

**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))**  
**平成 23-25 年度 総合研究報告書 (分担研究)**

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

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を行い、その結果をデータベースへと実装するための技術的問題の解消を行った。また、複数臨床項目を統合してフェノタイプとして扱うための、解析の枠組みを整えた。さらに、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)と組み合わせるためのデータ型の検討を引き続き行い、多様なデータ型間の関連検定・抽出を統合的に行うための情報エントロピー活用に関する基礎的な検討を実施した。

### 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)における情報・統計学的な課題)は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。第2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、最終年度に、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

データベースにおける臨床情報のデータ型の確定を行った。また、オミックスデータの保管・保全方針を確定した。これらに沿ったデータベースの構築作業を補助した。複数尺度を持つ臨床フェノタイプを多次元データとして扱うこと、それをスカラー化することに関する基礎的な検討を実施し、検定におけるマルチプルテストの視点からの問題点について、データシミュレーションを通じて行った。

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。

さらに情報エントロピーによるマルチオミ

ックデータの統合的処理の可能性に関する基礎的な手法特性の評価を行った。

#### 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を進め、当該分野における統計解析上の課題を克服するための端緒となる成果を得た。

#### E. 結論

研究全体の進行に即して分担部分を遂行した。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. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Nakata, I., Yamashiro, K., Yamada, R., Gotoh, N., Nakanishi, H., Hayashi, H., Tsujikawa, A., Otani, A., Saito, M., Iida, T., Oishi, A., Matsuo, K., Tajima, K., Matsuda, F. and Yoshimura, N. (2011) Association between the *SERPING1* Gene and Age-Related Macular Degeneration and Polypoidal Choroidal Vasculopathy in Japanese. *PLoS One*. 6, e19108.
2. Terao, C., Yamada, R., Ohmura, K., Takahashi, M., Kawaguchi, T., Kochi, Y., Human Disease Genomics Working Group, RA Clinical and Genetic Study Consortium, Okada, Y., Nakamura, Y., Yamamoto, K., Melchers, I., Lathrop, M., Mimori, T. and Matsuda, F. (2011) The human *AIRE* gene at chromosome 21q22 is a genetic determinant for the predisposition to rheumatoid arthritis in Japanese population. *Hum. Mol. Genet.* 20, 2680-2685.
3. 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- $\kappa$ B pathway are associated with rheumatoid arthritis in Japanese. *PLoS Genet.* 8, e1002949.
4. 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.
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.
6. Hamaguchi, Y., Fujimoto, M., Matsushita, T., Kaji, K., Komura, K., Hasegawa, M., Kadera, 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.
7. 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.
8. 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, I., 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.
2. 学会発表
1. Yamada, R., Terao, C., Kawaguchi, T. and Narahara, M. Evaluation of power for linkage disequilibrium mapping. International Genetic Epidemiology Society Meeting 2011 (Heidelberg, Germany), September 19, 2011.
  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. 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.
  4. 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.
  5. 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.
6. 藤井 庸祐、成田 岳雄、山田 亮 他 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
  7. 奈良原 舞子、中山 健夫、松田 文彦、山田 亮 他 動脈弾性指標における遺伝率推定 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
  8. Narahara, M., Matsuda, F., Yamada, R. et al. Establishing an eQTL map of the Japanese population. American Society of Human Genetic Annual Meeting (Boston, USA), Oct 22-26, 2013.
  9. 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
- G. 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))  
平成 23-25 年度 総合研究報告書 (分担研究)

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(GWAS)、エクソーム解析を行った。HAM 患者と HAM 未発症の HTLV-1 キャリアとを比較した GWAS から、2 番染色体に HAM に関連する候補 SNP を見いだした。一方、HTLV-1 のプロウイルス量に対する GWAS では、有意な関連を示す SNP は見当たらなかった。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、病勢に関連するレアバリエントが検出されなかったが、健常者を対照とした検討で疾患との関連が期待される低頻度変異が複数認められた。これら遺伝因子と疾患との関連について、継続して検証を進める。

