

厚生労働省科学研究費補助金(トキシコゲノミクス研究事業)

分担研究報告書

ヒト末梢血中リンパ球を用いたトキシコゲノミクス基盤研究

分担研究者 大島康雄 自治医科大学臨床薬理学 助教
// 篠原 歩 東北大学大学院システム情報学 教授
// 石野 明 東北大学大学院システム情報学 助教
// 草間幹夫 自治医科大学歯科口腔外科 教授

研究要旨

我々はこれまでに、萌芽的先端医療技術推進研究事業「トキシコゲノミクス」(平成 14-16 年度)において患者の手術検体から腎細胞を培養し、これをトキシコゲノミクス研究に用いる手法を確立した。このように、これまでの研究では手術により切除された臓器由来の培養組織を研究に用いた。しかし今後、ヒトに投与された薬物に対するヒト組織の反応性を臨床開発時に解析する場合、外科手術で組織を取り出して研究に用いることは被験者の負担が大きいため、現実には困難である。出来る限り負担の少ない方法で臨床検体を採取するという観点から、研究応用の現実性の高い検体としてヒト末梢血中有核細胞が考えられる。そこで本研究ではこれまでの研究成果を生かして、以下の項目を検討する。1)リンパ球を用いたトキシコゲノミクス研究の基盤整備・リンパ球の遺伝子発現に最も影響の少ない採血法及び RNA 抽出法の検討。2)腎障害性薬物評価をリンパ球によって行う際に用いる新しい DNA チップの作成—リンパ球に腎障害性薬物を曝露させ、有意に変化する遺伝子を見出す。新しい DNA チップを作製する場合に有用な遺伝子発現情報を得る。3)薬物性腎障害発現機序の検討—本研究で見出された薬物曝露によって有意に発現が変動する遺伝子の機能を検討することにより、細胞毒性のメカニズムを明らかにする。その結果、1)平成 18 年度までに得られた、細胞に最も影響が少ないとされる抗凝固剤を用いて薬の服用前後に採血を行い、RNA の抽出を行った。服用前の採血は採血室で行い、服用後は診察室で行ったが、服用前では解析に不向きな RNA が得られる事が多かった。最善の結果を得るためには、採血後すぐに RNA を抽出することが不可欠であると思われた。2)国内の複数の施設に腎障害性のある薬物5、およびない薬物5、試薬、およびチップを送付し、発現データを取得するとともに、当研究室においても発現データの取得を行い、データの品質の比較を行った。さらに腎障害の有無を前年度に構築した予測アルゴリズムにより予測を行った。その結果、正確な予測を行うためには、細胞の培養条件も厳密に管理する必要があることが明らかになった。3)腎障害性を予測するために用いた遺伝子リストより P2RX5 遺伝子に着目し、そのサブタイプである P2X2 のプロモーター活性を測定した。その結果、細胞特異的なエンハンサー領域の存在が明らかになった。

A. 研究目的

近年、分子生物学やバイオテクノロジーの進歩によって各種 DNA チップが開発され、これを用いて多くの組織や細胞から網羅的遺伝子発現データを得る事が可能になった。この方法は毒性学の分野にも応用され、遺伝子情報に基づいた毒性発現機序の解明や新たな

毒性評価法の確立が期待されている。最近、創薬の過程でも化合物を動物に投与した後、あるいは動物やヒト組織に曝露させた後に DNA チップを用いて遺伝子発現解析を行い、動物からヒトへのより確かな外挿法や臨床における安全性予測法の確立が試みられている。我々はこれまで萌芽的先端医療技術推進研究事業「トキシコゲノミクス」(平成 14-16 年度)によって患者の手

術検体から腎細胞を培養し、これをトキシコゲノミクス研究に用いる手法を確立した。また 20 種類以上の腎障害性薬物を腎細胞に曝露させ、DNA チップを用いて網羅的遺伝子発現実験を行った。創薬時には、より安全な化合物が前臨床研究によって選ばれるが、臨床開発時には、さらにその安全性を確認する必要がある。この臨床研究でもトキシコゲノミクスは有力な研究手段となると期待される。その際、患者からより負担の少ない方法で臨床検体を採取する必要がある。そのような検体としてヒト末梢血中有核細胞、特にリンパ球が考えられる。そこで平成 19 年度では 1) ヒトから採血したリンパ球の発現実験解析、2) 前年度に構築した腎障害性薬物予測アルゴリズムの検証、3) 薬物性腎障害の防御機構の解析、を行った。

1) ヒトから採血したリンパ球の発現実験解析

平成 17 年度の研究において、細胞に対して最も刺激が少ない抗凝固剤の検討と RNA の純化・抽出方法を検討した。その結果、抗凝固剤として EDTA-Na を使用し、全血をそのまま処理して RNA を抽出する QIAamp RNA preparation Kit (QIAGEN) を用いて抽出する事により、in vitro での細胞に対する刺激を最小限に抑えられる事が明らかとなった。そこで、本年度は実際に被験者より採血を行い、この方法を用いた採血及び RNA の純化・抽出方法の妥当性を検討し、ヒト全血より遺伝子発現解析を行うために十分な品質の RNA を得るための問題点を明らかにする事とした。

2) 腎障害性薬物予測アルゴリズムの検証

平成 18 年度の研究により、160 薬物の発現データを用いて腎障害の有無を予測する手法を確立し、約 83% の精度で予測可能である事を示した。しかし多数の企業で新規開発されている薬物の評価を一施設で行う事は、様々な面で障害がある。そこで、各研究者が各々の研究施設において、得られたデータを用いて予測が出来なければ実用性は低いものとなる。本年度はこの点を評価・検討するために、国内の複数の施設に依頼して薬物の曝露から発現データの取得までを行ない、それらのデータを本研究室で解析して実際に腎障害が予測可能か否か、および統一プロトコール化するために細部の検討を行った。

3) 薬物性腎障害の防御機構の解析

腎障害性を予測するための遺伝子リスト中より、マーカー遺伝子候補として P2RX5 を抽出した。細胞内で

エネルギー貯蔵に利用される ATP は他の神経伝達物質と共に細胞外へ分泌され、細胞膜表面に存在する P2X タイプ、および P2Y タイプの ATP 受容体チャンネルを刺激する。これまでの研究により、P2X 受容体の全てのサブタイプは活性化すると細胞内カルシウム濃度の上昇が生じ、これが下垂体、副腎皮質、膵臓などの内分泌臓器や神経系でシナプス伝達を含めた分泌機能に関わることが示唆された。一方、P2X 受容体が細胞障害を助長する可能性もある。P2X 受容体のカルシウムイオン透過性は NMDA 受容体に次ぐ高さであること、また細胞の障害により細胞内より流出する ATP が周囲の P2X 受容体を活性化し、細胞に過度の細胞内カルシウム濃度の上昇を惹起することが細胞障害を増幅する理由とされる。薬剤の投与による細胞障害を増強すると考えられる P2X 受容体について、特に受容体脱感作が弱くカルシウム流入が長時間続く P2X2 サブタイプを例に、その遺伝子発現を司るプロモーター活性を解析した。

B. 方法

1) ヒトから採血したリンパ球の発現実験解析

本学附属病院歯科口腔外科の外来で埋伏第三大臼歯(おやしらず)を抜歯予定の患者を対象とした。投与する薬物は本院でも通常使用されており、かつ腎障害の報告がある塩酸セフカペンピボキシル(フロモックス:塩野義製薬)とした。対象患者は埋伏第三大臼歯抜歯予定の他に、男女問わず、20 歳以上 60 歳以下とした。以下の患者は除外した。I) 腎機能障害、II) 肝機能異常、III) 临床上、心筋梗塞・心不全を有する、または疑われる所見を有する、IV) 糖尿病・高血圧に対する薬物療法中、V) 塩酸セフカペンピボキシル及びフロモックス(塩野義)の成分に対する過敏症の既往がある、VI) セフェム系抗生物質に対する過敏症の既往が有る。通常の診療では、特別な合併症等の問題の無い症例では第三大臼歯の除去の際は 3 回(以上)の受診が行われ、2 回目の受診の午後が手術日として予定されている。採血のポイントと投与スケジュールを以下に示す。なお目標症例数は 20 例とした。

1 回目受診: 同意の得られた患者については術前検査用の採血に加え、研究用の 2 mL の採血を行った。この際、患者の負担等も考慮し、一度で済む様に、術前検査用の採血を行う外来採血室に依頼して採血した。これを投与前サンプルとした。

2 回目受診:手術手技は日常診療と同様に行った。患者は昼食後(術前)に1回塩酸セフカペンピボキシルを100 mg 服用した。手術終了後、塩酸セフカペンピボキシルを100 mg 服用した。

3 回目受診:術後の消毒・術創の確認を午前中に行った。患者は朝食後に塩酸セフカペンピボキシル 100 mg を服用した。外来診療室にて通常診療後に2 mL の採血を行った。

得られた血液は研究室に持ち帰った後、直ちに QIAamp RNA preparation Kit (QIAGEN)を用いて1 mL の血液を15mL チューブに分注後、試薬を添加し、赤血球が完全に溶血するまで10分~20分氷上で放置した。その後遠心して末梢血有核細胞のみを沈殿させ、試薬添加後RNAを抽出した。抽出したRNAは濃度を測定した後、cDNAの合成とラベリングを行うまで-80度Cで保存した。cDNAの合成・ラベリングはこれまでと同様にO VATION Biotin RNA Amplification and Labeling System Ver.1.0 (NuGEN, MebiDic)を用いて行った。得られたcDNAを用いてGeneChip HG-U133A2.0(Affymetrix)による遺伝子発現実験を行った。

