

700500107 A

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

多施設連携による高齢者主要疾患横断的メディカル・バイオリ
ソースバンクおよびデータベース構築と遺伝子・遺伝子産物網
羅的解析に基づく疾患・薬物応答関連分子経路の解明

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 吉田 輝彦

平成18(2006)年4月

目 次

I. 総括研究報告	
多施設連携による高齢者主要疾患横断的メディカル・バイオリソースバンクおよびデータベース構築と遺伝子・遺伝子産物網羅的解析に基づく疾患・薬物応答関連分子経路の解明	
吉田 輝彦	1
II. 分担研究報告	
1. 痴呆等精神疾患のバイオリソースおよびデータベース構築とゲノム・遺伝子産物の網羅的解析による疾患解明	
後藤 雄一	7
2. がんのバイオバンク構築とゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム解析	
山田 哲司	11
3. 糖尿病関連疾患のバイオバンク構築とゲノム解析に関する研究	
安田 和基	14
4. 高血圧関連疾患のバイオバンク構築とゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム解析	
友池 仁暢	18
5. 喘息等免疫異常関連疾患のバイオバンク構築とゲノムトランスクリプトーム・プロテオーム解析	
斎藤 博久	20
6. メディカルバイオリソースバンクにおける薬物応答情報の取り扱いと解析	
澤田 純一	22
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	26

多施設連携による高齢者主要疾患横断的メディカル・バイオリソースバンク及びデータベース構築と
遺伝子・遺伝子産物網羅的解析に基づく疾患・薬物応答関連分子経路の解明

主任研究者 吉田 輝彦 国立がんセンター研究所腫瘍ゲノム解析・情報研究部 部長

研究要旨：認知症、がん、糖尿病、高血圧、喘息等の疾患の革新的な診療・予防法確立に貢献することを最終目的として、臨床試料に対する遺伝子及び遺伝子産物網羅的な解析から出発する研究を展開する。そのために必要な研究基盤として、疾患及び創薬ゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム解析に至適化され、高度な科学性・倫理性を備えた施設内バイオリソースバンク及び研究用診療・生活習慣情報データベースの構築を、各疾患を担当する国立高度医療センターの研究者の連携のもとに推進した。個別の疾患分子研究の主な成果としては、高危険度群の把握が求められている難治がんである膵がんの易罹患性と相関する代謝酵素の遺伝子多型を新たに見出した。血漿のプロテオーム解析で肺非小細胞がんの治療効果に相関するペプチドを見出した。糖尿病性網膜症症例の硝子体液のプロテオーム解析により、網膜症に特徴的なシグナルの存在を示唆した。高血圧の候補遺伝子の約 1000 SNPs の頻度情報のデータベース化を進め、CYP11B2 遺伝子多型がアルドステロンレベルに影響を与えること、エラスチン遺伝子多型と pulse wave velocity の間に相関が認められ、収縮期高血圧の素因であること、炎症性サイトカインの遺伝子 MCP1 の多型が血管合併症発症に寄与すること等を示唆した。構築した炎症組織固有に発現する遺伝子データベースを利用して、川崎病の急性期の単球に強く発現し、炎症をひきおこす物質としての S100A8/A9 蛋白質の同定、アレルギー性鼻炎患者の炎症組織において上昇する遺伝子のうち組織固有の遺伝子の同定を行った。薬物応答・副作用発現を規定する各種薬物動態関連分子のうち、トランスポーター等 6 種の遺伝子の連鎖不平衡解析及びハプロタイプ解析を行い、高多型密度ハプロタイプ情報を取得した。

分担研究者

後藤 雄一 国立精神・神経センター神経研究所
部長

山田 哲司 国立がんセンター研究所
部長

安田 和基 国立国際医療センター研究所
部長

友池 仁暢 国立循環器病センター
院長

斎藤 博久 国立成育医療センター研究所

部長

澤田 純一 国立医薬品食品衛生研究所
部長

A. 研究目的

認知症、がん、糖尿病、高血圧、喘息等の疾患の革新的な診療・予防法確立に貢献することを最終目的として、臨床試料に対する遺伝子及び遺伝子産物網羅的な解析から出発する研究を展開する。網羅的分子解析の結果と、試料に付随する診

療・病情報、生活習慣・環境情報と関連づけながら、疾患の発生・進展、薬物治療に関する分子経路の解明を行う。特にそのために必要な研究基盤として、疾患 omics 解析に至適化された施設内バイオリソースバンク及び研究用診療・生活習慣情報データベースの構築を、各疾患を担当する国立高度医療センターの研究者の連携のもとに推進する。

急速な少子高齢化が進行中の我が国において、認知症・がん・糖尿病・高血圧・喘息等の対策は厚生労働行政的観点からも焦眉の課題である。ヒトゲノム配列の 99%の解読が完了した今日、ゲノム医学は大きな可能性が期待されるとともに、組織的な取り組みの重要性が増している。いわば第一世代のポストシーケンス時代の疾患ゲノム研究により、重要な臨床情報と相関する多数の遺伝子・遺伝子産物が抽出され、ゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム網羅的 (“omics”) 解析の有用性が明らかになった。

このように重要な契機を迎えつつある一方、ヒト遺伝子・遺伝子産物は有限であり、知的所有権化を巡って激しい国際競争が展開されている。その中で、①ヒト遺伝子・遺伝子産物に関する標準的知識の体系化、②連携や一部拠点化により効率化・高速化されたゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム解析体制、③質の高い病理・薬理学的情報を含む診療情報、生活習慣・環境情報等と連結され、遺伝子・遺伝子産物網羅的解析を含む研究利用への技術的・倫理的対応がなされているヒト由来試料バンク、④解析結果の一部を広く共有し、新たな仮説創出に役立つ疾患データベース等を、日本人集団について確立することが必要とされている。特に③については、我が国の疾患ゲノム・プロテオーム研究の基盤として、早急に多施設連携に対応できる研究組織とシステムの基本構築を行い、継続的に維持し、かつ最終的には全国的な展開を目指すことが求められている。本研究はこの構想の出発点の一つとなることを目指す。

初年度の主たる個別研究成果としては各疾患における試料の収集と付随する診療情報の集計解析の他、それらの試料等に対する実際の omics 解析の応用として、進行食道がんに対する術前放射線化学療法 of 奏効性を血清のプロテオーム解析により 93.3%の判別率で予測するシステムの開発、喘息患者気道マスト細胞のみに特異的に発現し、その発現程度が喘息患者の喀痰排出量と正の相関を示すサイトカインの同定等が挙げられる。第2年度は初年度に引き続き、当研究組織全体としては以下の研究項目について研究を進める。①多施設連携型・疾患横断型バイオリソースバンクの構築を継続する。拠点化されたゲノム・プロテオーム解析体制の活用への対応を考慮し、試料等の収集・管理法等に関して整合性の確保と一部共通化を行う。②試料等の蓄積に応じて、個別研究として、各疾患の特性に応じた疾患・薬剤応答関連分子経路解明のためのゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム解析を行う。これらの研究は試料等提供者の人権とプライバシーを厳格に保護し、三省指針及び各施設の動物実験倫理指針等を遵守して実施される。

