

20010657

厚生科学研究費補助金  
脳科学研究事業

遺伝性精神遅滞症脆弱X症候群の分子機構解析とその治療への応用

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 塩見 春彦

平成14(2002)年 4月

## 目次

I. 総括研究報告	
遺伝性精神遅滞症脆弱X症候群の分子機構解析と その治療への応用	----- 1
塩見春彦	
II. 分担研究報告	
1. シナプスにおける翻訳調節機構の解析	----- 5
武井延之	
2. 脆弱X症候群の遺伝子診断とゲノム多型解析 に基づくCGGリピート伸長機構の解析	----- 9
難波栄二	
(資料) 倫理審査申請書及び審査結果通知書	
3. 知的障害児の医学的診断と脆弱X症候群の 神経生理学的解析	----- 32
加我牧子	
(資料) 脆弱X症候群に関するアンケート調査用紙	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 44
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 48

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

総括研究報告書

遺伝性精神遅滞症脆弱X症候群の分子機構解析とその治療への応用

主任研究者 塩見春彦 徳島大学ゲノム機能研究センター教授

要旨

脆弱X症候群はダウン症候群とならび遺伝性精神遅滞の代表的な疾患である。本疾患の原因遺伝子は1991年に同定され、現在遺伝子検査の方法も確立されている。しかし、本疾患の分子機構は未だに完全には明らかにされておらず、治療法がないのが現状である。特に日本では、その患者の実態の把握が不十分であるために、正確な頻度さえ不明と言わざるを得ない。トリプレットリピート病の代表例の一つである脆弱X症候群患者は頻繁に自閉症様症状を呈するため、これら二つの病気に至る分子病理学的経路に共通部分があると考えられる。脆弱X症候群と自閉症はいずれも小児精神神経疾患の中で極めて重要な位置を占めるものであり、少子化社会を迎える我が国の医療問題の大きな比重をしめることが予想され、有効な医薬の開発を必要とする疾患である。我々は、「(CGG) $n$  リピートの伸長の分子機構」と「FMR1の機能」の理解を通して治療戦略開発を目指す。

分担研究者

武井 延之 新潟大学脳研究所分子神経生物学部門・助教授

難波 栄二 鳥取大学遺伝子実験施設・助教授

加我 牧子 国立精神神経センター精神保健研究所・部長

A. 研究目的

脆弱X症候群 (fragile X syndrome) は遺伝性精神遅滞の代表的な疾患であり、その頻度は新生児の約4000人に一人といわれている。また、患者の40%以上が自閉症類似の症状を示すことから、自閉症のメカニズムを研究する上でも極めて重要な疾患である。脆弱X症候群と自閉症はいずれも小児精神神経疾患の中で極めて重要な位置を占めるものであり、少子化社会を迎える我が国の医療問題の大きな比重をしめることが予想され、有効な医薬の開発を必要とする疾患である。したがって、この疾患の原因究明と治療法の開発は社会的要請が極めて大きい。本疾患は病理学的には、神経シナプス形成の場である樹状突起上スパイン

(dendritic spines) の形態異常を示す。また、大部分の脆弱X症候群患者では、X染色体上に存在する遺伝子 FMR1 の5'非翻訳部位にある(CGG) $n$ リピートが伸長し、その結果 FMR1 遺伝子の転写が抑制され FMR1 蛋白質の発現が殆ど全く見られない。また、残りの少数の患者は(CGG) $n$ リピートの伸長は見られないが、FMR1 遺伝子内に欠損またはアミノ酸の変化を伴う点変異が見ついている。つまり、この病気は FMR1 の機能欠損によるものであると考えられている。「脆弱X症候群の発症機序の解明」、特に「(CGG) $n$  リピートの伸長の分子機構」と「FMR1の機能」の理解、を出発点として、得られた知見を治療法の開発につなげるにより社会還元を目指す。

## B. 研究方法

FMR1 蛋白質は RNA 結合性蛋白質であり、mRNA と複合体を形成し、この複合体が蛋白質合成の場であるリボゾームと相互作用する。このことから FMR1 の役割は、脳に関連する様々な遺伝子 (FMR1 標的遺伝子) の翻訳段階での調節であると考えられている。現在、この FMR1 標的遺伝子を同定及び FMR1 が関与する翻訳調節機構の解明が、治療を考える上でも最も重要な課題となっている。また (CGG) $n$  リピートの伸長の解明も根本的な原因を明らかにする上で極めて重要である。このような背景から、本研究では、第一の方法は、生化学的手法を用いて FMR1 が形成する複合体の構成成分を同定し、それらの FMR1 蛋白質による翻訳調節機構への関与を解析し、神経シナプス形成における FMR1 蛋白質の役割を明らかにする。第二は、罹患同胞対や多数の患者家系を対象として、単一ヌクレオチド多型 (SNPs) 等の多型情報を解析して (CGG) $n$  リピート伸長機構の理解に迫る。第三は、FMR1 の発現異常の影響を個体レベルで容易に解析できる遺伝子改変動物モデルを作製し、その表現型を個体レベルで解析することにより FMR1 の関与する遺伝学的経路を同定する。第 4 は、脆弱 X 症候群という疾患を理解するための社会的基盤整備。本研究では、これらをあわせ、脆弱 X 症候群発症の分子機序の理解に迫り、研究期間において治療戦略に関する研究基盤の確立を目指す。

(倫理面への配慮)

本研究におけるヒトゲノム・遺伝子解析研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) を遵守して行う。本研究は、既に鳥取大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会において審議され、承認された (平成 14 年 2 月 26 日)。また、同様の手続きを徳島大学

