

しかし、このような病気がどのようにして発症するのかはまだ充分わかっていません。また、原因となる遺伝子が見つかっていない病気も多く残されています。さらに、一部の疾患では、症状が強いひとと軽いひとに大きな差がありますが、そのような差が生じる原因はほとんどわかっていません。

#### 《この研究の目的と意義》

この研究の目的は、あなた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るものです。この研究によって、将来、患者さんの正確な診断が可能になります。さらに、この研究は、病気の原因の解明につながる可能性があり、将来、新たな予防法や治療法が開発されるきっかけになると考えられます。

#### 4. 研究対象

本研究では、本研究では、以下に示す先天奇形症候群と診断された患者さん、あるいはこれらの疾患が疑われる患者さんを対象として遺伝子解析を行います。なお、遺伝子解析の結果により、あなたのご家族の方の遺伝子解析が重要となる場合があります。この場合、別途説明をいたします。

- 1) 染色体異常症：ターナー症候群など
- 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) インプリンティング疾患：プラダーウィリー症候群、シルバーラッセル症候群など
- 4) 原因不明の多発奇形症候群：IMAGE 症候群など

#### 5. 研究期間

この研究の実施期間は、平成 23 年から 5 年間の予定です。しかし、終了時に期間を延長して研究を継続する必要があると判断したときには、研究の継続を当センターの倫理委員会に申請し、承認を受けたうえで延長することがあります。

#### 6. 研究方法

##### 《検体および診療情報の提供について》

この研究にご同意いただいた方からは、通常の採血時に血液を 3-10 ml 余分に採取させていただきます。採血にともなう身体の危険性はほとんどありません。また、手術を受けられる場合には、手術で摘出された細胞のうち、廃棄されるものを解析に使用することが可能ですので、このような検体を採取させていただきます。また、唾液からも、量は少ないのですが、いくつかの解析に必要な検体が得られますので、唾液を採取させていただくことがあります。そして、少ない検体から採取できる DNA などの物質に限

りがあることから、同意を頂けたときには、試験管内で増えるリンパ球（これをセルラインと呼びます）や組織（これを線維芽細胞と呼びます）を作製し、採血をくりかえさずに遺伝子研究に必要な DNA を得る用意をする予定です。また、必要なときには RNA あるいは染色体という物質を調べることもあります。

これらの検体をつかって、DNA 中の遺伝子のかたちが他の人とどのように違うかを調べ、さらにあなたの症状との関係を調べます。今まで知られている遺伝子に異常が見つからない場合は、さらに細かく染色体の変化について調べたり、約 3 万個の遺伝子をひろく調べます。また、同じ病気の患者さんの検体が数多く得られた場合は、関連解析という方法で、先天奇形症候群を引き起こしやすくする遺伝子の変化を探します。

また、あなたについての、個人情報を含まない診療情報についても、あわせてご提供をお願いいたします。診療情報は、遺伝子研究で得られた結果を解釈するのにたいへん重要です。なお、ここでいう診療情報とは、診断及び治療を通じて得られた症状のつよさ、血液検査や画像検査の結果などの情報のことです。以後、さきに述べた血液、唾液、組織から得られた検体と、診療情報を合わせて、「試料」と呼びます。

#### 《試料の外部研究機関への提供について》

研究の進展によって、特に専門的な遺伝子解析が必要となった場合は、患者さんまたはあなたの試料を、国立成育医療研究センター外の以下の施設に送ることがあります。その場合は、それぞれの施設の倫理委員会で研究計画の審査を受け、承認された場合にのみ検体を送付します。ただし、後で述べるように、試料には個人名ではなく符号をつけて取り扱いますので、患者さんまたはあなたが特定されるような個人情報が提供されることはありません。

提供先の施設名

九州大学大学院医学研究院分子生命系部門（責任者：諸橋憲一郎教授）

浜松医科大学小児科（責任者：緒方勤教授）

慶應義塾大学小児科（責任者：長谷川奉延准教授）

## 7. 予想される結果

本研究によって、あなたの遺伝子に関して以下のような結果が得られる可能性があります。

- 1) 先天奇形症候群の原因となる変化が見つかる
- 2) 先天奇形症候群に関連している可能性が高いと考えられるが、確実に病気の原因であるかどうかはわからない違いが見つかる

