

で様々な疾患について診断基準が策定されつつあるが、特に自己免疫性膵炎の国際診断基準は極めて複雑であり、これに基づく診断には多大な労力を要するのが現状である。

本研究では臨床情報管理システムで収集した臨床情報を用いて IgG4 関連疾患の自動診断を行う仕組みを作成し、ゲノム解析の対象とする症例の選定が正確かつ容易に行えるようになった。

E. 結論

臨床情報管理システムとそれを利用する自動診断システムによりオミックス解析において重要である正確かつ確実な臨床情報収集と有効な情報活用が行える体制を構築し、複数のプロジェクトに於いて運用している。

検体管理についてもシステムの機能追加が完了次第開始する予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1. 山口 泉、「多施設共同ゲノム疫学研究のための臨床情報管理基盤の構築」、第34回医療情報学連合大会、幕張メッセ（千葉）、2014年11月6～8日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他
該当なし

次世代シーケンス、統計遺伝学解析に関する研究

担当責任者：日笠幸一郎 京都大学大学院医学研究科・特定講師

研究要旨

多因子疾患の病因解明と新規診断・治療法の確立、並びに、遺伝性難治疾患を対象とした実地医療に即応可能な遺伝子診断ネットワークの構築を目的とし、エクソーム／全ゲノム／ターゲット領域シーケンスデータの集積、次世代解析パイプラインの構築と並列化処理による効率的疾患関連遺伝子変異の探索を実施した。遺伝子診断パネルの構築に有用な疾患関連変異を複数の疾患及び検体で認め、疾患関連変異データベースに登録・公開した。今後、変異未同定の検体について、より詳細なゲノム解析を進める方針である。

A. 研究目的

多因子疾患（IgG4 関連疾患、HTLV-1 関連脊髄症、肺高血圧症、好酸球性食道炎）の病因解明と新規診断・治療法の確立、並びに、遺伝性難治疾患（網膜色素変性症、遺伝性肺高血圧症、遺伝性間質性肺炎、小児遺伝性血液疾患）を対象とした実地医療に即応可能な遺伝子診断ネットワークの構築を実現するための効率的情報処理システムと情報基盤開発を目的とする。

B. 研究方法

- エクソーム／全ゲノム／ターゲット領域シーケンスデータ収集
- 次世代解析パイプラインの構築と並列処理による効率的疾患関連遺伝子変異の同定
- 網羅的オミックスデータ収集とクオリティコントロール
- 疾患関連変異データベース整備と変異登録

（倫理面への配慮）

本研究は、京都大学倫理委員会の承認を得て実施する。エクソーム解析や全ゲノムシーケンスなど網羅性の高いデータを扱うことから、データの公開・共有にあたっては、インフォームドコンセントで同意が得られているもののみとし、それに応じて公開レベルを設けるなど、十分に配慮する。

共同研究機関においては、各機関の倫理委員会で承認を得たプロトコルに基づいた解析情報のみを利用し、データベースへは、匿名化された情報のみを受領する。日本人レファレンスパネル（健常対照群）としての「ながはまプロジェクト」網羅的ゲノム多型情報は、国の倫理指針に基づき、独自に策定した「ながはまルール」（長浜市で条例化済み）に則って利用する。当該ルールは、京都大学の倫理審査委員会、ならびにながはまプロジェクト事業審査会の承認を得ている。参加者からは書面による包括同意を得ており、個人情報には二重匿名化している。

C. 研究結果

以下に次世代シーケンス解析を実施した検体数を示す。

エクソーム解析

- ・ IgG4 関連疾患 (635 検体)
- ・ HTLV-1 関連脊髄症 (126 検体+保因者 92 検体)
- ・ 肺高血圧症 (40 検体)
- ・ 遺伝性肺高血圧症 (11 検体)

全ゲノム解析

- ・ 遺伝性肺高血圧症 (6 検体)
- ・ 遺伝性間質性肺炎 (6 検体)

ターゲット領域解析

- ・ 網膜色素変性症 (329 検体)
- ・ IgG4 関連疾患 (768 検体/対照 767 検体)
- ・ HTLV-1 関連脊髄症 (431 検体/保因者 546 検体)

次世代シーケンスデータの解析パイプラインを構築し、多検体処理に堅牢な、並列・最適化を実施した。構築したパイプラインを利用し、エクソーム・全ゲノム・ターゲット領域シーケンスデータを処理し、疾患関連変異の同定を行った。以下疾患別に報告する。

IgG4 関連疾患

健常対照群として既存の 176 検体エクソームデータを使用し、遺伝子ベース関連解析 (Variable Threshold test, C-alpha test) を実施、 $P=5.84 \times 10^{-6}$ 程度の関連遺伝子を認めている。また、タイピングデータを用いた一塩基多型ベース関連解析では、ゲノム上の 2 箇所に疾患関連候補領域 ($P < 5.0 \times 10^{-8}$) を認めており、関連座位を絞込むためにターゲットシーケンスによるファインマッピング (検体あたり平均約 500 リードカバレッジ) を実施し、両領域において最近傍遺伝子の特

定のアミノ酸変異が疾患に関わっている可能性を示唆するデータが揃いつつある。当該疾患はオミックス解析対象であり、エクソームシーケンスだけでなく、Agilent Microarray による遺伝子発現量測定データ、質量分析機器による代謝物測定データ等、病態の解明に向け患者の網羅的生体内情報を順調に集積している。

HTLV-1 関連脊髄症

発症者 115 名とウィルス保因者 90 名のデータを使用し、遺伝子ベース関連解析を実施したが、特に関連のある遺伝子は見出せていない。タイピングデータを用いた一塩基多型ベース関連解析では複数の疾患関連候補領域 ($P < 5.0 \times 10^{-8}$) が検出されており、ターゲットシーケンスを用いたファインマッピングによる関連座位の絞込みを行う予定である。IgG4 関連疾患と同様、オミックス解析データも集積中である。

