

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：希少難病に対する機能喪失型バリエーション評価に基づく遺伝子治療ターゲット創出システムの構築

Development of gene therapy target creation system based on loss of function variant evaluation for rare diseases

研究開発実施期間：令和 5 年 4 月 15 日～令和 8 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：朝野 仁裕
Yoshihiro Asano

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
国立研究開発法人国立循環器病研究センター ゲノム医療支援部 部長
National Cerebral and Cardiovascular Center, Department of Genomic Medicine, Director

II 研究開発の概要

1. 研究の目的

本研究は、遺伝性心筋症をはじめとする遺伝性心血管疾患において、機能喪失型 (loss-of-function: LOF) バリエーションを体系的に同定し、その機能を多層的に評価することで、遺伝子治療の適応判定や創薬ターゲット探索に資する新たなプラットフォームの構築を目的とするものである。特に、国内最大規模の遺伝性心血管疾患バイオバンクに蓄積されたゲノム・オミックス・臨床情報を活用し、実臨床に存在するバリエーションを対象として、遺伝子レベルからバリエーションレベルへと解析精度を高めた評価系を確立する点に大きな特徴がある。

近年のゲノム解析技術の進展により、遺伝性心筋症においても多数の遺伝子バリエーションが同定されているが、その中には臨床的意義が不明確なバリエーション (variant of uncertain significance: VUS) が依然として多数存在している。これら VUS は、患者の正確な疾患層別化の妨げとなるだけでなく、適切な治療薬選択や遺伝子治療の適応判断を困難にする要因となっており、臨床現場における大きな課題となっている。特に心筋症のように遺伝子異常の種類によって病態や治療反応性が異なる疾患においては、バリエーションの機能的解釈の遅れがそのまま診療の不確実性に直結する。

一方で、これら意義不明バリエーションに対して網羅的かつ高精度に分子機能を評価する技術は未だ成熟しておらず、個別の実験系に依存した断片的な解析に留まっているのが現状である。このため、バリエーション情報の急速な蓄積に対して機能解析が追いついておらず、ゲノム医療の実装における大きなアンメットニーズとなっている。本研究は、この課題に対し、インフォマティクス解析と単一細胞解析技術、さらに細胞・動物モデルによる検証を統合することで、バリエーション機能を体系的に評価可能な基盤の構築を目指した。これにより、遺伝子バリエーションに基づく個別化医療の推進に資する新たな知見の創出を図った。

最終的には、LOF バリエーションに基づく遺伝子治療ターゲットの選定と、その妥当性を裏付けるデータの蓄積・整

理を進めることで、今後の診療および創薬研究への展開に貢献することを目的とした。

2. 研究方法

本研究は大きく 4 つの研究開発項目から構成された。

研究開発項目 1「インフォマティクス解析による機能喪失型バリエントを探索する基盤の構築」では、インフォマティクス解析により LOF バリエントを同定する基盤の構築を行った。既存の LOF スコアリング手法を出発点としつつ、バリエントの位置情報、機能アノテーション、タンパク質構造安定性などを統合した新規スコアリングアルゴリズムを開発した。さらに、遺伝子発現データや eQTL 解析を組み合わせることで、バリエントが実際に発現量変化に影響を及ぼすかを評価し、より信頼性の高い LOF 候補リストを作成した。また、機械学習を用いた病原性予測モデルを構築し、既存データと実験データの統合により精度向上を図った。

研究開発項目 2「Mutagenesis + scRNA-seq により機能喪失型バリエントを同定する実験系の構築」では、複数のバリエントの機能を同時に評価可能な解析フレームワークを構築した。遺伝子改変細胞を用いてバリエントを体系的に導入し、単一細胞レベルで遺伝子発現の違いを解析することで、それぞれのバリエントの機能的特性（LOF、gain-of-function、正常機能）を分類することを可能とする仕組みを整備した。これにより、多数の未知バリエントを効率的に評価できる基盤を整えた。

研究開発項目 3「同定された機能喪失型バリエントの細胞実験によるバリデーション」では、細胞モデルを用いたバリデーションを実施した。インフォマティクス解析で選定された候補バリエントについて、細胞レベルでその機能影響を検証し、さらに遺伝子補充による機能回復の可能性も検討した。

研究開発項目 4「同定された機能喪失型バリエントの動物実験によるバリデーション」では、動物モデルを用いた検証を行った。代表的なバリエントについてノックインマウスを作製し、心機能や病理変化を評価するとともに、遺伝子治療による表現型改善効果を検証した。

3. 研究成果

1) 研究開発項目 1「インフォマティクス解析による機能喪失型バリエントを探索する基盤の構築」

本研究開発項目においては、LOF バリエントの同定精度を飛躍的に向上させた新規インフォマティクスアルゴリズムを確立し、従来の遺伝子単位での評価に留まらず、個々のバリエントレベルで創薬ターゲット候補を抽出可能な解析基盤を構築した点が大きな成果である。特に、バリエントの位置情報、機能アノテーション、タンパク質構造安定性を統合した多次元的評価により、従来手法では困難であった高精度な機能予測が可能となった。さらに、この手法を複数の遺伝子に適用することで、その汎用性と拡張性が確認され、今後さまざまな疾患領域においても応用可能な基盤技術であることが示された。

