

201442084A

難治性疾患等実用化研究事業

遺伝性心血管疾患における集中的な遺伝子解析及び 原因究明に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

研究代表者 高島 成二

平成27（2015）年 3月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託費（難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業））による委託業務として高島成二が実施した平成26年度「遺伝性心血管疾患における集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

難治性疾患等実用化研究事業

遺伝性心血管疾患における集中的な遺伝子解析及び 原因究明に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

研究代表者 高島 成二

平成27（2015）年 3月

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
遺伝性心血管疾患における集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する研究	
高島 成二	2
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. 遺伝性心血管疾患における集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する研究	
高島 成二、坂田 泰史、朝野 仁裕	14
2. 遺伝性心血管疾患における集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する研究	
油谷 浩幸	22
3. 遺伝性心血管疾患における集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する研究	
森田 啓行	28
4. 遺伝性心血管疾患における集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する研究	
北風 政史、森崎 隆幸、山本 晴子、朝倉 正紀	34
5. 遺伝性心血管疾患における集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する研究	
永井 良三	40
6. 遺伝性心血管疾患における集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する研究	
中谷 明弘	46
7. 遺伝性心血管疾患における集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する研究	
筒井 裕之	52
8. 遺伝性心血管疾患における集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する研究	
下川 宏明	56
9. 遺伝性心血管疾患における集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する研究	
磯部 光章	60

10. 遺伝性心血管疾患における集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する研究 清水 渉	66
11. 遺伝性心血管疾患における集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する研究 室原 豊明	72
12. 遺伝性心血管疾患における集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する研究 山岸 正和	78
13. 遺伝性心血管疾患における集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する研究 堀江 稔	84
14. 遺伝性心血管疾患における集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する研究 木村 剛	92
15. 遺伝性心血管疾患における集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する研究 斎藤 能彦	98
16. 遺伝性心血管疾患における集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する研究 砂川 賢二	102
17. 遺伝性心血管疾患における集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する研究 蒔田 直昌	108
III. 参考資料	118
IV. 研究成果の刊行物・別刷	
Higd1a is a positive regulator of cytochrome c oxidase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Feb 3;112(5):1553-8.	138
Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. Nat Genet. 2014 Dec;46(12):1267-73.	144
A novel KCNQ1 missense mutation identified in a patient with juvenile-onset atrial fibrillation causes constitutively open IKs channels. Heart Rhythm 11(1): 67-75, 2014.	154

I．委託業務成果報告(総括)

厚生労働科学研究委託費(難治性疾患等実用化研究事業)

委託業務成果報告(総括)

遺伝性心血管疾患における集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する研究

研究代表者 高島 成二 大阪大学大学院 医学系研究科 教授

研究要旨

遺伝性心血管疾患は一つの臨床病型に数多くの候補遺伝子が含まれており、循環器難病の原因同定に際して症例間比較が困難であることが多く、循環器分野独特の解析戦略が必要である。かかる特性を加味しながら循環器遺伝難病のゲノム解析拠点形成のため、既知遺伝子の臨床診断応用、新規原因遺伝子同定に両者に重点を置き、大家系に対する遺伝子同定はもとより、少数症例解析に対応した情報解析システムを開発する。

全国循環器ゲノム解析ネットワークを構成するため、難治性疾患研究班、日本循環器各学会に属する研究各施設が分担となり、遺伝子情報の臨床現場への還元と診療ガイドラインへの反映するための臨床研究チームを構築する。とりわけ「臨床情報・迅速生体機能・相互作用分子探索」、原因同定に欠かせない3つの重要機能解析をゲノム解析と同時に実施できる研究基盤を整えた施設が協同し、創薬開発への発展性を高めた事業を展開する。

研究班で同定した新規原因遺伝子については創薬開発に資するシーズ探索を行うとともに、生体試料、臨床情報からしか入手できないアノテーションを情報解析に付加し汎用性の高い循環器ゲノムデータベースを作成する。最新のセキュアな情報管理システムの下に、一般研究班に迅速に情報を還元するシステム技術の開発を行う。

以上の業務を行う事で、難病遺伝子解析における標的シーズの同定と創薬開発に向けた取り組み、原因遺伝子同定による精密な疾患分類の実現、早期診断と治療最適化は、重症化予防医療の実現を目指す。

