

201128013A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

難治性炎症性腸疾患のゲノムおよびエピゲノム解析による
病因・病態・治療抵抗性機序の解明

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 笹月 健彦

平成24年（2012）4月

目 次

I. 総括研究報告		
難治性炎症性腸疾患のゲノムおよびエピゲノム解析による 病因・病態・治療抵抗性機序の解明	-----	1
笹月 健彦		
II. 分担研究報告		
1. 難治性炎症性腸疾患のゲノム解析による病因・病態・治療抵抗性 機序の解明	-----	6
日比 紀文		
2. 炎症性腸疾患における病期の進展および治療抵抗性の解明		
渡辺 守	-----	11
3. 炎症性腸疾患のゲノム疫学的研究		
松本 主之	-----	16
4. 炎症性腸疾患におけるエピゲノム変化の炎症と 発癌における意義に関する研究	-----	18
土肥 多恵子		
5. 炎症性腸疾患のゲノム解析に関する研究		
山本 健	-----	20
6. 難治性炎症性腸疾患のゲノムおよびエピゲノム解析による 病因・病態・治療抵抗性機序の解明	-----	22
石谷 太		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	23
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	29

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
総括研究報告書

難治性炎症性腸疾患のゲノムおよびエピゲノム解析による病因・病態・治療抵抗性機序の解明

研究代表者 笹月 健彦 九州大学高等研究院特別主幹教授

研究要旨

炎症性腸疾患 (IBD) の病因、病態および抗 TNF α 抗体療法抵抗性の遺伝的機序を、ゲノム情報およびエピゲノム情報により解明し、これらと臨床情報を加えた三大情報の統合的解析を進め、本疾病克服への道を拓く。患者の臨床・病理情報とゲノム情報のみならず、炎症現場のゲノム・エピゲノム情報を加えて、病因、激症化、抗 TNF α 抗体治療抵抗性、癌化に関して統合的に解明しようとする点が本研究の特色である。特にエピゲノム解析はこれまで行われておらず、極めて独創的な切り口である。本年度は、診断や治療過程が明確で質の高い臨床情報を備えた患者群収集の体制を整備し検体収集を開始した。これまでに 201 検体を収集し、HLA 6 遺伝子座ならびに全ゲノム相関解析によって報告された 42 遺伝子の遺伝子多型データを取得した。また、クローン病 TNF α 抗体療法治療抵抗性粘膜の生検組織を用い、エピゲノム解析を進め、CD3 陽性、CD33 陽性細胞のそれぞれに特有の H3K4 トリメチル化領域を同定した。

研究分担者 氏名・所属・職名

日比紀文

慶應義塾大学医学部内科学・教授

渡辺 守

東京医科歯科大学大学院医

歯学総合研究科・教授

松本 主之

九州大学病院・講師

土肥多恵子

国立国際医療研究センター研究所肝炎免

疫研究センター・消化器疾患研究部長

石谷 太

九州大学生体防御医学研究所・准教授

山本 健

九州大学生体防御医学研究所・准教授

に関する遺伝子群の解明、(3)大腸発癌のリスクに関する遺伝子変異の解明、および(4)これらのエピゲノム変化の解明を行うことが必須であり、それに基づいた、患者負担の軽減を図る治療法の開発は喫緊の課題である。

患者の臨床・病理情報とゲノム情報のみならず、炎症現場のゲノム・エピゲノム情報を加えて、病因、激症化、抗 TNF α 抗体治療抵抗性、癌化に関して統合的に解明しようとする点が本研究の特色である。特にエピゲノム解析はこれまで行われておらず、極めて独創的な切り口である。治療抵抗性の解明は、不要な治療をあらかじめ回避することに繋がり、患者負担の軽減とともに医療経済的な効果が得られ重要である。

A. 研究目的

炎症性腸疾患 (IBD) の病因、病態および抗 TNF α 抗体療法抵抗性の遺伝的機序を、ゲノム情報およびエピゲノム解析により解明し、これらと臨床情報を加えた三大情報を統合的に解析することにより、難治性 IBD の病因・病態・抗 TNF α 抗体治療抵抗性機序を解明し、本疾病克服への道を拓く。

IBD は、緩解再燃を繰り返し重症化すること、高発癌性であること、さらに治療抵抗性を示す頻度が高いことが問題である。その解決のためには、(1)発症および進展に寄与する遺伝子群の解明、(2) TNF α 抗体治療抵抗性

B. 研究方法

臨床検体の収集：抗 TNF α 抗体治療反応性に関わる遺伝的要因を解明するためは、バイアスがかからない前向き研究を実施するための抗 TNF α 抗体新規投与群を収集する組織構築が必須である。このための倫理審査承認を得た後、共通のインフォームドコンセントのもと、慶應義塾大学、東京医科歯科大学、九州大学を中心に組織を整備して検体収集を行う。

ゲノム解析：これまでに全ゲノム相関解析によって報告された遺伝子多型を文献より

抽出し、これらを本研究の解析対象遺伝子とする。一塩基多型遺伝子型の決定はTaqMan法を用いる。またHLAについては、強い相関が期待されることからHLA-A, C, B, DRB1, DQB1およびDPB1の6座について別途解析する。遺伝子型や対立遺伝子頻度の差異を治療抵抗性の有無において検討する。ゲノム統計遺伝学解析にはPLINK、SAS、Rなどのプログラムを用いる。

エピゲノム解析: クローン病大腸の生検組織を用いた治療抵抗性エピゲノム因子の解析として以下の方法による計画を立てた。

・検体のエントリー：(1) 抗TNF- α 抗体治療の対象症例から治療前の内視鏡検査の際に2個の生検組織を採取する。第一段階として20名のエントリーを行う。(2) 治療効果の判定を目的とした内視鏡検査を、治療開始後4-8週間または主治医が適当と判断した時期に行い、この際に治療後の生検組織を採取する。治療無効例の治療後の試料を確保するため、20名のエントリーで収集できなかった場合は第二段階として10名のエントリーを追加する。

・方法：生検試料から上皮細胞と粘膜固有層細胞を分取し、セルソーターを用いてマイクロファージ分画を精製した後、次の解析を行う予定とした。(1) RNAを用いたマイクロアレイ解析またはSAGE解析による網羅的遺伝子発現解析。(2) メチル化CpG結合蛋白MBDを用いたMeDIPシーケンシング。L-1のメチル化解析を含む。(3) 抗ヒストン3K4抗体を用いたChIPシーケンシング(遺伝子発現促進的修飾)(4) 抗ヒストン3K9、抗ヒストン3K27抗体を用いたChIPシーケンシング(発現低下修飾)

消化管上皮細胞分化因子の解析: Wnt及びNotchシグナルのバランス制御を介し、消化管上皮の再生分化を調節する特定の分子群を同定している。この内NLKはWntおよびNotchの両方を制御しているが、その発現が、UC組織で有意に低下していた。UCではこのために正常な上皮再生が阻害され、修復遅延や治療抵抗性につながっている可能性が高い。そこで、NLKを含めたこれらの分子群を標的とした個体レベルでの機能解析をゼブラフィッシュを用いて実施する。

(倫理面への配慮)

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(文部科学省、厚生労働省、経済産業省、平成13年3月29日(平成20年12月1日一部改正))に則り、各検体採取機関、およびゲ

ノム解析機関においては倫理委員会の承認のもと研究を遂行する。

C. 研究結果

検体収集機関においては、外来および入院患者の臨床情報から、ゲノム解析に供する詳細な臨床情報を備えた患者群を選択する体制が整った。平成23年度は201検体が収集され、現在も継続中である。

候補遺伝子多型の選択を行い、これまでに全ゲノム相関解析にて報告されたIBD感受性遺伝子より42遺伝子を抽出した(HLA-B, HLA-DRB1, ATG16L1, ATG5, C11orf30, CARD9, CCL2, CCR6, CDKAL1, CEP72, CUL2, DLD, FCGR2A, GCKR, ICOSLG, IFNG, IKZF1, IL10, IL12B, IL18RAP, IL23R, IRGM, ITLN1, JAK2, KIF21B, LRRK2, LYRM4, MST1, NKX2-3, ORMDL3, PSMG1, PTGER4, PTPN2, PTPN22, PUS10, REL, RNF186, SLC22A23, SLC26A3, STAT3, TNFSF15, ZNF365)。これらの遺伝子の中には、日本人を対象とした全ゲノム相関解析によって同定された遺伝子も含まれており、本研究における治療抵抗性に関わる遺伝子および治療感受性の個体差を解明する上での重要な標的遺伝子群である。これらについて201検体の遺伝子型を取得した。一般集団384名を対照とした相関解析を実施し、特にTNFSF15において強い相関($P=2.9 \times 10^{-10}$, $OR=2.5$ 、アレレルテスト)を認めた。また、上記201検体のHLA6遺伝子座についてのタイピングが終了し、同様の相関解析によって、新規感受性アレレルとしてHLA-C座の特定のアレレルを、発症抵抗性アレレルとしてHLA-DPB1座の特定のアレレルをそれぞれ同定した。これらは中間的な結果ながら、治療抵抗性の遺伝要因となり得る重要な遺伝子となることが示唆された。

