

201331002A

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 25 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

2014 (平成 26) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業

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 25 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

2014（平成 26）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)	13
2. 田原 康玄 (京都大学医学研究科・准教授)	15
3. 川口 喬久 (京都大学医学研究科・産官学連携研究員)	17
4. 寺尾知可史 (京都大学医学研究科・特定助教)	19
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)	22
6. 松原 謙一 (株式会社 DNA チップ研究所・取締役名誉所長)	24
7. 松原 広己 (国立病院機構岡山医療センター・臨床研究部長)	26
V. 解析プロトコル	
1. IgG4 関連疾患	29
2. 肺高血圧症	36
VI. 研究成果の刊行に関する一覧表	45
VII. 学会発表に関する一覧表	49
VIII. 研究成果の刊行物・別刷	53

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おり、そういった多型をとりこぼさずに同定・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。

事業の三年目である本年度は、対象とする疾患の患者検体をさらに増やし、前年度までに行った 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拡張してさらなる症例群の網羅的ゲノム解析数を増やした。また、難治性血管炎である高安動脈炎の検体を収集し、網羅的ゲノム解析を行った。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、高安動脈炎において、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 検体についての Exome シークエンシングを拡張し、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）、肺高血圧症の中の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）の時系列での検体を前年度までに比べてさらに収集した。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行い、疾患特異的な遺伝子発現や代謝物の変化を同定した。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努め、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、日本人健常人のまれな多型のデータを一般公開した。

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ことが期待される。

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
	松原広己	国立病院機構岡山医療センター	臨床研究部長
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 igakukenkyo@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

H25年度はIgG4関連疾患、肺高血圧症、混合性結合組織病、ヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV-1)関連脊髄症、高安動脈炎において統合的解析を行った。IgG4関連疾患におけるHLA領域および非HLA領域に疾患感受性領域を同定した他、疾患に関わるまれな多型(rare variant)を同定した。ヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV-1)関連脊髄症における疾患感受性領域およびrare variantを同定した。また、高安動脈炎においてIL12が決定的な役割を果たしている可能性を同定した。さらに、疾患特異的な遺伝子発現変化、代謝物変化を同定し、これら難病の病態基盤を明らかにする膨大な知見を得た。

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、疾患関連遺伝子群を同定するとともに、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バイオマーカーを探索し、これらの情報を統合して新たな難病の治療戦略を提示する。

B. 研究方法

健常者対照群の網羅的ゲノム・オミックス情報の取得

疾患解析に用いる対照群検体として、京都大学医学研究科が滋賀県長浜市で行っている「ながはま0次コホート事業」の参加者のうち、300名から新たに収集したゲノムDNA、末梢血RNA、血漿、血清検体を対照群として解析に利用した。H25年度までに行った、ゲノムDNAについてのゲノム網羅的な一塩基多型(SNP)解析(HumanOmni5MExome、Illumina社製)、およびエクソーム解析、Agilent社のアレイ(SurePrint G3 Human GE)を用いたRNAの発現量解析、血漿中低分子代謝物のガスクロマトグラフィー質量分析法(GC-MS法)解析で得られたデータを本事業での関連解析に利用した他、遺伝子変異データベースを構築し(厚生労働省難治性疾患克服研究事業「難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業の成果を基にした原因遺伝子変異データベースの構築」班長：京都大学医学研究科 松田文彦)、デ

ータベースを一般公開することで広く研究者コミュニティに提供した(後述)。

IgG4関連疾患

「IgG4関連疾患に関する調査研究班」(班長：京都大学医学研究科 千葉勉)との連携により、H25年度までに収集した検体のさらなる増加に努めた。その結果、758例のDNA検体を収集した。内訳は、自己免疫性膵炎(AIP)431例、唾液腺炎/涙腺炎(ミクリッツ病)184例、腎炎40例、その他のIgG4関連疾患38例(重複含む)であった。残りの135例については、詳細な臨床情報を収集中である。

このうち26例については、網羅的オミックス解析のために経時的に検体を収集している(治療介入直前、介入30、180、360、720日後)。各採血時点での病理所見、検査値も収集するとともに、随時症例を増やす予定である。

ゲノム網羅的なSNPタイピングの症例数を増やし、Illumina社製のHumanOmni5MExome、HumanCore Exome、HumanOmni2.5MExomeを用いて行った。これまでに698例まで増加した。定法に則ったクオリティコントロールを通過した955,113個のSNPについて、一般地域住民のDNA検体(ながはま0次コホート研究)1,849例のタイピング情報を対照に関連解析を行った。

AIP97例、ミクリッツ病95検体についてエクソーム解析を実施し、標的遺伝子領域の97.8%を10×以上の被覆率でカバーする高品質のデータを得た。遺伝子上の非同

義置換を抽出する解析パイプラインを構築し、疾患と関連する遺伝的変異の解析を行った。

遺伝子発現解析は、Agilent 社の発現アレイ(SurePrint G3 Human GE)を用いて行った。

肺高血圧症 (PH)

国立病院機構岡山医療センター循環器科と連携し、H25年度までに収集した検体のさらなる増加に努めた。PH患者178例の検体を収集した。内訳は慢性血栓閉塞性肺高血圧症(CTEPH)116例、特発性肺動脈性肺高血圧症(IPAH)24例、遺伝性肺動脈性肺高血圧症(HPAH)7例、結合組織病(CTD)19例、門脈肺高血圧症(POPH)4例、先天性短絡性疾患(CHD)4例、慢性閉塞性肺疾患(COPD)1例、肺静脈閉塞症(PVOD)/肺毛細血管腫症(PCH)2例、慢性壊死性アスペルギルス症(CAN)/気管支喘息1例であった。性別、年齢、平均肺動脈圧、深部静脈血栓症(DVT)に関する情報を収集した。

網羅的オミックス解析のための経時的な検体の増加に努め、CTEPH43例にまで検体を収集した(肺動脈カテーテル治療直前、治療3、7、180日後の採血)。併せて6分間歩行距離、右房圧、肺動脈圧、肺動脈楔入圧、心拍出量、心係数、肺血管抵抗、酸素飽和度、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、脳性ナトリウム利尿ポリペプチド、投薬に関する情報も収集した。