これらをin vivoの発現データとし、in vitroの発現データと比較するため塩酸セフカペンピボキシル(フロモックス)を生理食塩水で30分かけて溶出・調整した後、ポアサイズ0.45 μmのフィルター(ミリポア)にて濾過滅菌し、1 μg/mLをヒトB細胞由来細胞株であるHEV0034に24時間曝露した。得られたRNAを用いて末梢血サンプルと同様にcDNAを合成し、発現データを取得した。発現データ取得後は、GeneChip Operation System (GCOS, Affymetrix)により、RPTファイルとPivotdataを派生させ、RPTファイルよりhouse keeping geneであるβ-アクチン、GAPDHの3'/5'比と%Presentを抽出し、チップデータの品質比較を行った。その後、PivotdataをGeneSpringGX(トミーデジタルバイオロジー)に投入し、BetterHKによるnormalizationとnoise reductionの手順を踏んだ後、比較解析を行った。

本研究計画書はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する当施設の取り扱い規定(別紙)に従い審査され許可された。(申請書・許可通知書を添付する)

2) 腎障害性薬物予測アルゴリズムの検証

国内4施設と当施設を含め合計5カ所で同じ薬物を曝露し、発現データを取得した。各施設に対しては、当

研究室で保存していた同一ロットの曝露薬物10種類、HEV0034細胞とRNeasy Mini Prep Kit (QIAGEN)、O VATION Biotin RNA Amplification and Labeling System Ver.1.0 (NuGEN, MebiDic)、GeneChip HG-U133PI us2.0(Affymetrix)、およびチップハイブリダイゼーションに必要な試薬を同一ロットから分注し送付した。今回実験に用いた曝露薬物のリストは以下の通りである。

表 実験に使用した曝露薬物

実験ID	製品名	保存	容量	最終曝露濃度
#22-01	メテナリン	4度C	0.2mg/mL	0.05 μg/mL
#22-02	ヒルトニン	室温	0.5mg/mL	0.05 μg/mL
#22-03	アレリックス	室温	3mg/mL	1 μg/mL
#22-04	エルゴメトリンF	4度C	0.2mg/mL	0.05 μg/mL
#22-05	パンプロール	室温	10mg/mL	1 μg/mL
#22-06	メロベン	室温	0.5g	20 μg/mL
#22-07	トミポラン静注用	4度C	1g	20 μg/mL
#22-08	タゴシッド	室温	200mg	1 μg/mL
#22-09	ロイコン	室温	10mg/mL	1 μg/mL
#22-10	チエナム	室温	250mg	20 μg/mL

細胞の培養培地、培養器具は、各施設で通常使用しているものとして、継代の方法と曝露時の細胞数と培養器具のみ指定して行った。RNA抽出後のcDNAの合成とラベリングまでの時間は各施設のタイミングとしたが、ハイブリダイゼーションの時間は18時間とした。得られた発現データはDVDに移して送付してもらい、本研究室にて品質のチェックと比較を行った。手順としては各施設のデータを一度GCOSに戻した後に、RPTファイルとPivotdataを派生させ、RPTファイルよりhouse keeping geneであるβ-アクチン、GAPDHの3'/5'比と%Presentを抽出し、チップデータの品質比較を行った。その後、PivotdataをGeneSpringに投入し、BetterHKによるnormalizationとnoise reductionの手順を踏んだ後、比較解析を行った。

3) 薬物性腎障害の防御機構の解析

3-1) 遺伝子発現解析用コンストラクトの作成

P2X2受容体の発現が最も多く見られるマウス下垂体細胞mRNAよりP2X2のcDNAをクローニングし、シーケンズを行なって塩基配列を決定した。転写開始点を決定するため、RNase protection assayとprimer extension analysisを行なった。得られたcDNA配列をマウスゲノムデータベースと比較しゲノム上の遺伝子構造を決定した。正確な転写開始点を決定した後、上流プロモーター配列3.5 kbをpGL3ルシフェラーゼベクターにサブクローニングし、deletionコンストラクトを作成した。

3-2)プロモーター活性の解析

下垂体由来 GH₃細胞に作成したプロモーターコンストラクトを pRluc コントロールプラスミドと共にトランスフェクション後、Dual Luciferase Assay によりプロモーター活性を測定した。ネガティブコントロールとして本来はP2X2 受容体を発現しない HEK 細胞を使用した。測定には ARVO-MX(パーキンエルマージャパン製)を用い2種類のディスペンサーにて各々ホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼの発光基質を供給し発光強度を測定した。

C. 結果

1) ヒトから採血したリンパ球の発現解析

同意を取得することが出来た被験者 20 名すべてから 1 回目(投与前)と 2 回目(投与後)の採血を行なった。RNA を抽出し、NanoDrop で測定した結果、RNA 量はヒト末梢血 1mL から投与前は平均 57.72 ng/ μ L、投与後は 69.05 ng/ μ L であった(図1)。投与前と投与後で得られた RNA 量には有意な差は認められなかった。培養細胞の曝露前および曝露後の平均が 742.48 ng/ μ L であったのに対して約 1/10 以下の量しか得られなかったが、本実験で用いている OVATION RNA amplification system が必要とする RNA 量は総量で 100 ng で十分である。したがって、ヒト末梢血 1 mL を用いれば研究を行うための十分量の RNA が得られるものと思われる。

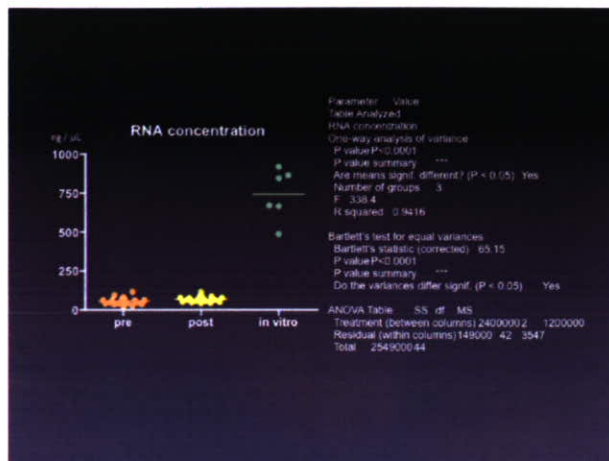


図1 臨床検体及び培養細胞より得られた RNA 濃度の分布

cDNA を合成・ラベルする前に、十分な RNA の質があることを確認するために、Bioanalyzer によりサンプル中の 18S 及び 28S RNA を確認した。その結果、臨床検体では No.7、及び No.26 で完全に rRNA である 18S、28S のバンドが消失し、断片化していた(図2)。その他に、rRNA のバンドはしっかりと認められるものの、断片化が多少見られるサンプルもあった。RNA バンドが確認されたサンプルに関しては、18S/28S 比は 1.8~2.0 であった。したがって、今回は完全に rRNA が見られなかったサンプルのみを解析対象から外すこととし、残りのサンプルについては、cDNA の合成とラベリングを行い、チップにハイブリダイゼーションして順次発現データを取得した。

臨床検体及び培養細胞より得られたRNAの電気泳動図

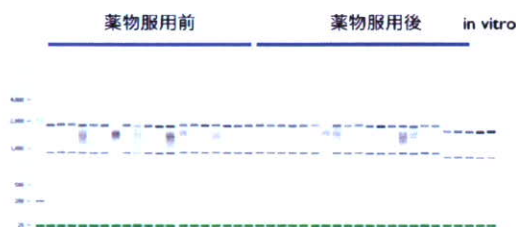


図2 臨床検体及び培養細胞から得られた RNA の電気泳動図

ジーンチップに18時間、45度でハイブリ後、得られたデータを基に、housekeeping gene である β -アクチンと GAPDH の 3'/5' 比と present or marginal の割合(% Present)を比較して、データの品質を検討し、解析に用いる事が出来るか否か検討した。その結果、臨床検体については、投与前のサンプルに比べて、投与後のサンプルの方が β -アクチン及び GAPDH の 3'/5' 比が安

定しており、有意に小さい事が明らかになった(図3、4)。その結果、検出された遺伝子の割合である%Present についても投与前と投与後で有意な差があった(図5)。

