

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

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

難治性心不全および難治性不整脈疾患の症例を対象に、新規ゲノム解析パイプラインの構築を行った。家系症例については連鎖解析を行い、ある程度候補遺伝子領域を絞るとともに、全エクソーム解析を行い、候補遺伝子を絞りこむこととした。Fluidigm社のAccessarrayを用いることによって48検体に関して48アンプリコンを同時かつ個別に増幅したPCR産物を検体毎に回収できる。それぞれにバーコードを付すことによって、由来する検体は同定可能であ

り、100程度の遺伝子数であれば、デスクトップ型のシーケンサーであるMiSeq(イルミナ)あるいはIon torrentで解析可能である。

情報解析環境と整えるべく、次世代シーケンス解析用Linuxサーバー上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開発した。

D. 考察

日々急速に進歩するゲノム解析技術を考慮の上で、研究戦略をたてる必要がある。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ことで、数百~数千におよぶ症例数を解析することも実現可能となりつつある。

一方、そのためには得られるゲノム情報を取り扱うための解析環境の整備が重要であり、診断、治療に役立つrare variantの探索法を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。希少難治性循環器疾患は同一病名内においても原因となる遺伝子が複数存在するヘテロな集団と類推されるため、別家系間での比較が困難であることが多い。そのため探索に際しては同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、既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症例に対して2次スクリーニングを実施することとした。

既知原因遺伝子パネルの変異スクリーニングにおいては、対象となる遺伝子の全長をカバー出来る一方、用いるゲノムDNA量を極力少なくするべく、マルチプルアンプリコン増幅法、パーソナル型シーケンサーの特性に関してさらなる検討が必要と思われた。

E. 結論

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。

今後はProbandに対する全Exome解析を行う上で、さらに効率よく解析することを目標とし、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解析を実現することが可能である。

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) Wang L (24人略) Aburatani H.
Whole-exome sequencing of human pancreatic cancers and characterization of genomic instability caused by MLH1 haploinsufficiency and complete deficiency. *Genome Research*. 2011.
- 2) Nagae G (15人略) Aburatani H.
Tissue-specific demethylation in CpG-poor promoters during cellular differentiation. *Hum Mol Genet*. 20(14): 2710-21. 2011.
- 3) Totoki Y (18人略) Aburatani H (1人略).
High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome. *Nat Genet*. 43(5): 464-9. 2011.
- 4) Matsuura K (6人略) Aburatani H (2人略).
Identification of a link between Wnt/ β -catenin signalling and the cell fusion pathway. *Nat Commun*. 2: 548. 2011.
- 5) Matsusaka K (8人略) Aburatani H (1人略).
Classification of epstein-barr virus-positive gastric cancers by definition of DNA methylation epigenotypes. *Cancer Res*. 71(23): 7187-97. 2011.
- 6) Watanabe A (12人略) Aburatani H.
Homozygously deleted gene DACH1 regulates tumor-initiating activity of glioma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(30): 12384-9. 2011.
- 7) Kanki Y (11人略) Aburatani H (2人略).
Epigenetically coordinated GATA2 binding is necessary for endothelium-specific endomucin expression. *EMBO J*. 30(13): 2582-95. 2011.
- 8) Sugita S (10人略) Aburatani H (9人略).
Increased systemic glucose tolerance with increased muscle glucose uptake in transgenic mice overexpressing RXR γ in skeletal muscle. *PLoS One*. 6(5): e20467. 2011.

- 9) Mizutani A (7人略) Aburatani H.
Cell type-specific target selection by combinatorial binding of Smad2/3 proteins and hepatocyte nuclear factor 4alpha in HepG2 cells. *J Biol Chem*. 286(34): 29848-60. 2011.
- 10) Nakabayashi K (7人略) Aburatani H (4人略).
Methylation screening of reciprocal genome-wide UPDs identifies novel human-specific imprinted genes. *Hum Mol Genet*. 20(16): 3188-97. 2011.
- 11) Sato K (7人略) Aburatani H (1人略).
Marked induction of c-Maf protein during Th17 cell differentiation and its implication in memory Th cell development. *J Biol Chem*. 286(17): 14963-71. 2011.

2. 学会発表

- 1) 多層的オミックス解析による診断と治療の標的分子の探索: その最新事情 ゲノム・エピゲノム解析. 臨床応用を目指した最前線セミナー-Part.12 東京 2011.4.27.
- 2) がんゲノム解析. 第16回東京肝臓シンポジウム 東京 2011.6.11.
- 3) Next generation genomic analysis of hepatocellular carcinoma. International Symposium on Application of NGS on Genomics and Epigenomics 台北 2011.6.27.
- 4) 第26回北摂循環器研究会 エピゲノム解析の現状と疾患解析. 大阪 2011.7.5.
- 5) Current Challenges & New Technologies. 5th ICGC Scientific Workshop (July 10-12, 2011, Kyoto).
- 6) 次世代シーケンサーを用いた癌ゲノム解析: 検体調製からデータ解析まで. 第6回肺癌分子病態研究会 東京 2011.9.3.
- 7) がんエピゲノム創薬. BioJapan2011 横浜 2011.10.6.
- 8) パーソナルゲノム解析がもたらすがん予防・治療戦略. 第61回日本体質医学会総会 東京 2011.10.8.
- 9) Genomic instability caused by MLH1 haploinsufficiency in pancreatic cancer. US-Japan Cancer Genomics and Epigenomics Workshop (October 24-26, 2011 - Kyoto).
- 10) Next generation genomic analysis of hepatocellular carcinoma. JSPS 164th committee 4th Kickoff Symposium (October

27, 2011, Tokyo)

