

タの再整理は欠かせない。そこで平成 23-24 年度に同定した心筋症発症に関わる新規遺伝子 AMF-GS2、他 2 遺伝子に対し、症例と類似の病型を示す臨床群を対象に、類似遺伝子変異を検索するとともにその機能解析を行った。

新規同定心不全関連遺伝子を基礎的検討から導き出し、それを候補として既に蓄積している心筋症家系ゲノムを用いて、候補遺伝子解析を行ったところ、2 家系について新規変異を同定した。同家系について全 Exome 解析を行い、既知遺伝子に発症の原因を示唆する変異を認めないことも合わせて確認した。

#### D. 考察

H23年度に引き続き、病院臨床部門ハートセンター（循環器内科・心臓血管外科）を中心に、学内共通の倫理申請書類、配列解析プロトコルを用いたことにより、データ閏比較も可能な均質なデータを提供することができた。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。

循環器領域、殊に心筋症の全 Exome 解析を行うにあたって、症例の選択には慎重を期す必要がある。本研究においては臨床診断上、遺伝性関与の可能性が高いもの、二次性心筋症の除外をエントリーの条件としているため、多くの対象者を持ちながら、集約的な同意書の取得による効率的な解析を実施が可能となっている。

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。

臨床と基礎両面から本研究課題は取り組んでいるため、今後次世代シーケンスによる遺伝子解析を必要とする症例について臨床現場からのニーズと、

将来の臨床実施に際しての運用上の問題点についても経験値を高めた形で、問題点を克服していくことが可能である。

遺伝子同定については、家系症例の充実と連鎖解析も含めた領域絞り込みが可能となるように、大家系の症例収集に今後力を注ぐ必要がある。心筋症・不整脈疾患含めてそれぞれ臨床病態・表現型の明確化をはかるとともに、同定作業の成否を決める症例数の増加に今後も努める。

平成 23-24 年度に同定した心筋症発症に関わる新規遺伝子 3 遺伝子（論文未公表データ）に対し、1) 疾患責任遺伝子としての妥当性の検証、機能性変異同定による創薬標的探索の基礎データ取得、疫学的重要性の検証、などを明らかにするために、類似の病型を示す臨床群における類似遺伝子変異も検索することができた。現在もなおゲノムバンクへの蓄積が進み再解析の対象となる症例数が増えており、それぞれの遺伝子について複数例の家系情報を入力することが可能となる見込みである。

一方で、同定作業を確実にするには未だ家系症例の充実と連鎖解析も含めた領域絞り込み作業が重要であることも事実である。そのため、心筋症・不整脈疾患含めてそれぞれ臨床病態・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ることを再認識の上、臨床データプロファイルの蓄積に関しても次年度も引き続き積極的に充実させていくことが必要であると考えられた。

#### E. 結論

臨床部門からの Exome 解析検体を効率よくかつ精度高く収集するモデルシステムが機能し、多くの検体を収集する音があった。

初年度より内科症例とも積算して：心筋症計 74 例、不整脈性疾患 17 例を集め、また孤発例（明確な家族歴はないものの二次性心筋症は除外できた症例）としては：特発性心筋症 50 例となった。

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バンクの構築に寄与した。

## 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) Myoblast sheet can prevent the impairment of cardiac diastolic function and late remodeling after left ventricular restoration in ischemic cardiomyopathy. Saito S, Miyagawa S, Sakaguchi T, Imanishi Y, Iseoka H, Nishi H, Yoshikawa Y, Fukushima S, Saito A, Shimizu T, Okano T, Sawa Y. Transplantation. 2012 Jun 15;93(11):1108-15.
- 2) Moriyama M, Moriyama H, Ueda A, Nishibata Y, Okura H, Ichinose A, Matsuyama A, Hayakawa T. :Human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells exposed to oxidative stress induce neurite outgrowth in PC12 cells through p38 MAPK signaling. BMC Cell Biol. 2012 Aug 7;13(1):21.
- 3) Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Sugawara M., Kikuchi K., Higuchi M., Nagamoto Y., Watanabe H., Tashiro K., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. : Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1  $\alpha$  transduction. J. Hepatol., 2012 Sep;57(3):628-36.
- 4) Nagamoto Y., Tashiro K., Takayama K., Ohashi K., Kawabata K., Sakurai F., Tachibana M., Hayakawa T., Hayakawa H., Furue MK., Mizuguchi H.: Promotion of hepatic maturation of human pluripotent stem cells in 3D

co-culture using Type I collagen and Swiss 3T3 cell sheets. Biomaterials, 2012 Jun;33(18):4526-34.

- 5) Shudo Y, Miyagawa S, Nakatani S, Fukushima S, Sakaguchi T, Saito A, Asanuma T, Kawaguchi N, Matsuura N, Shimizu T, Okano T, Sawa Y. Myocardial layer-specific effect of myoblast cell-sheet implantation evaluated by tissue strain imaging. Circ J. 2013;77(4):1063-72.

