

201135002A

厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実現化研究事業

網羅的統合オミックス解析を用いた難病の原因究明と
新規診断・治療法の確立

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

京都大学医学研究科附属ゲノム医学センター
松田文彦

2012(平成 24)年 3 月

目 次

I. 本事業について	1
II. 研究班構成	2
III. 総括研究報告 網羅的統合オミックス解析を用いた難病の原因究明と 新規診断・治療法の確立	3
研究代表者・松田 文彦 (京都大学医学研究科・教授)	
IV. 分担研究報告	
1. 山田 亮 (京都大学医学研究科・教授)	7
2. 寺尾知可史 (京都大学医学研究科・特定助教)	9
3. 川口 喬久 (京都大学医学研究科・産官学連携研究員)	12
4. 佐藤 孝明 (株式会社島津製作所 基盤技術研究所 ライフサイエンス研究所 所長)	14
5. 松原 謙一 (株式会社 DNA チップ研究所・取締役名誉所長)	15
V. 解析プロトコル	
1. IgG4 関連疾患	17
2. 肺高血圧症	24
VI. 研究成果の刊行に関する一覧表	33
VII. 学会発表に関する一覧表	37
VIII. 研究成果による特許等の知的財産権の出願・登録状況	39
IX. 研究成果の刊行物・別刷	41

I. 本研究事業について

希少難治性疾患（難病）の発症と予後には、頻度は低いが高相対的貢献度の高い遺伝子多型が深く関わっているが、そういった多型をとりこぼさず解析するには、SNP アレイによる解析に加えて次世代遺伝子解析装置を用いた網羅的解析が大きな力を発揮する。しかしながら、難病の克服にはゲノム解析のみを利用した戦略では限界があり、予知、診断、予後予測に加え、治療法の開発や創薬のためには、新たな疾患関連バイオマーカーの同定が極めて重要である。例えば、血中の代謝物の解析は、患者の病状把握に非常に有用な情報を提供し、また疾患の病態は、末梢血中の白血球の遺伝子発現パターンに直接反映される。そこで本研究では、次世代遺伝子解析装置やマイクロアレイ技術を駆使した網羅的ゲノム・転写物解析に加えて、我が国が誇る最先端の質量分析技術を利用した網羅的代謝物解析を加えた統合オミックス解析の拠点を構築し、疾患関連遺伝子や新たなバイオマーカーの同定を通じた疾患発症の分子機序の解明や、患者群内での亜集団解析による重症度・予後予測因子の同定を目指す。

本研究では、いかに高品質で多数の対照群検体を持つかが第二の鍵となるが、京都大学医学研究科附属ゲノム医学センターは、京都大学医学研究科が滋賀県長浜市、長浜市民との連携で実施している、我が国初の本格的ゲノム・環境情報統合解析研究である「ながはま0次コホート事業」の中核拠点であり、一万人の健康な住民の高品質かつ詳細な生活習慣・環境情報、臨床情報、生体試料に加え、約4,000人の網羅的ゲノム多型解析データを有している。疾患患者のデータとの比較による、疾患特異的ゲノム変異、疾患や予後と関わるオミックス情報の迅速かつ効率的な探索を通して、疾患の診断、治療、予後を含めた個人に応じた系統的治療法の確立、疾患予知バイオマーカーの発見と創薬シーズの算出に加え、疾患の正確な発症率や相対危険度の推定、疾患未発症者に対する予防的介入、臨床検査・分子診断産業の新規創出などの、医療行政上極めて大きな成果が期待される。

疾患を遺伝子や細胞のレベルで見るのではなく、「分子を通して身体全体で見る」このような革新的戦略はいまだ世界で例がなく、様々な病気の分子解析の極めてよいモデルケースとなるばかりか、究極の Human Bioscience としてのゲノム・環境情報統合解析の標準的手法の確立が本研究の最終目標である。

京都大学医学研究科附属ゲノム医学センター

松田 文彦

II. 研究班構成

区 分	氏 名	所 属	職 名
研究代表者	松田文彦	京都大学医学研究科 附属ゲノム医学センター	センター長 教授
研究分担者	山田亮	京都大学医学研究科 附属ゲノム医学センター	教授
	川口喬久	京都大学医学研究科 附属ゲノム医学センター	研究員 (産官学連携)
	寺尾知可史	京都大学医学研究科 附属ゲノム医学センター	特定助教
	佐藤孝明	株式会社島津製作所 基盤技術研究所 ライフサイエンス研究所	所長
	松原謙一	D N A チ ッ プ 研 究 所	取締役 名誉所長
事務局	金澤雅美	606-8507 京都市左京区聖護院川原町 53 京都大学医学研究科 附属ゲノム医学センター 電話：075-336-7400 Fax：075-751-4167 mkana@genome.med.kyoto-u.ac.jp	
経理事務 担当者	山本浩司	606-8501 京都市左京区吉田近衛町 京都大学医学研究科経理・研究協力室 電話：075-753-4685 Fax：075-753-4348 igakukenkyou@mail2.adm.kyoto-u.ac.jp	

Ⅲ. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実現化研究事業
（難病関係研究分野））総括研究報告書

