

臨床研究に関する情報公開（一般向け）

「ミトコンドリア病の生化学診断、責任遺伝子解析、病態解明と治療法の開発に関する研究」へご協力をお願い

—当科においてミトコンドリア病と診断された方へ—

研究機関名：埼玉医科大学病院

研究責任者：教授 大竹 明

個人情報管理者：リサーチアドミニストレーションセンター 千本松 孝明

1. 研究の概要

1) 研究の意義・目的：

ミトコンドリア病は小児科・新生児科領域における難病の一つで最も頻度の高い先天代謝異常症である。酸素消費量の測定および呼吸鎖複合体の量的・質的解析で正確に診断しその病像を明らかにしたい。我々は診断および病態解明に関する研究（大学倫理審査委員会 No.482-XI）と患者由来 iPS 細胞を用いた研究（大学倫理審査委員会 No.647-Ⅲ）の2つの課題に分けて、これまで研究を行ってきた。このたび両者を統一し、新規課題として申請する。

呼吸鎖複合体は複数ありそれぞれ多数のサブユニットで構成される。またサブユニットではないものの複合体のアセンブリーに関係するタンパクも多数存在する。それらが全てミトコンドリア遺伝子と核遺伝子の二重支配を受ける。そこで症例の遺伝子異常を検索するには、ミトコンドリア遺伝子解析に加えて、核遺伝子解析についても最新の解析方法が必要である。このために、患者の DNA を用いて、エキソーム（全エキソン）キャプチャーアレイなどを用いて、エキソーム断片を収集し、それを次世代シーケンサーにて解析を行う。またエキソーム内に異常を認めなかった症例については、必要に応じて全ゲノムシーケンス解析を行い、原因遺伝子の同定を行う。皮膚線維芽細胞などの培養細胞を用いて、最終的な確定診断を目的として機能回復実験などの検証実験を行う。また、培養細胞や臓器を用い、遺伝子発現解析（次世代シーケンサー）や LC-MS によって代謝物を測定し、原因遺伝子の同定を行う。さらに一部の異常症についてはアセンブリー機構異常を分子レベルで明らかにし、呼吸鎖複合体の生理的バイオゲネシス機構の解明にも寄与したいと考える。

iPS 細胞を用いて該当する細胞種を特異的に誘導し、細胞の機能障害の機序を明らかにする。上記の研究で取得した臨床検体である皮膚線維芽細胞などの培養細胞から iPS 細胞を誘導し、罹患臓器における病態の試験管内モデル化を目指す。

2. 研究の方法

1) 研究対象者：2020年3月4日～2027年3月31日までに「ミトコンドリア病の診断基準」において Possible（可能性例）以上の基準を満たす症例で、主治医が必要と認めた症例。なお患者情報については別紙「ミトコンドリア病スクリーニング患者情報提供書等」に記載をお願いする。

2) 研究期間：2020年3月4日～2027年3月31日まで

3) 研究方法：

①生化学的解析 ①In vitro 酵素活性：線維芽細胞や各種臓器・組織のミトコンドリア画分または抽出液（以下サンプル）に緩衝液と発色基質を加え、吸光度の経時的変化から酵素活性を計算し、対照と比較する（千葉県こども病院、順天堂大学）。②BN-PAGE 解析：サンプルを界面活性剤と Coomassie Brilliant Blue G を含んだ緩衝液で可溶化し、濃度勾配ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかける。イムノブロット解析で酵素の大きさと量とを検定すると共に、酵素活性染色を行うことにより、吸光度的に酵素活性を測らなくても活性のスクリーニングもできる（千葉県こども病院、埼玉医科大学小児科、帝京大学、順天堂大学）。③酸素消費量の解析：線維芽細胞のミトコンドリア画分を用いて細胞外フラックスアナライザーを用い OCR (oxygen consumption rate: 酸素消費量) を測定する（千葉県こども病院、順天堂大学）。細胞外フラックスアナライザーは分光光度計を用いた酵素活性測定よりも感度が高く、ミトコンドリア病のスクリーニングに有用である。

