

厚生科学研究費
ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業

平成11年度 研究報告書

新規遺伝子 (Ca-dependent mitochondrial solute carrier) の機能解析と
疾患発症の分子機構の解明ならびに遺伝子診断と治療法の開発

Annual Report of the Research on Human Genome and Gene Therapy
Health Sciences Research Grants
The Ministry of Health and Welfare of Japan 1999

平成12年3月

主任研究者 佐伯武頼
(鹿児島大学医学部教授)

厚生科学研究費補助金研究報告書概要

研究費の名称： 厚生科学研究費

研究事業名： ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業

研究課題名：新規遺伝子(**Ca-dependent mitochondrial solute carrier**)
の機能解析と疾患発症の分子機構の解明ならびに
遺伝子診断と治療法の開発

国庫補助金精算所要額 (円)： 35,000,000 円

研究期間 (西暦)： 1999年～2001年

研究年度 (西暦)： 1999年度

主任研究者名： 佐伯武頼 (鹿児島大学医学部)

分担研究者名： 小林圭子 (鹿児島大学医学部)

飯島幹雄 (鹿児島大学医学部)

Stephen W Scherer (University of Toronto, Canada)

目 次

1. 総括研究報告	-----	1
2. 倫理審査（承認）書類	-----	11
3. 研究業績		
A. 学会発表（主催学会のみ記載）		
(1) 日本先天代謝異常学会	-----	25
B. 論文発表		
(1) Nature Genetics	-----	30
(2) Cytogenet Cell Genet	-----	36
(3) Genomics	-----	39
(4) Calcium Book (Review)	-----	43
(5) 日本臨床分子医学会記録	-----	68
(6) 臨床検査	-----	70
(7) 日本マス・スクリーニング学会誌	-----	79
(8) 治療学	-----	88
(9) 日本先天代謝異常学会誌	-----	91
(10) 最新肝臓病学	-----	97
(11) 病理と臨床	-----	105

総括研究報告

はしがき

本研究は、主任研究者と分担研究者が中心になって、下記に示す多くの先生方の協力を得て、共同研究で遂行されたものである。また、主な研究組織としては鹿児島大学医学部生化学第一講座であるため、総括研究報告ならびに研究業績をもって、その成果報告書とする。

研究協力機関ならびに研究協力者名（敬称略）：

- | | |
|-------------------------|--|
| [鹿児島大学医学部] | 安田 智嗣、山口 直喜、Md Abdul Jalil、Laila Begum、
李 孟賢、堀之内 秀仁、山口 桂司、崎之原 文子、
中川 正法、納 光弘、福迫 博、瀧川 守國、
津山 新一郎、村田 長芳 |
| [University of Toronto] | David S Sinasac、Michael A Crackower、Lap-Chee Tsui |
| [Taiwan University] | Wuh-Liang Hwu |
| [愛媛大学医学部] | 近藤 郁子 |
| [大阪市立大学医学部] | 河田 則文、岡野 善行 |
| [東京警察病院] | 小貫 純一、平野 正憲 |
| [群馬大学医学部] | 笠原 群生、友政 剛、金子 浩章、森川 昭廣、森下 靖雄 |
| [国立国際医療センター] | 正木 尚彦 |
| [関西医科大学] | 伊藤 恒 |
| [紀南総合病院] | 畑中 史郎 |
| [名古屋大学医学部] | 長野 健一、梶田 光春、中野 功 |
| [岐阜大学医学部] | 安田 一朗、福富 尉、森脇 久隆 |
| [福岡大学医学部] | 坪井 義夫、山田 達夫 |
| [久留米大学医学部] | 西村 靖子、大泉 耕太郎 |
| [須磨赤十字病院] | 菅野 雅彦 |
| [神戸大学医学部] | 松尾 雅文 |
| [西脇市立西脇病院] | 高島 康弘 |
| [岡山大学医学部] | 寺田 亮、辻 孝夫 |
| [東京都立神経病院] | 川田 明広 |
| [鳥取大学医学部] | 細田 淑人、飯塚 俊之、田澤 雄作 |
| [岩手医科大学] | 岩井 正勝、佐藤 慎一郎、鈴木 一幸 |
| [鹿児島厚生連病院] | 今村 也寸志 |
| [信州大学医学部] | 矢崎 正英、池田 修一 |
| [京都大学医学部] | 上本 伸二、木内 哲也、田中 紘一 |

