

## V. 解析プロトコル

## IgG4 関連疾患統合オミックス解析 プロトコル

本研究は、我が国から提唱された新規疾患概念である IgG4 関連疾患の遺伝的背景を解明するとともに、IgG4 関連疾患の診断、予後予測が可能なバイオマーカーの探索を目的とする。

### <1> 背景

IgG4 関連疾患 (IgG4RD) は我が国から提唱された概念であり、血中 IgG4 の上昇、IgG4 陽性形質細胞が様々な組織へ浸潤する疾患を言う。副腎皮質ステロイドに良好な反応性を示すことが特徴の一つである。本疾患は、歴史的には自己免疫性膵炎 (AIP) における IgG4 上昇の報告から始まり、その後、シェーグレン症候群の一型であるミクリッツ病や、腹部の腫瘍と鑑別が必要な後腹膜線維症といった疾患群においても IgG4 の上昇、IgG4 陽性形質細胞の浸潤が報告されるようになり、疾患の包括的概念として IgG4RD が提唱されるにいたった。一方で、IgG4RD は新規の疾患概念であるためその病態の解明はほとんど進んでいないのが現状である。このような新規疾患の黎明期において、その遺伝的背景や病因学的背景を明らかにするのは、今後の診断・治療の標準化において極めて重要である。

### <2> 目的

以下の解明を目的とする。

1. IgG4RD 共通のあるいは群別の遺伝因子の同定
2. AIP 患者における末梢血白血球の転写物 (トランスクリプトーム) および末梢血中代謝物 (メタボローム) の網羅的測定によるそれらのプロファイルの解析と、健常者対照群との比較による、疾患特異的転写物、代謝物の同定
3. 統合オミックス解析による AIP のステロイド投与前後で変化する転写物、代謝物の同定
4. 統合オミックス解析による AIP の再燃における予後予測因子としての中間形質バイオマーカーの同定
5. IgG4 値に影響を及ぼす遺伝因子あるいは中間形質バイオマーカーの同定

### <3> プロトコル

本解析はゲノム解析とそれに中間形質であるトランスクリプトーム、メタボロームを合わせた網羅的統合オミックス解析から構成される。

#### 1. ゲノム解析

A) 対象：2011年に提唱された診断基準に基づき診断された IgG4RD 患者。AIP、ミクリッツなど IgG4RD に包含される疾患と診断された患者を含む。

B) 目標検体数：総数 300 例を目標にする。

根拠：希少難治性疾患の発症と予後には、有病率の高い複合遺伝性疾患とは異なり、頻度は低いが相対的貢献度の高い遺伝子多型が深く関わっている可能性が指摘されている。したがって頻度の低い遺伝的変異を取りこぼさず解析することで、比較的少数の検体を用いて疾患関連遺伝子／遺伝子変異の同定が可能であると思われる。

実現可能性：現在すでに 118 例の IgG4RD の患者 DNA 検体を採取済みであり、また、検体収集施設は我が国における IgG4RD の治療をリードする医療機関で多数の患者を診療・治療しており、また関連病院からの検体提供を期待できるため、目標数に十分到達可能であると期待される。

C) 検体収集施設：京都大学医学部附属病院、関西医科大学病院およびそれらの関連施設、厚生労働省難治性疾患克服研究事業「IgG4 関連疾患に関する調査研究班」の班員が所属する医療機関

D) 集積臨床情報：IgG4RD に関する臨床情報データベースを構築し、将来の研究にも利用することを目的に、セキュリティに最大の注意をはらった上で、ウェブベースの入力システムを利用して以下の項目を収集する。

性別、発症時年齢、生活歴、既往歴、家族歴、合併症

IgG4RD 診断基準各項目、IgG4RD に包含される各疾患の診断基準各項目、ステロイド反応性、1 年以内再燃の有無

E) 検体・臨床情報収集方法：

- 1) 各検体収集施設では倫理委員会の承認を受け、説明文書・同意書を準備する。
- 2) 各施設の医師が患者来院時に説明文書にもとづいて説明したのち患者の同意を取り、同意書の原本は患者に渡し、その複写は各施設で厳重に保管する。
- 3) 生体試料、臨床情報、検体に付随する患者の匿名化 ID は、すべて京都大学医学研究科附属ゲノム医学センター研究事務局(研究事務局)で一元管理する。(図 1 参照)。

