

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に応じて行われたもののうち、診療に用いない残余検体を利用することとし、危険や不利益はないと考える。誤って遺伝情報が外部に漏洩した場合、就職・結婚・保険への加入等に関して不利益をこうむる可能性が考えられるため、これを防ぐために、個人識別情報管理者を置き、同管理者は試料の匿名化を行うとともに個人情報を厳重に管理・保管し、試料提供者のプライバ

シーを保護する。

3) 試料提供者から採取した生体材料の取り扱いについて: 提供された試料は、個人識別情報管理者が連結匿名化し、匿名化ラベルのみ貼って保存する。これらの試料は、生体試料の包括利用同意を得ており、本研究だけでなく、将来倫理委員会で承認された他の自主臨床研究についても用いることが可能である。したがって検査済みの試料は、適宜連結可能匿名化番号を含む検体等を完全に削除した上で廃棄するが、使用可能な残余検体は匿名化されたまま施錠された保管場所で保管される。また、特に研究成果として得られた情報の管理には、外部に漏洩しないように対策を行う。

動物実験においても愛護上の問題点を考慮の上、施設の審査結果を本研究について得た。この倫理規定にのっとり動物愛護上の配慮を十分行って実験をおこなう。

C. 研究結果

1. ゲノム解析の迅速な実施と実用的解析システムの構築

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できた。

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, Sawabatav 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, Sawabatav 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

- Transplant Proc 45(4) 1295-1300 2013
- 12) Matsuda T Miyagawa S, Fukushima S, Kitagawa-Sakakida S, Akimaru H, Horii-Komatsu M, Kawamoto A, Saito A, Asahara T, Sawa Y
Human Cardiac Stem Cells With Reduced Notch Signaling Show Enhanced Therapeutic Potential in a Rat Acute Infarction Model
Circ J 78(1) 222-31 2013
- 13) Saito S Sakaguchi T, Miyagawa S, Nishi H, Yoshikawa Y, Fukushima S, Yoshioka D, Ueno T, Kuratani T, Sawa Y.
Jarvik 2000 biventricular assist device conversion from old pin-shaped bearing pumps to new conical bearing pumps
J Artif Organs. 16(1) 105-9 2013
- 14) Sakaguchi T Saito S, Yoshioka D, Sawa Y.
Long-term biventricular support with rotary blood pumps in a patient with a noncontractile heart.
J Thorac Cardiovasc Surg 146(4) e29-30 2013
- 15) Sakaguchi T Matsumiya G, Yoshioka D, Miyagawa S, Nishi H, Yoshikawa Y, Fukushima S, Saito S, Ueno T, Sawa Y.
DuraHeart™ magnetically levitated left ventricular assist device: Osaka University experience.
Circ J. 77(7) 1736-41 2013
- 16) Yoshioka D Toda K, Sakaguchi T, Miyagawa S, Nishi H, Yoshikawa Y, Fukushima S, Saito S, Saito T, Shibasaki I, Sakata Y, Ohtani T, Sawa Y
Initial report of bridge to recovery in a patient with DuraHeart LVAD.
J Artif Organs. 2013 16386-8 2013
- 17) Yu T Miyagawa S, Miki K, Saito A, Fukushima S, Higuchi T, Kawamura M, Kawamura T, Ito E, Kawaguchi N, Sawa Y, Matsuura N.
In vivo differentiation of induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes
Circ J. 77(5) 1297-306 2013
- 18) Uchinaka A Kawaguchi N, Hamada Y, Mori S, Miyagawa S, Saito A, Sawa Y, Matsuura N
Transplantation of myoblast sheets that secrete the novel peptide SVVYGLR improves cardiac function in failing hearts
Cardiovasc Res 99(1) 102-10 2013
- 19) Shudo Y Miyagawa S, Ohkura H, Fukushima S, Saito A, Shiozaki M, Kawaguchi N, Matsuura N, Shimizu T, Okano T, Matsuyama A, Sawa Y.
Addition of Mesenchymal Stem Cells Enhances the Therapeutic Effects of Skeletal Myoblast Cell-Sheet Transplantation in a Rat Ischemic Cardiomyopathy Model.
Tissue Eng Part A 20(3-4) 728-39 2014
- 20) Kubota Y Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Watabe H, Daimon T, Sakai Y, Akita T, Sawa Y
Impact of cardiac support device combined with slow-release prostacyclin agonist in a canine ischemic cardiomyopathy model.
J Thorac Cardiovasc Surg.147(3) 1081-7 2014
- 21) Maeda K Saito S, Toda T, Ueno T, Kuratani T, Sawa Y.
Transient Constrictive Pericarditis Following Cardiac Surgery.
Ann Thorac Cardiovasc Surg Epub 2014
- 22) 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 113(3) 552-8 2014
- 23) Nakamura T Sekiya N, Nakazato T, Sawa Y
Systolic anterior motion of the mitral valve masked by general anesthesia.
Asian Cardiovasc Thorac Ann. 22(2)197-9.2014
- 24) Kainuma S "Taniguchi K, Toda K, Funatsu T, Miyagawa S, Kondoh H, Masai T, Otake S, Yoshikawa Y, Nishi H, Sakaguchi T, Ueno T, Kuratani T, Daimon T, Sawa Y
Restrictive mitral annuloplasty with or without surgical ventricular reconstruction in ischaemic cardiomyopathy: impacts on neurohormonal

- activation, reverse left ventricular remodelling and survival
Eur J Heart Fail 16(2) 189-200 2014
- 25) Hirano K Tanaka T, Ikeda Y, Yamaguchi S, Zaima N, Kobayashi K, Suzuki A, Sakata Y, Sakata Y, Kobayashi K, Toda T, Fukushima N, Ishibashi-Ueda H, Tavian D, Nagasaka H, Hui SP, Chiba H, Sawa Y, Hori M.
Genetic mutations in adipose triglyceride lipase and myocardial up-regulation of peroxisome proliferated activated receptor- in patients with triglyceride deposit cardiomyovascuopathy
Biochem Biophys Res Commun 443(2) 574-9 2014
- 26) Takeda Y Sakata Y, Ohtani T, Tamaki S, Omori Y, Tsukamoto Y, Aizawa Y, Shimamura K, Shirakawa Y, Kuratani T, Sawa Y, Yamamoto K, Mano T, Komuro I
Endovascular aortic repair increases vascular stiffness and alters cardiac structure and function.
Circ J 78(2) 322-8 2014
- 27) Kainuma S Kazuhiro Taniguchi, Koichi Toda, Takashi Daimon, Toshihiro Funatsu, Shigeru Miyagawa, Haruhiko Kondoh, Hiroyuki Nishi, Yasushi Yoshikawa, Satsuki Fukushima, Daisuke Yoshioka, Tetsuya Saito, Takayoshi Ueno, Toru Kuratani, Yoshiki Sawa, Osaka Cardiovascular Surgery Research (OSCAR) group
Restrictive Mitral Annuloplasty with or without Surgical Ventricular Reconstruction in Ischemic Cardiomyopathy: Impacts on Neurohormonal Activation and Reverse Left Ventricular Remodeling and Survival.
European Journal of Heart Failure 16 189-200 2014
- 2、学会発表
- 1) 甲斐沼 尚 虚血性心筋症 モデルに対する筋芽細胞シートと大網同時移植による心筋再生療法の開発 日本心臓血管外科学会 44 熊本 2014 2/19 - 20
- 2) 樫山 紀幸 僧帽弁閉鎖不全証を伴う心筋症に対する僧帽弁手術の早期、遠隔期成績 日本心臓血管外科学会 44 熊本 2014 2/19 - 20
- 3) 川村 匡 ヒト iPS 細胞由来心筋細胞シート移植に対する大網同時移植法の有用性の検討 日本心臓血管外科学会 44 熊本 2014 2月19日(水)
- 4) 西 宏之 臨床研究を充実させるための理想的な心臓血管外科手術データベースの構築 OSCAR database experience 日本心臓血管外科学会 44 熊本 2014 2/19 - 20
- 5) 澤 芳樹 iPS 細胞を用いた心筋再生治療創生 再生医療学会 13 京都 2014 3/4-6
- 6) 澤 芳樹 再生医療の現状と将来 再生医療学会 13 京都 2014 3/4-6
- 7) 今西 悠基子 重症心不全に対する骨髄間葉系幹細胞移植後のガン化に関するマーカーの解析 再生医療学会 13 京都 2014 3/4-6
- 8) 原田 明季 細胞シート移植治療における血管新生プロセスの検討 再生医療学会 13 京都 2014 3/4-6
- 9) 河村拓史 iPS 細胞の抗原性を明らかにするための糖鎖構造の網羅的解析 再生医療学会 13 京都 2014 3/4-6
- 10) 大河原弘達 細胞シートの臨床的汎用性の向上を目指した新しい長時間保存法の開発 再生医療学会 13 京都 2014 3/4-6
- 11) 伊東 絵望子 重症心不全に対するヒストンメチル化の関与の検討 再生医療学会 13 京都 2014 3/4-6
- 12) 川村 匡 ミニブタ虚血性心筋症モデルに対するヒト iPS 細胞由来心筋細胞シート大網同時移植法の治療効果の検討 再生医療学会 13 京都 2014 03/04
- 13) 小澤 秀登 幼弱ブタ虚血性心筋症モデルに対する自己骨格筋細胞シート移植の有効性の検討 再生医療学会 13 京都 2014 03/04
- 14) 吉川 泰司 LVAD を要する末期拡張型心筋症患者に対する自己筋芽細胞シート移植の臨床研究の効果 再生医療学会 13 京都 2014 03/04
- 15) 吉川 泰司 植込型補助人工心臓装着後遠隔期に右心不全をきたす症例の検討 人工心

- 臓と補助循環懇話会 42 越後湯沢 2014 3月7日(金)~8日(土)
- 16) 平 将生 小児重症心不全に対する補助人工心臓使用経験 人工心臓と補助循環懇話会 42 越後湯沢 2014 3月7日(金)~8日(土)
- 17) 齋藤 哲也 60歳以上の高齢者に対するLVAD治療の検討 人工心臓と補助循環懇話会 42 越後湯沢 2014 3月7日(金)~8日(土)
- 18) 櫻山 紀幸 植込み型補助人工心臓を離脱した4症例とその離脱基準の検討 人工心臓と補助循環懇話会 42 越後湯沢 2014 3月7日(金)~8日(土)
- 19) 川村 匡 自己弁温存僧帽弁置換術後LVAD植込術を施行した僧帽弁逆流合併拡張型心筋症2例の経験 人工心臓と補助循環懇話会 42 越後湯沢 2014 3月7日(金)~8日(土)
- 20) 矢嶋 真心 LVAD植込み手術における止血機能の検討 ~HeartMate II, DuraHeartにおける検討~ 人工心臓と補助循環懇話会 42 越後湯沢 2014 3月7日(金)~8日(土)
- 21) 堂前 圭太郎 植込型補助人工心臓におけるデバイス感染に対する治療成績の検討 人工心臓と補助循環懇話会 42 越後湯沢 2014 3月7日(金)~8日(土)
- 22) 山本 晃裕 血栓による2度のポンプ交換を要した拡張型心筋症の一手術例 人工心臓と補助循環懇話会 42 越後湯沢 2014 3月7日(金)~8日(土)
- 23) 澤 芳樹 The first clinical trial of the self-expandable transcatheter heart valve (MDT-2111) in patients with symptomatic severe aortic stenosis 日本循環器学会 78 東京 2014 3/22
- 24) 戸田 宏一 Biventricular Support with Implantable Continuous flow VADs: Osaka University Experience 日本循環器学会 78 東京 2014 3/21
- 25) 福嶋教偉 日本における小児心臓移植の現状と課題 日本循環器学会 78 東京 2014 3/21
- 26) 戸田宏一 心臓移植へのブリッジとしての植込み型補助人工心臓の現状と問題点 日本循環器学会 78 東京 2014 3/21
- 27) 齊藤哲也 Myocardial Microvascular Changes after Mechanical Circulatory Support in the Failing Heart 日本循環器学会 78 東京 2014 3/21
- 28) 甲斐沼 尚 Cell Sheet Implantation combined with Pedicle Omentum Flap Promotes Angiogenesis and Stabilizes Blood Vessels in Rat Myocardial Infarction Model 日本循環器学会 78 東京 2014 3/22
- 29) 戸田 宏一 Multidisciplinary Approach for Heart Transplantation: Osaka University Experience 日本循環器学会 78 東京 2014 3/22
- 30) 伊藤絵望子 A novel system to eliminate undifferentiated iPS cells by using irradiation for safe clinical applications of iPS cell-derived cardiomyocytes 日本循環器学会 78 東京 2014 3/22
- 31) 吉川 泰司 Myocardial regenerative therapy using myoblast cell sheet in patients with end-stage heart failure - from bench to clinical trial- 日本循環器学会 78 東京 2014 3/23
- 32) 原田明希 Impacted mechanism of angiogenic process of skeletal myoblast sheet induced in chronological paracrine manner of various cytokines. 日本循環器学会 78 東京 2014 3/23
- 33) 河村拓史 Reduction in Immunogenicity of Syngeneic Induced Pluripotent Stem Cells by Promoting Cardiomyogenic Differentiation for safe application 日本循環器学会 78 東京 2014 3/23
- 34) 伊藤絵望子 Increased histone methylation in the cardiomyocyte under ventricular assist device support in end-stage cardiomyopathy; Potential target to enhance ¨ bridge-to-recovery¨ 日本循環器学会 78 東京 2014 3/23
- 35) 小澤秀登 Juvenile Skeletal Myoblast has Greater Therapeutic Potentials of Cell-Sheets than Adult Myoblasts for Treating Chronic

**H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定も含む)**

1、特許取得
なし

2、実用新案登録
なし

3、その他

以上、特記すべき事項なし

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 油谷浩幸 東京大学先端科学技術研究センター 教授

研究要旨

本研究では次世代シーケンス解析の実践と同定遺伝子情報を診断治療に迅速に応用する独創的手法を利用し実施する研究を行う中で、遺伝性が濃厚な希少難治性疾患の家系症例を対象に、原因となる新規 rare variant を同定し、診断および治療薬標的を見出し、臨床実用化することを目指す。迅速なゲノム医療への実践のため、既知変異の迅速な鑑別除外することにより、新規遺伝子変異の同定が必要な症例に次世代シーケンス解析によって新規分子ないし変異を探索し、候補遺伝子の表現型機能解析と同定遺伝子情報の臨床応用への迅速化をはかる。次世代解析拠点施設と連携し、In-house レファレンスデータの蓄積を実施した。本研究に適した情報解析が行えるよう、独自の解析パイプラインを構築し、循環器疾患特有の症例群解析に適した遺伝子解析/情報解析環境の整備を行った。

A. 研究目的

循環器系難治性疾患の原因遺伝子は多岐にわたり、未だ原因遺伝子が未解明のまま殆どが高度医療に臨まざるを得ない。

そこで遺伝性が濃厚な希少難治性疾患の家系症例群より新規 rare variant (遺伝子変異) を同定し、実用化を念頭にその分子機能解析と診断治療薬となる候補分子を見出すことを目標とする。

B. 研究方法

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

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

本研究は循環器系難治性疾患の未知原因遺伝子の新規探索を主としている。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、およびそれらの家系の除外によって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できる。

今年度になって次世代シーケンサーを用いた全 Exome 解析に関する日本人の variant database として 1,208 名の Human Genetic Variation Database も公開されたことから、先行して実施していた独自の Exome 解析データに基づく in-house の variant

database をも統合した変異同定解析のパイプラインを構築した。

得られた fastq ファイル形式のデータをもとに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、解析に適したパイプラインとして新たに構築した。

2) 複数のゲノム解析プラットフォームについての性能比較

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

(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。

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。

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。

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

東京大学にて取得した健常細胞ゲノム 862 名の全 Exome 解析を実施した。Agilent 社 SureSelect Human All Exon v4 kit (50Mb) により捕捉したゲノム DNA を Illumina 社 Hiseq2000/2500 を用いて 100 塩基ペアエンド解析し、平均カバレッジ 40x 以上のデータが得られた。

得られたデータの解析に必要なパイプラインの開発を行った。得られた fastq ファイル形式のデータをもとに BWA および Novoalign を用いてヒト参照ゲノム配列へのマッピングを行い、GATK による変異検出および ANNOVAR によるアノテーションまでを実行する解析パイプラインを確立した。

既存 SNP については dbSNP, 1000genome データベースに登録されている SNP の中で頻度が 1.5% 以上のものを除外した。

862 名の正常細胞ゲノムデータにおいて 1.5% 以下の頻度の SNP が 459,070 検出され、そのうち dbSNP に登録のあるものは 397,386 (86%) であっ

た。

2) 複数のゲノム解析プラットフォームについての性能比較

より広い領域をターゲットする目的にはエクソーム解析にも用いられるハイブリッドキャプチャ法が向いている。PCRプライマーの設計が難しい領域もカバー出来る可能性が高いが、必要DNA量も1 µg前後と多く、一般に特異性は低下する。対象疾患に応じてターゲットのカバー率、均一性、スループットおよびコスト等を考慮し最適な解析プラットフォーム(前処理技術およびシーケンサー)を選択する必要がある。

我々はFluidigm社AccessArray、Agilent社HaloPlex、Illumina社TruSeq Custom Amplicon、Life Technologies社Ion AmpliSeq等の複数の前処理手法と、Illumina社GAIIx/HiSeq/MiSeq、およびLife Technologies社Ion Protonシーケンサーを活用し、これらの性能比較を実施した。Ion Protonに関しては反応原理上indelの検出においてエラーが出やすい傾向があり、引き続き検討が必要であり、バリエーション検出プログラムの改良が必要であると思われる。

既知遺伝子のターゲット解析対象として、サルコミアの構造遺伝子などから遺伝性不整脈の原因遺伝子などを網羅した100程度の循環器疾患遺伝子パネルをHaloPlexを用いてデザインした。

D. 考察

次世代シーケンス解析用の日本人バリエーションデータベースが利用可能となったとはいえ、現況では1,208名のエクソーム解析データに基づくHuman Genetic Variation Databaseが最大である。発端者のExome解析と既存パイプラインによる同疾患感受性の既知バリエーションの検出、およびコモンバリエーションの除外は、効率良く未知疾患原因遺伝子を同定する上では非常に重要なステップとなる。

そこで初期よりin-houseのvariant database構築も見据えたexomeデータの蓄積を行い、862名の正常細胞のエクソームデータに基づくリファレンスデータを収集できたことは本研究事業を進める上で

大きな力となった。この結果検出された機能的変化を伴う変異遺伝子リストは長大であり、SNPデータベースを活用した高頻度SNPの除去、変異アリル頻度評価や家系解析による遺伝様式の妥当性の検証等、疾患に応じた適切なフィルター設計が可能となった。

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

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

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

E. 結論

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

既知遺伝子のターゲット解析として100程度の遺伝子パネルをデザインし、スクリーニングを行う準備を整えた。

次世代シーケンス解析用の日本人バリエーションデータベースについては、本年度になって1208名のエクソームデータの検索が可能となり、東北メガバンク

でも1000名の健常者の全ゲノムデータが取得された。既知未知バリエーション情報を分別するため、対象とする疾患感受性の既知バリエーションの検出、およびコモンバリエーションの除外を行うことができた。さらに今後も健常人および症例検体の蓄積を継続し、in-houseのvariant databaseの構築を進めるとともに、独自性を高めたアノテーションパイプラインの開発を行うことで、ゲノム解析データ処理を効率化する予定である。

情報解析手法を更新し、シーケンス解析のコスト低減に努め、解析試料の収集と情報解析のアップデートに特化した研究を本事業終了後も継承する予定である。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

G. 研究発表

1、論文発表

(英文原著)

- 1) Matsuoka K, Asano Y, Higo S, Tsukamoto O, Yan Y, Yamazaki S, Matsuzaki T, Kioka H, Kato H, Uno Y, Asakura M, Asanuma H, Minamino T, Aburatani H, Kitakaze M, Komuro I, Takashima S. Noninvasive and quantitative live imaging reveals a potential stress-responsive enhancer in the failing heart. *FASEB J.* 28(4):1870-9. 2014
- 2) Johnson BE, Mazarin T, Hong C, Barnes M, Aihara K, McLean CY, Fouse SD, Yamamoto S, Ueda H, Tatsuno K, Asthana S, Jalbert LE, Nelson SJ, Bollen AW, Gustafson WC, Charron E, Weiss WA, Smirnov IV, Song JS, Olshen AB, Cha S, Zhao Y, Moore RA, Mungall AJ, Jones SJ, Hirst M, Marra MA, Saito N, Aburatani H, Mukasa A, Berger MS, Chang SM, Taylor BS, Costello JF. Mutational Analysis Reveals the Origin and Therapy-Driven Evolution of Recurrent Glioma. *Science.* 343(6167):189-93. 2014
- 3) Aihara K, Mukasa A, Gotoh K, Saito K, Nagae G, Tsuji S, Tatsuno K, Yamamoto S, Takayanagi S, Narita Y, Shibui S, Aburatani H, Saito N. H3F3A K27M mutations in thalamic gliomas from young adult patients. *Neuro Oncol.* 16(1):140-6. 2014.
- 4) Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, Schnittger S, Sanada M, Kon A, Alpermann T, Yoshida K, Roller A, Nadarajah N, Shiraishi Y, Shiozawa Y, Chiba K, Tanaka H, Koeffler HP, Klein HU, Dugas M, Aburatani H, Kohlmann A, Miyano S, Haferlach C, Kern W, Ogawa S. Landscape of Genetic Lesions in 944 Patients with Myelodysplastic Syndromes. *Leukemia.* 28(2):241-7. 2014
- 5) Kon A, Shih LY, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, Yoshida K, Okuno Y, Bando M, Nakato R, Ishikawa S, Sato-Otsubo A, Nagae G, Nishimoto A, Haferlach C, Nowak D, Sato Y, Alpermann T, Nagasaki M, Shimamura T, Tanaka H, Chiba K, Yamamoto R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Nakamaki T, Ishiyama K, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Chiba S, Mori H, Nakauchi H, Koeffler HP, Aburatani H, Haferlach T, Shirahige K, Miyano S, Ogawa S. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nat Genet.* 45(10):1232-7. 2013
- 6) Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y, Maekawa S, Okuno Y, Kamura T, Shimamura T, Sato-Otsubo A, Nagae G, Suzuki H, Nagata Y, Yoshida K, Kon A, Suzuki Y, Chiba K, Tanaka H, Niida A, Fujimoto A, Tsunoda T, Morikawa T, Maeda D, Kume H, Sugano S, Fukayama M, Aburatani H, Sanada M, Miyano S, Homma Y, Ogawa S. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nat Genet.* 45(8):860-7. 2013

2、学会発表

- 1) 大規模がんゲノム解析がもたらすインパクト 金沢大学十全医学会総会・学術集会 金沢 6.28.2013
- 2) Chromatin remodeling in cardiomyocyte differentiation. The Fukuoka International Symposium on Genomics & Epigenomics 2013, Fukuoka, 9.10.2013
- 3) 心筋細胞分化における協調的エピゲノム転換

第36回日本分子生物学会年会 神戸
12.4.2013

4) ゲノムデータから読み解く環境応答メカニズム
第13回分子予防環境医学研究会 和歌山
1.31.2014

5) Single cell RNA sequencing reveals transition of
cell populations with epigenomic switch in cell
fate determination along cardiomyocyte
differentiation. AGBT2014 Marco Island, Florida
2.13.2014

6) Epigenomic Switch in Cardiomyocyte
Differentiation 第78回日本循環器学会学術総
会 東京 3.23.2014

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1、特許取得

なし

2、実用新案登録

なし

3、その他

以上、特筆すべき事項なし

厚生労働科学研究費補助金(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)

分担研究報告書

次世代遺伝子解析による希少難治性循環器疾患の診断治療法の開発と 臨床実用化に関する研究

研究分担者 朝野仁裕 大阪大学大学院医学系研究科 助教

研究要旨

平成 23-24 年度に継続して行ってきた希少難治性疾患動物モデル開発、病態機序解析、及びヒト臨床研究で得た多くの成果をもとに、難治性循環器疾患の診断治療の創薬開発とその迅速なる臨床実用化を目指す。

H25 年度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。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して迅速に表現型機能解析と同定遺伝情報の臨床応用に資する検討を実施する。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るとともに、心筋症マウス解析とゼブラフィッシュイメージングの利用による in vivo 検証の迅速化や、生化学的解析法を利用した独自の生理活性物質同定およびシーズ探索技術を利用し、治療標的リガンド開発と臨床実用化など得られたゲノム情報を迅速かつ有効に診療に結実させるよう進めてきた研究を完成させる。同定した遺伝子の機能解析を強力に推進し、生理活性のある相互作用分子の同定や、生物学的意義を検証するための迅速な生体イメージングモデル動物および生体機能検査を実施し、創薬に資するデータの蓄積に努める。

A. 研究目的

難治性循環器疾患の原因遺伝子は多岐にわたり未解明も多く、殆どが厳密に原因を同定できぬまま高度医療に臨まざるを得ない。

遺伝性を示す大家系はもとより発症者の少ない家系でも効率良く原因となる変異を正確に同定できるシステムを構築する。豊富データ量を有する in house database での非特異的変異の除外し、家系情報や特異性を高める項目を付加した独自の情報解析システムを立ち上げ、原因遺伝子を同定し、その機能解析と、生理的意義を求めて後、リード化合物のスクリーニング対象となり得る相互作用分子標的を見出す、3 年間の集大成なる研究を実施する。

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

拠点施設ゲノムバンク化事業に協力可能な検体収集システムの構築

循環器疾患ゲノム解析症例の蓄積のみならず、非循環器疾患症例、および家系内非発症症例を対象に、全 Exome 解析における in-house variant data のプロファイリングに適した症例の蓄積も目指す。次世代解析拠点施設と連携し、In-house Data Reference の蓄積に協力することも目指し、本研究に適した解析パイプラインを構築できる体制を整え

る。その実現へ向けて大阪大学医学部附属病院他診療科と連携し、倫理委員会同意書統一書式や検体収集システムを構築する。

次世代ゲノム解析用情報解析システムの利用による新規遺伝子同定

3年間継続して蓄積した希少循環器疾患検体ゲノムを用いてゲノム解析を実施する。症例ゲノムから超高速次世代シーケンサーを用いて配列解析を行う STEP と、次世代シーケンス情報解析を行う STEP にわける。情報解析にあたっては、解析用 Linux サーバーを立て、解析専用のパイプラインを構築する。

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、診断薬開発と細胞治療への応用)

細胞モデルと遺伝性疾患動物モデル(小・大動物)による in vivo 検証の迅速化

難治性疾患の新規候補遺伝子として同定されたものについて、迅速に in vivo の機能解析実験系の STEP へ検証を進めることが重要である。ゼブラフィッシュを用いた実験系は、心臓といえどもアルビノ種を用いることにより形態観察も容易であり、効率よく解析を進めることができる。Dual-CCD カメラ / LED 光源装備 / 倒立型電動リサーチ顕微鏡 - 細胞機能解析装置による、世界に先駆け新規に開発実用化に成功した in vivo FRET プローブ - イメージング解析システムを用いて心臓機能の生体精密機能解析を行う。H23-24 年度に同定した新規遺伝子

3 遺伝子に対し、既に解析系として研究代表者らが確立しているゼブラフィッシュ実験系を用い新規同定遺伝子の分子生物学的、生理学的解析、細胞機能解析と迅速な病態モデルのイメージング解析を行う。さらにそこで有意な機能変化を認めるものについては哺乳類における遺伝子改変心筋症マウスから大動物に至るまでの生理機能解析、病態解析を行う。H24 年度までの条件検討から発展させ、将来創薬候補となるか判断とすべく、蛋白機能解析を中心とした検討も実施する。

生化学的解析法を利用した独自の生理活性物質同定および治療薬シーズ探索

新規同定遺伝子の同定によるゼブラフィッシュ解析実験の開始と同時に、培養細胞、蛋白分子レベルでの検討を進め、生理活性を有する結合蛋白の同定や相互作用を有する蛋白を同定する作業を行う。独自の蛋白分離精製技術を利用し、超高感度 Nano LCMS 解析機器を用いて分子の生物学的、病態学的意義を検討する。これらの検討は H24 年度までと基本的にそいつの手技であるが、さまざまな条件を整理し、最終的には前項にも記載の通り、単に蛋白機能解析のみならず、創薬候補となる蛋白分子標的となり得るかも含めた検討を実施する。

同定した相互作用分子から、病態へ介入可能な分子修飾など、創薬へ向けた分子探索を進め、将来の臨床応用を考慮した研究へと発展させる。

H23-24 年度に同定した心筋症発症に関わる新規遺伝子など合計 3 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。

既に有意な標的分子も得た遺伝子については、企業共同研究が H25 年度に開始された。知財に関する検討も実施し、実際の化合物に関する検討も開始された。それ以外の候補についても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化合物を原則探索する。

(倫理)

患者情報の解析に関しては施設の倫理委員会の承認を得た上、臨床研究倫理指針を遵守し慎重に

おこなう。その上で患者とは個別に、医師が書面に示した計画書を明示し、十分説明をしたうえで承諾を得たもののみを本研究に使用する。特に以下の点に留意する。

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。

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。

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

拠点施設ゲノムバンク化事業に協力可能な検体収集システムの構築

循環器疾患ゲノム解析症例の蓄積のみならず、非循環器疾患症例、および家系内非発症症例を対象に、全 Exome 解析における in-house variant data の蓄積に適した症例の蓄積の実現へ向けて、大阪大学医学部附属病院他診療科と連携し、大阪大学医学部附属病院全診療科が参加し、倫理委員会同意書統一書式や検体収集システムを主導的に構築した。

大阪大学最先端医療融合イノベーションセンター・ゲノム解析コアファシリティ（新設 H26 年 2 月開館、現共同研究センター）におけるゲノム解析を実施するために、本研究チームが主導し、構築したパイプラインを移植するとともに、情報解析も担当することとなった。

平成 23-24 年度の症例に加えて、平成 25 年も同様に症例蓄積を進めて、循環器疾患ゲノム解析症例の蓄積のみならず、非循環器疾患症例、および家系内非発症症例を対象に、全 Exome 解析における in-house variant data 構築に適した症例の蓄積を行った。総数は 180 症例を超え、臨床データと連結可能な心筋症ゲノムデータベースを構築した。

次世代ゲノム解析用情報解析システムの利用による新規遺伝子同定

次世代解析拠点施設と連携し、in-house variant data の蓄積にも協力できるよう倫理委員会の申請、審査も終え、ゲノム蓄積が全診療科を通じて行う事ができるようになった。情報解析は本研究の根幹となるものであり、その解析手法は本研究のみならず、メンデル遺伝にも将来応用可能なように一般化された Linux サーバーによるスクリプトとして構築され、安定した運用をはかることができるようになった。その結果、全科協力して解析協力体制を敷くこ

とができるようになった。

次世代シーケンス解析用 Linux サーバーにデータ解析専用のパイプラインを構築し、本解析用に新たに開発するソフトも合わせて、独自のパイプラインとして構築した。対象となる 55 家系 164 症例について、順次全 Exome 配列解析を実施し、上記情報解析システムを用いた遺伝子解析を実施した。

採取した血液サンプルからゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンス解析を行い、特に前年度までに家系症例を対象に Microsatellite marker を用いた連鎖解析を行うことで、難治性不整脈の家系の疾患原因遺伝子として新規遺伝子、心筋症遺伝子、心臓エネルギー代謝に関わる遺伝子等を同定、Genotyping などを行うことができ、本年度もその検討を継続して行った。配列解読、配列解析(マッピング、バリエーション検出)を終え、これら情報解析中の家系においても、Co-segregation を確認しながら、さらに 20 以上の家系症例について候補遺伝子の絞り込み作業を開始することができるようになった。

海外の共同研究施設との情報交流を欠かさず行い、このたび少数家系でも解析同定が可能となるよう、独自にスクリプトを整え、従来同定しえなかった遺伝症例群に対しても、新規未知変異も含めた新規の同定が可能となるパイプラインを新たに構築した。

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)

遺伝性疾患動物モデル(小～大動物)による迅速な機能解析、イメージング技術による検証

難治性疾患の新規候補遺伝子として同定された遺伝子、すなわち H23 年度に同定した新規遺伝子 AMF-GS2、SSS1、心筋症新規原因遺伝子に対して、ヒト疾患のゲノム変異の有無検索を終えた。

その間、ゼブラフィッシュ、遺伝子改変心筋症マウス、大動物(イヌ)心不全モデルを用いて分子生物学的、生理学的解析な分子機能解析と迅速病態解析、イメージング解析を行った。

AMF-GS2: ゼブラフィッシュ実験系を用い新規同定遺伝子の分子生物学的、生理学的解析、細胞機能解析と迅速な病態モデルのイメージング解析

として有用であることが解り、さらに大動物で検証するために虚血再灌流モデルを用いた解析もを行い、同遺伝子の発現変化も確認した。類似遺伝子にも解析の範囲を広げ、現在ミトコンドリア心筋症等も含めた症例を対象に別変異の有無に関する検索を行っている。

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

ゼブラフィッシュ実験系については、世界に先駆け新規に開発実用化に成功した in vivo FRET プロブ - イメージング解析システムの構築に成功し、それを用いて心臓機能の生体精密機能解析を行えるようになったこと、そして様々な心筋症関連遺伝子について、心筋代謝変化なども含めた生体イメージを行う事でリアルタイムな機能解析を実施することができるようになった。さらにそれらに対する特異的化合物も得て、創薬開発に資する検討へと展開することに成功した。

生化学的解析系、高精度生理活性物質同定による治療薬シーズ探索

AMF-GS2 に対する生理活性相互作用を有する分子の探索を行った。Nano-LC MS 解析による相互作用を持つ標的分子探索を実施した。特定の蛋白複合体群を同定し、得られた現象をもとに物質特許申請を行うとともに、構造解析と創薬標的としての可能性に関する検討に入った。特に本年度は類縁遺伝子についても同様の検討をその構造解析を中心に行い、有意な結合部位を類推するところまで検討を進めることができるようになった。今後は同部位に対する構造解析を更に進め、成功すれば化合物などへのスクリーニングにも発展できるところまで実施することができた。

SSS1 について、既に有意な膜蛋白標的分子およびその類縁分子を得て生理活性を持つ化合物に関する検討を行った。企業共同研究について、今後の創薬開発を目的とした検討はすすみ、他大学にも協力を得て、類似症例の蓄積、他変異部位の同定など症例群の蓄積を行いつつ、同化合物の本遺伝子に対する分子機能変化を確認することができた。本遺伝子蛋白をシーズとして開発された化合物を in vivo 機能解析に関する検討へと発展させる

努力が行われた。

さらに別心筋症家系から同定した、心筋症原因遺伝子についても、生理活性と細胞機能を評価し、結合蛋白をリードとしたリガンドを探索を開始すべく、阪大産学連携共同創薬開発研究について具体的な方法の選定をすませ、リード化合物ライブラリーからの探索スクリーニングを実施することとなった。その準備検討実験が進み、パイロット解析を行った。コントロール実験も成功し、その間にアッセイに必要な精製蛋白も十分量を蓄積することができ、実際の化合物探索を行う準備が整った。

D. 考察

本研究より以前に開始した倫理計画書、および平成 24 年度より大阪大学全 26 診療科と共同連携し、全科に対応できる倫理委員会同意書統一書式を用いることにより、in-house database 構築に資する検体収集システムを構築できた。本方法は他学研究機関からの問い合わせも多く、類似研究の普及に非常に資する試みであったと考えられる。

循環器内科内部のみならず、大阪大学医学部附属病院全診療科(26 診療科)と共通の同意書統一書式や検体収集システムを構築できたことにより、得られた in-house database の利用により学内におけるゲノム情報解析の精度は一層増すものと考えられる。日本人 variant database が拠点班より運用開始され、H25 年度後半より、一層確度の高い情報絞り込み解析を実施することができた。しかし大量にデータを解析する上で、独自のパイプラインを用いて解析を可能にするため、依然 in-house database にある fastq 形式のデータへのアクセスは必須であり、その意味でも学内症例の蓄積は重要である。今後の共同研究他研究機関におけるゲノム研究でも、同様のシステムが利用できる予定である。このようなシステムは今後の次世代ゲノム解析には必須のものであり、本研究に限らず広く応用の効くものであると考えている。

解析環境の整備を行い、共同研究先ないし試料提供者を受ける他施設共同研究機関へ、我々が開発した解析技術を積極的に共有することで、多施設共同研究を進めることができるようになった。

これら症例の充実に対する試みは、本研究を独創的に進める上で必須のものとする。

それら症例をもとに実施した全 Exome 配列解析においては、我々が開発した情報解析技術を共同研究機関とも積極的に共有し、将来循環器ゲノム研究コンソーシアム全体に公開できるようにするために、データのクオリティチェック、リファレンスマッピング、アプリケーションごとの解析を迅速に行うことが可能な Linux サーバーおよびパイプラインを構築し膨大なデータ解析に対応できる情報解析システムを本研究に導入することができた。探索の際には一家系内での解析を基本とし、発端者へ家族歴の問診から遺伝性の有無を区別し、公知の原因遺伝子変異の鑑別スクリーニングを実施除外したのち、新規遺伝子変異を有する可能性のあるもののみに対して 2 次スクリーニングを実施することとなった。

さらに従来あきらめざるを得ない絞り込み不足の少数発症症例家系についても、独自のパイプラインの開発により、今後有効性を以て効率良くアプローチすることが可能となった。本パイプラインは海外からの共同研究の依頼にもつながり、現在より強固なものへと開発を進めている。

この情報解析システムを用いることにより、これまで同定できなかった疾患遺伝子を幾つか同定、ないし他家系の迅速な発見追加を行う事ができるようになった。臨床部門との強い連携の中で蓄積した家系より、別家系のスクリーニングを迅速に行う事ができる。

同定し得た新規原因遺伝子については、遺伝子生理活性の有無の検索を行うと同時に、培養細胞、蛋白分子レベルでの検討を進め、生理活性を有する結合蛋白の同定や相互作用を有する蛋白を同定する作業を行うことで、生物学的、病態学的意義を検討に留まらず、創薬標的分子の選択も広がり将来の臨床応用を考慮した研究へと発展させることが可能である。

E. 結論

循環器内科内部のみならず、大阪大学医学部附属病院全診療科(26 診療科)と共同連携し、倫理委

員会同意書統一書式や検体収集システムを構築できたことにより、ゲノム解析の精度を増すことができた。臨床情報が集積された症例を蓄積することで、他には無い独自の臨床データ解析が可能な症例バンクを構築することに成功し、その情報を基にした二次性心筋症はじめ病因既知の循環器疾患を除外することができた。それらの症例からゲノム解析を行う症例を選択するというシステムを作り上げた。

さらに臨床的観点からのみではなく、次世代シーケンス解析の精度上昇にも努めて、その効率化をはかるため、ゲノムワイドに既知原因遺伝子の変異を先に探索する情報解析システムを作成することができた。網羅性、拡張性があり、コスト的にも有利であると考えられるため、Probandに対する全Exome解析を行うことが可能である。

いくつかの同定遺伝子は既に機能解析も終了し、有意な標的分子も得て、創薬開発を目的とした企業共同研究へと至ったものも含めて、創薬開発に有用な解析ツールであることを証明した。

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. Imai A, Gotoh K, Asano Y* (corresponding author), Yamada N, Motooka D, Fukushima M, Kanzaki M, Ohtani T, Sakata Y, Nishi H, Toda K, Sawa Y, Komuro I, Horii T, Iida T, Nakamura S, Takashima S.
Comprehensive metagenomic approach for detecting causative microorganisms in culture-negative infective endocarditis.
Int J Cardiol. 2014 Mar 15;172(2):e288-9.
2. Kioka A, Kato A, Makoto Fujikawa M, Tsukamoto O, Suzuki T, Imamura H, Nakano A, Higo S, Yamazaki S, Matsuzaki T, Takafuji K, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Shintani Y,

Yoshida M, Noji H, Kitakaze M, Komuro I, Asano Y* (corresponding author), Takashima S*.

Evaluation of intra-mitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014 Jan 7;111(1):273-8.

3. Takahama H, Shigematsu H, Asai T, Matsuzaki T, Sanada S, Fu HY, Okuda , Yamato M, Asanuma H, Asano Y, Asakura M, Oku N, Komuro I, Kitakaze M, Minamino T. Liposomal amiodarone augments anti-arrhythmic effects and reduces hemodynamic adverse effects in an ischemia/reperfusion rat model.

Cardiovasc Drugs Ther. 2013 Apr;27(2):125-32.

4. Sato N, Gheorghide M, Kajimoto K, Munakata R, Minami Y, Mizuno M, Aokage T, Asai K, Sakata Y, Yumino D, Mizuno K, Takano T; ATTEND Investigators.

Hyponatremia and in-hospital mortality in patients admitted for heart failure (from the ATTEND registry).

Am J Cardiol. 2013 Apr 1;111(7):1019-25.

5. Kajimoto K, Sato N, Sakata Y, Takano T; Acute Decompensated Heart Failure Syndromes (ATTEND) investigators.

Relationship between systolic blood pressure and preserved or reduced ejection fraction at admission in patients hospitalized for acute heart failure syndromes.

Int J Cardiol. 2013 Oct 12;168(5):4790-5.

6. Kajimoto K, et al.

Low admission heart rate is a marker rather than a mediator of increased in-hospital mortality for patients with acute heart failure syndromes in sinus rhythm.

Int J Cardiol. 2014 Jan 15;171(1):98-100.

(和文総説)

- 1) 朝野仁裕、小室一成. 特集「エクソーム解析成果と将来」「全エクソーム解析による難治性循環器疾患の原因遺伝子の同定 医学のあゆみ 出版社:医歯薬出版株式会社

2013. Vol. 245, No.5 415-421.

2、学会発表

- 1) 第 77 回日本循環器学会学術集会
Young Investigator's Award Finalists Lectures
1st winner
Title : G0/G1 Switch Gene 2 Promotes Mitochondrial ATP Production and Protects Cardiomyocytes from the Energy Crisis under Hypoxia
Shuichiro Higo, Yoshihiro Asano* (*; corresponding author), et al.
2013 年 3 月 15 日、横浜

- 2) 第 78 回日本循環器学会学術集会
シンポジウム Title : Research Strategies of Whole Exome Sequencing Practical Approaches for 110 Patients (32 families) with Hereditary Cardiomyopathy and Arrhythmia
Yoshihiro Asano
2014 年 3 月 20 日、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

- 1、特許取得
2 件申請中(非公開特許)

- 2、実用新案登録
なし

- 3、その他
以上、特筆すべき事項なし

厚生労働科学研究費補助金(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)

分担研究報告書

次世代遺伝子解析による希少難治性循環器疾患の診断治療法の開発と 臨床実用化に関する研究

研究分担者 山崎 悟 国立循環器病研究センター 室長

研究要旨

H23年度より行ってきた希少難治性疾患動物モデル開発、病態機序解析、及びヒト臨床研究で得た多くの成果をもとに、難治性循環器疾患の診断治療の創薬開発とその迅速なる臨床実用化を目指す。

次世代シーケンス解析の実践と同定遺伝子情報を診断治療に迅速に応用する独創的手法を利用し実施する。迅速なゲノム医療への応用のため、既知変異を効率よく除外することにより、新規変異を持つ確率の高い症例に集中して解析を行い、新規分子ないし変異に対する表現型機能解析と同定遺伝情報の臨床応用への時間短縮をはかる。特に H25 年度は国立循環器病研究センターにおいて蓄積した遺伝性循環器疾患の全 Exome 解析を実施するとともに、大阪大学との連携で情報解析パイプラインの構築完成を目指した。その結果、次世代解析における既存のスクリプトと独自開発のスクリプトを組み合わせることにより、変異解析に適したパイプラインを構築し、遺伝性循環器疾患解析に適したソフトとして開発することが可能となった。最終的に、新規遺伝子の候補バリエーションを特異し、その変異の機能を解析することによりバリエーションと病態との関連を明らかにすることができた。

A. 研究目的

難治性循環器疾患の原因遺伝子は多岐にわたり未解明も多く、殆どが厳密に原因を同定できぬまま高度医療に臨まざるを得ない。この現状に対し、先進的技術による早期診療が予後改善へもたらす社会的、経済的効果は計り知れない。

遺伝性が濃厚な希少難治性疾患の家系症例群より新規 rare variant(遺伝子変異)を同定し、その分子機能解析と、生理的意義を知るための相互作用分子を同定し、実用化診断治療薬となる分子標的を見出すことを研究目標とする。

B. 研究方法

ゲノム解析の迅速な実施と実用的解析システムの構築

1) 集積された症例の独自の臨床データ解析とゲノム解析症例の選定

国立循環器病研究センターに入院ないし外来でフォロー中の原因として遺伝性が示唆される難治性心血管系疾患症例を対象に、ヒトゲノム解析の説明と同意を得て遺伝性が濃厚な家系症例の採

血(ゲノム DNA の保存)を実施する。大阪大学との共同で心筋症、不整脈(家族性突然死を含む)、血管疾患の症例収集を行った。また、非家系孤発症例のうち、二次性心筋症を除外したものから症例を蓄積する。

2) 次世代ゲノム解析用情報解析システムの利用による新規遺伝子同定

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

(倫理)

患者情報の解析に関しては施設の倫理委員会の承認を得た上、臨床研究倫理指針を遵守し慎重におこなう。その上で患者とは個別に、医師が書面に示した計画書を明示し、十分説明をしたうえで承諾を得たもののみを本研究に使用する。特に以下の点に留意する。

1) 試料提供者の個人識別情報を含む情報の保護: 診療情報を含めた個人情報と検体とは徹底した匿名化を行い、遺伝情報と個人情報の連結は個人識別情報管理者のみが可能となるように個人識別情報管理者において情報を管理する。

2) 試料提供者に対する予想される危険や不利益およびそれらが生じた場合の措置: 心筋生検試料採取は通常の診療の際に医学的必要性に応じて行われたもののうち、診療に用いない残余検体を利用することとし、危険や不利益はないと考える。誤って遺伝情報が外部に漏洩した場合、就職・結婚・保険への加入等に関して不利益をこうむる可能性が考えられるため、これを防ぐために、個人識別情報管理者を置き、同管理者は試料の匿名化を行うとともに個人情報を厳重に管理・保管し、試料提供者のプライバシーを保護する。

3) 試料提供者から採取した生体材料の取り扱いについて: 提供された試料は、個人識別情報管理者が連結匿名化し、匿名化ラベルのみ貼って保存する。これらの試料は、生体試料の包括利用同意を得ており、本研究だけでなく、将来倫理委員会で承認された他の自主臨床研究についても用いることが可能である。したがって検査済みの試料は、適宜連結可能匿名化番号を含む検体等を完全に削除した上で廃棄するが、使用可能な残余検体は匿名化されたまま施錠された保管場所で保管される。また、特に研究成果として得られた情報の管理には、外部に漏洩しないように対策を行う。動物実験においても愛護上の問題点を考慮の上、施設の審査結果を本研究について得た。この倫理規定にのっとり動物愛護上の配慮を十分行って実験をおこなう。

4) 新規遺伝子 の候補バリエーションの同定、および変異の機能解析

構築したパイプラインを駆使して特定されたバリエーションの確認のために、家系のすべての検体について、sanger 法による確認、および co-seglication 解析を行う。そして、機能解析としては、アフリカツメガエルの卵母細胞を用いたマクロの電流の測定、培養細胞を用いたパッチクランプ法、およびモデル動物、ゼブラフィッシュを用いた病態再現性を行うことにより、変異と病態との関連を解析する。

C. 研究結果

ゲノム解析の迅速な実施と実用的解析システムの構築

1) 集積された症例の独自の臨床データ解析とゲノム解析症例の選定

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

連結可能匿名化できる臨床データのプロフィール

ングも行い、発端者解析の実施後の家系症例拡大を行う際の準備を実施した。それらの症例選択については年度内計3回のゲノム解析実務者会議を実施し、倫理委員会準備、症例選択に関する検討を行った。全ゲノム解析が可能な倫理委員会承認を得て、豊富な症例登録環境となった。今後も遺伝性循環器疾患を疑うものを中心に症例収集を行うこととなった。

2) 次世代ゲノム解析用情報解析システムの利用による新規遺伝子同定

疾患群ではあるものの発症・非発症症例を合わせて、全 Exome 解析を行った。総数は国立循環器病研究センターにおける同意書に基づく解析数として18症例であった。本研究におけるデータ統合を最優先するため、配列解析プロトコール、情報解析プロトコールの完全な統一を行った。

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

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

上記で構築したパイプラインを用いて、ある難治性不整脈家系のゲノム解析を行った。その結果、疾患原因遺伝子として、新規遺伝子 の中に候補バリエーションを発見することができた。これを確認するために、Sanger 法によるシーケンスの confirm および RFLP 解析を用いた co-seglication 解析を行ったところ、疾患と新規遺伝子 の候補バリエーションの対応が確認された。続いて、候補遺伝子 はある種のイオンチャネルであることが予想されたので、この候補バリエーションを発現ベクターにクローニングし、アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた 2 electrode voltage clamp 法により、マクロスコピックな電流を測定した。その結果、野生型に対して異常な電流が見られた。さらに詳細に解析するために、発現ベクターを培養細胞に導入し、シングルチャネルのパッチクランプ解析を行った。その結果、チャ

ネルの性質と異常電流の関係が明らかになった。続いて、モデル動物ゼブラフィッシュに候補バリエーションの遺伝子を導入することにより、循環器における phenotype を解析した。その結果、ヒトの臨床における病態がある程度再現され、最終的に候補バリエーションの変異と病態との対応を明らかにすることができた。

D. 考察

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

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

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

E. 結論

国立循環器病研究センターにおける遺伝性が示唆される難治性心血管系疾患症例を対象に、ヒトゲノム解析の説明と同意を得て遺伝性が濃厚な家系症例の採血(ゲノム DNA の保存)を実施し、30例の採血保存および18症例の全 Exome 解析を実施した。本研究におけるデータ統合を行うため、配列解析プロトコール、情報解析プロトコールの完全な統一を行った。本研究で利用価値の高い専用の

In-house database の構築を行う事ができた。H25 年度のさらなる遺伝子同定と、In-house variant database および公的 database からの効率の良い variant の除外を行い、家系絞り込みの作業を円滑に実施するシステムとなるよう、2 次解析パイプライン開発とともに、アノテーションパイプラインの開発を開始した。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

G. 研究発表

1、論文発表

(英文原著)

- 1) Kioka H, Kato H, Fujikawa M, Tsukamoto O, Suzuki T, Imamura H, Nakano A, Higo S, Yamazaki S, Matsuzaki T, Takafuji K, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Shintani Y, Yoshida M, Noji H, Kitakaze M, Komuro I, Asano Y, Takashima S.

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. Jan 7;111(1):273-278.

2、学会発表

- 1) Morito D,(2人略), Yamazaki S,(4人略)
Structure and Function of Moyamoya Disease-Associated Protein

Mysterin/RNF213, IVBM 2014, 2013 年 4 月 Japan(Kyoto)

- 2) Akira Funada (1人略) Satoru Yamazaki,(10人略).

Impact of the Polymorphisms of Renin-Angiotensin System on Prognosis in Hypertrophic Cardiomyopathy in the Era of Cardiac Magnetic Resonance 第 77 回日本循環器学会学術総会 2013 年 3 月

- 3) 小谷友理、(1人略)、山崎 悟(3人略)
もやもや病関連タンパク質 mysterin による zebrafish の発生制御. 第 8 回臨床ストレス応答学会大会, 2013 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

- 1、特許取得
なし

- 2、実用新案登録
なし

- 3、その他
以上、特筆すべき事項なし

厚生労働科学研究費補助金(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)
分担研究報告書

次世代遺伝子解析による希少難治性循環器疾患の診断治療法の開発と
臨床実用化に関する研究

研究分担者 李 鍾國 大阪大学大学院医学系研究科 寄附講座准教授

研究要旨

ヒト臨床サンプルを用いた遺伝子解析より検出された遺伝子変異のうち、新規候補遺伝子として同定されたものについては、迅速に in vivo の機能解析実験系の STEP へ検証を進めることが重要である。

本研究は診断法及び創薬に関する標的同定を最終目標とし、その迅速な臨床実用化を企図している。これまでに行ってきた、希少難治性疾患動物モデル開発、病態機序解析、及びヒト臨床研究で得た多くの成果は、本研究が目指す診断治療の創薬開発とその迅速なる臨床実用化に大きく寄与させることが可能である。詳細なゲノム情報の利用実現は、難治性疾患の原因遺伝子に基づく医療アプローチを可能とすると予想される。

難治性循環器疾患の遺伝性家系及び心不全症例の生体試料バンクより、ゲノム解析を行い同定し得た遺伝子に就いて、心筋症マウス解析とゼブラフィッシュイメージングの利用による迅速な in vivo 解析を行う。

またゲノム創薬へ向けてヒト iPS 細胞による検証も用いた治療標的リガンド開発と臨床実用化など得られたゲノム情報を迅速かつ有効に診療に結実させことを目的として研究環境の整備を進める。

A. 研究目的

遺伝性が濃厚な希少難治性疾患の家系症例を対象に行った遺伝子解析から同定された、原因遺伝子と推定される新規 rare variant を対象に、診断および治療薬標的を見出し、臨床実用化するために迅速に in vivo の機能解析を行い生物学的意義を検証できる実験系を構築する。

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ク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。

B. 研究方法

ゲノム情報の臨床実用化 (ゲノム創薬、診断薬開発と細胞治療への応用)

原因遺伝子発端者から採血検体を得て、組織からの疾患 iPS 細胞株を樹立し、これまで構築してきた高効率心筋細胞分化系を用いて、病態機序、分子機能解析を行うとともに、既存治療薬剤の薬効

(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置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。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厳重に管理・保管し、試料提供者のプライバシーを保護する。

3) 試料提供者から採取した生体材料の取り扱いについて：提供された試料は、個人識別情報管理者が連結匿名化し、匿名化ラベルのみ貼って保存する。これらの試料は、生体試料の包括利用同意を得ており、本研究だけでなく、将来倫理委員会で承認された他の自主臨床研究についても用いることが可能である。したがって検査済みの試料は、適宜連結可能匿名化番号を含む検体等を完全に削除した上で廃棄するが、使用可能な残余検体は匿名化されたまま施錠された保管場所で保管される。また、特に研究成果として得られた情報の管理には、外部に漏洩しないように対策を行う。動物実験においても愛護上の問題点を考慮の上、施設の審査結果を本研究について得た。この倫理規定にのっとり動物愛護上の配慮を十分行って実験をおこなう。

C. 研究結果

原因遺伝子発端者組織から iPS 細胞を樹立し、独自の高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 細胞作製について具体的に 8 例の細胞株を樹立ないし樹立を開始した。

また、樹立した iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導を行い、iPS 細胞由来心筋細胞を用いて、分子シグナル、電気生理特性、細胞内 Ca 制御特性、収縮特性等の分子機能・生理機能の解析実験基盤を整備し、病態発症機構の解明および創薬に向けた実験を開始した。

SSS1 および新規同定心筋症原因遺伝子を有する家系を対象に、iPS 細胞株樹立へ向けて症例の遺伝的バックグラウンドの検証に入っている。本遺伝子蛋白をシーズとして開発された化合物を用いた機能解析を行うため、化合物の入手および培養

細胞実験における変化を培養細胞における検討を行う準備を開始するとともに、iPS 細胞でも行う事ができるよう実験準備を行っている。

D. 考察

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

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

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

E. 結論

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

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

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(英文原著)

- 1) Miwa K, Lee JK, Takagishi Y, Opthof T, Fu X, Hirabayashi M, Watabe K, Jimbo Y, Kodama I, Komuro I. Axon guidance of sympathetic neurons to cardiomyocytes by glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). PLoS One. 8(7):e65202, 2013

2. 学会発表

- 1) 李 鍾 國 . Electrical Properties of Engineered Heart Tissues: Its Implication and Application for Arrhythmias. 心臓再生治療と不整脈. 第17回日本心不全学会学術集会 シンポジウム. 2013年11月29日・さいたま
- 2) Haruyo Yasui, Jong-Kook Lee, Akira Yoshida, Teruki Yokoyama, Junichi Nakai, Issei Komuro. Electrical Propagation of Three-dimensional Engineered Hearts Using Decellularized Extracellular Matrix. Biophysical society 58th Annual Meeting. 2014年2月19日 (San Francisco, USA)
- 3) 李 鍾國、永井 敏雄、宮川 繁、田畑 泰彦、坂田 泰史、澤 芳樹、小室 一成. 細胞動員の制御による心筋再生治療：第13回日本再生医療学会総会 シンポジウム (京都)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

以上、特筆すべき事項なし

厚生労働科学研究費補助金(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)

分担研究報告書

次世代遺伝子解析による希少難治性循環器疾患の診断治療法の開発と 臨床実用化に関する研究

研究分担者 扇田久和 滋賀医科大学 生化学・分子病態生化学講座 教授

研究要旨

従来行ってきた希少難治性疾患動物モデル開発、病態機序解析、及びヒト臨床研究で得た多くの成果をもとに、難治性循環器疾患の診断治療の創薬開発とその迅速なる臨床実用化を目指す。

次世代シーケンス解析の実践と同定遺伝子情報を診断治療に迅速に応用する独創的手法を利用し実施する。迅速なゲノム医療への応用のため、既知変異の迅速な鑑別除外により、新規変異を持つ確率の高い症例に次世代解析を行い、新規分子ないし変異に対する機動力ある表現型機能解析と同定遺伝情報の臨床応用への時間短縮をはかる。難治性循環器疾患の遺伝性家系の生体試料バンクを利用し、ゲノム解析の精度と速度を高める方策をとると共に、モデルマウス解析とゼブラフィッシュイメージングの利用による in vivo 検証の迅速化や、生化学的解析法を利用した独自の生理活性物質同定およびシーズ探索技術を利用し、治療標的リガンド開発と臨床実用化など得られたゲノム情報を迅速かつ有効に診療に結実させるよう研究を進める。

A. 研究目的

難治性不整脈疾患の原因遺伝子同定を行うことを目的とする。また、解析に際しては本研究班において開発される統一された配列解析プロトコールおよび情報解析プロトコールが、他施設に広げて行うことが可能かどうかについての比較検証が行えるようプロジェクトを進める。

新規 rare variant(遺伝子変異)が同定された場合には、その分子機能解析と、生理的意義を知るための相互作用分子を同定し、実用化診断治療薬となる分子標的を見出すことを研究目標とする。

B. 研究方法

ゲノム解析の迅速な実施と実用的解析システムの構築

遺伝性が示唆される難治性心血管系疾患症例(不整脈症例)を対象に、ヒトゲノム解析の説明と同意を得て、滋賀医科大学で採取した採血検体(ゲノム DNA 抽出)を用いて、大阪大学との共同研究を行う。

難治性不整脈症例についてのゲノム解析を Illumina 社製 GA IIx を用いて行う。データスループットは大阪大学、国立循環器病研究センターで実施している本研究のプロトコールと同一のものを扱い、配列解

析に関してはHiseq2000で行った際の解析に揃えた設定とし、情報解析は本研究用に開発したパイプライン(大阪大学 Linux サーバー)を用いてバリエーションを検出する。

滋賀医科大学内で実施した不整脈疾患のIllumina社製GA IIxを用いた解析結果と大阪大学の解析結果について、比較検討する。

(倫理)

患者情報の解析に関しては施設の倫理委員会の承認を得た上、臨床研究倫理指針を遵守し慎重に行う。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。

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。

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：本研究での解析に使用する検体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。

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

本年度は、難治性不整脈1家系4検体を対象として、全Exome解析を実施した。解析はIllumina社製GA IIxを用いて行った。臨床データと連結可能匿名化されており、臨床情報をガイドに原因遺伝子の同定を行った。シーケンスのクオリティについては、従来比較検討されてきたものと同様のデータを取ることができ、情報解析のプロトコルの実施に際しても支障なく実施することができた。

全Exome解析用の日本人SNVデータベースが必ずしも網羅できていない状況もあり、また、今回解析を実施した家系数および検体数が少数であり、完全な原因遺伝子の同定には至っていない。しかし、候補遺伝子1つについてcDNAのクローニングを行い、哺乳類細胞での発現ベクターを構築した。このベクターを利用することで、in vitroおよびin vivo実験系による機能解析を行う準備を進めている。

D. 考察

独自に解析をすることと比較して、循環器ゲノム解析施設が均一な配列解析、情報解析プロトコルで解析を実施することにより、将来的にも互換性のあるデータの蓄積を行う事ができた。

In house dataの蓄積と日本のバリエーションデータベースの公開を待たなければ、小家系における原因遺伝子の同定には至らないことには変わりないが、将来の公共データベース利用が可能となった際には、同様の解析を行っている施設のデータとも参照、ないし同様の臨床家系症例を有する施設との統一解析プロトコルを用いての解析結果を蓄積していく

ことの意義は大きいものとする。

また、逆に循環器施設が共同してこれら症例の蓄積を進めていくことにより循環器疾患解析に適應させたIn house genome referenceを構築することも可能となる。これらは将来有用性の高いシステムの構築に資するものと考えられた。

E. 結論

難治性不整脈 4 検体について、家系症例全 Exome 解析を実施した。連結可能匿名化された臨床データを元に、家系情報から現在利用できる手法での原因遺伝子の絞り込みを試みた。しかし一般に利用できる全 Exome 解析用の日本人 SNV データベースはなく、現時点では一つの遺伝子に到達することはできなかった。

In-house database および今後整備される日本人 SNV データベースの利用により原因を突き止められるように引き続きデータ、検体の蓄積を継続する。

循環器ゲノム解析施設が多施設間で配列解析、情報解析を行えるようにシステムの普及実用化を目指す上では、均一のプロトコールを作り、均一な配列解析、情報解析を実施することにより、将来的にも互換性のあるデータの蓄積を行う事が望ましいと考えられた。

また循環器施設が共同してこれら症例や循環器疾患解析に適應させたIn house genome referenceの蓄積を進めていくことの重要性についても示唆的な検討を行うことができた。

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) Maeda T, Takeuchi K, Pang X, Zankov DP, Takashima N, Fujiiyoshi A, Kadowaki T, Miura K, Ueshima H, Ogita H.

Lipoprotein-associated phospholipase A2 regulates macrophage apoptosis through the Akt and caspase-7 pathways. *J Atheroscler Thromb.* In press. 2014.

- 2) Yamane T, Murao S, Kato I, Kashima L, Yuguchi M, Kozuka M, Takeuchi K, Ogita H., Ohkubo I, Ariga H.

Transcriptional regulation of the legumain gene by p53 in HCT116 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 438: 613-618. 2013.

- 3) Majima T, Takeuchi K, Sano K, Hirashima M, Zankov DP, Tanaka-Okamoto M, Ishizaki H, Miyoshi J, Ogita H.

An Adaptor Molecule Afadin Regulates Lymphangiogenesis by Modulating RhoA Activity in the Developing Mouse Embryo. *PLoS One.* 8: e68134. 2013.

- 4) Zankov DP, Ogita H. ACTN4 (actinin, alpha4). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 17: 663-669. 2013.

2. 学会発表

- 1) Pang Xiaoling, Toshinaga Maeda, Keisuke Takeuchi, Hisakazu Ogita.

Regulation of macrophage apoptosis by lipoprotein-associated phospholipase A2 through the caspase-7 and Akt pathways. 日本循環器学会 2014年3月・東京

- 2) 村木早苗, 上山久雄, 山出新一, 田邊詔子, 扇田久和, 大路正人

日本人先天色覚異常の2型3色覚における遺伝子型とアノマロスコプ結果との比較 日本臨床眼科学会 2013年10月・横浜

- 3) 真島崇, 扇田久和

アダプター分子アフアジンによる単量体 GTPアーゼ RhoA を介したリンパ管形成の制御機構 日本血管生物医学会 2013年9月・豊中

- 4) Keisuke Takeuchi, Dimitar P. Zankov, Takashi Majima, Hisakazu Ogita.

Afadin regulates lymphangiogenesis through RhoA activation in mouse embryos. 日本生化学会大会 2013年9月・横浜

- 5) 前田利長, 竹内圭介, Pang Xiaoling, 扇田久和

リポタンパク質関連ホスホリパーゼ A2 変異型 (V279F) 遺伝子によるアポトーシス誘導機序の検討 日本生化学会近畿支部例会 2013 年 5 月・吹田

- 6) 村木早苗、上山久雄、豊田太、扇田久和、大路正人
杆体一色覚における網膜錐体 cGMP 依存性カチオンチャンネルの変異の機能的解析 日本眼科学会総会 2013 年 4 月・東京

(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

H. 知的財産権の出願・登録状況