B. 研究方法

各疾患・薬剤応答性研究毎に以下の通り。

①認知症：国立精神・神経センター武蔵病院及び筑波大学病院（共同研究機関）において提供を受けた末梢血由来 DNA 試料及び個人情報を含む臨床情報をミレニアム・ゲノム・プロジェクトで開発した匿名化システム及び患者基本情報データベースである SNP2000 を用いて匿名化させ、管理保存した。さらに、研究の質及び成否に直結する臨床情報の高度化を図るため軽度認知障害検出に対応する Alzheimer's Disease Assessment Scale-MCI 日本版を作成した。また、脳の 3 次元 MRI データのボクセル処理後に容積計測 (VBM) を行い、アルツハイマー病 31 例と正常対照 41 例を比較した。ゲノム解析は候補遺伝子の SNP 解析として、HES-related repressor protein 1、カタ

ラーゼ、アデニンヌクレオチドトランスポーター1、グルタチオンパーオキシダーゼ1、グルタチオンパーオキシダーゼ4、CXCL1を解析した。

②がん：本研究に参画する国立高度医療センターが共有している上記のSNP2000システム使用を含め、認知症と同様の方法で難治がんの代表である膵がん罹患者の末梢血試料と膵がんに関連する診療情報・生活習慣情報収集を継続した。胃がん及び骨軟部腫瘍症例についても同様に施設内バンク構築を進めた。膵がんについて遺伝子-環境相互作用が考えられる47候補遺伝子についてMassARRAY法・TaqMan法等を使ってSNPタイピングを行った。また、肺非小細胞がんの化学療法奏効性と相関する血漿タンパク質の同定を目指し、国立がんセンター中央病院の肺非小細胞がん症例の治療前血漿検体51例をSELDI-QqTOF-MS (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization hybrid Quadrupole Time-Of-Flight Mass Spectrometry) 法を用いてプロテオーム解析を施行した。

③糖尿病関連疾患：糖尿病の施設内バイオバンク構築を継続し、「成因」の研究に必要な情報(ゲノム、家族歴、発症年齢、合併疾患、生活習慣)と「病期」の定義に必要な情報(血清、尿、硝子体液などの試料、臨床データ)とを、一定のフォーマットで収集した。合併症については網膜症の硝子体液に焦点をしばって収集した。ゲノム解析としては、ミレニアム・ゲノム・プロジェクトで解析できなかった候補遺伝子や、他民族で報告された遺伝子の関連解析の他、本研究の分担研究者が開発したWAVEシステム(Transgenomic社)によるミトコンドリア異常のスクリーニング系により、積極的に単一遺伝子異常の症例や家系を同定する。また、プロテオーム解析ではプロテインチップシステム及び二次元電気泳動、同定はLC-MS/MSなどを用いて解析し、分子情報と臨床情報とを合わせた多因子解析を行った。

④高血圧関連疾患：一般住民、約2000検体の収集を平成16年度中に行った。レニン活性・ア

ルドステロン濃度・BNP・MCP-1などを測定した。今までに解析しながら散逸しているデータを集め、あらためて300種類の高血圧素因候補遺伝子と血圧等の相関を解析、データベースとして統合した。

⑤喘息等免疫異常関連疾患：各種炎症細胞、免疫細胞、組織固有細胞を培養し、それぞれの細胞固有のトランスクリプトームを主としてAffymetrix社のGeneChip U133A plus2.0により解析した。国立成育医療センターの特色を生かした成育疾患研究を推進するため臍帯血血清等の施設内バイオバンク構築を開始した。

⑥薬物応答情報：日本人を対象とした薬物応答情報との相関解析等に必要とされる薬物応答関連遺伝子のハプロタイプ情報の取得及びその加工を行うため、SNPAlyze (Dynacom, Yokohama, Japan)により連鎖不平衡解析を行い、 $|D' |$ 値および r^2 値で連鎖の強さを評価した。ハプロタイプ解析はソフトウェアLDSUPPORT (Kitamura Y. et al., Ann. Hum. Genet. 66: 183-193, 2002)により行った。

(倫理面への配慮)

ヒト試料の生殖細胞系列の遺伝子解析が含まれる研究については「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」など、それぞれの研究の種類に応じて求められる国の指針に従い、適宜施設の倫理審査委員会の審査・機関の長の承認を受けて研究を行った。

C. 研究結果

各疾患・薬剤応答性研究毎に以下の通り。

①認知症：バイオバンクの登録例数は、平成17年度末までに、アルツハイマー病/アルツハイマー型痴呆(AD/ATD)の総数が1178例、血管性痴呆(VD)63例、AD/ATDとVDの混合型が49例、正常対照者は2329例となった。AD/ATDの早期診断の手段として、新たに導入したAlzheimer's Disease Assessment Scale-MCI日本版を用いた解析で、直後再生、遅延再生、再認確認などの項目

について、健常群、MCI 群、認知症群の各群間で危険率 1%以下で有意差を認めた。VBMによるMRI 所見の検討で、嗅内野容積の縮小が認知症群で顕著であり、対照群との区別ができた例は、87.8%と極めて高率であった。解析した候補遺伝子 6 種類の SNP 解析では有意な関連を示すものは見いだせなかった。

②がん：胃がん・膵がん・骨軟部腫瘍等の末梢血由来 DNA を累計 4120 例収集、内 1516 例は B リンパ球を株化することができた。対照群末梢血 DNA を 2302 例を収集し、内 1093 例は B リンパ球を株化した。膵がん 349 例を用いて遺伝子環境相互作用が考えられる 47 候補遺伝子の SNP との関連解析を行い、喫煙者でオッズ比 1.6、 $p=0.0017$ を示す代謝酵素を見出した。また、前治療が行われていない肺腺がんの治療前血漿検体 51 例を SELDI-QqTOF-MS 法を用いてプロテオーム解析し、総計 901 本ペプチドピークから化学療法無効例と有効例の間で、Mann-Whitney U 検定値が $p<0.005$ である 2 ピークを抽出した。これらピークの ROC 解析の AUC 値はすべて 0.74 以上であり、化学療法の奏効性を予測するバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

③糖尿病関連疾患：本年度までの累計で、ゲノム・血清検体としては糖尿病患者約 800 名・対照約 350 名から、また同一患者の教育入院前後の血清ペアを 95 名から得た。硝子体液については、網膜症患者 25 例、非糖尿病患者 25 例などを収集した。いずれも糖尿病の解析に必要な背景情報や臨床データを収集した。糖尿病候補遺伝子の SNP 解析については、小胞体ストレス関連等 11 個の候補遺伝子において合計約 170 個の多型 (SNP・挿入・欠失) を同定した。上記試料を WAVE システムによるミトコンドリア異常のスクリーニング系で解析したところ、塩基番号 3243 変異による糖尿病が数家系同定され、難聴、母系遺伝などのミトコンドリア糖尿病の特徴を有していた。また、若年発症の糖尿病家系において、MODY2 (グルコキナーゼ GCK 遺伝子) の今までに報告の無い