- 11) がんゲノム診断. 第 56 回人類遺伝学会 シンポジウム 12 家族性腫瘍 2011.11.12. 幕張.
- 12) エピゲノム解析からせまる循環器研究. 第 11 回 Cardiovascular Frontier Conference 東京 2011.11.19.
- 13) Cancer genomics and epigenomics
International Scientific Coordination Network
(November 22-25, 2011 - Montpellier, Franc).
- 14) Personalized oncology. FOCUS symposium
(11.29.2011, Sendai)
- 15) 次世代ゲノム研究の最前線. 2011 次世代シーケンサーセミナー 東京 2011.11.30.
Cancer genome sequencing. MBSJ2011
- 16) Workshop: Next generation molecular medicine
(12,13,2011. Yokohama).
- 17) 次世代ゲノム研究の最前線. 医科学政策研究会 東京 2011.12.17.
- 18) 肝がんのパーソナルオンコロジーへ向けて.
第 5 回肝がん分子標的治療研究会 東京
2012. 1.14.
- 19) パーソナルオンコロジーの実現へ向けて. ゲノムテクノロジー第 164 委員会沖縄分科会那覇 2011.1.25.
- 20) エピゲノム解析の現状&心筋分化のエピゲノム・ダイナミクス. 第 5 回 iPS 細胞・再生医学研究会 京都 2011.2.3.
- 21) 肝がんのパーソナルオンコロジーへ向けて.
第 6 回新肝臓病研究会 甲府 2012.3.2.
- 22) Cancer Genomics to Drug discovery. Next Generation Sequencing Applications Asia
(March 28-29, 2012, Singapore).

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 塩島一郎 大阪大学大学院医学系研究科 寄附講座准教授

研究要旨

ヒト臨床サンプルを用いた遺伝子解析より検出された遺伝子変異のうち、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。

本研究は診断法及び創薬に関する標的同定を最終目標とし、その迅速な臨床実用化を企図している。これまでに行ってきた、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。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すると予想される。

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より、ゲノム解析を行い同定し得た遺伝子に就いて、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迅速な *in vivo* 解析を行う。

また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ことを目的として研究環境の整備を進める。

A. 研究目的

遺伝性が濃厚な希少難治性疾患の家系症例を対象に行った遺伝子解析から同定された、原因遺伝子と推定される新規 rare variant を対象に、診断および治療薬標的を見出し、臨床実用化するために迅速に *in vivo* の機能解析を行い生物学的意義を検証できる実験系を構築する。

B. 研究方法

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)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

ヒト臨床サンプルを用いた遺伝子解析より検出された遺伝子変異のうち、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、これまでに確立された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。

2)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

新規候補遺伝子として同定された分子のうち、

生理機能解析にて蛋白相互作用解析により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。その前段階の実験検討を行うための研究環境を整える。

遺伝子変異を持つと同定された、ないし治療抵抗性心不全として診断されている患者のなかから説明と同意を得られた症例よりリンパ球を採取し、iPS 細胞を樹立することにより、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。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

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) 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

難治性不整脈の家系の疾患原因遺伝子として同定した新規遺伝子(未公表データ)、および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-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。

2) 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

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に病態解析を行うことができた。

E. 結論

疾患原因遺伝子として同定した遺伝子解析より検出された遺伝子変異のうち、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。

難治性不整脈の家系の疾患原因遺伝子、および心筋細胞機能変化を示す重要な分子スクリーニングにより、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(未公表データ)、その迅速に *in vivo* の機能解析実験を行った。

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 プロブー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。

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) Yasuda N (8人略) Shiojima I (3人略) Komuro I.
Agonist-Independent Constitutive Activity of Angiotensin II Receptor Promotes Cardiac Remodeling in Mice. *Hypertension* 59:627-33, 2012.
- 2) Zou Y (14人略) Shiojima I (5人略) Komuro I(1人略).
Ryanodine receptor type 2 is required for the development of pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Hypertension* 58:1099-110, 2011.

2. 学会発表 なし

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、特筆すべき事項なし

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 朝野仁裕 大阪大学大学院医学系研究科 助教

研究要旨

従来行ってきた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をもとに、難治性循環器疾患の診断治療の創薬開発とその迅速なる臨床実用化を目指す。

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。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同定遺伝情報の臨床応用への時間短縮をはかる。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同定およびシーズ探索技術を利用し、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

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、生理的意義を知るための相互作用分子を同定し、実用化診断治療薬となる分子標的を見出すことを研究目標とする。

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

ヒトゲノム解析を行う上で、対象となる患者群の臨床スクリーニングを行う。その中から臨床病態を判定し基準を満たす症例に対して、説明と同意を得て、心血管系難治性疾患患者採血を行う。

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。

(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

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があり、当初の計画に組み込まれていたが、目まぐるしく進歩するゲノム解析領域においては、次世代シーケンス解析のコストは急速に低減したため、より精密な解析を安価かつ効率よく行うことが可能となった。上記理由より proband に対して全エクソーム解析を行うことが可能となった。

以上、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。研究分担者東京大学油谷研究室により、膨大なデータ解析に対応できる情報解析環境構築のノウハウを得るとともに、本研究システムに導入する。

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)

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。

(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を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。従来の Chip 解析による既知遺伝子の変異決定には非効率性が予想された。よって Proband に対して全エクソーム解析を行い、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。

Proband 症例における全エクソーム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

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を同定した(未公表データ)。家系連鎖解析および全エクソーム解析を行い、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。

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)

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

新規に同定した原因遺伝子の生理活性の有無の検索を行うため、相互作用を持つ標的分子探索を目的として Nano-LC MS 解析を行った。新規遺伝子 AMF-GS2 については、既に有意な標的分子を得ることができ、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。

D. 考察

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。

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、今後の同様の研究を円滑に実施するためには、基礎と臨床が密接に連携して症例を蓄積することが必須と考えられる。

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、機種種の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。

それらのゲノム情報を取り扱う為の解析環境の整備も重要であり、診断、治療に役立つ rare variant の探索をどのような戦略で行うかを確立することが本解析における一つの目標であり工夫が必要であった。

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であると類推されるため、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

の間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したのち、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なった。

同定し得た新規原因遺伝子については、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ことが予定されている。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

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。

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。

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。

難治性不整脈の原因遺伝子の同定には、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。

また、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。

それら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) Nishikawa K (4人略) Asano Y (3人略) Minamino T.
Development of anti-HB-EGF immunoliposomes for the treatment of breast cancer. J Control Release. in press. 2011.
- 2) 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(4): 246-7. 2011.
- 3) 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(11): 714-20. 2011.