3) 先天奇形症候群の直接の原因ではないが、これらの疾患にかかりやすくなる遺伝子の変化が見つかる

4) この研究ではあなたの遺伝子に変化が見つからない

なお、この研究によって、先天奇形症候群とは関連しない遺伝子の変化が偶然見つかる可能性があります。

## 8. 検体提供者にもたらされる利益および不利益

あなたの遺伝子に病気の原因となる変異が見つかった場合は、治療法の選択に役立つ情報が得られることがあります。また、血縁者が同じ遺伝体質をもっているかどうかを同様の検査によって確かめやすくなります。しかし、あなたの遺伝子に変化が見つかったとしても、その変化が病気の原因であるかどうかわからない場合には、治療法につなげることはできません。

また、現在の解析技術ではすべての遺伝子変化を検出することはできないため、本研究中で遺伝子の異常が見つからない場合にも、あなたが遺伝性疾患を持っていないと結論づけることは出来ません。

なお、提供していただく採血量は通常の検査での採血量と比べて特に多い量ではありませんので、健康への影響はほとんどないと考えられます。唾液、組織の採取では健康への影響はありません。次項で述べるように、患者さんまたはあなたの個人情報には厳重に保護されますので、本研究に参加されることによる、社会的な差別等、社会生活上の不利益はないものと考えられます。

## 9. 個人情報の保護について

遺伝子の研究結果は、様々な問題を引き起こす可能性があるため、他の人に漏れないように、取扱いを慎重に行う必要があります。あなたの血液などの試料や診療情報は、分析する前に診療録や検体の整理簿から、住所、氏名、生年月日などを削り、代わりに新しく符号をつけます。あなたとこの符号を結びつける対応表は、成育医療研究センターの個人情報管理者が厳重に保管し、国立成育医療研究センター内部の研究者や、他の研究機関に提供されることはありません。これを連結可能匿名化といいます。このようにすることによって、あなたの遺伝子の分析結果は、分析を行う研究者にも、あなたのものであると分からなくなります。また逆に、遺伝子解析の結果についてあなたに説明する場合など、必要な場合には、国立成育医療研究センターにおいてこの符号を元の氏名などに戻す操作を行えば、結果をお知らせすることも可能になります。

## 10. 研究協力が任意であること、撤回の自由

この研究への協力の同意はあなたの自由意思で決めてください。強制いたしません。また、同意しなくても、あなたの不利益になるようなことはありません。

一旦同意した場合でも、患者さんまたはあなたが不利益を受けることなく、いつでも同意を取り消すことができ、その場合は採取した検体や遺伝子を調べた結果などは廃棄され、診療情報などもそれ以降、研究目的に用いられることはありません。同意を撤回される場合には文書に必要事項を記入の上、問い合わせ窓口におわたし下さい。ただし、同意を取り消した時すでに研究結果が論文などで公表されていた場合などのように、試料や研究結果を廃棄することができない場合があります。

## 11. 研究計画の内容の閲覧

この研究の内容については、国立成育医療研究センターホームページに掲載されます。

## 12. 遺伝子解析研究終了後の検体の取扱の方針

あなたの検体は、原則として本研究が終了した際に、個人情報を含まず、どなたの検体であるのかがわからない形で、密封容器に廃棄するか、焼却することによって廃棄いたします。しかし、将来、医学の発展にともなって、先天奇形症候群に関する新しい研究がおこなわれる可能性があります。あなたに同意を頂けましたら、検体の残りを保存し、将来、新たな研究のために使わせていただきます。この場合も、検体には個人情報ではなく符号をつけて取り扱い、検体が使い切られるまで保存します。保存は国立成育医療研究センター分子内分泌研究部で行います。なお、保存された検体を用いて行う新たな研究は、国立成育医療研究センター倫理委員会の審査を受け、承認された場合にのみ実施されます。

## 13. 研究成果の公表

あなたの協力によって得られた研究の成果は、提供者本人やその家族の氏名などが明らかにならないようにした上で、学会発表や学術雑誌およびデータベース上で公に発表されることがあります。

## 14. 費用負担

ここで行われる遺伝子・ゲノム解析研究に必要な費用は、公的機関の研究資金・財団からの研究助成金から出されますので、研究協力にあたって特別な費用がかかることはありません。また、交通費や、試料のご提供に対する謝礼はありません。

