

200607007A

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 吉田 輝彦

平成19（2007）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. 認知症等神経疾患のバイオリソース及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	-----	6
2. がんのプロテオーム解析		
山田 哲司	-----	9
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	-----	13
4. 代謝症候群等のバイオバンク構築		
加藤 規弘	-----	17
5. 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	-----	19
6. 喘息等免疫異常関連疾患を含む成育疾患のバイオバンク構築		
藤本 純一郎	-----	21
7. 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扱いと解析		
澤田 純一	-----	23
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	27

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・体系的な解析から出発する研究を展開した。また、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、認知症に関してミトコンドリアゲノムの塩基配列解析を行って疾患と関連が示唆される SNP を複数抽出し、欧米の報告と異なることを見出した。肝細胞がんトランスクリプトーム解析から、がん特異的なスプライシングプロファイルの存在を示唆した。高血圧素因候補遺伝子 10 種類の塩基配列解析により、変異・多型を 361 個見出した。吹田研究 3654 人を対象として血圧との相関を解析したところ、SLC9A2、UMOD、ELN 遺伝子と血圧レベルに相関が観察された。吹田サンプル約 2000 名で測定したところ、高血圧症例の 10%程度にアルドステロン分泌過剰の疑いがあることがわかった。アルドステロン合成酵素遺伝子（CYP11B2）のプロモーター領域の T(-344)C 多型と食塩摂取量、収縮期血圧の関係を定量的に評価した。薬物応答・副作用発現を規定する各種薬物動態関連遺伝子のうち、CYP2C8、CYP2D6、ABCC1 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
加藤 規弘 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
藤本純一郎 国立成育医療センター研究所
副所長

澤田 純一 国立医薬品食品衛生研究所
部長

A. 研究目的

臨床試料に対する遺伝子及び遺伝子産物網羅的な解析を出発点として、疾患の発生・進展、薬物応答に関する分子経路の解明に基づく、認知症・がん・糖尿病・高血圧・喘息等の革新的な診療・予防法確立を最終目的とする。H18 年度は従来の疾患関連分子の解析を進めるとともに、今後のこの種の研究戦略の発展に最も重要な基盤として高度な科学性・倫理性を備えたバイオリソースバンクを各施設に構築、カタログ情報の提供や共同研究等を通して多施設連

携型活用を目指す。

急速に高齢化社会を迎えつつある我が国において、上記の疾患対策の重要性は言うまでもないが、そのための画期的かつ有効な戦略開発の根幹をなすのは疾患の本態解明であり、その知見を臨床に科学的に導入する努力である。ポスト・ヒトゲノムシーケンス時代に入り、遺伝子及び遺伝子産物を網羅的に把握しつつ新しい治療・診断・予防法の分子標的を強力に探索することが可能になりつつある。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、知的所有権を巡って激しい国際競争が展開されている。また、本研究が対象とする多因子疾患においては、人種や生活習慣の違いが病態や治療応答性に大きな影響を与え、日本人臨床例を対象とした疾患研究に組織的に取り組む必要がある。すなわち研究の必要要素として、①ヒト遺伝子・遺伝子産物・分子経路に関する標準的知識の体系化、②標準化や一部拠点化等により効率化・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コホート等適切なデザインで収集され、質の高い病理・薬理学的情報を含む診療情報、生活習慣・環境情報等が付随し、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豊富な臨床試料、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、早急に我が国の疾患対策において重要な使命を担う施設でシステムの基本構築を行い、継続的かつノウハウの提供等の均てんを目指すことが求められている。我が国における遺伝子・環境要因を踏まえた疾患遺伝子及びその産物の網羅的・体系的な研究を推進するための強力な基盤が形成され、その効果は広く他の研究にも間接的に波及する。診療及び予防法の標的となりうる分子及び分子経路が同定され、高齢化社会の重要課題である生活習慣病の克服に貢献する。

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において、アルツハイマー病及び他の関連疾患の DNA 試料を収集した。候補遺伝子の SNP 解析、ミトコンドリア DNA の全塩基配列解析を症例対照デザインで実施し、変異頻度、アミノ酸置換変異、性別、喫煙、飲酒、教育歴との因子分析等を行った。

②がん：国立がんセンター中央病院で初診患者対象に実施している「検査試料生検組織、摘出標本などのがん研究への利用に関するお願い」への同意に基づく診療後の剰余検体の研究目的での保管を施設内データベース及びバイオバンクとして整備した。10 例の肝細胞がん症例の肝切除標本の腫瘍部と背景肝組織から total RNA を抽出し、DNase 処理にてゲノム DNA を除去した。Affymetrix 社のプロトコルに従い、ビオチン標識 cRNA プローブを合成し、それをエクソンアレイに hybridization した。マイクロアレイより得られた蛍光シグナルを総強度補正後、アレイアシスト (Stratagene 社) を用いて解析を行った。

③糖尿病関連疾患：成因の解析と病期の定義に必要な情報・試料とを、患者・対照集団及び同一患者の入院前後について収集した。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の多型解析、プロテオーム解析を行った。WAVE 法によるミトコンドリア異常のスクリーニング系を開発して解析する等、MODY を中心に単一遺伝子異常の症例や家系を同定した。国立国際医療センター病院の 29 診療科横断的にメタボリック症候群等の生活習慣病を対象として被験者をエントリーする、病院コホート・プロジェクトを平成 17 年 11 月よりスタートした。同プロジェクトの被験者収集過程において、共通の生活習慣調査、最小限の共通臨床検査を実施し、血液と尿を採取した。血液からは DNA を抽出し、さらに血清と血漿を分離保存した。各診療科が受診患者の記述的臨床情報 (罹患病名、薬歴を含む治療歴など) を系統的に整理し、これらを階層的に構築する統合データベースへの格納を進めた。メタボリック症候群

