

2014. 11. 14

新井修平、小須賀基通、藤直子、奥山虎之、中島公子、田中健佑、石井陽一郎、池田健太郎、下山伸哉、小林富男. ポンペ病の酵素診断におけるピットフォール - α グルコシダーゼ活性値の解釈について-. 第 56 回先天代謝異常学会. 仙台、2014. 11. 14

小須賀基通、熊谷淳之、田鹿牧子、三輪善之、藤巻考一郎、上村茂、福田冬季子、杉江秀夫、奥山虎之、梅田陽. 乳児型ポンペ病に対する酵素補充療法—早期治療の重要性. 第 56 回先天代謝異常学会. 仙台、2014. 11. 14

田中あけみ、濱崎孝史、門野千穂、工藤聡志、奥山虎之、酒井規夫、小須賀基通、加藤剛二、小林良二、加藤俊一. ムコ多糖症 II 型重症型の造血幹細胞移植の脳に対する効果と IDS 遺伝子変異について. 第 56 回先天代謝異常学会. 仙台、2014. 11. 15

小須賀基通、田鹿牧子、三輪善之、藤巻考一郎、松岡孝、曾我恭司、上村茂、福田冬季子、杉江秀夫、奥山虎之、梅田陽. 乳児型ポンペ病に対する酵素補充療法の効果 (姉妹例における検討). 第 59 回日本人類遺伝学会. 東京、2014. 11. 21

田中あけみ、濱崎孝史、門野千穂、工藤聡志、奥山虎之、酒井規夫、小須賀基通、新理子、加藤剛二、小林良二、澤田智、鈴木康之、石毛美香、麦島秀雄、矢部普正、加藤俊一. ムコ多糖症 II 型重症型の造血幹細胞移植の脳に対する効果と IDS 遺伝子変異について. 第 59 回日本人類遺伝学会. 東京、2014. 11. 22

[講演]

奥山虎之. 教育セミナー「治療可能なライソゾーム病の診断ポイント」第 117 回日本小児科学会学術集会、名古屋、2014 年 4 月 11 日

小須賀基通. 「ムコ多糖症 IVA 型に対する酵素補充療法」第 18 回 日本ムコ多糖症研究会、東京、2014. 8. 1

小須賀基通. 教育講演「当センターにおけるライソゾーム病の検査診断について」第 34 回小児臨床検査研究会、東京、2014. 10. 25

H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

特になし。

厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）
分担研究報告書

ファブリー病患者 α ガラクトシダーゼ A 遺伝子の遺伝子変異解析

研究分担者 大橋十也 東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター センター長

研究要旨

ファブリー病マススクリーニングによる早期診断を実現することは遺伝子治療等の治療の早期開始につながり、患者 QOL の維持・向上に大いに貢献する。本年も GLA 遺伝子変異未同定の患者の遺伝子解析を行ない、興味深い遺伝子変異を複数同定した。

A. 研究目的

ファブリー病(FD)の責任遺伝子 GLA は X 染色体上に存在する。GLA の機能不全はライソゾーム内に基質 Gb3 の蓄積を引き起こし、全身に様々な症状を発現させる。我々は将来の FD マススクリーニングの実施による早期診断と、その後の遺伝子治療・細胞治療などの早期治療による FD 症状の改善と患者 QOL の維持・向上を目的として本研究事業に参画している。

我々は毎年 10~20 件の GLA 遺伝子解析を行っており、これまでに 108 家系の GLA 遺伝子変異を明らかにした。男性 FD 患者は酵素活性などで確定診断でき、遺伝子解析は必須ではない。一方女性は X 染色体を 2 本持つので、女性 FD 患者は無症状の場合や GLA 酵素活性が健常者と同程度の場合があり、GLA 遺伝子解析は重要で唯一の確定診断法である。平成 26 年度は、FD スクリーニング陽性者と疑陽性者の GLA 遺伝子変異解析を詳細に行い、複数の患者・家系で GLA 遺伝子変異を同定した。

B. 研究方法

平成 26 年度に慈恵大学を受診し、FD 様症状と FD 家族歴の有無、GLA 酵素活性測定と Gb3 蓄積解析などによる簡易スクリーニングを行い、スクリーニング陽性例と女性 FD 疑い例に対して GLA 遺伝子解析をおこなった。

【具体的方法】 gDNA を用いた GLA exon の direct sequence と白血球中の GLA 酵素活性測定、尿中 Gb3 蓄積解析、GLA cDNA cloning、SNP 解析等を行った。

【解析数】 被遺伝子解析人数 14 名(男性 3 名・女性 11 名)及び健常対照群

(倫理面への配慮)

被験者検体(血液・尿)の採取と GLA 遺伝子解析は、慈恵大学の臨床研究の倫理指針およびヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針に則り、本学倫理委員会で審査・承認された後行った。

C. 研究結果

今回同定した GLA 遺伝子変異のうち、特徴

的な遺伝子変異を示す。

【解析 1】

FD 家族歴があり FD 様症状を持つ女性が受診した。GLA 活性は低下していたが、各 GLA exon は全て正常配列であった。そこで末梢全血から作成した GLA cDNA の cloning と、その配列解析を試みたところ、exon 4-5 間に intron 4 と purine-rich な配列を保持していることがわかった。さらに gDNA 解析すると intron 4 に上記の purine-rich 配列の挿入変異が存在することが明らかとなり、FD 確定診断に至った。また女性の家族の遺伝子解析を行い、2 名の女性の FD 確定診断に至った。

この遺伝子変異は、過去に本研究事業で報告した遺伝子変異と同一の変異であった(平成 25 年度報告)。

【解析 2】

FD 家族歴は無いが FD 様症状を持つ男性が受診した。GLA 活性はほぼゼロであった。各 GLA exon の遺伝子列解析をしたところ、exon 4 以外の exon は全て正常配列であった。exon 4 は PCR 増幅できなかった。末梢全血から作成した GLA cDNA の cloning とその配列解析を試みたところ exon 4 が完全に欠損していることがわかった。gDNA 解析すると exon 4 に L1 の挿入変異が存在することが明らかになった。

【解析 3】

FD 家族歴は無いが FD 様症状を持つ男性が受診した。GLA 活性はかなり低下しており、FD と診断された。しかし各 GLA exon は全て正常配列であった。末梢全血から作

成した GLA cDNA の cloning とその配列解析を試みたところ exon 3-4 間に intron 3 を保持していることがわかった。さらに gDNA 解析すると intron 3 に点突然変異が存在することが分かった。この点突然変異の SNP 解析をすると、no-SNP 点突然変異(日本人 1492 人中 0 人)であることが明らかになった。男性の家族の遺伝子解析を行った所、2 名の女性の FD 確定診断に至った。

D. 考察

【解析 1】

purine-rich 配列は splicing enhancer や silencer としての機能を持つという報告がある。今回解析した家系では purine-rich 配列が splicing enhancer として働き、intron 4 を cDNA に保持させたと考えられた。独立した 2 家系で同じ挿入変異がみられたことから、intron 4 には purine-rich 配列の挿入部位が存在している可能性がある。