## 15. 研究から生じる知的財産権の帰属

ご提供いただいた検体を用いた遺伝子解析研究の結果として、特許権などの知的財産権が生じる可能性があります。その権利は国、研究機関、民間企業を含む共同研究機関および研究遂行者などに帰属します。患者さんやあなたには帰属せず、また金銭等をお支払いすることはありません。これは諸外国を含む一般の研究機関に共通のルールです。また、その特許権などをもととして経済的利益が生じる可能性があります。これについても患者さんやあなたには権利があるとは言えません。

## 16. 遺伝子解析結果の開示

「7. 予想される結果」の項でのべたように、遺伝子解析で得られる結果には、いろいろの場合があります。結果をあなたにお知らせするかどうかについては、どのような結果が得られたかによって、以下のような原則で決定いたします。

1. あなたの遺伝子に先天奇形症候群を引き起こす違いがみつかった場合には、遺伝子解析結果についての説明を行います。
2. あなたの遺伝子に先天奇形症候群に関連する可能性が高いと考えられるが、確実に病気の原因であるかどうかはわからない違いが見つかることがあります。  
また、先天奇形症候群の直接の原因ではないが、これらの疾患にかかりやすくなる遺伝子の変化が見つかる場合があります。この時には、あなたが説明を望まれる場合に限り、遺伝子解析結果についての説明を行います。
3. 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。

上記1または2によって説明を受けたのち、あなたが再度結果の説明を受けたいと思われる可能性があります。このような場合は、診療を担当する医師・説明者・研究責任者にその旨申し出て下さい。なお、本研究期間終了後5年以後は遺伝子解析結果を保管できない場合があります。

上記2に関して、あなたの希望が変化する場合があります。このような場合は、結果開示前に、診療を担当する医師・説明者・研究責任者にその旨申し出て下さい。あなたが説明を望まれる場合にのみ、遺伝子解析結果についての説明を行います。

#### 17. 遺伝カウンセリングの体制

結果に関してあなたやご家族の方が、就職、結婚などへの影響などへの不安を感じたり、さらに詳しい情報を知りたいと思われる可能性があります。そのために成育医療研究センターにおいて専門医から検査の前後に遺伝カウンセリングを受けることができます。診療を担当する医師・説明者・研究責任者にその旨申し出てください。なお、遺伝カウンセリングでは、遺伝診療科の外来受診料金をお支払い頂くことになります。

本研究への参加のご同意の撤回、提供された個人情報の訂正、苦情、その他この研究に関することでわからないことや、心配なことなどがありましたら、いつでもご遠慮なく下記の問い合わせ窓口にお尋ねください。

#### 18. 問い合わせの窓口

〒157-8535 東京都世田谷区大蔵2-10-1

独立行政法人 国立成育医療研究センター 分子内分泌研究部

深見真紀

Tel: 03-5491-7120 (その後、自動音声にしたがって内線 7745)

#### 19. 本研究の研究責任者

深見真紀 (国立成育医療研究センター分子内分泌研究部部長)

---

## 同意書

独立行政法人国立成育医療研究センター総長 殿

私（私の子供）は、“先天奇形症候群における遺伝的要因の探索”について、説明書に基づいて、 医師 \_\_\_\_\_ より説明を受け、理解しましたので本研究に参加することを同意します。

説明を受け理解した項目（□の中にご自分でレを付けて下さい）

- 研究題目
- 遺伝子の解析を行うこと
- 研究の目的・意義
- 研究対象
- 研究期間
- 研究方法
- 予想される結果
- 検体提供者にもたらされる利益および不利益
- 個人情報の保護について
- 研究協力が任意であること、撤回の自由
- 研究計画の内容の閲覧
- 遺伝子解析研究終了後の検体の取り扱い
- 研究成果の公表
- 費用負担に関する事項
- 研究から生じる知的財産権の帰属
- 遺伝子解析結果の開示
- 遺伝カウンセリングに関する事項
- 問い合わせ先

1. 本遺伝子解析研究のために検体を提供することに同意します。

受診者のお名前 \_\_\_\_\_ (16歳以上は本人のご署名)

保護者のご署名 \_\_\_\_\_ 続柄 ( )

保護者のご署名 \_\_\_\_\_ 続柄 ( )

同意の上、署名した方は、次の2-6の質問の はい いいえ にレを付けて下さい。

2. 今回の解析終了後、DNA あるいは組織の一部が保存され、将来の研究に使用されることに同意します。(ただし、使用に関しては、新たに倫理委員会の承認を得ます。)