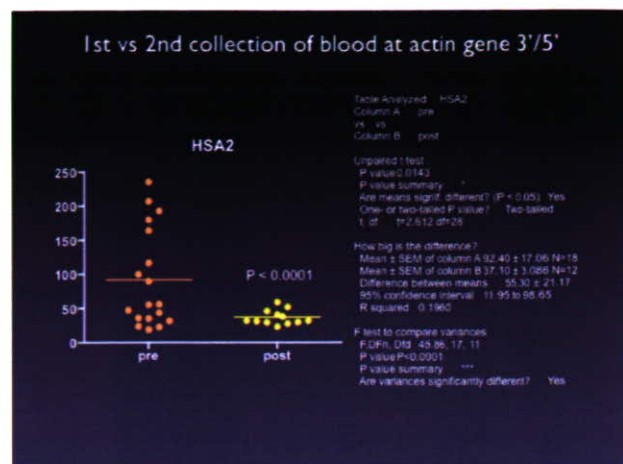


図3 投与前と投与後のβ-アクチン 3'/5' 比の比較

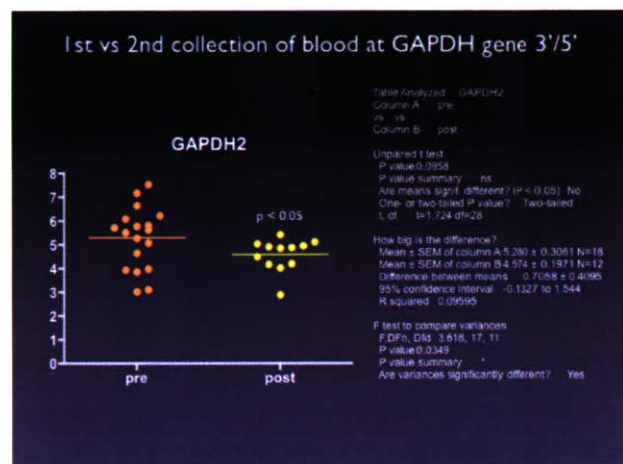


図4 投与前と投与後のGAPDH3' /5' 比の比較

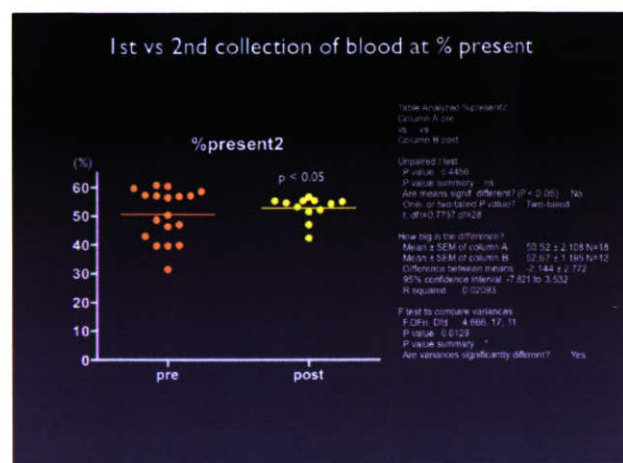


図5 投与前と投与後の%Present の比較

以上の結果を踏まえ、当研究室で定めた基準をクリアしなかったサンプルを除き、解析を行う事とした。な

お今回除かれた患者は3名であり、そのうち、投与前および投与後で基準をクリアしなかったのは1名、どちらかをクリアしなかったのは2名であった(表1朱色及び水色及び図6)。今回は、投与前あるいは投与後で基準を満たさなかった被験者のサンプルを解析から外し、合計34の実験データを解析に用いる事とした。

表1 解析対象としたサンプルのIDリスト

Patiente	pre	post
1	#21-01	#21-21
2	#21-02	#21-22
3	#21-03	#21-23
4	#21-04	#21-24
5	#21-05	#21-25
6	#21-06	#21-26
7	#21-07	#21-27
8	#21-08	#21-28
9	#21-09	#21-29
10	#21-10	#21-30
11	#21-11	#21-31
12	#21-12	#21-32
13	#21-13	#21-33
14	#21-14	#21-34
15	#21-15	#21-35
16	#21-16	#21-36
17	#21-17	#21-37
18	#21-18	#21-38
19	#21-19	#21-39

Patiente	pre	post
20	#21-20	#21-40

注:朱色は品質管理の基準を満たさなかったサンプル。
水色はそれに付随して解析から外したサンプル。

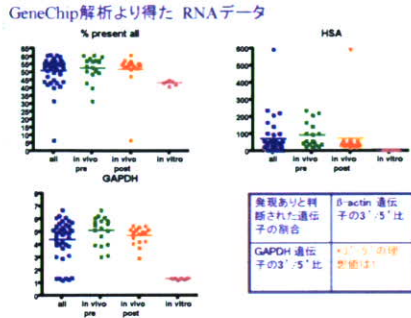


図6 GeneChip より得られた RNA の品質比較

また、HEV0034 に塩酸セフカペンピボキシルを曝露した in vitro データと比較したが、RNA の量、 β -アクチン・GAPDH・%Present いずれにおいても臨床検体サンプルより質が良く、解析から外したデータは無かった(図6)。

投与前と投与後のデータを解析ソフト GeneSpring に投入し、normalization の手順を行った後にそれぞれを比較した。まず、個人間差、実験間差を検討するために、横軸に実験 ID を縦軸に各遺伝子の相対発現量をプロットしてグラフを作成した(図7)。

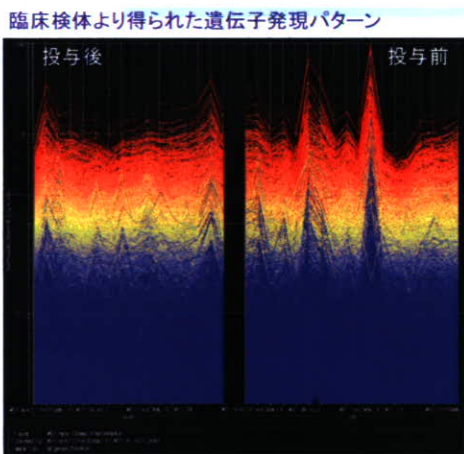


図7 各検体毎の相対遺伝子発現量の比較

その結果、実験間の遺伝子発現量は投与後よりも投与前の方が変動が大きい事が明らかになった。投与後では、各実験間(個体間)の変動が小さくなっていった。

次に、投与前と投与後の結果を比較するためにスクアッタープロットに当てはめた。投与後のグループで、発現量の比較的多い遺伝子を 10 数個認めた(図8)。さらに投与前と投与後で有意に発現変動のあった遺伝子を分離するためにボルケーノプロットを行った(図9)。その結果、2倍以上の発現変動を認める遺伝子として、P 値=0.05 で 62 遺伝子、P 値=0.01 で 61 遺伝子を生離した。P 値=0.05 で分離された遺伝子 62 のリストについて、投与後に発現が上昇した遺伝子を表2に、投与後に発現が減少した遺伝子を表3に示した。

投与前と投与後のヒト末梢血中の遺伝子発現比較

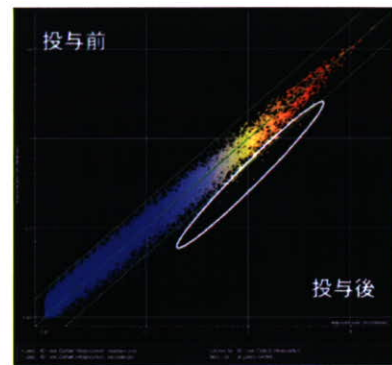


図8 投与前と投与後のスクアッタープロット図

Volcano plotによる遺伝子発現変動の検出

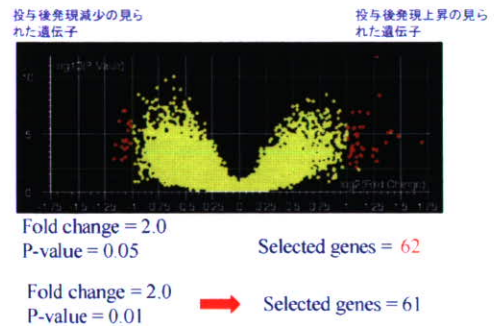


図9 ボルケーノプロット法による発現が有意に変動した遺伝子の検出

表2 塩酸セフカペンピボキシル投与後に発現が上昇した遺伝子 (42 遺伝子)

Probe ID	Common	Genbank
205227_at	IL1RAP	NM_002182
202430_s_at	PLSCR1	NM_021105

207674_at	FCAR	NM_002000
202581_at	HSPA1B	NM_005346
210773_s_at	FPRL1	U81501
206011_at	CASP1	A1719655
204646_at	DPYD	NM_000110
218669_at	RAP2C	NM_021183
216951_at	FCGR1A	X14355
205003_at	DOCK4	NM_014705
216950_s_at	FCGR1A	X14355
206765_at	KCNJ2	AF153820
206026_s_at	TNFAIP6	NM_007115
218668_s_at	RAP2C	NM_021183
210756_s_at	NOTCH2	AF308601
214511_x_at	LOC440607 ; FCGR1A	L03419
210484_s_at	TNFRSF10C	BC005043
221477_s_at	SOD2	BF575213
221764_at	C19orf22	AL574186
210873_x_at	APOBEC3A	U03891
205921_s_at	SLC6A6	U16120
221485_at	B4GALT5	NM_004776
204859_s_at	APAF1	NM_013229
212262_at	GK1; GK3	AF142419
206025_s_at	TNFAIP6	AW188198
206565_x_at	SMA3	NM_006780
202270_at	GBP1	NM_002053
206995_x_at	SCARF1	NM_003693
221156_x_at	CCPG1	NM_004748
212572_at	STK38L	AB023182
203604_at	ZNF516	N38750
218319_at	PELI1	NM_020651
202381_at	ADAM9	NM_003816
211924_s_at	PLAUR	AY029180
206090_s_at	DISC1	NM_018662
221345_at	GPR43	NM_005306
214754_at	MGC22014	AB007861
215043_s_at	SMA5	X83301
201299_s_at	MOBK1B	NM_018221

216511_s_at	TCF7L2	AJ270770
210772_at	FPRL1	M88107
207387_s_at	GK	NM_000167

表3 塩酸セフカペンピボキシル投与後に発現が減少した遺伝子 (20 遺伝子)

Probe ID	Common	Genbank
218025_s_at	PECI	NM_006117
210479_s_at	RORA	L14611
218723_s_at	RGC32	NM_014059
210439_at	ICOS	AB023135
206804_at	CD3G	NM_000073
208268_at	ADAM28	NM_021777
214255_at	ATP10A	AB011138
213454_at	CORT	AL578583
212650_at	EHBP1	AB020710
219870_at	ATF7IP2	NM_024997
213547_at	TIP120B	AB014567
200835_s_at	MAP4	AI553791
219826_at	FLJ23233	NM_024691
217627_at	ZNF573	BE515346
204440_at	CD83	NM_004233
209773_s_at	RRM2	BC001886
209570_s_at	D4S234E	BC001745
213615_at	C3F	AA773554
213523_at	CCNE1	AI671049
206115_at	EGR3	NM_004430