加えて、機械学習モデルと実験データを統合することで、未知バリエントに対する機能予測精度をさらに高めることに成功した点も重要である(図 1)。従来は限られた既知バリエントに依存していた病原性評価に対し、本研究では実測データを取り込むことで予測モデルの外挿性を向上させ、より実臨床で有用な評価体系を実現した。これにより、希少バリエントを含む多様な遺伝子変異に対しても、一定の信頼性をもって機能評価が可能となった。

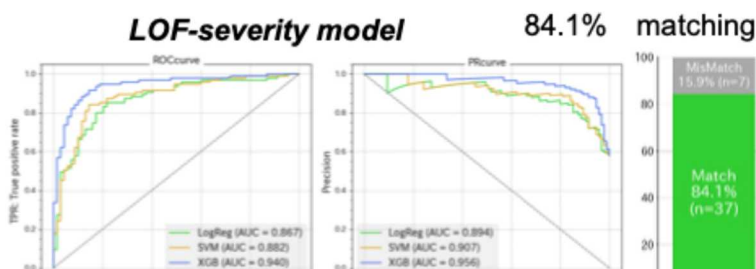


図 1：機械学習モデルと実験データの統合による新規確立 LOF 予測モデルの精度

さらに、遺伝子発現解析とバリエーション評価を統合したアプローチにより、バリエーションがもたらす分子影響を多角的に把握できるようになった点も重要である。特に eQTL 解析やトランスクリプトーム情報との統合により、単なる配列変化の予測にとどまらず、実際の細胞機能への影響を推定できる解析体系が確立された。このような多層的評価により、機能的意義の乏しいバリエーションの除外と、真に重要な病原性バリエーションの抽出が可能となり、創薬標的探索の効率化に大きく寄与した。

2) 研究開発項目 2「Mutagenesis + scRNA-seq により機能喪失型バリエーションを同定する実験系の構築」

本研究開発項目では、単一細胞 RNA シーケンスを活用した新規のバリエーション機能評価フレームワークを確立したことが、重要な成果である(図 2)。本手法により、複数のバリエーションを細胞レベルで評価し、それぞれの転写プロファイルに基づいて機能的に層別化する実験系の基盤が整備された。これまで個別に検証する必要があったバリエーション評価を、網羅的かつ高効率に実施できる可能性が明確になった点は、基礎研究のみならず、創薬スクリーニングの高度化にも大きく寄与する技術的進展であるといえる。また、この枠組みは、将来的に大規模なバリエーションデータの機能付与を自動化・高速化する基盤として発展する可能性を有している。



図 2: バリエーション機能スクリーニング系の構築

3) 研究開発項目 3・4「同定された機能喪失型バリエーションの細胞実験・動物実験によるバリデーション」

本研究開発項目では、細胞および動物モデルを用いた多層的なバリデーションにより、インフォマティクス解析で予測された LOF バリエーションの一部について、実際に機能喪失が病態形成に寄与することを実証した。特に、特定のバリエーション (Variant X) においては、心機能低下や心筋線維化といった明確な病態が動物モデルで再現され、その分子基盤として炎症応答および免疫関連シグナルの活性化が関与している可能性が示唆された。このように、遺伝子変異から表現型、さらには分子病態に至る一連の因果関係を明らかにした点は、本研究の学術的価値を高めるものである(図 3)。

加えて、同バリエーションに対する遺伝子補充療法により、心機能が有意に改善したことは、当該バリエーションが真の LOF 変異であることを強く裏付けるとともに、遺伝子治療の有効性を実証する直接的なエビデンスとなった(図 3)。この成果は、単なる機能解析にとどまらず、得られた知見を治療戦略へと橋渡しする「トランスレーショナル研究」の観点からも極めて重要である。また、本研究で確立された評価系と検証プロセスは、今後の遺伝子治療開発において、候補ターゲットの選定から前臨床評価までの効率化に大きく寄与することが期待される。

