

201238002A

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

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 24 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

2013（平成 25）年 3 月

目 次

I. 本研究事業について	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. 田原 康玄（京都大学医学研究科・准教授）	9
3. 川口 喬久（京都大学医学研究科・産官学連携研究員）	11
4. 寺尾知可史（京都大学医学研究科・特定助教）	13
5. 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）	15
6. 松原 謙一（株式会社 DNA チップ研究所・取締役名誉所長）	16
V. 解析プロトコル	
1. IgG4 関連疾患	19
2. 肺高血圧症	26
VI. 研究成果の刊行に関する一覧表	35
VII. 学会発表に関する一覧表	41
VIII. 研究成果の刊行物・別刷	45

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。

事業の二年目である本年度は、前年度より収集を開始した IgG4 関連疾患、混合性結合組織病を含む肺高血圧症、HTLV-1 関連脊髄症（HAM）の患者 DNA 検体を用いた網羅的ゲノム解析を実施した。得られた DNA 検体は、SNP アレイによるゲノムスキャンをおこない、前年度までに得られた健常者対照群の結果と比較して、疾患関連遺伝子の同定を試みた。IgG4 関連疾患、肺高血圧症、HAM において、各々疾患の発症と関連する遺伝子領域が同定された。また一部患者 DNA 検体については、Exome シークエンシングを実施し、疾患と関連する低頻度の遺伝的変異の同定を試みた。さらにオミックス解析については、IgG4 関連疾患のうち自己免疫性膵炎（AIP）、慢性血栓閉栓性肺高血圧症（CETPH）について治療介入前後の血液検体（DNA、RNA、血漿、血清）の時系列での収集を実施した。オミックス解析については、RNA 抽出と発現アレイによる遺伝子発現解析、患者血漿を用いた GC-MS 法による網羅的代謝物の測定を開始した。一方で、解析で得られた膨大な生体分析情報の管理、解析のための情報基盤の整備にもつとめ、こういった疾患研究の実施基盤として必要不可欠な統合オミックスデータベースを整備するとともに、臨床情報登録システムを構築し運用を開始した。さらには統計遺伝学的解析法の開発では、代謝物と FACS のデータに多次元データの減次元化・機械学習・多様体推定の手法を試験的に適用し、そのパフォーマンスを検討した。

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
	田原康玄	京都大学医学研究科 附属ゲノム医学センター	准教授
	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	DNA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：075-751-4157 Fax：075-751-4167 mkana@genome.med.kyoto-u.ac.jp	
経理事務 担当者	有井秀幸	606-8501 京都市左京区吉田近衛町 京都大学医学・病院構内共通事務部 経理・研究協力課 電話：075-753-4686 Fax：075-753-4347 igakukenko@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用化研究事業 (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ールを策定し、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

事業の二年目である本年度は、各疾患患者の解析を開始した。IgG4 関連疾患、混合性結合組織病を含む肺高血圧症、HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) を対象疾患としてそれぞれの疾患で既存の検体に加え新たに DNA 検体の収集を行った。またオミックス解析については、IgG4 関連疾患のうち自己免疫性膵炎 (AIP)、慢性血栓閉塞性肺高血圧症 (CETPH) について治療介入前後の血液検体 (DNA、RNA、血漿、血清) の時系列での収集を実施した。

得られた DNA 検体は、SNP アレイによるゲノムスキャンをおこない、前年度までに得られた健常者対照群の結果と比較して、疾患関連遺伝子の同定を試みた。また一部患者 DNA 検体については、Exome シークエンシングを実施し、疾患と関連する低頻度の遺伝的変異の同定を試みた。

オミックス解析については、RNA 抽出と発現アレイによる遺伝子発現解析に着手した。また患者血漿を用いた GC-MS 法による網羅的代謝物の測定を開始した。

解析で得られた膨大な生体分析情報の管理、解析のための情報基盤の整備にもつと

め、統合オミックスデータベースを構築した。また解析方法に関しても、GC-MS や FACS などで用いられている従来の解析法は、情報の大部分を捨てて典型的なもののみを拾い上げるような極めて無駄の多いものであるが、本研究では検出器で拾い上げた生データを数学的手法によって処理するという、全く新しい手法を導入した。

(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

当初計画に沿って、以下を実施した (詳細は、分担研究者の報告書を参照)。

疾患関連遺伝子の探索

- IgG4 関連疾患：千葉班と連携して、解析プロトコールに則って患者 572 例の DNA 検体を収集した。収集した DNA 検体のうち、まずは AIP に対象を限定して 240 検体のゲノムスキャンを実施した。既存の対照群 3,659 検体との関連解析を実施した結果、染色体 4 番、染色体 8 番に疾患と関連するゲノム多型が同定された。
- 肺高血圧症：国立病院機構岡山医療センター循環器科、混合性結合組織病の吉田班との連携により、解析プロトコールに則って患者 461 例から DNA 検体を収集し、356 検体にゲノムスキャンを実施し、対照群 3,659 検体との関連解析で関連領域を 3 ヶ所同定した。

- HTLV-1 関連疾患：京都大学ウイルス学研究所松岡雅雄教授、鹿児島大学高嶋班、正マリアンナ大学山野班との連携で、HAM 454 例、ATL 454 例、キャリア 502 例からの DNA 検体を収集した。(HAM vs ATL+キャリア) の関連解析から、2 番染色体に HAM と関連する SNP が観察された。また、ながはまコホート) を対照群とした関連解析では、3 番染色体と 20 番染色体に有意な SNP が見出された。