でも進めている。さらに、本研究に関する遺伝相談は、日本人類遺伝学会「臨床遺伝学認定医・指導医」である研究分担者難波栄二が対応可能である。

## C. 研究結果

主任研究者は、病態モデル動物としてショウジョウバエの FMR1 相同遺伝子 (DFMR1) の変異体 (欠損および組織特異的過剰発現) を作製し、これら変異体が概日リズムの異常を示すことを発見した (論文投稿中)。これら変異体は明暗サイクルでは正常であったが、暗所に放置されると locomotor rhythm が無周期または長周期を示した。一方、羽化 (eclosion) に関しては常暗所条件下においても正常であったため、DFMR1 は locomotor rhythm を仲介する新規 output 遺伝子であることが判明した。また、生化学的手法を駆使して DFMR1 タンパク質が形成する複合体の解析を行い、現在までに 4 種類のタンパク質を同定した。この内 2 種類が RNAi (RNA interference) 因子であることが判明し、DFMR1-Circadian rhythm-RNAi という一見全く関連を考慮することができないものの生化学的経路がどこかで交差している可能性を得た (論文投稿中)。分担研究者武井は、FMR1 蛋白質による翻訳調節機構への関与を解析するために、初代培養神経細胞を用いて翻訳調節機構の解析を行い、中枢神経細胞において翻訳因子が存在し、細胞外からの刺激、脳由来神経栄養因子 (BDNF) によってその活性が調節されて、蛋白合成がコントロールされていることを示した。また、難波は (CGG) $n$  リピートの伸長の解明のため、PCR を用いた簡易かつ迅速な脆弱 X 症候群診断システムを確立し、すでに 900 例以上の精神遅滞患者を検討し、10 名以上の患者を診断した。同時に、(CGG) $n$  リピート伸長機構を理解するためリピート近傍の SNP 多型解析に着手した。加我は、患者に対して、各種誘発電位やミスマッチネガティブティ検査な

どの方法で、臨床生理学的検討を行い、その特徴を明らかにするとともに、アンケート配布による日本における脆弱X症候群の実態調査を行った。

#### D. 考察

脆弱 X 患者の多くが睡眠障害を示すことが知られている。ヒトとショウジョウバエとの間では、学習、記憶、概日リズムといった複雑な行動を支配する遺伝子の機能が驚く程よく保存されていることが判ってきている。ショウジョウバエ FMR1 相同遺伝子 (DFMR1) の変異体が概日リズムの異常を示すという発見は、これら変異体が病態モデル動物として有用であり、これら変異体の詳細な解析から得られる知見は、FMR1 機能の理解を深めるだけでなく、治療法開発治療法開発の基盤となることが期待できる。一方、生化学的解析によりえられた知見は、FMR1 による神経シナプスにおける翻訳調節機能を理解するためのアッセイ系を立ちあげていく準備として大きな前進である。また、この研究に関するヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査申請が承認され、脆弱X症候群の実態調査のアンケートを開始したことは、患者及びその家族の協力を得て脆弱X症候群の発症機序解明のための倫理的、さらには社会的基盤の整備が大きく前進したことを意味する。

#### E. 結論

FMR1 が位置する遺伝学的経路を同定するための病態モデル動物を得ることができた。FMR1 が位置する生化学的経路の解析を進めていくための道具を得、さらにアッセイ系を立ち上げた。また患者及びその家族の協力を得て脆弱X症候群の発症機序解明のための倫理的、さらには社会的基盤の整備が大きく前進した。以上のように既にそれぞれの分野において大きな成果が出ており、主任研究者がインターフェイスとなり、これらを統合・発展させていくことで、日本がこの

分野において世界的な競争力を維持するための先導的拠点となることができる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表 (主任研究者分のみ)

##### (1) 論文発表

1. The double-stranded RNA binding protein RDE-4 interacts in vivo with RDE-1, DCR-1 and a conserved DExH-box helicase to direct RNA interference in *C. elegans*.

Hiroaki Tabara, Erbay Yigit, Haruhiko Siomi, and Craig C. Mello. *Cell* 2002. 印刷中.

2. Cell culture and whole animal approaches to understanding the function of the FMR1 protein in *Drosophila*. Haruhiko Siomi. *Genetic Counselling* 13, 2002. 印刷中.

3. The molecular mechanisms of mRNA export. Tetsuya Taura, Mikoko C. Siomi and Haruhiko Siomi. In *Nuclear Import and Export*. V. Citovsky and T. Tzfira, eds. (New York: Landes Bioscience) 2002 印刷中

4. 高田信二郎、塩見春彦 (2001) 遺伝性精神遅滞症脆弱X症候群の分子病態機構の理解に向けて. 神経進歩 特集第36回脳のシンポジウム 45、934-940.

5. 塩見春彦 (2002) 遺伝性精神遅滞症脆弱X症候群に至る分子経路の解析.

「ブレインサイエンスレビュー 2002」伊藤正男、川合述史編集、医学書院 印刷中

##### (2) 学会発表

1. 塩見春彦、井上俊介、岡村勝友、石塚明、塩見美喜子. ショウジョウバエの培養細胞と個体を用いた脆弱X遺伝子 FMR1 の機能解析. 第54回日本細胞生物学会 2001年 岐阜

2. 井上俊介、塩見美喜子、中村輝、小林悟、霜田政美、石田直理雄、塩見春彦. ショウジョウバエ FMR1 欠失変異体の解析. 第3回 RNA 学会 2001年 神戸

3. 塩見美喜子、東島今日子、石塚明、塩見春彦. 脆弱X遺伝子 FMR1 ショウジョウバエホモログ (dFMR1) 遺伝子産物の機能解析. 第3回 RNA 学会 2001年 神戸

4. 田原浩昭、塩見春彦. 線虫 rde-4 遺伝子は RNAi に必要な 2 本鎖 RNA 結合蛋白質をコードする. 第3回 RNA 学会 2001年 神戸

5. 塩見春彦. 脆弱X症候群: RNA 結合タンパク質の発現異常に伴う遺伝病の分子病態機能解析. 第24回日本神経科学 第44回日本神経化学合同大会 2001年 京都

6. Siomi H, Inoue SB, Okamura K, Siomi M. Cell culture and whole animal approaches to understanding the function of the FMR1 protein in Drosophila. 10<sup>th</sup> International Workshop on Fragile X and X-linked mental retardation. 2001 Frascati, Italy

