

201135003A

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究(難病関係研究分野)

小児科・産科領域疾患の大規模遺伝子配列解析による  
病因解明とゲノム解析拠点整備

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 梅澤 明弘

平成24(2012)年4月

厚生労働科学研究費補助金  
再生医療実用化研究事業

小児科・産科領域疾患の大規模遺伝子配列解析による  
病因解明とゲノム解析拠点整備

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 梅澤 明弘

平成24（2012）年4月

# 目 次

I. 総括研究報告書	
小児科・産科領域疾患の大規模遺伝子配列解析による 病因解明とゲノム解析拠点整備 .....	3
梅澤 明弘	
II. 分担研究報告書	
1. 性分化疾患、小児内分泌疾患、先天奇形症候群の遺伝子解析 .....	11
深見 真紀	
2. 大規模シーケンスのデータ解析技術の開発および 常在細菌叢ゲノムの解析 .....	39
服部 正平	
3. ゲノム変異と疾病の連関を解析するバイオインフォマティクス .....	41
高木 利久	
4. 小児科・産科領域疾患の大規模遺伝子配列解析による 病因解明とゲノム解析拠点整備 .....	43
秦 健一郎 他	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	75
VI. 研究成果の刊行物・別刷り .....	79

# I. 総括研究報告書

小児科・産科領域疾患の大規模遺伝子配列解析による  
病因解明とゲノム解析拠点整備（H23－実用化（難病）－一般－003）

研究代表者：梅澤明弘 所属：独立行政法人国立成育医療研究センター研究所副所長

研究要旨：遺伝学的解析手法の発展により、家系症例を収集可能な単一遺伝性疾患や、大きな染色体構造異常を有する疾患の多くで、原因遺伝子が同定されている。その一方で、多くの小児先天性疾患、異常妊娠は、未だ遺伝要因が明らかでない。これらの疾患は、稀少性に加え、点変異や微細欠失、多因子、あるいは *de novo* 変異等の背景があると推測され、従来の遺伝学的手法では責任遺伝子の同定が困難であり、次世代シーケンサーやマイクロアレイ技術による網羅的配列解析が必須かつ極めて有効と期待される。実際に、すでに様々な疾患で、これらの配列解析技術を利用し、多くの画期的研究成果が上げられている。しかし、小児科・産科疾患の原因遺伝子同定への応用例は少なく、ゲノム解析体制の整備が喫緊の課題である。本研究計画では、小児の難治性疾患を中心とし、原因不明の成育疾患のゲノム解析を行い、関連遺伝子変異あるいは関連遺伝子多型の同定を目的とする。また、他の拠点形成研究班や 6NC バイオバンクと連携し、小児疾患のゲノム解析拠点の形成を行う。

梅澤 明弘（独）国立成育医療研究センター  
深見 真紀（独）国立成育医療研究センター  
服部 正平 東京大学  
高木 利久 東京大学  
松本 健治（独）国立成育医療研究センター  
野村 伊知郎（独）国立成育医療研究センター  
小野寺 雅史（独）国立成育医療研究センター  
奥山 虎之（独）国立成育医療研究センター  
秦 健一郎（独）国立成育医療研究センター  
東 範行（独）国立成育医療研究センター  
藤原 成悦（独）国立成育医療研究センター  
中村 浩幸（独）国立成育医療研究センター  
田上 昭人（独）国立成育医療研究センター  
浅原 弘嗣（独）国立成育医療研究センター  
高田 修治（独）国立成育医療研究センター  
村島 温子（独）国立成育医療研究センター  
中澤 温子（独）国立成育医療研究センター  
新関 寛徳（独）国立成育医療研究センター  
堀川 玲子（独）国立成育医療研究センター  
藤野 明浩（独）国立成育医療研究センター  
大矢 幸弘（独）国立成育医療研究センター

遺伝要因が明らかでない。これらの疾患は、稀少性に加え、点変異や微細欠失、多因子、あるいは *de novo* 変異等の背景があると推測され、従来の遺伝学的手法では責任遺伝子の同定が困難であり、次世代シーケンサーやマイクロアレイ技術による網羅的配列解析が必須かつ極めて有効と期待される。実際に、すでに様々な疾患で、これらの配列解析技術を利用し、多くの画期的研究成果が上げられている。しかし、小児科・産科疾患の原因遺伝子同定への応用例は少なく、ゲノム解析体制の整備が喫緊の課題である。

本研究計画では、小児の難治性疾患を中心とし、原因不明の成育疾患のゲノム解析を行い、関連遺伝子変異あるいは関連遺伝子多型の同定を目的とする。また、他の拠点形成研究班や 6NC バイオバンクと連携し、小児疾患のゲノム解析拠点の形成を行う。

## A. 研究目的

遺伝学的解析手法の発展により、家系症例を収集可能な単一遺伝性疾患や、大きな染色体構造異常を有する疾患の多くで、原因遺伝子が同定されている。その一方で、多くの小児先天性疾患、異常妊娠は、未だ

## B. 研究方法

### 全エクソン解析による *de novo* 変異同定

約 60 Mb の全エクソン配列を網羅したオリゴキャプチャーで、ゲノム DNA からエクソン領域を選択的に捕捉回収し、次世代シーケンサー（HiSeq、GAII、SOLiD）で網羅的

に解読する（冗長度 10X 以上）。情報解析は、BWA による Mapping、dbSNP との異同比較、変異の及ぼすアミノ酸置換程度の評価、KEGG パスウェイなどの一連のアノテーションパイプラインにより行う。また、シークエンサーメーカー仕様の各種ソフト（Mapping, CNV, Inversion, SNPs, Large Indel, Small Indel 等）も活用する。さらに、OMIM と文献情報データベースへのアクセスツールを利用して、迅速な責任遺伝子候補の同定とその生物学的機能注釈を行う。なお、454 等を用いた変異の validation を行う。

### ターゲットリシーケンスによる既知・未知変異同定

すでに疾患責任領域が同定・推定されている疾患では、責任領域の任意配列を網羅したオリゴプローブを設計し、疾患責任領域を選択的に回収し、次世代シークエンサーで網羅的に配列解析する。

### ウイルスベクター挿入部位の解析

ベクター特異的な配列をプライマーとして、LMA-PCR 法（linear amplification-mediated PCR）により挿入ベクターおよび隣接する配列を取得し、次世代シークエンサー（ロシュ社 GS juniro, 454 等）を用いてベクター挿入部位を確認する。

### 全 cDNA 配列解析

疾患標的臓器から RNA を回収し、cDNA ライブラリーを作製し、次世代シークエンサーで網羅的配列解析を行い、Whole Transcriptome Analysis (Coverage, Known Exons, Splice junctions, Gene Fusions など) の解析ツールを活用し、transcriptome 解析、疾患特異的 splicing variants 同定、キメラ遺伝子同定、small RNA の同定に利用する。

### 網羅的一塩基多型解析

マイクロアレイ技術を用い、全ゲノム関連解析、未知微細欠失同定を含む染色体構造解析を行う。

### 既知疾患関連多型の大量並列解析

マイクロアレイ技術およびマスアレイ技術を用い、既知の遺伝子多型を多数検体で効率的に解析する。

### エピゲノム解析

バイサルファイト法により非 DNA メチル化シトシンをウラシルに置換し、次世代シークエンサーおよびマイクロアレイシステムで、高解像度の DNA メチル化解析を行う。

### 常在細菌叢解析

被験者の糞便及唾液腔分泌物等よりその常在細菌叢ゲノム DNA を調製し、次世代シークエンサーを用いて 16S リボソーム遺伝子並びにメタゲノム解析を行う。細菌叢の機能特性（遺伝子組成）と定量的な菌種組成を COG、KEGG、16S、リファレンスゲノムへのマッピング等の情報学的、統計学的解析により解明する。なお、上記の様々な解析では、信頼度の高い変異検出を行うために、異なった原理のシークエンサーを併用することも検討する。