2. 学会発表

なし

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、特筆すべき事項なし

研究成果の刊行に関する一覧表

(代表者及び研究分担者の業績一覧)

課題名：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

書籍

著者名	論文タイトル名	書籍名	出版社名	出版国	出版年	ページ
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	北隆館	日本	2011	26(3) :16-17
森下竜一 小室一成	第5回 臨床最前線	Bio Clinica	メディカル レビュー社	日本	2011	2(1) :67-71
小室一成	座談会「心不全を新しい視点が考える」	Cardiovascular Frontier	メディカル レビュー社	日本	2011	2(3) :7-11
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	メディカル レビュー社	日本	2011	22(3) :243-251
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	日本医師会	日本	2011	140(4) :777-780
小室一成	特集 心筋症－研究と診療の現状と課題 総論	CARDIAC PRACTICE	メディカル レビュー社	日本	2011	22(3):199

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 PR ACTICE	メディカル レビュー社	日本	2011	22(3) :243-251
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	医学出版	日本	2011	1(2) :10-11

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	1035-41	2011
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
Aoki A (4人略) Sakata Y (11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
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
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	207-214	2011
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
Shimizu I (9人略) Komuro I (2人略)	p53-induced adipose tissue inflammation is critically involved in the development of insulin resistance in heart failure	Cell Metab	15	51-64	2011
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
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	124	(11 Suppl) :S10-7	2011

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		Sep 14	2011
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	41(8)	1029-36	2011
Imanishi Y (7人略) Sawa Y (5人略)	Allogenic skeletal myoblast transplantation in acute myocardial infarction model rats	Transplantation	91(4)	425-31	2011
Miyagawa S Sawa Y (3人略)	Tissue-engineered cardiac constructs for cardiac repair	Ann Thorac Surg	91(1)	320-9	2011
Wang L (24人略) Aburatani H	Whole-exome sequencing of human pancreatic cancers and characterization of genomic instability caused by MLH1 haploinsufficiency and complete deficiency	Genome Research			2011
Totoki Y (18人略) Aburatani H (1人略)	High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome	Nat Genet	43(5)	464-9	2011
Matsuura K (6人略) Aburatani H (2人略)	Identification of a link between Wnt/ β -catenin signalling and the cell fusion pathway	Nat Commun	2	548	2011
Matsusaka K (8人略) Aburatani H (1人略)	Classification of Epstein-Barr virus-positive gastric cancers by definition of DNA methylation epigenotypes	Cancer Res	71(23)	7187-97	2011
Watanabe A (12人略) Aburatani H	Homozygously deleted gene DACH1 regulates tumor-initiating activity of glioma cells	Proc Natl Acad Sci U S A	108 (30)	12384-9	2011
Kanki Y (11人略) Aburatani H (2人略)	Epigenetically coordinated GATA2 binding is necessary for endothelium-specific endomucin expression	EMBO J	30(13)	2582-95	2011

Sugita S (10人略) Aburatani H (9人略)	Increased systemic glucose tolerance with increased muscle glucose uptake in transgenic mice overexpressing RXR γ in skeletal muscle	PLoS One	6(5)	e20467	2011
Nakabayashi K (7人略) Aburatani H (4人略).	Methylation screening of reciprocal genome-wide UPDs identifies novel human-specific imprinted genes	Hum Mol Genet	20(16)	3188-97	2011
Yasuda N (8人略) Shiojima I (3人略) Komuro I.	Agonist-Independent Constitutive Activity of Angiotensin II Receptor Promotes Cardiac Remodeling in Mice	Hypertension	59	627-33	2012
Zou Y (14人略) Shiojima I (5人略) Komuro I (1人略).	Ryanodine receptor type 2 is required for the development of pressure overload-induced cardiac hypertrophy	Hypertension	58	1099-110	2011
Nishikawa K (4人略) Asano Y (3人略) Minamino T	Development of anti-HB-EGF immunoliposomes for the treatment of breast cancer	J Control Release		in press	2011
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(4)	246-7	2011
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 inotropes	Clin Cardiol	34(11)	714-20	2011

Increased Akt-mTOR Signaling in Lung Epithelium Is Associated with Respiratory Distress Syndrome in Mice[∇]

Hiroyuki Ikeda,^{1,2} Ichiro Shiojima,^{1,3} Toru Oka,^{1,3} Masashi Yoshida,¹ Koji Maemura,⁴ Kenneth Walsh,⁵ Takashi Igarashi,² and Issei Komuro^{1,3*}

Department of Cardiovascular Science and Medicine, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba, Japan¹; Department of Pediatrics, University of Tokyo Graduate School of Medicine, Tokyo, Japan²; Department of Cardiovascular Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Japan³; Department of Cardiovascular Medicine, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Japan⁴; and Molecular Cardiology, Whitaker Cardiovascular Institute, Boston University School of Medicine, Boston, Massachusetts⁵

Received 24 June 2010/Returned for modification 31 August 2010/Accepted 17 December 2010