という視点より、これまでに実施してきた動脈硬化危険因子に関する疾病ゲノム解析研究結果を総括し、データベースとして公表を開始した。

④高血圧関連疾患：吹田研究を用いた候補遺伝子多型解析を行った。保存血清などを用いて生理活性物質などの測定を行った。今までに蓄積された生理機能検査などのデータベースとして統合を進めた。

⑤喘息等免疫異常関連疾患：健常人末血、各種アレルギー疾患患者末血ならびに生検組織、川崎病患者末血、小児がん患者末血および生検組織を使用し、採取細胞における遺伝子発現プロファイリング作成、各種刺激による免疫応答関連遺伝子発現様式変化および特定機能分子同定、細胞マーカー・遺伝子情報を付与した細胞・組織保存を行った。なお、一部では血清保存も実施した。

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連鎖不平衡解析の結果を基に、必要に応じて遺伝子多型データをブロック分けし、さらにハプロタイプ解析を行った。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：認知症関連バイオバンクの登録例数は、平成 18 年度末までに、アルツハイマー病/アルツハイマー型認知症 (AD/ATD) の総数は 1,178 例、血管性認知症タイプ 63 例、AD/ATD と VD の混合型が 49 例、正常対照者は 2,329 例となり、末梢血由来 DNA を保存した。加えて、パーキンソン病患者 200 例の登録

とリンパ芽球の登録を追加し、さらに連結不可能匿名化されたパーキンソン病及び類縁疾患の髄液を登録した。また、国立精神・神経センターで行われている小児の精神発達障害家系 (110 家系) のデータベース及び精神疾患 (約 200 例) データベースとの統合準備を行い、認知症バイオバンクの臨床情報の付加価値を高めた。ミトコンドリア DNA に関する SNP 解析を行い、D-loop の c303cc、c16245t 及び ND4 の g11914a 等、アルツハイマー病との関連が示唆される SNP を複数見いだした。また、リボローム RNA 領域に変異の多いことがわかった。これらは欧米からの報告と異なる結果であった。

②がん：既に病理検体で約 33,000 症例、血清・血漿検体で約 11 万本が保管されているがんバイオバンクのシステムの基本設計を終了した。国立がんセンター外の研究者とは、共同研究契約等に基づいて試料等の共同解析が可能である。肝細胞がんについて、ゲノム網羅的にエクソンレベルの発現解析を行うことで、肝がんの分子経路を探索した。全エクソンのスプライシングインデックスを算出し、クラスタリングを行った結果、非がんとがんが完全に独立したクラスターに分類され、肝細胞がんの発生に係わる分子経路異常に起因する特異的な結果であると考えられた。

③糖尿病関連疾患：既取得試料も含め、ゲノム・血清のそろった糖尿病患者約 950 例、対照約 500 例、同一患者の教育入院前後のペア血清 170 例、糖尿病網膜症患者・の硝子体液各 35 例を、背景情報・臨床情報とともに収集した。このうち教育入院前後のペア血清パネルについて、既知の代謝マーカーを解析した。昨年度に引き続き、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 13 個を抽出し、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ー領域をシークエンスした結果、約 220 の SNP を同定した。SELDI-TOF-MS による硝子体液のプロテオーム解析にて、疾患特異的ピークの変化を探索した。

④高血圧関連疾患：高血圧素因遺伝子の候補 10 種類 (SCNN1B、KCNJ1、CLCNKB、SLC12A3、SLC9A2、SLC9A3、GPX3、PTEN、UMOD、ELN) に関し塩基配列解

析を行い、多型・変異を 361 種類見出した。これらの内 161 種類に関し、吹田研究 3654 人を対象として遺伝子型を決定し、血圧との相関を解析したところ、SLC9A2、UMOD、ELN 遺伝子と血圧に相関が観察された。また、血清・血漿を対象にした各種マーカー等の測定を行い、データベースとしての価値を高めた。アルドステロン症の頻度は、想定されているよりも高いと考えられ、吹田サンプル約 2000 名で測定したところ、高血圧の 10%程度でアルドステロン分泌過剰の疑いがあることがわかった。アルドステロン合成酵素遺伝子 (CYP11B2) のプロモーター領域の T(-344)C 多型において、日本人の約 45%に見られる TT 型保因者は、食塩摂取 5 グラムの増加で、収縮期血圧が 5mmHg 増大すると見積もられた。一方、CC あるいは TC 型保因者では、食塩摂取増加による収縮期血圧の増加は観察されなかった。

⑤喘息等免疫異常関連疾患：小児がん等成育医療に関連の深い難治性希少疾患患者由来試料ならびに関連する健常人由来試料についての検体保存システム構築を開始した。小児がんについては全国規模で活動する臨床研究グループと連携し 1,000 例程度の検体保存を終了した。

⑥薬物応答情報：CYP2C8 は肝臓、腎臓等を含む多くの組織で発現し、抗がん剤パクリタキセル、非ステロイド性抗炎症剤イブプロフェン等の治療薬の代謝に重要な役割を果たしている。検出していた 40 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 1 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た。ハプロタイプ解析の結果、49 種のハプロタイプ (頻度 0.01 以上のものは 8 種) を推定した。またアミノ酸置換を含まないハプロタイプは、大きく 6 グループに分類できることが明らかとなり、分類のためのタグとなる多型を選定した。

ABCC1 トランスポーターは心臓、肝臓、腎臓等に発現しており、ある種の抗がん剤等を基質として輸送し、これらの体内動態・排泄に関与する。検出していた 86 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 5 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た。ハプロタイプ解析

