

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	藤林 周吾
学位論文題目 A high-throughput sequence analysis of Japanese patients revealed 11 candidate genes associated with type 1 autoimmune pancreatitis susceptibility (High-throughput sequencing による自己免疫性膵炎疾患感受性遺伝子の同定に関する研究)			
共著者名 笹島 順平 ¹ , 後藤 拓磨 ¹ , 田中 宏樹 ¹ , 河端 秀賢 ² , 藤井 常志 ² , 中村 和正 ³ , 千葉 篤 ³ , 柳川 伸幸 ⁴ , 盛一 健太郎 ¹ , 藤谷 幹浩 ¹ , 高後 裕 ¹			
1. 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 2. 旭川赤十字病院 消化器科 3. 市立旭川病院 消化器内科 4. JA 北海道厚生連旭川厚生病院 消化器科			
掲載雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports 6 (2016) 76-81 [Epub ahead of print]			
研究目的			
<p>自己免疫性膵炎(Autoimmune pancreatitis; 以下 AIP)は、特徴的画像所見、リンパ球浸潤を伴う高度な線維化、血清 IgG4 高値、自己抗体の存在、膵外病変の存在、およびステロイドへの良好な反応を特徴とする慢性膵疾患である。AIP は 1995 年に Yoshida らによってその疾患概念が提唱された。その後全身の IgG4 関連疾患の一病型としての位置付け、疾患亜分類の提唱を経て、その疾患概念は国際的にも確立されつつある。AIP はその発症に遺伝的要因と環境的要因の両要因が関連する多因子性疾患と考えられている。環境的要因として、細菌感染との関連が示唆されている。一方、遺伝的要因として、これまでに HLA DRB1*04:05-DQB1*04:01 ハプロタイプや、KCNA3, ABCF1, CTLA4, FCRL3, PRSS1 などの一塩基多型との関連が報告されている。しかし、これらの報告では、関連が予想される単一の遺伝子のみを解析している。複数の感受性遺伝子が AIP の発症に関連していると考えられ、より検索範囲を広げた high-throughput な遺伝子解析が望まれる。Oguchi らは AIP に合併した IgG4 関連涙腺・唾液腺炎を対象としてゲノムワイド関連解析を行っているが、疾患感受性については言及していない。そこで今回我々は免疫、炎症、代謝など幅広い分野の病態に関連する約 1000 種類の遺伝子のオリジナルパネルを作成し、それらを high-throughput sequencer を用いて網羅的に解析するという、既報とは異なる手法を用いて、AIP と感受性の強い、新規の遺伝子多型の同定を試みた。</p>			
材料・方法			
<p>旭川医科大学および各関連施設の倫理委員会の承認のもと、2013 年 1 月から 2014 年 9 月までに、旭川医科大学病院、旭川厚生病院、市立旭川病院、旭川赤十字病院に受診した 27 名の AIP 患者と 30 名の健常人ボランティアを対象として実施した。AIP 患者は、「自己免疫性膵炎臨床診断基準 2011」で確診または準確診になった症例のうち、本研究内容を理解し、研究への協力に同意した症例を対象とし、文書および口頭による十分な説明を行い、文書により同意を取得した上で、血液サンプルを回収した。臨床データは医療記録から収集した。</p> <p>既報の AIP 疾患感受性遺伝子の他に、炎症性腸疾患、非アルコール性脂肪性肝炎、鉄過剰症などの疾患で、既報の疾患感受性遺伝子とその周辺の代謝、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抽出し、最終的に炎症、免疫関連の 883 遺伝子、代謝異常、酸化ストレス関連の 209 遺伝子を選出し、重複するものを除いた 1031 の遺伝子を標的遺伝子とした。これらをさらに 12609 種類の amplicon に分割し、これらを標的としたプライマーセットを構築し、カスタムパネルとした。被験者のサンプルについては、末梢血 8ml を採取し、Ficol 比重遠心法により単核球を分離した。そ</p>			

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後, アガロースゲル電気泳動を行い, その品質を確認した。