### （倫理面への配慮）

#### 1. 本研究の倫理面での特徴とその対策

後述のように、本研究の解析対象疾患は、すでに遺伝子解析に必要な倫理申請を国立成育医療研究センターの倫理委員会に行い、承認を得ている。また、一部の研究は、次世代シークエンサーを用いた包括的網羅的遺伝子配列解析についても承認を得ている（国立成育医療研究センター倫理委員会受付番号374）。未承認の解析対象疾患は、改めて包括的網羅的遺伝子配列解析を行う旨を倫理申請し、提供者の再同意を得た後に遺伝子解析を行う。外部の医療機関から臨床検体の提供を受ける際は、双方の機関の倫理委員会に申請を行い、全ての研究を適正に遂行する。

次世代配列解析を行うに当たっては、網羅的配列解析に対する包括的同意を得る必要があるが、加えて本研究の検体提供者は、ほとんどが未成年者であり、代諾により同意を得るといった特異性を伴う。この点に関

しては、特段の配慮と検討を行い、決して拙速な結論に至らぬよう、十分な社会的合意のもとに研究を進めていく必要がある。前述のバイオバンク事業の推進の為に、すでに6つのナショナルセンターが合同で、これらの倫理的問題の取り扱いの検討作業を共同で開始しており、これらの作業と協調し、適正かつ厳格な倫理面の運用の枠組みを作成する。

また、当センターでは、定期的（年2回以上）に生命倫理に関する講演を開催し、申請者のみならず大部分のセンター医師・研究者が受講しており、適切な生命倫理観を身につける事に機関として努力を払っている。

## 2. 難治性疾患を取り扱うための倫理的配慮

本研究では、ヒト由来細胞および実験動物を用いた研究、遺伝子解析、臨床研究が予定されているので、機関の外部委員を含めた倫理審査委員会において生命倫理、安全管理を厳重に審査する。成育医療研究センターでは、下記の倫理申請が既に承認されており、遺伝子解析研究を行う際の倫理的な手続きに関しては十分な配慮がなされている。また、包括的網羅的遺伝子配列解析についても、必要に応じて追加申請を行う。

- 受付番号 39 : 先天奇形症候群の遺伝子解析
- 受付番号 234 : 子宮内胎児発育異常の遺伝子・ゲノム解析
- 受付番号 350 : 先天性代謝異常症および自己免疫性肝炎、劇症肝炎、突発性門脈圧亢進症、肝外門脈閉塞症、Budd-Chiari 症候群、肝内結石症、肝内胆管傷害等の病態解明と患者に由来する生体試料の収集・バンク化
- 受付番号 351 : ヒト神経組織・細胞の保存及びそれを用いた遺伝子解析
- 受付番号 362 : アトピー性皮膚炎、尋常性魚鱗癬における皮膚バリア機能遺伝子変異の解析
- 受付番号 365 : 新生児、乳児消化管ア

レルギー（Food-Protein Induced Enterocolitis Syndrome ; N-FPIES）の診断検査法開発、病態解明に関する研究

- 受付番号 371 : 新生児、乳児消化管アレルギー（Food-Protein Induced Enterocolitis Syndrome ; N-FPIES）の病態解析のための患者登録システムの開発と発症頻度に関する研究
- 受付番号 372 : 先天代謝異常症に関する研究
- 受付番号 374 : 肥厚性皮膚骨膜炎における原因遺伝子変異の検索
- 受付番号 379 : リンパ管腫に関する基盤研究
- 受付番号 382 : Rubinstein-Taybi 症候群の臨床診断基準の策定と新基準にもとづく有病率に関する調査
- 受付番号 391 : X 染色体の数的・構造的異常に起因する疾患における X 染色体からの遺伝子発現解析
- 受付番号 394 : 小児におけるリウマチ性・自己免疫性疾患の病態にかかわる遺伝子機能解析
- 受付番号 396 : ヒト肝細胞・組織を用いた創薬研究および肝疾患・病態に関する基礎研究
- 受付番号 398 : アレルギー発症機序の解明に向けたアレルギー出生コホート研究と免疫ヒト化マウス作製
- 受付番号 399 : 自然免疫異常により発症する NEMO 異常症ならびに慢性肉芽腫症における難治性腸炎の全国実態調査
- 受付番号 406 : 早産のゲノム疫学研究
- 受付番号 410 : 肝移植後の EB ウイルス関連リンパ増殖性疾患に関する研究
- 受付番号 435 : 不育症における原因遺伝子のゲノムワイド関

連解析

- 受付番号 440 : 新生児および乳幼児肝  
血管腫に対する研究  
受付番号 454 : ダウン症者の退行症状  
に関する横断調査

### 3. ヒト細胞に関する倫理

国立成育医療研究センターでは「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針」に基づきヒト ES 細胞に関する医学研究が適性に行われるよう、ヒト ES 細胞研究倫理審査委員会が組織されている。ヒト ES 細胞研究に関する各種規程（「ヒト ES 細胞研究倫理審査委員会規程」、「ヒト ES 細胞樹立に関する規程」、「ヒト ES 細胞分配に関する規程」、「ヒト ES 細胞使用に関する規程」）も整備され、機関全体として生命倫理及び医の倫理に基づき適切に行う（国立成育医療センターヒト ES 細胞研究倫理審査委員会：<http://www.ncchd.go.jp/essaibou/es.htm>）。申請者らは、当該センターが定期的（年 2 回以上）に開催している生命倫理に関する講演を受講し、適切な生命倫理観をみにつけ常に配慮し研究を実施する。

国立成育医療センター研究所（機関内番号 ES 倫 2）

文部科学大臣確認番号:18 諸文科振第 832 号

倫理委員会の承認かつ実施施設の長の許可を得て、全ての研究を遂行する。国立成育医療センター研究所においては、ヒト細胞の培養に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている（国立成育医療研究センター受付番号 49、平成 15 年 10 月承認、受付番号 55、平成 16 年 11 月追加承認、受付番号 146、平成 17 年 4 月承認、受付番号 156、平成 17 年 7 月承認、受付番号 197、平成 18 年 6 月承認、受付番号 201、237、238、平成 19 年 6 月承認）。また、それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、最新の社会的な影響を十分に考慮する。なお、研究協力者に倫理専門家を加え、本研究遂行にあたって新たな倫理的問題が生じないよう、常にモニタリングを行い、必要に応じて意見交換を行う予定である。

### 4. 実験動物を用いることに対する倫理的配慮

実験動物を用いる研究については、各施設の動物実験指針に準拠して研究を実施する。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

### C. 研究結果

解析チームに博士研究員二名、技術補助員一名を配置し、次世代シーケンサーを中心とした大規模高速配列解析を行った。全エクソン配列解析では、解析症例とマッチングさせた対照群の配列情報も併せて取得し、変異アレルの出現頻度、アミノ酸置換を伴う *de novo* 変異についてフィルタリングを行い、疾患原因候補を絞り込んだ。センター内でバイオインフォマティクス担当者（研究協力者 当センター研究所 中林室長）が一次解析を行い、高度な情報処理が必要とされる次世代シーケンサー解析結果のアノテーション・変異解析データベース構築等は、大量ゲノム情報解析を専門とする分担者研究者 服部と高木（東京大学柏キャンパス）と連携して進めた。