の結果、ブロック-1 では 12 種 (頻度 0.01 以上のものは 7 種)、ブロック 1 では 32 種 (同、10 種)、ブロック 2 では 23 種 (同、9 種)、ブロック 3 では 23 種 (同、10 種)、ブロック 4 では 13 種 (同、6 種) をそれぞれ推定した。さらに各ブロックで、頻度の高いハプロタイプを同定するためのタグとなる多型を選定した。またブロック 4 のハプロタイプ頻度は、日本人と中国人で異なることが示唆された。

CYP2D6 は、肝臓、脳を始めとする比較的多くの組織で発現しており、抗精神病薬、循環器病薬、抗うつ薬、抗ヒスタミン薬等の非常に多くの医薬品の代謝に関与している重要な酵素である。解析の結果、遺伝子の全欠損 (*5 ハプロタイプ) や重複 (*1X2、*2X2、*10X2 等)、アミノ酸置換により部分的活性低下を引き起こすもの (*10 等) や偽遺伝子との部分的組換えを示すもの (*36 等)、及びそのタンデム型 (*36-*10) 等、遺伝子構造の多様性に基づく多くのハプロタイプが認められ、日本人における CYP2D6 遺伝子構造の高度な複雑性が明らかとなった。

D. 考察

各疾患について、臨床試料と診療・病歴情報の施設内バイオバンク・データベース構築に関してはほぼ目標を達成し、今後も順調に試料等を体系的に収集し、ゲノム・プロテオーム解析を推進する体勢が整備された。これらの研究基盤は、専門医療機関という利点を生かして国際的にも質・量が充実しており、全国規模の臨床試験ネットワーク等を含めた各種共同研究を通して、他の研究者にとっての学術的意義も大きい。薬物応答関連遺伝子のハプロタイプ等の解析では第 1 相酵素が関与する基質の約 6 割をカバーする遺伝子の解析を終了し、またトランスポーターも主要なものをカバーした。薬物応答関連分子多型ではしばしば人種差が臨床的に重要な意味を持ち、日本人の情報を体系的に提供したことは学術的・社会的意義が高い。以上の成果の一部は、本研究終了後も継続する他の研究事業とも連携して、疾患ゲノムデータベース GeMDBJ (Genome Medicine Database of Japan)、代謝性疾患の統合データベー

ス JMDBase (Japan Metabolic Disease Database)等から公開した。本研究で蓄積されたノウハウやシステム等各種ツールの積極的な提供も今後行うが、これらのバンク及びデータベースを維持し、新規試料等受け入れが可能な体制を本研究終了後も継続して確保することが重要課題である。

E. 結論

ヒトゲノム研究成果をいち早く臨床研究に応用させる上で、質の高い診療等の情報が附随した臨床試料のバンク構築・維持・発展及び共同研究等による活用は今後の omics 疾患研究推進の最重要要素であり、その基盤構築が進んだ。分子網羅的な強力な手法により、新規バイオマーカー開発や疾患の本態解明に資する情報が抽出され、今後の生物学的機能解析等を踏まえて、創薬標的分子経路同定につながると期待される。

F. 健康危険情報

なし

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

「癌における転写異常活性の抑制法」

発明者：山田哲司、下重美紀、黄琳、廣橋説雄

出願予定

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

認知症等神経疾患のバイオリソース及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

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：認知症関連バイオバンクの登録例数は、平成 18 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 例となり、末梢血からの DNA が保存されている。加えて、パーキンソン病患者 200 例の登録とリンパ芽球の登録を追加し、さらに連結不可能匿名化されたパーキンソン病及び類縁疾患の髄液が登録された。また、当センターで行われている小児の精神発達障害家系 (110 家系) のデータベース及び精神疾患 (約 200 例) データベースとの統合準備を行い、認知症バイオバンクの臨床情報の付加価値を高めた。ミトコンドリア DNA に関する SNP 解析を行い、疾患と関連が示唆される SNP を複数見いだした。これらは欧米からの報告と異なる結果であった。

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、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、認知症、特にアルツハイマー病を中核に、各種神経疾患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. 認知症関連バイオバンク

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、試料を管理保存した。

DNA 試料が基本であるが、パーキンソン病については DNA 以外に血清、尿、髄液も保存した。また一部試料は、リンパ芽球化を行った。

2. ゲノム解析

候補遺伝子の SNP 解析として、ミトコンドリア DNA 全塩基配列結果をさらに詳細に検討した。変異頻度、アミノ酸置換変異、性別、喫煙、飲酒、教育歴との因子分析等を行った。

（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いただいた試料を用いた。

C. 研究結果

1. 認知症関連バイオバンク (図 1)

登録例数は、平成 18 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 例となり、末梢血からの DNA が保存されている。加えて、パーキンソン病患者 200 例の登録とリンパ芽球の登録を追加し、さらに連結不可能匿名化されたパーキンソン病及び類縁疾患の髄液が登録された。また、当センターで行われている小児の精神発達障害家系 (110 家系) のデータベース及び精神疾患 (約 200 例) データベースとの統合準備を行い、認知症バイオバンクの臨床情報の付加価値を高めた。

2. ゲノム解析

1) 比較的頻度の高い一箇所の変異の影響 (表 1)

D-loop の c303cc、c16245t 及び ND4 の g11914a などが疾患特異的である可能性が高く、また複数の SNP が疾患群とコントロール群で頻度の差が大きかった。

また、性別、喫煙、飲酒、教育歴との交互作用では、SNP の関連性が示唆された (表 2-1 ~ 2-4)。

2) 変異が多くあるとアルツハイマーになりやすいかアルツハイマー群でアミノ酸置換が多いという傾向は得られなかった。しかし、アルツハイマー群でリボソーム RNA 領域に変異の多いことが判明した (表 3)。

