

学位の種類	博士	氏名	堂腰達矢
<p>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  共著者名</p> <p>北海道医学雑誌 90巻 第1号  平成27年5月 掲載予定</p> <p>研究目的</p> <p>食道アカラシアは下部食道括約筋の過度の収縮や弛緩不全により下部食道の狭窄をきたす疾患である。その結果、食物などの通過障害を引き起こし、嘔気、胸痛、咳、体重減少などの症状を呈する。本症では、組織学的に下部食道の縦走筋と輪状筋の間の神経叢が減少ないし喪失しており、これらの神経叢の異常が病因に深く関与していると推測される。その原因として、ウイルス感染、免疫、代謝異常などが挙げられているが、詳細は解明されていない [1].</p> <p>これまで食道アカラシア感受性の遺伝子異常は、個別の遺伝子の、一部の DNA 配列だけを対象にした報告のみで、多数の遺伝子の全エクソン配列について解析した報告はない。本研究では、high-throughput sequencing を用いて炎症、自己免疫、代謝、ストレス応答に関連する 1000 以上の遺伝子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を目的とした。</p> <p>材料・方法</p> <p>1. 対象</p> <p>旭川医科大学病院を含む多施設に通院中の 21 名のアカラシア患者と 20 人の健常人から、倫理委員会の承認のもと、血液サンプルを回収した。診断は臨床症状、食道内圧測定、X 線造影、内視鏡所見によって行い、臨床データは診療記録から収集した。</p> <p>2. High-throughput sequencing</p> <p>本研究では、既報の食道アカラシア感受性遺伝子の他に、新規の遺伝子変異の同定を目的としている。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に感受性のある遺伝子変異を PubMed で検索し、候補遺伝子リストを作成した。更に、その周辺の代謝、免疫、シグナル伝達に関連する分子をコードする遺伝子を候補に加えた。その中から炎症、免疫に関連する 883 遺伝子、代謝異常、</p>			

酸化ストレスに関連する遺伝子 209 を選出し、重複を除いた 1031 の遺伝子を標的遺伝子とし、その全エクソン配列を網羅する 12609 対のプライマーを設定した。対象者の末梢血単核球から DNA を抽出し、polymerase chain reaction (PCR) を行った。PCR 産物を解析用の粒子に結合させ再度 PCR で増幅後 (emulsion PCR), Ion Proton™ Semiconductor sequencer で DNA 配列を決定し、健常人遺伝子配列データベース (GRCh37/hg19) と照合して、遺伝子変異を検出した。疾患群と健常群における各遺伝子変異の出現頻度についてフィッシャー検定を用い有意差検定を行った。

### 3, 直接シーケンス法 (サンガーシーケンス法)

検出した遺伝子多型を含む遺伝子配列を PCR で増幅し、ABI 3500 genetic analyzer を用いて DNA 配列を解析した。

## 成 績

### 1, 対象

アカラシア患者は男性 5 名と女性 16 名、計 21 名、発症年齢中央値は 40 歳だった。17 名が内視鏡または外科的治療が施行され、4 名が内服治療のみであった。健常人背景は、男性 10 名と女性 10 名、計 20 名で、年齢中央値は 34 歳であった。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 群間に差を認めなかった。

### 2, High-throughput sequencing および直接シーケンス法による解析

両群合わせて 4750 か所の遺伝子変異が検出された。その中で、食道アカラシア患者に有意に高頻度の変異は 46 か所であった。このうちエクソン領域の一塩基多型は 20 か所であった。この 20 か所から二重鎖の間での不一致率 (strand bias) が高い 12 か所を除外した。また、日本人固有の多型 1 か所を除外し、残ったのは 7 多型 (rs1881420, rs3795850, rs1063646, rs2032582, rs2526374, rs1127354, rs4898) であった。本研究では、強い疾患感受性をもつ遺伝子変異のみを確実に同定するため、直接シーケンシングを行い同様の多型を認めたものを選択した。その結果、rs4898 のみが全症例において両シーケンス法で同じ多型が証明され、残り 6 多型では一部の症例で両シーケンス法の結果に不一致があった。

### 3. rs4898 の背景解析

rs4898 (chrX:47444985) は tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) のエクソンに含まれると同時に、synapsin-1 (SYN-1) のイントロンに含まれていた。患者群 16 名 (67.2%), 健常群 7 名 (35%) にこの多型が認められた。

## 考 案

本研究は、食道アカラシア感受性遺伝子多型について、High-throughput sequencing を用いて、初めて多数の遺伝子の全エクソンを網羅的に解析した報告である。その結果、解析した 1031 遺伝子から、本症に感受性のある 7 遺伝子多型を同定した。その中でも、全症例で直接シーケンス法でも同じ多型を証明することができた rs4898 は、食道アカラシアに高感受