データベース構築は、特に、疾患とゲノム変異との相関性の観点に注意し、OMIM や種々の疾患データベース、アップデートに対応した文献情報データベースへのリンクを念頭に入れてデザインを行う。また、個人保護を最大限遵守するため、まず本課題関連研究者（分担者および協力者）と共有できるセキュリティの高い管理下（ローカルネットあるいは VPN 以上）で実施し、課題ごとに臨床上有用と判断できる状況になったものから、専門医や当該領域研究者がコントロールアクセス可能なシステム構築を行なった。

### D. 考察

国立成育医療研究センターには、全国から難治性疾患・稀少疾患が集積すると共に、厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業に研究代表として採択されたものだけでも 34 件を有しており、大規模な遺伝子配列解析が有用と予想される症例をすでに多数収集している。また、現在ナショナルセンター 6 施設が共同で構築構想を進めているバイオバンク（6NC バイオバンク）において、当施設は難治性疾患患者由来の



iPS 細胞をバンク化する予定であり、これらもゲノム解析を行う。加えて対照群は、当センターが長期にわたり独自に行っているコホート研究から、厳密にマッチングさせた症例を選択し、十分な数を準備可能である。6NC バイオバンクでは、検体の収集に止まらず、遺伝子解析に対する包括的な同意を得るための倫理的な枠組みについて、協調して検討し、社会的合意に基づく運用を行うための基盤を共同で整備する。特に、本研究で解析対象とする患者の多くは未成年者である為、インフォームドコンセントおよびインフォームドアセントの取得には特段の配慮と準備を行う。データベース構築および情報発信も共同で取り組み、汎用性の高いプロトコールを作成運用し、海外を含めた他の研究機関との有益な情報交換を目指す。

#### E. 結論

**原因不明とされてきた難治性疾患、稀少疾患の関連遺伝子変異および関連遺伝子多型の同定は、確定診断法の開発に直接つながる。また、解明した原因遺伝因子を臨床情報と併せて解析することで、新たな疾患概念の提唱・予防・予後予測、更には画期的な治療法の開発への展開応用が期待できる。**長年にわたり成育医療センターが独自に行ってきたコホート研究の資産を有効活用し、正確な情報を伴った対照群を選定できる事から、精度の高い研究成果が期待でき、利用価値の高い疾患遺伝因子のリファレンスデータベースを構築できる。

遺伝子治療や再生医療に用いる細胞は、臨床応用の際には安全性の評価が必須である。ゲノム解析による安全性評価は、今後標準的手法となる事が予想される。本研究で行うこれらの試料の安全性評価は、直接には本センターで行う遺伝子治療や再生医療に貢献でき、間接には追従する他の医療機関の遺伝子治療や再生医療の貴重な参考データとして活用、あるいは厚生行政の指針等に活用できる。

更に将来は、国立成育医療研究センターの特色を生かし、出生前からの正確な臨床情報と、両親のゲノム情報も網羅した、ゲノム疫学への展開応用が可能である。その一方で、網羅的包括的な遺伝情報を取得するに当たっては、倫理的問題への対応の十

分な検討を行い、社会的合意を踏まえた慎重な運用が必要である。以上の特色を活用し、倫理面の諸問題にも配慮した上で 6NC バイオバンクと協調することで、将来のゲノム疫学に耐えうる検体収集とデータベースの制度設計と構築が可能となり、本邦の医学研究の発展に多大な貢献を成す事が期待される。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 取得特許  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## II. 分担研究報告書

性分化疾患、小児内分泌疾患、先天奇形症候群の遺伝子解析

研究分担者 国立成育医療研究センター研究所 分子内分泌研究部長 深見真紀

研究要旨

小児難治性疾患の遺伝子解析について研究を行った。主な成果は下記の点である。1) 未成年者を対象とした遺伝子解析研究における倫理について検討し、説明文書・同意文書を作成した。さらに倫理委員会で承認を得た。この文書は、我が国における今後の小児の遺伝子解析の説明文書のモデルとなると推測される。2) サンガー法を中心とする従来法を用いて性分化疾患、小児内分泌疾患、先天奇形症候群患者の遺伝子解析を行い、多数の既知遺伝子変異を同定した。これには、世界で2報目となる PRKAR1A 遺伝子変異などが含まれる。3) アレイ CGH により、CYP19A1 遺伝子周辺領域などのゲノムコピー数異常を同定した。重要な成果として、プロモーター領域の重複と遺伝子上流の微小欠失が遺伝子過剰発現を招き、ヒトの遺伝病の原因となることを世界ではじめて明らかとした。4) 次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析について検討した。本年度は、ターゲットエンリッチメント、アンプリコンシーケンス、エクソーム解析を開始した。

共同研究者  
なし

連携研究者  
鏡雅代：(独) 国立成育医療研究センター 分子  
内分泌研究部 上級研究員  
瀧本哲也：(独) 国立成育医療研究センター 臨  
床研究センター室長  
緒方勤：浜松医科大学 小児科教授

他の厚生労働省難治性疾患克服研究事業研究班  
との連携

本研究は、厚生労働科学研究費補助金難治性疾患  
克服研究事業(性分化疾患における診断法の確立  
と治療指針の作成)(レリーワイル症候群の診断  
法確立と治療指針作成)(遺伝性女性化乳房の実  
態把握と診断基準の作成)(14番染色体父親性・  
母親性ダイソミー関連疾患の実態把握と治療指  
針の作成)(全ゲノムエクソン配列解析法による  
先天性内分泌疾患の分子基盤の解明)と連携して  
研究を推進した。

A. 研究目的

本研究の目的は、小児難治疾患患者の遺伝子解  
析によって発症機序の解明を行うことである。  
本研究の必要性は、上記の疾患が生涯にわたる  
QOL 低下を招く病態であるにもかかわらず、そ

の大部分が原因不明であり、有効な治療法が確立  
されていない点にある。事実、われわれは、厚生  
労働省難治性疾患克服研究事業の研究代表者・研  
究分担者として、これらの疾患の調査研究を行い、  
対象疾患患者の中で既知遺伝子異常が同定され  
る症例が比較的少数であることを明らかとして  
いる。したがって、このような疾患の発症には、  
未知のゲノム異常が関与すると推測される。また、  
患者の臨床像からは、原因遺伝子変異以外の遺伝  
子多型や環境因子が疾患重症化因子として機能  
していることが示唆される。

さらに近年、単一遺伝子疾患と多因子遺伝疾患  
の間に位置する概念として、Oligogenic disorder  
(少数遺伝子重複変異)が提唱された。この代表  
例がゴナドトロピン分泌不全症である。この疾患  
の発症には、FGFR1, FGF8, PROK2, PROKR2 など  
10以上の遺伝子が関与する。最近、多数の患  
者と正常人の解析により、これらの遺伝子の1  
アレルの異常は患者と正常人の両方に存在する  
が、2アレル以上の変異は患者のみに認められ  
ることが明らかとなった。したがって、このよう  
な疾患患者の遺伝子解析では、すべての遺伝子  
の変異解析を行う必要がある。

次世代シーケンサーやアレイ Comparative  
genomic hybridization (CGH) に代表される近年  
の遺伝子解析技術の進歩は、多数の患者における

効率的遺伝子解析を可能とし、さらに従来同定することが困難であったゲノム微細構造異常やインプリンティングの破綻の検出を可能とした。このような新規技術を活用することにより、新規疾患発症機序が解明されると期待される。しかし、新規技術を用いた解析を行う際には、倫理基盤の整備、結果の再現性の確認、効率的機器運用などの検討が必要である。

本年度われわれは、未成年者の遺伝子解析における倫理基盤の整備を行い、従来法と新規遺伝子解析法によって小児難治疾患患者の代表的疾患である男性外性器異常、成長障害、性成熟疾患の解析を行った。

