

201135009A

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用化研究事業

次世代遺伝子解析による希少難治性循環器疾患の診断治療法の開発と

臨床実用化に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小室 一成

(大阪大学大学院)

平成24年5月

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用化研究事業

次世代遺伝子解析による希少難治性循環器疾患の診断治療法の開発と

臨床実用化に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小室 一成

(大阪大学大学院)

平成24(2012)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

次世代遺伝子解析による希少難治性循環器疾患の診断治療法の開発と
臨床実用化に関する研究..... 1
小室一成

II. 分担研究報告

次世代遺伝子解析による希少難治性循環器疾患の診断治療法の開発と
臨床実用化に関する研究..... 12
澤 芳樹

次世代遺伝子解析による希少難治性循環器疾患の診断治療法の開発と
臨床実用化に関する研究..... 16
油谷浩幸

次世代遺伝子解析による希少難治性循環器疾患の診断治療法の開発と
臨床実用化に関する研究..... 20
塩島一朗

次世代遺伝子解析による希少難治性循環器疾患の診断治療法の開発と
臨床実用化に関する研究..... 23
朝野仁裕

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 27

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Increased Akt-mTOR signaling in lung epithelium is associated with respiratory distress syndrome
in mice..... 32
Mol Cell Biol 2011, 31: 1054-65

| | |
|---|-----|
| Ryanodine Receptor Type 2 Is Required for the Development of Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy..... | 44 |
| Hypertension 2011, 58(6): 1099-110 | |
| A crucial role of activin A-mediated growth hormone suppression in mouse and human heart failure | 69 |
| PLoS One 2012, 6:e27901 | |
| Oral treatment with nicorandil at discharge is associated with reduced mortality after acute myocardial infarction..... | 81 |
| J Cardiol 2012, 59:14-21 | |
| Whole-exome sequencing of human pancreatic cancers and characterization of genomic instability caused by MLH1 haploinsufficiency and complete deficiency..... | 89 |
| Genome Research 2011 | |
| High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome | 101 |
| Nat Genet 2011, 43(5): 464-9 | |
| Increased systemic glucose tolerance with increased muscle glucose uptake in transgenic mice overexpressing RXR γ in skeletal muscle..... | 109 |
| PLoS One 2011, 6(5): e20467 | |
| Novel regenerative therapy using cell-sheet covered with omentum flap delivers a huge number of cells in a porcine myocardial infarction model..... | 119 |
| J Thorac Cardiovasc Surg 2011 Sep 14 | |

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用化研究事業)

総括研究報告書

次世代遺伝子解析による希少難治性循環器疾患の診断治療法の開発と
臨床実用化に関する研究

研究代表者 小室一成 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

詳細なゲノム情報の利用実現は、難治性疾患の原因遺伝子に基づく医療アプローチを可能とした。本研究は診断法及び創薬に関する標的特定を最終目標とし、その迅速な臨床実用化を企図している。研究代表者及び分担者らが担当した厚生労働省難治性疾患克服研究事業における希少難治性疾患動物モデル開発、病態機序解析、及びヒト臨床研究で得た多くの成果は、本研究が目指す診断治療の創薬開発とその迅速なる臨床実用化に大きく寄与させることが可能である。本研究では次世代シーケンス解析の実践と特定遺伝子情報を診断治療に迅速に応用する独創的手法を利用し実施する。

そこで迅速なゲノム医療への応用のため、既知変異の迅速な鑑別除外により、新規変異を持つ確率の高い症例に次世代解析を行い、新規分子ないし変異に対する機動力ある表現型機能解析と特定遺伝情報の臨床応用への時間短縮をはかる。具体的には、難治性循環器疾患の遺伝性家系及び心不全症例の生体試料バンクの利用し、ゲノム解析の精度と速度を高める方策をとるとともに、心筋症マウス解析とゼブラフィッシュイメージングの利用による *in vivo* 検証の迅速化や、生化学的解析法を利用した独自の生理活性物質特定およびシーズ探索技術の利用、そしてゲノム創薬へ向けてヒトiPS細胞による検証も用いた治療標的リガンド開発と臨床実用化など、得られたゲノム情報を迅速かつ有効に診療に結実させるよう研究を進める。

研究分担者

澤 芳樹
大阪大学大学院医学系研究科
教授

油谷浩之
東京大学先端科学技術研究センター
教授

塩島一朗
大阪大学大学院医学系研究科
寄付講座准教授

朝野仁裕
大阪大学大学院医学系研究科
助教

A. 研究目的

循環器系難治性疾患の原因遺伝子は多岐にわたり未だ全てが明らかとは限らない。一方早期治療と予後改善をもたらす社会的、経済的効果は計り知れないものがある。

遺伝性が濃厚な希少難治性疾患の家系症例を対象に、原因となる新規 rare variant を同定し、診断および治療薬標的を見出し、臨床実用化することを目指す。

既存のシーズ候補のみならず、拠点施設と連携し複数の未解析家系から迅速に新規遺伝子同定を行う本ゲノム創薬研究は、今後の臨床実用化研究のモデルとなり得る。

難治性循環器疾患の原因遺伝子は多岐にわたり未解明も多く、殆どが厳密に原因を同定できぬまま高度医療に臨まざるを得ない。この現状に対し、先進的技術による早期診療が予後改善へもたらす社会的、経済的効果は計り知れない。

遺伝性が濃厚な希少難治性疾患の家系症例群より新規 rare variant (遺伝子変異) を同定し、その分子機能解析と実用化診断治療薬となる分子標的を見出すことを目標とする。

B. 研究方法

1. ゲノム解析の迅速な実施と実用的解析システムの構築

1) 集積された症例の独自の臨床データ解析とゲノム解析症例の選定

ヒトゲノム解析の説明と同意を得た心血管系難治性疾患患者を解析対象者とし、遺伝性が濃厚な家系症例から順に、心筋症:4家系・約30例、頻脈性不整脈(家族性突然死を含む):3家系・約20例、血管疾患:1家系・約5例を当初の目標に症例収集を行う。目標症例数には上限を設けず、遺伝性循環器疾患を疑うものを中心に症例収集を行う。また、家系ではなくとも、孤発症例のうち、二次性心筋症を除外したことから最終的には約100症例を目標に検体収集を行う(大阪大学ヒトゲノム倫理審査既に承認済)。

2) 実臨床への普及実用化が可能なゲノム解析システムのモデル構築

Affymetrics社製Chip技術では基板上の300k箇所にもわたるスポットに一塩基ずつずらした連続塩基配列がデザイン可能であり、検体DNAとの反応シ

グナル値を検出できる。心筋症や突然死症候群原因遺伝子のエクソン領域がデザインされたChip(上梓済み、価格数万円)では、公知の原因遺伝子の変異に関し rare variant の検出が可能であり、標的遺伝子の全エクソン配列を高精度に決定できる。次世代遺伝子解析前に行うことで、公知遺伝子変異の迅速かつ低コストの効率良い鑑別法となり得る可能性の追究が当初の目的であった。目まぐるしく進歩するゲノム解析領域において、次世代シーケンス解析のコストはみるみる低減したため、proband に対しての解析には、全 Exome 解析を行うことが十分可能となり、むしろその方がコスト的にも有利であると判断された。ゲノムワイドに候補遺伝子の変異を探索するため、全 Exome 解析の実施が適切であるかについて検証することで、一次スクリーニング検査としての方法を確立する。

3) 次世代遺伝子解析による新規遺伝子同定

次世代解析拠点施設と連携し、In-house Data Reference の蓄積にも協力しあいながら、本研究に適した LINUX によるスクリプトを構築できるような、解析協力体制を敷く。

次世代シーケンス解析用 LINUX サーバーにデータ解析専用のパイプラインを構築し、オープンソースを中心とした特殊ソフトウェアを導入し、データのクオリティチェック、リファレンスマッピング、アプリケーションごとの解析を迅速に行うことが可能な、スクリプトを構築する。膨大なデータ解析に対応できる情報解析環境を本研究システムに導入することで今後増える本研究に対応できるようにする。

上記解析システムを用いながら、採取した血液サンプルからゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンス解析を行い、家系に関してはマイクロサテライトマーカーによるポジショナルクローニングも併用しながら、特殊表現型を示す遺伝子座の同定を行う。

