

BMP2-Targeted MinION Sequencing as a Tool for Genetic Analysis in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension

研究分担者 田村 雄一
国際医療福祉大学 医学部循環器内科 教授

研究要旨

BMP2 遺伝子の変異は、肺動脈性肺高血圧症（PAH）の主要な遺伝的原因であり、PAH の遺伝子診断に不可欠である。MinION ナノポアシーケンサーは、低コストでロングリードシーケンサーを可能にするポータブルな第3世代の次世代シーケンサー技術であり、本研究では、BMP2 に焦点を当てた PAH 患者の遺伝子解析における MinION ナノポアシーケンサー活用の妥当性の検証を行ったところ、PAH 患者の BMP2 変異を適切に検出できることを示した。MinION ナノポアシーケンサーは、特に小規模な研究室や研究グループにおいて、BMP2 の変異をスクリーニングするための有望なツールとなることが期待される。

A. 研究目的

肺動脈性肺高血圧症（PAH）は、血管のリモデリングと肺小動脈の狭窄を伴う、まれで重篤な進行性疾患である。PAH の中でも遺伝性 PAH のほとんどは、トランスフォーミング成長因子 β (TGF- β) スーパーファミリーの受容体である骨形成タンパク質受容体 2 型遺伝子 (BMP2) の変異によって引き起こされる。BMP2 の変異は、家族歴のある人の約 80%、散発性 PAH 患者の 11~40% で検出される。そのため、BMP2 の変異を特定することは、PAH の遺伝子診断において非常に重要であり、個別化医療や遺伝カウンセリングにも影響する。通常はサンガーシーケンスを実施しており、一部では次世代シーケンシング (NGS) 技術を用いているが、コスト面や装置面での課題があった。近年、ナノポアテクノロジーを用いた第3世代シーケンシング技術が登場し、ナノポア DNA シーケンシングとして知られている。低コストで迅速な MinION ベースのナノポアシーケンス法は、手のひらサイズの装置の大きさであるにもかかわらず、正確な長いシーケンスリードを提供する技術として登場した。そこで本研究では、カスタム解析パイプラインを構築して MinION 技術を採用した迅速な遺伝子解析法を開発した。

B. 研究方法

ライブラリー調製は MinION のプロトコルに沿って行い、シーケンスは、MinION デバイスと FLO-MIN106 フローセルを用いて行った。MinION デバイスは、24 時間のランタイム中、MinKNOW ソフトウェアによって制御された。ベースコーリングは MinKNOW ソフトウェアを用いて行った。MinION シーケンシングで得られたデータを解析するために、パイプラインを特別に開発した。パスシグナルに分類された生の電気信号は、MinKNOW ソフトウェアを用いて FASTQ 形式の生のリードに変換された。FASTQC を用いて平均リード品質を決定した。品質とリードの長さに基づいてパラメータのフィルタリングを行い、Nanofilt を用いてトリミングを行った。50 ヌクレオチド長のリードを 5'端からトリミングし、品質とリード長に基づいてフィルタリングを実施したのち、Minimap2 プログラム (v2.13-r850) を用いて、ヒト BMP2 領域 (GRCh38/hg38, chr2: 202371789-202568449) にマッピングした。これらのマップされたリードを抽出し、Varscan を用いて、一塩基変異 (SNV) および小さな挿入・欠失 (Indels) を同定した。バリエーションコールは、次のパラメータを用いてフィルタリングされました: 最小カバレッジが 2,000 リード、対立遺伝子の頻度が少なくとも 10%、 p 値 < 0.05 、各ストランドからのリードの割合 (プラス/マイナス)

が 0.1-10 の範囲内であること。

次にフィルタリングされたバリエントを、日本人の全ゲノム配列決定によって検出されたゲノム変異の集団データベース (<https://jmorfp.megabank.tohoku.ac.jp>) およびユタ大学の提供する既知の BMPR2 バリエントのデータベースと比較した。

C. 研究結果

リード長の中央値は約 3.4kb であった。5 名の被験者に対する 5 回のランで得られたリード長の分布をプロットすると、リード長の範囲はシーケンスライブラリの物理的サイズと一致し、アンプリコンサイズは 430bp から 9kb の範囲であったことが確認できた。

ベースコールされたリードの総数は、症例間で均一であり、2,268,263 リードから 3,126,718 リードの範囲であった。フィルタリングを行うと、得られたリードは最終的にベースコールされたリードの 73~84% となった。アラインメントの結果ベースコールされたリードの平均 51% (42~59%) が参照ゲノムにマッピングされた。

平均カバレッジは均一で、塩基あたりのリード数はフローセル全体で 80,375~135,603 個と同程度であった。アラインメントされたリードのうち、各エクソン (エクソン 1 からエクソン 13 まで) に割り当てられたリードの比率は、症例間で一貫していた。

VarScan のフィルタリングパラメータを用いてバリエントコールを行ったところ、ほとんどが SNV で Indels は少なかった。これらのバリエントは、ゲノム上の位置 (エキソン、スプライシングバリエント、イントロニック)、アミノ酸変異を伴うか、日本人集団データベースと BMPR2 バリエントデータベースから得られたデータとの差があるかに基づいて解釈された。ほとんどのバリエントはイントロン領域に認められ、スプライシングバリエントや Indels はコーディング配列内には存在しなかった。評価のための Sanger Sequencing では Indel variant の存在を確認することができず、偽陽性であることがわかったが、その理由として変異の周辺のゲノム配列を調べたところ、繰り返し配列が観察されたため、エラーはホモポリマー領域に関係していることが分かった。