網羅的統合オミックス解析を用いた難病の原因究明と新規診断・治療法の確立

研究代表者：京都大学医学研究科・教授 松田 文彦

研究要旨

ゲノム、代謝物、転写物の網羅的解析を組み合わせた、極めて独創性の高い統合オミックス解析を実施し、疾患の予知、診断、予後予測に加え、治療法の開発や創薬のための情報の統合をおこなう。対象疾患として、IgG4 関連疾患、肺高血圧症、HTLV-1 関連疾患を選び、難病研究班との連携体制を構築して解析プロトコルを策定し、検体と臨床情報の収集を開始した。また本年度は健常者対照群のオミックス情報を分析・解析し、データベースを構築した。本事業の成果は、「遺伝子リファレンスライブラリー事業」で構築されるデータベースを通して広く公開し、また研究者間での共有を促進する。

A. 研究目的

難病の原因解明や診断・治療法の確立には、ゲノム解析だけではなく、生体内の分子の統合解析が必須である。本課題ではゲノム、代謝物、転写物の網羅的解析を組み合わせた、極めて独創性の高い統合オミックス解析を実施し、疾患の予知、診断、予後予測に加え、治療法の開発や創薬のための情報の統合をおこなう。

B. 研究方法

事業の一年目である本年度は、健常者対照群のオミックス情報の集積を通じた事業の各実施項目のフローの最適化と併せて、解析対象疾患の選定と疾患ごとの解析プロトコルの策定と検体の収集、統合オミックスデータベースの構築と運用試験、異なるデータセットを総合的に解析する統計学的手法の開発を実施した。

（倫理面への配慮）

すべて国の倫理指針他に基づき書面による同意が得られた場合にのみ、匿名化を二度実施し、ゲノム情報と個人情報とが連結されて漏洩することが決して起こらないように留意留意のうえ解析に使用する

C. 研究結果

2011年度は計画に沿って、以下を実施した（詳細は、分担研究者の報告書を参照）。

疾患の選定

IgG4 関連疾患（千葉班と連携）、HTLV-1

関連疾患、混合性結合組織病を含む肺高血圧症（吉田班と連携）を選定した。良性家族性ミオクロームステんかんは、他の研究グループにより年度途中で疾患関連遺伝子が同定されたので、候補疾患から除外した。これに加えて、難治性循環器疾患（小室班）、小児難病のゲノム解析（平家班）との連携も確立された。

研究計画策定

IgG4 関連疾患、肺高血圧症について解析プロトコルを策定し、検体収集／臨床情報収集を開始した。HTLV-1 関連疾患に関しては、以前からの継続で検体、情報を利用して解析を続行している。また、災害対応計画、事業継続計画の検討に着手し、24年度前半に検体／情報の分散を開始する予定である。

生体試料の分析・解析

健常者対照群の検体収集を用い、ゲノムスキャン、Exome 解析、GC-MS による網羅的代謝物解析、白血球を用いた転写物解析を開始した。Exome 解析や代謝物解析では、試料の調製法、実験条件などの検討を開始し、大規模データ分析・解析の基盤を整えた。年度末までに、300 検体についてゲノムスキャン、代謝物解析、転写物解析が終了した。Exome 解析は現在 100 例超の結果が得られており、2012 年度前半に終了する見込みである。

バイオインフォマティクス

代謝物・転写物の中間形質データベースを新たに構築し、臨床情報データベースは、対象疾患の臨床情報収集プロトコルに応

じて既存のものをカスタマイズして構築をほぼ終了した。

統計遺伝学的解析

対象疾患の臨床情報収集プロトコールに応じ、解析計画の立案を開始した。データの蓄積と共に、適宜検討・改訂を進めている

D. 考察

本年度は、分析・解析の最適化と得られるデータの扱いに関するシステムの試験的運用と対照群検体を用いた解析に注力し、対照群の解析は Exome 解析を残すのみとなった。また疾患別臨床情報データベースの構築と、統合解析のための統計学的手法の開発も並行して実施した。