はい いいえ

3. 提供する血液から本遺伝子解析研究に必要な DNA を採取するためのセルライン (試験管内で増えるリンパ球) あるいは皮膚線維芽細胞の作製に同意します。

はい いいえ

4. 今回の解析終了後、セルラインあるいは皮膚線維芽細胞が保存され、将来の研究に使用されることに同意します。(ただし、使用に関しては、新たに倫理委員会の承認を得ます。)

はい いいえ

5. 本研究によって、先天奇形症候群に関連する可能性が高いと考えられるが、確実に病気の原因であるかどうかはわからない遺伝子の違いが見つかった場合、その報告を希望します。

はい いいえ

6. 本研究によって、先天奇形症候群の直接の原因ではないが、これらの疾患にかかりやすくなる遺伝子の変化が見つかった場合、その報告を希望します。

はい いいえ

平成\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日

受診者のお名前 \_\_\_\_\_ (16歳以上は本人のご署名)

保護者のご署名 \_\_\_\_\_ 続柄 ( )

保護者のご署名 \_\_\_\_\_ 続柄 ( )

説明者 (自署) \_\_\_\_\_ 職名 ( )

口頭アセントを取得 (6歳以上) した しない



## 同意の撤回

主治医 殿

( ) 私 \_\_\_\_\_ は、研究協力の同意を撤回します。  
(検体提供者またはそのかわりに説明を受けた方 (代諾者))

( ) 私 \_\_\_\_\_ は、研究期間終了後の検体の保存  
と解析に対する  
(検体提供者またはその代諾者)  
同意を撤回します。

※上記のいずれか、あるいは両方に丸をつけ、下線欄に該当する方のお名前をご記入下さい。

平成 \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

検体提供者氏名 \_\_\_\_\_  
(本人自署、もしくは代諾者記載)

※お子様の検体に関する請求の場合には、以下もご記入ください。

代 諾 者 自 署  
(続柄 : \_\_\_\_\_ )

この申請書は、主治医、または説明を行った医師宛てにご郵送下さい。  
なお、この書式でなくとも、下記の連絡先にご連絡いただければ対応いたします。

〒157-8535 東京都世田谷大蔵 2-10-1  
(独) 国立成育医療研究センター  
主 治 医  
説明を行った医師  
T E L

検体使用・保存中止の実施連絡文書

独立行政法人 国立成育医療研究センター  
分子内分泌研究部長 深見真紀 殿

下記の請求がありましたのでご連絡します。検体の処理をお願いします。

請求内容

- ( ) 私 \_\_\_\_\_ は、研究協力の同意を撤回します。  
(検体提供者またはその代諾者)
- ( ) 私 \_\_\_\_\_ は、研究期間終了後の検体の保存  
と解析に対する  
(検体提供者またはその代諾者)  
同意を撤回します。

検体コード番号 \_\_\_\_\_

平成 \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

(独) 国立成育医療研究センター  
主 治 医  
説明を行った医師

検体使用・保存中止の実施連絡文書

主治医 殿（説明者）

下記の申し出に従い、検体を処理いたしましたので、ご報告いたします。

請求内容

- ( ) 私 \_\_\_\_\_ は、研究協力の同意を撤回します。  
(検体提供者またはその代諾者)
- ( ) 私 \_\_\_\_\_ は、研究期間終了後の検体の保存  
と解析に対する  
(検体提供者またはその代諾者)  
同意を撤回します。

検体コード番号 \_\_\_\_\_

平成 \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

独立行政法人 国立成育医療研究センター  
分子内分泌研究部 深見真紀

検体使用・保存中止の実施確認文書

検体提供者 殿

下記のお申し出について、検体保存施設の責任者に連絡しました。また、別紙のとおり検体が処理されたことを確認する文書を受け取りましたのでご報告いたします。

( ) 私 \_\_\_\_\_ は、研究協力の同意を撤回します。  
(検体提供者またはその代諾者)

( ) 私 \_\_\_\_\_ は、研究期間終了後の検体の保存と解析に対する  
同意を撤回します。  
(検体提供者またはその代諾者)

検体の（ 使用 ・ 保存 ）を中止する申し出に対して、検体保存施設の責任者に連絡しました。

平成 \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

主治医（説明者） \_\_\_\_\_

遺伝子解析結果の開示に関する同意の変更文書

主治医 殿

私 \_\_\_\_\_ は、(検体提供者またはそのかわりに説明を受けた方(代諾者))

“先天奇形症候群における遺伝的要因の探索”に関する結果の説明を下記のように希望します。

1. 本研究によって、成長障害に関連する可能性が高いと考えられるが、確実に病気の原因であるかどうかはわからない遺伝子の違いが見つかった場合、その報告を希望します。  
はい いいえ
2. 本研究によって、成長障害の直接の原因ではないが、これらの疾患にかかりやすくなる遺伝子の変化が見つかった場合、その報告を希望します。  
はい いいえ

平成 \_\_\_\_年 \_\_\_\_月 \_\_\_\_日

受診者のお名前 \_\_\_\_\_ (16歳以上は本人のご署名)  
保護者のご署名 \_\_\_\_\_ 続柄 ( )  
保護者のご署名 \_\_\_\_\_ 続柄 ( )

説明者(自署) \_\_\_\_\_ 職名 ( )

口頭アセントを取得(6歳以上) した しない

添付資料 2

本研究によって明らかになったアロマターゼ過剰症の変異と疾患重症の関連

表 1. これまでに報告されたアロマターゼ過剰症患者の遺伝子異常と臨床所見

遺伝子異常	微小重複	微小欠失	染色体逆位
症例数	2家系4例	4家系14例	4家系5例
獲得プロモーター <sup>a</sup>	<i>CYP19A1</i>	<i>DMXL2</i>	<i>MAPK6, CGNL1, TLN2, TMOD3</i>
臨床症状			
乳房腫大発症年齢(歳)	10-13	7-11	5-8
乳房腫大重症度 (Tanner stage)	2-3	3-4	4-5
成人期身長	正常	正常	低身長
内分泌所見			
LH (基礎値)	正常	正常/低値	正常/低値
LH (GnRH負荷後 <sup>b</sup> )	正常/低値	さまざま	低値
FSH (基礎値)	低値	低値	低値
FSH (GnRH負荷後 <sup>b</sup> )	低値	低値	低値
T (基礎値)	正常/低値	正常/低値	正常/低値
T (hCG負荷後 <sup>c</sup> )	不明	正常	正常
E <sub>1</sub> (基礎値)	高値	高値	高値
E <sub>2</sub> (基礎値)	正常/高値	正常/高値	高値
E <sub>2</sub> /T 比	高値	高値	高値
文献	(3)	(3)	(1), (2)

T: testosterone; E<sub>1</sub>: estrone; E<sub>2</sub>: estradiol; GnRH: gonadotropin releasing hormone; hCG: human chorionic gonadotropin

<sup>a</sup> *CYP19A1* に結合しているプロモーターが本来制御している遺伝子

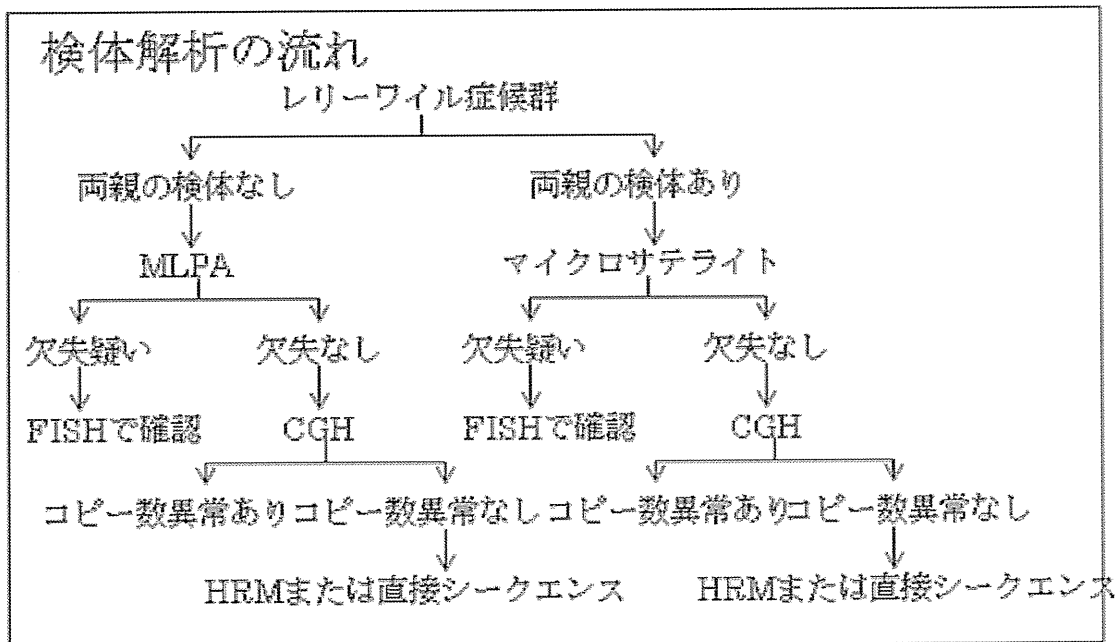
<sup>b</sup> GnRH 100 µg/m<sup>2</sup> (最大 100 µg) bolus i.v.; 血液採取 0, 30, 60, 90, 120分後.

<sup>c</sup> hCG 3000 IU/m<sup>2</sup> (最大5000 IU) i.m. 3日連続投与; 血液採取1日目と4日目

添付資料 3.

従来法とアレイ CGH を組み合わせた遺伝子解析システム

例) 先天奇形症候群(レリーワイル症候群)における効率的遺伝子解析



添付資料 4

臨床検体集積にあたって全国の専門医に送付した文書

2011年11月28日

担当医 殿

次世代遺伝子解析技術を用いた小児内分泌関連疾患の病因解明：  
プロジェクトへの参加のお願い

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事業

「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」班

研究代表者 長谷川奉延

「小児科・産科領域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」班

研究分担者 深見真紀

拝啓

今回、厚生労働省研究事業の一環として、次世代遺伝子解析技術を用いた小児内分泌関連疾患の病因解明プロジェクトが行われることになりました。本研究の目的は、小児内分泌疾患の患者さまの検体を、最新の遺伝子解析技術を用いて解析することによって新規疾患発症遺伝子や疾患成立機序を解明することです。

本研究は、慶應義塾大学小児科と（独）国立成育医療研究センターを解析拠点として行われます。慶應義塾大学小児科では、先天性内分泌疾患、すなわち①先天性下垂体機能低下症、②先天性甲状腺機能低下症、③先天性ステロイドホルモン産生異常（先天性副腎機能低下症、性分化疾患）、④先天性カルシウム代謝異常を対象として、国立成育医療研究センターでは、①性分化・性成熟疾患、②成長障害、③内分泌異常を伴う奇形症候群を対象として研究を推進します。なお、性分化・性成熟疾患に関しては、慶應義塾大学小児科と（独）国立成育医療研究センター共同で分担して作業を行います。本研究の研究計画と共同研究施設は、別紙1と2に示すとおりです。この研究計画は、それぞれの機関の倫理委員会で承認済みです。

つきましては、ぜひ本研究へのご参加をお願いいたします。診療にあたられている対象疾患の患者さまのなかで、研究に同意していただける方がおられましたら、別紙の方



法で検体を採取していただき、慶應義塾大学小児科と（独）国立成育医療研究センターのどちらかにお送りいただければ幸いです。どちらにお送りいただいても適切に解析をいたします。

遺伝子異常が同定された場合は、速やかに先生にご報告いたします。なお、変異の同定および同定された変異の病的意義の検討には、数カ月から1年以上を要する場合があります。ことをご了承いただければ幸いです。また、本研究では、さまざまな方法で遺伝子解析を行いますが、必ずしもすべての患者さんの遺伝子異常が解明されるわけではありません。なお、いただいた検体で陽性所見が得られた場合は、その知見を公表する際に先生を共同研究者として発表いたします。

何卒よろしくご協力のほどお願い申し上げます。ご不明の点がございましたら、事務局までお問い合わせ下さい。

（本依頼状送付については、横谷進理事長の了解のもとに、日本小児内分泌学会事務局で作成した宛名シールを受け取り、プロジェクト参加依頼の目的に限って使用させていただきます。）

敬具

（事務局） 慶應義塾大学医学部 臨床研究棟地下1階 小児科研究室  
〒160-8582 東京都新宿区信濃町35  
TEL:03-3353-1211（内線62368） FAX:03-5379-1978  
e-mail sat\_naru@hotmail.com（鳴海覚志）  
thaseg@a6.keio.jp（長谷川奉延）

独立行政法人 国立成育医療研究センター 分子内分泌研究部  
〒157-8535 東京都世田谷区大蔵2-10-1  
TEL:03-3416-0181 FAX:03-5494-7026  
molendo@nch.go.jp（深見真紀）

## 別紙 2

(独) 国立成育医療研究センター  
「小児科・産科領域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」  
プロジェクトへの参加のお願い

### 対象疾患

- 性分化疾患・性成熟疾患
- 成長障害（胎児発育障害を含む）
- 内分泌異常を伴う先天奇形症候群

### 目的

医学研究の推進：新規疾患原因遺伝子の発見、疾患発症機序の解明、多因子疾患における疾患感受性因子の同定を目指します。

### 解析実施施設

拠点：(独) 国立成育医療研究センター

解析施設：(独) 国立成育医療研究センター、浜松医科大学、九州大学、そのほか

### 必要検体

ヘパリン管（通常の染色体解析用容器）に採取した血液 5 ml 程度。

必要な臨床情報や検体送付方法、同意の取得などにつきましては、個々の状況に応じてご説明いたします。下記の連絡先にご連絡ください。

### 遺伝子解析方法

下記の方法の中から、当該患者さんの解析に有用であると思われる方法を選択して解析を行います。なお、今後、解析方法をよりよいものへと変更する可能性があります。

- ① サンガー法による直接塩基配列決定
- ② コピー数解析（MLPA、FISH、アレイ CGH など）
- ③ ゲノムメチル化解析（COBRA 法、Bisulfite sequence など）
- ④ ターゲットリシークエンス（次世代シーケンサーを用いた変異解析）
- ⑤ 多因子疾患における関連解析

### 検体送付・解析コスト

国立成育医療研究センターおよび解析実施施設ですべて負担します。

### 本プロジェクトに関するお問い合わせ

(独) 国立成育医療研究センター 研究所 分子内分泌研究部 深見真紀  
157-8535 世田谷区大蔵 2-10-1 電話: 03-5494-7025、FAX 03-5494-7026  
E-mail: molendo@nch.go.jp

## 大規模シーケンズ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

研究分担者 氏名 服部正平 所属 東京大学

研究要旨：本研究は、次世代シーケンサー等の大規模配列解析装置を駆使し、小児科・産科領域の難治性疾患や稀少疾患に関連するヒト常在菌叢ゲノム（マイクロバイオーム）を含めた遺伝因子を解明することを目的とする。

### A. 研究目的

本研究は、種々の小児科・産科領域の難治性疾患や稀少疾患の患者の腸内細菌叢等のマイクロバイオームについて次世代シーケンサーを用いた解析技術の開発、並びにマイクロバイオーム（遺伝的要因）と疾患との関連性を解明する。本研究は、マイクロバイオームの制御による疾患の緩解という新しい治療法の開発につながる。

### B. 研究方法

健常者及び疾患患者の腸内細菌叢等のヒト常在菌叢のゲノム DNA（マイクロバイオーム）を調製し、次世代シーケンサーを用いて、16S リボソーム RNA 遺伝子（16S）解析及びメタゲノム解析を行い、疾患患者の菌種組成と細菌遺伝子の特徴を解明する。また、次世代シーケンサーを用いた効率的で高速なゲノム情報取得法の確立も行う。

#### （倫理面への配慮）

本研究ではヒト常在菌の分離とその DNA を抽出し、遺伝子情報等を解析する。この遺伝子情報は被験者本人のヒト遺伝子情報ではないが、個人に固有の情報であるため、法令等により保護される個人情報として取り扱う。よって、本研究内容について被験者に対して文書と面接による十分な説明（研究の目的、解析データから被験者が特定できない匿名化、個人名が特定されない形式での情報公開、同意後における撤回または継続の中止の容認とそれらのサンプル及び解析結果の廃棄等）を行い、インフォームドコンセントを取得する。以上について、被験者のサンプルを収集する国立成育医療研究センター等の研究者が所属する機関の「ヒトゲノム倫理審査委員会」の承認を得ていることを文書で確認後、本研究を開始した。

### C. 研究結果

本年度は、平成 24 年 1 月にライフテクノロ

ジー社製のイオン PGM シーケンサーを新規に導入したため、その操作の練習／習得並びに試運転を行い、仕様通りのデータ（約 1Gb／稼働）が得られることを確認した。