生体試料の分析・解析

- 質量分析法による代謝物の網羅的測定：血漿中の低分子代謝成分の 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一部改良を実施した。対照群となる長浜コホート健常者血漿 2,086 検体について、GC-MS のスキャンデータを取得し、計 119 成分の定量解析を行った。
- 遺伝子発現解析：オミックス解析の時系列発現解析のモデルケースとして、京都大学で収集されたインフルエンザワクチン接種 7 日後の健常者の RNA 検体を用いた発現解析を実施し、結果を同一個体のワクチン接種直前の RNA を用いた解析結果とクラスター解析により比較した。その結果免疫関連遺伝子群をはじめとする遺伝子において発現量の変化をとらえることができた。

統計遺伝学的解析

トランスクリプトームデータの解析ルーチンの環境整備を行った。また、メタボロームと FACS のデータについては、多次元データの減次元化・機械学習・多様体推定の手法を試験的に適用し、そのパフォーマンスを先行研究とともに検討した。またそれらの適用がスムーズにできるように共同研究者の計算機環境に試験環境を構築した。

バイオインフォマティクス

ゲノム、トランスクリプトーム、メタボローム、FACS の解析データに関して、データ型に応じた正規化、二変数関連解析パイプラインを構築した。臨床情報に関しては、複数の医療機関からの臨床情報を適切に収集するための Web インタフェースや、検体の二次匿名化を行うための情報基盤を構築した。

D. 考察

本年度は、疾患患者の生体試料の集積と、

それを用いた網羅的ゲノム解析を中心に研究を進めた。IgG4 関連疾患、肺高血圧症、HAM において、各々疾患の発症と関連する遺伝子領域が同定された。また、次世代塩基配列決定装置を用いた解析も開始し、HAM においては複数の患者に共有される疾患特異的な遺伝子変異の候補が見出されており、さらに検体数を増やして検証を実施している。また、こういった疾患研究の実施基盤として必要不可欠なデータベースの整備、臨床情報登録システムの構築や、統計遺伝学的解析法の開発も順調に進んだ。

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。本年度は、高い解析能力と豊富な情報基盤を生かして、疾患の患者検体を用いた網羅的ゲノム解析を推進し、疾患関連遺伝子領域を多く見出している。次年度はさらに検体数を増やした解析により、疾患と関連するゲノム変異や疾患の病態・予後と関連するバイオマーカーの同定を目指して研究を推進する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Terao, C., Ohmura, K., Ikari, K., Kochi, Y., Maruya, E., Katayama, M., Yurugi, K., 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. (2012) ACPA-negative RA consists of two genetically distinct subsets based on RF positivity in Japanese. *PLoS One* 7, e40067.
2. Myouzen, K., Kochi, Y., Okada, Y., Terao, C., Suzuki, A., Ikari, K., Tsunoda, T., Takahashi, A., Kubo, M., Taniguchi, A., Matsuda, F., Ohmura, K., Momohara, S., Mimori, T., Yamanaka, H., Kamatani, N., Yamada, R., Nakamura, Y. and Yamamoto K. (2012) functional variants in NFKBIE and RTKN2 involved in activation of the NF- κ B pathway are associated with rheumatoid arthritis in Japanese. *PLoS Genet.* 8, e1002949.