7. 田原浩昭、塩見春彦. RNAi に必要な RDE タンパク質の生化学的解析. 第24回日本分子生物学会 2001年 横浜

8. 岡村勝友、塩見美喜子、塩見春彦. ショウジョウバエを用いた脆弱X遺伝子 FMR1 の機能解析. 第24回日本分子生物学会 2001年 横浜

9. 岡村実和子、塩見美喜子、塩見春彦. 脆弱X遺伝子産物 FMR1 蛋

白質に結合する mRNA の探索. 第24回日本分子生物学会 2001年 横浜

10. 東島今日子、塩見美喜子、塩見春彦. ショウジョウバエ脆弱X相同遺伝子産物 DFMR1 の生化学的解析. 第24回日本分子生物学会 2001年 横浜

11. 石塚明、塩見美喜子、塩見春彦. ショウジョウバエ培養細胞を用いた DFMR1 蛋白質の機能解析. 第24回日本分子生物学会 2001年 横浜

12. 井上俊介、霜田政美、塩見美喜子、中村輝、小林悟、石田直理雄、塩見春彦. ショウジョウバエ FMR1 欠失変異体の解析. 第24回日本分子生物学会 2001年 横浜

13. 霜田政美、井上俊介、塩見美喜子、中村輝、小林悟、塩見春彦、石田直理雄. ショウジョウバエ FMR1 欠失変異体の概日行動リズム. 第24回日本分子生物学会 2001年 横浜

14. 塩見春彦. ショウジョウバエの脆弱X相同遺伝子 dfmr1 は新規時計遺伝子である. 京都大学ウイルス研究所コロキウム 2002年 京都

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(1) 特許取得

なし

(2) 実用新案登録

なし

(3) の他

特になし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
遺伝性精神遅滞症脆弱 X 症候群の分子機構解析とその治療への応用  
主任研究者 塩見春彦 徳島大学ゲノム機能研究センター教授  
分担研究報告書

要旨

脆弱 X 症候群はダウン症候群とならび遺伝性精神遅滞の代表的な疾患である。本疾患の原因遺伝子は 1991 年に同定され、現在遺伝子検査の方法も確立されている。しかし、本疾患の分子機構は未だに完全には明らかにされておらず、治療法がないのが現状である。本疾患は病理学的には、神経シナプス形成の場である樹状突起上スパイン（dendritic spines）の形態異常を示す。また、大部分の脆弱 X 症候群患者では、FMR1 遺伝子産物の発現が抑制されている。つまり、この病気は FMR1 の機能欠損によるものである。FMR1 蛋白質が RNA 結合性蛋白質であり、mRNA と複合体を形成し、蛋白質合成の場であるリボソームと相互作用することから、FMR1 の機能は脳神経系の発達に重要な遺伝子（FMR1 標的遺伝子）の発現を翻訳段階で調節することであると考えられている。生化学的手法を用いて FMR1 蛋白質による翻訳調節機構への関与を解析し、神経シナプス形成における FMR1 蛋白質の役割を明らかにする

分担研究者

武井延之 新潟大学脳研究所分子神経生物学部門・助教授

A. 研究目的

研究の最終的な目的は脆弱 X 症候群の分子機構解析と治療法の確立にある。脆弱 X 症候群の責任遺伝子産物 FMR1 は RNA 結合蛋白質であり、ある種の mRNA の翻訳を調節していることが本研究主任研究者塩見らによって明らかにされている。さらに FMR1 は神経細胞のシナプス部に存在し、そこでの mRNA の局在と翻訳調節に関与している可能性が示唆されてきている。一方、神経機能（あるいは脳高次機能）の調節には、シナプス部に局在する mRNA を用いた新規の蛋白質合成が重要な役割を担っていると考えられるようになってきた。そこで本分担研究者は FMR1 の神経細胞、とくにシナプス部における役割について翻訳調節の観点から検討し、FMR1 の脳機能への関与を明らかにすること、さらには FMR1

の機能代替の方策を見出し治療への応用をおこなうことを目的としている。このための 1 年目の目標としては、  
# 神経細胞における翻訳調節因子の局在を知る。  
# 神経細胞における刺激応答性（とくに神経栄養因子による）翻訳調節のダイナミクスを明らかにする。

B. 研究方法

# 神経細胞における翻訳調節因子の局在  
モデル動物としてラットの脳、とくに学習記憶に関連の深い海馬、大脳皮質における翻訳因子の局在をしらべる。まず翻訳因子蛋白質の同定と定量的のためにウエスタンブロット法で解析したのち、抗体を用いた免疫組織化学法により脳内分布と細胞による違い、すなわち神経細胞とグリア細胞における蛋

白レベルの違いをしらべす。つぎにラット胎児脳（海馬、大脳皮質）より調整した初代培養細胞を用いてさらに詳細な細胞内分布を免疫細胞化学的に検討する。

# 神経細胞における刺激応答性（とくに神経栄養因子による）翻訳調節のダイナミクス

ラット胎児大脳皮質より神経細胞を初代培養し、神経栄養因子による蛋白合成の増強作用をアイソトープラベルしたアミノ酸の取込みにより測定する。増強作用の認められた栄養因子について、翻訳調節因子、eukaryote initiation factor 4E (eIF4E), 4E-binding protein (4EBP)のリン酸化の変化を<sup>32</sup>Pを取込ませた神経細胞を免疫沈降し、電気泳動、オートラジオグラフィを行うことによって調べる。また eIF2 および eIF2B の活性を生化学的に定量し、蛋白合成増強の細胞内シグナリング機構を明らかにする。

### C. 研究結果

# 神経細胞における翻訳調節因子の局在

ラット海馬において翻訳の各ステップ (initiation, elongation, release) に関与する翻訳因子の蛋白発現が ウェスタンブロット法により認められた。それぞれの因子 (eIF2a, eIF2B, eIF4E, eIF4G, eEF1a, eEF2 eRF3) に関して免疫組織化学染色をおこなったところ海馬にしておては神経細胞に強く発現しており、グリア細胞では弱いことがわかった。また海馬内の部位によって発現のレベルが異なっていることがわかった。また培養細胞を用いた免疫細胞化学染色から、これらの因子は細胞体のみならず、樹状突起に分布していることが明らかとなった。

# 神経栄養因子による翻訳調節のダイナミクス

初代培養神経細胞に各種神経栄養因

子を添加すると、脳由来神経栄養因子 (BDNF) は 15 分以内に新規蛋白合成を 1.5-2 倍増強することが明らかとなった。インシュリンはこれより弱い作用が認められたが、他の栄養因子には作用はなかった。また BDNF、インシュリン共に翻訳開始因子である eIF2e と IF2B の活性を数分以内に 1.5 倍ほど増強した。さらに BDNF は eIF4E のリン酸化、4EBP のリン酸化を引き起こし、翻訳開始過程を活性化することにより、蛋白合成を増強することが示唆された。この過程の細胞内シグナリングには PI3K/Akt, Ras/MAPk および mTOR の経路の活性化が必要であることも判明した。