研究分担者

油谷 浩幸
東京大学先端技術研究センター
教授

森田啓行
東京大学大学院医学系研究科
特任准教授

堀江 稔
滋賀医科大学
教授

中谷 明弘
大阪大学大学院医学系研究科
特任教授

北風 政史
国立循環器病研究センター
部長

永井 良三
自治医科大学
学長

筒井 裕之
北海道大学大学院医学系研究科
教授

下川 宏明
東北大学大学院医学系研究科
教授

磯部 光章
東京医科歯科大学大学院
医歯学総合研究科
教授

清水 渉
日本医科大学大学院医学研究科
教授

室原 豊明
名古屋大学大学院医学系研究科
教授

山岸 正和
金沢大学医薬保健研究域医学系
教授

木村 剛
京都大学大学院医学研究科
教授

斎藤能彦
奈良県立医科大学
教授

坂田 泰史
大阪大学大学院医学系研究科
教授

井手 友美
九州大学大学院医学研究院
教授

蒔田 直昌
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
教授

山本 晴子
国立循環器病研究センター
部長

森崎 隆幸
国立循環器病研究センター研究所
部長

朝倉 正紀
国立循環器病研究センター
室長

朝野 仁裕
大阪大学大学院医学系研究科
助教

A. 研究目的

ゲノム解析を要する循環器難病患者は数～十万人と非常に多く、原因遺伝子と臨床病型が 1 対 1 ではない拡張型心筋症は 50 種を超える遺伝子が同定されるも、未だ 7 割以上が原因遺伝子未同定である。精細な病因分類ができず治療の選択肢は乏しく、病態重症化と高度医療が不可避である。

難病克服のため全国規模の循環器ゲノム解析ネットワークの上に、ゲノム医学に精通する臨

床研究医が戦略的に解析を実施し疾患 rare variant の同定を行い、臨床現場に遺伝子情報を還元する必要がある。

少子・核家族化のため家系内の全エクソン解析による遺伝子同定は完結しないため、①ゲノム解析、②臨床病態診断、③未知遺伝子機能解析の 3 者に精通した臨床研究医が、ゲノム解析に適した臨床レジストリ、循環器専門基礎解析、生化学的探索を協同実施できる総合力のある循環器ゲノム解析拠点が必要である。

B. 研究方法

1. 全国普及を目指すゲノム情報解析システム

1) 全国統一プロトコールによるゲノム解析研究システムの構築

症例ゲノム情報のデータストレージへの収載と、付与された症例 ID による病院施設からのデータ参照システムをセキュアな環境の下で構築する。現在、大阪大学医学部附属病院および医学系研究科において、循環器内科が中心となり全診療科が参加して実施している施設内統一形式・共通プロトコールによる全エクソーム解析の実施例を参考に、同実施体制を応用し、全国各研究機関および病院施設、大阪府内循環器診療基幹病院との連携もはかり、遺伝子解析研究の実施運用体制の整備とそれに利用するための連携システムを構築する。研究施設内、施設外からのオーダーに対応する収集システムの構築を目指す。

2) 遺伝解析オーダー登録・情報解析・結果参照サーバーシステムの構築

整備された体制の下に、各遺伝子解析研究機関におけるゲノム解析を実施するためのオーダーシステムの構築と、その運用を目指す。さらにオーダーのみならず、同遺伝子解析研究システムを用いて、セキュアな環境で解析情報をフィードバックすることができる情報参照サーバーシステムの将来的構築も目指す。解析結果の報告フォーマットの作成と、臨床現場への遺伝子情報の還元するシステムの全国普及を目指す。

3) 独自新規解析パイプラインの開発と施設間共有

ゲノム解析研究者、ウェットラボ研究者、情報解析者、臨床医が分野を超えて協力し解析パイプラインの開発を行う。循環器疾患特異的遺伝子同定および創薬基礎研究開発も視野に統合的な標的シーズ探索システムを構築する。

2. ゲノム解析の基礎研究と臨床実用化

1) 既知遺伝子解析および新しい循環器疾患の分類法の確立

臨床病院へ迅速にゲノム診断を提供するためのシステムを構築する。そのため既知遺伝子変異を検出するため、Agilent 社 Haloplex または Illumina 社の TruSeq custom amplicon kit を基本にした既知遺伝子スクリーニングパネル（心筋症：85、不整脈：47 遺伝子に対応）を標準的に用い、循環器疾患特異的な既知遺伝子解析を実施する。

臨床情報と遺伝子変異情報を連結し遺伝子型に基づく疾患分類を試みる。病態経過、薬効評価とも連結させ診療最適化に有用な付加価値あるゲノム情報を提供する。

2) 未知遺伝子迅速機能解析による原因同定と創薬への応用

i) 既知遺伝子除外症例に対する全エクソン解析の実施：

疾患原因となる変異について既知遺伝子を除外した症例を中心に、全エクソーム解析を実施し、新規遺伝子変異の同定を試みる。候補化される未知遺伝子変異に対して分子機能解析を実施し、責任遺伝子変異としての検証を行う。