## B. 研究方法

### 1. 小児の遺伝子解析における倫理基盤の整備

現在、未成年者の遺伝子解析における適切な説明および同意の取得方法は確立されていない。とくに、網羅的遺伝子変異解析における代諾同意の取得については、指針が統一されていない。このことは、小児先天疾患研究の推進の上で大きな障害となっている。なお近年、日本医学会から臨床遺伝子解析に関するガイドラインが発表された。また、日本人類遺伝学会など関連 10 学会からもガイドラインが公表されている。本研究では、これらのガイドラインに基づき、小児を対象とする遺伝子解析における適切な倫理取得法について検討した。そして、国立成育医療研究センター臨床研究センター、日本小児科学会臨床遺伝子診断ワーキンググループとの連携により、説明文書の作成を行った。さらに倫理委員会基礎部会、倫理委員会で討議を行い、承認を得た。

表1. これまでに集積された検体(代表的疾患)

疾患	検体の種類	概数
<b>性分化疾患</b>		
尿道下裂・停留精巣	外陰部皮膚	270
尿道下裂・停留精巣	ゲノムDNA	280
早発性卵巣機能不全	ゲノムDNA	65
早発性卵巣機能不全	不死化細胞株	50
46, XX 精巢性性分化疾患	ゲノムDNA	15
46, XX 精巢性性分化疾患	不死化細胞株	7
46, XY 卵巣性性分化疾患・性腺無形成	ゲノムDNA	25
46, XY 卵巣性性分化疾患・性腺無形成	不死化細胞株	15
精子形成障害	ゲノムDNA	28
<b>性成熟疾患</b>		
思春期早発症	ゲノムDNA	14
思春期早発症	不死化細胞株	8
性成熟進行不全症	ゲノムDNA	150
性成熟進行不全症	不死化細胞株	80
<b>先天奇形症候群</b>		
先天奇形症候群(骨形成異常症を含む)	ゲノムDNA	150
先天奇形症候群(骨形成異常症を含む)	不死化細胞株	90
口唇・口蓋裂	皮膚線維芽細胞	60
<b>成長障害</b>		
胎児発育障害	ゲノムDNA	60
胎児発育障害	不死化細胞株	40
低身長	ゲノムDNA	300
低身長	不死化細胞株	100
<b>その他</b>		
先天性甲状腺機能低下症	ゲノムDNA	20
小児期発症糖尿病	ゲノムDNA	500
<b>日本人正常コントロール</b>		
男性	ゲノムDNA	250
女性	ゲノムDNA	250

## 2. 小児難治性疾患患者の遺伝子解析

### (1) 検体の集積

分子内分泌研究部では、これまでに 4000 以上の検体を集積している。本研究では、さらに新規検体の集積を行った。なお、幼少児では十分な採血量の確保が困難であり、しばしば解析に必要な DNA、RNA 量が得られないことがある。このため、本研究では、可能な限り EB ウイルス感染不死化リンパ芽球様細胞株または線維芽細胞株を樹立し、十分な核酸を抽出した。また、末梢血のほか、組織（手術検体）、唾液、爪などの採取を行った。唾液、爪については、専用の核酸抽出キットを用いて採取した。検体と同時に臨床データの集積を行い、さらに可能な限り両親と非罹患同胞の検体を採取した。

検体は、国立成育医療研究センター病院各診療科の他、全国と国外の医療機関の共同研究者によって集積された。なお、検体採取にあたっては、検体採取機関で適切なインフォームドコンセント・アセントの取得を行い、連結可能匿名化が行われた。当研究所ではすべて匿名化番号で検体を管理した。

### (2) 遺伝子解析

下記の検体の解析を開始した。

#### ① 性分化疾患

①-1 性腺形成不全：性腺無形性、性腺異形成、精巣形成不全、卵巣形成不全

①-2 性腺ホルモン産生異常：テストステロン産生異常、抗ミュラー管ホルモン産生障害、エストロゲン産生異常

①-3 性腺ホルモン抵抗症：アンドロゲン不応症、5 $\alpha$ 還元酵素欠損症、エストロゲン不応症

①-4 ゴナドトロピン産生異常：LH 産生異常、FSH 産生異常

①-5 ゴナドトロピン抵抗症：高ゴナドトロピン性性腺機能障害

①-6 外陰部・性管原基形成不全：ウォルフ管形成不全、ミュラー管形成不全、外陰部形成異常

①-7 その他：アロマターゼ欠損症、ゴナドトロピン非依存性思春期早発症

#### II 成長障害

① 成長ホルモン単独欠損症-成長ホルモン抵抗症

② 上記以外の下垂体機能異常症

③ IGF とその受容体の異常

④ 骨形成異常症：アントレービックスラー症候群、ピエールロバン症候群など

⑤ 原因不明の家族性低身長症

#### III. 先天奇形症候群

① 染色体異常症：ターナー症候群、クラインフェ

ルター症候群など

- ②単一遺伝子異常症：ヌーナン症候群、レリーワイル症候群など
- ③ダイソミー関連疾患：プラダーウィリー症候群、
- ④シルバーラッセル症候群、14 番染色体ダイソミー関連疾患など
- ⑤原因不明の多発奇形症候群：IMAGE 症候群
- ⑥原因不明の奇形・多因子疾患と推測される奇形：口唇口蓋裂、小眼球症・無眼球症

IV. その他の内分泌疾患

- ①先天性甲状腺機能低下症
- ②小児期発症 1 型糖尿病

本研究で解析した既知疾患遺伝子の例

性分化疾患・性成熟疾患

POR  
STAR  
SCC  
CYP21A2  
CYP19A1  
AR  
5 $\alpha$  HSD  
SF1/Ad4BP  
MAMLD1

下垂体機能障害

OTX2・SOX2  
PIT1  
FGFR1  
KAL1  
LHX4  
PROKR2・PROK2  
FGF8  
KISS1・GPR54  
TACR3・TAC3

先天奇形症候群

SHOX  
GATA3  
PTPN11

成長障害

GH1  
GHRHR  
GHR

(3) 解析方法

①既知遺伝子の直接塩基配列決定

単一遺伝子変異が疑われる症例では、血球、組織、唾液由来のゲノム DNA を抽出し、当該遺伝子のエクソン、エクソン-イントロン境界領域、プロモーター領域を主体として PCR で増幅した。PCR 産物のサンガー法直接塩基配列決定法により塩基置換を検索した。本研究で解析した代表的既知疾患責任遺伝子を表に示す。ヘテロ接合性変異が同定された場合は、PCR 産物のサブクローニングで正常アレルと変異アレルをそれぞれ増幅し、変異を確認した。

同定された変異は、バイオインフォマティクスの手法によってデータベース登録の有無を検討した。本研究で使用した主なデータベースの URL は下記のとおりである。Ensemble; [http://asia.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Info/Index](http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index) ; UCSC Genome blouse, <http://genome.ucsc.edu/>; NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; JSNP data base, <http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/>.

