

1400377

多因子疾患発症機構解析のモデルとしての
ヒルシュスプルング病発症機構の解析

(課題番号 15590289)

平成15年度～平成17年度科学研究費補助金
(基盤研究(C))研究成果報告書

平成19年3月

研究代表者 蒔田 芳男

旭川医科大学医学部講師

はしがき

HSCR を多因子疾患のモデルと考え、関連する5つ遺伝子に相互作用が存在するのではないかと仮定し、RET 遺伝子を主効果遺伝子と想定し、RET 遺伝子の変異解析並びにその他の遺伝子の SNP で構成されるパプロタイプ相関解析を行った。

しかしながら、3世代に渡る家系例において、RET 遺伝子の変異が同定されたものの、その他の孤発例では、パプロタイプの相関解析においても有意な違いは検出することができなかった。

このことは、以下の二つの可能性を提示する。

- 1、遺伝子間相互作用の中での情報伝達量の総和としての発症機序ではない、他の機序が存在する。
- 2、発症機序としては、情報伝達の総和が効果をもつが、そのような多型は、SNP で構成されるパプロタイプという形での多型ではない。

研究組織

研究代表者 蒔田 芳男(旭川医科大学医学部講師)

研究分担者 宮本 和俊(旭川医科大学医学部助手)

林 時仲(旭川医科大学医学部講師)

研究協力者 羽田 明(千葉大学大学院医学研究院公衆衛生教授)

大浜用克(神奈川県立こども医療センター外科部長)

黒澤健司(神奈川県立こども医療センター遺伝科科長)

青山興司(川崎医科大学小児外科教授)

交付決定額(配分額)

	直接経費	間接経費	合計
平成15年度	1,500 千円	0 円	1,500 千円
平成16年度	1,000 千円	0 円	1,000 千円
平成17年度	1,000 千円	0 円	1,000 千円
総計	4,000 千円	0 円	4,000 千円

研究発表

(1) 学会誌など

蒔田芳男、羽田 明

生命保険加入における遺伝情報の取り扱いに関する現状と問題点 日本マススクリーニング学会誌 14:17-23(2004)

(2) 口頭発表

蒔田芳男、松原洋一、羽田 明

先天性疾患患児の保険加入上の問題点

第26回日本小児遺伝学会、第3回臨床遺伝研究会 合同学術集会 2003/10/25 長崎

(3) 出版物

蒔田芳男

新生児スクリーニング検査

4 検査時期による遺伝学的検査の分類と問題点

日本臨床 2005 増刊「遺伝子診療学」—遺伝子診断の進歩と遺伝子治療の展望 104-108。

【はじめに】

ヒルシュスプルング病(HSCR)は、大腸における神経節細胞の欠損を原因とする比較的頻度の高い先天性疾患(1/出生児 5000 人)であり、環境因子の関与はほとんど無いと考えられる。通常は孤発性であるが 15-20%は家族性である。他の症候群に合併する型を除けば、細胞内チロシンリン酸化による RET 系とエンドセリン系の 2 つの情報伝達経路を構成する蛋白の遺伝子変異が報告されている。RET 系では RET 遺伝子とそのリガンドである GDNF、NRTN、エンドセリン系ではエンドセリン B 受容体とそのリガンドであるエンドセリン 3 の合計 5 遺伝子の変異がこれまでに見つかっていて、情報伝達量の低下を引き起こす変異が HSCR の原因と考えられている。しかし、最も頻度の高い RET 変異で説明できる症例は家族性で最大 50%程度、孤発性では 3%~30%程度である。他の 4 遺伝子における変異頻度は低く、RET 変異などと重複することが多い。以上より、HSCR は少なくとも 5 遺伝子が関与する疾患であり、環境要因も大きく関与するありふれた多因子疾患の単純化した理想的な疾患モデルであると考えられる。

これまでの変異解析にもかかわらず、A)HSCR の少なくとも 50%以上は原因不明である、B)同じ変異でもその表現型は大きく異なる、C)家族性の家系では浸透率が不完全である、などの現象は説明できていない。まずエクソンを中心とした従来の変異解析を RET 遺伝子および他の 4 遺伝子でおこない、症状との対比を試みる。次に A)~C)の問題点を検討するために解析をすすめる。その前提として次の 4 つの仮説が正しいとする。1)浸透率、表現度は環境因子、偶然因子ではなく、遺伝子変異により説明できる、2)単独で HSCR をおこす RET 変異(ヘテロの場合遺伝子発現が 50%になる)はその症例における突然変異であり、易罹病性を高める変異(ある程度変異遺伝子からも RET 遺伝子発現があり、正常アリルからの発現を合計すると 50%と 100%の間にある)は淘汰されず、変異発生から代々受け継がれてきている、3)HSCR の主要効果遺伝子は RET であり、他の 4 候補遺伝子の変異は単独では発症せず、代々受け継がれ、RET の易罹病性を高める変異と重なることで発症する。具体的には RET 遺伝子および他の 4 候補遺伝子のハプロタイプ解析を主要な手段として解析をすすめ、遺伝子相互作用と臨床症状との関連を検討し、そのメカニズムを明らかにする。

【材料】

健常成人 48 例を対象群とし、ハプロタイプ構築およびその保持頻度を計算する。

HSCR 症例の血液検体収集 150 例を目標とする。承諾が得られれば家族検体も集める。旭川医科大学第一外科症例、神奈川県立こども医療センター、慶応大学医学部小児外科小児外科外来で経過をみている症例を収集した。当初 150 例を目標にしていたが、検体の収集が進まず孤発例 34 例、3 世代に渡る家系一家系(8人)の収集にとどまった。