2. ゲノム情報の臨床実用化(ゲノム創薬、診断薬開発と細胞治療への応用)

1) Genotype から Phenotype へのフィードバックによる臨床データの再検証

遺伝子変異が同定された症例と類似の臨床病型を示す症例を中心に、あらためて遺伝子変異の検定を行う。遺伝型を解析する上で表現型の明確化は同定作業の成否を決める非常に重要な過程であり、特に原因不明の心筋症などの多い本研究分野

において、臨床データの再整理は欠かせない。

2) 細胞モデルと遺伝性疾患動物モデル(小・大動物)による in vivo 検証の迅速化

難治性疾患の新規候補遺伝子として同定されたものについては、迅速に in vivo の機能解析実験系の STEP へ検証を進めることが重要である。ゼブラフィッシュを用いた実験系は、心臓といえどもアルビノ種を用いることにより形態観察も容易であり、効率よく解析を進めることができる。そこで本研究においては、既に解析系として研究代表者らが確立しているゼブラフィッシュ実験系を用い新規同定遺伝子の分子生物学的、生理学的解析、細胞機能解析と迅速な病態モデルのイメージング解析を行う。さらにそこで有意な機能変化を認めるものについては哺乳類における遺伝子改変心筋症マウスから大動物(イヌ)に至るまでの生理機能解析、病態解析を行う。

3) 生化学的解析法を利用した独自の生理活性物質同定および治療薬シーズ探索

新規同定遺伝子の同定によるゼブラフィッシュ解析実験の開始と同時に、培養細胞、蛋白分子レベルでの検討を進め、生理活性を有する結合蛋白の同定や相互作用を有する蛋白を同定する作業を行う。独自の蛋白分離精製技術を利用し、超高感度 Nano LCMS 解析機器を用いて分子の生物学的、病態学的意義を検討する。

同定した相互作用分子から、病態へ介入可能な分子修飾など、創薬へ向けた分子探索を進め、将来の臨床応用を考慮した研究へと発展させる。

4) ゲノム創薬へ向けたヒト iPS 細胞による検証を併せた治療標的リガンド開発と臨床実用化

同定し得た標的リードに対するリガンド探索を行い、創薬を目指す。同定された遺伝子変異を持つヒト細胞を用いて、病態機序および新規薬剤や既存薬の薬効評価と機能解析を行う。

(倫理)

患者情報の解析に関しては施設の倫理委員会の承認を得た上、臨床研究倫理指針を遵守し慎重におこなう。その上で患者とは個別に、医師が書面に示した計画書を明示し、十分説明をしたうえで承諾を得たもののみを本研究に使用する。特に以下の点に留意する。

1) 試料提供者の個人識別情報を含む情報の保護:

診療情報を含めた個人情報と検体とは徹底した匿名化を行い、遺伝情報と個人情報の連結は個人識別情報管理者のみが可能となるように個人識別情報管理者において情報を管理する。

2) 試料提供者に対する予想される危険や不利益およびそれらが生じた場合の措置: 心筋生検試料採取は通常の診療の際に医学的必要性に応じて行われたもののうち、診療に用いない残余検体を利用することとし、危険や不利益はないと考える。誤って遺伝情報が外部に漏洩した場合、就職・結婚・保険への加入等に関して不利益をこうむる可能性が考えられるため、これを防ぐために、個人識別情報管理者を置き、同管理者は試料の匿名化を行うとともに個人情報を厳重に管理・保管し、試料提供者のプライバシーを保護する。

3) 試料提供者から採取した生体材料の取り扱いについて: 提供された試料は、個人識別情報管理者が連結匿名化し、匿名化ラベルのみ貼って保存する。これらの試料は、生体試料の包括利用同意を得ており、本研究だけでなく、将来倫理委員会で承認された他の自主臨床研究についても用いることが可能である。したがって検査済みの試料は、適宜連結可能匿名化番号を含む検体等を完全に削除した上で廃棄するが、使用可能な残余検体は匿名化されたまま施錠された保管場所で保管される。また、特に研究成果として得られた情報の管理には、外部に漏洩しないように対策を行う。

動物実験においても愛護上の問題点を考慮の上、施設の審査結果を本研究について得た。この倫理規定にのっとり動物愛護上の配慮を十分行って実験をおこなう。

C. 研究結果

1. ゲノム解析の迅速な実施と実用的解析システムの構築

1) 集積された症例の独自の臨床データ解析とゲノム解析症例の選定

特殊な心不全臨床病態を有するゲノム解析対象症例の蓄積は計画通り進み、遺伝性疾患を疑う家系としては: 心筋症 30 例、家族性突然死 20 例を、また孤発例としては: 特発性心筋症 10 例を集めた。症例提供協力施設も倫理委員会承認を得て、豊富な症例登録環境となった。今後も遺伝性循環器疾患を疑うものを中心に症例収集を行う。また、家系ではな

くとも、孤発症例のうち、二次性心筋症を除外したもののから約 20 症例の検体収集を行った(大阪大学ヒトゲノム倫理審査で既に承認済)。

2) 実臨床への普及実用化が可能なゲノム解析システムのモデル構築

目まぐるしく進歩する本ゲノム解析領域において、次世代シーケンス解析のコストが低減したため、従来の Chip 解析による既知遺伝子の Genotype 決定には非効率性が予想された。Proband に対して全 Exome 解析を行い、ゲノムワイドに候補遺伝子の変異を探索することが網羅性、拡張性があり、コスト的にも有利であると考えられたため、現在は Proband において全 Exome 解析を行うとともに、既知遺伝子も含めた候補遺伝子の網羅的解析を情報処理により行うべく、解析システムを構築した。現在 Pilot 症例のデータ解析をもとに、本方法が実施可能な一次スクリーニング検査であることを検証する作業が進行中である。今後は既知遺伝子の変異 rare variant を一次スクリーニングにて検出し除外する。一次スクリーニングで検出除外できなかった検体に対し、家系内 Exome 解析を実施することとし、症例を蓄積している。

3) 次世代遺伝子解析による新規遺伝子同定

既同定遺伝子に続き新規ゲノム解析を行った。拠点解析施設(松田班・京都大学)の承認を得て Exome 解析および SNP 解析について共同研究として連携できることとなった。SNP 解析データは、家系連鎖解析用の Mapping Data として用いることとなった。

次世代シーケンス解析用 LINUX サーバーにデータ解析専用のパイプラインを構築し、オープンソースを中心とした特殊ソフトウェアを導入し、データのクオリティチェック、リファレンスマッピング、アプリケーションごとの解析を迅速に行うことが可能な、スクリプトを構築した。

家系症例を対象に Microsatellite marker を用いた連鎖解析を行うことで、難治性不整脈の家系の疾患原因遺伝子として新規遺伝子の一つ同定した(未公表データ)。

2. ゲノム情報の臨床実用化(ゲノム創薬、診断薬開発と細胞治療への応用)

1) Genotype から Phenotype へのフィードバックによる臨床データの再検証

難治性不整脈の家系の疾患原因遺伝子とは別に、心筋細胞機能変化を示す重要な分子をスクリーニングし、心筋症発症に関わると想定される新規遺伝子 AMF-GS2、を同定した(未公表データ)。それぞれの症例と類似の病型を示すヒト臨床症例群を対象に、類似遺伝子変異を検索を行った。遺伝型を解析する上で表現型の明確化は同定作業の成否を決める非常に重要な過程であり、特に原因不明の心筋症などの多い本研究分野において、臨床データの充実とゲノム情報を基にした臨床データの再整理は欠かせない。各遺伝子について家族発症を認める別家系、孤発例ながら同遺伝子に non-synonymus 変異を認める症例などを突き止めることに成功した。それぞれの遺伝子変異と分子機能変化との関連を調べるための STEP へと繋げることとなった。

2) 遺伝性疾患動物モデル(小～大動物)による迅速な機能解析、イメージング技術による検証

H23 年度に同定した新規遺伝子 AMF-GS2 ほか 2 遺伝子に対し、ゼブラフィッシュ、遺伝子改変心筋症マウス、大動物(イヌ)心不全モデルなど適宜を用いて分子生物学的、生理学的解析な分子機能解析と迅速病態解析、イメージング解析を行った。