上記達成のため、循環器疾患に対応した情報解析パイプライン、既存バリエーション DB、in-houseDB、国内共同研究先の正常 CTL-DB

を用い、新規 rare variant の同定に注力する。

ii) 次世代機能解析による候補遺伝子の絞り込み:

ゲノム配列・情報解析から、蛋白相互作用、生体機能、分子イメージングに至る一連の解析を集中的に実施し原因遺伝子を同定する。大家系における候補遺伝子絞り込みにとどまらず、小家系、孤発症例からでも候補遺伝子の絞り込みを可能にするよう、新たな解析プログラムの開発を行う。

iii) 迅速生理機能解析による変異の生理活性の確認:

ゼブラフィッシュなど遺伝子改変可能かつ生体下に機能解析が可能なモデル動物を用いて、同定した変異機能を解析するため、生体機能を迅速に解析する。in vivo FRET/Dual CCD/倒立型電動リサーチ顕微鏡システムを用いることで、ゼブラフィッシュ心臓形態、心機能、遺伝子変異による分子機能変化を迅速に解析する。

研究班施設にて利用可能なプロテオミクス解析センターなどを利用し、新規遺伝子の相互作用分子を同定する。創薬候補分子に化合物の High Throughput Screening を実施し、同定された化合物に対して細胞機能変化、モデル動物の生体機能変化を検証する。創薬開発には医薬品医療機器総合機構の薬事承認審査経験者である研究分担と相談しながら進める。

3. 倫理的遵守事項

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。

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. 全国普及を目指すゲノム情報解析システム

1) 全国統一プロトコールによるゲノム解析研究システムの構築

ヒトゲノム倫理計画書に関しては、全エクソーム解析、パネル解析、情報解析を行う施設を共同研究施設として計画書に加え、共通の解析が各施設で一様に実施運用可能なように体制構築を行った。

症例から、同意取得、ゲノム抽出、既知遺伝子解析、情報解析ののち、未知変異が疑われる症例に対して実施する全エクソーム解析に至るまで、症例エントリーから共通パイプラインを用いて変異同定を目指す一連の流れを、分担研究者間で共有できる共通システムを開発し、研究班全体で検出したバリエーション情報も共有管理できるようなシステムの構築を行う事となった(参考資料1:2014年7月班会議資料)。

ゲノム抽出から、ライブラリー構築、配列解析に至るすべての工程を全施設共通化し、同じ解析システムを利用することにより、ゲノム抽出から全エクソーム解析を低コストのもとでの受託解析が実施可能な体制を構築した。

2) 遺伝解析オーダー登録・情報解析・結果参照サーバーシステムの構築

各研究施設で症例発生時に、同施設で匿名化作業を行って後、共通システムで統一したシステムの下に、症例登録から解析進捗確認、情報返却までを運用実施可能なように、検体情報の登録管理システムの開発を行った(参考資

料2:登録管理システム参考図)。

受け付けた解析検体情報をデータストレージへ収載することが可能なシステムを開発するため、受付サーバーを設置し、WEB 入力による症例登録が可能なプログラムを作成した。セキュアな環境の下でストレージサーバーが設置されたあかつきには、最終的に症例毎の解析 ID に基づき、登録元の施設からでも解析データを参照することが可能なシステムとなるよう構築する。

以上のシステムは解析の施設間連携を可能にし、共通フォーマットの下での遺伝子解析研究の実施運用体制の整備に直結する。最終的には臨床病院からの受け付けも可能となるようフォーマット化された解析結果報告書の形で、臨床現場への遺伝子解析情報を還元する全国システムとしての普及を目指す。

3) 独自新規解析パイプラインの開発と施設間共有

ゲノム解析研究者、ウェットラボ研究者、情報解析者、臨床医が分野を超えて協力し解析パイプラインの開発を行った。遺伝性心血管疾患の原因遺伝子同定のみならず、同定された分子に対する未知作用機序解析および創薬基礎研究開発も視野に統合的な標的シーズ探索システムを構築めざしている。そのため、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 によるスクリプ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。

さらに次世代シーケンス解析用 Linux サーバーに、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疾患共通のデータ解析専用のパイプラインを設置した。作動環境の維持管理・更新作業等を行うとともに、同パイプラインをベースにした、心血管疾患の解析に適する循環器専用のスクリプトも組み込んだ解析プログラムを構築した。本研究はこれらの情報解析システムを各研究班の情報解析に共有共通化して用いることであり、今年度の症例についても順次適用し解析が始まっている。