ゲノム網羅的な SNP タイピングの症例数を増やし、現在までに、173例のCTEPH症例を対象に、ゲノム網羅的な SNP タイピングを終えた (HumanCoreExome、Illumina 社製)。定法に則ったクオリティコントロールを通過した170例、251,819 SNPについて関連解析を行った。

エクソーム解析は家族性肺高血圧症患者8例、CTEPH39例を対象に行い、ターゲット遺伝子領域の81.6%を10×以上の被覆率でカバーする高品質のデータを得た。

混合性結合組織病 (MCTD)

「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」(班長：藤田保健衛生大学 吉田俊治)と連携し、H25年度までに収集した検体のさらなる増加に努めた。研究班に所属する京都大学、慶應義塾大学、東京女子医科大学などの研

究施設から合計288検体を収集した。MCTDの診断に必要な臨床情報を完全に収集することは困難なため、抗U1-RNP抗体陽性例をMCTDとみなした。SNPアレイ(HumanCoreExome、Illumina社製)を用いてゲノム網羅的なSNPタイピングを行い、定法に則ったクオリティコントロールを通過した286例、24,525 SNPについて関連解析を行った。関連解析では、ながはまコホートの参加者657人分の網羅的SNPタイピングの結果を健常対照群として用いた。有意な関連を示したSNPの再現性を確認する目的で、独立した患者検体219例、ながはまコホートの健常対照群1,405例のDNAを用いて、TaqMan法で候補SNPをタイピングした。

HTLV-1 関連脊髄症 (HAM)

解析対象は、主に「次世代遺伝子解析技術を用いた希少難治性疾患の原因究明及び病態解明に関する研究班」(班長：鹿児島大学医学部 高嶋博)、「HAMの新規バイオマーカー同定による重症度別治療指針の作成と病因細胞標的治療法の開発」(班長：聖マリアンナ医科大学 山野嘉久)、京都大学ウイルス研究所と連携し、H25年度までに収集した検体のさらなる増加に努めた。検体はHAM患者796例、成人T細胞白血病(ATL)患者448例、関連疾患非発症のHTLV-1陽性キャリア766例まで増加した。Illumina社製のSNPアレイ(Human610-Quad、HumanCoreExome)を用いてゲノム網羅的なSNPタイピングを行い、定法に則ったクオリティコントロールを通過したHAM患者634例、ATL患者408例、HTLV-1キャリア581例、127,126 SNPについて関連解析を行った。

また、HAM発症後に急速に症状が進行した重症患者16例、典型的な病勢を示した9例を対象にエクソーム解析を行い、ターゲット遺伝子領域の78.6%を10×以上の被覆率でカバーする高品質のデータを得た。

高安動脈炎

京都大学、東京医科歯科大学、東京大学、東京女子医科大学、新潟大学などの研究機関、ならびに患者会「あけぼの会」と連携し、H25年度までに収集した検体のさらなる増加に努めた。その結果、患者検体167例を収集した。Illumina社製のSNPアレイ

イ(HumanCoreExome)を用いてゲノム網羅的な SNP タイピングを行い、定法に則ったクオリティコントロールを通過した 166 例、24,487 個の SNP について関連解析を行った。解析では、ながはまコホートの参加者 663 人分の網羅的タイピング情報を健常対照群として用いた。有意な関連を示した SNP の再現性の確認は、独立した患者検体 212 例と、ながはまコホートの 1,322 人分の DNA(健常対照群)として TaqMan 法で実施した。

血漿中の網羅的代謝物測定

GC-MS を用い、血漿中の代謝物の解析条件最適化を行った。血漿中からの代謝物抽出工程の効率化やトリメチルシリル誘導体化反応条件の最適化などを進め、測定系の精度・再現性等の向上を行った。また、GC-MS データ中の未同定ピークの解析作業を進め、最終的に 135 個の代謝物とピークを対応付けた。これらの代謝物由来のピークを抽出・定量する解析方法を構築し、健常者対照群および難病患者群の GC-MS 測定と代謝物定量解析を実施した。

(倫理面への配慮)

全ての研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に則って実施した。対象者には研究の主旨について十分に説明し、書面にて同意を得た。収集した検体は二重に匿名化するとともに、個人情報やゲノム情報、臨床情報が漏洩することが決していないように十分配慮した上で研究に使用した。共同研究者からは、匿名化された状態で検体提供を受けた。

C. 研究結果

IgG4 関連疾患

<ゲノムワイド関連解析>

構造化を補正した関連解析において、ゲノムワイド有意水準($p < 5.2 \times 10^{-8}$)を満たす SNP が、全例を対象とした解析で染色体 1 番と 6 番に同定された(図 1)

(論文投稿準備中)。

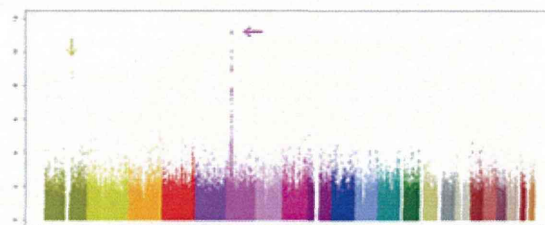


図 1 IgG4 の GWAS

これまでの IgG4 関連疾患に関する遺伝子解析研究では、HLA-DRB1 領域に有意な関連が報告されている。本研究でも染色体 6 番の HLA 領域に強い関連を認め、この関連は AIP、ミクリッツ病のいずれを対象とした病型別解析でも再現された。HLA 領域の関連が DRB1 領域以外にある可能性を検討するため、HLA-DRB1 上で最も関連が強い SNP で調整したゲノムワイド関連解析を行ったところ、HLA-A 領域に新たな関連座位を認めた($p = 6.2 \times 10^{-11}$)。さらに、HLA-DRB1、HLA-A の両方の SNP で調整すると、最も低い p 値を示すものは HLA Class I 領域の SNP($p = 1.0 \times 10^{-6}$)であり、さらなる関連領域の存在が示唆された。これらのことから、IgG4 関連疾患の疾患感受性において HLA-DRB1 領域のみならず HLA-A 領域も関連することが示された。

