

令和元年6月7日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15912

研究課題名(和文)自己免疫性膵炎の発症に影響する遺伝的背景の異常とその病態への関与に関する研究

研究課題名(英文)Candidate genes associated with type 1 autoimmune pancreatitis susceptibility

研究代表者

藤林 周吾 (Fujibayashi, Syugo)

旭川医科大学・医学部・客員助教

研究者番号：10624174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：自己免疫性膵炎(Autoimmune pancreatitis; AIP)はIgG4関連疾患の膵病変の可能性が高いが、その発症に環境因子に加え遺伝的素因の関与が示唆されている。本研究では、AIP患者のコホートを用いて(n=27)、健康人(n=30)を対照群にgermline variantの解析を行い、複数の候補遺伝子多型を同定した。これらのバリエーションのうち、P2RX3 (c.195delG)及びTOP1 (c.2007delG)が新規のAIP感受性遺伝子と考えられた。さらに、AIPの再燃、膵外病変の併存に関連するバリエーションの特定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AIPは原因不明の慢性膵炎であり、高IgG血症やリウマチ因子などの自己抗体が陽性で、ステロイド治療への良好な反応が特徴とされる。疾患感受性遺伝子の同定は、診断ならびに予後予測マーカーとして、診断に難渋する例や再燃を来す例に対する解決策となる。

研究成果の概要(英文)：We sought to identify the genetic variants associated with pathogenesis of autoimmune pancreatitis (AIP). Twenty-seven type 1 AIP patients and 30 healthy donors were recruited, and custom-made panel covering 1,031 genes was utilized to explore the genetic variants. Polymorphisms of CACNA1S (c.4642C4T), rs41554316, rs2231119, rs1042131, rs2838171, P2RX3 (c.195delG), rs75639061, SMAD7 (c.624delC) and TOP1 (c.2007delG), were found as candidate variants in the patients. P2RX3 and TOP1 were significantly associated with AIP. Additionally, we identified 8 variants that were associated with the relapse of AIP, namely: rs1143146, rs1050716, HLA-C (c.759_763delCCCCinsTCCCG), rs1050451, rs4154112, rs1049069, CACNA1C (c.5996delC) and CXCR3 (c.630_631delGC). Finally polymorphisms of rs1050716 and rs111493987 were identified as candidate genetic variants associated with extra-pancreatic lesions in patients with AIP. These variants might be used as markers of AIP susceptibility.

研究分野：消化器内科学

キーワード：自己免疫性膵炎

1. 研究開始当初の背景

自己免疫性膵炎 (Autoimmune pancreatitis, 以下 AIP) は 1995 年に Yoshida らによって提唱された疾患概念であり、組織学的にリンパ球や形質細胞の高度浸潤を伴う線維化と特徴的な画像所見、高グロブリン血症、高 IgG 血症、自己抗体の存在、膵外病変の合併、ステロイドへの良好な反応を特徴とする原因不明の慢性膵炎である (Yoshida K, *Dig Dis Sci* 1995)。その後、血清 IgG4 高値及び IgG4 陽性形質細胞浸潤が病態と深く関わるということが明らかとなり、IgG4 関連疾患の一病型として認識されるようになった (Hamano H, *N Engl J Med* 2001; Kamisawa T, *J Gastroenterol* 2003)。AIP はステロイドの減量中に 30-50% の症例で再燃を認め (Hirano K, *J Clin Gastroenterol* 2016)、膵外病変合併例に難治例が多いことも示唆されている (Naitoh I, *Pancreas* 2010)。

AIP は自己免疫性疾患の合併が高頻度であり、発症には遺伝的素因の関与が示唆されている。これまでに、AIP と関連する HLA 遺伝子のハプロタイプ、FCRL3 及び CTLA4、KCNA3 の遺伝子多型 (single nucleotide polymorphism, 以下 SNP) が報告されている (Kawa S, *Gastroenterology* 2002; Umemura T, *Am J Gastroenterol* 2008; Umemura T, *Gut* 2006; Ota M, *Dis Markers* 2011)。しかし、再燃や膵外病変の合併、さらに膵炎そのものの発症メカニズムにつながる候補遺伝子は十分に探索されていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、AIP の新規感受性遺伝子を同定し、再燃や膵外病変合併といった病態との関連を明らかにすることを目的とする。発症・進展のメカニズムを免疫遺伝学的に解明できれば、AIP の診断マーカーの発見や新たな分子標的薬開発への基盤的成果を挙げることが期待される。また、再燃のリスクの高い患者群を予め予測できれば、治療の個別化も可能となり、ステロイドの過剰投与も防ぐという臨床的な意義がある。