肺高血圧症

肺高血圧症の中でも特徴的臨床症状を呈する慢性血栓塞栓性肺高血圧症 (CTEPH) を対象として、オミックス解析データを集積中である。

遺伝性肺高血圧症

7 家系 11 名のエクソーム解析を実施し、5 家系について既知の疾患関連遺伝子内に変異を認めた。うち 2 変異は既報、3 変異は新規であった。

遺伝性間質性肺炎

現在 2 家系を対象に解析を進めている。うち 1 家系については、倫理手続き及び検体収集が完了し、全ゲノムシーケンス解析を進めている。

網膜色素変性症

Agilent Haloplex を用いたターゲット領域シーケンス解析を実施し、36.8% (121/329) の検体について既知の疾患関連遺伝子内に変異を認め、国際誌 *Investigative ophthalmology & visual science* に報告した。当該疾患患者より同定された 104 変異は、疾患関連変異データベースに登録・公開し、外部機関から参照可能となっている。

D. 考察

IgG4 関連疾患

解析に用いた検体数が、患者 635 検体に対し健常者 176 検体であり、検体数に偏りが生じている。今後、共同研究先より健常者のエクソームデータを入手し、検体数を補填した上で、関連候補遺伝子についての統計的有意性を確認する予定である。

HTLV-1 関連脊髄症

検体数が少ないために関連が見いだせない可能性が高い。他の疾患群と比較し、検体収集可能な地域が限られており、対照群（保因者群）も同地域から収集する必要があるため、更なる収集に向け尽力する必要がある。

遺伝性肺高血圧症

主に欧米人で報告されている既知の当該疾患関連遺伝子内に、日本人患者においても高頻度で変異が認められ、診断パネル遺伝子として有用と考えられる。変異未同定の 2 家系の検体については、全ゲノム解析を実施し、新規の疾患関連変異を探索する予定である。

網膜色素変性症

今回ターゲットシーケンスの対象とした遺伝子群は、約 4 割の患者で変異が認められ、遺伝子診断パネルとしての有用性が高いことが証明された。一方で 6 割以上の検体

は、変異未同定であり、更に診断パネルを充実させる上では、エクソーム、或いは、全ゲノムシーケンス解析による新規の疾患関連遺伝子の探索が必要である。

E. 結論

エクソーム/全ゲノム/ターゲット領域シーケンスデータを集積し、構築した次世代データ解析パイプライン処理による疾患関連遺伝子変異の探索を実施した。遺伝子診断パネルの構築に有用な疾患関連変異を複数の疾患及び検体で認め、104 変異を疾患関連変異データベースに登録・公開した。今後、変異未同定の検体について、より詳細なゲノム解析を進める予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Oishi, M., Oishi, A., Gotoh, N., Ogino, K., Higasa, K., Iida, K., Makiyama, Y., Morooka, S., Matsuda, F. and Yoshimura, N. (2014) Comprehensive molecular diagnosis of a large cohort of Japanese retinitis pigmentosa and Usher syndrome patients by next-generation sequencing. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 7369-7375.
2. Maruoka, R., Takenouchi, T., Torii, C., Shimizu, A., Misu, K., Higasa, K., Matsuda, F., Ota, A., Tanito, K., Kuramochi, A., Arima, Y., Otsuka, F., Yoshida, Y., Moriyama, K., Niimura, M., Saya, H. and Kosaki, K. (2014) The use of next-generation sequencing in molecular diagnosis of neurofibromatosis type 1: A validation study. *Genet. Test Mol. Biomarkers.* 18, 722-735.
3. Narahara, M., Higasa, K., Nakamura, S., Tabara, Y., Kawaguchi, T., Ishii, M., Matsubara, K., Matsuda, F., Yamada, R. (2014) Large-scale East-Asian eQTL mapping reveals novel candidate genes for LD mapping and the genomic landscape of transcriptional effects of sequence variants. *PLoS One.* 9,

e100924.

4. Tahira, T., Yahara, K., Kukita, Y., Higasa, K., Kato, K., Wake, N., Hayashi, K. (2014). A definitive haplotype map of structural variations determined by microarray analysis of duplicated haploid genomes. *Genomics Data*. **2**, 55-59.

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

自己免疫性疾患を中心とした難病に関する研究

担当責任者：寺尾知可史 京都大学大学院医学研究科・特定助教

研究要旨

IgG4 関連疾患、肺高血圧症関連疾患として混合性結合組織病と慢性血栓性肺高血圧症、高安動脈炎を対象に一塩基多型に着目したゲノム関連解析や次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析、遺伝子発現解析や代謝物の解析を進めた。また、関節リウマチ関連自己抗体の解析を健常人及び患者において行った。IgG4 関連疾患においては HLA 領域の他、非 HLA 領域に関連を認めた。混合性結合組織病については全身性エリテマトーデスと同じ領域の関連を認めた。高安動脈炎については潰瘍性大腸炎を高率に合併するという事実と、合併例の臨床的・遺伝学的特徴を同定した。関節リウマチ関連自己抗体の健常人における危険因子を同定し、患者においては骨破壊関連遺伝要素を同定した。

A. 研究目的

ゲノム解析に加えて、幅広い臨床情報や様々な種類の検体を組み合わせ、難病の原因を解明し、疾患メカニズムを明らかにし、診断・治療法の確立に結びつけることを目的とする。

B. 研究方法

本課題では、本邦から提唱された概念である IgG4 関連疾患、肺高血圧症関連疾患として混合性結合組織病(MCTD)と慢性血栓性肺高血圧症、高安動脈炎、関節リウマチを対象とした。

IgG4 関連疾患

他の研究分担者や研究協力者との連携により、946 例の DNA 検体を収集した。内訳は、自己免疫性膵炎(AIP) 532 例、唾液腺炎/涙腺炎(ミクリッツ病)382 例、腎炎 75 例（重複含む）であった。

896 例でゲノム網羅的な SNP タイピング

を Illumina 社製の HumanOmni5MExome, HumanOmni2.5MExome を用いて行った。定法に則ったクオリティコントロールを通過した SNP について、一般地域住民の DNA 検体(ながはま 0 次コホート研究) 1,849 例のタイピング情報を対照に関連解析を行った。

AIP、唾液腺炎/涙腺炎(ミクリッツ病)743 検体についてエクソーム解析を実施し、標的遺伝子領域の 97%以上を 10×以上の被覆率でカバーする高品質のデータを得た。遺伝子上の非同義置換を抽出する解析パイプラインを構築し、疾患と関連する遺伝的変異の解析を行った。