- 4) 研究事務局は、各検体収集施設と症例の組み合わせに対応する施設症例番号（一次匿名化 ID）を発行し、各施設に施設症例番号と対応するバーコードが印刷または貼付された DNA 抽出用採血管と DNA 抽出依頼伝票（4 枚綴りで、上の 2 枚は患者の氏名、カルテ ID を記入可能、下の 2 枚はそれらが複写されない）を送付する。
  - 5) 医師は、患者に施設症例番号の付いた採血管（株式会社 SRL の EDTA 入り 7ml 採血管）を渡す。DNA 抽出依頼伝票の上 2 枚は個人識別情報と一時匿名化 ID の対応表として各施設で厳重なセキュリティのもとで管理し、下の 2 枚は株式会社 SRL による採血管の回収まで保管する。
  - 6) 患者は採血管を診察後あるいは次回受診時の採血の際に検査技師あるいは看護師、医師に渡し、DNA 採血を行う。
  - 7) 株式会社 SRL は、採血済みの採血管と DNA 抽出依頼伝票の下 2 枚を回収の上、SRL にて DNA 抽出と血漿の回収を行い、施設症例番号の付いたチューブをゲノム医学センターの研究事務局に納入する。
  - 8) 研究事務局の匿名化管理者は、施設症例番号／二次匿名化 ID の対応表を作成し、DNA、血漿の入ったチューブに新たに二次匿名化 ID を付与し、検体管理室に保管する。
  - 9) 各施設からの臨床情報は、セキュリティの担保された電子媒体あるいは WEB ページを通して、施設症例番号を ID として研究事務局に送付され、二次匿名化 ID 付与の後に、ゲノム医学センターのデータサーバーに格納する。各施設への臨床情報などの問い合わせは、上の手順で匿名化管理者を通して各施設へ問い合わせる。
- F) ゲノム解析：網羅的ゲノム解析の手法をとる。具体的には、Illumina 社が販売する SNP アレイ（Infinium 5M+Exome あるいは類似のマイクロアレイ）を用いたゲノムスキャンおよび高速塩基配列決定装置を用いたゲノム中の遺伝子エクソン部分のみ（Exome）の網羅的塩基配列決定をおこなう。得られた結果の再検証は、Taqman アッセイ、限定領域の塩基配列決定などにより実施する。
- G) 統計遺伝学的解析：以下のすべての解析において、検体の集積状況に応じ、検体を疾患背景が過度に偏らないよう二群に分け、スクリーニング群と追認解析群とする。具体的手法として、アレイ上のマーカーおよび Exome 解析で同定された変異に対して、網羅的な関連解析および追認解析を実施する。対照群検体には、ゲノム医学センターですでにゲノムスキャンを終えた約 4,000 例と Exome 解析済みの 300 例を用いる。
- 1) IgG4RD 群全体と健常人対照群の比較を実施する。
  - 2) サブグループ解析として、IgG4RD の亜群（AIP やミクリッツ病）と健常人対照群との比較を実施する。

- 3) IgG4RD の亜群、性別、年齢で補正したうえで、1) と同様の解析および IgG4 値を従属変数とした回帰分析を実施する。
- 4) その他特徴的な臨床情報による分類による比較をおこなう。例えば癌合併 AIP が一定数集まる、再燃 AIP 例が一定数集まる等の場合、合併疾患や再燃の有無を指標とした二群間の比較を行う。

## 2. 統合オミックス解析

A) 対象：AIP でステロイド投与開始予定の患者

B) 目標検体数：総数 50 例を目標にする。

根拠：中間形質は effect size が大きい変化が期待できること、ステロイド投与は大きな介入であり、さらなる変化の増幅が期待できることから、時系列に沿った情報が 50 例あれば解析に耐えうると考える。

実現可能性：厚生労働省難治性疾患克服研究事業「IgG4 関連疾患に関する調査研究班」の一部の班員は 2011 年度まで「IgG4 関連全身硬化性疾患の診断法の確立と治療方法の開発に関する研究班」AIP を中心とした研究活動を行ってきた。現在においても毎年一定数の新規患者を診察・治療している。今後得られる新規の患者数は限定されるが、目標数は妥当な数と考える。

C) 検体収集施設：京都大学医学部附属病院、関西医科大学病院、札幌医科大学病院およびそれらの関連施設

D) 集積臨床情報：ゲノム解析のために収集する臨床情報と同じであるが、下記の方針に従う。

- 1) ステロイド投与は、中等量（プレドニン換算で 0.5mg/kg/day 前後）で 2 週間は継続し、その後は一週につき 5~10%程度の減量を行うが、5mg/day は維持する。
- 2) 画像評価は 1mm スライスの造影 CT 撮像で行い、腫瘤形成性病変は腫瘤の長径と短径を、びまん性腫大病変は脾臓の長径と短径を計測して評価する。
- 3) 再燃は、ステロイド投与にて画像上の改善が見られたが、その後画像にてステロイド投与前と投与後の中間より大きくなったものと定義する。

表 1 測定の時系列ポイント

	ステロイド投与開始前	ステロイド投与開始後		
		Day 30*	Day 90**	Day 365**
オミックス採血	○	○	○	○
体重	○	-	-	-
ステロイド投与量 (プレドニン換算)	○	○	○	○
IgG4 レベル	○	○	○	○
CT 画像	○	○	○	○
再燃の有無	-	○	○	○

