

し、排便回数が多い例、人工肛門造設例では閉鎖後であっても有意に低下していた。情緒的役割制限も同様の結果で、漏便があると有意に低下した。排便回数は多くのQOLに影響し、漏便は精神的な面から日常の役割を制限していた。両術式のQOLは人工肛門の有無などで補正すると差はなく、人工肛門の有無が大きな影響を及ぼしていた。以上から、両術式ともに術後1年まで分析したQOLの改善は良好で、両術式のQOL差は人工肛門造設の有無に大きく影響されていた。今後はQOLの改善のために人工肛門を造らない術式の確立、排便回数、漏便を減らすことが必要と考えられた。

F. 研究発表

未発表。ただし、平成15年度厚労科研難治性炎症性

腸管障害に関する調査研究班で発表、平成17年1月26日、東京で報告。

G. 知的財産の登録状況

該当なし

H. 文献

1. 杉田昭、橋本秀樹、岩男泰：潰瘍性大腸炎手術後患者のQOL—SF36を用いた回腸囊肛門吻合術と回腸囊肛門管吻合術の縦断比較—、厚生労働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」平成15年度研究報告書、p42-45

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服対策研究事業
「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

潰瘍性大腸炎と Crohn 病の臨床調査個人票に関する研究

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：47 都道府県より送付されてきた個人票（平成 10 年、11 年、12 年）は、潰瘍性大腸炎 48,738 件、Crohn 病 14,781 件で、入力作業が終了した段階である。昨年度より、個人票から得られるデータを基に記述統計解析を行っている。この解析結果の公表は、炎症性腸疾患の動向を知るうえで有用な基礎データになると考えられる。一方、本データは個人情報であるため、個人が特定されないような解析結果の公表等、慎重な取扱いが必要である。

A. 研究目的

厚生労働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臨床調査個人票について、そのデータの電子化ならびに基本的な記述統計解析を行うことを目的とした。

B. 研究方法

前年度に引き続き、臨床調査個人票に記載されているデータ（潰瘍性大腸炎 1 症例当り：183 項目、Crohn 病 1 症例当り：200 項目）の電子化データを基に、記述統計解析を行った。潰瘍性大腸炎では、都道府県別患者数、年齢別発症数、重症度別症例数、罹患範囲別症例数、臨床経過別症例数、家系内発症率などの解析を行った。Crohn 病では、都道府県別患者数、年齢別発症数、病変部位別症例数、初発症状別症例数、家系内発症率などの解析を行った。

（倫理面への配慮）

個人情報保護法に抵触しない配慮をしており、機密を保持し、生データの第三者への供与は一切行っていない。

C. 研究結果

47 都道府県より送付されてきた個人調査票（平成 10 年、11 年、12 年）は、潰瘍性大腸炎 48,738 件、Crohn 病 14,781 件であった。昨年度の報告件数と比べ、若干、件数が少ない理由は、重複カウントがあったためである。年齢別発症数の検討で、潰瘍性大腸炎は 26～30 歳、Crohn 病は 21～25 歳にそのピークが見られた。その他の解析結果を下記に示す。

【潰瘍性大腸炎】1) 臨床的重症度：軽症 51.5%、中等症 39.5%、重症 9.0%；2) 罹患範囲：直腸炎型 22%、左側大腸炎型 37%、全大腸炎型 38%、右側又は区域性大腸炎型 3%；3) 臨床経過：初回発作型 20%、再燃緩解型 54%、慢性持続型 25%、急性電撃型 1%；4) 家系内発症率：潰瘍性大腸炎 7.0%、Crohn 病 0.2%

【Crohn 病】1) 病変部位：回腸のみ 25%、大腸のみ 12%、回腸-大腸 63%；2) 初発症状：腹痛、下痢、体重減少、発熱；3) 家系内発症率：Crohn 病 2.8%、潰瘍性大腸炎 1.0%

上記の値は暫定的なもので、正確性を担保するために、再度、チェックを行う予定である。

D. 考察

潰瘍性大腸炎ならびに Crohn 病における疫学的データについては、これまでも一定の規模で発表がなされてきた。しかし全国規模でこれら両疾患のデータが公表されたことはない。個人調査票を基にした今回のデータ集積・解析ならびに公表は、本邦の両疾患の実態を把握し、その動向を一般社会に周知する観点から極めて重要で有益であると考えられる。ただし、本データが個人情報であることを勘案し、個人が特定されないようなデータ公表とすべきであり、慎重な取扱いが必要である。

E. 結論

潰瘍性大腸炎と Crohn 病の臨床調査個人票データを電子化し、基本的な記述統計解析を行っている。今後、一般への公表を行う予定である。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし。
2. 学会発表 該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況 （予定を含む。）

1. 特許取得 該当なし。
2. 実用新案登録 該当なし。
3. その他 該当なし。

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服対策研究事業
「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

クローン病および潰瘍性大腸炎に関する疫学指標の検討

分担研究者 武林 亨 慶應義塾大学医学部衛生学公衆衛生学 講師

研究要旨：クローン病および潰瘍性大腸炎について、記述疫学アプローチにより日本における潰瘍性大腸炎（UC）、クローン病（CD）の基礎疫学指標を求めるための方法を確立し、最新の推定値を求めることを目的として、罹患率・有病率の推定と予後調査を計画した。その第一のステップとして、医療費等助成の受給率調査のパイロット研究と予後調査計画の立案を行った。

共同研究者

西脇祐司¹⁾ 北洞哲治²⁾

松岡克善³⁾ 井上 詠³⁾

所属

慶應義塾大学医学部衛生学公衆衛生学教室¹⁾

国際医療福祉大熱海病院・内科²⁾

慶應義塾大学医学部消化器内科³⁾

D. 結果と考察

- 受給率は、UC67% (46%)，CD77% (71%)であった。
- UC では、女性の方が男性に比べ受給率が高かった。
- 年齢別の受給率には差がなかった。

以上より、臨床個人票より罹患率、有病率を推定する際には、受給率を考慮しないと過小評価になることが示された。平成 17 年度は対象施設を拡大して同様の調査を実施する予定である。

(1) UC，CD の罹患率・有病率等の推定

A. 研究の目的と方法

わが国におけるクローン病および潰瘍性大腸炎の罹患率、緩解率、再発率など疫学指標を算出することは、これらの疾患の動態を正しく把握するのに必要であり、また難治性疾患克服対策研究事業の基礎資料としても欠かせない。本年は、臨床調査個人票データの有用性について検討し、受給率調査のパイロット研究を実施した。

B. 臨床調査個人票データの有用性検討

各都道府県を通じて、難治性疾患克服対策研究事業における臨床調査個人票の集計結果が電子データとして利用可能となった。このデータを活用して、受給者のみを把握することになるため、UC、CD の罹患率、緩解率、再発率など疫学指標を算出には、調査個人票を提出しない患者数の把握・推定が欠かせない。そのため、パイロット研究として、東京都内の一医療施設で受給率調査を行った。

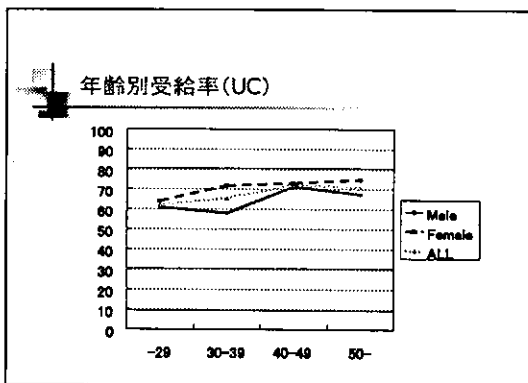
C. 受給率調査（パイロット研究）

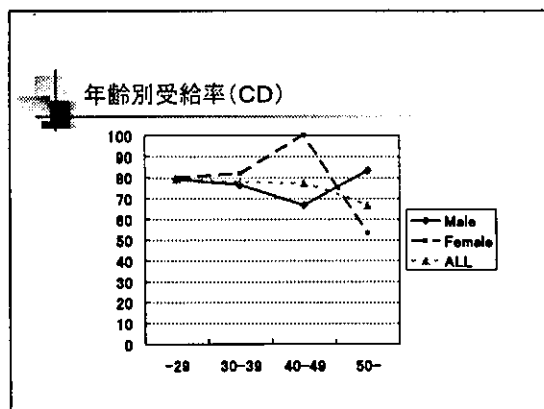
（方法）東京都内の某医療施設外来を 2004 年 11 月、12 月に受診した全 UC、CD 患者（初診を除く）を対象に、医療費等助成申請（臨床調査個人票作成）の有無とその時点で有効な医療券の有無について確認を行った。データ解析は、連結不可能匿名化したデータセットにより、男女別、年齢別の受給率を算出した。

性別の受給率
(過去に一度でも申請あり)