### D. 考察

以上の結果は中枢神経細胞において翻訳因子が存在し、細胞外からの刺激、BDNF によってその活性が調節されて、蛋白合成がコントロールされていることを示している。BDNF は神経活動に依存して放出され (論文リスト 2,3)、神経伝達を調節していること (4,5 及び *J. Neurochem.* 68, 370-375, 1997, *J. Biol. Chem.* 273: 27620-27624, 1998 など) が分担研究者らの研究からも示されており、神経活動によって翻訳調節がなされ、新たに合成された蛋白がさらに神経機能を調節している可能性を示唆している。FMRP はこのような翻訳調節のどこかの過程に関与していると考えられ、現在 FMRP ノックアウトマウスを用いて、蛋白合成レートや各種翻訳因子の活性化状態などを調べる準備を行っている。

### E. 結論

- (1) 翻訳因子群が脳内に存在し、しかもその分布は均一ではない。
- (2) 神経細胞内ではシナプスの存在する樹状突起部にも翻訳因子が存在する。以上の 2 点については学会発表を行い現在論文を



投稿中である。

- (3) 神経栄養因子 BDNF により神経細胞の蛋白合成は短時間中に調節されている。
- (4) BDNF により神経細胞で翻訳因子のリン酸化が起こり活性化される。
- (5) 翻訳因子活性化の細胞内シグナリングとしては PI3K/Akt, Ras/MAPK, mTOR の系が重要である。

以上の 3 点については学会発表を行い、論文にて発表した。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Takei, N., Kawamura, M., Hara, K., Yonezawa, K. and Nawa, H. (2001) Brain-derived neurotrophic factor enhances neuronal translation by activating initiation pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 42818-42825.
- (2) Nawa, H. and Takei, N. (2001) BDNF as an anterophin; A novel neurotrophic relationship between brain neurons. *Trends Neurosci.* 24, 683-684.
- (3) Kojima, M., Takei, N., Numakawa, T., Ishikawa, Y., Suzuki, S., Matsumoto, T., Kato-Semba, R., Nawa, H. and Hatanaka, H. (2001) Biological characterization and optical imaging of BDNF-GFP suggest an activity-dependent local release of BDNF in neurites of cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.* 64, 1-10

(4) Numakawa, T., Matsumoto, T., Adachi, N., Yokomaku, D., Kojima, M., Takei, N. and Hatanaka, H. (2001) Brain-derived neurotrophic factor triggers a rapid glutamate release through increase of intracellular Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> in cultured cerebellar neurons. *J. Neurosci. Res.* 66, 96-108

(5) Matsumoto, T., Numakawa, T., Adachi, N., Yokomaku, D., Yamagishi, S., Takei, N. and Hatanaka, H. (2001) Brain-derived neurotrophic factor enhances depolarization-evoked glutamate release from cultured cortical neurons. *J. Neurochem.* 79, 522-530

(6) Iwakura, Y., Nagano, T., Kawamura, M., Horikawa, PH., Ibaraki, K., Takei, N. and Nawa, H. (2001) NMDA-induced AMPA receptor down-regulation requires interaction of carboxyl terminal of GluR2/3 with pick1; Ligand-binding studies using sindbis vectors carrying AMPA receptor decoys. *J. Biol. Chem.* 276, 40025-40032

(7) Yuhara, A., Nishio, C., Abiru, Y., Hatanaka, H. and Takei, N. (2001) PACAP shows a neurotrophic effects on cultured basal forebrain cholinergic neurons from adult rats. *Dev. Brain Res.* 131, 41-45

### 2. 学会発表

シンポジウム等

- (1) 武井延之、稲村直子、那波宏之 (2001) 神経栄養因子による局所的翻訳調節の分子機構「ニューロンにおける mRNA の局在と局所的

翻訳機構」(Organizer) 第 44  
回神経化学会／第 24 回神経科学  
会合同大会 (京都)

(2)那波宏之、Jourdi Hussam, 難波  
寿明、永野忠聖、武井延之、斎  
藤真子 (2001) サイトカインによ  
る拮抗的シナプス発達と脳機能の  
調節 「脳神経の機能発達調節と  
神経栄養因子・サイトカイン 第  
44 回神経化学会／第 24 回神経  
科学会合同大会 (京都)

(3)武井延之、稲村直子、那波宏之  
(2001) BDNF による神経突起に  
おける翻訳調節 「神経活動依存  
的な神経回路形成とその分子機  
構」(世話人) 第 21 回分子生物  
学会

(4)武井延之、稲村直子、那波宏之  
(2002) BDNF によるニューロン  
の局所的翻訳活性化機構「神経栄  
養因子研究の新しい展開」第 75  
回薬理学会 (熊本)

口演／ポスター

(5)稲村直子、那波宏之、武井延之  
(2001) 海馬ニューロンにおける  
翻訳調節因子の発現変動と細胞内  
局在 第 44 回神経化学会／第 24  
回神経科学会合同大会

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
特になし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
遺伝性精神遅滞症脆弱X症候群の分子機構解析とその治療への応用  
主任研究者 塩見春彦 徳島大学ゲノム機能研究センター教授  
分担研究報告書

要旨

トリプレットリピート病の代表例の一つである脆弱X症候群はダウン症候群とならび遺伝性精神遅滞の代表的な疾患である。本疾患の原因遺伝子は1991年に同定され、現在遺伝子検査の方法も確立されている。しかし、日本では、その患者の実態の把握が不十分であるために、正確な頻度さえ不明と言わざるを得ない。大部分の脆弱X症候群患者では、X染色体上に存在する遺伝子FMR1の5'非翻訳部位にある(CG G)nリピートが伸長し、その結果FMR1遺伝子産物の発現が抑制されている。つまり、この病気はFMR1の機能欠損によるものである。(CG G)nリピートの伸長機構の解明は本疾患の根本的な原因を明らかにする上で極めて重要である。脆弱X症候群の遺伝子診断を行い、さらに罹患同胞対や多数の患者家系を対象として、単一ヌクレオチド多型(SNP)等の多型情報を解析して「(CG G)nリピートの伸長の分子機構」の理解に迫る。