発現が上昇した遺伝子の中には、シグナル受容体を含む受容体膜タンパク質が多く見られ、その他には炎症性サイトカインや酸化ストレス応答遺伝子等が見られた。また、in vitro により得られた発現データを臨床検体と同様の手順で normalization と noise reduction を行い比較したところ、各実験間での誤差は非常に小さかった。塩酸セフカペンピボキシルの曝露前と曝露後の遺伝子発現を比較したスクアットプロットを図10に示す。

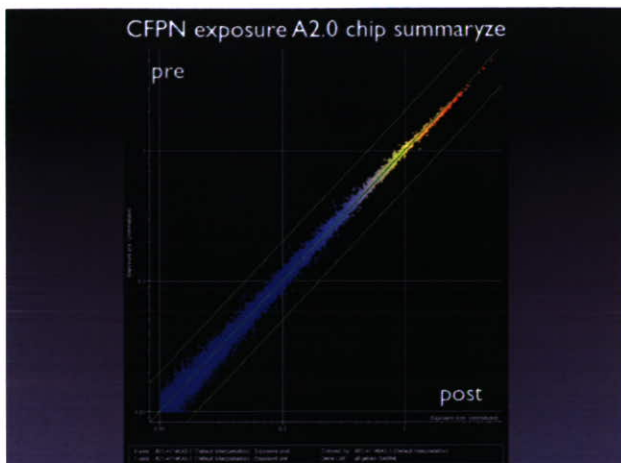


図10 in vitro における遺伝子発現変化の比較

in vitro で発現変動した遺伝子を1つ取り上げ、臨床検体で得られたデータと比較した。in vitro では薬物曝露により約 2 倍発現が減少しているが、一方臨床検体では薬物曝露により発現が増加しており、全く逆の変動を示していた(図11)。

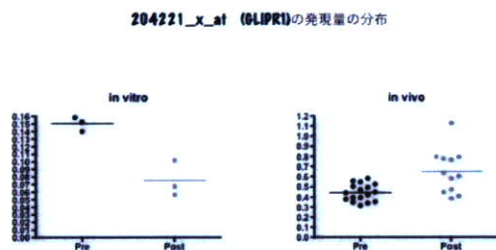


図11 薬物曝露前後での相対発現量の変化
-in vitro と in vivo の比較-

2) 腎障害性予測アルゴリズムの検証

各施設で得られた発現データには A-E のナンバリングを行い、ブラインド化した。それぞれのデータを一度 GCOS に投入し、RPT ファイルと Pivotdata を派生させ、チップデータ品質の比較と発現解析を行うデータとした。RPT ファイルからは、手順に従い housekeeping gene である β -アクチンと GAPDH の 3' / 5' 比及び、%Present を抽出し、比較した(図12)。なお今回は Bioanalyzer の使用出来ない施設もあったために、RNA の 18S/28S の比較は行わず、吸光度計における 260/280 比により各施設で RNA の品質管理を行い、GeneChip へハイブリダ

イズーションを行った。この時、各施設で特に問題となる RNA データは見られなかった。

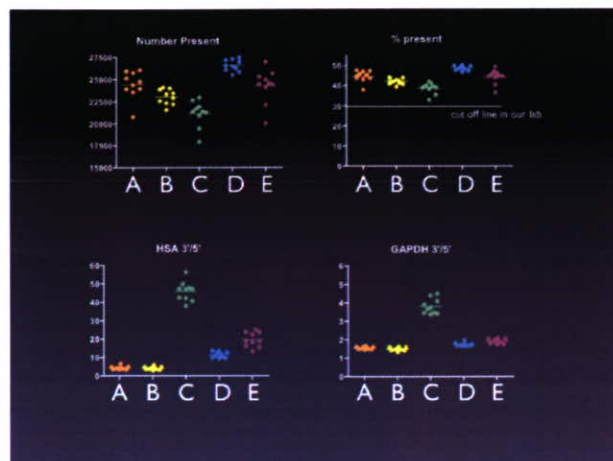


図12 各施設で得られたチップデータの品質項目の比較

%Present におけるラインは当研究室で定めた基準があり、これを下回った時は対象データを解析から外した。

その結果、一施設で β -アクチン、GAPDH の値が有意に高かった。またそれに逆相関して %Present 値が低かった。しかし、%Present に関しては有意な差は見られなかった。なお当研究室の品質管理の項目と照らし合わせた結果、 β -アクチン、GAPDH、%Present のいずれにおいても基準以内であり、解析対象とした。

次に、これらのデータを施設ごとに GeneSpring に投入、normalization と noise reduction の手順を踏んだ後に、腎障害ありの薬物となしの薬物の発現データでスキャッタープロットを作成した。その結果、 β -アクチンについて大きく外れた値を出した施設においてもバラツキは大きくはなかったが、他と比較して、発現量の比較的多い遺伝子の変動が有意に変化していると思われる(図13、C)。

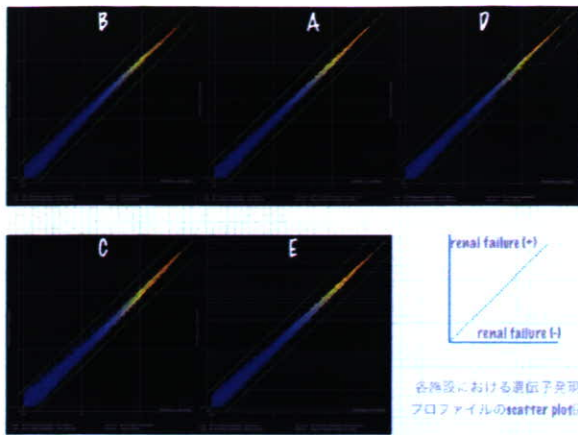


図13 各施設のデータを基にしたスキャタープロット

さらに、ボルケーノプロット法にて腎障害あり、なしの薬物群間で有意な発現変動を示した遺伝子の分離を各施設毎に行った。その結果、2倍以上の発現変動を示し、P値=0.05で分離された遺伝子数は、それぞれ、8、8、0、1、0となり、変動が見られない施設もあった(図14)。

腎障害性薬物予測時に用いた遺伝子セットは発現変動を1.6倍でカットしたが、今回のデータも同様に1.6倍でカットした。その結果、変動遺伝子数は35、103、6、12、7となり、最も多く遺伝子変動が観察されたのはβ-アクチンの3'/5'比が大であった施設のデータであった。それぞれ得られた遺伝子数は表4にまとめた。

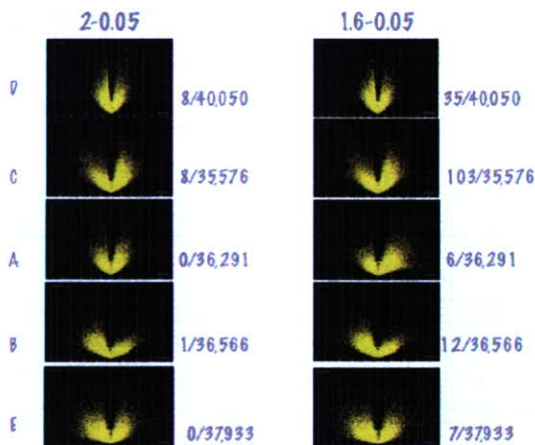


図14 各施設毎のデータから得られたボルケーノプロット図

表4 各施設データより得られた発現変動遺伝子数

施設 ID	Present or Marginal	Volcano plot 2-0.05	Volcano plot 2-0.01
A	36,291	0	6
B	36,566	1	12
C	35,576	8	12
D	40,050	8	35
E	37,933	0	7

今回得られたデータを腎障害予測アルゴリズムに当てはめ、予測が正確に出来るか否かを検討した。手順としては、各施設のデータを normalization と noise reduction の手順を行い、GeneSpring に内蔵されているサポートベクターマシンの test set にそれぞれ含ませた。training set としては腎障害予測時に構築したデータセットを用い、昨年度に報告した 32 遺伝子を判別器に含ませた。prediction の結果、5 施設中 4 施設では半分の 50% の薬物データでしか正解が出なかったが、残りの 1 施設では 70% の正解であった。

3) 薬物性腎障害の防御機構の解析

3-1) 遺伝子発現解析用コンストラクトの作成

薬物による組織障害の際に、過度の細胞内カルシウム濃度上昇を介して細胞毒性を助長する可能性のあるP2X受容体について、その発現機構を詳細に解析するため、まずP2X2受容体の転写産物をクローニングした。その結果、マウス下垂体よりP2X2受容体スプライシングバリエントを同定した。P2X2には野生型のP2X2aとカルボキシ末端スプライシングバリエントのP2X2bが知られているが、さらにcDNA 3'末端を解析したところ、バリエントP2X2eを発見した。このP2X2eは、ATPの刺激に対して、P2X2bなどこれまで知られているどのP2X2スプライシングバリエントよりもはるかに早く脱感作を起こすことが明らかになった。P2X2eはバリエントの中ではカルボキシル末端が最も短いために、受容体の活性化時間が短くなり、細胞内カルシウム濃度の過度の上昇が抑えられる。以上より、細胞内カルシウム動態を通じて、ホルモンの分泌が調節を受けている事が示唆された。さらに、マウスP2X2遺伝子の転写開始部位をprimer extension法、RNase protection assay法より同定した結果、下垂体においてP2X2遺伝子の転写開始は開始コドンより253塩基上流であり、デ

ーターベース上に存在するESTの中でも最も上流から転写されることが明らかになった。

3-2)プロモーター活性の解析

プロモーター活性をルシフェラーゼ遺伝子の発現を指標に計測したところ、P2X2 遺伝子の5' 上流には下垂体細胞で特異的に活性化されるエンハンサー領域が存在することが明らかとなった。

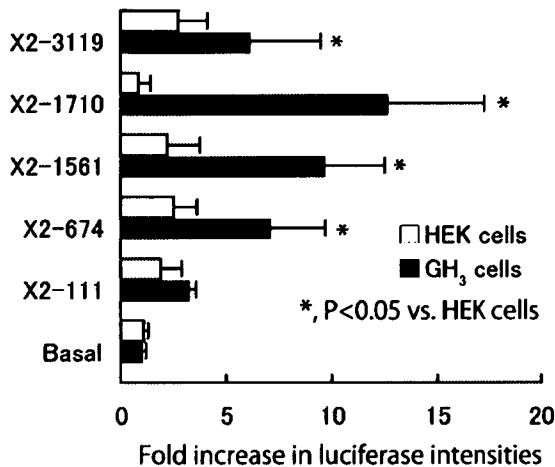


図 15 P2X2 遺伝子上流のプロモーターコンストラクト導入細胞によるルシフェラーゼ活性

D. 考察

1) ヒトから採血したリンパ球の発現実験解析

今回、臨床検体として末梢血リンパ球より RNA を抽出し、発現データを取得した。得られた RNA の量は 2 回目(投与後)の方が平均的に多かった。その理由として、抜歯手術をしたために、白血球成分である T 細胞や B 細胞等が炎症により分化・誘導されたこと、および採血後に比較的短時間(15 分以内)で抽出過程が行えた事が考えられる。後者に関しては、RNA の質を比較した時に、1 回目(投与前)の採血で 18S/28S が完全に分解していたサンプルや断片化しているサンプルが見られた事からも十分に考えられる。今回は本学附属病院の外来採血室で一般検査用採血と同時に試験用採血を行ったが、採血場所までの距離や連絡の迅速性等を今後検討する必要がある。しかし、最終的には 17 名の患者から投与前、投与後のサンプルとして合計 34 の発現データを取得し、解析を行えた。今後、前述の 2 点の要因に十分注意を払えば、さらに質の良い RNA を効率よく得る事が可能になると考えられる。

臨床検体より得られた発現データを解析すると、投与後に炎症に関連する遺伝子、特に膜タンパク質(レセプター)が多く見られた。これについては、被験者は抜

歯予定者であるために、薬物の投与の影響と抜歯の影響が考えられる。炎症関連遺伝子の発現が上昇した原因として、抜歯と薬物のどちらの影響が大きいのか、今回の研究からは判断出来なかった。しかし、抜歯後に炎症反応が生じ、白血球の分化が盛んに起こっていると仮定すると、得られた遺伝子の種類はこれらに非常にマッチしたものである。また、in vitro では発現が変動した遺伝子がほとんど見られず、さらに in vitro で薬物曝露により有意に減少した遺伝子が、臨床検体のデータでは薬物投与後に発現が上昇したという、全く逆の動きをしていた。その原因の一つとして、in vitro の培養細胞系は単一の遺伝子背景を持った細胞集団であるのに対し、末梢血リンパ球は多様に分化した細胞集団であることが考えられる。その結果、細胞によっては薬物の感受性やシグナルパスウェイが変化し、遺伝子発現にも影響している可能性がある。

in vitro データの有用性は今後さらに検討する必要がある。

2) 腎障害性薬物予測アルゴリズムの検証

今回、当施設と同様に Affymetrix 社製 GeneChip を使用した事があり、スキャンまで出来る施設の協力を得て、各施設で薬物曝露後の発現データを取得し、本研究室でデータ解析を行った。その結果、1 つの施設を除いて高品質の発現データを取得する事が出来た。残りの 1 施設に関しても、当施設における Chip 品質管理の基準内に収まるデータであった。したがって、培養細胞より得られた RNA を用いて発現データを取得する場合、ある程度 RNA を扱う上での知識と経験、および Chip をスキャンするまでの手順を知っていれば、品質的には問題のないデータを取得する事が可能であると考えられる。FDA は複数の施設で得られた同一プラットフォームの発現データを比較する事は妥当であると評価しており、今回のデータもそれを裏付けるものであると考えられる。しかし、腎毒性の予測を行った結果、ボルケーノプロットでの発現変動遺伝子数が少なかったため、100%の精度で正解を出す事が出来なかった。1 施設だけ、70%の正解率を出した施設があるが、他の施設との違いを調べた所、細胞継代数に差がある事が明らかになった。4 つの施設では細胞を凍結状態から起こした後、2-3 継代後に薬物を曝露し、RNA を調整していた。しかし、70%の正解率を出した施設では、5-6 継代後に曝露を行っていた。この事より、凍結保存細胞から起こした後、細胞数の増殖が見られても、細胞機能自体が完全ではなく、細胞外の刺激に対して完全に応答している訳

ではないと考えられる。逆に継代をある程度重ねた後に曝露を行うと、細胞機能はほぼ完全に回復し、刺激に対する反応性が十分見られるものと思われる。

以上より、培養細胞を用いて発現データを得る場合には、細胞の培養条件、継代回数や方法を細かく規定し、施設間や実験者間の違いをなるべく小さくする必要がある。

3) 薬物性腎障害の防御機構の解析

薬物によって細胞の障害や崩壊を生じると、細胞内物質の細胞外への遊離が惹起される。この過程について、傷害部位周囲の正常細胞が持つ ATP を伝達物質とする細胞間情報伝達機構が果たす役割は未だ不明の点が多い。各種細胞内物質は、一旦細胞外に出ると生理活性物質として周囲の細胞に作用し、細胞障害の進展に大きく影響する。細胞障害時には細胞膜表面に存在する特異的 ATP 受容体ファミリーが活性化し、パラクラインとして各種細胞機能を制御する可能性がある。P2X2 受容体の活性化は標的細胞内カルシウム濃度を大きく変化させるため、シナプス伝達を含めた各種細胞機能に関わる代表的なサブタイプとして研究が進んでいる。本研究では細胞内カルシウムの過剰負荷を起こす可能性のある P2X2 受容体の発現機構について解析を進めた。P2X2 遺伝子プロモーターはマウス下垂体前葉細胞に特異的に高発現し、組織特異的感受性や障害に影響を与える因子と考えられた。本研究により薬物の有害反応が惹起される際の新たな機序が提示され、細胞間 ATP 情報伝達機構を制御することにより新たな作用機序による治療が可能になると期待される。

E. 結論

1) ヒトから採血したリンパ球の発現実験解析

今回行った研究では、20人中17人の患者の薬物の服用前と服用後の発現データを合計 34 取得・比較する事が出来た。チップにハイブリする前に除かれたサンプルが 2 検体分、ハイブリ後に除かれたサンプルが 1 検体分あった。今回の研究により、RNA を抽出するためには、採血後 15 分以内に検体を処理することが理想であると考えられる。この事を遵守すれば、品質の良い RNA が得られるものと考えられる。

2) 腎障害性薬物予測アルゴリズムの検証

国内の複数の施設に発現データ取得を依頼した結果、全ての施設において解析対象となるデータを取得する

事が出来た。しかし、発現データを用いて腎障害性を予測した結果、100%の正解率を達成する事は出来なかった。その要因として、細胞継代数の違いや培養環境の違いが考えられ、今後、さらに詳細に検討する必要がある。

3) 薬物性腎障害の防御機構の解析

薬物腎障害性関与と思われた P2RX5 のサブタイプである P2X2 のプロモーター構造と活性を調べた。その結果、細胞特異的なエンハンサー領域の存在が明らかとなった。このことにより、薬物の有害反応が惹起される際の新たな機序が提示され、細胞間 ATP 情報伝達機構を制御することにより新たな作用機序による治療が可能になると期待される。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

トキシコゲノミクス研究論文 0 報(下記)、学会発表1件(下記)特許申請 1 件

[学会]

BMB2007(第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会)「遺伝子発現比較による薬物腎障害予測への応用<トキシコゲノミクスからのアプローチ>津田英利・大島康雄・藤村昭夫(12 月 14 日(金曜日)4P-1192 パシフィコ横浜 アネックスホール ポスター会場)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定をふくむ)

出願番号:特願 2007-72357, 発明の名称:遺伝子発現情報に基づく薬物有害反応の予測方法

第1章 総則

(目的)

第1条 この規程は、自治医科大学及び自治医科大学看護短期大学(以下「大学」という。)において行われるヒトゲノム・遺伝子解析研究について、人間の尊厳を確保し、試料等提供者、その家族又は血縁者(以下「試料等提供者等」という。)の人権を保障しながら適正に実施されるよう、必要な事項を定めることを目的とする。

(適用範囲)

第2条 この規程は、大学において行われるすべてのヒトゲノム・遺伝子解析研究に適用する。

(用語の定義)

