

	分担研究者	新潟大学大学院医歯学総合研究科	消化器内科学分野	助手	鈴木 健司	
	共同研究者	新潟大学大学院医歯学総合研究科	消化器内科学分野	摺木 陽久, 佐々木 俊哉, 渡辺 史郎, 河内 祐介, 朝倉 均		
		東京大学大学院医学研究科	分子予防医学	米山 博之, 成見 正作, 松島 綱治		
65.	抗 IP-10 抗体による炎症性腸疾患治療の試み					155
	分担研究者	新潟大学大学院医歯学総合研究科	消化器内科学分野	助手	鈴木 健司	
	共同研究者	新潟大学大学院医歯学総合研究科	消化器内科学分野	摺木 陽久, 佐々木 俊哉, 渡辺 史郎, 河内 祐介, 朝倉 均		
		東京大学大学院医学研究科	分子予防医学	米山 博之, 成見 正作, 松島 綱治		
66.	デキストラン硫酸誘発大腸炎に対する肝細胞増殖因子の治療効果に関する検討					156
	分担研究者	宮崎医科大学	第二内科	教授	坪内 博仁	
67.	腸管傷害修復過程に於ける TGF $\beta$ シグナリン Smad3 の役割の検討					157
	共同研究者	千葉大学医学部附属病院	第二内科	鈴木 康夫		
		千葉大学大学院医学研究院	細胞治療学	徳政 敦子, 勝野 達郎, 齋藤 康		
68.	DSS 誘発大腸炎における Transforming Growth Factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ ) の役割					159
	分担研究者	弘前大学医学部	第一内科	教授	棟方 昭博	
	共同研究者	弘前大学医学部	第一内科	櫻庭 裕丈, 石黒 陽, 山形 和史, 弘前大学医学部	細菌学	中根 明夫
69.	Prebiotics 投与による腸内細菌環境改善作用が潰瘍性大腸炎におよぼす影響について					161
	分担研究者	滋賀医科大学	第二内科	教授	馬場 忠雄	

厚生科学研究費補助金特定疾患対策研究事業  
「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」班  
分担研究報告書

潰瘍性大腸炎(UC)と Crohn 病(CD)のデータベースを拡張充実し、  
両疾患研究に資する態勢をつくる

分担研究者 名川 弘一 東京大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨：1) UCとCDの個人調査票について、統一書式案の作成が終了した(平成11年度)、厚生労働省を通じて各都道府県に本書式が配布された(平成12年度)、この統一個人調査票により、患者情報の整備・充実化が効率的に行えると考えられる。2) 35都道府県より送付されてきた個人調査票(平成10年、11年)は、潰瘍性大腸炎10719例、Crohn病5405例で、現在、入力作業中である。個人調査票から得られるデータは、炎症性腸疾患研究の観点から有用な基礎データとなる。一方、本データは個人情報であるため、その取扱いについては、慎重な管理・運営システムの構築が必要である。

共同研究者

下山 孝, 里見 匡迪  
所属 兵庫医科大学 消化器内科

A. 研究目的

- 1) 厚生省特定疾患医療受給者証交付申請にあたり、担当医が記載する個人調査票が各都道府県で異なるため、潰瘍性大腸炎とクローン病につき、統一した書式の個人調査表を作成することを目的とした。
- 2) 厚生労働省特定疾患医療受給者証交付申請における個人調査票のデータ(平成11年、12年)を電子化し、炎症性腸疾患の研究に資する態勢をつくることを目的とした。

B. 研究方法

- 1) 各都道府県で異なる個人調査票の書式を本研究班(内科医、外科医、病理医等)で討議し、その統一化を図った。
- 2) 個人調査票に記載されているデータを基に、ソフトとしてファイルメーカーを用い、電子化の作業を行った。(倫理面への配慮)

現在検討されている「個人情報の保護に関する法律」に抵触しない配慮をしており、現段階では本データに基づく発表ならびに第三者へのデータの供与は一切行っていない。

C. 研究結果

- 1) 担当医が記載する個人調査票として、患者の住所、病

態、治療、症状・所見等からなる統一書式案の作成が終了した(平成11年度)、厚生労働省を通じて各都道府県に本書式が配布された(平成12年度)。

- 2) 35都道府県より送付されてきた個人調査票(平成10年、11年)は、潰瘍性大腸炎10719例、Crohn病5405例で、現在、入力作業中である。本データは個人情報であるため、その取扱いについては、慎重な管理・運営システムの構築が必要で、これについても現在検討中である。

D. 考察

- 1) 個人調査票の書式統一化については、患者情報の均一化ならびに医療給付の観点から社会的意義が深い成果と考えられる。また、統一個人調査票により、患者情報の整備・充実化が効率的に行えると考えられる。今後、その使用目的を十分考慮し、目的にかなった書式となるよう、随時、見直しが必要となるであろう。
- 2) 個人調査票データの電子化については、炎症性腸疾患研究の観点から有用な基礎データとなる。特に疫学的研究の観点から学術的意義が深い成果と考えられる。一方、個人調査票の電子化データについては、個人情報であることを十分考慮した管理・運営システムの構築が必要であり、その上で社会に還元できる情報公開も必要と考えられる。

E. 結論

潰瘍性大腸炎およびクローン病の個人調査票について、統一書式が作成された。

炎症性腸疾患患者の個人調査票を基に、データの電子化作業を継続中である。

潰瘍性大腸炎の疫学的研究－わが国での問題点－

分担研究者 北洞 哲治 国立大蔵病院 臨床研究部 消化器科 医長

研究要旨：これまで本調査研究班において潰瘍性大腸炎(UC)の全国疫学調査が遂行されてきた。今回、2000～2001年の新たな調査を行い、従来の資料と合わせ、わが国のUCの現状について分析し、以下の5つの問題点が浮かび上がった。1) 世代とともに潰瘍性大腸炎の発病年齢は若年化傾向にある。2) 世代とともに潰瘍性大腸炎の罹患範囲は、全大腸炎型の占める割合が増える傾向にある。3) 世代に伴う本症発病様式の変化は、時代的な因子の関与が推測され、その要因の解析は素因も含め今後の検討課題である。4) 潰瘍性大腸炎の生命予後は改善されつつあるが、今後は、増加する大腸癌が主要な予後因子に位置付けられると予測され、対応は急務である。5) 潰瘍性大腸炎における胃癌の若年発生は本当か。これらの問題点は、UC発病の要因の解明、UC治療予後の改善にとって重要な課題を提起するものであり、今後、さらに詳細に検討されるべき内容と解釈される。

共同研究者

横山 巽子, 宇都宮利善, 小野ひろみ<sup>1)</sup>,  
林 篤, 大原 信, 田代 博一<sup>2)</sup>  
所属 国立大蔵病院 臨床研究部<sup>1)</sup>,  
国立大蔵病院 消化器科<sup>2)</sup>

表現されたが、この横ばい状態が一つの安定期に入ったのか、その構成因子は単一なのか検討を行った。その結果、UC発病率が増加のピークを迎え比較的安定した状態がみられた1974年から1983年の10年間につき(図1)、その年齢階層別にみた発病率の年度別推移をみると、年齢層が10歳～14歳、15歳～19歳、20歳～24歳の3年齢階層のみで発病率の増加がみられ、その他の年齢階層では一部横ばい、多くは減少傾向が示された(図2)。この発病年齢階層別の年度別推移の変化は、男性、女性共同様の傾向であった。

A. 研究目的

これまで本調査研究において潰瘍性大腸炎(UC)の全国疫学調査が、1973年より20年以上にわたり行われてきた。今回、2000～2001年の新たな追跡調査および新規症例登録がなされ、従来の資料と合わせ、わが国のUCの現状の分析および問題点を明らかにする目的にて解析を行い、種々の分析の中UCの発病様式および予後につきいくつかの視点を得たのでその調査結果につき報告する。

B. 研究方法

1973年より続けられてきたと同様の方法で今回全国の病院にアンケート方式で調査を行い新規登録症例、追跡調査症例の情報をこれまでの調査資料に加え、種々の項目について解析を行った。

C. 研究結果

1. 潰瘍性大腸炎の発病様式

これまで報告してきたごとく、本調査ではわが国でのUCの発病率は1960年代より急激な増加を示し、1970年代に横ばい状態となった。UCの発病に影響を与える因子をさぐる一つの方法として、わが国での発病を年代とともに分析し、時代とともに変化がみられるか検討を試みた。

1) 潰瘍性大腸炎の発病年齢

わが国のUC発病率は1970年代に横ばい状態として

図1 潰瘍性大腸炎の年度別発病率

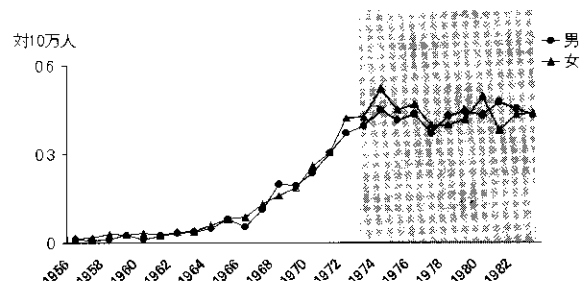
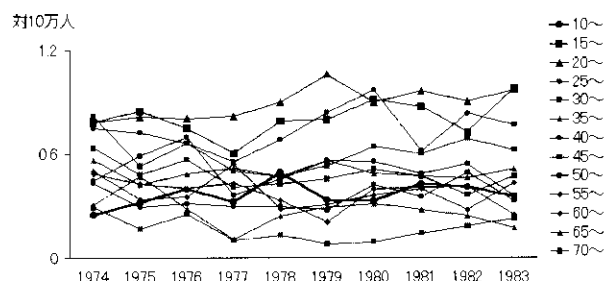


図2 潰瘍性大腸炎の年度別・年齢階層別発病率

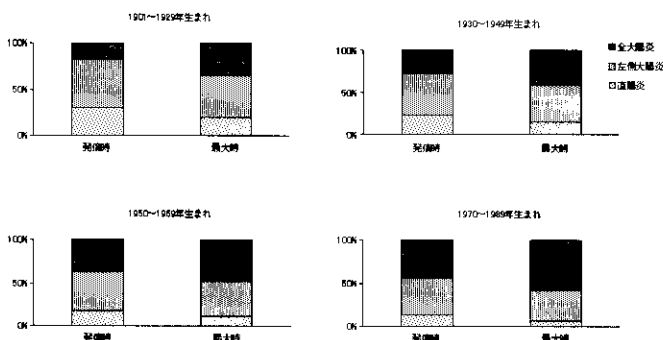


## 2) 潰瘍性大腸炎の罹患範囲

UCは罹患範囲により直腸炎型、左側大腸炎型、全大腸炎型の3型に分類されている。時代による発病様式の変化の一つとして発病時と最大時の罹患範囲の検討を行った。発病時と最大時の罹患範囲が明記されており、発病年が1950～1994年の症例を解析対象とした。

患者の生年を1901～1929年、1930～1949年、1950～1969年、1970～1989年の4時代に分け比較すると、発病時における全大腸炎型の占める割合が患者の生まれた時代とともに増加している現象が伺われた。最大時の罹患範囲も、時代とともに全大腸炎型の割合が多くなっていった。特に生年が1970年以降の場合、進展例も多くなる傾向にあり、進展例も含めると、罹患範囲の最大時では全大腸炎型が50%を超える状態となっていた(図3)。

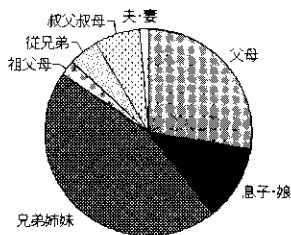
図3 潰瘍性大腸炎の世代別罹患範囲構成



## 3) 潰瘍性大腸炎の家族内発病

報告された家族内発病は230家系、1.8%であった。続柄で最も多いのは兄弟姉妹、ついで親子の関係であり、親子と兄弟で84.3%を占めていた。血縁関係のない夫婦は最も少なく0.02%であった(図4)。

図4 潰瘍性大腸炎の家族内発病の続柄 - 230家系 -



## 2. 潰瘍性大腸炎の予後

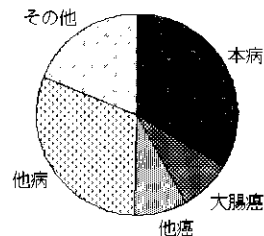
UC患者の予後につき検討を行ったところ、UCの死因と癌の併発に特異な時代的変化が認められた。

### 1) 潰瘍性大腸炎の年齢階層別死因

UCの死因を、UCの病気自体が直接原因と考えられるもの(本病)、大腸癌、大腸癌以外の癌(他癌)、その他の病気(他病)、自殺、事故などその他による死亡(その他)と5領域に分類し比率をみるとともに(図5)、年齢階層別に検討した。

本病による死亡は全年齢層に分散してみられ、20代をピークとし高齢になるほど減少するというUC発病率の高い年齢層に一致する分布となっており、本病の死因は、UC発病より短期間に発生していることが示された。一方、他病死は、高年齢となるほど増加する傾向にあり、他病死の主な原因は、急性心筋梗塞、心不全などの心疾

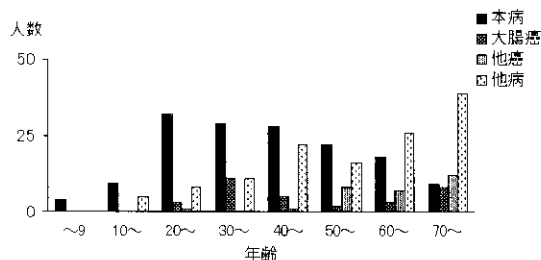
図5 潰瘍性大腸炎の死因 - 481例 -



患、脳出血、脳梗塞などの脳神経疾患、肝不全、腎不全など臓器不全疾患であり、一般人口の高齢者の疾患頻度・死因と同様のものとなっていた。

UC患者における癌併発も死因では重要な位置を占めていた。癌による死因では、大腸癌と大腸癌以外のその他の癌で明らかな傾向の違いが認められた。大腸癌は30代をピークとして若年を中心に高齢まで分布していたのに対し、他癌は一般人口同様高齢になるほど増加する分布を示していた(図6)。

図6 潰瘍性大腸炎の年齢階層別死因



### 2) 潰瘍性大腸炎の年代別死因

死因の本病、大腸癌、他癌、他病につき1980年以前、1981～1990年、1991～2000年の時代に分け傾向をみた。本病による死因は3年代とともに著明に減少し、大腸癌、他癌を含めた癌による死亡数が増加していた(図7)。死因を年代別に占める割合で比較すると、時代とともに本病による死因の減少、大腸癌、他癌の癌による死因の割合が著しく増える傾向がみられた(図8)。

図7 潰瘍性大腸炎の年代別死因

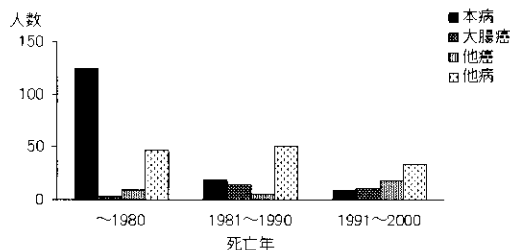


図8 潰瘍性大腸炎の年代別死因の割合



### 3) 潰瘍性大腸炎に併発した悪性新生物

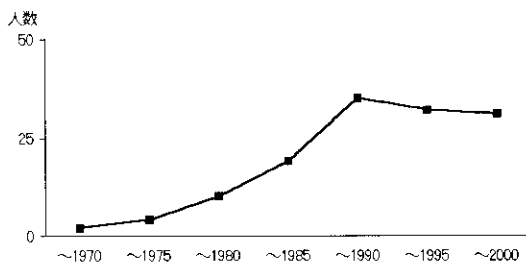
UCに併発した悪性新生物の54%が大腸癌であり、大腸癌の一般人口の発生率と異なりUCでは、女性にやや多いという特異な現象がみられた。その他の癌では、胃癌、乳癌、肝・胆のう癌の順であり、わが国の癌発生頻度の傾向と一致していた。UC併発癌での特徴は全体的にみて、女性に多いという一般人口の動向と違う傾向がみられたことにある(男性1770/10万人、女性2389/10万人)(表1)。

表1 潰瘍性大腸炎に併発した悪性新生物

	全体 (%)	男性	女性
大腸	147 (54)	66	81
胃	26 (10)	17	9
乳房	20 (7)	0	20
肝・胆のう	16 (6)	8	8
子宮・卵巣	10 (4)	0	10
食道	4 (1)	2	2
腎・泌尿器	4 (1)	3	1
その他	28 (10)	14	14
不明	15 (6)	8	7
計	270 (100)	118	152

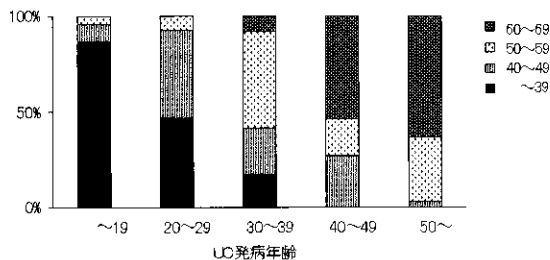
UCにおける大腸癌は併発癌全体の50%強を占める特異な頻度を示したが、その発生数は、1975年以後急激な増加となっていた(図9)。

図9 潰瘍性大腸炎の大腸癌発病数の年推移



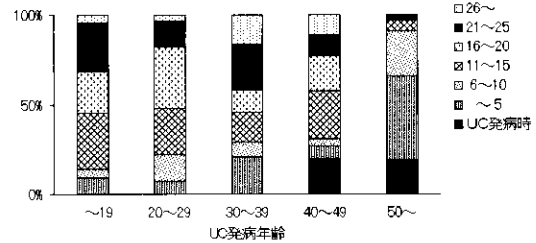
UCの発病年齢別に大腸癌併発の年齢を対比した。UC発病年齢が19歳以下では30歳代までの大腸癌併発が86%、20歳代UC発病では、46%とUC若年発病では若くして大腸癌の併発がみられた(図10)。

図10 潰瘍性大腸炎の発病年齢と大腸癌併発の年齢



UC発病年齢別に大腸癌併発までの年数をみると、UC発病年齢が19歳以下、20歳代ではUC発病より10年以上経過した後に大腸癌の併発がみられた例は、86%、78%を占めたのに対し、UC発病が50歳以上では、91%の症例で10年以内の大腸癌の併発が認められた(図11)。

図11 潰瘍性大腸炎の発病年齢と大腸癌併発までの年数



### D. 考察

1973年以来、当調査研究班にて遂行してきたUCの全国疫学調査につき2000年~2001年の新規登録症例、追跡症例を加え集積を行うとともに現時点の問題点の解析を試みた。その結果多くの分析結果が得られたが、その中より今回、下記の5つの問題点が浮かび上がった。

- 1) 世代とともに潰瘍性大腸炎の発病年齢は若年化傾向にある。
- 2) 世代とともに潰瘍性大腸炎の罹患範囲は、全大腸炎型の占める割合が増える傾向にある。
- 3) 世代に伴う本症発病様式の変化は、時代的な因子の関与が推測され、その要因の解析は素因も含め今後の検討課題である。
- 4) 潰瘍性大腸炎の生命予後は改善されつつあるが、今後は、増加する大腸癌が主要な予後因子に位置付けられると予測され、対応は急務である。
- 5) 潰瘍性大腸炎における胃癌の若年発生は本当か？

提起されたまとめ1), 2)にみられるUC発病の問題点は、本症発病における従来より指摘されている遺伝的素因と環境的要因の関与の関係につき一つの方向性を示唆する成績と解釈される。家族内発病の多発より、遺伝的素因は完全に否定されるものではないが、家族内発病の時代的变化は少なく、本現象は、いわゆる遺伝的な素因以外の因子の関与が多いと解釈すべきで、若年発病をもたらす背景、いかえると時代的な環境背景変化の作用を考えるのが妥当とみなされる。この要因の詳細な解析はUC発病を考える上で今後の重要な検討課題となろう。

一方、UCの予後を推測する上で、本症に起因する死亡例が最近著しく減少してきた事実は、UC治療の基本的向上が広く図られた結果であり本調査研究班のこれまでの活動成果の寄与するところが大きく、評価される成績ととらえられる。その反面、癌による死亡例が増加しつつあることは今後の重要問題である。他病死と同様、大腸癌以外の癌による死亡は、わが国の高齢者に一致してUC症例の高齢化に伴って生じている現象と推定されるが、大腸癌に焦点を絞ると大腸癌の併発は若年層に多く、また死亡年齢も一般の大腸癌より若年に多く、その対策は急務な問題となりつつある。UCに併発する大腸癌は1975年以後急激に増えており、1981~1990年の大腸癌による死亡数は、それ以前より急増した。しかしながら、1991~2000年では大腸癌による死亡は逆に減少していた。これはUCに大腸癌が若年で併発しやすく若年死因の危険因子となりうること、その対策としてUCでの大腸癌併発に対するサーベイランスの遂行が大切であることが周知されつつあり、その実行が効を奏しつつあるのではないかと考察される。これも本調査研究班の活動が、大きな貢献となっていると評価されるが、さらに嚴重なサーベイランスの徹底が今度とも望まれ、

その成果が期待される場所である。

最後に、UCでは一般人口に比し大腸癌の若年発病がこれまで注目されてきたが(図12)、頻度こそ高くないがUCに併発する胃癌の発病年齢も一般人口に比し若年である結果が今回得られた(図13)。症例数が未だ少なく結論的なことはまだ示唆されないが、新たな問題として今後病態への考慮も含め検討されるべきものと考えられる。

図12 大腸癌の年齢構成

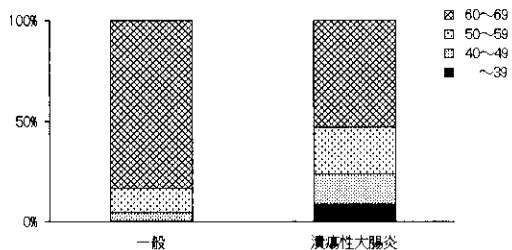
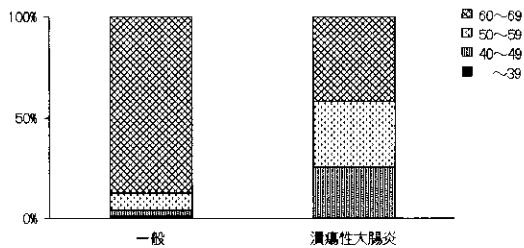


図13 胃癌の年齢構成



## 潰瘍性大腸炎とクローン病の遺伝的素因に関わる候補遺伝子の研究

分担研究者 田村 和朗 兵庫医科大学 先端医学研究所 家族性腫瘍部門 助教授

研究要旨：炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎，クローン病）発症の遺伝的背景にHLAハプロタイプやサイトカインの遺伝子型との相関が指摘されてきたが，日本人の遺伝的素因を明らかにすることを本研究の目的とした．*TNF*遺伝子，*TNFRSF1A*遺伝子，*TNFRSF1B*遺伝子さらには*IL18*遺伝子と炎症性腸疾患との関連性を変異解析/多型解析により検討した．さらに*NOD2*遺伝子と炎症性腸疾患の関連も検討に加えた．*TNF*遺伝子のハプロタイプAG(-308A，-238G)は潰瘍性大腸炎と有意な相関が認められた．*TNFRSF1B*遺伝子のハプロタイプAT(1466A，1493T)保有者はクローン病と有意な相関が認められた．瘻孔形成例，難治例でより強い相関を示した．*IL18*遺伝子のコドン35多型でTCCアレル保有とクローン病との間に相関を認めた．特に発症率の低い女性患者で強い相関を認められ，*IL18*遺伝子が遺伝的背景の一端を担う可能性が示唆された．*NOD2*遺伝子変異/多型がクローン病と相関することが欧米で示されたが，日本人患者では同一の遺伝子変化は認められず，新しい変異が検出されつつありあり，*NOD2*遺伝子とわが国の炎症性腸疾患との関連を今後明確にしていく必要がある．

### 共同研究者

指尾 宏子，古山 順一  
 所属 兵庫医科大学 遺伝学

### A. 研究目的

炎症性腸疾患(inflammatory bowel disease:IBD)に属する潰瘍性大腸炎(ulcerative colitis:UC)とクローン病(Crohn's disease:CD)の原因は未だ不明である。消化管粘膜に慢性非特異性炎症が持続し，たとえ一時的な緩解を得ても再燃を繰り返す難治性疾患である。両疾患とも若年期から発症する例が多く，罹患者の苦悩は甚だしく，原因究明と根治的治療の開発が切望されている。

多くの疾患は個人が生まれつき備えている易罹患性あるいは感受性(susceptibility, liability)と後天的に身体的変化(手術など)が生じたり，環境要因などの多種多様な外的因子が複雑に作用しあって発症することが知られている。関係するすべての要因の相互関係から生まれ出る機能の総和が，一定の閾値以上に達すると発病にいたることは，multifactorial threshold theoryで明らかにされてきた<sup>2)</sup>。UCとCDは消化管粘膜の局所免疫システムを主体とする生体防御機構に何らかの異常が生じ，慢性化に転じた結果と考えられる。その機序に関わる因子は，実に多様な因子でいわゆる多因子病であると認識されている。生来持ち合わせている形質のなかで本症発症に直接関わる因子(易罹患性)として，腸管粘膜の透過性と局所免疫機構が重要であることが予想される。さらには細胞周期やアポトーシス関連分子など細胞分裂・維持，細胞死に関係する機構にも関与しているものと考えられる。

遺伝要因がIBDに係わるという報告は，まず遺伝疫学的調査からなされた。同じ地域に在住するユダヤ系集団と他の民族集団を比較して，前者にIBD罹患率が高く，人種による易罹患性に差があることが明らかとなり，遺伝的背景の関与が示唆された。また，家族内集積が認められる場合，その第一度近親者の再発危険率は一般集団に比較し，10倍も高いことが示された<sup>3)</sup>。双生児を対象とした調査から，一卵性双生児のUC発症の一致率は18.2%，CDの一致率は58.3%であり，二卵性双生児の4.5%，0%と比較し有意に高かった<sup>4)5)</sup>。同一のゲノムを共有する一卵性双生児での一致率が高いことは遺伝的要因の存在を明らかにしている。

IBDは強直性脊椎炎，尋常性乾癬，原発性硬化性胆管炎，甲状腺炎，多発性硬化症，Turner症候群などをしばしば合併し，HLAタイピングや核型分析からIBDの発症に遺伝的側面が関与していることが指摘されてきた。

多因子が複雑に関わる疾患の感受性遺伝子を単離することは単一遺伝子病に比較し，数段困難を要する。研究方法はおもに次の二種類が知られている。一つは家系内特に兄弟姉妹で複数の罹患者がいる場合，罹患同胞間では該当する遺伝子の遺伝子型は一致するだろうという仮説を基に，遺伝子マーカーを用いてゲノムワイドにスクリーニングする方法である(sib pair linkage method)。第二の方法は家系内集積にとらわれず，罹患者群と健常対照者群での遺伝子型の差を遺伝子マーカーによりスクリーニングする方法である。従来遺伝子マーカーとして制限酵素断片長多型(restriction fragment length polymorphism:RFLP)が用いられてきたが，VNTR(variable number of tandem repeat)，dinucleotide repeatやtrinucleotide repeatなどのマイクロサテライトマーカー

を用いることでゲノム全体に対応できるようになってきた。さらに最近ではヒトゲノムをシークエンスレベルで解析することが容易になり、ゲノム中に存在する single nucleotide polymorphism(SNP)を用いることが常套手段となってきた。

兄弟発症例を基にしたリンケージ解析(sib pair method)から、現在までに感受性遺伝子の存在する遺伝子座の候補が報告されており、その染色体番号は1, 3, 4, 5, 6, 7, 12, 16, 19である<sup>6-18)</sup>。特に第16番染色体はIBD1, 第12番染色体はIBD2, 第6番染色体はIBD3, 第14番染色体はIBD4, 第5番染色体はIBD5, 第19番染色体はIBD6, 第1番染色体はIBD7としてMendelian Inheritance of Man等に掲載されている<sup>19)</sup>。

著者らはさまざまな分野から報告された研究を基にして、IBD発症あるいはその病態を左右する分子の遺伝情報を担っている遺伝子を候補遺伝子とし、遺伝的背景を探る糸口と考えている (Table1)。

Table1. Candidate genes for inflammatory bowel disease

Chr.	Gene Map Locus	MIM	Gene	Full Title
1	1p36.3-p36.2	191191	TNFRSF1B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
2	2q12-q21	147760	IL1A	interleukin 1 alpha
2	2q13-q21	147720	IL1B	interleukin 1 beta
2	2q12	147810	IL1R2	interleukin 1 receptor, type I
2	2q12-q22	147811	IL1R2	interleukin 1 receptor, type II
2	2q14.2	147679	IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist
2	2q35	146929	IL8RA	interleukin 8 receptor, alpha
2	2q35	146928	IL8RB	interleukin 8 receptor, beta
3	3p21	142408	HGF	hepatocyte growth factor-like protein
3	3p21	139360	GNAI2	guanine nucleotide-binding protein, alpha-inhibiting activity polypeptide 2
3	3q12-13.2	161560	IL12p35	interleukin 12A
4	4q12-q21	146930	IL8	interleukin 8
4	4q26-q27	147680	IL2	interleukin 2
5	5q31	147780	IL4	interleukin 4
5	5q31-q33	161561	IL12p40	interleukin 12B
6	6p21.3	142857	HLA-DRB1	major histocompatibility complex, Class II, DR beta-1
6	6p21.3	191160	TNF	tumor necrosis factor
6	6q23-q24	107470	IFNGR1	interferon gamma, receptor 1
7	7p12.3-p12.1	131550	EGFR	epidermal growth factor receptor
7	7q22	158371	MUC3	mucin 3, intestinal
8	8q12-q13	146660	IL7	interleukin 7
11	11q22.2-q22.3	600953	IL18	interleukin 18
10	10p15-p14	147730	IL2RA	interleukin 2 receptor, alpha
12	12p13.2-q24.1	601458	IBD2	inflammatory bowel disease 2
12	12p13.2	191190	TNFRSF1A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
12	12q12-q14	601769	VDR	vitamin D receptor
12	12q24.1	147570	IFNG	interferon gamma
16	16p12-q13	266600	IBD1	inflammatory bowel disease 1
16	16p11.2	107265	CD19	antigen CD19
16	16p11.2	182160	SPN	siatophorin; SPN; GPL115
16	16p11.2	153370	CD11A	CD11, alpha
16	16p12.1-p11.2	147781	IL4R	interleukin 4 receptor
16	16q12	605956	NOD2	NOD2 protein
21	21q22.1-q22.2	147569	IFNGR2	interferon gamma, receptor 2
22	22q11.2-q13	146710	IL2RB	interleukin 2 receptor, beta
X	Xq13	306380	IL2RG	interleukin 2 receptor, gamma

## B. 研究方法

- 潰瘍性大腸炎患者、クローン病患者の病態、家族集積性の情報収集を行うとともに、インフォームドコンセントを得た上で、末梢血からDNA/RNA抽出を行った。健康成人を対照群とし、同様に核酸試料を抽出し、遺伝子多型解析に供した。
- 遺伝子多型解析は本症の炎症に強く関与していると考えられる *TNF* 遺伝子(6p21.3)とその受容体をコードする *TNFRSF1A* 遺伝子(12p13.2)および *TNFRSF1B* 遺伝子(1p36.3-p36.2)を候補として、それぞれの single nucleotide polymorphism(SNP)を用いて解析した。
- TNF* 遺伝子は5'プロモーター領域に存在する -308 G/A, -238 G/Aの多型を用いて解析した。*TNFRSF1A* 遺伝子はコドン12の CCA/CCG多型を用いて解析した。*TNFRSF1B* 遺伝子は3'非翻訳領域の2ヶ所の SNP, nt.1466 A/G, nt.1493 C/T多型を用いて解析した。それぞれの SNP 解析は DNA シークエンス法による。

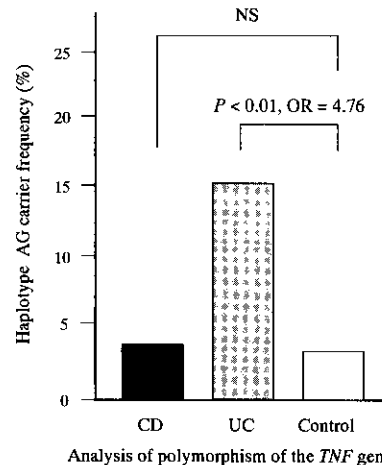
- TNF* 遺伝子の近傍に位置し、本疾患との関連が報告されている HLA DR の DNA タイピングを HLA DRB1 エキソン2のシークエンス解析により行った。
- Interferon- $\gamma$  産生を誘導する interleukin-18 をコードする *IL18* 遺伝子(11q22.2-q22.3)のコドン35の TCA/TCC 多型を用いて疾患との関連を検討した。
- NF- $\kappa$ B 産生を促す Nod2 をコードする *NOD2* 遺伝子(16q12)の当初欧米の報告で示された主要遺伝子変異, 2104 C to T(Arg702Trp), 2722 G to C(Gly908Arg), 3020 insC(1007fs)の頻度を各疾患で求め、対照群と比較する。
- TNFRSF1A* 遺伝子, *TNFRSF1B* 遺伝子, *IL18* 遺伝子および *NOD2* 遺伝子に関しては全翻訳領域の DNA シークエンス解析を行い、遺伝子変異検出を試みた。
- 対立遺伝子およびハプロタイプの頻度を基に  $\chi^2$  検定および Mantel-Haenszel 法で統計解析を行った。

## C. 研究結果

### 1-1. *TNF* 遺伝子多型との相関<sup>20)</sup>

*TNF* 遺伝子は5'プロモーター領域に存在する -308 G/A, -238 G/A の SNP 解析から4種類のハプロタイプに分類されるが、その内でハプロタイプ AG (-308 A, -238 G) 頻度は潰瘍性大腸炎と有意な相関が認められた ( $P < 0.01$ , OR=4.76, 95%CI=1.53-14.74, Fig.1)。

Fig.1. Haplotype AG carrier frequency of the *TNF* gene  
P: p-value, OR: odds ratio, NS: not significant



### 1-2. HLA-DRB1 遺伝子ハプロタイプとの相関<sup>20)</sup>

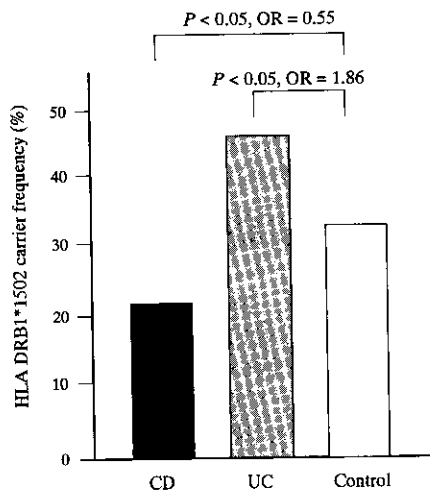
HLA と潰瘍性大腸炎との相関解析において *HLA DRB1* \* 1502 と有意な相関が認められた ( $P < 0.05$ , OR=1.86, 95%CI=1.07-3.23, Table2, Fig.2)。しかし

Table2. HLA-DR2(DRB1 \*1502)genotypes in IBD patients and controls

		OR (95%CI)	P
Crohn's Disease (n = 124)	DR2 positive (DR2/DR2 and DR2/DRx) (%)	26 (21)	$P < 0.05$
	DR2 negative (DRx / DRx) (%)	98 (79)	
Ulcerative Colitis (n = 106)	DR2 positive (DR2/DR2 and DR2/DRx) (%)	50 (47.2)	$P < 0.05$
	DR2 negative (DRx / DRx) (%)	56 (52.8)	
Healthy Control (n = 111)	DR2 positive (DR2/DR2 and DR2/DRx) (%)	36 (32.4)	
	DR2 negative (DRx / DRx) (%)	75 (67.6)	



Fig.2. HLA-DRB1\*1502 carrier frequency  
P: p-value, OR: odds ratio, NS: not significant



TNF 遺伝子の 5' プロモーター領域に存在する -308 G/A, -238 G/A の SNP 解析から分類されるハプロタイプ AG と *HLA DRB1\*1502* には連鎖不平衡はなく、潰瘍性大腸炎において両者は独立した易罹慢性要因と考えられた。一方、CD は *HLA DRB1\*1502* ハプロタイプと逆相関を示し ( $P < 0.05$ ,  $OR = 0.55$ ,  $95\%CI = 0.31-0.99$ , Table 2, Fig. 2), 発症阻止因子の可能性を示した。

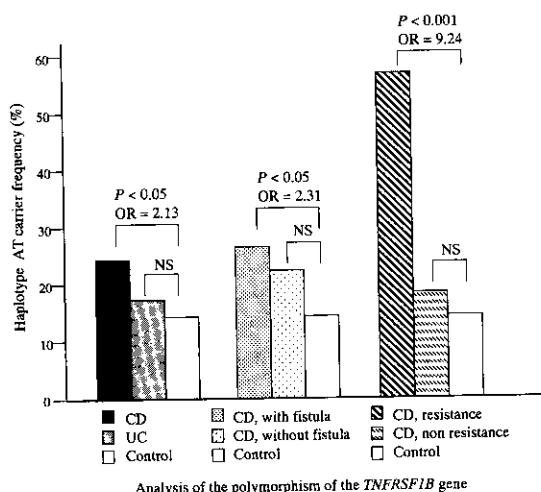
### 1-3. *TNFRSF1A* 遺伝子多型との相関<sup>20)</sup>

*TNFRSF1A* 遺伝子のコドン 12 の CCA/CCG の SNP 解析では、潰瘍性大腸炎患者群およびクローン病患者群において対象群と有意差は認められなかった。

### 1-4. *TNFRSF1B* 遺伝子多型との相関<sup>20)</sup>

*TNFRSF1B* 遺伝子は 3' 非翻訳領域の nt.1466 A/G, nt.1493 C/T の SNP 解析から 4 種類のハプロタイプに分類される。ハプロタイプ AT (nt.1466 A, nt.1493 T) 頻度はクローン病と有意な相関が認められた ( $P < 0.05$ ,  $OR = 2.13$ ,  $95\%CI = 1.08-4.21$ , Fig. 3)。特に瘻孔形成を伴うクローン病患者群で明らかな有意差を認めた ( $P < 0.05$ ,  $OR = 2.31$ ,  $95\%CI = 1.06-5.04$ ) が、とりわけ内瘻と外瘻が併発した患者群で高い相関を示した ( $P < 0.01$ ,  $OR = 4.8$ ,  $95\%CI = 1.73-13.33$ )。また、難治症例のクローン病患者群でも強い相関を認めた ( $P < 0.001$ ,  $OR = 9.24$ ,  $95\%CI = 3.37-25.36$ )。

Fig.3. Haplotype AT carrier frequency of the *TNFRSF1B* gene  
P: p-value, OR: odds ratio, NS: not significant



## 2. *IL18* 遺伝子多型との相関<sup>21)</sup>

*IL18* 遺伝子コドン 35 多型解析の結果、CD 群で TCC アレル頻度が高く、遺伝子型解析でも同様の結果であった。TCC アレル保有者頻度が CD 群で有意な相関が認められた ( $P = 0.002229$ ,  $OR = 2.58$ ,  $95\%CI = 1.34-4.66$ , Table 3, Fig. 4)。特に女性で TCC アレル保有者頻度が高く顕著であった ( $P = 0.000052$ ,  $OR = 8.17$ ,  $95\%CI = 2.73-24.41$ )。発症年齢や異なる病態間での差は認めなかった。

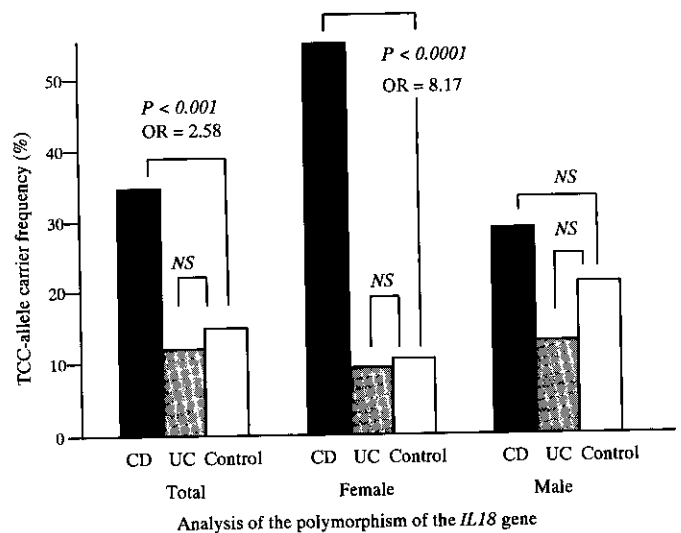
Table 3. Frequency of TCC-allele carrier at codon 35 of *IL18*

	Controls	CD patients	$\chi^2$ value	P value	OR	95% CI	UC patients	$\chi^2$ value	P value	OR	95% CI
<b>Total subjects</b>											
No. of individuals	110	134					110				
TCC-allele carrier (%)	18 (16.4)	45 (33.6)	9.35	< 0.01 (0.002229)	2.58	1.39 - 4.80	20 (18.2)	0.13	NS	1.14	0.56 - 2.29 (0.721310)
Non-carrier (%)	92 (83.6)	89 (66.4)					90 (81.8)				
<b>Female subjects</b>											
No. of individuals	55	32					52				
TCC-allele carrier (%)	6 (10.9)	16 (50.0)	16.36	< 0.001 (0.000052)	8.17	2.73 - 24.41	8 (15.4)	0.16	NS	1.48	0.48 - 4.62 (0.689451)
Non-carrier (%)	49 (89.1)	16 (50.0)					44 (84.5)				
<b>Male subjects</b>											
No. of individuals	55	102					58				
TCC-allele carrier (%)	12 (21.8)	29 (28.4)	0.81	NS (0.368144)	1.42	0.66 - 3.08	12 (20.7)	0.02	NS	0.93	0.38 - 2.30 (0.883445)
Non-carrier (%)	43 (78.2)	73 (71.6)					46 (79.3)				

Statistical analyses were performed by  $\chi^2$  test with a 2 x 2 contingency table.

NS: not significant

Fig.4. TCC-allele carrier frequency of the *IL18* gene  
P: p-value, OR: odds ratio, NS: not significant



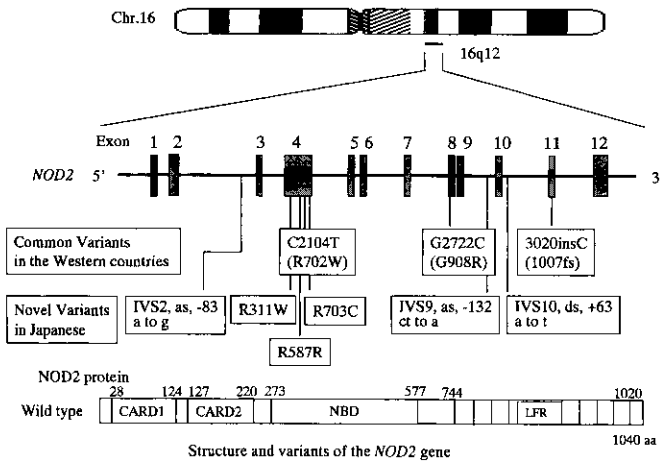
### 3) *TNFRSF1A* 遺伝子, *TNFRSF1B* 遺伝子および *IL18* 遺伝子の変異解析

三遺伝子の全翻訳領域を DNA シークエンス法により解析したが、アミノ酸置換をきたす遺伝子変異は認めなかった。

### 4) *NOD2* 遺伝子解析結果

*NOD2* 遺伝子で欧米で CD と関連すると報告された 3 種類の variant の有無を検討したが、日本人の CD 患者、UC 患者および対照者に該当する変異は認めなかった。ただ新たな変異 (多型) が認められ、これら疾患との関連が示唆された (Fig. 5)。

Fig.5. Structure and variants of the NOD2 gene



D. 考察

Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )は炎症に関わる重要なサイトカインであるが、二つの受容体を有する。55kDaからなる TNFR1 と 75kDaからなる TNFR2である。これら分子の発現、特にそれぞれの分子間の均衡・不均衡は炎症やアポトーシスなどのシグナル伝達を左右し、IBDの発症・病態を修飾すると考えられる。また、抗TNF抗体は治療に用いられつつあり、本症との関連は強いものと推し量られる<sup>22), 23)</sup>。Tumor necrosis factor- $\alpha$ をコードするTNF遺伝子は第6染色体短腕のHLA領域に位置し、そのプロモーター領域には複数の遺伝子多型が存在する。TNFプロモーター領域の遺伝子多型とIBDの関連研究は多くの研究者により行われており、CDとの相関が報告されてきた<sup>24), 25)</sup>。著者らが同じ領域の-308A/G、-238A/G多型を解析したところ、AGハプロタイプとUC患者群との間に有意な相関が認められ、そのORは4.76であった。

TNFR1をコードするTNFRSF1A遺伝子の座位は第12番染色体短腕(IBD2)であるが、そのコドン12にCCA/CCGのSNPが存在する<sup>26)</sup>。しかし、UC群、CD群と対照群での明らかな有意差は認められなかった。

TNFR2をコードするTNFRSF1B遺伝子は第1番染色体短腕(IBD7)に位置する。この遺伝子は複数の多型が報告されている。報告者らは3'非翻訳領域の1466A/G、1493C/T多型に注目し解析を行った。ATハプロタイプとCD患者群で相関が認められた。特に内外の瘻孔とともに併発した患者群や栄養療法を基本とし、ステロイド等を用いた通常の治療法に難治傾向を示した患者群で極めて強い相関が認められた。これはTNFR2の作用に変化が生じるとTNFR2を介するシグナル伝達の下流に位置するNF- $\kappa$ B等の活性化に影響を及ぼし、アポトーシスを助長したり、十分なステロイドの薬効がそがれることが推測される。

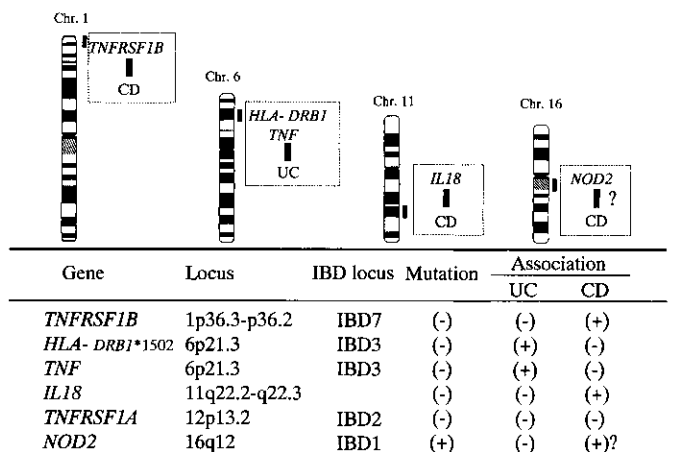
ヒトの主要組織適合性複合体(major histocompatibility complex)であるHLA(human leukocyte antigen)はT細胞に抗原を提示し、免疫応答を規定しており、IBD発症においても要の役を担っている分子と考える。HLA遺伝子は第6番染色体短腕(6p21.3)に位置し、サイズは約4Mbである。HLA class II分子は抗原提示細胞が取り込んだ抗原を分解し、生じたペプチドをCD4<sup>+</sup>T細胞に提示する機能を持つが、この遺伝子多型とIBD間に相関関係が報告されている。DRB1\*0103、DRB1\*12は欧州のUC患者の遺伝子型と相関し、特に全大腸炎型や消

化管外随伴病変を有する患者で高い相関を示した<sup>11), 27), 28)</sup>。一方DRB1\*04アレル保有率はUC患者で対照群に比較し低いことがわかった。DRB1\*0301、DQB\*0201は女性のUC患者で低率であった<sup>11)</sup>。わが国のUC患者はDRB1\*1502アレルとの相関が認められている<sup>29), 30)</sup>。報告者らの結果もこれに一致するものであった。

Interleukin-18はインターフェロン $\gamma$ を誘導する因子として単離されたが、現在はTh1/Th2細胞誘導のメディエーターとして重要であることがわかってきた<sup>31), 32)</sup>。IL18は第11番染色体長腕に位置し、193アミノ酸をコードする。Interleukin-18はCD患者の炎症が存在する腸粘膜で発現が著明に亢進しており、CDの成因に重要な関係があると考えられてきた<sup>33-35)</sup>。著者らはIL18コドン35にTCA/TCC多型を見いだした<sup>21)</sup>。日本の健康成人のTCCアレル頻度は9.0%でTCCアレルを保有する頻度は17.1%であった。この部位はInterleukin-18が活性型に変わる過程で、36残基と37残基間のペプチド結合がCaspase-1によって切断されるが、そのN末端側4残基(33-36残基)は種を越えて保存されている領域にあたり、重要な領域と考えられる。このコドン35の遺伝子多型を用い、IBD患者群と対照群で連関解析を行うとTCCアレルを有するCD患者が他の群より有意に高率であり、odds ratioは2.58であった(Table3, Fig.4)。性別で検討すると女性患者のodds ratioは8.17に達する。わが国のCD患者の男女比は約2:1であることが知られているが、多因子遺伝学においては低い発症率の性は閾値がより高いことが推測され、その性の患者は遺伝的素因のポテンシャルが他方の性の患者より高いと考えられている。

最近、IBD1にあたる第16染色体長腕(IBD1)に遺伝子座をもつNOD2の遺伝子変異がCDに関係するという内容の報告がなされた<sup>36), 37)</sup>。NOD2はApaf-1/Ced-4スーパーファミリーに属し、アポトーシスやNF- $\kappa$ B活性の制御機能を有する単球由来の分子である。Nod2にはエクソン11の1塩基対挿入によるフレームシフト変異3020 insC(1007fs)と2104 C to T(Arg702Trp)、2722 G to C(Gly908Arg)の二種類のミスセンス変異が健常対照者にも稀には認められるものの、CD患者で有意な差をもって高頻度に認められることが報告された<sup>36-38)</sup>。しかし、日本人の患者では同一の変化は皆無であり、人種間の相違による差異も考えられる。ただ、日本人サンプルの解析から、新しい変異や多型の存在が明らかになりつつあり、今後解析を進め、日本人患者におけるNOD2遺伝子の関与を明らかにすることが肝要と考える。

Fig.6. Summary of association study for inflammatory bowel disease



報告者らが関連研究(association study)を基に検討してきた結果をまとめると、CDに関わる遺伝子として *TNFRSF1B* 遺伝子と *IL18* 遺伝子があげられ、*NOD2* 遺伝子は今後の解析により明らかになるものと考えられる (Fig.6)。一方、UCはともに第6番染色体短腕に位置する *TNF* 遺伝子と *HLA-DRB1* 遺伝子が疾患感受性遺伝子と考えられる。

#### E. 参考文献

- 1) Podolsky DK: Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1997; 325: 928-937, 1008-1016.
- 2) Carter CO: Genetic common disorders. *Br. Med Bull* 1969; 25: 52-57.
- 3) Orhlohm M, Munkholm P, Langhholz E, et al: Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 84-88.
- 4) Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, et al: Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988; 29: 990-996.
- 5) Orhlohm M, Binder TIA, Sorensen LP, et al: Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* 35: 1075-1081, 2000.
- 6) Hugot J-P, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, et al: Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996; 379: 821-823.
- 7) Cavanaugh JA, Callen DF, Wilson SR, et al: Analysis of Australian Crohn's disease pedigrees refines the localization for susceptibility to inflammatory bowel disease on chromosome 16. *Ann Hum Genet* 1998; 62: 291-298.
- 8) IBD International Genetics Consortium: International collaboration provides convincing linkage replication in complex disease through analysis of a large pooled data set: Crohn's disease and chromosome 16. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 1165-1171.
- 9) Satsangi J, Parkes M, Louis E, et al: Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosome 3, 7, 12. *Nature Genet* 1996; 14: 199-202.
- 10) Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, et al: Linkage and association between inflammatory bowel disease and a locus on chromosome 12. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 95-100.
- 11) Satsangi J, et al.: Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1996; 347: 1212-1217.
- 12) Hampe J, Shaw SH, Saiz R, et al: Linkage of inflammatory bowel disease to human chromosome 6p. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 1647-1655.
- 13) Dechairo B, Dimon C, van Heel D, et al: Replication and extension studies of inflammatory bowel disease susceptibility regions confirm linkage to chromosome 6p (IBD3). *Europ J Hum Genet* 2001; 9: 627-623.
- 14) Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, et al: High-density genome scan in Crohn's disease shows confirmed linkage to chromosome 14q11-12. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1857-1862.
- 15) Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, et al: Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 1863-1870.
- 16) Rioux JD, Silverberg MS, Lindblad K, et al: Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. *Nat Genet* 2001; 29: 223-228.
- 17) Cho JH, Nicolae DL, Gold LH, et al: Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: Evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7502-7507.
- 18) Cho JH, Nicolae DL, Ramos R, et al: Linkage and linkage disequilibrium in chromosome band 1p36 in American Chaldeans with inflammatory bowel disease. *Hum Molec Genet* 2000; 9: 1425-1432.
- 19) OMIM Home page <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
- 20) Sashio H, Tamura K, Ito R, et al: Polymorphisms of *TNF* gene and *TNF* receptor superfamily, member 1B gene are associated with susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease, respectively. *Immunogenet* 53: 1020-1027, 2002.
- 21) Tamura K, Fukuda Y, Sashio H, et al: *IL18* polymorphism is associated an increased risk of Crohn's disease. *J Gastroenterol* (in submission).
- 22) Targan S, Hanauer SB, van Deventer SJ, et al: A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor  $\alpha$  for Chron's disease. *N Engl J Med* 1997; 337: 1029-1035.
- 23) Kam LY, Targan SR: *TNF*-alpha antagonists for the treatment of Crohn's disease. *Expert Opin Pharmacother* 2000; 1:615-22.
- 24) Negoro K, Kinouchi Y, Hiwatashi N, et al: Crohn's disease is associated with novel polymorphisms in the 5'-flanking region of the tumor necrosis factor gene. *Gastroenterol* 1999; 117: 1062-1068.
- 25) Louis E, Peeters M, Franchimont D, et al: Tumor necrosis factor (*TNF*) gene polymorphism in Crohn's disease (CD): influence on disease behaviour? *Clin Exp Immunol* 2000; 119: 64-68.
- 26) Pitts SA, Olomolaire OO, Westacott CI, et al: An *MspA1* polymorphism in exon 1 of the human *TNF* receptor type I (p55) gene. *Eur J Immunogenet* 1998; 25: 269-270.
- 27) Roussomoustakaki M, Satsangi J, Welsh K, et al: Genetic markers may predict disease behavior in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterol* 1997; 112: 1845-1853.
- 28) Stokkers PCF, Reitsma PH, Tytgat GN, van Deventer SJ, et al: *HLA-DR* and *-DQ* phenotypes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Gut* 1999; 45: 395-401.
- 29) Futani S, Aoyama N, Honsako Y, et al: *HLA-DRB1\*1502* allele, subtype of *DR15*, is associated with susceptibility to ulcerative colitis and its progression. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 814-818.
- 30) Yoshitake S, Kimura A, Okada M, et al: *HLA* class

- II alleles in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *Tissue Antigens* 1999; 53: 530-538.
- 31) Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, et al: Cloning of a new cytokine that induces IFN- $\gamma$  production by T cells. *Nature* 1995; 378: 88-91.
- 32) Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, et al: Interleukin-18 regulates th1 and th2 responses. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 423-474.
- 33) Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, et al: IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol* 1999; 162: 6829-6835.
- 34) Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, et al: Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol* 1999; 163: 143-147.
- 35) Kanai T, Watanabe M, Okazawa A, et al: Interleukin 18 is a potent proliferative factor for intestinal mucosal lymphocytes in Crohn's disease. *Gastroenterol* 2000; 119: 1514-1523.
- 36) Hugot, J-P, Chamaillard M, Zouali H, et al: Association of NOD2 leucin-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599-603.
- 37) Ogura, Y., Bonen DK, Inohara N, et al: A frameshift mutation in Nod2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 603-606.
- 38) Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, et al: Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001; 357:1925-8.

## resistin like molecule- $\beta$ (RELM $\beta$ )の潰瘍性大腸炎における発現低下

分担研究者 佐々木 巖 東北大学大学院 医学系研究科生体調節外科学分野 教授

研究要旨：炎症性腸疾患(IBD)の持続や増幅因子として腸内細菌叢が重要である。無菌マウスに腸内細菌を導入(bacterial reconstitution, BR)することで誘導される遺伝子をクローニングし、IBD (対照14例, クローン病10例, 潰瘍性大腸炎(UC)26例)でのヒトホモログの発現を定量的RT-PCRで検討した。また、大腸癌上皮細胞株 HT29, T84 を LPS, fMLP, MDP で刺激し mRNA 発現を検討した。完全長 cDNA は本年報告された RELM  $\beta$  に一致し、マウスの小腸および無菌大腸で発現せず、BR マウスと SPF マウスの大腸上皮に発現した。ヒトホモログは UC で有意の発現が低下していた。in vitro では LPS 刺激で発現が誘導された。本分子の機能は不明だが、その誘導様式から大腸での腸内細菌に対する生体防御関連分子の可能性があり、UC での発現低下が病態に関与する可能性が考えられた。

### 共同研究者

北山 卓, 内藤 広郎, 舟山 裕士, 福島 浩平,  
柴田 近, 児山 香, 佐藤 俊, 小川 仁,  
橋本 明彦, 西條 文人, 長尾 宗紀

所属 東北大学大学院

医学系研究科生体調節外科学分野

### A. 研究目的

炎症性腸疾患の病因と病態に関しては依然不明な点が多く、病因についてはこれまで遺伝的素因、感染、食餌因子、免疫異常などが検討されてきた<sup>[1-5]</sup>が、確定的な病因あるいは疾患特異的な増悪因子は見つかっていない。そのため患者はいわゆる難病指定をうけて医療費の公的負担が行われている。しかしながら本疾患は若年者に多く初発する性格を持つ上、近年その症例数は増加傾向を示しており、近い将来には我が国の国民医療費の負担増の要因となる危険性がある。したがって我々は従来の様な対症療法ではなく、その疾患本態の解明とともに疾病原因にたいする根治的治療法の開発が急務と考えている。我々は、潰瘍性大腸炎の病態を考える上でリンパ球系、マクロファージ系などに加えて、外的環境と直接接する腸管上皮細胞が生体防御機構にとって重要な細胞と考え注目してきた。一方、腸内細菌叢の変化は粘膜の炎症を増幅、難治化する要因ともなりうる事が知られており、例えば、IL-10遺伝子欠損マウスでは無菌状態で腸炎を発症せず通常飼育下で初めて腸炎を発症するが、このIL-10遺伝子欠損マウスの腸管内に予めLactobacillus属の細菌を定着させることで炎症はより軽度なものとなる<sup>[6]</sup>。この現象は、上皮細胞の生体防御機能が腸内細菌叢により修飾される可能性を示し、特に炎症性腸疾患の発症機序を検討する上で、上皮細胞と腸内細菌

叢の相互作用の面から検討することの重要性を示唆している。そこで、上皮と腸内細菌叢の相互作用および上皮細胞の機能発現を検討する目的で、無菌状態(germ-free 以下GF)のマウスに、specific pathogen-free(以下SPF)状態のマウス腸管内容懸濁液を経口投与し、腸内細菌を強制的に定着させ、腸管上皮細胞の種々の変化を検出する腸内細菌叢導入(bacterial reconstitution 以下BR)モデルを作成し、Differential display法を用いて上皮細胞の遺伝子発現の変化を検索してきた。このシステムで同定された分子の一部は、腸内細菌叢の関与する炎症性腸疾患の病態に何らかの役割を担っている可能性がある。

今回、我々は従来のDifferential display法に加え、遺伝子の発現プロファイルをより総合的に検討しうるマイクロアレイ(以下MA)法を遺伝子スクリーニングに導入した。すなわち、GF、SPF、およびBR3日後のマウス腸管の上皮細胞を用いてMA法で約8000種類の遺伝子発現の変化をスクリーニングすること、また遺伝子の生体内における発現とその機能を腸管上皮細胞、特に炎症性腸疾患に注目して解明することを目的とした。

### B. 研究方法

1. マウス BR モデルにおける遺伝子の発現の変化をMA法とノーザンブロットにより検討し、発現部位あるいは発現細胞を in situ hybridization で検討した。2. 発現の変化が見られたEST配列 AA239093 を MA13 と命名し、その完全長 cDNA 塩基配列を RACE 法により同定した。3. 後述のごとく、MA13 は近年報告された Resistin like molecule-beta(以下 RELM-beta)<sup>[7,8]</sup> と完全に一致したが、このヒトホモログであるヒト RELM-beta について、炎症性腸疾患での大腸上皮細胞の発現量を定量的 RT-PCR 法で定量した。4. ヒト培養大腸上皮細胞を Lipopolysaccharide(以下LPS)やデキサメサゾンで刺激し、RELM-beta の発現量を定量的 RT-

PCR法で検討し、ヒトRELM-beta遺伝子の発現誘導に関わる因子を検索した。

(倫理面への配慮)

本研究の動物実験については東北大学医学部動物実験委員会により承認された「東北大学における動物実験に関する指針」に準拠して行われた。また、臨床症例の取り扱いについては東北大学医学部倫理委員会の承認のもとに行われた。

#### C. 研究結果

BRモデルマウス上皮細胞のMA法を用いた解析において導入により著しい発現増強を認めるEST配列をMA13と命名し、その完全長cDNAの塩基配列とそのアミノ酸配列を同定したところ、最近報告されたマウスRELM-betaと完全に一致した。この遺伝子は無菌状態のマウス大腸では発現せず、細菌叢の定着により大腸上皮にのみ発現が誘導された。in situ hybridizationでは陰窩上部の上皮細胞にmRNA発現を認めた。ヒトホモログの炎症性腸疾患大腸上皮での発現量は、対照群に比べて潰瘍性大腸炎群で有意な低下を認めた。培養細胞においては細菌の菌体成分であるLPSおよびデキサメサゾンで発現が誘導された。

#### D. 考察

今回同定された遺伝子は、腸内細菌の存在により上皮細胞で発現が誘導され、培養細胞を用いた実験でも細菌の菌体成分であるLPSでの誘導が見られ、腸内細菌に対する何らかの生体防御機能を持つ可能性が示唆された。今後は、遺伝子組み換えにより蛋白質を精製し、その機能解析を試みると共に、ノックアウトマウスを用いその生体内での機能を検討する必要があると思われる。

#### E. 結論

マウスBRモデルにおいて大腸上皮に発現する遺伝子の変動をマイクロアレイ法で検索し、生体防御機構に関

与すると思われる遺伝子RELM-betaを同定した。本遺伝子のヒトホモログであるヒトRELM-beta遺伝子の潰瘍性大腸炎患者の大腸上皮における発現の低下は、同疾患の腸内細菌叢に対する免疫調節機構の破綻との関連性が示唆された。

#### F. 参考文献

- 1) Diepersloot, R.J., et al., Acute ulcerative proctocolitis associated with primary cytomegalovirus infection. *Arch Intern Med*, 1990. † 150(8): † p. † 1749-51.
- 2) Aiso, S., et al., Lymphocyte response to colonic antigen its role in the pathogenesis of ulcerative colitis. *Biochem Exp Biol*, 1980. † 16(3): † p. † 287-94.
- 3) Phillipotts, R.J., et al., A search for persistent virus infection in Crohn's disease. *Gut*, 1980. † 21(3): † p. † 202-7.
- 4) Butcher, P.D., J.J. McFadden, and J. Hermon-Taylor, Investigation of mycobacteria in Crohn's disease tissue by Southern blotting and DNA hybridisation with cloned mycobacterial genomic DNA probes from a Crohn's disease isolated mycobacteria. *Gut*, 1988. † 29(9): † p. † 1222-8.
- 5) Nakamura, M., et al., Cytokine production in patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, 1992. † 33(7): † p. † 933-7.
- 6) Madsen, K.L., et al., Lactobacillus species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology*, 1999. † 116(5): † p. † 1107-14.
- 7) Stepan, C.M., et al., A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. † 98(2): † p. † 502-6.
- 8) Holcomb, I.N., et al., FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *Embo J*, 2000. † 19(15): † p. † 4046-55.

## 炎症性腸疾患と CD14 遺伝子プロモーター領域多型の関連について

分担研究者 樋渡 信夫 仙台赤十字病院 大腸疾患センター長

**研究要旨:** [目的] 炎症性腸疾患は、その発症に遺伝因子や環境因子などが関与する多因子疾患と考えられており、中でも腸内細菌の関与が示唆されており、菌体壁成分であるリポポリサッカライドのレセプター、CD14も注目を集めている。最近、このCD14遺伝子のプロモーター領域-159位に、遺伝子の発現を変化させる1塩基置換多型(C/T)が見つかり、幾つかの疾患との関係が報告され始めた。そこでこの多型と炎症性腸疾患との関係を明らかにすることを目的として本研究を行うこととした。 [方法] 日本人潰瘍性大腸炎患者101名、クローン病患者82名、健常対照者123名の、CD14遺伝子プロモーター領域-159位の制限酵素切断片長多型を調べ、症例-対照研究を行った。またこの多型がCD14発現に与える影響について検討するため、健常者105名について血清soluble CD14(sCD14)をELISA法で測定し、遺伝子型別にその値を比較した。 [結果] -159Tの対立遺伝子頻度が、潰瘍性大腸炎患者、クローン病患者、健常対照者で、それぞれ57.4%、48.2%、44.7%、また-159TTの遺伝子型頻度が、それぞれ37.6%、25.6%、23.6%と、いずれも潰瘍性大腸炎患者において有意に高かった。また健常者sCD14値の検討では、遺伝子型-159TTのsCD14値が、遺伝子型-159CCと比べて有意に高かった。 [結論] CD14遺伝子プロモーター領域多型がCD14発現量に関わり、腸内細菌への宿主反応性を介し、潰瘍性大腸炎の病因・病態に関与している可能性が示唆された。

### 共同研究者

尾花 伸哉, 木内 喜孝, 高橋 成一  
所属 東北大学医学部 消化器内科

因や病態に影響を与えている可能性があると考え、炎症性腸疾患患者とCD14遺伝子多型との相関研究を行うこととした。

### A. 研究目的

炎症性腸疾患はその発症に環境因子や遺伝因子が関与する多因子疾患であると考えられているが、以前より発症に関与する環境因子のひとつに腸内細菌が挙げられ、腸内細菌抗原に対する異常反応が病因である可能性が示唆されてきた。昨年、クローン病の感受性遺伝子の一つが、グラム陰性菌の外膜構成成分であるリポポリサッカライド(LPS)の細胞内レセプターとして機能するNOD2遺伝子であることが明らかにされ<sup>1)2)</sup>、ますます腸内細菌の炎症性腸疾患病態への関与が注目を集めている。CD14はLPSの細胞外レセプターとして機能し、正常腸粘膜ではほとんど観察されないCD14陽性マクロファージが、炎症性腸疾患患者の腸粘膜上皮に密集し、これらが腸炎を引き起こす炎症性サイトカインを産生していることが報告されるなど、炎症性腸疾患との関連も示唆されている<sup>3)5)</sup>。最近、CD14の遺伝子プロモーター領域-159位に1塩基置換多型(C/T)が存在し、この多型がCD14の発現を変化させることで、アトピー<sup>6)</sup>や冠動脈病変<sup>7)9)</sup>、アルコール性肝障害<sup>10)</sup>などの疾患感受性に影響を与えていることが報告された。そこでこの多型が、腸内細菌への宿主感受性を変化させ、炎症性腸疾患の病

### B. 研究方法

潰瘍性大腸炎101例(女性47例, 男性54例, 平均年齢38.1歳), クローン病82例(女性21例, 男性61例, 平均年齢31.5歳), および健常対照者123例(女性68例, 男性55例, 平均年齢29.8歳)を対象として末梢血採血を行い、DNAを抽出した。まず、10例の健常者DNAを用いて、CD14遺伝子のプロモーター活性を強く有すると報告されている-227~-1塩基(Zhang et al. 1994)とCD14遺伝子全エクソンを十分含むように、-430~+1472塩基を6つのプライマー、CD14-1: -450CAGGGACTTGGATTTGGTGG<sup>-431</sup>, CD14-2: +47GCTTCTTTCCTACACAGCGG<sup>+28</sup>, CD14-3: -98AGGAAGAGAGGTGGGGAGGTGATC<sup>-75</sup>, CD14-4: +751CGTAGGAAAAGGCAGGCGAGTGTG<sup>+728</sup>, CD14-5: +620TTTCCAGCTTGC GCCTACG<sup>+638</sup>, CD14-6: +1493CCAGCACATAGCAGACATCCA<sup>+1473</sup>を用いてPCR増幅し、ダイレクトシーケンス法によりDNA塩基配列を読み取り、日本人におけるプロモーター領域を含むCD14遺伝子多型の有無を検討した。次に、CD14遺伝子プロモーター領域-159位のC/T制限酵素切断片長多型を、PCRプライマー:-517TTGGTGCCAACAGATGAGGTTTAC<sup>-494</sup>, +22TCTTTCCTACACAGCGG-CACCC<sup>+45</sup>と、制限酵素

HaeIIIを用いて調べ、潰瘍性大腸炎、クローン病患者および健常対照者の多型頻度を比較検討した。また、健常対照者105例(女性59例, 男性46例, 平均年齢28.8歳)の血清sCD14を、ELISAキット(ABL, Hamburg, Germany)で測定し、CD14遺伝子型別にその値を比較検討した。

この研究は東北大学医学部倫理委員会で承認されており、遺伝子解析である旨を対象者に説明し、同意を得て行った。

### C. 研究結果

1. プロモーター領域を含むCD14遺伝子塩基配列解析  
プロモーター領域の-159位と、エクソン2の+1290位にそれぞれC/T, G/Cの1塩基置換多型が存在したが、それ以外の部位に多型は認められなかった。10例の健常者全20本の染色体のうち、-159位塩基がCであるものは10本、Tであるものは10本と同数であった。また+1290位塩基がGであるものは5本、Cであるものは15本であった。+1290位の多型はアミノ酸置換を伴わないことから、本研究では-159位の多型のみを検討対象とした。

2. 潰瘍性大腸炎患者、クローン病患者および健常対照者の-159位対立遺伝子および遺伝子型

潰瘍性大腸炎患者、クローン病患者および健常対照者の-159位のT対立遺伝子頻度はそれぞれ57.4%, 48.2%, 44.7%であった。また遺伝子型がTTである頻度はそれぞれ37.6%, 25.6%, 23.6%であった(Table1)。健常対照者と比較して、潰瘍性大腸炎患者におけるT対立遺伝子頻度およびTT遺伝子型頻度が有意に高かった(対立遺伝子頻度:p=0.0074, OR=1.67, 95%CI=1.15-2.42, 遺伝子型頻度:p=0.022, OR=1.96, 95%CI=1.10-3.48)。潰瘍性大腸炎患者とクローン病患者、クローン病患者と健常対照者の間には、いずれも対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度ともに有意な差は認めなかった。また、潰瘍性大腸炎、クローン病患者をいくつかの臨床パラメーターを用いて細分類し比較検討したが、潰瘍性大腸炎患者における罹病範囲(Table2)、ステロイド強力静注療法の必要とした患者の割合、また強力静注療法に反応した患者と反応せず手術を必要とした患者の割合に、いずれも有意差は認めなかった。クローン病患者においても、罹病範囲(Table2)、ステロイド療法や手術を必要とした患者の割合、消化管穿孔の既往や肛門病変を有する患者の割合に、有意差は認めなかった。

Table1 Allele and Genotype frequencies of the polymorphism in the promoter region of the CD14 gene

Allele	Ulcerative colitis (n=101)		Crohn's disease (n=82)		Controls (n=123)	
	n	%	n	%	n	%
C	86	42.6	85	51.8	136	55.3
T	116	57.4**	79	48.2	110	44.7
Genotype**						
CC	23	22.8	24	29.3	42	34.1
CT	40	39.6	37	45.1	52	42.3
TT	38	37.6**	21	25.6	29	23.6

\*\* Ulcerative colitis vs. Controls, p=0.0074 (2×2 table using  $\chi^2$  test, odds ratio=1.67,

95% confidence interval=1.15-2.42)

\*\* Ulcerative colitis vs. Controls, p=0.044 (3×2 table using  $\chi^2$  test)

\*\* Ulcerative colitis vs. Controls, p=0.022 (3×2 table using  $\chi^2$  test, odds ratio=1.96,

95% confidence interval=1.10-3.48)

Table2 The allele frequencies of -159T in Crohn's disease or ulcerative colitis subgroups

	Allele frequency (%)	Carrier frequency (%)**
Ulcerative colitis		
/ disease extent		
Total colitis (n = 45)	60.0	80.0
Left side colitis (n = 40)	51.2	75.0
Proctitis (n = 16)	65.6	87.5
Crohn's disease		
/ disease location		
Small bowel (n = 12)	50.0	75.0
Ileocolon (n = 56)	48.2	69.6
Colon (n = 14)	46.4	71.4

\*\* Carrier frequency : proportion possessing one or two copies of T allele

### 3. 健常者の遺伝子型別血清sCD14値

健常者の血清sCD14値は、遺伝子型CC群:  $2.7 \pm 0.7 \mu\text{g/ml}$ , CT群:  $2.9 \pm 1.0 \mu\text{g/ml}$ , TT群:  $3.4 \pm 0.6 \mu\text{g/ml}$ で、遺伝子型TT群がCC群と比較して有意に血清sCD14値が高かった(p=0.0205)。

### D. 考察

最近、本多型がCD14発現に影響を与える機序について、-159位多型が、遺伝子の転写活性を制御する核内転写因子Sp1, 2, 3のCD14遺伝子プロモーター領域への結合親和性を変化させ、CD14遺伝子の転写活性が変化することが報告された<sup>11)</sup>。Levanらは、-159位がTの場合、転写活性を負に制御するSp3の結合親和性が低下し、その結果CD14遺伝子の転写活性が高くなると報告しており、本多型がCD14発現に影響を与えるとする我々のsCD14実験結果を支持するものである。CD14が潰瘍性大腸炎の病因・病態に影響を与える機序としては2つの可能性が考えられる。炎症性腸疾患の大腸粘膜においては、正常大腸粘膜では見られないCD14陽性マクロファージが多数観察される<sup>12)</sup>、これらCD14陽性マクロファージは、末梢血から移動し炎症腸粘膜局所において炎症性サイトカインを産生していることが知られている<sup>3)-5)</sup>。そのことから、第一の機序として、腸管炎症により粘膜バリアが破壊されると腸内細菌やLPSの上皮内への侵入が容易となり、これに反応したCD14陽性マクロファージが末梢血より炎症部位に多数移動し、-159位多型によりCD14発現量の多いマクロファージがより多くの炎症性サイトカインを産生し炎症を持続させるという可能性が考えられる。またヒト大腸上皮培養細胞を用いた実験で、LPSが腸上皮からのIL-8分泌を、同時に添加したsCD14依存性に促し、これに反応した多核白血球が上皮に浸潤することが示されている<sup>13)</sup>。こうした知見から第二の機序として、LPSなど腸内細菌由来物質がsCD14を利用したメカニズムで腸上皮を刺激し、上皮からのIL-8などの炎症性サイトカイン分泌を促し、腸炎の発病や慢性化の要因となる可能性が考えられる<sup>14)-15)</sup>。そのため、-159位遺伝子型がTTでCD14発現量が多ければ、腸炎の発病と慢性化が、より起こりやすいと予想される。最近、in vitroの実験で、大腸上皮系培養細胞が細胞膜表面にmCD14を発現し、培養液中にsCD14を分泌していることが示された<sup>16)</sup>。この大腸上皮に発現するmCD14や、分泌されるsCD14が、腸炎に関与する第三の可能性も考えられ、潰瘍性大腸炎のモデルとされてい



るIL-2ノックアウトマウスにおいても、大腸上皮CD14メッセンジャーRNA発現レベルが、正常マウスのそれと比較して数倍に増加しており、しかも腸炎が発症する以前から見られると報告されている<sup>17)</sup>。また、CD14の機能は現時点で完全に解明されておらず、CD14の未知の機能が潰瘍性大腸炎の病因・病態と関係している可能性も考慮すべきと思われる。

#### E. 結論

CD14遺伝子プロモーター領域-159位多型において、T対立遺伝子頻度およびTT遺伝子型頻度が日本人潰瘍性大腸炎患者において有意に高いことを示した。またTT遺伝子型がCD14高産生性であることを血清sCD14測定により確認した。本研究結果は、潰瘍性大腸炎の病態に腸内細菌由来のLPSなどが関与している可能性を示唆するものであると考えられた。

#### F. 参考文献

- 1) Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J. P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C. A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J. F., Sahbatou, M. & Thomas, G. (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411, 599-603.
- 2) Ogura, Y., Bonen, D. K., Inohara, N., Nicolae, D. L., Chen, F. F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R. H., Achkar, J. P., Brant, S. R., Bayless, T. M., Kirschner, B. S., Hanauer, S. B., Nunez, G. & Cho, J. H. (2001) A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411, 603-6.
- 3) Grimm, M. C., Pavli, P., Van de Pol, E. & Doe, W. F. (1995) Evidence for a CD14+ population of monocytes in inflammatory bowel disease mucosa--implications for pathogenesis. *Clin Exp Immunol*, 100, 291-7.
- 4) Rugtveit, J., Haraldsen, G., Hogasen, A. K., Bakka, A., Brandtzaeg, P. & Scott, H. (1995) Respiratory burst of intestinal macrophages in inflammatory bowel disease is mainly caused by CD14+L1+ monocyte derived cells. *Gut*, 37, 367-73.
- 5) Rugtveit, J., Nilsen, E. M., Bakka, A., Carlsen, H., Brandtzaeg, P. & Scott, H. (1997) Cytokine profiles differ in newly recruited and resident subsets of mucosal macrophages from inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 112, 1493-505.
- 6) Koppelman, G. H., Reijmerink, N. E., Colin Stine, O., Howard, T. D., Whittaker, P. A., Meyers, D. A., Postma, D. S. & Bleeker, E. R. (2001) Association of a promoter polymorphism of the CD14 gene and atopy. *Am J Respir Crit Care Med*, 163, 965-9.
- 7) Hubacek, J. A., Rothe, G., Pit'ha, J., Skodova, Z., Stanek, V., Poledne, R. & Schmitz, G. (1999) C(-260)->T polymorphism in the promoter of the CD14 monocyte receptor gene as a risk factor for myocardial infarction. *Circulation*, 99, 3218-20.
- 8) Shimada, K., Watanabe, Y., Mokuno, H., Iwama, Y., Daida, H. & Yamaguchi, H. (2000) Common polymorphism in the promoter of the CD14 monocyte receptor gene is associated with acute myocardial infarction in Japanese men. *Am J Cardiol*, 86, 682-4, A8.
- 9) Unkelbach, K., Gardemann, A., Kostrzewa, M., Philipp, M., Tillmanns, H. & Haberbosch, W. (1999) A new promoter polymorphism in the gene of lipopolysaccharide receptor CD14 is associated with expired myocardial infarction in patients with low atherosclerotic risk profile. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19, 932-8.
- 10) Jarvelainen, H. A., Orpana, A., Perola, M., Savolainen, V. T., Karhunen, P. J. & Lindros, K. O. (2001) Promoter polymorphism of the CD14 endotoxin receptor gene as a risk factor for alcoholic liver disease. *Hepatology*, 33, 1148-53.
- 11) LeVan, T. D., Bloom, J. W., Bailey, T. J., Karp, C. L., Halonen, M., Martinez, F. D. & Vercelli, D. (2001) A common single nucleotide polymorphism in the CD14 promoter decreases the affinity of Sp protein binding and enhances transcriptional activity. *J Immunol*, 167, 5838-44.
- 12) Smith, P. D., Smythies, L. E., Mosteller-Barnum, M., Sibley, D. A., Russell, M. W., Merger, M., Sellers, M. T., Orenstein, J. M., Shimada, T., Graham, M. F. & Kubagawa, H. (2001) Intestinal Macrophages Lack CD14 and CD89 and Consequently Are Down-Regulated for LPS- and IgA-Mediated Activities. *J Immunol*, 167, 2651-2656.
- 13) Beatty, W. L. & Sansonetti, P. J. (1997) Role of lipopolysaccharide in signaling to subepithelial polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun*, 65, 4395-404.
- 14) Cario, E., Rosenberg, I. M., Brandwein, S. L., Beck, P. L., Reinecker, H. C. & Podolsky, D. K. (2000) Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J Immunol*, 164, 966-72.
- 15) Schuerer-Maly, C. C., Eckmann, L., Kagnoff, M. F., Falco, M. T. & Maly, F. E. (1994) Colonic epithelial cell lines as a source of interleukin-8: stimulation by inflammatory cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Immunology*, 81, 85-91.
- 16) Funda, D. P., Tuckova, L., Farre, M. A., Iwase, T., Moro, I. & Tlaskalova-Hogenova, H. (2001) CD14 is expressed and released as soluble CD14 by human intestinal epithelial cells in vitro: lipopolysaccharide activation of epithelial cells revisited. *Infect Immun*, 69, 3772-81.
- 17) Meijssen, M. A., Brandwein, S. L., Reinecker, H. C., Bhan, A. K. & Podolsky, D. K. (1998) Alteration of gene expression by intestinal epithelial cells precedes colitis in interleukin-2-deficient mice. *Am J Physiol*, 274, G472-9.

## 炎症性腸疾患(IBD)上皮細胞特異的発現遺伝子同定の試み； SRCR superfamily 遺伝子の発現亢進

分担研究者 佐々木 巖 東北大学大学院医学系研究科生体調節外科 教授

研究要旨：炎症性腸疾患の発症，増悪，炎症の持続には腸内細菌の関与が強く示唆される。我々は，この観点から腸内細菌とのかかわりで重要な分子を動物モデルによりスクリーニングし，そのヒトホモログの発現を炎症性腸疾患で調べることに，今まで全く注目されていなかった分子を拾い上げている。今回，deleted malignant brain tumor 1(DMBT1)がクローン病，潰瘍性大腸炎の上皮で著しく発現亢進していることを明らかにした。

### 共同研究者

米澤 仁志，福島 浩平，小川 仁，北山 卓，  
内藤 広郎，舟山 裕上，柴田 近，上野 達也<sup>1)</sup>，  
寺島 雅典，齊藤 和好<sup>2)</sup>  
所属 東北大学大学院 生体調節外科<sup>1)</sup>，  
岩手医科大学 第一外科<sup>2)</sup>

### A. 研究目的

IBDは原因不明の疾患であり，確実な予防法や治療法は未だ確立されて居らず，IBD患者の増加と相まって病因の究明が望まれる。病因の解明のためには病態に関与する分子をまず同定し解析することが重要であるが，そのためには分子を拾い上げる手法がカギとなる。実験腸炎およびヒトIBDが腸内細菌により発症あるいは増悪する点に着目し，無菌マウスにspecific pathogen free(SPF)マウスの腸管内容を経口投与する腸内細菌叢通常化(bacterial reconstitution, BR)モデルにおける消化管上皮の遺伝子発現を検討してきた。我々は，このBRモデルにおいて特徴的な変化を示す分子を同定し，そのヒトホモログを調べて臨床検体における発現変化を検討するという手法をとることにより，IBDの病態に関与する分子を拾い上げかつ病因に近づくことができると考える。

今回，通常化過程で特徴的な発現誘導を認めた遺伝子の一つ，CRP-ductinに注目した。CRP-ductinはSRCR(scavenger receptor cysteine-rich) superfamilyに属する分子であり，悪性腫瘍との関連が示唆されるが炎症性疾患とのかかわりやその機能は全く不明である。CRP-ductin およびそのヒトホモログである DMBT1(deleted in malignant brain tumor 1)がIBDの病態に関与する可能性を調べるため，マウス実験腸炎および臨床検体を用い腸管上皮における遺伝子の発現の検討を行った。

### B. 研究方法

無菌マウス(ICR strain)にSPFマウスの糞便懸濁液を経口投与し，経時的に(投与後3, 7, 14, 28日後)小腸および大腸上皮細胞を分離し，DNA Microarray法による遺伝子スクリーニングを行った。この通常化過程で発現誘導を示唆する遺伝子の一つ，CRP-ductinに注目し northern blot を用いて検討した。粘膜炎症のコントロールとして dextran sulfate sodium(DSS)誘導大腸炎を作製し，同様に northern blot を行った。また，ヒトホモログである DMBT1 の mRNA 発現をヒト大腸上皮 RNA において northern blot および定量的 RT-PCR を用いて検討した。臨床検体採取にあたっては，本学倫理委員会の承認のもとインフォームドコンセントを得て行った。

### C. 研究結果

CRP-ductin mRNA は，腸内細菌投与後3および7日目の急性炎症極期に一致して，小腸および大腸上皮において発現増強した。DSS 大腸炎では，炎症極期および DSS 除去後の回復期でも発現レベルの上昇が持続した。DMBT1 の mRNA 発現を潰瘍性大腸炎(UC)25例，クローン病(CD)19例，対照18例の大腸上皮 RNA を用い定量的 RT-PCR で検討したところ，UC および CD では約 100 倍の発現上昇を認めた(p=0.002)。northern blot では対照と比較して UC と CD で共に発現増加を認めしたが，UC と CD にはサイズの異なるもう一つのバンドを認め，IBDにおける isoform 発現の可能性が示唆された。

### D. 考察

SRCR superfamily 蛋白は，オプソニンレセプター機能などの生体防御と細胞分化を調節する分子とされる。IBDにおける DMBT1 の役割については不明であるが，通常化モデルからヒトホモログを調べるという手法により本分子の関与がはじめて明かとなった。このアプ

ローチの蓄積によって、粘膜炎症あるいはIBDに重要な分子を包括的に拾い上げ全体像を解明することにより病因に迫りうると考える。

#### E. 結 論

IBDの大腸上皮細胞においてSRCR superfamilyに属するDMBT1は、対照群と比較し著しく発現が亢進し、病態と関わる可能性が示唆された。

## 炎症性腸疾患の病態と大腸粘膜における特徴的な炎症免疫反応と組織構築の変化—新しい治療戦略の提言—

分担研究者 名倉 宏 東北大学大学院医学系研究科 病理 教授

研究要旨：潰瘍性大腸炎(UC)、クローン病(CD)とも持続する活動性炎症とそれによる粘膜傷害と腸管の組織構築の改変が主要な病変である。活動性病変では好中球を中心とした活動性炎症が共通した病態であり、炎症細胞の持続的な遊走を司るケモカイン、ケモカインレセプターのプロファイルも類似していた。それに引き続く炎症免疫反応のカスケードのところで、UCとCDでは相違していた。UCはB細胞の増殖の制御異常とそれによる粘膜上皮細胞傷害と再生増殖の異常が主要であるが、CDでは活性化されたマクロファージ系細胞による肉芽腫形成とTh1細胞への過剰な抗原提示と活性化とそれに基く線維化を伴った組織構築の改変が中心となっていることがわかった。また、それに相応した血管構築とその内皮細胞での細胞接着因子の発現を認めた。それ故、両疾患とも初期の治療の導入としての白血球除去を始めとした好中球の抑制が有効であり、それに引き続きUC、CDそれぞれに特異な免疫抑制治療のプロトコル作成が必要ながわかった。

### 共同研究者

大谷 明夫<sup>1)</sup>、太田 達郎<sup>1,2)</sup>、笹野 公伸<sup>1)</sup>、  
福土 審<sup>2)</sup>、沖 元二<sup>1,3)</sup>、下瀬川 徹<sup>3)</sup>、  
福島 浩平<sup>4)</sup>、佐々木 巖<sup>4)</sup>、中村 志郎<sup>5)</sup>、  
神野 良男<sup>5)</sup>、松本 誉之<sup>5)</sup>

所属 東北大学大学院医学系研究科

病理学講座<sup>1)</sup>、

東北大学大学院医学系研究科

人間行動学 心療内科<sup>2)</sup>、

東北大学大学院医学系研究科

消化器病態学<sup>3)</sup>、

東北大学大学院医学系研究科

生体調節外科<sup>4)</sup>、

大阪市立大学医学部 第三内科<sup>5)</sup>

員会の承認を得た。

### C. 研究結果

1. UC、CDの活動性炎症を有する粘膜ではともにリンパ球とCD68<sup>+</sup>陽性マクロファージが著増し、好中球と好酸球、IgG形質細胞も著しく増加していた。UCでは後者の増加がより顕著であった。ともに固有層には小～細静脈様小血管が増加し、ICAM-1の発現増強とともに、E-, P-selectin, MAdCAM-1も陽性となっており、好中球やリンパ球の接着像や固有層への遊出像が観察された。しかしUCの潰瘍底ではMAdCAM-1の発現は減弱していた。

2. UC、CD粘膜ではB細胞の増殖が観察され、殊にUCに著しかった。さらにUC病変部ではCD19<sup>+</sup>20<sup>-</sup>の未熟なB細胞が胚中心を形成することなく集簇して、あるいはびまん性に多数出現していた。それらには40～80% (平均40%)のKi67標識率が観察され、免疫電顕法では幼若な形質細胞形態をとるものもあった。一方、CDの肉芽腫はCD80、86を発現する活性化されたマクロファージ系細胞によって構成されているが、それらにはINF- $\gamma$ 、IL-12の発現が観察され、さらに肉芽腫周囲のCD4<sup>+</sup>T細胞は高いKi67陽性率であった。

3. UCでは形態的機能的に上皮細胞障害がみられ、しばしば高度な幼若化や再生異型を示していた。また上皮細胞の水代謝に関与する11 $\beta$ -HSD2は健常粘膜では恒常的に発現しており、CD非潰瘍粘膜ではそれと著変なく、UCでは著明に減弱していた。

4. 大腸粘膜機能性疾患と考えられている過敏性腸症候群(IBS)では、被覆上皮直下の固有層のスカベンジャーマクロファージの減少と粘膜腺底部にCD68<sup>+</sup>マクロ

### A. 研究目的

UC、CDそれぞれに特異的な炎症免疫反応を背景とした病因病態の解明と、それに依拠した治療法の開発と提言を目的に、両疾患それぞれに観察される炎症免疫反応の共通な部分と特異な異常状態を、それぞれに特徴的な形態変化と密接な関連の許で観察した。

### B. 研究方法

手術的に摘出されたUC、CD患者の大腸組織を固定後、凍結保存、もしくはパラフィン包埋保存し、形態観察ならびに免疫組織化学染色に使用した。尚、すべて患者の承諾を得た手術摘出組織を使用した。本研究を実施するにあたって、東北大学医学部、医学系研究科倫理委