### 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。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。

### 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。

プロウイルス量の測定はリアルタイム PCR 法で行った。GWAS はプロウイルス量の測定値を rank-based inverted normal transformation 法での正規化し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>

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。

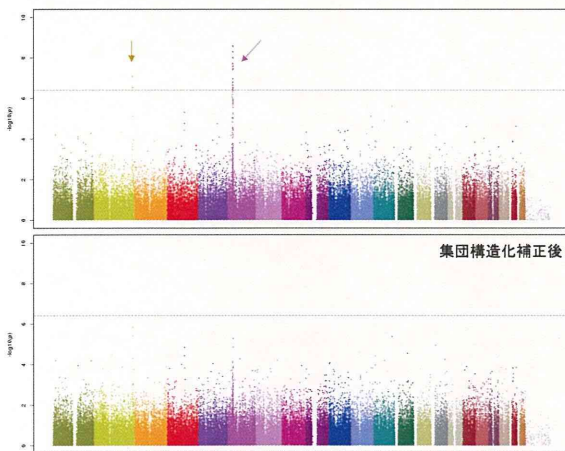


図 1 ATL 患者とキャリアを対照とした HAM の GWAS

### <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。

### <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。

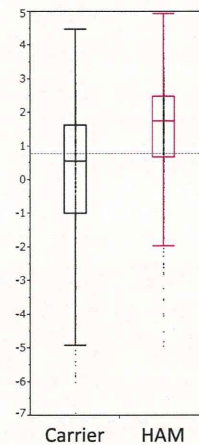


図 2 プロウイルス量の比較

プロウイルス量に対する GWAS では、HAM のみの解析(図 3 上段)、HAM とキャリアとを合わせた解析(図 3 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。

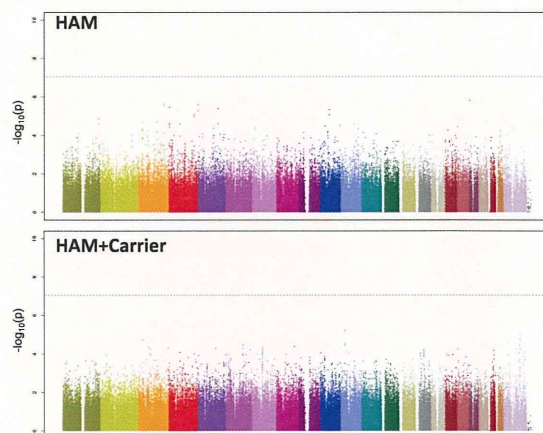


図 3 プロウイルス量の GWAS

## D. 考察

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. 研究発表

なし

#### G. 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))  
平成 23-25 年度 総合研究報告書(分担研究)

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 川口 喬久

### 研究要旨

統合的オミックス解析の情報基盤として、SNP チップや次世代シーケンサーによる遺伝子多型情報、発現アレイによるトランスクリプトーム、質量分析計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、複数の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、IgG4 関連疾患、肺高血圧症 (PH)、HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) /成人性白血病 (ATL) のゲノムワイド関連解析およびオミックス解析を実施した。

### 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、統計手法の開発および解析を行う。

### 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) : 多種類の商用 SNP チップによるゲノムスキャンや次世代シーケンサーによる多型同定の結果を統合的に解析するため、各多型を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 (発現アレイ) : プローブ配列セットによりデータを一意化する。異なるプラットフォームを統合のための標準化手法についても検討する。

・プロテオーム、メタボローム (GCMS) : 公共のスペクトルデータベースを用いて化合物を同定し、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(ターゲット法)。また、特定の化合物を同定せずに、すべてのピーク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(ノンターゲット法)。

・イミュノーム (FACS) : 血中の免疫関連

細胞を FACS により定量する。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、データ登録用 Web インタフェースの自動生成、匿名化の自動化等による作業量の軽減や不整合率の低減、アクセスコントロール等によるセキュリティ向上や進捗管理機能の充実を図る。