ミスセンス異常を認めた。糖尿病性網膜症患者の硝子体液に対するプロテインチップ解析では、症例・対照各 6 例による予備的検討において、前者でのみ見られるシグナルを同定した。

④高血圧関連疾患：現在までに候補遺伝子法により蓄積された情報を整理した。遺伝子数 251 種類、遺伝型数 1195 種類に関して、頻度情報、高血圧との関連の有無を明らかにした。また、基本情報に関しては 15 年以上の縦断コホートデータが存在する解析対象数約 3,500 名のデータベース化を図った。しかし単に高血圧との相関だけでは偽陽性の可能性もあり、遺伝子機能に即した中間形質との相関が偽陽性を鑑別する手段となり得る。そこでレニン・アルドステロン値と食塩感受性に関与すると思われる候補遺伝子遺伝型の相関に関して調査を行い、CYP11B2 遺伝子遺伝型がアルドステロンレベルに影響を与え、さらに食塩感受性に影響を与えている可能性を示唆した。エラスチン遺伝子遺伝型と高血圧に相関が観察され、更に Pulse Wave Velocity との相関も確認された。マクロファージ遊走作用を持つ炎症性サイトカイン MCP1 の血中濃度は、血管合併症を引き起こす種々の危険因子と相関しているが、MCP1 遺伝子の遺伝型とも弱い相関を示した。

⑤喘息等免疫異常関連疾患：前年度までの研究に引き続き炎症組織固有に発現する遺伝子データベースを利用し同定した遺伝子分子について詳細に機能を検討した。小児期に多い Th1 細胞系の免疫異常疾患である川崎病の急性期の単球に強く発現し、炎症をひきおこす物質としての S100A8/A9 蛋白質の同定、アレルギー性鼻炎患者の炎症組織において上昇する遺伝子のうち、組織固有の遺伝子の同定等に成功した。

⑥薬物応答情報：薬物トランスポーター ABCB1、ABCG2、SLC29A1 および薬物代謝酵素 TYMS、CES2、CDA に関して、蓄積していた遺伝子多型情報を基に連鎖不平衡解析を行い、さらにハプロタイプ解析を行った。ABCB1 について日本人 533 名の塩基配列再解析で検出した 93 種の遺伝子多型を用い

た連鎖不平衡解析の結果、本遺伝子は4ブロックでハプロタイプを解析することが妥当と考えられ、それぞれのブロックについて主要なハプロタイプとその頻度を推定した。同様に ABCG、SLC29A1、TYMS、CES2、CDA はそれぞれ 3、1、3、1、1 ブロックに分けてハプロタイプを構築することが適切と考え、アミノ酸置換を含むものを含め、日本人の主要なハプロタイプとその頻度を推定した。

D. 考察

各疾患とも、国立高度医療センターの特長を活かし、それぞれの疾患の特性に応じた、遺伝因子の中間形質を含む高度な診療情報が収集され、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に対応した基本的に共通性のあるシステムで個人情報と診療情報・生活習慣情報のデータベース化を進めた。これら疾患に特化した施設内バイオバンクは今後様々な共同研究等を通して、分子情報に基づく合理的な診断・治療・予防の個別化や、革新的な疾患対策の標的分子・分子経路の同定等の疾患研究推進に貢献すると考えられる。

それらの臨床試料等の収集・蓄積に基づく個別研究成果としても、たとえば肺小細胞がんの治療前血漿プロテオーム解析に基づく化学療法奏効性予測法の開発は、より安全で有効な個別化医療の実現に向けて重要な前進と言える。本態性高血圧に統計学的に相関する遺伝因子の評価のために、中間形質情報を積極的に解析した点も重要で、エラスチン遺伝子が血管の硬さを介して収縮期高血圧に関与する可能性等を明らかにした。しかし、中間形質の利用が可能なのはその候補遺伝子の機能が明らかになっている場合に限られる。

また、疾患や薬物応答性と遺伝子多型の関連解析をする場合、個々の遺伝子多型を用いた単点解析よりも、ハプロタイプ情報を加味した解析が有用である場合が少なくない。本研究で整備を進めた薬物代謝酵素・トランスポーター系遺伝子のハプロタイプ情報は、今後の薬理ゲノム学的研究とその知見に基づく個別化医療の推進に貢献する

と考えられる。

E. 結論

- a) アルツハイマー病、がん、糖尿病、高血圧、喘息について大規模な施設内バイオバンク及び一部の遺伝因子については中間形質情報を含めた診療情報のデータベース化に務め、生活習慣病関連遺伝子の新たな同定や検証に高い検出力を提供する研究基盤構築を進めた。
- b) 認知症の臨床情報の高度化を目指して軽度の認知障害を捉える神経心理学的検査法を開発し、また早期のアルツハイマー病の画像所見を見いだした。
- c) 高危険度群の把握が求められている難治がんである膵がんの易罹患性と相関する代謝酵素の遺伝子多型を新たに見出した。
- d) 血漿のプロテオーム解析で肺非小細胞がんの治療効果に相関するペプチドを見出した。今後症例数を増やし、検討を行う。
- e) 糖尿病性網膜症症例の硝子体液のプロテオーム解析により、網膜症に特徴的なシグナルの存在が示唆された。
- f) 高血圧の候補遺伝子の約 1000 SNPs の頻度情報のデータベース化を進め、CYP11B2 遺伝子多型がアルドステロンレベルに影響を与えること、エラスチン遺伝子多型と pulse wave velocity の間に相関が認められ、収縮期高血圧の素因であること、炎症性サイトカインの遺伝子 MCP1 の多型が血管合併症発症に寄与すること等を示唆した。
- g) 炎症組織固有に発現する遺伝子データベースを利用して、川崎病の急性期の単球に強く発現し、炎症をひきおこす物質としての S100A8/A9 蛋白質の同定、アレルギー性鼻炎患者の炎症組織において上昇する遺伝子のうち、組織固有の遺伝子の同定を行った。
- h) 薬物応答・副作用発現を規定する各種薬物動態関連分子のうち、これまでに蓄積した 6 種の遺伝子の多型解析データを用いた連鎖不平衡解析及びハプロタイプ解析を行い、高多型密度ハプロ

タイプ情報を取得した。

F. 健康危険情報

無し。

G. 研究発表

別添5の通り。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

発明の名称「液体クロマトグラフィーのデータ補正法」、発明者：尾野雅哉、山田哲司、廣橋説雄、特願 2005-177547

2. 実用新案登録

無し。

3. その他

痴呆のバイオバンク構築とゲノム・トランスクリプトーム解析

分担研究者 後藤 雄一 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第二部 部長

研究要旨：痴呆のバイオバンクの登録例数は、平成17年度末までに、アルツハイマー病／アルツハイマー型痴呆(AD/ATD)タイプの総数は1178例、血管性痴呆(VD)タイプ63例、AD/ATDとVDの混合型が49例、正常対照者は2329例となった。AD/ATDの早期診断の手段として、新たな神経心理検査（Alzheimer's Disease Assessment Scale-MCI 日本版）の導入、新たな画像所見（嗅内野の容積が縮小する）を見だし、痴呆等バイオバンクの臨床情報の付加価値を高めた。新たに候補遺伝子6種類のSNP解析を行ったが、疾患との関連を示すものは見いだせなかった。