	UC			CD		
	Number	Proportion(%)	95%CI	Number	Proportion(%)	95%CI
ALL	640	67.2	(63.4, 70.8)	232	76.7	(70.7, 82.0)
Male	319	63.3	(57.8, 68.8)	126	75.9	(68.7, 82.2)
Female	321	71.0*	(65.7, 75.9)	66	78.8	(67.0, 87.9)

* p<0.05 Compared with males





現在有効な医療券ありの割合(性別)

	UC			CD		
	Number	Proportion(%)	95%CI	Number	Proportion(%)	95%CI
ALL	640	45.6	(41.7, 49.6)	232	71.1	(64.8, 76.9)
Male	319	42.0	(36.5, 47.6)	126	70.5	(62.9, 77.2)
Female	321	49.2*	(43.8, 54.8)	66	72.7	(60.4, 83.0)

* p<0.07 Compared with males

(2) UC の予後調査

A. 研究の目的

潰瘍性大腸炎 (UC) 患者の予後および予後規定要因を明らかにし、今後の治療対策に役立てることを目的とした予後調査の立案を行った。

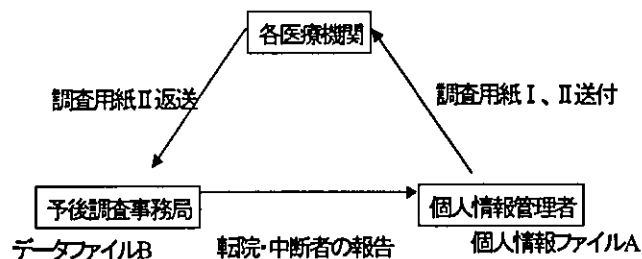
B. 計画 (案)

- 「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」班が1973 年より実施してきた疫学調査のデータベースより、2000 年以降 (2,868 名) に登録された UC 患者を対象とする。
- 予後調査への協力可能性調査を郵送にて登録患者報告医療機関あてに行う。

- 実施可能性調査で協力を表明した医療機関に対し郵送にて予後調査を実施する。
- 予後調査の項目は、発がんの有無・部位、生死 (死因)、手術・入院の有無など。
- 転院者・通院中止者については生死確認のため住民票 (除票) 請求を行う。
- データベース登録時の各要因から、予後規定因子を明らかにする。

C. 個人情報の保護などの倫理的配慮

- 既存資料に基づく研究であること。
- 主任研究者の所属する慶應義塾大学医学部の倫理審査委員会の承認を得る予定である。
- 資料の匿名化を行う。
- 個人が特定できるファイル A (医療機関、個人名、生年月日、住所都道府県、カルテ番号) と個人が特定できる情報を切り離したファイル B とに厳格に区別する。ファイル A は研究グループとは独立した個人情報管理者が厳密に管理する (下図参照)。
- これにより研究者が入手できる予後情報は匿名化され、調査医療機関担当者は、①対象者の IC を得なくても、②対象医療機関の倫理委員会や所属機関の長の承認を得ていなくても、情報提供が可能となり (疫学倫理指針 11 (2))、個人情報の保護は担保される。
- 以上の方法により特発性心筋症の疫学・臨床研究班は同様の予後調査をすでに実施済みである。



D. 実施

以上の計画は、平成 17 年度に実施予定である。

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服対策研究事業
「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

クローン病に対する抗菌薬治療に関する 多施設共同無作為化比較試験の計画と臨床試験プロトコルの作成

分担研究者 高後 裕 旭川医科大学第三内科 教授

研究要旨：クローン病治療においては、肛門部病変、腸管内外の感染巣に対し、抗菌剤・抗生物質がしばしば用いられる。この場合 Ciprofloxacin が抗菌活性およびクローン病における免疫調節作用を有するとの欧米の報告から選択薬剤となることが多い。本研究では、IL-10 KO マウスにおける腸炎改善効果がみられる Roxithromycin のクローン病に対する臨床的効果を明らかにする目的で臨床試験を計画し、その Ciprofloxacin に対する Roxithromycin の多施設共同無作為化非劣性試験プロトコル作成を行った。そのプロトコルの概要を以下に記載した。実際の臨床試験は全国 10 施設よりなる自主的臨床試験組織によって施行される予定となった。

A. 研究目的

クローン病の原因は不明であるが、現在のところ遺伝的因子、環境因子（ウイルスや細菌などの微生物感染、腸内細菌叢の変化、食餌性抗原など）などが複雑に関与し、免疫系の異常反応が生じていると考えられている。完治させる根本的な治療法は現時点ではないことから、内科的治療（薬物療法と栄養療法）、外科療法を組み合わせ、栄養状態を維持し、症状を抑え、炎症の再燃・再発を予防し、患者のQOLを高める治療が行なわれる。抗生物質は、肛門部病変特に膿瘍形成が認められる場合に用いることが薬物療法の基本方針として示されている。海外における抗菌薬のRCT試験としては、広域抗菌スペクトルを有するニューキノロン系抗菌薬 Ciprofloxacin (CPFX) による次の報告がある。

1) CPFX (1g/day、分2) と Mesalazine 2g/day、分2) との比較試験 (Colombel JF, et al. A controlled trial comparing ciprofloxacin with mesalazine for the treatment of active Crohn's disease. Groupe d'Etudes Therapeutiques des Affections Inflammatoires Digestives (GETAID). Am J Gastroenterol. 1999 94 (3): 674-8.

Complete Remission 率 (6週時: CDAI ≤ 150、ΔCDAI > 75)
CPFX: 56% Mesalazine: 55%

一方、本邦においてはRCT試験による報告はない。しかし、日常臨床においては上記の成績をもとに、CPFXの使用はよく行われている。また、CPFXは抗菌作用のみならず、immunomodulator としての作用機序もクローン病においては存在すると考えられており、これが本症において頻用される理由のひとつとなっている。一方、平成11年度厚生省難治性炎症性腸管障害調査研究班報告書では、慶応大学病院において、クローン病症例5例にマクロライド系抗生物質であるRoxithromycin (RXM) を

300mg/day、分2で8週間投与し、CDAI 250未満であった5例中3例に臨床的緩解が見られたとの報告がある(日比紀文、他：クローン病におけるRoxithromycin持続投与の有効性の検討。「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」班 平成11年度研究報告書、162-163 (2000))。また、マウスのIL-10ノックアウトマウス腸炎モデルにおけるRXMの腸炎軽減効果(玉川 浩司、他：IBDモデルマウスに対するロキシスロマイシンの腸炎抑制効果、第88回日本消化器病学会総会 2002、同、平成15年度厚生省難治性炎症性腸管障害調査研究班)が報告され、本薬剤も抗菌作用のみならずimmunomodulator活性を有し、炎症性腸疾患において有用である可能性が示された。そこで、本研究においては、抗菌薬投与が必要と考えられるクローン病患者に対し、RXMの有用性を、緩解導入率(CDAI < 150) およびCRP各群の平均値の2点をsubjective およびobjective のprimary endpointとした臨床試験により証明し、大規模臨床試験に向けたデータを得ることを目的とした。試験デザインは、既に海外において臨床効果が明らかなCPFXと、本研究における試験薬剤であるRXMのnon-inferiority testとした。多施設共同で症例を蓄積するものとし、試験薬剤の割付も封筒法によるrandomizationとして簡略化した。

B. 研究方法

クローン病に対する抗菌薬治療に関する多施設共同無作為化比較試験

1 対象患者

1) 対象疾患と選択基準

- (1) 厚生労働省の診断基準を満たすクローン病患者でインフォームドコンセントの得られた症例
- (2) 活動性が軽度～中等度 (CDAIが150～300) の患者
- (3) 肛門病変を有し、炎症反応が高値で抗菌薬投与が必

要と考えられる患者

- (4) 入院・外来の別は問わない
- (5) 年齢は16歳以上で、性別は問わない

2) 除外基準

- (1) 薬剤過敏症の既往歴のある患者（マクロライド系抗生物質あるいはニューキノロン系薬）
- (2) ケトプロフェンを投与中の患者（CPFXが禁忌）
- (3) 重篤な肝炎、腎炎、心疾患、肺疾患などの合併症を有する患者
- (4) 癌を合併している例
- (5) 妊娠の可能性のある女性、妊婦、授乳中の女性
- (6) 免疫抑制剤（アザチオプリン、メルカプトプリンなど）を試験開始3ヶ月以内に開始または増量した患者
- (7) ヒト抗TNF α モノクローナル抗体製剤を試験開始3ヶ月以内に使用したことのある患者
- (8) 副腎皮質ステロイドを試験開始1ヶ月以内に開始または増量した患者
- (9) 腸管・肛門病変に対する外科治療を試験開始1ヶ月以内に施行した患者
- (10) CPFX、RXM、または他の経口抗菌剤（メトロニダゾールは除く）を試験開始1ヶ月以内に投与した既往のある患者
- (11) メトロニダゾール、ペンタサ、サラゾピリン、栄養療法（経腸栄養療法、中心静脈栄養）、整腸剤の服用を試験開始前1か月以内に開始した患者。

2. 患者の同意

担当医師は、本調査の調査内容などを患者に説明し、調査への参加について、文書で、患者の自由意志による同意を得るものとする。

3. 調査方法

1) 方法

RXM投与群とCPFX投与群との無作為化多施設共同群間比較試験

2) 割付方法

封筒法

3) 投与薬剤と投与期間

RXMは300mg/日を1日2回分割、CPFXは600mg/日を1日3回分割で、6週間経口投与する。ただし2週目、4週目の観察時点でCDAIが150未満となり、継続投与の必要性がなくなった場合は中止してよい。

4) 評価法

割付前後に評価された症状および臨床検査結果を基に

1) 一次エンドポイント

CDAI<150に至る率、投与2、4、6週目のCRP値

2) 二次エンドポイント

有害事象（ADE）の発現率、2、4、6週目におけるCDAI値、およびその変化率について検討し、CPFXの効果に比較しRXMの効果が劣性でないことを明らかにする。

4. 併用薬剤・療法

- 1) 本研究に影響を及ぼすと考えられる下記の薬剤は併用しない。

- (1) 他の抗菌剤（ただし、メトロニダゾールは除く）
- (2) 抗TNF α 製剤

- 2) 下記の薬剤および療法は、継続して試験期間中併用することは可とするが、投与量の変更は行わないこととする。また、期間中新たに追加しない。

- (1) ペンタサ、サラゾピリン
- (2) 栄養療法（経腸栄養療法、中心静脈栄養など）
- (3) 整腸剤
- (4) メトロニダゾール

- 3) 下記の薬剤および療法は、継続して試験期間中併用することは可とし、減量は可能だが投与量の増量は行わないこととする。また、期間中新たに追加しない。

- (1) プレドニンその他のステロイド剤
- (2) アザチオプリン、6-MPやその他の免疫抑制剤

上記1)~3)に該当した場合は、その時点で試験を中止する。

- 4) 下記の薬剤および療法は常時併用可とするが、その薬剤名、用法・用量、投与期間および投与理由などを症例報告書に記録する。

- (1) 止瀉剤（ロペミン）
- (2) アヘンチンキ、リン酸コデインなどの止痢剤

5. 検査・観察項目

1) 患者背景

割付番号、患者イニシャル、性別、年齢、身長、体重、クローン病推定発病年月、病型の分類（小腸型、大腸型、小腸・大腸型）、X線・内視鏡所見、合併症、既往症、手術歴（腸切除、狭窄形成、肛門病変）、入院歴、現行治療薬剤を症例報告書に記載する。

2) CDAI

CDAI算定表に基づいて合計点数を求め、症例報告書に記入する。

3) 炎症反応

下記項目について測定し、症例報告書に記載する。

CRP (mg/dl)

4) 臨床検査

血液一般検査：

赤血球数、ヘモグロビン値、ヘマトクリット値、白血球数、白血球分画（好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球、単球）血小板数

血液生化学検査：

総蛋白、アルブミン、GOT、GPT、 γ -GTP、Al-P、総ビリルビン、BUN、中性脂肪、総コレステロール、 α -グロブリン、アミラーゼ

5) 有害事象

臨床試験開始から終了・中止までに認めた新たに発現した有害事象はすべて記載し、必要に応じて厚労省の指針に従い販売会社に連絡する。

6. 観察・検査スケジュール

同意を得たクローン病患者について、図1に従って観察・検査を実施する。

図1

試験スケジュール					
	登録期	割付け後（フォローアップ期）			
	前1週	投与開始時	2週後	4週後	6週後または中止時
患者背景	○				
服薬状況		←	←	←	←
CDAI	○	○	○	○	○
CRP, 臨床検査	○	○	○	○	○
有害事象（症状・臨床検査）*		←	←	←	←

* 1：中止・脱落症例についても可能な限り実施する

7. 評価項目

1) 一次評価項目 (primary endpoint, subjective)

Remission (6週時までにCDAI<150を満たした症例) の割合を比較

これ以外の症例 (6週時までにCDAI 150 以上 および途中中止例のうち同意撤回の場合以外) はすべて failureとして解析の分母とする。

2) 一次評価項目 (primary endpoint, objective)

CRP値 (2、4、6週時) を各群で比較する。

3) 二次評価項目 (secondary endpoint,)

有害事象 (症状および臨床検査値異常) の全試験期間中における出現率を各群で比較する。

8. 試験の中止および脱落

下記の基準に該当する出来事が発生した場合、担当医師の判断により本試験を中止し、中止日 (服薬中止日)、理由を症例報告書に記載する。なお、有害事象の発現など安全性に問題が生じ中止した場合、担当医師は速やかに適切な処置を行ない、患者の安全性が確認されるまで追跡調査を行う。

- (1) 重篤な有害事象の発現が認められ試験の遂行が困難と判断した場合
- (2) 症状の悪化が認められ試験の遂行が困難と判断した場合
- (3) 合併症の悪化が認められ試験の遂行が困難と判断した場合

(4) CPFX服用中に、踵の痛みあるいは腫れが見られた場合 (CPFXによるアキレス腱炎、腱断裂等の腱障害が報告されている)

(5) その他試験責任医師または分担医師が投与中止の必要性を認めた場合

9. 統計解析

1) 目標症例数

80例 (各群：40例)

2) 設定の根拠

前述のように対照薬CPFXの緩解導入率は5-ASAと同様に約50-60%と見込まれる。RXMに同様の効果がなければ、inactive placeboと同様に、最大有効率20-30%であると考えられる。この差を検出するためには、5%危険域の両側検定を用いた場合の要求症例数は各群約40例となる。本試験は非劣性試験として計画されているため、この症例数で対照薬CPFXと試験薬RXMの有効率に差が見られない場合、試験薬RXMは対照薬CPFXと同等に有効である可能性があると考えられ、placebo control trialを計画する根拠になり得るとした。

3) 解析方法

(1) 一次評価項目

群別にCDAI、CRPについて、投与前、投与後値をPaired t-testおよびWilcoxon signed-rank testで検定する。また、投与後の変化率について算出し、Student's t-testおよび Mann-Whitney U testで検定する。

(2) 二次評価項目、その他の観察項目

各項目について群別に集計し、Fisherの直接確立法により群間差を検討する。

C. 研究結果

上記のプロトコールは、臨床試験プロジェクトチームにより検討された。このプロトコールに従って実際の臨床試験実施は、全国10施設よりなる自主的臨床試験組織「IBD抗菌剤治療研究会」により平成17年5月以降1年間の研究期間で実施される予定である。

また、研究の倫理面への配慮として、各研究実施施設の倫理委員会の承認を得ることを研究遂行の条件とし、本試験本臨床試験に関する費用、および研究によって補償等の必要性が生じた場合の費用については、同研究会が負担することとなった。

潰瘍性大腸炎長期経過例へのサーベイランスシステムの確立 狙撃生検を中心としたサーベイランスシステム確立とアトラスの作成

分担研究者 松本 誉之 兵庫医科大学総合内科下部消化管 教授

研究要旨：潰瘍性大腸炎の長期経過に伴う、炎症性発癌を早期にかつ患者への負担を軽減し効率的に発見することを目的とするサーベイランスシステムの確立を目的とした狙撃生検による多施設共同研究（計 367 例）を行った結果、内視鏡的な有所見部（隆起並びに発赤を中心とする）を中心に生検することにより、約 3.8% の検出率で dysplasia の診断が可能であることが明らかになった。さらに、一般臨床医が容易に有所見部を同定するためのアトラスを作成することを目的として、メンバー施設を中心として代表的な内視鏡像の集積と検討を行っている。

共同研究者

工藤進英¹⁾ 春間 賢²⁾ 名川弘一³⁾
渡邊聡明³⁾ 五十嵐正広⁴⁾
味岡洋一⁵⁾ 岩男 泰⁶⁾ 樋田信幸⁷⁾
押谷伸英⁸⁾ 渡辺憲治⁸⁾

所属

昭和大学横浜北部病院¹⁾
川崎医科大学²⁾
東京大学大学院³⁾
北里大学⁴⁾
新潟大学大学院⁵⁾
慶應義塾大学⁶⁾
兵庫医科大学⁷⁾
大阪市立大学⁸⁾

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎は、長期経過例・難治例の増加などに伴い、慢性炎症を背景とした炎症性発癌の増加が問題となっている。特に、炎症性発癌では、通常の発癌に比して、分化度の低い癌や浸潤がんの比率が高く、効率的な早期発見が重要と考えられている。本研究班でも、潰瘍性大腸炎からの発癌をより早期に効果的に発見するサーベイランスシステムの確立をめざし、狙撃生検を主体とした多施設の共同研究を行ってきた。これらの結果を背景として、実地医家が実際に応用可能なアトラス作成を目的として、Dysplasia 例の内視鏡的特徴や典型例について検討した。

B. 研究方法

上記の目的でプロジェクトメンバーを中心とした多施設共同研究の症例を検討すると共に、各メンバーのこれまでの経験例から適切な症例と所見を検討した。

（倫理面への配慮）

多施設共同研究の参加者では、インフォームドコンセントを得るため、統一様式の説明文書と同意書を作成した。個人情報に配慮し、本研究への参加が自由意志で行われ、参加しなくても不利益を得ないことを明記した。

C. 研究結果

前年度までのプロトコルに従って集積された 367 例の狙撃生検について病理所見と内視鏡像の対比を行った。その結果、3.8% の症例から dysplasia が検出された。その大部分は、肉眼的有所見部から得られたものであり、内視鏡的正常部と判定された部分からは 1 例のみであった。アトラス作成に当たっては、典型例の内視鏡写真を集積し、その内視鏡的な肉眼所見から分類を行うことが適当と考えられた。また、dysplasia 発現例について今後の経過観察が重要と考えられた。

D. 考察

潰瘍性大腸炎で発症後長期経過（10 年以上）した症例で、特に全大腸炎型では、腸炎を背景とした発癌のリスクが高くなることが知られている。腸炎を背景とする癌は、多発したり粘膜の深いところから発生するため、早期診断が容易でないといわれている。このような癌の発見を目指して、これまで高リスク群に、一定期間で全大腸の内視鏡検査と組織検査（内視鏡的異常の有無にかかわらず盲目的に一定間隔で多数の組織を採取）で前癌病変の発見を行うサーベイランス検査が勧められている。欧米では、サーベイランスの精度を上げるには、盲目的に採取する生検の個数を増やし、数十個以上にすることが議論されている。しかしながら、必ずしも効率的な発見が得られないこと、症例数の増加に伴い実地診療に当たっては医療資源の効率的な利用にならないことなどの問題がある。今回の検討

の結果、異常所見部を中心とした狙撃生検において、これまでのランダムバイオプシーに遜色のない発見率が確認され、狙撃生検が有用であることが示された。今後 dysplasia の経過観察並びに、実地診療に当たり有用なアトラス作成を完成させる予定である。

E. 結論

本研究の結果は、より効率的なサーベイランス指針の設定に有用と考えられるが、実地臨床への応用にはアトラス作成が重要であり、早期の完成を目指して作業を進めている。

Colitic cancer における IL-6 trans-signaling の関与に関する研究

研究協力者 伊藤 裕章 大阪大学大学院医学系研究科分子病態内科学 講師

研究要旨: T cell specific TGF- β transgenic mice, T cell specific dominant-negative TGF β R II transgenic mice を用いた azoxymethan/dextran sulfate sodium 炎症発癌モデルの検討から IL-6 trans-signaling が大腸発癌に必須であり、腫瘍浸潤 T 細胞の産生する TGF- β がこれを抑制することによって腫瘍の発育を抑止する可能性が示唆され、抗 IL-6R 抗体が潰瘍性大腸炎に伴う大腸発癌の抑制にも有効である可能性が示された。

A. 研究目的

長期にわたる潰瘍性大腸炎が大腸癌のリスクとなることは知られており、ひとつには TGF- β が関与しているとされているが、その詳細なメカニズムはまだわかっていない。そこでマウスに azoxymethan (AOM) と dextran sulfate sodium (DSS) を投与してできる大腸の炎症発癌モデルを用いて、サイトカインの関与について比較検討した。この研究はドイツ・マインツ大学 Neurath 教授らとの共同研究による。

B. 研究方法

SPF 下の FVB/N, C57BL/6, RAG-1 knockout mice の腹腔内に AOM を 1 回投与し、その後 3% DSS 自由飲水 1 週間、飲用水 2 週間を 3 クール行い大腸癌を発症させた。T cell specific TGF- β transgenic mice (TGF- β tg)、T cell specific dominant-negative TGF β R II transgenic mice (dnTGF β R II) にも同様の処置を行った。1mg ラット抗マウス IL-6 レセプター (IL-6R) 抗体 (MR-16-1)、500 μ g の gp130-Fc は週 1 回腹腔内に投与した。マウス大腸を麻酔下に内視鏡で観察し大腸癌の発症を確認した。

C. 研究結果

TGF- β tg は wild type (WT) に比べて有意に発癌が遅く、腫瘍サイズも小さかった。このことから腫瘍浸潤 T 細胞の分泌する TGF- β が大腸発癌抑制効果をもつことが示唆された。一方 WT では TGF β R I の発現が非常に少なく、TGF- β がたくさんある環境下でもそのシグナル伝達が損なわれていることが示唆された。dnTGF β R II では TGF- β tg や WT に比べ腫瘍の数も多くサイズも大きかった。T 細胞の産生するサイトカインを測定したところ IFN- γ 、IL-4、IL-10、TNF- α には差がなかったが、dnTGF β R II は TGF- β tg や WT より著明に多くの IL-6 を産生していた。WT マウスの大腸での IL-6 産生を経時的にみると最初の腫瘍が発症する第 20 日頃に増加することもわかった。IL-6 の産生源は腫瘍間質と T 細胞で

あることも判明した。WT の腫瘍から分離した CD4 陽性 T 細胞は実際多量の IL-6 を産生し、TGF- β 添加により抑制された。AOM/DSS 処置をした dnTGF β R II や WT に抗 IL-6R 抗体を投与すると大腸発癌は強く抑制された。IL-6R の発現をみると正常大腸粘膜には強い発現が見られたが腫瘍にはほとんど見られなかったが STAT3 のリン酸化は強力に誘導されていた。腫瘍での IL-6R mRNA の発現が強いことと IL-6R を shedding する TACE の発現が強いことからこれらの細胞が可溶性 IL-6R (sIL-6R) の産生源であると考えられた。Hyper-IL-6 (IL-6 と sIL-6R を共有結合させたもの) を dnTGF β R II に投与すると腫瘍は強い増殖活性を示し、sIL-6R を介した IL-6 trans-signaling をブロックする gp130-Fc は dnTGF β R II の大腸発癌を抑制した。

D. 考察

抗 IL-6R 抗体はクローン病に対して臨床効果が示されたが、潰瘍性大腸炎に伴う大腸発癌の抑制にも有効である可能性が示された。

E. 結論

IL-6 trans-signaling が大腸発癌に必須であり、腫瘍浸潤 T 細胞の産生する TGF- β がこれを抑制することによって腫瘍の発育を抑止する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Ito H, Takazoe M, Fukuda Y, Hibi T, Kusugami K, Andoh A, Matsumoto T, Yamamura T, Azuma J, Nishimoto N, Yoshizaki K, Shimoyama T, Kishimoto T. A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease. *Gastroenterology* 126, 989-996, 2004
Becker C, Fantini MC, Schramm C, Lehr HA, Wirtz S,

Nikolaev A, Burg J, Strand S, Kiesslich R, Huber S, Ito H, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Galle PR, Blessing M, Rose-John S, Neurath MF. TGF β suppresses tumor progression in Th2 colitis and associated colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity* 21, 491-501, 2004

Doganci A, Eigenbrod T, Krug N, De Sanctis GT, Hausding M, Erpenbeck VJ, El-Bdaoui H, Schmitt E, Bopp T, Kallen K-J, Herz U, Schmitt S, Luft C, Hecht O, Hohlfeld M, Ito H, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Rose-John S, Renz H, Neurath MF, Galle PR, Finotto S. The IL-6R α chain controls lung CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cell development and function during allergic airway inflammation in vivo. *Journal of Clinical Investigation* 115, 313-325, 2005

Ito H. Novel therapy for Crohn's disease targeting interleukin-6 signalling. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 8, 287-294, 2004

2. 学会発表

伊藤裕章 Treatment of Crohn's Disease with Anti-IL-6

Receptor Antibody. 第 90 回日本消化器病学会総会 2004. 4. 23 仙台

Becker C, Fantini MC, Schramm C, Lehr HA, Burg S, Blessing M, Strand D, Galle PR, Ito H, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Rose-John S, Neurath MF. TGF- β Suppresses Tumor Progression in Th2 Colitis and Associated Colon Cancer by Inhibition of IL-6 Trans-Signaling. DDW2004 2004. 5. 18 New Orleans U. S. A.

伊藤裕章 Anti-IL-6 Receptor Antibody Therapy for Crohn's Disease. 第 32 回日本臨床免疫学会総会 2004. 10. 9 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

I. 特許取得

IL-6 アンタゴニストを有効成分として含有する炎症性腸疾患の予防または治療剤 1999 年 3 月 16 日出願 特願 2000-536409 及び JP99/01298

IL-6 アンタゴニストを有効成分として含有する乾癬の予防または治療剤 2001 年 10 月 25 日出願 JP01/09409

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服対策研究事業
「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

潰瘍性大腸炎に伴う colitic cancer における 抗 p53 抗体測定の有用性の検討

主任研究者 日比 紀文 慶應義塾大学医学部内科 教授

研究要旨：潰瘍性大腸炎の癌化例の早期発見のためには現在のところ surveillance colonoscopy を実践するしかなく、さらなる高危険群の絞り込みなどが可能となるマーカーが切望されている。colitic cancer は一般大腸癌に比べて比較的早期に、すなわち dysplasia の段階で p53 遺伝子の異常が関与するといった特徴を持ち、今回、潰瘍性大腸炎患者および colitic cancer 合併患者の血清抗 p53 抗体を測定し、その有用性を検討した。【方法】潰瘍性大腸炎患者 202 例、健常人 63 例の血清中の抗 p53 抗体を、ヒト wild-type p53 組み換え蛋白を固着化した anti-p53 ELISA kit を用いて測定した。【結果】健常人において抗 p53 抗体陽性率が 1.6%であったのに対し、潰瘍性大腸炎患者では 13.9%の陽性率であった。そのうち、colitic cancer、dysplasia 合併例では抗 p53 抗体が 84.6%と高率に陽性であった。【結論】ELISA 法を用いた血清中抗 p53 抗体の測定は、組織検体を必要とせず多数の検体を簡便に測定でき、潰瘍性大腸炎に伴う colitic cancer の高危険率群の絞り込みに有用である可能性が示唆された。

共同研究者

芳沢茂雄¹⁾ 松岡克善¹⁾ 久松理一¹⁾ 岡本 晋¹⁾
高石官均²⁾ 井上 詠²⁾ 藤田晴久³⁾ 河上 裕³⁾
日比紀文¹⁾

所属

慶應義塾大学消化器内科¹⁾
同 包括先進医療センター²⁾
同 先端医学研究所³⁾

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎に合併する大腸癌 (colitic cancer) は 1925 年に Crohn と Rosenberg の報告に端を発し、その後の研究により、潰瘍性大腸炎には高率に大腸癌が合併することが明らかとなっている。累積発癌率は潰瘍性大腸炎の罹患年数と比例して増加し、10 年で 2%、20 年で 8%、30 年で 18%にも及ぶと報告され、全大腸炎型および左側結腸型が高危険群とされている。しかし、colitic cancer では背景粘膜に炎症を伴うため、平坦で境界不鮮明な病変が多く早期診断は容易ではない。

colitic cancer は、慢性炎症を母地として dysplasia と呼ばれる異型粘膜が発生し、癌に進展していくと考えられている。そして dysplasia はそれ自身が前癌病変としての性格を持つとともに、dysplasia のみられた例では他の部位に dysplasia や癌のみられることも多く、dysplasia は癌発生の high risk のマーカーとしてとらえられている。これを利用して colitic cancer の早期

発見を目的とした surveillance が欧米を中心に行われている。しかし、これまでの surveillance は、物理的にも対費用効果の点からも有効性は高くはないと考えられ、効率の良い surveillance 法の確立や分子生物学的手法を用いた高危険率群の絞り込みが切望されている。

colitic cancer、dysplasia の分子生物学的特徴として、一般の大腸癌と比べ高率に p53 遺伝子の変異あるいは同遺伝子の存在する第 17 番染色体短腕の LOH が報告されており、免疫組織染色における検討でも癌は高率に p53 蛋白染色陽性で、さらに dysplasia の段階でもこれらの変化がすでに高率に認められると報告されている。抗 p53 抗体は遺伝子変異を起こした p53 蛋白質の分解遅延による過剰な蓄積に伴い産生される抗体であり、p53 遺伝子変異あるいは発現亢進の間接的な指標として臨床的意義を持つと考えられている。p53 抗体は p53 遺伝子変異を直接同定する方法ではないが、腫瘍組織を必要とせず、p53 遺伝子変異を間接的に簡易に測定でき、健常人ではほとんど認められない。今回我々は、以前より肺癌や食道癌、散発性大腸癌などにおいて今までの腫瘍マーカーに比べより早期のマーカーとなりうる事が報告されている血清抗 p53 抗体を測定し、臨床病理学的因子との関連について検討した。

B. 研究方法

対象は当院通院中の潰瘍性大腸炎患者 202 例と散発性進行大腸癌 85 例、健常人対照 63 例で、文書による同意を得た上で、末梢血を採取した。採取した末梢血を血清に分離し、抗 p53 抗体の測定まで、凍結保存した。

抗 p53 抗体の測定は、ヒト Wild-type p53 組み換え蛋白を固相化した Anti-p53 ELISA kit (DIANOVA) を用いて enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA 法) にて測定し、基準範囲は健常人の平均+2SD 以内とした。

大腸癌、dysplasia を認めた症例においては、組織中の p53 蛋白の過剰発現を免疫組織化学法にて検討した。

C. 研究結果および考察

抗 p53 抗体の陽性率は、健常人 63 例中 1 例で 1.6% であったのに対し、進行大腸癌 85 例中 45 例で 52.9%、潰瘍性大腸炎 202 例中 28 例で 13.9% であった。潰瘍性大腸炎患者について罹患年数別に検討すると、発症後 10 年未満の患者では 120 例中 9 例 (7.5%) が要請であったのに対して、10 年以上の患者では 82 例中 19 例 (23.2%) が陽性であった。罹患範囲別に検討すると、特に発症後 10 年以上で全大腸炎の患者が 44 例中 16 例 (36.3%) と高率に陽性であった。

今回検討した潰瘍性大腸炎症例中、8 例の大腸癌、1 例の high grade dysplasia (HGD)、4 例の low grade dysplasia (LGD) を認めたが、大腸癌 8 例中 7 例 (87.5%)、HGD 1 例中 1 例 (100%)、LGD 4 例中 3 例 (75%) が陽性であり、大腸癌・dysplasia を伴わない症例に比して有意に p53 抗体の陽性率が高かった。また、大腸癌の 1

例、LGD の 1 例をのぞいて、血清 p53 抗体と組織 p53 染色の結果は一致するものであった。

E. 結語

ELISA 法を用いた血清中抗 p53 抗体の測定は、組織検体を必要とせず多数の検体を簡便に測定でき、潰瘍性大腸炎症に伴う colitic cancer の高危険率群の絞り込みに有用である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

芳沢茂雄、井上 詠、松岡克善、高石官均、岡本 晋、久松理一、岩男 泰、岡田 勉、藤田知信、河上 裕、日比紀文：潰瘍性大腸炎合併 Colitic cancer のサーベイランスとしての抗 p53 抗体測定の有用性。第 63 回日本癌学会学術総会 2004 年

H. 知的財産権の出願

なし

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服対策研究事業
「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

遺伝子多型を用いた炎症性腸疾患感受性・疾患修飾遺伝子の検討

分担研究者 木内 喜孝 東北大学大学院消化器病態学分野 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・病態には遺伝的要因が強く関与することが指摘され、欧米では既にクローン病の感受性遺伝子として NOD2 遺伝子が同定されている。本研究では欧米の連鎖解析で確認された感受性領域 IBD3 について、日本人潰瘍性大腸炎疾患感受性遺伝子領域をさらに絞り込む目的で、IBD3 領域約 16Mb にわたって設定したマイクロサテライトマーカーを用いて症例・対照研究を行った。その結果、全てのマーカーの中で最も強い相関を認めたのはクラス I centromere 側に位置する C2-4-4. allele239 ($P=2.9 \times 10^{-9}$; OR=3.74, 95% CI = 2.50 - 5.60) であった。また、HLA-B との haplotype 解析、連鎖不平衡解析を行った結果、本研究で潰瘍性大腸炎と強く相関を認めた対立遺伝子はいずれも従来日本人潰瘍性大腸炎との相関が報告されている B*52 と強い正の連鎖不平衡の関係にあることが認められた。以上の結果より、日本人潰瘍性大腸炎の感受性遺伝子は、HLA 内、特にクラス I の centromere 側からクラス III の telomere 側にかけて存在し、B*52 と強い連鎖不平衡を呈していると考えられた。

共同研究者

野村栄樹¹⁾ 高橋成一¹⁾ 根来健一¹⁾
高木 承¹⁾ 下瀬川徹¹⁾ 杉村一仁²⁾ 井上 詠³⁾

所属

東北大学大学院消化器病態学分野¹⁾
新潟大学医歯学総合病院第三内科²⁾
慶應義塾大学医学部内科³⁾

A. 研究目的

炎症性腸疾患（クローン病・潰瘍性大腸炎）の発症に遺伝因子が関与していることは既に定説となり、欧米においては複数の感受性遺伝子座位や感受性遺伝子 NOD2 が同定されている。疾患感受性遺伝子が同定されることにより、本疾患の病因・病態の解明、診断・治療法の進歩への大きな貢献が予想されている。しかし、人種によって感受性遺伝子が異なることが判明したため、欧米の研究結果をそのまま日本人に当てはめることは不可能であり、今後日本人炎症性腸疾患感受性遺伝子の解明を行わなければならない。

炎症性腸疾患のような多因子疾患における感受性遺伝子同定戦略は、大きく分けて 2 通りある、1 つは、罹患同胞対による連鎖解析によって感受性遺伝子座位を特定していく方法、もう 1 つは候補遺伝子解析による方法である（現実的には 2 つの方法を組み合わせる解析することが多い）。罹患同胞対を用いた連鎖解析は、欧米において既に 10 数件に達する報告が存在し、その成果が欧米クローン病患者の感受性遺伝子 NOD2 同定につな

がっている。残念ながら、現在まで日本人炎症性腸疾患を対象とした連鎖解析のまとまった報告或いは連鎖解析に必要な罹患同胞対の検体は存在しない。

一方従来より日本人潰瘍性大腸炎患者と HLA (HLA-DRB1*1502, HLA-B*52) が強く相関することが報告されていた。この HLA 領域は欧米の連鎖解析の結果、感受性領域 IBD3 とされる領域の一部であり、日本人潰瘍性大腸炎の感受性遺伝子も IBD3 の領域にあることが強く示唆されていた。

そこで約 16Mb に及ぶ IBD3 領域から、さらに日本人潰瘍性大腸炎感受性領域を絞り込むため、マイクロサテライトマーカーを用いた相関解析（症例－対照研究）を行った。

B. 研究方法

1) 対象は潰瘍性大腸炎患者 (UC) 183 例、健常対照者 (HC) 186 例である。検体採取時期により UC 群、HC 群をそれぞれ 2 stage に分類し、マイクロサテライトマーカーを用いて相関マッピングを行った。Stage 1 で得られた結果を stage 2 でも同様に統計解析して比較検討し、replication study とした。両 stage で再現性が得られれば、より高い信頼性を持つ結果であると考えられる。次に、二つの stage で再現性を持って強く相関が認められた領域に 4 個のマーカーを追加し、さらに詳細な相関マッピングを行った。なお、3 省庁合同指針「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い計画書・患者説明文書・同意書・マニュアル書を作成し、東北大学倫理委員会にて承認された後、検体採取時にインフォ

ームドコンセントを得て研究を行った。

2) マイクロサテライトマーカー：第 6 染色体短腕の HLA 領域を中心とする約 16Mb の範囲に、最初に計 20 個のマイクロサテライトマーカーを設定した。マイクロサテライトマーカーの位置を図 1～3 に示す。また、強く相関を認めた領域である HLA クラス I の centromere 側に更に詳細にマッピングするために追加した 4 個のマイクロサテライトマーカーを同様に図 1～3 に示す。マーカーの位置、プライマー配列の一部は、過去の論文、Genome Database (<http://gdbwww.gdb.org/>), National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) を参考にした。

3) 統計解析

① Hardy-Weinberg proportion test: HC, UC 群の stage1, stage2 それぞれにおいて Hardy-Weinberg proportion test を施行し、各遺伝子型が Hardy-Weinberg 平衡を示すか検討した。P < 0.05 を有意とみなした。

② Genotypic differentiation test: 各々のマーカーにおいて、UC 群と HC 群の間で、対立遺伝子分布全体として差が存在しないか、Genotypic differentiation test を用いて検討した。P < 0.05 を有意とみなした。

③ Allelic association test: Genotypic differentiation test で有意に両群の対立遺伝子分布に差があるとされたマーカーについて、どの対立遺伝子において、両群で差が認められるか $2 \times 2 \chi^2$ 検定を用いて確認した。なお参考として、genotypic differentiation test で有意差が確認できなかったマーカーについても、各マーカーの対立遺伝子頻度について $2 \times 2 \chi^2$ 検定を行い、両群間の差を検定した。疾患と対立遺伝子の関連の強さは、オッズ比 (odds ratio: OR) と 95% 信頼区間 (95% confidence interval: 95% CI) で表した。この際、各マーカーの対立遺伝子数で補正を行った corrected P-value (Pc) を用いて、Pc < 0.05 を有意とした。

上記の① Hardy-Weinberg proportion test, ② Genotypic differentiation test, ③ Allelic association test について stage1, stage2, 全検体と統計解析を行い、比較検討した。

④ HLA-B との連鎖不平衡解析: 従来より日本人 UC と強い相関が報告されている HLA-B*52 と本研究で相関を認めたマーカーの対立遺伝子との関係を検討するために HLA-B との連鎖不平衡解析を施行した。2 マーカーで形成される全ての haplotype の頻度は再帰計算を用いた最尤法の一つである EM アルゴリズムを用いて推定した。

C. 研究結果

1) Hardy-Weinberg proportion test: HC 群では、stage1, stage2 とともに全マーカーの遺伝子型頻度の分布が、Hardy-Weinberg 平衡より逸脱していないことが示された。一方、UC 群 (図 1) では、stage1, stage2 で HLA に位置するマーカーを中心に Hardy-Weinberg 平衡より逸脱していた。

2) Genotypic differentiation test (図 2): stage 1, 2 とともに HLA 内のマーカーで有意差を認め、HLA 外のマーカーでは強い有意差は認められなかった。

3) Allelic association test: それぞれのマーカーで疾患と相関を示す対立遺伝子が存在したが、その中で最も強い相関 (maximum, ORlowest Pc) を認めたのは C2-4-4 allele239 (OR=3.74, 95%CI=2.50-5.60, Pc=2.9×10⁻⁹) であった。

4) HLA-B との連鎖不平衡解析: Allelic association test で UC と強い正の相関を示したマーカーの対立遺伝子と B*52 間の haplotype はそれぞれ強い正の連鎖不平衡を示していた。このうち、最も強い連鎖不平衡定数 (R=0.858) が認められたのは C2-4-4 allele239 - HLA-B*52 haplotype であった。

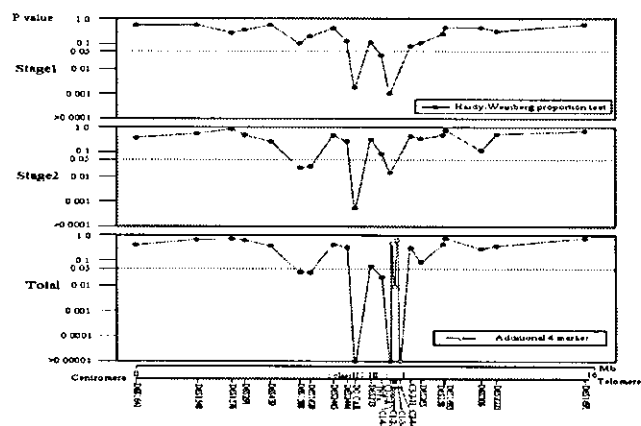


図 1. Hardy-Weinberg proportion test

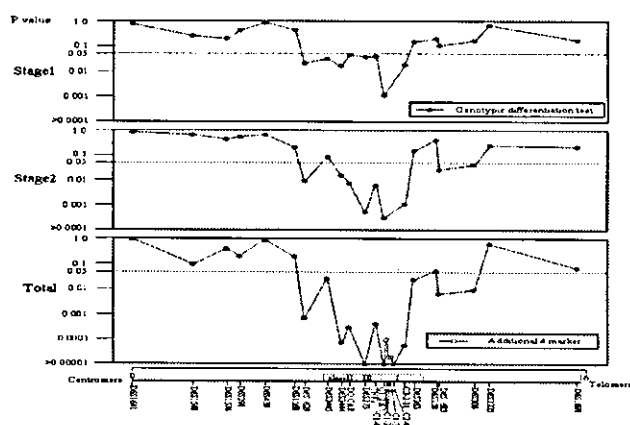


図 2. Genotypic differentiation test

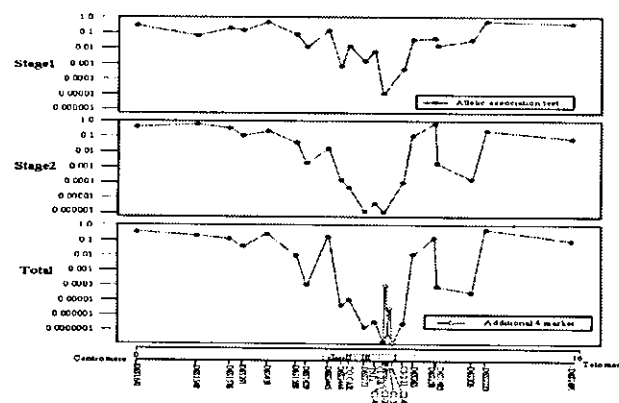


図 3. Allelic association test

D. 考察

本研究は、炎症性腸疾患感受性遺伝子座位の1つである第6染色体短腕 (IBD3) 約16Mbの範囲に、マイクロサテライトマーカーを用いて日本人HC群とUC群との間で相関マッピングを施行したものである。マイクロサテライトマーカーを用いて相関マッピングを行った研究は他疾患ではいくつか報告されているが、UCでHLA内外にわたってマーカーを設定し、相関解析を施行してHLA内、特にクラスIのcentromere側からクラスIIIのtelomere側にかけて強い相関を認めたという知見は、本研究が初めてである。

第6染色体短腕の炎症性腸疾患感受性座位は、Hampeらによる連鎖解析によってD6S276にピークLODスコア2.07が報告されて以来、数々のreplication studyによってその連鎖が確認された部位である。UC、CDともに強い連鎖を認める領域であるが、Hampeらは後にUC単独で解析した場合でも同じく第6染色体短腕のマーカーD6S461との連鎖があること(ピークLODスコア2.27)を報告している。また、相関解析においてもUCとHLA内の数々の対立遺伝子との相関が報告されている。以上より、UC感受性遺伝子はHLA領域を含めその近傍に存在すると考えられ、HLA領域を中心とした約16Mbの範囲を本研究の対象領域とした。本研究で用いたマイクロサテライトマーカーの平均対立遺伝子数は10.2で、これまでも過去の報告で相関解析において有用性の高いマーカーとして用いられている。

本研究では、HC群における各マーカーの遺伝子型頻度がHardy-Weinberg平衡を示し、対象集団に偏りがないうと同時にタイピングが正確に施行されている傍証が得られた。一方、UC群では、stage1, stage2ともに再

現性を持ってHLA内のマーカーを中心にHardy-Weinberg平衡からの逸脱がみられ、またGenotypic differentiation test, Allelic association testともにHLA内のマーカーに疾患との強い相関が認められた。Stage1, stage2ともにHLAクラスIに存在するC2-4-4.allele239 (OR=3.74, 95%CI=2.50-5.60, $P=2.9 \times 10^{-9}$)においてmaximum OR, lowest P_c を認めた。興味深いことに、この領域は尋常性乾癬やnon-melanoma skin cancerで相関を認め、感受性遺伝子の存在が示唆される部位と一致していた。しかし、これらの疾患とUCで相関を認めたマーカーの対立遺伝子が異なっていることから、マーカーと連鎖するhaplotype、そして感受性遺伝子そのものは疾患毎に異なっていることが予想される。また我々は、HLA-Bとの連鎖不平衡解析を施行したところ、C2-4-4.allele239-HLA-B*52 haplotypeにおいて強い正の連鎖不平衡($R=0.858$)を呈していることを見出した。

E. 結論

日本人潰瘍性大腸炎の感受性遺伝子はHLA領域内にあり、特にクラスIのcentromere側からクラスIIIのtelomere側にかけて存在し、①HLA-B*52と強い連鎖不平衡の関係にある可能性、または②HLA-Bそのものであり、強固な連鎖不平衡を示している可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

Genes & Immunity 2004 Sep;5(6):477-83.

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服対策研究事業
「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

炎症性腸疾患と TAP2 遺伝子多型に関する研究

研究協力者 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:炎症性腸疾患であるクローン病 (CD) と潰瘍性大腸炎 (UC) の成因の一つに抗原分子の認識異常が考えられている。マクロファージ等の細胞に取り込まれた蛋白抗原はペプチドに分解され、小胞体の膜状に存在する Transporter associated with antigen processing (TAP) の選択的輸送により小胞体内に取り込まれ、最終的に Major histocompatibility complex (MHC) class I 分子で抗原提示される。TAP1 および TAP2 遺伝子は IBD3 に相当する 6p21.3 領域に存在し、その多様性が疾患にかかわることが指摘されている。今回、TAP2 遺伝子のエキソン 10 近傍の遺伝子多型と炎症性腸疾患の症例-対照研究を行った。アレル頻度、では明らかな相関は認めなかったが、イントロン 10 に存在する IVS10, ds +23, t/c 多型において cc ホモ接合体は CD のリスクが有意に高いことが明らかとなった。同時に cc ホモ接合体は UC の発症に抑制的に働くこと可能性が示唆された。本遺伝子および近傍遺伝子に真の発症にかかわる遺伝子が存在することが示唆された。

共同研究者

高川哲也¹⁾ 武田直久¹⁾ 福田能啓¹⁾
松本登之¹⁾ 池内浩基²⁾ 山村武平²⁾

所属

兵庫医科大学 下部消化管内科学講座¹⁾
兵庫医科大学 外科学第2講座²⁾

Sjogren 症候群, systemic lupus erythematosus (SLE), 天疱瘡等の疾患の易罹患性と関連することが報告されてきた⁷⁻¹²⁾。TAP 遺伝子をホモ欠失で MHC class I 機能低下をきたすことが報告された¹³⁾。この事象は動物モデルでも確認されている³⁾。炎症性腸疾患との関連研究は北欧で行われ、CD との関連があり、UC においては重症度との関連があることが指摘された。今回、わが国の炎症性腸疾患患者において、TAP2 遺伝子多型と発症あるいは病態との関連性の有無を調査した。

A. 研究目的

難治性の炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease: IBD) には潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis: UC) とクローン病 (Crohn's disease: CD) が知られ、その病態解明は進められてきたが、未だ原因不明である。特定疾患としてその原因究明と根治的治療の開発が切望されている¹⁾。生まれながらに備わった易罹患性と環境因子などの多種多様な外的要因が加わり、それらの相互作用の結果によって発症することが考えられている。UC と CD は消化管粘膜の物質の輸送や透過性異常、さらには抗原提示・認識異常などの結果、局所免疫の異常により発症し、慢性化した疾患と考えられ、遺伝的要因と環境要因による多因子病の一つとして認識されている。

ATP 駆動型トランスポーター ABC (ATP binding cassette) スーパーファミリーとして Transporter associated with antigen processing (TAP) が存在する²⁻³⁾。TAP1 と TAP2 分子が互いにヘテロダイマー形成し、小胞体膜での選択的輸送機能を発揮する⁴⁻⁵⁾。両分子をコードする TAP1 遺伝子および TAP2 遺伝子にはいくつかの多型報告がなされた⁶⁻⁷⁾。さらに、強直性脊椎炎、insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM), celiac disease,

B. 研究方法

潰瘍性大腸炎患者、クローン病患者の病態調査を行うとともに、インフォームドコンセントを得た上で、末梢血から DNA 抽出を行った。研究対象数は CD 患者群 207 例、UC 患者群 206 例で健康成人 212 名を対照群とした。核酸試料を遺伝子多型解析に供した。

TAP2 遺伝子多型 (Figure 1a) の内、4 種類の伝子多型が集族するエキソン 10 近傍の塩基配列に焦点を当て、DNA シークエンサーを用いて解析した。すなわち IVS9, as -9 c/t, Ala565Thr, Met577Val, IVS10, ds +23 t/c で Figure 1b にそれぞれの多型部位でヘテロ接合を示した結果を示した。対立遺伝子 (アレル) 頻度を基に統計的解析を行った。

(倫理面への配慮)

研究計画書、説明書、意思確認書等とともに兵庫医科大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する専門小委員会に申請し、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」

(平成 13 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) に沿って審査を経た後、同大学倫理委員会で最終的な承認を得た。研究の内容や方法等を十分説明した

後、研究協力依頼をする。個人の自由意思を尊重し、「意思確認書」に書面で意思を記載してもらい同意を得られた場合は、試料採取等を行った。試料や臨床情報は個人情報担当管理者のもと、連結可能匿名化し個人情報保護に努める。解析はネットワークから遮断されたコンピューターを用いた。

C. 研究結果

TAP2 遺伝子のエキソン 10 近傍に存在する 4 種類の遺伝子多型である IVS9, as -9 c/t, Ala565Thr, Met577Val, IVS10, ds +23 t/c で前 3 者において対照群と炎症性腸疾患の各疾患群との間に有意さは認めなかった。唯一、IVS10, ds +23 t/c 多型において、cc ホモ接合体は日本人健常対照者 212 名の内、57 名 (26.9%) であったが、CD 群では 207 例中 83 例 (40.1%) でオッズ比 1.82 (95% C.I.: 1.21-2.75), p-value: 0.004 で有意に高値を示した (Table 1, Figure 2)。逆に UC 群では cc ホモ接合体は有意に少なく、206 例中 37 例 (18.0%) であった (オッズ比: 0.60, 95% C.I.: 0.39-0.99)。CD 群と UC 群でまったく異なる結果が示された。

D. 考察

ATP 駆動型トランスポーター「ABC (ATP binding cassette) タンパク質」は細胞質内外で、物質の選択的輸送機能を有する分子である。Transporter associated with antigen processing (TAP) は互いに相同性の高い TAP1 と TAP2 分子が存在し、ヘテロダイマー形成し、選択的輸送機能により蛋白分子を小胞体内に取り込み、ゴルジ装置を経由して MHC class I に抗原提示する重要な役割を担っている²⁻⁵⁾。TAP2 遺伝子はヒトの第 6 番染色体短腕 (6p21.3) に位置し、703 アミノ酸をコードする。第 6 番染色体短腕は HLA など免疫に関連する分子をコードする遺伝子が集族している領域で、炎症性腸疾患の候補遺伝子座 (IBD3) として最も注目されている領域である¹⁷⁾。今回、intronic SNP ではあるが、IVS10, ds +23 t/c の cc ホモ接合で有意差を得たことは、TAP2 あるいは近傍の遺伝子でホモ接合することで CD の易罹性をきたす候補の存在を示唆しているものと考ええる。ヒトの segregation study での TAP 分子のホモ欠失例と Tap2 knockout mouse (Tap2^{-/-}) で、MHC class I 分子の発現低下が指摘されており、報告者らの仮説と合致するものと考えている。強直性脊椎炎、insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM)、celiac disease、Sjogren 症候群、systemic lupus erythematosus (SLE)、天疱瘡等で TAP2 あるいは TAP1 を含めたハプロタイプ研究で相関が示されており、炎症性腸疾患においてもその局所免疫異常に TAP 遺伝子の多型が関与している可能性をうかがわせる。今後は TAP2 遺伝子の全領域を精査し、ハプロタイプ研究あるいは明らかな遺伝子異常の探索を進めていくことが必要である。

E. 結論

TAP2 遺伝子の IVS10, ds +23 t/c 多型による炎症性

腸疾患の症例-対照研究の結果、CD 群で cc ホモ接合体との相関を認めた。

(参考文献)

- 1) Podolsky DK: Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1997; 325: 928-937, 1008-1016.
- Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen IA, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 324: 84-88, 1991.
- 2) Spies, T., Bresnahan, M., Bahram, S., et al: A gene in the human major histocompatibility complex class II region controlling the class I antigen presentation pathway. *Nature*. 348: 744-747, 1990.
- 3) Spies, T., DeMars, R.: Restored expression of major histocompatibility class I molecules by gene transfer of a putative peptide transporter. *Nature* 351: 323-324, 1991.
- 4) Spies, T., Cerundolo, V., Colonna, M., et al: Presentation of viral antigen by MHC class I molecules is dependent on a putative peptide transporter heterodimer. *Nature* 355: 644-646, 1992.
- 5) Neefjes, J.J., Momburg, F., Hammerling, G.J.: Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science*. 261: 769-771, 1993.
- 6) Powis, S.H., Mockridge, I., Kelly, A., et al: Polymorphism in a second ABC transporter gene located within the class II region of the human major histocompatibility complex. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 89: 1463-1467, 1992.
- 7) Colonna, M., Bresnahan, M., Bahram, S., et al: Allelic variants of the human putative peptide transporter involved in antigen processing. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 89: 3932-3936, 1992.
- 8) Singal, D.P., Qiu, M.Y.X., D' Souza, M.: Polymorphisms in the TAP2 gene and their association with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 12: 29-33, 1994.
- 9) Kumagai, S., Kanagawa, S., Morinobu, A., et al: Association of a new allele of the TAP2 gene, TAP2*Bky2 (Val577), with susceptibility to Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 40: 1685-1692, 1997.

10) Kanagawa, S., Morinobu, A., Koshiba, M., et al: Association of the TAP2*Bky2 allele with presence of SS-A/Ro and other autoantibodies in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 12: 258-265, 2003.

11) Hoarau, J.J., Cesari, M., Dieye, A., et al: Comparison of TAP2 frequencies in type 1 diabetes patients and healthy controls from three ethnic groups indicates an African origin for the TAP2 G allele. *Eur. J. Immunogenet.* 30: 207-211, 2003.

12) Cesari, M., Hoarau, J.J., Caillens, H., et al: Is TAP2*0102 allele involved in insulin-dependent diabetes mellitus (type 1) protection? *Hum. Immunol.* 65: 783-793, 2004.

13) de la Salle, H.; Hanau, D.; Fricker, D.; et al: Homozygous human TAP peptide transporter mutation in HLA class I deficiency. *Science* 265: 237-241, 1994.

14) Heresbach D et al: Are HLA-DR or TAP genes genetic markers of severity in ulcerative colitis? *J Autoimmunity* 9: 777-784, 1996.

15) Heresbach D et al: Investigation of the association of major histocompatibility complex genes, including HLA class I, class II and TAP genes, with clinical forms of Crohn's disease. *Eur J Immunogenet* 23: 141-151, 1996.

16) Heresbach D et al: TAP gene transporter polymorphism in inflammatory bowel diseases. *Scand J Gastroenterol* 32: 1022-1027, 1997.

17) Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K, Terwilliger JD, Lathrop GM, Bell JI, Jewell DP. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet.* 14: 199-202, 1996.

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表
1. 論文発表

Takagawa, T., Tamura, K., Takeda, N., Tomita, T., Ohda, Y., Fukunaga, K., Hida, N., Ohnishi, K., Hori, K., Kosaka, T., Fukuda, Y., Ikeuchi, H., Yamamura, T., Miwa, H., Matsumoto, T.: IL-18 gene promoter polymorphism in ulcerative colitis: association with disease susceptibility and extent of disease.

(in submission)

2. 学会発表

田村和朗, 嵯峨山健, 山村武平 (2004) 潰瘍性大腸炎合併大腸癌の CDKN2A 異常およびミスマッチ修復機構異常とその意義. (パネルディスカッション) 第 104 回日本外科学会定期学術集会, 4. 7-9, 大阪. (日本外科学会雑誌, 105, 108, 2004)

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許取得
なし。

2. 実用新案登録
なし。

3. その他
なし。

Table 1. Frequency of allele and genotype of the polymorphism, where is at IVS 10, ds+23 in TAP2

	Allele		Genotype		cc homozygote		I-chimer	
	T	C	tt	tc	OR (95%CI)	P-value	No. (%)	OR (95%CI) P-value
CD (n=207)	164 (79.6%)	230 (60.4%)	40 (19.3%)	84 (40.6%)	1.82 (1.21-2.75)	0.004	123 (59.4%)	0.55 (0.36-0.83) 0.004
Controls (n=212)	204 (48.1%)	220 (51.9%)	49 (23.1%)	106 (50.0%)			163 (76.9%)	
UC (n=206)	239 (58.0%)	173 (42.0%)	70 (34.0%)	99 (48.0%)	0.60 (0.39-0.99)	0.029	136 (66.0%)	1.68 (1.05-2.68) 0.028
Controls (n=212)	204 (48.1%)	220 (51.9%)	49 (23.1%)	106 (50.0%)			163 (76.9%)	

Figure 1a Polymorphism sites of TAP1 and TAP2 genes

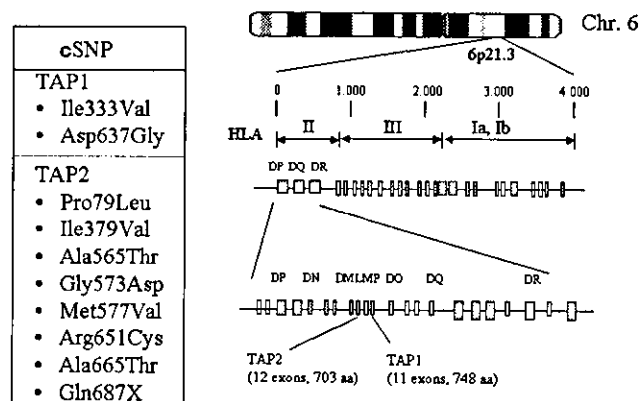


Figure 1b Polymorphism sites adjacent exon 10 of TAP2 gene

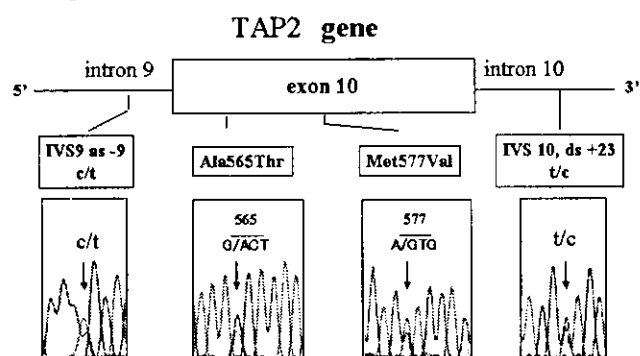


Figure 2 Frequency of cc genotype of polymorphism of IVS 10, ds +23 in TAP2 gene