最後に、MinION シーケンスにより 5 例中 4 例で 3 箇所の BMPR2 変異と 2 つの多型が発見され、これらの変異はすべてサンガーシーケンスでバリデーションされた。

D. 考察

本研究では、PAH 患者のサンプルを迅速にシーケンスし、標準的なサンガーシーケンスの結果と比較して実用に耐えうるパイプラインを開発した。ナノポアシーケンスは、多くの種 (ウイルス、バクテリア、動物、植物、人間) のゲノムシーケンスに成功しているが、臨床環境での使用に関しては限られた疾患のデータしか存在せず、PAH 診断に適用された最初の報告である。

次世代シーケンサーは一般的に多額の設備投資を必要とし、必要な材料も多いため、小規模な研究室ではその使用が制限されている。また第二世代のプラットフォームは、150~300bp という短いリード長であるため、大きなリアレンジメントを見逃す可能性も示唆されている。第 3 世代のプラットフォームであるナノポアシーケンサーは、リードの長さが長く、シーケンスプロセスがリアルタイムで行われ、今回用いた MinION ナノポアシーケンサーは、小型で操作しやすく、価格も手ごろなため、1 回の実験で何 GB ものシーケンシングを行うことができる。またポータブルな装置であるため、大規模なシーケンス装置の設置が不可能な小規模な研究室や研究ユニットでもシーケンスを行うことができる。

今後の課題としては Indel variant calling 関連のエラーなど、いくつかの技術上の克服すべき点が残っており、より多くのケースにおける分析で検証する必要がある。

E. 結論

MinION シーケンスは、PAH 患者の BMPR2 変異の検出に使用できることが明らかとなった。MinION 装置は使いやすく、長いシーケンスリードが得られるため、ベッドサイドにおいて BMPR2 の変異をスクリーニングするための有望なツールであることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文

Takashima T, Brisset S, Furukawa A, Taniguchi H, Takeyasu R, Kawamura A, Tamura Y. Case Report: BMPR2-Targeted MinION Sequencing as a Tool for Genetic Analysis in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8:711694.



Case Report: *BMPR2*-Targeted MinION Sequencing as a Tool for Genetic Analysis in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension

Tomoya Takashima¹, Sophie Brisset^{1,2,3}, Asuka Furukawa¹, Hirohisa Taniguchi^{1,4}, Rika Takeyasu¹, Akio Kawamura⁴ and Yuichi Tamura^{1,4*}

¹ Pulmonary Hypertension Center, International University of Health and Welfare, Mita Hospital, Tokyo, Japan, ² Faculty of Medicine, Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France, ³ Service d'Histologie, Embryologie et Cytogénétique, Assistance Publique Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Antoine Bécélère, Clamart, France, ⁴ Department of Cardiology, International University of Health and Welfare School of Medicine, Narita, Japan

OPEN ACCESS

Edited by:

Seitaro Nomura,
The University of Tokyo, Japan

Reviewed by:

Douglas A. Marchuk,
Duke University, United States
Crescenzo Francesco Minervini,
University of Bari Aldo Moro, Italy

*Correspondence:

Yuichi Tamura
tamura.u1@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Cardiovascular Genetics and Systems
Medicine,
a section of the journal
Frontiers in Cardiovascular Medicine

Received: 19 May 2021

Accepted: 11 August 2021

Published: 13 September 2021

Citation:

Takashima T, Brisset S, Furukawa A,
Taniguchi H, Takeyasu R, Kawamura A
and Tamura Y (2021) Case Report:
BMPR2-Targeted MinION Sequencing
as a Tool for Genetic Analysis in
Patients With Pulmonary Arterial
Hypertension.
Front. Cardiovasc. Med. 8:711694.
doi: 10.3389/fcvm.2021.711694

Background: Mutations in the bone morphogenetic protein receptor type 2 gene (*BMPR2*) represent a major genetic cause of pulmonary arterial hypertension (PAH). Identification of *BMPR2* mutations is crucial for the genetic diagnosis of PAH. MinION nanopore sequencer is a portable third-generation technology that enables long-read sequencing at a low-cost. This nanopore technology-based device has not been used previously for PAH diagnosis. This study aimed to determine the feasibility of using MinION nanopore sequencing for the genetic analysis of PAH patients, focused on *BMPR2*.

Methods: We developed a protocol for the custom bioinformatics pipeline analysis of long reads generated by long-PCR. To evaluate the potential of using MinION sequencing in PAH, we analyzed five samples, including those of two idiopathic PAH patients and a family of three members with one affected patient. Sanger sequencing analysis was performed to validate the variants.

Results: The median read length was around 3.4 kb and a good mean quality score of approximately 19 was obtained. The total number of reads generated was uniform among the cases and ranged from 2,268,263 to 3,126,719. The coverage was consistent across flow cells in which the average number of reads per base ranged from 80,375 to 135,603. We identified two polymorphic variants and three mutations in four out of five patients. Certain indel variant calling-related errors were observed, mostly outside coding sequences.

Conclusion: We have shown the ability of this portable nanopore sequencer to detect *BMPR2* mutations in patients with PAH. The MinION nanopore sequencer is a promising tool for screening *BMPR2* mutations, especially in small laboratories and research groups.

Keywords: nanopore sequencing, MinION, *BMPR2*, PAH, next generation sequencing