②同定された変異の病的意義の検討

患者で未登録のミスセンス変異が同定された場

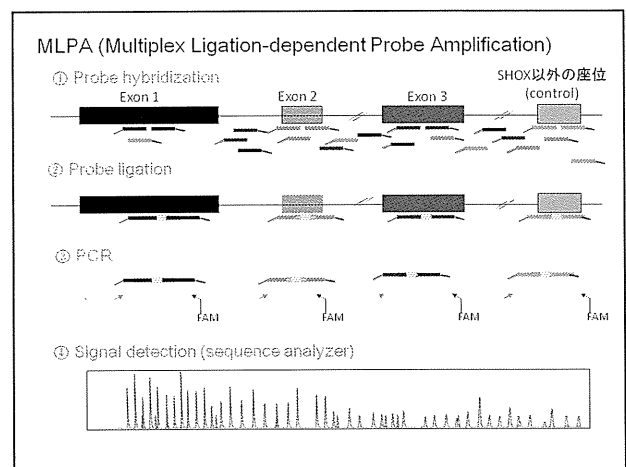
合は、正常人における当該変異の有無、患者家系における変異と疾患の連鎖の有無を検討した。また、バイオインフォマティクス解析により、蛋白立体構造予測、異種間保存性、機能ドメインとの位置関係などに基づいて当該変異の病的意義の有無について検討した(esypred 3D Web server, <http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred/>)。また、ルシフェラーゼレポーターベクターを用いた発現解析、ゲルシフトアッセイ、Western blotting などにより、変異蛋白の機能を検討した。スプライシング異常もしくは転写障害が疑われる場合は、白血球、組織、唾液由来の mRNA を抽出し、逆転写で cDNA を作成して塩基配列決定を行った。Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) が疑われる場合には、細胞を NMD 阻害剤 (Cycloheximide, 100  $\mu$ g/ml, Sigma) で 8 時間培養後に mRNA を抽出し、RT-PCR を行った。

③コピー数解析

ゲノム欠失/重複は、下記の方法で解析した。

③-1 Multiple ligation probe amplification (MLPA)

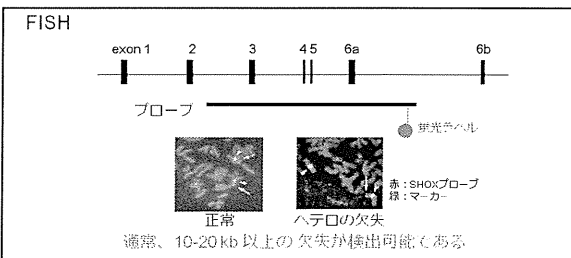
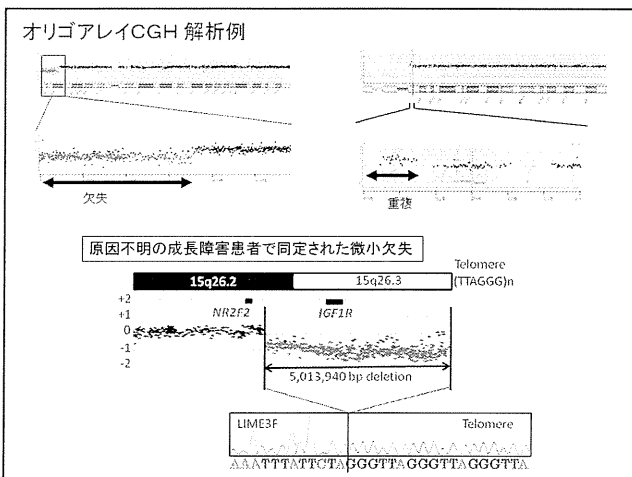
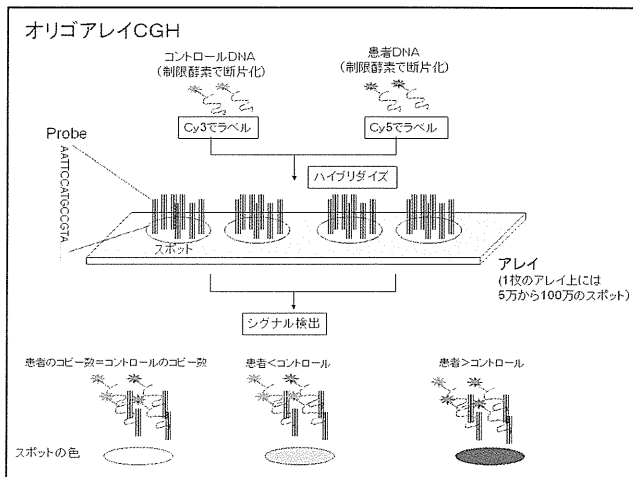
ゲノム上の複数の座位の数的異常を同時に解析する方法であり、ゲノム DNA を鋳型として標的座位特異的なプローブのハイブリダイゼーションと蛍光プライマーを用いた PCR 法を行なうことで、1 から 30 程度の座位の欠失および増幅の有無を検討する。本研究では、市販の MLPA キット (MRC Holland) を使用し、必要な場合は新規プローブを設計してキットに加えた。シグナルは、キャピラリーシーケンサー (Beckman Coulter Fullerton, CA, USA) で検出した。



③-2 Comparative genomic hybridization (CGH) アレイ

ゲノムコピー数を効率的に解析する方法であり、現在は研究レベルで行なわれている。プローブとなる DNA 断片をあらかじめスライドガラス上に固定し、標識したゲノム DNA をハイブリダイズさせ、そのシグナル強度によりコピー数を判定す

る。患者 DNA とコントロール DNA を競合的にハイブリダイズさせ、患者において増幅または欠失している領域を検出する。現在、1枚のアレイスライド上には、最大数十万のプローブが搭載される。本研究では、全ゲノム解析（カタログアレイ）もしくは染色体特定領域のカスタムアレイを作成し解析を行った（Agilent technologies、 Palo Alto, CA）。



### ③-3 Fluorescence in situ hybridization (FISH)

特定の染色体領域における欠失、重複、転座などの構造異常を検出する方法である。患者の染色体標本に、解析対象領域の塩基配列に相補的な標識プローブをハイブリダイズさせ、その蛍光シグナルの位置や強度から異常を判定する。異なった蛍光色素で標識した複数のプローブを使用することにより、複数の領域を同時に解析することも

可能である。検出できる異常のサイズは使用するプローブによって異なるが、通常、数 kb 以上の範囲が対象となる。

### ③-4 マイクロサテライト解析

両親の検体が得られた場合は、対象領域に位置するマイクロサテライトの繰り返し配列数を解析した。蛍光標識したプライマーを用いて PCR を行い、PCR 産物の長さと同量をシーケンサーで解析した。

### ④次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異解析

上記解析で変異が同定されなかった性分化疾患患者と成長障害患者を対象に、次世代シーケンサーを用いた効率的候補遺伝子変異解析について検討した。本研究では、ターゲットエンリッチメント（Agilent technologies）とアンプリコンシーケンス（Illumina）、エクソーム（Agilent technologies）解析を開始した。シーケンサーデータの取得は、Illumina 社 HiSeq1000, MySeq を使用した。

（倫理面への配慮）

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針（平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）を遵守して施行した。すべての検体は、書面で患者本人もしくは代諾者からインフォームドコンセントを得た後に採取され、各医療機関で匿名化された。網羅的遺伝子解析については、下記に述べる新規説明書・同意書を用いて同意を取得した。

## C. 研究結果

### 1. 倫理基盤の整備

小児を対象とする網羅的遺伝子解析の説明文書、同意文書モデルとして、先天奇形症候群、成長障害、性分化疾患を対象とした文書を作成した（添付資料1）。重要な点は下記のとおりである。

#### 1) インフォームドアセントの手續及び方法

被験者が未成年者の場合には、親権者を代諾者として同様の説明を行ったうえで、本研究参加の同意を文書にて取得する。なお、患者が未成年者であっても原則として以下の手順により同意またはアセントの取得に努める。

①患者が16歳以上の場合：代諾者からの文書同意に加え、患者本人からも文書による同意を取得する。

②患者が7歳以上16歳未満の場合：代諾者からの文書同意に加え、患者自身には、年齢に応じた説明を行い、理解を得るよう努めた上で、文書による意思確認を行う（インフォームドアセント）。

③患者が7歳未満の場合:代諾者からの文書同意に加え、患者自身の口頭によるインフォームドアセントを取得する。

④患者が16歳未満であったため、代諾者より同意を得た症例については、患者が20歳に達した時点で改めて本研究への登録に関する患者本人からの文書同意を得ることを原則とする。