【解析 2】

L1 は、挿入した exon の skipping に関与することが知られている。本家系では exon 4 に L1 が挿入されたことによって exon 4 の読み飛ばしが起きていたことが分かった。また exon 4 への L1 の挿入メカニズムは既知の報告に極めて類似していることがわかった。exon 4 上に L1 認識 site が存在することが明らかになった。L1 は 3'末端に長い poly(A)配列を持つ。そのため L1 が挿入された exon 4 は PCR 増幅し難かったのかもしれない。

【解析 3】

cDNA に保持された intron 3 の領域は既

知の選択的 exon 領域と同一であった。intron 3 上の no-SNP 点変異が選択的 exon の recruit に関与していることが示唆された。FD では intron 4 上にある deep intronic point mutation が選択的 exon 4 の recruit に関与し、心 FD の発症に関与するという報告があり、今回同定した遺伝子変異はそれと同じ種類の変異タイプであった。

E. 結論

GLA 遺伝子解析を行う場合、exon 領域や splicing site 周辺の遺伝子配列はアミノ酸の変異等に直結するためよく解析される。一方 deep intronic の変異は疾患との因果関係を明らかにし難く、解析に手間がかかるため遺伝子変異は見過ごされがちである。

今回、exon 上に変異が存在しないあるいは exon の増幅ができない検体の遺伝子変異解析を行った。難解析と思われた検体に対して、基礎的な遺伝子解析手法(GLA cDNA 解析など)を用いて GLA 遺伝子変異を同定できた。また、女性 FD 疑い例の確定診断に至ることもできた。

分担研究者が所属する慈恵大は日本で最も多くの GLA 遺伝子解析を行っている施設である。本研究事業では GLA exon 領域の direct sequence 解析と GLA cDNA 解析などの手法により、慈恵大に通院する全ての FD 患者の遺伝子解析を明らかにすることができた。将来 FD マスクリーニングが実施された際、本事業で我々が確立した手法を用いればほとんどの GLA 遺伝子変異を明らかにできると考える。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
第 28 回日本小児脂質研究会(幕張)演題 4
第 56 回日本先天代謝異常学会(仙台)演題 P48

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）
分担研究報告書

ライソゾーム病患者（LAL 欠損症並びにニーマンピーク C 病患者）の
スクリーニングに関する研究

研究分担者 衛藤 義勝 脳神経疾患研究所先端医療研究センター長

研究要旨

小児稀少難病に対する遺伝子治療を推進するためには代謝性稀少難病の患者のスクリーニングシステムが必要である。本研究では将来遺伝子治療の効果が期待される 2 つの疾患、ライソゾーム性酸性リパーゼ (LAL) 欠損症並びにニーマンピーク C (NPC) 病患者のスクリーニングシステムを開発し、前者では脂肪肝或は肝硬変をきたす患者 487 名のハイリスクスクリーニングを施行し、1 名の著明活性低下患者を見出した。又 NPC 患者のバイオマーカーとして血清オキシステロールを Q-TOFMS で測定する方法を確立し、7-ケトコレステロール (7KS) を測定することにより、NPC 患者の診断に有用であることを明らかにした。更に乾燥ろ紙血 (DBS) を用いて 7KS 測定することに成功し、患者の診断に有用であり、又ミグルスタット治療と共に血清 7KS が低下することを見出し、治療マーカーとしても使用できることを明らかにした。

A 研究目的

小児稀少疾患、特にライソゾーム病の遺伝子治療を推進するためには、ライソゾーム病患者のスクリーニングシステムの開発が重要である。我々は 40 種余りのライソゾーム病の内、特に①ライソゾーム性酸性リパーゼ (Lysosomal acid lipase, LAL) の測定法を開発し、脂肪肝或は肝機能障害で来院した 487 名の患者（東京女子医大消化器内科、並びに金沢大学消化器内科受診患者、何れも一般財団法人脳神経疾患研究所倫理委員会で承認）の DBS で LAL 酵素活性を測定し、患者の診断を目的とした。②NPC 患者の診断並びにバイオマーカーとして 7KS を Q-TOFMS で測定し、NPC 患者の診断を容

易として、将来の遺伝子治療に向けての患者スクリーニング法を開発した。

B. 研究方法

① LAL の測定と脂肪肝患者の診断：LAL 活性の測定は 4-methylumbelliferyl palmitate を基質として、Dairaku N らの方法 (Mol. Genet. Metab., 2013) に従い測定した。脂肪肝&肝硬変対象患者の条件は LDL 上昇 (160 mg/dl 以上)、HDL の低下 (男性 40mg 以下、女性 50mg 以下) 並びに肝機能障害、トランスアミラーゼの上昇患者を条件とした。2014 年 1 月から 9 月までの 9 ヶ月間に、原因不明の肝機能障害あるいは肝腫大の患者を対象として乾燥濾紙血を用いた LAL 活性測定を

行った。その結果、被検者 487 名中保因者の可能性が疑われる患者が 13 名、LALD が疑われる患者が 1 名見つかった。この 1 名については、精査を進める

②血清オキシステロール並びに DBS での 7KS の測定: 7KS はオキシステロールとして血中に含まれる 7-ketocholesterol (7-KC) を LC-MS 法により定量分析を行った。血清 50 μ L に安定同位体 d7 標識内部標準化合物を加え、MeOH を添加し除タンパク質を遠心分離後試料とし、C18 逆相カラムを繋いだ UHPLC 分離溶出した各成分を高分解能、高精度な Q-TOF (MaxisG3;Bruker) 質量分析器で、ミリマス精度のもと高感度にオキシステロール類を検出し定量測定を行った。DBS での 7-ketocholesterol の測定法濾紙血の 1 パンチに安定同位体 d7 標識内部標準化合物加え、LC-MS システムに注入し測定を行った。又添加した標的化合物の安定同位体化合物を内部標準物質として補正を行い、定量分析を行った(図 1)。

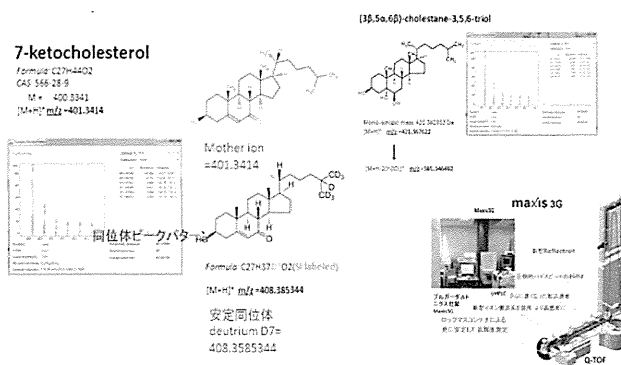


図 1 Oxysterol の Q-TOFMS 分析

C. 研究結果

①脂肪肝患者の LAL スクリーニング: 2014 年 1 月から 9 月までの 9 ヶ月間に、原因不明の肝機能障害あるいは肝腫大の

患者を対象として乾燥濾紙血を用いた LAL 活性測定を行った。その結果、被検者 487 名中保因者の可能性が疑われる患者が 13 名、LALD が疑われる患者が 1 名見つかった(図 2)。この 1 名については、精査を進める。キャリアと思われる患者は 13 名で正常とオーバーラップする。又 LAL 患者では著明に活性が低下する (affected)。