このうち AIP46 例については、網羅的オミックス解析のために経時的に検体を収集している(ステロイド治療介入前、介入 30、180、360、720 日後)。各採血時点での画像所見、検査値も収集するとともに、随時症例を増やす予定である。遺伝子発現解析は、Agilent 社の発現アレイ(SurePrint G3 Human GE)を用いて行った。

肺高血圧症関連疾患

「混合性結合組織病の病態解明、早期診断と治療法の確立に関する研究班」(班長:藤田保健衛生大学 吉田俊治)に所属する京都大学、慶應義塾大学、東京女子医科大学などの研究施設から合計 288 検体を収集した。MCTD の診断に必要な臨床情報を完全に収集することは困難なため、抗 U1-RNP 抗体陽性例を MCTD とみなし、京都大学において検体を増やした。国立病院機構岡山医療センター循環器科と連携し、慢性血栓閉塞性肺高血圧症(CTEPH)を中心に、PH 患者 178 例の検体を収集した。

MCTD については、SNP アレイ (HumanExome, Illumina 社製)を用いてゲノム網羅的な SNP タイピングを行い、定法に則ったクオリティコントロールを通過した 286 例、24,525 SNP について関連解析を行った。関連解析では、ながはまコホートの参加者 657 人分の網羅的 SNP タイピングの結果を健常対照群として用いた。有意な関連を示した SNP の再現性を確認する目的で、独立した患者検体 219 例、ながはまコホートの健常対照群 1,405 例の DNA を用いて、TaqMan 法で候補 SNP をタイピングした。PH については、CTEPH を中心に 173 例を対象に、ゲノム網羅的な SNP タイピングを終えた (HumanCoreExome, Illumina 社製)。定法に則ったクオリティコントロールを通過した 170 例、251,819 SNP について関連解析を行った。

エクソーム解析は CTEPH 39 例を対象に行い、ターゲット遺伝子領域の 81.6%を 10×以上の被覆率でカバーする高品質のデータを得た。

CTEPH 43 例については、網羅的オミックス解析のために経時的に検体を収集した(肺動脈カテーテル治療直前、治療 3、7、180 日後の採血)。併せて 6 分間歩行距離、右房圧、肺動脈圧、肺動脈楔入圧、心拍出量、心

係数、肺血管抵抗、酸素飽和度、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、脳性ナトリウム利尿ポリペプチド、投薬に関する情報も収集した。

血漿中の網羅的代謝物測定

GC-MS を用い、血漿中の代謝物の解析条件最適化を行った。血漿中からの代謝物抽出工程の効率化やトリメチルシリル誘導体化反応条件の最適化などを進め、測定系の精度・再現性等の向上を行った。また、GC-MS データ中の未同定ピークの解析作業を進め、最終的に 135 個の代謝物とピークを対応付けた。これらの代謝物由来のピークを抽出・定量する解析方法を構築し、健常者対照群および患者群の GC-MS 測定と代謝物定量解析を実施した。

高安動脈炎

14 施設から合計 470 例の高安動脈炎患者データを収集した。その内 426 例の DNA を集積した。全例の臨床情報を収集し、潰瘍性大腸炎に着目、その合併を調査した。合併例と非合併例を、臨床情報を用いて比較した。さらに、遺伝子情報を用いて合併例を特徴づける遺伝要因を調査した。また、潰瘍性大腸炎の関連 SNP に関して、潰瘍性大腸炎非合併高安動脈炎 226 例と健常人 656 例を用いた全ゲノム関連解析の結果を参照し、両疾患の遺伝的背景の相違について解析を行った。

関節リウマチ関連自己抗体

ながはまコホートの参加者から、以前に関節リウマチを始めとした膠原病にかかったことがある/現在かかっている可能性のある参加者を除いた 9575 名に関して、関節リウマチ関連自己抗体である抗 CCP 抗体と、リウマチ因子(RF)を測定した。健常人における陽性割合を同定するとともに、自己抗体産生に関わる危険因子を解析した。

京都大学及び東京女子医科大学において、抗 CCP 抗体陽性関節リウマチ患者データを収集し、HLA-DRB1 タイピングを行った。患者における骨破壊の進展と、関節リウマチ関連遺伝因子である HLA-DRB1 のアレルの一群である shared epitope(SE)との関連を解析した。

(倫理面への配慮)

全ての研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に則って実施した。対象者には研究の主旨について十分に説明し、書面にて同意を得た。収集した検体は二重に匿名化するとともに、個人情報やゲノム情報、臨床情報が漏洩することが決してないように十分配慮した上で研究に使用した。共同研究者からは、匿名化された状態で検体提供を受けた。

C. 研究結果

IgG4 関連疾患

<ゲノムワイド関連解析>

構造化を補正した関連解析において、ゲノムワイド有意水準 ($p < 5.2 \times 10^{-8}$) を満たす SNP が、全例を対象とした解析で染色体 1 番と 6 番と 8 番に同定された(図 1)。

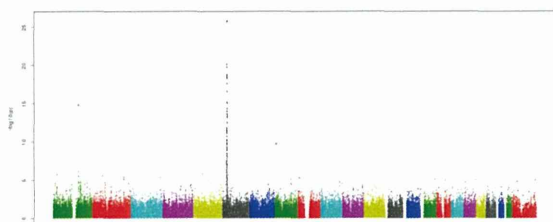


図 1 IgG4 の GWAS

これまでの IgG4 関連疾患に関する遺伝子解析研究では、HLA-DRB1 領域に有意な関連が報告されている。本研究でも染色体 6 番の HLA 領域に強い関連を認め、この関連は AIP、涙腺/唾液腺炎のいずれを対象とした病型別解析でも再現された。HLA 領域の関連が DRB1 領域以外にある可能性を検討する