エピゲノム解析においては、難治手術例のクローン病大腸病変組織から粘膜固有層単核細胞を分離し、DNAメチル化修飾、ヒストン3K4トリメチル化修飾、ヒストン3K9トリメチル化修飾、ヒストン3K27トリメチル化修飾の網羅的解析を行った。各々 1×10^5 個の細胞を用いて、次世代シーケンサーSOLiD4解析のためのライブラリーを作製した。ChIPのための細胞固定および破碎条件は細胞ごとに異なるため、CD3⁺細胞、CD33⁺細胞を用いて新たに条件決定を行った。ChIP後にはGAPDH(遺伝子発現促進的修飾)およびSAT2(遺伝子発現抑制的修飾)のPCRを行い、目的の領域が濃縮されていることを確認した。ChIP-DNA、MeDIP-DNAを用い、数十〜数百nMの次世代シ

ークエンサーを用いた解析に十分なサイズのライブラリーを作製出来た。得られたライブラリーをSOLiD4でシーケンシングし、ゲノムマッピングした。タグのマップ率はChIP-seqで60-70%、MeDIP-seqで53-65%であり、得られた結果が信頼出来ることを示していた。CD3e遺伝子座におけるヒストン3K4トリメチル化修飾がCD3⁺細胞では認められるもののCD33⁺細胞には無く、逆にCD33⁺細胞ではみられるCD33遺伝子座におけるヒストン3K4トリメチル化修飾は、CD3⁺細胞では認められなかった。これらの細胞特異的に見られる各々のエピゲノム修飾の、疾患の重症化における意義を統合的に理解するために、現在バイオフィン解析中である。

NLKによるWntシグナル制御の分子機構を解析した結果、腸上皮由来細胞及び神経芽細胞腫において、NLKがTCF/LEFの保存された二つのセリン・スレオニン残基をリン酸化することでTCF/LEFとヒストン脱アセチル化酵素HDAC1の結合を弱め、これによりTCF/LEFの転写活性が増強すること、を見いだした。さらに、腸上皮組織におけるNLKの機能を解析するためにゼブラフィッシュにおいてNLKの機能阻害実験を行ったところ、NLK阻害個体で腸上皮の増殖細胞マーカーと分化細胞マーカーの双方の発現減少を同定した。

D. 考察

治療低応答および抵抗性の問題こそが難治性疾患の本質的な問題である。本研究により、TNF α 抗体治療反応性および抵抗性に関連する因子が明らかとなれば、現在約30%が治療抵抗性を示す抗TNF α 抗体治療の際、応答する患者をあらかじめ選択することができ、患者の負担軽減とともに医療経済的な効果が期待される。

SNPを用いたIBDの全ゲノム解析が日本人もふくめほぼ終了し、現段階では、そこで同定された遺伝子がIBDのどのような病態に特異的に関連するのかが問われている。診断や治療過程が明確で質の高い臨床情報を備えた患者群の収集と、それを対象としたIBD感受性遺伝子を網羅した中規模ゲノム解析により、IBD感受性遺伝子群の中から、本研究が目的とする治療応答性に関わる遺伝子の同定が期待される。

平成23年度は検体収集グループにより201検体が収集された。検体収集を平成24年度前半まで継続する予定であるが、これまでの201検体についてHLA6座ならびに42候補遺伝

子の多型情報を取得した。対照384検体を用いて、疾患感受性について中間的な解析を実施したところ、HLA遺伝子座において新規の感受性アレルならびに抵抗性アレルを同定し、またSNPについてもTNFSF15をはじめとして複数の遺伝子座において相関を確認した。最終的な検体の蓄積を待って、治療抵抗性を規定する遺伝素因を解明するための解析を実施する。

エピゲノム解析においては、バイオフィン解析の途中段階ではあるが、ヒストン3K4トリメチル化修飾の様子が細胞特異的なエピゲノム修飾の存在が認められたことから、ターゲット細胞を絞り込んで解析を行うことが重要であると考えられた。このために、次世代シーケンサーでの網羅的解析のためのライブラリー作製の小スケール化に成功したことは大きな成果である。本年得られたデータのバイオフィン解析を続けることで、疾患の重症化に関連するエピゲノム修飾を見出すことができると期待している。

E. 結論

平成23年度はIBD201検体を収集し、HLA6座および42候補遺伝子の多型情報を取得した。対照384検体を用いた相関解析において、HLA座に新規の感受性アレルと抵抗性アレルを同定した。候補遺伝子SNP解析では、特にTNFSF15に強い相関を認めた。最終的な検体収集の後、疾患感受性、抵抗性HLAアレルの同定、ならびに治療抵抗性を規定するHLAならびにSNPを同定する。また、エピゲノム解析においては、クローン病病変部位におけるCD3陽性、CD33陽性細胞のそれぞれに特有のH3K4トリメチル化領域を同定した。

G. 研究発表

論文発表

Makrodouli E, Oikonomou E, Koc M, Andera L, Sasazuki T, Shirasawa S, Pintzas A. BRAF and RAS oncogenes regulate Rho GTPase pathways to mediate migration and invasion properties in human colon cancer cells: a comparative study. *Mol Cancer*. 2011 Sep 23;10:118.

Yoo BH, Wang Y, Erdogan M, Sasazuki T, Shirasawa S, Corcos L, Sabapathy K, Rosen KV. Oncogenic ras-induced down-regulation of pro-apoptotic protease caspase-2 is required for

- malignant transformation of intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 2011 Nov 11;286(45):38894-903.
- Nakabayashi K, Tajima A, Yamamoto K, Takahashi A, Hata K, Takashima Y, Koyanagi M, Nakaoka H, Akamizu T, Ishikawa N, Kubota S, Maeda S, Tsunoda T, Kubo M, Kamatani N, Nakamura Y, Sasazuki T, Shirasawa S. Identification of independent risk loci for Graves' disease within the MHC in the Japanese population. *J Hum Genet.* 2011 Nov;56(11):772-8.
- Yoshida Y, Tsunoda T, Doi K, Tanaka Y, Fujimoto T, Machida T, Ota T, Koyanagi M, Takashima Y, Sasazuki T, Kuroki M, Iwasaki A, Shirasawa S. KRAS-mediated up-regulation of RRM2 expression is essential for the proliferation of colorectal cancer cell lines. *Anticancer Res.* 2011 Jul;31(7):2535-9.
- Tsunoda T, Takashima Y, Yoshida Y, Doi K, Tanaka Y, Fujimoto T, Machida T, Ota T, Koyanagi M, Kuroki M, Sasazuki T, Shirasawa S. Oncogenic KRAS regulates miR-200c and miR-221/222 in a 3D-specific manner in colorectal cancer cells. *Anticancer Res.* 2011 Jul;31(7):2453-9.
- Miyoshi-Akiyama T, Ishida I, Fukushi M, Yamaguchi K, Matsuoka Y, Ishihara T, Tsukahara M, Hatakeyama S, Itoh N, Morisawa A, Yoshinaka Y, Yamamoto N, Lianfeng Z, Chuan Q, Kirikae T, Sasazuki T. Fully human monoclonal antibody directed to proteolytic cleavage site in severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus S protein neutralizes the virus in a rhesus macaque SARS model. *J Infect Dis.* 2011 Jun 1;203(11):1574-81.
- Noto H, Tsujimoto T, Sasazuki T, Noda M. Significantly increased risk of cancer in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Endocr Pract.* 2011 Jul-Aug;17(4):616-28.
- Doi K, Fujimoto T, Koyanagi M, Tsunoda T, Tanaka Y, Yoshida Y, Takashima Y, Kuroki M, Sasazuki T, Shirasawa S. ZFAT is a critical molecule for cell survival in mouse embryonic fibroblasts. *Cell Mol Biol Lett.* 2011 Mar;16(1):89-100.
- Van Schaeuybroeck S, Kyula JN, Fenton A, Fenning CS, Sasazuki T, Shirasawa S, Longley DB, Johnston PG. Oncogenic Kras promotes chemotherapy-induced growth factor shedding via ADAM17. *Cancer Res.* 2011 Feb 1;71(3):1071-80.
- Hisamatsu T, Okamoto S, Hashimoto M, Muramatsu T, Andou A, Uo M, Kitazume MT, Matsuoka K, Yajima T, Inoue N, Kanai T, Ogata H, Iwao Y, Yamakado M, Sakai R, Ono N, Ando T, Suzuki M and Hibi T. Novel, Objective, Multivariate Biomarkers Composed of Plasma Amino Acid Profiles for the Diagnosis and Assessment of Inflammatory Bowel Disease. *PLoS ONE* 2012;7(1):e31131. Epub 2012 Jan 31. 2011
- Yui S, Nakamura T, Sato T, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, Ichinose S, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Clevers H, Watanabe M: Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5+ stem cell. *Nat Med.* 18:618-623, 2012.
- Umeno J, Asano K, Matsushita T, Matsumoto T, Kiyohara Y, Iida M, Nakamura Y, Kamatani N, Kubo M: Meta-analysis of published studies identified eight additional common susceptibility loci for Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 17:2407-2415, 2011
- Cho YS, Yamamoto K, et al. East Asian Genome-Wide Association Meta-Analysis Identifies 8 New Loci for Type 2 Diabetes. *Nat Genet* 2011 Dec 11;44(1):67-72.
- Kawashima R, Kawamura YI, Oshio T, Son A, Yamazaki M, Hagiwara T, Okada T, Inagaki-Ohara K, Wu P, Szak S, Kawamura YJ, Konishi F, Miyake O, Yano H, Saito Y, Burkly LC, Dohi T. Interleukin-13 damages intestinal mucosa via TWEAK and Fn14 in mice—a pathway associated with ulcerative