疾患の解析については、解析プロトコールの策定が終了し、また厚労省の難病研究班との連携体制も構築され、検体・情報の収集が開始された。

E. 結論

事業は、当初の研究計画に沿って非常に順調に進捗している。特に、健常者の統合オミックス情報は、如何なる疾患の解析にも極めて重要な基盤情報であり、遺伝子リファレンスライブラリー事業を通して、多くの班で共有できるように公開を進めたい。疾患の解析は、24 年度に集中して実施し、解析能力と豊富な情報基盤を生かして短期間で疾患関連遺伝子の同定を目指す。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Terao, C., Yamada, R., Ohmura, K., Takahashi, M., Kawaguchi, T., Kochi, Y., Human Disease Genomics Working Group, RA Clinical and Genetic Study Consortium, Okada, Y., Nakamura, Y., Yamamoto, K., Melchers, I., Lathrop, M., Mimori, T. and Matsuda, F. (2011) The human *AIRE* gene at chromosome 21q22 is a genetic determinant for the predisposition to rheumatoid arthritis in Japanese population. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 2680-2685.
2. Nakata, I., Yamashiro, K., Yamada, R., Gotoh, N., Nakanishi, H., Hayashi, H., Tsujikawa, A., Otani, A., Saito, M., Iida, T., Oishi, A., Matsuo, K., Tajima, K., Matsuda, F. and Yoshimura, N. (2011) Association between the *SERPING1* Gene and Age-Related Macular Degeneration and Polypoidal Choroidal Vasculopathy in Japanese. *PLoS One.* **6**, e19108.
3. Terao, C., Ohmura, K., Katayama, M., Takahashi, M., Kokubo, M., Diop, G., Toda, T., Yamamoto, N., Human Disease Genomics Working Group, RA Clinical and Genetic Study Consortium, Shinkura, R., Shimizu, M., Gut, I., Heath, S., Melchers, I., Manabe, T., Lathrop, M., Mimori, T., Yamada, R. and Matsuda, F. (2011) Myelin basic protein as a novel genetic risk factor in rheumatoid arthritis - A genome-wide study combined with immunological analyses. *PLoS One.* **6**, e20457.
4. Meziani, R., Yamada, R., Takahashi, M., Ohigashi, K., Morinobu, A., Terao, C., Hiratani, H., Ohmura, K., Yamaguchi, M., Nomura, T., Vasilescu, A., Kokubo, M., Renault, V., Hirosawa, K., Ratanajaraya, C., Heath, S., Mimori, T., Sakaguchi, S., Lathrop, M., Melchers, I., Kumagai, S. and Matsuda, F. (2011) A Trans-ethnic genetic study of Rheumatoid Arthritis identified *FCGR2A* as a candidate common risk factor in Japanese and European populations. *Mod. Rheumatol.* **22**, 52-58.
5. Ratanajaraya, C., Nishimura, H., Takahashi, M., Kawaguchi, T., Saito, R., Mikami, Y., Suyama, M., Lathrop, M., Yamada, R., Ogawa, O. and Matsuda, F. (2011) A polymorphism of the *POLG2* gene is genetically associated with the invasiveness of urinary bladder cancer in Japanese males. *J. Hum. Genet.* **56**, 572-576.
6. Matsuse, M., Takahashi, M., Mitsutake, N., Nishihara, E., Hirokawa, M., Kawaguchi, T., Rogounovitch, T., Saenko, V., Bychkov, A., Suzuki, K., Matsuo, K., Tajima, K., Miyauchi, A., Yamada, R., Matsuda, F. and Yamashita, S. (2011) The *FOXE1* and *HKX2-1* are associated with susceptibility to papillary thyroid carcinoma in the Japanese Population. *J. Mol. Genet.* **48**, 645-648.
7. Okada, Y., Shimane, K., Kochi, Y., Tahira, T., Suzuki, A., Higasa, K., Takahashi, A., Horita, T., Atsumi, T., Ishii, T., Okamoto, A., Fujio, K., Hirakata, M., Amano, H., Kondo, Y., Ito, S., Takada, K., Mimori, A., Saito, K., Kamachi, M., Kawaguchi, Y., Ikari, K., Mohammed, O. W., Matsuda, K., Terao, C., Ohmura, K., Myouzen, K., Hosono, N., Tsunoda, T., Nishimoto, N., Mimori, T., Matsuda, F., Tanaka, Y., Sumida, T., Yamanaka, H., Takasaki, Y., Koike, T., Horiuchi, T., Hayashi, K., Kubo, M., Kamatani, N., Yamada, R., Nakamura, Y. and Yamamoto, K. (2012) A Genome-Wide Association Study Identified *AFF1* as a Susceptibility Locus for Systemic Lupus Erythematosus in Japanese. *PLoS Genet.* **8**, e1002455.

8. Kato, L., Beguma, N. A., Burroughs, M., Doi, T., Kawai, J., Daub, C. O., Kawaguchi, T., Matsuda, F., Hayashizaki, Y. and Honjo, T. (2012) Nonimmunoglobulin target loci of activation-induced cytidine deaminase (AID) share unique features with immunoglobulin genes. *Proc. Natl., Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 2479-2484.
9. Okada, Y., Terao, C., Ikari, K., Kochi, Y., Ohmura, K., Suzuki, A., Kawaguchi, T., Stahl, E. A., Kurreeman, F. A., Nishida, N., Ohmiya, H., Myouzen, K., Takahashi, M., Sawada, T., Nishioka, Y., Yukioka, M., Matsubara, T., Wakitani, S., Teshima, R., Tohma, S., Takasugi, K., Shimada, K., Murasawa, A., Honjo, S., Matsuo, K., Tanaka, H., Tajima, K., Suzuki, T., Iwamoto, T., Kawamura, Y., Tanii, H., Okazaki, Y., Sasaki, T., Gregersen, P. K., Padyukov, L., Worthington, J., Siminovitch, K. A., Lathrop, M., Taniguchi, A., Takahashi, A., Tokunaga, K., Kubo, M., Nakamura, Y., Kamatani, N., Mimori, T., Plenge, R. M., Yamanaka, H., Momohara, S., Yamada, R., Matsuda, F. and Yamamoto, K. (2012) Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Nat. Genet.* **44**, 511-517.
10. Kawaguchi, T., Yoshio Sumida, T., Umemura, A., Matsuo, M., Takahashi, M., Takamura, T., Yasui, M., Saibara, T., Hashimoto, E., Kawanaka, M., Watanabe, S., Kawata, S., Imai, Y., Kokubo, M., Shima, T., Park, H., Tanaka, H., Tajima, K., Yamada, R., Matsuda, F. and Okanoue, T. for Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG-NAFLD) (2012) Genetic Polymorphisms of the Human *PNPLA3* Gene are Strongly Associated with Severity of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Japanese. *PLoS One. in the press.* T. for Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG-NAFLD) (2012) Genetic Polymorphisms of the Human *PNPLA3* Gene are Strongly Associated with Severity of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Japanese. *PLoS One. in the press.*