Pregnancy in women with diabetes is associated with a higher risk of perinatal complications. In particular, infants of diabetic mothers frequently suffer from respiratory distress syndrome (RDS), which is a leading cause of death in preterm infants and is considered to be primarily due to hyperinsulinemia in infants in response to maternal hyperglycemia. To elucidate the mechanism of how insulin signaling induces RDS, bronchoalveolar epithelium-specific Akt1 transgenic (TG) mice were generated. Akt1 overexpression in fetal lung epithelium resulted in RDS in preterm infants born by Caesarean section at embryonic day 18.5 (E18.5). The expression levels of hypoxia-inducible factor 2 α (HIF-2 α) and its target vascular endothelial growth factor (VEGF) were downregulated in the lung of Akt1 TG mice. Inhibition of the Akt-mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling axis by rapamycin restored the expression of VEGF and improved the lung pathology of Akt1 TG pups. Rapamycin also attenuated the RDS phenotype in wild-type mice delivered preterm at E17.5. In cultured lung epithelial cells, insulin reduced VEGF expression and transcriptional activity of HIF-2 on VEGF promoter in an mTOR-dependent manner. Thus, aberrant activation of the Akt-mTOR pathway in lung epithelium plays a causal role in the pathogenesis of infant RDS, presumably through downregulation of HIF-2-dependent VEGF expression in the lung.

Pregnancy in women with diabetes is associated with a higher risk of perinatal complications. The estimated prevalence rate of gestational diabetes is approximately 4% and is considered to represent 90% of all cases of diabetes diagnosed during pregnancy (2). Moreover, pregnant women with type 2 diabetes are increasing in number in line with the rapid increase in the prevalence of type 2 diabetes in all age groups (9). Infants of diabetic mothers frequently suffer from macrosomia, neonatal hypoglycemia, cardiomegaly, respiratory difficulties, and other congenital anomalies (3, 5, 14, 21), which are considered to be primarily due to hyperinsulinemia in infants in response to maternal hyperglycemia. Respiratory distress syndrome (RDS) is one of the most clinically significant perinatal complications, with high morbidity and mortality (19, 22). RDS is caused by attenuated production of pulmonary surfactant, a mixture of phospholipids and surfactant-associated proteins that covers the alveolar surface and prevents alveolar collapse by reducing the surface tension of the air-water interface (12). Because pulmonary surfactant is specifically produced by type II lung epithelial cells, attenuated production of pulmonary surfactant is considered to be due to impaired differentiation and/or maturation of type II lung epithelial cells (31). Reduced expression of surfactant-associated proteins was observed in fetuses of streptozotocin-induced diabetic rats or in insulin-treated human fetal lung explants (8, 10, 11), suggesting that

hyperactivation of insulin signaling in the lung plays a causal role in the pathogenesis of RDS of infants having a diabetic mother.

Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) is activated by insulin and is responsible for most of the metabolic actions of insulin. PI3K also controls cell growth, differentiation, survival, and protein synthesis (28). The involvement of the PI3K pathway in RDS was suggested by a previous report showing that bronchoalveolar-specific deletion of *Pten* in mice led to upregulation of the PI3K pathway in the lung and resulted in RDS associated with marked hyperplasia of alveolar epithelial cells, increased numbers of bronchoalveolar stem cells (BASCs), and impaired production of surfactant proteins (SPs) (33). It was also shown that genetic ablation of hypoxia-inducible factor 2 α (HIF-2 α) causes RDS due to downregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the lung and that intratracheal VEGF administration stimulates maturation of type II lung epithelial cells (4). However, the downstream effectors of PI3K that cause RDS and the mechanistic link between the PI3K pathway and HIF-2-dependent VEGF expression in the lung have been elusive.

Using bronchoalveolar epithelium-specific Akt1 transgenic (TG) mice, we show here that aberrant activation of the Akt-mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway in lung epithelium plays a causal role in the pathogenesis of infant RDS. We also provide evidence suggesting that sustained Akt-mTOR activation induces RDS through downregulation of HIF-2-dependent VEGF expression in the lung.

MATERIALS AND METHODS

Animals and DOX administration. SP-C-rtTA TG mice expressing the reverse tetracycline transactivator (rtTA) protein under the control of the human surfactant protein-C promoter (pro-SP-C) on the FVB/N background were de-

* Corresponding author. Mailing address: Department of Cardiovascular Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita 565-0871, Japan. Phone: 81 6 6879 3631. Fax: 81 6 6879 3639. E-mail: komuro-ty@umin.ac.jp.

[∇] Published ahead of print on 28 December 2010.

scribed previously (23, 29) and were purchased from the Jackson Laboratory. These mice were crossed with Tet-myrAkt1 TG mice (25) harboring a myristoylated Akt1 (myrAkt1) transgene under the control of multimerized *tetO* sequences maintained on a mixed background of FVB/N, C57BL/6J, and 129Sv. For myrAkt1 expression, dams were treated with doxycycline (DOX) in drinking water from embryonic day 0.5 (E0.5) at a final concentration of 0.5 mg/ml (25, 29). Respiratory rate was measured by visual inspection of the movements of thorax and abdomen for 1 min. All animal procedures were performed with the approval of the Institutional Animal Care and Use Committee of Chiba University.

Histological analysis and immunohistochemistry. Lungs were formalin fixed without constant pressure inflation and embedded in paraffin for histological analyses. Serial sections of 4 μ m were stained with hematoxylin and eosin (HE) for morphological analysis, periodic acid-Schiff (PAS) for detection of glycogen-rich cells, and Masson's trichrome (MT) for detection of fibrosis. Aerated lung area and alveolar septal thickness were measured in toluidine blue-stained sections using ImageJ software (4). Aerated lung area was measured in 10 visual fields for each animal. Septal thickness was measured at 10 points in each visual field, and 10 visual fields for each animal were used for the measurement. The size and number of saccules were measured in PAS-stained sections using ImageJ software. The size of 10 saccules was measured in each visual field, and 10 visual fields for each animal were used for the analysis. Saccular number was counted in 10 visual fields for each animal. Immunohistochemistry was performed using an avidin-biotin-horseradish peroxidase detection system with Ni-diaminobenzidine (DAB) (ABC kit; Vector Laboratories) and Nuclear Fast Red as a counterstain. The antibodies used were hemagglutinin (HA), pro-SP-C, Clara cell 10-kDa protein (CC10), aquaporin-5 (AQP5), VEGF (Santa Cruz Biotechnology), and calcitonin gene-related peptide (CGRP; BioMol).

