



Title	MUC16遺伝子多型の解析によるドライアイの検査法の開発
Author(s)	
Citation	令和5（2023）年度学部学生による自主研究奨励事業 研究成果報告書．2024
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/95170
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

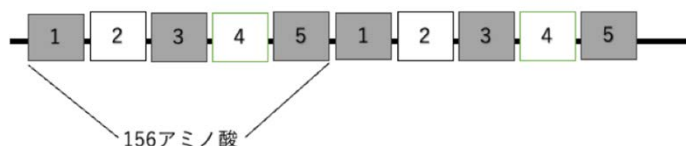
令和5年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな 氏名	かたやま ことは 片山 琴葉	学部 学科	医学部 保健学科	学年	3 年
ふりがな 共 同 研究者氏名		学部 学科		学年	年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	辻川元一	所属	医学系研究科		
研究課題名	MUC16 遺伝子多型の解析によるドライアイの検査法の開発				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。（先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽竊にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。）				

[1.研究目的]

眼の表面は角化しておらず、表面に粘膜層が存在し、それが外界からのバリアとして機能している。粘膜層の重要な物質として、角膜上皮細胞に発現しているムチンの一つである MUC16 がある。MUC16 はその粘性から、眼表面の保水性を保ち、眼表面の防御にも関係している。ムチン類は共通してリピート構造をもち、そこに糖鎖が修飾されることでそれらの機能を獲得している。MUC16 は、5つのエキソンからできた 156 アミノ酸を 1 単位としているリピート (Figure 1) があり、このリピート数には個人差があることが予想される[1]。リピート数が多い人は涙液の保水性が高く、少ない人は保水性が低いためドライアイ発症に繋がるのではないかと仮定し、そのリピート数の測定方法の開発を目的とした。[2]

Figure 1 (MUC16 のリピート構造)



[2.研究方法]

本研究では、MUC16に注目した。MUC16は、5つのエキソンからできた 156 アミノ酸を 1 単位としているリピートがあり、このリピート数は個人差があることが先行研究で示されている。今回この個人差を 5つのうち 1つのエキソンを縮重 Primer を用いて増幅、インターカレント法によって検

出し、*MUC16* の定常領域 (*Cterm* とする) と検討する。今回は、*MUC16* の増幅に 2 種類の縮重プライマーを使用し、その比較も行った。今回は、44 名の健常者検体の白血球 DNA を対象として実験を行い、それぞれの ΔC_t 値から *MUC16* のリピート数を比較した。データの正規性は Shapiro-wilk 検定を用いて確認した。今回使用したプライマー Table1 の通りである。

Table 1

MUC16(Primer1)

<i>Forward</i>	5'-ACNVVDRTGGAYVYYYVYCTGCA-3'
<i>Reverse</i>	5'-TCCAGDRHRTAGRRDCCCAG-3'

MUC16(Primer1)

<i>Forward</i>	5'-AGGYCHRWRAARRAYRGNDHWG-3'
<i>Reverse</i>	5'-BRWAGAGRCTRRTBBYKRTCCAG-3'

MUC16_Cterm**(リファレンス)**

<i>Forward</i>	5'-GTGACAGGTACAAGGTGGGG-3'
<i>Reverse</i>	5'-GTTCTGCCTCGTTGGATGA-3'

[3.研究結果]

Figure2(Primer1)

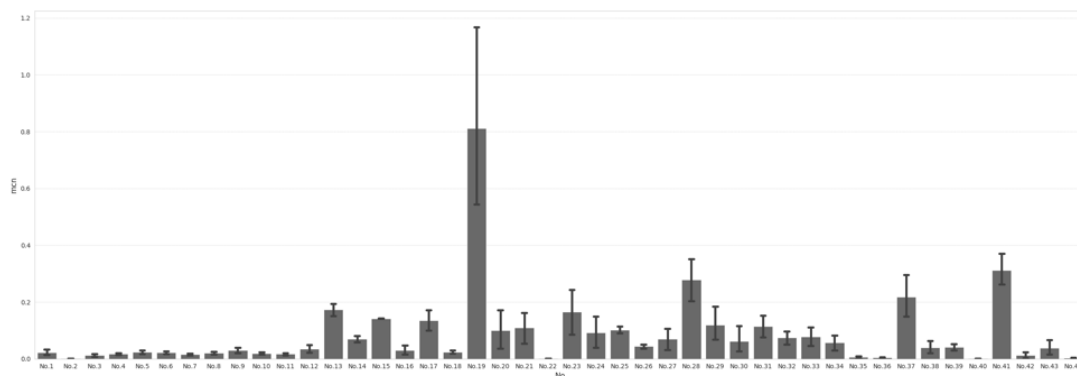


Table2(Primer1)

分散分析表

変動要因	分散	P-値
グループ間	0.151	1.18E-86
Shapiro-wilk 検定		
統計量	0.853	
P 値	0.190E-3	

Figure3(Primer2)

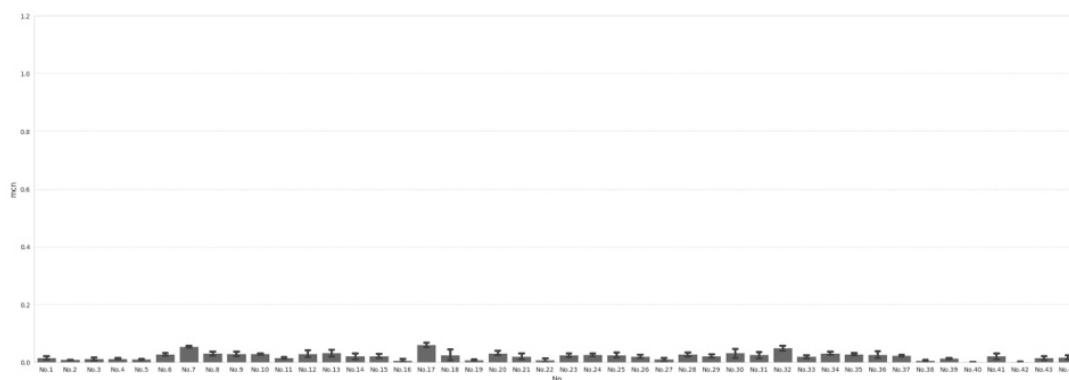


Table3(Primer2)

分散分析表

変動要因	分散	P-値
------	----	-----

グループ間	0.00118	1.45E-31
Shapiro-wilk 検定		
統計量	0.956	
P 値	0.103	

Figure2,3 は、全検体の *Cterm* に対する *MUC16* の発現量の発現量($2^{-\Delta Ct}$)を示したもので、Table2,3 はそれぞれ Figure2,3 の分散分析の結果と Shapiro-wilk 検定の結果である。Primer 1 では、検体間の分散が 0.151 (P 値=1.18e-86)であり、Primer2 では、検体間の分散が 0.00118 (P 値=1.45e-31)であった。どちらも全検体間のいずれかのペアに有意差があることが確認できた。Table2 より、Primer 1 では、Shapiro-wilk 検定の結果、p 値<0.05 であることから、Primer 1 のデータは正規分布しないと言える。Table4 より、Primer 2 では、Shapiro-wilk 検定の結果、p 値>0.05 であることから、Primer 2 のデータは正規分布していると言える。このことを踏まえて、次にプライマー間での分散の差をみる。

Figure 4

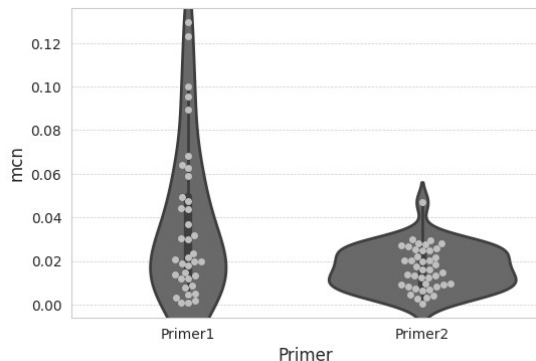


Table4

	<i>Primer1</i>	<i>Primer2</i>
<i>Mean</i>	0.03636	0.01682
<i>Variance</i>	0.001196	9.542e-05
<i>Standard deviation</i>	0.03458	0.009768

Figure4 は、それぞれの検体の *Cterm* に対する *MUC16* の発現量($2^{-\Delta Ct}$)を示したものである。この結果から、Primer1 の方が Primer2 よりも分散が 1 2 倍以上大きいことが確認できた。

[4.考察]

Primer1,2ともに、検体のリピート数の差を検出することができるが、Primer1の分散値が大きかったことから、個人のリピート数の差を検出しているのはPrimer1の方が優位と言える可能性が高い。リピート数の差が目の保水性に影響していると考えているため、*Cterm*に対する*MUC16*の発現量は個人差がある結果の方が感度よく検出できると予想できる。よって、今後の解析ではPrimer1を使用していく。問題点としては、今回の検討では正規性が証明できなかったことが挙げられる。また、検体によって得られる*MUC16*のCt値やMelt Peakにばらつきが出ることがみとめられるが、これは*MUC16*のリピート領域はリピート数だけでなく塩基配列にも個人差があり、混合塩基を使用したプライマーを使用しているため、プライマーが目的の配列とは違う場所に結合してしまう可能性が高くなること、縮重部分のTm値の差を検出しているためだと考える。

[5.今後の方針]

今回の実験では、再現性の確認ができていない検体がほとんどであるため、まずそれらの再現性を確認し、今回と同じように検体間での差をみる。その後、ドライアイ患者のサンプルを同様に解析し、今回実験した44検体と含めて、リピート数とドライアイ発症の相関関係があるかを検討していく。正しい数値を決定できるように、一度に得られる*MUC16*のCt値を増やすなどして対策を講じる必要がある。これを踏まえた上で、今後の実験を進めていきたい。

[6.謝辞]

本論文の作成にあたり、大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻教授 辻川元一先生には指導教官として終始適切なご指導ご鞭撻を賜りました。ここに深謝の意を表します。

[7.参考文献]

[1] Shantibhusan Senapati. Moorthy P Ponnusamy. Ajay P Singh. Maneesh Jain. Surinder K Batra, *MUC16 (mucin 16, cell surface associated)*. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 2007-10-01

[2]再生発生医学研究室 令和4年度修了 林真梨子 修士論文より引用