一方で、殆どの症例は様々な理由から原因遺伝子変異の同定に至らないものも多い。そこで、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新しい情報解析システムの構築に向けた取り組みも行った。上記同定に至らない症例の多くは、小家系または単症例のため、絞り込み情報が不十分であった場合がほとんどである。そこで、小家系または単症例の遺伝性疾患を対象に、原因遺伝子を同定するアルゴリズムを我々は開発した(論文投稿中)。現在、全エクソーム解析により既知遺伝子既知変異であった症例の全エクソーム解析結果を陽性コントロールとして用いて、絞り込みの精度検証を行っている。

2. ゲノム解析の基礎研究と臨床実用化

1) 既知遺伝子解析および新しい循環器疾患の分類法の確立

臨床における疾患既知遺伝子変異を検出する迅速な臨床ゲノム診断を将来提供するためのシステムを構築する取り組みを行った。Agilent 社 Haloplex または Illumina 社の TruSeq custom amplicon kit を基本にした既知遺伝子スクリーニングパネル(心筋症・心血管疾患:85 遺伝子

に対応(東京大学先端科学技術研究センター)、不整脈:47 遺伝子に対応(滋賀医科大学))を標準的に用いることができるようにシステムの構築を行う事で、遺伝性心血管症例に対する、既知遺伝子変異の同定するシステムが整った。

パイプラインの開発およびバリエーションデータベースの開発を行い、パネル解析と全エクソーム解析の解析精度の検証を行うため、初年度の症例については、一定数の症例に対して一律にパネル解析と全エクソーム解析の両者を実施し、将来的に次世代解析技術を循環器領域における遺伝子診断に利用するための基本情報について、年度末までに解析が終了するデータを用いてデータベース化作業をおこなっている。

2) 未知遺伝子迅速機能解析による原因同定と創薬への応用

i) 既知遺伝子除外症例に対する全エクソン解析の実施:

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、遺伝性を疑う心血管疾患 228 症例のサンプルを収集し、全エクソーム解析を実施した。

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。全エクソーム解析を実施した症例については、新規遺伝子変異の同定を試みている。さらにそれら幾つかは現在候補化された未知遺伝子変異に対して分子機能解析を開始し、責任遺伝子変異としての検証を行っている。

一例として、不整脈発症に関わると想定される新規遺伝子(遺伝子 A)を同定した。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、同遺伝子の配列検索を行い、家族発症を認める別家系から、同遺伝子における別の non-synonymous 変異を同定した。元の家系同様 Co-segregation および、日本人 common variant の除外も確認されこの遺伝子が本不整脈の原因遺伝子であることを確認した。遺伝子同定にあたっては、これら作業に関わるデータベースからの情報解析に関するノウハウも蓄積し、以後の情報解析における方法の統一化をはかることができた。

ii) 次世代機能解析による候補遺伝子の絞り込み:

前項 i) にて同定した遺伝子はイオンチャネルを構成することがわかっており、本分子に対する細胞機能解析を実施した。Xenopus を用いたパッチクランプによる機能解析も実施したところ、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。該当不整脈の原因遺伝子としての機能変化を検証することができた。さらに本分子に相互作用する化合物(化合物 B)を共同研究先と共に同定し、この化合物 B が変異遺伝子による細胞機能障害を改善させることをあきらかにした。

iii) 迅速生理機能解析による変異の生理活性の確認:

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、in vivo FRET プロブ—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とともに Light sheet fluorescence microscopy により鮮明に一細胞レベルの断層像撮像した心臓の形態、興奮収縮機能も観察することができた。

ゼブラフィッシュは遺伝子改変可能かつ生体下に機能解析が可能なモデル動物であり、さらに化合物 B の作用も確認することができたため、当初の仮説にしたがった、ゼブラフィッシュの心臓形態、心機能、遺伝子変異による分子機能変化を迅速に解析することができた。

D. 考察

遺伝子解析による成果を臨床・基礎双方に活用するためには、

1. 医学的側面から、学術情報の整理と技術開発および人的資源の育成を行うとともに、

2. 経済的側面から、解析研究および臨床診断の実施に必須のインフラ整備と、従事する人材を確保維持するためのコストを算出すること、

そして、

3. 社会的・倫理側面から、整備された倫理承認環境のもとでの遺伝子解析実施のみならず、社会的コンセンサスを得るとともに、実施側がコンプライアンス遵守の確認を行う事が必要である。

1. 医学的側面

遺伝性心血管疾患に対して遺伝子解析を実施する意義および特徴、そして技術開発

希少難治性循環器疾患症例のなかでも、心筋症、心不全は、心筋梗塞や感染性の心筋炎とは異なり、心筋細胞に発現する分子本来の機能が損なわれることにより形成される病態性格を有する。特発性心筋症をはじめとする肥大型心筋症、拡張型心筋症、拘束型心筋症、不整脈源性右室心筋症、左室緻密化障害等、また類縁心筋疾患として蓄積病(心アミロイドーシス、ダノン病、ファブリー病等)、心伝導障害、ミトコンドリア病、神経筋

疾患(筋ジストロフィー等)、全身系統疾患による心筋症等、様々な疾患が対象となる。上記に含まれる疾患には遺伝性を示す難治性疾患はもとより、発症機序がいまだ不明のものも数多く含まれており、分子遺伝学的アプローチが必要である。

疾患遺伝子解析を実施する上で画期的な解決策の一つとして、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析が用いられるようになり、全エクソン配列解析や既知遺伝子解析パネルを用いた標的遺伝子解析は、疾患原因の遺伝学的要因を明らかにする有力な手段として期待されている。我々は次世代遺伝子解析と通して、基礎的研究のためとしてだけでなく臨床診断として威力を発揮する解析手法の確立にむけた取り組みを現在行っている。

二次性心筋症の除外診断を受けた拡張型心筋症の孤発症例を対象に行った全エクソン解析においてリスト化された塩基変異のうち、いわゆる既知遺伝子・既知変異として合致するものは決して多くない。また遺伝性が家系図上疑われるも単症例解析しかできなかったものに対して行った場合においても、既知変異に合致するものは多くない。一方で従来報告にない塩基部位であるものの複数の既知遺伝子の非同義置換を含む症例は少なくない。次世代遺伝子解析技術が一定の正確性を確保できる時代となったいま、この事実は、拡張型心筋症孤発症例は必ずしも遺伝子変異を原因とする疾患とは限らない可能性があること、日本人のコモンバリエーションデータベースが不十分であることが主な要因と考えられる。

拡張型心筋症や肥大型心筋症、左室緻密化障害、拘束型心筋症などの原因遺伝子は、それぞれに特徴的な遺伝子も確かに存在するが、各疾患間での重複も多く、さらに塩基変異部位の別でも病態を必ずしも区別することができないことがわかっている。すなわち現状の臨床診断に対して変異遺伝子が重複するという事実は無視することができず、血縁関係の無い多症例間で比較す

る場合、病態病名による変異の絞り込みを行うことができない。加えて、各疾患毎に極めて多くの既知遺伝子が既に報告されており、症例内で頻度の多い共通疾患変異を見出すことも容易ではない。

そのような中で心不全の原因鑑別を行うには孤発症例を対象にした解析においても、効率良く疾患変異を絞り込むことが可能な情報解析プログラムの開発が必要と考えられた。そこで我々は現在遺伝性疾患を疑う家系症例において家系内発症者数の少ない場合、極端に言えば単症例の場合(血縁発症者が何らかの理由で解析に参加できない場合)でも対応できる解析方法の開発に取り組んでいる。本来約数百個検出される候補バリエーションが、ごく少数にまで絞り込むことが可能なプログラムとして、現在開発成果の検証に入っている。

2. 経済的側面

解析研究の実施および、インフラの整備に関するコスト

当該事業全体に求められていることの一つとして、「遺伝子解析技術の希少難病を克服するための臨床応用の実現」がある。基礎解析研究とは異なり、臨床でこれらの解析を実施し結果得られる情報を利用するためには、研究に左右されない恒常的な安定性をもつ実施環境の整備と維持が必要である。

そのためには疾患領域の各専門性を有する施設に併設して解析施設の設備、場所を恒常的に確保し、設備、プロトコルの一定基準に従った維持管理更新作業が必要になる。それら、試料管理保存、配列解析実施、情報解析実施、そしてそれに関わる人材は、従来の遺伝子解析研究の枠組みからは一部重複ももちろん可能である者の、一定程度は別に確保する必要

があり、それにかかるコストを考慮することが必要になる。

人的資源の維持・確保

今後ゲノム解析は日常的に実施される時代となり、それを利用した医療開発が進められると予想されるが、現在この領域を担う人材は流動的であるとはいえ不足し、さらにそれを維持する枠組みは不十分である。本事業において臨床応用を実現するために循環器疾患領域分野としてそれら人材に関して必要な情報を整理することが必要である。

本事業では当該事業実施期間を通じて、遺伝子解析システムを構築するなかで、そのモデル事業として、試料保存・管理、配列解析実施、情報解析実施、情報解析システム管理にかかる人的資源に関して情報を整理する予定としており、将来的に効率良い事業の実施を実現していく必要があると考えられる。