### 2. 学会発表

- 1) Sawa Y. Regenerative Cell Sheet Technology to Repair the Heart. AHA アメリカ 2012.11.3-7
- 2) Sawa Y. It's a Whole New Ball Game: Human Clinical Stem Cell Issue Engineering. AHA アメリカ 2012.11.3-7
- 3) Kainuma S. Effects of Pedicle Omentum Flap Combined With Cell Sheet Implantation on Vessel Stability, Myocardial Perfusion, and Left Ventricular Reverse Remodeling in Rat Myocardial Infarction Model. AHA アメリカ 2012.11.3-7
- 4) 宮川 繁。重症心不全における細胞シートを用いたトランスレーショナルリサーチ。日本再生医療学会総会 横浜 2012.6
- 5) 宮川 繁。Transitional Research of Cell Sheet-based Myocardial Regeneration Therapy。日本循環器病学会 福岡 2012.3.16-18
- 6) 宮川 繁。重症心不全に対する自己細胞シート移植と左室補助人工心臓を用いた集学的心筋再生治療。日本人工臓器学会 福岡 2012.11.22-24
- 7) 宮川 繁。重症心不全における細胞シート移植治療の基礎研究及びその臨床応用。日本外科学会 千葉 2012.4.12-14
- 8) 宮川 繁。細胞シートを用いた新しい心不全治療の現状と展望。日本老年医学会学術集会 東京 2012.6.28-30

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

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 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、候補遺伝子の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、未だ原因遺伝子が未解明のまま殆どが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候補分子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

実臨床への普及実用化が可能な次世代ゲノム解析用情報解析システムのモデル化(既知/未知バリエーション情報を分別する情報解析パイプラインの構築)

複数のゲノム解析プラットフォームについての性能比較

エクソーム解析に先立って既知遺伝子上の変異の有無を判定し、解析症例を絞り込むことは試薬コストおよびデータ解析コスト削減の両面から有益である。任意の対象遺伝子領域を濃縮する様々な技術が考案されているが、その基本原理は PCR 法かハイブリッドキャプチャ法に二分される。PCR 法はシンプルで特異性が高く、マルチプレックス PCR 化により少ないサンプル DNA 量(数十 ng)からの解析が可能であるが、数 Mb 以上の領域をカバーするには不向きである。現行のターゲット遺伝子解析手法について比較検討を行う。

(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

### ゲノム解析の迅速な実施と実用的解析システムの構築

東京大学にて取得した健常細胞ゲノムの全 Exome 解析を実施した。Agilent 社 SureSelect Human All Exon v4 kit (50Mb)により捕捉したゲノム DNA を Illumina 社 HiSeq2000 を用いて 100 塩基ペアエンド解析し、平均カバレッジ 40 以上のデータが得られた。得られたデータの解析に必要なパイプラインの開発を行った。得られた fastq ファイル形式のデータをもとに BWA および Novoalign を用いてヒトレファレンス配列へのマッピングを行い、GATK による変異検出および ANNOVAR によるアノテーションまでを実行する解析パイプラインを確立した。

### 複数のゲノム解析プラットフォームについての性能比較

より広い領域をターゲットする目的にはエクソーム解析にも用いられるハイブリッドキャプチャ法が向いている。PCRプライマーの設計が難しい領域もカバー出来る可能性が高いが、必要DNA量も1 $\mu$ g前後と多く、一般に特異性は低下する。対象疾患に応じてターゲットのカバー率、均一性、スループットおよびコスト等を考慮し最適な解析プラットフォーム(前処理技術およびシーケンサー)を選択する必要がある。我々は Fluidigm 社 AccessArray、Agilent 社 HaloPlex、Illumina 社 TruSeq Custom Amplicon、Life Technologies 社 Ion AmpliSeq 等の複数の前処理手法と、Illumina 社 GAIIx/HiSeq/MiSeq、および Life Technologies 社 Ion Proton シーケンサーを活用し、これらの性能比較に着手した。

## D. 考察

次世代シーケンス解析用の日本人バリエーションデータベースが利用可能ではない現況において、発端者の Exome 解析と既存パイプラインによる同疾患感受性の既知バリエーションの検出、およびコモンバリエーションの除外は、効率良く未知疾患原因遺伝子を同定する上では非常に重要なステップとなる。

そこで初期よりin-houseのvariant database構築も見据えたexomeデータの蓄積を行ったことは本研究事業を進める上で大きな力となった。この結果検出された機能的変化を伴う変異遺伝子リストは長大であり、SNPデータベースを活用した多頻度SNPの除去、変異アレル頻度評価や家系解析による遺伝様式の妥当性の検証等、疾患に応じた適切なフィルタ設計が次年度以降の解析の鍵となる。