1. 研究目的

尿素サイクル酵素の1つである argininosuccinate synthetase (ASS) の異常は、シトルリン血症を引き起こす。ASS 遺伝子の異常により全身性の ASS 欠損を示す古典型シトルリン血症 (CTLN1) とは異なり、肝臓特異的な ASS 蛋白の低下に基づく成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2) では、ASS 遺伝子の異常は認められず、長年真の原因は不明であった。最近、homozygosity mapping と positional cloning の手法を用いて、CTLN2 の責任遺伝子として新規遺伝子 SLC25A13 を同定し、Ca-dependent mitochondrial solute carrier と考えられるその遺伝子産物を citrin と命名した (Kobayashi et al. Nature Genetics 22:159-163, 1999)。

本研究の目的は、(1) citrin ならびにその類似蛋白である aralar の構造ならびに機能や生理的役割を解明する、(2) それらの異常により生じる疾患発症の分子機構を明らかにする、(3) 迅速で確実な診断法を確立する、(4) 有効な治療法かつ予防法の開発を目指すものである。CTLN2 は本邦で発症者数の多い予後不良の難病であるため、その成果は医学水準の向上をもたらし、社会に貢献するところ大である。

2. 研究方法

1) CTLN2 の病態解析と診断

国内外の医療機関から依頼を受け、20 数年来継続して行なってきた高アンモニア血症の酵素学的診断のために、尿素サイクルの5つの酵素活性を測定した。特に、シトルリン血症では、CTLN2 と CTLN1 を確実に鑑別診断する必要があるため、CTLN1 についても酵素学的診断ならびに ASS 遺伝子の変異解析と遺伝子診断を実施した。

2) CTLN2 の変異解析と遺伝子診断

CTLN2 で同定した SLC25A13 遺伝子上の5種類の変異に対する遺伝子診断は、Kobayashi らが Nature Genetics に報告した PCR/制限酵素切断の方法に従った。未知(新規)変異の解析は、RT-PCR およびゲノム DNA-PCR により増幅した cDNA や DNA 断片の塩基配列決定により行なった。患者とその家族および健常者における遺伝子解析や遺伝子診断では、インフォームドコンセントを得た後、主に血液細胞から抽出した DNA を用いた。

3) Citrin および aralar に対する抗体の作成

バクテリアの蛋白発現系 (pET-system) を用いて、citrin および aralar の cDNA を挿入したプラスミドから、リコンビナント蛋白 (His-tagged) を大量に発現合成した。アフィニティークロマトグラフィーなどによって単離精製した蛋白を用いて、ウサギを免疫し、ポリクローナル抗体を作成した。

4) 組織分布と細胞内局在性の検討

組織分布では、SLC25A13 cDNA (-53 to 928, 981 bp) および SLC25A12 cDNA (15 to 989, 975 bp) をプローブに用いた Northern blot 解析により mRNA の発現を、また上記抗体を用いた Western blot 解析により蛋白を検出した。

細胞内局在性は、グリーン蛍光蛋白質 (GFP) を発現するベクターに citrin (full, N-half, C-half) cDNA を挿入して構築した発現プラスミドを各種培養細胞株に導入した後、発現する融合蛋白を共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて観察した。一方、マウスあるいはラットの肝臓を用いて、細胞の種類別分離あるいは細胞内オルガネラ分画を行ない、Western blot 解析により、局在する分画を検討した。

5) Ca²⁺-binding 活性の測定

上記の pET-system を用いて合成した N-half citrin (1-284 aa, 35 kDa)、C-half citrin (284-675 aa, 44 kDa) および N-half aralar (1-312 aa, 38 kDa) の各々 His-tagged 蛋白を SDS-PAGE により分離し、ニトロセルロース膜に転写後、⁴⁵Ca overlay assay により Ca²⁺の結合能を調べた。

6) ノックアウトマウスの作成準備

マウス citrin 遺伝子ならびに aralar 遺伝子のクローニングを行ない、ノックアウトマウスを作成するための準備を行なった。

3. 結果と考察

1) シトルリン血症の診断

これまでに 400 症例の高アンモニア血症について、尿素サイクル5つの酵素活性の測定により、各々の欠損症を診断してきたが、平成 11 年度は国内外から 40 症例を超える解析依頼があり、酵素学的診断あるいは遺伝子診断を行なった。その結果、シトルリン血症以外では、5例の CPS (carbamoylphosphate synthetase) 欠損症、1例の ASL (argininosuccinate lyase) 欠損症、1例の LPI (lysinuric protein

intolerance) 症例などを診断した。また CTLN1 では、6 カ国（アメリカ、カナダ、ドイツ、オランダ、スペイン、イスラエル）から依頼された 10 症例を含めて、15 症例の ASS 欠損症を解析し、そのうち日本の 3 症例については遺伝子診断による出生前診断を行なった。一方、CTLN2 では、新たに 14 例の日本人症例と、2 例の台湾人症例を見出した。