3. 研究の方法

<対象・試料>

Type 1 AIP の診断は、日本膵臓学会の定めた自己免疫性膵炎診断基準にしたがった (J Jpn Pancreas Soc 27:17-25, 2012)。書面による同意のもと、27 例の Type 1 AIP 患者、及び 30 例の健常人ボランティアより末梢血を採取し、密度勾配超遠心法により単核球を分離し、DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen) を用いてゲノム DNA を調整した。

<解析方法>

Qubit™ Fluorometer による DNA 濃度測定、アガロース電気泳動法による Quality Check の後に、Ion Proton システム (Thermo-Fisher Scientific) を用いてターゲットシーケンス解析を行った。ターゲットゲノム領域の濃縮のため、下記の 1,031 遺伝子に対して、Ion AmpliSeq™ Designer software program を用いて 12,609 amplicon に対する 5 つの primer pool をデザインした。

- 883 genes; associated with inflammatory and autoimmune diseases
 - 209 genes; associated with metabolic disorders and oxidative stress
- (遺伝子名ならびに primer 配列は以下で公開；

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405580816300267?via%3DiHub>)

シーケンス結果は Torrent Suite Software program (Thermo Fisher Scientific) で human reference genome sequence (GRCh37/hg19) と照合し、Torrent Variant Caller plug-in for the software program (Thermo Fisher Scientific) を用いて、以下のパラメーターにより候補となるバリエーションを抽出した。

- allele frequency 10%
- coverage 5
- quality score 15
- strand bias < 0.60

サンプル間の変異データの比較用ツールには、CLC Genomics Workbench software system (CLC bio, Aarhus, Denmark) を用いた。Fisher's exact test による有意差検定を行い ($p < 0.05$)、抽出したバリエーションのうち、JSNP database (<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/>) をもとに日本人固有の多型を除外して、AIP 関連遺伝子変異の最終候補としサンガー法により配列確認した。

1) 日本人 AIP 患者に特異的な疾患感受性遺伝子の同定

健康人ボランティア群 (n=30) と比較して Type 1 AIP 患者群 (n=27) で有意に認められる遺伝子変異 (variant) を同定した。

2) 再燃・腓外病変合併に関わる variant の同定

ステロイドの減量中、または中止後に再燃を来した症例、発症時点または経過中に腓外病変を合併した症例を抽出し、再燃群と非再燃群、腓外病変合併群と腓外病変非合併群に分類し、それぞれの病態に関連する候補 variant を同定した。1) と同様に、サンガー法による配列に確認を行った。

4. 研究成果

1) 対象者の年齢・性別、及び AIP 患者の患者背景

AIP 患者の男女比は 22:5、年齢中央値は 73 歳 (55-87 歳) であった。健康人ボランティアはそれぞれ 17:13、29.5 歳 (20-49 歳) であった。両群の男女比は有意差を認めなかったが (p=0.228)、年齢は有意差を認めた (p < 0.01)。

患者背景は、閉塞性黄疸例 10 名、腓腫大例 25 名 (限局性 10 名、びまん性 15 名)、主腓管不整狭細像 27 名であった。血清 IgG4 高値 (135 mg/dL 以上) 及び、血清 IgG 高値 (1,800 mg/dL 以上) はそれぞれ 258 名、15 名であった。それぞれの中央値は 462mg/dL (57-3,245 mg/dL)、1,857 mg/dL (1,327-6,348 mg/dL) であった。血清グロブリン高値 (総蛋白の 20%以上) 17 名、抗核抗体陽性例 11 名、リウマトイド因子陽性例 1 名であった。特徴的病理所見陽性例 4 名、腓外病変例 18 名であった。ステロイド使用例 24 名で、そのうち再燃を 7 名に認めた。

2) 疾患感受性遺伝子多型の解析

4,206 か所の遺伝子多型が抽出され、このうち アミノ酸変異を伴い、p < 0.05 (Fisher 検定)、strand bias < 0.60 の条件で解析し、日本人固有の多型を除外したところ、以下の 9 か所の多型が同定された。