### (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

SNP に関しては、約 573 万種の多型、29,538 サンプル(うち 6,488 が健常人コントロール、3,362 が対象難治性疾患)を登録した。実験データはプラットフォームごとに整形し、またクオリティコントロール(QC)を実施して、plink 形式にて適宜研究者に頒布している。マイクロアレイによるトランスクリプトームでは、42,550 プローブ、811 サンプル(うち 599 が健常人コントロール、212 が対象難治性疾患)を登録した。実験データは QC および正規化を

実施した後、csv 形式で適宜研究者に頒布している。GCMS によるメタボローム解析では、4,671 サンプル（うち 4,458 が健常人コントロール、213 が対象難治性疾患）を登録した。ターゲット法に基づくピーク検出方法により 136 の化合物を同定・定量し、csv 形式で適宜研究者に頒布している。また、ノンターゲット法による解析手法の開発も並行して進めている。FACS による一細胞免疫染色では、1,173 サンプル（すべて健常人コントロール）を登録した。マニュアルゲーティングによる定量、正規化を実施して、csv 形式で適宜研究者に頒布している。臨床情報は、これまで、3000 を超える項目と、67,625 サンプルを登録した。データ登録時の論理矛盾チェックにより、データ間の不整合を排除したほか、同一項目を異なるプロジェクト間で統合することに努めた。また、データベースを、ゲノム疫学統合基盤のパッケージシステムとして開発した。



Fig1. ゲノム疫学統合基盤

本データベースを活用して、IgG4 関連疾患、PH、HAM/ATL らのゲノムワイド関連解析およびオミックス解析を実施した。

#### D. 考察

本課題は、他施設共同型の臨床研究であり、データの品質やアクセス権の制御、進捗状況の管理が重要であった。またプロジェクトにより、少なからず運用ルールやロジスティック等が異なったが、業務を洗い出し、一般化し、ゲノム疫学統合基盤システムとしてパッケージ化することにより、共通的に実施する基盤を整えた。Web インタフェースや各種機能に関しては、開発途上にあり、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

ゲノム疫学統合基盤システムとして開発することにより、データ品質の担保、作業の軽減をはかることができた。これを用い、多数の検体の臨床情報や実験情報を統合的に収集・管理し、容易にゲノムワイド関連解析を実施することができた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 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.
- Kawaguchi, T., Sumida, S., Umemura, A., Matsuo, K, Takahashi, M, Takamura,



- T., Yasui, K., Saibara, T., Hashimoto, E., Kawanaka, M., Watanabe, S., Kawata, S., Imai, Y., Kokubo, M., Shima, T., Park, H., Tanaka, H., Tajima, K., Yamada, R., Matsuda, F. and Okanoue, T. for Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG-NAFLD) (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.
3. Wakai, K., Matsuo, K., Matsuda, F., Yamada, R., Takahashi, M., Kawaguchi, T., Yatabe, Y., Ito, H., Hosono, S., Tajima, K., Naito, M., Morita, E., Yin, G., Sakamoto, T., Takashima, N., Suzuki, S., Nakahata, N., Mikami, H., Ohnaka, K., Watanabe, Y., Arisawa, K., Kubo, M., Hamajima, N. and Tanaka, H. the J-MICC Study Group. (2013) Genome-wide association study of the genetic factors related to confectionery intake: Potential roles of the *ADIPOQ* gene. *Obesity* 21, 2413-2419.
  4. Toyoda, H., Kumada, T., Tada, T., Hayashi, K., Honda, T., Katano, Y., Goto, H., Kawaguchi, T., Murakami, Y. and Matsuda F. (2012) Predictive value of early viral dynamics during peginterferon and ribavirin combination therapy based on genetic polymorphisms near the *IL28B* gene in patients infected with HCV genotype 1b. *J. Med. Virol.* 84, 61-70.
  5. Onomoto, K., Morimoto, S., Kawaguchi, T., Toyoda, H., Tanaka, M., Kuroda, M., Uno, K., Kumada, T., Matsuda, F., Shimotohno, K., Fujita, T., Murakami, Y. (2011) Dysregulation of IFN system can lead to poor response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C. *PLoS One.* 6, e19799.
2. 学会発表  
なし
- G. 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))  
平成 23-25 年度 総合研究報告書 (分担研究)