ため、HLA-DRB1 上で最も関連が強い SNP で調整したゲノムワイド関連解析を行ったところ、HLA-A 領域に新たな関連座位を認めた ($p = 6.2 \times 10^{-11}$)。さらに、HLA-DRB1、HLA-A の両方の SNP で調整すると、最も低い p 値を示すものは HLA Class I 領域の SNP ($p = 1.0 \times 10^{-6}$) であり、さらなる関連領域の存在が示唆された。これらのことから、IgG4 関連疾患の疾患感受性において HLA-DRB1 領域のみならず HLA-A 領域も関連することが示された。また、HLA 領域はエクソーム解析にても HLA class II 領域にアミノ酸変異を伴う強い関連が認められた他、低頻度変異の集積を遺伝子単位で解析したところ、HLA 領域は IgG4 関連疾患と有意な関連を示した。

<遺伝子発現解析>

6 例の AIP 初発例でステロイドによる治療介入前の末梢血 RNA を用いて、遺伝子発現情報を解析した。健常者群 300 例を対照に比較解析を行った結果、全 42,546 プローブ中、755 プローブにおいて有意な発現上昇(全身性エリテマトーデス関連遺伝子等)、1,255 プローブにおいて有意な発現抑制(Neuroactive ligand-receptor interaction 関連遺伝子等)が見られた ($p < 1.2 \times 10^{-6}$)。

<GC-MS による親水性低分子代謝物解析>

AIP 25 例のステロイド治療前の採血で得られた血漿検体、健常者対照群 302 例の血漿検体を対象に、135 種の血中代謝物濃度を測定した。2 群間で比較検定(t 検定)を行った結果、複数の代謝物について統計学的に有意な差がみとめられた ($p < 1.0 \times 10^{-4}$)。

さらに、治療介入開始前、および開始後 30 日の血漿検体(11 症例 22 検体)を用いて、代謝物濃度の変動評価解析を行った。その結果、ほぼ全ての症例において、開始後 30 日で尿酸濃度の減少が認められ、ステロイド投与の

影響によるものと考えられた。

肺高血圧症関連疾患

<ゲノムワイド関連解析>

HLA 領域($p=6.0\times 10^{-10}$)、および染色体 8 番の BLK 領域($p=3.4\times 10^{-7}$)が統計学的な有意水準に到達した(図 2)。

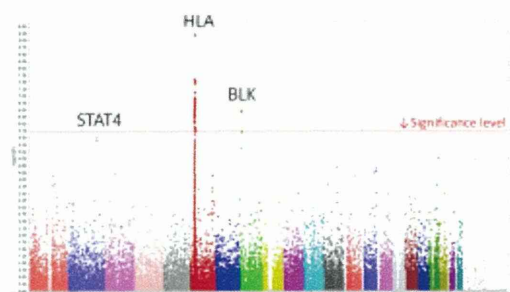


図 2 MCTD の GWAS

これら 2 領域に次いで強い関連を示した ZNF835 と STAT4 領域について検証パネルを用いて追認解析を行った。その結果、STAT4 領域と MCTD との関連が再現され($p<3.0\times 10^{-3}$)、全てのサンプルを合わせた解析において、当該 SNP のオッズ比は 1.81 ($p=1.7\times 10^{-8}$)であった。ZNF835 領域と MCTD との関連は再現されなかった。PH 170 例、あるいは CTEPH 112 例をケース群としてゲノムワイド関連解析を行った。いずれにおいても、有意水準($p<2.0\times 10^{-7}$)を満たす SNP は検出されなかった。

<遺伝子発現解析>

CTEPH の遺伝子発現は、時期によらず、健常者対照群 300 例と大きく異なる発現プロファイルを示した。一方で、CTEPH の治療介入前後一週間の比較では、ほとんど違いを見出さなかった。

<GC-MS による親水性低分子代謝物解析>

カテーテルによる治療介入直前の患者血漿と健常者対照群(302 検体)を用いて、135 種の血中代謝物濃度を測定した。2 群比較検定(t 検定)を行った結果、複数の代謝物で統

計学的な有意差がみとめられた($p<1.0\times 10^{-4}$)。

高安動脈炎

14 施設 470 症例の解析にて、30 例の患者が潰瘍性大腸炎を合併していた。合併割合は 6.4%(95%信頼区間 4.3-9.0%)であった。合併患者は非合併患者に比して早期に高安動脈炎を発症しており($p=0.0070$)、男性の割合が多めであった($p=0.12$)。他の合併症に違いはなかったが、潰瘍性大腸炎や他の疾患による使用を除いた生物学的製剤の使用割合は、合併患者の方が高い傾向にあった($p=0.074$)。合併患者は HLA-B*52:01 が 92.6%と極めて高率に陽性であり、非合併患者と比較してもオッズ比 12.14(95%信頼区間 2.96-107.23)と高い値を示した。さらに、我々が同定した IL12B 領域の risk SNP についても、検体数の影響で有意差は出なかったがオッズ比 2.47 (95%信頼区間 0.72-13.11)であった。潰瘍性大腸炎のリスクであると分かっている非 HLA 領域について、潰瘍性大腸炎非合併高安動脈炎患者について解析すると、SNP は潰瘍性大腸炎と同じ方向にリスクを示し、さらにそのエフェクトサイズも相関していた。これは、非 HLA 領域においても、両疾患の感受性領域が共通しており、さらにその影響の強さも相関していることを意味する。

関節リウマチ関連自己抗体

健常人 9575 例の解析にて、CCP 抗体、RF はそれぞれ 1.7%、6.4%に陽性であった。力価の高い(カットオフ値の 3 倍以上)健常人に着目すると、喫煙の有無は CCP 抗体産生に関連し、さらにその関連は量依存性を認められた。RF に関しては喫煙そのものとの関連は認められなかったが、量依存的に高力価陽性率が上昇していた。一方で、遺伝要素である SE との関連は、高力価の抗体陽性については認められなかった。

861 例の CCP 抗体陽性関節リウマチ患者

の解析にて、SE は骨破壊に関連していた。これは、SE と骨破壊との関連が、CCP 非依存性であることを示す。さらに、SE と骨破壊の関連は、東アジア人に多く、ヨーロッパ人に少ないアレルである DRB1*04:05 で説明可能であることが判明した(図 3)。

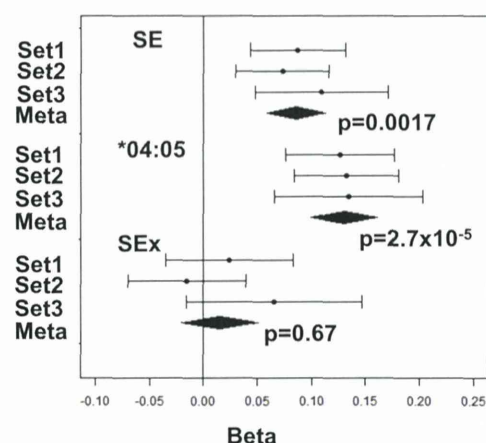


図 3 SE は骨破壊と関連を示し、その関連は*04:05 で説明可能でそれ以外の SE (SEx) は関連を示さない。

さらに、HLA-DRB1 のアミノ酸に着目した解析にて、57 番のアミノ酸のみが有意に骨破壊と関連していた(図 4)。

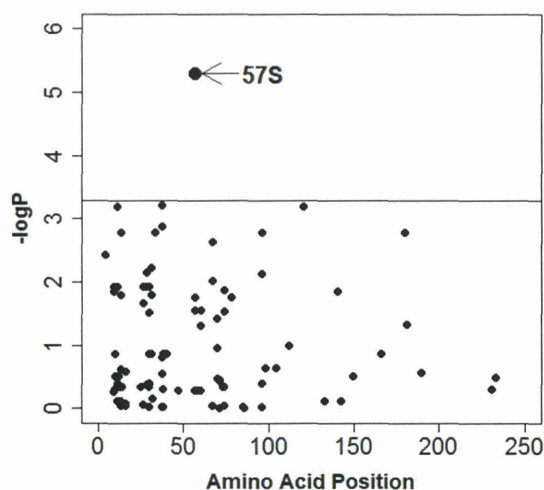


図 4 57 番のセリンが骨破壊に関連

D. 考察

IgG4 関連疾患については既報通り HLA 領域に関連を見出した。一方、以前の報告では HLA 領域を網羅的には解析できておらず、

一番強い関連を示す領域を同定する必要がある。また、他に独立した領域がないかどうかを見ることは重要である。HLA 領域の次世代シーケンサーを用いた解析により、HLA アレルを同定すれば、疾患感受性アミノ酸の同定とつなげることが可能であり、現在解析中である。

混合性結合組織病については、SLE 関連領域が関連を示した。U1RNP 抗体陽性/陰性 SLE で疾患感受性領域が異なるかを検討するのは興味深い。混合性結合組織病は肺高血圧症を合併しやすいことが知られており、もしも混合性結合組織病特異的な遺伝領域があれば、肺高血圧症を合併する患者のスクリーニングに用いられる可能性がある。CTEPH においては、現在までにゲノム関連解析で有意な領域は見つかっていない。CTEPH は一般的な肺高血圧症の中でかなり特異的な病態であるため、他の PH の症例に関してもゲノム関連解析を行うよりは、CTEPH に特化して検体数を増やしたほうが良いと思われる。

高安動脈炎患者は 6.4%の割合で潰瘍性大腸炎を合併する。HLA-B*52:01 が高率に合併例では陽性であり、非合併例と有意差を示したことは興味深い点である。この高い陽性率は、これまでの合併例の症例報告と一致する。合併例はより若年であるということは、その遺伝因子の強さからしても妥当であると思われた。その重症度が非合併例と違いはなかったが、生物学的製剤の使用率がより高率である傾向があり、また、HLA-B*52:01 はこれまでにより重症な病態を呈する可能性を示されてきたことから、より合併例のデータを増やし、重症度の標準化指標を確立できれば、実際の重症度の差を評価できる可能性がある。また、今後のフォローアップにより、新たな知見が生まれる可能性がある。

関節リウマチ関連自己抗体はその産生に関しては健常人も患者と同じメカニズムを

有している可能性がある。喫煙の影響が、関節リウマチ関連自己抗体にのみ見られるのか、それとも他の自己抗体でも同様の関連を示すのかは興味深い点である。これまで、RAにおける骨破壊がSEと関連していることは知られていたが、SEはCCP抗体とも関連するため、SEがCCP抗体非依存的に骨破壊と関連しているかどうかは不明であり、その解析結果はヨーロッパ人とアジア人で異なっていた。すなわち、ヨーロッパ人ではSEはCCP依存性であり、アジア人ではCCP非依存性であるという結果であった。関節リウマチ患者において、東アジア人で頻度の高いHLA-DRB1*04:05がCCP抗体陽性RAにおいて骨破壊と関連していることが、アジア人とヨーロッパ人とのデータの乖離の原因であると判明した。アミノ酸の解析において判明した57番のアミノ酸は、アジア人においてCCP抗体陽性RAの疾患感受性に関連しており、このことは、アジア人に特徴的な疾患進展メカニズムの存在を示唆するものであると思われる。

E. 結論

IgG4関連疾患については、HLAに複数の独立した関連領域があること、非HLAにも関連領域があることを見出した。HLAの原因アミノ酸や、非HLA領域の原因多型を同定する予定である。

混合性結合組織病はかなりSLEと遺伝的にも近い可能性がある。混合性結合組織病特異的な遺伝因子の有無について解析を進める予定である。混合性結合組織病の肺高血圧症の症例はまだ少なく、合併症ごとにおける遺伝因子の検討は十分な解析力を有していない。CTEPHにおいては、BPA前後の一週間、3つの時系列において、想定していたよりも血中の転写物の変動は小さい可能性がある。また、BPA後180日の段階の採血において、健常人およびBPA前のいずれとも

異なるプロファイルを示していることから、その後のフォローアップにより、再発群と非再発群を予想できる可能性があるものと考えられた。

高安動脈炎について主要14施設の、患者検体及び臨床情報集積ネットワークを構築した。ネットワークを通して集積した情報により、潰瘍性大腸炎が高安動脈炎の主要な合併症であること、およびその遺伝子背景の重複、合併症例の臨床的・遺伝学的特徴を同定した。HLA-B*52:01が合併例において主要な役割を果たしているものと考えられた。

関節リウマチに関しては、関節リウマチ関連自己抗体に着目し、健常人コホートを用いてその陽性率及び関連因子を同定したほか、遺伝学的な解析を行った。その結果、喫煙は患者群および健常人群の両方で関連していることが分かった。また、患者検体を用いた解析にて、CCP抗体陽性の関節リウマチの骨破壊に及ぼすHLA領域のアジア人とヨーロッパ人における差異に関しては、HLA-DRB1アレルの分布による違いであることを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. [Terao, C., Yoshifuji, H. and Mimori, T. \(2014\) Recent advances in Takayasu arteritis. *Int. J. Rheum. Dis.* 17, 238-247.](#)
2. [Terao, C. \(2014\) History of Takayasu arteritis and Dr. Mikito Takayasu. *Int. J. Rheum. Dis.* 17, 931-935.](#)
3. [Terao, C., Ohmura, K., Ikari, K., Kawaguchi, T., Takahashi, M., Setoh, K., Nakayama, T., Kosugi, S., Sekine, A., Tabara, Y., Taniguchi, A., Momohara, S., Yamanaka, H., Yamada, R., Matsuda, F., Mimori, T.; on behalf of the Nagahama Study Group. \(2014\) Effects of smoking and shared epitope on the production of ACPA and RF in a Japanese adult](#)

population: The Nagahama Study. *Arthritis Care Res.* 66, 1818-1827.

4. Terao, C., Yano, K., Ikari, K., Furu, M., Yamakawa, N., Yoshida, S., Hashimoto, M., Ito, H., Fujii, T., Ohmura, K., Yurugi, K., Miura, Y., Maekawa, T., Taniguchi, A., Momohara, S., Yamanaka, H., Mimori, T. and Matsuda, F. (2015) A main contribution of DRB1*04:05 among shared epitope and involvement of 57th DRB1 amino acid in association with joint destruction in ACPA(+) RA. *Arthritis Rheumatol.* in press.

2. 学会発表

1. Terao, C., Ohmura, K., Ikari, K., Kawaguchi, T., Takahashi, M., Setoh, K., Nakayama, T., Kosugi, S., Sekine, A., Tabara, Y., Taniguchi, A., Momohara, S., Yamanaka, H., Yamada, R., Matsuda, F. and Mimori, T. Limited effects of smoking and HLA on ACPA and RF in general population. 16th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress (APLAR), Cebu, Philippines. April 4, 2014.
2. 寺尾知可史・大村浩一郎・猪狩勝則・谷口敦夫・桃原茂樹・山中 寿・山田 亮・松田文彦・三森経世、「大規模健常人集団における抗 CCP 抗体と RF の分布と喫煙・遺伝因子との関連—ながはまコホートの解析から—」、第 58 回 日本リウマチ学会総会・学術集会、名古屋国際会議場（愛知）、2014 年 4 月 20 日
3. Terao, C., Matsumura, T., Yoshifuji, H., Kirino, Y., Maejima, Y., Nakaoka, Y., Takahashi, M., Amiya, E., Tamura, N., Nakajima, T., Origuchi, T., Horita, T., Matsukura, M., Kochi, Y., Ogimoto, A., Yamamoto, M., Takahashi, H., Nakayamada, S., Saito, K., Wada, Y., Narita, I., Kawaguchi, Y., Yamanaka, H., Ohmura, K., Atsumi, T., Tanemoto, K., Miyata, T., Kuwana, M., Komuro, I., Tabara, Y., Ueda, A., Isobe, M., Mimori, T. and Matsuda, F. Takayasu Arteritis and Ulcerative Colitis—High Concurrence Ratio and Genetic Overlap. Annual Congress of American College of Rheumatology, Boston, USA. November 16, 2014.
4. 寺尾知可史・松村貴由・吉藤元・桐野洋

平・前嶋康浩・中岡良和・高橋めい子・網谷英介・田村夏子・中島俊樹・折口智樹・大村浩一郎・桑名正隆・小室一成・上田敦久・磯部光章・三森経世・松田文彦、「潰瘍性大腸炎は高安動脈炎の主要な合併症であり、合併には HLA-B*52:01 が特に重要であって両疾患は遺伝因子を共有している」、日本人類遺伝学会第 59 回大会、タワーホール船堀（東京）、2014 年 11 月 22 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

網膜色素変性症のオミックス解析に関する研究

担当責任者：吉村長久 京都大学大学院医学研究科・教授

研究要旨

425人の網膜変性症患者（遺伝形式は多様）について、Agilent社 Haloplex, Illumina社 HiSeq2500を用い379遺伝子についてTarget Exome Sequencingを行った。原因変異が同定された患者は38%であった。欧米でも約4割の患者が同定されるが、原因遺伝子の分布は異なっていた。DNA以外のオミックス解析のために、眼由来の検体として、平成26年度中に前房水を30サンプルの収集・保管を行った。

A. 研究目的

遺伝性疾患の一モデルケースとして、網膜色素変性症を対象にして実地医療に即応可能な遺伝子診断ネットワークを構築する。網膜色素変性症は総称であり、それに包含される形で固有の網脈絡膜変性疾患が知られ、それぞれの予後、治験の有無などが異なる。臨床所見では区別がつかず、遺伝子情報に基づくことで固有のものか診断が下される場合も多いことから、オミックスの手法を用いて、425人あまりを対象に、網羅的な遺伝子変異スクリーニングを行った。また、難病の生体試料バンクとレジストリが構築することで難病対策事業を推進する上での情報基盤作成を目指すことから、眼由来検体の収集・保管を行う。

B. 研究方法

既存検体である425人の網膜変性症患者（遺伝形式は多様）のDNAを用い、Agilent社 Haloplex, Illumina社 HiSeq2500を用い379遺伝子についてTarget Exome Sequencingを行った。

網膜色素変性症患者の白内障手術時に、前房水を収集した。

（倫理面への配慮）

希望のある対象者については、本研究の分担研究者である京都大学医療倫理学・遺伝医療学小杉教授と協力し、遺伝カウンセラー立ち合いのもとに結果の説明を行った。ヘルシンキ宣言が言明する諸原則に従っている。「疫学研究の倫理指針」に準拠している。