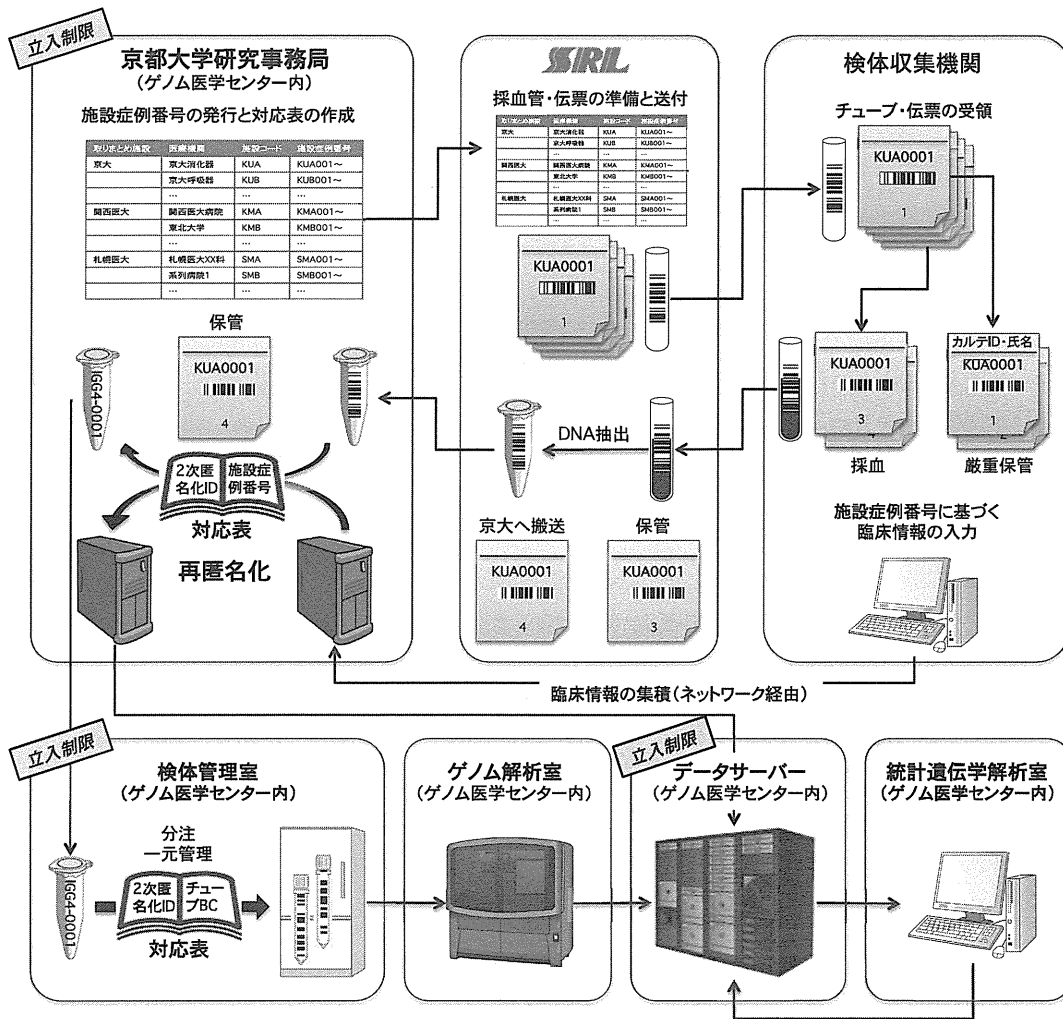
\*前後 2 週間のずれは許容する。 \*\*前後 30 日のずれは許容する。 また、Day 365 までに再燃が見られれば、その時点を終点ポイントとし、Day 365 と同様の評価を行う。

E) 検体・臨床情報収集方法：

- 1) 各検体収集施設で倫理委員会の承認を受け、説明文書・同意書を準備する。
- 2) 各施設の医師が患者来院時に説明文書にもとづいて説明したのち患者の同意を取り、同意書の原本は患者に渡し、その複写は各施設で厳重に保管する。
- 3) 生体試料、臨床情報、検体に付随する患者 ID は、すべて京都大学医学研究科附属ゲノム医学センター（ゲノム医学センター）で一元管理する。（図 1 参照）。
- 4) ゲノム医学センターの研究事務局は、各検体収集施設と症例の組み合わせに対応する施設症例番号（一次匿名化 ID）を発行し、各施設に施設症例番号と対応するバーコードが印刷または貼付された RNA 抽出用、血漿採取用採血管と RNA 抽出・血漿採取用依頼伝票（4 枚綴で、上の 2 枚は患者の氏名、カルテ ID を記入可能、下の 2 枚はそれらが複写されない）を送付する。
- 5) 医師は、患者に施設症例番号の付いた採血管（RNA は、BD 社製の PAXgene 2.5ml 採血管、血漿は株式会社 SRL の EDTA 入り 7ml 採血管）を渡す。RNA 抽出、血漿採取依頼伝票の上 2 枚は個人識別情報と一時匿名化 ID の対応表として各施設で厳重なセキュリティのもとで管理する。
- 6) PAXgene 採血には専用ホルダーと翼状針が必要であるため、翼状針による垂直採血を行う。血漿採取も同じホルダーを利用できるため、複数回の穿刺は不要である。
- 7) 表 1 で示された時系列に沿って複数回の採血を行う。血漿を採取した採血管は-20℃（可能であれば-80℃）に保存、PAXgene 採血管はマニュアルに従い内容物をよく混和した後室温で最低 2 時間放置し、その後-20℃で一時保存し、-20℃を保って京都大学ゲノム医学センター研究事務局へ搬送する。

- 8) 研究事務局の匿名化管理者は、施設症例番号（一時匿名化 ID）／二次匿名化 ID の対応表に則り、採血管に新たに二次匿名化 ID を付与し、検体管理室に保管する。
- 9) 各施設からの臨床情報は、セキュリティの担保された電子媒体あるいは WEB ページを通して、施設症例番号を ID として研究事務局に送付され、二次匿名化 ID 付与の後に、ゲノム医学センターのデータサーバーに格納する。各施設への臨床情報などの問い合わせは、上の手順で匿名化管理者を通して各施設へ問い合わせる。ゲノムセンターで匿名化担当者が二次匿名化 ID を付与し、検体を保管・管理する。一次匿名化 ID と二次匿名化 ID の対照表はゲノムセンター匿名化担当者が管理し、ゲノムセンターのシステムに入力する。
- F) 測定：末梢血白血球の遺伝子発現解析は、Agilent 社が販売する遺伝子発現アレイを用い、代謝物の網羅的解析には、株式会社島津製作所製のガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー（GC-MS）を用いて測定する。また解析に必要な対照群検体のデータは、すでに上述のアレイ及び分析機器を用いて測定済みの健常者 300 例を利用する。転写物解析は、将来的には高速シーケンサーを利用した転写物の塩基配列決定法による網羅的解析を試みる。
- G) 統計遺伝学的解析：発現解析アレイで測定された（将来的には、高速塩基配列決定装置を用いた転写物の網羅的塩基配列解析）転写物に対しての網羅的な解析を実施する。転写物の発現プロファイルとゲノム上の遺伝的変異の量的関連解析（QTL 解析）を実施し、特定の遺伝子の発現に影響する遺伝子変異の同定を試みる。  
GC-MS で測定された代謝物に関しても、同様の QTL 解析を実施し、末梢血中の代謝物の量に影響を及ぼす遺伝的変異の同定を試みる。
- 1) AIP と健常者対照群との比較
  - 2) AIP 診断後の患者の時系列臨床情報とオミックスプロファイル情報を用いた病態の比較解析
    - Day 0 と Day 30 の比較で、ステロイド投与前後のオミックスプロファイルの比較で、ステロイドの影響を解析する。
    - Day 0、Day 30、Day 90、Day 365 の比較で、再燃患者について、再燃時のオミックスプロファイルが介入前と異なるかどうか、ステロイドの影響がどれほど残っているのかを検討し、また再燃に関連のある因子を探索する。
  - 3) 性別、年齢で補正したうえで、IgG4 値を従属変数とした回帰分析
  - 4) AIP の予後予測因子の探索  
採血項目、ゲノム変異、転写物、代謝物の網羅的解析情報を合わせた統合オミックス解析により、AIP の予後・再燃予測モデルの構築を試みる。

図1 研究における生体試料と臨床情報の流れ





## 肺高血圧症統合オミックス解析 プロトコル

本研究は難治性病態である肺高血圧症の遺伝的背景を解明するとともに、慢性血栓塞栓性肺高血圧症の診断、予後予測が可能なマーカーの探索を目的とする。

### <1> 背景

肺高血圧症（PH）は心臓と肺を結ぶ肺動脈の圧力が上昇した状態で、平均肺動脈圧 25mmHg 以上の状態を言う。PH の治療は近年に至るまで有効な方法がほとんどなく、致命的な難治性病態の代表的存在であった。近年、PH の分類（後述）、病態解明に基づいた治療法の進歩により、徐々に生存率は高まっているが、未だに難治性病態であることに変わりはない。一方、PH は種々の疾患を包含した総称であり、その疾患概念の分類は、2003 年のベニス分類、2008 年のダナポイント分類へと変遷した。現在、ダナポイント分類に基づいた細分化が広く受け入れられている（表 1）。

PH の疾患感受性遺伝子として、*BMP2* や *KCNA5* が知られているが、それらは疾患に関わる遺伝因子全体のごく一部しか説明できていない。PH の遺伝因子の解明が十分に進んでいない原因として、PH がありふれた疾患ではなく症例数を集めるのが容易でないこと、また種々の疾患を含んだ総称であり、その概念が近年になって整理されたため、これまでの解析では遺伝因子が均一でない集団を一括で解析してしまっている可能性があることが挙げられる。

PH の内科的治療は、エンドセリン受容体拮抗薬、フォスフォジエステラーゼ阻害薬、プロスタグランジン製剤等が用いられる一方で、慢性血栓塞栓性肺高血圧症（CTEPH）の場合はバルーン肺動脈形成術（BPA）が著効し、治療法の選択肢が大きく異なる。よって、PH の治療にあたっては、BPA の適応がある CTEPH かどうかの判断が重要であるが、その診断は容易でなく、CTEPH に精通した熟練した循環器医の下で、心臓カテーテル検査や肺血流シンチグラムを受ける必要がある。BPA 後の再発も多く、BPA 後のフォローの際も同様の問題がある。CTEPH の早期診断、BPA の効果判定、予後予測が可能であれば、PH の診療や治療に劇的なパラダイムシフトをもたらし、患者にとっての福音となることが期待される。

## <2> 目的

以下の解明を目的とする。

6. PH 共通のあるいは群別の遺伝因子の同定
7. CTEPH/膠原病性の肺動脈性肺高血圧 (PAH) の末梢血白血球の転写物 (トランスクリプトーム) および末梢血中代謝物 (メタボローム) の網羅的測定によるそれらのプロファイルの解析と、健常者対照群との比較による、疾患特異的転写物、代謝物の同定
8. CTEPH と膠原病性 PAH のトランスクリプトーム、メタボローム比較による疾患特異的転写物、代謝物の同定
9. CTEPH における BPA による介入の前後でのトランスクリプトーム、メタボロームの変化を指標とした、CTEPH の予後予測バイオマーカーの同定

## <3> プロトコル

本解析はゲノム解析とそれに中間形質であるトランスクリプトーム、メタボロームを合わせた網羅的統合オミックス解析から構成される。

### 1. ゲノム解析

- A) 対象：ダナポイント分類に基づき診断された PH 症例
- B) 目標検体数：総数 500 例を目標にする。

根拠：希少難治性疾患の発症と予後には、有病率の高い複合遺伝性疾患とは異なり、頻度は低い相対的貢献度の高い遺伝子多型が深く関わっている可能性が指摘されている。したがって頻度の低い遺伝的変異を取りこぼさず解析することで、比較的少数の検体を用いて疾患関連遺伝子/遺伝子変異の同定が可能であると思われる。

実現可能性：現在すでに 50 例以上の膠原病性 PAH の患者 DNA 検体を採取済みであり、また、検体収集施設は我が国における PH の治療をリードする医療機関であり、多数の患者を診療・治療しているため、目標数に十分到達可能であると期待される。

- C) 検体収集施設：京都大学医学部附属病院、国立病院機構岡山医療センター、国立循環器病センター、厚生労働省難治性疾患克服研究事業「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」の班員が所属する医療機関
- D) 集積臨床情報：性別、年齢（発症時、DNA 採取時）、ダナポイント分類による分類、最大の肺動脈平均圧

E) 生体試料・臨床情報の収集と管理：

- 10) 各検体収集施設では倫理委員会の承認を受け、説明文書・同意書を準備する。
  - 11) 各施設の医師が患者来院時に説明文書にもとづいて説明したのち患者の同意を取り、同意書の原本は患者に渡し、その複写は各施設で厳重に保管する。
  - 12) 生体試料、臨床情報、検体に付随する患者の匿名化 ID は、すべて京都大学医学研究科附属ゲノム医学センター研究事務局（研究事務局）で一元管理する。（図 1 参照）。
  - 13) 研究事務局は、各検体収集施設と症例の組み合わせに対応する施設症例番号（一次匿名化 ID）を発行し、各施設に施設症例番号と対応するバーコードが印刷または貼付された DNA 抽出用採血管と DNA 抽出依頼伝票（4 枚綴で、上の 2 枚は患者の氏名、カルテ ID を記入可能、下の 2 枚はそれらが複写されない）を送付する。
  - 14) 医師は、患者に施設症例番号の付いた採血管（株式会社 SRL の EDTA 入り 7ml 採血管）を渡す。DNA 抽出依頼伝票の上 2 枚は個人識別情報と一時匿名化 ID の対応表として各施設で厳重なセキュリティのもとで管理し、下の 2 枚は株式会社 SRL による採血管の回収まで保管する。
  - 15) 患者は採血管を診察後あるいは次回受診時の採血の際に検査技師あるいは看護師、医師に渡し、DNA 採血を行う。
  - 16) 株式会社 SRL は、採血ずみの採血管と DNA 抽出依頼伝票の下 2 枚を回収の上、SRL にて DNA 抽出と血漿の回収を行い、施設症例番号の付いたチューブをゲノム医学センターの研究事務局に納入する。
  - 17) 研究事務局の匿名化管理者は、施設症例番号／二次匿名化 ID の対応表を作成し、DNA、血漿の入ったチューブに新たに二次匿名化 ID を付与し、検体管理室に保管する。
  - 18) 各施設からの臨床情報は、セキュリティの担保された電子媒体あるいは WEB ページを通して、施設症例番号を ID として研究事務局に送付され、二次匿名化 ID 付与の後に、ゲノム医学センターのデータサーバーに格納する。各施設への臨床情報などの問い合わせは、上の手順で匿名化管理者を通して各施設へ問い合わせる。
- F) ゲノム解析：網羅的ゲノム解析の手法をとる。具体的には、Illumina 社が販売する SNP アレイ（Infinium 5M+Exome あるいは類似のマイクロアレイ）を用いたゲノムスキャンおよび高速塩基配列決定装置を用いたゲノム中の遺伝子エクソン部分のみ（Exome）の網羅的塩基配列決定をおこなう。得られた結果の再検証は、Taqman アッセイ、限定領域の塩基配列決定などにより実施する。
- G) 統計遺伝学的解析：以下のすべての解析において、検体の集積状況に応じ、検体を疾患背景が過度に偏らないよう二群に分け、スクリーニング群と追認解析群とする。

- 5) PH 群全体と健常人対照群の比較をおこなう。具体的手法として、アレイ上のマーカーおよび Exome 解析で同定された変異に対して、網羅的な関連解析および追認解析を実施する。対照群検体には、ゲノム医学センターですでにゲノムスキャンを終えた約 4,000 例と Exome 解析済みの 300 例を用いる。
- 6) サブグループ解析として、ダナポイント分類に基づいた PH の亜群と健常人対照群との比較を、1) と同様の方法で実施する。
- 7) ダナポイント分類による亜群、性別、年齢で補正したうえで、1) と同様の解析および最大肺高血圧を従属変数とした回帰分析を実施する。

## 2. 統合オミックス解析

A) 対象:CTEPHでBPA予定の患者 膠原病性PAHで心臓カテーテル検査予定の患者。  
ただし、膠原病性 PAH の症例の集積が難しければ、ダナポイント分類の他の亜群に変更することがあり得る

B) 目標検体数：総数 50 例を目標にする。

根拠：中間形質は effect size が大きい変化が期待できること、BPA は大きな介入であり、さらなる変化の増幅が期待できることから、時系列に沿った情報が 50 例あれば解析に耐えうると考える。

実現可能性：国立病院機構岡山医療センターは CTEPH の日本トップの経験を持つ医療施設であり、国立循環器病センターは PAH が集まる施設であるため、実現可能であると考える。

C) 検体収集施設：京都大学医学部附属病院、国立病院機構岡山医療センター、国立循環器病センター

D) 集積臨床情報：性別、年齢(発症時、検体採取時)、ダナポイント分類による分類、6 分間歩行試験、NYHA 分類、心臓カテーテル検査データ（右房圧，心拍出量，肺血管抵抗、肺動脈圧）、術後肺水腫の有無、採血検査項目（BNP、PT、APTT、d-dimer）

表 1 測定の時系列ポイント

	BPA（または心臓カテーテル）前	BPA（または心臓カテーテル）後		
		Day 3	Day 7	Day 180*
オミックス採血	○	○	○	○
性別・年齢・体重	○	体重	体重	体重
6分間歩行試験	○	-	-	○
NYHA 分類	○	-	-	○
右心系のカテーテルデータ、右房圧、心拍出量、肺血管抵抗	○（カテーテル施行時）	-	-	○
術後肺水腫の有無	-	○	○	-
投薬内容	○	○	○	○
BNP、PT、APTT、d-dimer	○	○	○	○

\*前後 30 日のずれは許容する

E) 検体・臨床情報収集方法：

- 10) 各検体収集施設で倫理委員会の承認を受け、説明文書・同意書を準備する。
- 11) 各施設の医師が患者来院時に説明文書にもとづいて説明したのち患者の同意を取り、同意書の原本は患者に渡し、その複写は各施設で厳重に保管する。
- 12) 生体試料、臨床情報、検体に付随する患者の匿名化 ID は、すべて京都大学医学研究科附属ゲノム医学センター（ゲノム医学センター）で一元管理する。（図 1 参照）。
- 13) ゲノム医学センターの研究事務局は、各検体収集施設と症例の組み合わせに対応する施設症例番号（一次匿名化 ID）を発行し、各施設に施設症例番号と対応するバーコードが印刷または貼付された RNA 抽出用、血漿採取用採血管と RNA 抽出・血漿採取用依頼伝票（4 枚綴で、上の 2 枚は患者の氏名、カルテ ID を記入可能、下の 2 枚はそれらが複写されない）を送付する。
- 14) 医師は、患者に施設症例番号の付いた採血管（RNA は、BD 社製の PAXgene 2.5ml 採血管、血漿は株式会社 SRL の EDTA 入り 7ml 採血管）を渡す。RNA 抽出、血漿採取依頼伝票の上 2 枚は個人識別情報と一時匿名化 ID の対応表として各施設で厳重なセキュリティのもとで管理する。
- 15) PAXgene 採血には専用ホルダーと翼状針が必要であるため、翼状針による垂直採血を行う。血漿採取も同じホルダーを利用できるため、複数回の穿刺は不要である。
- 16) 表 1 で示された時系列に沿って複数回の採血を行う。血漿を採取した採血管は-20℃（可能であれば-80℃）に保存、PAXgene 採血管はマニュアルに従い内容物をよく混和した後室温で最低 2 時間放置し、その後-20℃で一時保存し、-20℃を保って京都大学ゲノム医学センター研究事務局へ搬送する。

- 17) 研究事務局の匿名化管理者は、施設症例番号（一時匿名化 ID）／二次匿名化 ID の対応表に則り、採血管に新たに二次匿名化 ID を付与し、検体管理室に保管する。
- 18) 各施設からの臨床情報は、セキュリティの担保された電子媒体あるいは WEB ページを通して、施設症例番号を ID として研究事務局に送付され、二次匿名化 ID 付与の後に、ゲノム医学センターのデータサーバーに格納する。各施設への臨床情報などの問い合わせは、上の手順で匿名化管理者を通して各施設へ問い合わせる。ゲノムセンターで匿名化担当者が二次匿名化 ID を付与し、検体を保管・管理する。一次匿名化 ID と二次匿名化 ID の対照表はゲノムセンター匿名化担当者が管理し、ゲノムセンターのシステムに入力する。
- F) 測定：末梢血白血球の遺伝子発現解析は、Agilent 社が販売する遺伝子発現アレイを用い、代謝物の網羅的解析には、株式会社島津製作所製のガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー（GC-MS）を用いて測定する。また解析に必要な対照群検体のデータは、すでに上述のアレイ及び分析機器を用いて測定済みの健常者 300 例を利用する。転写物解析は、将来的には高速シーケンサーを利用した転写物の塩基配列決定法による網羅的解析を試みる。
- G) 統計遺伝学的解析：発現解析アレイで測定された（将来的には、高速塩基配列決定装置を用いた転写物の網羅的塩基配列解析）転写物に対しての網羅的な解析を実施する。転写物の発現プロファイルとゲノム上の遺伝的変異の量的関連解析（QTL 解析）を実施し、特定の遺伝子の発現に影響する遺伝子変異の同定を試みる。GC-MS で測定された代謝物に関しても、同様の QTL 解析を実施し、末梢血中の代謝物の量に影響を及ぼす遺伝的変異の同定を試みる。
- 1) CTEPH 群と健常人対照群との比較
  - 2) 膠原病性 PAH あるいは他のダナポイント分類に基づいた PH 群の亜群と健常人対照群との比較
  - 3) CTEPH 群と膠原病性 PAH あるいは他のダナポイント分類に基づいた PH 群の亜群との比較
  - 4) ダナポイント分類による亜群、性別、年齢で補正したうえで、肺血圧を従属変数とした回帰分析

以下の解析においても、上と同様に発現解析アレイまたは高速塩基配列決定装置を用いた転写物の解析情報と、GC-MS による代謝物の測定情報を用いて実施する。

- 5) CTEPH 群における、転写物、代謝物の時系列の比較
  - BPA 前後（Day 0 と Day 3、Day 0 と Day 7）の比較で、BPA による転写物、代謝物の影響を調査する。心臓カテーテルによる侵襲の影響は、他の膠原病における介入

のデータにおける同タイムポイントの比較で補正する。

- Day 7 と Day 180 : 再発の有無で検体をグループ分けし、予後を予測する転写物、代謝物を探索する。
  - Day 0 と Day 180 : 介入前と再発時のオミックスプロファイルの比較および BPA による侵襲の影響を評価する。
- 6) 他の膠原病群における、時系列の比較
- 心臓カテーテル前後 (Day 0 と Day 3、Day 0 と Day 7) の比較により、心臓カテーテルによる侵襲の影響を評価する。
  - Day 7 と Day 180、Day 0 と Day 180: 肺動脈圧の変動に関連のある因子を探索する。
- 7) 薬剤による末梢血白血球の転写および血中の代謝物への量的影響
- Day 0、Day 7、Day 180 における転写物及び代謝物は、心臓カテーテルによる介入前後の安定化した状態であると考え、肺高血圧症に対する薬剤の影響を解析する。
- 8) CTEPH の予後予測因子の探索
- 採血項目、ゲノム変異、転写物、代謝物の網羅的解析情報を合わせた統合オミックス解析により、CTEPH の予後・再発予測モデルの構築を試みる。