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  
“自己免疫性疾患のオミックス解析に関する研究”

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

難病である高安動脈炎の検体を収集しゲノム解析を行い、疾患感受性遺伝子を 2 つ同定した。また、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解析を行い、検体を収集するとともに IgG4 関連疾患において関連領域を 2 つ同定した。

#### 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。また、高安動脈炎の DNA 解析を行う。

#### 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、健常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。高安動脈炎の DNA を集積し、全ゲノム関連解析を行い、病態を明らかにする。

#### (倫理面への配慮)

患者検体は二回匿名化され、患者の個人情報とオミックスデータが連結されないように注意する。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し進め、IgG4 関連疾患の DNA758 検体を集積した。698 例でゲノム網羅的な SNP タイピングを行った。955,113 SNP について、健常者検体 1,849 例を対照に関連解析を行った。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。また、対照群のデータについて、転写物と代謝物のデータの測定と解析を

終え、比較可能な状態としてデータベースに格納した。

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、全例あるいはミクリッツ病を対象とした解析では染色体 1 番と 6 番に、AIP type1 を対象とした解析では染色体 6 番に、腎炎を対象とした解析では染色体 20 番に同定された(補正後の  $\lambda$  は 1.03-1.05 であった)。

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。本研究でも全 IgG4 関連疾患、AIP type1、ミクリッツ病のいずれを対象とした解析でも、染色体 6 番の HLA 領域に強い関連を認めた。

全 IgG4 関連疾患において最も強く関連した HLA 領域の SNP は、HLA ClassII に分類される HLA-DRB1 にあり、既報の HLA-DRB1\*04:05 と強い連鎖不平衡の関係にあった( $r^2:0.73$ )。次に、HLA 領域の関連が HLA-DRB1\*04:05 の SNP 以外にあることを考え、ロジスティック回帰分析にて解析を行った。すると、最も強い関連を示した SNP の影響を除外した後も HLA ClassI に分類される HLA-A 領域の SNP に有意な関連を認めた( $p=6.2 \times 10^{-11}$ )。これら二つの SNP の影響を考慮すると、厳密なゲノムワイド関連解析の有意水準に到達する SNP はなくなったが、最も低い p 値を示すものが HLA Class I 領域の SNP( $1.0 \times 10^{-6}$ )にあり、さらなる関連領域の存在が示唆された。これらことから、IgG4 関連疾患の疾患感受性において HLA ClassII 領域のみならず ClassI 領域も関連することが示された。

肺高血圧症の症例の集まる、岡山医療センタ

一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DNA685 検体を収集、461 検体につき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塞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、176 検体を収集した。

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。時系列に沿ったRNAを遺伝子発現アレイにかけ、現在16検体を終了した。残りの検体を引き続き進めている。

#### 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。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( $p = 0.003$ )、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。

#### 高安動脈炎

東京医科歯科大学や新潟大学、東京女子医科大学、患者会と連携し、高安動脈炎患者DNAを379例集積した。167例のゲノムスキャンを行い、663例の健常人と比較を24,487SNPに関して行い、212人の患者群と1,322人の健常者で追認解析を施行、染色体5番のIL12B領域と染色体17番のMLX領域を関連領域として同定した。IL12B領域は既知のHLA-B\*52:01と疾患感受性について相互作用を示し、重篤な合併症である大動脈弁閉鎖症の合併頻度およびその重症度と関連を示した。

#### D. 考察

##### IgG4 関連疾患

HLA 領域の関連は既報のものと一致するが、複数のピークが見つかるのは初めてである。また、非HLA領域との関連の同定も初めてである。ClassIとClassIIが関連していることは、IgG4関連疾患が自己抗体の産生に加えて、外来抗原を認識している可能性を示唆する。さらなる検体数を増やした追認解析が重要である。

#### 慢性血栓塞栓性肺高血圧症

170例の遺伝子解析では有意水準に到達するSNPは検出されなかった。さらなる検体の増加が必要である。HLA領域にも関連は認められず、HLAの関連は弱い可能性がある。

#### 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/皮膚筋炎の要素を合わせもち、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、しばしば致命的な転帰をとる。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との関連に比して高い傾向にあり、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。

