

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に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な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

一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蔵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

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は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もおこなった。

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約 150 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ン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とともに Light sheet fluorescence microscopy により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

今年度は、循環器疾患の臨床病態に合致した遺伝子変異データベースを確立するために、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、既知遺伝子・既知変異として合致しないもの、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、新規塩基変異を同定する情報解析を実施した。

全エクソン解析を用いた症例解析を行う場合、変異の同定効率を高めるためには、Linuxサーバーによる統一化された情報解析プログラム(パイプライン)の利用が不可欠である。独自に情報解析を行う場合には、大学研究機関等は公的研究機関において利用可能な世界標準的なプログラムを情報解析パイプラインに組み込み使用することができる。配列情報のエラー除去を行い参照配列マップする過程や、マップされたリード配列から一定の基準で変異として検出する過程には、多検体間比較が可能なように全ての情報解析法を統一しておくことが極めて重要である。

希少疾患の常染色体優性の遺伝形式を取る症例を解析する場合、ヘテロ接合となる対立遺伝子の中から、希少変異変異を抽出しなければならない。我々の施設の情報解析パイプラインを用いると、約80000箇所ヘテロ接合変異を検出することができ、その中から非同義置換、アリル頻度などを各種パラメータの設定による除外を行い、最終的に約600個前後の変異が抽出されるようになっている。この過程でリストアップされた変異の中に疾患変異情報リストに該当をみつけることができれば、既知遺伝子変異による発症である可能性が高まる。その他の変異可能性の除外と、既知変異情報の精査、サンガー法による確認、Co-segregationの確認、機能解析などの組み合わせを経て最終的に確定にいたる。

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。したがって、一施設にとどまらず、全国の循環器ゲノム解析の情報を統合する必要があると考えられる。

E. 結論

新規遺伝子の同定:

遺伝性心疾患家系の原因遺伝子探索において連鎖解析と全エクソン解析を併用したことにより、2種類の解析手法の違いによる絞り込み遺伝子の変化をみることもできた。単一遺伝子変異と思われる常染色体優性の遺伝形式をとると考えられた。連鎖解析においては40Mbpの領域にまでしか絞り込むことができず、該当領域にMapされる遺伝子数は200個を超えていたが、遠戚発症者2例および近戚非発症者1例に対して全エクソン解析による希少変異の絞り込みを行った結果、約30個の遺伝子にまで絞り込むことができた。いずれも片方のみでは単一遺伝子変異の同定には至らなかったが、ゲノム組み換え情報により絞り込んだ候補領域と、全エクソン解析による塩基配列情報により絞り込んだ変異遺伝子情報の両者を組み合わせることにより、共通する遺伝子は一つのみとなり、原因遺伝子およびその塩基変異を同定することに成功した。

単症例解析の情報解析プログラムの開発:

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。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み、本来約600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。

以上より、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。

今年度は上記問題を解決すべく、各分担班とのゲノム解析情報の交換を可能にするシステムを作成し、実際に統一した解析を実施するシステムを作成稼働させることができた。

今後も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。

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 Pdlm5. 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」
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 回日本心臓血管作動物質学会

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

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（業務報告）

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

（研究協力者 野村 征太郎 東京大学医学部付属病院 特任研究員 ）

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必要がある。

本年度は遺伝性心血管疾患患者のゲノム解析パイプラインを構築した。概要は下記の6項目から構成される。1）各施設におけるゲノム解析倫理委員会への申請、2）十分なインフォームド・コンセントおよびゲノムDNA収集、3）既知変異遺伝子のターゲットリシーケンス、4）新規変異遺伝子の探索（エクソームシーケンス）、5）サンガー法による確認、6）各施設への結果の返送および臨床情報との統合解析。

我々は、アジレント社の Haloplex のプラットフォームを用いて遺伝性心血管疾患パネルを作成し、上記のパイプラインにより収集された23症例に対して既知遺伝子のターゲットリシーケンスを行った。アジレント社が提供する Haloplex 専用解析ツール SureCall を用いて解析し、549ヶ所の変異を同定した。さらに既知の SNPs を日本人の含めた SNP データベースを用いて除去し、81の疾患との関係が示唆される変異を同定した。例えば Long QT 症候群の発症との関係が示唆される遺伝子のエクソン領域に既報にない挿入変異を23例中4例に認めており、疾患発症との関係が示唆される。