旭川医科大学倫理委員会への提出資料は、巻末に添付する。

臨床情報の収集に使用したシートは、巻末に添付する。

【方法】

1) RET 遺伝子の解析まず、RET 遺伝子のプロモーター領域、各エクソンの塩基配列解析を行う。

ハプロタイプ解析 4 つの候補遺伝子領域における 10 個以上の一塩基多型(SNPs: single nucleotide polymorphisms)の情報をウェブ上から入手し、48 人健常者でのシーケンスにより、各遺伝子のハプロタイプ構築に適する 5-6 個の SNPs を選ぶ(多型頻度が高く、相互に強く連鎖していないもの)。ハプロタイプ解析は maximum-likelihood 法に基づく SNPalyze プログラムでおこなう。このプログラムは、同時に 20 カ所の SNP でのハプロタイプを構築できる。SNP 間の Pair-Wise 連鎖不平衡は D (Lewontin and Kojima, 1960)、 D' (D/D_{max})(Lewontin 1964)、 $r^2(D^2/p_1(1-p_1)p_2(1-p_2))$ 、およびカイ検定 (χ^2 値、 p 値)にて評価する。

【結果】

1) RET 遺伝子の解析

① 弧発例 34 例と家系例(8 例)の合計 42 例について RET 遺伝子の解析を行った。アミノ酸置換を伴う変化を弧発例 34 例中 5 例(14.7%)、家系例 8 例中 6 例に見出した。内訳は、Arg99Trp 2 例、Tyr204Cys 1 例、Tyr483His 1 例、Asn783Ser 1 例であった。家系例では、Asp300His を 8 例中 6 例に見出した。

Hirschsprung病家系 (旭川AMC)

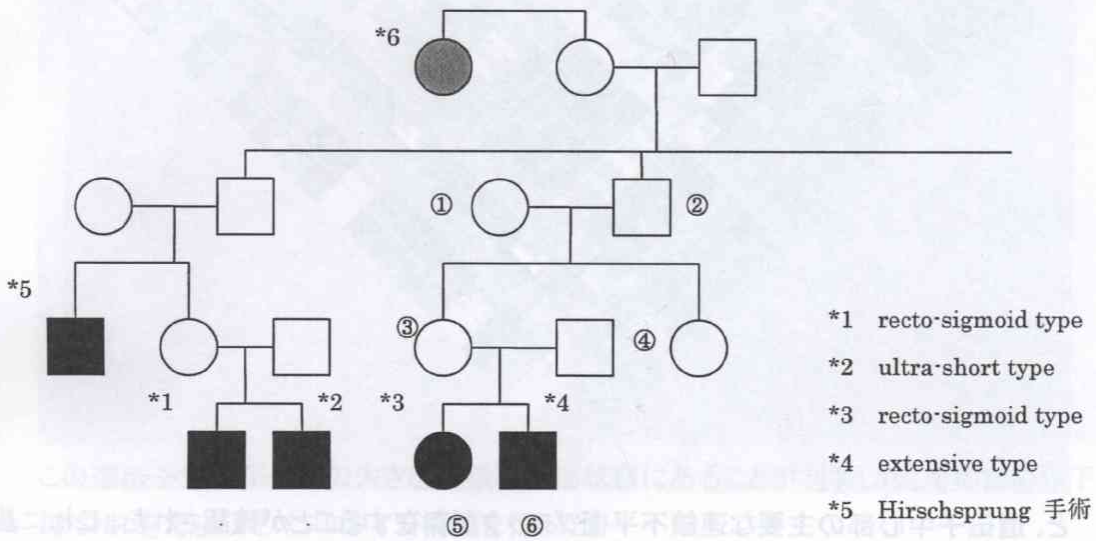


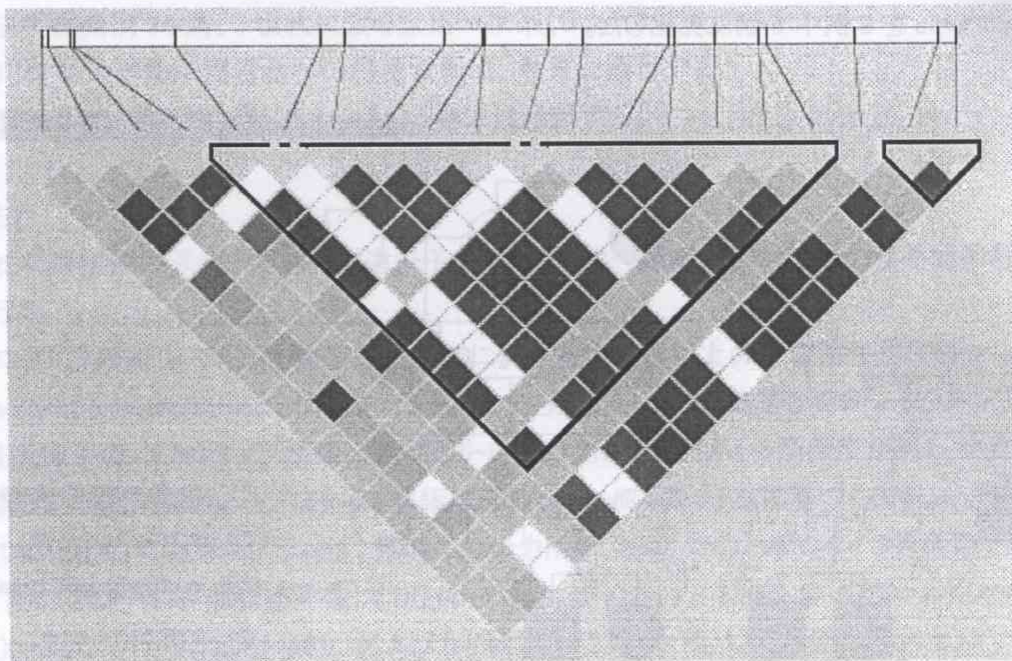
図1 ヒルシュシュプルング病 旭川家系

例数	ヒトモロタイプ	頻度
1	AAT ACC	0.18
2	ATA GGG	0.18
3	GGG GTG	0.22
4	AAT TGG	0.07
5	TTGA	0.07