2. 学会発表

1. Terao, C., Yamada, R., Ohmura, K., Kochi, Y., Okada, Y., Nakamura, Y., Yamamoto, K., Melchers, I. Lathrop, M., Mimori, T. and Matsuda, F. A haplotype of the human AIRE gene is associated with the risk for rheumatoid arthritis in Japanese population. EULAR Congress 2011 (London, UK), May 27, 2011.
2. 松田文彦 予防医療にとってのバイオマーカー探索の重要性～長浜コホート研究におけるオミックス解析～ 第 84 回日本生化学会バイオインダストリーセミナー 国立

京都国際会館（京都）2011年9月23日

3. 松田文彦 先制医療の実現を目指した 21 世紀型ゲノムコホート研究 JST イノベーションサテライト高知研究成果報告会 in 愛媛 愛媛大学南加記念ホール（松山）2012 年 1 月 21 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願 2011-95625 （出願中）
関節リウマチの新規遺伝因子としての
ミエリン塩基性蛋白の利用

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

IV. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実現化研究事業
（難病関係研究分野））分担研究報告書

網羅的統合オミックス解析を用いた難病の原因究明と新規診断・治療法の確立

研究代表者：京都大学医学研究科・教授 松田 文彦

研究分担者：京都大学医学研究科・教授 山田 亮

研究要旨

多様性の臨床データを系統的に取扱い、それを複数のオミックス実験データと組み合わせるためのデータ型の検討を行うとともに、その結果をデータベースの実装を担当する共同研究者と反映するための技術的問題の解消を行った。また、複数臨床項目を統合してフェノタイプとして扱うための、解析の枠組みの検討を進め、そのプロトタイプを実装した。

A. 研究目的

本研究課題（難病に関する個体差に関する知見を集め、それを臨床応用する）における情報・統計学的な課題として以下に挙げる点の検討と方法の確立を目的とする。適切な臨床情報の記録・保管と、体系的なオミックスデータの算出・保管を前提として、そこから有意な知見を見出すデータマイニングの側面、さらには、その知見を臨床現場に還元するための課題の選定とそれに基づく研究の方向付けに関する情報提供である。

B. 研究方法

対象疾患における臨床情報の情報学・統計学的な側面を臨床系研究分担者との協議を通じて捕捉する。オミックス解析データの情報学・統計学的な側面を実験分担研究者との協議を経て捕捉する。その上で、計算機シミュレーションにより、適切なデータハンドリングのための技術的課題を明らかにし、データベース設計者と課題克服のための設計要件を確定する。また、データマイニングのための解析手法に関する調査を進めるとともに、新規手法（特に複合フェノタイプの扱い）を考案する。

（倫理面への配慮）

本課題においては、ゲノム情報と臨床情報を研究するために、ゲノム指針に準拠した（書面による同意、個人情報の管理の方法など）。また、成果の臨床展開を目指していることから、臨床データとしてゲノム情報を取り扱うに至ったときのデータの扱いに関

する国内外の動静について適宜、情報収集を行った。

C. 研究結果

データベースにおける臨床情報のデータ型の確定を行った。また、オミックスデータの保管・保全方針を確定した。これらに沿ったデータベースの構築作業を補助した。複数尺度を持つ臨床フェノタイプを多次元データとして扱うこと、それをスカラー化することに関する基礎的な検討を実施し、検定におけるマルチプルテストの視点からの問題点について、データシミュレーションを通じて行った。

D. 考察

研究全体の進行のために必要な、統計・解析上、有用もしくは必要な事項について、共同研究者に適切なインプットを実施し、円滑な進行に寄与したと考えられる。また、統計解析の手法に関する検討も、実データの集積に先立って、進めた。

E. 結論

研究全体の進行に即して分担部分を遂行した。今後は、オミックス解析技術の進展・改変に対応するとともに、解析の実施・手法開発の改良を進める段階にある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Meziani, R., Yamada, R., Takahashi, M., Ohigashi, K., Morinobu, A., Terao, C., Hiratani, H., Ohmura, K., Yamaguchi, M., Nomura, T., Vasilescu, A., Kokubo, M., Renault, V., Hirose, K., Ratanajaraya, C., Heath, S., Mimori, T., Sakaguchi, S., Lathrop, M., Melchers, I., Kumagai, S. and Matsuda, F. (2011) A Trans-ethnic genetic study of Rheumatoid Arthritis identified *FCGR2A* as a candidate common risk factor in Japanese and European populations. *Mod. Rheumatol.* **22**, 52-58. Published online: 24 May 2011.
2. Nakata, I., Yamashiro, K., Yamada, R., Gotoh, N., Nakanishi, H., Hayashi, H., Tsujikawa, A., Otani, A., Saito, M., Iida, T., Oishi, A., Matsuo, K., Tajima, K., Matsuda, F. and Yoshimura, N. (2011) Association between the *SERPING1* Gene and Age-Related Macular Degeneration and Polypoidal Choroidal Vasculopathy in Japanese. *PLoS One.* **6**, e19108.
3. Terao, C., Yamada, R., Ohmura, K., Takahashi, M., Kawaguchi, T., Kochi, Y., Human Disease Genomics Working Group, RA Clinical and Genetic Study Consortium, Okada, Y., Nakamura, Y., Yamamoto, K., Melchers, I., Lathrop, M., Mimori, T. and Matsuda, F. (2011) The human *AIRE* gene at chromosome 21q22 is a genetic determinant for the predisposition to rheumatoid arthritis in Japanese population. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 2680-2685.