D. 考察

1. 認知症関連バイオバンクの充実は、ナショナルセンター疾患ゲノムデータベース (GeMDBJ) への情報提供の基礎となる。DNA 以外に血清、尿、髄液等の試料の登録も行うとともに、SNP 解析ばかりでなく、タンパク解析などの共同研究を推進させることができる。また他の疾患 (認知障害を認める小児精神遅滞患者、精神疾患など) のデータベースとの統合を進め認知症関連バイオバンクを精神神経疾患治療研究の研究基盤として有効利用することが可能になる。

2. 欧米からの報告では、ミトコンドリア DNA 多型と散発性アルツハイマー病との関連は得られないと

された。(Elson JL, et al. Human Genetics (2006; 119: 241-254.) 今回の日本人での検討では、有意な関連性の可能性がある SNP が、複数個見いだされた。またリボソーム RNA 領域の変異が疾患群で多いことが見いだされ、その意義を今後検討してゆく必要がある。また正常日本人の結果は、糖尿病などの他の疾患の基礎データとしても極めて有用である。

E. 結論

1. 認知症関連バイオバンクは、アルツハイマー病以外の関連疾患、パーキンソン病の症例を追加できた。また、小児精神発達遅滞家系、精神疾患のデータベースとの統合が進んでおり、質量ともに充実したデータベースとなった。

2. ゲノム解析としては、ミトコンドリア DNA の疾患関連の領域及び SNP が見いだされた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Umemura K, Yamashita F, Yu X, Arima K, Asada T, Makifuchi T, Murayama S, Saito Y, Kanamaru K, Goto Y, Kohsaka S, Kanazawa I, Kimura H. Autotaxin expression is enhanced in frontal cortex of Alzheimer-type dementia patients. *Neurosci Letter* 400: 97-100, 2006.

2) Sharli A-M, Jennings R, Shi J, Bailey K, Davidson Y, Tian J, Bigio EH, Ghetti B, Murrell JR, Delisle MB, Mirra S, Crain B, Zolo P, Arima K, Iseki E, Murayama S, Kretschmar H, Neumann M, Lippa C, Halliday G, MacKenzie J, Khan N, Ravid R, Dickson D, Wszolek Z, Iwatsubo T, Pickering-Brown SM, Mann DMA. Comparison of extent of tau pathology in patients with frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17), frontotemporal lobar degeneration with Pick bodies and early onset

Alzheimer's disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 32: 374-387, 2006.

3) Nakano S, Asada T, Yamashita F, Kitamura N, Matsuda H, Hirai S, Yamada T. Relationship between antisocial behavior and regional cerebral blood flow in frontotemporal dementia. *NeuroImage* 32: 301-306, 2006.

4) 木村英雄、後藤雄一、和田圭司、高坂新一. 国立精神・神経センター神経研究所. *Cognition Dementia* 5: 346-349, 2006.

5) 後藤雄一. ミトコンドリア病による知的発達障害の分子遺伝学. *神経研究の進歩* 50: 781-791, 2006.

6) 有馬邦正, 大出貴士, 坂元綾子, 木崎菜美子. *臨床検査* 50: 1111-1120, 2006.

2. 学会発表

(国内学会)

1) 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ー利根町研究ー、第20回日本老人精神医学会、東京、6.16、2005

2) 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ー利根町研究ー、第20回日本老人精神医学会、東京、6.16、2005

3) 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ー利根町研究ー、第20回日本老人精神医学会、東京、6.17、2005

4) 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

5) 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ーうつ病・うつ状態と認知機能との関係ー、第20回日本老人精神医学会、東京、6.17、2005

(国際学会)

1) arima K. Ultrastructural characteristics of tau filaments in tauopathies: immuno-electron microscopic demonstration of tau filaments. XVI International Congress of Neuropathology, San