分担研究者

難波 栄二 鳥取大学遺伝子実験施設・助教授

A. 研究目的

遺伝性精神遅滞の代表的な脆弱X症候群の遺伝メカニズムを解明し、その治療法を開発するためには、患者家系を対象にした研究が重要になる。

本研究は、1) 精神遅滞の遺伝子診断を進めることにより日本人の脆弱X症候群患者やその家族の原因解明に貢献すること、2) それらの患者や家族に協力を得てCG Gリピート機構を解析すること、3) 正常日本人の解析を行うことにより脆弱X症候群の正確な頻度を求めること、4) さらに、自閉症や他の精神遅滞など脆弱X症候群に密接に関連する疾患の原因解明や治療法にも寄与すること、などを目的として研究を進める。

初年度は、主に遺伝子診断システムを再構築し、今までに診断した患者数の把握を行った。また近年社会的に非常に重要となっている、遺伝子解析研究の倫理への対応を行った。

さらに、脆弱X症候群とも密接に関連している自閉症のメカニズムを解明するために、セロトニントランスポーター遺伝子多型の解析を行った。また、近年自閉症ではゲノムインプリンティング機構との関連が示唆されている。そこで、自閉症に関連すると推測されるセロトニン関連遺伝子のインプリンティング機構も研究した。

B. 研究方法

1) 脆弱X症候群の遺伝子診断

CG G繰り返し配列の解析はすでに確立している特殊なPCR法を用いた(Brain Dev 1995)。鳥取大学遺伝子実験施設、脳神経小児科および北九州市立総合療育センターに遺伝子解析依頼のあった精神遅滞患者を対象にした。2001年までに1,000例を越える患者を解析した。

2) 自閉症でのセロトニントランスポー

## ター遺伝子調節領域多型の検討

セロトニン調節領域の 44bp 多型は PCR 法で検討した。正常 402 名、自閉症 101 名（東日本 55 名、西日本 46 名）を解析した。

### 3) セロトニン関連遺伝子のインプリンティング機構

インプリンティングの解析には、ヒト染色体を 1 本のみ保持するマウス A9 細胞ライブラリー（鳥取大学細胞工学教室、押村教授より）を用いた。5-hydroxytryptamine receptor 1D (*HTR1D*)（染色体の領域 1q36.3-q34.3）、*HTR1A*（染色体の領域 5q11.2-q13）、*HTR1B*（染色体の領域 6q13）、*HTR1E*（染色体の領域 6q14-q15）、*HTR5A*（染色体の領域 7q36.1）、*HTR3A*（染色体の領域 11q23.1-q23.2）、*HTR2A*（染色体の領域 13q14-21）遺伝子が存在するクローンを選択し、このクローンでの遺伝子発現を RT-PCR 法で解析した。

### 4) 倫理面への対応

自閉症に関する遺伝子解析は鳥取大学および東京大学倫理委員会ですでに承認されている。また、脆弱 X 症候群の遺伝子解析に関しては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省、厚生労働省、経済産業省）に従い、鳥取大学倫理委員会へ倫理審査を求め、承認された（別紙研究計画、説明文、同意文書、同意取消通知書 参照）。

## C. 研究結果

### 1) 脆弱 X 症候群の遺伝子診断

2001 年までに、13 家系 26 名（うち女性 13 名）の患者を診断した。これは 1995 年に報告した 0.8% より頻度が高いが、脆弱 X 症候群を特に疑う患者を選んでいることが影響していると考えられた。

### 2) 自閉症でのセロトニントランスポーター遺伝子調節領域多型の検討

正常では、通常の s アレル、それより

44bp 長い 1 アレル、さらにそれより長い稀な g アレルが存在した。患者でのゲノタイプは、g/s が 3 名、l/l が 13 名、l/s が 134 名、s/s が 255 名であった。こらに対して自閉症では、g/s が 1 名、l/l が 2 名、l/s が 36 名、s/s が 62 名であった。これらは統計学的 ( $\chi^2$  検定) に差がなく、西日本と東日本の地域でも差はなかった。

### 3) セロトニン関連遺伝子のインプリンティング機構

RT-PCR 法にて目的の遺伝子発現を検討した。今回の検討では、すべての遺伝子は父方由来、母方由来の両クローンで発現を認め、インプリンティングを示唆する結果は得られなかった。

## D. 考察

### 1) 脆弱 X 症候群の遺伝子診断

脆弱 X 症候群は X 染色体遺伝ではあるが、その遺伝様式が独特であり、一見個発例の精神遅滞と考えるられる例も多い。また、精神遅滞以外の症状も目立たないことが多く、患者を正確に把握するには、より多くの精神遅滞患者の診断をする必要があると考えられる。

また、より正確な遺伝子異常の頻度を研究するためには、正常女性の premutation の頻度が重要になる。

### 2) 自閉症でのセロトニントランスポーター遺伝子調節領域多型の検討

セロトニントランスポーター遺伝子と自閉症との関連は、世界的に相反する様々な報告がなされている。今まで日本人の報告はなかった。今回の検討では、日本人自閉症患者では、セロトニントランスポーター遺伝子との関連が少ないと考えられた。

### 3) セロトニン関連遺伝子のインプリンティング機構

近年、脳のみでインプリンティングを示す遺伝子が発見されてきており、この遺伝子が自閉症など精神疾患に関連する可能性がある。事実 *HTR2A* 遺伝子では脳でのインプリンティングを示唆する報

告もある。今回用いた解析方法では、脳に特異的なインプリンティングを検討することができない。今後、この脳で特異的なインプリンティングを検討する新しいシステムの構築も重要な課題になる。

#### E. 結論

- 1) 脆弱X症候群の遺伝子診断を精神遅滞患者により広く行う必要がある。
- 2) 脆弱X症候群の正確な頻度を検討するためには、正常女性の premutation 頻度を検討する必要がある。
- 3) 日本人自閉症とセロトニントランスポーター遺伝子は関連しない。
- 4) 自閉症に関連する遺伝子を研究するには、脳に特異的なインプリンティング遺伝子を単離するシステムの構築が重要である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### a. 論文発表