2. 学会発表

1. Yamada, R., Terao, C., Kawaguchi, T. and Narahara, M. Evaluation of power for linkage disequilibrium mapping. International Genetic Epidemiology Society Meeting 2011 (Heidelberg, Germany), Sep 19, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

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（難病・がん等の疾患分野の医療の実現化研究事業
（難病関係研究分野））分担研究報告書

網羅的統合オミックス解析を用いた難病の原因究明と新規診断・治療法の確立

研究代表者：京都大学医学研究科・教授 松田 文彦

研究分担者：京都大学医学研究科・特定助教 寺尾 知可史

研究要旨

IgG4 関連疾患および肺高血圧症の統合オミックス解析を実施する。そのために、各疾患における研究プロトコルを策定し、難病研究班との連携を確立し、検体、臨床情報の収集を試みた。また、健常者対照群を用いた統合オミックス解析を実施し、疾患研究のリファレンス情報の取得を開始した。

A. 研究目的

IgG4 関連疾患および肺高血圧症を本事業のモデル疾患として選定し、ゲノム情報、転写物、代謝物を用いた統合的オミックス解析を用い、疾患の原因究明と、疾患の予知や予後を予測するバイオマーカーの同定を試み、また、分子情報に基づいた新たな治療戦略を提示する。

B. 研究方法

各疾患の解析プロトコルを策定し、難病研究班との連携体制を構築する。患者の DNA、転写物、代謝物検体の集積を開始し、併せて対照群検体の分析・解析によりオミックスデータを集積する。

（倫理面への配慮）

検体及び付随情報は二回匿名化され、個人情報とオミックスデータが連結されないよう管理している。

C. 研究結果

検体や情報の流れの検証、また解析手法の最適化のための試験研究として、300 検体の健常人対照群検体を用いたオミックス解析に着手し、網羅的ゲノム多型解析、網羅的転写物解析を実施し、得られた結果をデータベースに格納した。また、次世代シーケンサーを用いた健常者の Exome 解析を開始し、100 名を超える対照群のデータを得た。

IgG4 関連疾患、肺高血圧症の解析プロトコルを策定し、前者に関しては 118 例、後者は肺高血圧症を合併することが知られている混合結合組織病 40 例の DNA 検体を集積した。また、IgG4 関連疾患研究

班（千葉班）、

MCTD 研究班（吉田班）に加え、肺高血圧症の症例の集まる岡山医療センターとの共同研究体制を確立した。

D. 考察

本年度は研究計画に従い対照群のデータ集積に注力するとともに、患者の検体・臨床情報の収集のための連携体制を構築した。本事業は従来の単純な症例・対照群解析と比較にならないほどの詳細な解析を実施しており、難病の病態解明に大きく貢献することが期待される。

E. 結論

統合的オミックス解析の対照群データの集積・解析を実施した。疾患群集積のための体制を確立し、検体収集を開始した。2012 年度より患者を用いた本格的なオミックス解析を実施する。

F. 健康危険情報

採血の影響のみで、ほとんどないと考える。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Terao, C., Yamada, R., Ohmura, K., Takahashi, M., Kawaguchi, T., Kochi, Y., Human Disease Genomics Working Group, RA Clinical and Genetic Study Consortium, Okada, Y., Nakamura, Y., Yamamoto, K., Melchers, I., Lathrop, M., Mimori, T. and Matsuda, F. (2011) The human *AIRE* gene at chromosome 21q22 is a genetic determinant for the predisposition to rheumatoid arthritis in Japanese population. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 2680-2685.