2) SLC25A13 変異遺伝子の頻度

変異解析によって新規に 1800ins1 変異を同定することができ、合計 6 種類の変異に対する遺伝子診断を 110 例の CTLN2 症例で行なった。そのうち 92 症例は 6 種類の変異のどれかをホモ接合あるいは複合ヘテロ接合として有していた。また、12 症例においては 1 つの対立遺伝子に変異を認めたが、片方の対立遺伝子には 6 種類の変異は見い出せなかった。この遺伝子診断の結果は、これまで CTLN2 を診断する際に用いてきた判定基準が間違っていなかったことを示している。変異が検出できなかった症例および対立遺伝子については、さらに変異解析を進めている。一方、近親婚由来の患者（22 例）であるにもかかわらず、うち 5 例が複合ヘテロ接合体を示したことから、SLC25A13 変異遺伝子の集団での頻度は高いと予想される。まだ予備的段階ではあるが、一般集団からの健常者 400 人程の遺伝子を検索した結果、7 人の保因者を見い出しており、変異遺伝子をホモに持つ人がかなり高い頻度（2 万人に 1 人以上）で存在する可能性がさらに示唆された。

3) CTLN2 の肝移植による治療

1989 年にピッツバーグで実施された CTLN2 最初の肝移植症例は、術後 10 年を経過するが、順調に過ごしている。3 例目からは、日本において生体部分肝移植が行なわれ、すでに 15 症例の治療に適用された。これまではドナー候補者として適正か否かを、血液生化学検査と生検肝における ASS 活性の測定により行なってきたが、CTLN2 の責任遺伝子発見と変異同定後は遺伝子診断を行なうことでより正確な判断が可能になった。

平成 11 年度には 7 例の CTLN2 症例で生体部分肝移植が実施された。その際発端者である患者が持つ変異を同定した後、ドナー候補者を含む同意が得られた家族の構成メンバーにおいて、遺伝子診断を実施した。また、以前に移植手術が行なわれ、すでに組織提供となった人やその家族などにおいても、現在同定している変異に対する遺伝子診断を行なった。13 家系での結果、組織提供者である父親（7 家系）、兄弟（2 家系）、子供（2 家系）ではすべてヘテロ接合体を示し、また配偶者（2 家系）では検索した変異は認められなかった。そ

の解析中、1家系において、肝移植を考慮して遺伝子診断を行なったところ、ドナー候補者として予定していた2人の弟がいずれも発端者と同じ変異を持つホモ接合体であることが判明し、結果的に発症前診断となった。さらに、遺伝子診断の結果、現在のところ CTLN2 の症状は見られないが、SLC25A13 変異遺伝子をホモに持つ人を5名見い出した。彼等の今後の経過観察は CTLN2 の発症機構を明らかにしていく上でも特に重要であり、慎重にかつ詳細に行なうべきである。

4) Ca-dependent mitochondrial carrier の機能解析

Northern blot ならびに Western blot 解析により、citrin は主に肝臓の肝実質細胞に発現していることを明らかにした。また、citrin および aralar の詳細な機能は不明であるが、いずれの蛋白も mitochondria に局在することが GFP との融合蛋白の実験ならびに細胞のオルガネラ分画の解析から確認できた。さらに、subfractionation により、mitochondria の inner membrane に局在することが認められた。しかし、一部は outer membrane にも存在する可能性があるため、さらに詳細な検討を行なう必要があると考えている。

⁴⁵Ca overlay assay により、citrin および aralar の N-half 部分（細胞質側領域で EF-hand モチーフが存在）に Ca²⁺結合活性があることを見い出した。一方、その活性は C-half 領域（mitochondrial transmembrane domain が存在）には認められず、N-half 領域に存在する EF-hand モチーフがその結合に必要であることが明らかになった。しかし、両 mRNA あるいは蛋白が発現する組織分布は、citrin（肝臓、腎臓、膵臓など）と aralar（心臓、筋肉、脳など）の間で異なっており、輸送する基質に違いがあるのか、代謝の臓器分担に関与するのか、などの機能解析が必要である。