3. 社会的・倫理側面：

倫理承認環境の整備

遺伝子解析研究の最初に直面する問題点は、希少難病含めた該当疾患の症例収集にある。遺伝性心血管疾患に分類される希少難病は循環器領域には特発性心筋症、代謝蓄積性疾患、先天性疾患、不整脈など含めて多くの疾患が分類されるが、臨床遺伝子診断が可能なものは非常に限られている。

一方、それら全ての症例の収集およびそれを用いた研究には、従来の一般臨床研究の倫理指針の遵守に加えて、ヒトゲノム解析研究の倫理指針に則った研究計画書および同意の取得が必要となるのは周知のことである。しかしながら一拠点機関または限られた基幹病院・研究施設に症例

が全て集中していることはなく、その多くが一定規模の一般医療機関において診療をされているのが現状である。残念ながらそれら全ての各研究機関、各臨床病院施設が、効率良くゲノム研究計画を提出審査する体制にはなく、書式も独自フォーマットとして設定されていることも多く、結果としてヒトゲノム解析研究実施の大きな障壁となっている。そこで本事業を通じてこれら倫理にかかわる問題点を明確にし、他の研究領域の拠点班とも共有しながらその障壁を克服していく必要がある。

さらに遺伝子解析研究と臨床遺伝子診断の境界についての患者側の認識はいまだ不十分であり、臨床医や臨床遺伝専門医、そしてGMRC (genome medical research coordinator) の育成と配置によるゲノム医療に関する啓蒙活動、そして症例への理解と研究への参加を促す試みを行っていかなければならない。

E. 結論

従来の遺伝性心血管疾患のバリエーションデータベースの構築により、臨床遺伝子診断が可能な疾患を早期に整理し、臨床診断と遺伝子解析研究の境界を明確にし、両者実施の環境整備を実現することが急務である。

その為には、本事業で開発を目指す「全国普及を目指すゲノム情報解析システム」の実現が必要である。具体的には、① 難病の原因究明と、創薬開発の推進(難治疾患克服)、② 全国循環器遺伝子解析機関ネットワーク構築(難病医療支援ネットワークへの連携)、③ 生体試料バンク、ゲノムデータベース事業への症例提供、④ 早期診断、先制医療の実現、診療ガイドライン改訂、医療費低減、予後改善を目指す臨床研究への情報提供が必要である。

実際に今年度は、循環器疾患の特殊性を理解した汎用性ある研究システムの構築するため、

- ①臨床病態診断
- ②ゲノム解析
- ③原因同定
- ④情報返却、

を主とした事業を実施したが、それらの一体化した解析拠点の実現により、運用ノウハウは一般施設へ汎用性を以て提供される予定である。

さらに長期的視点および発展的事業として、①本邦発の循環器創薬治療薬開発、② 遺伝子情報解析システム開発、③ ゲノム解析技術と人材の育成、倫理啓蒙活動、ゲノム研究従事者の技術水準向上などのプロジェクトも同時に推進する必要がある。

分子遺伝学的なアプローチを用いた難治性循環器疾患の病態研究において、心機能障害惹起に関与する分子について様々な検討が行われてきた。また従来、臨床遺伝学的アプローチによっても多くの遺伝子変異の同定がなされ、それら分子の病態形成における役割が明らかとなってきた。最新のゲノム解析技術はさらに新たな遺伝子変異の発見を加速し、先進的な分子生物学的手法の導入は詳細な分子機能解析を可能にした。その結果、病態機序解明に役立てるだけでなく臨床に還元できる橋渡しの研究も実現可能な時代となった。臨床病態の原因鑑別のため遺伝子変異を同定し、症例毎に病因をつきとめることも可能な時代において、正確な原因同定と情報の利活用は診療の適正化と、基礎的にも心不全の病態の正しい理解につながり、新しい診断法治療法の開発など今までにない展開も期待できる。それら実現に最も重要なことの一つに、ゲノム情報解析系の統一であり解析して得た情報を有効的に共有利活用できるよう、新しい時代の研究システムが構築されることが望まれる。

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) Hayashi T, Asano Y, Shintani Y, Aoyama H, Kioka H, Tsukamoto O, Hikita M, Shinzawa-Itoh K, Takafuji K, Higo S, Kato H, Yamazaki S, Matsuoka K, Nakano A, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Goto YI, Ogura T, Kitakaze M, Komuro I, Sakata Y, Tsukihara T, Yoshikawa S, Takashima S. Higd1a is a positive regulator of cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2015) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Feb 3;112(5):1553-8. doi:10.1073/pnas.1419767112. Epub 2015 Jan 20.
- 2) Yan Y, Tsukamoto O, Nakano A, Kato H, Kioka H, Ito N, Higo S, Yamazaki S, Shintani Y, Matsuoka K, Liao Y, Asanuma H, Asakura M, Takafuji K, Minamino T, Asano Y, Kitakaze M, Takashima S. Augmented AMPK activity inhibits cell migration by phosphorylating the novel substrate Pdlim5. *Nat Commun*. 6: 6137. (2015) *Nat Commun*. 2015 Jan 30;6:6137. doi: 10.1038/ncomms7137.