<エクソーム解析>

検出されたアミノ酸変化を伴う遺伝的変異について、176 例の対照群のエクソーム解析結果と比較したところ、ゲノムワイド有意水準は満たさないものの、HLA class II 領域に強い関連が認められた($p = 7.3 \times 10^{-7}$)。この領域は、AIP とより強く関連したものの($p = 2.7 \times 10^{-6}$)、ミクリッツ病とも関連を示しており($p = 9.1 \times 10^{-5}$)、両病態共通の疾患関連遺伝子座位であることが明らかになった。

次に、低頻度変異の集積による病態発症の可能性を探索するため、遺伝子単位で変異の蓄積を解析した。多重検定補正後も、HLA 領域は IgG4 関連疾患と有意な関連を示した($p = 8.0 \times 10^{-7}$)。一方、AIP に限った解析では、4p15.31 領域に有意な関連を認めた($p = 3.0 \times 10^{-7}$)。この結果は、AIP とミクリッツ病が IgG4 関連疾患として統合されているにもかかわらず、遺伝的な背景が異なる可能性だけでなく、過去のゲノムワイド関連解析では検出・解析が困難であっ

た低頻度変異が、これらの病態の違いに関与している可能性が示唆された。

今後は既に収集している AIP 334 検体を用いて、同定された候補遺伝子領域のターゲットシーケンスを行い、これらの関連について再現性を検証する予定である。また、現在収集している遺伝子発現等のオミックス情報を基に、今回関連が示唆されたアミノ酸置換を伴う変異が、遺伝子の機能に及ぼす影響について精査していく予定である。

<遺伝子発現解析>

6 例の AIP 初発例でステロイドによる治療介入前の末梢血 RNA を用いて、遺伝子発現情報を解析した。健常者群 300 例を対照に比較解析を行った結果、全 42,546 プローブ中、755 プローブにおいて有意な発現上昇(全身性エリテマトーデス関連遺伝子等)、1,255 プローブにおいて有意な発現抑制(Neuroactive ligand-receptor interaction 関連遺伝子等)が見られた($p < 1.2 \times 10^{-6}$)。今後は介入前の検体を最大数まで増やし、結果の再現性検証を行うとともに、介入前、介入後の遺伝子発現量測定を進めた後、時系列解析を行い、これら遺伝子の予後予測マーカーとしての有用性について検討する予定である。

<GC-MS による親水性低分子代謝物解析>

AIP 25 例のステロイド治療前の採血で得られた血漿検体、健常者対照群 302 例の血漿検体を対象に、135 種の血中代謝物濃度を測定した。2 群間で比較検定(Student's t 検定)を行った結果、複数の代謝物について統計学的に有意な差がみとめられた($p < 1.0 \times 10^{-4}$) (論文投稿準備中)。これらの代謝物は、診断のためのバイオマーカー候補であると同時に、治療ターゲット、疾患プロセスの解明など幅広い応用が期待できる。

さらに、治療介入開始前、および開始後 30 日の血漿検体(11 症例 22 検体)を用いて、代謝物濃度の変動評価解析を行った。その結果、ほぼ全ての症例において、開始後 30 日で尿酸濃度の減少が認められ、ステロイド投与の影響によるものと考えられた。今後、更に検体数、測定代謝物の種類を増やすとともに、再発などの予後情報とも照合することで、各代謝物の予後予測マーカーとしての可能性を探る予定である。

肺高血圧症(PH)

<ゲノムワイド関連解析>

PH 170 例、あるいは CTEPH 112 例をケース群としてゲノムワイド関連解析を行った。いずれにおいても、有意水準($p < 2.0 \times 10^{-7}$)を満たす SNP は検出されなかった。CTEPH を対象とした解析において、弱いながらも関連が認められる候補 SNP ($p < 1.0 \times 10^{-5}$)が染色体 6 番および 8 番に 1 つずつ同定されたため、今後は検体数を増やして解析を継続する予定である。

<エクソーム解析>

家族性肺高血圧症 8 検体のうちの 5 検体で、過去に疾患原因遺伝子として報告のある BRMP2、KCNK3 遺伝子に 2 カ所の新規変異を含む計 4 カ所の変異を同定した(論文投稿準備中)。既知の遺伝子内に変異が認められなかった家族性 3 検体については未知の遺伝子が関与している可能性が示唆されたため、患者の家族からの DNA 検体の収集を進めており、候補遺伝子の同定を目指している。一方、CTEPH の弧発例の 39 検体のうち 2 検体では、過去に疾患原因遺伝子として報告されている KCNK3、ENG 遺伝子内に 2 カ所の新規変異を同定し、当該患者が家族性の肺高血圧症である可能性が示唆された。その場合、当該家族においてこれら新規変異の有無が発症予測に重要なマーカーとなりうるため、家族への聞き取り調査と DNA 検体の収集を進めている。既知の遺伝子内に変異が同定されなかった 37 検体については、新規の疾患関連遺伝子を同定すべく検体数を増やし、引き続き解析を進めている。

<遺伝子発現解析>

治療介入直前の採血により得た 16 例の RNA 検体を用いて遺伝子発現情報を解析した。健常者対照群 300 例との比較解析を行ったところ、全 42,546 プローブ中、2,770 プローブにおいて有意な発現上昇(Oxidative phosphorylation 関連遺伝子等)、3,419 プローブにおいて有意な発現抑制(Olfactory transduction 関連遺伝子等)を観察した($p < 1.2 \times 10^{-6}$)。今後は全 44 検体の介入前、介入後の遺伝子発現量測定を進め、予後に関する臨床情報との関連解析から治療前の予後予測マーカーを探索する。また、介入後に得られた RNA 検体を用いた時系列解析から、同定された遺伝子の予後予測マーカーとしての有用性についても検討する予定である。

<GC-MSによる親水性低分子代謝物解析>

カテーテルによる治療介入直前の患者血漿 45 検体、健常者対照群(302 検体)を用いて、135 種の血中代謝物濃度を測定した。2 群比較検定(Student's t 検定)を行った結果、複数の代謝物で統計学的な有意差がみとめられた($p < 1.0 \times 10^{-4}$)。これらの代謝物は、診断のためのバイオマーカー候補であると同時に、治療ターゲット、疾患プロセスの解明など幅広い応用が期待できる。