5) ノックアウトマウスの作成

単離したマウス citrin cDNA の塩基配列から推定すると、676 個からなるアミノ酸配列は、ヒト citrin と 96% の identity を示した。さらに、マウス citrin 遺伝子もほぼクローニングできたので、homologous recombination の手法を用いて、citrin 蛋白の最初の mitochondrial transmembrane domain をコードする exon 9 と 10 を欠失したモデルマウスを作成する予定で準備を始めている。一方、Crackower らによって、alaral をコードする遺伝子 SLC25A12 がヒトの染色体 2q24 に座位することが明らかにされた。Aralar 欠損症はまだ報告されていないので、ノックアウトマウスの作成は重要である。Scherer らのグループにより、マウス aralar 遺伝子を含む BAC クローンが得られたので、これから詳細な遺伝子解析を進めて、

疾患マウスの作成に備える。

一方、極々最近、約 50,000 種類の遺伝子に対するインサーション変異 ES 細胞をストックする企業があり、その中に相当するものがあれば変異マウスとして購入可能であるという情報が入ったので、現在検討しているところである。

4. 結論

SLC25A13 遺伝子が CTLN2 の責任遺伝子であることは、今回行なった 100 例におよぶ遺伝子診断で、ほぼすべての CTLN2 症例において変異の存在が認められ、さらに確実なものとなった。遺伝子診断は、発症した患者の診断や保因者検索のみならず、肝移植時のドナー候補者の決定に役立ち、さらには発症前診断をも可能にした。今後、診断例を増やして、変異遺伝子の頻度や患者としての発症率を正確に把握し、発症の分子機構ならびにその要因を明らかにし、CTLN2 を予防可能な遺伝性疾患として確立することを目指す。また、日本人症例で見いだした変異と同じ変異を持つ台湾人の CTLN2 症例が認められたことは、日本のみならず少なくともアジア諸国に患者がいること、およびそれらの変異が、日本人と台湾人に分かれる前の古い時代のものであることを示唆しており、CTLN2 疾患の拡がり在今后の大きな問題となる。

一方では、citrin および aralar が Ca-binding mitochondrial carrier として機能するであろうデータが少しずつ得られているので、何を carry するのかという最も重要な点に関して、さらに解析する必要がある。さらに、ノックアウトマウスの樹立は、病態解析を行なう上で、また新規遺伝子産物の機能や役割を解析する上で欠かせないものであり、本研究の目的を達成するための推進力として必須である。

研究業績

A. 学会発表

- [1] 佐伯 武頼：高アンモニア血症の病因・病態解析
シンポジウム：「病因病態の生化学的・分子生物学的解析」
日本生化学会九州支部例会（久留米）
- [2] 小林 圭子、David S. Sinasac、飯島 幹雄、Stephen W. Scherer、佐伯 武頼：
成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2) 遺伝子の同定
第 36 回日本臨床分子医学会学術総会（福岡）
- [3] 小林 圭子、佐伯 武頼：
成人発症 II 型シトルリン血症を引き起こす責任遺伝子の同定
パラレルシンポジウム：代謝性肝疾患における診断と治療の進歩
第 35 回日本肝臓学会総会（東京）
- [4] 小林 圭子、飯島 幹雄、安田 智嗣、Stephen W Scherer、佐伯 武頼：
成人発症 II 型シトルリン血症責任遺伝子の同定と遺伝子診断
第 6 回日本遺伝子診療学会大会（名古屋）
- [5] 岡 裕介、正木 尚彦、吉永 秀哉、白旗 久美子、馬場 仁、本谷 大介、
朝山 雅子、秋山 純一、大和 滋、正田 良介、村岡 亮、松枝 啓、
下条 糸み、林 茂樹、佃 正明、蓮尾 金博、斎藤 澄、小林 圭子：
肝細胞癌を合併した II 型シトルリン血症の 1 例
日本消化器病学会関東支部例会
- [6] 佐伯 武頼、小林 圭子、Stephen W Scherer：成人発症 II 型シトルリン血症
の病因解析と発症機構解析
シンポジウム：成人発症遺伝性疾患の分子病因病態と治療への応用
第 42 回日本先天代謝異常学会（鹿児島）
- [7] 坂 京子、浜嶋 直樹、伊藤 哲哉、鷺見 聡、杉山 成司、和田 義郎、
鈴木 達也、橋本 俊、小林 圭子：
生体部分肝移植を施行した古典型シトルリン血症の 1 例
第 42 回日本先天代謝異常学会（鹿児島）

