

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790764

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析による慢性膵炎の病原体候補の探求

研究課題名(英文)Search for infectious agents in pancreatitis by next-generation sequencing

研究代表者

桑 潔(Kume, Kiyoshi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30431563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：膵炎の成因として一部のウイルス感染などが知られているが、その関連性については十分解明されていない。今回、次世代シーケンサーによる網羅的なメタゲノム解析により膵組織から感染性病原体の同定を試みたが解明には至っておらず、今後の解析が待たれる。また免疫の主要な構成要素であるMannose binding lectinについて、その機能障害と関連するコドン54の遺伝子異常が、急性膵炎後の感染合併例の50%に認められ、感染非合併例における頻度27%に比べやや高率であったが、統計学的有意差を認めなかった。さらに症例を蓄積して検討する必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The vast majority of episodes of pancreatitis are noninfectious in origin, and the role of infectious agents in this disorder remains controversial. Next-generation sequencing has many potential applications in virology, such as discovery of new viruses, and detection of unexpected viral pathogens in clinical specimens. In this study, we could not discover of new viruses as the origin of pancreatitis. The major cause of death by acute pancreatitis is secondary infection of pancreatic tissue. Mannose-binding lectin (MBL) is one of the main components of immunity. We demonstrated that the prevalence of the codon 54 mutation of MBL gene in patients with infectious complications was slightly higher compared with patients without infectious complications (50% vs 27%).

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 感染症 レクチン

1. 研究開始当初の背景

慢性膵炎の成因としてはアルコール性が61%と過半数を占めるが、大酒家のうち慢性膵炎となるのは5%程度と少なく、他の背景因子の存在が考えられている。一方、これまでの遺伝学的な知見は、トリプシンの膵内での早期活性化が他の消化酵素を活性化する鍵となるという仮説を支持している。しかし、遺伝性膵炎の頻度は1%未満と稀であり、アルコール性慢性膵炎でも既知の遺伝子異常をごく一部の患者に同定されるのみである。遺伝子異常を認めない慢性膵炎患者が大半であり、遺伝子異常により病態のすべてを説明することは困難である。

一方、感染性膵炎の原因として報告されている病原体として、ムンプス、コクサッキー、サイトメガロなどのウイルスや、マイコプラズマ、アスペルギルスなどがある。ムンプスウイルスは唾液腺および膵外分泌腺への親和性が高く、またコクサッキーB群ウイルスも膵組織への親和性があるとされる。これらのウイルス感染は主に、一部の稀な急性膵炎症例として報告されており、慢性膵炎との関連については明らかではない。

近年、DNA配列決定技術の進歩は著しい。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、従来のものに比べて格段の性能をもち、医学・生物学に革新的なインパクトをもたらすものと予想される。もっとも特徴的なのは、メタゲノムの解析である。メタゲノムは、さまざまな環境からDNAを一挙に抽出し、その配列をすべて決定することで、混和した状態であるが、その環境中に存在する生物のゲノム情報を一挙に得ようというものである。具体的には病変部からDNAを分離し、その全体をシーケンスし、得られた短い配列をGenBank上の全配列データと比較する。コンピューターによる計算量は膨大になるものの、思いがけないバクテリアやマイコ

プラズマの配列と相同性のあるタグを発見する可能性がある。それがわかれば、PCRや抗体などを使用して、発見した細菌やウイルスなどの微生物と疾患との関係を明らかにすることができる。

また重症急性膵炎の後期死亡の原因となる感染性膵壊死は、多臓器不全や敗血症性ショックを合併し、34~40%と高い死亡率を示す。この場合の感染を引き起こす微生物は一般に腸管内の細菌であるが、その臨床的な重要性に関わらず、重症急性膵炎の研究において十分な検討はなされていない。Mannose binding lectin (MBL)は補体のレクチン経路の認識分子であり、免疫反応の鍵となる構成要素である。これまでに血中のMBL濃度に影響する遺伝子多型が知られているが、膵炎の重要な後期合併症である感染との関連性についてはわかっていない。

2. 研究の目的

膵炎の成因として一部のウイルス感染などが知られているが、その関連性については十分解明されていない。近年の次世代シーケンサーによる網羅的なメタゲノム解析の出現により、新興・再興感染症の病原体の同定や新たな発症メカニズムの解明などが可能になりつつある。膵炎と関連する感染性病原体を解明することを目的とする。また免疫の主要な構成要素であるMBLについて、その遺伝子異常と重症急性膵炎後の感染性膵壊死合併に与える影響を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 当院にて手術された慢性膵炎症例の切除標本から組織を採取し組織中に含まれる全DNAを抽出する。対象は既知の遺伝子異常であるカチオニックトリプシノーゲン(PRSS1)遺伝子、膵分泌性トリプシンインヒビター(SPINK1)遺伝子、キモトリプシノーゲ

ン C(CTRC)遺伝子の変異のない慢性膵炎患者とする。手術後に切除された膵組織より DNA もしくは RNA を抽出し、RNA の場合は逆転写により cDNA を生成し、Random-primer PCR により増幅する。次世代シーケンサーによる核酸配列解読を行うが、具体的には採取した DNA の両末端にアダプターを結合させ、DNA ライブラリーを作製する。アダプターが結合した DNA 断片とアダプター相補配列が固定化されたビーズを混合後、エマルジョン PCR を行う。DNA 断片 1 分子とビーズ 1 粒子が分配されたエマルジョン液胞内で、1 種類の DNA 断片が増幅されビーズ表面に結合する。このビーズをピコタイタープレートの各ウェルに 1 粒子ずつ数十万個を充填し、ピロシーケンズにより配列を決定する。

(2) MBL に関しては欠損症を引き起こすと考えられるエクソン 1 のコドン 54 の遺伝子異常を解析した。使用した primer は forward が 5' -GTAGGACAGAGGGCATGCTC-3'、reverse が 5' -CAGGCAGTTTCCTCTGGAAGG-3' であり、制限酵素 Ban を用いた restriction fragment length polymorphism (RFLP)解析によって検討した。またサンガー法によるダイレクトシーケンズにより変異を確認し、コドン 52 と 57 にある遺伝子多型の解析も同時に行った。

4. 研究成果

(1) 研究遂行のため倫理申請を行い、本学の医学系研究科倫理委員会に申請し、承認された。本学で次世代シーケンサーを保有する細胞増殖制御分野と研究を進めていたが、解析対象となる遺伝子配列情報が膨大であり、同分野でアノテーションを担当していた長嶋先生が本学から移動となったため、標的遺伝子情報の拾い上げが困難となった。他企業に遺伝子配列の解析依頼を行った場合、解読のみに 1 検体あたり数十万円のコストとなるため、現在調整中である。

(2) MBL 欠損症を起こすコドン 52、54、57 変異について、今回コドン 52、57 変異は同定されず、本邦では稀と考えられた。コドン 54 の GG genotype (野生型) は急性膵炎群 222 例中 153 例(68.9%)で、健常者 479 例中 339 例(70.8%)と同程度の頻度であった。感染を合併した急性膵炎患者 14 例中では非野生型を 7 例(50.0%)に認め、感染を合併しなかった 98 例中 26 例(26.5%)に比べやや高率であったが、p 値は 0.11 と統計学的有意差は認めなかった。MBL の機能障害が急性膵炎後の感染に関与するか否かはさらに症例を蓄積して検討する必要があると考えられた。

表1. 急性膵炎患者におけるMBL遺伝子異常

MBL variant	急性膵炎 n=222	健常者 n=479
G/G	153 (68.9%)	339 (70.8%)
G/A	56 (25.2%)	108 (22.5%)
A/A	13 (5.9%)	32 (6.7%)
Low MBL variant	69 (31.3%)	140 (29.2%)

表2. 急性膵炎後の感染症合併とMBL遺伝子異常

MBL variant	感染合併例 n=14	感染非合併 n=98
G/G	7 (50.0%)	72 (73.5%)
G/A	5 (35.7%)	19 (19.4%)
A/A	2 (14.3%)	7 (7.1%)
Low MBL variant	7 (50.0%)	26 (26.5%)

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7件)

Witt H, Beer S, Rosendahl J, Chen JM, Chandak GR, Masamune A, Bence M, Szmola R, Oracz G, Macek M Jr, Bhatia E, Steigenberger S, Lasher D, Bühler F, Delaporte C, Tebbing J, Ludwig M, Pilsak C, Saum K, Bugert P, Masson E, Paliwal S, Bhaskar S, Sobczynska-Tomaszewska A, Bak D, Balascak I, Choudhuri G, Nageshwar

Reddy D, Rao GV, Thomas V, Kume K, Nakano E, Kakuta Y, Shimosegawa T, Durko L, Szabó A, Schnür A, Hegyi P, Rakonczay Z Jr, Pfützner R, Schneider A, Groneberg DA, Braun M, Schmidt H, Witt U, Friess H, Algül H, Landt O, Schuelke M, Krüger R, Wiedenmann B, Schmidt F, Zimmer KP, Kovacs P, Stumvoll M, Blüher M, Müller T, Janecke A, Teich N, Grützmann R, Schulz HU, Mössner J, Keim V, Löhr M, Férec C, Sahin-Tóth M. Variants in CPA1 are strongly associated with early onset chronic pancreatitis. Nat Genet. 査読有, 45, 2013, 1216-1220.

DOI:無

Masamune A, Nakano E, Kume K, Takikawa T, Kakuta Y, Shimosegawa T. PRSS1 c.623G>C (p.G208A) variant is associated with pancreatitis in Japan. Gut. 査読有, 63, 2014, 366.

DOI:無

Masamune A, Nakano E, Kume K, Kakuta Y, Ariga H, Shimosegawa T. Identification of novel missense CTSC variants in Japanese patients with chronic pancreatitis. Gut. 査読有, 62, 2013, 653-654.

DOI:無

Kume K, Masamune A, Ariga H, Hayashi S, Takikawa T, Miura S, Suzuki N, Kikuta K, Hamada S, Hirota M, Kanno A, Shimosegawa T. Do genetic variants in the SPINK1 gene affect the level of serum PSTI? J Gastroenterol. 査読有, 47, 2012, 1267-1274.

DOI:無

桑潔、正宗淳、下瀬川徹、次世代シーケンサーによる膵炎関連遺伝子の網羅的解析、Annual Review 消化器、査読無、2009、239-244

DOI:無

桑潔、下瀬川徹、遺伝子解析の進展

新しい変異は日本で意味があるのか?肝・胆・膵、査読無、64、2012、913-917

DOI:無

桑潔、下瀬川徹、遺伝子多型は膵炎発症にどのように関与するか、分子消化器病、査読無、8、2011、220-226

DOI:無

〔学会発表〕(計3件)

桑潔、正宗淳、下瀬川徹、Whole exome sequencing might become the new strategy to identify unknown mutations for pancreatitis. 2013 Annual Meeting of the American Gastroenterological Association、2013年5月18-22日、Orland

桑潔、正宗淳、下瀬川徹、次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析による膵炎関連遺伝子の検討、第99回日本消化器病学会総会、2013年3月21-23日、鹿児島

桑潔、正宗淳、下瀬川徹、慢性膵炎における遺伝子変異、第42回日本膵臓学会大会、2011年7月29-30日、弘前

6. 研究組織

(1)研究代表者

桑潔 (Kume, Kiyoshi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号: 30431563