さらに CTEPH 患者 39 症例を対象に、バルーン肺動脈形成術(BPA)による治療開始後 3 日、7 日、180 日の血漿検体を用いて治療介入による代謝物濃度の変動評価解析を行った。その結果、ある有機酸が開始後 3 日で有意な濃度減少を示した($p < 1.4 \times 10^{-2}$)が、BPA や心臓カテーテルによる侵襲の影響が考えられる。一方、開始前と開始後 180 日の比較においても有意に変動する代謝物が見とめられた。これらの代謝物については、再発の有無などの臨床情報と照合し、BPA による効果判定や予後予測マーカーとしての可能性を探る予定である。

混合性結合組織病 (MCTD)

HLA 領域($p = 6.0 \times 10^{-10}$)、および染色体 8 番の BLK 領域($p = 3.4 \times 10^{-7}$)が統計学的な有意水準に到達した(図 2)。

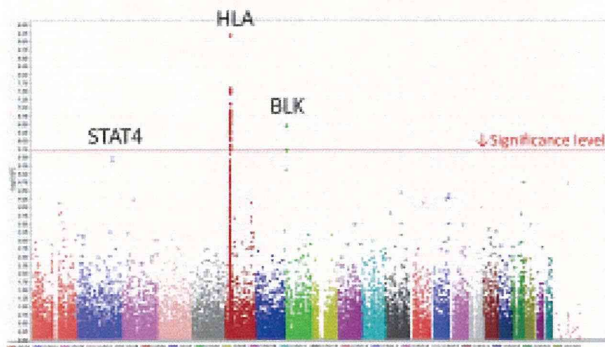


図 2 MCTD の GWAS

これら 2 領域に次いで強い関連を示した ZNF835 と STAT4 領域について検証パネルを用いて追認解析を行った。その結果、STAT4 領域と MCTD との関連が再現され($p < 3.0 \times 10^{-3}$)、全てのサンプルを合わせた解析において、当該 SNP のオッズ比は 1.81 ($p = 1.7 \times 10^{-8}$)であった。ZNF835 領域と MCTD との関連は再現されなかった。

HTLV-1 関連脊髄症 (HAM)

<ゲノムワイド関連解析>

HAM 患者と非 HAM 発症者(ATL 患者 + 健常キャリア)とを比較した関連解析から、HLA-DRA 領域と染色体 2 番の遺伝子 X に有意な関連を認めた(図 3)。これらの関連は、集団の構造化を補正後に消失したが、染色体 2 番のピークは検体を増やした解析において関連の強さが上がっており、擬陽性ではなく真の関連を持つ遺伝子であることが強く示唆された。現在、検体数を最大まで増やして再現性検証を急いでいる。

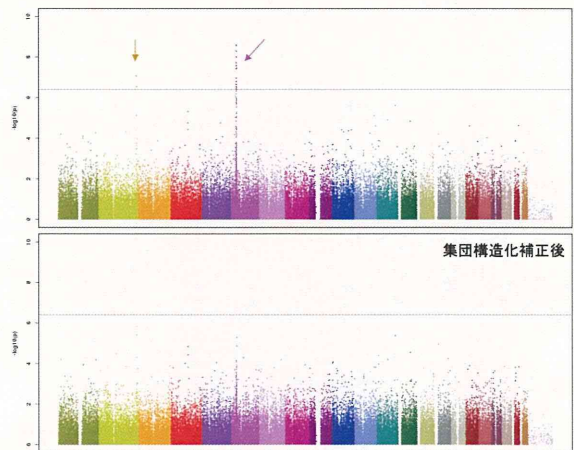


図 3 ATL 患者と健常キャリアを対照とした HAM の GWAS

<エクソーム解析>

急速進行重症例(16 例)と典型例(9 例)を対照としたエクソーム解析では、38,439 個の遺伝的変異が検出され、このうち公共データベース(dbSNP)と独自のデータベースに登録がない新規の 963 個について関連解析を行った。その結果、急速例進行例と典型例との関連解析では有意差を示す変異は検出できなかったが、地域住民 300 例を対照とした解析では、HAM 患者に特異的な遺伝的変異が染色体 1 番($p = 8.4 \times 10^{-11}$)、7 番($p = 3.8 \times 10^{-10}$)、17 番($p = 4.2 \times 10^{-10}$)に認められた。

高安動脈炎

関連解析の結果、従来から関連が報告されていた HLA 領域に加えて、染色体 5 番の IL12B 領域(rs6871626)に強い関連を認めた($p = 1.8 \times 10^{-7}$)。両者の関連は検証パネルでも再現され、全検体を合わせた解析から当該 SNP のオッズ比は 1.75 ($p = 1.8 \times 10^{-13}$)であった。加えて染色体 17 番の MLX 領域

(rs665268)でも有意な関連を認め(GWAS: $p=1.7 \times 10^{-5}$ 、検証パネル: $p=3.2 \times 10^{-3}$)、オッズ比は 1.50 ($p=5.2 \times 10^{-7}$)であった。一方、HLA 領域で最も強い関連を示した SNP (rs9263739) (オッズ比 2.44、 $p=2.8 \times 10^{-21}$) は HLA-B*52:01 と連鎖する SNP であり、既報と同様の結果であった。

本研究であらたに同定した IL12B 領域の SNP rs6871626 について、高安動脈炎の合併症との関連を検討した。その結果、当該 SNP は大動脈弁閉鎖不全の合併頻度(図 4A)、重症度(図 4B)と有意に関連し、炎症性マーカーである CRP の時間平均値の上昇とも関連した(図 4C)。

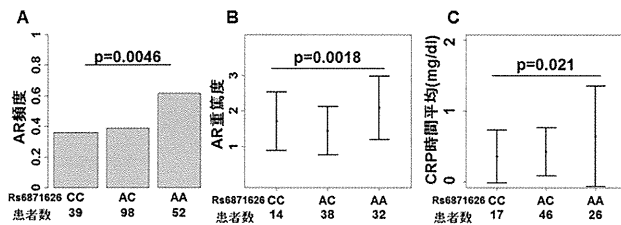


図 4 rs6871626 と高安動脈炎の症状との関連

A: AR 合併頻度、B: AR 重症度、C: CRP 時間平均との関連。A, B は男性検定、C は線形回帰分析の結果。AR の重症度は心臓超音波検査あるいは心血管造影検査の結果によって、mild、moderate、severe をそれぞれ 1/2/3 として評価した