A. 研究目的

痴呆、がん、糖尿病、高血圧、喘息等の疾患の革新的な診療・予防法確立に貢献することを最終目的として、遺伝子及び遺伝子産物網羅的な解析技術を駆使し、疾患の発生・進展、薬物治療に関する分子経路の解明を行う。特に、そのために必要な研究基盤の確立として、疾患及び創薬ゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム解析に至適化され、高度な科学性・倫理性を備えた多施設連携型のバイオリソースバンク及び、疾患・薬物応答関連分子経路探索用疾患データベースのモデルを構築する。

当センターでは、痴呆、特にアルツハイマー病患者の臨床情報と試料の収集とデータベースの構築を行う。

B. 研究方法

1. 血液からのDNA試料とデータベース

国立精神・神経センター武蔵病院及び筑波大学病院（共同研究機関）において、倫理委員会で承認された説明文書、同意文書を用いたインフォームド・コンセントの後、個人情報を含む臨床情報をミレニアム研究で用いているデータベ

ースであるSNP2000に入力し、ランダムな英数字のラベルを発行し匿名化させ、DNA試料を管理保存した。

2. 臨床情報の高度化

1) 軽度認知障害を検出するために新たに「単語遅延再生」と「集中・散漫」を評価する項目を加えたAlzheimer's Disease Assessment Scale-MCI 日本版を開発し、94名に施行した。健常群、MCI (minimum cognitive impairment) 群、痴呆群に分けて、検査合計点を1要因分散分析を行った。

2) 痴呆群、正常コントロール群の3次元MRIデータをボクセル処理後に容積計測(VBM)を行うことによりアルツハイマー病31例と正常コントロール41例を比較した。

3. ゲノム解析

候補遺伝子のSNP解析として、HES-related repressor protein 1、カタラーゼ、アデニンヌクレオチドトランスポーター1、グルタチオンパーオキシダーゼ1、グルタチオンパーオキシダーゼ4、CXCL1を解析したが、疾患との関係は見いだせなかった。

(倫理面への配慮)

国立精神・神経センター倫理委員会で承認を受けた説明文書を用いて、主治医が診断、検体保存、研究利用について説明し、同意文書に署名をしていただいた試料を用いた。

C. 研究結果

1. アルツハイマー病患者のDNA試料数とデータベース

	正常対照者	AD/ ATD	VD	Mix
H16年度	17	63	2	0
総数	2329 病院：806 利根町： 1513	1178	61	49

AD：アルツハイマー病

ATD：アルツハイマー型認知症

VD：血管性認知症

Mix：ADとVDの混合と考えられる症例

2. 臨床情報の高度化

1) オリジナルの米国版と同様に、本日本語版において、直後再生、遅延再生、再認確認などの項目で、健常群、MCI群、痴呆群の各群間で危険率1%以下で有意差が存在した。また、米国版に比較して、やや認知障害の程度が軽度であることが判明した。

2) VBMによる検討で、両側中側頭葉領域に痴呆群と正常コントロール群で有意差が存在した。特に嗅内野が顕著であり、両群の区別ができた例は、87.8%と極めて高率であった。

D. 考察

1. アルツハイマー病患者の登録数は1100を超え、また、主に患者の配偶者である正常対照者が800、利根町(65歳以上)の正常対照者が1500余りの計2300例のDNA試料と情報がデータベース化された。この数は、さらに新しい痴呆関連遺伝子の同定に十分な数であると考えられる。新たに血管性認知症の症例を蓄積することで、この

病態に関わる遺伝子、もしくは、アルツハイマー病の発症や進行に関わる血管性の因子の研究も開始できる。

2. 臨床情報の高度化

1) この日本語版は、軽度認知障害を検出する際に有用であり、さらに縦断的な検査を行うことで重症化の判定の用いたり、さらにより鋭敏な診断精度を得られるように改良を加えたい。

2) この結果から、アルツハイマー病の超早期診断が可能になる可能性がある。また、SPECTによる観察で、嗅内野の血流と帯状回後部との相関関係がアルツハイマー病群で認められ、“遠隔効果”があると考えられた。

E. 結論

1. 痴呆データベースには、アルツハイマー病以外の痴呆関連疾患の症例も追加できた。

2. 臨床情報の高度化という点で、軽度の認知障害を捉える神経心理学的検査法を開発し、また早期のアルツハイマー病の画像所見を見いだした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

・Tamura Y, Sakasegawa Y, Omi K, Kishida H, Asada T, Kimutra H, Tokunaga K, Hchiya N, Kanekko K, Hohjoh H: Association study of the chemokine, CXC motif, ligand 1 (CXCL1) gene with sporadic Alzheimer's disease in a Japanese population. *Neuroscience Letters* 379: 149-151, 2005.

・Iwakiri M, Mizukami K, Ikonovic MD, Ishikawa M, Hidaka S, Abrahamson EE, Dekosky ST, Asada T: Changes in hippocampal GABAB1 subunit expression in Alzheimer's disease patients: association with Braak staging. *Acta*

Neuropathologica 109: 467-474, 2005.

・Cichocki A, Shinshkin SL, Musha T, Leonowicz Z, Asada T, Kurachi T: EEG filtering based on blind source separation (BSS) for early detection of Alzheimer's disease. *Clinical Neurophysiology* 116: 729-737, 2005.

・Hirata Y, Matsuda H, Nemoto K, Ohnishi T, Hirao K, Yamashita F, Asada T, Iwabuchi S, Samejima H: Voxel-based morphometry to discriminate early Alzheimer's disease from controls. *Neuroscience Letters* 382: 269-274, 2005.

・Mizukami K, Ishikawa M, Iwakiri M, Ikenomovic MD, Dekosky ST, Kamma H, Asada T: Immunohistochemical study of the hnRNP A2 and B1 in the hippocampal formations of brains with Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 386: 111-115, 2005.

・Ohiwa N, Saito T, Chang H, Omori T, Fujikawa T, Asada T, Soya H: Activation of A1 and A2 noradrenergic neurons in response to running in the rat. *Neuroscience Letters* 395: 46-50, 2005.

・Iwakiri M, Mizukami K, Ishikawa M, Asada T: GABAA receptor γ subunits in the hippocampus of the rat after perforant pathway lesion. *Neuroscience Letters* 394: 88-91, 2005.

・Hirao K, Ohnishi T, Matsuda H, Nemoto K, Hirata Y, Yamashita F, Asada T, Iwamoto T: Functional interactions between entorhinal cortex and posterior cingulate cortex at the very early stage of Alzheimer's disease using brain perfused single-photon emission computed tomography. *Nuclear Medicine Communications* 27: 151-158, 2006.

