

令和元年5月23日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15916

研究課題名（和文）網羅的機能解析プラットフォームの構築による新規膵炎関連遺伝子異常の同定

研究課題名（英文）Identification of the novel pancreatitis-related gene

研究代表者

中野 絵里子（Nakano, Eriko）

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：90779729

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では若年発症および特発性慢性膵炎患者において、新たな膵炎関連遺伝子の新規変異を多数同定した。アミノ酸変異を伴う変異に加えてナンセンス変異やフレームシフトを伴う変異が複数認められ、遺伝子機能の喪失が膵炎発症に寄与していると推測された。データベースによる予測でも遺伝子機能の低下・喪失が起こると判定されるものが含まれていた。変異体の中には野生型に比べ蛋白発現が低下するもの、遺伝子機能の低下がみられるものが確認され、膵炎発症と本遺伝子の機能低下との関連が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では新たな膵炎関連遺伝子において多数の新規変異が同定された。同遺伝子の機能喪失が膵炎発症につながるメカニズムは未解明であり、新たな発症機序解明の糸口となる一連の結果は意義深いものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：This research project identified various novel mutations in the newly identified pancreatitis-associated gene in patients with early onset chronic pancreatitis. These mutations include missense mutations, nonsense mutations and frameshift mutations, suggesting possible contribution of loss-of-function to pancreatitis development. Database analysis also indicated loss-of-function due to these mutations. Part of these mutants revealed decreased protein expression level or attenuated function of gene product, suggesting relationship between these mutations and pancreatitis.

研究分野：消化器内科

キーワード：膵炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 既知の膵炎関連遺伝子

慢性膵炎は発症機序や成因が明らかとなっていない部分が多く、いまだ有効な治療法は確立されていない難治性の疾患である。膵炎発症の機序として、膵腺房細胞内で起こるトリプシノーゲンの異所性活性化が想定され、生体内におけるトリプシン活性と防御機構のバランスが破綻した場合に膵炎を発症すると考えられている。1996年に遺伝性膵炎の疾患原因遺伝子としてカチオニックトリプシノーゲン (PRSS1) 遺伝子変異が同定されて以降 (Whitcomb, Nat Genet 1996)、トリプシン活性調整に関連する様々な遺伝子が膵炎関連遺伝子として報告されてきた。代表的な遺伝子として、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) 遺伝子異常や (Witt, Nat Genet 2000)、トリプシン分解に寄与するキモトリプシン C (CTRC) 遺伝子異常などがある。

### (2) 全エクソーム解析による新規膵炎関連遺伝子の同定

2013年、カルボキシペプチダーゼ A1 (CPA1) 遺伝子異常が若年性膵炎と関連することを、研究代表者を含めた国際共同研究グループが明らかにした (Witt, Nat Genet 2013)。CPA1 遺伝子変異は生成される変性蛋白質の misfolding が膵腺房細胞に小胞体ストレスを与えて膵炎を発症する可能性が示されている。このように、トリプシンの活性調整に関連しない新たな膵炎発症機序が解明されてきている。しかし、本邦での遺伝性・家族性膵炎家系を対象とした調査では、約3割の家系において PRSS1 遺伝子や SPINK1 遺伝子など原因遺伝子異常を認めていない (Masamune A, Tohoku J Exp Med 2014)。

近年、新規の疾患原因遺伝子同定の手法として、次世代シーケンサーによる解析が用いられつつある。これまで遺伝子変異解析に主に用いられてきたサンガー法と比較し、次世代シーケンサーによる解析は、遺伝子配列を大量に低コストで短時間に解析することが可能であり、様々な分野で次世代シーケンサーを用いた新規疾患関連遺伝子の検索が行われている。研究代表者は次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析による新規膵炎関連遺伝子の同定を試み、これまでに若年発症の特発性慢性膵炎患者で健常者の両親とのトリオ解析を行い、新たな膵炎関連遺伝子に新規多型を同定している (図1)。このように、全エクソーム解析を用いたこれまでにない大量かつ網羅的な解析により、新たな遺伝子プロファイルが明らかになることが期待される。

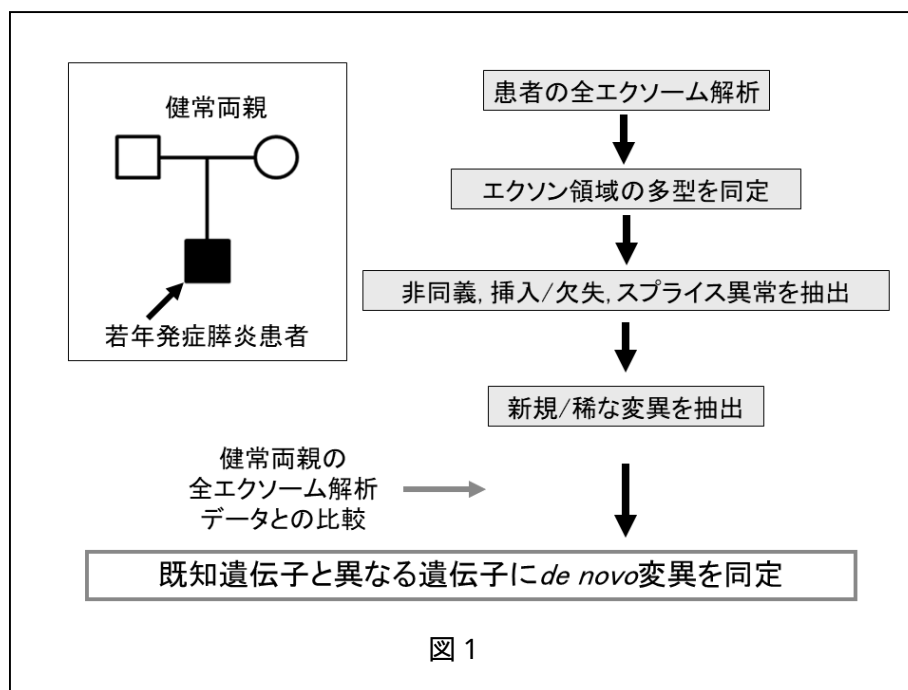


図1

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、全エクソーム解析を用いた慢性膵炎患者の遺伝子プロファイルの網羅的解析をすることにより、既知の膵炎発症機序に依存しない新規膵炎関連遺伝子を抽出すること及び、抽出された膵炎関連遺伝子について遺伝子機能機能解析プラットフォームを構築することである。

## 3. 研究の方法

### (1) DNA 検体の採取

既知の膵炎関連遺伝子変異を認めない遺伝性膵炎、家族性膵炎、若年発症の特発性慢性膵炎患者ならびにその家族を対象として末梢血より DNA を抽出した (Promega 社の Wizard Genomic DNA Purification Kit を使用)。遺伝性膵炎の診断は、2 世代以上にわたり 1 親等内に 2 人以上

あるいは2親等内3人以上の、明らかな成因をもたない慢性膵炎・反復性膵炎患者とした。家族性膵炎の診断は、遺伝性膵炎の診断基準は満たさないものの、同一家系内に2人以上の膵炎患者を認める場合とした。特発性慢性膵炎の診断は、家族歴を有さずアルコール多飲や外傷、薬物及び解剖学的異常など明らかな成因をもたない患者とした。

## (2) 膵炎関連遺伝子解析

アジレント社の Sure-Select Human All Exon Kit V5 を用いてシーケンスを行い、イルミナ社 HiSeq 2000 (既に東北大学で運用中) を用いて全エクソーム解析した。本解析により膵炎関連遺伝子のゲノム情報が網羅的に明らかになった。HiSeq にて得られた全ての遺伝子多型は、非同義多型やスプライシング多型の抽出、遺伝形式、アレル頻度から候補遺伝子の絞り込みを行った。従来は膵発現蛋白や膵消化酵素関連の遺伝子に重点を置いた解析を行っていたが、既知の膵炎発症機序に関与しないと思われる遺伝子においても、抽出し検討対象とした。

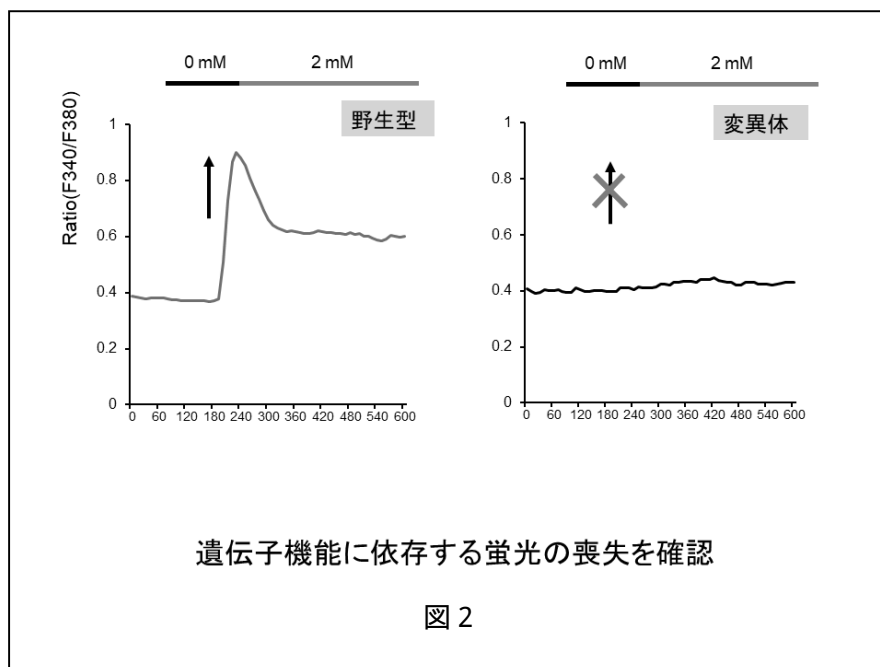
## 4. 研究成果

### (1) 新規膵炎関連遺伝子変異の同定

若年発症および特発性慢性膵炎患者において、同膵炎関連遺伝子の新たな変異を多数同定した。アミノ酸変異を伴う変異に加えてナンセンス変異やフレームシフトを伴う変異が複数認められ、遺伝子機能の喪失が膵炎発症に寄与していると推測された。データベースによる予測でも遺伝子機能の低下・喪失が起こると判定されるものが含まれていた。

### (2) 変異遺伝子発現ベクター作成による機能解析

本膵炎関連遺伝子の発現ベクターを用いて、膵炎患者にみられた変異遺伝子を site-directed mutagenesis にて再構築した。HEK293 細胞へのトランスフェクションにより、野生型遺伝子および変異体遺伝子を強制発現させ蛋白レベルでの発現を比較したところ、ナンセンス変異やフレームシフトを伴う変異体では特異バンドの消失を、アミノ酸変異を伴う変異体では蛋白発現が低下するものが認められた。遺伝子機能に依存した細胞内蛍光を可視化した実験では、野生型で認められた蛍光強度の増強に比べ、変異体で蛍光が減弱するものが認められた(図2)。



以上の結果から、同遺伝子の変異は遺伝子機能の喪失・減弱につながることが明らかとなった。現時点でも新たな変異が膵炎患者で同定されており、変異体作成による機能解析を継続している。当遺伝子を安定発現する細胞株の作成も進めており、細胞モデルを用いた病態解明の基盤として応用予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Protease-Sensitive Pancreatic Lipase Variants Are Associated With Early Onset Chronic Pancreatitis. Lasher D, Szabó A, Masamune A, Chen JM, Xiao X, Whitcomb DC, Barmada MM, Ewers M, Ruffert C, Paliwal S, Issarapu P, Bhaskar S, Mani KR, Chandak GR, Laumen H, Masson E, Kume K, Hamada S, Nakano E, Seltsam K, Bugert P, Müller T,

Groneberg DA, Shimosegawa T, Rosendahl J, Férec C, Lowe ME, Witt H, Sahin-Tóth M. *Am J Gastroenterol*. 2019 Feb 13. [Epub ahead of print] doi: 10.14309/ajg.0000000000000051. 査読有

2. Nationwide epidemiological survey of early chronic pancreatitis in Japan. Masamune A, Kikuta K, Nabeshima T, Nakano E, Hirota M, Kanno A, Kume K, Hamada S, Ito T, Fujita M, Irisawa A, Nakashima M, Hanada K, Eguchi T, Kato R, Inatomi O, Shirane A, Takeyama Y, Tsuji I, Shimosegawa T; Research Committee of Intractable Pancreatic Diseases in Japan. *J Gastroenterol*. 52(8):992-1000, 2017 doi: 10.1007/s00535-017-1311-8. 査読有
3. Nationwide survey of hereditary pancreatitis in Japan. Masamune A, Kikuta K, Hamada S, Nakano E, Kume K, Inui A, Shimizu T, Takeyama Y, Nio M, Shimosegawa T. *J Gastroenterol*. 53(1): 152-160. 2017 doi: 10.1007/s00535-017-1388-0. 査読有
4. Successful Endoscopic Treatment of Severe Pancreaticojejunostomy Strictures by Puncturing the Anastomotic Site with an EUS-guided Guidewire. Nabeshima T, Kanno A, Masamune A, Hayashi H, Hongo S, Yoshida N, Nakano E, Miura S, Hamada S, Kikuta K, Kume K, Hirota M, Unno M, Shimosegawa T. *Intern Med*. 57(3):357-362, 2017 doi: 10.2169/internalmedicine. 査読有

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。