さらに rs6871626 は HLA-B*52:01 と相互作用を示し、リスクアレルの重積により相乗的にリスクが高まることが明らかとなった(図 5)。

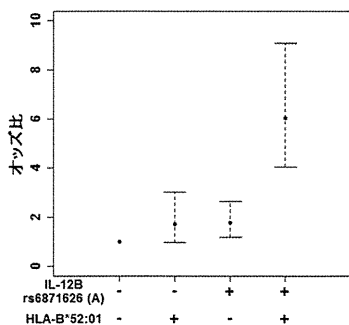


図 5 rs6871626 と HLA-B*52:01 との相互作用

rs6871626 と HLA-B*52:01 のリスクアレルの組み合わせごとにオッズ比を示す。

対照群ゲノム・遺伝子発現情報の収集とデータベースの構築

難治性疾患関連遺伝子探索に先立ち、対照群の検体収集・解析および、データベース構築を実施した。具体的には、日本人健常者約 3,200 人の SNP 頻度情報と、5 ヶ所の難病解析拠点(東北大学、東京大学、横浜市立大学、国立成育医療研究センター、京都大学)で行った 1,208 検体のエクソーム解析から得た変異の頻度情報とを一元化し、ゲノム上の遺伝子領域に存在する日本人標準的な塩基配列情報とその遺伝子変異とを明らかにした。遺伝子翻訳領域内に同定した 288,025 個の遺伝子変異のうち、156,622 個(54.4%)は欧米の既存のデータベースには存在しない日本人特異的な変異であり、そのうち 88.6%は、日本人集団における頻度が 0.5% 以下の低頻度変異であった。また、95,020 個(60.7%)の変異はアミノ酸変化を伴い、タンパク質の機能に影響を与える変異であったことから、これらの日本人特異的ゲノム変異は、遺伝子の機能に関わる重要な変異の可能性が高く、難病に関連する遺伝子変異の効率的な探索に有用なリソースとなることが期待できる。更に、本研究でエクソーム解析を実施した DNA 検体 300 例については、ゲノムスキニング法による SNP 情報、及び末梢血 RNA の発現アレイによる遺伝子発現量情報を収集し、これらの情報をもとに遺伝子多型と発現量との関連解析(eQTL 解析)を実施した。ゲノムワイド関連解析等で同定された疾患関連変異だけでなく、エクソーム解析で見出された新規のゲノム変異の機能的役割を解釈する上で有用なリソースといえる(論文投稿中)。これら全情報のデータベース化ならびに、効率的な閲覧を可能にするインターフェースの開発を実施し、2013 年 11 月 12 日に、遺伝子リファレンスライブラリデータベース(Human Genetic Variation Database: HGVD)を一般公開し、幅広く情報を配信した。このデータベースを研究者が活用することによって、日本人での遺伝病の原因遺伝子の発見や、見出された変異が疾患発症に関わる可能性の評価・解釈、種々の病気になるやすい遺伝的体質の解明が大きく進展するものと期待される(論文投稿準備中)。

Human Genetic Variation Database
<http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/index.html>

D. 考察

IgG4 関連疾患

IgG4 関連疾患は、免疫グロブリンのアイソタイプのうち IgG4 サブセットが上昇する。そのため、抗原認識とその後の B 細胞活性化および抗体産生に重要な役割を果たす HLA-ClassII の重要性が想定されており、これまでの遺伝的解析でも HLA-DRB1 との関連が示されていた。今回、大規模な検体を用いた GWAS により、IgG4 関連疾患には HLA-ClassII に加え HLA-ClassI の領域が関与していること、および非 HLA 領域の関与が示された。これは IgG4 関連疾患の病態が複数の要因によって制御されていることを示唆している。また、IgG4 関連疾患がこれまで遺伝的解析が進んでいる他の自己免疫性疾患と共通の発症基盤を有していることも示唆している。本研究で示されたように、IgG4 関連疾患で各疾患に特異的な rare variant が存在する可能性は、IgG4 産生を始めとした共通の病型の方で、異なった遺伝的背景によって疾患病態が規定されている可能性を示すものである。

肺高血圧症 (PH)

CTEPH は、その治療法が他の PH と大きく異なり侵襲的治療の適応であることから、PH の中で明確に区別されるべき病態であり、早期発見および治療反応性を評価するためのバイオマーカー同定は臨床的にも大きな意味を持つ。今回、バイオマーカーの候補に挙げた遺伝子発現や代謝物は、BPA の影響そのもので変化している可能性もあり、時系列データの充実や症例数の増加により、その影響を慎重に評価する必要がある。一方で、全ゲノム関連解析にて明確な疾患感受性遺伝子が同定されなかったことから、本病態には effect size の非常に大きい common variant が関与している可能性は限定的であると思われた。

混合性結合組織病 (MCTD)

MCTD は全身性エリテマトーデス (SLE)、強皮症 (SSc)、多発筋炎/皮膚筋炎の要素をあわせもち、抗 U1-RNP 抗体陽性となる疾患である。肺高血圧症の合併頻度が高く、しばしば致死的な転帰をとる。近年、欧米を中心として SLE や SSc で多くの疾患感受性遺伝子が同定されたことを鑑みれば、MCTD の発症にも遺伝素因が関連していることが強く示唆されるが、MCTD の遺伝子解析が十

分に進んでいるとはいえない。

本研究で同定された HLA、BLK、STAT4 領域は、いずれも SLE および SSc の疾患感受性遺伝子として同定されている。しかし、これらの領域と MCTD との関連は、SLE や SSc との関連に比して強い傾向にあり、疾患寄与率は MCTD 病態においてより大きい可能性がある。これらの結果は、SLE や SSc、筋炎に共通する感受性遺伝子の解析が、MCTD の遺伝的背景を解明するうえで有効であることを示唆している。

HTLV-1 関連脊髄症 (HAM)

我が国における HTLV-1 の感染者数は 108 万人と推計され、感染者の数%程度が HAM を発症する。HAM 発症後の病勢は一律でなく、発症後数十年経過しても症状が軽度である場合もあれば、発症後数か月単位で急速に症状が悪化するケースもある。しかし、実臨床で用いられている血液・髄液マーカーやプロウイルス量 (感染細胞率) のみでは、発症や病勢を十分に予測できないことから、HAM の発症・病勢には遺伝的な因子が関連することが強く示唆されている。