さらに24例の検体に対してエクソーム解析を行うことにより、両解析手法の妥当性を確認するとともに、既知遺伝子座以外の新規変異遺伝子の探索を進めた。今後、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し、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。これら遺伝性心血管疾患のゲノム解析を通して、原因遺伝子による精密な疾患分類の実現、早期診断と治療最適化の実現を目指す。

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) 解析パイプラインの開発と施設間共有

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解析ソフトウェアを導入し、データのクオリティチェック、リファレンス配列へのマッピング、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、スクリプトを開発した。

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リプトと独自開発のスクリプトを組み合わせ、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。

ゲノム解析研究者、実験系研究者、情報解析者、臨床医が分野を超えて協力し、循環器疾患特異的遺伝子同定を行うための解析パイプラインの構築に着手した。

2. ゲノム解析の基礎研究と臨床実用化

1) 遺伝性心血管疾患の原因同定に向けた、既知・未知遺伝子解析のための環境整備とゲノム解析の実施

臨床施設へ迅速にゲノム診断結果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 を基本にした既知遺伝子スクリーニングパネル（遺伝性心筋症、遺伝性不整脈疾患などで変異の報告のある 95 遺伝子に対応）を標準的に用い、遺伝性循環器疾患特異的な既知遺伝子解析に着手した。

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べく、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システム構築に関して情報処理部門との連携を開始した。

2) 新規変異遺伝子同定のための全エクソン解析の実施

新規遺伝子変異を同定するため、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た。初年度は上記パネルの性能評価のため、エクソーム解析と並行して実施した。

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-house DB、国内共同研究先の正常 CTL-DB を用い、新規 rare variant の同定パイプラインの構築を進めた。

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。

C. 研究結果

1. 遺伝性循環器疾患患者のゲノム解析パイプラインの構築

全国の臨床施設から収集した遺伝性心血管疾患患者の検体を用いたゲノム解析パイプラインを構築した。概要は以下の通りである。

各施設においてゲノム解析における倫理委員会の承認を受けた後に、患者の血液から抽出したゲノム DNA を大阪大学にて収集する。現在、大阪大学・国立循環器病研究センター・九州大学・滋賀県立医科大学・奈良県立医科大学などから検体が送付された。

上記検体を用いて当施設において、既知遺伝子のスクリーニングを開始した。既知遺伝子に変異を認めない症例においては、新規変異遺伝子同定のために、エクソーム解析を行う。以上の結果を収集して各施設に結果を返送するとともに、臨床情報との統合解析を行う予定である。

2. ゲノム解析の実施

既知遺伝子のスクリーニングのために、アジレント社の Haloplex のプラットフォームを用いて、心筋症発症との因果関係が既に報告されている 95 遺伝子のエクソン領域の 99.43% をカバーするパネルを作成した。このキットを用いて、アジレント社の自動化システム Bravo を使ってターゲット領域のエンリッチメントを均一に行い、次世代シーケンサー（イルミナ社 HiSeq2500）を用いて、既知遺伝子のターゲットリシーケンスを行った。解析は、アジレント社が提供する Haloplex 専用解析ツールである SureCall を用いた。

23 症例に対して Haloplex 解析を行い、各検体の塩基配列情報をヒトゲノム配列情報（UCSC human genome 19）をレファレンスとして解析し、計 549 の変異を同定した。日本

人データを含めた SNP データベースを用いて既知の SNPs を除去したところ、81 の変異が同定された。例えば Long QT 症候群の発症との関連が示唆される遺伝子のエクソン領域に既報にない挿入変異が 23 例中 4 例に認められており、疾患発症との関係が示唆される。今後当該変異部位の配列をサンガー法で確認する予定である。