特にゼブラフィッシュ実験系について、Dual-CCD カメラ/LED 光源装備/倒立型電動リサーチ顕微鏡一細胞機能解析装置による、世界に先駆け新規に開発実用化に成功した in vivo FRET プローブイメージング解析システムを用いて心臓機能の生体精密機能解析を行った。

3) 生化学的解析系、高精度生理活性物質同定による治療薬シーズ探索

上記新規同定遺伝子の生理活性の有無の検索を行うと同時に、Nano-LC MS 解析による相互作用を持つ標的分子探索も並行して行った。新規遺伝子 AMF-GS2 については、既に有意な標的分子も得て、創薬開発を目的とした企業共同研究も開始する見通しとなった。生理活性と細胞機能を評価し、Phenotype 改善効果の有無を判定し、新規蛋白、結合蛋白をリードとしたリガンドを探索を開始した。阪大産学連携共同創薬開発研究の利用も今後の研究発展の中で考慮している。

4) ゲノム創薬へ向けたヒト iPS 細胞による検証を併せた治療標的リガンド開発と臨床実用化

原因遺伝子発端者組織から iPS 細胞を樹立し、独自の高効率心筋細胞分化系を用いて、病態機序、

分子機能解析を行うため、承諾を得た家系に対しての iPS 細胞作製について技術の安定的な供給を行った。

D. 考察

①希少難治性循環器疾患症例を対象とし、かつ先進的基礎解析を要する臨床-基礎研究の場合には、基礎研究、臨床研究ともに専門的技術の両立が必要である。当施設は病院臨床部門ハートセンター（循環器内科・心臓血管外科）として数多くの診療にあたりながら疾患の難治性判断を行う経験が多く、従来ヒトを対象とした遺伝子解析はもとより蛋白機能解析の研究が可能であったが、今後の同様の研究の円滑な実施には、基礎臨床が連携することが可能な研究環境の充実が必須と考えられる。

最重症心不全症例（心臓移植、最新型人工心臓、高度先進医療）の多くの経験をもとに臨床病態評価システムを確立し、臨床検査データと生体試料、血清組織バンクを連結させてゲノム解析に用いる詳細な表現型を規定することで、難治性疾患解析の精度を高めることができた。

希少難治性循環器疾患の診断法および創薬の開発につなげるゲノム解析研究を行うためには、高度な臨床診断技術および現有の先進的治療の施行実績と、ゲノム、遺伝子発現、蛋白機能解析、病理の各解析に適した検体試料サンプルが蓄積されていることが必要であるとともに、ゲノム解析はじめ探索的解析過程から同定後の分子機能解析を行う基礎研究環境の充実を期さなければならない。

②日々急速に進歩するゲノム解析技術を考慮の上で、研究デザインを行う必要がある。次世代シーケンス解析のコスト低減、機種バージョン更新は目まぐるしく、ハイエンドモデルの機能、能力をフルに動作させるパフォーマンス効率の良い解析処理を達成するには、数100～数1000におよぶ検体数を準備するとともに、それらを解析する多額の解析費用の準備が必要となる。

さらにそれらのゲノム情報を取り扱う為の解析環境の整備が重要であり、診断、治療に役立つ rare variant の探索に対する戦略方法確立することを本解析における一つの目標とし、工夫を行った。循環器における希少難治性疾患は同一病名内においてもヘテロな原因の集合体と類推されるため、別家系間での比較が困難であることが多い。そのため探索の際

には一家系内での解析を基本とし、臨床部門との強い連携の中で、発端者へ家族歴の問診から遺伝性の有無を区別し、公知の原因遺伝子変異の鑑別スクリーニングを実施除外ののち、新規遺伝子変異を有する可能性のあるもののみに対して2次スクリーニングを実施することとした。

③心筋症発症に関わる新規遺伝子 AMF-GS2、および不整脈疾患含めた2遺伝子を同定し得た（未公表データ）。不整脈症例における原因遺伝子は3症例による Exome 解析では全ゲノムにおいて300程度の候補遺伝子として残ったが、事前に行った連鎖解析により40MB の領域に狭めることに成功していたため、2つの候補遺伝子にまで絞ることができた。さらに、症例と類似の病型を示す臨床群を対象に、類似遺伝子変異検索を行い新たに別の家系を見つけることができた。遺伝型を解析する上で表現型の明確化は同定作業の成否を決める非常に重要な過程であり、特に原因不明の心筋症などの多い本研究分野において、臨床データの再整理は欠かせない。

④ゼブラフィッシュ実験系は、心電図、心臓壁運動 M モードなど種々の心機能測定法を駆使しながら、標的とする遺伝子改変（mRNA 打ちこみによる強制発現系、モルフォリノ打ちこみによる遺伝子発現抑制系）モデルを作成し、分子の果たす *in vivo* 的役割を見、その機能を知ることができる。わずか数十時間で発生分化していく過程で、その心臓の表現型を知ることができ、迅速に諸指標を検証するには非常に有用な動物実験モデルである。今回新規に同定した心不全関連新規遺伝子 AMF-GS2 に対するゼブラフィッシュによる機能解析はその手技を上手く適用し、生理学的解析と分子生物学的解析と迅速病態解析を行うことができた。

⑤新規同定の遺伝子生理活性の有無の検索を行うと同時に、本解析では Nano-LC MS 解析による標的分子探索が効率よく行われた。相互作用する分子を網羅的に探索する本方法として、質量分析により新規相互作用分子を繰り返し再現性良く入手することが可能であった。その結果、創薬開発を目的とした企業共同研究も開始する見通しとなり、生理活性と細胞機能を評価し、Phenotype 改善効果の有無を判定し、新規蛋白、結合蛋白をリードとしたリガンドを探索を開始する予定である。阪大産学連携共同創薬開発研究も利用も考慮している。

E. 結論

- ①臨床情報が集積された症例を蓄積することで、他には無い独自の臨床データ解析が可能な症例バンクを構築することに成功し、その情報を基にした二次性心筋症はじめ病因既知の循環器疾患を除外することができる。それらの症例からゲノム解析を行う症例を選択するというシステムを作り上げた。
- ②次世代シーケンス解析の効率化をはかるため、ゲノムワイドに既知原因遺伝子の変異を先に探索する情報解析システムを作成することができた。網羅性、拡張性があり、コスト的にも有利であると考えられるため、Probandに対する全 Exome 解析を行うことが可能である。
- ③家系症例を対象に Microsatellite marker を用いた連鎖解析を行うことで、難治性不整脈の家系の疾患原因遺伝子として新規遺伝子の一つ同定した(未公表データ)。
- ④心筋細胞機能変化を示す重要な分子をスクリーニングすることで、難治性心筋症発症に関わると想定される新規遺伝子 AMF-GS2、を同定した(未公表データ)。
- ⑤ゼブラフィッシュ実験系について、Dual-CCD カメラ / LED 光源装備 / 倒立型電動リサーチ顕微鏡 - 細胞機能解析装置による、世界に先駆け新規に開発実用化に成功した in vivo FRET プローブイメージング解析システムを構築した。それは心臓機能の生体精密機能解析を行うことに応用できる。
- ⑥新規同定遺伝子の生理活性の有無の検索を行うと同時に、超高感度 Nano-LC MS 解析による相互作用を持つ標的分子探索も並行して行うことができた。新規遺伝子 AMF-GS2 については、既に有意な標的分子も得て、創薬開発を目的とした企業共同研究も開始する見通しとなった。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

G. 研究発表

1. 論文発表 (英文原著)

- 1) Shimizu I (9人略) Komuro I (1人略)

Minamino T.

p53-induced adipose tissue inflammation is critically involved in the development of insulin resistance in heart failure. *Cell*

*Metab.*15(1): 51-64, 2012.