3. Jia, W. H., Zhang, B., Matsuo, K., Shin, A., Xiang, Y. B., Jee, S. H., Kim, D. H., Ren, Z., Cai, Q., Long, J., Shi, J., Wen, W., Yang, G., Delahanty, R. J.; Genetics and Epidemiology of Colorectal Cancer Consortium (GECCO); Colon Cancer Family Registry (CCFR), Ji, B. T., Pan, Z. Z., Matsuda, F., Gao, Y. T., Oh, J. H., Ahn, Y. O., Park, E. J., Li, H. L., Park, J. W., Jo, J., Jeong, J. Y., Hosono, S., Casey, G., Peters, U., Shu, X. O., Zeng, Y. X. and Zheng, W. (2012) Genome-wide association analyses in east Asians identify new susceptibility loci for colorectal cancer. *Nat Genet.* **45**, 191-196.
 4. Terao, C., Ohmura, K., Kawaguchi, Y., Nishimoto, T., Kawasaki, A., Takehara, K., Furukawa, H., Kochi, Y., Ota, Y., Ikari, K., Sato, S., Tohma, S., Yamada, R., Yamamoto, K., Kubo, M., Yamanaka, H., Kuwana, M., Tsuchiya, N., Matsuda, F. and Mimori, T. (2013) PLD4 as a novel susceptibility gene for systemic sclerosis in a Japanese population. *Arthritis & Rheumatism* **65**, 472-480.
 5. Yoshimura, K., Nakayama, T., Sekine, A., Matsuda, F., Kosugi, S., Sugino, Y., Yoshimura, K. and Ogawa, O.; Nagahama Cohort Research Group. (2013) Prevalence of postmicturition urinary incontinence in Japanese men: Comparison with other types of incontinence. *Int. J. Urol.* 2013 Jan 10. doi: 10.1111/iju.12074. [Epub ahead of print]
 6. Terao, C., Hashimoto, M., Yamamoto, K., Murakami, K., Ohmura, K., Nakashima, R., Yamakawa, N., Yoshifuji, H., Yukawa, N., Kawabata, D., Usui, T., Yoshitomi, H., Furu, M., Yamada, R., Matsuda, F., Ito, H., Fujii, T. and Mimori, T. (2013) Three groups in the 28 joints for rheumatoid arthritis synovitis - analysis using more than 17,000 assessments in the KURAMA database. *PLoS One.* **8**, e59341.
 7. Cui, J., Stahl, E. A., Saevarsdottir, S., Miceli, C., Diogo, D., Trynka, G., Raj, T., Mirkov, M. U., Canhao, H., Ikari, K., Terao, C., Okada, Y., Wedrén, S., Askling, J., Yamanaka, H., Momohara, S., Taniguchi, A., Ohmura, K., Matsuda, F., Mimori, T., Gupta, N., Kuchroo, M., Morgan, A. W., Isaacs, J. D., Wilson, A. G., Hyrich, K. L., Herenius, M., Doorenspleet, M. E., Tak, P. P., Crusius, J. B., van der Horst-Bruinsma, I. E., Wolbink, G. J., van Riel, P. L., van de Laar, M., Guchelaar, H. J., Shadick, N. A., Allaart, C. F., Huizinga, T. W., Toes, R. E., Kimberly, R. P., Bridges, S. L. Jr., Criswell, L. A., Moreland, L. W., Fonseca, J. E., de Vries, N., Stranger, B. E., De Jager, P. L., Raychaudhuri, S., Weinblatt, M. E., Gregersen, P. K., Mariette, X., Barton, A., Padyukov, L., Coenen, M. J., Karlson, E. W. and Plenge, R. M. (2013) Genome-wide association study and gene expression analysis identifies CD84 as a predictor of response to etanercept therapy in Rheumatoid Arthritis. *PLoS Genet.* **9**, e1003394.
2. 学会発表
1. 松田文彦 「分子を通して自分を知る未病社会の健康観～大規模コホート研究とゲノム、タンパク、代謝物～」未病社会の診断技術研究会第7回講演会 東京大学武田ホール（東京）2012年10月11日
 2. 松田文彦 「ヒト生命情報統合研究と先制医療～大規模コホート研究とゲノム、タンパク、代謝物～」第20回Liver Club'50s 神戸メリケンパークオリエンタルホテル（神戸）2012年10月12日
 3. 松田文彦 「ヒト生命情報統合研究と大規模コホート」医療情報学会関西支部・日本医療ネットワーク協会共同シンポジウム TKP 大阪梅田ビジネスセンター（大阪）2012年10月13日
 4. 松田文彦「Human Biology とゲノム情報」日本 DNA 多型学会第21回学術集会シンポジウム 京都教育文化センター（京都）2012年11月7日
 5. 松田文彦 「ヒト生命情報統合研究とそのモデルケースとしてのながはまゲノムコホート事業」第59回日本臨床検査医学会学術集会シンポジウム 国立京都国際会館（京都）2012年11月30日
 6. 松田文彦 「分子を通して自分を知る次世代の予防医療～大規模コホート研究とゲノム、タンパク、代謝物～」疾患メタボロミクスシンポジウム 大阪大学吹田キャンパス・银杏会館（吹田）2012年12月18日
 7. Fumihiko Matsuda The Nagahama Study as a model for the comprehensive human bioscience. Kyoto Symposium on Bioinformatics for Next Generation Sequencing with Application in Human

Genetics 京都大学芝蘭会館稲盛ホール（京都） 2013 年 1 月 19 日

8. 松田文彦 「ヒト生命情報統合研究に向けた大規模ゲノムコホート事業の推進～国内外の例を中心に～」日本学術会議公開シンポジウム「ヒト生命情報統合研究」日本学術会議ホール（東京） 2013 年 1 月 23 日
9. 松田文彦 「分子を通して自分の健康をながめる～ながはま 0 次コホート研究と次世代の予防医療～」いわて東北メディカル・メガバンク機構 発足記念シンポジウム岩手医科大学矢巾キャンパス（矢巾） 2013 年 2 月 2 日
10. 松田文彦 「ヒト生命情報統合研究とその情報基盤」大阪大学蛋白研究所セミナー「ビッグデータ時代に向けた医療データベース」大阪大学中之島センター（大阪） 2013 年 3 月 8 日

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

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用化研究事業 (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

疾患の診断基準・分類基準などを中心に、多軸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（ゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム・メタボローム・FACS オーム）と組み合わせて解析するためのデータ型の検討を引き続き行うとともに、マルチオミックス横断的解析を実施するためのデータハンドリングの技術的な課題・解析上の課題について実験系研究者と共同で検討を実施した。

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あたっての情報・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。今年度は特にトランスクリプトーム・メタボローム・FACS オームの3オミックスに関するサンプルデータについてその記述統計を実施した。

(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

トランスクリプトームデータの解析ルーチンを共同研究者の解析環境で実験出力とシームレスに適用できるように環境整備を行った。また、メタボロームと FACS オームのデータについては、多次元データの減次元化・機械学習・多様体推定の手法を試験的に適用し、そのパフォーマンスを先行研究とともに検討した。またそれらの適用がスムーズにできるように共同研究者の計算機環境に試験環境を構築した。

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、実験データの産出に引き続き、迅速にデータの確認・クオリティコントロールを実行できる計算機環境の整備をすることは、研究全体の遅滞なき進行に不可欠であることが再確認されるとともに、その面でのさらなる改善が必要かつ有用であると考えられた。

