

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：82801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08163

研究課題名(和文) HLA領域のムチンMUC22遺伝子とアジア人の非嚢胞性線維症性気管支拡張症の検討

研究課題名(英文) Genetic polymorphisms of MUC22 gene and non-cystic fibrosis bronchiectasis in Asians

研究代表者

土方 美奈子 (Hijikata, Minako)

公益財団法人結核予防会 結核研究所・生体防御部・部長

研究者番号：90332387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：日本のびまん性汎細気管支炎症例とベトナムの副鼻腔気管支症候群症例の、HLA領域内に存在するムチン・ムチン様遺伝子クラスターの遺伝的多型をIllumina短鎖シーケンサーとOxford Nanopore長鎖シーケンサーを用いて解析した。日越の症例で共通して存在する多型が明らかになり、アジア人の非嚢胞性線維症性気管支拡張症に関わる可能性を有する遺伝的多型として注目された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ムチン遺伝子のリピート領域の配列は、従来のサンガーシーケンス法やIllumina型の短鎖シーケンサーでの解析が困難であったが、long PCRと長鎖シーケンサーを用いた方法で配列が決定できた。また、HLA領域のムチン・ムチン様遺伝子の遺伝的多型と疾患の関連解析は、HLA領域特有の長く続く連鎖不平衡状態のために絞り込みが難しいが、日本のびまん性汎細気管支炎症例とベトナムの副鼻腔気管支症候群で共通の遺伝的多型を探索することで、日本人集団での関連領域をさらに絞り込める可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Genetic polymorphisms in mucin/mucin-like genes in HLA region were analyzed in Japanese patients of diffuse panbronchiolitis and in Vietnamese patients of sinobronchial syndrome, using short reads from Illumina sequencer and long reads from Oxford Nanopore sequencer. Several genetic polymorphisms related to diffuse panbronchiolitis in Japanese patients were also found in Vietnamese patients of sinobronchial syndrome. Shared polymorphisms between the two Asian populations may be related to non-cystic fibrosis bronchiectasis in Asians.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：びまん性汎細気管支炎 副鼻腔気管支症候群 ムチン遺伝子 HLA領域 遺伝的多型 長鎖シーケンサー

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム6番染色体のHLA領域内に存在する4つのムチン・ムチン様遺伝子で構成されるムチン遺伝子クラスターの遺伝的多型は、びまん性汎細気管支炎(DPB)や喘息との関連が知られており、また、その中のMUC22はHLA領域で最も多型に富む遺伝子であるとされている。MUC22を中心とする領域の遺伝的多型はアジア人の非嚢胞性肺線維症性気管支拡張症(non-CF BE)と関連する可能性が考えられるが、ムチン遺伝子の長いリピート配列とHLA領域に特有の連鎖不平衡状態のため、解析が十分に行われていなかった。

2. 研究の目的

従来のサンガーシーケンシング法やIlluminaなどの短鎖の次世代シーケンサーでは遺伝子配列の解析が困難であった、ムチン遺伝子のリピート配列を有する長いエクソンの遺伝子配列を、PCR増幅と長鎖リードが取得可能な第3世代シーケンサーを用いて決定する。さらに、日本人のDPB検体とベトナム人の副鼻腔気管支症候群検体の2か国のパネルで国際比較をすることで、疾患関連領域の絞り込みを行い、関連する多型・ハプロタイプを詳細に検討し、アジア人のnon-CF BEの遺伝的素因の一端を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)日本人DPB患者DNA検体(倫理委員会承認済)と、ベトナムハノイ市における慢性上下気道感染症の有病率調査および遺伝的背景を探索する国際共同研究で、バックマイ病院および申請者の所属施設の倫理委員会での承認の上、既に集積された200患者の臨床疫学情報とDNA検体を用いた。200症例から、慢性副鼻腔炎の確定診断と高解像度胸部CT画像などの臨床データにより副鼻腔気管支症候群症例を選び、日本人DPB患者の中から選ばれたDNA検体とともに以下の詳細な遺伝子解析を実施した。

(2)過去の我々の研究(Keicho N, *et al.* Am J Respir Crit Care Med 1998)で日本人DPB患者での関連が明らかな、HLA B*5401-A*2402, B*5401-A*1101, B*5504-A*1101のハプロタイプを含むように、日本人DPB検体3検体を選び、ベトナム人副鼻腔気管支症候群症例からは、B*5401をヘテロ接合体で有する3症例を選んだ。我々の過去の研究で絞り込まれたDPB疾患感受性候補遺伝領域の80 kb(我々がクローニングしたMUC22, PBMUCL2遺伝子を含む)(Hijikata M, *et al.* Hum Genet 2011)に、80 kb領域外のムチン・ムチン様遺伝子領域(MUCL3, MUC21およびMUC22の一部)を追加し、合計120 kbの領域を解析対象とした。ターゲットリシーケンシングの方法は、我々の報告(Keicho N, *et al.* Mol Genet Genomic Med 2020)に準じ、ターゲット領域を互いにオーバーラップするlong PCR(最長10 kb程度)によって増幅し、ライブラリー作成を行い、Illumina MiSeqによりシーケンシングを行った。

(3)検体数を増やし、従来、遺伝子配列の決定が困難であったMUC22とMUC21のリピート配列を有する長いエクソンをそれぞれ一つのlong PCRによって増幅を行った。インデックスとアダプターの付加を行い、オクスフォードナノポア社のGridIONシーケンサーを用いてシーケンシングした。同PCR産物について、Illuminaシーケンサーによるシーケンシングも実施した。いずれも得られたデータは、CLC Genomics Workbench(キアゲン)等を用いて解析を行った。

4. 研究成果

2011年の報告時には、MUC22遺伝子のイントロン2内の一部配列のPCR増幅ができなかったが、本研究では、条件検討を重ねて改善したPCR法(Keicho N, *et al.* Mol Genet Genomic Med 2020)により、MUC22全遺伝子領域の増幅が可能になり、ターゲットリシーケンシング法で配列解析を行った。日越各3検体の、DPB疾患感受性候補遺伝領域を含む120 kbのIllumina短鎖データは、ヒトゲノム参照配列としてhg38と日本人基準ゲノムJG2.0の2種類のゲノム配列にそれぞれマッピングして、詳細に遺伝的多型の検出を行った。また、*de novo*アセンブリもを行い、マッピング結果ではわかりにくい挿入欠失配列の確認を実施した。Illumina短鎖データのマッピングでは、MUC22およびMUC21遺伝子のリピート配列を有する長いエクソン領域の多型の有無の判定が困難である場所が認められ、*de novo*アセンブリでもcontig配列が一つにつながらなかった。さらに検体数を増やし、リピート配列を有する長いエクソンを含む遺伝子領域をPCR増幅し、長鎖シーケンサーを用いてシーケンシングしたところ、多型の有無を判定することができ、またハプロタイプも決定された。しかし、アレル間でリピート配列領域に長さの違いがあるヘテロ接合体の検体では、Nanoporeシーケンサー特有のエラーの修正が困難であったため、今回の検討では、両アレルでリピート配列領域の長さが同じ検体のシーケンシングから配列を決定した。

我々が報告した、DPBに関連する遺伝的多型(Hijikata M, *et al.* Hum Genet 2011)については、ベトナム人副鼻腔気管支症候群症例の中に、同じ遺伝子型を有する症例が存在しており、ベトナム人コントロール集団と副鼻腔気管支症候群症例でタイピングを実施した。また、日本人DPB症例とベトナム人副鼻腔気管支症候群症例の比較から、日越症例に共通する候補多型がMUC22のイントロン2内に新たに見いだされた。

MUC22 は、気道上皮細胞では炎症刺激による誘導性の発現を示し、その遺伝的多型は、アジアの non-CF BE のみならず、近年急増する肺非結核性抗酸菌症にも関連する可能性があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Keicho Naoto, Hijikata Minako, Morimoto Kozo, Homma Sakae, Taguchi Yoshio, Azuma Arata, Kudoh Shoji	4. 巻 8
2. 論文標題 Primary ciliary dyskinesia caused by a large homozygous deletion including exons 1-4 of DRC1 in Japanese patients with recurrent sinopulmonary infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Genetics & Genomic Medicine	6. 最初と最後の頁 e1033
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mgg3.1033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究 分 担 者	慶長 直人 (Keicho Naoto) (80332386)	公益財団法人結核予防会 結核研究所・副所長・副所長 (82801)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
ベトナム	Bach Mai Hospital		