- [8] 小林 圭子、David S Sinasac、飯島 幹雄、Laila Begum、Stephen W Scherer、佐伯 武頼：
成人発症 II 型シトルリン血症責任遺伝子のポジショナルクローニング
第 42 回日本先天代謝異常学会（鹿児島）
- [9] 安田 智嗣、小林 圭子、堀之内 秀仁、山口 桂司、山口 直喜、崎之原文子、佐伯 武頼：
成人発症 II 型シトルリン血症における変異遺伝子の頻度と遺伝子診断
第 42 回日本先天代謝異常学会（鹿児島）
- [10] 飯島 幹雄、小林 圭子、安田 智嗣、Md Abdul Jalil、Stephen W Scherer、佐伯 武頼：成人発症 II 型シトルリン血症責任遺伝子 SLC25A13 および類似遺伝子 SLC25A12 mRNA の組織分布ならびに citrin の細胞内局在
第 42 回日本先天代謝異常学会（鹿児島）
- [11] 小林 圭子、飯島 幹雄、安田 智嗣、佐伯 武頼、Stephen W Scherer：
成人発症 II 型シトルリン血症（CTLN2）の病因解明
ワークショップ：「単一遺伝子病・先天代謝異常」
日本人類遺伝学会第 44 回大会（仙台）
- [12] 小林 圭子、佐伯 武頼：成人発症 II 型シトルリン血症
パネルディスカッション：
「肝性脳症（非肝硬変性を含む）の分野、病態、診断、マネジメント」
第 33 回日本肝臓学会西部会（富山）
- [13] 小林 圭子、David S. Sinasac、飯島 幹雄、安田 智嗣、山口 直喜、Stephen W. Scherer、佐伯 武頼：成人発症 II 型シトルリン血症の分子遺伝学的解析
ワークショップ：「遺伝子病の分子遺伝学」のトピックス
第 22 回日本分子生物学会年会（福岡）
- [14] 飯島 幹雄、小林 圭子、安田 智嗣、Abdul Jalil、佐伯 武頼：
成人発症 II 型シトルリン血症責任遺伝子産物 citrin の細胞内分布
第 22 回日本分子生物学会年会（福岡）

- [15] 安田 智嗣、小林 圭子、堀之内 秀仁、山口 桂司、山口 直喜、崎之原文子、佐伯 武頼：
成人発症 II 型シトルリン血症で同定した SLC25A13 遺伝子の変異頻度
第 22 回日本分子生物学会年会（福岡）

B. 論文発表

- [1] Keiko Kobayashi, David S. Sinasac, Mikio Iijima, Andrew P. Boright, Laila Begum, Jeffrey R. Lee, Tomotsugu Yasuda, Sayaka Ikeda, Ryuki Hirano, Hiroki Terazono, Michael A. Crackower, Ikuko Kondo, Lap-Chee Tsui, Stephen W. Scherer and Takeyori Saheki: The gene mutated in adult-onset type II citrullinaemia encodes a putative mitochondrial carrier protein. *Nature Genetics* 22:159-163 (1999)
- [2] MA Crackower, DS Sinasac, JR Lee, J-A Herbrich, L-C Tsui, SW Scherer: Assignment of the SLC25A12 gene coding for the human calcium-binding mitochondrial solute carrier protein aralar to human chromosome 2q24. *Cytogenet Cell Genet* 87: 197-198 (1999)
- [3] David S. Sinasac, Michael A. Crackower, Jeffrey R. Lee, Keiko Kobayashi, Takeyori Saheki, Stephen W. Scherer, and Lap-Chee Tsui: Genomic structure the adult-onset type II citrullinemia gene, SLC25A13, and cloning and expression of its mouse homologue. *Genomics* 62: 289-292 (1999)
- [4] Keiko Kobayashi, Mikio Iijima, Tomotsugu Yasuda, David S Sinasac, Naoki Yamaguchi, Lap-Chee Tsui, Stephen W Scherer, Takeyori Saheki: Type II citrullinemia (citrin deficiency): a mysterious disease caused by a defect of calcium-binding mitochondrial carrier protein. *Calcium. The Molecular Basis of Calcium Action in Biology and Medicine* (ed. Roland Pochet) Kluwer Academic Publishers, in press (2000)
- [5] Ronald G Jenkins, William H Tolleson, Keith D Newkirk, Dean W Roberts, Kenneth L Rowland, Takeyori Saheki, Keiko Kobayashi, Paul C Howard, William B Melchior Jr: Identification of fumonisin B₁ as an inhibitor of argininosuccinate synthetase using fumonisin affinity chromatography and in vitro kinetic studies. *J Biochem Molecular Toxicol* (submitted)