Francisco, USA, 9.10-15, 2006

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

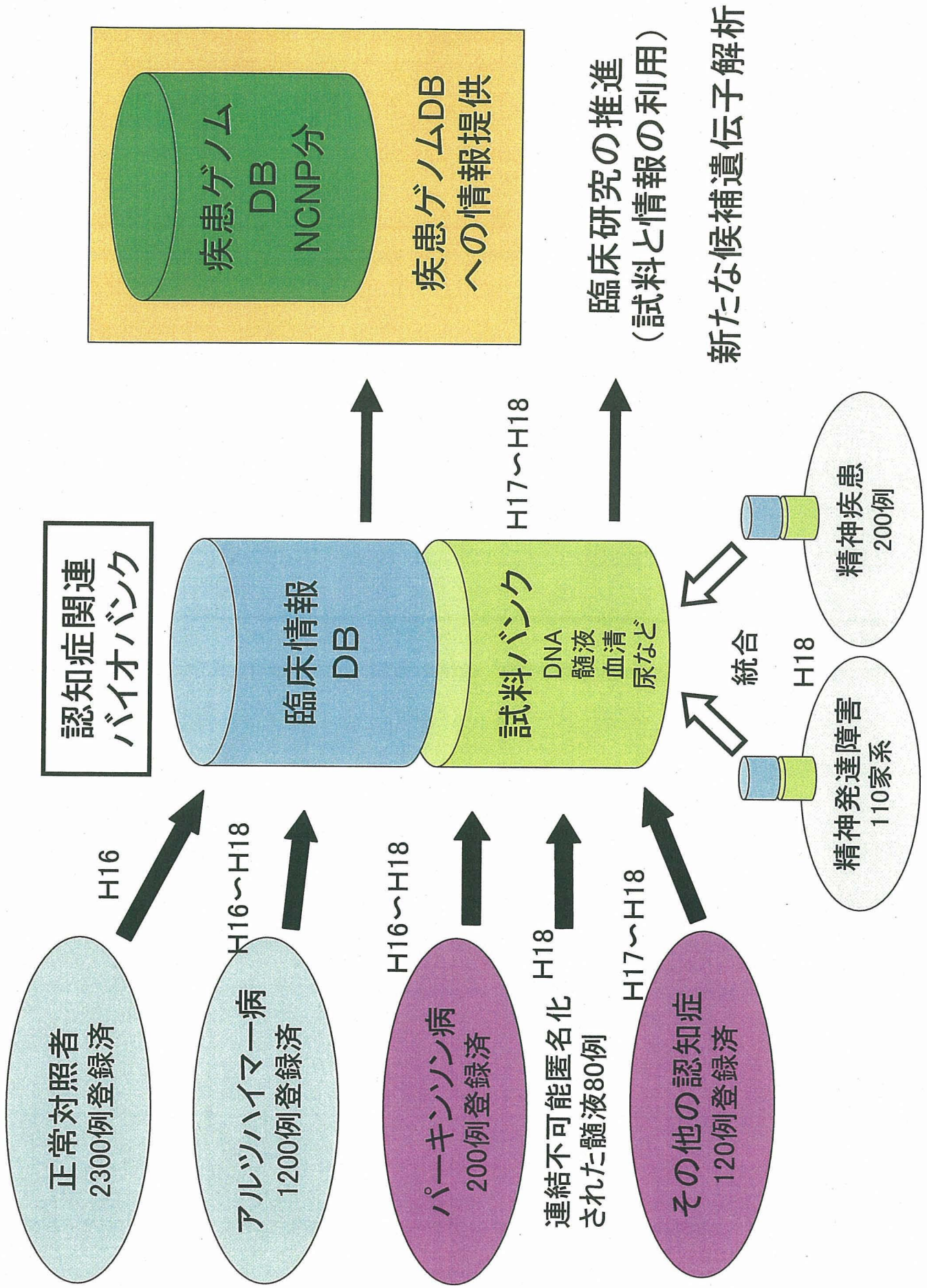


図1 認知症関連バイオバンクの登録数

可能性大
 頻度差が大きい
 十分な検出力が得られていない

SNP_No	gene	Location	AA_change	% case	% cont	Odds Ratio	LowerCL	UpperCL	P value	Other study
57	D-loop	c303cc	-	53.2	41.9	1.71	1.027	2.856	0.039	
60	D-loop	c309t	-	1.9	5.4	0.26	0.060	1.115	0.070	
101	12SrRN	a663g	-	7.8	3.1	2.75	0.840	8.980	0.094	
128	12SrRN	t1107c	-	4.5	1.6	3.70	0.706	19.365	0.122	
156	16SrRN	a1736g	-	7.8	3.1	2.88	0.880	9.413	0.080	
181	16SrRN	c2766t	-	2.6	0.0	1443937.12	0.000		0.981	
276	ND2	a4715g	Syn	1.9	4.7	0.29	0.065	1.275	0.101	
284	ND2	a4824g	T-A	7.8	2.3	3.67	0.985	13.672	0.053	
325	ND2	a5301g	I-V	4.5	1.6	3.70	0.706	19.365	0.122	
426	COI	c7196a	Syn	1.9	4.7	0.29	0.065	1.275	0.101	
469	COII	t8200c	Syn	1.3	5.4	0.22	0.042	1.161	0.075	
518	ATP6	c8794t	H-Y	8.4	3.1	3.00	0.928	9.725	0.066	
608	ND3	c10181t	Syn	0.0	3.1	0.00	0.000		0.981	
620	ND3	a10397g	Syn	4.5	1.6	3.70	0.706	19.365	0.122	
679	ND4	c11647t	Syn	7.1	2.3	3.25	0.866	12.220	0.081	
682	ND4	g11696a	V-I	0.0	3.1	0.00	0.000		0.981	
693	ND4	g11914a	Syn	2.6	7.8	0.28	0.078	0.974	0.045	
705	tRNA-H	a12172g	-	0.0	3.1	0.00	0.000		0.981	
715	ND5	g12372a	Syn	7.1	2.3	3.83	0.963	15.226	0.057	
753	ND5	t12957c	Syn	0.6	3.9	0.19	0.020	1.824	0.150	
762	ND5	a13105g	I-V	3.9	0.0	1359177.72	0.000		0.977	
780	ND5	t13392c	Syn	2.6	0.0	1038853.29	0.000		0.982	
835	ND5	a14133g	Syn	2.6	0.0	1296878.38	0.000		0.981	
932	cytb	t15440c	Syn	0.0	3.1	0.00	0.000		0.981	
936	cytb	a15487t	Syn	1.9	4.7	0.29	0.065	1.275	0.101	
1002	D-loop	t16140c	T-C	3.9	7.8	0.44	0.146	1.331	0.146	
1025	D-loop	c16184t	-	1.9	4.7	0.27	0.064	1.174	0.081	
1051	D-loop	t16224c	-	2.6	0.0	1598069.14	0.000		0.981	
1061	D-loop	c16245t	-	4.5	0.0	1402399.77	0.000		0.975	
1083	D-loop	c16287t	-	0.0	3.1	0.00	0.000		0.981	
1085	D-loop	c16290t	-	7.8	3.9	2.69	0.818	8.822	0.103	
1126	D-loop	a16497g	-	6.5	2.3	3.50	0.861	14.219	0.080	
1127	D-loop	t16519c	-	45.5	55.0	0.61	0.369	1.021	0.060	