- 2) Yasuda N (8人略) Minamino T (2人略) Shiojima I (3人略) Komuro I. Agonist-Independent Constitutive Activity of Angiotensin II Receptor Promotes Cardiac Remodeling in Mice. *Hypertension*. 59(3): 627-33, 2012.
- 3) Ikeda H, Shiojima I (5人略) Komuro I. Increased Akt-mTOR signaling in lung epithelium is associated with respiratory distress syndrome in mice. *Mol Cell Biol*. 31: 1054-65, 2011.
- 4) Shioyama W (19人略) Komuro I. Docking Protein Gab1 Is an Essential Component of Postnatal Angiogenesis After Ischemia via HGF/c-Met Signaling. *Circ Res*. 108: 664-75, 2011.
- 5) Zou Y (14人略) Shiojima I (1人略) Komuro I, (1人略). Ryanodine Receptor Type 2 Is Required for the Development of Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy. *Hypertension*. 58(6): 1099-110, 2011.
- 6) Zou Y (15人略) Komuro I (1人略). Heat shock transcription factor 1 protects heart after pressure overload through promoting myocardial angiogenesis in male mice. *J Mol Cell Cardiol*. 51: 821-9, 2011.
- 7) Taneike M (14人略) Komuro I (1人略). Calpain protects the heart from hemodynamic stress. *J Biol Chem*. 286: 32170-7, 2011.
- 8) Wu X (9人略) Minamino T, Komuro I. Role of Jagged1 in arterial lesions after vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 31: 2000-6, 2011.
- 9) Yamamoto R (8人略) Komuro I. Angiotensin II type 1 receptor signaling regulates feeding behavior through anorexigenic corticotropin-releasing hormone in hypothalamus. *J Biol Chem*. 286: 21458-65, 2011.
- 10) Aoki A (16人略) Komuro I (3人略). SNPs on chromosome 5p15.3 associated with myocardial infarction in Japanese population. *J Hum Genet*. 56: 47-51, 2011.
- 11) Takano H (6人略) Komuro I. Effects of valsartan and amlodipine on home blood pressure and cardiovascular events in

- Japanese hypertensive patients: a subanalysis of the VART. *J Hum Hypertens.* 13-Oct, 2011.
- 12) Masuda D (16人略) Komuro I (1人略)
Fasting Serum Apolipoprotein B-48 Can be a Marker of Postprandial Hyperlipidemia. *J Atheroscler Thromb.* 18(12): 1062-70, 2011.
 - 13) Kamimura D (15人略) Komuro I (1人略).
Ca²⁺ entry mode of Na⁺/Ca²⁺ exchanger as a new therapeutic target for heart failure with preserved ejection fraction. *Eur Heart J.* 2011.
 - 14) Hasegawa H (6人略) Komuro I.
Effects of telmisartan and losartan on cardiovascular protection in Japanese hypertensive patients. *Hypertens Res.* 34(11): 1179-84, 2011.
 - 15) Yamashita T (7人略) Komuro I (6人略).
IL-6-mediated Th17 differentiation through ROR γ t is essential for the initiation of experimental autoimmune myocarditis. *Cardiovasc Res.* 91: 640-8, 2011.
 - 16) Iwakura T (8人略) Komuro I (3人略).
STAT3/Pim-1 signaling pathway plays a crucial role in endothelial differentiation of cardiac resident Sca-1⁺ cells both in vitro and in vivo. *J Mol Cell Cardiol.* 51: 207-14, 2011.
 - 17) Gong H (13人略) Komuro I (2人略).
Urotensin II inhibits the proliferation but not the differentiation of cardiac side population cells. *Peptides.* 32:1035-1041, 2011.
 - 18) Ohno K (8人略) Komuro I (6人略).
Unique "delta lock" structure of telmisartan is involved in its strongest binding affinity to angiotensin II type 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 404:434-437, 2011.
 - 19) Hanada H (18人略) Komuro I (1人略).
Establishment of chemiluminescence enzyme immunoassay for apolipoprotein B-48 and its clinical applications for evaluation of impaired chylomicron remnant metabolism. *Clin Chim Acta.* 413:160-165, 2011.
 - 20) Shiozaki M (4人略) Sakata Y, Komuro I, (1人略).
Longitudinal Risk of Cardiovascular Events in Relation to Depression Symptoms After Discharge Among Survivors of Myocardial Infarction. *Circ J.* 75:2878-2884, 2011.
 - 21) Takeda Y, Sakata Y (7人略) Komuro I (1人略)
Competing risks of heart failure with preserved ejection fraction in diabetic patients. *Eur J Heart Fail.* 13:664-669, 2011.
 - 22) Kurotobi T (9人略) Komuro I.
The significance of the shape of the left atrial roof as a novel index for determining the electrophysiological and structural characteristics in patients with atrial fibrillation. *Europace.* 13:803-808, 2011.
 - 23) Nakamura K (5人略) Komuro I.
Left atrial wall thickness in paroxysmal atrial fibrillation by multislice-CT is initial marker of structural remodeling and predictor of transition from paroxysmal to chronic form. *Int J Cardiol.* 148:139-147, 2011.
 - 24) Uehara M (6人略) Komuro I.
Comparison of three techniques for evaluation of de novo asymptomatic pulmonary arterial thrombosis following deep vein thrombosis in total knee arthroplasty. *Int J Cardiol.* 148:11-16, 2011.
 - 25) Uehara M (13人略) Komuro I.
Detailed distribution of acute pulmonary thromboemboli: Direct evidence for reduction of acquisition length and radiation dose for triple rule-out CT angiography. *Int J Cardiol.* 147:234-238, 2011.
 - 26) Miyazaki S (6人略) Komuro I.
Cardiac sarcoidosis complicated with atrioventricular block and wall thinning, edema and fibrosis in left ventricle: Confirmed recovery to normal sinus rhythm and visualization of edema improvement by administration of predonisolone. *Int J Cardiol.* 150:e4-10, 2011.
 - 27) Kudo K (7人略) Komuro I.
Reversible left ventricular wall thickening during recovery procedure in takotsubo cardiomyopathy demonstrated by multislice computed tomography. *Int J Cardiol.* 149:e97-99, 2011.
 - 28) Narumi H (5人略) Komuro I.
Effects of valsartan and amlodipine on cardiorenal protection in Japanese hypertensive patients: the Valsartan Amlodipine Randomized Trial. *Hypertens Res.* 34:62-69, 2011.
 - 29) Hara M (3人略) Asano Y, Sakata Y, Komuro I.

