

学位論文

High-throughput sequencingによる食道アカラシア
感受性遺伝子の同定に関する研究

旭川医科大学大学院医学系研究科博士課程医学専攻

堂腰 達矢

論著の種類 学位論文

表題

High-throughput sequencing による食道アカラシア感受性遺伝子の同定に関する研究

短縮題名

食道アカラシアにおける rs4898 変異

著者 堂腰 達矢

所属

旭川医科大学 消化器・血液腫瘍制御内科学分野
主任教授 高後 裕

原稿総ページ数 16

図および表の総数 6

連絡者

堂腰 達矢

旭川医科大学 消化器・血液腫瘍制御内科学分野
郵便番号 078-8510 北海道 旭川市 緑が丘東 2 条 1 丁目

電話番号 : 0166-68-2462

FAX 番号 : 0166-68-2469

E-mail: ta1983@asahikawa-med.ac.jp

学位論文

High-throughput sequencing による食道アカラシア感受性遺伝子の同定に関する
研究

旭川医科大学 消化器・血液腫瘍制御内科学分野

堂腰 達矢

主任教授 高後 裕

緒言

食道アカラシアは下部食道括約筋(LES)の収縮および弛緩不全を特徴とする食道蠕動運動障害をきたす疾患で、発病率は10万人に1人、罹患率は10万人に10人と非常に稀である。臨床的には、もたれ、嘔気、胸痛、咳、誤嚥、体重減少などの症状を呈する。食道バリウム造影にて下部食道のなだらかな狭窄と口側食道の拡張、食道蠕動波の消失をみとめること、上部消化管内視鏡にて腫瘍性の変化を認めないこと、食道内圧測定にて食道蠕動波の消失を確認することの3つのうち2つ以上を満たすことで診断される [1, 2]。

食道アカラシアの病因は不明であるが、患者の食道壁縦走筋と輪状筋の間の神経叢が減少、喪失していることから、この神経叢の機能異常が食道アカラシアの病因に深く関与していることが考えられる [3-5]。このような神経叢の機能不全が起こる原因としては、ウイルス感染、免疫異常、代謝異常などによる炎症や酸化ストレスによっておきる神経叢の損傷などが挙げられているが、その原因となるウイルス、自己抗体、代謝関連分子などは同定されていない [1, 2]。

これまで食道アカラシアに感受性のある遺伝子異常として、tyrosine phosphatase N22 [6], vasoactive intestinal peptide receptor 1 [7], L23 receptor [8], promoter region of IL10 [9], c-kit [10], lymphotoxin- α (LTA)/tumor necrosis factor- α (TNF α) locus [11], IL33 [12], HLA-DQ [13] の変異が報告されてきた [6-13]。しかし、これらの検討は、あらかじめ一つあるいは少数の神経伝達物質や炎症関連分子の遺伝子に異常があることを想定し、その遺伝子変異のみを対象として検索していること、また、各遺伝子のエクソン領域の中でもごく一部のDNA配列のみを解析しているためエクソン全体の配列異常については検討されていないことなどの限界がある。したがって、新規の食道アカラシア感受性遺伝子異常を明らかにするには、アカラシアとオーバーラップすると考えられる疾患群、すなわち他臓器における炎症性疾患や自己免疫疾患、代謝異常に関連する遺伝子を含め、多くの遺伝子の全エクソンの解析が必要であると考えた。そこで今回我々は、炎症性疾患や炎症関連サイトカイン遺伝子、自己免疫疾患関連遺伝子、代謝異常関連遺伝子などの1000以上の遺伝子を対象としたオリジナルパネルを作成し、その全エクソン領域を網

羅的に解析することで、食道アカラシアに高い感受性を持つ遺伝子異常を同定することとした。

対象と方法

1, 対象

2012年12月から2014年2月までに、旭川医科大学, 旭川厚生病院, 札幌東徳洲会病院, 遠軽厚生病院, 旭川市立病院, 中標津町立病院に通院中の21名のアカラシア患者と20人の健常人ボランティアを対象とした。アカラシアの診断は、食道バリウム造影にて下部食道のなだらかな狭窄と口側食道の拡張, 食道蠕動波の消失をみとめること, 上部消化管内視鏡にて腫瘍性の変化を認めないこと, 食道内圧測定にて食道蠕動波の消失を確認することの3つのうち2つ以上を満たすことで行われた [1, 2]。すべての対象者に同意を得た上で、旭川医科大学の倫理委員会の承認のもと、血液サンプルを回収した。診断方法は臨床症状, 食道内圧測定, X線造影, 内視鏡所見によって行われ、臨床データは医療記録から収集した [14]。

2, amplicon sequencing のためのカスタムパネルデザイン

本研究では、既報の食道アカラシア感受性遺伝子の他に本疾患に感受性のある新規の遺伝子異常を同定することを目的としている。そこで、消化管, 肝臓, 胆膵, 血液領域における炎症性疾患や自己免疫疾患, 代謝異常, 酸化ストレスに注目し、アカラシア以外にも、炎症性腸疾患, 非アルコール性脂肪性肝炎, 自己免疫性膵炎, 鉄過剰症などの疾患で、Pub Med で検索し得たこれまで報告のある感受性遺伝子とその周辺にある代謝, 免疫, シグナル伝達に関連するたんぱく質をコードする遺伝子を網羅的に挙げた後、最終的に炎症, 免疫関連に関連する 883 遺伝子, 代謝異常, 酸化ストレスに関連する遺伝子 209 を選出、このうち重複するものを除いた 1031 の遺伝子を標的遺伝子として決定した。その概略を図 1 に示す。これらの遺伝子の全エクソン領域について Ion AmpliSeq™ Designer software program (<https://www.ampliseq.com/browse.action>) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)を用いて網羅的に解析するため、エクソン領域をさらに 12609 種類の amplicon に分割し、これを標的としたプライマーセット(5 プライマーブ

ール)を構築し、カスタムパネルとした。

3, DNA 抽出および精製

対象者の末梢血 8ml を EDTA 入り採血管で採取し, Ficol 比重遠心法により単核球を分離した. そこから DNA を DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen, Venlo, Netherlands) を用いて精製し, Qubit™ Fluorometer (Life Technologies)を用いて濃度測定を行った. さらにアガロースゲルによって電気泳動を行い, ゲノム DNA の断片化が起きていないことを確認した.

4, High through put sequencing

精製した 50ng の DNA サンプルをテンプレートとして amplicon を作るために, 12609 ペアのプライマーを 5つのプライマープールを用いて ultra-high multiplex polymerase chain reaction (PCR)を行った. これによって1サンプルあたり 12609 の amplicon を同時に作成した. 作成した amplicon は Agilent 2200 Tape station(Aglient Technologies)を用いて濃度および amplicon のサイズが 110bp 付近であり, 解析に適した質であることを確認した. Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (Life Technologies)を利用し, amplicon 末端に sequencing 用のリンカーおよび, サンプル識別用のバーコード配列を結合させ, Amplicon seqence 用の DNA 断片ライブラリを作成した. この DNA ライブラリを Ion OneTouch 200 Template Kit v3 (Life Technologies)を用いて, 1分子の DNA 断片を1粒子のビーズに結合させ, 粒子状で DNA 断片を増幅させる emulsion PCR を行い1粒子の nano particle を作成した.これを Ion OneTouch™ System を使用して精製して濃縮した. これを半導体シーケンシング Ion PI™ Chips (Life Technologies)にアプライし, Ion Proton™ Semiconductor sequencer (Life Technologies)でシーケンスした.

5, シーケンスデータ解析

シーケンスデータは Torrent Suite Software program (Life technologies) を使用して human reference genome sequence (GRCh37/hg19)と照合し, Torrent Variant Caller plug-in for the software program (Life technologies)を用いて遺伝子変異を検出した.このプログラムでは allele frequency を 10% 以上, coverage が 5以上で, quality score が 15以上の変異を遺伝子変異として検出した.各遺伝子変異を CLC Genomics Workbench software system

(CLC bio, Aarhus, Denmark)へ転送し、フィッシャー検定にて有意差検定を行った.P 値を 0.05 未満に設定して、有意な変異を検出した. strand bias は、ある領域をリードした際に、既知の配列のプラス方向からのリード数を C_p 、マイナス方向からのリード数を C_m とし、変異の配列のプラス方向からのリード数を V_p 、マイナス方向からのリード数を V_m とした場合に

$$\frac{\max(V_p C_m, V_m C_p)}{V_p C_m + V_m C_p}$$

で定義される数値とした.

6. Direct sequence 法

検出した遺伝子変異の近傍の遺伝子配列を参考にプライマーを Primer 3 plus web server を用いて作成した.各 DNA サンプルについて、Mastercycler nexus (Eppendorf, Hamberg, Germany)を用いて PCR を行った. DNA polymerase は KOD FX Neo (TOYOBO Life Science, Osaka, Japan)を用いた. 増幅プロトコルは 94°C で 1 分, その後 98°C で 10 秒 68°C で 1 分の 2 ステップサイクルを 25 サイクル, 最後に 68°C で 7 分伸張させ, 終了後 4°C で保存した.この PCR 産物を QIA quick PCR Purification Kit (Qiagen)で精製し, ABI Big Dye terminators で反応させ ABI 3500 genetic analyzer (Life Technologies)を使用して DNA 配列を解析した.