colitis. *Gastroenterology*. 2011
Dec;141(6):2119-2129. e8.

Ota S, Ishitani S, Shimizu N, Matsumoto K,
Itoh M, Ishitani T. NLK positively
regulates Wnt/ β -catenin signalling by
phosphorylating LEF1 in neural progenitor
cells. *EMBO Journal* 31, 1904-1915. 2012

学会発表
国外

Kawamura YI, M Toyota, Hagiwara T, Suzuki
H, Yamazaki M, Okada T, Kawamura YJ,
Konishi F, Yano H, Saito Y, and Dohi T.
IL-6, a potential inducer of DNA
hypermethylation and malignant-type
glycosylation in ulcerative colitis.
Digestive Disease Week 2011, May 10, 2011

Sujino T, Kanai T, Ono Y, Mikami Y, Hayashi
A, Doi T, Matsuoka K, Hisamatsu T, Takaishi

H, Ogata H, Yoshimura A, Hibi T: CD4+CD25+
regulatory T cells suppress the
developmental pathway from TH17 to
alternative TH1 Cells via TH17/TH1 and
TH1-like cells. *Digestive Disease Week*
2011, May 7-10, 2011 Chicago

Nagahori M, Watanabe M: Patient
preferences in the choice of anti-TNF
treatments in inflammatory bowel
diseases: A questionnaire survey at an
academic IBD center in Japan. 2011
Advances in Inflammatory Bowel Diseases
Crohn's & Colitis Foundation's Clinical &
Research Conference. Florida, 2011, Dec. 2

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業
「難治性炎症性腸疾患のゲノムおよびエピゲノム解析による病因・病態・治療抵抗性機序の解明」

-難治性炎症性腸疾患のゲノム解析による病因・病態・治療抵抗性機序の解明-

研究分担者 日比 紀文
慶應義塾大学医学部内科学 教授

研究要旨：炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎(ulcerative colitis; UC)やクローン病(Crohn's disease; CD)はいまだ原因不明の慢性難治性炎症性腸疾患であるが、その疾患関連遺伝子が genome-wide association study (GWAS) や候補遺伝子解析によって同定されつつある。しかし、治療反応性に関する遺伝学的背景は解明されていない。抗 TNF α 抗体製剤が治療の中心となりつつあるが、同剤に対する治療抵抗性が大きな課題として残されている。そこで本研究においては、両疾患について、近年治療の中心となっている抗 TNF α 抗体製剤に対する治療応答性をゲノムレベルで解析する。

A. 研究目的

炎症性腸疾患である潰瘍性大腸炎(ulcerative colitis; UC)やクローン病(Crohn's disease; CD)はいまだ原因不明の慢性難治性炎症性腸疾患であるが、その疾患関連遺伝子が genome-wide association study (GWAS) や候補遺伝子解析によって同定されつつある。しかしながら、治療に直結する情報は未だ得られていない。それらの疾患における病態には何らかの免疫学的機序が関与していると考えられ、臨床的にはアミノサリチル酸製剤、副腎皮質ステロイド、免疫抑制剤の投与を中心とした薬物療法や白血球除去療法、抗 TNF α 抗体製剤等を用いて治療されているが、治療抵抗性の問題こそが難治性疾患の本質的な問題であり、再燃と緩解を繰り返すことが多い。そこで本研究においては、両疾患について、近年治療の中心となっている抗 TNF α 抗体製剤に対する治療応答性をゲノムレベルで解析する。抗 TNF α 抗体製剤に対する治療応答性を規定する因子は解明されておらず、実際には、TNF α 抗体治療抵抗を示す患者が存在し、その割合はクローン病においては約30%の一次無効例、および有効例の中の約30%におよぶ二次無効例が報告されている。潰瘍性大腸炎に関しては、本邦では2010年6月より抗 TNF α 抗体治療が承認されているが既に承認されている白血球除去療法や新たに承認された経口タクロリムス治療との使い分け、適応症例の選別が問題となっている。

本研究により遺伝子レベルで抗 TNF α 抗体製剤に対する応答性が規定されていることが明らかになれば対象患者の選別が可能になり、副作用の軽減や医療経済的側面で大きな有益性があると考えられる。

B. 研究方法

プロジェクト全体の多施設共同研究では、対象群数は UC 500名、CD 300名であるが、そのうち、慶應義塾大学では、UC 80名、CD 80名を対象とする。末梢血液3mlを採取、検体として使用し、遺伝子多型の解析を行う。

- ① 末梢血液よりDNAを抽出する。個別タイプングにおいては、PCRで多型領域を増幅し、TaqMan法によりその遺伝子型を決定する。
- ② 患者群と対照群との間で、遺伝子型分布の差を統計学的に検討すると共に、様々な臨床マーカー(発症年齢、病理組織像、臨床病期分類、治療抵抗性)との相関を検討する。

*血液試料は EDTA採血後にただちに九州大学へ郵送される。九州大学でゲノム解析に供され、ゲノムの抽出ならびに解析が行われる(慶應義塾大学医学部倫理委員会承認済)。

(倫理面への配慮)

本研究にまつわる個人の情報は厳重な管理のもと守秘義務を遵守する。まず検体提供施設である慶應義塾大学においては、提供者には符号をつけることで匿名化を行う。また、データシートなどには、名

前、患者番号など個人の特定に通じる情報は記載せず、符号（データ番号）のみで対応させる（連結可能匿名化）。個人情報管理者は、符号化されたIDと個人名の対応表のみを保持する。対応表は、個人情報管理者によって、施錠と入室・入室管理のできる研究室において厳重に管理される。データの管理は、研究実施責任者の責任のもとで、施錠と入室・入室管理のできる研究室において厳重に管理する。また、解析を行う研究者は、個人を特定できる情報がわからない状態で、採取機関で付けられているID番号・臨床情報とともに標本を受け取る。研究者はID番号から患者情報にアクセスできない。

解析機関である九州大学では、採取機関別に試料番号を新たに付け、以降の解析はこの試料番号を用いて行う。研究成果を公表する際には個人が特定される形では公表しない。さらに個人に帰属する検討結果を個人に求められた場合には、個人本人のみに伝達する。この際、慶應大学病院医師から患者名を個人情報管理者に伝達し、個人情報管理者を通じてIDを九州大学に伝達する。九州大学では、伝えられたIDをもとに該当者の情報を慶應大学に個人情報管理者を通じて伝達し、個人情報管理者がIDから患者名に変換した後に慶應大学病院医師に伝達され、医師は患者に情報を提供する。

ゲノム解析は九州大学でのみ実施する。匿名化された血液検体よりDNAが抽出され、DNA検体は、施錠された研究室の施錠された冷凍庫において厳重に保管される。得られた遺伝子型は、施錠された研究室のネットとは接続されていないコンピューターにおいて管理される。当該コンピューターのパスワードは、九州大学の研究担当者（笹月健彦、山本健）のみに与えられる。

C. 研究結果

すでにUC10名、CD35名の承諾を得、20名の血液を九州大学に送付した。他の検体収集機関とも合わせ、平成23年度はIBDとして201検体が収集され、HLA6座ならびにIBD感受性遺伝子として報告されている42遺伝子のSNP多型情報が取得された。平成24年度の検体と合わせ、疾患感受性、抵抗性HLAアレルの同定、ならびに治療抵抗性の遺伝素因に関する最終的な解析が実施される。