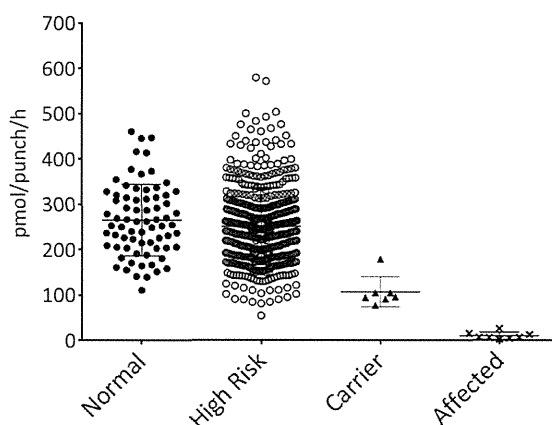


図 2 血清 7-KC 値の測定

②NPC 患者オキシステロール測定では図 3 に見られるごとく、著明に 7-KC が NPC 患者では上昇していた。又 7-KC の値は乳児型 NPC1 患者でミグルスタット 300mg 投与により、血清 7-KC の値は 600mg/dl から 100mg/dl と著明に低下したことから今後ミグルスタットによる治療のバイオマーカーとして使用できることを明らかにした。また DBS を用いた 7-KC の測定では NPC1 患者では高値を示し患者の診断に今後 DBS による診断は有用であることを示した。

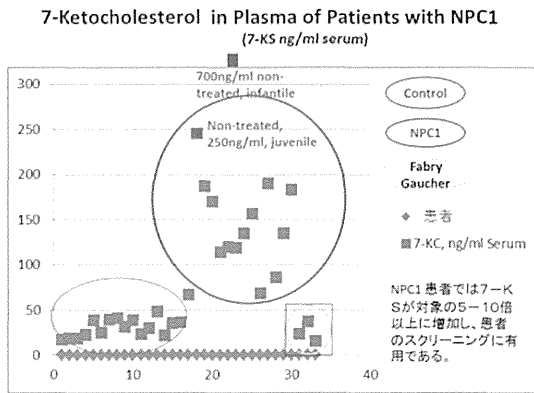


図3 NPC 患者血清 7-KC の上昇、単位は 7-KC, ng/ml

D. 考察

稀少難病の内、特にライソゾーム病である LAL 欠損症は成人脂肪肝或は肝硬変を来すだけでなく、小児でも脂肪肝或は肝硬変を来す。LALD 患者の早期発見のため、肝機能異常患者、肝腫大・肝硬変などを呈する患者のハイリスクスクリーニングを更に進めていく。今回成人脂肪肝患者で1名の LAL 患者と思われる患者を見出し、更に遺伝子変異を検討し、病理組織で証明する。

又 NPC 患者の診断に患者血清 7-KC の測定は有用であることを示し、又ミグスタットによる NPC 患者の治療のバイオマーカーになることを証明した。更に DBS での NPC 診断法を明らかにしたことは極めて NPC が現在フィリピン染色を侵襲性のある皮膚培養によらねばならない現在、大変診断には有用であることを証明した。

E. 結論

LAL 欠損症は現在酵素補充療法が開発され、近い将来わが国でも酵素補充療法が

承認されるが、永続的な治療法として将来遺伝子治療の効果が最も期待できる疾患であり、AAV 或はレンチウイルス Vector での遺伝子治療が期待できる。今回 NPC 病も酵素補充療法などない現在根治治療としての遺伝子治療は将来的に NPC 患者の治療としてレンチウイルス或は AAV ベクターを用いて治療が期待でき、今回患者のハイリスクスクリーニング法を確立したことは大変重要で、将来の遺伝子治療への応用に期待できる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Higuchi T, Kawagoe S, Otsu M, Shimada Y, Kobayashi H, Hirayama R, Eto K, Ida H, Ohashi T, Nakauchi H, Eto Y. : The generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) from patients with infantile and late-onset types of Pompe disease and the effects of treatment with acid- α -glucosidase in Pompe's iPSCs. *Mol Genet Metab.* 2014;112(1):44-8.
- 2) Akiyama K, Shimada Y, Higuchi T, Ohtsu M, Nakauchi H, Kobayashi H, Fukuda T, Ida H, Eto Y., Crawford BE, Brown JR, Ohashi T. : Enzyme augmentation therapy enhances the therapeutic efficacy of bone marrow transplantation in mucopolysaccharidosis type II mice. *Mol Genet Metab.* 2014 Feb;111(2):139-46.

- 3) Sato Y, Kobayashi H, Sato S, Shimada Y, Fukuda T, Eto Y, Ohashi T, Ida H. : Systemic accumulation of undigested lysosomal metabolites in an autopsy case of mucopolipidosis type II; autophagic dysfunction in cardiomyocyte. *Mol Genet Metab.* 2014 Jul;112(3):224-8.
- 4) Dairaku T, Iwamoto T, Nishimura M, Endo M, Ohashi T, Eto Y. : A practical fluorometric assay method to measure lysosomal acid lipase activity in dried blood spots for the screening of cholesteryl ester storage disease and Wolman disease. *Mol Genet Metab.* 2014 Feb;111(2):193-6.
- 5) Kobayashi M, Ohashi T, Iizuka S, Kaneshiro E, Higuchi T, Eto Y, Ida H. : Frequency of de novo mutations in Japanese patients with Fabry disease. *Mol Genet Metab Rep.* 2014;1: 283-287
- 6) Katagiri S, Gekka T, Hayashi T, Ida H, Ohashi T, Eto Y, Tsuneoka H. : OAT mutations and clinical features in two Japanese brothers with gyrate atrophy of the choroid and retina. *Doc Ophthalmol.* 2014 Apr;128(2):137-48
- 7) Kawagoe S, Higuchi T, Otaka M, Shimada Y, Kobayashi H, Ida H, Ohashi T, Okano HJ, Nakanishi M, Eto Y. Morphological features of iPS cells generated from Fabry disease skin fibroblasts using Sendai virus vector (SeVdp). *Mol Genet Metab.* 2013 Aug;109(4):386-9.
- 8) Takamura A, Sakai N, Shinpoo M, Noguchi A, Takahashi T, Matsuda S, Yamamoto M, Narita A, Ohno K, Ohashi T, Ida H, Eto Y. : The useful preliminary diagnosis of Niemann-Pick disease type C by filipin test in blood smear. *Mol Genet Metab.* 2013 Nov;110(3):401-4.
- 9) Nishiyama Y, Shimada Y, Yokoi T, Kobayashi H, Higuchi T, Eto Y, Ida H, Ohashi T. : Akt inactivation induces endoplasmic reticulum stress-independent autophagy in fibroblasts from patients with Pompe disease. *Mol Genet Metab.* 2012 Nov;107(3):490-5.
- 10) Ohashi T, Iizuka S, Shimada Y, Higuchi T, Eto Y, Ida H, Kobayashi H. : Administration of Anti-CD3 Antibodies Modulates the Immune Response to an Infusion of α -glucosidase in Mice. *Mol Ther.* 2012 Oct;20(10):1924-31.
- 11) Higuchi T, Shimizu H, Fukuda T, Kawagoe S, Matsumoto J, Shimada Y, Kobayashi H, Ida H, Ohashi T, Morimoto H, Hirato T, Nishino K, Eto Y. : Enzyme replacement therapy (ERT) procedure for mucopolysaccharidosis type II (MPS II) by intraventricular administration (IVA) in murine MPS II. *Mol Genet Metab.* 2012 Sep;107(1-2):122-8.
- 12) Kobayashi M, Ohashi T, Fukuda T, Yanagisawa T, Inomata T, Nagaoka T, Kitagawa T, Eto Y, Ida H, Kusano E. : No accumulation of globotriaosylceramide in the heart of a patient with the E66Q mutation in the α -galactosidase A gene. *Mol Genet Metab.* 2012 Dec;107(4):711-5.

2. 学会発表

- 1) 衛藤義勝：遺伝子治療の現状、稀少疾患創薬に向けて、レット症候群シンポジウム，4月19日，東京
- 2) 衛藤義勝：基調講演ファブリー病最新の話題，大阪オープンセミナー2014，4月20日，大阪
- 3) 衛藤義勝：ファブリー病～早期診断・早期治療の重要性～，第55回日本神経学会学術大会ランチョンセミナー，5月23日，福岡
- 4) 衛藤義勝：基調講演ライソゾーム病の研究－診断、治療の進歩，東京シンポジウム2014，5月31日，東京
- 5) 衛藤義勝：特別講演小児から成人の広範囲発症 開業医の先生方にも役立つ！ 遺伝性・進行性難病 早期診断の手掛かり－ファブリー病を中心に－，先天代謝異常症セミナー，6月4日，山梨
- 6) 衛藤義勝：先天性ムコ多糖症の診断、治療に関する最近の進歩－早期発見のために小児保健関係者ができること－，第61回日本小児保健協会学術集会，6月22日，福島
- 7) 衛藤義勝：先天性ムコ多糖症－臨床と治療の進歩，久留米大学グランドカンファレンス，7月11日，福岡
- 8) 衛藤義勝：特別講演，第100回慈恵医大小児医学研究会記念大会，7月12日，東京
- 9) Yoshikatsu Eto : Toward Gene Therapy of Genetic Diseases-Past, Present and Future, 20th memorial JSGT annual meeting, 2014.8.7, Tokyo
- 10) 衛藤義勝：LAL の測定法，ライソゾーム酸性リパーゼ欠損症 エキスパート会議，8月26日，東京
- 11) 衛藤義勝：Gaucher 病 最近の知見 -Clinical and Genetic Features and the Treatment, 第2回ゴーシェ病フォーラム，9月20日，東京
- 12) Yoshikatsu Eto : Gaucher disease: Clinical and genetic features and the treatment related to bone disease, The 2nd International Gaucher Conference on Bone disease, 2014.9.26, Korea
- 13) Yoshikatsu Eto: Gaucher disease type 3 –Diagnosis and Treatment, The 16th Asia LSD Symposium –Two decades of ERT: Achievements and Challenging issues, 2014.9.27, Korea
- 14) 衛藤義勝：先天性ムコ多糖症 臨床と治療の進歩，学術講演会，10月8日，愛知
- 15) 衛藤義勝：小児から成人期発症 進行性遺伝性疾患の最新の治療～酵素補充療法の早期導入の重要性と今後の問題点，第10回長野県稀少難病治療研究会，10月10日，長野
- 16) 衛藤義勝：先天性ムコ多糖症の診断、治療に関する最近の進歩，北海道ムコ多糖症講演会，10月25日，北海道

H. 知的財産権の出願、登録状況 特になし

厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）
分担研究報告書

単球・マクロファージに NADPH oxidase 活性を有した X-CGD 症例の検討

研究分担者 有賀 正 北海道大学大学院医学研究科小児科学 教授

研究協力者 大倉有加、竹崎俊一郎、山田雅文、小林一郎

北海道大学大学院医学研究科小児科学

研究要旨

X連鎖性慢性肉芽腫症 (X-CGD)は NADPH oxidase の構成蛋白の 1 つである gp91^{phox} の異常によって食細胞における活性酸素 (ROI) 産生の障害を来す疾患である。X-CGD において単球/マクロファージに特異的に gp91^{phox} の発現が保たれている報告はない。今回我々は生後 4 ヶ月から細菌感染症を反復し 1 才時に X-CGD と診断された現在 31 才の男性症例を報告する。患者は 1 才以降徐々に感染症の頻度は減少し、ST 合剤と ITCZ の予防投薬下で現在まで明らかな細菌、真菌感染症や過炎症病態を認めず、健康に就労している。この非典型的な臨床経過より患者の免疫能を改めて評価した。Respiratory burst analysis にて好中球では ROI 産生はほとんど認められなかったのに対し、単球においてはほぼ正常に近い産生を認めた。また gp91^{phox} 発現に関しても、好中球ではほぼ欠損していたのに対し、単球/マクロファージにおいてほぼ正常な発現を確認した。好中球、単球の両者における gp91^{phox} の発現の違いに関して、モザイクや mRNA の安定性の違いによる可能性は否定的であった。患者で同定された c.1016C>A による X-CGD の報告は 10 家系あるが classical X-CGD であり本症例の臨床像とは明らかに異なっていた。本症例においては好中球の NADPH oxidase の機能は乳児期の自然免疫として重要であるが、加齢とともに単球/マクロファージにおける NADPH oxidase 残存活性が代償しているものと推測された。また、単球/マクロファージの残存活性の評価は X-CGD の長期的予後の予測因子ともなりうる可能性が考えられた。

A. 研究目的

慢性肉芽腫症 (CGD) は乳児期より重症細菌・真菌感染症を反復し、各種臓器に肉芽腫を形成する特徴を有する疾患である。CGD は NADPH oxidase 構成蛋白の異常により種々の貪食細胞(好中球、好酸球、単球、マ

クロファージ)の活性酸素 (ROI) の産生障害が主病態である。CGD の約 70% は X-linked CGD (X-CGD) でありその責任遺伝子と責任蛋白はそれぞれ *CYBB*、gp91^{phox} である。一般的に、X-CGD において gp91^{phox} の発現と NADPH oxidase の機能は食細胞の種類は

間わず一様であるとされている。よって CGD の診断において ROI 産生能の評価は好中球が用いられることが多く、その NADPH oxidase の残存活性は CGD において生存率と相関するとされている。しかし CGD における単球・マクロファージ系におけるその残存機能と予後の関係は明らかにはなっていない。今回、我々は *CYBB* に c.1016C>A (p.P339H) の変異を有し好中球の NADPH oxidase 活性はほぼ欠損していたものの、単球・マクロファージにおいては正常に近い NADPH oxidase 活性と gp91^{phox} 発現を認めた X-CGD 患者について検討した。