既存の市販ソフトウェアではなく、独自にバリエーション検出パイプライン開発構築したことにより、日本人にしかない特異的な遺伝子配列情報を導き出すことも可能となった。

マッピング、バリエーション検出、リードクオリティの検証などの配列解析パイプライン構築を完了したことにより、これからさらに独自性を高めたアノテーションパイプラインの開発を行う予定としており、それらが完成すれば、近い将来の日本人バリエーションデータベースの公開利用の時期も近いことから、遺伝子機能および家系情報も含めた精度の高い情報解析が可能となると考えられる。

一方、急速に進歩するゲノム解析技術を考慮の上で、最先端ハイエンドモデル、デスクトップモデルなどの機能、能力をフルに活用すべく、複数の解析プラットフォームについての性能比較を実施した。遺伝性疾患にはミトコンドリア遺伝子変異を原因とするものが少なくないが、核遺伝子とミトコンドリア遺伝子を同時に効率よく濃縮する方法についてもさらなる検討が必要である。機種バージョン、解析手法の変化に左右されることなく、ノウハウを維持、シーケンス解析の最適化に努める必要がある。

## E. 結論

最先端次世代シーケンサー解析機器の解析能力を活用して得られた配列情報から、マッピング、バリエーション検出、リードクオリティの検証などの情報解析および変異アノテーションを行う解析パイプラインの構築を完了した。

次世代シーケンス解析用の日本人バリエーションデータベースはまだ利用できない環境にあるが、既知未知バリエーション情報を分別するため、対象とする疾患

感受性の既知バリエーションの検出、およびコモンバリエーションの除外を行うことができた。さらに今後も健常人および症例検体の蓄積を継続し、in-houseのvariant databaseの構築を進めるとともに、独自性を高めたアノテーションパイプラインの開発を行うことで、ゲノム解析データ処理を効率化する予定である。

情報解析手法を更新し、シーケンス解析のコスト低減に努め、解析マテリアルの収集と情報解析のアップデートに特化した研究を進める方針については、次年度も継承する。

## 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) Mimura I, Nangaku M, Kanki Y, Tsutsumi S, Inoue T, Kohro T, Yamamoto S, Fujita T, Shimamura T, Suehiro JI, Taguchi A, Kobayashi M, Tanimura K, Inagaki T, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Aburatani H, Kodama T, Wada Y. Dynamic change of the chromatin conformation in response to hypoxia enhances the expression of GLUT3 (SLC2A3) by cooperative interaction of HIF1 and KDM3A. *Mol Cell Biol.* 32(15): 3018–32. 2012.
- 2) Tsuji S, Ihara S, Aburatani H. A simple knowledge-based mining method for exploring hidden key molecules in a human biomolecular network. *BMC Syst Biol.* 6(1): 124. 2012.
- 3) Matsubara D, Kanai Y, Ishikawa S, Ohara S, Yoshimoto T, Sakatani T, Oguni S, Tamura T, Kataoka H, Endo S, Murakami Y, Aburatani H, Fukayama M, Niki T. Identification of CCDC6-RET Fusion in the Human Lung Adenocarcinoma Cell Line, LC-2/ad. *J Thorac Oncol.* 7(12):1872–1876. 2012
- 4) Son BK, Akishita M, Iijima K, Ogawa S, Arai T, Ishii

H, Maemura K, Aburatani H, Eto M, Ouchi Y.  
Thrombomodulin, a novel molecule regulating  
inorganic phosphate-induced vascular smooth  
muscle cell calcification. J Mol Cell Cardiol. 2012  
Dec 26.. [Epub ahead of print]

## 2、学会発表

- 1) がんエピゲノム創薬 第49回日本臨床分子医学会  
学術集会 京都 4.14.2012
- 2) パーソナルオンコロジーへ向けてのゲノム情報解  
析 第327回CBI学会研究講演会 東京  
6/1/2012
- 3) ゲノム医療の最前線 第102回発明教室 未来医  
療セミナー 金沢 8/29/2012
- 4) Genomic Medicine towards personal oncology.  
JDDW2012 神戸 10/11/2012
- 5) 次世代シーケンサーによるがん診断 日本人類遺  
伝学会第57回大会 新宿 10/25/2012
- 6) Chromatin dynamics during cardiomyocyte  
differentiation. International Symposium on genetic  
and epigenetic control of cell fate. Kyoto 11.6.2012

## 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 朝野仁裕 大阪大学大学院医学系研究科 助教

## 研究要旨

平成 23 年度より継続して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。特に平成 24 年度は同定した遺伝子の機能解析を強力に推進し、生理活性のある相互作用分子の同定や、生物学的意義を検証するための迅速な生体イメージングモデル動物および生体機能検査を実施し、創薬に資するデータの蓄積に努める。

