

2012年9月27日（大阪）

鳴海覚志、石井智弘、長谷川奉延ら。「次世代シーケンシングによる先天性甲状腺機能低下症の包括的遺伝子解析」日本甲状腺学会学術集会 2012年11月30日（福岡）

鳴海 覚志、石井 智弘、長谷川 奉延ら。「次世代シーケンシングによる体細胞 GNAS 変異の定量的検出」日本人類遺伝学会学術集会 2012年10月25日（東京）

鳴海 覚志、石井 智弘、長谷川 奉延ら。「次世代シーケンシングによる体細胞 GNAS 変異の定量的検出」日本小児内分泌学会学術集会 2012年9月29日（大阪）

鳴海 覚志、石井 智弘、長谷川 奉延ら。「次世代シーケンシングによる先天性内分泌疾患の包括的遺伝子解析」日本小児内分泌学会学術集会

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

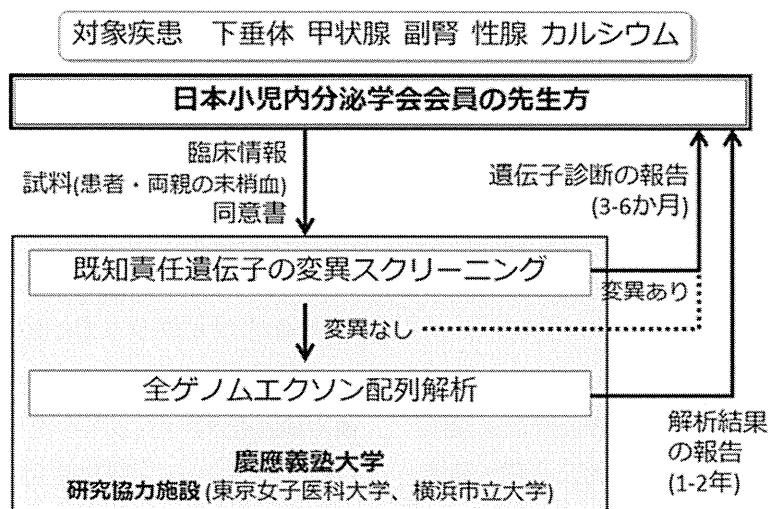


図1 研究協力施設と研究班との役割分担

ベンチトップ型次世代シーケンサーを用いた高速・包括的な 先天性内分泌疾患遺伝子解析系「Endocrinome システム」の運用

研究分担者 鳴海 覚志 慶應義塾大学医学部小児科学教室 特任助教

研究代表者 長谷川 奉延 慶應義塾大学医学部小児科学教室 教授

研究要旨

先天性内分泌疾患の既知責任遺伝子 120 種を超高速解析可能な「Endocrinome システム」を開発した。研究期間に 640 の患者検体を解析し、152 名（23.8%）において変異を同定した。本システムは従来法では不可能であった先天性内分泌疾患の包括的遺伝子解析を可能とし、先天性内分泌疾患の臨床・研究の両面をサポートするツールとなると考える。

A. 研究目的

ベンチトップ型次世代シーケンサーを用いた先天性内分泌疾患・関連遺伝子 120 種を超高速解析可能な「Endocrinome システム」の開発と運用

B. 研究方法

（1）試料

本研究のために全国の小児内分泌科医から提供された、先天性内分泌疾患・周辺疾患患者の末梢血 640 検体を解析対象とした。疾患内訳は、先天性複合型下垂体機能低下症 51 例、中枢性性腺機能低下症 48 例、先天性甲状腺機能低下症 220 例、先天性カルシウム代謝異常 49 例、先天性副腎機能低下症 28 例、性分化疾患 130 例、糖代謝異常 14 例、骨形成不全症 100 例。

（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に準拠して行われた。遺伝子解析研究への参加に関する書面での同意を全ての患者（もしくは患者の親権者）から取得した。

（2）解析対象遺伝子

解析対象とする先天性内分泌疾患および周辺疾患として、先天性下垂体機能低下症、先天性甲

状腺機能低下症、先天性副腎機能低下症、性分化疾患、先天性糖代謝異常症、先天性カルシウム代謝異常症、骨形成不全症を選択した（最新バージョン(v2.3)の対象遺伝子のリストを表 1 に示す）。

（3）遺伝子解析

Agilent 社のウェブページ SureDesign (<https://earray.chem.agilent.com/suredesign/>) を利用して表 1 に示す遺伝子のエクソン領域を選択的に捕捉するための相補的 RNA 群 (SureSelect XT カスタムキット) をデザインした。

末梢血白血球細胞から抽出したゲノム DNA 2 μ g を Covaris で断片化し、上記カスタムキットを用いて解析対象 120 遺伝子 (表 1) のエクソンに由来する DNA を選択的に濃縮した。濃縮した DNA からライブラリ (次世代シーケンサーで解析可能な状態の DNA プール) を構築する過程で 24 種の識別配列のうち 1 つを付加した。塩基配列決定はベンチトップ型次世代シーケンサー MiSeq (Illumina) で行った。識別配列を利用して 24 検体を同時に 150 塩基ペアエンドモードで解析した。得られた配列データは二次・三次解析プログラム群 (Novoalign, SAMtools, GATK, ANNOVAR など) による標準パイプラインで解析し、バリエーション (多型、変異) の一覧リストを出力した。標的

エクソンの95%以上で30×以上のカバレッジ（塩基あたり配列決定回数）が得られた場合を解析完了とした。患者の疾患との関連が疑われるバリエーションが検出された場合、Sanger法でその存在を確認した。

C. 研究結果

解析システム確立後、標的領域の平均カバレッジはおおむね200×以上であり、95%以上の検体は1回で解析完了した。対象640名中152名で変異を検出した（変異陽性率23.8%）。

疾患別変異陽性率は、骨形成不全症（35%）、中枢性性腺機能低下症（33%）、先天性副腎機能低下症（32%）、複合型下垂体機能低下症（22%）、先天性カルシウム代謝異常（22%）、性分化疾患（20%）、先天性甲状腺機能低下症（20%）、糖代謝異常（0%）の順であった。

D. 考察

本研究事業の中核部である「先天性内分泌疾患の新規責任遺伝子同定」に関する研究は、①全ゲノムエクソン配列解析（エクソーム解析）対象の設定 ②エクソーム解析 ③検証実験の3段階から構成される。新規責任遺伝子の同定を目指す性質上、第一段階において既知責任遺伝子に変異が存在するか否かをスクリーニングにかけ必要がある。このスクリーニングを時間的・費用的観点から効率的に行うことを目的に、我々は先天性内分泌疾患の既知責任遺伝子120種を高速解析する「Endocrinome システム」を開発した。

先天性内分泌疾患は、「21水酸化酵素欠損症」といったごく一部の例外を除くと、遺伝的異質性が高い疾患である。すなわち、先天性下垂体機能低下症、先天性甲状腺機能低下症といった各先天性内分泌疾患にはそれぞれ10種前後の責任遺伝子が存在する。このため、遺伝子をひとつずつ逐次的に解析する従来法では、真に包括的な遺伝子解析を行うことは事実上不可能であった。今回開発した「Endocrinome システム」はこのような従

来法の限界を打破し、包括的な遺伝子解析を持続的に維持可能な費用で提供できる。このことから、先天性内分泌疾患の臨床・研究の両面をサポートする重要なツールと考える。

E. 結論

Endocrinome システムにより、先天性内分泌疾患の既知責任遺伝子を迅速かつ包括的に解析することが可能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yoshizawa-Ogasawara A, Narumi S, Hasegawa T et al., Congenital hypothyroidism caused by a novel mutation of the dual oxidase 2 (DUOX2) gene. J Pediatric Endocrinol Metab. 2013;26;45-52.