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. Myouzen, K., Kochi, Y., Okada, Y., Terao, C., Suzuki, A., Ikari, K., Tsunoda, T., Takahashi, A., Kubo, M., Taniguchi, A., Matsuda, F., Ohmura, K., Momohara, S., Mimori, T., Yamanaka, H., Kamatani, N., Yamada, R., Nakamura, Y. and Yamamoto, K. (2012) Functional variants in NFKBIE and RTKN2 involved in activation of the NF- κ B pathway are associated with rheumatoid arthritis in Japanese. *PLoS Genet.* **8**, e1002949.
2. Terao, C., Ohmura, K., Ikari, K., Kochi, Y., Maruya, E., Katayama, M., Yurugi, K., 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. (2012) ACPA-negative RA consists of two genetically distinct subsets based on RF positivity in Japanese. *PLoS One.* **7**, e400673.
3. Onuki, R., Yamada, R., Yamaguchi, R., Kanehisa, M. and Shibuya, T. (2012) Population model-based inter-diplo type similarity measure for accurate diplo type clustering. *J. Comput. Biol.* **19**, 55-67.
4. Terao, C., Ohmura, K., Kawaguchi, Y., Nishimoto, T., Kawasaki, A., Takehara, K., Furukawa, H., Kochi, Y., Ota, Y., Ikari, K., Sato, S., Tohma, S., Yamada, R., Yamamoto, K., Kubo, M., Yamanaka, H., Kuwana, M., Tsuchiya, N., Matsuda, F. and Mimori, T. (2013) PLD4 as a novel susceptibility gene for systemic sclerosis in a Japanese population. *Arthritis Rheum.* **65**, 472-480.
5. 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.

2. 学会発表

1. Fujii, Y., Narita, T., Yamada, R., et al. Isotonic regression-based method for high throughput genotoxicity screenings. Congress of the European Societies of Toxicology (Stockholm, Sweden) June 18, 2012.
2. Kajimoto, S., Yamada, R. An orthogonal matrix, which is useful to interpret the restriction of marginal counts of multi-way tables. XXXIth International Biometric Conference (Kobe, Japan), August 27, 2012.
3. Yamada, R. Statistical challenges in the analysis of rare genetic variants in association studies, discussing comment. XXXIth International Biometric Conference (Kobe, Japan), August 27, 2012.
4. Narahara, M., Yamada, R. DNA-based identifications in mass fatality incidents based on probabilities conditional on an entire dataset. XXXIth International Biometric Conference, (Kobe, Japan), August 28, 2012.
5. 藤井 庸祐、成田 岳雄、山田 亮ら 単調減少モデルによる遺伝毒性ハイスループットスクリーニングの解析 日本人類遺伝学会第57回大会 京王プラザホテル(東京)2012年10月25日

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用化研究事業 (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

“HTLV-1 関連疾患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・准教授 田原 康玄

研究要旨

HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の発症や予後に関連する遺伝因子を同定する目的で、ゲノム網羅的な一塩基多型 (SNP) 解析 (GWAS) を行った。HAM 患者と健常一般地域住民とを比較した GWAS から、3 番染色体と 20 番染色体に候補 SNP を見いだした。さらなる検体収集を進めて候補 SNP の再現性を検証するとともに、エクソーム解析により疾患発症や病勢と関連する頻度の低い遺伝的多型の探索を行う。

A. 研究目的

我が国におけるヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) の感染者数は 108 万人と推計され、感染者の 5 % 程度が成人 T 細胞白血病や HTLV-1 関連ぶどう膜炎、HTLV-1 関連脊髄症 (HTLV-1 Associated Myelopathy, HAM) を発症する。このうち HAM は 1986 年に日本から提唱された疾患であり、本邦における有病者数は 3,000 人程度と諸外国に比して高率である。HAM 患者は緩徐進行性の両下肢痙性不全麻痺から下肢筋力低下と痙性による歩行障害を来し、進行すると歩行不能、座位不能で寝たきりとなるが、その病勢は様ではなく、現在臨床で用いられている血液や髄液のマーカー、プロウイルス量 (感染細胞率) 等のみでは、病勢を十分に予測できない。また、HTLV-1 ウィルス感染者のうち数%しか HAM を発症しないことから、HAM の発症や予後には遺伝的な因子が関連することが強く示唆される。

そこで本研究では、HAM 患者を対象としたゲノム網羅的な遺伝子多型解析から、疾患の発症や病勢に関連する遺伝因子を同定することを目的とした。

B. 研究方法

【対象】対象は、主に九州地方で共同研究者らが収集した HAM 患者 513 例、成人 T 細胞白血病 (ATL) 患者 448 例、関連疾患非発症の HTLV-1 キャリア 532 例とした。また、対照群として、滋賀県長浜市民を対象としたゲノムコホート研究 (ながはま 0 次コホート) の情報を参照した。

【方法】HAM、ATL 患者およびキャリア

の GWAS には、イルミナ社の DNA アレイ (Human610-Quad) を用いた。プロウイルス量の測定はリアルタイム PCR 法で行った。SNP との関連解析には、PLINK ver 1.07 を用いた。プロウイルス量は、rank-based inverted normal transformation 法での正規化行ってから解析に供した。

(倫理面への配慮)