既に所有しているロシュ社製 GS シーケンサーを用いて、健常者（18 名）からの予備的なヒト腸内細菌叢の 16S 解析とメタゲノム解析を行い、細菌叢 DNA の調製法や 16S 遺伝子の PCR 増幅条件等のウェット実験の最適化をはかった。

糞便からの腸内細菌叢 DNA の調製は、分担者らが開発したリゾチームとアクロモペプチダーゼという酵素を用いて、グラム陰性と陽性細菌を偏りなく溶菌し、最終的には SDS によって高収率の細菌叢 DNA を得ることができた。本法と他の方法や市販キットとの比較からも、本法がもっとも高収率で高分子量の DNA を与えることが示された。得られた DNA の GS シーケンサーでの解析は、メーカーのプロトコールに従って行った。その結果、サンプルあたり平均 100 万リードのデータが得られ、この数値はメーカーのスペック通りまたはそれ以上であった。

ついで、分担者の高木との連携によって開発したメタゲノムリードからヒト由来リードと夾雑多重リードを除去する品質評価解析ラインを用いて、ユニークで高精度なメタゲノムリードとした。この数は全リードの平均 80%程度となった。

各サンプルで得られたユニークリードを Newbler を用いたアセンブリによって平均 100 Mb／サンプルのユニーク配列データを取得し、18 名からは合計 1,800 Mb のユニーク配列が得られた。このメタゲノム配列から MetaGene により約 450 万の遺伝子が同定され、さらに、これら遺伝子のクラスタリング（配列類似度  $\geq 95\%$ ）によって、約 230 万のユニークな遺伝子が同定された。

16S 解析については、健常者（24 名）の腸内

細菌叢を対象に行い、3,000 データ／サンプルの 16S (V1-V2) 配列を得た。この PCR では、27Fmod と 338R を用いた。27Fmod は従来の 27F の塩基配列に修正を加えたもので、27F を用いた時の Actinobacteria の過小評価を改良し、より定量性の高い解析結果を提供する。ついで、得られた 16S 配列は、高木との連携で開発した配列精度の評価システムを用いて低精度やキメラ配列等を除去した。得られた高精度配列データの 96%類似度での OTU 解析から、サンプル当たり平均 120 種 (34 属) の菌種を同定した。

#### D. 考察

本年度では、分担者の高木との連携によって、健常者サンプルを用いて次世代シーケンサーを用いた腸内細菌叢の菌種構成及び遺伝子組成の解析におけるウェットとバイオインフォマティクス解析工程の確立をめざした。今後、本補助金で購入したライフテクノロジー社製イオンPGMを用いたマイクロバイオーム解析についても同様に進める。この異なった原理のシーケンサーを併用は、変異遺伝子や特徴的な菌種について信頼度の高い検出を行うためである。

予備的な健常日本人の腸内細菌叢の菌種及び遺伝子組成解析では次世代シーケンサーのもつ網羅性により、数百万の遺伝子の同定等、これまでにない深度での解析が可能となった。本年度では、予備的研究として 18~24 サンプルを解析したが、今後、その数を 60~100 サンプルに増やし、健常者細菌叢のデータセットを整備する。この広範囲で多数の健常者細菌叢ゲノムデータは、今後実施する疾患患者の細菌叢データを評価する上で重要なデータベースでありバイオリソースとなる。

#### E. 結論

次世代シーケンサーを用いた腸内細菌叢の菌種構成及び遺伝子組成の解析におけるウェット工程を確立した。次世代シーケンサーを用いることにより、これまでよりもより網羅的で広範囲な菌種及び遺伝子組成を解析することが出来た。また、得られるデータの定量性も高く、今後実施する健常者と疾患患者細菌叢との比較解析において、疾患に関連して有意に増減する菌種と遺伝子／機能の特定におおいに有用であると考えられる。よって、本研究は、常在細菌叢を制御することによる新規な緩解法あるいは治療法の開発に繋がると期待できる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- ・ 服部正平他：腸内細菌叢比較による日本人特異的遺伝子の特定(口頭発表). 日本ゲノム微生物学会 (平成 24 年 3 月 10~12 日).
- ・ 服部正平他：Metagenomics of Japanese gut microbiomes(口頭発表). International Human Microbiome Congress in Paris (平成 24 年 3 月 19~21 日).

#### 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。