2. 学会発表

鳴海 覚志、石井 智弘、長谷川 奉延ら。「次世代シーケンシングによる先天性内分泌疾患の包括的遺伝子解析」日本小児内分泌学会学術集会、2012年9月27日（大阪）

鳴海 覚志、石井 智弘、長谷川 奉延ら。「次世代シーケンシングによる先天性甲状腺機能低下症の包括的遺伝子解析」日本甲状腺学会学術集会、2012年11月30日（福岡）

G. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

表1 Endocrinome システム(v 2.3)の解析対象遺伝子

先天性下垂体機能低下症 : *CHD7, FGFR1, FSHB, GH1, GHR, GHRH, GHRHR, GHSR, GLI2, GNRH1, GNRHR, HESX1, IGF1, IGF1R, KAL1, KISS1, KISS1R, LHB, LHX4, NELF, OTX2, PAX6, POU1F1, PROK2, PROKR2, PROP1, SIX3, SIX6, SOX2, STAT5B, TAC3, TACR3, TBX19*

先天性甲状腺機能低下症 : *DUOX2, DUOXA2, GLIS3, IGSF1, IYD, NKX2-5, PAX8, SLC26A4, SLC5A5, TG, THRA, THRB, TPO, TRH, TRHR, TSHB, TSHR*

先天性副腎機能低下症 : *AAAS, CYB5A, CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2, CYP17A1, GPX1, HSD17B3, HSD3B2, MC2R, MRAP, NNT, NROB1, POR, STAR*

性分化疾患 : *AKR1C2, AKR1C4, AR, BNC2, CBX2, DHH, FGF8, LHCGR, MAMLD1, MAP3K1, MCM4, NR5A1, RBM28, RSPO1, SOX9, SRD5A2, SRY, TSPYL1, WDR11, WNT4, WT1, ZFPM2*

先天性カルシウム代謝異常 : *CASR, DHCR7, GATA3, GCM2, GNAS1, PDE4D, PRKAR1A, PTH, TBCE*

先天性糖代謝異常 : *ABCC8, BLK, GCK, GLUD1, HNF1A, HNF1B, HNF4A, INS, KCNJ11, KLF11, NEUROD1, PAX4*

骨形成不全症 : *BMP1, COL1A1, COL1A2, CRTAP, FGFR2, FKBP10, LEPRE1, LRP5, NPR2, PPIB, SERPINF1, SERPINH1, SP7*

既知遺伝子変異陽性の先天性内分泌疾患の臨床像解析

研究分担者 鳴海 覚志 慶應義塾大学医学部小児科学教室 特任助教
研究分担者 荒木 俊介 産業医科大学医学部小児科 助教

研究要旨

新規責任遺伝子の探索を行う本研究において、その第一段階は症例毎に既知責任遺伝子の変異を検索することである。変異同定で診断が確定する場合、エクソーム解析には進まないが、詳細な臨床像解析を通じて既知遺伝性疾患の新規臨床知見が得られる場合がある。以下、本研究の一部として行った4研究を概説する。

A. 研究目的

既知の遺伝性先天性内分泌疾患である、*PAX8* 異常症（先天性甲状腺機能低下症）、*DUOX2* 異常症（先天性甲状腺機能低下症）、*NR5A1* 異常症（性分化疾患）、*LHX4* 異常症（先天性下垂体機能低下症）に関する新規の臨床的知見を報告する。

B. 研究方法

（1）*PAX8* 異常症の研究

先天性甲状腺機能低下症患者コホートに対し、甲状腺の発生分化に重要な役割を果たす転写因子 *PAX8* の変異スクリーニングを行った。同定された新規変異の分子機能を発現実験で解析した。すなわち、野生型 *PAX8* 発現ベクターを鋳型に変異導入を行い、野生型および変異型 *PAX8* 分子のたんぱく質発現能、細胞内局在、標的 DNA 結合能、標的遺伝子発現活性化能を汎用培養細胞である HeLa 細胞で評価した。

（2）*DUOX2* 異常症の研究

妊娠中に母がヨードを大量摂取（耐容量の10倍以上）していた出生児。先天性甲状腺機能低下症に対する新生児マススクリーニングは陰性判定であったが、2か月時に遷延黄疸、体重増加不良などを契機に遅発発症型の先天性甲状腺機能低下症と診断された。この時点で甲状腺腫があり、甲状腺腫性先天性甲状腺機能低下症の責任遺伝

子のひとつである *DUOX2* を解析した。

（3）*NR5A1* 異常症の研究

性分化疾患患者コホート 34 名に対し、性腺の発生分化で重要な役割を果たす転写因子 *NR5A1* の変異スクリーニングを行った。同定された新規変異の分子機能を発現実験で解析した。すなわち、野生型 *NR5A1* 発現ベクターを鋳型に変異導入を行い、野生型および変異型 *NR5A1* 分子のたんぱく質発現能、細胞内局在、標的遺伝子発現活性化能を汎用培養細胞である HEK293 細胞で評価した。

（4）*LHX4* 異常症の研究

先天性下垂体機能低下症患者コホート 91 名に対し、器官形成期の下垂体に発現する転写因子群 9 種（*LHX4* を含む）の変異検索を行った。同定された新規 *LHX4* 変異の分子機能を発現実験で解析した。すなわち、野生型 *LHX4* 発現ベクターを複製、それを鋳型に変異導入を行い、野生型および変異型 *LHX4* 分子のたんぱく質発現能、細胞内局在、標的遺伝子発現活性化能を汎用培養細胞である COS7 細胞で評価した。

C. 研究結果/D. 考察

（1）*PAX8* 異常症の研究

遺伝子解析の結果、4家系8名の新規 *PAX8* 変異を有する患者を同定した（家系 1 p.L16P, 家系 2

p.F20S, 家系 3 D46Sfs*24, 家系 4 p.R133Q)。家系 1-3 は親子例であり、家系 4 のみ de novo 変異の孤発例であった。

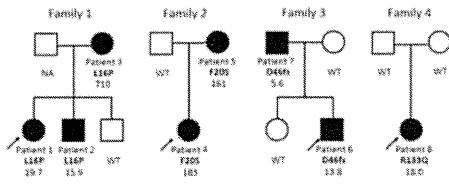


図 1 変異陽性患者の家系図 4 家系 8 名の新規 PAX8 変異陽性患者が認められた。変異陽性者はいずれも血清 TSH 値が高く（図中、各記号の下に血清 TSH 値 (mU/L) を示す：基準値 0.5-5.0）、甲状腺機能低下であった。