## 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。

遺伝性を示す大家系はもとより発症者の少ない家系でも効率良く原因となる変異を正確に同定できるシステムを構築する。豊富データ量を有する *in house* database での非特異的変異の除外し、家系情報や特異性を高める項目を付加した独自の情報解析システムを立ち上げ、原因遺伝子を同定し、その機能解析と、生理的意義を求めて後、リード化合物のスクリーニング対象となり得る相互作用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 拠点施設ゲノムバンク化事業に協力可能な検体収集システムの構築

未だ日本人バリエーションの Exome 解析用データが公開されていない中では、各診療科内では疾患症例ゲノムと考えられる症例であっても、他科診療科



のゲノムデータであれば、疾患コントロールとして代用して解析することも考える必要がある。そこで様々な循環器疾患ゲノム解析症例の蓄積のみならず、非循環器疾患症例、および家系内非発症症例を対象に、全 Exome 解析における in-house variant data のプロファイリングに適した症例の蓄積も目指す。その実現へ向けて大阪大学医学部附属病院他診療科と連携し、倫理委員会同意書統一書式や検体収集システムを構築する。

## ② 次世代ゲノム解析用情報解析システムの利用による新規遺伝子同定

平成 23 年度より継続して蓄積している希少循環器疾患検体ゲノムを用いてゲノム解析を実施する。症例ゲノムから超高速次世代シーケンサーを用いて配列解析を行う STEP と、次世代シーケンス情報解析を行う STEP にわける。情報解析にあたっては、解析用 Linux サーバーを立て、解析専用のパイプラインを構築する。

オープンソースを中心としつつ、本解析用に新たに開発するソフトも合わせて、独自のパイプラインとして連結する。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し膨大なデータ解析に対応できる情報解析システムを本研究に導入する。

## 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 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、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。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

行う。H23 年度に同定した新規遺伝子 AMF-GS2 ほか 2 遺伝子に対し、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に至るまでの生理機能解析、病態解析を行う。

### ② 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。

H23 年度に同定した心筋症発症に関わる新規遺伝子 AMF-GS2、他 2 遺伝子の生理活性の有無の探索を行うと同時に、Nano-LC MS 解析による標的分子探索も並行して行う。

AMF-GS2 については、既に有意な標的分子も得た企業共同研究についても今後の創薬開発を目的とした計画を進める。

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する。

(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と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 拠点施設ゲノムバンク化事業に協力可能な検体収集システムの構築

平成 23 年度の症例に加えて、平成 24 年も同様に症例蓄積を進めて、循環器疾患ゲノム解析症例の蓄積のみならず、非循環器疾患症例、および家系

内非発症症例を対象に、全 Exome 解析における in-house variant data 構築に適した症例の蓄積を行った。総数は 150 症例を超え、臨床データと連結可能な心筋症ゲノムデータベースの構築を始めた。大阪大学医学部附属病院他診療科と連携し、倫理委員会同意書統一書式や検体収集システムを構築した。

#### ② 次世代ゲノム解析用情報解析システムの利用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 variant data の蓄積にも協力できるよう倫理委員会の申請、審査も終え、ゲノム蓄積が全診療科を通じて行う事ができるようになった。さらに本研究のみならず、メンデル遺伝にも将来応用可能なように一般化された、Linux サーバーによるスクリプトを構築した。全科協力して解析協力体制を敷く準備を始めている。

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、本解析用に新たに開発するソフトも合わせて、独自のパイプラインとして構築した。対象となる 26 家系 94 症例について、順次全 Exome 配列解析を実施し、上記情報解析システムを用いた遺伝子解析を実施した。

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、心筋症遺伝子、心臓エネルギー代謝に関わる遺伝子等を同定、Genotyping などを行った。配列解読、配列解析（マッピング、バリエーション検出）を終えた家系は 26 家系 94 症例である。これら情報解析中の家系においても、Co-segregation を確認しながら、幾つかの家系症例について候補遺伝子の絞り込み作業を開始している。

### 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 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

難治性疾患の新規候補遺伝子として同定された遺伝子、すなわち H23 年度に同定した新規遺伝子

AMF-GS2、SSS1、心筋症新規原因遺伝子に対して、ヒト疾患のゲノム変異がないかについて、検索を開始した。

その間、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。

AMF-GS2: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として有用であることが解り、さらに大動物で検証するために虚血再灌流モデルを用いた解析も行い、同遺伝子の発現変化も確認した。

SSS1:細胞実験系によるパッチクランプ法、ゼブラフィッシュを用いた心臓不整脈表現型を解析し、ヒト臨床表現型との相同性を確認した。

ゼブラフィッシュ実験系については、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の構築に成功し、それを用いて心臓機能の生体精密機能解析を行えるようになったこと、そして様々な心筋症関連遺伝子について、心筋代謝変化なども含めた生体イメージンを行う事でリアルタイムな機能解析w実施することができるようになった(論文投稿中)。

## ② 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

AMF-GS2 に対する生理活性相互作用を有する分子の探索を行った。Nano-LC MS 解析による相互作用を持つ標的分子探索を実施した。特定の蛋白複合体群を同定し、得られた現象をもとに物質特許申請を行うとともに、構造解析と創薬標的としての可能性に関する検討に入った。

