

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461030

研究課題名(和文) アルコール性膵炎患者の網羅的エクソーム解析による遺伝的要因の解明

研究課題名(英文) Search for new candidate genes of alcoholic pancreatitis by whole exome sequencing

研究代表者

条 潔 (Kume, Kiyoshi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30431563

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)：アルコール性膵炎の遺伝的背景因子は十分に解明されていない。本研究では次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析により、これまで不明であったアルコール性膵炎発症のメカニズムを解き明かすことを目的とする。アルコール性膵炎症例16例を対象に、次世代シーケンサーのHiSeq2500を用いて行い、エクソン領域の遺伝子異常を網羅的に検出した。16検体から1,340,000個の遺伝子異常を同定し、日本人健康者と比較し、オッズ比が高かった遺伝子異常93個について、症例数を増やして追加検討した。その結果、RNFI13Bのミスセンス変異がアルコール性膵炎患者において有意に高頻度であることが確認された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to identify a new candidate gene responsible for alcoholic pancreatitis. Genomic DNA was prepared from a total of 560 patients with pancreatitis and 439 control subjects. The SureSelect Human All Exon kit was used for the analysis of all exons in 16 patients with alcoholic pancreatitis. There were about 1,340,000 variants in total of the 16 samples. We compared frequency of the residual variants from that of control samples by Human Genetic Variation Browser. Statistically significant difference was observed in the frequency of p. S89R variant in ring finger protein 113B between patients with alcoholic pancreatitis (14.3%; 31/217) and control subjects (6.6%; 29/410) (OR 2.4 p=0.002). The frequency of this variant in patients with non-alcoholic pancreatitis (8.2%; 28/343) was not statistically different from that in controls. Next generation sequencing might become the new strategy to identify the candidate genes for alcoholic pancreatitis.

研究分野：膵炎

キーワード：膵炎 遺伝子異常

1. 研究開始当初の背景

アルコールの過剰な摂取は公衆衛生に深刻な影響をもたらし、世界的にみても健康障害の最大のリスク要因の一つである。若年死と身体障害を引き起こすリスクとしては第3位にあり、2004年には世界でおよそ250万人がアルコール関連の原因で死亡し、世界の全死亡者の3.8%、疾病の4.5%が有害なアルコールの使用によるものと考えられている。有害な飲酒は、精神神経疾患や心血管疾患、肝硬変や膵炎などの重大な危険因子である。慢性膵炎に関する本邦の全国調査の結果、2007年の1年間の慢性膵炎の推定受療患者数は47,100人であり、新規発症の慢性膵炎患者数は15,200人であった。成因別ではアルコール性64.8%、特発性18.2%であり、アルコール性の占める割合は非常に高く、特に、男性患者ではアルコール性が73.1%と多かった。女性患者ではアルコール性が27.4%であったが、過去の全国調査と比較すると、1978年から1984年の調査で女性患者におけるアルコール性の割合が8.2%、1999年で13.8%であったのに比べ増加傾向にあるといえる。一方、大酒家のうちでも慢性膵炎となるのは5%程度と少なく、遺伝的背景因子などの存在が考えられている。

近年登場した次世代シーケンサーは、従来のキャピラリーシーケンスとは異なる技術で読み取った短いDNA断片の塩基配列を、ヒトゲノム解読で得られた既存の地図に貼り付けていくという手法により、短期間のうちにゲノム全体を読み取ることを可能にした。なかでも蛋白質を符号化しているmRNAの翻訳領域(エクソーム)はゲノムの1.5%、総和は32Mb余りであり、遺伝病の85%以上を説明できるとされ、解析費用を大幅に縮小しながらも網羅的解析が可能である。我々も家族歴のある膵炎患者3家系7症例の遺伝子検体を用い、エクソーム解析し、膵炎と関連するカルボキシペプチダーゼA1(CPA1)の遺伝子変異p.V251Mを1家系に同定した。本遺伝子異常は新規の膵炎関連遺伝子であり、共同研究の結果、p.V251Mでは分泌が著明に低下しており、変異による折り畳みの異常の結果、小胞体ストレスを誘導し膵炎リスクを上昇させると考えられた。今日までに、稀な膵炎である遺伝性膵炎の家系においてカチオニックトリプシノーゲン(PRSS1)の点突然変異が報告され、膵分泌性トリプシンインヒビター(SPINK1)やCystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)の遺伝子変異が、原因不明の特発性膵炎と関連することが報告されている。またキモトリプシンC(CTRC)の遺伝子異常やトリプシノーゲン遺伝子座のコピー数変異が一部の遺伝性膵炎や特発性膵炎と関連すると報告されている。しかし、これらの遺伝子異常は遺伝性膵炎や特発性膵炎の背景因子であり、最も主要な成因であるアルコール性膵炎の遺伝的背景因子はこれまで明らかにされていない。

2012年に報告されたゲノムワイド関連解析(GWAS)の結果、クローディン2(CLDN2)とPRSS1-PRSS2座位の遺伝子多型とアルコール性膵炎との関連が明らかとなった[2]。クローディン2はタイトジャンクションを形成する膜タンパク質であり、CLDN2のリスクアレルはクローディン2の膵腺房細胞における局在の異常に関連していた。CLDN2のリスクアレルであるrs12688220[T]のアレル頻度は対照群で0.261であるのに対し、非アルコール性膵炎患者で0.322、アルコール性膵炎患者で0.427であり、飲酒が重なることでリスクを上昇させると考えられた。しかしこれらのオッズ比は小さく、アルコール性膵炎の発症機構全体を理解するには至っていない。

2. 研究の目的

本研究では超高速の次世代シーケンサーを用いて、蛋白質を符号化しているmRNAの翻訳領域を網羅的に解析し、アルコール性膵炎発症と関連する低頻度アレルを同定することで、これまで不明であったアルコール性膵炎発症のメカニズムを解き明かすことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) PRSS1 遺伝子、SPINK1 遺伝子、CTRC 遺伝子、CPA1 遺伝子などの変異のないアルコール性膵炎患者16例を対象とし、次世代の超高速シーケンサーによりエクソーム解析を行った。具体的にはゲノムDNAを末梢白血球より抽出し、Sure-Select Human All Exon Kit V4(Agilent社)を用いて、エクソーム領域のDNA断片のみを抽出・濃縮した。ゲノムDNAを200~300bp程度に断片化し、両端に2種類のアダプターを結合させた。アダプター配列を利用して、フローセル上に結合・増幅させ、クワスターを合成。可逆的ターミネーターを使ったSequencing-by-Synthesis法により、1塩基伸長と蛍光の読み取りステップを繰り返すことにより、フローセル上で並列的な大量のシーケンスを行った。シーケンスにはillumina社のHiSeq2500を用い、リード長101bpのpaired-end readsにより解読した。得られたシーケンスデータについてUCSC hg19を標準ゲノム配列としnovoalignによりマッピングした。マッピング結果からgatkによりバリエーションコールを行い、信頼性を評価した上でフィルタリングすることで、変異を検出した。本邦の健常者における遺伝子異常のデータはHuman Genetic Variation Database (HGVD)を利用した。

(2) 膵炎との関連が疑われた候補の遺伝子異常について、ABI3100 Genetic Analyzerを用いたサンガー法によるダイレクトシーケンスを行い、遺伝子異常を確認した。他の16例のアルコール性膵炎患者と対象に遺伝子解析を追加し、候補遺伝子を絞り込んだ。絞り込まれた4つの遺伝子については、さらに多数例の膵炎患者を対象に解析し、膵炎との関連性を評価した。対象とした患者は膵炎患者560例(慢性膵炎307例、急性膵炎253例)、

健常者 439 例であった。多数例の解析はダイレクトシーケンシングもしくは PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism(RFLP)により行った。対象患者の成因の内訳は慢性膵炎ではアルコール性 120 例、特発性 77 例、遺伝性・家族性 36 例、自己免疫性 77 例であり、急性膵炎ではアルコール性 97 例、特発性 115 例、胆石性 41 例であった。

4. 研究成果

(1)各検体の総リード数は 6100 万リード以上、を読み取った。ターゲット領域の平均 depth は 70 以上、コーディング領域の約 70%は depth50 以上で読み取れており、良好な結果であった。解析を行った 16 例全例では計 134 万個の遺伝子異常を同定し、うちエクソン領域に認められた遺伝子異常は 68000 個であった。HGVD を用いて健常者における頻度と比較してオッズ比が 5 以上でかつマイナーアレル頻度が 9%以上であった 74 遺伝子(表 1)と、オッズ比が 3 以上でかつマイナーアレル頻度が 9%以上であった 19 候補遺伝子(表 2)を抽出した。

表1 エクソーム解析による候補遺伝子

遺伝子	dbSNP	MAF	オッズ比	P値
OR10G4	rs547068	12/32	10.114	<0.001
BOD1L2	rs147672790	6/32	6.5266	<0.001
RNF113B	rs114712839	5/32	7.1118	0.0015
MYO7B	rs148715226	5/32	8.424	<0.001
EDN3	rs11570255	5/32	6.5268	0.0021
GPR125	rs147390035	5/32	8.5828	<0.001
SLC25A2	rs10075302	5/32	5.9508	0.003
RHCE	rs1053345	4/32	7.3117	0.0037
FAM170B	rs76513413	4/32	11.439	<0.001
OR1S2	rs78572631	4/32	6.3445	0.006
AHNAK2	rs150385420	4/32	5.8031	0.0084
DSG2	rs146402368	4/32	7.8432	0.003
ZNF236	rs3794873	4/32	8.1209	0.0027
DMRTC2	rs202150918	4/32	17.857	<0.001
RIF1	rs61748231	4/32	7.2403	0.0039
HIRA	NA	4/32	7.7143	0.0036
SELO	rs202018920	4/32	5.5922	0.009
MARCKS	NA	4/32	6.3439	0.0067
WDR27	rs117912086	4/32	6.8723	0.0046
ARSE	rs138149353	4/32	7.3673	0.0037
MXRA5	rs201873687	4/32	13.011	<0.001
NUP62CL	rs202006097	4/32	8.9524	0.0019
THOC2	rs145905162	4/32	19.151	<0.001
ARHGAP36	NA	4/32	20.449	<0.001
F8	rs28933673	4/32	9.1796	0.0018
PLCH2	NA	3/32	6.9978	0.0129
CAMTA1	rs142045456	3/32	20.191	<0.001
MACF1	rs202052424	3/32	25.448	<0.001
LEPRE1	NA	3/32	5.7739	0.0216
MROH7	rs118026373	3/32	6.1579	0.0176
ST6GALNAC3	rs115654316	3/32	6.5054	0.0154
COL11A1	NA	3/32	23.542	<0.001
GPATCH4	rs181615124	3/32	10.16	0.005
IL15RA	rs77226427	3/32	5.6638	0.0216
HPS1	rs58548334	3/32	9.3476	0.0062
RBM20	rs188054898	3/32	7.3384	0.0114
WDR11	rs200126172	3/32	13.034	0.0027
OR52A5	rs145258281	3/32	7.1097	0.0123
YIF1A	rs139558494	3/32	7.824	0.0105
ARHGEF17	rs76880358	3/32	12.321	0.0031
KRT5	rs11549949	3/32	5.6224	0.022
MYO1A	rs4759043	3/32	10.754	0.0044

表1 続き エクソーム解析による候補遺伝子

VSIG10	rs145604064	3/32	5.73	0.0209
GCN1L1	rs201585823	3/32	5.5567	0.0226
ISLR	rs144807493	3/32	6.2414	0.0171
C16orf90	rs199609822	3/32	11.617	0.0036
ZNF768	rs143274508	3/32	9.3476	0.0062
PLCD3	NA	3/32	5.5468	0.0227
SCPEP1	rs140119129	3/32	7.6516	0.0103
EPB41L3	rs79592897	3/32	6.6946	0.0143
DNMT1	rs62621087	3/32	8.7056	0.0075
EML2	rs188243744	3/32	5.7569	0.0208
ZNF175	rs200245853	3/32	6.4483	0.0157
ZNF611	rs186341996	3/32	50.103	<0.001
LILRA1	rs151320443	3/32	7.5877	0.011
PPP6R1	rs185704163	3/32	28.216	<0.001
GEN1	rs149936944	3/32	23.069	<0.001
OSBPL6	rs117627894	3/32	5.9891	0.0189
DNAH7	rs192120666	3/32	7.7655	0.0099
COL6A3	rs2270668	3/32	6.2874	0.0168
HSPA13	rs199961353	3/32	10.151	0.005
KRTAP19-1	NA	3/32	11.493	0.0037
DOPEY2	rs141956049	3/32	7.1609	0.0124
NR1D2	rs78292562	3/32	6.5477	0.0152
DOK7	rs77513082	3/32	6.1839	0.0175
SCLT1	rs201991504	3/32	22.697	<0.001
SPEF2	rs202179572	3/32	5.6328	0.0219
PNPLA1	rs182227800	3/32	6.8398	0.0136
C6orf222	NA	3/32	7.9349	0.0095
HEY2	rs3734638	3/32	5.9655	0.019
ACTR3C	rs189540596	3/32	5.508	0.0232
DERL1	rs2272722	3/32	5.8112	0.0203
MAPK15	rs146609910	3/32	6.477	0.0155
EPPK1	rs117516827	3/32	6.9067	0.0132

表2 エクソーム解析による候補遺伝子

遺伝子	dbSNP	MAF	オッズ比	P値
SPATA31C2	rs201943385	10/32	4.8814	<0.001
SNAPC4	rs3812561	10/32	4.5564	<0.001
CDH23	rs74145660	9/32	3.8692	0.0021
MMP12	rs652438	7/32	5.5542	<0.001
XYLT1	rs79030430	7/32	4.2477	0.0033
FAM101B	rs76404864	7/32	3.5671	0.0079
TBC1D8	rs3739011	7/32	3.9418	0.0048
TGM4	rs142655195	7/32	4.9244	0.0015
FAM194A	rs78132193	7/32	4.2039	0.0035
REPIN1	rs10237887	7/32	5.2989	0.0011
ADAMTS14	rs61749230	6/32	5.3029	0.0022
TRIM5	rs11601507	6/32	4.641	0.004
FAM181B	rs147683846	6/32	4.9904	0.0029
KITLG	rs3741457	6/32	5.7433	0.0015
ANKS1B	rs79164944	6/32	3.5525	0.0128
FYB	rs35384751	6/32	3.884	0.0087
PPARGC1B	rs17572019	6/32	3.5064	0.0135
GEM	rs17847126	6/32	3.9123	0.0085
SPATA31E1	rs77208054	6/32	3.7556	0.0101

(2)候補として同定した計 93 の遺伝子について別のアルコール性膵炎患者 16 例を対象に遺伝子解析を行った。その結果 AHNAK2: rs150385420, CDH23: rs74145660, KITLG: rs3741457, RNF113B: rs114712839 の 4 つの遺伝子異常に絞り込まれた。この 4 つの遺伝子については、さらに多数例の膵炎患者を対象に解析し、膵炎との関連性を評価した。そ

の結果を表3に示す。

表3 4候補遺伝子の解析結果

遺伝子	dbSNP	アルコール性膵炎	健常者	P値
AHNAK2	rs150385420	10/165 (6.1%)	4/95 (4.2%)	0.58
CDH23	rs74145660	21/82 (25.6%)	25/89 (28.1%)	0.73
KITLG	rs3741457	18/173 (10.4%)	9/112 (8.0%)	0.54
RNF113B	rs114712839	31/217 (14.3%)	29/439 (6.6%)	0.002

4候補遺伝子のうち3つの候補遺伝子において有意差はなく、RNF113B遺伝子のrs114712839がアルコール性膵炎患者において有意に高頻度であった。本遺伝子異常について、アルコール性膵炎以外の成因の膵炎患者を対象に遺伝子異常の有無を調査した(表4)。

表4 RNF113Bのp.S89Rの成因別頻度

成因	症例数	p.S89R (nm)	頻度	P値
慢性膵炎				
アルコール性	120	20(0)	16.7%	0.002
特発性	77	6(0)	7.8%	0.63
遺伝性/家族性	36	1(0)	2.8%	0.72
自己免疫性	74	4(0)	5.4%	>0.99
全慢性膵炎	307	31(0)	10.1%	0.1
急性膵炎				
アルコール性	97	11(0)	11.3%	0.13
特発性	115	9(1)	7.8%	0.68
胆石性	41	8(0)	19.5%	0.009
全急性膵炎	253	28(1)	11.1%	0.04
全膵炎	560	59(1)	10.5%	0.03
健常者	439	29(1)	6.6%	-
健常者(HGVDのデータ)	1129	57(1)	5.0%	-