HeLa 細胞を用いた分子機能解析では、4 種の変異をそれぞれ単独で発現した場合、いずれも残存転写活性はほぼ 0 であり、機能低下型であることが確認された（図 2）。ウェスタンブロットによるたんぱく質発現量の検討では、D46fs を除く変異体のたんぱく質発現量が野生型と同等であったのに対し、D46fs はたんぱく質発現が認められなかった。なお、このたんぱく質発現量の低下は、プロテアソーム阻害剤の MG132 を添加し細胞培養を行うことで回復した。このため、D46fs は異常な立体構造をとり、その結果ユビキチン-プロテアソーム系を介して破壊されたと推測された。残る L16P、F20S、R133Q の検討では、これらはいずれも核内移行は正常であるものの、PAX8 の標的 DNA 配列に対する結合能の低下がゲルシフト実験で示され、標的 DNA 結合障害であることが明らかとなった。なお、これらの 3 変異体は、甲状腺形成に重要な役割を果たすもうひとつの転写因子 TTF-1 と共発現させることにより、転写活性が部分的に（60-75%）回復することが示された（図 2）。下流遺伝子の活性化において、PAX8 と TTF-1 は、プロモーター領域で複合体を形成することが知られており、TTF-1 による転写活性の部分的救済は、DNA 結合能が低下した PAX8 変異をプロモーターにとどめることにより生じたと推測された。

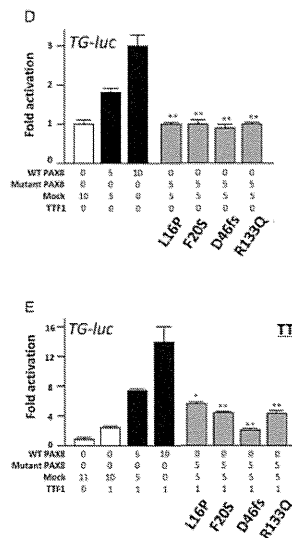


図 2 変異体の転写活性化能の評価 HeLa 細胞にルシフェラーゼレポーター（ヒト TG 遺伝子のプロモーター配列を有する）とエフェクター（PAX8 発現ベクター±TTF-1 発現ベクター）を一過性発現し、細胞のルシフェラーゼ活性を測定した。（上）TTF-1 を共発現しない条件下での実験結果。4 つの変異体の転写活性はいずれも空ベクターと同程度であった。（下）TTF-1 を共発現した条件下での実験結果。たんぱく質発現のない D46fs はこの条件下においても活性を認めなかった。一方、標的 DNA 結合障害である残り 3 変異（L16P、F20S、R133Q）は、部分活性が認められた。

本研究において同定された D46fs 変異は、世界で初めて、たんぱく質発現が欠如することを *in vitro* で証明された無活性型 PAX8 変異である。D46fs 変異は常染色体優性の甲状腺機能低下症を起こしえたことから、PAX8 変異による甲状腺機能低下症の発症にはハプロ不全で十分であり、優性阻害効果は必ずしも必要でないことが本研究を通じて初めて明らかにされた。

（2）DUOX2 異常症の研究

遺伝子解析の結果、発端者は DUOX2 の両アリルに機能低下型バリエーションを有することが明らかとなった（p.[E327X]+[H678R]）。p.E327X は新規変異であり、7 つの膜貫通ドメイン全てを喪失することから残存活性のない null 変異と考えられた。p.H678R は既報の機能性多型であった（Narumi et al. J Clin Endocrinol Metab 2011）。

家族解析の結果、p.E327X は母に、p.H678R は

父にそれぞれ由来することが明らかとなった。また、甲状腺機能低下症の既往のない妹は、p.E327X のヘテロ接合体であった（図3）。

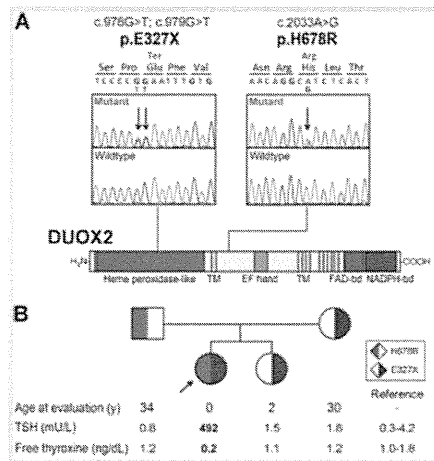


図3 患者および家族の *DUOX2* 解析の結果 患者は複合ヘテロ接合、その他の家族（甲状腺機能正常）はヘテロ接合であった。

本症例のように、ヨード過剰と *DUOX2* 変異が同一個体に生じた例は過去に一例報告があるのみである (Vigone MC et al., Human Mutat 2005)。興味深いことに、この症例も本症例と同様に、新生児マススクリーニングの結果は偽陰性であった。ヨード過剰は、先天性甲状腺機能低下症を惹起する確立された病因であるが、逆説的ではあるが、もうひとつ病因である *DUOX2* 変異との共存により、新生児期の甲状腺機能はむしろ正常に維持されたと推測される。

DUOX2 変異が先天性甲状腺機能低下症の最も高頻度の遺伝的病因であること、国際的にみて海藻類（ヨードを多量に含有する）の摂取量が多い本邦ではヨード過剰も稀ではないこと、を考慮すると、*DUOX2* 変異とヨード過剰の共存は、マススクリーニング偽陰性の重要な原因となっている可能性があり、今後さらなる研究が必要と考えられた。

(3) *NR5A1* 異常症の研究

遺伝子解析の結果、2家系6名の新規 *NR5A1* 変異を有する患者を同定した（家系1 p.D257Tfs*39, 家系2 p.V424del）。家系1の発端者は重度尿道下

裂、矮小陰茎があり女兒として養育されていた。家系2の発端者は尿道下裂、矮小陰茎を認めた。家系1において変異は発端者、母、祖母に認められた。家系2では、発端者、姉（XX核型であることを確認済み）、母に認められた。興味深いことに、両家系とも発端者の母は精神症状（不安障害、抑うつ）を有していた（図4）。

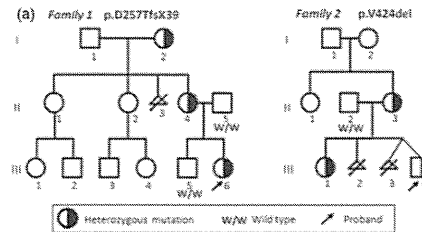


図4 変異陽性患者の家系図 2家系6名の新規 *NR5A1* 変異陽性患者が認められた。性分化疾患を有した2名の発端者を除くと、残り4名の変異陽性者はいずれも女性であった。このうち、両家系とも、発端者の母に精神症状（不安障害、抑うつ）がみられた。

HEK293細胞を用いた分子機能解析では、2種の変異型 *NR5A1* はいずれも *CYP11A1* プロモーター、*CYP19A1* プロモーターに対する転写活性が著明に低下しており、機能低下型変異であることが確認された。なお、野生型 *NR5A1* との共発現実験では、優性阻害効果を認めなかった（図5）。

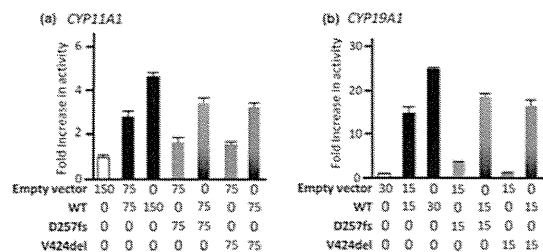


図5 変異体の転写活性化能の評価 HEK293細胞にルシフェラーゼレポーター（ヒト *CYP11A1* および *CYP19A1* のプロモーター配列をそれぞれ有する）とエフェクター（*NR5A1* 発現ベクター）を一過性発現し、細胞のルシフェラーゼ活性を測定した。2つの変異体の転写活性はいずれも野生型に比べ低下しており、優性阻害効果は認めなかった。