高安動脈炎で最も強い関連を示したIL12B領域は、IL12p40タンパクをコードしている。同領域は炎症性腸疾患や乾癬でその関連が示されており、これらの疾患ではIL12p40をターゲットとした分子生物学的製剤であるウステキヌマブが治療に用いられている。IL12Bが高安動脈炎の病態において中心的な役割を果たしている可能性が高いことから、ウステキヌマブは高安動脈炎の新規治療法として有望である可能性がある。

## E. 結論

IgG4 関連疾患については HLA 領域の複数の関連を同定した他、非 HLA 領域の関連領域候補を同定した。現在さらに数を増やして追認解析を行っている。また、時系列に沿ったデータをさらに拡充して解析予定である。

慢性血栓性肺高血圧症の時系列に沿った遺伝子発現データを解析を開始した。さらなる詳細な解析を行う予定である。

混合性結合組織病について、HLA 領域の他に BLK 領域を疾患感受性領域として同定した。

高安動脈炎の新規疾患感受性領域として IL12B と MLX の二領域を同定した。ウステキヌマブは高安動脈炎の新規治療法となる可能性がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 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-RodriguezL., Rantapaa-Dahlqvist, S., Arlestig, L., Choi, 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.
- 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, I., 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.
- Terao, C., Yoshifuji, H., Ohmura, K., Murakami, K., Kawabata, D., Yurugi, K., Tazaki, J., Kinoshita, H., Kimura, A., Akizuki, M., Kawaguchi, Y., Yamanaka, H., Miura, Y., Maekawa, T., Saji, H., Mimori, T. and Matsuda, F. (2013) Association of Takayasu arteritis with HLA-B\*67:01 and two amino acids in HLA-B protein. *Rheumatol.* **52**, 1769-1774.
- 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.

5. 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.
  6. 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.
  7. 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- $\kappa$ B pathway are associated with rheumatoid arthritis in Japanese. *PLoS Genet*. 8, e1002949.
  8. 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. 学会発表
1. Yoshifuji, H., Terao, C., Murakami, K., Kawabata, D., Ohmura, K., Fujii, T., Kawaguchi, Y., Yamanaka, H. and Mimori, T. Association between HLA-B's amino acid variation and disease-susceptibility to Takayasu arteritis. American College of Rheumatology 2013, (San Diego, USA), October 27, 2013.
  2. 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-. 2012 Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, (Chiba, Japan) December 6, 2012
  3. 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. Annual Congress of The Japan Society of Human Genetics, (Tokyo, Japan), October 25, 2012.
  4. 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.
  5. 寺尾 知可史, 吉藤 元、木村 彰方、松村 貴由、大村 浩一郎、成瀬 妙子、佐藤 愛子、前島 康浩、和田 庸子、成田 一衛、川口 鎮司、山中 寿、前川 平、小川 誠司、小室 一成、永井 良三、田原 康玄、磯部 光章、三森 経世、松田 文彦 IL12B は高安動脈炎の新規疾患感受性遺伝子であり HLA-B\*52:01 と相互作用を示す 第 41 回日本臨床免疫学会、海峡メッセ下関(下関) 2013 年 11 月 28 日
  6. 寺尾 知可史, 吉藤 元、村上 孝作、川端 大介、大村 浩一郎、秋月 正史、川口 鎮司、山中 寿、三森 経世 高安動脈炎感受性と相関する 3 つの新規 HLA-B アミノ酸多型 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会 国立京都国際会館(京都) 2013 年 4 月 20 日

G. 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))  
平成23-25年度 総合研究報告書(分担研究)

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  
“質量分析装置を用いた代謝物解析”

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した。3年間のプロジェクトでは、GC-MSによる血漿中の低分子代謝物測定系を確立し、対照群となる健常者検体および難病患者検体のGC-MS測定を完了した。同時に、未同定ピークの解析をすすめ、計135代謝物の定量解析が可能となった。得られた定量データについては、健常者対照群と難病患者群での2群比較統計解析などを実施し、バイオマーカー候補を同定した。