- [6] Mureo Kasahara, Susumu Ohwada, Takayuki Takeichi, Hiroaki Kaneko, Takeshi Tomomasa, Akihiro Morikawa, Kimie Yonemura, Katsuhiko Asonuma, Koichi Tanaka, Keiko Kobayashi, Takeyori Saheki, Izumi Takeyoshi Yasuo Morishita: Living-related liver transplantation for type II citrullinemia using a graft from heterozygote donor: a case report. Transplantation (submitted)
- [7] 小林 圭子、David S Sinasac、飯島 幹雄、Stephen W Scherer、佐伯 武頼：成人発症 II 型シトルリン血症（CTLN2）遺伝子の同定. 日本臨床分子医学学会記録 36: 27 (1999)
- [8] 小林 圭子、佐伯 武頼：シトルリン血症. 臨床検査 43:798-805 (1999)
- [9] 小林 圭子、佐伯 武頼：成人発症 II 型シトルリン血症遺伝子のポジショナルクローニング—Homozygosity Mapping による責任遺伝子座位の探索を中心にして—. 日本マス・スクリーニング学会誌 9: 83-91 (1999)
- [10] 小林 圭子、佐伯 武頼：ポジショナルクローニングの有用性と遺伝子診断・治療の問題点. 治療学 33: 1316-1317 (1999)
- [11] 佐伯 武頼、小林 圭子、Stephen W Scherer：成人発症 II シトルリン血症の病因解析と発症機構解析. 日本先天代謝異常学会雑誌 in press (2000)
- [12] 小林 圭子、佐伯 武頼：成人発症 II 型シトルリン血症. 最新肝臓病学（編者：渡辺 明治、樋口 清博）in press (2000)
- [13] 小林圭子、佐伯武頼：生化学遺伝学と代謝異常症. 病理と臨床 in press (2000)
- [14] 小貫 純一、西村 秀司、吉野 克正、高橋 秀和、鈴木 剛、阿部 潔、桜林 真、山本 佳洋、岩瀬 透、平野 正憲、小林 圭子、佐伯 武頼：遺伝子診断により発症前診断がなされた、成人発症 II 型シトルリン血症の兄弟の例. 肝臓（投稿中）

倫理審査（承認）書類

審 査 結 果 通 知 書

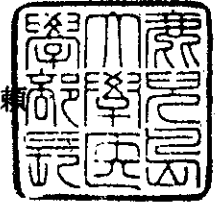
平成12年1月25 日

申請者

佐 伯 武 頼 殿

鹿児島大学医学部倫理委員会

委員長 (医学部長) 佐 伯 武 頼



受付番号 20

課題名 精神神経症状を伴う高アンモニア血症を呈する症候群における遺伝子
要因の同定と遺伝子診断および予防と治療の研究

研究者名 小林 圭子、飯島 幹雄、安田 いつみ、安田 智嗣、山口 直喜、
中川 正法、福迫 博、橋口 知、北島 勲、宇宿 功市郎、山田 勝士

上記実施計画を、平成12年1月14日の委員会で審査し、下記のとおり
判定した。

記

判 定	<p style="text-align: center;">承認 不承認</p> <p style="text-align: center;">条件付承認 非 該 当</p> <p style="text-align: center;">変更の勧告</p>
条 件 又 は 不 承 認 あ る 理 由	<p style="text-align: center;">(条 件)</p> <p style="text-align: center;">な し</p>

倫 理 審 査 申 請 書

平成11年 7月22日提出
(平成12年 1月 5日修正)