D. 考察

治療抵抗性の問題こそが難治性疾患の本質

的な問題である。本研究により、TNF α 抗体治療抵抗性に関連する因子が明らかとなれば、クローン病においては30%の一次無効例、および有効例の中の1/3におよぶ二次無効例についてあらかじめ選別することができ、患者の負担軽減とともに医療経済的な効果が期待される。また潰瘍性大腸炎においてはその有効性はクローン病よりもやや低いと考えられており、既存の治療法（タクロリムスや白血球除去療法など）との使い分けが大きな課題となっている。本研究により抗TNF α 抗体治療への応答性が遺伝子レベルで明らかになれば本剤に反応する患者をあらかじめ選択することができ、医療費の削減、副作用の軽減などにつながる。

E. 結論

慶應義塾大学、東京医科歯科大学、九州大学の3施設によって、平成23年度はIBD201検体が収集され、それらのHLA6座および42候補遺伝子多型が決定された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 久松理一、日比紀文 総説 『クローン病の長期予後について考える』日本消化器病学会雑誌 2011 108巻3号p373-380

2) 久松理一、日比紀文 特集：小腸疾患：診断と治療の進歩 II. 診療の進歩
6. Crohn病 日本内科学会雑誌第100巻
2011 第1号 p85-95

3) Ichikawa R, Takayama T, Yoneno K, Kamada N, Kitazume MT, Higuchi H, Matsuoka K, Watanabe M, Itoh H, Kanai T, Hisamatsu T and Hibi T. Bile acids induce monocyte differentiation toward IL-12 hypo-producing dendritic cells via a TGR5-dependent pathway. *Immunology* 2012 Jan 12.

4) Hisamatsu T, Okamoto S, Hashimoto M, Muramatsu T, Andou A, Uo M, Kitazume MT, Matsuoka K, Yajima T, Inoue N, Kanai T, Ogata H, Iwao Y, Yamakado M, Sakai R, Ono N, Ando T, Suzuki M and Hibi T. Novel, Objective, Multivariate Biomarkers Composed of Plasma Amino Acid Profiles for the Diagnosis and Assessment of Inflammatory Bowel Disease. *PLoS ONE*

2012;7(1):e31131. Epub 2012 Jan 31. 2011

5) Miyoshi J, Yajima T, Okamoto S, Matsuoka K, Inoue N, Hisamatsu T, Shimamura K, Nakazawa A, Kanai T, Ogata H, Iwao Y, Mukai M, Hibi T. Ectopic expression of blood type antigens in inflamed mucosa with higher incidence of FUT2 secretor status in colonic Crohn's disease. *J Gastroenterol.* 2011 Jul 5 ; 46(9) : 1056-63.

6) Sujino T, Kanai T, Ono Y, Mikami Y, Hayashi A, Doi T, Matsuoka K, Hisamatsu T, Takaishi H, Ogata H, Yoshimura A, Littman DR, Hibi T. Regulatory T Cells Suppress Development of Colitis, Blocking Differentiation of T-Helper 17 Into Alternative T-Helper 1 Cells. *Gastroenterology.* 2011 Jun 7 ; 141(3) : 1014-23

7) Kobayashi T, Matsuoka K, Sheikh SZ, Elloumi HZ, Kamada N, Hisamatsu T, Hansen JJ, Doty KR, Pope SD, Smale ST, Hibi T, Rothman PB, Kashiwada M, Plevy SE. NFIL3 Is a Regulator of IL-12 p40 in Macrophages and Mucosal Immunity. *J Immunol.* 2011 Apr 15;186(8):4649-55.

8) Naruse H, Hisamatsu T, Yamauchi Y, Chang JE, Matsuoka K, Kitazume MT, Arai K, Ando S, Kanai T, Kamada N, Hibi T. Intracellular bacteria recognition contributes to maximal interleukin (IL)-12 production by IL-10-deficient macrophages. *Clin Exp Immunol.* 2011 Apr;164(1):137-44.

2. 学会発表

1) Sujino T, Kanai T, Ono Y, Mikami Y, Hayashi A, Doi T, Matsuoka K, Hisamatsu T, Takaishi H, Ogata H, Yoshimura A, Hibi T: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress the developmental pathway from TH17 to alternative TH1 Cells via TH17/TH1 and TH1-like cells. *Digestive Disease Week 2011, May 7-10, 2011 Chicago*

2) Uo M, Hisamatsu T, Miyoshi J, Yoneno K, Matsuoka K, Kanai T, Hibi T: Intestinal Cxcr4+IgG+ immature plasma cells contribute to the pathogenesis of

ulcerative colitis through IgG-immune complex-FC γ R signaling. *Digestive Disease Week 2011, May 7-10, 2011 Chicago*

3) Hayashi A, Kanai T, Ono Y, Sujino T, Mikami Y, Doi T, Takabayashi K, Matsuoka K, Yajima T, Hisamatsu T, Ogata H, Hibi T: The roles of helicobacter hepaticus in the initiation and the maintenance of chronic colitis in the gnotobiotic system in mice. *Digestive Disease Week 2011, May 7-10, 2011 Chicago*

4) Ono Y, Kanai T, Mikami Y, Sujino T, Hayashi A, Doi T, Matsuoka K, Hisamatsu T, Hibi T: LT α -expressing lymphoid-tissue inducer cells produce IL-6 and promote the development of intestinal TH17 cells in collaboration with CD11c+ Dendritic Cells. *Digestive Disease Week 2011, May7-10, 2011 Chicago*

5) Mikami Y, Kanai T, Sujino T, Ono Y, Hayashi A, Doi T, Matsuoka K, Hisamatsu T, Ebinuma H, Nakamoto N, Hibi T: The breakdown of liver tolerance in colitic conditions induced by the disappearance of immature CCR9+ pDCs and the emergence of activated macrophages in liver. *Digestive Disease Week 2011, May 7-10, 2011 Chicago*

6) Miyoshi J, Yajima T, Okamoto S, Matsuoka K, Inoue N, Hisamatsu T, Shimamura K, Nakazawa A, Kanai T, Ogata H, Iwao Y, Mukai M, Hibi T: Ectopic expression of blood type antigens in inflamed mucosa with higher incidence of FUT2 secretor status in colonic Crohn's disease. *15th International Congress of Mucosal Immunology, July 5-9, 2011 Paris France*

7) Hisamatsu T, Uo M, Miyoshi J, Yoneno K, Inoue N, Ogata H, Kanai T, Hibi T: Intestinal CXCR4+IgG+ immature plasma cells contribute to the pathogenesis of ulcerative colitis through IgG immune complex-Fc γ R signaling. *15th International Congress of Mucosal Immunology. July5-9, 2011, Paris France*

- 8) Kanai T, Sujino T, Ono Y, Hayashi A, Doi T, Mizuno S, Matsuoka K, Hisamatsu T, Ogata H, Hibi T: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress the developmental pathway from Th17 to alternative Th1 cells via Th17/Th1 cells. 15th International Congress of Mucosal Immunology, July5-9, 2011, Paris France
- 9) Mikami Y, Kanai T, Sujino T, Ono Y, Hayashi A, Doi T, Matsuoka K, Hisamatsu T, Ebinuma H, Nakamoto N, Hibi T: Liver tolerance is maintained by tolerogenic immature CCR9+ pDCs and their breakdown is caused by activated macrophages in IBD model mice. 15th International Congress of Mucosal Immunology. July5-9, 2011, Paris France
- 10) 久松理一、金井隆典、日比紀文：炎症性腸疾患の病態解明—ヒト病変腸管粘膜の解析からのアプローチ—。第97回日本消化器病学会総会 2011.5.13 シンポジウム 東京
- 11) 三好 潤、矢島知治、岡本 晋、松岡克善、井上 詠、中澤 敦、久松理一、島村克好、金井隆典、緒方晴彦、岩男 泰、日比紀文：糖鎖抗原に着目した炎症性腸疾患の病態への新規アプローチ—腸管上皮における血液型抗原の発現についての検討。第97回日本消化器病学会総会 2011.5.13 ミニシンポジウム 東京
- 12) 小野祐一、金井隆典、金井康真、三上洋平、筋野智久、土井知光、林 篤史、岡沢 啓、高林 馨、木村佳代子、水野慎大、松岡克善、久松理一、日比紀文：リンホトキシン α -(LT α)-発現リンパ組織誘導細胞(LTi)は腸Th17細胞発生に必要である(Lymphotoxin alpha-(LT α)-expressing lymphoid-tissue inducer cells (LTi) are essential for the development of intestinal Th17 cells). 第97回日本消化器病学会総会 2011.5.13 ミニシンポジウム 東京
- 13) 筋野智久、金井隆典、三上洋平、小野祐一、松岡克善、久松理一、緒方晴彦、日比紀文：炎症性腸管におけるROR γ t陽性細胞の関与。第97回消化器病学会総会 2011.5.14 ミニシンポジウム 東京
- 14) 高林 馨、金井隆典、筋野智久、小野祐一、水野慎大、木村佳代子、三上洋平、林 篤史、土井知光、松岡克善、久松理一、緒方晴彦、日比紀文：Th17細胞はTh17/Th1細胞を介し腸炎惹起性Th1細胞へと変換する。第97回日本消化器病学会総会 2011.5.14 ミニシンポジウム 東京
- 15) 林 篤史、金井隆典、筋野智久、三上洋平、小野祐一、土井知光、高林 馨、木村佳代子、岡 沢啓、松岡克善、水野慎大、久松理一、日比紀文：Helicobacter hepaticusノトバイオートマウスの検討。第97回日本消化器病学会総会 ミニシンポジウム 2011.5.14 東京
- 16) 三上洋平、金井隆典、筋野智久、小野祐一、水野慎大、高林 馨、木村佳代子、林 篤史、岡沢 啓、土井知光、海老沼浩利、中本伸宏、久松理一、日比紀文：炎症性腸疾患モデルマウスにおける肝臓内抗原提示細胞の攪乱。第97回日本消化器病学会総会 2011.5.15 ミニシンポジウム 東京
- 17) 久松理一、鵜尾道秀、米野和明、井上 詠、緒方晴彦、金井隆典、日比紀文：粘膜内CXCR4+IgG産生型形質細胞はIgG免疫複合体を介して潰瘍性大腸炎病態に関与する。第48回日本消化器免疫学会総会 2011.7.21 金沢
- 18) 金井隆典、筋野智久、三上洋平、佐藤俊朗、松岡克善、矢島知治、久松理一、日比紀文：腸管慢性炎症性疾患におけるTreg、Th17、Th17/Th1、Th1細胞の産生誘導、競合性、可塑性に関する総括的検討。第39回臨床免疫学会 合同シンポジウム 2011.9.16 東京
- 19) 筋野智久、金井隆典、三上洋平、久松理一、松岡克善、日比紀文：炎症性腸疾患においてCD4+CD25+制御性T細胞におけるTh1/Th17細胞バランス是正機構。第39回日本臨床免疫学会総会 ワークショップ 2011.9.17 東京
- 20) 丸山悠里子、松岡克善、岩男 泰、矢島知治、井上 詠、久松理一、筋野智久、高林馨、米野和明、三上洋平、三好 潤、水野慎大、木村佳代子、金井隆典、緒方晴彦、日比紀文：難治性潰瘍性大腸炎における

cytomegalovirus 再活性化例の検討. 第 53 回日本消化器病学会大会 2011. 10. 20 ポスター 福岡

21) 米野和明、久松理一、岡本晋、松岡克善、市川理子、筋野智久、三好潤、三上洋平、高山哲朗、矢島知治、井上詠、岩男泰、金井隆典、緒方晴彦、日比紀文：クローン病インフリキシマブ投与症例における長期治療成績の検討. 第 53 回日本消化器病学会大会 2011. 10. 20 福岡

22) 久松理一、三好潤、日比紀文：難治性潰瘍性大腸炎に対するタクロリムス経口投与の治療効果と限界. 第82回日本消化器内視鏡学会総会 2011. 10. 23 シンポジウム 福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

炎症性腸疾患における病期の進展および治療抵抗性の解明

研究代表者 渡辺 守 東京医科歯科大学大学院消化器病態学分野 教授

研究要旨：潰瘍性大腸炎、クローン病に代表される炎症性腸疾患は比較的若年に発症し、難治性のため長期罹患による QOL の低下、出血・狭窄などにより手術を余儀なくされるなど病勢のコントロールが非常に難しい疾患である。その発症原因は未だ不明なことが多いが、全ゲノム関連解析において種々の遺伝子多型が明らかとなり病態と直結する機構を一部解明する事に成功している。一方治療に関しては近年抗 TNF α 抗体製剤の開発により、潰瘍性大腸炎、クローン病共に従来の難治例でも寛解に維持できる症例が増加し一定の効果を上げている。その反面抗 TNF α 抗体製剤が無効な症例ではさらに重篤な状態に陥る事が危惧されており、治療抵抗性に関する予測因子の確立が早急に望まれている現状である。これまで治療抵抗性に関する患者の遺伝子多型解析はされていないため本研究においては治療抵抗性特異的遺伝子多型を同定し、治療予測因子を確立するとともに治療抵抗性の原因解明を行うことで新規治療薬の開発への基盤とすることを目的とする。本年度は潰瘍性大腸炎、クローン病において抗 TNF α 抗体にて治療歴のある患者を検索し、同意のもと病歴・重症度・治療抵抗性の有無を調査し、血液採取を行った。

研究協力者

土屋輝一郎

東京医科歯科大学大学院 消化管先端治療学分野

1. 研究目的

炎症性腸疾患は難治性持続性の腸管炎症を主体とし、粘膜障害から下痢、出血、狭窄、感染等を引き起こす疾患である。近年本邦においても潰瘍性大腸炎罹患患者が 10 万人を超えるなど増加傾向にあり、特に若年者に発症が多く罹患期間が長期にわたるため治療のメンテナンスが非常に重要な位置を占める。炎症性サイトカインである TNF α を標的とした抗 TNF α 抗体はクローン病で効果があることが証明され、最近では潰瘍性大腸炎にも治療効果があることが示唆されている。一方で無効例、抗体製剤に対する抗体産生による中和作用から有効血中濃度を維持できないなどいまだ長期の寛解を保持できない症例が多い。治療抵抗例では手術適応になることが多く、特にクローン病では病変部を切除しても残存小腸から病変が再発する事が示唆されており、手術を繰り返した結果短腸症候群を引き起こすなど患者の QOL を著しく低下させる結果となっている。そこで本研究では抗 TNF α 抗体製剤に対する治療抵抗性の原因検索を行うことを目的とし、患者ゲノム、エピゲノムを解析することで治療抵抗性に関与する遺伝子変異を同定する。

2. 研究方法

1) 難治性炎症性腸疾患のゲノム解析による病因・病態・治療抵抗性機序の解明

当院に通院している炎症性腸疾患患者の内、抗 TNF α 抗体製剤を使用した経験のある患者および現在使用中の患者を対象としてインフォームドコンセントのもと血液採取を行い、ゲノムを抽出する。

ゲノムは九州大学において HLA ハプロタイプ解析、ゲノムワイド関連解析を行う。

研究班全体でクローン病患者 200 名、潰瘍性大腸炎 100 名の解析をおこない、当院ではそれぞれ 100 名の患者に対して解析を行う。

2) 難治性炎症性腸疾患のエピゲノム解析による病因・病態・治療抵抗性機序の解明

病変部である腸粘膜上皮細胞のエピゲノム解析を行う。抗 TNF α 抗体製剤使用前後に内視鏡を行い、生検検体から上皮細胞を単離しゲノムを抽出する。ゲノムの修飾（メチル化など）の変化を解析し治療抵抗性との関連を同定する。具体的には 1) RNA を用いてマイクロアレイ解析ないし SAGE 解析により遺伝子発現を網羅的に解析する。2) Bisulfate シークエンス法による DNA メチル化解析。3) 抗ヒストン 3K4 抗体を用いた ChIP シークエンス。4) 抗ヒストン 3K9 ないし抗ヒストン 3K27 抗体を用いた ChIP シークエンスを行い、この網羅的解析の他に内外の研究の進歩により、特定の遺伝

子の発現及びエピゲノム修飾について解析を行う。

(倫理面への配慮)

以上の研究の施行に当たっては、厚生科学審議会の「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」などに準じて、1)倫理審査委員会で研究の適否などを議論・審査し承認を得る。2)意義と必要性を説明しその自由意志に基づき同意を得られた場合にのみ検体提供を受ける。検体提供の有無により、治療など不利益を被ることはない。3)個人のプライバシーの保護を厳密に行う。4)希望に応じ検体提供者やその保護者への研究結果の説明を行う。5)研究目的でのみ検体を使用し、その他の目的では使用しない等、人権及び利益の確保を行うよう配慮した。

3. 研究結果及び考察

1) 難治性炎症性腸疾患のゲノム解析による病因・病態・治療抵抗性機序の解明

当院での倫理審査委員会での承認を得た後、患者同意のもと血液からゲノムを採取した。

本年度は潰瘍性大腸炎患者 23 名、クローン病患者 47 名の計 70 名の検体を採取した。平均年齢は 36.4 才、女性 30 名、男性 40 名であった。クローン病 47 症例のうち 30 例が有効例であり、その内男性は 21 例、女性 9 例を男性に有効例が多く認められた。無効例は 4 例で男性 1 例、女性 3 例であった。潰瘍性大腸炎では 23 例中 10 例が有効例であり男性 5 例女性 5 例であった。無効例は 6 症例あり男性女性ともに 3 例ずつであった。クローン病では女性の有効例が低い事が示唆された。また年齢は無効例と有効例で変化を認めなかった。

2) 難治性炎症性腸疾患のエピゲノム解析による病因・病態・治療抵抗性機序の解明

当院での倫理審査委員会に承認され、患者をリクルート中である。

4. 評価

1) 達成度について

本研究の目的に沿って研究計画をほぼ遂行することができた。ゲノム採取については多くの検体を採取し解析可能であるエピゲノム解析についても倫理委員会にて承認されたため今後患者解析が可能となった。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究結果に関しては抗 TNF α 抗体製剤を使用した多数の患者検体を解析予定であり、治療抵抗性に関する原因を解明することで、治療効果予測モデルの構築および新規治療薬の開発に寄与出来ると考える。さ

らに抗 TNF α 抗体製剤は世界中の炎症性腸疾患患者に対して使用されているため治療効果予測モデル構築は国際的にみてもインパクトがあると考えられる。

2) 今後の展望について

来年度も患者検体の収集を行い、治療抵抗性 2 巻夜する因子の探索を行う。

3) 研究内容の効率性について

当初たてた目標を着実に遂行できており一定の効率性は挙げられた。

5. 結論

当初の予定どおり検体の収集および臨床情報の集約を行った。今後網羅的なゲノム、エピゲノム解析により治療抵抗性因子の同定を試みるための基盤を構築した。

6. 研究発表

1. 論文発表

1. Yui S, Nakamura T, Sato T, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, Ichinose S, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Clevers H, Watanabe M: Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5+ stem cell. *Nat Med.* 18:618-623, 2012.
2. Mizutani T, Nakamura T, Morikawa R, Fukuda M, Mochizuki W, Yamauchi Y, Nozaki K, Yui S, Nemoto Y, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M: Real-time analysis of P-glycoprotein-mediated drug transport across primary intestinal epithelium three-dimensionally cultured in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 419:238-243, 2012.
3. Yamaji O, Nagaishi T, Totsuka T, Onizawa M, Suzuki M, Tsuge N, Hasegawa A, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Arase H, Kanai T, Watanabe M: The development of colitogenic CD4+ T cells is regulated by IL-7 in collaboration with natural killer cell function in a murine model of colitis. *J Immunol.* 188:2524-2536, 2012.
4. Watanabe M, Hibi T, Lomax KG, Paulson SK, Chao J, Alam SS, Camez A: Adalimumab for the Induction and Maintenance of Clinical Remission in Japanese Patients With Crohn's Disease. *J Crohns Colitis.* (in press), 2012.
5. Watanabe T, Sasaki I, Sugita A, Fukusima K, Futami K, Hibi T, Watanabe M: Interval of less than 5 years between the first and second operation is a risk

- factor for a third operation for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 18:17–24, 2012.
6. Nemoto Y, Kanai T, Shinohara T, Ito T, Nakamura T, Okamoto R, Tsuchiya K, Lipp M, Eishi Y, Watanabe M: Luminal CD4+ T cells penetrate gut epithelial monolayers and egress from lamina propria to blood circulation. *Gastroenterology.* 141:2130–2139, 2011.
 7. Shinohara T, Nemoto Y, Kanai T, Kameyama K, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Totsuka T, Ikuta K, Watanabe M: Upregulated IL-7R α expression on colitogenic memory CD4+ T cells may participate in the development and persistence of chronic colitis. *J Immunol.* 186:2623–2632, 2011.
 8. Zheng X, Tsuchiya K, Okamoto R, Iwasaki M, Kano Y, Sakamoto N, Nakamura T, Watanabe M: Suppression of *hath1* gene expression directly regulated by *hes1* via notch signaling is associated with goblet cell depletion in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 17:2251–2260, 2011.
 9. Hibi T, Sakuraba A, Watanabe M, Motoya S, Ito H, Motegi K, Kinouchi Y, Takazoe M, Suzuki Y, Matsumoto T, Kawakami K, Matsumoto T, Hirata I, Tanaka S, Ashida T, Matsui T: Retrieval of serum infliximab level by shortening the maintenance infusion interval is correlated with clinical efficacy in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* (Epub ahead of print), 2011.
 10. Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, Ikeuchi H, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, Iinuma H, Kanazawa T, Tanaka T, Yokoyama T, Konishi T, Eshima K, Ajioka Y, Hibi T, Watanabe M, Muto T, Nagawa H: Predicting ulcerative colitis-associated colorectal cancer using reverse-transcription polymerase chain reaction analysis. *Clin Colorectal Cancer.* 10:134–141, 2011.
 11. Naganuma M, Watanabe M, Hibi T: Safety and usefulness of balloon endoscopy in Crohn's disease patients with postoperative ileal lesions. *J Crohns Colitis.* 5: 73–74, 2011.
 12. Iwasaki M, Tsuchiya K, Okamoto R, Zheng X, Kano Y, Okamoto E, Okada E, Araki A, Suzuki S, Sakamoto N, Kitagaki K, Akashi T, Eishi Y, Nakamura T, Watanabe M: Longitudinal cell formation in the entire human small intestine is correlated with the localization of *Hath1* and *Klf4*. *J Gastroenterol.* 46:191–202, 2011.
 13. D'Haens GR, Panaccione R, Higgins PD, Vermeire S, Gassull M, Chowers Y, Hanauer SB, Herfarth H, Hommes DW, Kamm M, Löfberg R, Quary A, Sands B, Sood A, Watermayer G, Lashner B, Lémann M, Plevy S, Reinisch W, Schreiber S, Siegel C, Targan S, Watanabe M, Feagan B, Sandborn WJ, Colombel JF, Travis S: The London Position Statement of the World Congress of Gastroenterology on Biological Therapy for IBD With the European Crohn's and Colitis Organization: When to Start, When to Stop, Which Drug to Choose, and How to Predict Response? *Am J Gastroenterol.* 106:199–212, 2011.
 14. Hyun SB, Kitazume Y, Nagahori M, Toriihara A, Fujii T, Tsuchiya K, Suzuki S, Okada E, Araki A, Naganuma M, Watanabe M: Magnetic resonance enterocolonography is useful for simultaneous evaluation of small and large intestinal lesions in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 17:1063–1072, 2011.
 15. Watanabe T, Kobunai T, Ikeuchi H, Yamamoto Y, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, Iinuma H, Kanazawa T, Tanaka T, Yokoyama T, Konishi T, Eshima K, Ajioka Y, Hibi T, Watanabe M, Muto T, Nagawa H: RUNX3 copy number predicts the development of UC-associated colorectal cancer. *Int J Oncol.* 38: 201–207, 2011.
 16. Naganuma M, Kunisaki R, Yoshimura N, Nagahori M, Yamamoto H, Kimura H, Sako M, Kawaguchi T, Takazoe M, Yamamoto S, Matsui T, Hibi T, Watanabe M: Conception and pregnancy outcome in women with inflammatory bowel disease: A multicentre study from Japan. *J Crohns Colitis.* 5: 317–323, 2011.
 17. Naganuma M, Watanabe M, Hibi T: The use of traditional and newer calcineurin inhibitors in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* 46:129–137, 2011
 18. Watanabe T, Ajioka Y, Matsumoto T, Tomotsugu N, Takebayashi T, Inoue E, Iizuka B, Igarashi M, Iwao Y, Ohtsuka K, Kudo SE, Kobayashi K, Sada M, Matsumoto T, Hirata I, Murakami K, Nagahori M, Watanabe K, Hida N, Ueno F, Tanaka S, Watanabe M,

Hibi T: Target biopsy or step biopsy? Optimal surveillance for ulcerative colitis: a Japanese nationwide randomized controlled trial. *J Gastroenterol* . 46:11-16, 2011.

2. 学会発表

1. Nagahori M, Watanabe M: Patient preferences in the choice of anti-TNF treatments in inflammatory bowel diseases: A questionnaire survey at an academic IBD center in Japan. 2011 Advances in Inflammatory Bowel Diseases Crohn's & Colitis Foundation's Clinical & Research Conference. Florida, 2011年12月2日
2. Yui S, Watanabe M: Regeneration of damaged colon epithelium by transplanted colon stem cells maintained and expanded in vitro. The 5th Japan & US Collaboration Conference in Gastroenterology. Tokyo, 2011年11月9日
3. Tsuchiya K, Zheng X, Kano Y, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: Flagellin via TLR5 on basolateral membrane of primary intestinal epithelial cells(IEC) shows the role of IEC in the response to bacteria. UEGW2011. Stockholm, 2011年10月26日
4. Naganuma M, Nagahori M, Fujii T, Akiyama J, Saito E, Watanabe M: Serological test and vaccinations for Measles, Mumps, Rubella, and Varicella Zoster deserve considerations as early as possible after diagnosis of Inflammatory Bowel Disease. UEGW2011. Stockholm, 2011年10月25日
5. Nemoto Y, Watanabe M: Luminal CD4+T cells penetrate gut epithelial monolayers and egress from lamina propria to blood circulation. 第15回 国際粘膜免疫学会. Paris, 2011年10月25日
6. Yui S, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, Nagaishi T, Tsuchiya K, Watanabe M, Nakamura T, Okamoto R, Ichinose S, Sato T, Clevers H: Regeneration of damaged colonic tissue by transplanted colonic epithelial stem cells maintained and expanded in vitro. GI Research Academy 2011. Kyoto, 2011年6月17日
7. Nemoto Y, Watanabe M: IL-7R α expression on CD4+T cells, but not on other cells is essential for the development of chronic colitis. DDW2011. Chicago, 2011年5月10日
8. Okamoto R, Watanabe M: Notch-Hes1 pathway and TNF- α synergistically up-regulates OLFM1 expression in the inflamed mucosa of the human intestine. DDW2011. Chicago, 2011年5月7日
1. 渡辺 守:潰瘍性大腸炎の克服に向けた「厚生労働省難病研究班」の取り組み. 進歩する潰瘍性大腸炎治療. 大阪, 2011年11月27日
2. 渡辺 守:新しい時代に入ったIBD治療を考え直す. 第19回 日本消化器病学会関東支部教育講演. 東京, 2011年11月13日
3. 渡辺 守:炎症性腸疾患治療の新展開. 第39回 内科学の展望/第108回 日本内科学会講演会. 横浜, 2011年11月13日
4. 土屋輝一郎、鄭 秀、加納嘉人、水谷知裕、油井史郎、岡本隆一、中村哲也、渡辺 守: 小腸上皮細胞初代培養による生理的フラジェリン応答解析. 第49回 小腸研究会. 東京, 2011年11月12日
5. 渡辺 守:新しい時代に入った炎症性腸疾患を考える. 第105回 みなとセミナー. 横浜, 2011年10月27日
6. 山地 統、戸塚輝治、鬼澤道夫、柘植直人、鈴木雅博、永石宇司、金井隆典、渡辺 守: マウス腸炎モデルにおける腸炎惹起性CD4+T細胞の増殖はIL-7とNK細胞により制御される. JDDW2011. 福岡, 2011年10月23日
7. 加納嘉人、土屋輝一郎、渡辺 守: Atoh1発現大腸癌における悪性形質獲得機構解析. JDDW2011. 福岡, 2011年10月23日
8. 藤井俊光、長沼 誠、渡辺 守: 重症潰瘍性大腸炎に対するHybrid Tacrolimus療法の試み. JDDW2011. 福岡, 2011年10月23日
9. 根本泰宏、金井隆典、渡辺 守: 炎症性腸疾患病原性メモリーCD4+T細胞は腸管粘膜から全身血流に再循環する. JDDW2011. 福岡, 2011年10月23日
10. 鄭 秀、土屋輝一郎、岩寄美智子、加納嘉人、水谷知裕、油井史郎、岡本隆一、中村哲也、渡辺 守: 初代培養小腸上皮細胞による生理的フラジェリン応答解析. JDDW2011. 福岡, 2011年10月23日
11. 土屋輝一郎、岡本隆一、中村哲也、渡辺 守: IBDにおける消化管上皮の分化制御と免疫応答. 第39回 日本臨床免疫学会総会. 東京, 2011年9月17日
12. 渡辺 守:潰瘍性大腸炎を知っていますか. 健康プラザかつしかオープニングイベント. 東京, 2011年9月17日
13. 渡辺 守:炎症性腸疾患における内視鏡を考え直す.

- 山梨 IBD 講演会 2011. 甲府, 2011 年 9 月 8 日
14. 岡田英里子、渡辺 守: ダブルバルーン内視鏡を用いた潰瘍性大腸炎患者の小腸所見の検討. 第 81 回 日本消化器内視鏡学会総会. 名古屋, 2011 年 8 月 18 日
 15. 渡辺 守: 治りにくい炎症性腸疾患 新しい視点で緋く. 第 9 回 三重 IBD 研究会. 津, 2011 年 8 月 4 日
 16. 渡辺 守: 新しい時代に入ったクローン病治療を考える. 第 5 回 多摩 GI-Endoscopy 研究会. 東京, 2011 年 6 月 30 日
 17. 渡辺 守: 抗 TNF 製剤が炎症性腸疾患治療に与えたインパクト. 第 15 回 日本適応医学会学術集会. 浜松, 2011 年 6 月 25 日
 18. 渡辺 守: 炎症性腸疾患における腸上皮自然炎症調節機構の破綻. 新学術領域: 平成 23 年度第 2 回領域班会議. 東京, 2011 年 6 月 24 日
 19. 渡辺 守: 炎症性腸疾患の病態を新しい側面から緋く. 第 2 回 炎症性腸疾患と免疫を語る会. 横浜, 2011 年 6 月 24 日
 20. 渡辺 守: クローン病. 第 140 回 日本医学会シンポジウム. 東京, 2011 年 6 月 9 日
 21. 渡辺 守: 生物製剤がクローン病治療に与えたインパクト. 第 32 回 日本炎症・再生医学会. 京都, 2011 年 6 月 2 日
 22. 渡辺 守: 炎症性腸疾患の分子標的治療. フォーラム富山「創薬」第 33 回 研究会. 富山, 2011 年 5 月 20 日
 23. 渡辺 守: クローン病に生物学的製剤をどのように使っていくのか. ～いつ? 誰に? 何を? どのように? ～. 第 97 回 日本消化器病学会総会. 東京, 2011 年 5 月 15 日
 24. 秋山純子、長沼 誠、藤井俊光、玄 世鋒、長堀正和、渡辺 守: チオプリン、タクロリムス不応例潰瘍性大腸炎に対するインフリキシマブ (IFX) の検討. 第 97 回 日本消化器病学会総会. 東京, 2011 年 5 月 15 日
 25. 藤井俊光、長沼 誠、渡辺 守: 免疫調整剤/分子生物製剤を用いた難治性潰瘍性大腸炎に対する治療戦略. 第 97 回 日本消化器病学会総会. 東京, 2011 年 5 月 15 日
 26. 渡辺 守: 生物学的製剤がもたらした新しい時代の炎症性腸疾患治療. 第 97 回 日本消化器病学会総会. 東京, 2011 年 5 月 14 日
 27. 長沼 誠、長堀正和、国崎玲子、木村英明、吉村直樹、酒匂美奈子、河口貴昭、高添正和、山本正二郎、松井敏幸、日比紀文、渡辺 守: 本邦における IBD 患者の妊娠・出産の転帰に関する検討. 第 97 回 日本消化器病学会総会. 東京, 2011 年 5 月 14 日
 28. 中村哲也、渡辺 守: 再生医療へ向けた腸管上皮研究 ～幹細胞体外培養と細胞移植～. 第 97 回 日本消化器病学会総会. 東京, 2011 年 5 月 14 日
 29. 渡邊聡明、渡辺 守、日比紀文: 潰瘍性大腸炎合併癌に対する診断および治療に関する現状および今後の展望. 第 97 回 日本消化器病学会総会. 東京, 2011 年 5 月 14 日
 30. 渡辺 守: 炎症性腸疾患における免疫異常と腸上皮分化・修復・再生障害の接点. 第 97 回 日本消化器病学会総会. 東京, 2011 年 5 月 13 日
 31. 渡辺 守、本谷 聡: クローン病治療 新時代の幕開け. 第 97 回 日本消化器病学会総会. 東京, 2011 年 5 月 13 日
 32. 長沼 誠、藤井俊光、国崎玲子、山本慧恵、吉村直樹、高添正和、竹内義明、渡辺 守: 免疫調節薬・抗体製剤使用 IBD 患者におけるインフルエンザ感染症の現状. 第 97 回 日本消化器病学会総会. 東京, 2011 年 5 月 13 日
 33. 根本泰宏、金井隆典、渡辺 守: CD4+CD45RB^{high}T 細胞移入大腸炎マウスの病態における腸内細菌の役割. 第 97 回 日本消化器病学会総会. 東京, 2011 年 5 月 13 日
 34. 玄 世鋒、長沼 誠、渡辺 守: MR エンテロコロノグラフィ (MREC) によるクローン病の小腸大腸病変の同時評価の検討. 第 97 回 日本消化器病学会総会. 東京, 2011 年 5 月 13 日
7. 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