Fluorescence imaging. A BZ-9000 (Keyence) microscope was used for fluorescence imaging. Paraffin-embedded lung sections were incubated with isolectin B4-fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugate (Sigma) to detect endothelial cells and with wheat germ agglutinin-tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TRITC) conjugate (Sigma) to counterstain the cell membrane. Vascular cell counts with three replications were performed with BZ application software (Keyence), and the median value was used for each sample.

Western blot analysis. Total protein lysate was extracted from lung tissue, and SDS-PAGE was performed as described previously (26). The antibodies used were HA, total Akt1, total S6 kinase (S6K), SP-A, pro-SP-C, AQP5, CC10, VEGF, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; Santa Cruz Biotechnology), phospho-Akt (Ser473), phospho-S6K1 (Thr389), phospho-S6 (Ser235/236), total S6, phospho-glycogen synthase kinase 3 β (phospho-GSK3 β) (Ser9), phospho-FOXO3a (318/321), total FOXO3a (Cell Signaling Technology), SP-B, SP-D (Chemicon/Millipore), and HIF-2 α (Novus Biologicals). Densitometric analysis was performed using ImageJ.

Mouse model of preterm infants. Pups were collected by Caesarean section at E18.5 for Akt1 TG mice and at E17.5 for wild-type ICR mice (4, 20). The umbilical cord was cut, amniotic fluid and membranes were removed from the mouth and nose, and body temperature was kept at 37°C.

Administration of rapamycin. Rapamycin (LC Laboratories) was prepared in the solvent containing 0.2% sodium carboxymethylcellulose and 0.25% polysorbate-80 in water (24, 25). Rapamycin (1 mg/kg of body weight/day) or vehicle was administered subcutaneously to dams.

Reporter gene assays. Luciferase assays were performed essentially as previously described (18). The plasmids used were VEGF reporter plasmid (pGL2hVEGF) and the expression vectors for HIF-1 α (phHIF-1 α), HIF-2 α (phEP-1), and ARNT (phARNT). A549 cells were transfected with the plasmids indicated in the Fig. 8 legend and treated with 250 μ M CoCl₂ to mimic hypoxic condition.

Statistical analysis. Data are expressed as means \pm standard errors of the means (SEM). Statistical significance between two groups was determined with a Student's *t* test or χ^2 test. Probability values of <0.05 were considered to be statistically significant.

RESULTS

Generation of bronchoalveolar epithelium-specific Akt1 TG mice. Two lines of TG mice (Tet-myrAkt1 and SP-C-rfTA) were used to generate bronchoalveolar epithelium-specific Akt1 TG mice (Fig. 1A). The Tet-myrAkt1 TG line harbors an active form of the Akt1 transgene (myrAkt1) under the control of multimerized tetracycline operator (*tetO*) sequences (25), and the SP-C-rfTA TG line expresses the reverse tetracycline

transactivator (rtTA) in respiratory epithelial cells driven by human surfactant protein-C (SP-C) promoter (23, 29). DOX enables rtTA binding to *tetO* sequences by inducing its conformational change. Therefore, DOX treatment of double-TG (DTG) mice harboring both transgenes induces transcription of the myrAkt1 gene in lung epithelial cells (Fig. 1A). Mating of SP-C-rfTA mice with Tet-myrAkt1 mice resulted in the generation of mice with four different genotypes (wild type, Tet-myrAkt1 single TG, SP-C-rfTA single TG, and DTG) at the expected frequencies. Western blot analysis of lung lysates harvested at postnatal day 0 (P0) revealed that the transgene product detected by anti-HA blotting was observed in the lung of DTG mice treated with DOX (Fig. 1B). The induced expression of myrAkt1 was associated with a marked increase in phosphorylation levels of several downstream effectors such as S6K1, S6, and glycogen synthase kinase-3 (GSK3), but not FOXO3 (Fig. 1B). Because it was reported that treatment of SP-C-rfTA mice with DOX may exert toxic effects on alveolar epithelial cells (20), the phenotype of DOX-treated SP-C-rfTA single-TG mice was carefully compared with littermates of other genotypes (wild type, Tet-myrAkt1 single TG, and DTG). However, although there was an obvious lung phenotype in DTG mice (described in detail below), no apparent abnormality was observed in mice with other genotypes under our experimental conditions (Fig. 1C and D). We therefore used DOX-treated single-TG littermates as controls in this study.

Akt activation in lung epithelial cells *in utero* results in transient tachypnea associated with delayed maturation of the lung. Activation of Akt signaling in the lung was achieved by DOX treatment of dams starting at embryonic day 0.5 (E0.5). When analyzed at P0, DTG pups were viable and exhibited no cyanosis or growth retardation (Fig. 2A). Postnatal growth of DTG animals was also comparable to that of control mice. However, DTG mice at P0 exhibited significant tachypnea (Fig. 2B) and various histological abnormalities such as markedly reduced aerated space, increased atelectasis, bronchiolar hyperplasia, impaired thinning of the alveolar septa, and abundant PAS-positive glycogen stores (Fig. 2C to E). Since PAS-positive glycogen is normally converted to surfactant phospholipids in mature epithelial cells, these observations suggest that the differentiation of lung epithelial cells is impaired by aberrant activation of Akt signaling. Of note, these histological findings were improved spontaneously at P2 (Fig. 2C to E). Although mild elastic fiber deposition was observed at P2, no such pathology was evident at the age of 12 weeks (data not shown). Thus, Akt activation in lung epithelium induces transient respiratory difficulties associated with lung maturational defects, which improves spontaneously after birth.