類縁遺伝子についても同様の検討を行った。

SSS1 について、既に有意な膜蛋白標的分子およびその類縁分子を得て生理活性を持つ化合物に関する検討を行った。企業共同研究について、今後の創薬開発を目的とした検討協議を開始している。本遺伝子蛋白をシーズとして開発された化合物を用いた機能解析を行う準備を進めている。

さらに別心筋症家系から同定した、心筋症原因遺伝子についても、生理活性と細胞機能を評価し、結

合蛋白をリードとしたリガンドを探索を開始すべく、阪大産学連携共同創薬開発研究について具体的な方法の選定をすませ、リード化合物ライブラリーからの探索スクリーニングの準備に入った。

## D. 考察

平成 24 年度より、大阪大学全26診療科と共同連携し、倫理委員会同意書統一書式や検体収集システムを構築できるように先導してきた。循環器内科内部のみならず、大阪大学医学部附属病院全診療科(26診療科)と共通の同意書統一書式や検体収集システムを構築できたことにより、今後のゲノム解析の精度が増すものと考えられる。その結果、H25年度より同書式を用いたゲノム差研究が可能な見込みとなった。今後の他研究機関におけるゲノム研究でも、同様のシステムが利用できる予定である。このようなシステムは今後の次世代ゲノム解析には必須のものであり、本研究に限らず広く応用の効くものであると考えている。

さらに解析環境の整備を行い、共同研究先ないし試料提供を受ける他施設共同研究機関へ、我々が開発した解析技術を積極的に共有することで、多施設共同研究を進めることができるようになった。これら症例の充実に対する試みは、本研究を独創的に進める上で必須のものとする。

それら症例をもとに実施した全 Exome 配列解析においては、我々が開発した情報解析技術を共同研究機関とも積極的に共有し、将来循環器ゲノム研究コンソーシアム全体に公開できるようにするために、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 Linux サーバーおよびパイプラインを構築し膨大なデータ解析に対応できる情報解析システムを本研究に導入することができた。探索の際には一家系内での解析を基本とし、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。

なお、この情報解析システムを用いることにより、

これまで同定できなかった疾患遺伝子を幾つか同定、ないし他家系の迅速な発見追加を行う事ができた。臨床部門との強い連携の中で蓄積した家系より、別家系のスクリーニングを迅速に行う事ができる。

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、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ことで、生物学的、病態学的意義を検討に留まらず、創薬標的分子の選択も広がり将来の臨床応用を考慮した研究へと発展させることが可能である。

## E. 結論

循環器内科内部のみならず、大阪大学医学部附属病院全診療科(26診療科)と共同連携し、倫理委員会同意書統一書式や検体収集システムを構築できたことにより、今後のゲノム解析の精度が増すものと考えられる。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た。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。

さらに臨床的観点からのみではなく、次世代シーケンス解析の精度上昇にも努めて、そ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。

いくつかの同定遺伝子は既に機能解析も終了し、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) Takahama H, Shigematsu H, Asai T, Matsuzaki T, Sanada S, Fu HY, Okuda K, Yamato M, Asanuma H, Asano Y, Asakura M, Oku N, Komuro I, Kitakaze M, Minamino T.  
Liposomal amiodarone augments anti-arrhythmic effects and reduces hemodynamic adverse effects in an ischemia/reperfusion rat model. *Cardiovasc Drugs Ther.* 27(2):125-32. 2013.
- 2) Takahashi A, Asakura M, Ito S, Min KD, Shindo K, Yan Y, Liao Y, Yamazaki, S, Sanada S, Asano Y, Ishibashi-Ueda H, Takashima S, Minamino T, Asanuma H, Mochizuki N, Kitakaze M.  
Dipeptidyl-Peptidase IV Inhibition Improves Pathophysiology of Heart Failure and Increases Survival Rate in Pressure-Overloaded Mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013 Mar 15.
- 3) Yoshida A, Asanuma H, Sasaki H, Sanada S, Yamazaki S, Asano Y, Shinozaki, Y, Mori H, Shimouchi A, Sano M, Asakura M, Minamino T, Takashima S, Sugimachi M, Mochizuki N, Kitakaze M.  
H(2) mediates cardioprotection via involvements of K(ATP) channels and permeability transition pores of mitochondria in dogs. *Cardiovasc Drugs Ther.* 26(3):217-26. 2012.
- 4) Nishikawa K, Asai T, Shigematsu H, Shimizu K, Kato H, Asano Y, Takashima S, Mekada E, Oku N, Minamino T.  
Development of anti-HB-EGF immunoliposomes for the treatment of breast cancer. *J Control Release.* 160(2):274-80. 2012.