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

難治性炎症性腸疾患のゲノムおよびエピゲノム解析による病因・病態・治療抵抗性機序の解明
-炎症性腸疾患のゲノム疫学的研究-

研究分担者 松本 主之 九州大学大学院病態機能内科学講師

研究要旨

炎症性腸疾患であるクローン病と潰瘍性大腸炎は複数の遺伝的要因や環境要因が発症に関与する多因子疾患である。これまでにゲノムワイド関連研究や再現性研究から両疾患に共通する遺伝子領域が報告されているが、その多くは依然として不明である。本研究では、既報告の研究をメタ解析することで両疾患に共通する領域として新規に8カ所の遺伝子領域(*GCKR*, *ATG16L1*, *CDKAL1*, *ZNF365*, *LRRK2-MUC19*, *C13orf31*, *PTPN2*, *SBNO2*)を同定した。領域毎の影響は小さいものの、両疾患は病因の一部を共通していることが示され、結果を論文報告した。

A. 研究目的

クローン病(以下CD)と潰瘍性大腸炎(以下UC)は、複数の遺伝的要因や環境要因が発症に関与する多因子疾患である。臨床の現場では両疾患の鑑別に苦慮する症例(いわゆる indeterminate colitis)が存在し、両疾患に共通する感受性遺伝子の存在が示唆されている。これまでにゲノムワイド関連研究のメタ解析であるMcGovernらの報告から両疾患に共通する感受性遺伝領域として18カ所の領域が同定されている。しかし、*NOD2*, *PTPN22*, *ATG16L1*, *IRGM* 領域以外に既報の症例対照研究を対象としたメタ解析は報告されておらず、両疾患に共通する感受性遺伝領域の多くは依然として不明である。

そこで本研究では、CDとUCの両疾患に共通する新規の感受性遺伝領域を同定することを目的とした。

B. 研究方法

CDのゲノムワイド関連研究で同定された疾患感受性領域について報告している、UCを対象とした症例対照研究を網羅的に検索し、メタ解析を行った。

1. 一塩基多型(Single nucleotide polymorphism; 以下SNP)の選択: 既報(2010年6月末まで)のCDに対するゲノムワイド関連研究10報におい

て、 $P < 5 \times 10^{-7}$ を満たすMHC領域外の62SNPを選択した。

2. メタ解析の対象となる論文検索および選択: PubMed文献検索および対象論文の引用文献から白人のUC100例を対象とし、オッズ比および95%信頼区間が算出可能である症例対照研究を抽出した。

3. メタ解析: 均質性の評価(CochranのQ検定および I^2 統計量)し、漸近分散法もしくはDerSimonian-Lairdの方法を用いてメタ解析を行った。

(倫理面への配慮)

既報告の論文データのみを使用しているため、倫理面への配慮は必要ないものと思われる。

C. 研究結果

2報以上の論文に記載がないため、選択した62SNPのうち7SNPを除外し、 $r^2 \geq 0.95$ の強い連鎖不均衡状態にある複数のSNPは1つに統合して解析した。最終的に45SNP(33領域)について解析可能であった。43報の論文を対象としたメタ解析を行い、SNP毎の症例数は4,852~31,125例であった。

McGovernらの報告に加えて8領域について新たに関連を認めた(*GCKR*, *ATG16L1*,

CDKAL1, ZNF365, LRRK2-MUC19, C13orf31, PTPN2, SBNO2). ただし、オッズ比は1.05-1.22と比較的小さかった。

McGovernらが報告している18領域について、6q21領域以外の17領域でUCとの関連が確認された。

D. 考察

本研究では新規に8カ所の遺伝子領域 (*GCKR, ATG16L1, CDKAL1, ZNF365, LRRK2-MUC19, C13orf31, PTPN2, SBNO2*) を CD と UC に共通する感受性遺伝子として同定した。各領域のオッズ比は比較的小さく、個々の影響は小さいと考えられた。今後の機能解析が必要であるが、これまで報告されている IL-23/Th17 経路以外にオートファジーなどの経路が両疾患の発症に関与していると考えられた。

E. 結論

メタ解析の結果、領域毎の影響は小さいものの CD と UC は多数の疾患感受性領域を共有していることが示唆される。

G. 研究発表

論文発表

1. Umeno J, Asano K, Matsushita T, Matsumoto T, Kiyohara Y, Iida M, Nakamura Y, Kamatani N, Kubo M: Meta-analysis of published studies identified eight additional common susceptibility loci for Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 17:2407-2415, 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

炎症性腸疾患におけるエピゲノム変化の炎症と発癌における意義

研究分担者 土肥多恵子

国立国際医療研究センター研究所 肝炎免疫研究センター消化器疾患研究部長

研究要旨：潰瘍性大腸炎やクローン病は、再燃緩解を繰り返し発癌のリスクも高い難治疾患であることから、治療抵抗性の機序を解明し、これを克服することが予後改善のために最も必要とされている。本研究では治療抵抗性の機序解明のためのアプローチとして、炎症現場におけるエピゲノム修飾を明らかにすることを目的としている。その方法として治療抵抗性を示す症例の大腸生検検体のエピゲノム修飾の網羅的解析を計画した。本年度は倫理委員会の承認を受け、標本の収集を引き続き行うとともに、難治性のため手術適応となった症例から得られた標本で解析を実施した。

A. 研究目的

潰瘍性大腸炎やクローン病は、近年著しい増加傾向にある若年発症の重篤な慢性炎症性疾患である。難治性の粘膜傷害が特徴で下痢、発熱、腹痛を症状として緩解再燃を繰り返すため、患者の社会生活に大きな支障を来すばかりでなく、緩解時にも食生活に制限が必要など QOL が著しく障害される。病因として、腸内細菌に対する過剰な免疫応答が指摘されてはいるが、根治療法がなく、近年開発された抗体医薬にも応答しない患者が約 3 割にも及ぶため、更なる対策が必要である。慢性化により発癌のリスクも高くなることから、治療抵抗性の機序を解明し、これを克服することが予後改善のために最も必要とされている。治療抵抗性に関わる因子としては、ゲノム多型に加えて、炎症によって誘導されるエピゲノム修飾による遺伝子の異常な活性化および不活化や DNA メチル化による遺伝子サイレンシングの固定化も、重要であると予測される。さらに、我々はヒトゲノム上ゲノム以外の配列であるトランスポゾンにも注目した。Long interspersed nuclear element, (L-1)はヒトゲノムの 17%を占め、レトロトランスポゾンとして DNA に挿入されているが、挿入部位によっては遺伝子機能を障害して疾患発症の誘因となり、ゲノム不安定性の原因としても重要である。通常 L1 エlement は DNA メチル化によりサイレンシングされているが、我々は、潰瘍性大腸炎手術摘出標本組織においても L-1 の低メチル化がみられることを既に見いだしている。この事実は、L-1 は炎症によって活性化が誘導される可能性を示している。その結果が炎症性腸疾患の病態にどのように関わっているかは未だ明らかにされていないが、炎症発癌に関連している可能性が強いと考えている。本研究では治療抵抗性の機序解明のためのアプローチとして、炎症現場におけるエピゲノム修飾について、レトロトランス

ポゾン活性化状態を含めて明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法

1. クローン病大腸の生検組織を用いた治療抵抗性エピゲノム因子の解析として以下の方法による計画を立てた。

- (1) 抗 TNF- α 抗体治療の対象症例から治療前の内視鏡検査の際に 2 個の生検組織を採取する。第一段階として 20 名のエントリーを行う。
 - (2) 治療効果の判定を目的とした内視鏡検査を、治療開始後 4-8 週間または主治医が適当と判断した時期に行い、この際に治療後の生検組織を採取する。治療無効例の治療後の試料を確保するため、20 名のエントリーで収集できなかった場合は第二段階として 10 名のエントリーを追加する。
2. 生検試料から上皮細胞と粘膜固有層細胞を分離し、セルソーターを用いてマクロファージ分画を精製した後、次の解析を行う予定とした。
- (1) RNA を用いたマイクロアレイ解析または SAGE 解析による網羅的遺伝子発現解析。
 - (2) メチル化 CpG 結合蛋白 MBD を用いた MeDIP シークエンス。L-1 のメチル化解析を含む。
 - (3) 抗ヒストン 3K4 抗体を用いた ChIP シークエンス (遺伝子発現促進的修飾)
 - (4) 抗ヒストン 3K9、抗ヒストン 3K27 抗体を用いた ChIP シークエンス(発現低下修飾)

(倫理面への配慮)

本計画は、平成 22 年 12 月 16 日国立国際医療研究センター倫理委員会の承認を受けた(承認番号 937)。

C. 研究結果

治療前症例のエントリーを継続しているが、抗