50ng に精製した DNA サンプルに対して, 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)を行い, 1 サンプル当たり 12609 の amplicon を同時に作成した。Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (Life Technologies)を利用し, amplicon sequence 用の DNA ライブラリを作成し, Agilent 2200 Tape station (Agilent Technologies)を用いて quality check を行った。この DNA ライブラリを希釈し, Ion OneTouch 200 Template Kit v3 (Life Technologies)を用いて, emulsion PCR を行った。これを Ion OneTouch™ System を使用して精製, 濃縮し, 半導体 sequencing Ion PI™ Chip v2 (Life Technologies)に流し込み, Ion Proton™ Semiconductor sequencer (Life Technologies)で sequence した。

sequence data 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。allele frequency $\geq 10\%$, coverage ≥ 5 で, quality score ≥ 15 の変異を遺伝子変異として検出し, さらに strand bias < 0.60 のものだけを抽出し, それらの各遺伝子変異を CLC Genomics Workbench software system (CLC bio, Aarhus, Denmark)へ転送し, AIP 群と健常人ボランティア群間で Fisher 検定を行い, 有意差検定を行った ($p < 0.05$)。

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 Fisher 検定を用い, サンプルの背景の検定には Mann-Whitney U test を用いて有意差検定を行った ($p < 0.05$)。

成 績

① 対象者の年齢, 性別および AIP 患者の患者背景

AIP 患者の男女比は, 22:5(男性:女性)年齢中央値は 73 歳 (55-87 歳)であった。健常人ボランティアはそれぞれ 17:13, 29.5 歳(20-49 歳)であった。両群の男女比は有意差を認めなかった ($p = 0.228$)が, 年齢は有意差を認めた ($p < 0.01$)。

患者背景は, 閉塞性黄疸例: 10 名, 脾腫大例: 25 名(限局性: 10 名, び漫性: 15 名), 主脾管不整狭細像: 27 名であった。血清 IgG4 高値(135mg/dl 以上)および血清 IgG 高値(1800mg/dl 以上)はそれぞれ 25 名, 15 名であった。それぞれの中央値は 462mg/dl(57-3245mg/dl), 1857mg/dl(1327-6348mg/dl)であった。血清 γ グロブリン高値(総蛋白の 20%以上): 17 名, 抗核抗体陽性例: 11 名, リウマトイド因子陽性例: 1 名であった。特徴的病理所見陽性例: 4 名, 脾外病変例: 18 名であった。ステロイド使用例: 24 名, 再燃例: 7 名であった。

② 疾患感受性遺伝子多型の解析

4206 か所の遺伝子多型が抽出され, アミノ酸変異を伴い, $p < 0.05$ (Fisher 検定), strand bias < 0.60 の条件で解析し, 日本人固有の多型を除外すると, 以下の 9 か所の多型が同定された。rs41554316, rs2231119, rs1042131, rs2838171, rs75639061, CACNA1S (c.4642C>T), P2RX (c.195delG), SMAD7 (c.624delC), TOP1 (c.2007delG)。特に P2RX (c.195delG), TOP1 (c.2007delG)はそれぞれ $p = 0.00071$, $p = 0.000025$ と, 極めて強い関連性が認められた。

③ 再燃に関連する遺伝子多型の解析

再燃例 7 名と, 非再燃例 17 名の DNA サンプルを解析した。2631 種類の多型が抽出され, 上記と同様に検討したところ, 以下の 8 か所の多型が同定された。rs1143146, rs1050716, rs1050451, rs41544112, rs1049069, HLA-C (c.759_763delCCCCinsTCCCG), CACNA1C (c.5996delC), CXCR3 (c.630_631delGC)。

④ 脾外病変と関連する遺伝子多型の解析

脾外病変例 18 名と, それ以外の 9 名の DNA サンプルを解析した。3319 種類の多型が抽出された。上記と同様に解析したところ, 以下の 2 か所の多型が同定された。rs1050716, rs111493987。

考 案

疾患感受性遺伝子として同定した 9 か所の多型のうち, P2RX (c.195delG), TOP1 (c.2007delG) の 2 か所の多型が特に関連性が強かった。

P2RX3 遺伝子は, ATP 感受性プリン受容体である P2X 受容体を coding しており, この受容体は主に後根神経節ニューロンに存在し, 痛覚刺激の伝達を担っている。burning mouth syndrome,

overactive bladder との関連が報告されているが、自己免疫性疾患との関連についての報告は認められていないが、膵β細胞からのインスリン分泌に関連があるとする報告が認められている。

TOP1 遺伝子は、DNA topoisomerase I を coding する遺伝子であり、DNA 合成に関連のある酵素で、その阻害によってアポトーシスが誘導されることから、抗がん剤のターゲットとしても知られている。各種悪性腫瘍や SLE や SSc などの自己免疫性疾患との関連が報告されている。さらにその抗体が線維化促進に関連するとの報告があり AIP の線維化との関連も疑われる。