1. Maegawa S, Yoshioka H, Itaba N, Kubota N, Nishihara S, Shirayoshi Y, Nanba E, Oshimura M. Epigenetic silencing of PEG3 gene expression in human glioma cell lines. *Mol Carcinog* 31: 1-9, 2001.
2. Tsukamoto H, Yamamoto T, Nishigaki T, Sakai N, Nanba E, Ninomiya H, Ohno K, Inui K, Okada S. SSCP analysis by RT-PCR for the prenatal diagnosis of Niemann-Pick disease type C. *Prenat Diag* 21(1): 52-54, 2001.
3. Yamamoto T, Pipo JR, Feng J-h, Takeda H, Nanba E, Ninomiya H, Ohno K. Novel TSC1 and TSC2 mutations in Japanese patients with tuberous sclerosis complex. *Brain Dev* (in press)
4. Yamamoto T, Akaboshi S, Ninomiya H, Nanba E. DEFECT 11 syndrome associated with agenesis of corpus callosum. *J Med Genet* 38:e5, 2001.
5. Kono Y, Okada S, Tazawa Y, Kanzaki S, Mura T, Ueta E, Nanba E, Otsuka Y. Effect of lactational exposure to 1,2,3,4-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on cytochrome P-450 1A1 mRNA in the neonatal rat liver: Quantitative analysis by the competitive RT-PCR method. *Pediatr Int* 43: 458-464, 2001.
6. Ueta E, Suzuki E, Nanba E, Tadokoro Y, Otsuka Y, Kurata T. Regulation of cigarette smoke-induced cytochrome P450A1 gene expression in osteogenic disorder Shionogi rat liver and in lung by large ascorbic acid dose. *Biosci Biotechnol Biochem* 65: 2548-2551, 2001.
7. Tsuboi M, Hisatome I, Morisaki T, Tanaka M, Tomikura Y, Takeda S, Shimoyama M, Ohtahara A, Ogino K, Igawa O, Shigemasa C, Ohgi S, Nanba E. Mitochondrial DNA deletion associated with the reduction of adenine nucleotides in human atrium and atrial fibrillation. *Eur J Clin Invest* 31: 489-496, 2001.
8. Kishimoto T, Suyama A, Igarashi A, Osaki Y, Okamoto M, Yamamoto T, Nanba E, Kurosawa Y, Fukumoto S. Angiotensinogen gene variation and hypertension in a cohort study in Japanese. *J Epidemiol* 11: 115-119, 2001.
9. Tominaga L, Ogawa Y, Taniguchi M, Ohno K, Matsuda J, Oshima

- A, Suzuki Y, Nanba E. Galactonojirimycin derivatives restore mutant human beta-galactosidase activities expressed in fibroblasts from enzyme-deficient knockout mouse. *Brain Dev* 23: 284-287, 2001.
10. Miyake N, Maeta H, Horie S, Kitamura Y, Nanba E, Kobayashi K, Terada T. Absence of mutations in the beta-catenin and adenomatous polyposis coli genes in papillary and follicular thyroid carcinomas. *Pathol Int* 51: 680-685, 2001.
  11. Nishimura K, Ohgi S, Nanba E. Expression of MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 in the wall of abdominal aortic aneurysms. *Yonago Acta medica* 44: 25-35, 2001.
  12. 難波栄二 自閉症の遺伝的背景  
精神保健研究 14 2001年3月
- b. 学会発表
1. 吉岡広陽, 前川真治, 板場則子, 白吉安昭, 難波栄二, 押村光雄. ヒトグリオーマ細胞株における PEG3 遺伝子の発現抑制. 第 60 回日本癌学会総会 (横浜) 2001 年 9 月 26-28 日.
  2. 前川真治, 板場則子, 久保田智香, 難波栄二, 吉岡広陽, 門田満隆, 目黒牧子, 押村光雄. ヒト 19 番染色体長腕領域におけるインプリント機構の解析. 日本人類遺伝学会第 46 回大会 (大宮) 2001 年 10 月 3-5 日.
  3. 前田眞恵, 前川真治, 難波栄二, Ma Yinghua, 竹下研三, 小枝達也, 汐田まどか, 下村登規夫, 加我牧子, 林隆, 谷池雅子, 橋本大彦, 丸井徹也, 加藤千枝子, 加藤進昌. セロトニントランスポーター遺伝子と日本人自閉症の関連. 日本小児遺伝学会第 24 回大会 (山口) 2001 年 11 月 14-15 日.
  4. 前川真治, 板場則子, 久保田智香, 難波栄二, 白石昌彦, 吉岡広陽, 門田満隆, 目黒牧子, 押村光雄. ヒト 19 番染色体長腕領域における新規インプリンティング遺伝子の検索. 第 24 回日本分子生物学会年会 (横浜) 2001 年 12 月 9-12 日.
- 1 2. 知的財産権の出願・登録状況
- (ア) 特許取得  
なし
  - (イ) 実用新案登録  
なし
  - (ウ) その他  
特になし

# 資料 3

受付番号 45

## 倫理審査申請書

平成 14 年 2 月 6 日 提出

鳥取大学医学部長殿

申請者 (主任研究者)

所属 鳥取大学医学部附属脳幹性疾患  
研究施設脳神経小児科部門

職名 教授

氏名 大野 耕策



所属教授 又は診療 科の長印	
----------------------	--

1. 課題名	精神遅滞の原因と頻度に関する遺伝子の研究		
2. 主任研究者	所属 鳥取大学医学部附属 脳幹性疾患研究施設 脳神経小児科部門	職名 教授	氏名 大野 耕策
3. 分担研究者	所属 鳥取大学医学部附属 脳幹性疾患研究施設 脳神経小児科部門	職名 助教授	氏名 岡 明
	鳥取大学医学部附属 脳幹性疾患研究施設 脳神経小児科部門	講師	前垣 義弘
	鳥取大学遺伝子実験施設 徳島大学ゲノム機能解析センター 分子機能解析分野 国立精神・神経センター 精神保健研究所精神薄弱部	助教授 教授 部長	難波 栄二 塩見 春彦 加我 牧子
4. 医学研究等の概要	<p>精神遅滞の原因の多くは未だ解明されていない。この原因の中には、様々な遺伝子異常が含まれていると考えられている。また、比較的研究が進んでいる脆弱X症候群のような病気でも、遺伝子診断が可能になってきたが、治療法は未だ開発されていない。この疾患では、原因の遺伝子 (FMR-1 遺伝子) が他の様々な遺伝子に影響を与え、そのために精神遅滞が引き起こされることが明らかになってきており、現在、精神遅滞を直接引き起こす遺伝子を明らかにする研究が重要になっている。これらの研究から明らかにされた遺伝子は、脆弱X症候群以外の精神遅滞の直接の原因になっている可能性もあり、精神遅滞全体の研究に発展する。そのために、この研究では、まず精神遅滞の患者さんやその家族の方々を対象に、FMR-1 遺伝子や精神遅滞に関係する可能性のある遺伝子の解析を行い、脆弱X症候群のように原因が分かった場合には、さらに詳しくメカニズムに関係した遺伝子解析を進める。さらに、精神遅滞のない人の遺伝子を解析し患者さんの遺伝子の特徴を明らかにするとともに、遺伝子異常が起きる頻度などを検討する。</p>		