### 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

IgG4 関連疾患(IgG4RD)および肺高血圧症(PH)の2疾患について、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との関連を解析する。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、ながはま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

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。

PHおよびIgG4RDの2疾患について、これらの難病の疾患特異的代謝物探索を目的として、各代謝物の定量データについて、難病患者検体群(IgG4RD: 25検体、PH: 45検体)と健常者対照群(302検体)との2群比較検定を行った。その結果、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。

さらに、IgG4RDについては治療介入(ステロイド投与)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みとめられた。

PHについては、慢性血栓塞栓性肺高血圧症(CTEPH)を対象とし、バルーン肺動脈形成術(BPA)による治療開始を基準として、開始前、開始後3日、7日、180日の血漿検体(39症例156検体)について解析を行った。その結果、ある有機酸については、開始後3日でその濃度が統計学的

に有意に減少している（P 値:0.0138）という結果が得られた。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みとめられた。

#### D. 考察

IgG4RD および PH の両疾患において、健常者対照群と患者群の血中代謝物の比較により、量的変動がみとめられた複数の代謝物を同定した。これらは、炎症などの病態の結果もたらされる変動なのか、疾患プロセスに基づくものなのか見極める必要があるものの、今後診断マーカーや治療ターゲットとしての応用が期待される。また、治療経過に伴って変動する代謝物については、症例数に限りはあるものの、治療効果の判定などの臨床応用へとつながるものであると考えられる。

#### E. 結論

ながはまコホートの健常者対照群、IgG4RD および PH の 2 種類の難病患者群の検体について、GC-MS による網羅的代謝物の測定を完了した。2 群の比較により、

複数のバイオマーカー候補を同定した。また、治療経過に沿った時系列解析では、変動する代謝物を同定し、治療効果の判定など臨床応用への可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### G. 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))**  
**平成 23-25 年度 総合研究報告書(分担研究)**

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：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

初年度には、健常者 302 名の被験者から血液サンプルを得た。2 年度目は、インフルエンザワクチン接種後 7 日目の健常者 298 名の被験者から血液サンプルを得た。最終年度の 3 年度目には、IgG4 関連疾患 37 名、肺高血圧症 176 名、計 213 名の被験者から血液サンプルを得た。

いずれの血液サンプルも PAXgene 採血管を用いて採取した。採取した血液から RNA を抽出し、バイオアナライザーによるクオリティチェックを行った。品質基準を満たした RNA サンプルについて、ラベ

ル化 (Cy3) 反応を行い、ターゲット RNA を作製した。色素取込について、分光光度計で評価し、ラベル化効率を確認した。ラベル化を完了したサンプルについて、アジレント社製網羅型マイクロアレイを用いて遺伝子発現データを取得し、データ解析を行った。

### (倫理面への配慮)

京大学生命研究倫理委員会の承認済

### C. 研究結果

RNA の品質評価の結果、2 年度目の 1 サンプル、3 年度目の 1 サンプルがそれぞれマイクロアレイに用いる RNA 品質基準を満たさなかった。3 年間の研究期間を通じて、健常者 302 例、インフルエンザ接種後 7 日目の健常者 297 例、IgG4 関連疾患 37 例、肺高血圧症 175 例のマイクロアレイによる遺伝子発現データを取得することができた。

初年度に集積した健常人 302 症例について、発現データに正規化処理を行い、有効データを取得し、クラスター解析と主成分分析を行い、健常人基礎データを構築した。

2 年度目には、インフルエンザワクチン接種後 7 日目の健常者 297 例を集積し、初年度の 302 例の発現データと合わせて正規化処理を行い、インフルエンザワクチン投与で発現変動する遺伝子群を同定した。これら遺伝子群の中には、特定の免疫機能に関連する遺伝子群が含まれていた。またその他、年齢を反映するマーカーについて、

年齢との相関を解析し、再現性を得ることができた。

3年度目は、難病症例となる IgG4 関連疾患例並びに肺高血圧症例をそれぞれ 37 例、135 例集積した。これらの難病症例に初年度の健常者 302 例を合わせた計 514 例の発現データに対して、正規化処理を実施した。この正規化データを用いて、健常群と IgG4 関連疾患群、肺高血圧症群で発現差の認められる遺伝子群を統計検定により抽出したところ、IgG4 関連疾患の病態関連候補因子として 830 プローブ (498 遺伝子)、肺高血圧症の病態関連候補因子 551 プローブ (294 遺伝子) の同定に成功した。続いて、抽出遺伝子群に高頻度に濃縮する生物学的機能について Gene ontology 解析により評価した。IgG4 関連疾患で発現亢進する遺伝子群には、ウイルス、細菌感染、細胞周期に関連する遺伝子群が、肺高血圧症群で発現が亢進する遺伝子群には、ウイルス感染やミトコンドリア機能に関連する遺伝子群が高頻度に含まれることが明らかとなった。

#### D. 考察

2011 年度に取得した大規模健常者データを活用することにより、2012 年度にはインフルエンザワクチン投与により発現変動する遺伝子群、2013 年度には難病である IgG4 関連疾患、肺高血圧症で特徴的に発現変動する遺伝子群の同定に成功した。インフルエンザワクチン投与で発現変動する遺伝子群には特定の免疫機能に関連する遺伝子群が多く含まれており、末梢血遺伝子発現情報がヒトの免疫系の状態を鋭敏にとらえることができる系であることが証明された。また末梢血遺伝子発現解析としては他に類のない十分な N 数で解析されているため、これら遺伝子にはヒトのワクチン免疫メカニズム寄与する重要な因子が含まれる可能性が大きいと考えられた。また IgG4 関連疾患、肺高血圧症で特徴的に発現変動する遺伝子群については、健常群に比べて発現亢進する遺伝子が多い傾向が認められ、これら病態においては免疫細胞の機能が健常者に比べて活性化した状態にあることを示唆した。また変動遺伝子群の機能的解析により、IgG4 関連疾患においてはウイルス・細菌感染、細胞周期に関連

する遺伝子群が発現亢進すること、肺高血圧症では同じくウイルス感染やミトコンドリア機能に関連する遺伝子群が発現亢進することを明らかにした。両疾患病態に微生物感染が関与する可能性を示唆した。

#### E. 結論

3 年間の研究期間を通じて、集積されたサンプルから健常者群と難病群を大規模に比較することが可能となった。また、発現データの比較から各疾患の病態関連因子候補の同定に成功した。研究代表者の所有する臨床情報と融合して大規模なデータ解析を行うことにより、より精密に、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が可能であり、非常に貴重なデータを構築することに貢献できた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Nakamura, S., Kawai, K., Takeshita, Y., Honda, M., Takamura, T., Kaneko, S., Matoba, R. and Matsubara, K. (2012) Identification of blood biomarkers of aging by transcript profiling of whole blood. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 418, 313-318.

##### 2. 学会発表

1. 中村 誠二 Identification of blood biomarkers of aging by transcript profiling of whole blood 第 35 回日本分子生物学会年会 マリンメッセ福岡 (福岡) 2012 年 12 月 12 日

#### G. 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))  
平成 23-25 年度 総合研究報告書(分担研究)

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: 国立病院機構岡山医療センター・

臨床研究部長 松原 広己

### 研究要旨

慢性血栓塞栓性肺高血圧症に対するバルーン肺動脈形成術の合併症である肺障害は、血管内超音波による病変の詳細な評価に基づいて拡張方法を決定することにより、出現頻度を著明に減少させることが可能であった。

### A. 研究目的

慢性血栓塞栓性肺高血圧症(chronic thromboembolic pulmonary hypertension: CTEPH)は、無治療の場合 3 年生存率 10%と予後不良で、特定疾患に指定されている。肺動脈血栓内膜摘除術以外に確立された治療法はないとされてきたが、われわれは、既報のバルーン肺動脈形成術(balloon pulmonary angioplasty: BPA)を改良し、血行動態の改善と死亡率の低下を実現した。最新の日本循環器学会のガイドラインでは、BPA は治療の選択肢のひとつに挙げられている。しかし、術後に肺障害が出現し、一部で重症化することが課題として残存する。そこで、肺障害の発生率の減少を目的として検討を行った。