(和文)

- 1) 朝野仁裕、小室一成  
特集-心不全 心不全の原因診断の進歩  
診断と治療 100(9):1558-1564. 2012. 診断と治療社
- 2) 朝野仁裕、小室一成

特集「エクソーム解析—成果と将来」  
「全エクソーム解析による難治性循環器疾患の  
原因遺伝子の同定」

医学のあゆみ 2013 年出版予定 医歯薬出版株  
式会社

#### 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、学会発表

##### 1) 朝野仁裕

「パネルディスカッション 再生医療に貢献する技  
術」心筋細胞の可塑性を判断する病理学的臨床  
指標の開発 第 11 回日本再生医療学会総会  
2012 年 6 月・横浜

##### 2) 肥後修一郎、朝野仁裕

Featured Research Session 2

Title : Quantitative ChIP-sequence Analysis  
Reveals the Differentially Altered Active  
Epigenomic States in Murine  
Pressure-overloaded Failing Hearts 第 29 回国  
際心臓研究学会(ISHR)日本部会総会 2012 年 10  
月・福岡

##### 3) S Higo、Y Asano.

Oral session : Novel Regulators of Cardiac  
Hypertrophy

Title : Comprehensive quantitative epigenome  
mapping reveals the differential induction of  
histone H3 lysine 4 trimethylation marks in  
pressure-overloaded murine hearts

米国心臓協会学術集会 American Heart  
Association Scientific Sessions 2012 2012 年 11  
月・Los Angeles、USA

##### 4) 木岡秀隆、朝野仁裕

Young Investigator's Award Finalists Lectures

Title : G0/G1 Switch Gene 2 Promotes  
Mitochondrial ATP Production and Protects  
Cardiomyocytes from the Energy Crisis under  
Hypoxia 第 77 回日本循環器学会学術集会  
2013 年 3 月・横浜

2、実用新案登録  
なし

#### 3、その他

以上、特筆すべき事項なし

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 山崎 悟 国立循環器病研究センター 室長

## 研究要旨

H23 年度より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、既知変異を効率よく除外することにより、新規変異を持つ確率の高い症例に集中して解析を行い、新規分子ないし変異に対す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。特に H24 年度は国立循環器病研究センターにおいて蓄積した遺伝性循環器疾患の全 Exome 解析を実施するとともに、大阪大学との連携で情報解析パイプラインの構築完成を目指した。次世代解析における既存のスク립トと独自開発のスク립トを組み合わせることにより、変異解析に適したパイプラインを構築し、遺伝性循環器疾患解析に適したソフトとして開発することが可能となった。

### 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

#### 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

国立循環器病研究センターに入院ないし外来でフォロー中の原因として遺伝性が示唆される難治性心血管系疾患症例を対象に、ヒトゲノム解析の説明と同意を得て遺伝性が濃厚な家系症例の採血(ゲノム DNA の保存)を実施する。大阪大学との共同で心筋症、不整脈(家族性突然死を含む)、血管疾患の症例収集を行った。また、非家系孤発症例のうち、二次性心筋症を除外したものからも症例を蓄積す

る。

## 2) 次世代ゲノム解析用情報解析システムの利用による新規遺伝子同定

全 Exome 解析に利用可能な日本の公的な variant database が公開されていないため、公開に先行して In-house の variant database を持つことを目的として、発症・非発症症例を合わせて、全 Exome 解析を行う。得られた fastq ファイル形式のデータは、大阪大学で実施した全 Exome 解析データと統合し、Linux サーバシステムを用いた variant 検出ができるパイプラインを構築した。既存のスク립トと独自開発のスク립トを組み合わせ、解析に適したパイプラインとして本解析に適したソフトを開発する。

(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

### 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

国立循環器病研究センターにおいて拡張型心筋症、肥大型心筋症症例を中心に、遺伝性が濃厚な家系症例への採血の説明と同意書を得て、約 30 症例への採血を行った。国立循環器病研究センター内のバイオバンクの稼働に伴い、同部署への検体保存システムを活用し検体保存を行った。

連結可能匿名化できる臨床データのプロファイリングも行い、発端者解析の実施後の家系症例拡大を行う際の準備を実施した。それらの症例選択については年度内計 3 回のゲノム解析実務者会議を実施し、倫理委員会準備、症例選択に関する検討を行った。全ゲノム解析が可能な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こととなった。

#### 2) 次世代ゲノム解析用情報解析システムの利用による新規遺伝子同定

疾患群ではあるものの発症・非発症症例を合わせて、全 Exome 解析を行った。総数は国立循環器病研

究センターにおける同意書に基づく解析数として18症例であった。本研究におけるデータ統合を最優先するため、配列解析プロトコール、情報解析プロトコールの完全な統一を行った。

結果として、fastq ファイル形式のデータが得られて後、大阪大学で実施した全 Exome 解析データと統合してのち、本研究グループ全体で開発された独自の Linux サーバシステムを用いたパイプラインを用いて解析を実施した。

variant 検出に際しては、既存のスクリプトと独自開発のスクリプトを組み合わせ、解析に適したパイプラインとして開発することにより、遺伝性循環器疾患解析に適した(細かな条件設定が行われた)ソフトとして開発ができた。