2. 学会発表

(国内学会)

・征矢英昭、加藤守匡、坂巻祐史、本山輝幸、朝田隆：高齢者の記憶力改善に及ぼす軽運動の効果 - 利根町研究 -、第20回日本老人精神医学会、東

京、6.16、2005

・児玉千稲、木之下徹、山下典生、宮本美佐、朝田隆：MCIの査定に使用される記憶検査の一致率の検討 - 利根町研究 -、第20回日本老人精神医学会、東京、6.16、2005

・山下典生、根本清貴、横銭拓、木之下徹、宮本美佐、谷向知、水上勝義、大西隆、松田博史、朝田隆：軽度認知障害(MCI)の下位分類における脳機能画像所見 - 利根町研究 -、第20回日本老人精神医学会、東京、6.17、2005

・宮本美佐、山下典生、木之下徹、日高真、佐々木恵美、朝田隆：地域在住の65歳以上高齢者における生存率を予測する要因の分析、第20回日本老人精神医学会、東京、6.17、2005

・谷向知、日高真、佐々木恵美、宮本美佐、山下典生、児玉千稲、木之下徹、水上勝義、朝田隆：痴呆症の前駆状態診断に関する問題点 - うつ病・うつ状態と認知機能との関係 -、第20回日本老人精神医学会、東京、6.17、2005

(国際学会)

・Yamashita F, Nemoto K, Kinoshita T, Hidara S, Sasaka M, Ohnishi T, Matsuda H, Asada T: Abnormalities of regional cerebral blood flow in subclassifications of mild cognitive impairment. The Alzheimer's Association International Conference on Prevention of Dementia, Washington D.C., USA, 6.18-21, 2005

Kodama C, Noguchi H, Kinoshita T, Hidaka S, Sasaki M, Yamashita F, Asada T: The Alzheimer's disease assessment scale \sim Cognitive subscale (Japanese version): The performance in community-dwelling people with mild cognitive impairment. The Alzheimer's Association International Conference on Prevention of Dementia, Washington D.C., USA, 6.18-21, 2005

・Kato M, Motoyama T, Sakamaki Y, Saito T, Nishijima T, Asada T, Soya H: Differential physical activity between MCI and normal elderly people project. The Alzheimer's Association International Conference on Prevention of Dementia, Washington D.C., USA, 6.18-21, 2005

・Asada T, Sasaki M, Yamashita F, Kinoshita T, Kodama C, Miyamoto M, Tanimukai S: Prevalence of

pre-dementia in Tone town, Japan: An important notice of coexisting of predementia and depression. The Alzheimer's Association International Conference on Prevention of Dementia, Washington D.C., USA, 6.18-21, 2005

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

がんのバイオバンク構築とゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム解析

分担研究者 山田 哲司 国立がんセンター研究所化学療法部 部長

研究要旨：がん患者における放射線や化学療法の応答関連分子経路解明を解明し、治療効果を予測できる診断方法を確立することを目的として、放射線や化学療法を受けた食道癌、肺小細胞癌患者を対象に治療効果と相関する血中タンパク質を大規模に検索した。また大腸癌株化細胞よりシスプラチンに自然耐性をしめすクローンを7株分離し、網羅的な遺伝子の構造と発現の解析を行った。

A. 研究の目的

放射線や化学療法の効果には大きな個体差があり、現時点ではそれを事前に予測することは困難な場合が多い。支持療法が発達したとはいえ、自覚的にまた臨床検査値上、化学療法は相当の毒性も伴い、患者の日常生活にも重大な影響を与える。加えて稀ながら治療関連死もみられる。このため治療前にいかにしてその効果を予測し、効果の期待できる症例にのみ化学療法を行う医療のオーダーメイド化が急務である。がん患者における放射線や化学療法の応答関連分子経路解明を解明し、治療効果を予測できる診断方法を確立することを目的として研究をおこなった。

また化学療法や放射線療法の治療効果が認められた症例においても、少数の治療に反応性を示さない細胞が残存し、治療後に再発することが癌患者の治療を困難にしている。このような少数の放射線や化学療法に自然耐性を示す細胞の特性を明らかにすることを目的として、大腸癌株化細胞よりシスプラチンに自然耐性をしめすクローンを7株分離した。

B. 研究方法

肺非小細胞癌の化学療法奏効性と相関する血漿

タンパク質の同定

国立がんセンター中央病院にて2001年1月から2003年12月までにカルボプラチンとパクリタキセルを用いて治療された肺非小細胞がん症例の147例のうち、化学療法がレジメに従い3回以上施行されかつそれ以外に前治療が行われていない肺腺がんの治療前血漿検体51例を SELDI-QqTOF-MS (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization hybrid Quadrupole Time-Of-Flight Mass Spectrometry)法を用いてプロテオーム解析した。化学療法の奏効性はPD 2例、SD 16例、PRが33例だった。PDとSDを化学療法無効例とし、PRを有効例として検討した。血漿は、変性した後 CM10 pH4, CM10 pH7, IMAC 銅, H50 のチップ条件でたんぱく質精製が行われ、Q-star XL PCI 1000にてペプチドプロファイルが取得した。

大腸癌細胞の自然薬剤耐性に関わる遺伝子の同定

Near diploidを示す大腸癌細胞株 HCT116 を cis-diamminedichloroplatinum (CDDP) 0.5 g/mL を含むメEDIUMにて限界希釈を行い、CDDP に対し自然耐性を示す細胞をクローン化した。23株樹立したうち、7クローンについて

Affymetrix GeneChip システムを用い、親株との遺伝子の構造の違いを Human Mapping 100K セットで、遺伝子発現の変化を Human Genome U133 Plus 2.0 アレイを用い検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は事前に国立がんセンター倫理審査委員会で研究によって提供者の不利益が生じない事を確認し、医学上の貢献予測が審査され、承認された上で行った。対象とする研究材料は担当医により説明を受け、包括的な医学研究への協力の同意のもとに採取され、凍結保存されている血漿を用いた。本研究で解析したのは血中のペプチドとタンパク質のみであり、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に定められている生殖細胞系のゲノム・遺伝子情報は含まれない。

C. 研究結果

肺非小細胞癌の化学療法奏効性と相関する血漿タンパク質の同定

前治療が行われていない肺腺がんの治療前血漿検体 51 例を SELDI-QqTOF-MS 法を用いてプロテオーム解析し、総計 901 本ペプチドピークから化学療法無効例と有効例の間で、Mann-Whitney U 検定値が $p < 0.005$ の 2 ピークを抽出した。これらピークの AUC 値はすべて 0.74 以上であり、化学療法の奏効性を予測するバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

大腸癌細胞の自然薬剤耐性に関わる遺伝子の同定

シスプラチンに自然耐性を示す 7 全クローンで共通に遺伝子 copy number 増加を示す領域を第 7 染色体に同定した。またシスプラチンの処理で親株で変化せず、耐性クローンで変化する遺伝子を同定した。