2. Takeda, N., Nojima, T., Terao, C., Yukawa, N., Kawabata, D., Ohmura, K., Usui, T., Fujii, T., Ito, Y., Iinuma, Y., Mimori, T. (2011) Interferon-gamma release assay for diagnosing Mycobacterium tuberculosis infections in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. **20**, 792-800.
 3. Meziani, R., Yamada, R., Takahashi, M., Ohigashi, K., Morinobu, A., Terao, C., Hiratani, H., Ohmura, K., Yamaguchi, M., Nomura, T., Vasilescu, A., Kokubo, M., Renault, V., Hirose, K., Ratanajaraya, C., Heath, S., Mimori, T., Sakaguchi, S., Lathrop, M., Melchers, I., Kumagai, S. and Matsuda, F. (2011) A Trans-ethnic genetic study of Rheumatoid Arthritis identified *FCGR2A* as a candidate common risk factor in Japanese and European populations. *Mod. Rheumatol.* **22**, 52-58.
 4. Terao, C., Ohmura, K., Katayama, M., Takahashi, M., Kokubo, M., Diop, G., Toda, T., Yamamoto, N., Human Disease Genomics Working Group, RA Clinical and Genetic Study Consortium, Shinkura, R., Shimizu, M., Gut, I., Heath, S., Melchers, I., Manabe, T., Lathrop, M., Mimori, T., Yamada, R. and Matsuda, F. (2011) Myelin basic protein as a novel genetic risk factor in rheumatoid arthritis—a genome-wide study combined with immunological analyses. *PLoS One*. **6**, e20457.
 5. Terao, C., Ohmura, K., Kochi, Y., Ikari, K., Maruya, E., Katayama, M., Shimada, K., Murasawa, A., Honjo, S., Takasugi, K., Matsuo, K., Tajima, K., Suzuki, A., Yamamoto, K., Momohara, S., Yamanaka, H., Yamada, R., Saji, H., Matsuda, F. and Mimori T. (2011) A large-scale association study identified multiple *HLA-DRB1* alleles associated with ACPA-negative rheumatoid arthritis in Japanese subjects. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 2134-2139.
 6. Terao, C., Ohmura, K., Yamamoto, K., Yukawa, N., Kawabata, D., Nojima, T., Fujii, T. and Mimori, T. (2011) Serum IgG levels demonstrate seasonal change in connective tissue diseases: a large-scale, 4-year analysis in Japanese. *Mod. Rheumatol.* [Epub ahead of print]
 7. Terao, C., Ikari, K., Ohmura, K., Suzuki, T., Iwamoto, T., Takasugi, K., Saji, H., Taniguchi, A., Momohara, S., Yamanaka, H., Matsuda, F. and Mimori, T. (2012) Quantitative effect of HLA-DRB1 alleles to ACPA levels in Japanese rheumatoid arthritis: no strong genetic impact of shared epitope to ACPA levels after stratification of HLA-DRB1*09:01. *Ann. Rheum. Dis.* **71**, 1095-1098.
 8. Okada, Y., Shimane, K., Kochi, Y., Tahira, T., Suzuki, A., Higasa, K., Takahashi, A., Horita, T., Atsumi, T., Ishii, T., Okamoto, A., Fujio, K., Hirakata, M., Amano, H., Kondo, Y., Ito, S., Takada, K., Mimori, A., Saito, K., Kamachi, M., Kawaguchi, Y., Ikari, K., Mohammed, O. W., Matsuda, K., Terao, C., Ohmura, K., Myouzen, K., Hosono, N., Tsunoda, T., Nishimoto, N., Mimori, T., Matsuda, F., Tanaka, Y., Sumida, T., Yamanaka, H., Takasaki, Y., Koike, T., Horiuchi, T., Hayashi, K., Kubo, M., Kamatani, N., Yamada, R., Nakamura, Y. and Yamamoto, K. (2012) A Genome-Wide Association Study Identified *AFF1* as a Susceptibility Locus for Systemic Lupus Erythematosus in Japanese. *PLoS Genet.* **8**, e1002455.
 9. Okada, Y., Terao, C., Ikari, K., Kochi, Y., Ohmura, K., Suzuki, A., Kawaguchi, T., Stahl, E. A., Kurreeman, F. A., Nishida, N., Ohmiya, H., Myouzen, K., Takahashi, M., Sawada, T., Nishioka, Y., Yukioka, M., Matsubara, T., Wakitani, S., Teshima, R., Tohma, S., Takasugi, K., Shimada, K., Murasawa, A., Honjo, S., Matsuo, K., Tanaka, H., Tajima, K., Suzuki, T., Iwamoto, T., Kawamura, Y., Tanii, H., Okazaki, Y., Sasaki, T., Gregersen, P. K., Padyukov, L., Worthington, J., Siminovitch, K. A., Lathrop, M., Taniguchi, A., Takahashi, A., Tokunaga, K., Kubo, M., Nakamura, Y., Kamatani, N., Mimori, T., Plenge, R. M., Yamanaka, H., Momohara, S., Yamada, R., Matsuda, F. and Yamamoto, K. (2012) Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Nat. Genet.* **44**, 511-517.
2. 学会発表
1. Terao, C., Yamada, R., Ohmura, K., Kochi, Y., Okada, Y., Nakamura, Y., Yamamoto, K., Melchers, I. Lathrop, M., Mimori, T. and Matsuda, F. A haplotype of the human AIRE gene is associated with the risk for rheumatoid arthritis in Japanese population. EULAR Congress 2011 (London, UK), May 27, 2011.
 2. 寺尾 知可史 関節リウマチの病型と疾患感受性遺伝子、及びその機能解析、日本臨床免疫学会 京王プラザホテル（東京）2011年9月15日
 3. 寺尾 知可史、大村 浩一郎、高地 雄太、猪狩 勝則、丸屋 悦子、片山 昌紀、島田 浩太、村澤 章、本荘 茂、高杉 潔、松尾 恵太郎、田島 和雄、鈴木 亜香里、山本 一彦、桃原 茂樹、山中 寿、山田 亮、佐治 博夫、松田 文彦、三森 経世 抗CCP抗体陰性関節リウマチ関連HLA-DRB1アレルおよびディプロタイプの同定、日本臨床免疫学会 京王プラザホテル（東京）2011年9月15日
 4. Terao, C., Ohmura, K., Kochi, Y., Ikari, K., Maruya, E., Katayama, M., Shimada, K., Murasawa, A., Honjo, S., Takasugi, K., Matsuo, K., Tajima, K., Suzuki, A., Yamamoto, K., Momohara, S., Yamanaka, H., Yamada, R., Saji, H., Matsuda, F. and Mimori, T. A Large-Scale Association Study Identified Multiple HLA-DRB1 Alleles Associated with Anti-Citrullinated Peptide Antibody Negative Rheumatoid Arthritis in Japanese. Annual

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願 2011-95625 (出願中)

関節リウマチの新規遺伝因子としてのミエ
リン塩基性蛋白の利用

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（難病・がん等の疾患分野の医療の実現化研究事業
（難病関係研究分野）） 分担研究報告書

網羅的統合オミックス解析を用いた難病の原因究明と新規診断・治療法の確立

研究代表者：京都大学医学研究科・教授 松田 文彦

研究分担者：京都大学医学研究科・研究員（産官学連携）川口 喬久

研究要旨

網羅的な統合オミックス解析を実施するための情報基盤として、臨床情報や遺伝子多型情報に加え、発現アレイによる網羅的遺伝子発現情報などを格納するデータベースを構築した。また、難病疾患のひとつである混合性結合組織病やながはま0次コホートをモデルケースに、Electronic Health Record（EHR）との連携による臨床情報の電子的な取得や、質量分析（GC-MS）によるメタボローム、次世代シーケンサーによる Exome データなどを対象にデータベースの拡張や洗練を行った。