本研究において、疾患に感受性を示す候補領域が染色体 2 番に観察された。両者の関連は GWAS における統計学的有意水準 ($p=5.0 \times 10^{-8}$) を満たさなかったものの、検体数を増やした解析を行うことで水準をクリアすることが期待された。既に追加で HAM 患者 38 例、健常対照 153 例の検体を収集しており、GWAS のための網羅的 SNP 解析を進めている。

健常者を対照としたエクソーム解析から、疾患発症との関わりが期待される変異がいくつか得られた。

高安動脈炎

高安動脈炎は、1908 年に本邦から報告された血管炎であり、本邦では約 6,000 人が特定疾患受給者として登録されている (2012 年度)。若年女性に好発し、大動脈及び主要な分枝の炎症、狭窄・閉塞に関連して心不全、大動脈弁閉鎖不全症、肺梗塞、脳梗塞、心筋梗塞、大動脈解離など重篤な病態を呈する。高安動脈炎の発症には HLA 領域の多型が関与することが示されており、特に HLA-B*52:01 の関連が強い。しかし、非 HLA 領域の遺伝子と疾患との関連はほとんど解明されていない。

本研究で感受性遺伝子として同定された

IL12B 領域は、他の自己免疫性疾患である乾癬や炎症性腸疾患のリスク領域として報告されている。加えて本研究で最も強い関連を示した SNP (rs6871626)は潰瘍性大腸炎のGWASで同定された感受性SNPと同一であった。これらのことは他の自己免疫性疾患と高安動脈炎の病態背景に共通部分がある可能性を示唆している。

IL12B 遺伝子は、IL12 と IL23 の共通サブユニットである IL12/23p40 タンパクをコードしている。IL12B の SNP が合併症やその重症度とも関連していたこと、ならびに IL12 と IL23 が高安動脈炎の病態に関わるヘルパーT細胞(Th1、Th17)の分化・増殖・活性化に重要なサイトカインであることを考え合わせると、IL12B 遺伝子や IL12/23p40 が高安動脈炎の発症や病態に本質的な役割を果たしていることが強く示唆される。

IL12/23p40 を標的とした分子標的薬であるウステキヌマブは、乾癬および炎症性腸疾患へ適用されており、治療効果も確認されている。高安動脈炎の感受性遺伝子として IL12B が同定されたこと、関連解析で同定された感受性領域が疾患の原因に根差す可能性が高いとを考慮すれば、ウステキヌマブが高安動脈炎の治療薬として応用可能である可能性が考えられる。

E. 結論

H25 年度は検体の数をさらに増やし、遺伝子解析、転写物解析、代謝物解析を行った。Common variant に着目した解析で、IgG4 関連疾患、HAM、高安動脈炎について新規疾患感受性領域を同定したほか、rare variant に着目した解析にて、IgG4 関連疾患、HAM について新規疾患感受性領域を同定した。また、疾患関連転写物や代謝物を同定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Okada, Y., Wu, D., Trynka, G., Raj, T., Terao, C., Ikari, K., Kochi, Y., Ohmura, K., Suzuki, A., Yoshida, S., Graham, R. R., Manoharan, A., Ortmann, W., Bhangale, T., Denny, J. C., Carroll, R. J., Eyler, A. E., Greenberg, J. D., Kremer, J.

M., Pappas, D. A., Jiang, L., Yin, J., Ye, L., Su, D. F., Yang, J., Xie, G., Keystone, E., Westra, H. J., Esko, T., Metspalu, A., Zhou, X., Gupta, N., Mirel, D., Stahl, E. A., Diogo, D., Cui, J., Liao, K., Guo, M. H., Myouzen, K., Kawaguchi, T., Coenen, M. J. H., van Riel, P. L. C. M., van de Laar, M. A. F. J., Guchelaar, H. J., Huizinga, T. W. J., Dieude, P., Mariette, X., Bridges Jr, S. L., Zhernakova, A., Toes, R. E. M., Tak, P. P., Miceli-Richard, C., Bang, S. Y., Lee, H. S., Martin, J., Gonzalez-Gay, M. A., Rodriguez-Rodriguez L., Rantapaa-Dahlqvist, S., Arlestig, L., Choi, H. K., Kamatani, Y., Galan, P., Lathrop, M., the RACI consortium, the GARNET consortium, Eyre, S., Bowes, J., Barton, A., de Vries, N., Moreland, L. W., Criswell, L. A., Karlson, E. W., Taniguchi, A., Yamada, R., Kubo, M., Liu, J. S., Bae, S. C., Worthington, J., Padyukov, L., Klareskog, L., Gregersen, P. K., Raychaudhuri, S., Stranger, B. E., De Jager, P. L., Franke, L., Visscher, P. M., Brown, M. A., Yamanaka, H., Mimori, T., Takahashi, A., Xu, H., Behrens, T. W., Siminovitch, K. A., Momohara, S., Matsuda, F., Yamamoto, K. and Plenge, R. M. (2014) Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* 506, 376-381.

2. Tanaka, K., Terao, C., Ohmura, K., Takahashi, M., Nakashima, R., Imura, Y., Yoshifuji, H., Yukawa, N., Usui, T., Fujii, T., Mimori, T. and Matsuda, F. (2014) Significant association between *CYP3A5* polymorphism and blood concentration of tacrolimus in patients with connective tissue diseases. *J. Hum. Genet.* 59, 107-109.
3. Yamakawa, N., Fujimoto, M., Kawabata, D., Terao, C., Nishikori, M., Nakashima, R., Imura, Y., Yukawa, N., Yoshifuji, H., Ohmura, K., Fujii, T., Kitano, T., Kondo, T., Yurugi, K., Miura, Y., Maekawa, T., Saji, S., Takaori-Kondo, A., Matsuda, F., Haga, H. and Mimori, T. (2014) A clinical, pathological and genetic characterization of methotrexate-associated lympho-

proliferative disorders. *J. Rheumatol.* 41, 293-299.