- A case of non-cardiogenic acute pulmonary edema in a patient with POEMS syndrome-associated pulmonary arterial hypertension. *Ann Hematol.* 90:489-490, 2011.
- 30) Takahashi A (9人略) Komuro I, (1人略).
Quantitative evaluation of right atrial volume and right atrial emptying fraction by 320-slice computed tomography compared with three-dimensional echocardiography. *Int J Cardiol.* 146:96-99, 2011.
- 31) Uehara M (7人略) Komuro I.
Quality of coronary arterial 320-slice computed tomography images compared with 16-slice computed tomography images in subjects with chronic atrial fibrillation. *Int J Cardiol.* 149:e90-93, 2011.
- 32) Nomura S (7人略) Komuro I.
Cardiac sarcoidosis evaluated by multimodality imaging. *Int J Cardiol.* 150:e81-84, 2011.
- 33) Kawakubo M (15人略) Komuro I.
Relationship of natriuretic peptide and transthoracic echocardiographic findings in 135 subjects with muscular dystrophy. *Int J Cardiol.* 145:506-514, 2011.
- 34) Yajima R (6人略) Komuro I (1人略).
Distinguishing focal fibrotic lesions and non-fibrotic lesions in hypertrophic cardiomyopathy by assessment of regional myocardial strain using two-dimensional speckle tracking echocardiography: Comparison with multislice CT. *Int J Cardiol.* 2011 Feb 25, 2011.
- 35) Ueda H (12人略) Komuro I (1人略).
Prevention of Contrast-Induced Nephropathy by Bolus Injection of Sodium Bicarbonate in Patients With Chronic Kidney Disease Undergoing Emergent Coronary Procedures. *Am J Cardiol.* 107:1163-1167, 2011.
- 36) Kuramoto Y (12人略) Komuro I (1人略).
Usefulness of Cardiac Iodine-123 Meta-Iodobenzylguanidine Imaging to Improve Prognostic Power of Seattle Heart Failure Model in Patients With Chronic Heart Failure. *Am J Cardiol.* 107:1185-1190, 2011.
- 37) Kadohira T (3人略) Komuro I.
Coronary Artery Endothelial Dysfunction Associated With Sleep Apnea. *Angiology.* 62:397-400, 2011.
- 38) Aizawa Y, Sakata Y (7人略) Komuro I (1人略).
Transition from asymptomatic diastolic dysfunction to heart failure with preserved ejection fraction. *Circ J.* 75:596-602, 2011.
- 39) Hashimoto T, Sakata Y (10人略) Komuro I.
Pulmonary arterial hypertension associated with chronic active Epstein-Barr virus infection. *Intern Med.* 50:119-124, 2011.
- 40) Hori Y (10人略) Komuro I (2人略).
Presence of structural heart disease and left ventricular dysfunction predict hospitalizations for new-onset heart failure after right ventricular apical pacing. *Europace.* 13:230-236, 2011.
- 41) Minamiguchi H (4人略) Komuro I.
Low atrial septal pacing with dual-chamber pacemakers reduces atrial fibrillation in sick sinus syndrome. *J Cardiol.* 57:223-230, 2011.
- 42) Hara M (3人略) Asano Y, Sakata Y, Komuro I.
A case of non-cardiogenic acute pulmonary edema in a patient with POEMS syndrome-associated pulmonary arterial hypertension. *Ann Hematol.* 90:489-490, 2011.
- 43) Takahashi A (9人略) Komuro I (1人略).
Quantitative evaluation of right atrial volume and right atrial emptying fraction by 320-slice computed tomography compared with three-dimensional echocardiography. *Int J Cardiol.* 146:96-99, 2011.
- 44) Kataoka A (6人略) Komuro I (1人略).
A case of fulminant myocarditis ultimately diagnosed by tenascin C staining. *Int J Cardiol.* Oct 10, 2011.
- 45) Kurotobi T (10人略) Komuro I.
Local Coronary Flow is Associated with an Unsuccessful Complete Block line at the Mitral Isthmus in Patients with Atrial Fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 4:838-843, 2011.
- 46) Muratsu J (2人略) Asano Y, Sakata Y (3人略) Komuro I.
The impact of cardiac resynchronization therapy in an end-stage heart failure patient with a left ventricular assist device as a bridge to recovery. A case report. *Int Heart J.* 52:246-247, 2011.
- 47) Takeda Y (7人略) Komuro I (1人略).
Diabetic retinopathy is associated with impaired

- left ventricular relaxation. *J Card Fail.* 17:556–560, 2011.
- 48) Nomura S (8人略) Komuro I (1人略). Dilated cardiomyopathy with centronuclear myopathy in a young male. *Int J Cardiol.* 150:213–216, 2011.
- 49) Nakatani K (14人略) Komuro I (1人略). Serum apolipoprotein B-48 levels are correlated with carotid intima-media thickness in subjects with normal serum triglyceride levels. *Atherosclerosis.* 218:226–232, 2011.
- 50) Kitahara H (3人略) Komuro I. Effect of pioglitazone on endothelial dysfunction after sirolimus-eluting stent implantation. *Am J Cardiol.* 108:214–219, 2011.
- 51) Takaoka H (3人略) Komuro I (1人略). Comparison of image characteristics of plaques in culprit coronary arteries by 64 slice CT and intravascular ultrasound in acute coronary syndromes. *Int J Cardiol.* May 3, 2011.
- 52) Kurotobi T (10人略) Komuro I. Electrophysiological features of atrial tachyarrhythmias after the creation of a left atrial roof line during catheter ablation of atrial fibrillation. *Int Heart J.* 52:929–7, 2011.
- 53) Ueda H (12人略) Komuro I (1人略). Prevention of contrast induced nephropathy by bolus injection of sodium bicarbonate in patients with chronic kidney disease undergoing emergent coronary procedures. *Am J Cardiol.* 107:1163–1167, 2011.
- 54) Minamiguchi H (4人略) Komuro I. Low atrial septal pacing with dual-chamber pacemakers reduces atrial fibrillation in sick sinus syndrome. *J Cardiol.* 57:223–230, 2011.
- 55) Kataoka A (8人略) Komuro I. Differentiation of pseudodyskinesia of inferior left ventricular wall from inferior myocardial infarction by assessment of regional myocardial strain using two-dimensional speckle tracking echocardiography. *Int J Cardiol.* 152:362–368, 2011.
- 56) Kataoka A (10人略) Komuro I. Quantitative evaluation of left atrial volumes and ejection fraction by 320-slice computed-tomography in comparison with three- and two-dimensional echocardiography: A single-center retrospective-study in 22 subjects. *Int J Cardiol.* 153:47–54, 2011.
- 57) Masuda M (7人略) Komuro I (1人略). The Impact of Atrial Fibrillation Ablation on Left Atrial Function: Association with Baseline Left Atrial Function. *Pacing Clin Electrophysiol.* Dec 8, 2011.
- 58) Hara M (3人略) Asano Y, Sakata Y (1人略) Komuro I. Clinical impact of off-label cardiac resynchronization therapy in end-stage heart failure patients on continuous intravenous inotrope. *Clin Cardiol.* 34:714–720, 2011.
- 59) Sasaki K (3人略) Sakata Y, Komuro I. A case of thyroid storm with multiple organ failure effectively treated with plasma exchange. *Intern Med.* 50:2801–2805, 2011.
- 60) Yuasa-Kawase M (12人略) Komuro I (1人略). Patients with CD36 Deficiency Are Associated with Enhanced Atherosclerotic Cardiovascular Diseases. *J Atheroscler Thromb.* Nov 10, 2011.
- 61) Kobayashi N (10人略) Komuro I, Arano Y (2人略). Toward in vivo imaging of heart disease using a radiolabeled single-chain Fv fragment targeting tenascin-C. *Anal Chem.* 83:9123–9130, 2011.
- 62) Odaka K (8人略) Komuro I (1人略). In vivo tracking of transplanted mononuclear cells using manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *PLoS One.* 6:e25487, 2011.
- 63) Sakata Y (13人略) Komuro I. Oral treatment with nicorandil at discharge is associated with reduced mortality after acute myocardial infarction. *J Cardiol.* 59:14–21, 2012.
- 64) Uchiyama R (4人略) Komuro I (1人略). Role of regulatory T cells in atheroprotective effects of granulocyte colony-stimulating factor. *J Mol Cell Cardiol.* Jan 18, 2012.
- 65) Hasegawa H (4人略) Komuro I. Effect of Switching from Telmisartan, Valsartan, Olmesartan, or Losartan to Candesartan on Morning Hypertension. *Clin Exp Hypertens.* Jan 17, 2012.
- 66) Fukushima N (10人略) Komuro I.

A crucial role of activin A-mediated growth hormone suppression in mouse and human heart failure. PLoS One. 6:e27901, 2012.

- 67) Iwashita M (11人略) Komuro I (3人略). Valsartan, independently of AT1 receptor or PPAR γ , suppresses LPS-induced macrophage activation and improves insulin resistance in cocultured adipocytes. Am J Physiol Endocrinol Metab. 302:E286-296, 2012.
- 68) Ma H (9人略) Komuro I (2人略). Association of Stat3 with HSF1 plays a critical role in G-CSF-induced cardio-protection against ischemia/reperfusion injury. J Mol Cell Cardiol. Mar 6, 2012.
- 69) Kameda Y (4人略) Komuro I (1人略). Effects of Pitavastatin on Pressure Overload-Induced Heart Failure in Mice. Circ J. Feb 23, 2012.