B. 研究方法

1. 症例

症例は現在 31 才の男性。生後 4 ヶ月より化膿性頸部リンパ節炎、歯肉炎、中耳炎、皮膚の感染症などを反復し、1 才時に NBT 還元試験陰性、*CYBB* 遺伝子解析により X-CGD と診断された。家族内検索では母と次姉はキャリア、長姉は正常であった。1 才以降は感染頻度は減少し、7 才時に肺炎、下肢の外傷からブドウ球菌による皮膚感染症を認めた。20 才時に遷延する腹痛のため下部消化管内視鏡検査を行ったが、異常所見は観察されず、病理検査でも肉芽腫性病変なども認められなかった。現在、ST 合剤、ITCZ の予防内服下で、明らかな真菌感染症や過炎症病態も認めず健康に就労している。このような非典型的臨床経過より改めて患者の免疫能を評価した。

2. 血液試料

本症例とその母と次姉、3 人の X-CGD 患者、コントロールから北海道大学倫理委員会規定に基づきインフォームドコンセントを行い血液を採取した。X-CGD1、X-CGD2、X-CGD3 の有する *CYBB* 変異はそれぞれ：c.1180_1182delinsATGTGATGAACACAT、IVS5 -3c>a、c.161G>T (p.R54M) である。ヘパリン加血より Ficoll-Hypaque 法により末梢血単核球(PBMC)を分離、その後メチルセルロース法で好中球(PMNs)を採取した。単球 (Mono) は CD14 MicroBead と MACS Separation Columns を用いて PBMC から分離した。単球に M-CSF を加え(5 ng/ml)、約 10 日間培養しマクロファージ (MDMs) へ分化させた。

3. フローサイトメトリー法による Respiratory burst analysis

Dihydrorhodamine123(DHR)と aminophenyl fluorescein (APF)を蛍光プローブとして用い、PMNs と Mono の ROI 産生能を評価した。

4. gp91^{phox} の発現解析

抗 gp91^{phox} 抗体 (7D5)を用いてフローサイトメトリー法で PMNs、Mono、MDMs の細胞膜表面の gp91^{phox} の発現を解析した。また PMNs と Mono の whole cell lysate を用いて western blot 法により gp91^{phox} 発現も解

析した。

5. CYBB RT-PCR とリアルタイム RT-PCR

本症例と母の PMNs と Mono の CYBB RT-PCR を施行し、その産物の遺伝子解析を行った。また本症例の PMNs と Mono の CYBB リアルタイム RT-PCR を施行した。

C. 研究結果

1. 単球の NADPH oxidase 活性は保たれていた (図 1)

Respiratory burst 活性を mean fluorescence intensity (MFI) を用いて測定し、表 1 に記した。DHR による解析では X-CGD 1、2、3 の PMNs の ROI 産生は様々であったのに対し (MFI; 0.35~76.47)、単球の ROI 産生はほぼ欠損していた (MFI; 0~5.44)。本症例では PMNs では ROI 産生はほぼ認められなかったのに対し (MFI; 2.51)、Mono では明らかな ROI 産生を認めた (MFI; 9.53)。一方、APF を用いた解析において、本症例、X-CGD2、X-CGD3 の MFI は PMNs で 6.92、7.56、9.90 であったのに対し、Mono では 37.94、3.78、1.86 であった。以上より本症例は単球に特異的に NADPH oxidase 活性が保たれていることが明らかとなった。

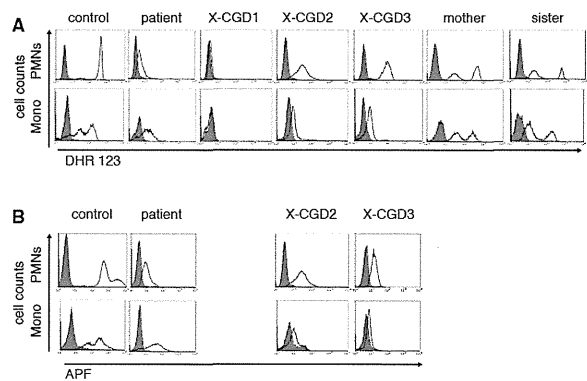


図 1. Respiratory burst 活性解析結果

表 1. PMNs と Mono における MFI 値

	DHR		APF	
	PMNs	Mono	PMNs	Mono
Control	353.92	70.47	1101.66	267.62
Patient	2.51	9.53	6.92	37.94
X-CGD1	0.35	0	N.D.	N.D.
X-CGD2	28.12	5.44	7.56	3.78
X-CGD3	76.47	4.24	9.90	1.86

2. 単球の gp91^{phox} 発現は保たれていた

7D5 抗体を用いたフローサイトメトリー法では (図 2A)、X-CGD1、X-CGD2 の gp91^{phox} の発現は PMNs と Mono の両方で欠損していたが、X-CGD3 ではほぼ正常の発現を認めた。本症例の gp91^{phox} の発現は PMNs では著しく低下していたが、Mono はほぼ正常の発現が認められた。更に gp91^{phox} の Western blot 法では (図 3)、本症例の PMNs では発現は認められなかったのに対し、Mono ではコントロールと同等の発現を認めた。X-CGD1、X-CGD2 は両細胞で発現は認められなかったが、X-CGD3 ではほぼ正常の発現を認めた。

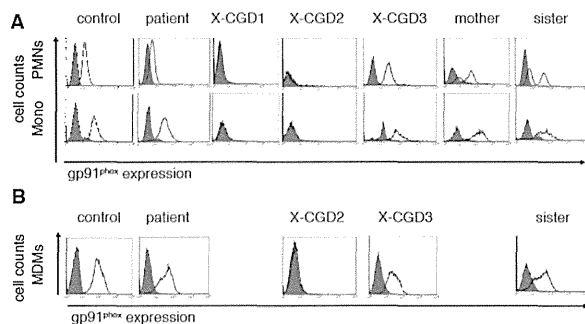


図 2. 7D5 抗体によるフローサイトメトリ結果

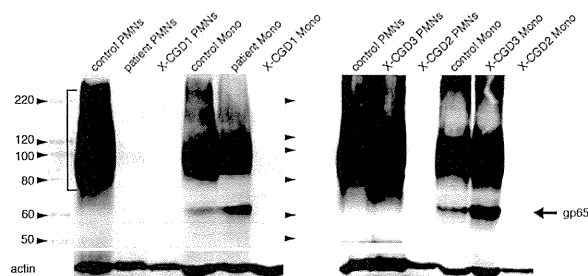


図 3. gp91phox 抗体による western blot 解析結果

3. 単球の gp65 発現が増加していた

gp91^{phox} の前駆蛋白として知られている gp65 は小胞体の中で合成され、p22^{phox} と結合しゴルジ体の中でプロセッシングを受け成熟した gp91^{phox} となるとされている。Bustamante らは *CYBB* 変異 (Q231P あるいは T178P) によりマクロファージ特異的に NADPH oxidase 活性の欠損を認め細胞内寄生菌に易感染性を呈する家系を報告している¹。これらの家系ではマクロファージにおける gp65 の発現が増加していたことより、マクロファージに局限した gp65 から gp91^{phox} への成熟障害が原因ではないかと推測し、細胞内寄生菌のコントロールにはマクロファージの NADPH oxidase 機能が重

要であることを述べている。今回我々の解析では Mono において gp65 の発現を認めた (コントロール、本症例、X-CGD3) (図 3)。本症例と X-CGD3 ではほぼ正常な gp91^{phox} の発現に加え gp65 の発現がコントロールより増加していたことより、gp65 から gp91^{phox} への部分的な成熟障害があるのではないかと推測した。

4. 単球特異的な gp91^{phox} の発現はモザイクによるものではなかった

PMNs と Mono における gp91^{phox} の発現が異なる原因が体細胞モザイクによる可能性を考え、PMNs と Mono における *CYBB* の遺伝子解析を行ったが、両細胞において c.1016C>A の変異のみ認め体細胞モザイクの可能性は否定的であると考えた (図 4)。

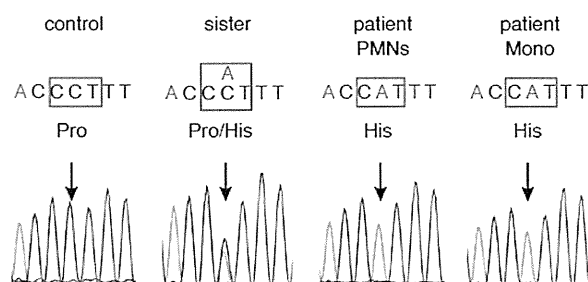


図 4. PMNs と Mono における遺伝子解析結果

5. P339H mutant の mRNA の安定性は保たれていた

本症例と母の PMNs と Mono において *CYBB* RT-PCR を行い (図 5A)、その産物の

遺伝子解析を行った(図 5B)。母の PMNs と Mono では正常塩基(C)と変異塩基(A)のシグナルの強度は両細胞ではほぼ同等であり、変異アリル由来の CYBB mRNA の安定性は両細胞で明らかな差はないことが示唆された。更に本症例の PMNs と Mono を用いて CYBB リアルタイム RT-PCR を行ったが、両細胞ともコントロールと差は認められなかったことより、gp91^{phox} の発現の差は mRNA の安定性の違いによるものではないことが明らかとなった。

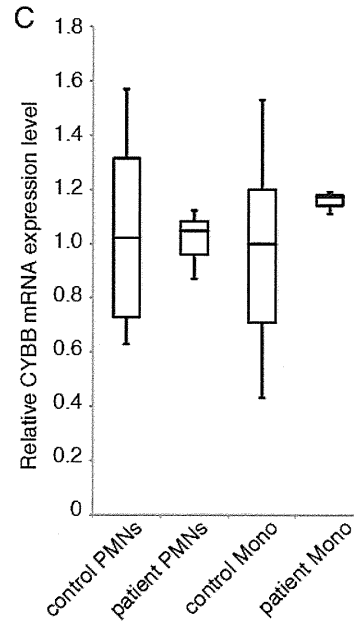
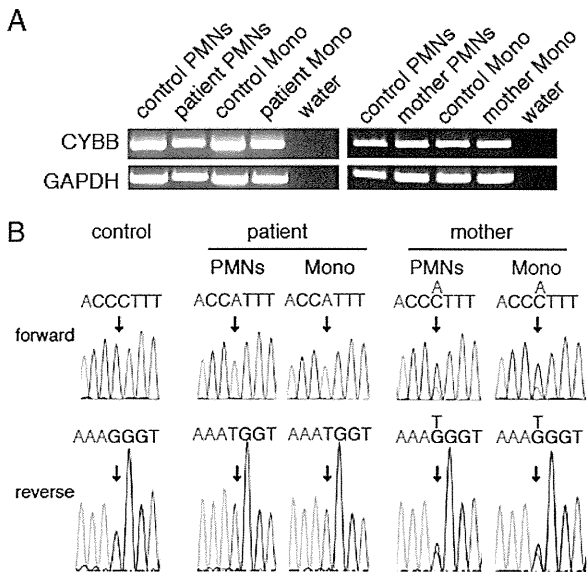


図 5. CYBB RT-PCR(A)とその産物の遺伝子解析結果(B)、および CYBB リアルタイム RT-PCR 結果(C)

6. MDMs の gp91^{phox} の発現も保たれていた

本症例の MDMs の gp91^{phox} の発現を 7D5 抗体を用いてフローサイトメトリー法で解析したところ、Mono と同様に gp91^{phox} の発現が保たれていることがわかった(図 2B)。X-CGD2 の MDMs における gp91^{phox} の発現は欠損、X-CGD3 の MDMs ではほぼ正常の発現を認めた。

D. 考察

今回我々は単球・マクロファージに特異的に gp91^{phox} の発現と機能が保たれ非典型的臨床経過を呈する X-CGD 患者の成人例を報告した。CGD において真菌感染症、特にアスペルギルス感染症の頻度は年齢ともに増加

し CGD の死因の約 1/3 を占めるとされている。また CGD では肉芽腫性腸炎や自己免疫性疾患なども合併することが多いとされている。しかし、本症例は乳児期に細菌感染症を反復したが、1 才以降はその頻度は減少し、現在まで明らかな真菌感染症や肉芽腫性過炎症病態は一度も認めていない。好中球における NADPH oxidase 活性は病原体の殺菌に重要でありまたその残存機能は CGD における臨床経過や生存率の指標になるとされているが、単球・マクロファージにおけるその機能はよく知られていない。*Ncf1* 欠損マウスの系で、*CD68* プロモーターを用いて単球・マクロファージ特異的に *NCF1* 発現および NADPH oxidase の機能を正常化させた transgenic マウスでは、すべての血球系で *Ncf1* を欠損しているマウスに比べ細菌・真菌感染症は軽減され、また β グルカンなどの刺激に対する炎症性サイトカインの産生も軽減されることがわかっている。以上のことをふまえ、本症例において単球・マクロファージ特異的な NADPH oxidase 機能の残存が、感染防御や過炎症の制御に関与しているものと推測した。

本症例で認められた c.1016C>A (p.P339H) を有する X-CGD は 10 家系ありいずれも海外からの報告である。臨床経過の知り得た 9 家系はすべて classical X-CGD である。そのうちの 1 家系は 3 才時に X-CGD の診断となり、重症感染症のため骨髄移植が施行されている。好中球の ROI 産生は DHR assay でゼロであった。他の 1 家系においても DHR assay で好中球の ROI 産生は認めて

いない。いずれの症例も単球における機能や蛋白発現などの検討はされていない。

本症例において好中球と単球・マクロファージ系で *gp91^{phox}* の発現と機能が異なっていた原因として、モザイクの可能性は否定的であり、mRNA の安定性も両者で差は認められなかった。特定の細胞に *gp91^{phox}* の発現を認めた報告として、*CYBB* に p.Q231P または p.T178P の変異を有しマクロファージに局限して *gp91^{phox}* の発現欠損を認め、細胞内寄生菌に易感染性を呈する家系がある¹⁾。これらの患者では *gp65* の発現がマクロファージにおいて増加していたことよりマクロファージに局限した *gp65* から *gp91^{phox}* への成熟障害が原因ではないかと考えられている。本症例においても単球においてほぼ正常な *gp91^{phox}* の発現は認められたが、*gp65* の発現も増大していたことより、*gp65* から *gp91^{phox}* への部分的な成熟障害があるものと考えられた。*gp65* は好中球では不安定であるためかコントロール、本症例ともに発現は認められなかったため好中球における成熟障害に関しては評価することはできなかったが、好中球における成熟障害が単球より強く生じていることが、両細胞において *gp91^{phox}* の発現に違いを生じた原因ではないかと推測している。

gp91^{phox} の発現が単球・マクロファージ系に局限している現象が、p.P339H を有する X-CGD 患者に共通の現象であるのか、また本症例に特異的であるのかに関しては今回の検討では明らかにできなかった。*gp91^{phox}* の生合成および成熟過程、またその安定性な

どに関して、好中球と単球・マクロファージ系において異なるのか明らかにする必要がある。

E. 結論

単球・マクロファージにおける NADPH oxidase 機能が X-CGD において感染防御や過炎症の制御に重要であることが示唆された。また好中球の NADPH oxidase の残存機能は乳児期には自然免疫として重要であるが、年齢とともに単球・マクロファージが好中球の機能を代償できる可能性が考えられた。X-CGD において好中球だけでなく単球・マクロファージの機能の評価は X-CGD 患者の予後を予測する上で重要であると思われた。CGD において単球・マクロファージにおける機能の解明は遺伝子治療も含めた CGD の治療戦略において重要な課題になるかもしれない。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

論文作成中 J Clin Immunology submitted.

2. 学会発表

大倉有加、山田雅文、栗林太、小林一郎、有賀正 第 22 回食細胞機能異常症研究会
2014 年 12 月 13 日 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

参考文献

1. Bustamante J, Arias AA, Vogt G, et al. Germline CYBB mutations that selectively affect macrophages in kindreds with X-linked predisposition to tuberculous mycobacterial disease. *Nat Immunol.* 2011;12(3):213-221.

日本における p47phox 欠損型慢性肉芽腫症の遺伝子解析

研究分担者 布井 博幸 宮崎大学医学部生殖発達医学講座小児科学分野 教授

研究要旨 日本における慢性肉芽腫症患者は現在 364 名が登録されており、278 名が病型分類されている。その内 p47phox 欠損症患者は 16 名であり、2 家系 4 名の姉妹兄弟例が見られた。p47phox 欠損型が日本では約 6%と欧米の約 1/4 で、かなり少なく、その遺伝的な背景が明らかでない。遺伝子解析では、73-74del1GT 変異が 7 名の患者で見出され、また、片アレルの GT 欠失と Williams 症候群を伴う 7 番染色体の一部欠失を伴う症例が 1 例認められた。Missense 変異では c269G>A, Arg90His が 2 名と c295G>A, Gly99Ser が 1 名確認された。NCF1 遺伝子には 2 つの偽遺伝子があり、これらの遺伝子間での cross-over が GT 欠失の主たる原因とされるが、欧米と比較した時の発症頻度の低さが説明できない。さらなる検討が必要である。

A. 研究目的

日本における慢性肉芽腫症 (Chronic Granulomatous Disease; CGD) 患者の全体像とその病型分類を明らかにする。今回 p47 欠損型 CGD 患者の 16 症例につき、その全体像まとめ、遺伝子解析などの確実なデータをまとめ、今後登録患者の重症度分類をアンケート調査し、病型および遺伝子変異と臨床的重症度比較を行うことにより、より根拠のある診療ガイドラインが作成されることを目的としている

B. 研究方法

日本における CGD 患者診断のため H26 年度までに宮崎大学小児科に登録いただいた症例と、PIDJへ登録され閲覧可能だった症例で、記載された生年月日から両登録に重複が無いことを確認できた症例は、総数 364 名であった。病型分類まで出来ている症例は 285 名を研究対象とした。

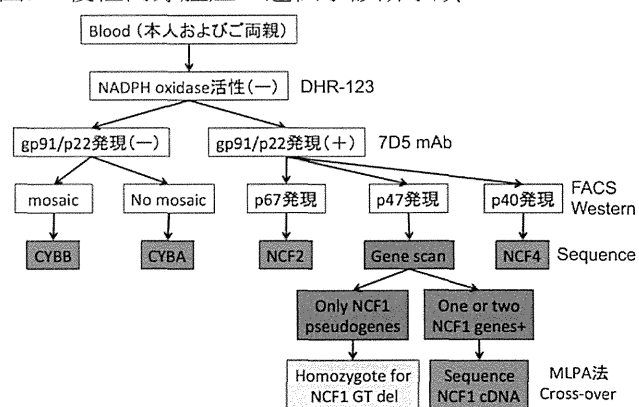
病型分類は、最初 DHR-123 法により活性酸素産生能低下を確認後、本人およびご両親の 7D5moAb による gp91-/p22-phox 発現を確認し、欠損している場合、ご両親（特に母親の）の gp91-/p22-phox 発現が陽性の場合 CYBA (p22-phox) 遺伝子検査を、2 相性発現の場合は CYBB (gp91-phox) 遺伝子解析を行った。P47-/p67-phox 発現は western blot 法と Wada らが発表した FACS 解析 (J Clin Immunol 2013;33:857-864) を行った (図 1)。

p47 欠損型 CGD 患者の DNA 遺伝子解析は従来の Sanger 法で行われ、これまで報告された p47 欠損型患者のデータをまとめ、SNPs と考えられる配列と比較し、変異配列を決定した。

(倫理面への配慮)

CGD 患者調査に関しては、両施設の倫理委員会ですでに承認されており、患者さんまたは患者家族からすでに IC をいただいている。

図1 慢性肉芽腫症の遺伝子診断手順



C. 研究結果

日本における慢性肉芽腫症患者は総数 364 名中 280 名で病型が確定しているが、79 名の病型がまだ確定されていない。病型分類されている 280 例中 16 例が p47 欠損型 CGD 患者で、5.6% であった。これはほぼ同数の病型分析をされている米国 NIH の報告 (NEJM 363(27):2600-2610, 2010) と比較すると米国の p47 欠損型 CGD 患者は 71/288 名 (24.7%) で、日本では 16/280 名 (5.6%) と日本人でかなり少ない傾向にあった。一方で p67 欠損症が多いことが特徴であった (表 1)。

表1 欧米との病型比較

	患者数 NIH 1)	%	患者数 日本 2)	%
gp91-	196	70.2%	220	77.2%
p22-	8	4.5%	17	6.0%
p47-	71	24.7%	16	5.6%
p67-	13	2.8%	32	11.2%
total	288		285	

1) NIH: National Institutes of Health
N Engl J Med 363(27):2600-2610,2010
2) H26年 本邦

p47遺伝子解析では、3種類の変異が確認され、del GT変異が8/16 (50%)で、その他、Missense変異ではc269G>A, Arg90Hisが2名とc295G>A, Gly99Serが1名確認された(表2)。まだ5例で遺伝子解析がなされていなかった。

表2 p47phox欠損型患者の遺伝子解析結果

Pt. #	既報のSNPs										新規のSNPs									
	65D>C	73D>A	73,74del	230>23	295G>	345G>T	387C>A	468C>T	496A>G	558A>G	621G>A	765C>A	825C>T	848A>G	923C>T	936C>T				
63																				
65																				
79																				
95																				
106																				
126																				
146																				
181																				
188																				
208																				
218																				
325																				
305																				
301																				
358	X	X	GGT/G	X	A/A	G/A	X	G/A	X	A/G	A/G	G/A	A/C	C/T	X	C/T	C/T			
388	X	X	GGT/G	C/A	A/A	G/A	C/T	G/A	X	A/G	G/A	A/C	C/T	A/G	C/T	C/T	C/T			
288	X	X	GGT/G	X	G/A	A/A	C/T	X	X	A/G	A/G	X	C/T	A/G	X	C/T	C/T			
NCF1			GT		G	G	C	G		A	A			T		C				
NCF1B			G		A	G	T	G		A	G			T		C				
NCF1C			G		A	A	T	A		G	G			T		C				

病因遺伝子変異の欧米との比較ではdelGTの頻度は高かったが、他の変異は2つしか同定できておらず、これらは新規変異であった。

D. 考察

p47欠損型CGD患者16名の遺伝子解析に基づく解析を行った。11名でNCF1遺伝子変異が確認されたが、5名で遺伝子解析できていなかった。

delGT変異は8例で1例ではWilliams症候群を呈しており、7番染色体の部分欠失が証明されていた。

delGT変異以外で遺伝子解析ができていた3例では、いずれもmissense変異でc269G>A, Arg90Hisが2名とc295G>A, Gly99Serが1名で、いずれも新規変異であった。

p47-phox欠損型CGD患者はほぼ同数の病型分析をされている米国NIHの報告(NEJM 363(27):2600-2610, 2010)と比較すると、米国では71/288名(24.7%)で、日本では16/280名(5.6%)と日本人でかなり少なく、他の常染色体劣性遺伝形式の病型と同等の傾向にあった。一方でp67欠損症が多いことが特徴であった。

p47-phox欠損患者が日本で米国の約1/4と少ない原因については、NCF1は、pseudogeneを2個持ち、その偽遺伝子がmRNAに読まれていたり、true geneとの変異がexonでは2箇所しか無く、変異の同定が難しいなどの問題があった。Gene scanやMLPA法によるpseudogeneとのcross overの確認などより詳細な解析が必要である。

E. 結論

p47phox欠損CGD患者のNCF1遺伝子解析の結果、欧米と比較して約1/4と他の常染色体劣性遺伝形式の病型とほぼ同様であることから、日本の患者における偽遺伝子の同定とMLPA法によるさらに詳細な解析が必要である。また、p47-phox欠損患者は臨床的にも軽症である可能性もあり、今後アンケート調査を準備し、診療ガイドライン作成に備えたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Proposed strategy for the use of high-dose chemotherapy with stem cell rescue and intrathecal topotecan without whole-brain irradiation for infantile classic medulloblastoma. Yamada A, Moritake H, Kamimura S, Yamashita S, Takeshima H, Nunoi H. *Pediatr Blood Cancer*. 2014 Dec; 61(12): 2316-8.

2) Clinical characteristics and genetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia with hemophagocytic lymphohistiocytosis: a Japanese retrospective study by the Kyushu-Yamaguchi Children's Cancer Study Group. Moritake H, Kamimura S, Nunoi H, Nakayama H, Suminoe A, Inada H, Inagaki J, Yanai F, Okamoto Y, Shinkoda Y, Shimomura M, Itonaga N, Hotta N, Hidaka Y, Ohara O, Yanagimachi M, Nakajima N, Okamura J, Kawano Y. *Int J Hematol*. 2014 Jul;100(1):70-8.

3) Nephrotic syndrome complicated by idiopathic central diabetes insipidus. Konomoto T, Tanaka E, Imamura H, Orita M, Sawada H, Nunoi H. *Pediatr Nephrol*. 2014 May;29(5):927-30.

2. 学会発表

1) Unknown fever and cytokine profiles. Hiroyuki Nunoi, Toyoki Nishimura, Erina Taniguchi. 12th innate immunity and cytokine conference in San Diego, USA, 2014/1/31

2) 溶血性尿毒症症候群におけるチトクロームCの検討. 田中悦子, 此元隆雄, 今村秀明, 織田真悠子, 中原彰彦, 布井博幸. *日本小児腎臓病学会雑誌* 27(suppl): 106-106, 2014.

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）

分担研究報告書

遺伝子・細胞治療実施に係る基盤整備

分担研究者 藤本純一郎 国立成育医療研究センター 理事長特任補佐

研究要旨 本研究に係る治験実施に関する枠組みについて、昨年度までに社会・臨床研究センターの担当者との間で協議を行い、概要ならびに役割分担を決定した。本年度は相手企業との協議あるいは PMDA との協議に参加した。また、外国企業から送付された共同研究契約書の内容検討や和訳に係る顧問弁理士へ仲介は本年度も実施した。国立成育医療研究センターは、平成 25 年厚生労働省の臨床研究中核病院整備業における機関に指定されたため、治験推進基盤が構築されつつあり、本研究で実施している遺伝子治療は主たる支援対象と認定されている。

A. 研究目的

遺伝子・細胞治療の臨床研究開発に係る基盤整備を行い、医師主導治験等の開発を促進することを目的とする。

B. 研究方法

当センターは厚生労働省の臨床研究中核病院整備事業の指定を受けたが、施設内で基盤整備が進んでいる。そこで本事業の中での当該研究への推進支援について昨年度に引き続き、研究代表者、関連企業の担当者、社会・臨床研究センター担当者等との協議を行い方向性や計画等を定めた。また、外国企業からの契約書等の内容確認については当センターの顧問弁理士に相談しつつ検討を行った。

（倫理面への配慮）

本年度の分担研究を実施するにあたっては、ヒトを対象とした研究は行わないため、該当しない。

C. 研究結果

1. 臨床研究中核病院整備事業での位置づけ

臨床研究中核病院整備事業は世界的に通用する ICH-GCP 準拠の質の高い臨床研究を実施するための基盤整備である。本研究の中で計画している遺伝子治療はまさにこの方向性と合致しているため、臨床研究中核病院整備事業が支援を行う重点的なシーズのひとつと位置付けられている。本年度は、昨年度に定めた推進計画の進捗状況を検討したところ予定通り進行していることを確認した。

2. 関係者との協議

臨床研究中核病院整備事業では、治験・医師主導治験の薬事・開発等に精通しているもの、データマネジメントに精通しているもの、ならびに知財・産学連携の担当者がチームを組んで個別の計画を担当している。本研究の推進に対しては特別な推進チームを作成し、このチームが研究代表

者、企業関係者らとの協議を行った。

3. 海外の製薬企業からの契約書等の内容検討

本研究が目指す遺伝子治療は海外製薬メーカーとの連携で行う可能性を模索していることから契約に係る文書作成等が必要となる。昨年度に引き続き、知財・産学連携担当者が当センターの顧問弁理士と相談しながら内容の吟味、日本語訳などを実施した。

D. 考察

臨床研究中核病院事業に係る機関として当センターが指定を受けたため、各種の臨床研究を推進する体制が構築されつつあるが、本年度はその活動が活発化し、臨床研究の推進を実質的に支援することが可能になったと考えられる。このような活動を通じ、現場の医師らの負担を軽減し、医療ならびに研究により集中できる環境が整備できると期待される。

E. 結論

臨床研究中核病院整備事業で構築しつつある研究推進支援機能を十分に活用できた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表等

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許出願

該当なし

2. 実用新案

該当なし

3. その他

該当なし