## 2) 遺伝情報の開示に関する考え方

①本研究で得られた遺伝子解析の結果、得られた遺伝情報のうち、既知責任遺伝子の異常については、患者本人の健康に役立つと考えられるため、本人あるいは代諾者に開示する。

②当該患者の遺伝子に、疾患に関連する可能性が高いと考えられるが病原性が確立されていない変異(多型)が同定された場合、また、疾患感受性多型が同定された場合、その情報は患者本人の健康に役立つ可能性がある。このような場合の情報開示については、同意取得時に患者もしくは代諾者の意思を確認し、開示希望があった場合にのみ開示する。また、結果開示前に、患者もしくは代諾者から意思の変更の申し出があった場合は、その希望にしたがって開示の有無を決定する。

③当該患者の遺伝子に疾患には関連しない、または関連する可能性が低いと考えられる変異(多型)が同定された場合は、原則として開示しない。これは、このような遺伝情報の臨床的意義が不明であり、当該情報が個人の健康状態の評価や管理に十分な意義があるとはいえず、かえって誤解による弊害や混乱を招く危険性があるためである。

なお、説明文書には、この incidental findings の非開示方針について下記のように記載した。

「偶然、あなたの遺伝子に先天奇形症候群には関連しない、または関連する可能性が低い遺伝子変化が存在すると疑われることがあります。このような変化の一部は、先天奇形症候群以外の病気に関係する可能性があります。しかし、この変化がほんとうにあなたの遺伝子にあって、他の病気と関係するかどうかを調べるには、多くの作業と長い時間をかけた研究が必要となります。今回の研究は、先天奇形症候群の原因を解明することを目的としていますので、先天奇形症候群に関係する可能性がない、または可能性が低い遺伝子の変化について解析をすることはありません。したがって、あなたの遺伝子に先天奇形症候群に関連する可能性が低いと考えられる変化があると疑われた場合には、その結果をあなたもしくはご家族にお伝えすることはありません。」

## 3) 開示に対する希望に変化が生じる可能性

上記2)に関して、患者もしくは家族の開示への

の希望が変化する可能性について検討し、対応する文書を作成した。

上記の文書は、国立成育医療研究センター倫理委員会で承認された。(課題番号 512 性分化疾患・性成熟疾患における遺伝的原因の探索: 9月30日承認。課題番号 518 先天奇形症候群における遺伝的要因の探索、519 成長障害における遺伝的要因の探索:12月18日承認)

## 2. 遺伝子解析

### ①既知遺伝子の直接塩基配列決定

多数の既知遺伝子変異が同定された。46XY 性分化疾患の原因となるアンドロゲン受容体遺伝子サイレント変異、尿道下裂を招く MAMLD1 スプライス変異、卵巣機能に影響を与える SF1/Ad4BP 変異などが新たに見出された。また、レリーワイル症候群患者において、新規 SHOX ミスセンス変異が同定され、国際 SHOX 変異データベース (http://hyg-serv-01.hyg.uni-heidelberg.de/lovd/index.php?select\_db=SHOX) に登録された。一方、重要な成果として尿道下裂、先天性甲状腺機能低下症、ゴナドトロピン分泌不全症、下垂体機能低下症において既知変異陽性患者の割合が半数以下であり、これらの疾患の発症には未知遺伝子の関与が大きいことが明確となった。

### ②同定された変異の機能解析

SF1、OTX2、SOX2、FGFR1 などの変異についてレポーターアッセイ、Western blotting などの解析を行った。代表的な成果として、下記の2つが挙げられる。

第1に、偽性副甲状腺機能低下症 Ia 型を呈し GNAS 遺伝子に変異を持たない女兒1例において、世界で2報目となる PRKAR1A 遺伝子変異(p.T239A)を同定した。PRKAR1A は、cAMP カスケードの構成因子で、PKA 活性に対し抑制的に働く蛋白である。この変異は、cAMP 結合ドメイン B に位置していることが見出された。cAMP 反応エレメントを組み込んだルシフェラーゼベクターを用いたレポーターアッセイでは、p.T239A 変異体を強制発現させた細胞において、野生型より Forskolin に対する反応性が低下していることが見出された。さらに、患者のリンパ芽球様細胞株では、Forskolin 処理後の CREB 蛋白のリン酸化が低下していることが確認された。以上の成績は、PRKAR1A の変異が GPCR シグナリングの異常を介して、複合型ホルモン抵抗性を生じることを明確とするものである。

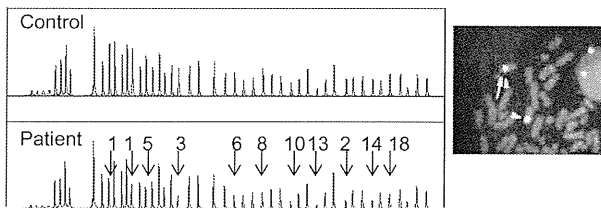
第2に、POR 遺伝子のエクソン12と13のフ

レームシフト変異が NMD の対象となることを見出した。これは、最終エクソンまたは最終エクソン-エクソン境界から 55 塩基以内の領域に含まれない早期終止コドンが NMD の対象になるとの仮説に一致する。一方、エクソン 1 のフレームシフト R48fsX63 が NMD をうけないことから、NMD の制御に何らかの未知の機構が関与することが示唆される。

### ③コピー数解析

#### ③-1 MLPA

成長障害患者、先天性副腎過形成症患者、複合型下垂体機能低下症患者、先天性骨系統疾患患者を対象として MLPA を行い、それぞれ、GH1、CYP21A2、OTX2、SHOX 遺伝子欠失などを同定した。重要な成果として、成長ホルモンとゴナドトロピン欠損症を有する患者において、はじめて FGFR1 遺伝子のヘテロ接合性欠失を見出した。その後この欠失は FISH で確認され、アレイ CGH によって範囲が決定された。この成績は、FGFR1 半量不全が、ゴナドトロピン単独欠損症のみならず、複合型下垂体機能低下症の原因となることをはじめて明確とするものである。MLPA は、少量のゲノム DNA でコピー数異常の同定が可能であることから、欠失主体で発症する疾患の遺伝子診断にはきわめて有用であると推測される。



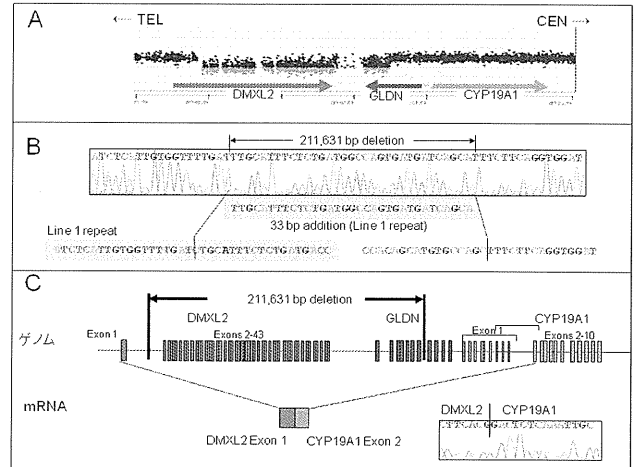
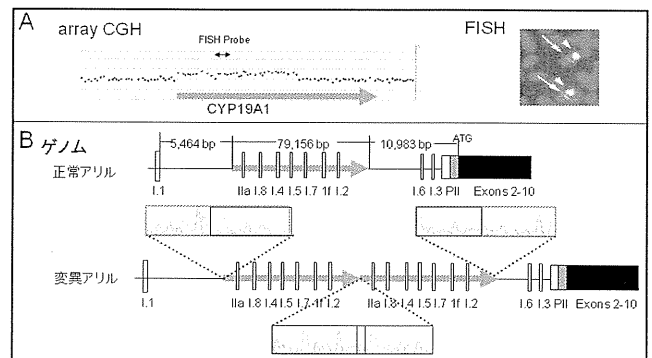
#### ③-2 CGH アレイ

本研究期間では、①MLPA で欠失が同定された患者の欠失範囲の決定、②遺伝子内変異陰性患者を対象とした欠失/同定の確認を行った。①については上述のように複数の患者で欠失範囲が明らかとなった。②に関する代表的成果を下記に述べる。

遺伝性女性化乳房 (HG) の発症原因は不明であった。本研究では、臨床的に HG と診断された男性 6 家系 18 例 (家系 A-F) の CGH 解析を行った。その結果、家系 A-F において、CYP19A1 遺伝子翻訳領域上流にヘテロ接合性ゲノム構造異常が同定された。家系 A と B では CYP19A1 スタートコドンから 10,983 bp 離れた領域に 79,156 bp の大きさのタンデム重複が同定された。この領域は、CYP19A1 の 11 の非翻訳エクソン 1 のうちの 7 つ (エクソン IIa, 1.8, 1.4, 1.5, 1.7, 1f, 1.2) を包含し

ていた。この重複の切断点は、反復配列外にあり、1 塩基の相同性を有していた。

家系 C では、CYP19A1 スタートコドンから 141,758 bp 離れた領域に 211,631 bp の欠失が同定された。この欠失は、隣接遺伝子 DMXL2 エクソン 2-43 と GLDN エクソン 5-10 を包含していた。この欠失の切断点は、一方は LINE 1 配列内、他方は反復配列外にあり、33 塩基の由来不明の塩基配列の挿入を伴っていた。家系 D-F では CYP19A1 スタートコドンから 174,315 bp 離れた領域に 165,901 bp の欠失が同定された。この欠失は、DMXL2 エクソン 2-43 を包含していた。この欠失の 2 つの切断点はともに LINE 1 配列内にあり、12 塩基の重複を伴っていた。



5'-RACE により、患者の CYP19A1 mRNA について検討した。家系 A と B では、CYP19A1 エクソン 1 のうちの 1 つを有する正常な mRNA クローンのみが検出された。一方、5'-RACE 産物をテンプレートとして、各エクソン 1 に位置するプライマーを用いて行った PCR では、5'側にエクソン 1.4、3'側にエクソン 1.8 が結合したクローンが得られた。このクローンはスプライスエラーによって生じた産物であると推測される。このクローンの存在は、重複によって遠位に増えた 1.4 プロモーターから転写が生じていることを示すものである。

家系 C-F では、CYP19A1 エクソン 1 のうちの 1

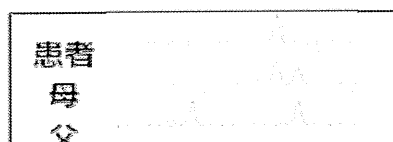


つを有するクローンのほか、*DMXL2* エクソン 1 を含む *DMXL2-CYP19A1* キメラクローンが得られた。このキメラ mRNA は、全 5'-RACE 産物の 2-5% を占めていた。このクローンの存在は、欠失によって *DMXL2* エクソン 1 と *CYP19A1* エクソン 2 の間でスプライスが生じ、その結果 *CYP19A1* 翻訳領域が *DMXL2* プロモーターによる制御を受けるようになったことを示唆する。

本研究によって、プロモーター領域の重複と遺伝子上流の微小欠失が遺伝子過剰発現を招き、ヒトの遺伝病の原因となることがはじめて明らかとなった。HG の発症には多様な染色体微細構造異常が関与し、本症患者の重症度は当該患者において獲得されたプロモーターの機能と構造を反映すると推測される（添付資料 2）。

### ③-3 マイクロサテライト解析

X 染色体上の遺伝子 *AR* の CAG リピート多型を利用して、マイクロサテライト解析により X 不活化パターンの検討を行った。また、14 番染色体、7 番染色体、11 番染色体の片親性ダイソミーの同定を行った。これらの成果は、マイクロサテライト解析が、欠失の同定だけでなく、各アレルの親由来やメチル化パターンの検討に有用であることを明確とするものである。



### ④ 次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異解析

上記の解析で遺伝子異常が同定されなかった患者を対象として、次世代シーケンサーを用いた変異解析について検討を開始した。

#### 1) ターゲットエンリッチメント

①性腺形成不全：122 の既知疾患責任遺伝子・候補遺伝子を対象としてターゲットエンリッチメント（Agilent 社、Sureselect を使用）システムの構築を行った。50 検体のゲノム DNA を不死化細胞株から抽出し、超音波破碎を行った後にライブラリを作成した。シーケンスは HiSeq1000（Illumina 社）で行った。現在、バイオインフォマティクス解析を開始している。

②成長障害：上記 1) と同様に 39 遺伝子を対象としたシステムを構築した。現在 100 検体のシーケンスデータ集積を終了し、解析を行っている。

③性成熟疾患：同様に 49 遺伝子を対象としたシステムを構築した。現在 75 検体の解析を開始した。

#### 2) アンプリコンシーケンス

①尿道下裂・停留精巣：20 の既知疾患責任遺伝

子・候補遺伝子を対象としてアンプリコンシーケンス（Illumina 社、Truseq を使用）を設計した。現在、96 症例の解析を開始している。シーケンスは MySeq（Illumina 社）で行う。

#### 3) エクソーム解析

原因不明の腎機能障害患者家系、甲状腺機能低下症患者家系を対象としてエクソーム解析を開始した。現在、データの取得を行っている。

## D. 考察

### 1. 倫理基盤の整備

未成年者の遺伝子解析における説明と同意取得の基盤となる文書の作成を行った。この文書は、網羅的変異解析や全ゲノムコピー数解析にも対応可能であり、今後の小児医療現場における倫理取得のモデルとなると考えられる。今後、関連諸学会と連携し、文書の改良を行うと同時に、一般に情報発信していく計画である。一方、遺伝子検査としての既知遺伝子の解析には、今回作成した文書より簡潔なものが望ましい。今後、臨床遺伝子診断に特化した簡潔な文書の作成を行う計画である。

### 2. 従来法による遺伝子変異解析

多数の既知遺伝子の範囲が同定された。遺伝子変異の情報は、患者の治療法の選択、予後予測、遺伝カウンセリングなどにおいてきわめて有用である。したがって、継続的で確実な遺伝子診断技術の提供は、我が国における小児医療のレベルの向上のために必須であると考えられる。複数の遺伝子解析技術を組み合わせることにより、効率的変異同定が可能となる（添付資料 3）。また今後、下記に述べる新規遺伝子解析技術の導入などにより、より安価で確実な解析システムの構築が可能になると期待される。

### 3. 新規技術を用いた遺伝子解析

近年開発された遺伝子解析技術により、従来法では同定できなかったさまざまな遺伝子変異が同定可能となった。これには、新規遺伝子の変異、ゲノム微細構造異常、遺伝子翻訳領域外の異常、インプリンティングの破綻などが含まれる。本研究においても、このような異常が多数の患者で同定された。今後、われわれがこれまでに集積している臨床検体を最新の方法で解析することにより、小児疾患を招く新たな遺伝子異常が解明されると期待される。また、本研究では新たな検体を集積するために、関連諸学会（日本小児内分泌学会・日本小児遺伝学会など）と連携し、全国の専門医への呼びかけを行った（添付資料 4）。