(和文業績)

- 1) 小室一成. 陳旧性心筋梗塞. 今日の診断指針 第6版. 838-849. 2011.
- 2) 小室一成. 心不全治療の最前線「総論:心不全はエベレストである」Bio Clinica. 26(3):16-17,2011.
- 3) 赤澤宏、小室一成. 特集 高血圧学会治療の未来への展開 II.治療 2. 合併症のある高血圧の治療 3)心臓病. 日本内科学会雑誌 100 (2)394-399,2011.
- 4) 赤澤宏、小室一成. 5.患者背景を考慮した配合剤の選択と使い分けのアポイント 2)ARB/CCB 配合剤. Progress in Medicine. 31(1),2011.
- 5) 森下竜一、小室一成. 第5回 臨床最前線 Cardiovascular Frontier. 2(1): 67-71, 2011.
- 6) 小室一成. 座談会「心不全を新しい視点が考える」Cardiovascular Frontier. 2(3): 7-11, 2011.
- 7) 赤澤宏、小室一成. 第2章 慢性炎症と生活習慣病 4.心疾患と慢性炎症.実験医学増刊 29(10):88(1566)-93(1571), 2011.
- 8) 小室一成、池田隆徳、小林義典、山下武志. 座談会 変革期にある心房細動診療—最新動向と今後の展望. Nikkei Medical. 6:68-71, 2011.
- 9) 森下竜一(司会)、小室一成、堀内正嗣、益崎裕章、光山勝慶. 座談会 沖縄クライシスに学ぶ今後の研究課題と治療戦略 —メタボリックシンドロームを中心として—. Pharma Medica. 29(6):72-78, 2011.
- 10) 赤澤宏、小室一成. 第2章 慢性炎症と生活習慣病 4.心疾患と慢性炎症.実験医学増刊 29(10):88-93, 2011.
- 11) 小室一成(司会)、石坂信和、塩島一朗、寺崎文生. 座談会 心臓細動治療の現状と今後の展開. Pharma Medica. 29(7):101-105, 2011.
- 12) 赤澤宏、小室一成. 特集 心臓の謎に迫る RAS 抑制はなぜ心不全に有効なのか? Angiotensin Research. 8(3):120-124, 2011.
- 13) 赤澤宏、小室一成. 特集 心血管病予防からみた高血圧の最新治療戦略 心不全と高血圧治療. 月間循環器 1(1):77-83, 2011.
- 14) 森下竜一(司会)、Juan Carlos Lopez、室原豊明、小室一成. 特別座談会「トップジャーナルにアクセプトされる論文とは—Nature Medicine 編集長に聞く—」Cardio-Lipidology. 5(2):37-46, 2011.
- 15) 小室一成. メタボ時代の高血圧との付き合い方 高血圧は死に至る“サイレントキラー(静かな殺し屋)”Beautiful-aging Festa 2011 別冊.
- 16) 小室一成(司会)、奥山裕司、塩島一朗、山下武志. 座談会 これからの心房細動治療. Nikkei Medical. 8:112-115. 2011.
- 17) 小室一成、李鍾國. 特集 心不全診療—予防と治療の最前線 心不全再生治療の現状と展望. 日本医師会雑誌 . 140(4):777-780. 2011.
- 18) 小室一成. 特集 心筋症—研究と診療の現状と課題 総論. CARDIA CPRACTICE. 22(3):199. 2011.
- 19) 小室一成(司会)、竹村元三、森田啓行、山岸正和. 特集 心筋症—研究と診療の現状と課題 座談会 心筋症—発症原因から新しい治療法を考える. CARDIAC PRACTICE. 22(3):243-251. 2011.
- 20) 小室一成(企画編集). 循環器治療薬の選択と適性使用. 月刊循環器 CIRCULATION. 1(2):10-11. 2011.
- 21) 小室一成(司会)、堀内正嗣(コメンテーター)、野出孝一(コメンテーター). メタボリックシンドローム合併高血圧治療における‘メタボサルタン’への期待. Medical Tribune . 44(35):20-21. 2011.
- 22) 小室一成(司会)、苅尾七臣、森下竜一、佐田政隆. 心血管イベント抑制を目指す高血圧治療における‘メタボサルタン’への期待. 日経メディカル 553:135-138. 2011.

2、学会発表

- 1) 小室一成. 心不全の新しい発症機序と治療.

- 小児循環器学会 福岡市 2011-7.6-8.
- 2) 小室 一成. Mechanism and Regeneration Therapy for Heart Failure. 心不全学会 鹿児島市 2011/10/13-15.
 - 3) 小室 一成. Anti-hypertensive therapy for Patients Complicated with Heart Diseases. 高血圧学会 宇都宮市 2011.10.20-22.
 - 4) 小室 一成. ARB の最新知見. 高血圧学会 宇都宮市 2011.10.20-22.
 - 5) 小室 一成. Aging as a cause of vascular injury. 血管生物医学会 東京都 2011.12.8-10.
 - 6) 小室 一成. 心筋保護と左室リモデリングの抑制を目的とした薬物治療. 日本循環器学会 福岡市 2012.3.16-18.
 - 7) 小室 一成. VART-家庭血圧サブ解析からの最新知見. 日本循環器学会 福岡市 2012.3.16-18.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1、特許取得

公開番号：特開 2011-084571

公開日：平成23年4月28日

出願番号：特願 2011-007128

出願人：積水メディカル会社 N/A

大門雅夫

出願日：平成23年1月17日

発明人：大門雅夫

南野 徹

橋本謙二

小室一成

2、実用新案登録

なし

3、その他

以上、特筆すべき事項なし

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用化研究事業)
分担研究報告書

次世代遺伝子解析による希少難治性循環器疾患の診断治療法の開発と
臨床実用化に関する研究

研究分担者 澤 芳樹 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

難治性疾患の原因遺伝子に基づく医療アプローチを可能とすべく、これまでヒト臨床研究で得た多くの成果をいかす。診断治療の創薬開発と、その迅速なる臨床実用化により、次世代シーケンス解析の実践と同定遺伝子情報を診断治療に迅速に応用する独創的手法を利用し実施する。

難治性循環器疾患の遺伝性家系及び心不全症例の生体試料バンクの利用し、ゲノム解析の精度と速度を高める方策をとり検体を整理する。ゲノム創薬へ向けてヒト iPS 細胞による検証も用いた治療標的リガンド開発と臨床実用化など得られたゲノム情報を迅速かつ有効に診療に結実させるよう研究を進める。

A. 研究目的

循環器系難治性疾患の原因遺伝子は多岐にわたり未だ全てが明らかとは限らない。遺伝性が濃厚な希少難治性疾患の家系症例をできるだけ多く集積させ、それらの症例から原因となる新規 rare variant を同定することを目指す。また、症例より採取の組織から患者に準拠した細胞を用いて実験検討ができる研究環境を整える。

B. 研究方法

1. ゲノム解析の迅速な実施と実用的解析システムの構築

集積された症例の独自の臨床データ解析とゲノム解析症例の選定

大阪大学医学部附属病院において、特に心臓血管外科加療対象となる、心移植、重症心不全の症例を中心に、説明と同意を得られる症例の中から、外来経過観察中ないし入院中の患者を対象にする。

ヒトゲノム解析の説明と同意を得た心血管系難

治性疾患患者を解析対象者とし、遺伝性が濃厚な家系症例から順に、心筋症:4家系・約30例、頻脈性不整脈(家族性突然死を含む):3家系・約20例、血管疾患:1家系・約5例を当初の目標に症例収集を行う。

目標症例数には上限を設けず、遺伝性循環器疾患を疑うものを中心に症例収集を行う。また、家系ではなくとも、孤発症例のうち、二次性心筋症を除外したものから最終的には約100症例を目標に検体収集を行う

(大阪大学ヒトゲノム倫理審査で既に承認済)。

2. ゲノム情報の臨床実用化

(ゲノム創薬、診断薬開発と細胞治療への応用)

ゲノム創薬へ向けたヒト iPS 細胞による検証を併せた治療標的リガンド開発と臨床実用化

原因遺伝子発端者組織から iPS 細胞を樹立し、独自の高効率心筋細胞分化系を用いて、病態機序、分子機能解析を行うため、承諾を得た家系に対してその臨床データの整理を行い iPS 細胞作製について技術の安定的な供給を行う研究環境を整える。

疾患原因遺伝子として同定し得た標的リードに対するリガンド探索を行い、創薬を目指すため、病態

機序および新規薬剤や既存薬の薬効評価と機能解析が可能となる iPS 細胞研究の環境を整える。

(倫理)

患者情報の解析に関しては施設の倫理委員会の承認を得た上、臨床研究倫理指針を遵守し慎重におこなう。その上で患者とは個別に、医師が書面に示した計画書を明示し、十分説明をしたうえで承諾を得たもののみを本研究に使用する。特に以下の点に留意する。