(和文業績)

- 1) タンパク質・核酸計測機器の発展と生体制御メカニズムの解明・医療への応用
高島 成二 生産技術 医療と技術
生産技術振興協会 季刊誌 66(2) 113-117
2014

2) 循環器専門医

「特集 II: 第 78 回日本循環器学会学術集会」

5. 網羅的ゲノム研究は循環器病学の臨床を

いかに変えたか ―遺伝/臨床/疫学情報

のリンケージ

「遺伝性循環器疾患の原因遺伝子同定における超高速シーケンサーを用いた全エクソーム解析戦略」

朝野仁裕、2015 年 南光堂

3) 「循環器内科」 第 77 巻第 4 号 (2015 年 4 月)

特集/循環器疾患の分子遺伝学

4. 心不全における分子遺伝学

Molecular Genetics of Heart Failure

朝野仁裕、2015 年、科学評論社

2、学会発表

1) 生化学若い研究者の会 初夏セミナー 京都
21 世紀; 生化学の標的をいかに絞り込むか
(2014 年 8 月 2 日)

2) 第 17 回血管病態研究会 仙台
特別講演 虚血適応としての ATP 代謝
(2014 年 10 月 11 日)

3) 第 17 回日本心不全学会 大阪
シンポジウム「心不全の分子メカニズム」
ATP 代謝と心不全
(2014 年 10 月 11 日)

4) Multi-dimensional Fluorescence Live
Imaging of Cellular Function and
Molecular Activities (MDFLI)
シンポジウム
「循環器系の蛍光イメージング」
ATP concentration imaging in beating heart
(2015 年 1 月 28 日)

5) 第 62 回日本心臓病学会学術集会
シンポジウム 4 心不全患者に対する多面的
アプローチ

「重症慢性心不全の病態可塑性判断を可能にする心臓病理エピゲノム診断指標の開発」朝野仁裕

(2014 年 9 月 27 日)

6) 第 31 回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会
名古屋

Symposium 2 「Heart Failure Research Update」A New Diagnostics Method for Refractory Heart Failure

朝野仁裕

(2014 年 11 月 29 日)

7) 第 3 回 AAA (Academy of Aging and Cardiovascular-Diabetes Research) 東京
「疾患ゲノム解析による新規原因遺伝子変異の同定と機能解析」

朝野仁裕

(2015 年 1 月 11 日)

8) 第 44 回日本心脈管作動物質学会
高松

シンポジウム S3-3 心不全研究のカッティング・エッジ

「拡張型心筋症の病態不可逆性を予測する新規心臓エピゲノム診断指標の開発」

朝野仁裕

(2015 年 2 月 7 日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

1、特許取得

高島成二、朝野仁裕、中谷明弘、今井敦子
(国立大学法人大阪大学)、ゲノム解析装置、
ゲノム解析方法及びゲノム解析プログラム、
特願 2014-212799 (2014 年 10 月 17 日出願)

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．委託業務成果報告(業務項目)

厚生労働科学研究委託費(難治性疾患等実用化研究事業)

委託業務成果報告(業務項目)

遺伝性心血管疾患における集中的な遺伝子解析及び原因究明に関する研究

研究代表者	高島 成二	大阪大学大学院 医学系研究科	教授
研究分担者	坂田 泰史	大阪大学大学院 医学系研究科	教授
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

希少難病を中心とする遺伝性心血管疾患の原因遺伝子変異同定を行う。既知遺伝子の既知塩基変異の同定から、新規原因遺伝子新規変異の同定にいたるまで、臨床遺伝子診断および基礎病態解析からの臨床応用の両者に共通するゲノム解析技術の確立を目指して研究を実施する。大家系に対する遺伝子同定はもとより、少数症例解析に対応した情報解析システムを開発し、循環器遺伝難病のゲノム解析拠点を形成する。とりわけ「臨床情報・迅速生体機能・相互作用分子探索」、原因同定に欠かせない 3 つの重要機能解析をゲノム解析と同時に実施できる研究基盤を整えた施設が協同し、創薬開発への発展性を高めた事業を展開する。同定した新規原因遺伝子については創薬開発に資するシーズ探索を行うとともに、生体試料、臨床情報からしか入手できないアノテーションを情報解析に付加し汎用性の高い循環器ゲノムデータベースを作成する。最新のセキュアな情報管理システムの下に、一般研究班に迅速に情報を還元するシステム技術の開発を行う。

