

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17177

研究課題名（和文）全エクソン解析による日本人における間質性肺炎疾患関連遺伝子の解明

研究課題名（英文）Disease susceptibility genes for Japanese pulmonary fibrosis using whole exome sequence

研究代表者

岡本 師（Okamoto, Tsukasa）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座准教授

研究者番号：60724200

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）：予後不良な間質性肺疾患の疾患関連遺伝子に関わる報告は主に白人に対するものであり、日本人におけるものは少なく全エクソン解析はこれまでにない。特に多くの間質性肺炎を発症している家族性間質性肺炎16症例のDNAを用いて全エクソン解析を実施した。得られた変異データについて機能予測ツールであるSIFT, PolyPhen-2などを用い、候補遺伝子を絞り込み、CELSR3, UNC13Dなどの変異を認めた。特にCELSR3の細胞間接着分子に注目し、A549細胞株を用いてsiRNAによるノックダウンを実施。60%ノックダウンに対して、N-Cadherin、 α -SMA、Vimentinの発現増加を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

予後不良な間質性肺疾患の疾患関連遺伝子に関わる報告は主に白人を対象とした研究であるが、報告された遺伝子変異の多くは人種の異なる日本人では当てはまらないことが明らかとなっている。例えばMUC5B promoter領域のSNPは非ヒスパニック系白人においては保有アリル頻度が高く、かつ発症に対する効果が強いことが知られているが、日本人においては非常にまれな変異である。日本人集団を対象とし全エクソン解析を報告した文献は乏しいことから、本研究では日本人の家族性間質性肺炎症例の全エクソン解析を行い複数の候補遺伝子を同定した。今後は症例数を増やし検証していくこと、機能的な役割の解明が望まれる。

研究成果の概要（英文）：Reports on disease susceptibility genes for interstitial lung diseases are mainly for Caucasians, and there are few reports on Japanese, and no whole exon analyses have been published so far. We performed whole exon analysis using DNA from 16 cases of familial interstitial pneumonia. Using SIFT, PolyPhen-2, and other function prediction tools, we narrowed down the candidate genes and found mutations in CELSR3, UNC13D, and other genes. In particular, we focused on the intercellular adhesion molecule CELSR3 and performed siRNA knockdown using the A549 cell line, which showed increased expression of N-Cadherin, α -SMA, and Vimentin in response to 60% knockdown of CELSR3 gene.

研究分野：間質性肺炎

キーワード：家族性間質性肺炎 全エクソン解析 CELSR3 間質性肺炎 疾患感受性遺伝子

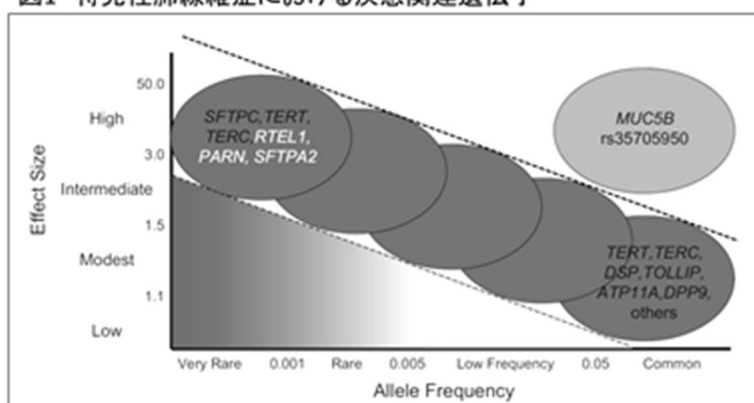
1. 研究開始当初の背景

間質性肺炎とは、胸部 X 線写真や CT 画像にて両側びまん性の陰影を認める疾患のうち、肺の間質を炎症や線維化病変の場とする疾患の総称である。間質性肺炎の原因は多岐にわたり、職業・環境や薬剤など原因の明らかなものや、膠原病・サルコイドーシスなどの全身性疾患に付随して発症するものとともに、原因が特定できないものが含まれる。肺の線維化の病態には不明な点が多く、有効な治療法は肺移植以外に乏しい。特に特発性肺線維症の予後は診断から 3~5 年と不良である (Am J Respir Crit Care Med 2000;161:646-664)。