#### D. 考察

希少難治性循環器疾患の原因遺伝子同定に向けて、次世代シーケンス解析の研究の独自性を保ちつつ質の高い解析を低コストで実現すべく力点を置いて解析を行った。また、それらが将来の利用も可能となるよう意識した解析環境の整備も行った。

結果、研究代表者大阪大学との解析プロトコールの統一を徹底し、配列解析のみならず、情報解析データのやり取りができるように、その必要性も加味した倫理委員会申請も行い、大きなデータとしての統合解析研究を実現した。

必ずしも多数症例のビッグデータとされない限られた症例に対する個別解析、すなわち大型サーバではなく個々の研究室が有する personal server としての解析には、そのような解析手法は非常に有用であることも示唆された。今後もこれらの経験をもとにゲノム解析のみならず臨床病態評価システムの統一評価システムも確立し、臨床検査データと生体試料、血清組織バンクを連結させた統合的なゲノム解析ことができるように、臨床と基礎両面から本研究課題は取り組むこととなった。

#### E. 結論

国立循環器病研究センターにおける遺伝性が示唆される難治性心血管系疾患症例を対象に、ヒトゲノム解析の説明と同意を得て遺伝性が濃厚な家系症例の採血(ゲノム DNA の保存)を実施し、30 例の採血保存および 18 症例の全 Exome 解析を実施した。本研究におけるデータ統合を行うため、配列解析プロトコール、情報解析プロトコールの完全な統一を行った。本研究で利用価値の高い専用の In-house database の構築を行う事ができた。H25 年度のさらなる遺伝子同定と、In-house variant database および公的 database からの効率の良い variant の除外を行い、家系統り込みの作業を円滑に実施するシステムとなるよう、2 次解析パイプライン開発ととともに、アノテーションパイプラインの開発を開始した。

#### 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) Yoshida A, Asanuma H, Sasaki H, Sanada S, Yamazaki S, Asano Y, Shinozaki Y, Mori H, Shimouchi A, Sano M, Asakura M, Minamino T, Takashima S, Sugimachi M, Mochizuki N, Kitakaze M.  
H(2) mediates cardioprotection via involvements of K(ATP) channels and permeability transition pores of mitochondria in dogs. *Cardiovasc Drugs Ther.* 26(3):217-26. 2012.
- 2) Takahashi A, Asakura M, Ito S, Min K, Shindo K, Yan Y, Liao Y, Yamazaki S, Sanada S, Asano Y, Ishibashi-Ueda H, Takashima T, Minamino T, Asanuma H, Mochizuki N, Kitakaze M.  
Dipeptidyl-Peptidase IV Inhibition Improves Pathophysiology of Heart Failure and Increases



Survival Rate in Pressure-Overloaded Mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2013.

以上、特筆すべき事項なし

- 3) Yamazaki S, Kobayashi H, Takashima S, Liu W, Okuda H, Yan J, Fujii Y, Hitomi T, Harada KH, Habu T, Koizumi A. Ablation of Rnf213 retards progression of diabetes in the Akita mouse. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Feb 11.

## 2、学会発表

- 1) 小林 果、山崎 悟、(5人略).  
ゼブラフィッシュモデルによるもやもや病感受性遺伝子 *mysterin* の機能解析 第82回日本衛生学会学術総会 2012年3月
- 2) Daisuke Morito, (3人略) Satoru Yamazaki, (6人略).  
Structure and Function of AAA+/ubiquitin ligase Mysterin/RNF213. FASEB summer research conferences "Quality Life through Research. Saxtons River 2012年7月 USA
- 3) Yuri Kotani, (1人略), Satoru Yamazaki (4人略).  
Regulation of *mysterin*, a moyamoya disease-associated protein, by de-ubiquitinating enzyme. EMBO/EMBL Symposium "Quality Control-From Molecules to Organelles-", Heiderberg 2012年9月 Germany
- 4) Akira Funada (1人略) Satoru Yamazaki, (10人略).  
Impact of the Polymorphisms of Renin-Angiotensin System on Prognosis in Hypertrophic Cardiomyopathy in the Era of Cardiac Magnetic Resonance 第77回日本循環器学会学術総会 2013年3月

## 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

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 李 鍾國 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)

原因遺伝子発端者から採血検体を得て、組織からの疾患 iPS 細胞株を樹立し、これまで構築してきた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とともに、既存治療薬剤の薬効評価を行う。大阪大学医学部未来医療センターの協力を得て、前項分子標的リガンドの薬剤 assay 系にも用いる。その際、同定した標的分子に対するシーズ化合物の探索も同時に進め、化合物を得た際には疾患 iPS 細胞を用いて同定された遺伝子変異を持つヒト細胞を用いた、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検討も行えるよう、創薬研究の基盤整備を行う。

