. *Am. J. Hypertens*. 26: 973-980, 2013
6. Tabara Y, Sekine A, et al.: Increased aortic wave reflection and smaller pulse pressure amplification in smokers and passive smokers confirmed by urinary cotinine levels: The Nagahama Study. *Int. J. Cardiol.*, 2013
7. Yoshimura K, Sekine A, et al.: Prevalence of postmicturition urinary incontinence in Japanese men: Comparison with other types of incontinence. *Int. J. Urol.*, 2013
8. Kitamoto A, Sekine A, et al.: NUDT3 rs206936 is associated with body mass index in obese Japanese women. *Endocr. J*. 60:991-1000, 2013
9. Kitamoto T, Sekine A, et al.: Genome-wide scan revealed that polymorphisms in the PNPLA3, SAMM50, and PARVB genes are associated with development and progression of nonalcoholic fatty liver disease in Japan. *Hum. Genet*. 132:783-92, 2013
10. Hotta K, Sekine A, et al.: Replication study of 15 recently published Loci for body fat distribution in the Japanese population. *J. Atheroscler. Thromb*. 20:336-350, 2013

##### 2. 学会発表

1. 関根章博：“WGSの実際について”、ヒト生物資源研究会設立記念シンポジウム ゲノムシークエンスとバイオバンク、東京、(2013年1月)
2. Sekine A：“Establishment of an accurate genome sequencing method combining next generation short-read (Hisq, Miseq) and long-read (PacBio) sequencers”, Okinawa International Project for Construction of Intellectual Cluster and Industrybased on Advanced Genomic Research., Okinawa Japan, (2013.11.5)

#### H . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし（原因遺伝子が同定されれば申請予定）  
2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし