

201331009A

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

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

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小室 一成

(東京大学大学院)

平成26(2014)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

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

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小室 一成

(東京大学大学院)

平成26(2014)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

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.....	3
小室一成	

II. 分担研究報告

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.....	15
澤 芳樹	

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.....	23
油谷浩幸	

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.....	29
朝野仁裕	

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.....	37
山崎 悟	

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.....	41
李 鍾國	

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.....	45
扇田久和	

III. 研究成果の刊行物・別刷	49
Evaluation of intramitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014. 111(1):273-8.	51
Noninvasive and quantitative live imaging reveals a potential stress-responsive enhancer in the failing heart. FASEB J. 2014. 28, 1870–1879.	67
Comprehensive metagenomic approach for detecting causative microorganisms in culture-negative infective endocarditis International Journal of Cardiology 2014. 172. e288–e289.	81
Aberrantly methylated genes in human papillary thyroid cancer and their association with BRAF/RAS mutation. Front Genet. 2013 Dec 5;4:271.	83
Mutational Analysis Reveals the Origin and Therapy-Driven Evolution of Recurrent Glioma. Science. 2014. 343 (10), 189-193.	94
Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms Nature Genetics 2013. 45 (10). 1232-1237.	100
Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma Nature Genetics 2013. 45 (8). 860-867.	108
Enhanced Survival of Transplanted Human Induced Pluripotent Stem Cell–Derived Cardiomyocytes by the Combination of Cell Sheets With the Pedicled Omental Flap Technique in a Porcine Heart Circulation. 2013. 128. S87-S94	119

I . 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)

総括研究報告書

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

研究代表者 小室一成 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

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した。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。研究代表者及び分担者らが担当した厚生労働省難治性疾患克服研究事業における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。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。

そこで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。具体的には、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の利用、そして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るよう研究を進める。

研究分担者

澤 芳樹
大阪大学大学院医学系研究科
教授

油谷浩之
東京大学先端科学技術研究センター
教授

李 鍾國
大阪大学大学院医学系研究科
准教授

扇田久和
滋賀医科大学 生化学・分子病態
生化学講座 教授

朝野仁裕
大阪大学大学院医学系研究科
助教

山崎 悟
国立循環器病研究センター
室長

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全てが明らかとは限らない。一方早期治療と予後改善をもたらす社会的、経済的効果は計り知れないものがある。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。既存のシーズ候補のみならず、拠点施設と連携し複数の未解析家系から迅速に新規遺伝子同定を行う本ゲノム創薬研究は、今後の臨床実用化研究のモデルとなり得る。

難治性循環器疾患の原因遺伝子は多岐にわたり未説明も多く、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実用化診断治療薬となる分子標的を見出すことを目標とする。

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) 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

ヒトゲノム解析の説明と同意を得た心血管系難治性疾患患者を解析対象者とし、遺伝性が濃厚な家系症例から順に当初の目標症例数を越えているため、現在の頻度を引き続き、全ての心筋症、頻脈性不整脈(家族性突然死を含む)、血管疾患の症例収集を行う。目標症例数には上限を設けず、遺伝性循環器疾患を疑うものを中心に症例収集を行う。また、家系ではなくとも、孤発症例のうち、二次性心筋症を除外したものから

最終的には約 100 症例を目標に検体収集を行う

2) 実臨床への普及実用化が可能なゲノム解析システムのモデル構築

当初、Affymetrics 社製 Chip 技術による公知遺伝子変異の迅速かつ低コストの効率良い鑑別法となり得る可能性の追究が当初の目的であったが、次世代ゲノム解析技術の進歩と低コスト化により、proband に対しての解析には、全 Exome 解析を行うことが十分可能となり、むしろその方がコスト的にも有利であると判断された。さらに、ゲノムワイドに候補遺伝子の変異を探索するため、全 Exome 解析の実施が適切であるかについて検証することで、一次スクリーニング検査としての方法を確立する。

3) 次世代遺伝子解析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 Data Reference の蓄積にも協力しあいながら、本研究に適した LINUX によるスクリプトを構築できるような、解析協力体制を敷く。

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、オープンソースを中心とした特殊ソフトウェアを導入し、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、スクリプトを構築する。上記解析システムを用いながら、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う。また、家系に関してはゲノムの組み換え情報も利用し、遺伝子を同定するためにマイクロサテライトマーカーによるポジショナルクローニングも併用しながら、疾患特異的な原因遺伝子座の同定を行う。

2. ゲノム情報の臨床実用化(ゲノム創薬、診断法開発と細胞治療への応用)

1) Genotype から Phenotype へのフィードバックによる臨床データの再検証

変異解析を行う上で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り、特に原因不明の心筋症などの多い本研究分野において、臨床データの再整理は欠かせない。そこで本研究において同定した心筋症発症に関わる新規遺伝子に対し、想定される疾患群、症例のゲノムを用いて、それら遺伝子変異の出現頻度について再度検証を行うとともに、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。遺伝子変異が同定された症例と類似の臨床病型を示す症例を中心に、あらためて遺伝子変異の検定を行う。

2)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。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。そこで本研究においては、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。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。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(イヌ)に至るまでの生理機能解析、病態解析を行う。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。

3)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

本研究において同定する新規遺伝子の生理活性の有無の検索を行うと同時に、Nano-LC MS 解析による標的分子探索も並行して行う。有意な標的分子も得た場合についても今後の創薬開発を目的とした計画を進めるため、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。

具体的には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。

4)ゲノム創薬へ向けたヒトiPS細胞による検証を併せた治療標的リガンド開発と臨床実用化

同定し得た標的リードに対するリガンド探索を行い、創薬を目指す。同定された遺伝子変異を持つヒト細胞を用いて、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を行う。

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を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。

4) 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) 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

特殊な心不全臨床病態を有するゲノム解析対象症例の蓄積は計画通り進み、遺伝性疾患を疑う家系としては心筋症・不整脈合わせて、68 家系・164 症例、の症例を収集した。症例提供協力施設も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。また、家系ではなくとも、孤発症例のうち、二次性心筋症を除外したもので約 150 症例の検体収集を行った(大阪大学と協同収集)。

2) 実臨床への普及実用化が可能なゲノム解析システムのモデル構築

本研究は未知原因遺伝子の新規変異探索を主としているため、既知原因遺伝子内の既知変異、未知変異に関する変異同定、およびその家系の除外による未知遺伝子変異を有すると推定される家系の抽出を効率良く行う事が必要である。

研究開始当初は次世代シーケンサーを用いた全 Exome 解析に関する日本の variant database が公開されていないため、先行して in-house の variant database を持つことを目的として、疾患群ではあるものの、164 症例の全 Exome 解析を行った。さらに得られた fastq ファイル形式のデータをもとに Linux サーバーシステムを用いてバリエーション検出ができるパイプラインを

既存のスク립トと独自開発のスク립トを組み合わせ、遺伝性心疾患既知遺伝子もリスト化した上で、心血管特異的に発現する遺伝子の同定を効率良く行うことに適したパイプラインを構築した。

既にマッピング、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パイプラインは既存オープンソースのスク립トに本解析に沿ったスク립トも加え、独自のパイプラインとして構築を完了した。また、企業共同開発とともに、アノテーション以降の遺伝子機能および家系情報も含めた解析が可能となるようにした情報解析システムの構築に向けて、国際共同研究協議も開始した。

3) 次世代遺伝子解析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 の蓄積にも協力しながら、本研究に適したLinux によるスク립トを構築できるような、解析協力体制を敷くようにした。倫理委員会などの事務手続きを進め In-house reference variant data の共有を行い、パイプラインに組み込んだ。

次世代シーケンス解析用 Linux サーバーに、全疾患に共通のデータ解析専用のパイプラインをベースに、特に心血管疾患を解析する場合に適するよう、循環器専用のスク립トも組み込んだパイプラインを構築した。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した。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した。

上記解析システムを用いながら、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、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2年目終了時点で26家系94症例となり、最終年度終了時点で68家系164症例となった。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実施し、心筋症発症に関わる新規遺伝子①～③の3遺伝子(いずれも論文未発表のため仮称①～③とする)を同定した。

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) GenotypeからPhenotypeへのフィードバックによる臨床データの再検証

心筋細胞機能変化を示す重要な分子をスクリーニングし、心筋症発症に関わると想定される新規遺伝子を同定(遺伝子①)した。それぞれの症例と類似の病型を示すヒト臨床症例群を対象に、類似遺伝子変異を検索を行った。遺伝型を解析する上で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り、特に原因不明の心筋症などの多い本研究分野において、臨床データの充実とゲノム情報を基にした臨床データの再整理は欠かせない。各遺伝子について家族発症を認める別家系、孤発例ながら同遺伝子に non-synonymous 変異を認める症例などを突き止めることに成功した。それぞれの遺伝子変異と分子機能変化との関連を調べるためのSTEP へと繋げることとなった。新規同定した遺伝子②について、難治性不整脈の機能解析を行うために心筋細胞および Xenopus を用いたパッチクランプによる機能解析も実施、該当不整脈の原因遺伝子としての機能変化を証明することができた。当初の家系症例とは別に同様の変異の有無を検索するために、類似病型を示すヒト臨床症例群を対象に、類縁遺伝子も含めた遺伝子変異スクリーニングを行ったところ、家族発症を認める別家系において、本遺伝子の別の non-synonymous 変異を同定することができた。同変異による分子機能変化を調べるため、パッチクランプによる機能解析を行ったところ、ヒト表現型を再現する機能変化を有することを確認した。

2) 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

H23-25 年度に同定した 3 遺伝子に対し、ゼブラフィッシュ、遺伝子改変心筋症マウス、大動物(イヌ)心不全モデルなど適宜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。

新規遺伝子②(難治性不整脈原因遺伝子)については細胞実験系のみならず、Xenopus を用いたパッチクランプ法、Zebrafish 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。

特にゼブラフィッシュ実験系について、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った。

3) 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

上記同定した遺伝子の生理活性の有無の検索を行うと同時に、Nano-LC MS 解析による相互作用を持つ標的分子探索も並行して行った。新規遺伝子については、既に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。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を開始した。阪大産学連携共同創薬開発研究の利用も今後の研究発展の中で考慮している。

新規遺伝子②(難治性不整脈原因遺伝子)については既に有意な標的分子を得て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。

4) ゲノム創薬へ向けたヒトiPS細胞による検証を併せた治療標的リガンド開発と臨床実用化

原因遺伝子発端者組織から iPS 細胞を樹立し、独自の高效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平成 24 年度に 8 例の細胞株を、平成 25 年度には 4 症例の細胞株の樹立ないし樹立を開始した。

また、健常者および症例から樹立した iPS 細胞から心筋細胞を分化誘導し、細胞の形態、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確立し病態発症機構の解明を行っている。また、表現型が明らかな一部症例については創薬に向けたハイコンテンツスクリーニング系を構築し、市販ライブラリーを用いたスクリーニングに着手した。

新規同定した難治性不整脈原因遺伝子を保有する家系を対象に、iPS 細胞株樹立へ向けた患者説明、交渉を開始した。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

①希少難治性循環器疾患症例を対象とし、かつ先進的基礎解析を要する臨床-基礎研究の場合には、基礎研究、臨床研究ともに専門的技術の両立が必要である。当施設は病院臨床部門ハートセンター(循環器内科・心臓血管外科)として数多くの診療にあたりながら疾患の難治性判断を行う経験が多く、従来ヒトを対象とした遺伝子解析はもとより蛋白機能解析の研究が可能であったが、今後の同様の研究の円滑な実施には、基礎臨床が連携することが可能な研究環境の充実が必須と考えられる。

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。

希少難治性循環器疾患の診断法および創薬の開発につながるゲノム解析研究を行うためには、高度な臨床診断技術および現有の先進的治療の施行実績と、ゲノム、遺伝子発現、蛋白機能解析、病理の各解析に適した検体試料サンプルが蓄積されていることが必要であるとともに、ゲノム解析はじめ探索的解析過程から同定後の分子機能解析を行う基礎研究環境の充実を期さなければならぬ。

②日々急速に進歩するゲノム解析技術を考慮の上で、研究デザインを行う必要がある。次世代シーケンス解析のコスト低減、機種バージョン更新は目まぐるしく、ハイエンドモデルの機能、能力をフルに動作させるパフォーマンス効率の良い解析処理を達成するには、数100～数1000におよぶ検体数を準備するとともに、それらを解析する多額の解析費用の準備が必要となる。

さらにそれらのゲノム情報を取り扱う為の解析環境の整備が重要であり、診断、治療に役立つ rare variantの探索に対する戦略方法確立することを本解析における一つの目標とし、工夫を行った。循環器における希少難治性疾患は同一病名内においてもヘテロな原因の集合体と類推されるため、別家系間での比較が困難であることが多い。そのため探索の際には一家系内での解析を基本とし、臨床部門との強い連携の中で、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ののち、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した。

③心筋症発症に関わる新規遺伝子①、および不整脈疾患遺伝子②、遺伝子③を同定し得た(未公表データ)。不整脈症例における原因遺伝子は3症例による Exome 解析では全ゲノムにおいて3

00程度の候補遺伝子として残ったが、事前に行った連鎖解析により40MB の領域に狭めることに成功していたため、2つの候補遺伝子にまで絞ることができた。さらに、症例と類似の病型を示す臨床群を対象に、類似遺伝子変異検索を行い新たに別の家系を見つけることができた。遺伝型を解析する上で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り、特に原因不明の心筋症などの多い本研究分野において、臨床データの再整理は欠かせない。

④ゼブラフィッシュ実験系は、心電図、心臓壁運動 M モードなど種々の心機能測定法を駆使しながら、標的とする遺伝子改変(mRNA 打ちこみによる強制発現系、モルフォリノ打ちこみによる遺伝子発現抑制系)モデルを作成し、分子の果たす in vivo 的役割を見、その機能を知ることができる。わずか数十時間で発生分化していく過程で、その心臓の表現型を知ることができ、迅速に諸指標を検証するには非常に有用な動物実験モデルである。今回新規に同定した心不全関連新規遺伝子①に対するゼブラフィッシュによる機能解析はその手技を上手く適用し、生理学的解析と分子生物学的解析と迅速病態解析を行うことができた。

⑤新規同定の遺伝子生理活性の有無の検索を行うと同時に、本解析では Nano-LC MS 解析による標的分子探索が効率よく行われた。相互作用する分子を網羅的に探索する本方法として、質量分析により新規相互作用分子を繰り返し再現性良く入手することが可能であった。その結果、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り、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を開始する予定である。阪大産学連携共同創薬開発研究も利用も考慮している。

⑥同定した難治性循環器疾患の原因遺伝子がどのような機序で病態形成に関与しているかを明ら

かにするため、原因遺伝子発端者組織からの iPS 細胞を

樹立した。iPS 細胞から独自の高効率心筋細胞分化系を用いて心筋細胞を作成し、分子シグナル、電気生理特性、収縮特性等の分子機能・生理機能の解析を実施した。病態解明に iPS 由来心筋細胞を利用するためには、の非心筋細胞の除去、心筋細胞のサブタイプ別分離、表現型解析の培養条件を整備することが重要であることが推察された。

E. 結論

- ①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る。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。
- ②次世代シーケンス解析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。
- ③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の一つを同定した(未公表データ)。
- ④心筋細胞機能変化を示す重要な分子をスクリーニングすることで、難治性心筋症発症に関わると想定される新規遺伝子①を同定した(未公表データ)。
- ⑤ゼブラフィッシュ実験系について、Dual-GCCD カメラ/LED 光源装備/倒立型電動リサーチ顕微鏡一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 プロブーイメージング解析システムを構築した。それは心臓機能の生体精密機能解析を行うこ

とに適用できる。

- ⑥新規同定遺伝子の生理活性の有無の検索を行うと同時に、超高感度 Nano-LC MS 解析による相互作用を持つ標的分子探索も並行して行うことができた。新規遺伝子①については、既に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。
- ⑦難治性循環器疾患患者から採取した組織を用いて iPS 細胞を樹立し、独自の高効率分化誘導技術を用いて心筋細胞を作成、生理機能解析を行った。新規同定した遺伝性不整脈家系からの iPS 細胞樹立に向けた状況整備を実施した。

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) Nakatani D, Sakata Y, Suna S, Usami M, Matsumoto S, Shimizu M, Hara M, Uematsu M, Fukunami M, Hamasaki T, Sato H, Hori M, Komuro I. Osaka Acute Coronary Insufficiency Study (OACIS) Investigators. Impact of Beta Blockade Therapy on Long-Term Mortality After ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction in the Percutaneous Coronary Intervention Era. *Am J Cardiol*. 111(4):457-64, 2013.
- 2) Sakamoto A, Ishizaka N, Imai Y, Ando J, Nagai R, Komuro I. Association of serum IgG4 and soluble interleukin-2 receptor levels with epicardial adipose tissue and coronary artery calcification. *Clin Chim Acta*. 2014 Jan 20;428:63-9
- 3) Oka T, Akazawa H, Naito AT, Komuro I. Angiogenesis and cardiac hypertrophy:

- maintenance of cardiac function and causative roles in heart failure. *Circ Res*. 2014 Jan 31;114(3):565–71
- 4) Kojima T, Imai Y, Komuro I. Giant coronary arteriovenous fistula between left superior pulmonary vein and left atrial appendage. *Europace*. 2014 Jan;16(1):39.
 - 5) Takahashi T, Asano Y, Amiya E, Hatano M, Tamaki Z, Takata M, Ozeki A, Watanabe A, Kawarasaki S, Taniguchi T, Ichimura Y, Toyama T, Watanabe M, Hirata Y, Nagai R, Komuro I, Sato S. Clinical correlation of brachial artery flow-mediated dilation in patients with systemic sclerosis. *Mod Rheumatol*. 2014 Jan;24(1):106–11.
 - 6) Nakayama A, Morita H, Miyata T, Hoshina K, Nagayama M, Takanashi S, Sumiyoshi T, Komuro I, Nagai R. Predictors of mortality after emergency or elective repair of abdominal aortic aneurysm in a Japanese population. *Heart Vessels*. 2014 Jan;29(1):65–70.
 - 7) Fujita D, Takahashi M, Doi K, Abe M, Tazaki J, Kiyosue A, Myojo M, Ando J, Fujita H, Noiri E, Sugaya T, Hirata Y, Komuro I. Response of urinary liver-type fatty acid-binding protein to contrast media administration has a potential to predict one-year renal outcome in patients with ischemic heart disease. *Heart Vessels*. 2014 Feb 20.
 - 8) Takata M, Amiya E, Watanabe M, Ozeki A, Watanabe A, Kawarasaki S, Nakao T, Hosoya Y, Uno K, Saito A, Murasawa T, Ono M, Nagai R, Komuro I. Brachial artery diameter has a predictive value in the improvement of flow-mediated dilation after aortic valve replacement for aortic stenosis. *Heart Vessels*. 2014 Feb 5.
 - 9) Yamagata K, Goto Y, Nishimasu H, Morimoto J, Ishitani R, Dohmae N, Takeda N, Nagai R, Komuro I, Suga H, Nureki O. Structural basis for potent inhibition of SIRT2 deacetylase by a macrocyclic peptide inducing dynamic structural change. *Structure*. 2014 Feb 4;22(2):345–52.
 - 10) Nishizaki Y, Shimada K, Tani S, Ogawa T, Ando J, Takahashi M, Yamamoto M, Shinozaki T, Miyauchi K, Nagao K, Hirayama A, Yoshimura M, Komuro I, Nagai R, Daida H. Significance of imbalance in the ratio of serum n-3 to n-6 polyunsaturated fatty acids in patients with acute coronary syndrome. *Am J Cardiol*. 2014 Feb 1;113(3):441–5.
 - 11) Taniguchi T, Sakata Y, Ohtani T, Mizote I, Takeda Y, Asano Y, Masuda M, Minamiguchi H, Kanzaki M, Ichibori Y, Nishi H, Toda K, Sawa Y, Komuro I. Usefulness of transient elastography for noninvasive and reliable estimation of right-sided filling pressure in heart failure. *Am J Cardiol*. 2014 Feb 1;113(3):552–8.
 - 12) Tada Y, Ogawa M, Watanabe R, Zempo H, Takamura C, Suzuki J, Dan T, Miyata T, Isobe M, Komuro I. Neovascularization induced by hypoxia inducible transcription factor is associated with the improvement of cardiac dysfunction in experimental autoimmune myocarditis. *Expert Opin Investig Drugs*. 2014 Feb;23(2):149–62.
 - 13) Gong H, Yan Y, Fang B, Xue Y, Yin P, Li L, Zhang G, Sun X, Chen Z, Ma H, Yang C, Ding Y, Yong Y, Zhu Y, Yang H, Komuro I, Ge J, Zou Y. Knockdown of nucleosome assembly protein 1-like 1 induces mesoderm formation and cardiomyogenesis via Notch signaling in murine induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2014 Mar 19.