一般に、*NR5A1* 変異はXY個体においては性分化疾患を惹起する一方、XX個体に対する影響は、軽度の卵巣機能不全を除くと臨床症状は軽微と

考えられてきた。本研究は、*NR5A1* 変異を有する個体における精神症状の存在を初めて記載したものである。視床下部特異的な *Nr5a1* ノックアウトマウスでは不安行動が増加することが知られているが、本研究を通じて、ヒトにおいても同様の精神症状がおこる可能性が示唆された。

（4）*LHX4* 異常症の研究

遺伝子解析の結果、1名において *POU1F1* 既報変異を同定した。また、2名において *LHX4* 新規変異を同定した（家系 1 c.294-1G>A, 家系 2 p.V75I）。

家系 1 の発端者（16 歳女兒）は、低身長を主訴に受診し、当初成長ホルモン単独欠損症として経過を観察されていたが、経過中 14 歳から低血糖負荷に対するコルチゾール反応不良を認めた。臨床的な副腎不全はないものの ACTH 分泌不全が存在することが示唆された。発端者と同様の変異が、低身長（-2.9 SD）の父、および正常身長の同胞（姉 0.2 SD、兄 -1.3 SD）からも検出された（図 6）。

家系 2 の発端者は 3 か月時に矮小陰茎、停留精巣を契機に医療機関を受診し、その後 11 か月時より重度の成長障害を認め汎下垂体機能低下症の診断にいたった。発端者と同様の変異が、身長正常範囲低値（-1.8 SD）の父にも認められた（図 6）。

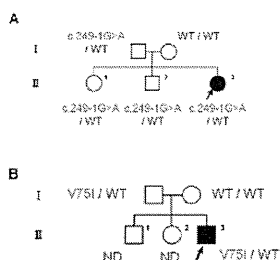


図 6 変異陽性患者の家系図 新規 *LHX4* 変異を認めた 2 家系の家系図を示す。両家系とも、変異は父に由来しており、家系 1 では同胞 2 名にも変異が認められた。発端者を除くと、2 家系 4 名の家族解析を通じて同定された変異キャリアはいずれも下垂体機能低下症を示す内分泌学的所見はなく、表現型の幅広さが示唆された。

COS7 細胞を用いた分子機能解析では、2 種の変異型 *LHX4* はいずれも *POU1F1* プロモーター、 α *GSU* プロモーターに対する転写活性が低下しており、機能低下型変異であることが確認された。なお、野生型 *LHX4* との共発現実験では、優性阻害効果を認めなかった。

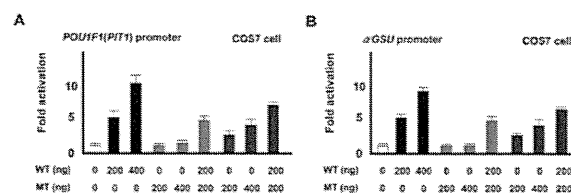


図 7 変異体の転写活性化能の評価 COS7 細胞にルシフェラーゼレポーター（ヒト *POU1F1* および α *GSU* のプロモーター配列をそれぞれ有する）とエフェクター（*LHX4* 発現ベクター）を一過性発現し、細胞のルシフェラーゼ活性を測定した。2 種の変異体の転写活性はいずれも野生型に比べ低下しており、優性阻害効果は認めなかった。

本研究を通じて同定された *LHX4* 変異の 2 家系とも、変異保有者の臨床症状は重度の下垂体機能低下症から正常まで幅が広がった。このような表現度のゆらぎは、転写因子異常のヘテロ接合性変異ではしばしば認められる現象であり、*LHX4* においても同様の現象が起こりうることを確認された。臨床的な観点からは、家系 1 の発端者で認められた進行性 ACTH 分泌不全が重要である。進行性 ACTH 分泌不全は *PRO1* 変異による下垂体機能低下症において報告があるが、*LHX4* 変異における報告は世界初であった。ACTH 分泌不全による二次性副腎不全は、未診断の場合死亡原因ともなりうる。このため、初期評価で ACTH 分泌能正常であった *LHX4* 変異保有者においても、後の ACTH 分泌能低下を予期した定期的評価が重要であると考えられる。また、*PRO1*、*LHX4* のように一部の遺伝子異常による下垂体機能低下症では臨床像の経年変化が予測できるため、変異スクリーニングを行い遺伝子診断を適切に行っておくことが、患者診療を改善しうることを示唆する知見ともいえる。

E. 結論

本研究計画を通じて同定された既知責任遺伝子の変異による先天性内分泌疾患患者の臨床像を解析し、得られた新知見を報告した。これらの知見は変異陽性症例の臨床像・自然歴をより明確にし、フォローアップ上の注意を喚起するものである。このような知見の積み重ねが、遺伝子診断を単なる「患者のラベルづけ」とせず、患者毎に個別化された最適医療の提供に貢献するものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Narumi S, Araki S, Hasegawa T et al. Functional characterization of four novel *PAX8* mutations causing congenital hypothyroidism: new evidence for haploinsufficiency as a disease mechanism. *Eur J Endocrinol*. 2012;167:625-632

Kasahara T, Narumi S, Hasegawa T et al. Delayed onset congenital hypothyroidism in a patient with *DUOX2* mutations and maternal iodine excess. *Am J Med Genet A*. 2013;161A:214-217.

Suwanai AS, Ishii T, Narumi S, Hasegawa T et al. A report of two novel *NR5A1* mutation families: possible clinical phenotype of psychiatric symptoms of anxiety and/or depression. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;78:957-965.

Takagi M, Ishii T, Narumi S, Hasegawa T et al. Gradual loss of ACTH due to a novel mutation in *LHX4*: comprehensive mutation screening in Japanese patients with congenital hypopituitarism. *PLoS One*. 2012;7:e46008.

2. 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

器官別 RNA 発現データベースの構築

研究分担者 鳴海 覚志 慶應義塾大学医学部小児科学教室 特任助教
研究分担者 石井 智弘 慶應義塾大学医学部小児科学教室 専任講師

研究要旨

先天性内分泌疾患の新規責任遺伝子を同定する上で、内分泌器官特異的に発現する遺伝子のカタログは効率的な研究遂行上有用と考えられる。我々は Bodymap Project、The Human Protein Atlas が公開する RNA シーケンシングのデータを独自に解析し、ヒト成人正常器官の RNA 発現データベースを構築した。

A. 研究目的

内分泌器官（甲状腺、副腎、精巣、卵巣）を含むヒト正常器官の RNA 発現データベースの作成。

B. 研究方法

（1）データ取得・解析

RNA シーケンシングのデータは、Bodymap プロジェクトが行った健常ヒト 16 器官（副腎、脂肪組織、脳、乳腺、結腸、心、腎、肝、肺、リンパ節、卵巣、前立腺、骨格筋、精巣、甲状腺、白血球）および The Human Protein Atlas プロジェクトが行った健常ヒト 27 器官（脂肪、副腎、虫垂、膀胱、骨髄、大脳皮質、結腸、十二指腸、食道、胆嚢、心筋、腎、肝、肺、リンパ節、卵巣、膵臓、胎盤、前立腺、唾液腺、皮膚、小腸、脾臓、胃、精巣、甲状腺、子宮）を利用した（下線は内分泌臓器）。

データは下記ウェブサイトからそれぞれダウンロードした。

Bodymap 2.0

<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/browse.html>

The Human Protein Atlas

<http://www.proteinatlas.org/>

ダウンロードしたファイルは、Bodymap について

は配列データから Linux プログラム群（Tophat、Cufflinks）を用いて各遺伝子ごと FPKM 値を算出した。The Human Protein Atlas では、FPKM 値のデータが単一のファイルに格納されていたため、Linux コマンドで器官別に分けた。いずれの FPKM 値のデータも、縦軸：遺伝子名、横軸：器官名 として Excel 2010 に展開できるファイル形式に加工した。各器官の FPKM 値の raw data は、細胞の特性に影響を受けるため器官間の比較が困難である。このため、ヒストグラムの形状を共通にする Quantile 補正を行った。

（2）器官別 RNA 発現データベースの構築と検証
発現量の器官特異性の指標として以下の通り Selectivity index を定義した。

$$\text{器官 O での遺伝子 G の Selectivity Index} = \frac{(\text{O での G の FPKM 値}) \text{ の平均}}{(\text{O を除く器官での G の FPKM 値}) \text{ の平均}}$$

本データベースの有効性を評価するため、各器官に特異的に発現すると予想される遺伝子の Selectivity index を確認した。

C. 研究結果

本解析により、計 29 器官の RNA 発現量に関するデータベースを作成した。本データベースは

Excel 2010 で容易に扱うことができ、数値にもとづくフィルタリングや統計操作（平均値や中央値の演算処理など）を実行できることを確認した。

Bodymap と The Human Protein Atlas の両方にデータがある器官につき、両者の補正済み FPKM 値の相関を検証したところ、ほとんどの器官で相関関係は良好であったが、唯一、副腎のみ不良であった。

次に、各器官で特異的発現を見せる既知遺伝子（甲状腺での TSH 受容体、肝での C reactive protein など）の Selectivity Index を参照し、各器官の解析の妥当性を検証した。その結果、大半の器官では特異的発現の知られる既知遺伝子が高い Selectivity Index を示したが、唯一、Bodymap の副腎のみ、ACTH 受容体、21 水酸化酵素など副腎に特異的に発現するはずの遺伝子の高値を確認できなかった。The Human Protein Atlas の副腎では、これら特異的遺伝子の選択的発現を確認できた。

D. 考察

本分担研究では公共で利用可能な RNA シーケンシングのデータを利用し、甲状腺、精巣、卵巣に加え、副腎を含むヒト 29 器官の RNA 発現量のデータベースを作成した。27 器官はそれぞれ特異的遺伝子が高い Selectivity index を示しており、ウェット実験、ドライ解析とも有効に行われていると考えられた。唯一の例外は Bodymap の副腎であり、データの信頼性に問題があると考えられた。

エクソーム解析では約 2 万種の遺伝子を解析するため、偽陽性の制御、すなわち変異が発見された遺伝子が、真の疾患責任遺伝子か否かを見極めることが肝要である。これまで同定されてきた先天性内分泌疾患の責任遺伝子は、当該内分泌器官に特異的に発現する遺伝子が大半である。このため、今回作成した甲状腺、精巣、卵巣、副腎の発現データベースは、それぞれの器官の候補遺伝子の病因としての確からしさを判断する上で重要なリソースとなる。一方、下垂体、副甲状腺など他の内分泌器官の RNA 発現データベースは独自

にデータを得る必要があり、今後の課題である。

E. 結論

公共で利用可能な RNA シーケンスのデータを利用し、甲状腺、精巣、卵巣、副腎を含むヒト 29 器官の RNA 発現量のデータベースを作成した。このデータベースは、先天性内分泌疾患の新規責任遺伝子を同定する上での補助手段として有用と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

全ゲノムエクソン配列（エクソーム）解析による先天性内分泌疾患 5 種の 新規責任遺伝子の探索：新規副腎低形成症候群の発見

研究分担者 鳴海 覚志 慶應義塾大学医学部小児科学教室 特任助教

研究分担者 古川 徹 東京女子医科大学統合医科学研究所 教授

研究要旨

先天性内分泌疾患 5 種（先天性下垂体機能低下症、先天性甲状腺機能低下症、先天性カルシウム代謝異常、先天性副腎低形成、性分化疾患）の患者計 58 例に対してエクソーム解析を行い、計 199 種の候補遺伝子を同定した。各疾患での検証解析を進行中であり、先天性副腎機能低下症において新規責任遺伝子 S を同定した。

A. 研究目的

先天性内分泌疾患の新規責任遺伝子の探索

B. 研究方法

（1）対象

Endocrinome システム（上述）で、既知責任遺伝子変異陰性を確認した先天性内分泌疾患患者 58 名をエクソーム解析の対象とした。両親の協力が得られた家系では、トリオ解析（発端者と両親の同時解析）を行った。

疾患内訳（括弧内はトリオ解析例数）は、先天性複合型下垂体機能低下症 15 例（含む 8 トリオ）、先天性甲状腺機能低下症 20 例（含む 6 トリオ）、先天性カルシウム代謝異常 7 例（含む 7 トリオ）、先天性副腎機能低下症 9 例（含む 4 トリオ）、性分化疾患 7 例（含む 3 トリオ）。

（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に準拠して行われた。遺伝子解析研究への参加に関する書面での同意を全ての患者（もしくは患者の親権者）から取得した。

（2）エクソーム解析

エクソーム解析は、拠点研究班「遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築」（研究代

表：松本直通）との共同研究として行った。

末梢血白血球細胞から抽出したゲノム DNA 3 µg を Covaris で断片化し、SureSelect All Exon v4（Agilent）を用いてエクソン領域を濃縮した。塩基配列決定は HiSeq（Illumina）で行った。配列データは二次・三次解析プログラム群（Novoalign、SAMtools、Picard、GATK、ANNOVAR など）による標準パイプラインで解析し、バリエント（多型、変異）の一覧リストを出力した。

本研究では、以下のクライテリアを満たすものを変異（機能異常を伴うレアバリエント）と定義した。

- ・アレル頻度が 0.002 未満
- ・たんぱく質機能への影響が強いと予想される（ナンセンスバリエント、フレームシフトバリエント、スプライスサイトバリエント、もしくは下記基準*を満たすミスセンスバリエント）

*PolyPhen-2 スコア 0.5 以上かつ SIFT スコア 0.05 未満

トリオ解析では、発端者と両親の保有する変異を比較し、発端者における各変異の親由来（父由来、母由来、*de novo*）を検討した。

想定される遺伝形式にもとづき、下記の基準か

ら各疾患の新規責任遺伝子の候補を定めた。

（AD）優性遺伝モデル

- ① 孤発例における *de novo* 変異
- ② 患者 3 症例以上でヘテロ接合性変異が共有され、かつ、非患者群でヘテロ接合性変異を認めない遺伝子。トリオ解析で親からの遺伝が複数例で確認される場合は除外。

（AR）劣性遺伝モデル

ホモ接合もしくは複合ヘテロ接合（疑いも含む）の変異が 1 名以上で存在する遺伝子

（XL）X 連鎖遺伝モデル

男性患者において、ヘミ接合性変異が 1 名以上で存在する遺伝子

C. 研究結果

（1）先天性下垂体機能低下症

患者 15 名（うちトリオ解析 8 名）のエクソーム解析を行った。AD モデルでの候補遺伝子は 69 種（*de novo* 変異の遺伝子 48 種、3 症例以上で変異が共有される遺伝子 21 種）、AR モデルでの候補遺伝子は 34 種、XL モデルでの候補遺伝子は 7 種であった。

（2）先天性甲状腺機能低下症

患者 20 名（うちトリオ解析 6 名）のエクソーム解析を行った。AD モデルでの候補遺伝子は 13 種（*de novo* 変異の遺伝子 10 種、3 症例以上で変異が共有される遺伝子 3 種）、AR モデルでの候補遺伝子は 33 種、XL モデルでの候補遺伝子は 3 種であった。

現在、エクソーム解析対象ではない患者コホート約 300 名において、これら候補遺伝子の変異を検索中である。

（3）先天性カルシウム代謝異常

患者 7 名（うちトリオ解析 7 名）のエクソーム

解析を行った。AD モデルでの候補遺伝子は 30 種（*de novo* 変異の遺伝子 29 種、3 症例以上で変異が共有される遺伝子 1 種）、AR モデルでの候補遺伝子は 4 種、XL モデルでの候補遺伝子は 2 種であった。

（4）先天性副腎機能低下症

患者 9 名（うちトリオ解析 4 名）のエクソーム解析を行った。うち 1 例は、研究途中でカリフォルニア大学ロサンゼルス校のグループが報告した *CDKN1C* 変異を持つことが判明したため、以下の解析対象から除外した。

AD モデルでの候補遺伝子を 1 種同定した（S 遺伝子）。この遺伝子の変異は患者 4 名で共有されており、またトリオ解析を行った 1 名では *de novo* 変異であった。これらのエクソーム解析の結果は、Sanger 法による解析でも確認された。

AR モデルでの候補遺伝子は 2 種、XL モデルでの候補遺伝子は 0 種であった。

（5）性分化疾患

患者 7 名（うちトリオ解析 3 名）のエクソーム解析を行った。AD モデルでの候補遺伝子は 18 種（*de novo* 変異の遺伝子 13 種、3 症例以上で変異が共有される遺伝子 5 種）、AR モデルでの候補遺伝子は 5 種、XL モデルでの候補遺伝子は 1 種であった。

（6）S 遺伝子の検証解析

エクソーム解析の対象とは独立の患者コホート 20 名を対象に S 遺伝子を解析し、新たに 3 名で変異を同定した。うち 1 例は、同胞罹患例であり、同胞の一方はエクソーム解析で既に変異が同定されていた。以上、エクソーム解析での同定例も含めて 6 家系 7 名の S 遺伝子変異症例を同定した。

これらの変異はいずれもヘテロ接合性であり、両親解析の結果全 6 家系で両親での変異の不在を確認できた。このため、大半は発端者において変

異が *de novo* に生じたと考えられた。例外的に、同胞罹患例では、両親（末梢血で変異を認めない）のいずれかが変異を性腺モザイクとして有しており、同胞2名に変異が伝達されたと推測された。

6家系7名のS遺伝子変異陽性副腎皮質機能低下症患者の臨床情報を収集比較したところ、これら7名は極めて酷似した共通の臨床像をとることが判明した。7例全例が出生前からの成長障害を指摘されており、胎児仮死徴候出現を契機に緊急帝王切開で出生していた。出生後成長も全例で不良であるほか、精神発達遅滞も全例で認められた。XY核型を有する個体4例はいずれも矮小陰茎、尿道下裂、停留精巣など外生殖器形態の異常があり、うち1例は完全女性型外生殖器のため女兒として養育されていた。この他、乳児期の造血異常が全例で認められた。

患者表現型（副腎低形成）から、S遺伝子はたんぱく質発現により細胞増殖が抑制される遺伝子と予想された。このような遺伝子の発現実験は一過性発現では困難であり（遺伝子導入された細胞が増殖しないため）、また、単純に安定発現株を作製しても、S遺伝子発現レベルの低いクローンが選択される（遺伝子発現が高いクローンは、その細胞増殖抑制作用により増殖できないため）可能性を考慮し、誘導発現が可能な安定発現株を樹立する方針とした。

培地への *cumate* 添加により RFP タグつき S 遺伝子（野生型もしくは変異型）を誘導発現する HEK293 細胞を樹立し、解析に用いた。変異型 S 遺伝子5種のたんぱく質発現量および細胞内局在は野生型と同等であった。誘導性安定発現株を約10%のコンフルエンスで96ウェルプレートに培養し、S遺伝子を誘導した。7日間連続、3時間毎にコンフルエンスを計測し、細胞増殖に対するS遺伝子発現の影響を評価した。野生型S遺伝子を誘導すると、誘導しなかった対照細胞に対しごくわずかな細胞増殖抑制効果が認められた。一方、変異型S遺伝子5種いずれも、誘導により著明な細胞増殖抑制効果を示した。フローサイトメトリ

一法を用いた、細胞周期へのS遺伝子（野生型、変異型）誘導の影響の検討では、有意な影響は確認されなかった。

D. 考察

既知責任遺伝子に変異を認めない先天性内分泌疾患5種に対し、トリオ解析を含むエクソーム解析を行い、5疾患で計199種の候補遺伝子の同定に成功した。このうち、先天性副腎機能低下症において先行して検証解析を進め、新規責任遺伝子Sを同定することができた。

遺伝子Sの変異による副腎低形成症候群の大半は *de novo* のヘテロ接合性変異で発症していた。このことは、従来の常染色体優性遺伝形式の責任遺伝子同定法のゴールドスタンダードである連鎖解析法では、S遺伝子の同定は不可能であったことを意味する（連鎖解析には大家系の存在を前提とするため）。また、遺伝子Sは機能未知の分子であり、生物学的な知識にもとづく候補遺伝子アプローチを用いたとしても、責任遺伝子としての同定は不可能であったと考えられる。すなわち、エクソーム解析によって初めて同定可能となった遺伝子の典型例である。

今後、遺伝子Sの機能解明を進めると同時に、実験モデル動物の作製、治療薬のスクリーニング、周辺疾患のS遺伝子の役割の解明などの派生研究を推進してゆく予定である。

E. 結論

病因不明先天性内分泌疾患患者検体を用いたエクソーム解析により、多数の候補遺伝子を同定した。先行して行った先天性副腎機能低下症における検証解析において、新規責任遺伝子Sを同定した。エクソーム解析は先天性内分泌疾患領域においても、新規責任遺伝子を同定する上で極めて有力な手法である。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

ベンチトップ型次世代シーケンサーを用いた McCune-Albright 症候群の 新規診断法の開発

研究分担者 鳴海 覚志 慶應義塾大学医学部小児科学教室 特任助教

研究要旨

McCune-Albright 症候群は、体細胞モザイク性 *GNAS* 変異を病因とし、皮膚病変、骨病変、内分泌病変を呈する稀少難病である。末梢血での変異モザイク率は通常低く従来の末梢血からの遺伝子診断は感度不十分であった。今回、次世代シーケンサーを用いることにより、従来法の 100 倍の変異検出感度を持つ新規診断法を開発した。

A. 研究目的

McCune-Albright 症候群は、体細胞モザイク性 *GNAS* 変異を病因とし、皮膚病変、骨病変、内分泌病変を呈する稀少難病である。従来法の遺伝子診断率は 50%前後であり、精度が不十分と認識されていた。本研究では、*GNAS* 変異を末梢血サンプルから高感度に検出する、新規遺伝子診断法の確立とその診断精度の評価を目的に行われた。

B. 研究方法

(1) PCR 増幅・ペプチド核酸法

McCune-Albright 症候群と関連する *GNAS* 変異はエクソン 8 および 9 に生じる。このゲノム領域を増幅可能な PCR プライマーを設計した。この際、のちに PCR 産物を次世代シーケンサーで解析するため、それぞれの PCR プライマーの 5'側にアダプター配列を組み込んだ。

また、PCR 増幅反応に添加することにより、特定変異の存在比率を増加することができるペプチド核酸プローブを、既報の配列にならひ合成した (Bianco P *et al.* *J Bone Mineral Res.* 2000)。

(2) 試験用鋳型 DNA

次世代シーケンシング (NGS) を用いた遺伝子変異検出法の感度および定量性を評価するため、試験用鋳型 DNA (プラスミド) を作製した。すな

わち、上記のプライマーで PCR を行い得られた産物を TA クローニング法でサブクローニングし、野生型 DNA の鋳型とした。また、site-directed mutagenesis 法で R201H 変異を導入し、変異型 DNA の鋳型とした。変異型 DNA を順次野生型 DNA で希釈し、下記の希釈系列を作成した：変異型 DNA の割合 10%、1%、0.3%、0.1%、0.03%、0.01%。

(3) NGS 解析

上記の第一 PCR 産物 (アダプター配列付加済み) を精製し、全量の 1/20 を用いて第二 PCR を行った。この際の PCR プライマーには、Illumina 社の NGS 解析を可能とする P5 配列、P7 配列を付加したほか、24 種のインデックス識別配列のうち 1 つを付加した。塩基配列決定は MiSeq (Illumina) で行った (図 1)。識別配列を利用して 24 検体を同時に 50 塩基以上をペアエンドモードで解析した。解析にあたり、塩基配列決定の精度を向上するため、PhiX コントロールを 50%混入して解析した。得られた配列データは Bowtie でアライメントし、SAMtools で各塩基のコールおよびカウントを行った。

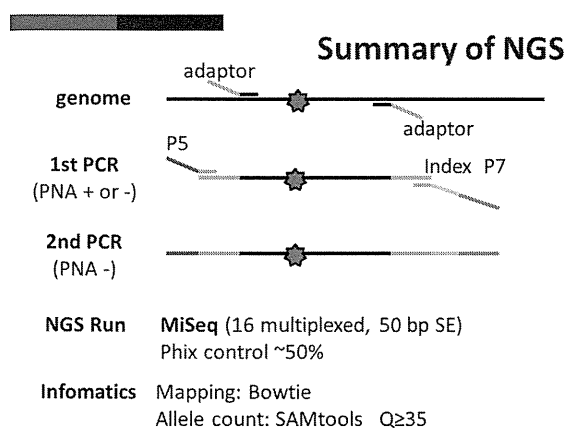


図 1 NGS による GNAS 解析：サンプル調整のまとめ
まず、ゲノム DNA 配列に対し、アダプター配列を付加したプライマーで第一 PCR を行う。得られたフラグメントに対して、イルミナ次世代シーケンシング解析が必要とされる P7 配列、P5 配列、および認識配列を付加したプライマーを用いて第二 PCR を行った。得られた PCR 産物を MiSeq で解析した。

患者解析にあたっては、必ず同一ランで健常コントロール由来の PCR 産物を同時に解析した。健常者における変異アレルカウント（バックグラウンドの誤差）の平均+2.5 SD を越える変異アレルカウントが患者で観察された場合を変異陽性とした。

（4）McCune-Albright 症候群患者コホート

McCune-Albright 症候群の古典的三徴（皮膚病変、骨病変、内分泌病変）のうち二徴以上を有する患者 16 名を解析対象とした。それぞれ PNA 法、PNA を用いない NGS（NGS 単独法）、PNA を併用する NGS（PNA-NGS 法）でそれぞれ解析し、変異陽性率を比較した。

C. 研究結果

まず、健常者 DNA を鋳型とした PCR 産物を NGS 単独法で解析し、我々の解析法で極めて低い誤差率（0.01%未満）で各塩基の配列を決定可能であることを確認した。

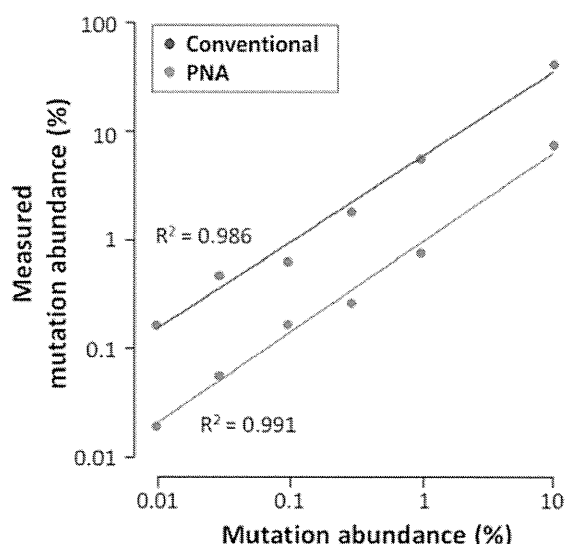


図 2 試験用 DNA の変異割合（横軸）と NGS による実測値 NGS でのアレルカウントにもとづく変異割合の測定値は、実際の変異割合と良好に相関しており、アレルカウントの信頼性が高いことが示唆された。図中、上の線は PNA を併用しない NGS 単独法のデータ、下の線は PNA を併用する PNA-NGS 法のデータを示す。

次に、希釈系列の試験用 DNA を使い、従来法である PNA 法、NGS 単独法、PNA-NGS 法それぞれの解析を行った（図 2）。その結果、PNA 法では変異割合 1%まで、NGS 単独法では変異割合 0.03%まで、PNA-NGS 法では変異割合 0.01%まで変異が検出可能であることが明らかとなった。試験用 DNA の変異割合と NGS 単独法のアレルカウントにもとづく変異割合測定値は直線関係にあり、NGS による変異割合の評価は妥当と考えられた。

最後に、16 名の MAS 患者由来末梢血 DNA 検体を用いて PNA 法、NGS 単独法、PNA-NGS 法のそれぞれで遺伝子診断を行い、変異陽性率を比較した。PNA 法、NGS 単独法、PNA-NGS 法の変異陽性率はそれぞれ 56%、63%、75%であり、PNA-NGS 法の変異検出感度が最も優れていた。

D. 考察

NGS では、大量の DNA を並列解析することができる。本研究では 1 サンプルあたり約 20 万リードの PCR 産物が解析されたが、これは従来法に

あてはめると 20 万回のサブクローニング解析を行ったことと同義である。NGS では、膨大な塩基決定能力、すなわち量的な能力の高さに目を奪われがちであるが、並列解析という質的特性に着目することにより、本研究では独自性の高い解析を行うことができたと考える。

本研究により開発された PNA-NGS 法は、従来法である PNA 法と比較して 100 倍の変異検出感度を持つ。このことから、PNA-NGS 法の応用により、変異アリル頻度の低いことが想定される MAS 部分症症例における遺伝子診断が実用化できる可能性がある。