4. Yamamoto, H., Higasa, K., Sakaguchi, M., Shien, K., Soh, J., Ichimura, K., Furukawa, M., Hashida, S., Tsukuda, K., Takigawa, N., Matsuo, K., Kiura, K., Miyoshi, S., Matsuda, F. and Toyooka, S. (2013) Novel germline mutation in the transmembrane domain of HER2 in familial lung adenocarcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 106, djt338.
5. Terao, C., Bayoumi, N., McKenzie, C. A., Zelenika, D., Muro, S., Mishima, M.: The Nagahama Cohort Research Group, Connell, J. M., Vickers, M. A., Lathrop, G. M., Farrall, M., Matsuda, F. and Keavney, B. D. (2013) Quantitative variation in plasma angiotensin-I converting enzyme activity shows allelic heterogeneity in the ABO blood group locus. *Ann. Hum. Genet.* 77, 465-471.
6. Terao, C., Yoshifuji, H., Kimura, A., Matsumura, T., Ohmura, K., Takahashi, M., Shimizu, M., Kawaguchi, T., Chen, Z., Naruse, T. K., Sato-Otsubo, A., Ebana, Y., Maejima, Y., Kinoshita, H., Murakami, K., Kawabata, D., Wada, Y., Narita, I., Tazaki, J., Kawaguchi, Y., Yamanaka, H., Yurugi, K., Miura, Y., Maekawa, T., Ogawa, S., Komuro, K., Nagai, R., Yamada, R., Tabara, Y., Isobe, M., Mimori, T. and Matsuda, F. (2013) Two susceptibility loci to Takayasu arteritis reveal a synergistic role of the IL12B and HLA-B regions in a Japanese population. *Am. J. Hum. Genet.* 93, 289-297.
7. Plenge, R. M., Greenberg, J. D., Mangravite, L. M., Derry, J. M., Stahl, E. A., Coenen, M. J., Barton, A., Padyukov, L., Klareskog, L., Gregersen, P. K., Mariette, X., Moreland, L. W., Bridges, S. L. Jr, de Vries, N. Huizinga, T. W. Guchelaar, H. J., International Rheumatoid Arthritis Consortium

(INTERACT), Friend, S. H. and Stolovitzky, G. (2013) Crowdsourcing genetic prediction of clinical utility in the Rheumatoid Arthritis Responder Challenge. *Nat. Genet.* 45, 468-469.

2. 学会発表

1. Matsuda, F. Genomic analysis of immune-related diseases using GWAS and WES. The Second Kyoto Symposium on Bioinformatics for Next Generation Sequencing with Applications in Human Genetics, (Kyoto, Japan), March 14, 2014.
2. Matsuda, F. Genome-wide association studies in IgG4-RD. Second International Symposium on IgG4 and Related Diseases, (Honolulu, USA), February 18, 2014.
3. 松田文彦「地域に根ざした新時代の予防医学の試み」 2013年度ソニー／医科歯科クリニックサミット 東京医科歯科大学鈴木記念講堂（東京）2013年8月20日
4. 松田文彦「ヒト生命情報統合研究とゲノムコホート」 第20回日本遺伝子診療学会大会 教育講演 アクトシティ浜松コンgresセンター（浜松）2013年7月20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

一昨年度・昨年度には、多様な多様性の臨床データを系統的に取扱い、それを複数のオミックス実験データと組み合わせるためのデータ型の検討と複合的フェノタイプの取扱いのデータベース構築上の諸課題に取り組み、特に登録データの統計解析的観点からのインプットを行った。本年度はそれに引き続き、多様なデータ型からなるデータ全体から意味を取り出すための統合的統計解析手法のための基礎的考察を行った。

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

マルチオミックス(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の結果に基づき、その単体としての特定を明らかにしたうえで、それらを同じ土俵で解析の遡上に乗せるための統計学的手法について調査考察を行い、その一方法として情報エントロピーを用いた統合の可能性についてシミュレーションデータを作成して検討した。

(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

多様なデータ型からなるマルチオミックスデータのデータ型を、データベース構築の観点から再検討するとともに、統計手法の観点から検討し、マルチ層からペアワイズの比較をするパターンを確認した。その比較ペアごとに用いられる定型的な統計手法を情報エントロピーの観点から考察し、エントロピーを用いて各種手法の統計量の統一を図るための技術的課題の検討を行い、その基礎的特性を明らかにした。

D. 考察

第1・2年度に進めた、実データのデータベース登録に引き続き、それを定型的な統計解析で処理することについては、ルーチンとして、処理フローを確認した。そのうえで、より詳細なデータマイニングにつなげるための、統合的データマイニングのための統計量統一の可能性について検討を加え、その基盤とする知見を得た。

E. 結論

研究全体の進行に即して分担部分を遂行した。非定型的なデータマイニングの可能性について先行的検討を行った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hamaguchi, Y., Fujimoto, M., Matsushita, T., Kaji, K., Komura, K., Hasegawa, M., Kodera, M., Muroi, E.,

- Fujikawa, K., Seishima, M., Yamada, H., Yamada, R., Sato, S., Takehara, K. and Kuwana, M. (2013) Common and Distinct Clinical Features in Adult Patients with Anti-Aminoacyl-tRNA Synthetase Antibodies: Heterogeneity within the Syndrome. *PLoS One*. 8, e60442.
2. Terao, C., Yoshifuji, H., Kimura, A., Matsumura, T., Ohmura, K., Takahashi, M., Shimizu, M., Kawaguchi, T., Chen, Z., Naruse, T. K., Sato-Otsubo, A., Ebana, Y., Maejima, Y., Kinoshita, H., Murakami, K., Kawabata, D., Wada, Y., Narita, I., Tazaki, J., Kawaguchi, Y., Yamanaka, H., Yurugi, K., Miura, Y., Maekawa, T., Ogawa, S., Komuro, K., Nagai, R., Yamada, R., Tabara, Y., Isobe, M., Mimori, T. and Matsuda, F. (2013) Two susceptibility loci to Takayasu arteritis reveal a synergistic role of the IL12B and HLA-B regions in a Japanese population. *Am. J. Hum. Genet.* 93, 289-297.
1. Narahara, M., Matsuda, F., Higasa, K., Tabara, Y., Kawaguchi, T. and Yamada, R. Establishing an eQTL map of the Japanese population. American Society of Human Genetic Annual Meeting (Boston, USA), October 25, 2013.
 2. 奈良原 舞子、松田 文彦、日笠 幸一郎、田原 康玄、川口 喬久、山田 亮 日本人におけるeQTL マップの構築 第58回日本人類遺伝学会 江陽グランドホテル (仙台) 2013年11月22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

