

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790646

研究課題名(和文) 膵炎関連コピー数変異の網羅的解析とスクリーニング系の確立

研究課題名(英文) A comprehensive analysis of pancreatitis associated CNVs to establish a screening method

研究代表者

条 潔 (KUME KIYOSHI)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：30431563

研究成果の概要(和文)：本邦の膵炎患者においてトリプシノーゲン遺伝子座の triplication や duplication の有無を解析した。対象は慢性膵炎患者 230 例と急性膵炎患者 180 例とした。その結果、対象とした患者にこれらのコピー数変異を認めず、本邦では稀な遺伝子異常であると考えられた。また CGH アレイにより、遺伝性もしくは家族性膵炎患者を対象に網羅的なコピー数解析を行った。その結果、既知のコピー数多型とは異なる短い配列の欠失を複数個認め、一部はタンパク質コード領域内に存在していた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the association of trypsinogen copy number mutations with pancreatitis in Japan. None of 230 Japanese patients with chronic pancreatitis and 180 patients with acute pancreatitis had this mutation. This copy number mutation might be rare in Japan.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：膵炎・遺伝子異常

1. 研究開始当初の背景

慢性膵炎は非可逆性、進行性の疾患と考えられており、その病態はいまだに不明である。また、膵炎関連遺伝子異常の保有者では膵癌発症の危険性が高まることが指摘されており、早期に診断し、その進行を抑制する治療法の開発が急務である。膵炎に関連する遺伝子変異としては、これまで一塩基置換に焦点が当てられ、いくつかの関連遺伝子が報告されている。

膵分泌性トリプシンインヒビター(SPINK1)は、膵腺房細胞で生成される内因性のトリプシンインヒビターであり、我々は日

本人の特発性慢性膵炎患者では 27.1%と高率に SPINK1 遺伝子変異が認められることを明らかにした。一方、当科で診療した膵癌 137 症例中 7 例(5.1%)に SPINK1 遺伝子変異を確認し、健常者で同変異頻度が 0.4%であるのに比べ高率であり、SPINK1 変異陽性者は膵癌発症の高危険群でもあると考えられる。遺伝性膵炎の疾患遺伝子であるカチオニックトリプシノーゲンの遺伝子変異は当科ではこれまでに R122H 変異を 6 家系 23 人に、N29I 変異を 1 家系 2 人に同定している。またアニオニックトリプシノーゲンの G191R 多型は、多型により易分解性となることで慢性膵炎に

対して保護的に作用することが報告された。我々は本邦において本多型が白色人種より高頻度(378人中25人 6.6%)に存在し、慢性膵炎(241人中3人 1.2%)ならびにアルコール性の急性膵炎(59人中0人 0%)で低頻度であり、これらに対し保護的に作用することを報告している。また近年、新たな膵炎関連遺伝子として、トリプシン分解酵素であるキモトリプシン C (CTRC)が同定された。しかし以上の遺伝子異常を認めない原因不明の慢性膵炎患者も多く存在し、その病態の全容はいまだ解明されていない。

一方、もうひとつの遺伝子異常であるコピー数変異(CNVs)が最近明らかにされた。これらは定量的蛍光マルチプレックスPCR法により同定されたトリプシノーゲン遺伝子座の triplication や duplication であり、フランスの遺伝性膵炎家系あるいは若年性特発性膵炎患者において認められた。このコピー数変異は 7q34 遺伝子座のカチオニックトリプシノーゲン遺伝子、アニオニックトリプシノーゲン遺伝子と 4 つの偽遺伝子を含む 605kb の範囲で生じており。この遺伝子変異ではトリプシノーゲンのコピー数の増加により、膵内のトリプシン活性が増強すると推測される。一方、SPINK1 遺伝子の広範囲を欠失する変異である c.1-320 c.55+961del1336bp が家族性膵炎の家系で、全領域を欠失する c.1-15969 c.240+7702del130588bp が遺伝性膵炎の家系で報告された。

マイクロアレイはさまざまな改良が加えられ、高感度化や高精度化が進んでいる。多くの場合 RNA をサンプルとして遺伝子発現解析に使用されてきたが、最近では DNA をサンプルとしてコピー数変異の解析にも用いられてきている。多数のクローン化 DNA 断片をアレイ化したスライドガラスを用いて Comparative Genomic Hybridization (CGH) を行うことにより (CGH アレイ)、従来検出できなかった、ゲノム DNA の微細領域に生じる欠失・重複などのコピー数異常を詳細に検出可能となっている。プローブ数 244,000 を使用した場合の平均解像度は約 6kb であり、目的の領域に多くのプローブを配置することで最大~0.2kb まで解像度をあげることができる。また CGH アレイでは各スポットの蛍光シグナル強度比の定量的評価が可能となり、1 コピーレベルの変化が検出可能である。ゲノム全体にプローブを配置することで、1 回の分析で全染色体にわたるゲノム構造異常の情報を収集することができる。

2. 研究の目的

これまで慢性膵炎に関連する遺伝的要因として一塩基置換に焦点が当てられ精力的な研究がなされてきたが、既知の遺伝子異常

を認めない原因不明の慢性膵炎患者も多く存在していた。最近報告されたもうひとつの遺伝子異常であるコピー数変異(CNVs)の網羅的解析は、これまでの解析で不明だった特発性膵炎患者の病因究明へのおおきな手がかりを与えるかもしれない。本研究では本邦膵炎患者におけるトリプシノーゲン遺伝子座の triplication や duplication の有無を明らかにする。また CGH アレイにより、遺伝性もしくは家族性膵炎患者を対象に網羅的な解析を行い、膵炎におけるコピー数変異の意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 当施設で診断され、本研究への参加の同意が得られた慢性膵炎患者 230 例、急性膵炎患者 180 例を対象とした。

末梢血白血球よりゲノム DNA を抽出した。トリプシノーゲン遺伝子のコピー数変異による重複領域を特異的に増幅するプライマーを用いて PCR で増幅した。増幅された変異アレルをゲル電気泳動によってバンドとして検出した。

(2) 直接標識法にて Cyanine3 および Cyanine5 標識ヌクレオチドを用いて、DNA を標識した。Agilent ハイブリダイゼーションキット (Human Genome CGH マイクロアレイ 244K) を用いたが、具体的には 60°C30 分で標識 DNA を断片化した後、ガスケットスライド上にアプライした。DNA マイクロアレイをガスケットスライドの上に乗せ、ターゲット溶液を挟み込み、65°C17 時間ハイブリダイゼーションさせた。アレイを洗浄後、当施設に設置済みの Agilent 社製の XDR スキャンにより測定した。対象は遺伝性もしくは家族性膵炎患者 7 例とした。なおサンプル DNA のラベル化色素を入れ換えた Dye Swap 解析により、再現性を確認した。

4. 研究成果

(1) 対象となった慢性膵炎患者 230 例の成因別患者数は遺伝性膵炎が 11 家系、家族性膵炎が 14 家系、特発性慢性膵炎が 71 例、アルコール性慢性膵炎が 108 例、自己免疫性膵炎が 26 例であった。急性膵炎患者 180 例の成因別患者数は特発性急性膵炎が 79 例、アルコール性急性膵炎が 53 例、胆石性膵炎 29 例、高脂血症性膵炎が 6 例、その他が 13 例であった。解析した全患者にフランスの遺伝性膵炎家系で報告された 605kb 長のトリプシノーゲン遺伝子座のコピー数変異を認めず、本邦では稀な遺伝子異常であると考えられた。

表 2 急性膵炎患者におけるトリプシノーゲン領域のコピー数変異頻度

成因	コピー数変異	頻度
特発性急性膵炎	n=79 0	0%
アルコール性急性膵炎	n=53 0	0%
胆石性膵炎	n=29 0	0%
高脂血症性膵炎	n=6 0	0%
その他	n=13 0	0%

表 1 慢性膵炎患者におけるトリプシノーゲン遺伝子領域のコピー数変異頻度

成因	コピー数変異	頻度
遺伝性膵炎	n=11	0
家族性膵炎	n=14	0
特発性慢性膵炎	n=71	0
アルコール性慢性膵炎	n=108	0
自己免疫性膵炎	n=26	0

(2) CGH アレイによるコピー数解析では、遺伝性もしくは家族性膵炎患者 7 症例について、全ゲノムのコピー数の増幅や欠損を包括的かつ高密度に解析した。その結果、新規の広範な領域のコピー数異常は同定されなかった。また SPINK1 遺伝子や CTSC 遺伝子などの膵炎関連遺伝子のコピー数異常も認められた。一方、既知のコピー数多型とは異なる短い配列の欠失や重複を複数個認め、一部はタンパク質コード領域内に存在していた。ごく最近になりカチオニックトリプシノーゲンの遺伝子内での duplication が原因と思われる遺伝性膵炎家系が報告された。小さい範囲内でのコピー数異常も疾患の原因となりうることを示唆すると考えられる。本研究で同定された短い領域のコピー数異常が遺伝子の機能に影響を与えるか否かはさらなる研究が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

- ① 正宗淳、有賀啓之、糸潔、ほか 4 名、Genetic background is different between sentinel and recurrent acute pancreatitis. J Gastroenterol Hepatol. 査読有、2011 年、印刷中
- ② 正宗淳、糸潔、菊田和宏、ほか 8 名、-651C/T promoter polymorphism in the CD14 gene is associated with severity of acute pancreatitis in Japan. J Gastroenterol. 査読有、45 巻、225-233、2010 年
- ③ 糸潔、下瀬川徹、遺伝子異常と膵炎の発症、HUMAN SCIENCE、査読無、21 巻、22-25、2010 年
- ④ 糸潔、正宗淳、菅野敦、ほか 7 名、慢性膵炎と膵癌、肝胆膵画像、査読無、12 巻、215-222、2010 年
- ⑤ 糸潔、正宗淳、下瀬川徹、家族性膵疾患とそのアプローチ、成人病と生活習慣病、査読無、40 巻、69-73、2010 年
- ⑥ 高木康彦、正宗淳、糸潔、ほか 6 名、Microsatellite polymorphism in intron 2 of human Toll-like receptor 2 gene is associated with susceptibility to acute pancreatitis in Japan. Hum

Immunol、査読有、70 巻、200-204、2009 年

⑦ 糸潔、正宗淳、高木康彦、ほか 7 名、A loss-of-function p.G191R variant in the anionic trypsinogen (PRSS2) gene in Japanese patients with pancreatic disorders. GUT、査読有、58 巻、820-824、2009 年

⑧ 糸潔、正宗淳、下瀬川徹、膵癌危険因子としての SPINK1 遺伝子変異、消化器科、査読無、49 巻、533-537、2009 年

⑨ 糸潔、正宗淳、下瀬川徹、膵癌危険因子としての SPINK1 遺伝子変異、THE GI FOREFRONT、査読無、5 巻、89-91、2009 年

⑩ 糸潔、正宗淳、下瀬川徹、遺伝子異常は膵炎とどうかかわるのか、分子消化器病、査読無、6 巻、219-225、2009 年

⑪ 糸潔、正宗淳、下瀬川徹、急性膵炎と修飾する遺伝子異常、肝・胆・膵、査読無、59 巻、173-179、2009 年

⑫ 糸潔、正宗淳、下瀬川徹、成因別特徴 (膵石症の頻度・分布) 遺伝性膵炎、肝・胆・膵、査読無、58 巻、467-475、2009 年

⑬ 下瀬川徹、糸潔、濱田晋、膵臓疾患の分子機構、臨床消化器内科、査読無、24 巻、239-238、2009 年

[学会発表] (計 5 件)

- ① 糸潔、正宗淳、下瀬川徹、Measurement of serum PSTI level might be useful to detect IVS3+2T>C (c.194+2T>C) mutation in the SPINK1 gene、United European Gastroenterology Week、2010 年 10 月 26 日、Barcelona, Spain
- ② 糸潔、正宗淳、下瀬川徹、膵炎リスクとしてのアルコールと遺伝的要因、日本アルコール・薬物医学会、2010 年 10 月 8 日、福岡
- ③ 糸潔、正宗淳、下瀬川徹、Genetic background of chronic pancreatitis in Japan、国際膵臓学会、2010 年 7 月 13 日、福岡
- ④ 糸潔、正宗淳、下瀬川徹、Chymotrypsin C gene variations in Japanese patients with Chronic Pancreatitis、国際膵臓学会、2010 年 7 月 12 日、福岡
- ⑤ 糸潔、正宗淳、下瀬川徹、慢性膵炎における遺伝子異常、日本膵臓学会、2009 年 7 月 31 日、東京

[図書] (計 2 件)

- ① 糸潔、正宗淳、下瀬川徹、財団法人日本消化器病学会、遺伝子変異による機能異常と膵炎、第 94 回日本消化器病学会総会記念誌、2009 年、61-64 ページ
- ② 糸潔、中外医学社、Annual Review 2009

消化器、2009、239-244 ページ

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑 潔 (KUME KIYOSHI)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：30431563