C. 研究結果

原因変異が同定された患者は38%であった。欧米でも約4割の患者が同定されるが、原因遺伝子の分布は異なっていた。

網膜変性症の臨床診断	診断率	原因遺伝子	人数
網膜色素変性症 (Usher症候群含む)	128/329 (38.9%)	EYS	39
		USH2A	16
		RHO	8
		PRPH2	7
		PDE6B	7
		その他	44
レーバー先天盲	4/10 (40.0%)	RPE65	2
		CRB1	2
嚙体/嚙体杆体ジストロフィ	14/50 (28.0%)	ABCA4	5
		その他	9
スタルガルド病	6/10 (60.0%)	ABCA4	5
		その他	1
その他			15
合計	161/425 (37.9%)		

前房水を30サンプル得た。既存のサンプルとして20サンプルあり、総数50サンプルとなった。

D. 考察

従来、日本人の網膜色素変性症の遺伝子診断率は 10%以下とされてきたが、欧米からの報告と同程度の約 40%の患者に、既知の網膜変性遺伝子上に変異がみられた。

E. 結論

オミックスの手法を用いて、日本人の網膜色素変性症の遺伝子変異を網羅的に初めて明らかにした。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Oishi, M., Oishi, A., Gotoh, N., Ogino, K., Higasa, K., Iida, K., Makiyama, Y., Morooka, S., Matsuda, F. and Yoshimura, N. (2014) Comprehensive molecular diagnosis of a large cohort of Japanese retinitis pigmentosa and Usher syndrome patients by next-generation sequencing. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 16, 55, 7369-7375.
2. Oishi, M., Oishi, A., Ogino, K., Makiyama, Y., Gotoh, N., Kurimoto, M. and Yoshimura, N. (2014) Wide-field fundus autofluorescence abnormalities and visual function in patients with cone and cone-rod dystrophies. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 20, 55, 3572-3577.

2. 学会発表

1. 大石真秀・大石明生・後藤謙元・荻野颯・牧山由希子・諸岡諭・栗本雅史・吉村長久、「ターゲットエクソームシーケンスによる網膜色素変性患者の網羅的遺伝子検査」、第 53 回日本網膜硝子体学会総会、大阪国際会議場（大阪）、2014 年 11 月 28 日
2. 大石真秀・大石明生・後藤謙元・荻野颯・牧山由希子・諸岡諭・栗本雅史・吉村長久、「次世代シーケンサーを用いた遺伝性網膜変性疾患の網羅的遺伝子診断」、

第 68 回日本臨床眼科学会、ポートピアホテル（神戸）、2014 年 11 月 13 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

網膜色素変性についての遺伝子診断ネットワーク構築に関する研究

担当責任者：白 神 史 雄 岡山大学医歯薬学総合研究科・教授

研究要旨

網膜色素変性症は有効な治療法が存在しない難病である。これまでに、約 70 の遺伝子が原因遺伝子として同定されているが、本疾患の診断、治療に有効活用されていないのが現状である。そこで、本研究では、実地医療に即応可能な遺伝子診断ネットワークを構築することを目的として、岡山大学、京都大学、東京大学、香川大学、神戸先端医療センターの各眼科で、DNA 検体を収集する体制を構築した。今年度は最終的に約 180 のサンプルを収集し、共通のプロトコールに則って、DNA の抽出、患者情報の管理を行うことができた。今後さらなる検体の収集、解析を行うと共に、遺伝子診断ネットワークの拡充を図る必要がある。

A. 研究目的

遺伝性疾患の一モデルケースとして、網膜色素変性症を対象にして実地医療に即応可能な遺伝子診断ネットワークを構築する。網膜色素変性症は、少なく見積もって 70 遺伝子が原因遺伝子とされている難病であるが、そのうち RPE65 遺伝子、ABCA4 遺伝子などの変異を伴う網膜色素変性症にたいしては海外で治験がすすんでいる。我が国では遺伝子診断体制が確立されておらず、診断・治療に活用される体制が調っていない。

B. 研究方法

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究 研究事業）網膜脈絡膜・視神経萎縮症に関する調査研究（26070201）の研究班のうち、本学（岡山大学）、京都大学、東京大学、香川大学、神戸先端医療センターの各眼科で、DNA 検体を収集する体制を構築する。DNA の抽出には、QuickGene-610L（クラボー）を用いた。

（倫理面への配慮）

十分な倫理的配慮の元に遂行され、ヘルシンキ宣言が言明する諸原則に従っている。「ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針」「疫学研究の倫理指針」に準拠している。

C. 研究結果

平成 26 年度内に、新規 DNA 試料として、約 180 サンプルを、岡山大学と京都大学で得た。いずれの検体も 10ug/検体の DNA 量を確保した。神戸先端医療センターでは、すでに DNA 検体収集の体勢が調っており、独自に収集している。東京大学と香川大学では収集へ向け、検体や情報の取り違えがないノウハウを伝達されており、平成 27 年度に検体管理が完成する。

D. 考察

全ゲノム解析にも耐える量と品質の DNA 検体が得られ、今後の遺伝子診断の実施に支障がないと考えられた。

E. 結論

平成26年度厚生労働科学研究委託費(難治性疾患実用化研究事業)研究計画書に示したロードマップにある遺伝子診断の部分については、網膜色素変性症としては概ね計画通りに遂行された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

遺伝性間質性肺炎に関する研究

担当責任者：伊達洋至 京都大学大学院医学研究科・教授

研究要旨

遺伝性間質性肺炎の家系において、全ゲノムシーケンシングによる原因遺伝子の同定とオミックス解析を行い、日本人における疾患原因遺伝子を探索する。家族例の解析で同定された原因遺伝子に関して、特発性間質性肺炎孤発例を対象に、遺伝子変異の有無の検討や生体試料の解析を行い、特発性間質性肺炎の病態解明を目指す。

A. 研究目的

特発性間質性肺炎は、有効な薬物治療が確立されていない原因不明の難治性疾患であり、厚生労働省の定める指定難病のひとつである。なかでも家族性発症を認める遺伝性間質性肺炎は若年での発症、進行例が少なくなく、肺移植の対象ともなる。常染色体優性遺伝の発症様式をとることが多いが、家系によって異なる遺伝子の突然変異が報告されており、原因遺伝子の探索、同定は、とくに日本人において十分になされていない。本研究では、遺伝性間質性肺炎の日本人家系を対象に疾患原因遺伝子を探索することを目的とする。また家族発症例で同定された遺伝子変異に関して、日本人の孤発例においてもその有無を検討し、特発性間質性肺炎の病態解明の一助とする。