第3条 この規程において、次の各号に掲げる用語の意義は、それぞれ当該各号に定めるところによる。

- (1) 試料等 ヒトゲノム・遺伝子解析研究に用いようとする血液、組織、細胞、体液及び排泄物並びにこれらから抽出したDNA等人の体の一部並びに試料等提供者の診療情報(死者から提供された試料等を含む。)をいう。ただし、学術的な価値が定まり、研究実績として十分に認められ、研究用に広く利用され、一般に入手可能な組織、細胞、体液及び排泄物並びにこれらから抽出したDNA等を除く。
- (2) 診療情報 診断及び治療を通じて得られた疾病名、投薬名、検査結果等の情報をいう。
- (3) ヒトゲノム・遺伝子解析研究(以下「遺伝子解析研究」という。) 疾病の予防、診断及び治療法の向上並びに新薬の開発を目的として行われるヒトゲノム・遺伝子の構造又は機能を明らかにする研究(当該研究に用いる試料等の提供のみを含む。)をいい、次のとおり分類する。ただし、薬事法(昭和35年法律第145号)第14条第3項に基づき実施される医薬品の臨床試験、薬事法の規定による医療用具の製造及び輸入承認申請のために実施される臨床試験、教育目的で実施される生物実習等で構造又は機能が既知の遺伝子領域について実施される遺伝子構造解析実習であって、実習目的以外には試料等の解析結果の利用が行われないもの、並びに医療の場において診療のみを目的として行われるものは、この規程における遺伝子解析研究には含まない。
 - ア 遺伝子発現解析研究 ある特定の遺伝子の機能を調べるため、mRNA量を調べる研究をいう。
 - イ 体細胞遺伝子解析研究 体細胞のDNAに起きた病的な変化を調べるため、DNA又はmRNAから作られた相補DNAの塩基配列等の構造を解析する研究をいう。
 - ウ 生殖細胞系列遺伝子解析研究 生殖細胞系列におけるDNAの変化又は個体差を調べるため、DNA又はmRNAから作られた相補DNAの塩基配列等の構造を解析する研究(遺伝子多型を調べる研究を含む。)をいう。
- (4) 遺伝情報 試料等を用いて行われる遺伝子解析研究の過程を通じて得られた情報、又は既に試料等に付随している個人の遺伝的特徴若しくは体質を示す情報をいう。
- (5) 個人識別情報 個人の氏名、生年月日、住所、電話番号、患者の診療録番号その他その者を特定する情報(それだけではその者を特定できない情報であっても、各種の名簿等他で入手できる情報と組み合わせることによりその者を特定できる場合を含む。)をいう。
- (6) 匿名化 ある者の個人識別情報が含まれている情報が、法令、国が示す指針、この規程若しくは研究計画に反して外部に漏洩しないように、その者に関する情報から個人識別情報の全部若しくは一部を取り除き、代わりにその者と関わりのない符号若しくは番号を付すこと、又は試料等に付随する情報のうち、ある情報だけでは特定の者を識別できない情報であっても、各種の名簿等他で入手できる情報を組み合わせることによりその者を識別で

きる場合には、組み合わせに必要な情報の全部若しくは一部を取り除き、その者が識別できないようにすることをいい、次のように分類する。

- ア 連結可能匿名化 個人識別情報に結びつけられるように、その者と新たに付された符号又は番号の対応表を残す方法による匿名化をいう。
 - イ 連結不可能匿名化 個人識別情報に結びつけられないように、その者と新たに付された符号又は番号の対応表を残さない方法による匿名化をいう。
- (7) 個人識別情報管理者 自治医科大学学長(以下「学長」という。)の指示を受け、試料等提供者の個人識別情報が含まれている情報が外部に漏洩しないように個人識別情報を含む情報を管理し、匿名化する責任者をいう。
 - (8) インフォームド・コンセント 試料等の提供を求められた者が、自治医科大学生命倫理委員会及び遺伝子解析研究倫理審査委員会(以下「倫理委員会等」という。)により認められた説明者から遺伝子解析研究に関する十分な説明を受け、その研究の目的、方法、予測される成果、不利益等を理解し、自由意志に基づいて行う試料等の提供並びに試料等の取扱いに関する同意をいう。
 - (9) 代諾者等 試料等の提供を求められた者が、インフォームド・コンセントを与える能力がない場合に、その者の代わりにインフォームド・コンセントを与える者(試料等提供者が死者の場合は遺族)をいう。ただし、遺族を含めない場合には、代諾者という。
 - (10) 未成年者 婚姻をしていない満 20 歳未満の者をいう。
 - (11) 研究実施機関 遺伝子解析研究を実施する機関(試料等の提供が行われる機関を含む。)をいう。
 - (12) 試料等の提供が行われる機関 研究実施機関のうち、医療機関、保健所等試料等提供者から試料等の提供が行われる機関をいう。
 - (13) 共同研究機関 倫理委員会等により認められた遺伝子解析研究を共同して行う国公立又は民間の研究実施機関(遺伝子解析研究の対象となる試料等を学外の機関から提供を受ける場合には、その試料等の提供が行われる機関を含む。)をいう。
 - (14) 研究責任者 遺伝子解析研究を遂行するとともに、その研究に係る業務を統括する者であって、遺伝子解析研究の有用性及び限界並びに生命倫理について十分な知識を有する者をいう。
 - (15) 研究実施担当者 研究責任者の指示又は委託に従って遺伝子解析研究を実施する者であって、業務の内容に応じて必要な知識と技能を持つ教員、病院助手、レジデント、薬剤師、看護婦(士)、臨床検査技師等をいう。
 - (16) 研究遂行者 研究責任者及び研究実施担当者をいう。
 - (17) 試料等提供者 遺伝子解析研究のために試料等を提供する者をいい、次のように分類する。
 - ア 第一群試料等提供者 単一遺伝子疾患(一つの遺伝子の変化による遺伝素因の明らかな疾患)の患者等で、研究開始の時点において、遺伝素因の関与が明らかな遺伝性疾患若しくは重篤な薬剤反応性異常を有する者又はその可能性のある者をいう。ただし、試料等の提供を依頼できるのは、病名等の告知を受けている者に限る。
 - イ 第二群試料等提供者 第一群試料等提供者以外の疾患の患者等で、研究開始の時点においては、遺伝素因の関与の程度が明らかでない疾病若しくは薬剤反応性異常等を有する者又はその可能性のある者をいう。ただし、試料等の提供を依頼できるのは、病名等の告知を受けている者に限る。
 - ウ 第三群試料等提供者 集団検診等の健康診断受診者又はこの研究に自発的に協力する者で、当該研究の対象となる疾病に罹患しているかどうか明らかでない者をいう。

- エ 第四群試料等提供者 健康の維持及び疾患の罹患における環境要因と遺伝素因との相互作用等の解明を目的としたコホート研究等に自発的に協力する者をいう。
- (18) 遺伝カウンセリング 遺伝医学に関する知識及びカウンセリングの技法を用いて、対話と情報提供を繰り返しながら、遺伝性疾患をめぐり生じ得る医学的又は心理的諸問題の解消又は緩和を目指し、援助及び支援することをいう。
- (19) 研究実施前提供試料等 大学において、遺伝子解析研究の実施前に提供され、保存されている試料等をいい、試料等の提供時における同意の状況に応じて、次のように分類する。
- ア A群試料等 試料等の提供時に、遺伝子解析研究における利用を含む同意が与えられている試料等をいう。
- イ B群試料等 試料等の提供時に、医学的研究に用いることに同意するなど、遺伝子解析研究における利用が明示されていない研究についての同意のみが与えられている試料等をいう。
- ウ C群試料等 試料等の提供時に、研究に利用することの同意が与えられていない試料等をいう。
- (20) ヒト細胞・遺伝子・組織バンク 提供されたヒトの細胞・遺伝子・組織等を研究用資源として品質管理を実施して、不特定多数の研究者に分譲する非営利的事業をいう。

第2章 研究遂行者及び研究責任者の責務

(研究遂行者の責務)

- 第4条 研究遂行者は、生命現象の解明、診断、治療、予防方法の改善、健康の増進等を目的として遺伝子解析研究を実施しなければならない。
- 2 研究遂行者は、遺伝子解析研究の社会的有益性を確認するとともに、個人の人権の保障を科学的、社会的な利益に優先して配慮しなければならない。
- 3 研究遂行者は、試料等提供者又は代諾者等からインフォームド・コンセントを受けて、遺伝子解析研究を実施することを基本としなければならない。
- 4 研究遂行者は、在職中又はその職を退いた後においても、職務上知り得た個人に関する情報を正当な理由なく他に漏洩してはならない。
- 5 研究遂行者は、個人に関する情報の保護を図るとともに、個人に関する情報の取扱いに関する苦情等に誠実に対応しなければならない。
- 6 研究遂行者は、個人に関する情報の予期せぬ漏洩等、試料等提供者等の人権の保障の観点から重大な懸念が発生した場合には、速やかに学長及び研究責任者に報告しなければならない。
- 7 研究遂行者は、倫理委員会等の承認を得て、学長により許可された研究計画書に従って研究を実施するなど、法令及び国の示す指針(以下「国の指針等」という。)並びにこの規程を遵守し、人間の尊厳及び人権の尊重に最大限配慮して、適正に遺伝子解析研究を実施しなければならない。
- 8 研究遂行者は、研究実施に当たっての適正な手続の確保、学外の有識者による調査への協力、試料等提供者からの研究進捗状況の問い合わせへの的確な対応、研究結果の公表等、研究の透明性の確保を図らなければならない。
- 9 研究遂行者は、試料等の提供が善意に基づくものであることに留意し、既に提供されている試料等を適切に活用すること等により、人からの試料等の提供を必要最低限にするよう努めなければならない。

(研究責任者の責務)