表1 アルツハイマー病207例とコントロール200例のミトコンドリアDNA

Region	Location	Amino-acid change	p-value
D-loop	t16298c	noncoding	0.00854
ATP6	g8584a	非同義	0.03916
D-loop	t16189c	noncoding	0.04092
D-loop	c303ccc	noncoding	0.04182
ND4	a11084g	非同義	0.04706
16SrRN	c2772t	noncoding	0.04787

表2-1 性別との交互作用

Region	Location	Amino-acid change	p-value
ATP6	g8584a	非同義	0.012109
D-loop	t16298c	noncoding	0.012378
ND2	c5178a	非同義	0.022756
D-loop	t152c	noncoding	0.028587
D-loop	a16497g	noncoding	0.047025

表2-2 喫煙との交互作用

Region	Location	Amino-acid change	p-value
D-loop	t16311c	noncoding	0.02395

表2-3 飲酒との交互作用

Region	Location	Amino-acid change	p-value
D-loop	c303cc	noncoding	0.005499
ND1	c4071t	同義	0.022061
D-loop	a16497g	noncoding	0.035615
D-loop	g16129a	noncoding	0.035667
12SrRN	a1382c	noncoding	0.041824

表2-4 教育歴との交互作用

表2 ミトコンドリアDNA多型と性別、喫煙、飲酒、教育歴との交互作用

region	Estimate	StdErr	ProbChiS
dloop1	0.1034	0.0765	0.1762
dloop2	-0.0571	0.0642	0.3738
rRNA			^g
12SrRNA	0.3868	0.1699	0.0228
16SrRNA	0.1711	0.1503	0.2552
all rRNA	0.3357	0.1283	0.0089
tRNA			
tRNA phe	0.6844	0.9581	0.475
tRNA val	-0.4387	0.9498	0.6442
tRNA L(UUA)	13.9747	1221.2	0.9909
tRNA gln	0.3235	0.3969	0.415
tRNA try	-0.4451	1.5538	0.7746
tRNA ala	0.1608	0.6495	0.8045
tRNA asn	13.7115	1221.2	0.991
tRNA cys	-0.1066	0.6971	0.8785
tRNA tyr	0.568	1.2406	0.647
tRNA asp	-1.0349	1.5212	0.4963
tRNA lys	-0.9425	1.2676	0.4571
tRNA gly	-14.6015	857.4	0.9864
tRNA arg	-0.1986	0.6286	0.7521
tRNA his	-1.2735	0.8238	0.1221
tRNA S(AGY)	-1.5127	1.1704	0.1962
tRNA L(CUN)	14.5157	843.5	0.9863
tRNA glu	-0.9712	0.7976	0.2234
tRNA thr	-0.4483	0.5031	0.3729
tRNA pro	-0.4985	1.446	0.7303
all tRNA	-0.2403	0.2077	0.2474
coding region			
ND1	-0.1143	0.1528	0.4544
ND2	-0.0376	0.143	0.7926
CO1	-0.2222	0.1457	0.1271
CO2	-0.3276	0.1813	0.0707
ATP8	0.1869	0.1886	0.3219
ATP6	-0.041	0.1578	0.795
CO3	-0.3327	0.4493	0.459
ND3	-0.0447	0.1295	0.73
ND4L	0.0845	0.3156	0.7888
ND4	-0.0186	0.1293	0.8854
ND5	0.0251	0.1219	0.8367
ND6	0.1278	0.1795	0.4766
cytb	-0.1035	0.0824	0.2089

表3 ミトコンドリアDNAの領域毎の多型数

がんのプロテオーム解析

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：タンパク質をコードする遺伝子には多様な転写開始点があり、さらに選択的スプライシング、タンパク質に翻訳後のリン酸化や糖鎖の修飾、タンパク質切断や分解などの過程で生じる中間産物の蓄積などによりプロテオームの多様性が生み出され、疾患関連分子経路の異常を来しているものと考えられる。エクソンアレイは一枚のアレイ上に全ゲノムのすべてのエクソンに対応するプローブセットが設計されており、未知のエクソンを含むゲノムワイドなエクソンレベルの遺伝子発現解析が可能になっている。我々は肝細胞がん特異的なエクソンレベルの発現解析を試み、肝発がんの分子経路を探索した。

A. 研究の目的

ヒトゲノムプロジェクトが終了し、ヒトのタンパク質をコードする遺伝子の数は 20000 強といわれているが、高度な生命現象や複雑な経過をとる疾患応答関連分子経路の全てを説明するには少ない数であると思われる。しかし限られた遺伝子にも、それぞれに多様な転写開始点があり、選択的スプライシング、タンパク質に翻訳後のリン酸化や糖鎖の修飾、タンパク質切断や分解などの過程で生じる中間産物などによりプロテオームの多様性が生み出され、複雑な生命現象を担保していると考えられる。実際ヒト遺伝子の 60%はスプライシングを受け、遺伝子あたり平均 10 種類のスプライシングバリエーションが生じるとも言われている。質量分析機を用いて網羅的にタンパク質のアミノ酸配列を決定すると、従来知られていないエクソンが多く実際に発現し、タンパク質に翻訳されていることが最近明らかになっている。

がん等の疾患関連分子経路と選択的スプライシングの関連についても一部の遺伝子では解明が進んでいる。がん抑制遺伝子のがん細胞ではスプライシングをうけて不活化している例や、がん組織で特異的なスプライシングバリエーションが通常型のバリエーション

に対して抑制的に働くという例が見られる。スプライシングの調節異常は疾患の発生に大きく関係し、シングルポイントミューテーションの約 15%はスプライシング異常を引き起こしているとも言われている。しかしその全容は不明であり、今後のスプライシング研究によりがん疾患応答関連分子経路が解明されることが期待される。

これまでエクソンレベルの発現解析は、限られた数の遺伝子をピックアップし、それらの遺伝子のエクソンのつなぎ目にまたがるようにプローブを設定したジャンクションアレイなどによる報はあるが、ゲノム全体にまたがる大規模な解析の報告はなかった。Affymetrix 社が開発したエクソンアレイでは、一枚のチップ上に全ゲノムの予測されるエクソンに対応するプローブが設計されており、エクソンレベルでの発現変化をゲノム規模で解析できる。我々は肝細胞がん特異的なエクソンレベルの発現解析を試み、肝発がんの分子経路を探索した。

B. 研究方法

10 例の肝細胞がん症例の肝切除標本の腫瘍部と背景肝組織から 1 μ g のトータル RNA を抽出し、DNase 処理にてゲノム DNA を除去した。Affymetrix

社のプロトコールに従い、ビオチン標識 cRNA プローブを合成し、それをエクソンアレイに hybridization した。マイクロアレイより得られた蛍光シグナルを総強度補正後、アレイアシスト

(Stratagene 社) を用いて解析を行った。アレイアシストによりエクソンレベルでのシグナル (エクソンシグナル) と遺伝子レベルでのシグナル (ジーンシグナル) をそれぞれ別々に算出した。次にジーンシグナルに対するその遺伝子中のひとつのエクソンシグナル値より、各エクソンに対するスプライシングインデックスを算出し、エクソンレベルでの発現解析の指標とした。

(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手術組織標本を用いた。

C. 研究結果

全遺伝子のジーンシグナルを算出し、人工的なクラテリアにて遺伝子の抽出を行うことなく階層的クラスタリングを行うと、非がんとがんの検体が完全に別のクラスターに分類されたが、同様に全エクソンのスプライシングインデックスを算出し、クラスタリングを行った結果、非がんとがんが完全に独立したクラスターに分類された。この結果はエクソンレベルの発現がランダムにおきているわけではなく、肝細胞がんの発生に係わる分子経路に以上に起因する特異的な結果である考えられた。

Mann-Whitney 検定で非がんとがんの間で p 値が 0.001 以下で、ジーンシグナルに 2 倍以上差があるもの 304 遺伝子、スプライシングインデックスに 2 倍以上差があるもの 324 遺伝子を同定した。この内 150 遺伝子はジーンシグナルおよびスプライシングインデックスの両方に変化がみられた。Gene Ontology に基づき機能・細胞内局在で分類すると、スプライシングインデックスに変化のある遺伝子中

には、シグナル伝達系に関与するものや細胞外因子、膜タンパクなど治療標的として期待できる分子が多く含まれていた。

アレイの結果ジーンレベルで 3 倍以上の差ある遺伝子は、がんで下がっているものが 100 遺伝子、上がっているものが 23 遺伝子同定された。一部の遺伝子についてリアルタイム PCR で検証した結果、8 遺伝子すべてでアレイと同じ結果であることが確認できた。そのうち 3 つはすでに肝細胞がんが発現に変化があることが報告されているものであり、本アレイを用いた遺伝子レベルでの発現変化に高い信頼性があることが示唆された。

スプライシングインデックスに変化の見られたエクソン内の配列でリアルタイム PCR 用のプローブを作成しエクソンレベルでの発現変化を確認したところ、7 エクソン中 5 エクソンで発現変化がアレイと一致した。これらのことからこのエクソンアレイを用いてエクソンレベルでの発現変化を検出できることが確認できた。

D. 考察

実際にスプライシングバリエーションを検出するには、スプライシングインデックスに変化のある遺伝子を同定した後、予想したスプライシングパターンに基づきそれを検出できるようなプライマーを設計し、RT-PCR、シーケンスを行い、確認する必要がある。実際は複数のバリエーションが混在している場合が多く、アレイのシグナル値からスプライシングパターンを決定するのは難しいことが多い。これまで知られているバリエーションの知見と照らし合わせることの出来ない未知のスプライシングパターンの検出は現状では困難であると予想される。

E. 結論

全エクソンのスプライシングインデックスでクラスタリングを行った結果、非がんとがんが完全に独立したクラスターに分類された。この結果はエクソンレベルの発現制御が、ランダムにおきているわけではなく、肝細胞がんの発生に係わる分子経路特異

的な現象であったと考えられる。スプライシングインデックスに変化のある遺伝子中には、シグナル伝達系に参与するものや細胞外因子、膜タンパクなど、治療標的として期待できる分子が多く含まれており、個別の遺伝子について今後検討を進める必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Idogawa M, Masutani M, Shitashige M, Honda K, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Hirohashi S, Yamada T. Ku70 and poly(ADP-ribose) polymerase-1 competitively regulate beta-catenin and T-cell factor-4-mediated gene transactivation: possible linkage of DNA damage recognition and Wnt signaling. *Cancer Res.* 2007 Feb 1;67(3):911-8.
- 2) Ono M, Shitashige M, Honda K, Isobe T, Kuwabara H, Matsuzuki H, Hirohashi S, Yamada T. Label-free quantitative proteomics using large peptide data sets generated by nanoflow liquid chromatography and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 2006 Jul;5(7):1338-47. Epub 2006 Mar 21.
- 3) 本田一文、逢坂由昭、土田明彦、青木達哉、山田哲司、放射線感受性 - 血清ペプチドプロファイルを用いた食道がん術前化学放射線療法奏効性予測の可能性 別冊医学のあゆみ Ver. 3, 2006, 341-344.
- 4) 本田一文、山田哲司、ゲノム・プロテオーム情報を利用した薬剤感受性・副作用予測 臨床と研究 2006, 83:1270-1273.
- 5) 下重美紀、本田一文、尾野雅哉、山田哲司、5. プロテオミクスの臨床応用への期待 *Annual Review 呼吸器* 2007, 208-213.
- 6) 尾野雅哉、本田一文、山田哲司、腫瘍マーカー *クリニカルプラクティス* 2007, 26:35-36.

2. 学会発表

- 1) 97th Annual Meeting, American Association for Cancer Research Idogawa M, Sato S, Shinomura Y, Imai K, Tokino T, Hirohashi S, Yamada T. Proteomic analysis of a nuclear complex containing β -catenin and TCF-4.
- 2) Honda K, Hirohashi S, Yamada T. Association of the β -catenin and actinin-4 in infiltrating colorectal cancer cells.
- 3) 28th Congress of the Society of International Urology Hara T, Honda K, Umaki T, Ono M, Hayashida Y, Naito K, Hirohashi S, Yamada T. Two serum biomarkers of renal cell carcinoma by surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry
- 4) 2nd International Cancer Biomarker Consortium Conference 2006 Yamada T, Honda K, Ono M, Hirohashi S. Biomarker discovery strategy of Japanese ICBC team
- 5) Ono M, Honda K, Hirohashi S, Yamada T. Plasma biomarker discovery by a new proteome platform 2DICAL Honda K, Ono M, Hirohashi S, Yamada T.
- 6) Development of a biomarker discovery software platform NCC-ProteoJudge for large-scale clinical proteomics
- 7) International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa 2007 Yamada T. Proteomic analysis of β -catenin-mediated colorectal carcinogenesis
- 8) 第1回肺がん分子病態研究会 山田哲司、網羅的発現解析による放射線・化学療法の治療効果予測の可能性
- 9) 第65回日本がん学会学術総会 山田哲司、本田一文、下重美紀、尾野雅哉、廣橋説雄、プロテオミクスによる大規模解析とその臨床応用
- 10) 第26回日本分子腫瘍マーカー研究会 山田哲司、血漿・血清プロテオミクスによる新しいがんの診断法の開発と実用化
- 11) 第45回今堀フォーラム 山田哲司、プロテオーム解析を用いた発がんの分子機構解明と新しい診断法の開発
- 12) 第9回ヒューマンサイエンス総合研究ワークショップ 山田哲司、プロテオミクスによる新規バイオマーカー探索
- 13) 第3回千葉疾患プロテオミクス研究会 山田哲司、プロテオーム解析による発がん機構の解明と新しい診断法の開発
- 14) 第9回がん治療増感研究シンポジウム 山田哲司、臨床応用を目指したプロテオーム研究の現況と

展望

15) 第 16 回泌尿器科分子・細胞研究会 山田哲司、
臨床応用を目指した疾病プロテオミクスの現状と展
望

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「「がんにおける転写異常活性の抑制法」

発明者：山田哲司、黄琳、下重美紀、廣橋説雄

特許出願準備中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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 950 例、対照約 500 例、同一患者の教育入院前後のペア血清 170 例、糖尿病網膜症患者・の硝子体液各 35 例、等を、背景情報・臨床情報とともに収集した。昨年度に引き続き、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 13 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ケンスした結果、約 220 ほどの SNP を同定した。SELDI-TOF-MS（プロテインチップシステム）による、硝子体液のプロテオーム解析を、条件検討も含め引き続き行っている。

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、発症年令、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、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 μ DE、同定はLC μ 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、他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、血清の一部はプロテオームファクトリーに解析をゆだねる。

(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、全体の数%を占めると考えられている単一遺伝子病タイプ同定は、臨床的にも研究面からも重要であるが、実際の臨床の場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。

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」を遵守し、試料等提供者の人權とプライバシーを保証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18年度までの累計で、ゲノム/血清を得ている糖尿病患者約950名、対照約500名、また同一患者の教育入院前後の血清ペア170名、また硝子体液については、網膜症患者35例、非糖尿病患者35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) 教育入院パネルの解析

同一患者の教育入院前後の血清ペアパネルについて、その有用性を検討する目的も兼ねて、既知の代謝マーカーを測定した。最近、脂肪組織から分泌されるいわゆるアディポサイトカインが、多彩な生理活性作用をもつことから、代謝だけでなく、動脈硬化や炎症、発ガンなどとの関係で注目されている。そのなかで、体脂肪量を反映するとされるレプチンと、インスリン感受性を高め肥満でむしろ低下するアディポネクチン（高分子アディポネクチン）との比 (A/L) が、インスリン抵抗性に対して、従来よく指標として利用されている HOMA-R よりも鋭敏なマーカーになる、との報告が、主に断面的な研究から散見される。

教育入院後には、体重変化だけでは説明がつかないほどインスリン感受性が増し、血糖コントロールが改善し、しかも糖尿病治療効果が長続きすることが、経験的に知られている。そこで、同一患者で、糖尿病教育入院前後でこの A/L 比が変化するかどうか、治療効果を反映する指標となるかどうかを、preliminary に調べた。

80名の2型糖尿病患者を選んで、教育入院前後の血清で A/L 比を測定した。A/L 比はかなり広く分布したが、驚いたことに、同一人では入院前後ではこの比はほとんど変化がなく、体重変化や血糖コントロール・インスリン感受性の改善をほとんど反映していなかった。一方、PPAR ガンマアゴニストが投与された症例でのみ、A/L 比が著明に大きく（10倍程度）増加したが、この変化は糖尿病治療効果と必ずしも平行しなかった。