Akt activation in lung epithelial cells *in utero* results in increased numbers of CC10/SP-C double-positive cells and defective maturation of lung epithelial cells. In order to further assess the extent of epithelial differentiation, we performed Western blot analysis of surfactant proteins (SP-A to SP-D) and immunohistochemistry of marker proteins: SP-C for type II alveolar epithelial cells, Clara cell 10-kDa protein (CC10) for Clara cells, aquaporin-5 (AQP5) for type I alveolar epithelial cells, and calcitonin gene-related peptide (CGRP) for neuroendocrine cells. Western blot analysis of surfactant proteins revealed downregulation of SP-B and upregulation of

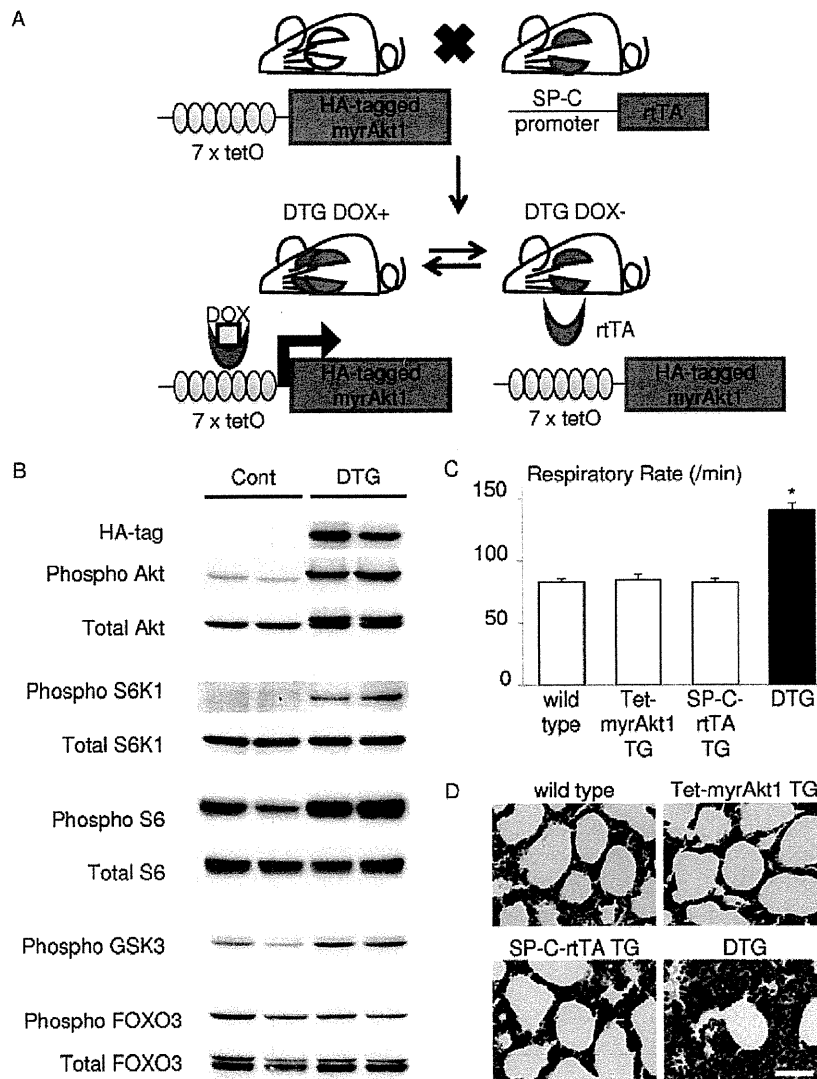


FIG. 1. Generation of bronchoalveolar epithelium-specific Akt1 TG mice. (A) Schematic illustration of binary TG system. (B) Western blot analysis of the whole-lung lysate from control and DTG mice at P0. (C) Respiratory rate at P0. DOX-treated SP-C-rtTA TG mice do not show respiratory distress. *, $P < 0.05$ versus DOX-treated wild-type, Tet-myAkt1 TG mice, and SP-C-rtTA TG mice ($n = 7, 5, 6,$ and 6 mice, respectively, from 3 dams). All animals were treated with DOX in the drinking water. (D) HE staining of the lung sections. Scale bar, $50 \mu\text{m}$.

SP-D, whereas the expression levels of SP-A and SP-C were not altered (Fig. 3A). Western blot analysis and immunohistochemistry also revealed increased expression of CC10 and reduced expression of AQP5 in the lung of DTG mice (Fig. 3A and B). CGRP expression was not altered between control and DTG mice (date not shown). Previous studies characterized CC10/SP-C double-positive cells as BASCs that reside at the bronchoalveolar duct junction and differentiate to both Clara cells and type II alveolar epithelial cells; the latter further differentiate to type I alveolar epithelial cells (15). Double immunostaining revealed that CC10/SP-C double-positive cells were increased in number in the lung of DTG mice (Fig. 3C and D). Collectively, these findings suggest that aberrant activation of Akt signaling in lung epithelial cells results in increased numbers of CC10/SP-C double-positive cells and impaired differentiation of alveolar epithelial cells.