- rs41554316
- rs2231119
- rs1042131
- rs2838171
- rs75639061
- CACNA1S (c.4642C>T)
- P2RX (c.195delG)
- SMAD7 (c.624delC)
- TOP1 (c.2007delG)

特に P2RX (c.195delG)、TOP1 (c.2007delG) は、極めて強い関連性が認められた (それぞれ p=0.00071, p=0.000025)。

P2RX3 遺伝子は、ATP 感受性プリン受容体である P2X 受容体を coding しており、この受容体は主に後根神経節ニューロンに存在し、痛覚刺激の伝達を担っている。burning mouth syndrome や overactive bladder との関連が報告されているが、自己免疫性疾患との関連についての報告はない。腓 細胞からのインスリン分泌に関する報告がある。

TOP1 遺伝子は、DNA topoisomerase I を coding し、DNA 合成に関連のある酵素で、その阻害によってアポトーシスが誘導されることから、抗がん剤のターゲットとして知られている。各種悪性腫瘍や SLE や SSc などの自己免疫性疾患との関連が報告されており、その抗体が線維化促進に関連することから、AIP における線維化との関連も考えられる。

3) 再燃に関連する遺伝子多型の解析

再燃例 7 名と、非再燃例 17 名のサンプルを比較解析したところ、2,631 種類の多型が抽出された。これらを上記と同様にフィルタリングした結果、以下の 8 か所の多型が同定された。

- rs1143146
- rs1050716
- rs1050451
- rs41544112
- rs1049069
- HLA-C (c,759_763delCCCCinsTCCCG)
- CACNA1C (c.5996delC)
- CXCR3 (c.630_631delGC)

これらのうち 6 か所が HLA 遺伝子であり、AIP を含む自己免疫性疾患との関連が報告されている。特に HLA-DQB1 遺伝子は、AIP 再燃との関連について知られているのみである。

4) 膵外病変と関連する遺伝子多型の解析

膵外病変例 18 名と、それ以外の 9 名のサンプルを比較解析した結果、3,319 種類の多型が抽出され、以下の 2 か所の多型を同定した。

- rs1050716
- rs111493987

これまでの報告では唾液腺炎及び涙腺炎に限定して解析が行われたが、本研究では硬化性胆管炎、リンパ節腫大、後腹膜線維症、間質性腎炎を含む、全ての膵外病変との関連を対象としており、これらは新規の膵外病変関連遺伝子多型と考えられる。

本研究によって同定された遺伝子多型は、AIP の発症、再燃、さらに膵外病変合併に関連する新規の知見と考えられ、診断、及び再燃や膵外病変合併の診断マーカーとして期待される。AIP は 10 万人に 4.6 人という稀少疾患であり、今後、全国や世界規模の大規模研究が求められる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

- 1) Fujibayashi S, Sasajima J, Goto T, Tanaka H, Kawabata H, Fujii T, Nakamura K, Chiba A, Yanagawa N, Moriichi K, Fujiya M, Kohgo Y. A high-throughput sequence analysis of Japanese patients revealed 11 candidate genes associated with type 1 autoimmune pancreatitis susceptibility. *Biochem Biophys Res Commun* 24;6:76-81, 2016
- 2) Goto T, Fujiya M, Konishi H, Sasajima J, Fujibayashi S, Hayashi A, Utsumi T, Sato H, Iwama T, Ijiri M, Sakatani A, Tanaka K, Nomura Y, Ueno N, Kashima S, Moriichi K, Mizukami Y, Kohgo Y, Okumura T. An elevated expression of serum exosomal microRNA-191, -21, -451a of pancreatic neoplasm is considered to be efficient diagnostic marker. *BMC Cancer* 18, 116, 2018
- 3) 鈴木康秋、伊藤啓太、上原聡人、上原恭子、久野木健仁、藤林周吾、芹川真哉 . MRI IDEAL IQ による肝内鉄沈着の評価が有用であった肝へモクロマトーシスの 1 例 . 日本内科学会雑誌 107; 923-930, 2018
- 4) 柴垣圭佑、鈴木康秋、上原恭子、小林裕、久野木健仁、藤林周吾、芹川真哉 . 肝転移の minor rupture 及び腫瘍内出血による急性腹症を契機に診断された AFP 産生胃癌の 1 例 . 名寄市立病院医誌 26; 33-35, 2018
- 5) 由井美佳、鈴木康秋、上原恭子、久野木健仁、藤林周吾、芹川真哉 . 食道癌を合併した胃 mixed adenoneuroendocrine carcinoma(MANEC)の 1 例 . 名寄市立病院医誌 26; 36-39, 2018
- 6) 船山拓也、鈴木康秋、上原恭子、久野木健仁、藤林周吾、芹川真哉 . メディカルハーブによる薬物性肝障害の 1 例 . 名寄市立病院医誌 26; 30-32, 2018
- 7) 久野木健仁、船山拓也、由井美佳、上原聡人、上原恭子、芹川真哉、藤林周吾、鈴木康秋 . 当科における GERD 治療の現状-実臨床における P-CAB と PPI の比較検討- 名寄市立病院医誌 26; 5-9, 2018
- 8) 上原恭子、鈴木康秋、久野木健仁、藤林周吾、芹川真哉 . ミノサイクリン固定術が有効であった高齢者巨大肝 complicated cyst の 3 例 . 名寄市立病院医誌 26; 23-26, 2018