B. 研究方法

1. 特発性間質性肺炎の家族性発症を認める日本人家系において、罹患患者および非罹患患者を対象に全ゲノムシーケンシングを行い、各家系における遺伝性間質性肺炎の原因遺伝子を同定する。同時に得られた生体試料のオミックス解析から、原因遺伝子の機能解析を行う。

2. 家族例のゲノム解析で同定された疾患原因遺伝子に関して、特発性間質性肺炎の孤発例を対象に、遺伝子異常の有無を検索する。孤発例の生体試料のオミックス解析から、これらの遺伝子異常の病態への関与を検討する。

（倫理面への配慮）

研究開始に先立ち、各種倫理指針に則った研究計画を作成し、主たる研究機関である京都大学大学院医学研究科・医学部附属病院ならびに共同研究機関となる他病院の倫理委員会において、審議のうえ、承認を得た。家系内の罹患患者および非罹患患者の遺伝子解析にあたっては、必要に応じて京都大学医学部附属病院遺伝子診療部の臨床遺伝専門医による遺伝カウンセリングを受けられる体制を整備済である。

C. 研究結果

共同研究施設において、一家系の罹患患者および非罹患患者計6名の検体を採取し、全ゲノムシーケンシングを施行中である。

別の共同研究施設においても、一家系内の検体採取に向けて準備中である。

D. 考察

家族性発症例を含む家系の全ゲノム解析から、日本人の家族性間質性肺炎の新たな原因遺伝子が同定されることを期待している。結果に応じて、同一家系内でのオミックス解析を行うことで、疾患原因遺伝子の機能解析を試みる。今後別の家系でも同様の検討を行うことで、より多くの原因遺伝子の同定を試みる。

家族例のゲノムおよびオミックス解析の結果を、孤発例においても検討することで、遺伝性間質性肺炎だけでなく、特発性間質性肺炎全体の病態を解明する手がかりとなることが期待される。また新規バイオメーカーや新規治療の基礎となる結果が得られる可能性がある。

E. 結論

十分な倫理面への配慮のもと、遺伝子間質性肺炎の一家系を対象に原因遺伝子の同定に着手しており、今後別の家系での探索、オミックス解析、孤発例の検討を進めていく。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

肺高血圧症に関する研究

担当責任者：松原 広己 国立病院機構岡山医療センター・臨床研究部長

研究要旨

慢性血栓塞栓性肺高血圧症に対するバルーン肺動脈形成術の合併症である肺障害は、ワイヤーやカテーテル操作による血管損傷である可能性が高いことが示唆された。

A. 研究目的

慢性血栓塞栓性肺高血圧症（chronic thromboembolic pulmonary hypertension: CTEPH）は、特定疾患に指定されている難治性疾患である。われわれは、閉塞した肺動脈を拡張するバルーン肺動脈形成術（balloon pulmonary angioplasty: BPA）を改良し、血行動態の改善と死亡率の低下を実現した。現在日本循環器学会のガイドラインでは、BPAは血栓内膜摘除術の適応のない場合において治療選択肢のひとつに挙げられるに至った。しかし、術後に肺障害が出現し、一部で重症化することが課題である。これまでの検討で、ワイヤーなどによる血管損傷が肺障害の原因のひとつである可能性が示唆されている。そこで、肺障害の発生率と血管損傷の関連について検討を行った。

B. 研究方法

2012年11月から2013年12月までに当院で初回BPAを施行した症例を対象とした。術後撮影したCTで肺障害の出現の有無を全例で確認した。また、肺血管造影画像を確認し、カテーテル検査時の血管損傷の有無を判定した。その他術前後の臨床的な特徴と肺障害の関連についても検討した。

（倫理面への配慮）

BPAの実施については当院倫理委員会の承認を得ており、全例で治療前に書面で同意を得た。

C. 研究結果

76症例297セッションが解析対象となった。術後撮影されたCTでは、138セッション（47%）で肺障害の出現が確認された。肺血管造影画像で血管損傷が確認されたのは、肺障害出現群では33.3%であったのに対し、肺障害非出現群では3.1%と有意に低かった。術前の各種臨床指標の中で、肺障害の出現に関連していたのはWHO機能分類クラスIII/IVであり、重症例ほど肺障害の出現リスクが高いことがわかった。また、BPAに関連した指標についても肺障害の出現に寄与する因子の検討を行ったが、初回治療時には肺障害の出現が少なかった。血管造影上血管損傷が確認された場合は、risk ratio 13.9 (95% CI: 4.4-43.9)で高率に肺障害が出現していた。

D. 考察

BPAでは、血栓内膜摘除術よりも術後肺障害の出現が多いことが報告されている。われわれの施設で、BPA後の肺動脈を病理学的に検討した結果、BPAにより肺動脈に解離が起こることが判明している（文献1）。そ

ここで、BPA 後の肺障害の多くは血管損傷が原因であることが予測されていた。今回の検討結果から、実際に血管損傷と肺障害の出現に関連があることが示唆された。初回に肺障害の出現が少ないのは、初回は血行動態が不良であるため、手技困難な病変は対象とせず、治療病変数も少ないことが影響していると考えられる。BPA 施行時には、血管損傷をできるだけ起こさないよう、操作に細心の注意が必要である。

E. 結論

BPA 術後の肺障害の原因は、ワイヤーやカテーテル操作による血管損傷である可能性が示唆された。施行時には血管損傷をできるだけ起こさないよう心がける必要がある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kitani, M., Ogawa, A., Sarashina, T., Yamadori, I. and Matsubara, H. (2014) Histological changes of pulmonary arteries treated by balloon pulmonary angioplasty in a patient with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circ. Cardiovasc. Interv.* 7, 857-859.
2. Ogawa, A., Kitani, M., Mizoguchi, H., Munemasa, M., Matsuo, K., Yamadori, I., Andou, A. and Matsubara, H. (2014) Pulmonary microvascular remodeling after balloon pulmonary angioplasty in a patient with chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Intern. Med.* 53, 729-733.

2. 学会発表

1. Matsubara, H. Angioplasty. International CTEPH Conference 2014, Paris, France. June 3, 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし