

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10918

研究課題名(和文) 次世代シーケンサーを用いた慢性特発性偽性腸閉塞症の原因遺伝子探索

研究課題名(英文) Causative Gene of Chronic Intestinal Pseudo-obstruction

研究代表者

照井 慶太 (Terui, Keita)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70375773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：慢性特発性偽性腸閉塞症(CIIP)は乳児期に発症し、腸閉塞症状を呈する稀な疾患である。我々は極めてまれなCIIP父子例を管理中である。父子は同一の症状を呈し、かつ4世代に渡る家系調査では本父子以外に発症者はいなかった。そのため、少なくとも本症例は突然変異を発端とした単一遺伝子疾患であると考え、同一家系内のCIIP罹患者と非罹患者の遺伝型を比較し、次世代シーケンサーを用いた網羅的ゲノム解析により原因遺伝子を探索した。死後症例のDNAの質が悪く、原因遺伝子を十分に絞り込むことができなかった。

一方、CIIPの既知原因遺伝子であるACTG2、MYH11の変異も検索したが、本家系に異常はなかった。

研究成果の概要(英文)：Chronic Intestinal Pseudo-obstruction (CIIP) is infantile disease presenting progressive ileus. We care rare family cases of CIIP with same symptom.

We tried to find causative gene by using next generation sequencer. However, we could not because of low quality DNA sample of one of the families.

ACTG2 (Enteric smooth muscle actin -2), MYH11 (myosin heavy chain 11) were thought to be causative gene of CIIP. But, there was no abnormal gene in this family cases.

研究分野：小児外科

キーワード：慢性特発性偽性腸閉塞症 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

偽性腸閉塞症は、腸管の蠕動運動が障害されることにより、機械的な閉塞機転がないにもかかわらず腸閉塞症状がみられる疾患の総称である。様々な要因による続発性と、原因の特定が困難な原発性とに分類される。原発性偽性腸閉塞症の内、成人領域では慢性偽性腸閉塞症 (Chronic intestinal pseudo-obstruction: CIPO) という疾患概念が知られている。「消化管に器質的な狭窄・閉塞病変を認めないにもかかわらず腸管蠕動障害を認めるもので、慢性の経過を経るもの」と定義されている。通常は慢性的な便秘症として経過した後、妊娠・出産や腹部手術を契機として発症する場合が多い。一方、小児領域においては慢性特発性偽性腸閉塞症 (Chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction: CIIP) という疾患概念が知られている。消化管に器質的な狭窄・閉塞病変を認めないにもかかわらず、乳児期より腸閉塞を発症し、慢性の経過をとるものである。腸管蠕動の異常を認めるが、神経節細胞には異常を認めず、Hirschsprung 病とは明確に異なる疾患である。CIPO と CIIP は非常に近い疾患概念と考えられ、CIIP の方がより重症度が高く、病期の進行も速いことから、CIPO の重症型が CIIP とする考えもある。しかし両者とも希少疾患であり、原因が解明されていないため、その関係性についても依然不明である。

CIPO 症例の多くは散発的に発生するが、16 家系(本邦 2 家系を含む)における家族内発生が報告されている。遺伝形式は常染色体優性・常染色体劣性・X 連鎖性などが報告されている。一方、CIIP の家族内発生は世界的にも稀で、報告例はない。乳児期に発症する CIIP が正常に発育し、子孫を残すことの難しさを物語っていると思われる。

様々な手法により CIPO 家族内発生例の原因遺伝子探索が行われてきている。Mitochondrial

myopathy-encephalopathy-lactic acidosis-stroke-like episodes syndrome (MELAS)を合併した CIPO における DNA polymerase gamma gene (POLG) の変異や 1)、中枢神経異常を伴った CIPO における Filamin A の変異が報告されている 2) また、Waardenburg 症候群に合併した CIPO に SOX10 の異常を指摘するものもあるが 3)、Hirschsprung 病で知られている RET などの遺伝子に異常は認められないとする報告もある 4)。いずれにせよ、CIPO・CIIP の原因遺伝子として決定的なものは依然同定されていない。

2. 研究の目的

次世代シーケンサー(NGS)による網羅的シーケンス解析を用いて、CIIP の原因遺伝子を同定する。

遺伝子異常を同定するためのアプローチとして様々な方法が知られているが、希少疾患においては発端者のみの孤発例である場合が多く複数の罹患者がいる家系収集がきわめて困難であるため、原因遺伝子の同定に至らない場合が多い。最近のゲノム研究手法の急速な進歩によって、次世代シーケンサー(NGS)による網羅的な塩基配列解析も可能になりつつあるが、いまだに孤発例では難しいのが現状である。今回、我々が解析しようとしている家系例は父子例であり、血縁者の協力も得られることから、依然困難である事は否定できないが、本研究では NGS を用いた解析による原因遺伝子の同定を試みる。

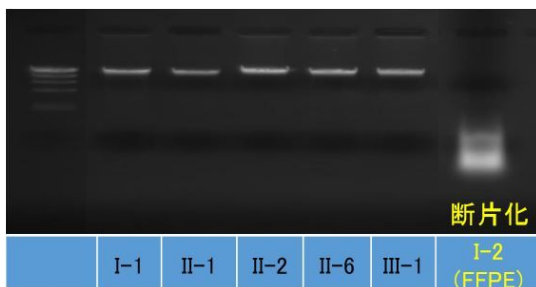
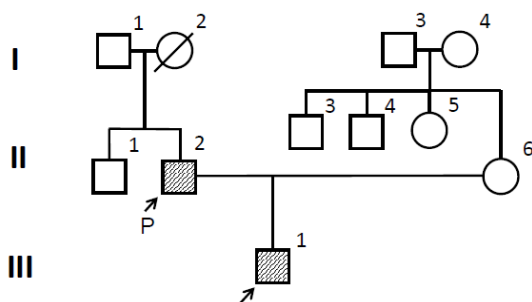
本研究により本症の原因遺伝子が同定された場合、病態解明への大きな手がかりとなることが予想される。更に治療法開発の糸口になることが予想され、難病を患う患者にとって大きな福音となる可能性を秘めている。更に、腸管蠕動の病態生理に新しい知見をもたらす可能性があり、様々な分野への研究の広がりが予想される。

3. 研究の方法

千葉大学生命倫理審査委員会による承認を得た後、十分な説明と同意を得た上で、CIIP 罹患者、及びその家系内の非罹患者のヒト試料として血液などの提供を受ける。家系解析により CIIP の原因遺伝子(座)を次世代シーケンサーにより探索する。当該家系罹患者・非罹患者の血液由来ゲノム DNA を用いて TruSight One(イルミナ社)による解析を実施する。平成 28 年度に罹患者および解析に重要な試料に絞って全ゲノム解析を実施し、候補領域を絞り込む。

4. 研究成果

慢性特発性偽性腸閉塞症(CIIP)は乳児期に発症し、進行性の腸閉塞症状を呈する稀な疾患である。我々は極めてまれな CIIP 父子例を管理中である。父子は同一の症状を呈し、かつ 4 世代に渡る家系調査では本父子以外に発症者はいなかった。そのため、少なくとも本症例は突然変異を発端とした単一遺伝子疾患である事が有力となった。そこで同一家系内の CIIP 罹患者と非罹患者の遺伝型を比較し、次世代シーケンサーを用いた網羅的ゲノム解析により原因遺伝子を探索した。しかし父の母が既に没後であり、生前に行われたリンパ節生検検体から DNA 抽出を試みた。その抽出された DNA の質が悪く、原因遺伝子を十分に絞り込むことができなかった。



一方、CIIPの既知の遺伝子異常としてACTG2 (Enteric smooth muscle actin -2), MYH11 (myosin heavy chain 11)が知られている。そこで、ACTG2, MYH11についてCIIP罹患者と非罹患者とで比較を行った。罹患者にあって非罹患者にない変異はACTG2で8つのSNV (Single Nucleotide Variant), MYH11で6つのInsertion & Deletion, 13のSNVであった。この内、Exon上に変異があったのはひとつだけ(rs1050113)であった。ただSNPのReferenceを調べてみると、このrs1050113はマイナーアレルがホモ(A/A)の確率が8.9%であった。CIIPの原因として単一遺伝子を想定しているが、人類の8.9%にみられる変異では仮説に合致しないため、本症例の原因としては認められないと判断した。

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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

1. 発表者名

照井慶太, 関根章博, 山下泰生, 北原輝栄, 竹村 亮, 真下陽一, 齋藤 武, 中田光政, 小松秀吾, 羽田 明, 吉田英生

次世代シーケンサーを用いた慢性特発性偽性腸閉塞症の原因遺伝子探索

第54回日本小児外科学会 2017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

照井 慶太 (TERUI, Keita)
千葉大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 70372773

(2) 研究分担者

羽田 明 (HATA, Akira)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 00244541

吉田 英生 (YOSHIDA, Hideo)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 60210712

(3) 連携研究者

関根 章博 (SEKINE, Akihiro)
千葉大学・予防医学センター・教授
研究者番号: 30425631

竹村 亮 (TAKEMURA, Ryou)
千葉大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号: 50747516

真下 陽一 (MASHIMO, Youichi)
千葉大学・大学院医学研究院・技術職員

研究者番号： 90422253

齋藤 武 (SAITOU, Takeshi)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号： 20406044

(4)研究協力者
()