1) 試料提供者の個人識別情報を含む情報の保護: 診療情報を含めた個人情報と検体とは徹底した匿名化を行い、遺伝情報と個人情報の連結は個人識別情報管理者のみが可能となるように個人識別情報管理者において情報を管理する。

2) 試料提供者に対する予想される危険や不利益およびそれらが生じた場合の措置: 心筋生検試料採取は通常の診療の際に医学的必要性に応じて行われたもののうち、診療に用いない残余検体を利用することとし、危険や不利益はないと考える。誤って遺伝情報が外部に漏洩した場合、就職・結婚・保険への加入等に関して不利益をこうむる可能性が考えられるため、これを防ぐために、個人識別情報管理者を置き、同管理者は試料の匿名化を行うとともに個人情報を厳重に管理・保管し、試料提供者のプライバシーを保護する。

3) 試料提供者から採取した生体材料の取り扱いについて: 提供された試料は、個人識別情報管理者が連結匿名化し、匿名化ラベルのみ貼って保存する。これらの試料は、生体試料の包括利用同意を得ており、本研究だけでなく、将来倫理委員会で承認された他の自主臨床研究についても用いることが可能である。したがって検査済みの試料は、適宜連結可能匿名化番号を含む検体等を完全に削除した上で廃棄するが、使用可能な残余検体は匿名化されたまま施錠された保管場所で保管される。また、特に研究成果として得られた情報の管理には、外部に漏洩しないように対策を行う。

動物実験においても愛護上の問題点を考慮の上、施設の審査結果を本研究について得た。この倫理規定にのっとり動物愛護上の配慮を十分行って実験をおこなう。

C. 研究結果

1. ゲノム解析の迅速な実施と実用的解析システムの構築

集積された症例の独自の臨床データ解析とゲノム解析症例の選定

大阪大学医学部附属病院における、特殊な心不全臨床病態を有するゲノム解析対象症例の蓄積は計画通り進んだ。

遺伝性疾患を疑う家系としては: 心筋症 30 例、家族性突然死 20 例を、また孤発例としては: 特発性心筋症 10 例を集めた。今後も遺伝性循環器疾患を疑うものを中心に症例収集を行う。

また、家系ではなくとも、孤発症例のうち、二次性心筋症を除外したことから約 20 症例の検体収集を行った。

2. ゲノム情報の臨床実用化

(ゲノム創薬、診断薬開発と細胞治療への応用)

ゲノム創薬へ向けたヒト iPS 細胞による検証を併せた治療標的リガンド開発と臨床実用化

原因遺伝子発端者組織から iPS 細胞を樹立し、独自の高効率心筋細胞分化系を用いて、病態機序、分子機能解析を行うため、承諾を得た家系に対しての iPS 細胞作製を行いながら、実験プロトコルを確立した。

D. 考察

最重症心不全症例(心臓移植、最新型人工心臓、高度先進医療)の多くの経験をもとに臨床病態評価システムを確立し、臨床検査データと生体試料、血清組織バンクを連結させてゲノム解析に用いる詳細な表現型を規定することで、難治性疾患解析の精度を高めることができた。

希少難治性循環器疾患症例を対象とし、かつ先進的基礎解析を要する臨床-基礎研究の場合には、基礎研究、臨床研究ともに専門的技術の両立が必要である。当施設は病院臨床部門ハートセンター(循環器内科・心臓血管外科)として数多くの診療にあたりながら疾患の難治性判断を行う経験が多く、従来ヒトを対象とした遺伝子解析はもとより蛋白機能解析の研究が可能であった。

E. 結論

内科外科に広がる症例の蓄積には、診療科を超えて協力を行う必要がある。臨床情報が集積された

築することができる。

臨床情報を基にした二次性心筋症はじめ病因が既知である循環器疾患を除外することができるよう、それらの症例からゲノム解析を行う症例を選択するというシステムを作り上げることができた。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Imanishi Y, Sawa Y, (7人略).
Induced adipocyte cell-sheet ameliorates cardiac dysfunction in a mouse myocardial infarction model: a novel drug delivery system for heart failure. *Circulation*. 2011 Sep 13;124(11 Suppl):S10-7.
- 2) Shudo Y, Sawa Y, (11人略).
Novel regenerative therapy using cell-sheet covered with omentum flap delivers a huge number of cells in a porcine myocardial infarction model. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2011 Sep 14.
- 3) Fujita T, Sawa Y, (11人略).
Clinical impact of combined transplantation of autologous skeletal myoblasts and bone marrow mononuclear cells in patients with severely deteriorated ischemic cardiomyopathy. *Surg Today*. 2011 Aug;41(8):1029-36.
- 4) Imanishi Y, (7人略) Sawa Y, (5人略).
Allogenic skeletal myoblast transplantation in acute myocardial infarction model rats. *Transplantation*. 2011 Feb 27;91(4):425-31.
- 5) Miyagawa S, Sawa Y, (3人略).
Tissue-engineered cardiac constructs for cardiac repair. *Ann Thorac Surg*. 2011 Jan;91(1):320-9.

2. 学会発表

- 1) Sawa Y. Tissue-Engineered Cell Sheets to Facilitate VAD Wean. 49th American Heart Association (AHA) Orland 2011.11.12-16.
- 2) Shirasaka T. Combined Therapy of Skeletal Myoblast Cell-Sheet Transplantation with Administration of Prostacycline Agonist Makes Left Ventricular Reverse Remodeling on the Impaired Myocardium in Rapid-Pacing Induced End-stage Heart Failure in Canine Heart. 49th

American Heart Association (AHA) Orland 2011.11.12-16.

- 3) Saito S, Sakaguchi T, Miyagawa S, Nishi H, Yoshikawa Y, Fukushima S, Ueno T, Kuratani T, Saito A, Sawa Y. Myoblast Sheet Implantation Can Prevent the Impairment of Cardiac Diastolic Function after Left Ventricular Restoration by Modulating the Extracellular Matrix Gene Expression. Progress Meeting on International consortium for cardiac tissue engineering Tampere, Finland 2011.8.22-24.
- 4) Shudo Y, Miyagawa S, Saito A, Sakaguchi T, Kainmuma S, Kuratani T, Sawa Y. Novel Regenerative Therapy Using Cell-Sheet Covered with Omentum Flap to Deliver Huge Numbers of Cells in a Porcine Myocardial Infarction Model. 91th AATS (American Association for Thoracic Surgery) Philadelphia 2011.5.7-11
- 5) Saito S, Sakaguchi T, Miyagawa S, Nishi H, Yoshikawa Y, Fukushima S, Ueno T, Kuratani T, Saito A, Sawa Y. Myoblast Sheet Implantation Can Prevent the Impairment of Cardiac Diastolic Function after Left Ventricular Restoration by Modulating the Extracellular Matrix Gene Expression. 31th International Society for Heart and Lung Transplantation San Diego 2011.4.13-16.
- 6) 宮川 繁. 澤 芳樹. 再生医療を用いた心不全に対するアンチエイジング治療. アンチエイジングフェスタ2011 大阪 2011.12.2-3.
- 7) 宮川 繁. 澤 芳樹. 心不全における再生医療の現況. 第49回日本人工臓器学会大会 東京 2011.11.25-27.
- 8) 宮川 繁. 吉川泰司, 坂口太一, 西 宏之, 福嶋五月, 斎藤俊輔, 斎藤充弘, 樋口貴宏, 首藤恭広, 澤 芳樹. 虚血性心筋症に対する自己筋芽細胞移植の効果—症例報告—. 第15回日本心不全学会学術集会 鹿児島 2011.10.13-15.
- 9) Yoshikawa Y, Miyagawa S, Sakaguchi T, Saito A, Nishi H, Fukushima S, Saito S, Higuchi T, Shudo Y, Sawa Y. A Scaffold-free myocardial regenerative therapy using the autologous skeletal-muscle-derived cell (SC) sheet implantation for patients with dilated cardiomyopathy. 第15回日本心不全学会学術集会 鹿児島 2011.10.13-15.
- 10) 吉川泰司. 宮川 繁, 坂口太一, 西 宏之, 福嶋五月, 斎藤俊輔, 斎藤充弘, 樋口貴宏, 首藤恭広, 澤 芳樹. 虚血性心筋症に対する自己筋芽細胞移植の効果—症例報告—. 第32回循環器内科・外科フォーラム 大阪 2011.9.10.
- 11) 宮川 繁. From Bench to Bedside work in cell sheet-based myocardial regeneration therapy.