D. 考察

血液のプロテオーム解析で、がんの早期診断を

めざした研究は国内外で行われているが、治療奏効性の予測が可能あるかについては知見がない。化学療法の効果の期待できる症例を選別し、治療による副作用を未然に防ぐ医療のオーダーメイド化を実現することが期待される。

シスプラチンの処理で親株で変化せず、耐性クローンで変化する遺伝子には既に細胞死に関わっていることが知られている分子に加え、oxidoreductase などの酸化還元に関わる酵素が多く含まれていた。これらの遺伝子がどのような薬物応答関連分子経路に関わっているのか興味がある。

E. 結論

血漿のプロテオーム解析で肺非小細胞癌の治療効果に相関するペプチドを見出した。今後症例数を増やし、検討を行う。また遺伝子発現とタンパク質発現は必ずしも相関しないため、シスプラチンに自然耐性を示すクローンのタンパク質発現解析を行う必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hayashida Y, Honda K, Osaka Y, Hara T, Umaki T, Tsuchida A, Aoki T, Hirohashi S, Yamada T.

Possible prediction of chemoradiosensitivity of esophageal cancer by serum protein profiling. Clin Cancer Res. 2005 Nov 15;11(22):8042-7.

Honda K, Hayashida Y, Umaki T, Okusaka T, Kosuge T, Kikuchi S, Endo M, Tsuchida A, Aoki T, Itoi T, Moriyasu F, Hirohashi S, Yamada T.

Possible detection of pancreatic cancer by plasma protein profiling. Cancer Res. 2005 Nov 15;65(22):10613-22.

Sato S, Idogawa M, Honda K, Fujii G, Kawashima H, Takekuma K, Hoshika A, Hirohashi S, Yamada T.

beta-catenin interacts with the FUS

proto-oncogene product and regulates pre-mRNA splicing. Gastroenterology. 2005 Oct;129(4):1225-36.

Hayashida Y, Honda K, Idogawa M, Ino Y, Ono M, Tsuchida A, Aoki T, Hirohashi S, Yamada T. E-cadherin regulates the association between beta-catenin and actinin-4. Cancer Res. 2005 Oct 1;65(19):8836-45.

Hara T, Honda K, Ono M, Naito K, Hirohashi S, Yamada T. Identification of 2 serum biomarkers of renal cell carcinoma by surface enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry. J Urol. 2005 Oct;174(4 Pt 1):1213-7.

Idogawa M, Yamada T, Honda K, Sato S, Imai K, Hirohashi S. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a component of the oncogenic T-cell factor-4/beta-catenin complex. Gastroenterology. 2005 Jun;128(7):1919-36.

Naishiro Y, Yamada T, Idogawa M, Honda K, Takada M, Kondo T, Imai K, Hirohashi S.

Morphological and transcriptional responses of untransformed intestinal epithelial cells to an oncogenic beta-catenin protein. Oncogene. 2005 Apr 28; 24(19):3141-53.

2. 学会発表

96th Annual Meeting, American Association for Cancer Research Expression pattern and functional properties of Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in colorectal carcinogenesis. Idogawa M, Yamada T, Sato S, Honda K, Ono M, Imai K, Hirohashi S. April 19, 2005

Identification of Novel Serum Biomarkers for Renal Cell Carcinoma by SELDI-TOF mass spectrometry. Hara T, Honda K, Ono M, Hayashida Y, Naito K, Hirohashi S, Yamada T., April 19, 2005

Prognostic significance of tissue factor in pancreatic ductal adenocarcinoma. Nitori N, Ino Y, Nakanishi Y, Yamada T, Honda K, Yanagihara K, Kosuge T, Kanai Y, Kitajima M, Hirohashi S. April 17, 2005

E-cadherin regulates the association of β -catenin and actinin-4. Hayashida Y, Honda K, Idogawa M, Ino Y, Ono M, Tsuchida A, Aoki T, Yamada T, Hirohashi S.

April 20, 2005

Possible prediction of chemoradiosensitivity of

esophageal cancer by serum protein profiling. Yamada T, Honda K, Hayashida Y, Osaka Y, Tsuchida A, Aoki T, Hirohashi S. April 19, 2005

Alternative splice variant of actinin-4 specific to small cell lung cancer. Honda K, Yamada T, Hayashida Y, Idogawa M, Hirohashi S. April 19, 2005

Human Proteome Organization 4th Annual World Congress Diagnosis of pancreatic cancer by high-resolution mass spectrometry. Honda K, Hirohashi S, Yamada T. August 29, 2005

2-dimensional-image-converted analysis of nano-flow liquid chromatography and mass spectrometry Ono M, Honda K, Hirohashi S, Yamada T. August 31, 2005

10th Japanese-German Workshop on Molecular and Cellular Aspects of Carcinogenesis Proteomic Analysis of β -Catenin-Mediated Colorectal Carcinogenesis. Yamada T. September 29, 2005

The Fourth Japan-China Joint Conference for Cancer Research Cancer Diagnosis by high-resolution mass spectrometry. Yamada T. October 6, 2005

The 10th Korea-Japan Cancer Research Workshop Proteomic analysis of β -catenin-mediated colorectal carcinogenesis. Yamada T. December 17, 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

発明の名称「液体クロマトグラフィーのデータ補正法」

発明者：尾野雅哉、山田哲司、廣橋説雄

特願 2005-177547

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

糖尿病関連疾患のバイオバンク構築とゲノム解析に関する研究

分担研究者 安田 和基 国立国際医療センター研究所代謝疾患研究部 部長

研究要旨：糖尿病関連疾患について、既取得試料も含め、ゲノム・血清のそろった糖尿病患者約 850 例、対照約 400 例、同一患者の教育入院前後のペア血清 95 例、糖尿病網膜症患者・の硝子体液各 25 例、等を、背景情報・臨床情報とともに収集した。新たに候補遺伝子として、小胞体ストレス関連の遺伝子を中心に 11 ほど抽出し、日本人 48 人のパネルで全エクソン領域およびプロモータ領域をシークエンスした結果、約 170 ほどの SNP を同定した。また、単一遺伝子病タイプの糖尿病家系を同定した。SELDI-TOF-MS（プロテインチップシステム）により、硝子体液のプロテオーム解析を行い、糖尿病網膜症に存在する有望なシグナルを得ている。

A. 研究目的

当センターでは分担している糖尿病は、その「成因」に遺伝的側面、環境因子の双方が強く関与し、かつ同一個人でも「病期」により全くことなる臨床像、治療反応性を示す。しかも生活習慣の西洋化に伴い急増しており、「予備軍」を含めると 1,500 万人以上と推定されているが、現時点では良好な血糖コントロールを得るには専門医でも試行錯誤を必要とする。また不十分なコントロールでは、さまざまな合併症を生じ、生命予後や QOL に大きく影響するだけでなく、医療経済上も大きな問題となっている。

そこで、これまで進められてきた、ミレニアムプロジェクト、メディカルフロンティアやプロテオームファクトリーなどの研究の成果や方法論を基盤として、糖尿病関連疾患について、ゲノム・プロテオーム解析および臨床情報に関する解析を統合可能なパネルを再構築しする。具体的には、ゲノムと血清を同時に採取したパネル、同一人で異なる時期の血清、合併症に関連した試料を収集したパネル、などを構築し、また同時に臨床情報について、成因に関係する情報、生活習慣に関する情報、断面的あるいは病期に関する情報

などに分けて、整備する。この過程を通じて、多施設共同研究を可能にする標準化した収集方法を確立する。

これらをもとに、重要な候補遺伝子のゲノム解析、血清や特に網膜症に焦点をあてた試料のプロテオーム解析、臨床情報をあわせた解析などをおこない、さまざまな次元の解析情報を統合して、画期的な診断、治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

(1) パネル作成

糖尿病については、「成因」の研究に必要な情報（ゲノム、家族歴、発症年齢、合併疾患、生活習慣）と「病期」の定義に必要な情報（血清、尿、硝子体液などの試料、臨床データ）とを、一定のフォーマットで収集する。特に過去の情報は、本人記入でなく糖尿病の専門知識を有する CRC 又はドクターによる「聞き取り」により収集する。収集するパネルとしては、

- (1) 患者／対照集団
- (2) 同一患者の入院前後
- (3) 合併症患者の試料

の 3 つである。

このうち合併症については、腎症患者の尿、動脈硬化症患者の血清などは、同じく厚生労働科学研究費の「プロテオームファクトリー」事業で網羅的なプロテオーム解析が行われることになったのでそちらへ移管し、本研究では、網膜症の硝子体液に焦点をしばって収集することとした。

(2) 試料を用いた解析

これらに対して当初予定した解析は以下の通りであった。

(1) 既にミレニアムプロジェクトで得られた遺伝因子をタイピング、

(2) ミレニアムプロジェクトで解析しきれなかった候補遺伝子や他民族で報告された遺伝因子のタイピングとその意義の研究、

(3) プロテオーム解析による新たな診断・治療・病態マーカーの同定（プロテインチップシステム及び2-DE、同定はLC-MS/MSなど）、

(4) これらの情報と臨床情報とを合わせた多因子解析を行う。

このうち、(1)については、糖尿病サブチームの合意により、他の省庁の研究費で遂行することになったため、本研究から除外した。(3)については、一部試料をプロテオームファクトリーにも送付するので、そのデータも活用する。

また以上の臨床試料を用いた実験を補うために、適宜培養細胞株を用いた機能実験（プロモータ解析を含む）を行う。

(3) 特殊な臨床像を示す症例や家系の検討

糖尿病のなかで、単一遺伝子病タイプを示すものは、全体の数%を占めると考えられているが、実際の臨床の間では必ずしも明確に認識されずに見逃されている可能性が高い。一方で、専門医の注意深い観察により、糖尿病のなかでも特徴的な臨床像から疑われ、遺伝子異常が明らかになることがある。こうした単一遺伝子病タイプは、診療面でも、また病態の解明の突破口としても、大変興味深く且つ意義深いものと考えられる。

我々が開発した、WAVE システム (Transgenomic 社) によるミトコンドリア異常のスクリーニング

系により、上記サンプルを解析するほか、各地糖尿病専門医との連携により、積極的に単一遺伝子異常の症例や家系を同定する。

(倫理面への配慮)

ゲノム試料は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」それ以外の試料については「臨床研究に関する倫理指針」を厳格に遵守し、試料等提供者の人権とプライバシーを保障しつつ研究を進める。研究計画は当施設の倫理委員会の審議・承認を得て行い、試料は説明・同意を得て採取している。外部施設よりの試料は、すべて匿名化されて送られ、当センターでは個人情報と連結できない。

C. 研究結果

(1) パネルの作成

ミレニアムプロジェクト及びプロテオームファクトリー用として別々に検体を収集されていたが、そのインフラ（臨床情報収集フォーマットや院内の採血、検体処理システム）を活用して、検体収集を行った。既取得試料も含め、平成17年度までの累計で、ゲノム/血清を得ている糖尿病患者約800名、対照約350名、また同一患者の教育入院前後の血清ペア95名、また硝子体液については、網膜症患者25例、非糖尿病患者25例などを収集した。いずれも糖尿病の解析に必要な背景情報や臨床データを収集している。

(2) 候補遺伝子解析

昨年度に続き、糖尿病候補遺伝子のSNP解析を行った。小胞体ストレス関連 (EIF2AK3、DDIT3、XBP1、HSPA2、TXNDC4、DNAJC3、DNAJC10)、その他 (CCR2、NDN など) を中心とした11の候補遺伝子について、合計約170のSNP (挿入・欠失を含む) を同定した。

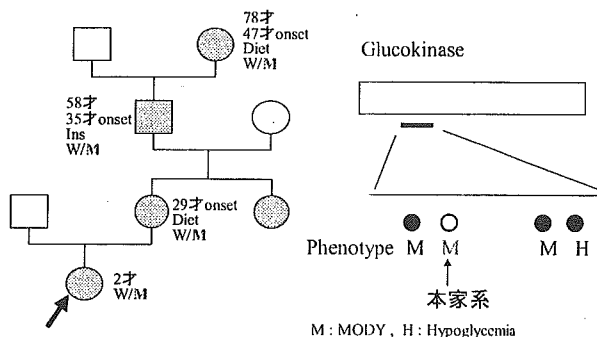
(3) 単一遺伝子病タイプの同定

我々が開発した、WAVE システム (Transgenomic 社) によるミトコンドリア異常のスクリーニング系により、上記サンプルをスクリーニングした。3243変異による糖尿病が数家系同定され、これら

は確かに、難聴、母系遺伝などのミトコンドリア糖尿病の特徴を有していた。また、ある同胞例では、WAVE システムでヘテロプラスミーパターンを示したが 3243 変異を認めず、PCR フラグメントをサブクローニングしてシーケンス解析を行ったところ、近傍の新しい変異であった。

また、ある若年発症の糖尿病家系において、MODY2 (グルコキナーゼ GCK 遺伝子) 異常を認め、この家系では 4 世代にわたって変異と糖尿病を確認できた (図 1)。現在までに MODY2 変異は、文献になっていないものも含めて世界で 200 近く同定されているが、本例は新しいミスセンス変異であった。グルコキナーゼは、膵β細胞のグルコースセンサー分子であるが、この変異の存在する領域は、既知の酵素活性中心や既知の機能ドメインではない。しかし、近傍の報告された変異のなかには、MODY の表現型を示すもの、逆に活性化変異により低血糖をしめすもの、があることなどから、このあたりは未知のアロステリックな調節を受ける領域ではないかと推測され、現在海外の研究者と共同でこの変異の機能解析を、行って

図1 4世代にわたる MODY2家系



いる。

(4) プロテオーム解析

入院患者血清及び網膜症患者の硝子体液について、プロテインチップ (サイファージェン社) を用いた検討を行った。

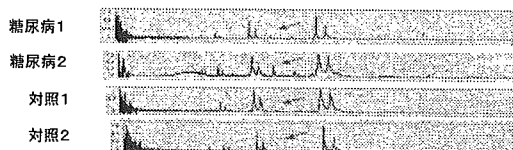
このうち、硝子体液については、糖尿病網膜症症例・非糖尿病症例各 6 例で解析し、前者でのみ見られるシグナルが存在した (図 2)。糖尿病網

膜症では、血管透過性が亢進したり、脆弱な新生血管が脆弱だったり、血中タンパクが非特異的に漏出している可能性も否定できなかったが、我々の検討では、非糖尿病患者の硝子体液でもタンパクは存在し、逆に非糖尿病患者にのみ存在するシグナルも見られた。したがって、糖尿病網膜症患者にのみ見られたシグナルは、病態に深く関連するタンパクである可能性がある。ただし、個人差がかなりみられるのも確かであり、さらに多くの症例で、臨床像とあわせて解析してゆく必要がある。

教育入院患者の血清については、予備的検討により、同一人でも入院直後と退院直前とで差のある可能性のあるシグナルも見られている。ただし全体に得られるシグナルの数が十分でないので、アルブミンなど血清に多量に存在するタンパクの除去をいくつかの方法で行ったり、分画して解析したりして、より詳細な解析をすすめてゆく予

図2

ヒト硝子体液の解析 (プロテインチップシステム)



定である。

D. 考察

糖尿病関連疾患の病態に関する研究は、国内外で精力的行われているが、いまだその全体像を完全に説明できる分子機構はあきらかでない。遺伝因子については、それぞれの相対危険度が弱いことから、糖尿病の全体像を完全に説明するのは不可能に近い。プロテオーム解析については、病態のカギとなる患者由来臓器 (膵β細胞、肝、脳など) を得ることは不可能に近く、血清・尿などに限られている。さらに臨床情報としては、糖尿病の「成因」の研究に必要な情報と「病期」の定義に必要な情報とを、収集する必要がある。また非常に多

くのサンプルが必要であるが、きわめて不均一な疾患であるにもかかわらず、臨床試料・情報の収集に標準化された方法がなく、多施設由来のサンプルを用いた研究のネックになっていた。

日本では糖尿病を含めた疾患関連の大型プロジェクトとして、ミレニアムプロジェクト（平成12年度～16年度）、メディカルフロンティア（平成13年度～16年度）、プロテオームファクトリー（平成15年度～19年度）が進められてきている。また海外では、ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオームなどの解析は以前より盛んであり、それぞれ地域ベースや家系ベースで大規模なパネルで研究されていること、詳細な臨床情報、特にインスリン分泌や抵抗性など、一部侵襲的検査も含めて一般検査で行わないデータも集めているなどの特徴がある。しかしこれらを統合した病態の解析は行われていないのが現状である。

今回構築しつつあるパネル及び解析情報は、こうした多元的な解析を疾患研究の場で実現するために貴重なものと考えられる。

ただし、科学としては、さまざまな「オーム」を統合して表現型を理解する「フェノーム」という概念が提唱されているが、臨床試料を用いた解析ではお手本となる成功例がなく、本研究でもまだ事実上手探りといえる。得られつつある成果、あるいは網羅的な解析の結果などを、統合的解析の糸口として平成18年度に挑戦してゆきたい。

E. 結論

ゲノム、プロテオーム、臨床情報を完備したパネルを収集した。糖尿病の成因及び病期について、これまで個別で研究されてきた、基礎的な分子の性質、疾患関連遺伝因子や生活習慣との関係、及び時間軸との関係を、総合的にとらえるために非常に有用と思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nawata H, Shirasawa S, Nakashima N et al ;
Genome-wide linkage analysis of type 2 diabetes mellitus reconfirms the susceptibility locus on 11p13-p12 in Japanese. J Hum genet 49:629-634, 2004.

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

高血圧関連疾患のバイオバンク構築とゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム解析

分担研究者 友池 仁暢 国立循環器病センター 病院長

研究要旨：高血圧素因遺伝子がどのように高血圧発症に関わるかを明らかにするため、今までに収集した遺伝情報と、生活習慣及び中間形質を包含したデータベースを作成し創薬予防の基盤形成を目指す。対象数3500人、300種類の候補遺伝子の遺伝型情報、1000項目以上の検診情報、レニン活性など10種類以上の特殊生化学的検査、頸動脈エコーなど特殊生理学的検査などが含包され、基本情報に関しては15年以上の縦断データが存在する。

A. 研究目的

高血圧の革新的な診療・予防法の確立が目的である。候補遺伝子がどのように高血圧発症に関わるかを明らかにするためには、遺伝子の機能ばかりでなく、対象集団において、詳細な生活習慣に関するデータベースが必要となる。今までに収集した各種データを統合し、生活習慣病のゲノム疫学解析の基盤となるデータベース作成を目指す。

B. 研究方法

一般住民、約2000検体のサンプル収集を平成16年度中に行った。レニン活性・アルドステロン濃度・BNP・MCP-1などを測定した。今までに解析しながら散逸しているデータを集め、あらためて300種類の高血圧素因候補遺伝子と血圧等の相関を解析、データベースとして統合した。

（倫理面への配慮）

データベースは匿名化された遺伝情報と臨床情報とを用いる。本研究の計画は施設の倫理委員会と吹田市の遺伝情報審議会で審査を経て承認を頂いた後に実施した。データベースを用いて解析する際は、匿名化した情報で対応表が破棄されたものである。したがって、個人情報法の保護は完璧に行うことが出来る。また、解析の実施に当たって同意を必要としない。

C. 研究結果

高血圧部会の一翼を担い、高血圧原因遺伝子のゲノムワイドスクリーニングを遂行した。3次スクリーニングの結果、4種類の遺伝子に関し、高血圧との関連を認めた。このうち1種類に関しては、吹田スタデー2000人においても高血圧との関連が観察されたため（4次スクリーニング）より詳細な解析を進める予定である。

現在までに候補遺伝子法により蓄積された情報を整理した。遺伝子数251種類、遺伝型数1195種類に関して、頻度情報、高血圧との関連の有無を明らかとした。遺伝子名・遺伝型の場所・頻度情報に関してデータベースへの登録を行った。単に高血圧との相関だけでは偽陽性の可能性もあり、遺伝子機能に即した中間形質との相関が偽陽性を鑑別する手段となり得ると考えている。今年度は、レニン・アルドステロン、MCP1、Pulse wave velocity などの中間形質と遺伝型の相関を検討した。

レニン・アルドステロン値と食塩感受性に関与すると思われる候補遺伝子遺伝型の相関に関して調査を行い、CYP11B2 遺伝子遺伝型が、アルドステロンレベルに影響を与えること、及び、このことを通して食塩感受性に影響を与えている可能