本研究は、京都大学医の倫理委員会により承認を受けて実施している。加えて個々の共同研究機関においても、独自に倫理委員会から承認を得ている。患者採血にあたっては、本研究の主旨を十分に説明した後、書面にて同意を確認している。個人情報には採血を行った研究機関で保存し、本研究では匿名化された検体のみを解析に用いた。

C. 研究結果

<HAM の GWAS>

対象者のうち、DNA アレイによる SNP 解析で①成功率が 95%未満であった 9 例 (HAM 5 例、ATL 19 例、キャリア 4 例)、②主成分分析でアジア人から外れた 2 例 (HAM 2 例、ATL 1 例)、③親子または兄弟 (一卵性双生児含む) と推定された 78 組のうち SNP 解析の成功率が低い方の 78 人 (HAM 52 例、ATL 23 例、キャリア 26 例) を除外した HAM 454 例、ATL 454 例、キャリア 502 例を解析対象とした。

ATL とキャリアを対照とした関連解析から (HAM vs ATL+キャリア)、2 番染色体に HAM と関連する SNP ($p=2.4 \times 10^{-7}$) が観察された。この SNP は、集団の構造化を補正した後でも有意な関連を示した

($p=2.4 \times 10^{-6}$)。一方、健常対照群（ながはまコホート）を対照とした関連解析では、3番染色体と20番染色体に有意なSNPが観察され、構造化補正後のp値は、それぞれ 1.1×10^{-9} 、 5.6×10^{-9} であった（図1）。

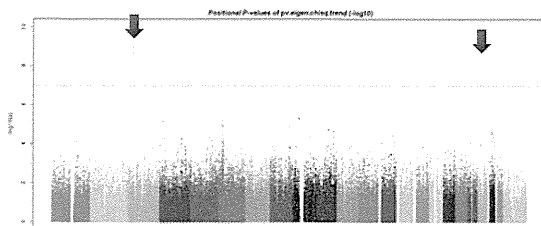


図1 HAM と健常対照群の関連解析結果

<プロウイルス量の GWAS>

HAM とキャリアとでプロウイルス量を比較した結果を図2に示した。HAM 患者では、プロウイルス量が有意に高値であった。

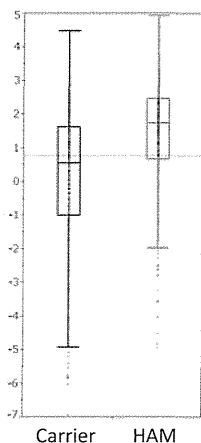


図2 プロウイルス量の比較

プロウイルス量に対するGWASでは、HAMのみの解析（図2上段）、HAMとキャリアとを合わせた解析（図2下段）のいずれにおいても、有意な関連を示すSNPは見当たらなかった。

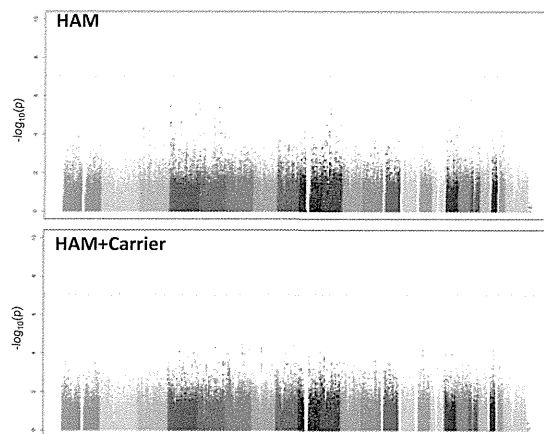


図3 プロウイルス量のGWAS

D. 考察

HAM に対する GWAS から、疾患に感受性を示す候補 SNP が複数個観察された。しかし、今回の解析では対象者数が少なく、観察された候補 SNP が偽陽性である可能性も否定できないことから、さらなる検体の収集を進め、再現性を検証する計画である。

DNA アレイでは、一般集団において一定のアレル頻度が観察される SNP（コモン SNP）が解析対象となっている。次世代シーケンサーの実用化により、エクソン網羅的なシーケンシング（エクソーム）から頻度の低い多型（レアバリエント）の解析も可能となった。次年度はレアバリエントの解析も行い、より多角的に感受性遺伝子の同定を進める計画である。

E. 結論

HAM 患者を対象とした GWAS から、疾患に感受性を示す候補 SNP が見いだされた。今後、候補 SNP の再現性を検証するとともに、エクソーム解析により疾患発症や病勢と関連する低頻度の遺伝子多型の探索を行う。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

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 (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

統合的にオミックス解析を実施するための情報基盤として、SNP チップによる遺伝子多型や次世代シーケンサーによる配列情報、発現アレイによるトランスクリプトーム、質量分析 (GCMS) によるメタボロームやフローサイトメトリー (FACS) などを格納するデータベースを構築した。また、多病院からの臨床情報や健康診断での健診情報を適切に収集するための Web インタフェースや、検体の二次匿名化を行うための情報基盤を構築した。本データベースを活用して、非アルコール性肝炎における肝線維化の進展と関連する遺伝子を同定するとともに、難病である IgG 4 関連疾患のゲノムワイド関連解析を実施した。また、各種オミックスを統合的に解析するための手法の検討やデータベースの拡張を行った。

A. 研究目的

網羅的オミックス解析を大規模に実施するための情報基盤の整備を目的とし、匿名化などの倫理規約の遵守・円滑な解析が可能なデータ格納方法や交換フォーマットの策定、統計手法の開発を行う。