A. 研究目的

大規模に網羅的オミックス解析を実施するための情報基盤の整備を目的とし、各種オミックスデータに対応し、解析に適したデータの格納方法や交換フォーマットの構造の策定や、統計手法の開発、さらにそれらの実装を行う。

B. 研究方法

臨床情報や遺伝子変異、各種オミックスの実験データについては、実験プラットフォームに依存せずに情報を扱うための必須開発項目を抽出し、異なる実験プラットフォームから得られた情報を統合する。一方では、プラットフォーム特有の情報を定義し、実験データの保全や品質管理の方法を検討する。得られた知見を基にデータベースの構築および疾患や介入との関連解析や予後予測を実施し、その妥当性を検証する。データ格納上の課題に対してはその解決策を検討・実装し、さらなる検証を実施する。

（倫理面への配慮）

本研究はすべて国の倫理指針に基づいた倫理委員会での審議、許可を得ている。また、検体はすべて匿名化する。

C. 研究結果

臨床情報は、データ型とその型に基づいた制約を定義、一元的に管理し、それに基づいてデータベースに格納した。さらに、データ取得の省コスト化と正確性の向上を目指し、EHR との連携による臨床情報電子的な取得、データのキュレーションシステムの開発を実施した。

遺伝子多型データは、NCBI の参照配列上の位置とアレルを一意化することで、実験プラットフォームによらず遺伝子多型を扱うことができた。トランスクリプトームに関しては、プローブ配列による転写産物の特定のほか、オントロジーを活用しての関連付けを実施した。

質量分析（GC-MS）によるメタボロームでは、化合物の同定と定量化の手法を開発し、1,000 検体を超えるデータを格納した。また、化合物を特定せずに検体間を比較する方法を検討した。次世代シーケンサーによるデータでは、多型の同定や発現量の定量を行うパイプラインを実装した。

D. 考察

実証実験から、遺伝子多型データ、臨床情報、一部のオミックスデータのデータベースへの格納、そこからの抽出は適切であった。また、臨床情報に関しては、EHR 連携とキュレーションシステムにより、適切な時系列の情報の取り扱いとデータのキュレーションの省力化が達成されつつある。遺伝子多型以外のオミックスについては、扱ったデータ数が限られていたが、より大規模なデータを扱うためには、データベースのパフォーマンスチューニングを進める必要があると考える。

E. 結論

種々のオミックス情報に時系列の臨床情報を統合し、体系的に扱うデータベース構築のモデルが確立された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Onomoto, K., Morimoto, S., Kawaguchi, T., Toyoda, H., Tanaka, M., Kuroda, M., Uno, K., Kumada, T., Matsuda, F., Shimotohno, K., Fujita, T., and Murakami, Y. (2011) Dysregulation of IFN system can lead to poor response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C. *PLoS One*. **6**, e19799.
2. Toyoda, H., Kumada, T., Tada, T., Kawaguchi, T., Murakami, Y., Matsuda, F. (2011) Impact of genetic polymorphisms near the IL28B gene and amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region on interferon sensitivity/resistance in patients with chronic hepatitis C. *J. Med. Virol.* **83**, 1203-1211.
3. Toyoda, H., Kumada, T., Tada, T., Hayashi, K., Honda, T., Katano, Y., Goto, H., Kawaguchi, T., Murakami, Y., and Matsuda, F. (2011) Antiviral combination therapy with peginterferon and ribavirin does not induce a therapeutically resistant mutation in the HCV core region regardless of genetic polymorphism near the IL28B gene. *J. Med. Virol.* **83**, 1559-1564.
4. Toyoda, H., Kumada, T., Tada, T., Hayashi, K., Honda, T., Katano, Y., Goto, H., Kawaguchi, T., Murakami, Y., and Matsuda, F. (2012) Predictive value of early viral dynamics during peginterferon and ribavirin combination therapy based on genetic polymorphisms near the IL28B gene in patients infected with HCV genotype 1b. *J. Med. Virol.* **84**, 61-70.
5. Kawaguchi, T., Sumida, Y., Umemura, A., Matsuo, K., Takahashi, M., Takamura, T., Yasui, K., Saibara, T., Hashimoto, E., Kawanaka, M., Watanabe, S., Kawata, S., Imai, Y., Kokubo, M., Shima, T., Park, H., Tanaka, H., Tajima, K., Yamada, R., Matsuda F., and Okanoue T. for Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG-NAFLD) Genetic Polymorphisms of the Human *PNPLA3* Gene are Strongly Associated with Severity of Non-Alcoholic Fatty liver Disease in Japanese. *PLoS One*. *in the press*.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

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（難病・がん等の疾患分野の医療の実現化研究事業
（難病関係研究分野））分担研究報告書

網羅的統合オミックス解析を用いた難病の原因究明と新規診断・治療法の確立

研究代表者：京都大学医学研究科・教授 松田 文彦

研究分担者：島津製作所ライフサイエンス研究所・所長 佐藤 孝明

研究要旨

難病の網羅的統合オミックス解析プロジェクトにおいて、本分担研究では質量分析技術を利用した網羅的代謝物解析を担当する。初年度に当たる本年は、血清サンプルのガスクロマトグラフィー質量分析計（GC-MS）によるスキャン測定を行うための条件検討を行うと共に、対照群となる健常者検体約 1,050 検体の GC-MS 測定、並びに解析を行った。詳細解析は次年度に継続して行う予定。