間質性肺炎のうち特に特発性肺線維症について欧米を中心に原因遺伝子探索に関する報告がなされ、MUC5B promoter 領域の SNP (rs35705950) やテロメア領域 (TERT、TERC)、SFTPC、DSP の遺伝子変異が関与する (図 1)。申請者の留学先であるコロラド大学の David Schwartz Lab において、82 例の家族性間質性肺炎症例を用いて Genome wide linkage analysis が行われ、Muc5b promoter 領域の SNP (rs35705950) が強く関与することが示された (Seibold MA, et al. N Engl J Med. 2011;364:1503-12)。rs35705950 は Common variant でありながら、この variant を有していると heterozygous で発症リスクが約 7 倍、homozygous で約 20 倍と強いインパクトを残した (図 1)。

申請者らは、ヨーロッパにおける特発性肺線維症 602 例と健常者 3366 例を用いて、Genome-wide association study を行ったところ、既報告の MUC5B や DSP の遺伝子異常に加え、AKAP13 の遺伝子異常の関与が明らかとなった (Allen RJ, Okamoto T (43 人中 9 番目), et al. Lancet Respir Med. 2017;5:869-880)。また、申請者らは近年 Non-Hispanic white を対象に、既報告の common/rare variant について、間質性肺炎 3624 例と健常者 4442 例に対し Deep targeted resequencing を行い、既報告の rs35705950 や新たに FAM13A との関連を示した (Moore C, Okamoto T (123 人中 95 番目), et al. Am J Respir Crit Care Med. 2019;200:199-208)。このように、Genome wide study の結果や、家族の中に多数の間質性肺炎を発症する家族性間質性肺炎の存在を考えると、遺伝因子は間質性肺炎発症に重要である。

図1 特発性肺線維症における疾患関連遺伝子



しかし、欧米では MUC5B の rs35705950 の minor allele frequency (MAF) が 10~20% であるのに対し、表 1 のようにアジア人では少ない。申請者らが検索した日本人の rs35705950 の MAF は 0.4% にとどまる (未発表データ)。また、日本人は欧米人と比較し薬剤性間質性肺炎を発症する頻度が高い (Camus P, et al. Br J Cancer. 2004;91:S18-23)。したがって、間質性肺炎発症において、日本人は遺伝的背景が欧米人と異なる可能性が示唆され、間質性肺炎発症に異なる機序が関与している可能性が考えられる。

したがって、日本人における間質性肺炎の疾患関連遺伝子は何か、その遺伝子と臨床データとの関連は何かということは未解決な点となる。

表1 rs35705950のminor allele frequency (MAF)

Race	IPF (n)	Control (n)	MAF		P value
			IPF (%)	Control (%)	
Non-Hispanic white	3624	4442	64.1	19.2	9.6 X 10 ⁻²⁹⁵
アジア人	209	1323	3.3	0.8	2.6 X 10 ⁻⁶
日本人(未発表データ)	44	3488	3.4	0.4	5.9 X 10 ⁻³

2. 研究の目的

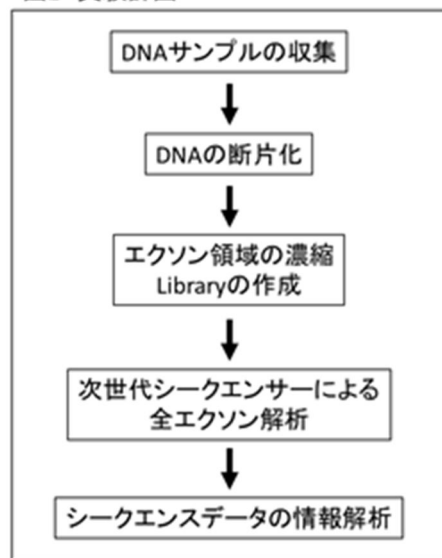
本研究の目的は、日本人における間質性肺炎の疾患関連遺伝子を同定することである。疾患関連遺伝子が同定されれば、間質性肺炎発症の機序を理解する一助となり、さらには治療の標的となる可能性もある。

3. 研究の方法

(1) 家族性間質性肺炎および孤発性間質性肺炎症例の臨床情報、DNA サンプルの収集

本研究計画の概要を図2に示す。一親等内に間質性肺炎を2人以上発症した家族性間質性肺炎80例および孤発性間質性肺炎症例100例を東京医科歯科大学にて臨床情報とDNAサンプルを収集した。DNAの抽出については、まずPAX gene Blood DNA tube (PreAnalytiX)を用いて血液10ml採取した。このPAX gene Blood DNA tubeを用いれば、採取された血液中の白血球は常温で2週間安定している。PAX gene Blood DNA kit (Qiagen)を用いて保存された白血球よりDNA (5 µg)を抽出した。

図2 実験計画



(2) DNAサンプルを用いた全エクソン解析

実際の解析対象としては、特に遺伝関連が強いと予想される家族性間質性肺炎症例16サンプルを用いることとした。DNAをタカラバイオに送付し、DNAを物理的に断片化し、SureSelect Target Enrichment システム (Agilent Technology) を用いてエクソン領域を濃縮し、ライブラリーを作成した。次世代シーケンサー (HiSeq) を用いて全エクソン解析を実施。

(3) 全エクソン解析で得られたデータの統計学的解析

シーケンスの結果から、間質性肺炎の疾患関連遺伝子の検索を行う。本学疾患バイオリソースセンター田中敏博教授とともに解析を実施した。fastqデータをシーケンスデータに加工し、得られた変異データについて機能予測ツールである SIFT, PolyPhen-2 などを用いて病的意義を予測、候補遺伝子を絞り込んだ。

(4) 候補遺伝子の遺伝子発現抑制試験

A549細胞株を用い、CELSR3、陰性コントロール、陽性コントロールに対する siRNA 実験を実施。A549細胞株を96-well plateに1X10⁵個まき、24時間培養後、siRNAを適切な濃度で48時間添加。標的遺伝子に対する遺伝子発現抑制レベルをqPCRで測定し、ノックダウン効率を検証した。

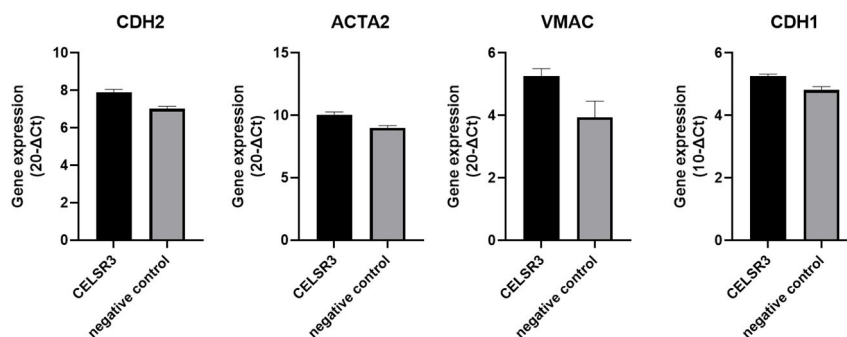
4. 研究成果

特に多くの間質性肺炎を発症している家系16症例よりPAX gene Blood DNA kit (Qiagen)を用いてDNAを抽出した。SureSelect Target Enrichment システムを用いてエクソン領域を濃縮しライブラリーを作成し、次世代シーケンサーHiSeqを用いてシーケンスした。fastqデータをシーケンスデータに加工し、得られた変異データについて機能予測ツールである SIFT, PolyPhen-2 などを用いて病的意義を予測、候補遺伝子を絞り込んだ。

複数のDNAが収集された3家系で解析し、また全16サンプルでも解析した結果、病的意義が予測された遺伝子領域として、CELSR3 (16人中4人), UNC13D (16人中5人) などの変異を認めた。これらは変異についてサンガーシーケンスでも確認した。

特に肺にも発現している CELSR3 の細胞間接着因子に注目し、A549細胞株を用いて siRNA による遺伝子発現ノックダウンを実施。CELSR3 に対し60%の遺伝子発現抑制が得られた。同様の細胞より間葉系細胞のマーカーである CDH2 (N-Cadherin), ACTA2 (α-SMA), VMAC (Vimentin) の遺伝子発現をqPCRで測定したところ発現増加を認めた (図3)。一方、上皮系細胞マーカーである CDH1 (E-cadherin) も上昇していた。今後これら発現の変化の意義について検証する予定である。

図3. CELSR3に対するsiRNA



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------