## 5. 医学研究等の対象及び実施場所

本研究は、研究計画に同意してもらえらる精神遅滞の患者さんおよびその家族の人、さらに、この説明文の研究計画に同意していただける精神遅滞に関係のない成人の方を対象にする。精神遅滞患者および家族は1000例程度、また精神遅滞に関係ない成人の方も1000例程度を対象に解析する予定である。

鳥取大学附属病院、国立精神神経センターで採血を行う。解析は鳥取大学脳幹性疾患研究施設脳神経小児科、鳥取大学遺伝子実験施設、徳島大学ゲノム解析センターで行う予定である。その他、本研究の協力を得られる施設がある場合には、倫理審査委員会に届け出る。

## 6. 医学研究等における医学倫理的配慮について

### (1) 医学研究等の対象とある者の人権の擁護

試料は連結可能匿名化を行い、個人情報が決して漏れないように配慮する。研究成果の発表も必ず個人情報を守秘して、学会や学術雑誌およびデータベースに発表する。遺伝子解析の結果は、遺伝カウンセリングで扱い、対象者の人権が十分に守られるように配慮する。

### (2) 医学研究等の対象となる者に理解を求め、同意を得る方法

対象者に対しては、「説明文」(別紙)を渡し、それに従って説明を行い「同意文書」(別紙)に署名を得る。また、同意文書提出後に研究への協力の意思がなくなった場合には、いつでも「同意取消通知書」の提出により、それに従って提出者の試料や情報を処理する。

### (3) 医学研究等の対象となる者に生ずる不利益及び危険性に対する配慮

協力者からは通常の診療と同様の方法で採血を10ml行うので、通常診療以上の危険は伴わない。また、解析結果により生命保険や社会生活上に影響を与える可能性があるため、その取扱いは特に慎重にする。患者さんやその家族の方の診断に結びつく情報が得られた時には、遺伝カウンセリングにてその情報を説明する方針とする。それ以外の人には原則として解析結果は非公開とするが、本人や家族に重大な影響を与えると考えられる場合には、改めて倫理審査委員会に申請し、その取扱いを決定する。

### (4) 医学上の貢献の予測

この研究により精神遅滞の新たな遺伝子異常(特に単一遺伝子病)が明らかになり、遺伝子診断を行うことが可能になる。また、脆弱X症候群をはじめとして、精神遅滞患者全体の中でそれぞれの遺伝子異常が発症する頻度を推定できる。また、精神遅滞の遺伝的なメカニズムを明らかにすることにより新しい治療法の開発にも結びつくと考えられる。このように最終的には精神遅滞患者の診断、予防、治療、福祉行政に役立つ研究である。

### (5) その他

#### 参考文献

- |             |      |                       |              |       |
|-------------|------|-----------------------|--------------|-------|
| 脆弱X症候群      | 難波栄二 | CLINICAL NEUROSCIENCE | 13:1310-1311 | 1995年 |
| 脆弱X症候群と精神遅滞 | 難波栄二 | 発達障害研究                | 18:112-116   | 1996年 |
| 精神遅滞と脆弱X症候群 | 難波栄二 | BRAIN and NERVE       | 50:317-323   | 1998年 |
| 知的障害        | 難波栄二 | 小児内科                  | 32:1323-1326 | 2000年 |

通知年月日

平成

年

月

日

通知番号



## 研究計画

### 課題：精神遅滞の原因と頻度に関する遺伝子の研究

#### 1. 研究の意義と目的

精神遅滞の原因の多くは未だ解明されていない。この原因の中には、様々な遺伝子異常が含まれていると考えられている。また、比較的研究が進んでいる脆弱X症候群のような病気でも、遺伝子診断が可能になってきたが、治療法は未だ開発されていない。この疾患では、原因の遺伝子（FMR-1 遺伝子）が他の様々な遺伝子に影響を与え、そのために精神遅滞が引き起こされることが明らかになってきており、現在、精神遅滞を直接引き起こす遺伝子を明らかにする研究が重要になっている。これらの研究から明らかにされた遺伝子は、脆弱X症候群以外の精神遅滞の直接の原因になっている可能性もあり、精神遅滞全体の研究に発展する。

そのために、この研究では、まず精神遅滞の患者さんやその家族の方々を対象に、FMR-1 遺伝子の解析や精神遅滞に関係する可能性のある新規遺伝子の探索を行い、脆弱X症候群のように原因が分かった場合には、さらに詳しくメカニズムに関係した遺伝子解析を進める。

さらに、精神遅滞のない人の遺伝子を解析し患者さんの遺伝子の特徴を明らかにするとともに、遺伝子異常が起きる頻度などを検討する。

この研究により、患者の診断が可能になるばかりではなく、遺伝子異常の患者さんがどの程度発生するかも予想できる。その結果、疾患の予防や病態解明にも重要な意味をもつと考えられる。

#### 2. 研究協力をお願いする人と同意や撤回について

本研究は、研究計画に同意してもらえる精神遅滞の患者さんおよびその家族の人、さらに、この説明文の研究計画に同意していただける精神遅滞に関係のない成人の方を対象にする。精神遅滞患者および家族は 1000 例程度、また精神遅滞に関係ない成人の方も 1000 例程度を対象に解析する予定である。この研究への協力は強制するものではなく、研究に協力しない場合にも、不利益な対応をうけないように十分に配慮する。

インフォームド・コンセントは、十分な説明の後に、同意文書に署名をもら

って得る。研究に同意した人が同意文書提出後に協力同意を撤回する場合には、署名された同意取消通知書を得て、その同意を取り消す。同意を取り消した場合は、同意取消通知書の内容に従って、解析を中止し、保存試料を処理する。

### 3. 研究の方法・場所と協力者の危険性について

血液を 10ml 採取して試料とする。採血は通常の診療と同様の方法で行うので、通常診療以外の危険性はない。半分の試料からリンパ球を分離して、最終的に芽球化し培養が可能な状態にする。培養可能になった細胞は超低温フリーザーまたは液体窒素タンクの中で保存する。残りの試料からは DNA を分離して、遺伝子の解析に用いる。解析する遺伝子は FMR-1 遺伝子ならびに、それに関連した遺伝子を解析する（文献）。さらに進んだ解析が必要な場合には、保存している培養リンパ球から DNA や RNA などを分離して研究を進める。

遺伝子の解析は、鳥取大学医学部附属脳幹性疾患研究施設、鳥取大学遺伝子実験施設、ならびに徳島大学ゲノム解析センターで行う予定である。この施設以外の協力が必要な場合には倫理審査委員会に追加申請する。

### 4. 研究期間

平成 14 年 3 月から平成 16 年 3 月の予定。

### 5. 同意が本人から得られない場合

精神遅滞の患者さんやその家族の人の中には、16 歳以下の未成年者の方や病気のために説明が理解できないなどの理由で、本人から同意が得られない場合がある。この研究は精神遅滞患者さんやその家族の協力がなければ成り立たない。そのため、この場合には、親権者、後見人の方に同意を得て、代諾者または署名代行者からインフォームド・コンセントを得て研究を進める。親権者、後見人は提供者本人の配偶者、父母、祖父母、子、孫、同居の親族とする。

精神遅滞の患者さんやその家族以外の人では、本人の同意がない限り研究への協力をお願いしない。

### 6. 予測される研究結果および協力者に対する不利益

この研究により精神遅滞の新たな遺伝子異常（特に単一遺伝子病）が明らかになり、遺伝子診断を行うことが可能になる。また、脆弱 X 症候群をはじめと

して、精神遅滞患者全体の中でそれぞれの遺伝子異常が発症する頻度を推定できる。また、精神遅滞の遺伝的なメカニズムを明らかにすることにより新しい治療法の開発にも結びつくと考えられる。

このように最終的には精神遅滞患者の診断、予防、治療、福祉行政に役立つ研究である。

一方、原因が明らかになることにより生命保険などに影響を与える可能性もある。また、場合によっては家族や家系の方々にも同様な病気が発症するリスクが明らかになることがあり、社会生活に影響を与える可能性もある。そのため、試料や解析情報を以下に書くように慎重に扱い、できるだけ個人の不利益にならないように努める。

## 7. 研究協力者への解析結果の説明について

### A) 患者さんおよびその家族の人について

この研究では、精神遅滞の患者さんの中に単一遺伝子病が見つかる可能性がある。この患者さんの原因と考えられる遺伝子異常が発見された場合には、遺伝カウンセリングを十分に行い、家族の要望に応える。解析結果この遺伝カウンセリングの中で説明することを原則にする。もし、カウンセリングの過程で解析結果を知りたくないなどの要望がある場合には、その要望を尊重する。

その他の単一遺伝子病とは関連しない遺伝子情報は、下記の B) の取扱いと同様にする。

### B) それ以外の人について

病気とは関係しない人の遺伝子解析結果は原則として知らせない。これは、病気と関係しない人では、遺伝子の解析を行うと結果が他の人と異なった多型などが通常多くみつかるため、この多型が病気と関係しているかどうかは、すぐに判断するのが困難なためである。このように、評価の定まっていない情報は直接本人の社会生活や利益に結びつく可能性は低く、かえって混乱を招く可能性があり好ましくないと考える。しかし、研究が進む中では、精神遅滞と関係する傾向が見つかる場合も想定される。また、将来精神遅滞が発症するリスクの高い保因者が明らかになる可能性もある。このように、結果が本人やその家族に重大な影響をもつと考えられる場合には、改めて倫理審査委員会に申請

し、その解析結果の取扱いを決定する。

#### 8. 解析結果や個人情報の取扱い（匿名化の方法）

本研究では原因と考えられる遺伝子の異常が見つかった場合などには、患者さんやその家族などにその結果を伝える必要があるため、連結可能匿名化を採用する。提供者の血液は個人の情報が漏れないように、すべて標識記号をつけ、解析する場合にはすべてこの標識記号で取り扱う。そして、この標識記号から協力者が特定できる情報を管理する。この特定できる情報や個人情報（氏名、生年月日、性別、住所など）は鳥取大学医学部脳神経小児科に外部と遮断された専用のコンピューターを設置し、このコンピューターの中および書類や記憶メディアは施錠されたキャビネット内に厳重に保存する。標識記号からは患者さんの診療録も検索できるようにしておき、遺伝カウンセリングに対応する。

#### 9. 共同研究施設と他施設での試料の扱い

本研は鳥取大学脳幹性疾患研究施設脳神経小児科、鳥取大学遺伝子実験施設、徳島大学ゲノム解析センター、国立精神・神経センターの共同研究である。血液を他の機関で処理したり、共同で解析したりする場合には、各施設ではすべて標識番号のみであつかうことを原則とする。つまり患者の個人情報などは、直接患者さんが受診した機関以外には漏れないように配慮する。各研究施設では、それぞれ同じ内容の説明と同意が得られるようにする。さらに協力機関や施設が増えた場合には、倫理審査委員会へその旨届け出る。

#### 10. 試料等の保存及び使用方法

DNA や細胞の形で保存された試料は、それぞれの研究機関の冷蔵庫や冷凍庫などの保存庫の中に標識番号をつけて保管する。そして、遺伝子解析を行う時に研究室内でのみ利用する。

#### 11. 研究終了後の試料等の保存、使用

研究終了後の試料は同意がえられた場合には、将来の研究のための貴重な資源として研究終了後も保存する。将来、試料を別の研究に使いたい場合には改めて研究計画を倫理審査委員会に提出し、その承認を得たうえで利用する。