7. 統計解析

amplicon sequence 解析で検出された各サンプルの遺伝子変異の検定にはカイ二乗検定および Fisher 検定を用い, 患者群の遺伝子変異の頻度と疾患背景との検定には Mann-whitney U test を用いた.P 値 0.05 未満を有意な差とした.

結果

1. 対象者の年齢, 性別および治療歴

アカラシア患者 21 名と健常人ボランティア 20 名を対象に検討した.アカラシア患者の背景は, 男性 5 名と女性 16 名, 発症年齢中央値は 45 歳 (6~82 歳) と 58 歳 (24~89 歳) だった.すべての患者が食道造影にて食道胃接合部のなだらかな狭窄とその口側の著明な拡張を認め, 食道アカラジアの診断が確定していた.15 名に内視鏡的バルーン拡張が, 2 名に内視鏡的筋層切開術が, 1 人に

外科的切除が施行された.17 名が内視鏡または外科的治療が必要であったのに対し、内服治療のみで良好な経過にあったのは4名であった。

20 人の健常人ボランティアにおいては、男女比1対1で、年齢中央値は34歳(22~50歳)であった.血液サンプル採取時の年齢は健常人ボランティアの年齢が有意に低かったが、男女比は2群間に有意差を認めなかった(表1)。

2, High-throughput sequencing および direct sequencing による解析

まず、アカラシア患者群21名と健常ボランティア群20名のDNAサンプルを解析した.アカラシア患者と健常ボランティア群の比較で検出された4750種の多型を、フィッシャー検定にてP値0.05未満を有意なものとして検出し、46個の1塩基多型(Single Nucleotide Polymorphism : SNP)を同定した.これらのうちエクソン領域に含まれる多型は、以下の20であった. rs1801133 (chr1: 11856378), rs2070901 (chr1: 161185058), rs1635498 (chr1: 242045275), rs1881420 (chr2: 29416481), rs3795850 (chr2: 29445458), rs2229629 (chr2: 75116527), rs1063646 (chr6: 31107648), rs41541216 (chr6: 31323215), rs709054 (chr6: 31324086), rs41417449 (chr6: 32364011), rs7765803 (chr6: 161007538), rs113809137 (chr7: 38305142), rs2032582 (chr7: 87160618), rs748235 (chr10: 71142420), rs3744718 (chr17: 5462805), rs2526374 (chr17: 56435885), rs536560 (chr18: 55221648), rs2248069 (chr19: 13445208), rs1127354 (chr20: 3193842), rs4898 (chrX: 47444985)(表2).この研究では、strand bias のカットオフ値を0.55と設定し、strand bias が0.55以下のもののみを変異陽性として、再度検定を行った(表4). その結果、rs1635498, rs1881420, rs3795850, rs1063646, rs2032582, rs2526374, rs1127354, rs4898の8多型が抽出された(表3). rs1635498は日本人固有の多型であることが知られているため除外し(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1635498), 残りの7つの遺伝子多型を疾患感受性の強い多型として抽出した。

さらに、この研究では、疾患との強い感受性をもつ遺伝子変異のみを確実に同定するため、これら7多型の全サンプルにおいてABI 3500 genetic analyzer を使用し直接シーケンシング(サンガーシーケンス法)を行った。

その結果 rs4898 はすべてのサンプルで確認できたが、残りの6多型については、high-throughput sequencingと同様の多型を必ずしも確認することができなかった。

3. rs4898 遺伝子多型の背景解析

上記の研究結果から、rs4898 は食道アカラシアに感受性の高い遺伝子異常であることが明らかになったため、rs4898 の遺伝子多型について、患者と対照群の各々について、その背景の解析を行った。

rs4898 はアカラシア患者群 21 名のうち 16 名 (67.2%) に認められ、そのうち 7 名がホモの変異、9 名がヘテロの変異であった。また、健常ボランティア群 20 名のうち 7 名 (35%) に認められ、そのうち 5 名がホモの変異、2 名がヘテロの変異であった(表 4)。全遺伝子情報を参照すると、rs4898 は synapsin-1 (SYN-1) の intron に含まれると同時に、tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) の exon 5 に含まれていた。

更に、rs4898 陽性例の性、年齢、外科的処置の有無について検討したところ、患者群では女性患者の 87.5%、男性患者の 40% に認めており、女性に有意に高率に認めていた ($p=0.063$)。この変異は健常ボランティア群でも女性の 50% に認められたが ($p=0.069$)、その頻度は女性の食道アカラシア患者 (87.5%) で有意に高率であり、この遺伝子変異が女性患者におけるアカラシアの発症に強く関連することが示唆された。また、発症年齢と外科的処置の必要性との関連は認めなかった(表 5)。

考察

本研究では、high-throughput sequencer を用いて 1031 遺伝子を網羅的に解析し、rs1635498, rs1881420, rs3795850, rs1063646, rs2032582, rs2526374, rs1127354, rs4898 の 8 多型が抽出されたが、rs1635498 は日本人固有の多型であることが知られているため除外し、残りの 7 つの遺伝子多型が候補であると考えられた。さらに、これらの多型のうち、サンガーシーケンス法でも確認できた rs4898 が、少なくとも食道アカラシア患者におい感

受性の高い遺伝子異常であることが明らかになった。その他の異常については、サンガー法で確認できなかったが、この違いは両者の読み取り特性による相違と考えられる。Ion Proton™ Semiconductor sequencer (Life Technologies)はシーケンス反応の際に、1塩基ずつ伸長させ、その際の水素イオンが放出されるのを半導体が検出し配列を同定してゆくのに対し、サンガーシーケンス法は4種の塩基にそれぞれ別の蛍光ラベルを行い伸長させたのちに、キャピラリー電気泳動と蛍光検出を同時に行い塩基の長さ、末端の蛍光シグナルから塩基配列を同定する。この際サンガー法では伸長反応後にDNAが2次構造を形成すると電気泳動に影響をおよぼし、正確に配列が同定できないことがある。本研究においてサンガーシーケンスで同定が不可能であったものについてはこのようなことが考えられ、必ずしも他の6多型について変異がないとは言い切れ、今後さらに検討する必要がある。

これまで、いくつかの遺伝子を個別に解析した研究が報告されているが、1000以上の遺伝子の全エクソンを網羅的に解析したのは本研究が初めてである。今回の検討では、本疾患に感受性のある新規の遺伝子異常を同定することを目的として、広く消化管、肝臓、胆膵、血液領域における炎症性疾患や自己免疫疾患、代謝異常に関連する疾患の感受性遺伝子を標的とした、オリジナルのカスタムパネルを作成し、high-throughput sequencingを行った。その結果、新規の食道アカラジア感受性遺伝子異常として rs4898 を同定することができた。

rs4898はSYN-1遺伝子のイントロンに含まれる。SYN-1遺伝子は軸索の神経終末のシナプス小胞膜に発現する分子である [15-18]。SYN-1遺伝子のリン酸化により、シナプス小胞が神経終末へ移動し、神経伝達物質が放出される [19-24]。SYN-1欠損マウスにおいてはこの小胞の循環が著明に減少していることから、SYN-1遺伝子はシナプス小胞の恒常性を維持する中心的な役割を果たしていると考えられている [25, 26]。本研究においてはSYN-1遺伝子の変異はエクソン領域ではなく、イントロン領域であった。しかしながら、このイントロン領域の変異はpre-messenger RNAのスプライシングの変化を引き起こすことが知られており、遺伝子発現に関連することが示唆されている [27-29]。また、食道アカラシアの括約筋機能異常と酷似する機能異常を持つ、内肛門括

約筋アカラシア(IASA)患者の平滑筋において、SYN-1 の発現が減少していることが報告されている [30]. SYN-1 遺伝子のイントロン領域の変異は、筋神経叢内シナプスの SYN-1 発現を減少させることにより、食道アカラジアの発症に関係している可能性がある.

一方で、rs4898 は SYN-1 遺伝子と相補的な配列である TIMP-1 のエクソン 5 領域でもある.この変異によって合成されるアミノ酸は変化しないが、この変異部位は pre-messenger RNA のスプライシングに必須である snRNP の結合部位であり、この変異が TIMP-1 mRNA の成熟を阻害することが示唆される.実際に TIMP-1 遺伝子の発現は rs4898 変異を持つ炎症性腸疾患患者において減少していることが報告されている [31]. rs4898 は敗血症性ショックの患者の生存率を低下させることや全身硬化症の発症率を低下させることが報告されている [32, 33].しかし、食道アカラシアにおける TIMP-1 の役割は明らかにされていない.今後さらにアカラシア患者における TIMP-1 遺伝子の発現と機能について解析を進めることによって、この変異と疾患の発症や進展との関連が明らかになるだろう.

これまで食道アカラジアに関連する遺伝子異常の解析として、炎症性腸疾患や他の自己免疫疾患関連遺伝子、炎症関連サイトカイン遺伝子に関する変異を直接シーケンス法で解析する研究が行われてきた.その結果、tyrosine phosphatase N22 [6], vasoactive intestinal peptide receptor 1 [7], L23 receptor [8], promoter region of IL10 [9], c-kit [10], lymphotoxin- α (LTA)/tumor necrosis factor- α (TNF α) locus[11], IL33[12], HLA-DQ[13] の 1 塩基多型が食道アカラジア患者に高頻度に認められることが報告されている.本研究では N22, IL23 受容体, IL10, HLA-DQ の遺伝子についても全エクソン領域で検討したが、どの変異も有意なものとしては検出されなかった.これは、解析手法や対象集団の差異に起因するものと推測される.今後、多様な人種を対象とした多数例での解析により、食道アカラシア患者に共通の、あるいは人種特異的な遺伝子変異を同定する必要がある.

結語

本研究では high-throughput sequencer を用いてアカラシア患者の 1031 の

遺伝子の全エクソンを網羅的に解析した.その結果,神経シナプスの機能に必須の分子である SYN-1 のイントロン領域および TIMP-1 のエクソン領域に含まれる,アカラシア高感受性の rs4898 を同定した.この遺伝子異常は食道アカラシアの疾患リスクマーカーとして有用であるとともに,本症の発生や病態に関係している可能性がある.

謝辞

稿を終えるにあたり,本研究の企画段階から,終始御指導を賜りました旭川医科大学内科学講座消化器・血液腫瘍制御内科学分野 高後 裕教授に深謝しますとともに,実験に関し,直接御助言を頂きました藤谷幹浩准教授,消化管再生修復医学講座 田中宏樹特任講師,臨床消化器・肝臓診療連携講座 稲場 勇平特任講師に感謝します.

文献

- 1)Francis DL, Katzka DA. Achalasia: update on the disease and its treatment. *Gastroenterology* 2010;139:369-74.
- 2)Park W, Vaezi MF. Etiology and pathogenesis of achalasia: the current understanding. *The American journal of gastroenterology* 2005;100:1404-14.
- 3)Staiano A, Clouse RE. Detection of incomplete lower esophageal sphincter relaxation with conventional point-pressure sensors. *The American journal of gastroenterology* 2001;96:3258-67.
- 4)Galey KM, Wilshire CL, Niebisch S, Jones CE, Raymond DP, Little VR, et al. Atypical variants of classic achalasia are common and currently under-recognized: a study of prevalence and clinical features. *Journal of the American College of Surgeons* 2011;213:155-61; discussion 62-3.
- 5)Cunningham ET, Jr., Sawchenko PE. Central neural control of esophageal motility: a review. *Dysphagia* 1990;5:35-51.
- 6)Santiago JL, Martinez A, Benito MS, Ruiz de Leon A, Mendoza JL, Fernandez-Arquero M, et al. Gender-specific association of the PTPN22

- C1858T polymorphism with achalasia. *Human immunology* 2007;68:867-70.
- 7)Paladini F, Cocco E, Cascino I, Belfiore F, Badiali D, Piretta L, et al. Age-dependent association of idiopathic achalasia with vasoactive intestinal peptide receptor 1 gene. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 2009;21:597-602.
- 8)de Leon AR, de la Serna JP, Santiago JL, Sevilla C, Fernandez-Arquero M, de la Concha EG, et al. Association between idiopathic achalasia and IL23R gene. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 2010;22:734-8, e218.
- 9)Nunez C, Garcia-Gonzalez MA, Santiago JL, Benito MS, Mearin F, de la Concha EG, et al. Association of IL10 promoter polymorphisms with idiopathic achalasia. *Human immunology* 2011;72:749-52.
- 10)Alahdab YO, Eren F, Giral A, Gunduz F, Kedrah AE, Atug O, et al. Preliminary evidence of an association between the functional c-kit rs6554199 polymorphism and achalasia in a Turkish population. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 2012;24:27-30.
- 11)Wouters MM, Lambrechts D, Becker J, Cleynen I, Tack J, Vigo AG, et al. Genetic variation in the lymphotoxin-alpha (LTA)/tumour necrosis factor-alpha (TNFalpha) locus as a risk factor for idiopathic achalasia. *Gut* 2014;63:1401-9.
- 12)Latiano A, Palmieri O, Bossa F, Latiano T, Corritore G, De Santo E, et al. Impact of genetic polymorphisms on the pathogenesis of idiopathic achalasia: Association with IL33 gene variant. *Human immunology* 2014;75:364-9.
- 13)Gockel I, Becker J, Wouters MM, Niebisch S, Gockel HR, Hess T, et al. Common variants in the HLA-DQ region confer susceptibility to idiopathic achalasia. *Nature genetics* 2014;46:901-4.

- 14) Moonen A, Boeckxstaens G. Current diagnosis and management of achalasia. *Journal of clinical gastroenterology* 2014;48:484-90.
- 15) De Camilli P, Cameron R, Greengard P. Synapsin I (protein D), a nerve terminal-specific phosphoprotein. I. Its general distribution in synapses of the central and peripheral nervous system demonstrated by immunofluorescence in frozen and plastic sections. *The Journal of cell biology* 1983;96:1337-54.
- 16) De Camilli P, Harris SM, Jr., Huttner WB, Greengard P. Synapsin I (Protein D), a nerve terminal-specific phosphoprotein. II. Its specific association with synaptic vesicles demonstrated by immunocytochemistry in agarose-embedded synaptosomes. *The Journal of cell biology* 1983;96:1355-73.
- 17) Huttner WB, Schiebler W, Greengard P, De Camilli P. Synapsin I (protein D), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. *The Journal of cell biology* 1983;96:1374-88.
- 18) Sudhof TC, Czernik AJ, Kao HT, Takei K, Johnston PA, Horiuchi A, et al. Synapsins: mosaics of shared and individual domains in a family of synaptic vesicle phosphoproteins. *Science* 1989;245:1474-80.
- 19) Schulman H, Greengard P. Stimulation of brain membrane protein phosphorylation by calcium and an endogenous heat-stable protein. *Nature* 1978;271:478-9.
- 20) Humeau Y, Doussau F, Vitiello F, Greengard P, Benfenati F, Poulain B. Synapsin controls both reserve and releasable synaptic vesicle pools during neuronal activity and short-term plasticity in *Aplysia*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2001;21:4195-206.
- 21) Witzmann FA, Arnold RJ, Bai F, Hrnčirova P, Kimpel MW, Mechref YS, et al. A proteomic survey of rat cerebral cortical synaptosomes. *Proteomics* 2005;5:2177-201.

- 22) Cesca F, Baldelli P, Valtorta F, Benfenati F. The synapsins: key actors of synapse function and plasticity. *Progress in neurobiology* 2010;91:313-48.
- 23) Bykhovskaia M. Synapsin regulation of vesicle organization and functional pools. *Seminars in cell & developmental biology* 2011;22:387-92.
- 24) Giachello CN, Montarolo PG, Ghirardi M. Synaptic functions of invertebrate varicosities: what molecular mechanisms lie beneath. *Neural plasticity* 2012;2012:670821.
- 25) Ryan TA, Li L, Chin LS, Greengard P, Smith SJ. Synaptic vesicle recycling in synapsin I knock-out mice. *The Journal of cell biology* 1996;134:1219-27.
- 26) Orenbuch A, Shalev L, Marra V, Sinai I, Lavy Y, Kahn J, et al. Synapsin selectively controls the mobility of resting pool vesicles at hippocampal terminals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2012;32:3969-80.
- 27) Greenwood TA, Kelsoe JR. Promoter and intronic variants affect the transcriptional regulation of the human dopamine transporter gene. *Genomics* 2003;82:511-20.
- 28) Wang L, Li B, Lu X, Zhao Q, Li Y, Ge D, et al. A functional intronic variant in the tyrosine hydroxylase (TH) gene confers risk of essential hypertension in the Northern Chinese Han population. *Clin Sci (Lond)* 2008;115:151-8.
- 29) Vreeswijk MP, Kraan JN, van der Klift HM, Vink GR, Cornelisse CJ, Wijnen JT, et al. Intronic variants in BRCA1 and BRCA2 that affect RNA splicing can be reliably selected by splice-site prediction programs. *Human mutation* 2009;30:107-14.
- 30) Oue T, Puri P. Altered intramuscular innervation and synapse formation in internal sphincter achalasia. *Pediatric surgery international* 1999;15:192-4.
- 31) Meijer MJ, Mieremet-Ooms MA, van Hogezaand RA, Lamers CB, Hommes DW, Verspaget HW. Role of matrix metalloproteinase, tissue

inhibitor of metalloproteinase and tumor necrosis factor-alpha single nucleotide gene polymorphisms in inflammatory bowel disease. World journal of gastroenterology : WJG 2007;13:2960-6.

32)Lorente L, Martin M, Plasencia F, Sole-Violan J, Blanquer J, Labarta L, et al. The 372 T/C genetic polymorphism of TIMP-1 is associated with serum levels of TIMP-1 and survival in patients with severe sepsis. Crit Care 2013;17:R94.

33)Skarmoutsou E, D'Amico F, Marchini M, Malaponte G, Scorza R, Mazzarino MC. Association of TIMP-1 +372 SNP with digital ulcer manifestation in female systemic sclerosis patients. Human immunology 2012;73:950-3.

図1 対象遺伝子の抽出法

本研究では、最初に文献からこれまで報告のある遺伝子について検索し、アカラシア・炎症性腸疾患関連遺伝子から 120 種類、膵疾患関連遺伝子から 131 種類、肝疾患については特に 1 塩基多型まで限定して抽出して 633 種類、血液疾患関連遺伝子から 93 種類、金属代謝関連遺伝子から 59 種類を抽出した。これらを機能別に分類し、炎症・免疫関連の遺伝子 833 種類、代謝異常・酸化ストレス関連遺伝子 209 種類が抽出された。このうち amplicon 作成時に重複するものなどを除き、最終的に 1031 種類の遺伝子(12609 種類の amplicon)を標的とした。

表1 対象者の年齢、性別および治療歴

表2 High through put sequencer によって検出された P 値 0.05 未満かつエクソン領域の多型

表3 strand bias が 0.55 以下の変異を陽性とした場合の陽性数と、その Fisher 検定の結果

表5 健常ボランティア群と食道アカラシア群における rs4898 変異

表6 genotype と性別、年齢、発症年齢、治療歴との関係

図1

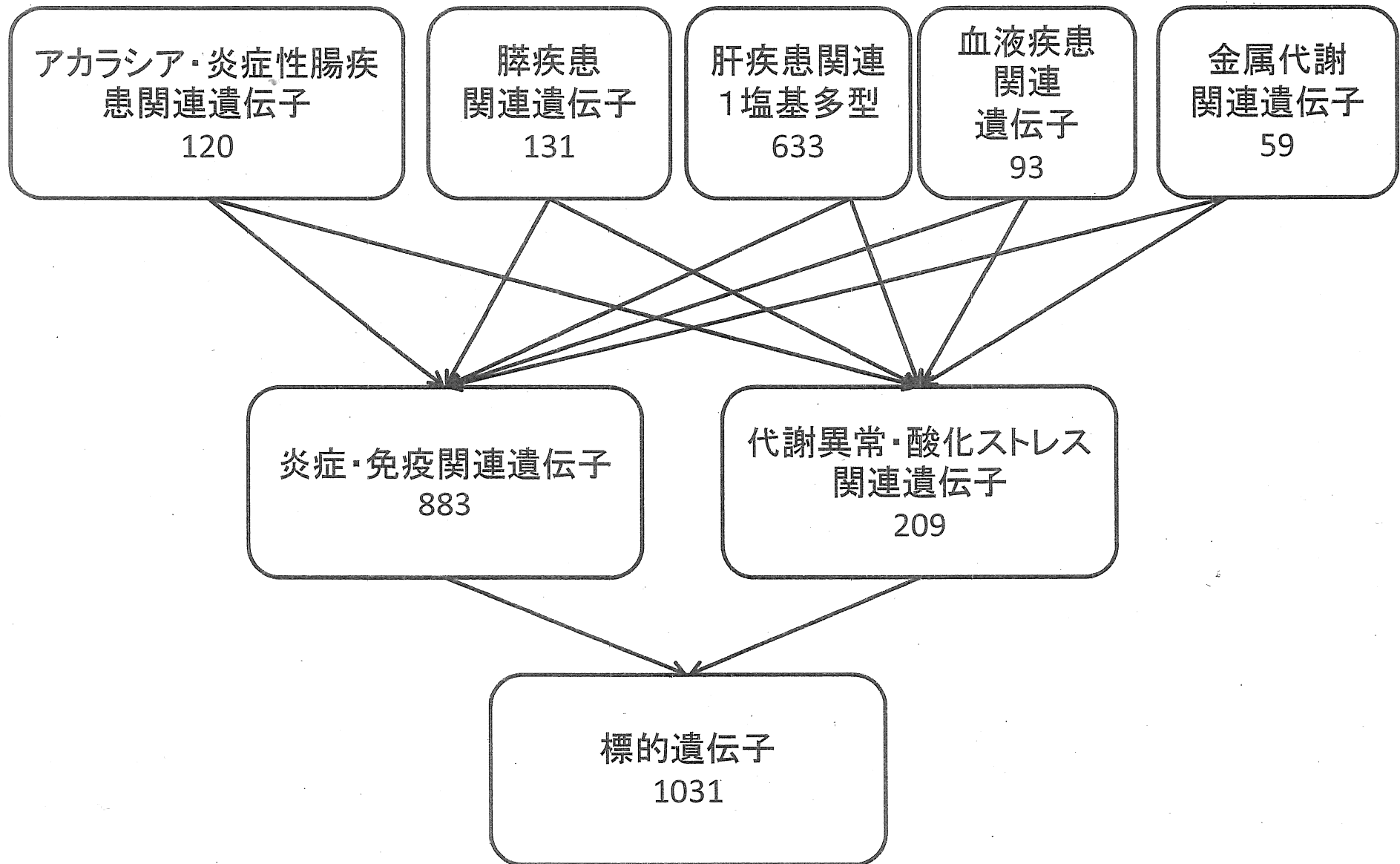


表1

	アカラシア患者群 (n=21)	健常ボランティア群 (n=20)
男:女	5:11	10:10
採取時年齢	40 [24,89]	31 [22,50]
疾患背景		
発症年齢	60 [6, 82]	
治療歴		
内視鏡的バルーン拡張術	17(81%)	
内視鏡的食道括約筋切開術	2(10%)	
外科的切除術	1(5%)	
内服加療のみ	4(19%)	

年齢:中央値[最小, 最大]

表2

Gene ID	Chromosome	Region	Reference	Allele	Rs number in dbsnp	Zygoty
MTHFR	1	11856378	G	A	rs1801133	Homo and hetero
FCER1G	1	161185058	G	T	rs2070901	Homo and hetero
EXO1	1	242045275	C	T	rs1635498	Homo and hetero
ALK	2	29416481	T	C	rs1881420	Homo and hetero
ALK	2	29445458	G	T	rs3795850	Homo and hetero
HK2	2	75116527	G	A	rs2229629	Homo and hetero
PSORS1C1	6	31107648	C	T	rs1063646	All hetero
HLA-B	6	31323215	T	C	rs41541216	All hetero
HLA-B	6	31324086	G	A	rs709054	Homo and hetero
BTNL2	6	32364011	T	C	rs41417449	Homo and hetero
LPA	6	161007538	G	C	rs7765803	Homo and hetero
TRGC1	7	38305142	G	C	rs113809137	Homo and hetero
ABCB1	7	87160618	A	T	rs2032582	Homo and hetero
HK1	10	71142420	G	A	rs748235	Homo and hetero
NLRP1	17	5462805	C	T	rs3744718	All hetero
RP5-1171I10.4, RNF43	17	56435885	G	T	rs2526374	Homo and hetero
FECH	18	55221648	T	C	rs536560	Homo and hetero
CACNA1A	19	13445208	C	T	rs2248069	Homo and hetero
ITPA	20	3193842	C	A	rs1127354	All hetero
SYN1, TIMP1	X	47444985	T	C	rs4898	Homo and hetero

dbsnp: 1塩基多型データベース(single nucleotide polymorphism database)

Homo: ホモ

Hetero: ヘテロ

表3

Gene ID	Chromosome	Region	Rs number in dbsnp	Mean STB	STB<0.99		STB≤0.55		P值
					患者群 (N=21)	健常群 (N=20)	患者群(N=21)	健常群 (N=20)	
MTHFR	1	11856378	rs1801133	0.518	16	8	14	8	0.087
FCER1G	1	161185058	rs2070901	0.518	18	10	16	9	0.0578
EXO1	1	242045275	rs1635498	0.505	21	15	21	15	0.0207
ALK	2	29416481	rs1881420	0.515	21	16	20	13	0.0205
ALK	2	29445458	rs3795850	0.513	21	16	21	15	0.0207
HK2	2	75116527	rs2229629	0.609	8	2	1	1	>0.9999
PSORS1C1	6	31107648	rs1063646	0.530	11	2	11	2	0.0063
HLA-B	6	31323215	rs41541216	0.584	13	6	6	4	0.7186
HLA-B	6	31324086	rs709054	0.498	10	3	8	3	0.1589
BTNL2	6	32364011	rs41417449	0.796	12	5	0	1	0.4878
LPA	6	161007538	rs7765803	0.552	15	7	11	2	0.0063
TRGC1	7	38305142	rs113809137	0.557	13	5	6	4	0.7186
ABCB1	7	87160618	rs2032582	0.524	12	17	9	16	0.0247
HK1	10	71142420	rs748235	0.575	16	10	7	3	0.2379
NLRP1	17	5462805	rs3744718	0.526	7	1	6	1	0.0931
RP5- 1171110.4, RNF43	17	56435885	rs2526374	0.521	19	10	17	8	0.0109
FECH	18	55221648	rs536560	0.509	21	16	20	16	0.1836
CACNA1A	19	13445208	rs2248069	0.489	21	16	19	14	0.1035
ITPA	20	3193842	rs1127354	0.527	11	3	10	3	0.0431
SYN1, TIMP1	X	47444985	rs4898	0.543	16	7	12	5	0.0368

STB;strand bias值

表4

	Genotype group		P値
	TT(N=18)	T/C又はC/C[T/C, C/C](%)	
健常ボランティア群	13(65%)	7[2, 5](35%)	0,0091
アカラシア患者群	5(23.8%)	16[9, 7](76.2%)	

表5

	Genotype group	
	TT(N=18)	T/C又はC/C
健常ボランティア群	13 (65.0%)	7 (35.0%)
男性	8 (80.0%)	2 (20%)
女性	5 (50.0%)	5 (50.0%)
アカラシア患者群	5 (23.8%)	16 (76.2%)
男性	3 (60.0%)	2 (40%)
女性	2 (12.5%)	14 (87.5%)
発症年齢	37 [21, 70]	45 [6, 82]
内視鏡または外科治療歴		
あり	4 (23.5%)	13 (76.5%)
なし	1 (25.0%)	3 (75%)

年齢: 中央値 [最小, 最大]