- 第5条 研究責任者は、遺伝子解析研究を実施するに当たって、あらかじめ研究計画書を作成し、

学長に許可を求め、倫理委員会等の審査を受けなければならない。研究計画書を変更しようとするときも同様とする。

- 2 研究責任者は、研究計画書の作成に当たり、実施しようとしている遺伝子解析研究に伴う、試料等提供者等に予想される様々な影響等を踏まえ、研究の必要性、試料等提供者等の不利益を防止するための研究方法等を十分考慮しなければならない。この場合において、研究責任者は、試料等提供者が、治療又は予防方法が確立していない単一遺伝子疾患であって、精神・知的障害を伴うものである場合には、研究の必要性、当該提供者に対する医学的・精神的影響、それらに配慮した研究方法の是非等について、特に慎重に検討しなければならない。
- 3 研究責任者は、学長が許可した研究計画書に記載された事項を、すべての研究実施担当者に遵守させるなど、研究実施担当者が適正に遺伝子解析研究を実施するよう監督しなければならない。
- 4 研究責任者は、次に掲げる事項を実施する場合には、試料等又は遺伝情報を原則として匿名化しなければならない。ただし、試料等提供者又は代諾者等が匿名化を行わないことに同意し、かつ、学長が許可した研究計画書において匿名化を行わないことが認められている場合には、その試料等又は遺伝情報の匿名化を行わないことができる。
 - (1) 試料等又は遺伝情報を用いた遺伝子解析研究を実施する場合
 - (2) 試料等又は遺伝情報を学外の機関に提供する場合
 - (3) 遺伝子解析研究の一部を委託する受託者に試料等又は遺伝情報を提供する場合
- 5 研究責任者は、試料等提供者等の人権の保障及び特許権等の知的財産権の保護に配慮しながら、遺伝子解析研究の進捗状況及びその結果を、定期的に又は試料等提供者若しくは代諾者等の求めに応じて、分かりやすく説明又は公表しなければならない。

第3章 研究の申請、審査、許可、変更及び迅速審査手続

(申請手続)

第6条 遺伝子解析研究を実施しようとする研究責任者は、遺伝子解析研究許可申請書(別記様式第1号)に、研究計画書を添付の上、所属長(自治医科大学看護短期大学にあっては短期大学学長。以下同じ。)の承認を得て、学長に申請するものとする。

- 2 前項に規定する研究計画書には、次に掲げる事項を記載しなければならない。
 - (1) 試料等提供者の選定方針(合理的に選択していることがわかる具体的な方法。試料等提供者が疾病や薬剤反応性異常を有する場合等にあつては、病名又はそれに相当する状態像の告知方法等。)
 - (2) 研究の目的、方法(対象とする疾患、分析方法等。将来の追加、変更が予想される場合はその旨。第一群試料等提供者の場合には研究の必要性、不利益を防止するための措置等。)、期間、予測される成果、予測される試料等提供者に対する危険及び不利益並びに個人に関する情報の保護の方法(匿名化しない場合の取扱いを含む。)
 - (3) 試料等の種類及び量
 - (4) 共同研究機関の名称(あらかじめ共同研究機関を特定できない場合にはその理由及び将来参加が予測される共同機関の類型。)
 - (5) 研究責任者、インフォームド・コンセントのための説明者その他研究実施担当者の所属及び氏名
 - (6) インフォームド・コンセントのための手続及び方法
 - (7) インフォームド・コンセントを受けるための説明文書及び同意文書
 - (8) 代諾者等を必要とする試料等提供者が予定されている場合には、その試料等が研究のために必須である理由及び代諾者等の選定に関する基本的な考え方
 - (9) 遺伝情報の開示に関する考え方

- (10) 研究実施前提供試料等を使用する場合には、その試料等の提供の時期、提供を受けたときの同意の有無、同意を得ている場合にはその内容、同意がない又は不十分な場合には研究対象として使用する必要性
- (11) 他の研究実施機関から試料等又は遺伝情報の提供を受ける場合には、他の研究実施機関が受けるインフォームド・コンセントの内容
- (12) 試料等又は遺伝情報を国内外の公的研究機関、営利を目的としない団体の研究機関又は他の大学に対して提供する場合には、次の事項
 - ア 提供の必要性
 - イ 提供先の機関名
 - ウ 大学において行われる匿名化の方法
 - エ 匿名化しない場合には、その理由及び個人識別情報を含む情報の保護の方法
 - オ 試料等を提供する機関において、提供する試料等の遺伝子解析研究を行うか否か
 - カ 反復、継続して提供するか否か
- (13) 試料等若しくは遺伝情報を国内外の営利を目的とする団体の研究実施機関に提供する場合又は国内外の民間の機関に遺伝子解析の一部の作業若しくは研究用資材の作成を委託する場合には、次の事項
 - ア 提供の必要性
 - イ 提供先の機関名
 - ウ 大学において行われる匿名化の方法
 - エ 提供先における責任者の氏名、責任体制及び予定する契約の内容
- (14) 研究期間の終了後に研究遂行者が試料等を大学で保存する場合には、保存の方法及び必要性(他の研究への利用の可能性及び予測される研究内容を含む。)
- (15) ヒト細胞・遺伝子・組織バンクに試料等を提供する場合には、当該バンクを運営する機関の名称、当該バンクの名称及び責任者の氏名並びに試料等の匿名化の方法
- (16) 試料等を廃棄する場合には、廃棄の方法及びその際の匿名化の方法
- (17) 第二群、第三群又は第四群試料等提供者から試料等の提供を受ける場合には、遺伝カウンセリングの必要性の有無(第一群試料等提供者から試料等の提供を受ける場合には、試料等提供者等からの求めに応じ、遺伝カウンセリングを実施するものとする。)

(研究計画の審査)

第7条 学長は、前条第1項に規定する申請書を受理したときは、自治医科大学生命倫理委員会(以下「生命倫理委員会」という。)に当該研究計画実施の可否について諮問するものとする。

- 2 生命倫理委員会委員長は、学長から前項に規定する諮問があったときは、直ちに遺伝子解析研究倫理審査委員会(以下「遺伝子解析委員会」という。)に当該案件の審査を付託し、その審査結果を踏まえて生命倫理委員会において審査を行い、その内容について学長に遺伝子解析研究に関する答申書(別記様式第2号)をもって答申するものとする。
- 3 生命倫理委員会は、遺伝子解析委員会の審査結果に反して、試料等提供者等の不利益になるような答申をしてはならない。
- 4 生命倫理委員会は、遺伝子解析委員会が不承認の審査結果を提出した場合には、同じく不承認の答申をしなければならない。

(許可又は不許可)

第8条 学長は、前条第2項に規定する答申書を受理したときは、当該研究実施の許可又は不許可を決定し、申請者に対し遺伝子解析研究許可(不許可)決定通知書(別記様式第3号)を交付するものとする。

- 2 学長は、生命倫理委員会の答申に反して、試料等提供者等の不利益になるような決定をしてはならない。
- 3 学長は、生命倫理委員会が不承認の答申を提出した研究については、その実施を許可してはならない。

(研究計画の変更)

第9条 前条第1項の規定に基づき研究実施の許可を得た研究責任者は、当該研究計画の内容を変更するときは、遺伝子解析研究変更許可申請書(別記様式第4号)に、変更した内容が判別できるように記載した新たな研究計画書を添付のうえ、所属長の承認を得て、学長に申請するものとする。

- 2 前項の規定に基づく申請に対する許可又は不許可の決定手続は、前2条の規定を準用する。この場合において、前条中「遺伝子解析研究許可(不許可)決定通知書(別記様式第3号)」とあるのは、「遺伝子解析研究変更許可(不許可)決定通知書(別記様式第5号)」と読み替えるものとする。

(迅速審査手続)

第10条 生命倫理委員会は、第7条第1項の規定に基づき、学長から諮問を受けた研究計画又は変更研究計画の実施の可否について、次の各号に掲げる事項を審査するため、迅速審査手続を行うことができる。

(1) 研究計画の軽微な変更

- ア インフォームド・コンセントのための説明者その他研究実施担当者の異動
- イ 当初の研究計画では類型を記載した共同研究機関について、具体的な共同研究機関が定まったとき
- ウ 当初の研究計画では連結可能匿名化を行って使用することとしていた試料等を連結不可能匿名化するとき
- エ その他生命倫理委員会委員長が、研究計画の軽微な一部変更であって、試料等提供者の人権に重大な支障を来さないと判断した事項

(2) 既に学長の許可を受けた研究計画に準じて類型化されている研究計画であって、あらかじめ倫理委員会等において迅速審査手続を行うことの承認を得ている研究計画の審査

(3) 共同研究の分担研究であって、既に主たる研究実施機関において当該機関における倫理審査委員会の承認を受けた研究計画の審査

- 2 迅速審査手続は、生命倫理委員会委員長があらかじめ指名した遺伝子解析委員会委員2名(以下この条において「迅速審査委員」という。)の合意により行われるものとする。
- 3 迅速審査委員は、前項の規定に基づき審議された事項及び結果を他の遺伝子解析委員会委員及び生命倫理委員会委員(以下この条において「倫理委員会等委員」という。)に報告しなければならない。
- 4 前項の報告を受けた倫理委員会等委員は、生命倫理委員会委員長に対し、理由を付した上で、当該事項について、改めて倫理委員会等における審査を求めることができる。この場合において、生命倫理委員会委員長は、相当の理由があると認めるときは、速やかに第7条第2項の規定に基づく審査を開始しなければならない。
- 5 前項に規定する倫理委員会等委員の意見がない場合には、第2項に規定する合意の結果をもって、第7条第2項に規定する倫理委員会等の審議結果とみなすものとする。
- 6 この条に定めるもののほか、迅速審査手続に関して必要な事項は、生命倫理委員会において別に定める。

第4章 インフォームド・コンセント及び情報の開示
(試料等提供者の選定)

第 11 条 研究責任者は、試料等の提供の依頼を受ける者を不合理、不当又は不公平な方法で選んではならない。

2 研究責任者は、試料等の提供の依頼を受ける者が、疾病若しくは薬剤反応性異常を有する場合又はそれらの可能性がある場合には、その者が、病名又はそれに相当する状態像等の告知を受けていなければ、試料等の提供の依頼をすることができない。

(インフォームド・コンセント)

第 12 条 研究責任者は、試料等提供者からインフォームド・コンセントを受けなければ、試料等の提供を受けることができない。

2 研究責任者は、試料等提供者からインフォームド・コンセントを受けることが困難な場合であって、次に掲げるいずれかの要件を満たし、かつ、その者からの試料等の提供を受けなければ実施しようとしている研究が成り立たないと倫理委員会等が承認し、学長が許可した場合には、試料等提供者の代諾者等からインフォームド・コンセントを受けることができる。

(1) 試料等提供者が痴呆等により有効なインフォームド・コンセントを与えることができないと客観的に判断される場合

(2) 試料等提供者が死者であって、その生前における明示的な意思に反していない場合

(3) 試料等提供者が未成年者の場合(この場合においても、研究責任者は、試料等提供者が理解できる言葉で十分な説明を行うよう努めなければならないとともに、試料等提供者が 16 歳以上の場合には、代諾者とともに、試料等提供者からもインフォームド・コンセントを受けなければならない。)

3 研究責任者は、代諾者等からインフォームド・コンセントを受けようとする場合には、代諾者等を選定する考え方について、国の指針等に準拠して研究計画書に記載し、学長の許可を受けるものとする。

(インフォームド・コンセントの撤回)

第 13 条 試料等提供者又は代諾者等は、自らが与えたインフォームド・コンセントについて、いつでも不利益を受けることなく撤回することができる。

2 研究責任者は、試料等提供者又は代諾者等からインフォームド・コンセントの撤回があった場合には、原則として、当該試料等提供者に係る試料等及び研究結果を匿名化して廃棄しなければならない。ただし、次のいずれかの場合には廃棄しないことができる。

(1) 当該試料等が連結不可能匿名化されている場合

(2) 廃棄しないことにより個人識別情報が含まれている情報が明らかになるおそれ極めて小さく、かつ、廃棄作業が極めて過大である場合等やむを得ない場合

(3) 既に研究結果が公表されている場合の研究結果

(インフォームド・コンセントの説明文書)

第 14 条 研究責任者は、インフォームド・コンセントを受ける手続においては、試料等提供者又は代諾者等に対し、十分な理解が得られるよう、次に掲げる事項を記載した文書を用いて説明を行わなければならない。

(1) 試料等の提供は任意であること。

(2) 試料等の提供の依頼を受けた者は、提供に同意しないことにより不利益な対応を受けないこと。

(3) 試料等提供者又は代諾者等は、自らが与えたインフォームド・コンセントについて、いつでも不利益を受けることなく撤回することができること。

(4) 試料等提供者又は代諾者等により同意が撤回された場合には、当該撤回に係る試料等及び研究結果が連結不可能匿名化されている場合等を除き、廃棄されること。

(5) 試料等提供者として選ばれた理由

- (6) 研究の目的、方法(対象とする疾患、分析方法等。将来の追加、変更が予想される場合にはその旨。第一群試料等提供者の場合には研究の必要性、不利益を防止するための措置等。)及び期間
- (7) 研究責任者の氏名、職名及び所属名
- (8) 予想される研究結果並びに試料等提供者等に対して予想される危険及び不利益(社会的な差別等社会生活上の不利益も含む。)
- (9) 試料等提供者等の希望により、他の試料等提供者等の個人に関する情報の保護及び研究の独創性の確保に支障が生じない範囲内で研究計画及び研究方法についての資料を入手又は閲覧することができること。
- (10) 提供を受けた試料等又はそれから得られた遺伝情報についての連結可能匿名化又は連結不可能匿名化の別及び匿名化の具体的方法。匿名化できない場合にあっては、その旨及びその理由
- (11) 試料等又はそれから得られた遺伝情報を他の機関へ提供する可能性及びその場合は、倫理委員会等により、個人識別情報が含まれている情報の取扱い、提供先機関名、提供先における利用目的が妥当であることについて、審査されていること。
- (12) 遺伝情報の開示に関する事項
- (13) 将来、研究の成果が特許権等の知的財産権を生み出す可能性があること。特許権等の知的財産権を生み出した場合の想定される帰属先
- (14) 試料等から得られた遺伝情報は、匿名化された上、学会等に公表され得ること。
- (15) 試料等の保存及び使用方法
- (16) 研究終了後の試料等の保存、使用又は廃棄の方法(他の研究への利用の可能性と予測される研究内容を含む。)
- (17) 試料等をヒト細胞・遺伝子・組織バンクに提供し、一般的に研究資源として分譲することがあり得る場合には、バンクの学術的意義、当該バンクを運営する機関の名称、当該バンクの名称及び責任者の氏名並びに提供される試料等の匿名化の方法
- (18) 遺伝カウンセリングの利用に係る情報(第一群試料等提供者の場合には、遺伝カウンセリングが利用可能であること等)
- (19) 試料等の提供は無償であること。
- (20) 問い合わせ、苦情等の窓口

2 研究責任者は、第一群試料等提供者からインフォームド・コンセントを受ける場合には、遺伝カウンセリングの利用に関する情報を含めて説明を行うとともに、必要に応じて遺伝カウンセリングを実施しなければならない。

(他機関からの提供試料等のインフォームド・コンセントの確認)

第 15 条 研究責任者は、他の研究実施機関から試料等又は遺伝情報の提供を受ける場合には、当該試料等又は遺伝情報に関するインフォームド・コンセントの内容を当該他の研究実施機関から文書等によって確認しなければならない。

(研究実施前に受けるインフォームド・コンセント)

第 16 条 研究責任者は、遺伝子解析研究の実施前に、遺伝子解析研究又は関連する医学研究に使用することを想定して、試料等提供者又は代諾者等からインフォームド・コンセントを受けるとともに、その時点において予想される具体的研究目的を明らかにするとともに、個人に関する情報が、匿名化の可能性を含めて、どのように管理され、かつ、保護されるかを説明し、理解を得なければならない。

(遺伝情報の試料等提供者の希望による開示)

第 17 条 研究責任者は、個々の試料等提供者の遺伝情報が明らかとなる遺伝子解析研究に関して、試料等提供者が、自らの遺伝情報の開示を希望している場合には、原則として開示しな

なければならない。ただし、遺伝情報がそれを提供する十分な意義がなく、開示しないことについて試料等提供者のインフォームド・コンセントを受けている場合には、この限りでない。

- 2 研究責任者は、試料等提供者のインフォームド・コンセントに際し、遺伝情報の開示をしないことにつき同意が得られているにもかかわらず、当該試料等提供者が事後に開示を希望した場合には、次項の場合を除き、当該試料等提供者の遺伝情報を開示しなければならない。
- 3 研究責任者は、多数の人又は遺伝子の遺伝情報を相互に比較することにより、ある疾患と遺伝子の関連又はある遺伝子の機能を明らかにしようとする遺伝子解析研究等であって、当該情報が当該試料等提供者の健康状態等を評価するための情報としての精度又は確実性に欠けており、当該試料等提供者に知らせるには十分な意義がない研究であることにつき研究計画書に記載され、当該研究計画書が倫理委員会等の承認を受け、学長から許可を得た場合には、遺伝情報を開示しないことができる。この場合において、研究責任者は、当該試料等提供者に遺伝情報を開示しない理由を分かりやすく説明しなければならない。
- 4 研究責任者は、試料等提供者が未成年者の場合に、当該未成年者が自らの遺伝情報の開示を希望している場合には、開示した場合の精神的な影響等を十分考慮した上で、当該未成年者に開示することができる。ただし、当該未成年者が16歳未満の場合には、当該未成年者の代諾者の意向を確認し、これを尊重しなければならない。
- 5 研究責任者は、未成年者の遺伝情報を開示することによって、差別、養育拒否、治療への悪影響が心配される場合には、学長に報告しなければならない。この報告を受けた場合、学長は、開示の前に、必要に応じ、開示に係る倫理委員会等の意見を聴き、又は、当該未成年者とその代諾者との話し合いを求める措置を講じなければならない。

(遺伝情報の試料等提供者の希望による非開示)

第18条 研究責任者は、個々の試料等提供者の遺伝情報が明らかとなる遺伝子解析研究に関して、試料等提供者が、自らの遺伝情報の開示を希望しない場合には、開示してはならない。

- 2 研究責任者は、試料等提供者が自らの遺伝情報の開示を希望しない場合であっても、その遺伝情報が試料等提供者等の生命に重大な影響を与えることが判明し、かつ、有効な対処方法があるときは、学長に報告しなければならない。この報告を受けた場合、学長は、特に次に掲げる事項について考慮した開示に関する倫理委員会等の意見を求め、その意見に基づき、研究責任者、当該試料等提供者の診療担当医師、当該診療科長及び自治医科大学附属病院長又は自治医科大学附属大宮医療センター長と協議しなければならない。その結果を踏まえ、研究責任者は試料等提供者に対し、十分な説明を行った上で、当該試料等提供者の意向を確認し、なお開示を希望しない場合には、開示してはならない。

- (1) 試料等提供者等の生命に及ぼす影響
- (2) 有効な治療法の有無及び試料等提供者の健康状態
- (3) 血縁者が同一疾患等に罹患している可能性
- (4) インフォームド・コンセントに際しての研究結果の開示に関する説明内容

(遺伝情報の試料等提供者以外への非開示)

第19条 研究責任者は、試料等提供者の遺伝情報を試料等提供者以外の者から求めがあっても、試料等提供者の同意がない場合には、原則として開示してはならない。

- 2 研究責任者は、試料等提供者の代諾者等(未成年者の代諾者を除く。)が、試料等提供者の遺伝子情報の開示を希望する場合には、学長にその対応について指示を求めなければならない。この指示を求められた場合、学長は、当該代諾者等が開示を求める理由又は必要性を倫理委員会等に諮った上で、その意見に基づき対応を決定するものとする。
- 3 研究責任者は、試料等提供者が未成年者の場合に、当該未成年者の代諾者から当該未成年者の遺伝情報の開示の求めがあったときは、当該代諾者にこれを開示することができる。た