(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に必要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

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を用いて具体的に 8 例の細胞株を樹立ないし樹立を開始した。

また、iPS 由来心筋細胞を用いて、分子シグナル、電気生理特性、収縮特性等の分子機能・生理機能の解析実験基盤を整備し、病態発症機構の解明および創薬に向けた実験を開始している。

SSS1 および新規同定心筋症原因遺伝子を有する家系を対象に、iPS 細胞株樹立へ向けて症例の遺伝的バックグラウンドの検証に入っている。本遺伝子蛋白をシーズとして開発された化合物を用いた機能解析を行うため、化合物の入手および培養細胞実験における変化を培養細胞における検討を行う準備を開始するとともに、iPS 細胞でも行う事ができるよう実験準備を行っている。

## D. 考察

原因遺伝子発端者由来の疾患 iPS 細胞株の樹立は、それを用いた特異的実験系を実際のヒト症例の組織へ分化した培養細胞で組むことができる。そのため、従来の培養細胞を用いた生理実験、in vitro / in vivo 薬理実験、動物生体実験、ヒト臨床試験への橋渡しとして、効率良くかつ精度を高め同定した遺伝子の機能解析として有用である。

これまで構築してきた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とともに、既存治療薬剤の薬効評価を行う。大阪大学医学部未来医療センターの協力を得て、前項分子標的リガンドの薬剤 assay 系にも用いる準備を進めている。

同定した標的分子に対して、シーズ化合物の探索も同時に進め、または既に得た化合物を用いて、疾患 iPS 細胞による、新規薬剤開発検討および薬効評価に関する検討を進めており、次世代シーケンサーを用いた、ゲノム解析による創薬基盤研究整備を行う上でも、非常に重要な実施モデルとなると考えられる。

## E. 結論

平成 24 までに同定された疾患原因遺伝子に対して、平成 25 年度からの本格的検討開始を視野に、遺伝子機能及び生物学的意義を検証できる解析を実施し、将来探索化合物を用いた機能解析を行うための実験準備として、iPS 細胞株化への準備を開始した。

新規同定心筋症原因遺伝子を有する家系への次世代ゲノム解析の継続と、同定した標的分子に対して、シーズ化合物の探索も同時に進め、または既に得た化合物を用いて、疾患 iPS 細胞による、新規薬剤開発検討および薬効評価に関する検討は非常に重要な実施モデルとなると考えられる。

## 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) Naito AT, Sumida T, Nomura S, Liu ML, Higo T, Nakagawa A, Okada K, Sakai T, Hashimoto A, Hara Y, Shimizu I, Zhu W, Toko H, Katada A, Akazawa H, Oka T, Lee JK, Minamino T, Nagai T, Walsh K, Kikuchi A, Matsumoto M, Botto M, Shiojima I, Komuro I.  
Complement C1q activates canonical Wnt signaling and promotes aging-related phenotypes. *Cell*. 149(6):1298–313, 2012.
- 2) Takeuchi A, Shimba K, Mori M, Takayama Y, Moriguchi H, Kotani K, Lee JK, Noshiro M, Jimbo Y.  
Sympathetic neurons modulate the beat rate of pluripotent cell-derived cardiomyocytes in vitro. *Integr Biol (Camb)*. 4(12):1532–9. 2012.

### 2. 学会発表

- 1) 李鍾國  
機能的再生心筋の構築～神経栄養因子を用いた交感神経軸索誘導～ 第41回 日本脈管作動物質学会シンポジウム「再生医療研究の最先端」 2012年2月・秋田
- 2) 李鍾國  
機能的再生心筋の構築 - Axon guidance of sympathetic neurons by neurotrophic factors - 第10回 旭川脈管クラスター 2012年2月・旭川
- 3) 李鍾國  
洞結節・刺激伝導系組織の再生 ～バイオペースメーカ治療は可能か？ 第48回 日本小児循環器学会学術集会 シンポジウム“サイエンス”はここまで進んだ～生命科学の最前線～第二部 生命科学の最前線② ～細胞、組織、臓器を創る～ 2012年7月・旭川
- 4) 李鍾國  
再生心筋構築に関する 最近の話題 第27回 犬山不整脈カンファランス「再生心筋の興奮発生と伝導および不整脈研究への応用」 2012年8月・東京
- 5) FU X, LEE J, MIWA K, SHIMIZU T, USUI A, HIRABAYASHI M, UEDA Y  
Reinnervation of Sympathetic Neurons in Engrafted Cardiac Cell Sheets Using Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in vivo 第49回 日本臨床分子医学会学術集会 2012年4月・京都
- 6) 今岡栄喜、内藤篤彦、原優里菜、李鍾國、小室一成、WntシグナルによるiPS細胞分化制御機構の解明、第11回日本再生医療学会総会 2012年6月・横浜

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

### 1. 特許取得