- 14) Imamura T, Kinugawa K, Murasawa T, Kagami Y, Endo M, Muraoka H, Fujino T, Inaba T, Maki H, Hatano M, Kinoshita O, Nawata K, Kyo S, Komuro I, Ono M. Cardiac allograft vasculopathy can be distinguished from donor-transmitted coronary atherosclerosis by optical coherence tomography imaging in a heart transplantation recipient. *Int Heart J.* 2014 Mar 28;55(2):178-80
- 15) Imamura T, Kinugawa K, Minatsuki S, Muraoka H, Kato N, Inaba T, Maki H, Hatano M, Yao A, Komuro I. Urine sodium excretion after tolvaptan administration is dependent upon baseline serum sodium levels. *Int Heart J.* 2014 Mar 28;55(2):131-7.
- 16) Nakayama A, Morita H, Hamamatsu A, Miyata T, Hoshina K, Nagayama M, Takanashi S, Sumiyoshi T, Komuro I. Coronary atherosclerotic lesions in patients with a ruptured abdominal aortic aneurysm. *Heart Vessels.* 2014 Mar 7.
- 17) Hara H, Yamashita H, Nakayama A, Hosoya Y, Ando J, Iijima K, Hirata Y, Komuro I. A rare case of anomalous origin of the left anterior descending artery from the pulmonary artery. *Int J Cardiol.* 2014 Mar 1;172(1):e66-8.

(和文業績)

- 1) 森田啓行、山田奈美恵、小室一成
 医学と医療の最前線
 肥大型心筋症の遺伝子診断: 推進に向けての方策 *日本内科学会雑誌* 102(5), 1233-1242, 2013

- 2) 朝野仁裕、小室一成
 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* Vol.245 No.5 : 415-421, 2013

2、学会発表

- 1) 小室一成 心不全の発症機序の解明から新しい治療へ. *日本臨床分子医学会* 東京都、2013. 4. 13.
- 2) 小室一成 補体 C1q は老化を促進する *日本細胞生物学会* 名古屋、2013. 6. 21
- 3) 小室一成 心不全治療の現状と将来展望 *日本循環器学会* 札幌市、2013. 11. 23
- 4) Komuro I. Molecular mechanism of heart failure *Wihuri Research Institute, Helsinki,* 2013. 8. 19.
- 5) Komuro I. Genetic and Molecular Determinants of Angiogenesis and Heart Failure *Korea Society for Vascular Biology and Medicine* Jeju 2013. 8. 22-23

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

Ⅱ. 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)

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 澤 芳樹 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

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べく、これまでヒト臨床研究で得た多くの成果をいかす。診断治療の創薬開発と、その迅速なる臨床実用化により、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。

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り検体を整理する。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るよう研究を進める。

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全てが明らかとは限らない。遺伝性が濃厚な希少難治性疾患の家系症例をできるだけ多く集積させ、それらの症例から原因となる新規 rare variant を同定することを目指す。また、症例より採取の組織から患者に準拠した細胞を用いて実験検討ができる研究環境を整える。

筋症家系)より解析症例を選択する。大阪大学医学部附属病院において、特に心臓血管外科加療を目的に入院した、心移植、重症心不全の症例を中心に、二次性心筋症の除外がすみ、特発性拡張型心筋症症例、ほか遺伝性を示す心筋症家系が対象となる。循環器内科とも連携し臨床経過全般から判断を行う。また、家系ではなくとも、孤発症例のうち、二次性心筋症を除外したものからも検体収集を行う。

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

H23 年、H24 年に引き続き、ヒトゲノム解析の説明と同意を得た遺伝性が濃厚な家系症例(主に心

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)

これまでに本研究において同定した心筋症発症に関わる新規遺伝子 3 遺伝子に対し、想定される疾患群、症例のゲノムを用いて、それら遺伝子変異の出現頻度について再度検証を行うとともに、類似の病型を示す臨床群における類似遺伝子変異も

検索するため、該当する症例を収集する。遺伝子変異が同定された症例と類似の臨床病型を示す症例を中心に、あらためて遺伝子変異の検定を行うにあたり、変異解析を行う上で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り、特に原因不明の心筋症などの多い本研究分野において、臨床データの再整理は欠かせないため、今年度も引き続き症例の蓄積に努め、同方針を踏襲する。

疾患原因遺伝子として同定し得た標的リードに対するリガンド探索を行い、創薬を目指すため、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が可能となるiPS細胞研究の環境を整える。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。

(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

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を行った。

遺伝性疾患を疑う家系としては、循環器内科との連携で、H23年度より積算して: 心筋症約100症例、不整脈性疾30症例を集め、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例を集めた。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った。大阪大学に特徴的な最重症心不全を呈する心筋症家系など心不全病態を有する心筋症ゲノム解析対象症例の蓄積は計画通り進み、症例提供協力施設も倫理委員会承認を得て、豊富な症例登録実績を見た。

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)

遺伝型を解析する上で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り、特に原因不明の心筋症などの多い本研究分野において、臨床データの充実とゲノム情報を基にした臨床データの再整理は欠かせない。そこでこれまでに同定した心筋症発症に関わる新規遺伝子3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。

前年度の機能解析を踏襲し、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

3年間を通じて内科および外科の連携で症例を集める事の重要性を認識することとなった。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、データ間の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。外科内科間の連携による相乗効果が非常に重要であることがわかる。

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。

同定した心筋症発症に関わる新規遺伝子3遺伝子に対し、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手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今後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 100

例、不整脈性疾患 30 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

- 1) Sawa Y Miyagawa S
Cell sheet technology for heart failure.
Curr Pharm Biotechnol 14 61 2013
- 2) Sawa Y Matsumiya G, Shigemura S, Nishi H, Ichikawa H, Minami M, Fukushima N, Inoue M, Ueno T, Sawabata A, Sakaguchi T, Saito S, Okumura M.
The first successful heart-lung transplantation in Japan: report of a case.
Surg Today 43 1461 2013
- 3) Sawa Y Matsumiya G, Shigemura S, Nishi H, Ichikawa H, Minami M, Fukushima N, Inoue M, Ueno T, Sawabata A, Sakaguchi T, Saito S, Okumura M.
Current status of myocardial regeneration therapy.
Gen Thorac Cardiovasc Surg 61 17 2013
- 4) Sawa Y
Current status of myocardial regeneration therapy
Personalized Medicine Universe Vol. 2 2-6 2013
- 5) Nishi H Toda K, Sakaguchi T, Miyagawa S, Yoshikawa Y, Fukushima S, Kamata S, Yoshioka Y, Saito S, Saito T, Ueno T, Kuratani T, Sawa Y.
Prediction of Outcome in Patients with Liver Dysfunction After Left Ventricular Assist Device Implantation
Journal of Artificial Organs 16(4)404-10 2013
- 6) Fukushima S Sawa Y, Suzuki K
Choice of cell-delivery route for successful cell transplantation therapy for the heart.
Future Cardiol 9(2) 215-27 2013
- 7) 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 77(4) 1063-72 2013
- 8) Shudo Y Cohen JE, Macarthur JW, Atluri P, Hsiao PF, Yang EC, Fairman AS, Trubelja A, Patel J, Miyagawa S, Sawa Y, Woo YJ
Spatially oriented, temporally sequential smooth muscle cell-endothelial progenitor cell bi-level cell sheet neovascularizes ischemic myocardium.
Circulation 128 S59-68 2013
- 9) Kawamura M Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Miki K, Ito E, Sougawa N, Kawamura T, Daimon T, Shimizu T, Okano T, Toda K, Sawa Y
Enhanced Survival of Transplanted Human iPS Cell-Derived Cardiomyocytes by the Combination of Cell-sheets with the Pedicled Omental Flap Technique in a Porcine Heart
Circulation surgical suppl 128 S87-94 2013
- 10) Ishimaru K Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Sakai Y, Ueno T, Sawa Y.
Synthetic prostacyclin agonist, ONO1301, enhances endogenous myocardial repair in a hamster model of dilated cardiomyopathy: A promising regenerative therapy for the failing heart.
J Thorac Cardiovasc Surg 146(6) 1516-25 2013
- 11) Konaka S Shimizu S, Iizawa M, Ohkawara H, Kato O, Ashikari J., Fukushima N.
Current status of in-hospital donation coordinators: Nationwide survey in Japan