

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659392

研究課題名（和文）全エクソーム領域の網羅的解析による膵炎関連遺伝子異常の究明

研究課題名（英文）Analysis of pancreatitis-associated genetic disorders by whole exome sequencing

研究代表者

下瀬川 徹 (TOORU SHIMOSEGAWA)

東北大学・病院・教授

研究者番号：90226275

研究成果の概要（和文）：新たな膵炎関連遺伝子異常を同定することを目的に、次世代シーケンサーを用いて全エクソーム解析を行った。遺伝様式より 1348 個の候補遺伝子を抽出し、その機能や発現部位、変異による疾患の有無などを確認した。一方、新たなトリプシン関連遺伝子異常として、キモトリプシン C (*CTRC*) 遺伝子異常の日本人慢性膵炎患者における変異解析を行い、新規のミスセンス変異を 5 個同定した。*CTRC* 遺伝子異常の日本人膵炎患者における頻度や分布は、欧米やインドのものと異なっていた。

研究成果の概要（英文）：We performed whole exome sequencing using a next-generation sequencer. We extracted 1348 candidate genetic variants and analyzed their locations and functions. We also examined the distribution of mutations in the chymotrypsin C gene, and identified 5 novel mutations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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：胆道学、膵臓学

1. 研究開始当初の背景

急性膵炎は重症化すると致命率が 8%となる難治性の疾患である。重症急性膵炎は厚生労働省の特定疾患（難病）に指定されている。一方、慢性膵炎は腹痛発作を繰り返したのち、進行すると膵外内分泌障害により消化吸収障害や糖尿病を発症する。急性膵炎、慢性膵炎のいずれもアルコール性が最大の成因であるが、原因不明の特発性膵炎の症例も少なくない。

膵炎発症に関連する遺伝子異常としては、1996 年に遺伝性膵炎の疾患遺伝子としてカチオニックトリプシノーゲンが報告されて以来、トリプシンの活性化と不活性化に関わる遺伝子異常が報告されてきた。例えば、膵

腺房細胞で生成され、トリプシン活性を阻害する膵分泌性トリプシンインヒビター (*SPINK1*) 遺伝子の p.N34S 変異や c.194+2T>C 変異は、遺伝性膵炎、家族性膵炎や特発性膵炎、特に若年発症の症例に少なからず認められる。しかし濃厚な家族歴を有するにもかかわらず、約 30%の家系では原因遺伝子は明らかではなく、未知の遺伝子異常の関与も想定される。

さて、新規膵炎関連遺伝子異常を同定するためには、ひたすら候補遺伝子の解析を行うアプローチがある。しかし *CFTR* 遺伝子のようにならぬ 20 以上のエクソンを有する遺伝子も少なくなく、莫大な労力や費用対効果の面からは現実的ではない。一方、網羅的解析法とし

て次世代シーケンサーを用いたアプローチが始まっている。2005年より市販が開始された、いわゆる“次世代シーケンサー”は、ナノレベルでの超並列化により、従来のキャピラリーシーケンサー数百台分のデータ生産量を1台で賄える。また、蛋白質を符号化している mRNA の翻訳領域、すなわちエクソーム領域の総和はゲノムの 1.5%を占めるのみであるが、このエクソーム領域の異常により遺伝病の 85%以上を説明できるとされている。

2. 研究の目的

本研究では、次世代シーケンサーを用いて新たな膵炎関連遺伝子異常を同定することを目的とした。あわせて、*PRSS1* 遺伝子ならびに新たなトリプシン関連遺伝子異常として、キモトリプシン C (*CTRC*) 遺伝子異常の、日本人慢性膵炎患者における解析を行った。

3. 研究の方法

研究 1: 次世代シーケンサーを用いた膵炎家系の遺伝子解析

既知の遺伝子異常を認めない、遺伝性もしくは家族性膵炎の 3 家系 7 症例(家系 1: 親、子 2 人; 家系 2 および家系 3: 親子) 7 サンプルにつき、Illumina 社 HiSeq2000 を用いてヒトゲノム中の 180,000 個の全エクソン領域をシーケンスした。

研究 2: 次世代シーケンサーを用いた特発性膵炎症例の遺伝子解析

若年発症の特発性膵炎症例について、膵消化酵素や膵発現蛋白、細胞内 Ca 関連、ウビキチンプロテアソーム、小胞体ストレス関連などのターゲットを含む 68 遺伝子をカバーする HaloPlex を作成し、新型機種 MiSeq を用いて解析を行った。

研究 3: トリプシン関連遺伝子異常の解析
PRSS1 遺伝子の全 5 エクソンならびに *CTRC* 遺伝子の全 8 エクソンを各エクソンに特異的なプライマーを用いて PCR で増幅し、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮)

検体採取、遺伝子解析にあたっては、書面を用いた十分な説明のもと書面による同意を得て行った。本研究は東北大学医学部倫理

委員会の承認(承認番号 2009-403、2011-260)に基づいて行われた。

4. 研究成果

研究 1: 各サンプル平均 1.76 億リードが得られた。エクソン、スプライスサイトに含まれる多型を抽出し、dbSNP、1000Genomes に含まれるものを除外し、さらに家系内に共通してみられる 1348 個を候補遺伝子多型とした。その機能と発現部位などを確認し、さらに候補を絞り込んだ。その結果、膵炎との関連が予測された 10 個の遺伝子を抽出した。10 個の内訳は、膵消化酵素あるいは膵発現蛋白 4 個、細胞内 Ca 関連 2 個、ウビキチンプロテアソーム 2 個、小胞体ストレス関連 2 個であった。これら候補遺伝子につき、慢性膵炎患者における頻度などを現在解析中である。

研究 2: 若年発症の特発性慢性膵炎 6 症例の検討では、エクソン領域の 122 ミスセンス変異を同定可能であった。これらについて、日本人健常者における頻度などとの比較を行い、絞り込み、慢性膵炎患者における頻度などを現在解析中である。

研究 3: *PRSS1* 遺伝子の c.623G>C (p.G208A) 変異が、日本人アルコール性ならびに特発性慢性膵炎において高頻度であることを初めて明らかにした(表 1)。機能解析の結果、p.G208A 変異は中等度の分泌障害により小胞体ストレスを引き起こし、膵炎発症につながる可能性が最近報告された。このため、アルコールや他の遺伝子異常(2 例に後述する *CTRC* 遺伝子の p.R29Q 変異を、1 例に *SPINK1* 遺伝子の p.N34S 変異を認めている)と相乗的に作用し、膵炎を発症させると推測している。なお、この p.G208A 変異の報告はアジアからのみであり、東アジア地域に特徴的な膵炎関連遺伝子異常である可能性がある。

表 1. 日本人慢性膵炎患者における *PRSS1* 遺伝子 c.623G>C (p.G208A) の頻度

成因	陽性	頻度	P 値	
アルコール性	n=232	8	3.4%	0.002
特発性	n=198	9	4.5%	<0.001
遺伝性	n=34	1	2.9%	0.15
家族性	n=20	0	0%	>0.99

慢性膵炎全体	n=484	18	3.7%	<0.001
コントロール	n=411	1	0.2%	

いずれもヘテロ接合

一方、*CTRC* 遺伝子の新規 5 ミスセンス変異を同定した (表 2)。ヨーロッパで高頻度とされる 3)c.738_761del124 (p.K247_R254del) は認めず、p.R254W 変異も 1 例に認めるのみであった。一方、インドで高頻度とされる 4)c.217G>A (p.A73T) および c.703G>A (p.V251I) 変異も認めず、欧米やインドとは *CTRC* 遺伝子変異の分布が異なること、すなわち膵炎の遺伝的背景の地域差が示唆された。

本研究は次世代シーケンサーを用いた全エクソームの網羅的解析により、新たな膵炎関連遺伝子異常を同定しようとするものである。日本における遺伝性膵炎家系の検討では、約 30%の家系で *PRSSI* や *SPINK1* といった既知の膵炎関連遺伝子異常が同定されない。本研究においては、そのような家系を対象とし、遺伝様式や機能、発現部位などに基づき 10 個の膵炎関連候補遺伝子を抽出した。膵炎関連遺伝子異常の同定は、疾患の成因や病態を明らかとするものであり、特に若年発症の特発性 (原因不明) 膵炎症例の診療においては、無用な検査を避ける点でも大きな意義がある。

これまで、トリプシンの活性化・不活性化に関わる遺伝子異常を中心に膵炎関連遺伝子異常の解析が進められてきた。日本人膵炎患者における *CTRC* 遺伝子異常の頻度や分布は、欧米やインドにおけるそれらと異なっており、地域差や人種差が示唆された。このため、欧米などで報告された既知の遺伝子変異のみをスクリーニングする方法では、新しい遺伝子異常の同定には限界があることが予想される。この観点からも次世代シーケンサーを用いた包括的解析は、合理性がある。今回抽出した遺伝子異常につき、膵炎患者における頻度や機能解析の結果をもとに、膵炎との関連を検討中である。

表 2. 日本人慢性膵炎患者における *CTRC* 遺伝子異常 (ミスセンス変異)

<i>CTRC</i> 遺伝子変異	全症例	アルコール性	非アルコール性	健常対照群

エクソン 2				
c.86G>A (p.R29Q)	2/506	1/244	1/262	0/274
エクソン 6				
c.627C>G (p.I209M)	0/506	0/244	0/262	1/274
エクソン 7				
c.715T>G (p.S239A)	1/506	0/244	1/262	0/274
c.716C>G (p.S239C)	1/506	0/244	1/262	0/274
c.739A>G (p.K247E)	3/506	1/244	2/262	0/274
c.760C>T (p.R254W)	1/506	0/244	1/262	0/274
全ミスセンス変異	8/506 (1.6%)	2/244 (0.8%)	6/262 (2.3%)	1/274 (0.4%)

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 2 件)

1. Masamune A, Nakano E, Kume K, Kakuta Y, Ariga H, Shimosegawa T. Identification of novel missense *CTRC* variants in Japanese patients with chronic pancreatitis. *Gut* 2013;62:653-654.

2. Masamune A, Nakano E, Kume K, Kakuta Y, Shimosegawa T. *PRSSI* c.623G>C (p.G208A) variant is associated with pancreatitis in Japan. *Gut* 2013, in press. doi:10.1136/gut.jnl-2013-304925

[学会発表] (計 3 件)

1. 桑 潔、正宗 淳、下瀬川 徹. 次世代シーケンサーを用いた新たな膵炎関連遺伝子の同定. 第 99 回日本消化器病学会総会. 2013 年 3 月 21 日、鹿児島

2. Masamune A, Shimosegawa T. Geographical differences in the genetics of

pancreatitis. 7th International Symposium
on Inherited Diseases of the Pancreas.
2012年6月23日, Prague, Czech Republic.

3. 桑 潔、正宗 淳、下瀬川徹. 次世代シ
ークエンサーを用いた新たな膵炎関連遺伝
子の同定. 第20回浜名湖シンポジウム.
2012年12月22日、浜松

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下瀬川 徹 (TOORU SHIMOSEGAWA)

東北大学・病院・教授

研究者番号：90226275

(2) 研究分担者

正宗 淳 (ATSUSHI MASAMUNE)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90312579

桑 潔 (KIYOSHI KUME)

東北大学・病院・助教

研究者番号：30431563

(3) 連携研究者