図1 研究における生体試料と臨床情報の流れ

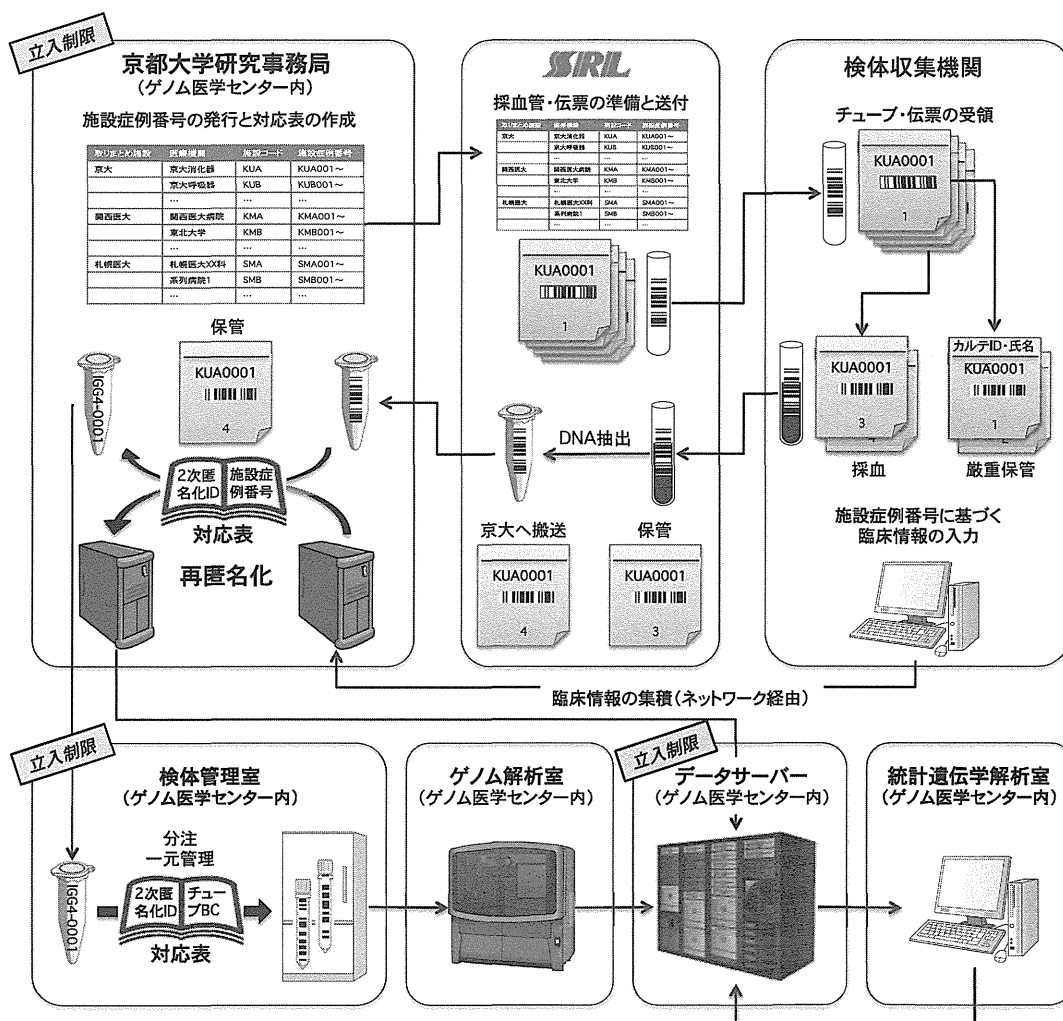




表 1 肺高血圧症 (PH) の臨床分類 (Dana Point 分類 2008 年)

1. 肺動脈性肺高血圧症 (Pulmonary Arterial Hypertension : PAH)
  - 1.1. 特発性 (Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension : IPAH)
  - 1.2. 遺伝性 (Heritable)
    - 1.2.1. BMPR2
    - 1.2.2. ALK1, endoglin (with or without hereditary hemorrhage telangiectasia)
    - 1.2.3. 不明 (Unknown)
  - 1.3. 薬物/毒物誘発性
  - 1.4. 各種疾患に伴う肺動脈性肺高血圧症 (Associated with PAH : APAH)
    - 1.4.1. 膠原病
    - 1.4.2. HIV 感染
    - 1.4.3. 門脈圧亢進症
    - 1.4.4. 先天性シャント性心疾患
    - 1.4.5. 住血吸虫症
    - 1.4.6. 慢性溶血性貧血
  - 1.5. 新生児遷延性肺高血圧症 (Persistent pulmonary hypertension of the newborn)
- 1'. 肺静脈閉塞性疾患/肺毛細血管腫症 (Pulmonary veno-occlusive disease : PVOD/  
Pulmonary capillary hemangiomatosis : PCH)
2. 左心疾患による肺高血圧症 (PH owing to left heart disease)
3. 呼吸器疾患および/または低酸素血症による肺高血圧症 (PH owing to lung disease  
and/or hypoxemia)
4. 慢性血栓塞栓性肺高血圧症 (Chronic thromboembolic pulmonary hypertension :  
CTEPH)
5. 原因不明および/または複合的要因による肺高血圧症 (PH with unclear  
multifactorial mechanisms)
  - 5.1. 血液疾患 (Hematologic disorders) : myeloproliferative disorders, splenectomy
  - 5.2. 全身性疾患 (Systemic disorders) : sarcoidosis, pulmonary Langerhans cell  
histiocytosis, lymphangiomyomatosis, neurofibromatosis, vasculitis
  - 5.3. 代謝疾患 (Metabolic disorders) : glycogen storage disease, Gaucher disease,  
thyroid disorders
  - 5.4. その他 (Others) : tumoral obstruction, fibrosing mediastinitis, chronic renal  
failure on dialysis

## VI. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究代表者：松田 文彦

雑 誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌	巻号	ページ	出版年
Okada, Y. <i>et al.</i> (共著者97人中95番目)	Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery.	<i>Nature</i>	506	376-381	2014
Tanaka, K. <i>et al.</i> (共著者12名中12番目)	Significant association between <i>CYP3A5</i> polymorphism and blood concentration of tacrolimus in patients with connective tissue diseases.	<i>J. Hum. Genet.</i>	59	107-109	2014
Yamakawa, N. <i>et al.</i> (共著者21人中19番目)	A clinical, pathological and genetic characterization of methotrexate-associated lymphoproliferative disorders.	<i>J. Rheumatol.</i>	41	293-299	2014
Yamamoto, H. <i>et al.</i> (共著者15人中14番目)	Novel germline mutation in the transmembrane domain of HER2 in familial lung adenocarcinomas.	<i>J. Natl. Cancer Inst.</i>	106	djt338	2014
Terao, C. <i>et al.</i> (共著者13名中12番目)	Quantitative variation in plasma angiotensin-I converting enzyme activity shows allelic heterogeneity in the ABO blood group locus.	<i>Ann. Hum. Genet.</i>	77	465-471	2013
Terao, C. <i>et al.</i> (共著者32名中32番目)	Two susceptibility loci to Takayasu arteritis reveal a synergistic role of the IL12B and HLA-B regions in a Japanese population.	<i>Am. J. Hum. Genet.</i>	93	289-297	2013
Plenge, R. M. <i>et al.</i> (共著者19名中17番目)	Crowdsourcing genetic prediction of clinical utility in the Rheumatoid Arthritis Responder Challenge.	<i>Nat. Genet.</i>	45	468-469	2013
Cui, J. <i>et al.</i> (共著者56名中19番目)	Genome-wide association study and gene expression analysis identifies <i>CD84</i> as a predictor of response to etanercept therapy in rheumatoid arthritis.	<i>PLoS Genet.</i>	9	e1003394	2013
Terao, C. <i>et al.</i> (共著者18名中15番目)	Three groups in the 28 joints for rheumatoid arthritis synovitis - analysis using more than 17,000 assessments in the KURAMA database.	<i>PLoS One</i>	8	e59341	2013
Yoshimura, K., Nakayama, T., Sekine, A., Matsuda, F., Kosugi, S., Sugino, Y., Yoshimura, K. and Ogawa, O.; Nagahama Cohort Research Group	Prevalence of postmicturition urinary incontinence in Japanese men: Comparison with other types of incontinence.	<i>Int. J. Urol.</i>	20	911-916	2013
Jia, W. H. <i>et al.</i> (共著者33人中19番目)	Genome-wide association analyses in east Asians identify new susceptibility loci for colorectal cancer.	<i>Nat. Genet.</i>	45	191-196	2013

Terao, C. <i>et al.</i> (共著者20人中19番目)	<i>PLD4</i> as a novel susceptibility gene for systemic sclerosis in a Japanese population.	<i>Arthritis Rheum.</i>	65	472-480	2013
Myouzen, K. <i>et al.</i> (共著者19名中11番目)	Functional variants in <i>NFKBIE</i> and <i>RTKN2</i> involved in activation of the NF- $\kappa$ B pathway are associated with rheumatoid arthritis in Japanese.	<i>PLoS Genet.</i>	8	e1002949	2012
Terao, C. <i>et al.</i> (共著者21人中20番目)	ACPA-negative RA consists of two genetically distinct subsets based on RF positivity in Japanese.	<i>PLoS One</i>	7	e40067	2012
Kawaguchi, T. <i>et al.</i> (共著者22名中21番目)	Genetic polymorphisms of the human PNPLA3 gene are strongly associated with severity of non-alcoholic fatty liver disease in Japanese.	<i>PLoS One</i>	7	e38322	2012
Okada, Y. <i>et al.</i> (共著者51名中50番目)	Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population.	<i>Nature Genet.</i>	44	511-517	2012
Kato, L., Beguma, N. A., Burroughs, M., Doi, T., Kawai, J., Daub, C. O., Kawaguchi, T., Matsuda, F., Hayashizaki, Y. and Honjo, T.	Nonimmunoglobulin target loci of activation-induced cytidine deaminase (AID) share unique features with immunoglobulin genes.	<i>Proc. Natl., Acad. Sci. U. S. A.</i>	109	2479-2484	2012
Okada, Y. <i>et al.</i> (共著者44名中32番目)	A genome-wide association study identified <i>AFF1</i> as a susceptibility locus for systemic lupus erythematosus in Japanese.	<i>PLoS Genet.</i>	8	e1002455	2012
Matsuse, M. <i>et al.</i> (共著者16名中15番目)	The <i>FOXE1</i> and <i>NKX2-1</i> loci are associated with susceptibility to papillary thyroid carcinoma in the Japanese population.	<i>J. Mod. Genet.</i>	48	645-648	2011
Ratanajaraya, C. <i>et al.</i> (共著者11名中11番目)	A polymorphism of the <i>POLG2</i> gene is genetically associated with the invasiveness of urinary bladder cancer in Japanese males.	<i>J. Hum. Genet.</i>	56	572-576	2011
Meziani, R. <i>et al.</i> (共著者22名中22番目)	A trans-ethnic genetic study of rheumatoid arthritis identified <i>FCGR2A</i> as a candidate common risk factor in Japanese and European populations.	<i>Mod. Rheumatol.</i>	22	52-58	2011
Terao, C. <i>et al.</i> (共著者20名中20番目)	Myelin basic protein as a novel genetic risk factor in rheumatoid arthritis-A genome-wide study combined with immunological analyses.	<i>PLoS One</i>	6	e20457	2011
Nakata, I. <i>et al.</i> (共著者15名中14番目)	Association between the <i>SERPING1</i> gene and age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy in Japanese.	<i>PLoS One</i>	6	e19108	2011