E. 結論

NGS を用いた MAS の新規遺伝子診断法を開発し、その基本性能を実証した。PNA-NGS 法は従来法と比較して 100 倍の変異検出感度を持つ。

F. 研究発表

1. 論文発表

Narumi S, Matsuo K, Ishii T, Tanahashi Y, Hasegawa T. Quantitative and Sensitive Detection of *GNAS* Mutations Causing McCune-Albright Syndrome with Next Generation Sequencing. PLoS One. 2013;8:e60525

2. 学会発表

鳴海 覚志、石井 智弘、長谷川 奉延ら。「次世代シーケンシングによる体細胞 *GNAS* 変異の定量的検出」日本人類遺伝学会学術集会 2012 年 10 月 25 日（東京）

鳴海 覚志、石井 智弘、長谷川 奉延ら。「次世代シーケンシングによる体細胞 *GNAS* 変異の定量的検出」日本小児内分泌学会学術集会 2012 年 9 月 29 日（大阪）

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

社会へ向けての研究成果の発信 (ウェブサイト・プレスリリース)

研究分担者 鳴海 覚志 慶應義塾大学医学部小児科学教室 特任助教
研究代表者 長谷川 奉延 慶應義塾大学医学部小児科学教室 教授

研究要旨

本研究の最終目標のひとつは、先天性内分泌疾患患者の QOL 改善であるが、これを達成する上で「研究成果の社会への還元」が必要である。2012 年 7 月に研究班のウェブサイトを開設し、一般市民向けに成果を紹介した。さらに、新規性の高い研究成果の論文発表においては、大学のプレスリリースを活用した。

A. 研究目的

研究班の研究成果をアカデミアのみにとどめず、日本国民に幅広く発信すること。

B. 研究方法

(1) 研究班ウェブサイト

大学病院医療情報ネットワーク研究センター (UMIN) のサービスを利用し、ウェブサイトを開設した (図 1)。

URL <http://plaza.umin.ac.jp/nge/>

全ゲノムエクソン配列解析

Endocrinome プロジェクト

McCune-Albright 症候群プロジェクト

- ・研究者紹介
- ・業績一覧
- ・リンク

無料公開されているアクセス解析サイト Google analytics に研究班のウェブサイトを登録した。日別のアクセス数、アクセス元 (国、都道府県など)、検索エンジンを経由した場合の検索ワードの情報を得た。

なお、このアクセス解析では、アクセス者の特定につながる個人情報 (性別、年齢、職業、利用しているプロバイダ) は収集されていない。

(2) プレスリリース

新規性が高いと考えられる研究成果については、その論文発表の際に、慶應義塾大学を通じてプレスリリースを行った。

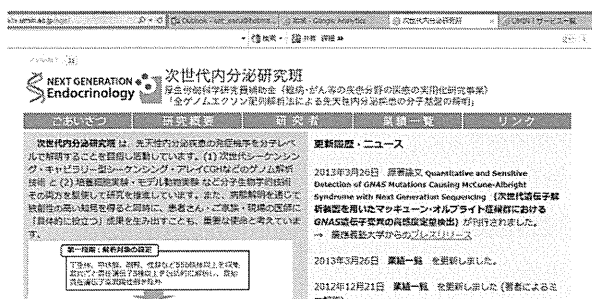


図 1 研究班ウェブサイトのトップページ
トップページで研究班の目的と研究の概要に関する説明、更新履歴などのニュースを読むことができる。研究概要のタブをクリックすると、「次世代シーケンシング」「全ゲノムエクソン配列解析」といった詳細情報が閲覧できる。

ウェブサイトの内容は以下の通りである。

- ・研究代表者からのあいさつ
- ・研究概要の解説
次世代シーケンシング

C. 研究結果

(1) 研究班ウェブサイト

研究班ウェブサイトは 2012 年 7 月 20 日に開設された。以後、のべ 3072 ユーザーによる計 9185 アクセスであった (図 2)。アクセスは全国都道

府県から確認されたほか、海外（米国、英国、ドイツなど）からのアクセスも確認された。

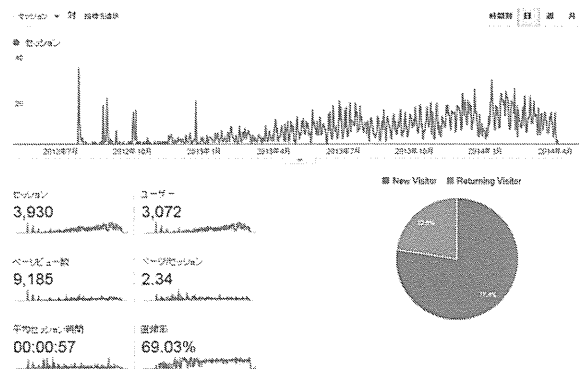


図2 研究班ウェブサイトへの総アクセス数

検索キーワードの分析では、「エクソーム解析」「エクソーム」が90%以上を占めたが、少数ながら「McCune-Albright 症候群」「5 α 還元酵素欠損症」といった、先天性内分泌疾患の病名による検索も見られた。

(2) プレスリリース

分担研究「ベンチトップ型次世代シーケンサーを用いた McCune-Albright 症候群の新規診断法の開発」（詳細は別掲）について、論文発表を行った2013年3月26日に慶應義塾大学からプレスリリースを行った（図3）。

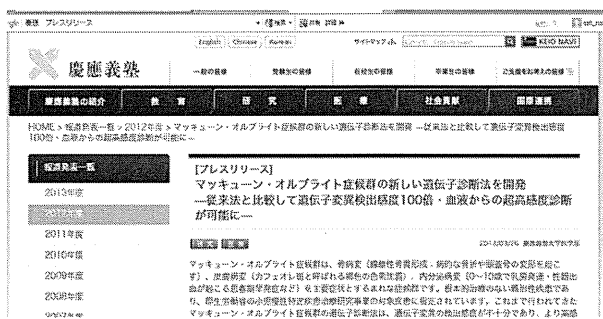


図3 「ベンチトップ型次世代シーケンサーを用いた McCune-Albright 症候群の新規診断法の開発」に関する慶應義塾大学のプレスリリース

プレスリリースは「日経プレスリリース」に掲載され、複数のニュースサイトへと転載された。

D. 考察

厚生労働省大臣官房厚生科学課による平成23年度「厚生労働科学研究費補助金公募要項」（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）には、「特に、1件当たり年間3千万円以上の公的研究費（競争的資金又はプロジェクト研究資金）の配分を受ける研究者等においては、国民との双方向コミュニケーション活動に積極的に取り組む」と記載されている。インターネット上での研究成果の継続的な発信はこの活動の一つの例として記載されている。研究班ウェブサイトはこの活動に合致する。

E. 結論

研究班ウェブサイトへのアクセスは全国から確認された。検索ワードの上位は次世代シーケンシング関連で占められたが、疾患名で検索を行い、ウェブサイトを閲覧したユーザも確認された。ウェブサイトの開設により、研究概要・成果を幅広い国民に伝達しうる体制が整備されたと考える。分担研究「ベンチトップ型次世代シーケンサーを用いた McCune-Albright 症候群の新規診断法の開発」のプレスリリースを行い、マスメディアを通じた情報発信を行った。

F. 研究発表

- 1. 論文発表
該当なし
- 2. 学会発表
該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

- 1. 特許取得
該当なし
- 2. 実用新案登録
該当なし
- 3. その他
該当なし