[学会発表](計 24 件)

- 1) 藤林周吾、水上奨一郎、上原聡人、上原恭子、久野木健仁、芹川真哉、鈴木康秋 . 肝嚢胞による胆管狭窄によって生じた感染性胆汁性嚢胞 (biloma) に対して、内視鏡的ドレナージが有効であった 1 例 . 日本消化器病学会第 122 回北海道支部例会 . 2017 年
- 2) 鈴木康秋、上原恭子、小林 裕、久野木健仁、藤林周吾、芹川真哉 . NAFLD・中間飲酒肝障害群の比較検討 . 日本消化器病学会第 122 回北海道支部例会 . 2017 年
- 3) 水上奨一郎、鈴木康秋、上原聡人、上原恭子、久野木健仁、藤林周吾、芹川真哉 . S 状結腸原発性腹膜垂炎の 1 例 . 日本消化器病学会第 122 回北海道支部例会 . 2017 年
- 4) 石川雄大、藤林周吾、水上奨一郎、上原聡人、上原恭子、久野木健仁、芹川真哉、鈴木康秋 . 保存的加療で治癒した胸腔内穿破型特発性食道破裂の 1 例 . 日本消化器病学会第 122 回北海道支部例会 . 2017 年
- 5) 鈴木康秋、上原恭子、久野木健仁、藤林周吾、芹川真哉、長嶋裕美 . 超音波 Shear Wave Elastography (SWE) による慢性肝疾患の再評価 MR Elastography (MRE) との比較検討 日本超音波医学会第 47 回北海道地方会学術集会 . 2017 年
- 6) 田中有紀、鈴木康秋、上原恭子、久野木健仁、藤林周吾、芹川真哉、佐竹秀美、泉谷正和、斎藤なお、松本靖司 . 甲状腺腫瘍との鑑別を要した咽頭食道憩室の 1 例 . 日本超音波医学会第 47 回北海道地方会学術集会 . 2017 年
- 7) 鈴木康秋、上原恭子、小林 裕、久野木健仁、藤林周吾、芹川真哉、佐竹秀美、泉谷

- 正和、斎藤なお、松本靖司．穿刺ドレナージに際し CT fusion 造影超音波が有用であった胆嚢周囲膿瘍の 1 例．日本超音波医学会第 47 回北海道地方会学術集会．2017 年
- 8) 岩原素子、鈴木康秋、上原恭子、久野木健仁、藤林周吾、芹川真哉、佐竹秀美、泉谷正和、斎藤なお、松本靖司．CT fusion 超音波が有用であった胆嚢穿孔による腹腔内膿瘍の 1 例．日本超音波医学会第 47 回北海道地方会学術集会．2017 年
 - 9) 鈴木康秋、藤林周吾．肝癌症例における MR Elastography と IDEAL IQ による背景肝の肝硬度及び脂肪・鉄沈着の評価．第 42 回日本肝臓学会西部会（シンポジウム 8 治療法の選択に影響を与える肝画像診断の進歩）．2017 年
 - 10) 鈴木康秋、藤林周吾．高アンモニア血症・肝性脳症におけるカルニチン補充療法の中期成績～カルニチン不応例におけるリファキシミン投与例も含めて～ 第 42 回日本肝臓学会西部会．2017 年
 - 11) 鈴木康秋、上原聡人、上原恭子、久野木健仁、藤林周吾、芹川真哉．化膿性肝膿瘍に合併し、膿瘍治療後に自然消失した肝静脈血栓の 1 例．日本内科学会第 282 回北海道地方会．2018 年
 - 12) 鈴木康秋、上原恭子、久野木健仁、藤林周吾、芹川真哉．リンパ節転移と異時性肝転移を造影超音波で評価し得た胃 mixed adenoneuroendocrine carcinoma (MANEC) の 1 例．第 31 回日本腹部造影エコー・ドブラ診断研究会．2018 年
 - 13) 鈴木康秋、上原恭子、久野木健仁、藤林周吾、芹川真哉．11 年間にわたり造影超音波・造影 CT で長期経過観察中の肝 reactive lymphoid hyperplasia (RLH) の 1 例．第 31 回日本腹部造影エコー・ドブラ診断研究会．2018 年
 - 14) 鈴木康秋、上原恭子、小林 裕、久野木健仁、藤林周吾、芹川真哉．MRI IDEAL IQ による肝内鉄沈着の評価が有用であった肝ヘモクロマトーシスの 3 例．第 104 回日本消化器病学会総会．2018 年
 - 15) 鈴木康秋、上原恭子、小林 裕、久野木健仁、藤林周吾、芹川真哉．MR Elastography と IDEAL IQ による ALD・NAFLD・中間飲酒肝障害群の比較検討．第 104 回日本消化器病学会総会．2018 年
 - 16) 鈴木康秋、上原恭子、久野木健仁、藤林周吾、芹川真哉．MR Elastography・IDEAL IQ による C 型肝炎 DAA 治療 SVR 例のフォローアップ．第 115 回日本内科学会講演会．2018 年
 - 17) 鈴木康秋、上原恭子、久野木健仁、藤林周吾、芹川真哉．MR Elastography・IDEAL IQ による NAFLD の非侵襲的病態評価．第 115 回日本内科学会講演会．2018 年
 - 18) 鈴木康秋、藤林周吾．当院における肝硬変の成因別実態～MR Elastography・IDEAL IQ による非侵襲的評価を中心に～ 第 54 回日本肝臓学会総会（ポスターシンポジウム：「肝硬変の成因別実態」）．2018 年
 - 19) 鈴木康秋、藤林周吾．MR Elastography・IDEAL IQ による NAFLD 治療介入後の評価．第 54 回日本肝臓学会総会．2018 年
 - 20) 泉谷正和、佐竹秀美、齊藤なお、松本靖司、上原恭子、久野木健仁、藤林周吾、芹川真哉、鈴木康秋．10 年間の長期観察で増大傾向を認め切除に至った脾リンパ管腫の 1 例．日本超音波医学会第 91 回学術集会．2018 年
 - 21) 鈴木康秋、上原恭子、久野木健仁、藤林周吾、芹川真哉、長嶋裕美．超音波 Shear Wave Elastography (SWE) によるフォローアップ MR Elastography (MRE) との比較検討．日本超音波医学会第 91 回学術集会．2018 年
 - 22) 鈴木康秋、上原恭子、久野木健仁、藤林周吾、芹川真哉．肝転移と膵原発巣を造影超音波で評価し得た膵 solid-pseudopapillary neoplasm の 1 例．日本超音波医学会第 91 回学術集会．2018 年
 - 23) 鈴木康秋、藤林周吾、林 秀美、中嶋駿介、長谷部拓夢、澤田康司、奥村利勝、斎藤義徳．十二指腸静脈瘤破裂を契機に診断された AIH-PBC overlap の 1 例．第 42 回日本肝臓学会東部会．2018 年
 - 24) 鈴木康秋、藤林周吾．短期間で脂肪肝を発症した肥満を伴わない非切除進行膵癌の 2 例．第 42 回日本肝臓学会東部会．2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.asahikawa-med.ac.jp/dept/mc/imed3/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：該当なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：笹島 順平

ローマ字氏名：SASAJIMA, Junpei

研究協力者氏名：後藤 拓磨

ローマ字氏名：GOTO, Takuma

研究協力者氏名：藤谷 幹浩

ローマ字氏名：FUJIYA, Mikihiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。