

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670363

研究課題名(和文) マイクロRNA関連遺伝子多型の網羅的解析による膵炎遺伝子異常の検討

研究課題名(英文) Analysis of pancreatitis-associated gene variation by next-generation sequencing

研究代表者

下瀬川 徹 (Shimosegawa, Tooru)

東北大学・大学病院・教授

研究者番号：90226275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本検討では膵炎発症に関与する遺伝子のうち、マイクロRNAの機能に影響する遺伝子多型を同定するための基礎検討として、次世代シーケンスを用いた広範な遺伝子領域の網羅的解析が可能であるかを明らかにすることを目的とした。対象として遺伝子に含まれるエクソン数が27と多数であり、従来法では解析が困難なCFTR遺伝子を選択した。その結果、10個の非同義多型と6個の同義多型を同定し、そのうち非同義多型であるc.4056G>C (p.Q1352H)多型が慢性膵炎患者において有意に高頻度であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We performed comprehensive analysis of gene variation in CFTR gene using next-generation sequencing. Total 10 non-synonymous and 6 synonymous variants were identified. Among them, the frequency of the c.4056G>C (p.Q1352H) variant was higher in patients with chronic pancreatitis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：次世代シーケンス 膵炎関連遺伝子

1. 研究開始当初の背景

近年の研究により蛋白質をコードしない non-coding RNA が細胞内に大量に存在することが明らかとなり、なかでも 20-23 塩基からなるマイクロ RNA は数百にも及ぶ標的 mRNA を有していることが判明している。数多くの遺伝子が同時に制御されることでマイクロ RNA による細胞機能の網羅的な制御がなされており、マイクロ RNA 発現レベルは様々な生体機能に大きく影響する。マイクロ RNA と mRNA との相互作用を規定するのは seed 領域と呼ばれる 8 塩基の配列であり、mRNA の 3' UTR に存在する遺伝子多型は潜在的なマイクロ RNA の標的配列を変化させる可能性を有している。また、マイクロ RNA 自体をコードする領域の遺伝子多型はマイクロ RNA 前駆体の高次構造を変化させ、その安定性やマイクロ RNA 成熟過程に影響すると考えられている。

これまで、膵炎を含む炎症性疾患の原因遺伝子については主に蛋白質をコードする遺伝子のエクソン領域での変異についての知見が集積されてきた。慢性膵炎においては遺伝性膵炎の原因遺伝子である PRSS1 遺伝子の p. R122H 変異や膵分泌性トリプシンインヒビターをコードする SPINK1 遺伝子の p. N34S 変異が報告されているが、蛋白質をコードする遺伝子の多型に比較して膵炎の疾患感受性におけるマイクロ RNA を介した制御機構に関わる遺伝子多型の意義については未解明である。

2. 研究の目的

本研究ではマイクロ RNA 関連遺伝子多型を含めた遺伝子多型の網羅的解析の基礎的検討として、以下の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 小児例を含む 160 人の慢性膵炎患者末梢血あるいは口腔粘膜ぬぐい液よりゲノム DNA を抽出し、アジレント社の HaloPlex target enrichment システムを用いて既知の膵炎関連遺伝子や膵消化酵素、膵に高発現する蛋白、細胞内 Ca 関連、小胞体ストレス関連分子など膵炎との関連が想定される約 70 遺伝子をライブラリ化した。

(2) Miseq (illumina 社) を用いて解析を行い、遺伝子変異の頻度を慢性膵炎患者群及びコントロール群で比較検討した。コントロールデータとして、日本人 1208 名のエクソームシーケンスデータが解析されている Human Genetic Variation Browser (HGVB) を使用した。

(倫理面への配慮)

本研究は東北大学医学部倫理委員会の承認のもと、本人または親権者から文書による同意を得て行った (承認番号: 2009-403、2011-260)。

4. 研究成果

次世代シーケンスによる解析対象とした約 70 の遺伝子に 713 個の遺伝子異常・遺伝子多型を同定した (非同義変異・同義変異を含む)。マイクロ RNA 関連遺伝子多型の解析を実現するためには広範な領域の網羅的解析が必要であり、基礎実験として遺伝子に含まれるエクソン数が 27 個と非常に多く、従来の直接シーケンス法では解析が困難な CFTR 遺伝子 (嚢胞性線維症の原因遺伝子である) に着目し、以後の検討を行った。

CFTR 遺伝子に同定された多型について、表 1 および 2 に示す。

表 1

次世代シーケンサーで同定した CFTR 遺伝子非同義多型

エクソン	非同義多型	アミノ酸置換	遺伝子型
2	c.91C>T	R31C	CT
2	c.92G>A	p.R31H	GA
4	c.374T>C	p.I125T	TC
10	c.1231A>G	p.K411E	AG
11	c.1408G>A	p.V470M	GA AA
12	c.1666A>G	p.I556V	AG GG
17	c.2869delC	p.L957fs	
21	c.3468G>T	p.L1156F	GT TT
25	c.4056G>C	p.Q1352H	GC CC
27	c.4357C>T	p.R1453W	CT

表 2

次世代シーケンサーで同定した CFTR 遺伝子同義多型

エクソン	同義多型	アミノ酸置換	遺伝子型
4	c.C372T	p.G124=	CT
15	c.2562T>G	p.T854=	TG GG
23	c.3723C>A	p.G1241=	CA
25	c.3975A>G	p.R1325=	AG
27	c.4254G>A	p.E1418=	GA
27	c.4389G>A	p.Q1463=	GA

これらの多型について、慢性膵炎患者群における頻度と、コントロール群として HGVB における頻度を比較した結果を表 3 及び 4 に示す。

表 3
同定された非同義多型の頻度

アミノ酸 置換/ 遺伝子型		全慢性 膵炎 (%)	HGVB (%)	P 値
R31C	CT	3/160 (1.9)	12/1102 (1.1)	0.42
p.R31H	GA	1/160 (0.6)	0	-
p.I125T	TC	3/160 (1.9)	5/1102 (0.5)	0.07
p.K411E	AG	1/160 (0.6)	0	-
p.V470M	GA	85/160 (53.1)	573/119 9 (47.8)	0.36
	AA	19/160 (11.9)	185/119 9 (15.4)	
p.I556V	AG	8/160 (5.0)	78/1150 (6.8)	0.40
	GG	0/160 (0)	3/1150 (0.3)	
p.L957fs		1/160 (0.6)	0	-
p.L1156F	GT	11/160 (6.9)	45/1136 (4.0)	0.10
	TT		1/1136 (0.1)	
p.Q1352H	GC	17/160 (10.6)	57/1153 (4.9)	0.009
	CC		1/1153 (0.1)	
p.R1453W	CT	8/160 (5)	42/1144 (3.7)	0.38

非同義多型のうち、c.4056G>C (p.Q1352H)多型の頻度は慢性膵炎患者 160 人中 17 人 (10.6%) であり、HGVB のデータ (4.9%) と比較し有意に高頻度であった (P=0.009)。c.3468G>T (p.L1156F) 多型は慢性膵炎患者 160 人中 11 人 (6.9%) に認められ、HGVB (4.0%) と比較し頻度が高い傾向にあったが、統計学的に有意差は認めなかった (P=0.1)。他の非同義多型に関しては、HGVB と比較して頻度に有意差を認めなかった。

表 4
同定された同義多型の頻度

アミノ酸 置換/ 遺伝子型		全慢性 膵炎 (%)	HGVB (%)	P 値
p.G124=	CT	1/160 (0.6)	0	-
p.T854=	TG	80/160 (50)	528/1154 (45.8)	0.10
	GG	15/160 (9.4)	181/1154 (15.7)	
p.G1241 =	CA	1/160 (0.6)	3/671 (4.5)	0.58
p.R1325 =	AG	1/160 (0.6)	0	-
p.E1418 =	GA	1/160 (0.6)	0	-
p.Q1463 =	GA	2/160 (1.3)	40/1112 (3.6)	0.26

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. Nakano E, Masamune A, Kume K, Kakuta Y, Shimosegawa T. Variants in the interferon regulatory factor-2 gene are not associated with pancreatitis in Japan. *Pancreas*. 2014;43:1125-1126. doi: 10.1097/MPA.0000000000000207. 査読有
 2. Nakano E, Masamune A, Niihori T, Kume K, Hamada S, Aoki Y, Matsubara Y, Shimosegawa T. Targeted Next-Generation Sequencing Effectively Analyzed the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene in Pancreatitis. *Dig Dis Sci*. 2015;60:1297-1307. doi: 10.1007/s10620-014-3476-9. 査読有

- 〔学会発表〕(計 2 件)
1. 中野絵里子 正宗淳 桑潔 下瀬川徹
次世代シーケンサーを用いた膵炎関連遺伝子の解析
第 100 回日本消化器病学会総会 2014 年 4 月

23 26日 東京国際フォーラム(東京都千代田区)

2. Masamune A

Genetics of pancreatitis in Japan.
Cystic fibrosis in Asia from basics to clinics 2014年9月28 - 29日 名古屋大学
(名古屋市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下瀬川 徹 (Shimosegawa, Tooru)
東北大学・大学病院・教授
研究者番号: 90226275

(2) 研究分担者

正宗 淳 (Masamune, Atsushi)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 90312579

桑 潔 (Kume, Kiyoshi)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号: 30431563

濱田 晋 (Hamada, Shin)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 20451560