2. 学会発表

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)の発症や病勢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)解析を行った。HAM 患者と HAM 未発症の HTLV-1 キャリアとを比較したゲノムワイド関連解析から、2 番染色体に候補 SNP を見いだした。一方、HAM 発症後に急速に病態が悪化した重症例と緩徐進行の典型例とを比較したエクソーム解析では、病勢に関連する低頻度変異は検出されなかったが、健常対象者との関連解析では、いくつかの候補が検出された。これら遺伝因子と疾患との関連について検証を進める。

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い。発症後数十年経過しても症状が軽度である場合もあれば、発症後数か月単位で急速に症状が悪化するケースもあるが、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ウイルス感染者のうち数%しかHAMを発症しないことから、HAMの発症や病勢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(GWAS)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。今年度は、さらに検体の収集を進め、検出力を高めたGWASから感受性遺伝子の同定を進めた。平行して、HAM発症後に急速に症状が進行した重症例、典型的な病勢を示した典型例を対象にエクソーム解析を

行い、HAM発症後の病勢に関連するレアバリエントの解析も進めた。

事前仮説に依らないゲノム網羅的な解析からは、これまで予想されなかった遺伝因子が同定される可能性が高い。疾患に感受性を示す遺伝因子の同定は、病因の解明と病勢マーカーの獲得において大きな手がかりを与える点で、厚生労働行政に大きく寄与するものと期待される。

B. 研究方法

主に「次世代遺伝子解析技術を用いた希少難治性疾患の原因究明及び病態解明に関する研究班」(班長：鹿児島大学医学部 高嶋博)、「HAMの新規バイオマーカー同定による重症度別治療指針の作成と病因細胞標的治療法の開発」(班長：聖マリアンナ医科大学 山野嘉久)、京都大学ウイルス研究所で収集したHAM患者796例、成人T細胞白血病(ATL)患者448例、関連疾患非発症のHTLV-1陽性キャリア766例とした。Illumina社製のSNPアレイ(Human610-Quad、HumanCoreExome)を用いてゲノム網羅的なSNPタイピングを行い、定法に則ったクオリティコントロールを通過したHAM患者634例、ATL患者408例、HTLV-1キャリア581例、127,126 SNPについて関連解析を行った。関連解析にはPLINK(ver 1.07)を用いた。

また、HAM発症後に急速に症状が進行した重症患者16例、典型的な病勢を示した9例を対象にエクソーム解析を行い、ターゲット遺伝子領域の78.6%を10×以上の

被覆率でカバーする高品質のデータを得た。

(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、キャリアの検体収集>

平成 25 年度に、共同研究者から HAM 患者 265 検体、キャリア 97 検体の提供を受け、これらのサンプルのゲノム網羅的 SNP タイピング (ゲノムスキャン) を行った。昨年の同時期 (HAM 患者 531 検体、キャリア 669 例 (うちゲノムスキャンを実施したのはそれぞれ 513、532 検体)) に比べて、大幅に検体数を増やすことができた。

<HAM の GWAS>

HAM 患者と非 HAM 発症者 (ATL 患者 + 健常キャリア) とを比較した関連解析から、HLA-DRA 領域と染色体 2 番の遺伝子 X に有意な関連を認めた (図 1)。これらの関連は、集団の構造化を補正後に消失したが、染色体 2 番のピークは検体を増やした解析において関連の強さが上がっており、擬陽性ではなく真の関連を持つ遺伝子であることが強く示唆された。現在、検体数を最大まで増やして再現性検証を急いでいる。

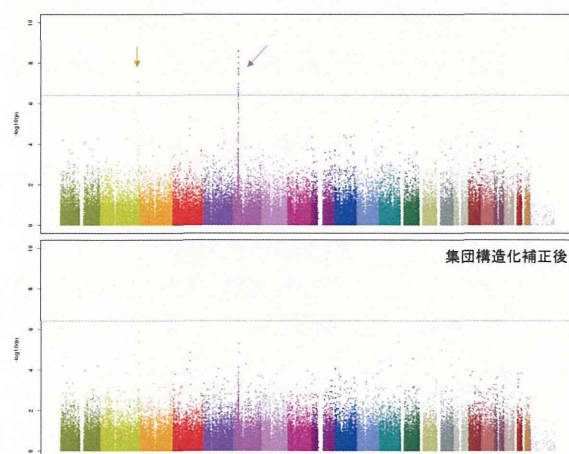


図 1 ATL 患者とキャリアを対照とした HAM の GWAS

<エクソーム解析>

急速進行重症例 (16 例) と典型例 (9 例) を対照としたエクソーム解析では、38,439 個の遺伝的変異が検出され、このうち公共データベース (dbSNP) と独自のデータベースに登録がない新規の 963 個について関連解析を行った。その結果、急速例進行例と典型例との関連解析では有意差を示す変異は検出できなかったが、地域住民 300 例を対照とした解析では、HAM 患者に特異的な遺伝的変異が染色体 1 番 ($p=8.4 \times 10^{-11}$)、7 番 ($p=3.8 \times 10^{-10}$)、17 番 ($p=4.2 \times 10^{-10}$) に認められた。

D. 考察

本研究において、疾患に感受性を示す候補領域が染色体 2 番に観察された。両者の関連は GWAS における統計学的有意水準 ($p=5.0 \times 10^{-8}$) を満たさなかったものの、検体数を増やした解析を行うことで水準をクリアすることが期待された。既に追加で HAM 患者 38 例、健常対照 153 例の検体を収集しており、GWAS のための網羅的 SNP 解析を進めている。関連解析では、検体数が多いほど統計学的な検出力が高まるが、我が国における HAM 患者は 3,000 例程度と少なく、容易に検体を得ることができない。本研究で収集した 800 例強の検体は、世界的にも極めて貴重な生体試料セットである。

健常者を対照としたエクソーム解析から、疾患発症との関わりが期待される変異がいくつか得られた。これらの変異が真に疾患発症と関連するかは、今後独立した検体で再現性を確認していく予定である。

E. 結論

HAM 患者を対象とした GWAS およびエクソーム解析から、疾患に感受性を示す候補 SNP や低頻度変異が見いだされた。今後、例数を増やした解析から、SNP や低頻度変異と疾患との関連を検証する。

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