B. 研究方法

実験手法に応じ、クオリティコントロールの最適化、解析手法の開発を行うとともに、同一オミックスデータの統合手法を検討する。以下、オミックス別に要点を示す。

ゲノム (SNP チップ、次世代シーケンサー) : 一塩基置換や転座等、多型の種類ごとに、それを弁別するための情報を定義し、それぞれリファレンス配列に対する変異として ID 化する。トランスクリプトーム (マイクロアレイ、次世代シーケンサー) : マイクロアレイでは、プローブ配列セットによりデータを一意化するが、対象トランスクリプトームによるデータ統合のための標準化手法についても検討する。次世代シーケンサーも同様である。プロテオーム、メタボローム (GCMS、LCMS) : ノイズ除去の後、内部標準に対する相対値で (半) 定量化する。この際、化合物同定の手法を確立するとともに、pubchem の化合物 ID をキーに定量化データを格納する。また、未知ピークを含むすべての実験データを用いた解析手法の開発も進める。具体的には、ピークアライメントによるデータ統合と主成分分析や Lasso 等による次元縮約、それらを用いた関連解析である。イミュノーム (FACS) : 血中の免疫関連細胞を FACS に

より定量化する。いわゆるゲート法によるマニュアルクラスタリングによって細胞種を同定する一方、ゲート化を行わずに、各抗体の蛍光量を軸とする多次元空間から統計的手法を用いたクラスタリングを行う。フェノーム (臨床情報など) : データの型づけ (文字列型、数値型、カテゴリ型など)、複合的な制約 (性別に応じた上下限値の設定など) により、精度の高い情報を収集する。また、一般利用者が容易にデータを登録できるインタフェースを開発する。

(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

ゲノムは、514 万の多型を登録し、SNP に関しては plink 形式で提供しており、容易に解析することができる。マイクロアレイによるトランスクリプトームは実験単位で正規化している。GCMS によるメタボローム解析では、ピーク検出方法を改善し、59 の化合物が新たに同定・定量化可能となった。また、未知ピークを含む解析手法として、ノイズ除去・ピークアライメントの方法を検討している。FACS は、マニュアルゲーティングによる定量、正規化の後、ゲノムワイド SNP 関連解析 (GWAS) を実施した。臨床情報は、現在、総計 895 の項目が登録されており、うち 3% が複数のプロジェクトで共有されている。また、データ型に応じた正規化、二変数

関連解析パイプラインを構築した。また、多病院からの臨床情報や健康診断での健診情報を適切に収集するための Web インタフェースや、検体の二次匿名化を行うための情報基盤を構築した。本データベースを活用して、非アルコール性肝炎における肝線維化の進展と関連する遺伝子を同定するとともに¹⁻⁴⁾、難病である IgG 4 関連疾患の解析を進めている。

D. 考察

取り扱うデータの種類とともに、データ数も積み増している。特に、臨床情報は、制約の導入により、入力時に論理矛盾を排除することができた。また、それにつながる解析パイプラインの構築により、解析の労力が大幅に低減できた。一方、ゲノムに関しては、SNP や CNV のような単純な多型以外についても格納する枠組みを確立する必要がある。また、その他のオミックスについては、実験単位のデータセットごとの標準化を進めることができたが、実験手法横断的な統合は不十分であり、データの標準化方法を含め、今後も検討を進める必要がある。Web インタフェースや匿名化に関しては、より利便性・安全性が高いものを提供できるよう、今後も改善をすすめる必要があると感じている。

E. 結論

データのデータベースの構造、その入出力パイプラインにおけるクオリティコントロールは適切であり、疾患解析に活用することができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tabara, Y., Takahashi, Y., Setoh, K., Muro, S., Kawaguchi, T., Terao, C., Kosugi, S., Sekine, A., Yamada R., Mishima, M., et al. (2013) Increased aortic wave reflection and smaller pulse pressure amplification in smokers and passive smokers confirmed by urinary cotinine levels: The Nagahama Study. *Int. J. Cardiol. in press*.
2. Wakai, K., Matsuo, K., Matsuda, F., Yamada, R., Takahashi, M., Kawaguchi, T., Yatabe, Y., Ito, H., Hosono, S., Tajima, K., et al. (2013) Genome-wide association study of the genetic

factors related to confectionery intake: potential roles of the ADIPOQ gene. *Obesity* (Silver Spring) *in press*.

3. Okada, Y., Terao, C., Ikari, K., Kochi, Y., Ohmura, K., Suzuki, A., Kawaguchi, T., Stahl, E.A., Kurreeman, F.A.S., Nishida, N., et al. (2012). Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Nat. Genet.* **44**, 511–516.
4. Kawaguchi, T., Sumida, Y., Umemura, A., Matsuo, K., Takahashi, M., Takamura, T., Yasui, K., Saibara, T., Hashimoto, E., Kawanaka, M., et al. (2012) Genetic polymorphisms of the human PNPLA3 gene are strongly associated with severity of non-alcoholic fatty liver disease in Japanese. *PLoS One* **7**, e38322.

2. 学会発表

1. 川口 喬久、松田 文彦、岡上 武、ゲノムワイド関連解析を用いた非アルコール性脂肪性肝疾患の関連遺伝子の探索 日本人類遺伝学会第 57 回大会 京王プラザホテル (東京) 2012 年 10 月 26 日

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用化研究事業(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

難病である混合性結合組織病の特に重篤な合併症である肺高血圧症、また、IgG4 関連疾患における DNA、転写物、代謝物を用いた統合的オミックス解析を用いた疾患の原因究明と新たな治療対象の同定を目指し、平成 24 年度は疾患群の検体収集に特に力を入れ、集まった検体について網羅的ゲノム解析を実施した。

A. 研究目的

肺高血圧症、また、IgG4 関連疾患における DNA、転写物、代謝物を用いた統合的オミックス解析を用い、原因究明と新たな治療対象の同定を行う。

B. 研究方法

肺高血圧症・IgG4 関連疾患患者の DNA、転写物、代謝物検体を集積し、健康人データと比較する他、詳細な臨床情報を基に、病態の解析を行う。

(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のみ、匿名化を二度実施し、ゲノム情報と個人情報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。また検体の採取は一回当たり 20cc 程度にとどめ、健康上の影響がないようにする。

C. 研究結果

2012 年より統合された IgG4 関連疾患研究班(千葉班)との協力体制の元、検体収集を強力に推進し、IgG4 関連疾患の DNA572 検体を集積した。また、IgG4 関連疾患の代表的疾患である自己免疫性膵炎に標的を絞り、ゲノムスキャンを施行、合計 240 検体の症例サンプルと 3,659 サンプルの健康人サンプルについて関連解析を施行した。その結果、染色体 4 番に 1 領域、8 番に 2 領域の合計 3 領域の関連が示唆された。また、自己免疫性膵炎を代表として、IgG4 関連疾患の病態を詳細に解析するため、未治療の自己免疫性膵炎患者を登録し、その投薬後の経過を時系列で追跡して解析する統合オミックス研究を開始し、検体収集を開始した。対照群のデータについては、転写物と代謝物のデータの測定

と分析を終え、比較可能な状態にしてデータベースに格納した。

肺高血圧症については、多くの症例の集まる国立病院機構岡山医療センターとの共同研究体制を確立したほか、「混合性結合組織病の病態解明・早期診断と治療法の確立に関する研究班」と共同し、合わせて患者 461 例から DNA 検体を収集し、356 検体のゲノムスキャンを施行した。混合性結合組織病について、有意水準に到達した領域の他、候補領域も含め、関連領域を 3 つ同定した。肺高血圧症の中で特に慢性血栓性肺高血圧症に標的を絞り、その病態の詳細な解析を目指した統合オミックス研究も開始し、52 検体を収集した。

D. 考察

2012 年度は症例検体の収集に特に力を入れ、解析も開始した。その結果、IgG4 関連疾患では世界で類を見ない規模の DNA 検体を集積することができた。また、慢性血栓性肺高血圧症の時系列データの揃った検体 52 例もまた、前例のない規模である。解析の初期段階において、IgG4 関連疾患では関連が期待される領域を複数同定した。2013 年度の詳細な解析によって、豊富な DNA 検体を用いて、疾患の真の関連領域の同定と、時系列データの揃った転写物・代謝物の検体から、疾患の本態が明らかになると期待される。

E. 結論

統合的オミックス解析の疾患群データの集積に努め、膨大な検体を収集するとともに、解析を実施した。2013 年度に疾患の分子的基盤を明らかにするとともに、治療標的の同定につながる知見が得られるよう、詳細な解析

を行う予定である。

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., Ohmura, K., Ikari, K., Kochi, Y., Maruya, E., Katayama, M., Yurugi, K., 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. (2012) ACPA-negative RA consists of two genetically distinct subsets based on RF positivity in Japanese. *PLoS One*. **7**, e40067.
2. Myouzen, K., Kochi, Y., Okada, Y., Terao, C., Suzuki, A., Ikari, K., Tsunoda, T., Takahashi, A., Kubo, M., Taniguchi, A., Matsuda, F., Ohmura, K., Momohara, S., Mimori, T., Yamanaka, H., Kamatani, N., Yamada, R., Nakamura, Y. and Yamamoto, K. (2012) Functional variants in NFKBIE and RTKN2 involved in activation of the NF- κ B pathway are associated with rheumatoid arthritis in Japanese. *PLoS Genet*. **8**, e1002949.
3. Terao, C., Ohmura, K., Kawaguchi, Y., Nishimoto, T., Kawasaki, A., Takehara, K., Furukawa, H., Kochi, Y., Ota, Y., Ikari, K., Sato, S., Tohma, S., Yamada, R., Yamamoto, K., Kubo, M., Yamanaka, H., Kuwana, M., Tsuchiya, N., Matsuda, F. and Mimori, T. (2013) PLD4 as a novel susceptibility gene for systemic sclerosis in a Japanese population. *Arthritis Rheum*. **65**, 472-480.
4. Terao, C., Hashimoto, M., Yamamoto, K., Murakami, K., Ohmura, K., Nakashima, R., Yamakawa, N., Yoshifuji, H., Yukawa, N., Kawabata, D., Usui, T., Yoshitomi, H., Furu, M., Yamada, R., Matsuda, F., Ito, H., Fujii, T. and Mimori, T. (2013) Three groups in the 28 joints for rheumatoid arthritis synovitis - analysis using more than 17,000 assessments in the KURAMA database. *PLoS One*. **8**, e59341.
5. Cui, J., Stahl, E.A., Saevarsdottir, S., Miceli, C., Diogo, D., Trynka, G., Raj, T., Mirkov, M.U., Canhao, H., Ikari, K., Terao, C., Okada, Y., Wedrén, S., Askling, J., Yamanaka, H., Momohara, S., Taniguchi, A., Ohmura, K., Matsuda, F., Mimori, T., Gupta, N., Kuchroo, M., Morgan, A.W., Isaacs, J.D., Wilson, A.G., Hyrich,

K.L., Herenius, M., Doorenspleet, M.E., Tak, P.P., Crusius, J.B., van der Horst-Bruinsma, I.E., Wolbink, G.J., van Riel, P.L., van de Laar, M., Guchelaar, H.J., Shadick, N.A., Allaart, C.F., Huizinga, T.W., Toes, R.E., Kimberly, R.P., Bridges, S.L. Jr, Criswell, L.A., Moreland, L.W., Fonseca, J.E., de Vries, N., Stranger, B.E., De Jager, P.L., Raychaudhuri, S., Weinblatt, M.E., Gregersen, P.K., Mariette, X., Barton, A., Padyukov, L., Coenen, M.J., Karlson, E.W. and Plenge R.M. (2013) Genome-wide association study and gene expression analysis identifies CD84 as a predictor of response to etanercept therapy in rheumatoid arthritis. *PLoS Genet*. **9**, e1003394.

2. 学会発表

1. Terao, C., Ohmura, K., Ikari, K., Kochi, Y., 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. ACPA-negative rheumatoid arthritis consists of two genetically distinct subsets based on RF positivity. EULAR Congress 2012 (Berlin, Germany) June 9, 2012.
2. Terao, C., Ohmura K., Nakayama T., Sekine, A., Kosugi, S., Yamada, R., Mimori T. and Matsuda, F. HLA region conferring levels of anti-nuclear antibody in a Japanese population. 日本人類遺伝学会第 57 回大会 京王プラザホテル (東京) 2012 年 10 月 25 日
3. Terao, C., Hashimoto, M., Yamamoto, K., Ohmura, K., Nakashima, R., Murakami K., Yamakawa, N., Yoshifuji, H., Yukawa, N., Kawabata, D., Usui, T., Yoshitomi, H., Furu, M., Yamada, R., Matsuda, F., Ito, H., Fujii, T., and Mimori, T. Three groups of joint synovitis in rheumatoid arthritis -analysis in KRAMA database-. 第 41 回日本免疫学会学術集会 神戸国際会議場 (神戸) 2012 年 12 月 6 日

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用化研究事業 (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。2年目に当たる本年は、対照群となる健常者検体として長浜コホート参加ボランティアの血漿 2,086 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である。

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・解析を継続して行う。血漿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、長浜コホート研究に参加しているボランティアの血漿を用いる。

(倫理面への配慮)

血液検体は、国の倫理指針他に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

血漿中の低分子代謝成分の 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一部改良を実施した。対照群となる長浜コホート健常者血漿 2,086 検体について、

GC-MS のスキャンデータを取得した。また、GC-MS 代謝成分データベースを拡充させ、新たに化合物 59 成分のピークの特特定が可能となった。これにより、計 119 成分の定量解析を行った。

D. 考察

取得データの更なる詳細解析については、平成 25 年度に行う予定。

E. 結論

難病患者の対照となる健常者血漿 2,086 検体の GC-MS 測定・解析を行った。また代謝成分データベースの拡充により、新たに 59 成分を特定し、計 119 成分の定量解析を行った。

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

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用化研究事業 (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。例えば、血中の代謝物の解析は、患者の病状把握に不可欠な情報を提供し、また末梢血中の白血球の遺伝子発現パターンは患者の患部に起きている病態を直接反映する。この際、いかに多くの良質の対照群検体を持つかが成功の鍵となる。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、遺伝子発現の時系列解析のモデルケースとして、京都大学で収集されたインフルエンザワクチン接種 7 日後の健常者の RNA 検体を用いた発現解析を実施した。具体的には、PAXgene 採血管を用いて 298 名の被検者から血液を採取し、そこから RNA を抽出した。次いでラベル化反応によりターゲット RNA を作製し、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を行った。また PAXgene 採血管からの RNA 抽出方法 2 種類 (マニュアルによる精製法、自動化機器による精製法) について検討実験を行った。

(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

インフルエンザワクチン接種 7 日後全 298 サンプルのうち必要量の RNA が取得できた 297 サンプルについて、バイオアナライザーを用いてクオリティ (分解度) をチェックしたところ、全サンプルについて RIN 値が基準値の 7.0 以上を示し、網羅的マイクロアレイ発現解析に適した高クオリティであることが確認できた。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 297 サンプルにおいて Agilent 社が推奨する 9pmol/μg 以上のラベル化効率が確認できた。続いて Agilent 社マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、データを取得した。全サンプルにおいてクオリティに問題ないデータが取得でき、正規化処理の後、全サンプルについて有効データを取得した。クラスター解析を行い、各サンプルに特徴を示す基礎データを取得した。また、前年度取得した、インフルエンザ接種前のサンプルデータとの比較解析を行い、免疫関連遺伝子群 (免疫グロブリン関連遺伝子他) の変化をとらえることができた。年齢との相関を解析した結果、これまで明らかになっている年齢マーカーについて再現性が得られた。

さらに RNA 抽出方法の検討を行った結果、多少の異なる点はあるものの、一定の相関のあるデータを取得することができた。

D. 考察

採取されたインフルエンザワクチン接種