RNF113B 遺伝子の rs114712839 すなわち p.S89R はアルコール性慢性膵炎 120 例中 20 例 16.7% に認められ、健常者 439 例中 29 例 6.6% に比べ有意に高頻度であった (P 値 0.002)。アルコール性急性膵炎患者 97 例中 11 例 11.3% にも認められ、急性と慢性を合わせた全アルコール性膵炎患者 217 例中 31 例 14.3% に同定され、これも健常者と比べ有意に高頻度であった (P 値 0.002)。他の成因については胆石性急性膵炎で高頻度であったが、それ以外では有意差を認めなかった。RNF113B 蛋白の詳細な機能については現在のところ十分には解明されておらず、アミノ酸置換を伴うこの p.S89R 遺伝子異常による機能障害についても今後の検討が必要である。

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 7 件)

Zou WB, Boulling A, Masamune A, Issarapu P, Masson E, Wu H, Sun XT, Hu LH, Zhou DZ, He L, Fichou Y, Nakano E, Hamada S, Kakuta Y, Kume K, Isayama H, Paliwal S, Mani KR, Bhaskar S, Cooper DN, Férec C, Shimosegawa T, Chandak GR, Chen JM, Li ZS, Liao Z. No Association Between CEL-HYB Hybrid Allele and Chronic Pancreatitis in Asian Populations. *Gastroenterology*. 査読有, 150, 2016, 1558-1560, DOI:10.1053/j.gastro.2016.02.071.

Nakano E, Geisz A, Masamune A, Niihori T, Hamada S, Kume K, Kakuta Y, Aoki Y, Matsubara Y, Ebert K, Ludwig M, Braun M, Groneberg DA, Shimosegawa T, Sahin-Tóth M, Witt H. Variants in pancreatic

carboxypeptidase genes CPA2 and CPB1 are not associated with chronic pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 査読有, 309, 2015, 688-694, DOI:10.1152/ajpgi.00241.

Masamune A, Nakano E, Hamada S, Kakuta Y, Kume K, Shimosegawa T. Common variants at PRSS1-PRSS2 and CLDN2-MORC4 loci associate with chronic pancreatitis in Japan. *Gut*. 査読有, 64, 2015, 1345-1346, DOI:10.1136/gutjnl-2015-309802.

Nakano E, Masamune A, Niihori T, Kume K, Hamada S, Aoki Y, Matsubara Y, Shimosegawa T. Targeted next-generation sequencing effectively analyzed the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in pancreatitis. *Dig Dis Sci*. 査読有, 60, 2015, 1297-1307, DOI:10.1007/s10620-014-3476-9.

Nakano E, Masamune A, Kume K, Kakuta Y, Shimosegawa T. Variants in the interferon regulatory factor-2 gene are not associated with pancreatitis in Japan. *Pancreas*. 査読有, 43, 2014, 1125-1126, DOI:10.1097/MPA.0000000000000207.

桑 潔、正宗 淳、下瀬川徹、遺伝性膵炎から学ぶ慢性膵炎早期像、医学のあゆみ、査読無、256、2016、129-134、DOI:無

桑 潔、正宗 淳、下瀬川徹、若年性膵炎と遺伝性膵炎、肝胆膵、査読無、69、2014、541-546、DOI:無

〔学会発表〕(計 1 件)

Kume K, Masamune A, Nakano E, Niihori T, Aoki Y, Funayama R, Nakayama K, Shimosegawa T. Next generation sequencing might become the new strategy to identify the candidate genes for alcoholic pancreatitis. International Association of Pancreatology, 2016年8月4-6日、国際会議場(仙台)

〔図書〕(計 1 件)

桑 潔、正宗 淳、下瀬川徹、診断と治療社、「こどもの病気 遺伝について聞かれたら」、2015、101-102 ページ

6. 研究組織

(1)研究代表者

桑 潔 (KUME, KIYOSHI)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号: 30431563