- 11) 宮川 繁. From Bench to Bedside work in cell sheet-based myocardial regeneration therapy. 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会 横浜 2011.8.3-4.
- 12) 宮川 繁、坂口太一、西 宏之、吉川泰司、福嶋五月、齋藤俊輔、齋藤充弘、首藤恭広、樋口貴宏、上野高義、倉谷 徹、澤 芳樹. 虚血性心筋症に対する再生型治療の現状と展望. 第 16 回日本冠動脈外科学会学術大会 長野 2011.7.14-15.
- 13) 吉川泰司、坂口太一、宮川 繁、西 宏之、福嶋五月、齋藤俊輔、上野高義、倉谷 徹、澤 芳樹. 虚血性心筋症患者への自己筋芽細胞シート移植の効果. 第 54 回関西胸部外科学会学術集会 高松 2011.6.30-7.1.
- 14) 宮川 繁、坂口太一、西 宏之、吉川泰司、福嶋五月、齋藤俊輔、首藤泰広、齋藤充弘、倉谷徹、澤 芳樹. 重症心不全における再生型治療の基礎研究および臨床応用. 第 111 回日本外科学会定期学術総会 震災の影響により誌上発表(予定:東京国際フォーラム 2011.5.26-28).
- 15) 首藤恭広、宮川 繁、齋藤充弘、坂口太一、西宏之、吉川泰司、倉谷 徹、澤 芳樹. 重症心不全における新しい細胞移植の検討:細胞シートの大網を用いた大量細胞移植法. 第 111 回日本外科学会定期学術総会 震災の影響により誌上発表(予定:東京国際フォーラム 2011.5.26-28).
- 16) 宮川 繁、坂口太一、西 宏之、吉川泰司、福嶋五月、齋藤俊輔、齋藤充弘、首藤恭広、清水達也、岡野光夫、澤 芳樹. 重症心不全に対する筋芽細胞シートの大網を用いた大量細胞移植法. 第 27 回日本医工学治療学会学術大会 岡山 2011.4.22-24.
- 17) 澤 芳樹. 弱った心臓は甦る!?. 第 10 回日本再生医療学会総会 東京 2011.3.1-2.
- 18) 澤 芳樹. 自己筋芽細胞シートによる心筋再生治療臨床研究. 第 10 回日本再生医療学会総会 東京 2011.3.1-2.
- 19) 吉川泰司、宮川繁、坂口太一、齋藤充弘、西宏之、福嶋五月、齋藤俊輔、首藤恭広、澤 芳樹. 左室補助人工心臓装置を要する末期拡張型心筋症患者に対する自己筋芽細胞シート移植の臨床研究の効果. 第 10 回日本再生医療学会総会 東京 2011.3.1-2.
- 20) 首藤恭広、宮川 繁、齋藤充弘、坂口太一、西宏之、吉川泰司、福嶋五月、齋藤俊輔、甲斐沼尚、清水達也、岡野光夫、澤 芳樹. 重症心不全における新しい細胞移植法の検討:細胞シートと大網を用いた大量細胞移植法. 第 10 回日本再生医療学会総会 東京 2011.3.1-2.
- 21) 宮川 繁、坂口太一、西宏之、吉川泰司、福嶋五月、齋藤俊輔、齋藤充弘、倉谷徹、澤 芳樹. 重症心不全に対する自己細胞による再生医療の展開. 第 41 回日本心臓血管外科学会学術総会 浦安 2011.2.23-25.
- 22) 吉川泰司、坂口太一、宮川 繁、西宏之、福嶋五月、上野高義、倉谷徹、澤 芳樹. 重症心不全患者に対する自己筋芽細胞シート移植の臨床研究の効果. 第 41 回日本心臓血管外科学会学術総会 浦安 2011.2.23-25.
- 23) 首藤恭広、宮川繁、齋藤充弘、坂口太一、西宏之、吉川泰司、福嶋五月、齋藤俊輔、首藤恭広、樋口貴宏、鎌田創吉、甲斐沼尚、吉岡大輔、清水達也、岡野光夫、澤 芳樹. 重症心不全における細胞シートと大網を用いた新しい大量細胞移植法の検討. 第 41 回日本心臓血管外科学会学術総会 浦安 2011.2.23-25.
- 24) 吉川泰司、宮川 繁、坂口太一、齋藤充弘、西宏之、福嶋五月、齋藤俊輔、首藤恭広、樋口貴宏、澤 芳樹. 左室補助人工心臓装置を要する末期拡張型心筋症患者に対する自己筋芽細胞シート移植の臨床研究の効果. 第 39 回人工心臓と補助循環懇話会 米子 2011.2.18-19.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

- 1、特許取得
なし
- 2、実用新案登録
なし
- 3、その他
以上、特記すべき事項なし

次世代遺伝子解析による希少難治性循環器疾患の診断治療法の開発と
臨床実用化に関する研究

研究分担者 油谷浩幸 東京大学先端科学技術研究センター 教授

研究要旨

本研究では次世代シーケンス解析の実践と同定遺伝子情報を診断治療に迅速に応用する独創的手法を利用し実施する研究を行う中で、遺伝性が濃厚な希少難治性疾患の家系症例を対象に、原因となる新規 rare variant を同定し、診断および治療薬標的を見出し、臨床実用化することを目指す。迅速なゲノム医療への実践のため、既知変異の迅速な鑑別除外することにより、新規遺伝子変異の同定が必要な症例に次世代シーケンス解析によって新規分子ないし変異を探索し、機動力ある表現型機能解析と同定遺伝子情報の臨床応用への迅速化をはかる。次世代解析拠点施設と連携し、In-house レファレンスデータの蓄積にも協力する。本研究に適した情報解析が行えるよう、独自の解析パイプラインを構築し、循環器疾患特有の症例群解析に適した遺伝子解析/情報解析環境の整備に着手した。

A. 研究目的

循環器系難治性疾患の原因遺伝子は多岐にわたり未だ全てが明らかとは限らない。未解明のまま殆どが厳密に原因を同定できぬまま高度医療に臨まざるを得ない。

そこで遺伝性が濃厚な希少難治性疾患の家系症例群より新規 rare variant (遺伝子変異) を同定し、その分子機能解析と実用化診断治療薬となる分子標的を見出すことを目標とする。

B. 研究方法

ゲノム解析の迅速な実施と実用的解析システムの構築

次世代遺伝子解析による新規遺伝子同定

次世代解析拠点施設と連携し、In-house レファレンスデータの蓄積にも協力する。本研究に適した Linux によるパイプラインを構築し、循環器疾患特有の症例群解析に適した遺伝子解析/情報解析環境を整える。

次世代シーケンス解析用 Linux サーバー内にデ

ータ解析専用システムを構築し、オープンソースを中心とした専用ソフトウェアを導入し、データのクオリティチェック、リファレンスマッピング、アプリケーションごとの解析を迅速に行うことが可能なパイプラインを構築する。膨大なデータ解析に対応できる情報解析環境を本研究システムに導入することで今後増える本研究に対応できるようにする。

上記解析システムを用いながら、採取した血液サンプルから抽出したゲノム DNA について次世代シーケンス解析を行い、特殊表現型を示す遺伝子座の同定を行う。

全エクソン解析の実施に先立ち、既知遺伝子変異の迅速な鑑別除外を行うことが望ましいため、疾患原因遺伝子パネルをスクリーニングする手法に関して検討を行った。

(倫理)

患者情報の解析に関しては施設の倫理委員会の承認を得た上、臨床研究倫理指針を遵守し慎重におこなう。その上で患者とは個別に、医師が書面に示した計画書を明示し、十分説明をしたうえで承諾を得たもののみを本研究に使用する。特に以下の点に留意する。

1) 試料提供者の個人識別情報を含む情報の保護: