

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460953

研究課題名(和文)全エクソンシーケンスによる非特異性多発性小腸潰瘍症の原因遺伝子同定

研究課題名(英文)Causal gene for chronic nonspecific multiple ulcers of the small intestine

研究代表者

梅野 淳嗣 (Umeno, Junji)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：70621704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：エクソーム解析により非特異性多発性小腸潰瘍症はSLC02A1遺伝子のホモ変異ないしコンパウンドヘテロ変異に起因することを突き止め、“Chronic Enteropathy Associated with SLC02A1”(CEAS)という新規の名称を提唱した。同遺伝子は肥厚性皮膚骨膜炎の原因としても知られており、一部の非特異性多発性小腸潰瘍症患者において、肥厚性皮膚骨膜炎の臨床徴候を有することも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：By using exome sequencing loss-of-function mutations in the SLC02A1 gene encoding a prostaglandin transporter cause the hereditary enteropathy; chronic nonspecific multiple ulcers of the small intestine. We suggest a more appropriate nomenclature of “chronic enteropathy associated with SLC02A1 gene” (CEAS). CEAS and primary hypertrophic osteoarthropathy share a causative gene and that their clinical features are profoundly influenced by other modifiers.

研究分野：消化管

キーワード：小腸潰瘍症 プロスタグランジン

1. 研究開始当初の背景

非特異性多発性小腸潰瘍症 (chronic nonspecific multiple ulcers of the small intestine: CNSU) は、若年時に発症し小腸に潰瘍が多発する消化管疾患である。長期間に渡って小腸潰瘍から出血するため、高度の貧血および低蛋白血症をきたす。クローン病や潰瘍性大腸炎など他の炎症性腸疾患に用いられる薬剤(ステロイド、サリチル酸製剤、免疫抑制剤)は無効であり、潰瘍に伴う腸管狭窄に対し外科的切除がしばしば必要となる難治性疾患である。本症はまれと考えられてきたが、カプセル内視鏡やバルーン内視鏡の普及により小腸潰瘍の内視鏡診断が比較的容易となった現在、その存在が注目されている。

これまでにわれわれは、内視鏡所見やX線所見などの臨床像を詳細に検討することで、世界に先駆けて疾患の診断基準について示している¹⁾。また2011年には、自験13例中6例に血族結婚を認め、同胞発症例も存在することから、CNSUは常染色体劣性遺伝を示すメンデル遺伝性疾患である可能性を報告している²⁾。また本疾患の小腸病変は、近年増加傾向にある非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)起因性の小腸病変と類似した潰瘍の形態を呈する³⁾ことから、アラキドン酸カスケードに参与する酵素を規定する遺伝子に変異をきたしている可能性が疑われる。

近年、次世代シーケンサーを用いたヒトゲノムの網羅的解析によって、メンデル遺伝性疾患の責任遺伝子を同定することが可能となった。なかでも、全ゲノム配列の約2%強でありながら、メンデル遺伝性疾患の原因の約85%が存在していると考えられるタンパク質コード領域のみにターゲットを絞った、いわゆるエクソーム解析が検出力やコストの面で注目されている⁴⁾。

2. 研究の目的

本症患者および家系内非発症者のゲノム検体を用いたエクソーム解析を行うことで本症の責任遺伝子を同定することを目的とした。また責任遺伝子の機能を調べることで小腸における潰瘍形成の機序を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 非特異性多発性小腸潰瘍症患者および同一家系内非発症者の同意取得および採血検体収集
- (2) 全エクソームシーケンセスによる候補遺伝子の絞り込み
 - ① タンパク質コード領域の抽出・濃縮 (Illumina® TruSeq Exome Enrichment Kit)
 - ② 次世代シーケンサーを用いた大量シーケンセス (Illumina® HiSeq2000)
 - ③ リファレンス配列へのマッピング (BWA)
 - ④ 塩基多型のコール (GATK)
 - ⑤ dbSNP135などの公開データベースを用いたフィルタリング (非同義変異もしくはスプライス部位変異)

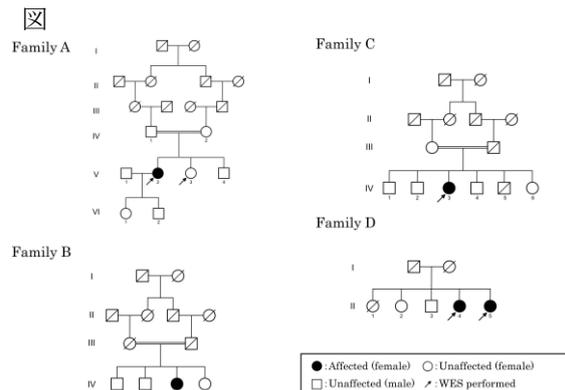
⑥ 家系情報を用い候補遺伝子を絞り込む

⑦ サンガー法による確認

- (3) 日本人コントロールでの確認
コントロール症例において同定した変異の頻度がまれであることをサンガー法で確認する。
- (4) 別症例における検証、原因遺伝子の同定
サンガー法で候補遺伝子のエクソン領域のダイレクトシーケンセスを行い、再現性を検証する。
- (5) クローン病と診断された患者において遺伝学的に非特異性多発性小腸潰瘍症と診断すべき症例が存在しているか調査する。
過去にクローン病と診断された患者由来のDNA検体を用いて同定した遺伝子変異を常染色体劣性遺伝形式で有する症例がないかタイピングを行う。

4. 研究成果

当科もしくは共同研究施設に通院中の患者および家族のうち、同胞発症2家系を含む15家系25例から書面による同意が得られ、血液の採取を行った(非特異性多発性小腸潰瘍症発症者17例、非発症者8例)。DNAを抽出し、4家系6検体(発症者5例、非発症者1例)について全エクソームシーケンセスを行った(下図)。



4家系6検体の全エクソームシーケンセスの結果は、平均105.8×106リード(QC後)、全ターゲット領域における平均被覆度68.9、全ターゲット領域中の被覆度10以上の領域が占める平均の割合92.5%であった。表1にGATKを用いてコールした変異数及び非同義変異/スプライス部位の変異数を示す。表2にdbSNP135に登録されていない非同義変異もしくはスプライス部位の変異を有する遺伝子数を示す。

まず、常染色体劣性遺伝形式をとることから血族結婚を有する3家系3症例(A-V-2、B-IV-3、C-IV-3)に注目した。dbSNP135に未登録の非同義的もしくはスプライス部位の変異が3症例に共通してホモ接合型にみられる遺伝子は9個のみであった。さらにA-V-3は非発症者であることを考慮すると候補遺伝子はSLCO2A1のみに絞り込まれた。家系Dの同胞発症2症例は、ともに同遺伝子内にコンパウンドヘテロ変異を有していた。同定された4ヶ所の変異はいずれもタンパクの機能に変化をきたすと

推測される変異であった(表 3)。

表 1. 全エクソームシーケンスの結果

Subjects	A-V-2	B-IV-3	C-IV-3	D-II-4	D-II-5	A-V-3 (unaffected)
Mapping						
Total number of sequenced reads passing QC (x10 ⁹)	103.5	111.0	93.1	117.6	97.9	111.6
Total number of mapped reads (x10 ⁹)	103.1	110.4	92.4	117.2	97.5	110.8
Mean target coverage	66.7	71.2	55.8	82.8	65.1	71.8
% targets with 10x coverage	91.7%	93.5%	92.7%	92.7%	91.7%	92.9%
Number of identified variants						
SNV/indel	107,406	112,602	105,357	110,880	107,840	104,545
NS/SS	9,436	9,477	9,095	9,544	9,285	8,937

QC, quality control; SNV, single nucleotide variant; indel, insertion/deletion; NS, non-synonymous mutation; SS, splice-site mutation.

表 2. 変異を有する遺伝子数

	A-V-2		B-IV-3		C-IV-3		D-II-4		D-II-5		A-V-3 (Unaffected)	
	homo	hetero	homo	hetero	homo	hetero	homo	hetero	homo	hetero	homo	hetero
NS/SS	2,731	3,227	2,797	3,253	2,775	3,023	2,727	3,367	2,659	3,343	2,754	2,921
Not in dbSNP135	27	286	25	265	29	257	18	294	16	265	22	159

NS, non-synonymous mutation; SS, splice-site mutation

表 3. 全エクソームシーケンスで同定した変異

No	Exon	Variants		Methods
1	5	c.664G>A	Gly222Arg	Sanger sequencing
2	7	c.940+1G>A	Splice site	RFLP(<i>Hpy</i> CH4IV)
3	10	c.1461+1G>C	Splice site	RFLP(<i>Bsr</i> I)
4	13	c.1807C>T	Arg603X	Sanger sequencing

全エクソームシーケンスを行った 5 症例について *SLCO2A1* 遺伝子内に上記変異があることをダイレクトシーケンス法で確認した。次に日本人コントロール 747 検体を用いて 4 ヶ所についてダイレクトシーケンスもしくは制限酵素断片長多型を用いてタイピングを行ったところ、3 例においてイントロン 7 に存在する c.940+1G>A 変異をヘテロ接合型で有していた。

他非特異性多発性小腸潰瘍症 12 例において *SLCO2A1* 遺伝子の全エクソン領域における変異を検索したところ、12 例中 11 例にタンパクの機能変化をきたしうる変異をホモ接合型またはコンパウンドヘテロ接合型変異として有していた。以上の結果より、非特異性多発性小腸潰瘍症の原因は *SLCO2A1* 遺伝子の変異によるものと断定した。

次にクローン病患者と過去に診断された 603 例の検体を用いて *SLCO2A1* 遺伝子内の変異を検索したところ、2 例においてタンパクの機能変化をきたしうる変異をコンパウンドヘテロ接合型変異として有していた。上記 2 症例は、非特異性多発性小腸潰瘍症と考えられた。

以上の通り、計 18 例の非特異性多発性小腸潰瘍症患者において原因と考えられる *SLCO2A1* 遺伝子内の 7 ヶ所の変異部位を同定した。

SLCO2A1 遺伝子は、プロスタグランジン輸送体をコードする遺伝子であり、肥厚性皮膚骨膜炎の原因遺伝子として知られている。肥厚性皮膚骨膜炎は、ばち指、長管骨などの骨膜炎性骨肥厚、皮膚肥厚性変化を 3 主徴とする常染色体劣性の遺伝性疾患であり、臨床徴候は血中などの

プロスタグランジン濃度上昇による二次的な変化と考えられている。18 例の非特異性多発性小腸潰瘍症患者における消化管外の臨床徴候を調査したところ、ばち指や骨膜炎は 7 例にみられた。うち 3 例は肥厚性皮膚骨膜炎の 3 主徴を全て有していた。

参考文献

- Matsumoto T, Iida M, Matsui T, Yao T Chronic nonspecific multiple ulcers of the small intestine: a proposal of the entity from Japanese gastroenterologists to Western enteroscopists. *Gastrointest Endosc* 66: S99-107, 2007.
- Matsumoto T, Kubokura N, Matsui T, Iida M, Yao T Chronic nonspecific multiple ulcer of the small intestine segregates in offspring from consanguinity. *J Crohns Colitis* 5: 559-565, 2011.
- Matsumoto T, Nakamura S, Esaki M, Yada S, Koga H, et al. Endoscopic features of chronic nonspecific multiple ulcers of the small intestine: comparison with nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced enteropathy. *Dig Dis Sci* 51: 1357-1363, 2006.
- Majewski J, Schwartzentruber J, Lalonde E, et al. What can exome sequencing do for you? *J Med Genet*. 48:580-589, 2011

5. 主な発表論文等 [雑誌論文](計 1 件)

- Umeno J, Hisamatsu T, Esaki M, Hirano A, Kubokura N, Asano K, Kochi S, Yanai S, Fuyuno Y, Shimamura K, Hosoe N, Ogata H, Watanabe T, Aoyagi K, Ooi H, Watanabe K, Yasukawa S, Hirai F, Matsui T, Iida M, Yao T, Hibi T, Kosaki K, Kanai T, Kitazono T, Matsumoto T. A Hereditary Enteropathy Caused by Mutations in the *SLCO2A1* Gene, Encoding a Prostaglandin Transporter. *PLoS Genetics*. 11: e1005581, 2015.

[学会発表](計 4 件)

- 梅野淳嗣, 江崎幹宏, 松本主之. 非特異性多発性小腸潰瘍症の原因遺伝子の同定および新規名称の提案. 第 102 回消化器病学会総会(東京) 2016 年 4 月
- Umeno J, Hisamatsu T, Esaki M, Hirano A, Kochi S, Watanabe K, Aoyagi K, Hirai F, Matsui T, Yao T, Hibi T, Kanai T, Matsumoto T, Kitazono T. Chronic enteropathy associated with *SLCO2A1* gene, encoding

prostaglandin transporter (CEAS).
Advances in Inflammatory Bowel
Diseases: Crohn's & Colitis Foundation
of America's Clinical & Research
Conference (Florida, USA) 2015 年 12
月

3. 梅野淳嗣、江崎幹宏、松本主之. 非特異性多発性小腸潰瘍症の原因遺伝子の同定. 第 101 回消化器病学会総会 (仙台) 2015 年 4 月
4. 梅野淳嗣、江崎幹宏、松本主之. エクソームシーケンスを用いた非特異性多発性小腸潰瘍症の原因遺伝子の同定. 第 56 回日本消化器病学会大会 (神戸) 2014 年 10 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願なし

ホームページ等

<http://www.gut.med.kyushu-u.ac.jp/>

<http://www.nanbyou.or.jp/entry/4708>

6. 研究組織

(1)研究代表者

梅野 淳嗣 (UMENO, Junji)

九州大学大学院病態機能内科学・助教

研究者番号:70621704

(2)研究分担者

森山 智彦 (MORIYAMA Tomohiko)

九州大学大学院病態機能内科学・助教

研究者番号:20452758

江崎 幹宏 (ESAKI Motohiro)

九州大学大学院病態機能内科学・講師

研究者番号:50335957