



Title	ERCP後膵炎におけるIL-6アンブ活性化および炎症制御機構に関する研究
Author(s)	古川, 龍太郎
Description	配架番号 : 2713
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14977号
Issue Date	2022-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14977
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/96900
Type	doctoral thesis
File Information	FURUKAWA_Ryutaro.pdf



学位論文

ERCP 後膵炎における IL-6 アンプ活性化および

炎症制御機構に関する研究

(Study on the mechanism of IL-6 amplifier activation and
inflammation control in post-ERCP pancreatitis)

2022 年 3 月

北海道大学

古川 龍太郎

学位論文

ERCP 後膵炎における IL-6 アンプ活性化および

炎症制御機構に関する研究

(Study on the mechanism of IL-6 amplifier activation and
inflammation control in post-ERCP pancreatitis)

2022 年 3 月

北海道大学

古川 龍太郎

目 次

発表論文目録および学会発表目録.....	1 頁
要旨.....	2 頁
略語表.....	5 頁
緒言.....	7 頁
方法.....	12 頁
結果.....	17 頁
考察.....	30 頁
結論.....	33 頁
謝辞.....	34 頁
利益相反.....	35 頁
引用文献.....	36 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Ryutaro Furukawa, Jing-Jing Jiang, Mona Uchida, Kumiko Tanaka, Rie Hasebe, Yuki Tanaka, Takeshi Yamasaki, Shintaro Hojyo, Masaki Kuwatani, Naoya Sakamoto, Masaaki Murakami

The polymorphism at *GGT1* loci is associated with post-ERCP pancreatitis
Annals of Internal Medicine 投稿中

本研究の一部は以下の学会に発表した。

古川龍太郎、ジャンジンジン、栗谷 将城、坂本 直哉、村上 正晃

Gene analysis of post-ERCP pancreatitis via IL-6 amplifier

第7回北大・部局横断シンポジウム 2021年10月1日・札幌市北区
ベストプレゼンテーション賞受賞

要 旨

【背景と目的】

急性膵炎は、膵臓の急性炎症で、入院が必要となる頻度も高く、重症化すると致命的となる疾患である。アルコールと胆石が 2 大原因であるが、内視鏡的胆管膵管造影 (Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography: ERCP) が原因となる場合もあり、ERCP 後膵炎 (Post-ERCP Pancreatitis: PEP) と呼ばれる。PEP は、ERCP の偶発症で最も頻度が高く重症化すると致命的となるため、最も注意すべき偶発症である。しかし、ERCP を含む急性膵炎に対する治療薬・予防法で確立されたものはなく、様々な研究が行われている。ゲノムワイド関連解析 (Genome wide association study : GWAS) の発展により、一塩基多型 (single nucleotide polymorphism : SNP) と疾患の関わりが次第に解明されてきている。これまで、慢性膵炎に関連する遺伝子/SNP として 13 種類、急性膵炎に関連する遺伝子として 6 種類 (全て慢性膵炎関連遺伝子に含まれる) の報告があるが、PEP と関連した遺伝子/SNP の報告はない。また、膵臓細胞を含む非免疫細胞を nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) 経路を活性化する TNF- α や IL-17 などと JAK- signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) 経路を活性化する interleukin-6 (IL-6) で同時に刺激することで相乗的に NF- κ B 経路が活性化され、IL-6 やケモカイン、増殖因子などの炎症性関連因子群の発現が局所にて上昇する。このようなポジティブフィードバック機構を、当研究室は 2008 年に発見して IL-6 アンプと呼んでいる。その後の研究から、IL-6 アンプは、多くのヒト慢性炎症性疾患と関連していることがわかっているが、膵臓の急性膵炎との関連を調べた報告はない。そこで本研究では、PEP と関連する遺伝子/SNP を明らかにし、その遺伝子と IL-6 アンプを含めた炎症制御機構について解析することを目的とした。

【対象と方法】

研究対象は、北大病院消化器内科にて ERCP を受けた患者とし、膵炎を発症した群 (PEP 群) と膵炎を発症しなかった群 (非 PEP 群) に分けた。対象者からは、血液および膵組織 (膵切除を受けた場合) を採取した。まず、既報の慢性膵炎関連遺伝子 13 種類が IL-6 アンプに関連しているかを確認するため、ヒト神経膠腫細胞株 H4 細胞で siRNA を用いた関連遺伝子ノックダウン実験を行い、サイトカイン刺激後の IL-6 の mRNA 発現を quantitative real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR) で測定した。次に患者検体から DNA を抽出し、PCR で IL-6 アンプとの関連がみられた遺伝子/SNP の保有頻度を調べた。PEP 群と非 PEP 群で保有頻度に差がでた遺伝子/SNP に対して、免疫組織染色を行い遺伝子の発現を確認した。また、その遺伝子が NF- κ B 経路のどこで機能しているのか、short hairpin ribonucleic acid (sh-RNA) を用いて非免疫細胞である BC1 細胞株にてノックダウン実験を行い、サイトカイン刺激前後に

共焦点レーザー顕微鏡を用いて NF- κ B タンパク質の局在について観察を行った。さらに、Imiquimod を用いてマウスの皮膚炎を誘発し、標的遺伝子に対する siRNA を用いて炎症が抑制されるかを評価した。

【結果】

本研究に登録された症例は、PEP 群 24 例、非 PEP 群 85 例であり、年齢、性別、PEP リスク因子にて比較した。その結果、「複数回の膵管へのガイドワイヤー挿入」が、PEP 群において有意に多かった。傾向スコアマッチングを行なって解析すると、各群 20 例がマッチし、有意差のある項目はなくなった。慢性膵炎関連遺伝子である 13 種類の遺伝子に対してノックダウン実験を行うと、*CASR*、*PRSSI*、*GGTI*、*ABO*、*CTRB1* 遺伝子のノックダウンで IL-6 mRNA の発現が有意に抑制され、これらの遺伝子は、IL-6 アンプを正に制御する可能性があることが示唆された。次に、患者検体を用いて DNA シークエンスを行い SNP の保有率を調べると、PEP 患者では Gamma-Glutamyltransferase 1 (*GGTI*) SNP rs5751901 のリスクアレル (C) を有する割合が非 PEP 患者と比較して有意に高かった。傾向スコアマッチングで抽出された群間においても、PEP 群でリスクアレル (C) を有する割合が有意に高く、*GGTI* SNP rs5751901 が PEP の発症に関与している可能性高いことがわかった。そこで *GGTI* SNP rs5751901 の有無が *GGTI* の発現に与える影響をデータベースで調べると、SNP を有することで *GGTI* の発現が増加することがわかった。実際に、免疫組織染色ではリスクアレル (C) を有する膵組織において *GGTI* 陽性細胞の割合が多く、SNP によって膵臓にて *GGTI* の発現が増すことが示唆された。次に shRNA を用いたノックダウン実験にて、*GGTI* が NF- κ B p65 の核移行に及ぼす影響を調べた。その結果、*GGTI* をノックダウンした細胞でサイトカイン刺激依存性の p65 核移行が抑制され、*GGTI* は細胞質内で p65 の核移行までのイベントに関与していることが考えられた。*GGTI* のマウスの皮膚炎に対する影響を調べたところ、*GGTI* の siRNA を塗布したマウスで、Imiquimod 依存性の耳介の肥厚が抑制され、NF- κ B 経路に作用して炎症誘導に関与することが示唆された。

【考察】

本研究では、急性膵炎のカテゴリーに含まれる ERCP 後膵炎 (PEP) について、IL-6 アンプとの関連や遺伝的リスク因子について検証し、有意な結果が得られた。siRNA を用いたノックダウン実験によって PEP と IL-6 アンプの関連性が示され、さらに、DNA シークエンスを用いることで、*GGTI* SNP rs5751901 が PEP 発症に関連している可能性を示した。さらに、その *GGTI* SNP が、非免疫細胞内で *GGTI* の発現量を増やすことで炎症反応を惹起している可能性を示し、また、その炎症制御機構の一端を p65 の核移行を解析することで示した。*GGTI* がコードしている GGT は膜結合型の酵素で、抗酸化物質であるグルタチオンの代謝に重要な役割を果たしているため、酸化ストレスと深い関係があり、様々な疾患に関与していることが知られている。本研究で

は、*GGT1* SNP rs5751901 が膵臓での GGT の発現に影響を与えることで膵炎発症に関与している可能性を示すことができ、PEP を含めた急性膵炎の治療および予防のターゲットとなり得ると考える。

【結論】

GGT1 SNP rs5751901 は、*GGT1* 分子の膵臓での発現を亢進し、NF- κ B 経路の活性化を介して炎症誘導に影響を与え、PEP の発症に促進的に関与している。

略 語 表

本文中および図表に記載した略語は以下の通りである。

ABO	Alpha1-3-N-Acetylgalactosaminyltransferase And Alpha 1-3-Galactosyltransferase
CASR	Calcium-sensing receptor
cDNA	complementary DNA
CEL	Carboxyl Ester Lipase
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CLDN2	Claudin 2
CPA1	Carboxypeptidase A1
CTRB1	Chymotrypsinogen B 1
CTRC	Chymotrypsin C
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ERCP	Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography
eQTL	expression Quantitative Trait Locus
FBS	Fetal bovine serum
FUT2	Fucosyltransferase 2
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GGT1	Gamma-Glutamyltransferase 1
GWAS	Genome wide association study
HPRT	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase
I κ B α	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha
IKK	I κ B kinase
IL-6	Interleukin-6
IL-6R	Interleukin-6 receptor
LT	leukotriene
MORC4	Microrachidia 4
MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger ribonucleic acid
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
NSAIDs	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs
PEP	Post-ERCP Pancreatitis

PRSS1	Serine Protease 1
qPCR	quantitative real-time Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic acid
shRNA	short hairpin ribonucleic acid
siRNA	small interfering ribonucleic acid
SNP	Single nucleotide polymorphism
SPINK1	Serine protease inhibitor, Kazal type I
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TNF- α	Tumor necrosing factor- α

緒 言

【急性膵炎、ERCP 後膵炎について】

急性膵炎は、膵臓の急性炎症で、臨床的には上腹部痛、嘔吐、発熱などの症状と尿中もしくは血液検査で膵酵素の上昇を伴う。米国においては、2009 年に約 275,000 件の入院を引き起こし(1982 年から 2 倍以上に増加)、最も頻度の高い消化器系の入院原因の 1 つとなっている(Peery et al., 2012)。その原因は国や地域によって異なるが世界的にアルコールと胆石が 2 大原因である(Yadav and Lowenfels, 2013)。内視鏡的胆管膵管造影 (Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography ; ERCP) が原因の膵炎は、ERCP 後膵炎 (Post-ERCP Pancreatitis ; PEP) と呼ばれ、本邦においては急性膵炎の約 2% を占める(下瀬川徹, 2013)。ERCP は内視鏡を用いて胆管や膵管における異常を診断し、同時にドレナージ等の治療も可能な手技である(図 1(a))。生検診断や胆管・膵管狭窄に対するステント留置など、非常に有用な処置である一方、偶発症の比較的多い手技である。中でも PEP の発症率は、10% 程度(Kochar et al., 2015)と ERCP の偶発症で最も頻度が高く、重症化すると致命的となるため、最も注意すべき偶発症である(図 1(b))。しかし、急性膵炎に対する治療薬で確立されたものはなく発症初期の十分な輸液が最も重要とされている(Lankisch et al., 2015)。PEP の予防には、現時点では膵管ステントの留置(Fazel et al., 2003; Singh et al.)と非ステロイド性抗炎症薬 (Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: NSAIDs) の経肛門的投与 (Elmunzer et al., 2012; Murray et al., 2003) が有効であることが分かっている。しかし、いずれも完全な予防方法ではなく、また本邦においては未だ保険適応が認可されていないという問題もある。以上のように、PEP を含めた急性膵炎に対する治療および新たな予防法の確立が望まれている。

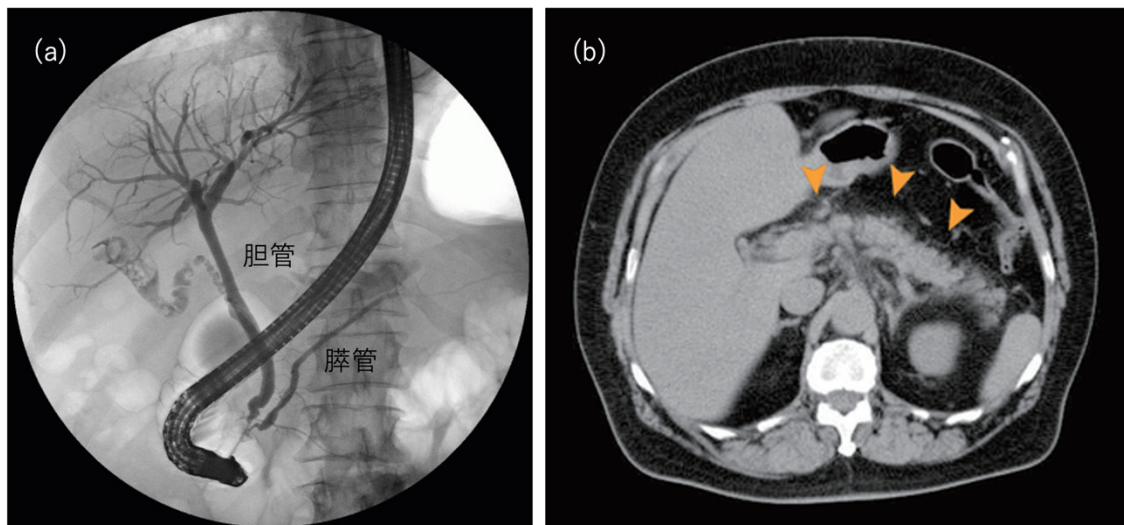


図 1. (a) ERCP の透視画像。カテーテルを用いて造影剤を胆管および膵管に注入することで、胆管や膵管の異常を検索することができる。さらには組織採取やステントの留置などを行うことができ、胆膵疾患領域において中心となる検査・治療である。(b) 急性膵炎の CT 画像。膵の腫大と周囲脂肪組織濃度の上昇を認め、急性膵炎の所見である。

【膵炎関連遺伝子について】

疾患と関連遺伝子を検索する方法として、近年ゲノムワイド関連解析 (Genome wide association study : GWAS)が行われている(MacArthur et al., 2017)。GWAS とは、DNA シーケンス法を用いて特定の疾患の患者集団と健常対照集団との間で統計学的に有意な頻度差を示す遺伝子多型をゲノム全域に渡って網羅的に検索する手法である。その解析の中心となるのは一塩基多型 (single nucleotide polymorphism : SNP) であり、SNP は数百塩基に一個の割合でゲノム上に存在している。イントロン領域やノンコーディング領域に存在するものもあるが、遺伝子の発現に影響を与えて多様性や疾患感受性に寄与している変異も多いと考えられている。

膵炎に関連する遺伝子として、*PRSSI* の p.R122H 変異および p.N29I 変異が遺伝性膵炎を引き起こすことが知られている (Otsuki M et al.2004)。また、GWAS の発展により、慢性膵炎に関連する遺伝子についても多数の報告があり、これまで 13 種類 (Serine protease inhibitor, Kazal type I (*SPINK1*), Chymotrypsin C (*CTRC*), Calcium-sensing receptor (*CASR*), Serine Protease 1 (*PRSSI*), Claudin 2 (*CLDN2*), Carboxypeptidase A1(*CPA1*), Gamma-Glutamyltransferase 1(*GGT1*), Carboxyl Ester Lipase (*CEL*), Fucosyltransferase 2 (*FUT2*), Alpha1-3-N-Acetylgalactosaminyltransferase And Alpha 1-3-Galactosyltransferase (*ABO*), Cystic

fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*), Microrchidia 4 (*MORC4*), Chymotrypsinogen B 1-2 (*CTRB1-2*))の関連遺伝子の報告がある(Brand et al., 2013; Fjeld et al., 2015; Hegyi and Sahin-Tóth, 2019; Muddana et al., 2008; Rosendahl et al., 2008, 2018; Weiss et al., 2015; Whitcomb et al., 2012; Witt et al., 2000, 2013) (表 1(a))。また、急性膵炎に関連する遺伝子については、6 種類(*SPINK1*, *CTRC*, *PRSSI*, *CLDN2*, *MORC4*, *GGT1*)の遺伝子の報告がある(Koziel et al., 2017; Rai et al., 2014; Ścisłalska et al., 2020; Tukiainen et al.; Weiss et al., 2018; O'Reily et al. 2008) (表 1(b))。また、PEP の関連遺伝子に関してこれまで 2 編の報告があるが、いずれも関連遺伝子の同定には至らなかった(Angsuwatcharakon et al., 2018; Mystakidis et al., 2012)。PEP のリスク因子としては患者関連と処置関連の要因が多数同定されている(Chandrasekhara et al., 2017)が、これまで遺伝的素因に関する報告はない(表 2)。

Gene	Authors	Year	Gene	Authors	Year	Gene	Authors	Year
<i>SPINK1</i>	Witt H, et al.	2000	<i>CEL</i>	<u>Field K</u> , et al.	2015	<i>SPINK1</i>	<u>Tukiainen E</u> , et al.	2005
<i>CTRC</i>	Rosendahl J, et al.	2008	<i>FUT2</i>	Frank UW, et al.	2015	<i>SPINK1</i>	<u>O'Reily</u> , et al.	2008
<i>CASR</i>	<u>Muddana V</u> , et al.	2008	<i>ABO</i>	Frank UW, et al.	2015	<i>SPINK1</i>	Praveer R, et al.	2014
<i>PRSSI-2</i>	Whitcomb DC, et al.	2012	<i>CFTR</i>	<u>Hegvi P</u> , et al.	2016	<i>CTRC</i>	<u>Koziel D</u> , et al.	2017
<i>CLDN2</i>	Whitcomb DC, et al.	2012	<i>MORC4</i>	<u>Hegvi P</u> , et al.	2016	<i>PRSSI-2, CLDN2, MORC4</i>	F.U. Weiss, et al.	2018
<i>CPA1</i>	Witt H, et al.	2013	<i>CTRB1-2</i>	Rosendahl J, et al.	2018	<i>GGT1</i>	<u>Ściskalska M</u> , et al.	2020
<i>GGT1</i>	Brand H, et al.	2013						

Patient-related	Odds ratio	Procedure-related	Odds ratio
PEPの既往	8.7	挿管困難	1.76
女性	3.5	複数回の膵管へのガイドワイヤー挿入	2.77
反復性膵炎の既往	2.46	膵管造影	2.2
乳頭機能不全の疑い	1.91	膵管口切開	3.07
若年(<40)	1.8	内視鏡的乳頭大口径バルーン拡張	4.51
慢性膵炎なし	1.87		
血清ビリルビン正常	1.89		

【IL-6 アンプについて】

さまざまな疾患にて炎症を引き起こす分子機構として、非免疫細胞（角化細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞など）からの多量の炎症性因子の産生機構である IL-6 アンプがこれまでに見出されている(Atsumi et al., 2014; Murakami et al., 2013; Ogura et al., 2008)。本機構は、サイトカイン刺激などにて、非免疫細胞において Signal transducers and activator of transcription 3 (STAT3)経路および Nuclear factor-kappa B kinase (NF- κ B)経路が同時活性化されることで NF- κ B がさらに活性化され、炎症性サイトカイン、ケモカイン、増殖因子を含んだ標的遺伝子群の大量発現を引き起こすポジティブフィードバック機構である(図 2)。さらに、局所への免疫細胞浸潤によって、組織の恒常性が破綻することで機能障害を呈し、慢性炎症が引き起こされる。GWAS にて IL-6 アンプを正に制御する 1200 以上の遺伝子群や 500 以上の標的遺伝子群が同定され、ヒト疾患関連遺伝子データベースの情報を利用することで、多くのヒト慢性炎症性疾患の関連遺伝子が含まれることが証明された(Murakami et al., 2013)。また、NF- κ B は、物理的なメカノストレスでも非免疫細胞で活性化する(Christian et al., 2016)。

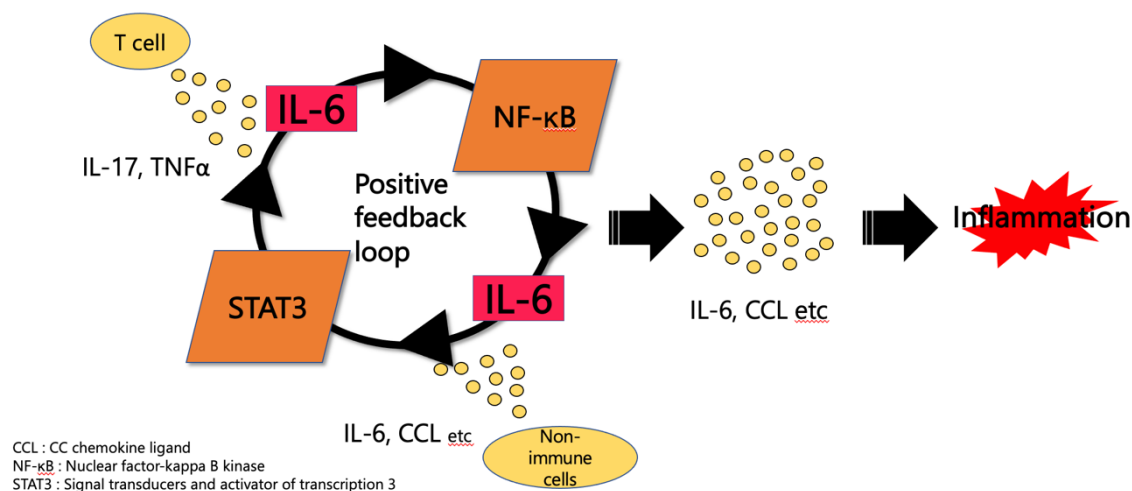


図 2 IL-6 アンプの模式図 (Atsumi et al. 2013 の図を改変)

非免疫細胞において、NF- κ B 経路を活性化する TNF- α や IL-17 と JAK- STAT3 経路を活性化する IL-6 などと同時に刺激することで相乗的に NF- κ B 経路が活性化されるポジティブフィードバック機構により IL-6 などのサイトカイン、ケモカインの発現が上昇し、炎症が引き起こされる。

【仮説および本研究の目的】

本研究では、慢性腭炎に関連する遺伝子は急性腭炎にも関連している可能性があると考え、既報の慢性腭炎関連遺伝子および SNP において、PEP と関連する遺伝子および SNP を明らかにすることを目的とした。また、その遺伝子および SNP が IL-6 アンプを含めた炎症制御機構にどのように関与しているのかを解明することを目的とした。

方法

1. 対象患者と診断

本研究の実施に際して、すべての患者からインフォームド・コンセントを取得しており、北海道大学医学部医の倫理委員会によって承認された研究『急性膵炎における IL-6 アンブ活性化及び炎症制御機構に関する研究 (承認番号 医 19-029)』の一環として実施した。文書による同意取得のもと回収された検体は、匿名化を行った後、北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学分野において解析した。2019 年 10 月 29 日から 2021 年 9 月 24 日までの間に、北海道大学病院消化器内科にて ERCP を行い、本研究の参加に同意を得られた患者を対象とした。ERCP 後に膵炎を発症した患者を PEP 群、膵炎を発症しなかった患者を非 PEP 群とした。PEP の診断については、米国消化器内視鏡学会の定める判断基準に従い、ERCP 後に血清アミラーゼないしリパーゼ値の上昇(正常上限値の 3 倍以上)を伴う腹痛を認めた際に診断した (Cotton et al., 1991)。対象患者から約 10ml の末梢血液(EDTA 保存全血)を採取し、DNA および RNA の抽出に使用した。膵切除を行った患者からは、切除された新鮮膵組織の一部およびホルマリン固定後のブロック片を使用した。

2. 細胞と培養環境

ヒト神経膠腫細胞株 H4 は、ATCC (住友ファーマインターナショナル) から購入した。マウス血管内皮細胞株 BC-1 は、大阪大学宮坂昌之先生より入手した。これらの細胞株は、IL-6 アンブとの関連を調べる実験に適しているため使用し、さらに BC-1 は shRNA によるノックダウンに適しているため使用した。Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM ; Life Technologies) に 10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum ; FBS) (Thermo Scientific) を添加したものをを用いて、37°C、5% CO₂ の条件下において継代、培養した。また培養に使用した器具類はオートクレーブによる滅菌処理を施し、全ての操作をクリーンベンチ内で無菌的に行った。

3. DNA 抽出、RNA 抽出、cDNA 合成

患者血液検体からの DNA 抽出は QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) を、RNA 抽出は QIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN) を使用し、標準プロトコールに従って行った。RNA 抽出後は RecoDNase I (TAKARA) を使用して混入の恐れのあるゲノム DNA を除去後、M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) を用いて標準プロトコールに従って cDNA を合成した。

4. quantitative real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Small interfering ribonucleic acid (siRNA)を用いて後述の方法によりノックダウンした細胞とコントロール細胞とを 96 well プレートに 1×10^4 cells/well で播種した。播種翌日に 2 時間の血清飢餓処理の後、ヒト IL-6 (東レ) 100 ng/mL、ヒト可溶性 IL-6 receptor (IL-6R; PeproTech) 100 ng/mL、ヒト TNF- α (PeproTech) 50 ng/mL で 3 時間刺激した。その後、SuperPrep® Cell Lysis & RT Kit for qPCR (東洋紡ライフサイエンス) を用いて標準プロトコールによって RNA 抽出を行った。short hairpin ribonucleic acid RNA (shRNA)による *GGT1* ノックダウン細胞においては、ヒト IL-6、ヒト可溶性 IL-6R、マウス IL-17 (R&D systems) 50ng/mL を添加し、以下同様に 3 時間インキュベートしたのちに mRNA 抽出を行った。cDNA の合成は M-MLV Reverse Transcriptase (Promega)を用いて標準プロトコールに従って行った。標的遺伝子に対する内在性コントロールとして、マウス由来細胞では hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*HPRT*)、ヒト由来細胞では glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*)を用いた。測定するにあたり、7300 fast real-time PCR システム (Applied Biosystems)もしくは CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD)、および SYBR Green PCR master mix (Kapa Biosystems)を使用した。使用したプライマー配列を表 3 に示す。

表 3 qPCR で用いたプライマー

Gene	Sequence (5' to 3')	
Human GAPDH	Forward	GAGTCAACGGATTTGGTCGT
	Reverse	CGCTCCTGGAAGATGGTG
Human IL-6	Forward	GGTACATCCTCGACGGCATCT
	Reverse	GTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC
Human GGT1	Forward	AAGCAGTGCTCGAAGATTGG
	Reverse	ACACACAACAGGGCTGCAAT
Mouse HPRT	Forward	GATTAGCGATGATGAACCAGGTT
	Reverse	CCTCCCATCTCCTTCATGACA
Mouse IL-6	Forward	GAGGATACCACTCCCAACAGACC
	Reverse	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA

5. ヒト *GGT1* に対する Human small interfering RNA (siRNA) を用いた遺伝子ノックダウン

H4 cell もしくは BC-1 cell を 96well plate に 1.0×10^4 cells/well で播種し、Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) を使用して siRNA (5 μ M) 0.5 μ l をトランスフェクションした。37°C 5%CO₂ 下で 48 時間インキュベートした後、前述の方法で刺激し、qPCR に用いた。

6. ヒト *GGT1* に対する short hairpin ribonucleic acid RNA (shRNA) を用いた遺伝子ノックダウン

96-well plate に BC-1 細胞を 1.5×10^3 個/well で播種し 24 時間培養した。目的の遺伝子に対する shRNA を含むウィルス粒子 (non-target (コントロール)shRNA, Sigma Mission SHC002V; *GGT1* shRNA-1, TRCN0000032395; and *GGT1* shRNA-2, TRCN0000032398; Sigma-Aldrich) を氷上で緩徐に解凍し、multiplicity of infection (MOI) が約 50 程度になるように polybrene (8 μ g/ml) を加えた DMEM で調整して、40 μ l/well ずつ細胞に添加した。37°C、5% CO₂ 下で 24 時間培養した後、puromycin (5 μ g/ml) を加えた DMEM を 100 μ l ずつ加えて 3 日間培養した。この薬剤選択により生存した細胞を一過性のノックダウン細胞株とし、培養条件を 24-well plate、12-well plate、および 100 mm dish へと段階的にスケールアップさせながら、puromycin 含有 DMEM でさらに 3-4 日間培養かつ薬剤選択を行った。この過程で確立したクローンについて qPCR を行い、目的遺伝子のノックダウン効率の検証を行い、安定ノックダウン細胞株として実験に用いた。

7. SNP シーケンス

対象患者の血液検体を EDTA 採血管で保存し、ゲノム DNA を抽出した。抽出されたゲノム DNA を用いて、IL-6 アンプとの関連がみられた慢性膵炎関連遺伝子の SNP に対して設計したプライマー (表 4) を利用し、シーケンスを行った。ゲノム DNA 100-200ng に対し KOD Fx (東洋紡ライフサイエンス) を用いて PCR を行い、電気泳動にて増幅を確認後、PCR 産物を Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて精製した。精製した PCR 産物に対して BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンス PCR を行った。

表 4 SNP genotyping シーケンスに用いたプライマーの配列

Gene	SNP	Sequence (5' to 3')	
<i>ABO</i>	rs8176693	Forward	TCACTTCTCCCCAAACCAGG
		Reverse	AAGGAGGTCAATGGGAAGCC
<i>PRSSI-2</i>	rs2855983	Forward	TTCATATTACAGGAACAAGCCTTA
		Reverse	ATCACACAGCTGGGCTTTCTTAG
<i>PRSSI-2</i>	rs10273639	Forward	GGAATGCTGAGTCTCCCTTCT
		Reverse	GAGACCGGCTGTTTCCTGCA
<i>CASR</i>	rs1042636	Reverse	CAAGAGCAACAGCGAAGACC
		Reverse	TCCTTGCAGACCTGTTTCCT
<i>CTRB1-2</i>	rs8055167 and rs8048956	Forward	GTTTCAGCTCATTCACCTGCA
		Reverse	CCTTCTGGGGTCATATTCGC
<i>GGT1</i>	rs8135987	Forward	CCTTTGGAGTCTTCTGCAACATA
		Reverse	TTTCATCTGCCATCTTTGTTTTTC
<i>GGT1</i>	rs2236626	Forward	AACAGGCTCTGAGAGGACCA
		Reverse	GCAATCTCTGGGAGAATCCA
<i>GGT1</i>	rs4820599	Forward	CCACCCAGCTCAAGGTGTAT
		Reverse	GCAGTGCTTAACCCAAAGGA
<i>GGT1</i>	rs5751901	Forward	CTTGTTGGATGTGTAACCATAGGC
		Reverse	ATAGTGAGACCCCACTGCAAAAAT

8. 免疫組織化学染色

手術にて摘出された膵組織は、北海道大学病院病理部においてホルムアルデヒド固定後、パラフィン包埋処理されたブロックから 5 μ m 厚で切り出された切片を用意した。キシレンで脱パラフィン後、無水エタノールで検体を完全脱水させた。超純水で洗浄した後、クエン酸ナトリウムバッファー (pH6.0) に浸して 10 分間煮沸し、抗原賦活化を行った。室温に 30 分放置後、超純水で洗浄し、3%過酸化水素水で 5 分間処理し、内在性酵素を不活化した。VECTASTAIN ABC KIT (Vector Laboratories)を用いた標準プロトコールでブロッキングを行った。一次抗体には抗リン酸化 p65 抗体 (Sigma-Aldrich)、抗リン酸化 STAT3 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 GGT1 抗体 (Sigma-Aldrich) を使用し、二次抗体にはビオチン標識抗ウサギ IgG モノクローナル抗体を使用した。発色基質としては DAB (ImmPACT™ DAB Peroxidase Substrate Kit, Vector Laboratories) を用いた。

9. 共焦点レーザー顕微鏡による p65 の局在を観察

コントロールおよび *GGT1* をノックダウンした BC-1 細胞を、 μ -Slide (Ibidi) に播種し、37°C、5%CO₂ で一晩培養した。翌日、2 時間の細胞飢餓処理後、TNF α 50 ng/ml で 0 分、15 分、および 30 分間刺激した。その後、Cytfix/Cytoperm kit (BD Biosciences) の標準プロトコールで固定及び透過処理を施した後に、2% BSA で 1 時間ブロッキングした。次に、一次抗体として抗 p65 抗体を室温で 1 時間反応させ、細胞を洗浄して余分な一次抗体を除いた後、二次抗体として抗ウサギ Alexa Fluor-488 標識抗体 (Life technologies) と Hoechst 33342 nuclear stain (Life technologies) を用いて室温で 30 分間反応させた。洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡 (AxioCam MRm, Carl Zeiss) を用いて細胞内タンパク質の局在について観察を行った。

10. 皮膚炎誘導モデルと炎症スコアの評価

本研究では *in vivo* における遺伝子の関与を検証するため、炎症性疾患の代表として皮膚炎誘導モデルを用いた。野生型マウス (C57BL/6) は日本 SLC 株式会社より購入して用いた。マウスは北海道大学遺伝子病制御研究所において室温管理された specific-pathogen-free ルームで飼育した。動物の取り扱いについては「北海道大学動物実験に関する規定」に則り行った。実験には開始時に 6-8 週齢のマウスを用いた。皮膚炎モデルにおける炎症スコアは、既報にある評価方法に従って行った (Kanada et al., 2011)。C57BL/6 マウスの耳に以下の siRNA をそれぞれ耳の表裏に塗布した (day 0)。GGT1 siRNA (Dharmacon, L-045756-01-0005、ON-TARGETplus Mouse Ggt1 (14598) siRNA)、NF- κ B p65 siRNA (Dharmacon, L-040776-00-0005、ON-TARGETplus Mouse Rela (19697) siRNA)、non-target siRNA (Dharmacon, D-001810-10-05、ON-TARGETplus Non-targeting Pool)。その後、day1, 2, 3 において、Toll-like receptor 7 (TLR7) アゴニストであるイミキモド (Mochida Pharmaceuticals, Japan) を siRNA とともに塗布した。なお、塗布にあたっては、クリーム (Johnson & Johnson) 5.6 μ l に siRNA (20 μ M) 9.4 μ l と生理食塩水 (day0) あるいはイミキモド (day1,2,3) 5.0 μ l を混合した液を用いた。皮膚炎は耳の皮膚の厚さをマイクロメータで計測し、元の厚さからの変化量で評価した。計測は day8 まで行い、著者のほかもう一人の研究者によりダブルチェックした。

11. 統計処理

実験データは平均 $\pm$ 標準誤差 (Mean $\pm$ SEM) で示した。2 群間の有意差検定には、Student's *t* 検定もしくはカイ二乗検定を用いた。患者背景の傾向スコアマッチングは、EZR (Kanda, 2013) を使用して解析を行った。p 値は 0.05 未満のものを有意とし、*p < 0.05、**p < 0.01、および***p < 0.001 で示した。

結果

1. 患者背景

本研究に登録された症例は PEP 群 24 例、非 PEP 群は 85 例であった。年齢、性別、原疾患の他、表 2 で示した PEP のリスク因子として同定されている 12 項目のうち、「女性」を除いた 11 項目に関して、両群間で比較した。結果を表 5 に示している。その結果、「複数回の膵管へのガイドワイヤー挿入」のみが、PEP 群において有意に多く($p=0.02$)、「膵管造影」および「内視鏡的乳頭大口径バルーン拡張」も PEP 群で多い傾向があった($p=0.07$ 、 $p=0.06$)。

表 5 患者背景

	PEP群 (n=24)	非PEP群 (n=85)	p value
年齢 中央値 (range)	69.5 (44-92)	70 (27-90)	0.59
男/女	12/12	50/35	0.44
原疾患 (膵癌 / その他の癌 / 良性)	8 / 10 / 6	21 / 38 / 26	0.68
PEPの既往	0	1	0.63
反復性膵炎の既往	0	2	0.45
乳頭機能不全の疑い	0	0	-
若年 (<40)	0	2	0.45
慢性膵炎なし	24	85	-
血清ビリルビン正常	10	38	0.79
挿管困難 (>10min)	12	37	0.57
複数回の膵管へのガイドワイヤー挿入	16	34	0.02
膵管造影	8	14	0.07
膵管口切開	2	4	0.49
内視鏡的乳頭大口径バルーン拡張	2	1	0.06

次に、EZR(Kanda, 2013)を使用して傾向スコアマッチングを行った。目的変数を PEP の有無、説明変数を年齢、性別、PEP リスク因子 11 項目(「女性」を除いたもの)として解析した。各群 20 例がマッチし、再度比較検討した結果を表 6 に示している。各群で有意差はみられなかった。

表 6 患者背景(傾向スコアマッチング後)

	PEP群 (n=20)	非PEP群 (n=20)	p value
年齢 中央値 (range)	70 (41-84)	70 (41-90)	0.95
男/女	10/10	5/15	0.10
原疾患 (膵癌 / その他の癌 / 良性)	8 / 10 / 6	21 / 38 / 26	0.72
PEPの既往	0	0	-
反復性膵炎の既往	0	0	-
乳頭機能不全の疑い	0	0	-
若年(<40)	0	0	-
慢性膵炎なし	20	20	-
血清ビリルビン正常	10	6	0.20
挿管困難(>10min)	11	11	1
複数回の膵管へのガイドワイヤー挿入	14	13	0.74
膵管造影	8	6	0.52
膵管口切開	1	3	0.29
内視鏡的乳頭大口径バルーン拡張	2	0	0.15

2. 慢性膵炎関連遺伝子に対して IL-6 アンブとの関連を調べた結果

これまで慢性膵炎関連遺伝子として報告されている 13 種類の遺伝子 (*SPINK1*, *CTRC*, *CASR*, *PRSSI*, *CLDN2*, *CPA1*, *GGT1*, *CEL*, *FUT2*, *ABO*, *CFTR*, *MORC4*, *CTRB1*) と急性膵炎関連遺伝子として報告されている 6 種類の遺伝子 (*SPINK1*, *CTRC*, *PRSSI*, *CLDN2*, *MORC4*, *GGT1*) に対して、ヒト神経膠腫細胞株 H4 cell を用いて各遺伝子につき 3 種類の siRNA によりノックダウンを行い、qPCR にて IL-6 の mRNA の発現を確認した。その結果、*CTRC*、*CLDN2*、*CPA1*、*FUT2*、*MORC4* に関しては siRNA で IL-6 mRNA の発現は抑制されなかった (図 4(a))。 *SPINK1*、*CEL*、*CFTR* では一部で抑制された (図 4(b))。 *CASR*、*PRSSI*、*GGT1*、*ABO*、*CTRB1* では全ての siRNA で発現が有意に抑制された (図 4(c))。この結果から、*CASR*、*PRSSI*、*GGT1*、*ABO*、*CTRB1* が IL-6 アンブを正に制御する可能性があることが示唆された。また、*GGT1* に対しては、*GGT1* のプライマーを作成し qPCR で *GGT1* mRNA の発現を確認した。その結果、全ての siRNA において発現が抑制された (図 5)。すなわち、*GGT1* の発現抑制によってサイトカイン依存性の IL-6 の発現が抑制されていることが確認された。

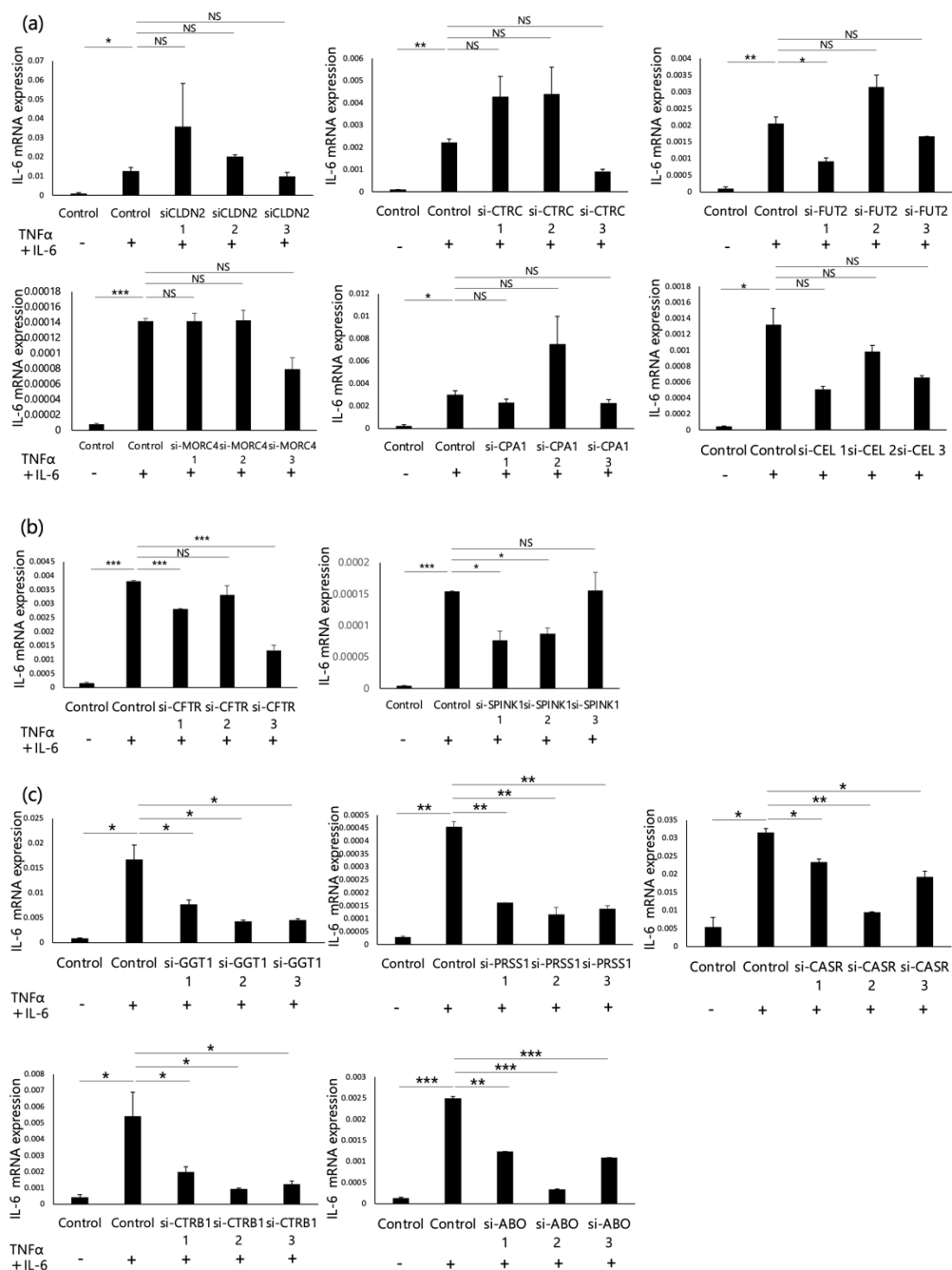


図 4. 慢性膵炎関連遺伝子に対して siRNA を導入し IL-6 mRNA の発現をみた結果
H4 細胞を用いて、各遺伝子 3 種類の siRNA をトランスフェクションし、TNF- α + IL-6 で刺激後、qPCR を行った。データはハウスキーピング遺伝子 GAPDH に対する相対量を示している。(a) 抑制されず (*CLDN2*, *CTRC*, *FUT2*, *MORC4*, *CPA1*, *CEL*)、(b) 一部抑制 (*CFTR*, *SPINK1*)、(c) 全てで抑制 (*GGT1*, *PRSS1*, *CASR*, *CTRB1*, *ABO*)
データは平均値 $\pm$ 標準偏差で示され、NS は有意差なし、*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ 、***は $p < 0.001$ を示す。

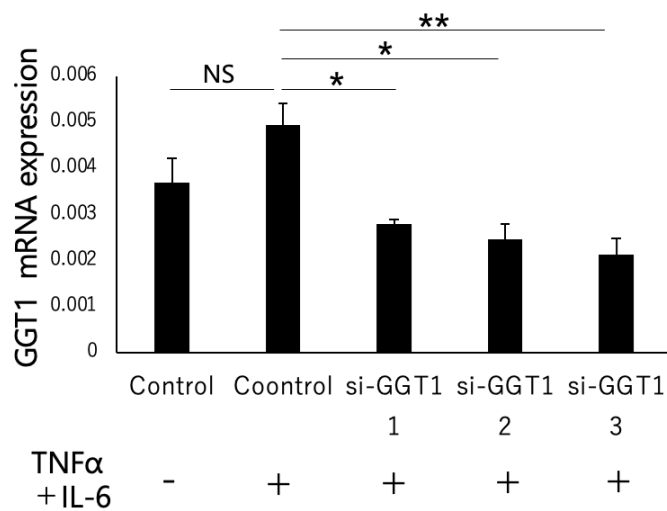


図 5. GGT1 mRNA の発現を確認

H4 細胞に対して 3 種類の siRNA をトランスフェクションし、TNF- α +IL-6 で刺激後、*GGT1* のプライマーを用いて qPCR を行った。データはハウスキーピング遺伝子 GAPDH に対する相対量を示している。データは平均値±標準偏差で示され、NS は有意差なし、*は $p<0.05$ 、**は $p<0.01$ を示す。

3. 患者検体における *CASR*、*PRSS1*、*GGT1*、*ABO*、*CTRB1* の SNP genotype の結果

siRNA を用いた実験にて IL-6 アンプとの関連が考えられた遺伝子 (*CASR*、*PRSS1*、*GGT1*、*ABO*、*CTRB1*) の SNP について、PEP 患者と非 PEP 患者の血液から抽出した核酸を用いて、SNP のリスク多型の有無を確認した。上記遺伝子のうち慢性膵炎との関連が指摘されている SNP は 10 (rs8176693、rs2855983、rs10273639、rs1042636、rs8055167、rs8048956、rs8135987、rs2236626、rs482059、rs5751901) あり、サンガー法により DNA シークエンスを行った。その結果、*GGT1* rs5751901 SNP において、PEP 患者ではリスクアレル (C) を有する割合が非 PEP 患者と比較して有意に高かった (PEP 群 16/24 例、非 PEP 群 19/85 例、 $p<0.001$) (図 6)。また、傾向スコアマッチングを行なって抽出された PEP 群 20 例、非 PEP 群 20 例においても、リスクアレル (C) を有する割合が PEP 群において有意に高かった (PEP 群 15/20 例、非 PEP 群 4/20 例、 $p<0.001$) (図 7)。例として、*GGT1* SNP rs5751901 の genotype 結果を図 8 に示している。

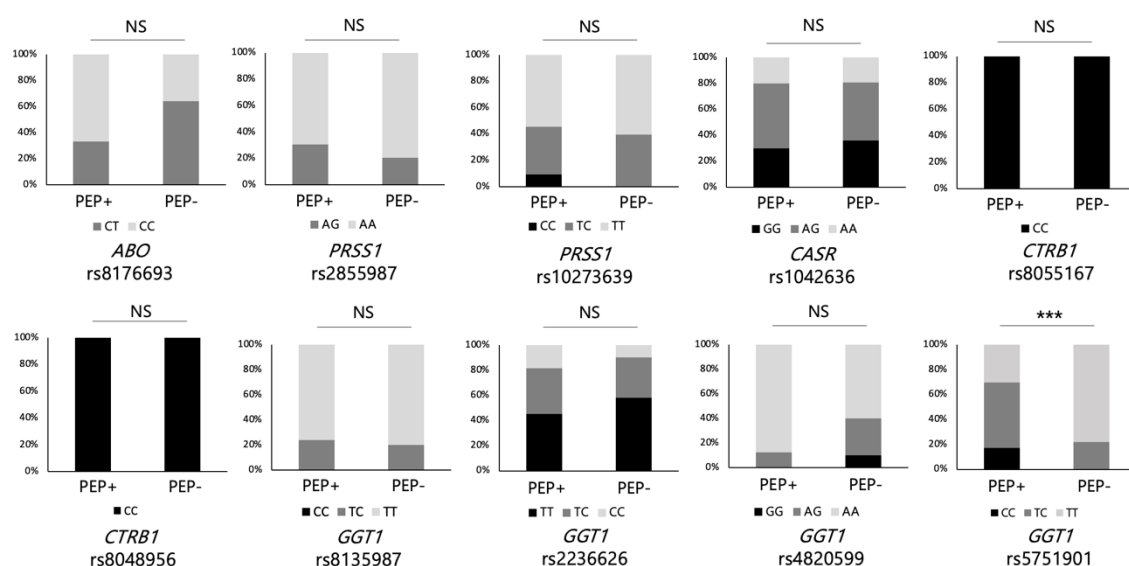


図 6. 対象者における各 SNP の保有率

本研究の同意が得られた患者の血液から DNA を抽出し、各 SNP について DNA シークエンスを行い、両群間で保有率を比較した。リスクアレルホモを黒色、リスクアレルヘテロを濃灰色、ワイルドタイプを薄灰色で示している。NS は有意差なし、***は $p<0.001$ を示す。

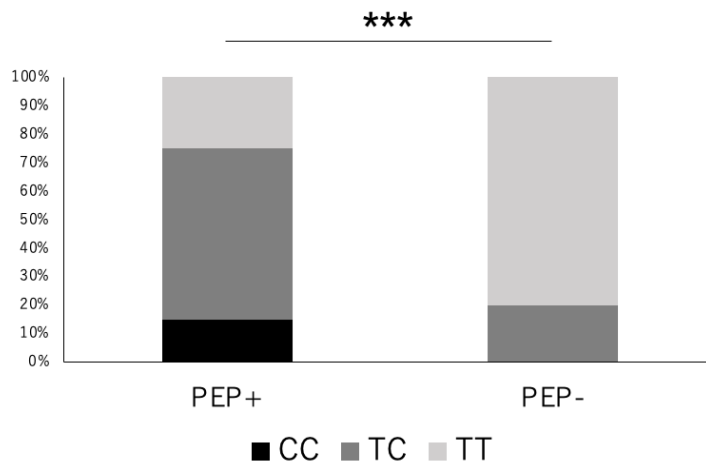


図 7. 傾向スコアマッチング後の患者群における *GGT1* SNP rs575190 の保有率
 膵炎のリスク因子による傾向スコアマッチングで患者背景を調整した群で、*GGT1* SNP rs575190 の保有率を調べた。***は $p<0.001$ を示す。

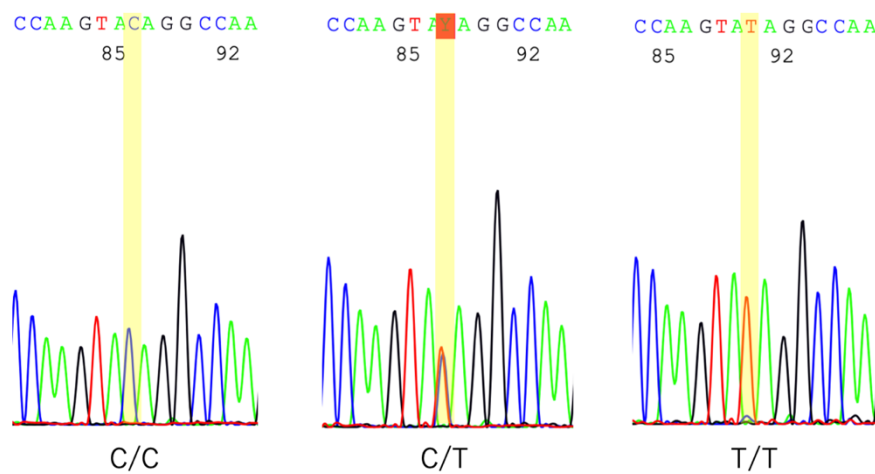


図 8. DNA シーケンスによる *GGT1* SNP rs575190 genotyping
 PEP 患者および非 PEP 患者の血液から抽出されたゲノム DNA を用いて、*GGT1* SNP rs575190 の genotype を確認した。

4. *GGT1* SNP rs5751901 は *GGT1* の発現量を増すことで表現型に影響を与える

GGT1 には 26 種類のスプライシングバリエントが存在する(ただし、23～26 番はタンパク質をコードしない)。*GGT1* の SNP が、*GGT1* mRNA 表現型にどのように関与しているのかを確認するために、まず各エクソンに対し primer を設計し、RNA から合成した cDNA を使用して RT-PCR にて発現量を確認した。その結果、各エクソンの発現量に明らかな差は見られなかった(not shown)。そのため、SNP の有無によってはスプライシングバリエント間では発現量に差が出ないと考えられた。そこで SNP の有無によって *GGT1* の発現量が増える可能性を考え、GTEx portal (南北米および欧州の複数の研究機関からなる国際コンソーシアムによるヒトの体組織ごと、遺伝子型ごとの遺伝子発現を網羅的に調べたプロジェクトのポータルサイト)

(<https://gtexportal.org/home/>; accessed 2021/10/1) にて *GGT1* rs5751901 SNP を検索すると、SNP-(T/T)→SNP+(T/C)→SNP+(C/C)の順に発現量が増えるというデータが得られた。

上記データを確認するため、リスク多型 SNP を有する患者の膵組織(T/C)とリスク多型 SNP の無い患者の膵組織(T/T)における *GGT1* の発現を免疫組織化学染色で確認した。その結果、SNP ありの膵組織(T/C)で、SNP のない膵組織(T/T)と比べ、*GGT1* 陽性細胞の割合が有意に多かった(図 9)。これらから *GGT1* SNP rs5751901 は、膵臓にて *GGT1* 分子の発現量を増すことがわかった。

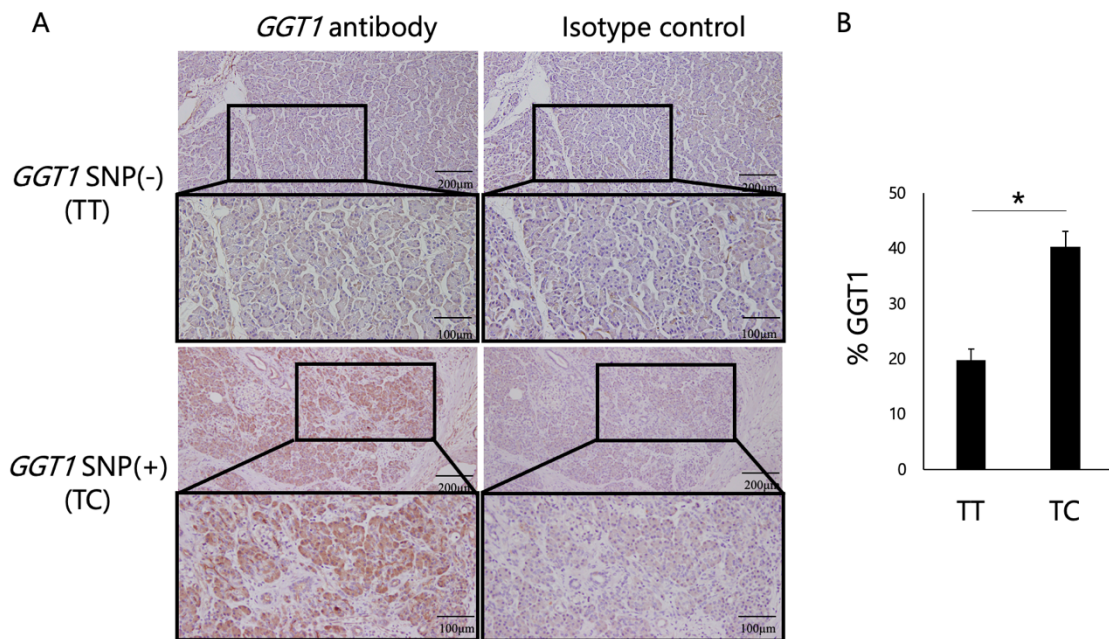


図 9. 免疫組織染色を用いて膵組織における *GGT1* の発現を観察

(A) リスクアレル(C)を有する症例(TC, n=3)と有さない症例(TT, n=5)の膵組織を免疫組織染色した。

(B) *GGT1* の陽性細胞数を計測し、定量化した。各々の切片について 200 個以上の細胞を任意の 3 部位以上で計測した。データは平均値±標準偏差で示され、* は $p<0.05$ を示す。

5. *GGT1* は NF- κ B p65 の核移行に関与する

NF- κ B 経路は、IL-6 アンプ活性化に必須の信号伝達系である。特に、NF- κ B 経路において p65 分子は、IL-6 アンプ活性化に重要である(Murakami et al., 2019)。刺激が入らない場合には、p65 は細胞質において Inhibitor of κ B(I κ B) α と結合し非活性化した状態で存在する。IL-17 や TNF- α 、LPS、メカノストレスなどの炎症性サイトカインやストレスの刺激による I κ B kinase(IKK)複合体のリン酸化を経て I κ B α がリン酸化されることで最終的にプロテアソームにより分解される。I κ B α が分解されて細胞質内に遊離された p65 分子は、セリン 536 のリン酸化により活性化し、核局在シグナルが露出することにより核内へ移行し、プロモーター部分に結合して転写活性を有するようになる(Meng et al., 2016; Ota et al., 2020)。

GGT1 をノックダウンした BC-1 細胞を作成し IL-6、IL-17、IL-6+IL-17 にて刺激して qPCR を行ったところ、IL-17 および IL-6+IL-17 で刺激したノックダウン細胞において、IL-6 mRNA の発現が有意に抑制されることを確認した(図 10)。この *GGT1* ノックダウン BC-1 細胞に対して TNF- α による刺激を行い、蛍光染色後に共焦点レーザー顕微鏡にて観察することで、*GGT1* がどのようにして炎症に関与するのかを調べた。その結果、*GGT1* をノックダウンした細胞では、サイトカイン依存性の p65 の核移行が抑制された(図 11)。このことから、*GGT1* は、細胞質内で p65 の核移行までのイベントに関与していることが考えられた。

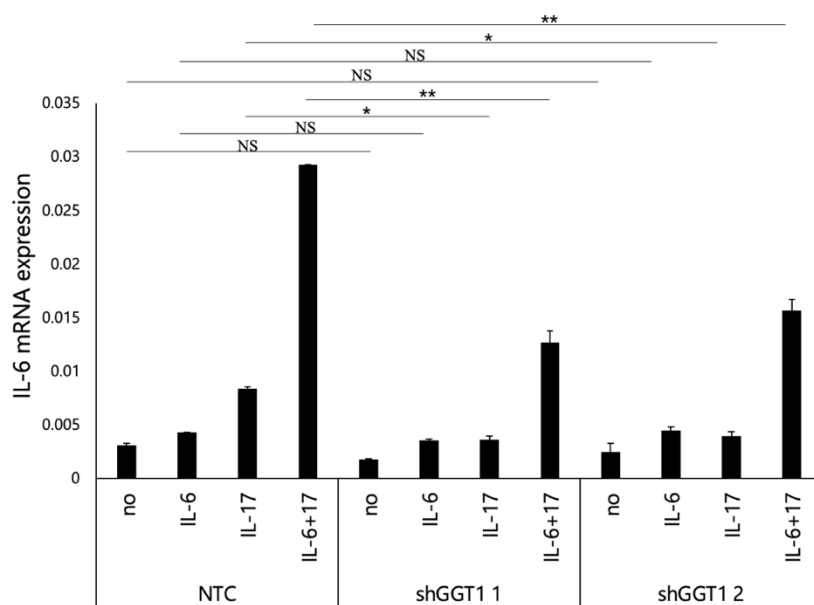


図 10. *GGT1* をノックダウンした細胞に対し qPCR を行なった結果

GGT1 ノックダウン細胞に対し、IL-6、IL-17、IL-6+IL-17 で刺激したのち RNA を抽出し、IL-6 の発現を確認した。データは平均値±標準偏差で示され、NS は有意差なし、*は $p<0.05$ 、**は $p<0.01$ を示す。

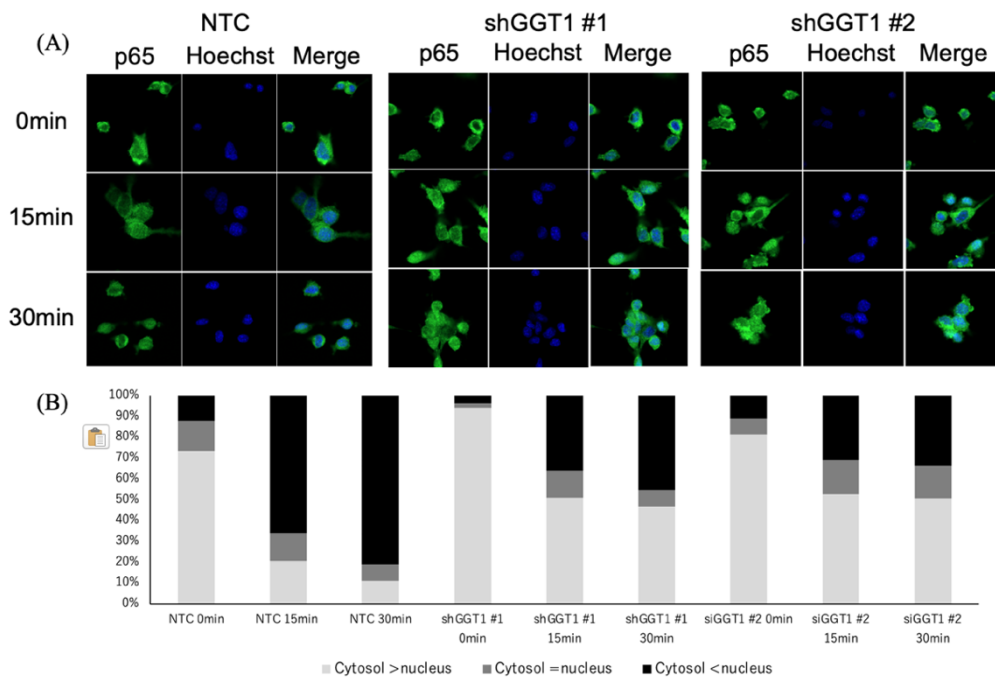


図 11. 共焦点レーザー顕微鏡を用いて NF κ B p65 の核移行を観察

(A) *GGT1* ノックダウン BC-1 細胞および mock 細胞を 24 時間血清飢餓状態で培養し、TNF- α で 0、15、30 分間刺激した後に共焦点レーザー顕微鏡で p65 の核内移行を観察した。(B) 各サンプルにつき 100 個以上の細胞について p65 の核内移行の有無を計測した。NTC : no template control. shRNA: short hairpin ribonucleic acid.

6. *GGT1* は *in vivo* において NF- κ B 経路に作用して炎症に関与する

Imiquimod は、樹状細胞や単球に存在する Toll 様受容体 7 (TLR7b) のリガンドで NF- κ B を活性化させる作用をもち、マウスの耳や背部皮膚に塗布すると乾癬様皮膚炎モデルが誘導 ((Kanemaru et al., 2015; Morimura et al., 2016)) され、マウス生体内で IL-6 アンプの反応性を解析できる (Fujita et al., 2019)。 *GGT1* の NF- κ B 経路に対する作用を確認するために、siRNA を用いて上記マウスモデルにて評価した。その結果、mock を塗布したものと比較して *GGT1* siRNA および p65 siRNA を塗布したものは、有意に耳の肥厚が抑制されていた (図 12)。このことから、 *GGT1* はマウスモデルにおいても NF- κ B 経路に作用して炎症誘導に関与することが考えられた。

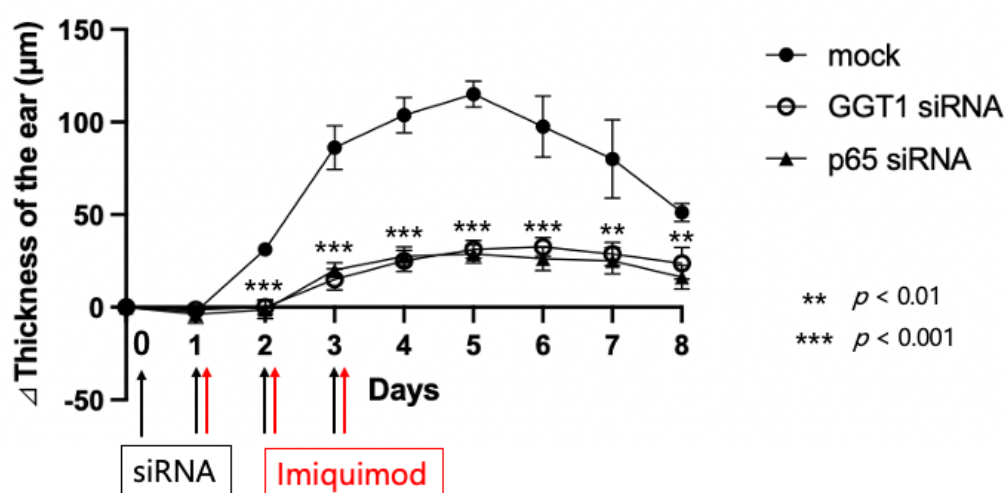


図 12. Imiquimod の乾癬様皮膚炎によるマウスの耳の肥厚を観察

マウスの片耳を $n=1$ として、各 siRNA に対し 2 匹使用し $n=4$ とした。siRNA (mock、*GGT1*、p65) は day0～3、Imiquimod は day1～3 に耳介に塗布した。塗布時に耳介の厚さを計測し記録した。データは平均値 $\pm$ 標準偏差で示され、**は $p<0.01$ 、***は $p<0.001$ を示す。

考察

本研究では、急性膵炎のカテゴリーに含まれる ERCP 後膵炎 (PEP) について、IL-6 アンプとの関連や遺伝的リスク因子について検証した。世界的な GWAS の発展により、慢性膵炎に関連する遺伝子および SNP の報告は多くなされているが、急性膵炎の関連遺伝子は少なく、また、PEP の関連遺伝子についての報告はこれまでなされていなかった。さらに、膵炎関連遺伝子と IL-6 アンプとの関連についてこれまで報告されたものはない。

本研究ではまず、siRNA を用いて膵炎関連遺伝子をノックダウンして IL-6 の mRNA の発現をみることで、IL-6 アンプと関連する可能性がある遺伝子を見出した。次に、患者検体を用いて DNA シーケンスを行うことで、PEP 群と非 PEP 群で発現に差がある SNP を発見した。さらに、その SNP が、非免疫細胞内で、*GGTI* の発現量を増やすことで炎症反応を惹起していることを示し、また、その炎症制御機構の一端を p65 の核移行を解析することで示した。

近年 GWAS により、ヒトの病気の発症に影響を与える多くの新しい一塩基 DNA 変異が明らかになってきた。それらの DNA の変異は、しばしば mRNA の発現レベルと関連することがわかっており、mRNA の発現レベルに関連する遺伝子は量的形質遺伝子座 (expression quantitative trait loci : eQTL) と呼ばれている。eQTL についての GWAS によると、rs5751901 のマイナーアレルは *GGTI* レベルの 0.21 (95%信頼区間 : 0.13-0.29) 標準偏差の増加と関連していた。また、遺伝子転写のデータベース (Dixon et al., 2007) で検索すると、*GGTI* SNP rs5751901 は、*GGTI* 転写量に関連する SNP (rs6519519) と $r^2 = 0.71$ で相関しており ($p = 2.4 \times 10^{-5}$)、このことはタンパク質レベルで見られた *GGTI* の関連性が転写レベルの変化によるものであることを示唆している (Melzer et al., 2008)。このように、今回解析した *GGTI* SNP rs5751901 は eQTL であり、*GGTI* の転写を増加させることで発現に影響を与えることが知られており、本研究の結果と矛盾ないと考える。

GGT 分子は、グルタチオンの代謝に関与する膜結合型の酵素で、さまざまな組織に存在するが、腎臓、肝臓、膵臓に最も多く発現している。GGT の主な生理機能は、細胞内グルタチオン (Glutathione SH : GSH) の再生にシステインを利用できるようにすることであり、その結果、酸化ストレスから身を守ることができる (Zhang et al., 2005)。GGT は一方、GSH を加水分解する過程で反応性の高いチオール基を有する物質を生じ、活性酸素種の産生および酸化ストレス障害へとつながる (Stark et al., 1993)。つまり GGT は、抗酸化 (anti-oxidant) 作用と酸化ストレス亢進 (pro-oxidant) 作用を併せ持つ酵素であることがわかっている。GGT 活性とヒトの疾患の関連については、アテローム性動脈硬化 (Emdin et al., 2005)、高血圧 (Lee et al. 2002)、心不全 (Wang et al., 2013)、腎の虚血性障害 (Cutri'n et al., 2000)、癌 (Corti et al., 2009)、肺の炎症 (Corti et

al., 2012)などの報告がなされている。急性膵炎と GGT 活性の関連についての報告はないが、急性膵炎発症には酸化ストレスが重要な役割を果たし、抗酸化状態の低下が膵炎発症につながる(Jamer; Barreto, 2016)ことが明らかとなっており、GGT 活性の関与が予想される。ヒトでは、22 番染色体(22q11)の *GGT1* に活性酵素がコードされており(Heisterkamp et al., 2008)、GGT の発現は *GGT1* に依存している。GWAS により SNP と肝酵素との関連を評価した報告では、*GGT1* SNP rs5751901 は GGT 活性と強い関連を示した(Seo et al., 2020)。また、*GGT1* SNP rs5751901 は GGT 活性の変化を引き起こし、喫煙者では急性膵炎発症のリスクが上昇していた(Ściskalska et al., 2020)。オーストラリア人を対象として GWAS を行い血清 GGT 活性と SNP の関連性を検証した報告では、5 つの SNP で有意な関連がみられ、そのうちの 1 つが *GGT1* rs5751901 であった(Middelberg et al., 2012)。加えて、日本人を対象として行われた GWAS では、GGT 活性値は *GGT1* rs5751902 と有意な関連がみられ、これは今回検証した rs5751901 と非常に近い位置に存在している(Kamatani et al., 2010)。以上のように、*GGT1* SNP rs5751901 が GGT の発現に影響を与えていることは間違いないことと考える。

GGT1 と炎症経路の関与については、本研究では、BC-1 細胞において *GGT1* の発現を抑制することによって NF- κ B p65 の核移行が抑えられることを示した。これは、ヒトのメラノーマ細胞において GGT 活性の刺激により p65 の核移行が促進し、GGT 活性の阻害により p65 の核移行が抑制された報告(Maellaro et al., 2000)と矛盾のない結果である。また、GGT は炎症性脂質メディエーターであるロイコトリエン(leukotriene: LT)の C4 から D4 への変換を触媒し、内皮細胞の接着やマスト細胞によるケモカインの産生などの炎症性活動を促進するといわれている(Steinke and Borish, 2004)。遺伝的に GGT が欠損している患者では、LTD4 の生合成が完全に欠如している一方、LTC4 の濃度は上昇していた(Mayatepek et al., 2004)。また、*GGT1* に依存した活性酸素の産生が、NF- κ B の DNA 結合およびトランス活性を誘導することがわかっている(Accaoui et al., 2000)。以上のように、*GGT1* が複数の経路で炎症を惹起することが考えられるが、どの経路が最も急性膵炎惹起に寄与しているのかは不明である。さらに、GGT1 が NF- κ B 経路に作用する詳細なメカニズムも明らかとなっておらず、今後の研究が期待される。本研究では *GGT1* と IL-6 アンプとの関連を示すことができ、これまで報告されていなかった機序での *GGT1* の炎症惹起機構の解明につながるものと考ええる。

本研究の問題点としては、第一に症例数が少ないことが挙げられる。*GGT1* SNP rs5751901 の有無に関しては今回の症例数でも有意差が確認されたが、より症例数を増やすことで他の SNP でも有意差がでる可能性がある。また、今回は単施設、限られた期間、PEP に限定した症例集積であったが、今後多施設で PEP に限らずアルコール性や胆石性の急性膵炎の症例を集積できれば、急性膵炎のリスク因子としてより信

頼性の高い結果が得られると考える。第二には、*in vitro* の実験においてヒト神経膠腫細胞株 H4 およびマウス血管内皮細胞株 BC-1 を使用し、膵臓の細胞を用いていないことである。また、*in vivo* の実験においても、皮膚炎での炎症抑制効果を示したのみである。今後、ヒトの膵臓細胞を用いて IL-6 アンプとの関連や p65 核移行に関して検証を行い、また、マウスの膵炎モデルなどを用いて実験を行うことで、より説得力のある結果が得られることが期待される。第三には、今回の SNP が具体的にどのような機序で膵炎発症に関与しているのかを解明できていないことである。上述のように、*GGTI* SNP rs5751901 が *GGTI* 分子の発現を亢進し炎症を惹起することで膵炎発症に関与していること、p65 のサイトカイン依存性の核移行を制御していることが示唆されるが、詳細な分子機構の解明には至っていない。これらの詳細な機序が明らかになることで、膵炎に限らず他の疾患との関連についても新たな知見が得られる可能性があると考ええる。

結論

- *GGTI* 遺伝子は NF- κ B 経路を介して IL-6 アンプを正に制御する。
- PEP 患者では、非 PEP 患者に比べて、*GGTI* のリスク多型 SNP rs5751901 を有する(C/C もしくは T/C)割合が有意に多く、*GGTI* SNP rs5751901 が PEP の関連遺伝子である可能性がある。
- *GGTI* は NF- κ B p65 の核移行に関与している。
- マウスモデルにおいても、NF- κ B 経路に作用して炎症に関与する。

PEP は、ERCP の合併症として最も高頻度で重大な合併症である。しかし PEP を含めた急性膵炎の治療薬で確定的に有効なものはこれまでなく、その予防法も限られている。PEP に関しては患者要因、手技要因でリスク因子が同定されているが、遺伝的なリスク因子はこれまで報告がなかった。

本研究は、*GGTI* のリスク多型 SNP rs5751901 が PEP の遺伝的リスクとなり得ることを示した、調べた限りでは初めての報告である。また、*GGTI* SNP rs5751901 が喫煙者で急性膵炎のリスクとなることを示した既報はあるものの、その機序および分子機構は明らかとなっていなかった。本研究では *GGTI* SNP rs5751901 が *GGTI* の発現量に影響を与え、NF- κ B 経路を介して炎症に関与していることを示すことができた。

今後、さらに症例数を増やすことで *GGTI* SNP rs5751901 が PEP のリスク因子として確かであることを示す必要がある。*GGTI* の発現が膵炎発症に影響を与えることはこれまでの報告と合わせても確定的であるため、rs5751901 以外の *GGTI* SNP が PEP に関与している可能性を模索する研究も期待される。将来的に SNP を簡便に解析できるようになれば、PEP の予防に関して非常に有用であると考ええる。そして、この SNP が膵炎発症や重症化に関与する詳細な分子機構が明らかとなれば、アンタゴニストの開発や創薬につながることを期待される。また、*GGTI* のノックアウトマウスを作製し膵炎を発症させることで、急性膵炎の発症や重症化における *GGTI* の働きが解明できる可能性がある。

GGTI は様々な疾患と関連していること、およびその分子機構も明らかとなってきた。しかし膵炎との関連についてはその分子機構を詳細に解析したものではなく、ノックアウトマウス作製などを通して *GGTI* と膵炎との関連についてより明らかにすることが今後の課題と考える。また、次世代シーケンサーを用いた RNA シーケンスにより、より多くの急性膵炎関連遺伝子を同定できる可能性があり、今後の研究が期待される。

謝辞

本研究の機会を与えて頂いた北海道大学大学院医学研究科内科学講座消化器内科学教室の坂本直哉教授に謝意を表します。

本研究全般にわたり直接ご指導ご鞭撻賜りました北海道大学遺伝子病制御研究所分子神経免疫学の村上正晃教授に深く感謝いたします。

本研究の立案・計画から、論文作成、臨床など、様々な面でご指導頂きました北海道大学病院消化器内科講師の栗谷将城先生に心より御礼申し上げます。

手術検体の提供を快く許可して下さった北海道大学大学院医学研究科消化器外科学教室Ⅱの平野聡教授を始め同教室の先生方に深く感謝申し上げます。

本研究で用いた検体をご提供して下さったすべての患者様に感謝致します。

本研究の遂行にあたりご支援頂いた日本消化器内視鏡学会北海道支部の方々に深く御礼申し上げます。

最後に、本研究を遂行するにあたりご助言・ご協力・ご支援頂きました北海道大学大学院医学研究科内科学講座免疫消化器内科学教室および遺伝子病制御研究所分子神経免疫学の全ての皆様に心より御礼申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Accaoui, M.J., Enoiu, M., Mergny, M., Masson, C., Dominici, S., Wellman, M., and Visvikis, A. (2000). Gamma-glutamyltranspeptidase-dependent glutathione catabolism results in activation of NF- κ B. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 276, 1062–1067.

Angsuwatcharakon, P., Sodsai, P., Rerknimitr, R., and Hirankarn, N. (2018). The Polymorphisms at PRSS1-PRSS2 and MORC4 Loci and the Risk of Post-ERCP Pancreatitis. *Gastroenterology Research and Practice* 2018.

Atsumi, T., Singh, R., Sabharwal, L., Bando, H., Meng, J., Arima, Y., Yamada, M., Harada, M., Jiang, J.J., Kamimura, D., et al. (2014). Inflammation amplifier, a new paradigm in cancer biology. *Cancer Research* 74, 8–14.

Barreto, S.G. (2016). How does cigarette smoking cause acute pancreatitis? *Pancreatology* 16, 157–163.

Brand, H., Diergaarde, B., O’Connell, M.R., Whitcomb, D.C., and Brand, R.E. (2013). Variation in the F-glutamyltransferase 1 gene and risk of chronic pancreatitis. *Pancreas* 42, 836–840.

Chandrasekhara, V., Khashab, M.A., Muthusamy, V.R., Acosta, R.D., Agrawal, D., Bruining, D.H., Eloubeidi, M.A., Fanelli, R.D., Faulx, A.L., Gurudu, S.R., et al. (2017). Adverse events associated with ERCP. *Gastrointestinal Endoscopy* 85, 32–47.

Corti, A., Duarte, T.L., Giommarelli, C., de Tata, V., Paolicchi, A., Jones, G.D.D., and Pompella, A. (2009). Membrane gamma-glutamyl transferase activity promotes iron-dependent oxidative DNA damage in melanoma cells. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 669, 112–121.

Corti, A., Franzini, M., Cianchetti, S., Bergamini, G., Lorenzini, E., Melotti, P., Paolicchi, A., Paggiaro, P., and Pompella, A. (2012). Contribution by polymorphonuclear granulocytes to elevated gamma-glutamyltransferase in cystic fibrosis sputum. *PLoS ONE* 7.

Cotton, P.B., Lehman, G., Vennes, J., Geenen, J.E., Russell, R.C.G., Meyers, W.C., Liguory, C., and Nickl, N. (1991). Endoscopic sphincterotomy complications and their management: an attempt at consensus. *Gastrointestinal Endoscopy* 37, 383–393.

Cutri'n, J.C., Cutri'n, C., Zingaro, B., Camandola, S., Boveris, A., Pompella, A., and Poli, G. (2000). Contribution of glutamyl transpeptidase to oxidative damage of ischemic rat kidney.

Dixon, A.L., Liang, L., Moffatt, M.F., Chen, W., Heath, S., Wong, K.C.C., Taylor, J., Burnett, E., Gut, I., Farrall, M., et al. (2007). A genome-wide association study of global gene expression. *Nature Genetics* 39, 1202–1207.

Elmunzer, B.J., Scheiman, J.M., Lehman, G.A., Chak, A., Mosler, P., Higgins, P.D.R., Hayward, R.A., Romagnuolo, J., Elta, G.H., Sherman, S., et al. (2012). A Randomized Trial of Rectal Indomethacin to Prevent Post-ERCP Pancreatitis. *New England Journal of Medicine* 366, 1414–1422.

Emdin, M., Pompella, A., and Paolicchi, A. (2005). Gamma-glutamyltransferase, atherosclerosis, and cardiovascular disease: Triggering oxidative stress within the plaque. *Circulation* 112, 2078–2080.

Fazel, A., Quadri, A., Catalano, M.F., Meyerson, S.M., and Geenen, J.E. (2003). Does a pancreatic duct stent prevent post-ERCP pancreatitis? A prospective randomized study. *Gastrointestinal Endoscopy* 57, 291–294.

Fjeld, K., Weiss, F.U., Lasher, D., Rosendahl, J., Chen, J.M., Johansson, B.B., Kirsten, H., Ruffert, C., Masson, E., Steine, S.J., et al. (2015). A recombined allele of the lipase gene CEL and its pseudogene CELP confers susceptibility to chronic pancreatitis. *Nature Genetics* 47, 518–522.

Fujita, M., Yamamoto, Y., Jiang, J.J., Atsumi, T., Tanaka, Y., Ohki, T., Murao, N., Funayama, E., Hayashi, T., Osawa, M., et al. (2019). NEDD4 Is Involved in Inflammation Development during Keloid Formation. *Journal of Investigative Dermatology* 139, 333–341.

Hegyi, E., and Sahin-Tóth, M. (2019). Human CPA1 mutation causes digestive enzyme misfolding and chronic pancreatitis in mice. *Gut* 68, 301–312.

Heisterkamp, N., Groffen, J., Warburton, D., and Sneddon, T.P. (2008). The human gamma-glutamyltransferase gene family. *Human Genetics* 123, 321–332.

Jamer, T. [ETIOLOGY OF ACUTE PANCREATITIS--UNDERESTIMATED PROBLEM IN PEDIATRICS]. *Developmental Period Medicine* 19.

Kamatani, Y., Matsuda, K., Okada, Y., Kubo, M., Hosono, N., Daigo, Y., Nakamura, Y., and Kamatani, N. (2010). Genome-wide association study of hematological and biochemical traits in a Japanese population. *Nature Genetics* 42, 210–215.

Kanada, S., Nishiyama, C., Nakano, N., Suzuki, R., Maeda, K., Hara, M., Kitamura, N., Ogawa, H., and Okumura, K. (2011). Critical role of transcription factor PU.1 in the expression of CD80 and CD86 on dendritic cells. *Blood* 117, 2211-2222.

Kanda, Y. (2013). Investigation of the freely available easy-to-use software “EZR” for medical statistics. *Bone Marrow Transplantation* 48, 452–458.

Kanemaru, K., Matsuyuki, A., Nakamura, Y., and Fukami, K. (2015). Obesity exacerbates imiquimod-induced psoriasis-like epidermal hyperplasia and interleukin-17 and interleukin-22 production in mice. *Experimental Dermatology* 24, 436–442.

Kochar, B., Akshintala, V.S., Afghani, E., Joseph Elmunzer, B., Kim, K.J., Lennon, A.M., Khashab, M.A., Kalloo, A.N., and Singh, V.K. (2015). Incidence, severity, and mortality of post-ERCP pancreatitis: A systematic review by using randomized, controlled trials. *Gastrointestinal Endoscopy* 81, 143-149.e9.

Koziel, D., Gluszek, S., Kowalik, A., and Chlopek, M. (2017). CTSC gene polymorphism (p.G60=; c.180 C > T) in acute pancreatitis. *BMC Gastroenterology* 17.

Lankisch, P.G., Apte, M., and Banks, P.A. (2015). Acute pancreatitis. In *The Lancet*, (Lancet Publishing Group), pp. 85–96.

- Lee, D.-H., Ha, M.-H., Kim, J.-R., Gross, M., and Jacobs, D.R. (2002). Gamma-glutamyltransferase, alcohol, and blood pressure. A four year follow-up study. *Annals of Epidemiology* 12.
- MacArthur, J., Bowler, E., Cerezo, M., Gil, L., Hall, P., Hastings, E., Junkins, H., McMahon, A., Milano, A., Morales, J., et al. (2017). The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog). *Nucleic Acids Research* 45, D896–D901.
- Maellaro, E., Dominici, S., Delf Bello, B., Valentini, M.A., Pieri, P., Perego, P., Supino, R., Zunino, F., Lorenzini, E., Paolicchi, A., Comporti, M., Pompella, A. (2000). Membrane gamma-glutamyl transpeptidase activity of melanoma cells: effects on cellular H₂O₂ production, cell surface protein thiol oxidation and NF-κB activation status. *J. Cell Sci.* 113, 2671-2678.
- Mayatepek, E., Okun, J.G., Meissner, T., Assmann, B., Hammond, J., Zschocke, J., and Lehmann, W.D. (2004). Synthesis and metabolism of leukotrienes in γ-glutamyl transpeptidase deficiency. *Journal of Lipid Research* 45, 900–904.
- Melzer, D., Perry, J.R.B., Hernandez, D., Corsi, A.M., Stevens, K., Rafferty, I., Lauretani, F., Murray, A., Gibbs, J.R., Paolisso, G., et al. (2008). A genome-wide association study identifies protein quantitative trait loci (pQTLs). *PLoS Genetics* 4.
- Meng, J., Jiang, J.-J., Atsumi, T., Bando, H., Okuyama, Y., Sabharwal, L., Nakagawa, I., Higuchi, H., Ota, M., Okawara, M., et al. (2016). Breakpoint Cluster Region–Mediated Inflammation Is Dependent on Casein Kinase II. *The Journal of Immunology* 197, 3111–3119.
- Middelberg, R.P., Benyamin, B., de Moor, M.H.M., Warrington, N.M., Gordon, S., Henders, A.K., Medland, S.E., Nyholt, D.R., de Geus, E.J.C., Hottenga, J.J., et al. (2012). Loci affecting gamma-glutamyl transferase in adults and adolescents show age × SNP interaction and cardiometabolic disease associations. *Human Molecular Genetics* 21, 446–455.

Morimura, S., Oka, T., Sugaya, M., and Sato, S. (2016). CX3CR1 deficiency attenuates imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation with decreased M1 macrophages. *Journal of Dermatological Science* 82, 175–188.

Muddana, V., Lamb, J., Greer, J.B., Elinoff, B., Hawes, R.H., Cotton, P.B., Anderson, M.A., Brand, R.E., Slivka, A., and Whitcomb, D.C. (2008). Association between calcium sensing receptor gene polymorphisms and chronic pancreatitis in a US population: Role of serine protease inhibitor Kazal 1 type and alcohol. *World Journal of Gastroenterology* 14, 4486–4491.

Murakami, M., Harada, M., Kamimura, D., Ogura, H., Okuyama, Y., Kumai, N., Okuyama, A., Singh, R., Jiang, J.J., Atsumi, T., et al. (2013). Disease-association analysis of an inflammation-related feedback loop. *Cell Reports* 3, 946–959.

Murakami, M., Kamimura, D., and Hirano, T. (2019). Pleiotropy and Specificity: Insights from the Interleukin 6 Family of Cytokines. *Immunity* 50, 812–831.

Murray, B., Carter, R., Imrie, C., Evans, S., and O’suilleabhain, C. (2003). Diclofenac reduces the incidence of acute pancreatitis after endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Gastroenterology* 124, 1786–1791.

Mystakidis, K., Kouklakis, G., Papoutsis, A., Souftas, V.D., Efremidou, E., Kapetanios, D., Pitiakoudis, M., Lyratzopoulos, N., Karagiannakis, A., and Pantelios, A. (2012). Is post-ERCP pancreatitis a genetically predisposed complication? *Gastroenterology Research and Practice*.

Ogura, H., Murakami, M., Okuyama, Y., Tsuruoka, M., Kitabayashi, C., Kanamoto, M., Nishihara, M., Iwakura, Y., and Hirano, T. (2008). Interleukin-17 Promotes Autoimmunity by Triggering a Positive-Feedback Loop via Interleukin-6 Induction. *Immunity* 29, 628–636.

O’Reilly, D.A., Witt, H., Rahman, S.H., Schulz, H.-U., Sargen, K., Kage, A., Cartmell, M.T., Landt, O., Larvin, M., Demaine, A.G., et al. (2008). The SPINK1 N34S variant is associated with acute pancreatitis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 20.

Ota, M., Tanaka, Y., Nakagawa, I., Jiang, J.J., Arima, Y., Kamimura, D., Onodera, T., Iwasaki, N., and Murakami, M. (2020). Role of Chondrocytes in the Development of Rheumatoid Arthritis Via Transmembrane Protein 147–Mediated NF- κ B Activation. *Arthritis and Rheumatology* 72, 931–942.

Peery, A.F., Dellon, E.S., Lund, J., Crockett, S.D., McGowan, C.E., Bulsiewicz, W.J., Gangarosa, L.M., Thiny, M.T., Stizenberg, K., Morgan, D.R., et al. (2012). Burden of gastrointestinal disease in the United States: 2012 update. *Gastroenterology* 143.

Rai, P., Sharma, A., Gupta, A., and Aggarwal, R. (2014). Frequency of SPINK1 N34S mutation in acute and recurrent acute pancreatitis. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences* 21, 663–668.

Rosendahl, J., Witt, H., Szmola, R., Bhatia, E., Ózsvári, B., Landt, O., Schulz, H.U., Gress, T.M., Pfützer, R., Löhr, M., et al. (2008). Chymotrypsin C (CTRC) variants that diminish activity or secretion are associated with chronic pancreatitis. *Nature Genetics* 40, 78–82.

Rosendahl, J., Kirsten, H., Hegyi, E., Kovacs, P., Weiss, F.U., Laumen, H., Lichtner, P., Ruffert, C., Chen, J.M., Masson, E., et al. (2018). Genome-wide association study identifies inversion in the CTRB1-CTRB2 locus to modify risk for alcoholic and non-alcoholic chronic pancreatitis. *Gut* 67, 1855–1863.

Ściskalska, M., Ołdakowska, M., Marek, G., and Milnerowicz, H. (2020). Increased risk of acute pancreatitis occurrence in smokers with rs5751901 polymorphisms in *ggt1* gene. *International Journal of Medical Sciences* 17, 242–254.

Seo, J.Y., Lee, J.E., Chung, G.E., Shin, E., Kwak, M.S., Yang, J.I., and Yim, J.Y. (2020). A genome-wide association study on liver enzymes in Korean population. *PLoS ONE* 15.

Singh, P., Das, A., Isenberg, G., Wong, R.C., Sivak Jr, M. v, Agrawal, D., and Chak, A. Does prophylactic pancreatic stent placement reduce the risk of post-ERCP acute pancreatitis? A meta-analysis of controlled trials.

Stark, A.A., Zeiger, E., and Pagano, D.A. (1993). Glutathione metabolism by gamma-glutamyltranspeptidase leads to lipid peroxidation: characterization of the system and relevance to hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 14.

Steinke, J.W., and Borish, L. (2004). Leukotriene receptors in rhinitis and sinusitis. *Current Allergy and Asthma Reports* 4.

Tukiainen, E., Kylänpää, M.-L., Kemppainen, E., Nevanlinna, H., Paju, A., Repo, H., Stenman, U.-H., and Puolakkainen, P. Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor (SPINK1) Gene Mutations in Patients With Acute Pancreatitis.

Wang, Y., Tuomilehto, J., Jousilahti, P., Salomaa, V., Li, B., Antikainen, R., Mähönen, M., Katzmarzyk, P.T., and Hu, G. (2013). Serum γ -glutamyltransferase and the risk of heart failure in men and women in Finland. *Heart* 99, 163–167.

Weiss, F.U., Schurmann, C., Guenther, A., Ernst, F., Teumer, A., Mayerle, J., Simon, P., Völzke, H., Radke, D., Greinacher, A., et al. (2015). Fucosyltransferase 2 (FUT2) non-secretor status and blood group B are associated with elevated serum lipase activity in asymptomatic subjects, and an increased risk for chronic pancreatitis: A genetic association study. *Gut* 64, 646–656.

Weiss, F.U., Hesselbarth, N., Párniczky, A., Mosztbacher, D., Lämmerhirt, F., Ruffert, C., Kovacs, P., Beer, S., Seltsam, K., Griesmann, H., et al. (2018). Common variants in the CLDN2-MORC4 and PRSS1-PRSS2 loci confer susceptibility to acute pancreatitis. *Pancreatology* 18, 477–481.

Whitcomb, D.C., LaRusch, J., Krasinskas, A.M., Klei, L., Smith, J.P., Brand, R.E., Neoptolemos, J.P., Lerch, M.M., Tector, M., Sandhu, B.S., et al. (2012). Common genetic variants in the CLDN2 and PRSS1-PRSS2 loci alter risk for alcohol-related and sporadic pancreatitis. *Nature Genetics* 44, 1349–1354.

Witt, H., Luck, W., Christian Hennies, H., Claßen, M., Kage, A., Laß, U., Landt, O., and Becker, M. (2000). Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis.

Witt, H., Beer, S., Rosendahl, J., Chen, J.M., Chandak, G.R., Masamune, A., Bence, M., Szmola, R., Oracz, G., Macek, M., et al. (2013). Variants in CPA1 are strongly associated with early onset chronic pancreatitis. *Nature Genetics* 45, 1216–1220.

Yadav, D., and Lowenfels, A.B. (2013). The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology* 144, 1252–1261.

Zhang, H., Forman, H.J., and Choi, J. (2005). γ -glutamyl transpeptidase in glutathione biosynthesis. *Methods in Enzymology* 401, 468–483.