A. 研究目的

難病克服に向けて、統合オミックス解析を行い、新たなバイオマーカーの同定や、疾患発症の分子機序の解明、患者内でのサブグループ解析による重症度・予後予測因子の同定等を目指す。上記目的のため、本分担研究では、質量分析技術を利用した網羅的代謝物解析の標準手法を確立し、血中メタボローム解析を行うことを目的とする。

B. 研究方法

三年間に三疾患程度の解析を目標に、各難病患者群データと健常者対照群データとの比較を行う。患者の病態を表現している中間形質として代謝物を解析対象とし、さらに、それらの経時的変化と病状の変化や予後を関連付ける。今年度は、対照となる健常者検体の測定・解析を行う。血清サンプルから低分子代謝成分を抽出し、トリメチルシリル（TMS）化による誘導体化を行った後、ガスクロマトグラフィー質量分析計（GC-MS）によるスキャン測定を行う。健常者検体としては、ながはまコホート事業参加者の血清を用いる。

（倫理面への配慮）

血液検体は、国の倫理指針他に基づき書面による同意が得られた場合にのみ研究に用いている。また、検体は二度の匿名化を行った後に研究に使用しており、プライバシー保護には十分に留意している。

C. 研究結果

血清中の可溶性代謝成分の GC-MS

による網羅的解析に向けて、前処理条件並びに測定条件の最適化を行った。対照群となる長浜コホート健常者血清約 1,050 検体について、GC-MS のスキャンデータを取得すると共に、GC-MS 代謝成分データベースとの照合により、化合物 60 成分についてはピークの特異・定量解析を行った。

D. 考察

取得データの更なる詳細解析については、平成 24 年度に行う予定。

E. 結論

血中代謝物成分の GC-MS による網羅的解析条件の最適化を行った。本解析手法を用いて、難病患者の対照となる健常者血清約 1,050 検体の測定・解析を行った。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

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（難病・がん等の疾患分野の医療の実現化研究事業
（難病関係研究分野）） 分担研究報告書

網羅的統合オミックス解析を用いた難病の原因究明と新規診断・治療法の確立

研究代表者：京都大学医学研究科・教授 松田 文彦

研究分担者：株式会社 DNA チップ研究所・取締役名誉所長 松原 謙一

研究要旨

難病克服に向けた総合的戦略として、本課題ではゲノム、代謝物、転写物の網羅的解析を組み合わせた極めて独創性の高い統合オミックス解析を実行する。これにより疾患の予知、診断、予後予測、治療法の開発や創薬に不可欠な新たな疾患関連バイオマーカーを同定する。特に、今回は時系列を考慮した白血球の転写物の網羅的解析を実施する。これにより疾患関連遺伝子や新たなバイオマーカーの発見が可能となるので疾患発症の分子機序の解明や、患者群内での亜集団解析による重症度・予後予測因子の同定を進める方策が確定できる。

A. 研究目的

難病の克服にゲノム解析を利用した戦略は強力だが限界があり、予知、診断、予後予測に加え、治療法の開発や創薬を更に進めるためには、更に新たな疾患関連バイオマーカーの同定が重要である。本研究では、末梢血を用い、時系列を考慮した網羅的転写物解析をおこない、健常者対照群のデータとの比較により、遺伝子発現から迫る疾患部位の同定とそこに働いている遺伝子や未知バイオマーカーの同定を目指す。また、患者群内での亜集団解析により、重症度や予後を予測する因子の探索をおこなう。

B. 研究方法

本年度は、健常者を対象に基礎データを取得する。具体的には、PAXgene 採血管を用いて 302 名の被検者から血液を採取し、RNA 抽出ののち、品質検査を行った。その後網羅的マイクロアレイを用いて発現データを取得した。続いて正規化方法を検討し、全データのクラスター解析、主成分分析を行った。

（倫理面への配慮）

京都大学生命研究倫理委員会の承認済

C. 研究結果

全 302 サンプルについて RNA 品質検査を行った結果、全検体において網羅的マイクロアレイ発現解析に適した高品質の RNA が得られたことがわかった。また、Cy3 による標識を行い、ターゲット RNA

を作成したところ、全検体において高いレベル化効率が維持されていた。続いて Agilent 社網羅的マイクロアレイ（ヒト）を用いて発現解析を行いデータを取得した。全検体において品質に問題ないデータが取得でき、正規化処理の後有効データを取得した。クラスター解析と主成分分析を行い、各検体に特徴を示す基礎データを取得した。

D. 考察

採取された全検体（302 症例）について良好な網羅的遺伝子発現情報を得ることができた。これは、今後の疾患関連遺伝子や新しいバイオマーカー同定のための基盤情報となる。網羅的マイクロアレイには non-coding RNA などを含む約 6 万の遺伝子プローブが搭載されており、臨床情報と合わせて解析することにより、全体の発現パターンが異なる特異的な検体の抽出が可能となる。

E. 結論

今年度は健常者対照群の 302 例について解析を行い、遺伝子発現解析の基盤情報を取得した。今後は臨床データとの関連解析を進め、様々な角度からマーカー探索及びネットワーク解析を進めてゆく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

準備中 (分子生物学会)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

V. 解析プロトコル