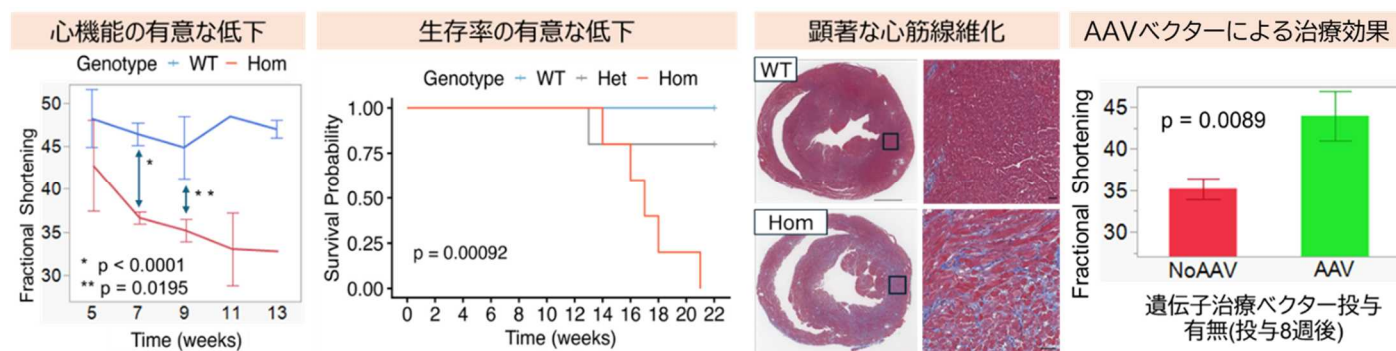


図 3: バリエーション X ノックインマウスの表現型及び遺伝子治療ベクターによる治療効果からの LOF 性の証明

4. まとめと意義

以上の成果から、本研究は、「予測（dry）－検証（wet）－治療応用」までを一体的に結ぶ統合型プラットフォームを初めて体系的に構築した点に最大の意義がある。従来は断片的であった遺伝子変異の機能評価と創薬応用の流れを、本研究では一連のプロセスとして統合し、実用化に近い形で提示した。

加えて、本研究により、網羅的に機能解析されたバリエーション情報を蓄積したリストを取得可能であることが示された。このような体系化されたバリエーション機能情報は、臨床診療において極めて重要な価値を有する。具体的には、患者が保有するバリエーションの機能情報に基づき、疾患の重症度や進行速度の予測、さらには発症リスクの評価といった予後予測や発症予測への応用が期待される。また、従来は不確実であった VUS の再分類を可能とし、診断精度の向上にも寄与する。

さらに、本研究で構築された評価基盤により、短期間かつ網羅的にバリエーション機能を評価することが可能となるため、機能喪失型疾患に対する遺伝子補充療法のみならず、機能獲得型（gain-of-function）疾患に対する阻害療法など、異なる治療戦略に応じた創薬ターゲットの同定およびバリデーションが加速されることが期待される。すなわち、本プラットフォームは単に解析技術にとどまらず、創薬パイプライン全体の効率化に直結する基盤技術として位置づけられる。

また、本研究で得られた技術や知見は、心筋症にとどまらず、他の遺伝性疾患や希少疾患への展開が可能であり、将来的には個々の患者の遺伝子変異に応じた精密医療（precision medicine）の実現にも直結する基盤となることが期待される。さらに、バリエーション単位での治療適応判断や治療効果予測といった新たな医療概念の実装にも貢献しうるものであり、医療・創薬のパラダイム転換を支える重要な基盤技術として位置付けられる。

Summary of the Research Project

This project aimed to develop an integrated platform for identifying and validating loss-of-function (LOF) genetic variants associated with hereditary cardiomyopathies, ultimately supporting drug discovery and gene therapy target identification. Using a large-scale cardiovascular disease biobank, the study combined genomic, multi-omics, and clinical data with newly developed computational and experimental approaches to enable systematic evaluation of variant function.

The research consisted of four main components. First, an informatics framework was established to identify candidate LOF variants. Existing LOF scoring algorithms were applied but showed limited precision for drug target discovery. Therefore, a new scoring model was developed incorporating variant position, functional annotation, and protein stability metrics. Expression-level validation using eQTL analyses and public datasets further refined the predictions. Machine learning-based pathogenicity prediction models were also constructed, achieving high accuracy, and enabling prioritization of candidate variants.

Second, a novel experimental platform combining mutagenesis and single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) was developed. Induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived cardiomyocytes carrying specific gene variants were generated, and optimal stress conditions were identified to reveal phenotypic differences. A barcode-based system enabled simultaneous analysis of multiple variants at single-cell resolution. Genome editing libraries were used to introduce random mutations, allowing classification of variants based on transcriptional profiles. This system demonstrated proof-of-concept for linking genetic variation to functional outcomes.

Third, cell-based validation of selected variants was conducted. Candidate LOF variants were introduced into iPSC-derived cardiomyocytes and evaluated using phenotypic and molecular analyses. Although clear differences were not always observed under baseline conditions, adeno-associated virus (AAV)-mediated gene delivery was developed to assess functional rescue. Cardiac-specific gene expression and delivery protocols were successfully established, supporting further evaluation of variant effects under optimized conditions.

Fourth, in vivo validation was performed using knock-in mouse models. Among the tested variants, one (Variant X) showed clear cardiomyopathy phenotypes, including cardiac dysfunction, fibrosis, and reduced survival. Transcriptomic analysis revealed activation of inflammatory pathways. Importantly, gene therapy using AAV vectors significantly improved cardiac function, demonstrating that this variant represents a true LOF mutation and validating the computational prediction framework.

Overall, the project successfully established a comprehensive pipeline integrating computational prediction and multi-level validation. This platform enables systematic identification of disease-relevant LOF variants and provides a foundation for precision medicine and gene therapy development. Future work will focus on expanding the platform to other genes and diseases, improving genome editing accuracy, and enhancing phenotype detection systems.