

令和 6 年 4 月 6 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07918

研究課題名(和文) コピー数多型研究に基づいた腸管炎症の新たな重症化機序の解明

研究課題名(英文) A new mechanism of intestinal inflammation based on copy number polymorphism

研究代表者

上村 修司 (Kanmura, Shuji)

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・准教授

研究者番号：60448561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Defensin alpha (DEFA)1-3のコピー数多型(CNVs)は自己免疫疾患の発症に関与しているが、DEFA1A3-CNVsと潰瘍性大腸炎(UC)との関連は不明であった。本研究においてUC患者のDEFA1A3のコピー数と臨床的活動性は相関性を示した。多変量解析においてDEFA1A3コピー数が臨床的重症化を判定する独立した因子として抽出された。一方、好中球特異的DEFA1A3-トランスジェニック(Tg)マウスにおいても高コピー数のTgマウスは、野生型マウスと比較し、DSS腸炎での死亡率が有意に高く、臨床的活動性や腸管の組織学的スコアは高い傾向であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はこれまで報告のない潰瘍性大腸炎における重症度とDEFA1A3-CNVの関連性に着目した新しいバイオマーカー探索の研究である。DEFA1A3コピー数の測定は、潰瘍性大腸炎患者個人における、治療反応性や重症化の予測マーカーの開発につながり、極めて臨床的にも意義深い。この研究の発展させることができれば、不要なリスクを冒すことなく適切な治療を選択できるような医療を提供できる社会の実現が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Copy number variations (CNVs) of defensin alpha (DEFA) 1-3 have been implicated in the pathogenesis of autoimmune diseases, the association between DEFA1A3-CNVs and ulcerative colitis (UC) is unknown. In this study, DEFA1A3 copy number and clinical activity were correlated in patients with UC. In a multivariate analysis, DEFA1A3 high copy number was an independent factor determining clinical severity. On the other hand, in neutrophil-specific DEFA1A3-transgenic (Tg) mice, high copy number Tg mice also showed a significantly higher mortality rate from DSS colitis and a higher clinical activity and histological scores of colitis compared to wild-type mice.

研究分野：消化器内科

キーワード：Defensin alpha 好中球ペプチド 潰瘍性大腸炎 コピー数多型

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

タイトル: コピー数多型解析による腸炎の重症化予測と腸炎機序の解明

## 1. 研究開始当初の背景

疾患や薬剤感受性等に関与する遺伝子多型として、コピー数多型 (copy number variation: CNVs)の影響が着目されている。近年、Defensin alpha (DEFA)1-3のコピー数が感染症の重症化や IgA 腎症など自己免疫性疾患に関与していると報告されている。DEFA1A3 によりコードされるヒト好中球ペプチド (Human Neutrophil Peptides: HNP) 1-3 は好中球アズール顆粒内に存在し、抗菌作用を有するだけでなく、プリン作動性受容体を介し上皮や内皮細胞から IL-1 等の炎症性サイトカイン発現を誘導するといった免疫調節作用も認められている。DEFA1A3 コピー数と HNP 分泌能は正の相関を示し、潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis: UC) の病態に HNP が関与するとの報告があるものの、UC と DEFA1A3-CNV との関連は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、UC と DEFA1A3 コピー数に着目し、DEFA1A3 コピー数と潰瘍性大腸炎の重症度と相関性を解析し、DEFA1A3 の炎症誘発作用の機序解明も実施することで新規治療法の開発の基盤を確立することである。

## 3. 研究の方法

(1) DEFA1A3-CNV と潰瘍性大腸炎との関連性を解明する臨床研究:

2020年9月までに当院で加療された潰瘍性大腸炎患者を対象とした。潰瘍性大腸炎の臨床背景として、現年齢、性別、発症年齢、病型(直腸炎型、左側結腸炎型、全大腸炎型)内視鏡的重症度(MES; Mayo endoscopic score)、臨床的重症度(Mayo score)、治療内容(アミノサリチル酸製剤、ステロイド、生物学的製剤、免疫調節薬)、手術歴等の情報を診療録から得た。DEFA1A3-CNVの測定に関しては、通常診療で採取する末梢血測定用のEDTA-2Naの残血液からリンパ球を分離しgDNAを抽出し、digital PCRを用いたqPCR法で解析した。これらの情報よりDEFA1A3コピー数と重症度など臨床背景との相関性やリスク因子解析を検討した。

(2) DEFA1A3 トランスジェニック (DEFA1A3-Tg)マウスと生存率の関連性:

DEFA1A3 遺伝子はマウスに欠損しているため、DEFA1A3 を好中球/単球に特異的に発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作成した。尻尾血から DNA を抽出し、DEFA1A3 のコピー数をデジタル PCR で測定し、高コピー群と低コピー群に分類した。これらの DEFA1A3-Tg マウスに 3%デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を7日間自由飲水させ大腸炎を誘導し、高コピー群と低コピー群で以下の項目を比較検討した。生存率・体重・腸管長の変化、臨床スコア (disease activity index)・腸炎病理スコア、大腸組織中の炎症性サイトカイン (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) の発現を解析した。

## 4. 研究成果

(1) UC197例を対象解析とした。DEFA1A3 コピー数は Mayo スコアと有意な相関を示し ( $r = 0.46, p < 0.0001$ )、多変量解析において DEFA1A3 コピー数は、臨床的重症化を判定する独立した因子として抽出された。さらに高コピー群はステロイドに対する治療抵抗性

を示す割合が高かった。また、DEFA1A3 コピー数と HNP<sub>s</sub> の血清濃度は相関しており、HNP<sub>s</sub> が腸管炎症の増悪に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

(2) 好中球/単球に DEFA1A3 を発現する Tg マウスを作成でき、DSS により実験腸炎を誘導した。高コピー数 Tg マウスは、低コピー数 Tg マウスと比較し、死亡率が有意に高く、臨床的活動性や腸管の組織学的スコアは高値を示した。大腸組織中のサイトカイン変化に関しては有意な差は今回解析では認められなかった。

これら成果は DEFA1A3 コピー数が UC の重症度や治療予測マーカー候補であることを示しただけでなく、DEFA1A3 研究は新規治療開発の基盤となる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kanmura Shuji, Morinaga Yuko, Tanaka Akihito, Komaki Yuga, Iwaya Hiromichi, Kumagai Kotaro, Mawatari Seiichi, Sasaki Fumisato, Tanoue Shiroh, Hashimoto Shinichi, Sameshima Yoichi, Ono Yohei, Ohi Hidehisa, Ido Akio	4. 巻 12
2. 論文標題 Increased Gene Copy Number of DEFA1A3 Is Associated With the Severity of Ulcerative Colitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Translational Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 e00331 ~ e00331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14309/ctg.0000000000000331	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kanmura S, Morinaga Y, Maeda N, Tanaka A, Komaki Y, Ido A.
2. 発表標題 High copy number polymorphisms of alpha defensin 1-3 are associated with therapeutic responsiveness in inflammatory bowel disease.
3. 学会等名 CROHN'S & COLITIS CONGRESS (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 坂江 遥, 小田耕平, 小牧祐雅, 上村修司, 井戸章雄.
2. 発表標題 炎症性腸疾患患者における脂肪肝の臨床的特徴と意義.
3. 学会等名 第121回日本消化器病学会九州支部例会・第115回日本消化器内視鏡学会九州支部例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 前田将久, 上村修司, 桑水流康介, 小牧路子, 田中啓仁, 鯨島洋一, 小牧祐雅, 井戸章雄
2. 発表標題 ディフェンシン1-3の遺伝子コピー数多型は潰瘍性大腸炎の治療反応性の予測マーカーとなる
3. 学会等名 第13回日本炎症性腸疾患学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shuji Kanmura
2. 発表標題 Copy number variation of alpha defensin 1-3 is a predictive marker of therapeutic response in ulcerative colitis
3. 学会等名 18th Congress of European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO2023)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中啓仁, 上村修司, 桑水流康介, 湯通堂和樹, 小野陽平, 小牧祐雅, 大井秀久, 中村勇一, 徳重浩一, 井戸章雄.
2. 発表標題 Real world における潰瘍性大腸炎に対するベドリズマブの治療成績.
3. 学会等名 第117回日本消化器病学会九州支部例会 / 第111回日本消化器内視鏡学会九州支部例会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	熊谷 公太郎 (Kumagai Kotaro) (80626664)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・助教  (17701)	
研究分担者	田中 啓仁 (Tanaka Akihito) (90896127)	鹿児島大学・鹿児島大学病院・医員  (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------