2) 関連4遺伝子の連鎖不平衡状態の解析

① EDN3

この遺伝子は、第20番染色体上に存在し、Endothelin-3 precursor (ET-3) (Preproendothelin-3) (PPET3)をコードしている。5つのエクソンで構成されている。この遺伝子周辺を含む解析では、



と、遺伝子中心部の主要な連鎖不平衡ブロックが存在することが確認された。これに基づいてパロタイプ構築に必要なSNPを選択した。選択したSNPは以下の3つである。

アレル頻度

IMS-JST034774(rs260740) A : 0.55 C : 0.45

IMS-JST188490(rs197184) C : 0.75 T : 0.25

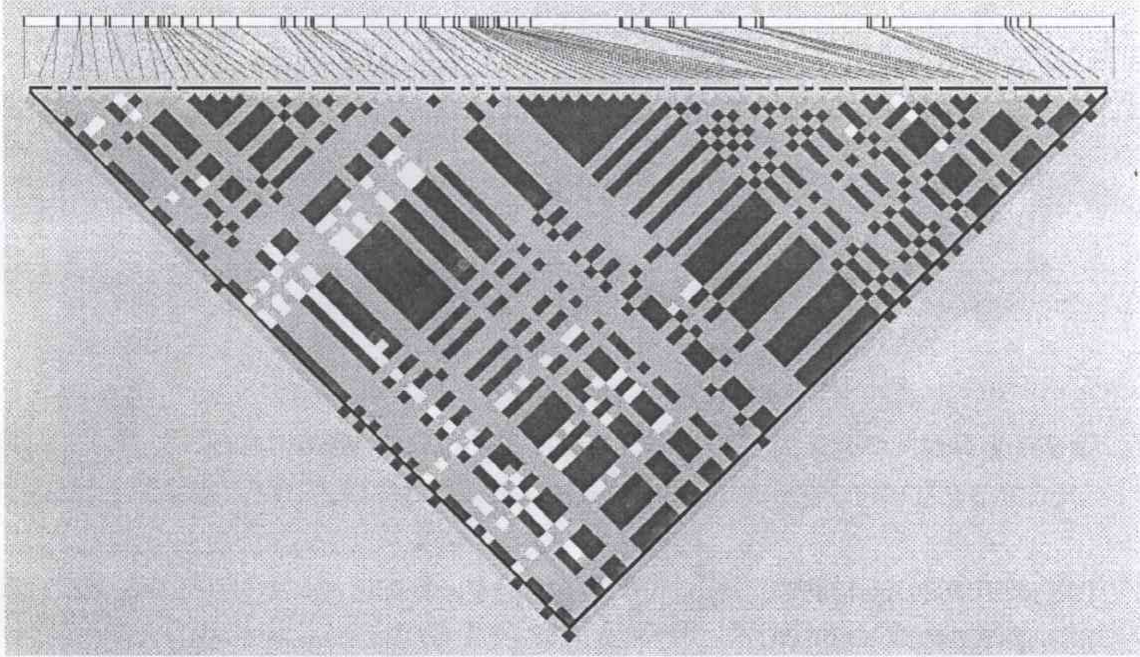
IMS-JST022607(rs197183) C : 0.75 A : 0.25

この3つのSNPにより構成されるパロタイプ頻度は以下の表のようであった。

	パロタイプ	頻度(%)
1	ACC	0.70
2	CTA	0.25
3	CCC	0.04
4	CCA	0.01

② EDNRB

この遺伝子は、第 13 番染色体上に存在し、Endothelin B receptor precursor (ET-B) (Endothelin receptor Non-selective type)。をコードしている。7つのエクソンで構成されている。この遺伝子の周辺を含む解析では、



この遺伝子全体が一つの大きな連鎖不平衡状態にあることが判明した。そのため以下の4つの SNP をえらんでパプロタイプ構築を行った。

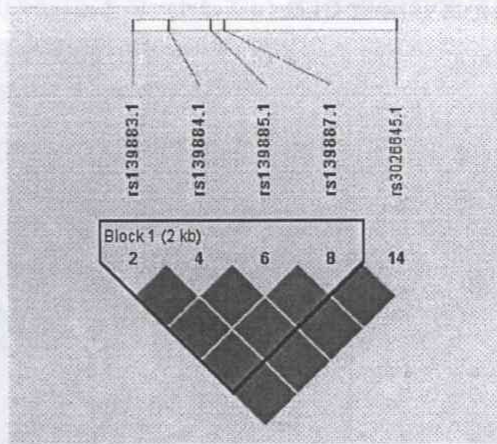
	アレル頻度	
rs3027096	C: 0.55	T: 0.45
rs7982910	C: 0.35	T: 0.65
rs17068573	A: 0.50	G: 0.50
rs9565372	A: 0.55	G: 0.45

	パプロタイプ	頻度
1	TTAA	0.38
2	CCGG	0.35
3	CTGG	0.22
4	TTGG	0.03
5	TTGA	0.02

4	CCGA	0.07
5	CCCC	0.05

2) ③ SOX10 子の連鎖不平衡状態の解析

(6-73) この遺伝子は、第 22 番染色体上に存在し、Transcription factor SOX-10 として機能する。
 (7-7) 5つのエクソンを持つが3つのコーディング領域で形成されている。この遺伝子の周辺の解析を行うと



遺伝子全体が一つの連鎖不平衡ブロックの存在することが明らかになった。

そこで、ハプロタイプを形成する SNP を選び以下のようにハプロタイプ構築を行った。

アレル頻度

IMS-JST020767(rs139883) T : 0.7 C : 0.3
 IMS-JST004465(rs139884) A : 0.3 G : 0.7

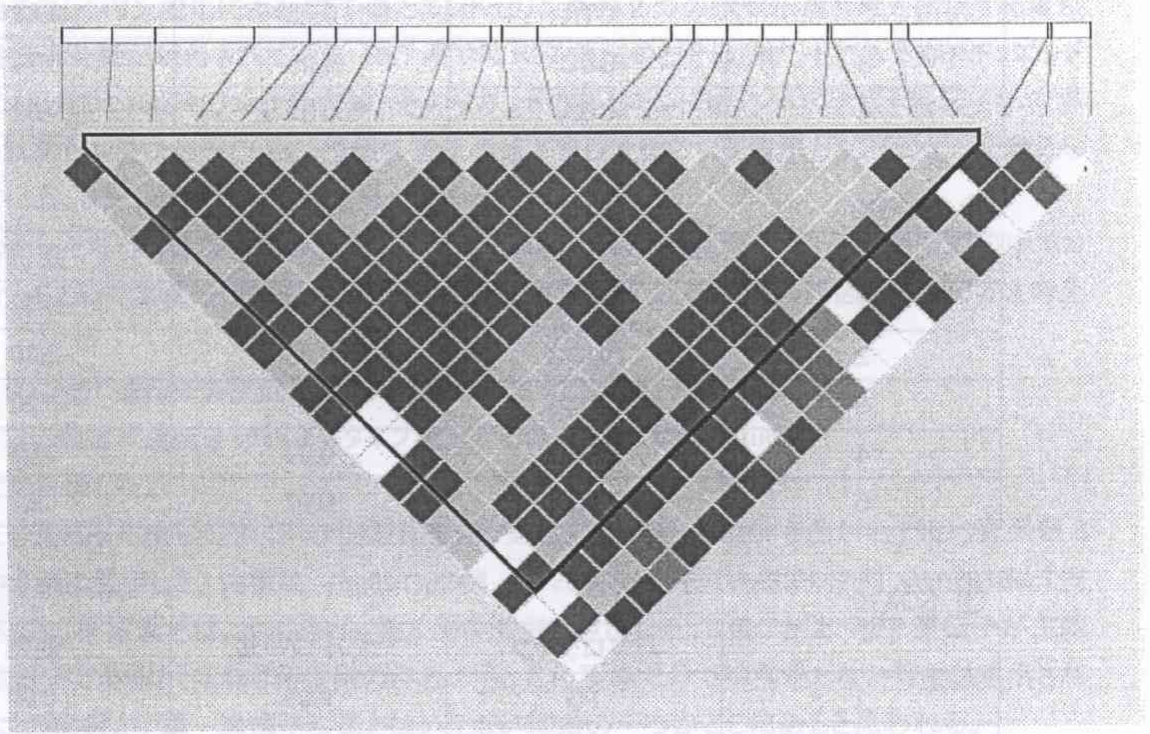
	ハプロタイプ	頻度
1	TG	0.69
2	CA	0.29
3	CG	0.02

この3つの SNP により構成されるハプロタイプ頻度は以下の表のようであった。

アレル	ハプロタイプ	頻度 (%)
85.0	AATT AGG	70
25.0	GGGG GTA	25
55.0	GGGG GGG	90
60.0	GGTT GGA	10
50.0	AGTT	5

④ GDNF

この遺伝子は、第5番染色体上に存在し、神経栄養因子である Glial cell line-derived neurotrophic factor precursor (Astrocyte-derived trophic factor 1) (ATF-1)。をコードする。この遺伝子周辺の解析では、



以上のように、遺伝子全体が一つの連鎖不平衡ブロックで構成されていることが判明した。そのため、以下の SNP を選定し、パプロタイプ構築を行った。

アレル頻度

rs13361833	C: 0.80	T: 0.20
rs2973045	C: 0.80	T: 0.20
rs2973043	C: 0.70	T: 0.30
rs2216710	A: 0.20	C: 0.80

	パプロタイプ	頻度
1	CCTC	0.40
2	TCCC	0.24
3	CTCC	0.24
4	CCCA	0.07
5	CCCC	0.05

3) パプロタイプを頻度の比較

① EDN3

	パプロタイプ	コントロール	症例
1	ACC	0.70	0.65
2	CTA	0.25	0.23
3	CCC	0.04	0.06
4	CCA	0.01	0.02

② EDNRB

	パプロタイプ	コントロール	症例
1	TTAA	0.38	0.43
2	CCGG	0.35	0.30
3	CTGG	0.22	0.20
4	TTGG	0.03	0.05
5	TTGA	0.02	0.02

③ SOX10

	パプロタイプ	コントロール	症例
1	TG	0.69	0.60
2	CA	0.29	0.39
3	CG	0.02	0.01

④ GDNF

	パプロタイプ	コントロール	症例
1	CCTC	0.40	0.38
2	TCCC	0.24	0.28
3	CTCC	0.24	0.20
4	CCCA	0.07	0.10
5	CCCC	0.05	0.04

すべての遺伝子のパプロタイプにおいて permutation 法での検討で $p < 0.05$ になるパプロタイプは存在しないことが明らかになった。

【考察】

ヒルシュスプルング病(HSCR)は、大腸における神経節細胞の欠損を原因とする比較的頻度の高い先天性疾患(1/出生児 5000 人)であり、環境因子の関与はほとんど無いと考えられる。通常は孤発性であるが 15-20%は家族性である。他の症候群に合併する型を除けば、細胞内チロシンリン酸化による RET 系とエンドセリン系の 2 つの情報伝達経路を構成する蛋白の遺伝子変異が報告されている。RET 系では RET 遺伝子とそのリガンドである GDNF、エンドセリン系ではエンドセリン B 受容体とそのリガンドであるエンドセリン 3 の合計4遺伝子の変異がこれまでに見つかっていて、情報伝達量の低下を引き起こす変異が HSCR の原因と考えられている。また、SOX10 も原因遺伝子と考えられている。

わたしたちは、塩基置換の形の「変異」ではない情報が、遺伝子-遺伝子間関連の中でカスケードとして全体の情報量の低下を引き起こすことが、この疾患の原因ではないかと考えた。

- ① RET 遺伝子を主効果遺伝子と想定して RET 遺伝子の変異解析
- ② 候補 4 遺伝子のパプロタイプ構築とその case-control study

以上を計画した。

RET 遺伝子に関しては、アミノ酸置換を伴う変化を孤発例 34 例中 5 例(14.7%)、家系例 8 例中 6 例に見出した。内訳は、Arg99Trp2例、Tyr204Cys1例、Tyr483His1例、Asn783Ser1例であった。家系例では、Asp300His を 8 例中 6 例に見出した。このことは、RET 遺伝子が主効果遺伝子であるとともに、家系例の存在から、この要素だけでは発症しない可能性も示された。この疾患が、単一遺伝子疾患とはいえない理由の一つがここにあると思われる。

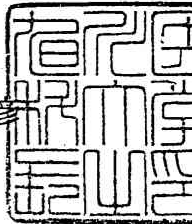
パプロタイプを用いた case-control study では、有意なハプロタイプの存在を示すことができなかった。これは、症例数が少なく有意差が出ない可能性もあるが、パプロタイプ相関解析では検出できない機序の存在を考えるべきであると思われる。今回の直接シーケンスでの SNP 解析では、遺伝子の欠失重複というコピー数の異常を検出できないため、カスケードとしての情報量の低下を引き起こす機序を網羅していない可能性がある。



旭医大第2129号
平成13年6月27日

公衆衛生学講座
教授 羽田 明 殿

旭川医科大学長 久保良彦



多因子遺伝病解析手法の開発ーヒルシュスブル
ング病をモデルとして

平成13年3月26日付けで貴殿から申請のあった標記調査研究については、
その実施を承認します。

なお、標記研究については、十分に医学倫理的な配慮を行い、適切に実施願
います。


倫理委員会審議申請書

平成 13 年 6 月 27 日提出

旭川医科大学長 殿

申請者氏名 羽田 明
 所属 公衆衛生学講座
 職名 教授

※受付番号 65

所属の長印 

1. 課題名	多因子遺伝病解析手法の開発 ーヒルシュスプルング病をモデルとして	
2. 主任研究者	所属	職名
羽田 明	旭川医科大学公衆衛生学講座	教授
3. 分担研究者	所属	職名
蒔田芳男	旭川医科大学公衆衛生学講座	助手
石井拓磨	旭川医科大学小児科学講座	助手
大浜用克	神奈川県立こども医療センター外科	部長
今泉 清	神奈川県立こども医療センター遺伝科	科長
4. 研究等の概要	<p>ヒトゲノム計画の急速な進展によって、ドラフトシーケンスは既に公表された。ポストシーケンス研究の主要なテーマとして、本態性高血圧、糖尿病、虚血性心疾患などの生活習慣病の疾患感受性遺伝子同定がある。個々人の遺伝的易罹病性を調べることにより、遺伝素因に基づいた発症予防をおこなう、いわゆるオーダーメイド医療の確立が最終目標である。数年以内に疾患感受性遺伝子群の一部が明らかになるのは間違いないと思われるが、複数の発症関連遺伝子が明らかになっても、そのまま実際のオーダーメイド医療に結びつくわけではない。各発症関連遺伝子が、相互にどのようなメカニズムで疾患を発症させるのか、また、生活習慣要因がどの遺伝子の作用にどのように関わってくるかなどを明らかにしなければ、実際の応用は困難である。本研究では、1) 表現型の同定が容易である、2) 発症に生活習慣要因が関与しない、3) 複数の発症関連遺伝子が明らかになっている、4) 多因子遺伝病である、などの条件を満たす疾患を単純なモデルとして遺伝子の相互作用を研究することにより、実際の応用にあって必要とされるソフトの開発を目的とする。</p> <p>本研究で解析するモデル疾患はヒルシュスプルング病(HSCR)である。本症は腸</p>	

管のガングリオン細胞欠損による巨大結腸を呈する先天性疾患である。これまでの研究で、主要効果遺伝子として 1) RET, 2) エンドセリン受容体 B(EDNRB), 修飾遺伝子として 3) エンドセリン-3(EDN3), 4) Glial cell line-derived neurotrophic factor(GDNF), 5) Neurturin(NRTN)などの遺伝子の関与が明らかにされている。しかし、1) アミノ酸をコードする領域の遺伝子異常で説明できるのは症例の 30-50%のみであること、2) 一つの遺伝子変異だけでは、発症しない例も含めて症状に大きな差があること、3) RET と NRTN の変異の発症における相互作用が見られる家系があること、などから本症は多因子遺伝病であると考えられる。

具体的には以下の研究をおこなう。

- 1) 上記 5 遺伝子の 5'上流, イントロンを含めた領域から Single Nucleotide Polymorphism (SNP)を探し, 対照群 50 人のハプロタイプ解析をおこなう。
- 2) HSCR 症例の原因変異検索: 5 遺伝子の 5'上流, エクソン部分を中心におこなう。また, 変異が見つからなかった症例はハプロタイプ解析により, 各遺伝子の関与を検討する。

5. 研究等の対象及び実施場所

研究対象検体の採取に関して

神奈川県立こども医療センター外科および内科外来を対象とし, 研究承諾者の採血を外来でおこなう。

検体保存および DNA 抽出施設

検体採取機関において匿名化の後, 旭川医科大学公衆衛生学講座において保存する。血液からの DNA 抽出も同講座でおこなう。

遺伝子解析

旭川医科大学公衆衛生学講座において行う。

6. 研究等における医学倫理的配慮について (I~IIIは必ず記載のこと)

ガイドラインに従っておこなう。具体的には下記の通り。

I. 研究等の対象とする個人の人権擁護

研究参加の任意性を基本的理念とし, 参加しない場合においても, 治療などあらゆる事に不利益を被ることがないことを保証する。分担研究者のレベルで同意の得られた個人から, 血液検体および臨床情報を収集するが, 機密保持の為の責任者(個人識別情報管理者)をおき, 主任研究者に送付する時点で氏名, 住所, 生年月日などを削除する連結可能な匿名化をおこなう。一旦, 得られた同意はどの段階でも撤回できることを保証する。学会や論文などにおける, 得られたデータのあらゆる発表では, 個人情報を出さない。

II. 研究等の対象となる者に理解を求め同意を得る方法

添付した「研究へのご協力のお願い」と題する説明文書をわたし, 説明をおこなう。この説明文書では遺伝子解析の意味を説明し, 研究テーマ, 研究機関, 研究目的などを記載する。その上で, 承諾の得られた方または代理人に, 「遺伝子解析研究への同意文書」に自署していただく。この書類には, 検体保存施設および連絡先を明記し, 写しを協力者にわたす。承諾書は検体収集施設で保存する。

III. 研究等によって生じる個人への不利益並びに危険性と医学上の貢献の予測

研究協力者の遺伝子解析結果が外部に漏れた場合, 不当な差別をうける可能性が考えられる。これを防ぐため, 検体採取機関に個人識別情報管理者をおき, 個人情報の厳密な管理をおこない, 遺伝子解析研究を実施する機関へ検体および診療

情報を送付する前に匿名化をおこなう。本研究は多因子遺伝病の解析手法を開発する上で必須であり、ヒトの健康増進への貢献は多大なものになると予想される。

IV. その他

特になし。

研究計画書

1. 研究課題名

多因子遺伝病解析手法の開発ーヒルシユスプルング病をモデルとして

2. 研究の目的, 方法, 期間, 予想される成果

本研究の目的は, 本態性高血圧, 糖尿病などの多因子遺伝病の解析法を開発するために, 小児の多因子遺伝病であるヒルシユスプルング病をモデルとして解析する事である. 本症は 1) 表現型の同定が容易である, 2) 発症に生活習慣要因が関与しない, 3) 複数の発症関連遺伝子が明らかになっている, 4) 多因子遺伝病である, などの条件を満たし, 多因子遺伝病の単純なモデルとして遺伝子の相互作用の解析手法を開発するには最適なモデルであると考えられる. 既に本症の発症に関与する遺伝子として 1) RET, 2) エンドセリン受容体 B(EDNRB), 修飾遺伝子として 3) エンドセリン-3(EDN3), 4) Glial cell line-derived neurotrophic factor(GDNF), 5) Neurturin(NRTN)などの遺伝子の関与が明らかにされている. これまでに, 1) アミノ酸をコードする領域の遺伝子異常で説明できるのは症例の 30-50%のみであること, 2) 一つの遺伝子変異だけでは, 発症しない例も含めて症状に大きな差があること, 3) RET と NRTN の変異の発症における相互作用が見られる家系があること, などが報告されている.

具体的には症例を使って, 以下の研究をおこなう.

- 1) 上記 5 遺伝子の 5'上流, イントロンを含めた領域から Single Nucleotide Polymorphism (SNP)を探し, 対照群 50 人のハプロタイプ解析をおこなう.
- 2) HSCR 症例の原因変異検索: 5 遺伝子の 5'上流, エクソン部分を中心におこなう. また, 変異が見つからなかった症例はハプロタイプ解析により, 各遺伝子の関与を検討する.

明らかになった各遺伝子変異と症状との相関を検討し, 多因子遺伝病解析のための方法を検討する.

研究期間は 4 年間で予定している. 本研究を通して得られる解析手法のノウハウは生活習慣病の解析において多大な貢献が期待される.

3. 予測される血液検体提供者に対する危険や不利益および個人識別情報を含む情報保護の方法

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従っておこなう. 具体的には下記の通り.

I. 研究等の対象とする個人の人権擁護

研究参加の任意性を基本的理念とし, 参加しない場合においても, 治療などあらゆる事に不利益を被ることがないことを保証する. 分担研究者のレベルで同意の得られた個人から, 血液検体および臨床情報を収集するが, 機密保持の為の責任者(個人識別情報管理者)をおき, 主任研究者に送付する時点で氏名, 住所, 生年月日などを削除する連結可能な匿名化をおこなう. 一旦, 得られた同意はどの段階でも撤回できることを保証する. 得られたデータの学会や論文などのあらゆる発表では, 個人情報を出

さない。

II. 研究等の対象となる者に理解を求め同意を得る方法

添付した「研究へのご協力のお願い」と題する説明文書をわたし、説明をおこなう。この説明文書では遺伝子解析の意味を説明し、研究テーマ、研究機関、研究目的などを記載する。その上で、承諾の得られた方または代諾者に、「遺伝子解析研究への同意文書」に自署していただく。この書類には、検体保存施設および連絡先を明記し、写しを協力者にわたす。承諾書は検体収集施設で保存する。

III. 研究等によって生じる個人への不利益並びに危険性

検体提供者の遺伝子解析結果が外部に漏れた場合、雇用、生命保険加入などに際して、社会における不当な差別をうける可能性が考えられる。これを防ぐため、上記のように検体採取機関に個人識別情報管理者をおき、個人情報の厳密な管理をおこない、遺伝子解析研究を実施する機関へ検体および診療情報を送付する前に匿名化をおこなう。

4. 共同研究機関の名称

蒔田芳男	旭川医科大学公衆衛生学講座	助手
石井拓磨	旭川医科大学小児科学講座	助手
大浜用克	神奈川県立こども医療センター外科	部長
今泉 清	神奈川県立こども医療センター遺伝科	科長