Akt activation in lung epithelial cells *in utero* results in RDS in preterm infants. Since RDS is more frequent in preterm infants than in full-term infants, we examined preterm infants born by Caesarean section at E18.5. DTG mice born at E18.5 showed cyanosis (Fig. 4A) associated with an irregular respiratory pattern, and all DTG mice died by 2 h after birth (Fig. 4B). The airway spaces of DTG lungs were filled with amorphous, proteinaceous material that was not observed in control lungs (Fig. 4C). PAS staining revealed that the size and the density of saccules in DTG lung were smaller and higher than those of controls, respectively (Fig. 4D to F). Western blot analysis of surfactant proteins revealed downregulation of SP-B, whereas the expression levels of SP-A, -C, and -D were not altered (Fig. 4G). Immunohistochemistry also revealed expansion of CC10/SP-C double-positive cells in the lung of DTG mice (Fig. 4H to J). AQP5 expression was barely detect-

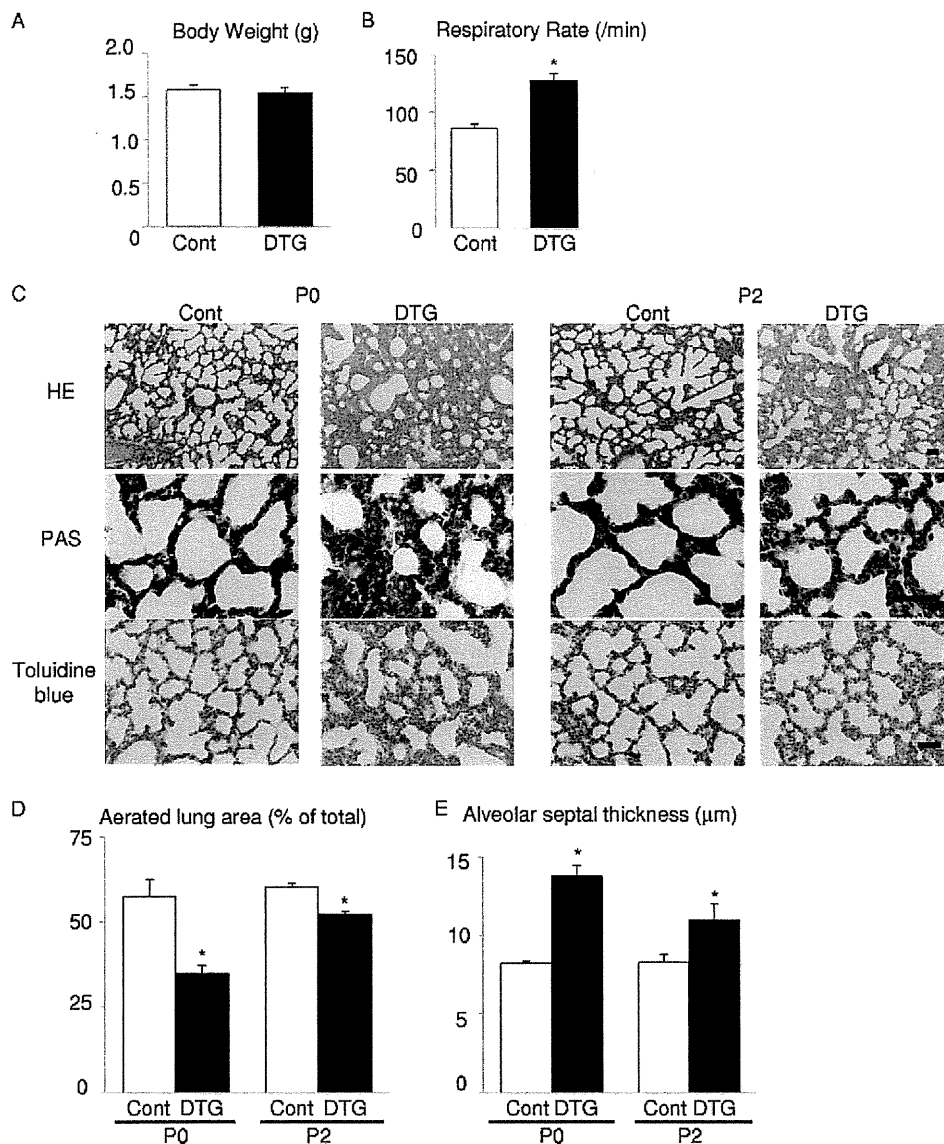


FIG. 2. Akt activation in lung epithelium induces tachypnea and delayed maturation of the lung. (A) Body weight at P0 of control (Cont; $n = 6$) and DTG ($n = 4$) mice from 2 dams. (B) Respiratory rate at P0 of control ($n = 14$) and DTG ($n = 8$) mice from 4 dams. (C) Histological analysis. HE, PAS, and toluidine blue staining of lung sections at P0 and P2. Scale bar, 50 μ m. (D) Aerated lung area in control and DTG mice at P0 and P2. *, $P < 0.05$ versus control. (E) Thickness of alveolar septum in control and DTG mice at P0 and P2. *, $P < 0.05$ versus control. For experiments shown in panels D and E, $n = 3$ from a single dam under all conditions.

able at this stage (data not shown). These results collectively suggest that Akt activation in lung epithelial cells *in utero* results in RDS and perinatal lethality in preterm infants.

Rapamycin improves respiratory distress and lung maturational defects induced by Akt1 overexpression in lung epithelium. To test whether the Akt-mTOR pathway mediates lung pathology in DTG mice, rapamycin was administered to dams for 3 days (at E17.5, E18.5, and E19.5). Downregulation of mTOR signaling by rapamycin was confirmed by reduced phosphorylation levels of S6K1 (Fig. 5A). Examination of infants at P0 demonstrated that tachypnea observed in vehicle-treated DTG mice was improved by rapamycin treatment (Fig. 5B). Hematoxylin and eosin (HE)

staining revealed that abnormal morphology of lung alveoli in DTG mice was reversed by rapamycin treatment (Fig. 5C, upper panel), and PAS staining demonstrated a reduced number of PAS-positive glycogen stores following rapamycin treatment (Fig. 5C, lower panel). By quantitative analysis of toluidine blue-stained sections, a decrease in aerated space and an increase in alveolar septal thickness observed in DTG mice were rescued by rapamycin treatment (Fig. 5D and E). Impaired differentiation of lung epithelial cells in DTG mice was also improved by rapamycin treatment, as evidenced by reduced expression of CC10, increased expression of AQP5, and a normal expression pattern of SP-C (Fig. 5F). These results suggest that mTOR is critically involved