### B. 研究方法

BPA 施行時に血管内超音波(intravascular ultrasound: IVUS)を用いて病変の評価を行い、肺障害の出現頻度や重症度との関係を検討した。

#### (倫理面への配慮)

BPA の実施については当院倫理委員会の承認を得ており、全例で治療前に書面で同意を得た。

### C. 研究結果

CTEPH の病変は、手術時摘出標本の観察に基づいて形態的に分類されているが、IVUS を用いた観察により、病変タイプにより病変部の血栓量が異なることが明らかとなった。また、この病変タイプの違いにより、BPA の成功率や合併症発生率も異なっており、血栓量の多い病変ではより合併

症発生率が高かった(ring-like stenosis ; 成功率 100%・合併症率 2%、complete obstruction; 成功率 80%・合併症率 19%)。さらに、術前の肺動脈圧が高いほど肺障害の出現率が高いことも明らかとなった。そこで、病変タイプに応じてバルーンサイズを変更し、血栓量の多い病変では小さなバルーン径のものを選択する方針とし、肺動脈圧が高い症例ではさらにバルーン径を 20%低下させることとした。

このような戦略でバルーンサイズを決定する方針をとった後、重症肺障害の発生率は 14.2%から 0.8%へと有意に低下した。

### D. 考察

BPA 施行症例を重ねるにつれて、肺障害の多くは血管障害によって引き起こされていることがわかってきた。病変タイプと血行動態を勘案して拡張方法を選択することで肺障害の出現を著減させることができた。しかしながら、これらについて注意をしてもなお、肺障害の根絶には至っていない。肺障害の出現する症例は限られており、複数回の治療に伴って肺障害が繰り返し出現する症例もあることから、未知の因子が影響していると予測される。肺障害の出現した症例について、さらに詳細な解析を加え、肺障害の根絶を目指していく必要がある。

### E. 結論

IVUS の評価に基づいて拡張方法を検討することにより、BPA の合併症である肺障害の出現頻度を減少させることが可能となった。BPA 治療の標準化と拡大につながることを期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 芹澤直紀、松原広己 (2013) III・5・忘れてはならない肺高血圧症、変貌する心不全診療 8, 30-35.
2. 下川原祐人、松原広己 (2013) 慢性血栓塞栓性肺高血圧症のカテーテル治療 *CARDIAC PRACTICE* 24, 73-76.
3. Fukumoto, Y., Yamada, N., Matsubara, H., Mizoguchi, M., Uchino, K., Yao, A., Kihara, Y., Kawano, M., Watanabe, H., Takeda, Y., Adachi, T., Osanai, S., Tanabe, N., Inoue, T., Kubo, A., Ota, Y., Fukuda, K., Nakano, T. and Shimokawa, H. (2013) Double-blind, placebo-controlled clinical trial with a rho-kinase inhibitor in pulmonary arterial hypertension. *Circ J.* 77, 2619-2625.
4. Ogawa, A., Yamadori, I., Matsubara, O. and Matsubara, H. (2013) Pulmonary tumor thrombotic microangiopathy with circulatory failure treated with imatinib. *Intern. Med.* 52, 1927-1930.

### 2. 学会発表

1. 松原広己 「慢性血栓塞栓性肺高血圧症と肺動脈バルーン拡張術」第17回日本心不

全学会学術集会 教育講演 大宮ソニックシティ (埼玉) 2013年11月29日

2. 松原広己 「肺高血圧症治療の進歩」日本呼吸器学会第34回生涯教育講演会 東京国際フォーラム (東京) 2013年4月18日
3. Matsubara, H. Innovative approaches: balloon pulmonary angioplasty. 6th Annual Central European PH Meeting (Wien, Austria) November 23, 2013.
4. Ogawa, A., Miyaji, K. and Matsubara, H. Clinical prediction rule for identifying patients with pulmonary veno-occlusive disease/pulmonary capillary hemangiomatosis. European Society of Cardiology Congress 2013 (Amsterdam, Netherlands) August 31, 2013.

## G. 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