5. 提供を受けようとする試料等の種類と量

提供を受けるのは血液、約 10ml である。

6. インフォームドコンセントを得る際の説明内容、同意文書

添付の「研究へのご協力のお願い」と「遺伝子解析研究への同意文書」に記載するとおり。

7. 研究期間内、もしくは終了後の試料の保存法と保存の必要性

血液検体は旭川医科大学公衆衛生学講座の研究室に保存する。研究期間終了後に検体を研究に使用する場合は、再び倫理委員会の承認を得る。今後、ヒトゲノム計画の進展に伴い、新しい知見を基に研究を進める必要が出てくると考えられ、研究期間終了後の検体破棄は行わない。

8. 遺伝カウンセリング体制の必要性の有無

ヒルシュスプルング病の遺伝子解析結果は、試料採取機関である神奈川県立こども医療センターの共同研究者に報告する。遺伝カウンセリングは同センターで遺伝科スタッフにより行われる。必要な場合は旭川医科大学遺伝子診療カウンセリング室（仮称）で対応する。

9. 試料提供者を選ぶ方針や考え方、基準

これまで神奈川県立こども医療センターでヒルシュスプルング病の診断を受け、外科治療、外来でフォローされている症例および可能であればその両親。

研究へのご協力をお願い

私たちは、ヒルシュスプルング病の発症原因を究明すべく、分子遺伝学的手法を用いて研究をおこなっています。以下の文書をお読みいただき研究の趣旨をご理解いただいた上、研究にご参加いただければ幸いです。

旭川医科大学小児科学講座 蒔田 芳男

この文書は、病気と遺伝子との関係、研究内容などについて説明したものです。研究にご参加いただける場合には、「遺伝子解析研究への同意文書」に署名することにより同意の表明をお願いいたします。もちろん、同意いただけないからといって、それを理由にあなたが不利益を被ることは一切ありません。

以下に、遺伝子解析に関する説明と研究参加に関わるいくつかの重要な点を説明します。
遺伝子とは

遺伝子とは、生き物の体を作る設計図に相当し、細胞の中に存在しています。ヒトには約5万個の遺伝子があると考えられています。父親と母親から半分ずつ受け継いだ遺伝子という設計図に従って、一個の受精卵から体の様々な部分が作られ、最終的にヒトの体ができあがります。また、完成された体の機能をうまくコントロールするのも遺伝子の役目です。

病気と遺伝子

ほとんどすべての病気は、その人の生まれながらの体質（遺伝子素因）と病原体、生活習慣などの影響（環境因子）の両者が組み合わさって起こります。これらのどちらかの原因が強く影響しているもの（狭い意味での遺伝病や結核などの感染症）もあれば、高血圧や糖尿病などの生活習慣病のように両者が複雑に絡み合って生じるものもあります。今回解析の対象とするヒルシュスプルング病は、RET と呼ばれる遺伝子を中心に複数の因子が発症に関与していると考えられていますが、詳細は不明です。

遺伝子解析とは

遺伝子解析とは遺伝子の構造を調べることです。現在のところ多くの疾患において、原因となる遺伝子がまだよくわかっていません。その原因わかれば、病気の診断が確実なものになり、治療がより良くなるようになると期待されます。私たちは、ヒルシュスプルング病の発症に関与する遺伝子を見いだすことで、ヒルシュスプルング病の治療や診断に使えるのではないかと期待しています（現在のところ、すぐに治療に結びつくものではあ

りません。)

研究の目的

ヒルシュスプルング病は、新生児期から乳児期に便秘を主体にして発症する疾患で、日本では出生 5000 人に一人の割合で発症しています。この疾患には、遺伝的要因が多く関係していると考えられていますが、その実態は不明です。また、男児での発症が多く、また症状の程度も強い傾向がありますが、その理由についても不明です。現在までに、RET と呼ばれる遺伝子が中心的な役割を演じていることがわかっていますが、その他の因子については、不明のままです。私たちは、これらの因子の解明によって、病気の診断や治療（現段階ですぐに役立つものではありません）への応用できるのではないかと考えています。

どの様にご協力いただくか

遺伝子解析に必要なものは、血液 約5ml です。他の検査をする際、多めに採血させていただきます。採取された血液より DNA を抽出し、RET やこの遺伝子の調節に関わる遺伝子を解析する予定です。

この外来での採血、遺伝子解析にかかる費用は研究費により支払われますので、ご家族の負担はありません。また、ご希望があれば、研究計画書の内容を見ることができます。また遺伝子を調べる方法等に関する資料が必要な場合は用意します。

どこで研究をおこない、どの様にプライバシーを保護するか

研究は、旭川医科大学小児科学講座および共同研究期間でおこないます。原則として血液および抽出した DNA は、旭川医科大学小児科学講座で保管します。血液は、旭川医科大学小児科学講座の責任者が、個人識別情報（氏名、生年月日、性別、住所など）をとりのぞき、あらためて付けなおした符号をつけます（連結可能匿名化）。遺伝子解析の結果と患者さんのカルテの内容を照合できるようにするためです。共同研究機関での研究の場合、この匿名化された情報のみを用いることとなります。遺伝子解析結果は厳重に保管されま

研究結果はどう利用されるか

得られた研究結果は専門学会、学術専門誌を通じて発表します。その際、個人情報公表されることはありません。研究の進展によっては特許などの知的財産権が生ずる可能性もありますが、その場合、その知的財産権は大学に帰属し、DNA をご提供いただいた方には帰属しません。

遺伝子解析を受ける人の権利：

この研究に協力するかどうかは、各個人の自由意思で決定すべきもので、強制ではありません。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、

同意した後でも、いつでも同意を取り消すことができます。その場合、お渡しする書式「検体の（使用、保存）についての中止請求」に署名のうえ、担当者にお渡しいただければ、迅速に処理し、以後研究には使用いたしません。ただし、同意を取り消した時にすでに研究結果が論文などで公表されていた場合は、遺伝子を調べた結果などを廃棄することができない場合もあります。

解析結果の報告：

本研究で得られる遺伝子解析結果は、さらに詳しい検討が必要なものが多く、結論が出るにはかなりの時間を要するものと思われます。したがって、解析結果の十分な意義が明らかでない段階において、個々の方への解析結果をお知らせすることは差し控えさせていただきます。ただし、研究が進み、ある遺伝子の分析結果が病気の予防に役立つことが明らかになった場合には、その成果を公表することで社会に還元します。

研究に協力することによる利益と不利益：

本研究に参加することにより、ご家族が個人的に受ける利益はありません。しかし、本研究によって解明された成果を社会へ還元することにより、新しい知見にもとづく病気の診断や治療の開発につながります。

一方、遺伝子解析結果が外部に漏れた場合、不当な差別につながる可能性が考えられます。このような不利益を防ぐため、検体採取に機密保持のための責任者を置く、解析する機関には匿名化した情報のみをわたす、解析結果の厳重な保管などの配慮をしています。

遺伝カウンセリングの体制：

本研究で得られた遺伝子解析結果について担当医以外の意見を聞きたい場合や遺伝子解析結果について不安が生じた場合には、遺伝カウンセリングを受けることが可能です。旭川医科大学附属病院に設置されている「遺伝子診療カウンセリング室」が担当します。遺伝子診療カウンセリング室の利用に関しては担当医にご相談下さい。

以上の点をご理解いただいた上、研究へのご協力をお願い申し上げます。

なお、今後、この件に関してのお問い合わせは、以下にお願いいたします。

〒078-8510 旭川市緑が丘東2条1丁目1-1

旭川医科大学小児科学講座 蒔田 芳男（まきた よしお）

電話：0166-68-2481、FAX 0166-68-2489

平成 __年__月__日

説明者 旭川医科大学小児科学講座_____

検体の（使用，保存）についての中止請求

私は、検体の保存、使用について以下のように中止したいので通知します。
（該当する項目に○をつけて下さい。）

① _____ 検体を遺伝子解析に使用することを中止する。

② _____ 検体の保存を中止する。

平成____年____月____日

研究協力者氏名（自署）

親権者

氏名

上記のごとく、検体の（使用，保存）について中止する申し出がありましたのでお知らせ
ます。検体の破棄または検体の使用許可を変更したことを証明する文書をお送り下さい。

説明者（自署）

氏名 _____

病院名 _____

病院住所 _____

電話

FAX

遺伝子解析研究への同意文書

私は遺伝子解析研究について、説明者から必要かつ適切な説明を受け、その目的個人情報
の保護等について十分理解しました。

説明を受け理解した項目（□の中に しを付けて下さい。）

- 遺伝子の分析を行うこと
- 研究には自分の意志で協力すること、またいつでも撤回できること
- 研究の目的
- 研究に協力する方法
- 研究計画書等を見ることが可能なこと
- 試料提供者にもたらされる利益および不利益
- プライバシー（個人情報）の保護の方法
- 遺伝子解析結果の開示
- 研究成果の公表の方法
- 研究から生じる知的財産権の帰属について
- 遺伝子解析研究終了後の試料等の取扱方針
- 費用負担がないこと
- 遺伝カウンセリングの体制について

研究協力への同意（「はい」または「いいえ」に○をつけ、署名してください。）

・はい ・いいえ

提供する生体試料（血液）が、ヒルシュスブルング病関連遺伝子解析研究のために、使
用および長期間保存されることに同意します。

・はい ・いいえ

平成__年__月__日

研究協力者名（自署）氏名

親権者 氏名

説明者 氏名

病院 _____

検体保存施設および責任者

旭川医科大学小児科学講座 蒔田 芳男（まきた よしお）

〒078-8510 旭川市緑が丘東2条1丁目1-1

電話：0166-68-2481 FAX：0166-68-2489

ヒルシュスプルング病遺伝子解析個人票

病院名 カルテID	
患者イニシャル	
性別	M F ○で囲んでください。
在胎週数 出生時体重 身長 頭囲	
手術時年齢	

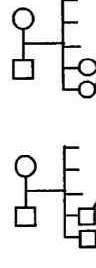
術前診断方法	画像診断 直腸肛門内圧反射 直腸粘膜生検 開腹生検 その他 ○で囲んでください。
--------	---

最終病理診断	
--------	--

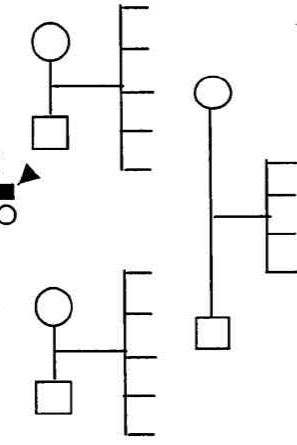
病型	<ul style="list-style-type: none"> ① short segment aganglionosis ② recrosignoid aganglionosis ③ long segment aganglionosis ④ total aganglionosis ⑤ extensive aganglionosis ○で囲んでください。記載の必要な場合は 右の図に書き込みをお願いします。 ⑤の広範囲無神経症の場合は、回盲部からの無神経 節の部分の距離を記入ください。
----	---

○で囲んでください。記載の必要な場合は
右の図に書き込みをお願いします。
⑤の広範囲無神経症の場合は、回盲部からの無神経
節の部分の距離を記入ください。

家系図



記入例



便秘傾向の有無や難聴、発達の遅れ
新生児死亡やヒルシュコリ症類縁疾患の存在などに
注目して記入ください。