平成 26 年度はタカラバイオへのシーケンス委託により、24 症例のエクソーム解析を行った。Haloplex 法で同定していた既知遺伝子領域における変異が同様に確認され、両者の解析手法の妥当性を確認することができた。新規変異遺伝子の同定に向けて、今年度中に、既知遺伝子以外の部位についても解析終了予定である。こちらも合わせて、新たに同定された変異をサンガー法で確認するとともに、検体を拡大して解析を継続していく。

D. 考察

本事業により、我々は遺伝性心血管疾患のゲノム解析パイプラインを構築し、実際のゲノム解析を開始した。フィージビリティスタディとして我々が専ら担当する既知変異遺伝子スクリーニングでは、予定した解析をパイプラインに沿って行うことが十分可能であることを確認した。今後さらに症例を重ねることにより、日本の遺伝性心血管疾患におけるゲノム変異情報を蓄積することができると考えているが、本事業の発展に向けてさらに考察を加える。

遺伝性心血管疾患は全国に多くの患者が存在するにも関わらず、これまでほとんどゲノム解析の対象となっていなかった。その原因として、ゲノム変異が明らかとなっても、適切な治療法の選択に影響を与えるようなエビデンスが存在しなかったことが挙げられるが、遺伝性心血管疾患には変異の報告のある対象遺伝子が多く、臨床医が解析対象遺伝子を容易に選択できなかったことも一因であったと考えられ

る。

本事業で行っている既知遺伝子に対するターゲットリシーケンスは、1 回の測定で複数患者のサンプルを用いて 95 遺伝子における変異解析を行うことが可能であり、解析対象の選択に悩まされることが少なくなる。対象遺伝子を変更することも可能であり、柔軟性が高いことも利点である。このターゲットリシーケンスの確立及び発展が、一般の臨床医によるゲノム情報の活用に対するハードルを下げるのに大きく貢献することは間違いない。今後こういった一般の臨床施設・臨床医への周知を徹底することにより、日本循環器患者のゲノム解析が大きく進展し、新たな疾患概念の構築、より良い治療法の確立へと繋がると期待される。

今回解析に用いるツールとして、アジレント社が提供する SureCall を用いた。本ツールは極めて使い勝手が良く、シーケンスデータから一気に分かりやすいビューワーを展開し、容易に遺伝子変異リストへと抽出することができる。ゲノム解析において、情報解析に専門の人員を確保することが極めて大きなハードルとなっているが、本ツールを用いることにより、そのような人員を確保する必要がなくなり、日常臨床の継続としてゲノム解析を行える環境がある。そのような仕組みを多くの臨床施設・臨床医へと徹底して周知することも本事業における重要なテーマとなると考えられる。

さらにゲノム解析情報をどのように臨床情報と統合していくかも重要な点である。本事業で解析対象とする患者の臨床情報データベースが整備されることにより、ゲノム解析情報の意義が大きくなる。患者情報の取り扱いには倫理的に匿名化して行われるため容易ではないが、今後臨床情報データベースを統合するチームとの協力、もしくは難治性疾患研究事業に特化したデータベースの構築も進めていくことが望ましい。

E. 結論

我々は本事業を通して、遺伝性心血管疾患のゲノム解析パイプラインを構築し、特に既知変異遺伝子のターゲットリシーケンスを確立した。今後対象症例を拡大して引き続き解析することで、日本の遺伝性心血管疾患におけるゲノム変異情報を蓄積し、新たな疾患概念の構築、早期診断、良い治療法の開発へと繋げていくとともに、一般臨床機関・臨床医に対する本事業の徹底した周知も並行して行っていく必要がある。

G. 研究発表

1、論文発表

(英文原著)