鹿児島大学医学部
倫理委員会委員長 殿

申請者名 佐伯武頼 印
所 属 医学部生化学第一講座
職 名 教 授

※ 受付番号

所属長印	
------	--

1 審 査 対 象	実施計画		
2 課 題 名	精神神経症状を伴う高アンモニア血症を呈する症候群における遺伝要因の同定と遺伝子診断および予防と治療の研究		
3 主任研究者名	佐伯武頼	生化学第一講座	教授
4 分担研究者名	小林圭子	生化学第一講座	助教授
	飯島幹雄	生化学第一講座	助手
	安田いづみ	生化学第一講座	助手
	安田智嗣	生化学第一講座	大学院生
	山口直喜	内科学第三講座	大学院生
	中川正法	内科学第三講座	講師
	福迫博	神経精神医学講座	講師
	橋口知	神経精神医学講座	助手
	北島勲	臨床検査医学講座	助教授
	宇宿功市郎	医療情報管理学講座	助教授
	山田勝士	薬剤部	教授
5 研究等の概要	<p>精神神経症状を伴う高アンモニア血症を呈する症候群の原因とそれらの発症機構を明らかにし、病気の診断、予防ならびに治療を目指す。具体的には、患者、その家族、健常者（通常の検査で異常がなく、健康に生活している人）の血液や組織の細胞からDNAを抽出し、その遺伝子解析を行なう。（A）すでに原因遺伝子が明らかである疾患では、既知変異に対する遺伝子診断を実施し、また変異が未知の場合は新規変異の同定を行ない、各々の変異頻度を検索する。（B）その原因が特定されていない疾患では、多型DNAマーカーによる解析結果と症状発症との関連から、遺伝性要因の有無を検討し、その原因遺伝子を同定する。また、対照DNAとしては、いわゆる健常者に採血の協力を求め、一般集団における変異頻度あるいは多型の傾向を検討する。</p>		

6 研究等の対象及び実施場所

対象：（１）高アンモニア血症とそれに関連する精神神経症状をもつ患者とその家族
（２）一般集団における健常者

検査項目：詳細は「実験計画書」参照

実施場所：鹿児島大学医学部・付属病院を中心に、国内外の医療施設

検査施設：鹿児島大学医学部生化学第一講座を中心に、内科学第三講座、
神経精神医学講座、臨床検査医学講座、医療情報管理学講座、薬剤部

7 研究等における医学倫理的配慮について

I 研究等の対象とする個人の人権擁護

被験者のプライバシーを完全に守るため、研究結果発表や出版に際しては個人が特定されないよう配慮する。研究責任者は、被験者のいかなる個人情報も漏出しないように細心の注意を払い、検査実施者には登録記号のみで対応する。

II 研究等の対象となる者に理解を求め同意を得る方法

DNA を用いて解析する病気（項目）を明確に記載し、被験者の同意が得られた項目に限って検討する。目的の病気（項目）については文書で詳細に説明し、被験者に充分理解して頂くように努め、インフォームドコンセントを確保する。

III 研究等によって生ずる個人への不利益並びに危険性と医学上の貢献の予測

被験者にとって予測外の「遺伝病」の原因遺伝子に異常があることが判明した場合、被験者が誰かに知られて診療、結婚、就職、保険契約などで不当な差別を受けはしないかと心配する可能性があるため、医療情報の守秘義務に基づくことを記載する。また、被験者が家族構成員にどう対応すべきかと不安感を抱くこともあるので、カウンセリングの体制を整え、知る権利と知りたくない権利を守る。

医学上の貢献予測としては、遺伝子診断の実施により、（１）保因者頻度を明らかにできるとともに（２）発症前に患者を診断することが可能になり、（３）発症機構解明の手掛かりを得ることができ、結果として病気の予防や治療法の開発につながる。また、薬物代謝遺伝子群多型検査により、薬物投与などによって生じる高アンモニア血症の遺伝子型が特定できる可能性があると同時に、個別的な治療ができる。さらには、高アンモニア血症を引き起こす病気を原因別に分類でき、原因不明あるいは特定できないが遺伝性要因の高い症例群が絞り込める可能性がある。新たな疾患の原因遺伝子の同定は医学研究の発展につながる。

IV その他

本研究を理解して頂くための「説明文書」を主治医ならびに被験者全員に配布し、主治医にはさらに「遺伝子診断・検査についてのお願い」の依頼文書を、また特に被験者に対しては「同意書」を用意する。説明文書および同意書の形式は、できるかぎり「一体化または三枚複写」で作成する。

一方、諸外国において本研究を実施する場合は、当該国の倫理問題に関する制度に則した方法に従うと共に、「説明文書」ならびに「同意書」を当該国の通用語に翻訳したものを準備する。