なお、アンプリコンシーケンスなど、次世代シーケンサーを運用することにより、従来法よ

り大幅にコストを抑えた遺伝子解析が可能となる。これは、尿道下裂や成長障害など、罹患率が高く関連遺伝子が多い疾患患者の解析を可能とするものである。今後、これらの方法の有効性と限界を明確にし、個々の疾患の遺伝子解析システムを構築していく必要がある。

今後、新規遺伝子が発見され新規発症機序が解明されれば、その知見は、従来原因不明であった患者の診断を可能とし、エビデンスに基づいた治療法開発に役立つと期待される。さらに、このような診断技術の向上と治療の適正化は、医療コスト削減と医療均てん化の基盤となる。

#### E. 結論

従来の遺伝子解析法と近年開発された新規解析報を組み合わせて、多数の小児患者における遺伝子解析を行った。これまでに多数の遺伝子変異が同定され、新規発症機序が見出された。今後、さらに新たな原因遺伝子の発見、疾患成立機序の解明がなされると期待される。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Fukami M Tsuchiya T, Takada S, Kanbara A, Asahara A, Igarashi A, Kamiyama Y, Nishimura G, Ogata T. Complex Genomic Rearrangement in the *SOX9* 5' Region in a Patient with Pierre Robin Sequence and Hypoplastic Left Scapula. *Am J, Med Genet A* 2012 (in press)

##### 2. 講演・シンポジウム

1. 深見真紀. 小児内分泌疾患診療に役立つ分子遺伝学の知識 第45回 小児内分泌学会学術集会教育セミナー 2011年10月6日、大宮
2. 深見真紀. 小児内分泌疾患の分子遺伝学：最近の進歩と今後の展望 静岡県小児内分泌学術講演会 2011年12月1日、浜松
3. 深見真紀. チトクロームP450オキシドレダクターゼ (POR) 異常症の分子基盤：POR遺伝子発現制御機構の解明 第16回生殖内分泌学会学術集会シンポジウム 2011年11月19日、東京
4. 深見真紀. SHOXの基礎と臨床 第29回 小児代謝性骨疾患研究会 2011年12月3日、東京
5. Fukami M, Shozu M, Soneda S, Kato F, Inagaki A, Takagi H, Hanaki K, Kanzaki S, Ohyama K, Sano T, Nishigaki T, Yokoya S, Binder G, Horikawa R, Ogata T. Aromatase Excess Syndrome Caused by Cryptic Duplications and

Deletions Leading to Gain-of-Function of CYP19A1. ENDO annual meeting, June 4-7, 2011, Boston

6. Soneda S, Fukami M, Ogata T. Identification of the Promoter Region for Cytochrome P450 Oxidoreductase Gene. ENDO annual meeting, June 4-7, 2011, Boston
7. Fukami M, Shozu M, Soneda S, Kato F, Inagaki A, Takagi H, Hanaki K, Kanzaki S, Ohyama K, Sano T, Nishigaki T, Yokoya S, Binder G, Horikawa R, Ogata T. Aromatase excess syndrome: identification of cryptic duplications and deletions leading to gain-of-function of CYP19A1 and assessment of phenotypic determinants. 50<sup>th</sup> annual ESPE meeting, 25-28 September, 2011, Glasgow
8. Ogata T, Soneda S, Fukami M. Identification and characterization of the promoter region for cytochrome P450 oxidoreductase gene. 50<sup>th</sup> annual ESPE meeting, 25-28 September, 2011, Glasgow

#### 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

## 添付資料 1.

### 小児(未成年者)の遺伝子診断における倫理基盤の整備 先天奇形症候群の遺伝子解析に関する説明文書・同意文書

#### 「先天奇形症候群における遺伝的要因の探索」研究へのご協力について (ご本人あるいはご本人の代わりに説明を受けるかたへ)

あなた(注)は、先天奇形症候群にかかっている、または、その疑いがあります。この疾患の原因には、あなたが、もともと持つておられる遺伝子の変化や体質が関係している可能性があります。この疾患の原因を明らかにするために、遺伝子を調査する研究について、説明させていただきますので、ご理解のうえ、研究に協力してあなたの血液や体の一部を提供することに同意しても良いと考えていただける場合には、「遺伝子解析研究への協力の同意書」に署名することにより同意の表明をお願いいたします。心配なこと、わからないことがありましたら、ご遠慮なく担当医師にお尋ねください。

(注) あなたが提供者の代わりに説明を受けている場合には、その提供者のことです。

#### 1. 研究題目

先天奇形症候群における遺伝的要因の探索

#### 2. 遺伝子の解析を行うこと

《遺伝子とは》

「遺伝」という言葉は、「親の体質が子に伝わること」を言います。ここでいう「体質」の中には、顔かたち、体つきのほか、性格や病気に罹りやすいことなども含まれます。「遺伝」という言葉に「子」という字が付き「遺伝子」となりますと、「遺伝を決定する小単位」という科学的な言葉になります。人間の場合、約3万個の遺伝子が働いていますが、その本体は「DNA」という物質です。遺伝子は、染色体という構造物の上に載っています。

遺伝子には二つの重要な働きがあります。一つは、遺伝子が精密な「人体の設計図」であるという点です。受精した一つの細胞は、分裂を繰り返してふえ、一個一個の細胞が、「これは目の細胞」、「これは腸の細胞」と決まりながら、最終的には60兆個まで増えて人体を形作りますが、その設計図はすべて遺伝子に含まれています。第2の重要な役割は「種の保存」です。両親から子供が生まれるのもやはり遺伝子の働きです。

人類の先祖ができてから現在まで「人間」という種が保存されてきたのは、遺伝子の働きによっています。

#### 《遺伝子と病気》

こうした非常に大事な役割を持つ遺伝子の違いはさまざまな病気の原因になります。完成された人体を形作る細胞で遺伝子の違いが起きると、違いのある細胞を中心にその人限りの病気が生ずることがあります。これを体細胞変異といい、がんがその代表的な病気です。一方、ある遺伝子に生まれつき違いがある場合には、その違いが子、孫へと伝わってしまいます。この場合、遺伝する病気が出てくる可能性が生じます。

このように説明すると、遺伝子の変化が必ず病気を引き起こすと思われるかもしれませんが、事實はそうではなく、遺伝子の変化が病気を引き起こすことはむしろきわめてまれなことと考えられています。たとえば、一人一人の顔や指紋が違っているのと同じように人によって生まれつき遺伝子に違いが見られ、その大部分は病気との直接の関わりがないことがわかってきました。すなわち、遺伝子の変化のうちごく一部の变化のみが病気を引き起こし、遺伝する病気として気が付かれるのだと思われま

#### 《遺伝子解析研究への協力について》

最近、遺伝子に変化があると、先天奇形症候群になりやすいことがわかってきました。そこで、本研究では、患者さんの遺伝子に病気を引き起こす違いがあるかどうかを調べ、病気の原因を明らかにしようと考えています。

あなたは、この病気にかかっている、または、その疑いがあるので、血液、唾液、または手術によって取り出された体の一部を診療記録とともにこの研究に利用させていただきたいのです。血液、唾液の採取は大きな危険を伴いません。

具体的には、まず、あなたにこの研究への協力をお願いするため、研究の内容を含め、あなたが同意するための手続きについて説明を行います。あなたがこの説明をよく理解でき、あなたが研究に協力して血液や体の一部を提供することに同意しても良いと考える場合には、「遺伝子解析研究への協力の同意書」に署名することにより同意の表明をお願いいたします。

### 3. この研究は、何のために行うのでしょうか？（研究の目的・意義）

#### 《先天奇形症候群について》

ヒトの体は、受精した一つの細胞が分裂を繰り返してふえ、最終的には 60 兆個まで増えることによって形作られます。最近、遺伝子に変化があると、体を形成していく段階のどこかが障害され、先天奇形症候群になることがあることがわかってきました。