②原因遺伝子の解析：

核遺伝子およびミトコンドリア遺伝子解析、遺伝子構造解析は以下の方法で行う。

患者 DNA を用いて、次世代シーケンサーにてエキソーム解析を行う。エキソーム解析に関しては、順天堂大学並びに理化学研究所生命医科学研究センターにて行う。なお全ゲノム解析に関しては、必要に応じて信頼のおける外部検査機関（たとえば、イルミナ株式会社 (<http://www.illumina.co.jp/>) や macrogen 社

(<http://www.macrogen-japan.co.jp/>)、novogen 社 (<http://www.novogene.com/>) などに委託する。この際、データの取り扱いには十分に配慮するとともに、完全に符号化された試料のみを用いる。また遺伝子の構造異常をみるために、SNP アレイを用いて染色体領域の欠失や増幅を調べる（順天堂大学）。次世代シーケンサーによる遺伝子発現解析は順天堂大学並びに理化学研究所生命医科学研究センター、必要に応じて信頼のおける外部検査機関（たとえば、イルミナ株式会社 (<http://www.illumina.co.jp/>) や macrogen 社 (<http://www.macrogen-japan.co.jp/>)、novogen 社 (<http://www.novogene.com/>) などに委託する。ミトコンドリア遺伝子変異率の測定は、国立循環器病センター等で行う。

原因変異の遺伝学的・バイオインフォマティクス解析は主として順天堂大学において行う。上述したエキソーム解析から得た結果からは 1 人あたり 10-12 万の塩基置換情報が得られる。ここから当該患者の真の病因変異へ辿り着くためには、一般健常人または当該疾患以外の患者検体より得た塩基置換データにおいても、同様の塩基置換情報が見られるかどうかの検討が極めて重要になる。この検討を行うにあたっては対応表有りの匿名化された、日本人を中心とした一般健常人集団の塩基置換データおよび当該疾患以外の患者検体より得た塩基置換データが必要になる。この比較により、我々の行う研究の中で疾患変異の同定を強力に推進することが可能になる。そのために共同研究機関との間で、お互いにこれら塩基置換データ (VCF ファイル: Variant Call Format) を対応表有りの匿名化のもとに共有できる体制を構築する。共同研究機関とのバイオインフォマティクス解析プロトコルが著しく異なる場合は、解析条件を等しくするためにシーケンスデータ (FastQ ファイル) を共有することがある。ただし FastQ ファイルについても個人情報的一切が付属しないことは上述した通りである。

京都大学とは健常な日本人集団のエキソームデータを、対応表有りの匿名化の状態に共有する。大阪大学とはミトコンドリア病ではない疾患集団のエキソームデータを共有する。東北大学メディカルメガバンクとは健常な日本人集団の全ゲノムシーケンスデータから産生されたアレル頻度データを共有する。この共有については、任意のバリエーションを申請者側が指定して、そのバリエーションに対して情報共有を受ける。また京都大学・大阪大学・東北大学メディカルメガバンクからリクエストがあった場合のみ、本研究の VCF ファイル (または FastQ ファイル) を対応表有りの匿名化の状態に共有する場合がある。慶応大学とはミトコンドリア病患者のエキソームデータを対応表有りの匿名化の状態に共有する。最終的に個人識別ができない状況でバリエーションのみを公開データベースに登録する。

また提供して頂いたデータから incidental finding (予期されない重大な疾患変異を保因している、など) が起きることは可能性が低いですがゼロではない。そのため、このような結果開示の希望の有無をあらかじめ対象者に確認した上、希望する者へは ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing (<http://www.nature.com/gim/journal/v15/n7/abs/gim201373a.html>) の対象になっている有害変異の保因者を偶然発見した場合は、提供元の共同研究機関等を介して対象者へ連絡することで適切に対応する。

③原因遺伝子の確定実験：皮膚線維芽細胞などの培養細胞または臓器から得られた細胞については、最終的な確定診断を目的として、候補遺伝子を発現ベクターに組み込んで、細胞を形質転換することで機能回復実験を行うなどの検証実験を行う。また、生検皮膚線維芽細胞を用い、LC-MS による代謝物の分析を行う (首都大学東京、順天堂大学)。首都大学では、アミノ酸、核酸、糖代謝物、有機酸などの分析を行い、順天堂大学では脂質、リン脂質等の分析を行う。東京大学では、tRNA の解析を行う。

④iPS 細胞および分化細胞の解析：本研究では、順天堂大学、バイオバンク拠点等で、匿名化された線維芽細胞等の細胞に対し、OCT3/4、SOX2、KLF4 を中心とするリプログラミング因子をウイルスベクター、episomal プラスミド、合成 RNA またはタンパク質の形で導入し、iPS 細胞を樹立する。なお、導入する具体的な因子や導入方法に関しては、その当時において最良と思われるものを用いる。分化細胞が得られた後は、その細胞の形態、機能および生存率の相違等を検討する。

⑤ミトコンドリア病患者の培養線維芽細胞を用いた治療薬開発：千葉県がんセンターと東北大学では、ミトコンドリア病患者の皮膚線維芽細胞を用いて新たなミトコンドリア治療薬の開発を行っており、新しい治療薬の候補化合物を開発した。しかしながらまだ研究段階でありまた実際多くのミトコンドリア異常症患者さんに有効かどうかは未だ分らないため、本研究では千葉県がんセンターと東北大学に皮膚線維芽細胞を送り、薬物が有効であるかどうかを検討する。

4) 使用する試料・情報の項目：

2 次性原因疾患を除外後のミトコンドリア病疑い例につき、患者さん及びその家族からの十分なインフォームド Consent の下に採取した生検皮膚線維芽細胞や手術や剖検で得た各種臓器・組織、および臨床情報を用いる。

5) 利用又は提供を開始する予定日:2020 年 3 月 4 日

6) 情報の保存：

患者さんのプライバシー情報 (臨床データおよび同意書) と検体との対応表は埼玉医科大学に保管され、ペーパー情報は鍵のかかった引き出しに、デジタル情報はパスワードでプロテクトされたコンピュータにのみ保管され、個人情報管理者と管理補助者のみがアクセスする権限を持つ様にする。検体が他の研究施設に移送される場合は検体番号としてのみ送られ、検査結果が戻った際に管理者と管理補助者のみが臨床データとの連結を行う権限を持つ。

なお、取得した試料・情報は、記録媒体・郵送・電子的配信で埼玉医科大学病院に提供する。

細胞や臓器・組織は原則として本研究のためにのみ使用する。しかし、もし本人あるいは保護者・代理人の同意があれば、将来の研究のための貴重な資源として研究終了後も埼玉医科大学、千葉県こども病院で 10 年間 (延長有) 、

保管する。この場合も守秘義務を順守し、誰の検体かわからないようにしたままで保管する。

将来検体を別の医学研究に用いる場合には、改めて研究計画書を提出し倫理審査委員会の承認を受けるものとする。

7) 情報の保護：

研究に関わる関係者は、研究対象者の個人情報保護について、適用される法令、条例を遵守する。また、関係者は、研究対象者の個人情報およびプライバシー保護に最大限の努力を払い、本研究を行う上で知り得た個人情報を漏らすことはない。

8) 倫理審査：

社会医療法人宏潤会で行われる全ての臨床研究は、研究に参加される方の人権や安全性の保護および科学性について問題がないかを社会医療法人宏潤会大同病院倫理審査委員会で審査され、その意見をもとに病院長が許可したもののみ実施される。本研究は、社会医療法人宏潤会大同病院倫理審査委員会において審査を受け、病院長の許可を得ている。

※同意を得る方法

各主治医が説明・同意文書を用いて、患者あるいはその保護者から承諾を得る。

承諾書は検査全体用と遺伝子検査用との2種類あり、さらに検査全体用の説明書も医師用と患者用の2本立てとなっている。これらを研究材料に応じて生検用と剖検用の2通りに分けて使用する。

9) 研究資金源及び利益相反：

本研究は主にAMED難治性疾患実用化事業の予算とSBIファーマ株式会社からの資金提供を受けて実施される。遺伝子解析は原則として研究費によって賄うが、カウンセリングのもと家系内解析を行う場合は、実費を請求することもある。

10) 研究計画書および個人情報の開示：

個人情報の保護や研究の独創性の確保に支障がない範囲内で、この研究計画の資料等を閲覧または入手することができる。また、この研究における個人情報の開示は、希望される場合にのみ行う。親権者を交えてお知らせすることもできる。研究成果は、個人が誰であるかわからないようにした上で学会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る。

11) 研究への使用を希望されない場合：

最終結果報告以前であれば、別紙の「変更・中止願」を出すことによって、いつでも担当医師を通じて検査を中止できる。皮膚由来細胞や臓器・組織はできるだけ長く保管するが、不慮の事故の場合はその限りではない。さらにこの保存も患者さんの求めがあれば上述した「変更・中止願」でいつでも中止できる。

この場合も診療など病院サービスにおいて患者の皆様には不利益が生じることはない。

12) 代表研究機関および共同研究機関

代表研究機関名・研究代表者：埼玉医科大学病院 教授 大竹 明

共同研究機関名・研究責任者：

埼玉医科大学病院 講師 本多 正和
同 助教 味原 さや香
同 助教 荒尾 正人
同 客員教授 高柳 正樹
同 助手 原嶋 宏子
同 実験補助員 竹内 理恵
同 非常勤講師 山崎 太郎
同 非常勤講師 木下 善仁
難病センター 遺伝カウンセラー 齋藤 恵

千葉県こども病院 部長 村山 圭

医長 松永 綾子

医員 市本 景子

医員 志村 優

医師 伏見 拓矢

医員 田鹿 牧子

医員 杉山 洋平

遺伝カウンセラー 秋山 奈々

主任医長 鶴岡 智子

研究補助員 富永 美菜子

研究補助員 脇坂 京子

研究補助員 石井 真樹

千葉県がんセンター 研究所 所長 永瀬 浩喜

研究員 越川 信子

順天堂大学大学院医学研究科 難治性疾患診断・治療学/難病の診断と治療研究センター

教授 岡崎 康司

講師 新田 和広

助教 木下 善仁

特任助手 八塚 由紀子

特別研究員 Lim Sze Chern

研究員 Nurun Nahar Borna

非常勤講師 神田 将和

非常勤講師 岡崎 敦子

同 生化学第一講座 教授 横溝 岳彦

准教授 奥野 利明

助教 李 賢喆

同 研究基盤センター-生体分子研究室

助教 上野 紀子

理化学研究所 生命医科学研究センター 応用ゲノム解析技術研究チーム

チームリーダー 岡崎 康司

慶応大学医学部臨床遺伝学センター 教授 小崎 健次郎

東北大学大学院医工学研究科分子病態医工学 教授 阿部 高明

助教 鈴木 健弘

特任研究員 松橋 徹郎

国立国際医療研究センター メディカルゲノムセンター ゲノム医療研究推進室 室長 今井 敦子

帝京大学 医学部 小児科 教授 三牧 正和

国立成育医療研究センター総合診療部 総合診療科 医員 伊藤玲子

松戸市立病院 小児科 副部長 森 雅人

首都大学東京 理工学研究科 生命科学専攻 細胞遺伝学研究室 教授 相垣 敏郎

研究員 佐藤 由紀子

大学院生 大沼 康平

国立循環器病センター研究所 分子薬理部 室長 山崎 悟

Murdoch Children's Research Institute, Australia Professor David Thorburn

Monash University, Australia Professor Mike Ryan

Deakin University, Australia Lecturer Matthew McKenzie

Helmholtz Zentrum Munchen and Technische Universitat Munchen, Germany

Head of the research group Holger Prokisch

京都大学 医学研究科附属ゲノム医学センター 教授 松田 文彦

講師 日笠 幸一郎

大阪大学 医学系研究科循環器内科学 教授 高島 成二

助教 朝野 仁裕

東北大学 メディカルメガバンク 教授 山本 雅之

教授 安田 純

教授 長崎 正朗

東京大学 工学系研究科 化学生命工学専攻 教授 鈴木 勉

講師 鈴木 健夫

助教 長尾 翌手可

<問い合わせ・連絡先>

社会医療法人宏潤会 大同病院、だいでうクリニック

小児科 主任部長

研究責任者：浅井 雅美

T E L : 052-611-6261(代)