再燃関連遺伝子多型 8 か所のうち 6 か所が HLA 遺伝子であり、AIP を含む自己免疫性疾患との関連が報告されており、HLADQB1 と AIP 再燃との関連についての報告が認められる。膵外病変関連遺伝子多型として 2 か所同定しているが、これまでの報告では唾液腺炎および涙腺炎に限定して解析しており、本研究では硬化性胆管炎、リンパ節腫大、後腹膜線維症、間質性腎炎も含め、全ての膵外病変との関連を解析しており、これまでに報告は認められていない。

いずれの遺伝子多型も今後機能的な解析を進める必要がある。AIP は 10 万人に 4.6 人という稀少疾患であり、全国や世界規模の大規模な研究が今後求められる。

結 論




High-throughput sequencing を用いて、疾患、再燃、膵外病変合併に関連する遺伝子多型を同定した。これらは診断マーカー、再燃や膵外病変合併の予測マーカーとなり得る。

引 用 文 献

参 考 论 文

- Fujibayashi S, Goto T, Sasajima J, et al. Intraductal cholangioscopic visualization of moving Fasciola hepatica. *Gastrointestinal Endoscopy*. 2015;81(6):1485-1486.
- Utsumi T, Sasajima J, Goto T, et al. The Detection of Pancreatic and Retroperitoneal Plasmacytoma Helped to Diagnose Multiple Myeloma: A Case Report. *Medicine* 2015;94(27):e914.
- Moriichi K, Fujiya M, Ijiri M, et al. Quantification of autofluorescence imaging can accurately and objectively assess the severity of ulcerative colitis. *International Journal of Colorectal Disease*. 2015;30(12):1639-1643.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	藤林 周吾
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; margin-bottom: 10px;"> 審査委員長 西川 祐司  </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; margin-bottom: 10px;"> 審査委員 古川 博之  </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> 審査委員 武井 英博  </div>			
<h3 style="margin: 0;">学 位 論 文 題 目</h3> <p style="margin: 10px 0 0 0;">A high-throughput sequence analysis of Japanese patients revealed 11 candidate genes associated with type 1 autoimmune pancreatitis susceptibility (High-throughput sequencing による自己免疫性膵炎疾患感受性遺伝子の同定に関する研究)</p>			
<p style="margin: 0;">I 型自己免疫性膵炎は稀な慢性炎症性膵疾患であり、膵腫大や膵管狭窄をきたし、しばしば膵癌との鑑別が問題となる。また、本疾患は IgG4 高値、IgG4 陽性形質細胞の浸潤を伴う IgG4 関連疾患の膵病変と捉えられており、実際に、経過中に胆管、唾液腺、涙腺などの他臓器の自己免疫性疾患の合併が高頻度に認められる。ステロイド治療が著効するが、漸減中に 30-50%の症例で再燃をきたすことが知られている。原因として遺伝性要因が重要であると想定されているが、不明の点が多く、診断および疾患感受性マーカーや予後予測マーカーの同定が待たれている。</p> <p style="margin: 0;">本研究は自己免疫性膵炎の疾患感受性遺伝子、再燃関連遺伝子、他臓器疾患合併関連遺伝子を見出すことを目的に行われた。27 人の I 型自己免疫性膵炎の患者および 30 人の健康ボランティアから得た末梢血から単核球由来のゲノム DNA を抽出し、high-throughput sequencing による標的遺伝子解析を実施した。標的遺伝子として、炎症性・自己免疫性疾患、血液疾患、代謝疾患、消化管・肝・胆・膵の酸化ストレスに関連する 1031 個を抽出し、それぞれに多数のプライマーセットを設定し、解析した。</p>			

その結果、疾患感受性遺伝子として P2RX3、TOP1、SMAD7 などの 9 個、再燃関連遺伝子として HLA-A、HLA-C などの 8 個、他臓器疾患合併関連遺伝子として HLA-C、MLL3 の 2 個が同定された。これらはそれぞれ免疫調節や自己免疫疾患の発生との関わりが示唆されているが、自己免疫性膵炎との関連についてはこれまで報告がなく、新しい知見であると言える。今後、今回同定された遺伝子多型の分子生物学的な意義を解明するとともに、これらを自己免疫性膵炎の診断および予後推定に応用していくことが期待される。

申請者に対して、各審査委員から論文内容、関連領域について試問がなされ、これに対して適切な回答が寄せられた。

本審査委員会では慎重な意見交換を行い、本論文は I 型自己免疫性膵炎の遺伝子多型に関するきわめて貴重なデータを提供するものであり、学術的にも十分貢献したことを認め、学位を授与する価値があると結論した。