性の確実な遺伝子多型であると考えられた。一方、その他の6多型については、一部の症例で High-throughput sequencing と直接シーケンス法の結果に不一致があった。これは読み取り特性の相違に起因すると考えられ、この6多型については、今後さらに検討が必要であると考えられた。

rs4898 は SYN-1 のイントロンに含まれる。SYN-1 は神経終末シナプス小胞膜に発現する分子であり、シナプス小胞の神経終末への移動を制御し、シナプス機能の恒常性を維持している。rs4898 は SYN-1 のエクソンではなく、イントロン領域であったが、この変異は pre-messenger RNA のスプライシングの変化を引き起こし、遺伝子発現を低下させることが示唆されている [2]。また、食道アカラシアの括約筋機能異常と酷似する内肛門括約筋アカラシア(IASA)患者において、SYN-1 の発現低下が報告されている [3]。以上から、SYN-1 のイントロン変異は、筋神経叢内シナプスの SYN-1 発現を減少させ、食道アカラシアの発症に関係している可能性がある。

一方 rs4898 は TIMP-1 のエクソン5領域でもある。この部位は 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、この多型が TIMP-1 mRNA の成熟を阻害することが示唆される。食道アカラシアにおける TIMP-1 の役割は不明であり、今後この多型と疾患の発症や進展との関連性を明らかにする必要がある。

#### 結 論

本研究では High-throughput sequencing を用いた網羅的解析で、食道アカラシア高感受性遺伝子多型、rs4898 を同定した。この遺伝子多型は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ていた。Rs4898 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。




引 用 文 献

- 1) Francis DL, Katzka DA. Achalasia: update on the disease and its treatment. Gastroenterology 2010;139:369-74.
- 2) Greenwood TA, Kelsoe JR. Promoter and intronic variants affect the transcriptional regulation of the human dopamine transporter gene. Genomics 2003;82:511-20.
- 3) Oue T, Puri P. Altered intramuscular innervation and synapse formation in internal sphincter achalasia. Pediatric surgery international 1999;15:192-4.

参 考 論 文

- 1) Fujiya M, Kashima S, Ikuta K, Dokoshi T, Sakatani A, Tanaka K, Ando K, Ueno N, Tominaga M, Inaba Y, Ito T, Moriichi K, Tanabe H, Saitoh Y, Kohgo Y. Decreased vessel networks and irregular vessel on narrow band imaging are useful findings to distinguish intestinal lymphoma from lymphoid hyperplasia. Gastrointestinal Endoscopy 2014;Dec;80(6):1064-71.
- 2) 完全摘除生検可能な大腸 T1(SM)深部浸潤癌の術前診断 超音波内視鏡  
藤谷幹浩ら他13名と共著：胃と腸 49巻7号
- 3) 炎症性腸疾患の画像診断 炎症性腸疾患の上部消化管病変  
坂谷慧ら他17名と共著：胃と腸 48巻5号

## 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	堂腰 達矢
<p>審査委員長 奥村利勝 </p> <p>審査委員 谷口隆信 </p> <p>審査委員 清水恵子 </p>			

## 学位論文題目

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

食道アカラシアは下部食道括約筋の弛緩不全により下部食道の狭窄をきたす疾患である。その原因として、ウイルス感染、免疫、代謝異常などが挙げられているが、詳細は解明されていない。これまで食道アカラシア感受性の遺伝子異常は、個別の遺伝子の、一部の DNA 配列だけを対象にした報告のみで、多数の遺伝子の全エクソン配列について解析した報告はない。本研究では、high-throughput sequencing を用いて炎症、自己免疫、代謝、ストレス応答に関連する 1000 以上の遺伝子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を目的とした。アカラシア患者は男性 5 名と女性 16 名、計 21 名、対照は健常人 20 名である。High-throughput sequencing および直接シーケンス法により両群合わせて 4750 か所の遺伝子変異が検出され、その中で、患者に有意に高頻度の変異は 46 か所であった。このうちエクソン領域の一塩基多型は 20 か所であった。この 20 か所から二重鎖の間での不一致率 (strand bias) が高い 12 か所を除外した。また、日本人固有の多型 1 か所を除外し、残ったのは 7 多型 (rs1881420, rs3795850, rs1063646, rs2032582, rs2526374, rs1127354, rs4898) であった。本研究では、強い疾患感受性をもつ遺伝子変異のみを確実に同定するため、直接シーケンシングを行い同様の多型を認めたものを選択した。その結果、rs4898 のみが全症例において両シーケンス法で同じ多型が証明され、残り 6 多型では一部の症例で両シーケンス法の結果に不一致があった。rs4898 (chrX:47444985) は tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) のエクソンに含まれると同時に、synapsin-1 (SYN-1) のイントロンに含まれている。患者群 16 名 (67.2%)、健常群 7 名 (35%) にこの多型が認められた。SYN-1 は神経終末シナプス小胞膜に発現する分子であり、シナプス小胞の神経終末への移動を制御し、シナプス機能の恒常性を維持している。以上から、SYN-1 のイントロン変異は、筋神経叢内シナプスの SYN-1 発現を減少させ、食道アカラシアの発症に関係している可能性があることを示唆する。アカラシアの病態及び治療を考える上でも極めて興味深い意義ある研究結果である。各委員による査問にも的確な解答が得られ、関連領域の知識も十分で、学位論文にふさわしいと判断した。