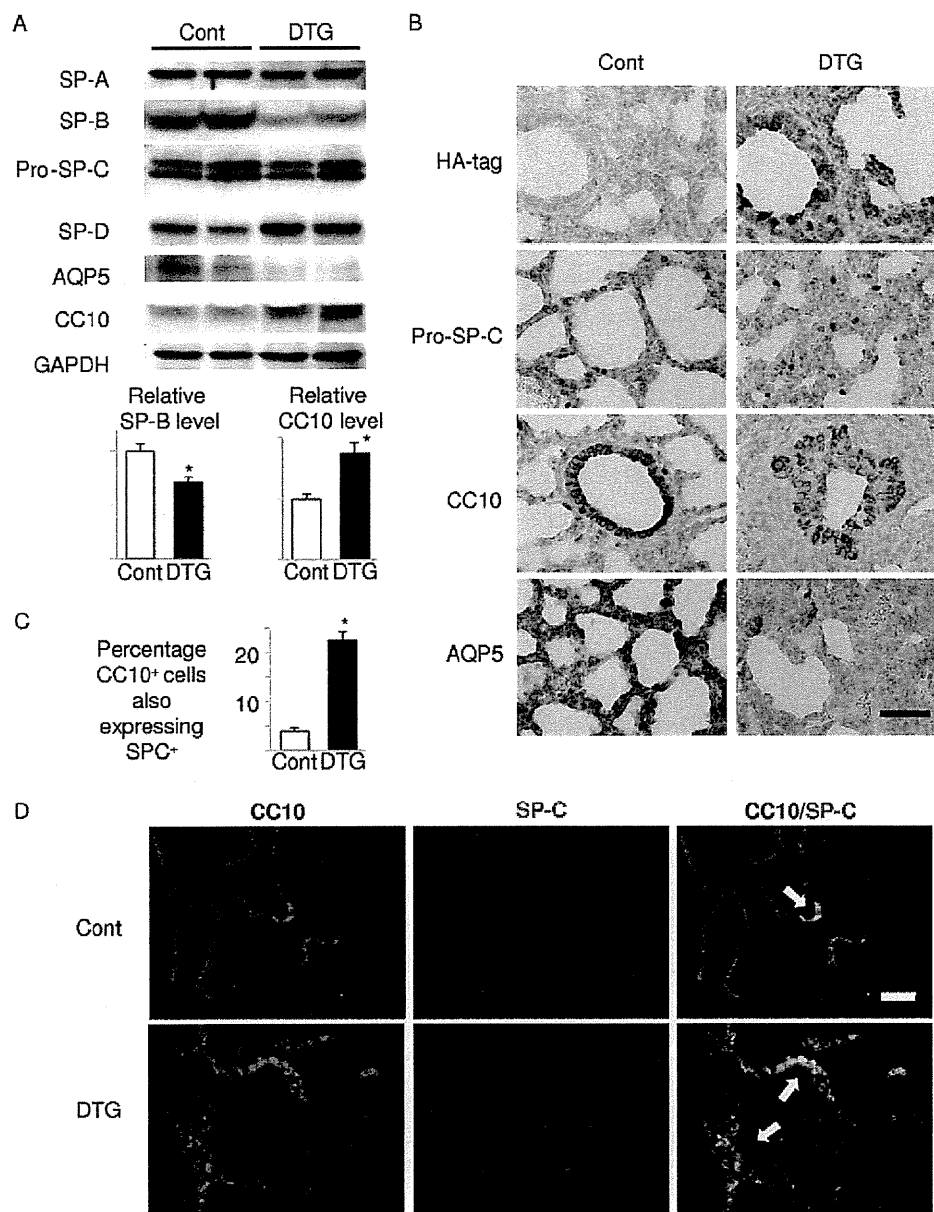


FIG. 3. Akt activation in lung epithelium results in defective maturation of lung epithelial cells and expansion of CC10/SP-C double-positive cells. (A) Western blot analysis of surfactant proteins (SP-A, SP-B, pro-SP-C, and SP-D), CC10 (a marker of Clara cells), and AQP5 (a marker of type I alveolar cells). Lower panels show densitometric analysis. *, $P < 0.05$ versus control ($n = 4$ mice from 2 dams for both controls and DTG). (B) Immunohistochemical analysis of HA tag (Akt1 transgene), SP-C, CC10, and AQP5. SP-C, CC10, and AQP5 were detected in cuboidal type II alveolar cells, Clara cells, and flat type I alveolar cells, respectively. Scale bar, 50 μm . (C and D). Double immunostaining of CC10 and SP-C. CC10/SP-C double-positive cells are indicated by arrows. Scale bar, 100 μm . *, $P < 0.05$ versus control ($n = 5$ control and $n = 3$ DTG mice from 3 dams).

in respiratory distress and lung maturational defects induced by Akt1 overexpression in lung epithelium.

Rapamycin improves respiratory distress induced by preterm delivery. The above-mentioned results suggest the possibility that mTOR activation mediates RDS in wild-type infants delivered preterm. To test this hypothesis, pregnant wild-type mice were treated with vehicle or rapamycin at E15.5 and E16.5, and pups were collected at E17.5 by Caesarean section. Inhibition of mTOR in the lung of rapamycin-treated pups was

confirmed by reduced phosphorylation levels of S6K1 (Fig. 6A). All pups delivered from vehicle-treated dams died within 1 h after birth, whereas more than 50% of pups delivered from rapamycin-treated dams survived in this time frame (Fig. 6B). Histological examination revealed that rapamycin treatment promoted lung maturation, as demonstrated by increased aerated lung area, decreased alveolar septal wall thickness, a normal expression pattern of SP-C, and increased expression of AQP5 (Fig. 6C to F). Thus, downregulation of mTOR signal-