- 1) van Thuijl HF, Mazor T, Johnson BE, Fouse SD, Aihara K, Hong C, Malmström A, Hallbeck M, Heimans JJ, Kloezenman JJ, Stenmark-Askmal M, Lamfers ML, Saito N, Aburatani H, Mukasa A, Berger MS, Söderkvist P, Taylor BS, Molinaro AM, Wesseling P, Reijneveld JC, Chang SM, Ylstra B, Costello JF. Evolution of DNA repair defects during malignant progression of low-grade gliomas after temozolomide treatment. *Acta Neuropathol*. 2015 Feb 28. [Epub ahead of print]
- 2) Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, Ueda H, Creighton CJ, Kato M, Tsuji S, Donehower LA, Slagle BL, Nakamura H, Yamamoto S, Shinbrot E, Hama N, Lehmkuhl M, Hosoda F, Arai Y, Walker K, Dahdouli M, Gotoh K, Nagae G, Gingras MC, Muzny DM, Ojima H, Shimada K, Midorikawa Y, Goss JA, Cotton R, Hayashi A, Shibahara J, Ishikawa S,

Guiteau J, Tanaka M, Urushidate T, Ohashi S, Okada N, Doddapaneni H, Wang M, Zhu Y, Dinh H, Okusaka T, Kokudo N, Kosuge T, Takayama T, Fukayama M, Gibbs RA, Wheeler DA, Aburatani H, Shibata T. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nat Genet*. 2014 Dec;46(12):1267-73.

- 3) Kakiuchi M, Nishizawa T, Ueda H, Gotoh K, Tanaka A, Hayashi A, Yamamoto S, Tatsuno K, Katoh H, Watanabe Y, Ichimura T, Ushiku T, Funahashi S, Tateishi K, Wada I, Shimizu N, Nomura S, Koike K, Seto Y, Fukayama M, Aburatani H, Ishikawa S. Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. *Nat Genet*. 2014 Jun;46(6):583-7.

(和文業績)

なし

2、学会発表

なし

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(業務報告)

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

研究分担者 森田 啓行 東京大学大学院 医学系研究科 特任准教授

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。

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

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. ゲノム解析の基礎研究と臨床実用化

1) 遺伝性心血管疾患の原因同定の為の、既知・未知遺伝子解析のための環境整備とゲノム解析の実施

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。

遺伝子解析に適合する症例のリスト化と臨床情報と遺伝子変異情報を蓄積し、原因検索の為の遺伝子解析へとつなげる環境を整備する。将来的には病態経過、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) 遺伝子機能解析による原因同定とその応用

疾患原因となる変異検索のため、既知遺伝子解析または既知遺伝子変異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。

ゲノム配列・情報解析から得られた情報をもとに、細胞機能、蛋白相互作用、生体機能、分子イメージングに至る一連の機能解析を実施し着目した遺伝子の分子機能を解析する。

またゲノム解析によって明らかになった患者のゲノム変異情報を、臨床情報さらには iPS 心筋細胞の機能情報と統合解析することにより、ゲノム変異が引き起こす機能変異を解析する。

2. 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。

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なって実験をおこなう。

C. 研究結果

1. ゲノム解析の基礎研究と臨床実用化

1) 遺伝性心血管疾患の原因同定の為の、既知・未知遺伝子解析のための環境整備とゲノム解析の実施

ヒトゲノム倫理計画書に関しては、既知遺伝子パネル解析、全エクソーム解析、情報解析を行う施設と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に関する検討を行った。

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（資料1：2014年7月班会議資料）。

2) 遺伝子機能解析による原因同定と応用

遺伝性心筋症を有するゲノム解析対象症例の蓄積を行った。そのうち23症例のサンプルについては、既知遺伝子パネル解析を、20症例のサンプルについては、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。既知遺伝子パネル解析を実施した症例においては、既知変異に加えて複数の新規の変異を同定した。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。

D. 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ter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。

E. 研究発表

1、論文発表

（英文原著）

1) Morita H, Komuro I.

The metabolic syndrome and *DYRK1B*.

New England Journal of Medicine 371: 785, 2014

2) Morita H, Komuro I.

Somatic mutations in cerebral cortical malformations.

New England Journal of Medicine 371: 2037, 2014

3) Hirokawa M, Morita H, Tajima T, Takahashi A, Ashikawa K, Miya F, Shigemizu D, Ozaki K, Sakata Y, Nakatani D, Suna S, Imai Y, Tanaka T, Tsunoda T, Matsuda K, Kadowaki T, Nakamura Y, Nagai R, Komuro I, Kubo M.

A genome-wide association study identifies *PLCL2* and *AP3D1-DOT1L-SF3A2* as new susceptibility loci for myocardial infarction in Japanese.

European Journal of Human Genetics 23: 374-380, 2015

4) Sumida T, Naito AT, Nomura S, Nakagawa A, Higo T, Hashimoto A, Okada K, Sakai T, Ito M, Yamaguchi T, Oka T, Akazawa H, Lee

JK, Minamino T, Offermanns S, Noda T, Botto M, Kobayashi Y, Morita H, Manabe I, Nagai T, Shiojima I, Komuro I.
Complement C1q-induced activation of β -catenin signalling causes hypertensive arterial remodelling.
Nature Communications 6: 6241, 2015

5) Nakayama A, Morita H, Hamamatsu A, Miyata T, Hoshina K, Nagayama M, Takanashi S, Sumiyoshi T, Komuro I. (Corresponding author)
Coronary atherosclerotic lesions in patients with a ruptured abdominal aortic aneurysm.
Heart and Vessels (in press)

6) Yagi H, Hatano M, Takeda N, Harada S, Suzuki Y, Taniguchi Y, Shintani Y, Morita H, Kanamori N, Aoyama T, Watanabe M, Manabe I, Akazawa H, Kinugawa K, Komuro I.
A case of congenital contractural arachnodactyly without *FBN1* or *FBN2* gene mutation, complicated with dilated cardiomyopathy.
Internal Medicine (in press)

7) Kimura K, Daimon M, Morita H, Kawata T, Nakao T, Okano T, Lee SL, Takenaka K, Nagai

R, Yatomi Y, Komuro I.
Evaluation of right ventricle by speckle tracking and conventional echocardiography in rats with right ventricular heart failure.
International Heart Journal (in press)

(和文業績)

なし

2、学会発表

なし

F. 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

[テキストを入力してください]

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（業務報告）

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

研究分担者 北風 政史 国立循環器病研究センター 部長
研究分担者 森崎 隆幸 国立循環器病研究センター研究所 部長
研究分担者 山本 晴子 国立循環器病研究センター 部長
研究分担者 朝倉 正紀 国立循環器病研究センター 室長
（研究協力者 中野 敦 国立循環器病研究センター 室長）

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。

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

[テキストを入力してください]

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. ゲノム解析の基礎研究と臨床実用化

1) 遺伝性心血管疾患の原因同定の為の、既知・未知遺伝子解析のための環境整備とゲノム解析の実施

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。

遺伝子解析に適合する症例のリスト化と臨床情報と遺伝子変異情報を蓄積し、原因検索のための遺伝子解析へとつなげる環境を整備する。将来的には病態経過、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) 遺伝子機能解析による原因同定とその応用

[テキストを入力してください]

疾患原因となる変異検索のため、既知遺伝子解析または既知遺伝子変異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。

ゲノム配列・情報解析から得られた情報をもとに、細胞機能、蛋白相互作用、生体機能、分子イメージングに至る一連の機能解析を実施し着目した遺伝子の分子機能を解析する。

2. 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. ゲノム解析の基礎研究と臨床実用化

1) 遺伝性心血管疾患の原因同定の為の、既知・未知遺伝子解析のための環境整備とゲノム解析の実施

ヒトゲノム倫理計画書に関しては、既知遺伝子パネル解析、全エクソーム解析、情報解析を行う施設と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に関する検討を行った。

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

[テキストを入力してください]

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（資料1：2014年7月班会議資料）。

2) 遺伝子機能解析による原因同定と応用

本年度は当センターにおいて、特発性肺動脈性肺高血圧症と慢性肺血栓塞栓症患者 60 例、肥大型心筋症と拡張型心筋症患者 7 例の全エクソーム解析を実施した。特発性肺動脈性高血圧症と診断されている患者のうち、既知の遺伝子異常が見つからないが遺伝性が疑われる症例は以前存在すると考えられ、本研究において解析対象とすることは臨床的に重要性が高い。また、慢性肺血栓塞栓症もその発症に遺伝性が示唆されている患者もあり、今回の解析対象とした。

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。

D. 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