以上の業務を行う事で、難病遺伝子解析における標的シーズの同定と創薬開発に向けた取り組み、原因遺伝子同定による精密な疾患分類、早期診断と治療最適化、重症化予防医療の実現を目指す。

A. 研究目的

ゲノム解析を要する循環器難病患者は数～十万人と非常に多く、原因遺伝子と臨床病型が 1 対 1 ではない拡張型心筋症は 50 種を超える遺伝子が同定されるも、未だ 7 割以上が原因遺伝子未同定である。精細な病因分類ができず治療の選択肢は乏しく、病態重症化と高度医療が不可避である。

難病克服のため全国規模の循環器ゲノム解析ネットワークの上に、ゲノム医学に精通する臨

床研究医が戦略的に解析を実施し疾患 rare variant の同定を行い、臨床現場に遺伝子情報を還元する必要がある。

少子・核家族化のため家系内の全エクソン解析による遺伝子同定は完結しないため、①ゲノム解析、②臨床病態診断、③未知遺伝子機能解析の 3 者に精通した臨床研究医が、ゲノム解析に適した臨床レジストリ、循環器専門基礎解析、生化学的探索を協同実施できる総合力のある循環器ゲノム解析拠点が必要である。

B. 研究方法

1. 全国普及を目指すゲノム情報解析システム

1) 全国統一プロトコールによるゲノム解析研究システムの構築

症例ゲノム情報のデータストレージへの収載と、付与された症例 ID による病院施設からのデータ参照システムをセキュアな環境の下で構築する。現在、大阪大学医学部附属病院および医学系研究科において、循環器内科が中心となり全診療科が参加して実施している施設内統一形式・共通プロトコールによる全エクソーム解析の実施例を参考に、同実施体制を応用し、全国各研究機関および病院施設、大阪府内循環器診療基幹病院との連携もはかり、遺伝子解析研究の実施運用体制の整備とそれに利用するための連携システムを構築する。研究施設内、施設外からのオーダーに対応する収集システムの構築を目指す。

2) 遺伝解析オーダー登録・情報解析・結果参照サーバーシステムの構築

整備された体制の下に、各遺伝子解析研究機関におけるゲノム解析を実施するためのオーダーシステムの構築と、その運用を目指す。さらにオーダーのみならず、同遺伝子解析研究システムを用いて、セキュアな環境で解析情報をフィードバックすることができる情報参照サーバーシステムの将来的構築も目指す。解析結果の報告フォーマットの作成と、臨床現場への遺伝子情報の還元するシステムの全国普及を目指す。

3) 独自新規解析パイプラインの開発と施設間共有

ゲノム解析研究者、ウェットラボ研究者、情報解析者、臨床医が分野を超えて協力し解析パイプラインの開発を行う。循環器疾患特異的遺伝子同定および創薬基礎研究開発も視野に統合的な標的シーズ探索システムを構築する。

2. ゲノム解析の基礎研究と臨床実用化

1) 既知遺伝子解析および新しい循環器疾患の分類法の確立

臨床病院へ迅速にゲノム診断を提供するためのシステムを構築する。大阪大学において収集したゲノム検体は既知遺伝子変異を検出するため、滋賀医科大学および東京大学に送付し、Agilent 社 Haloplex または Illumina 社の TruSeq custom amplicon kit を基本にした既知遺伝子スクリーニングパネルを用いた、循環器疾患特異的な既知遺伝子解析を実施する。

臨床情報と遺伝子変異情報を連結し遺伝子型に基づく疾患分類を試みる。病態経過、薬効評価とも連結させ診療最適化に有用な付加価値あるゲノム情報を提供する。

2) 未知遺伝子迅速機能解析による原因同定と創薬への応用

i) 既知遺伝子除外症例に対する全エクソン解析の実施:

疾患原因となる変異について既知遺伝子を除外した症例を中心に、全エクソーム解析を実施し、新規遺伝子変異の同定を試みる。候補化される未知遺伝子変異に対して分子機能解析を実施し、責任遺伝子変異としての検証を行う。

上記達成のため、循環器疾患に対応した情報解析パイプライン、既存バリエーション DB、in-houseDB、国内共同研究先の正常 CTL-DB を用い、新規 rare variant の同定に注力する。

ii) 次世代機能解析による候補遺伝子の絞り込み:

ゲノム配列・情報解析から、蛋白相互作用、生体機能、分子イメージングに至る一連の解析を集中的に実施し原因遺伝子を同定する。大家系における候補遺伝子絞り込みにとどまらず、小家系、孤発症例からでも候補遺伝子の絞り込みを可能にするよう、新たな