〔実施計画書〕：倫理委員会提出用（補足資料）

1 課題名 精神神経症状を伴う高アンモニア血症を呈する症候群における
遺伝要因の同定と遺伝子診断および予防と治療の研究

2 研究等の概要

〔背景〕

申請者らは、これまでに国内外の医療施設で見出された400症例を超える精神神経症状を伴う高アンモニア血症の患者を、酵素学的ならびに分子遺伝学的に解析してきた。尿素サイクル酵素遺伝子（5つのうちのどれか）異常症の診断は比較的容易であるが、成人発症 II 型シトルリン血症のように、病気の原因遺伝子が明らかでなかったり、また類似の症状を認めるが、真の原因が特定できない場合もあり、すべてを診断することは困難であった。

成人発症 II 型シトルリン血症は、20～50歳代で突然、意識障害や行動異常を主症状として発症し、高アンモニア血症を伴うことが多い。II 型症例では、肝臓特異的に ASS (argininosuccinate synthetase、尿素サイクル酵素の1つ) 蛋白が低下するが、ASS 遺伝子に異常を認めず、長年その原因遺伝子は不明であった。申請者らは最近、遺伝子多型を利用した homozygosity mapping により、II 型の責任遺伝子を同定した (Kobayashi et al. Nature Genetics 22: 159-163, 1999)。その手法には、一般集団のいわゆる健常者 DNA サンプルを用いた多型解析結果の蓄積が不可欠であった。この責任遺伝子の発見により、成人発症 II 型シトルリン血症が常染色体劣性の遺伝形式に基づく遺伝性疾患であることが確認でき、直接的な遺伝子診断が可能となった。この結果から、発症頻度は従来の推定（10万人に1人）より高い（約1万人に1人）可能性があり、保因者は50～60人に1人と予想される。

〔目的〕

高アンモニア血症を伴い精神神経症状を呈する疾患は、主として尿素サイクル酵素とそれに関連した遺伝子の異常に基づくが、その他にもさまざまな原因によって生じる。肝性脳症あるいは薬物投与などでも類似の症状を示す症例もあり、その発症機構や病因との関連性は明らかでなく、遺伝因子との関わりを調べる研究が必要である。本研究は、従来の生化学的、酵素学的検査に加え、遺伝子診断と多型解析を導入し、それら症候群を分類し、原因不明の病気ではその原因を明らかにし、治療に直結する効率よい適確な診断法を確立することを目指す。さらに、各疾患の発症頻度を検討し、発症予防に貢献することを目的とする。

3 実施計画

- (1) 対象は、鹿児島大学医学部付属病院を含む国内外の医療機関において、従来の検査によって診断された高アンモニア血症とそれに関連する精神神経症状をもつ患者とその家族とする。主治医には、「遺伝子診断・検査についてのお願い」の依頼書とともに「説明文書」を送付し、患者および家族への説明をして頂く。また一方、一般集団の被験者にも「説明文書」を渡し、理解と協力を得る。
- (2) 患者とその家族、ならびに健常者、すべての被験者に研究の目的を十分に説明し、被験者の自由意志で承諾を得るよう努め、「同意書」を作成する。
- (3) 被験者から 5-10 ml の採血を行ない、DNA を分離する。
- (4) 遺伝子診断と多型解析は、主に PCR 法で行なう。

遺伝子診断と検査項目：

ASS (argininosuccinate synthetase) 遺伝子 (古典型シトルリン血症)

SLC25A13 (citrin) 遺伝子 (成人発症 II 型シトルリン血症)

その他尿素サイクル酵素および関連遺伝子

薬物代謝遺伝子群遺伝子多型

アルデヒド脱水素酵素 (ALDH)

チトクローム P450 (CYP)

グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST)

N-アセチルトランスフェラーゼ (NAT) など

染色体全般に渡る多型遺伝子マーカー

4 実施に際しての倫理的配慮について

(1) 研究等の対象とする個人の人権擁護

研究結果や成果を学会や論文で発表する際は、個人が特定できない配慮を行ない、被験者のプライバシーを守る。また、守秘および盲検性を厳守するため、DNA 保管者は、検査実施者には番号で通知し、被験者のいかなる個人情報も漏出しないように細心の注意を払う。

(2) 同意を得る方法

すべての被験者には、別紙の「説明文書」と「同意書」を渡し、十分に説明した上で、その自由意志による同意を得る。「患者」、「その家族」、および「健常者」用の同意書は別々に準備する。

(3) 不利益ならびに危険性に対する配慮

診断に従事する者は医療情報の守秘義務を守り、また医師または臨床検査技師など法的に許された者が採血に携わり、被験者に不利益 (診療や保険契約などにおいて) や危険性が生じないように、十分に配慮する。