

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22790628

研究課題名（和文） クローン病感受性遺伝子 IL12B が感受性を亢進させる分子メカニズムの解明

研究課題名（英文） Candidate gene analysis of the IL12B gene in Crohn's disease

## 研究代表者

遠藤 克哉 (Endo Katsuya)

東北大学・高等教育開発推進センター・助教

研究者番号：40509197

研究成果の概要（和文）：IL12B がクローン病感受性遺伝子であることを確定するためには、その相関する対立遺伝子が IL12B 遺伝子の機能、特に発現に影響を与えることを示さなければならぬ。そこで、最初に IL12B 遺伝子周囲の Tag SNP を用いて、最も強く日本人クローン病と相関するハプロタイプを同定する作業を行った。日本人 IL12b 遺伝子を含む領域には、2 つのメジャーハプロタイプ (A, B) が存在していることを明らかにした。そのうちハプロタイプ A がリスクハプロタイプであり、ハプロタイプ B が非リスクハプロタイプであることを明らかにした。次に、ハプロタイプ A と B 由来の m-RNA の発現比を測定することで (allelic imbalance)、リスクハプロタイプは m-RNA の発現を亢進させることが、明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：IL12B is one of the promising candidates for susceptibility genes to Crohn's disease (CD). The aim of this study was to do a candidate gene analysis of IL12B in Japanese CD, and to determine how the risk allele affects the susceptibility to CD. Therefore, allelic expression imbalance of IL-12B mRNA was determined in peripheral monocytes. A total of 364 patients with CD, 242 patients with ulcerative colitis (UC) and 445 healthy controls (HCs) were examined. Eight SNPs around IL12B were genotyped. The allelic ratio of IL12B-mRNA was examined using SNaPshot analysis in LPS-stimulated monocytes. Two SNPs (rs6887695, rs41292470) were significantly associated with CD ( $P_c = 0.012, 0.020$ , respectively) and one SNP (rs3212227) showed an association with marginal significance ( $P_c = 0.10$ ). Haplotype A formed by these three SNPs showed significant association with CD ( $P_c = 0.00054$ , odds ratio = 1.46). The allelic ratios of IL12B-mRNA transcribed from the haplotype A to the non-risk haplotype (haplotype B) in LPS-stimulated monocytes from ten healthy controls heterozygous for the risk haplotype were significantly higher than the allelic ratio of respective genomic DNA ( $p = 0.00069$ ). We confirmed the association of the haplotype 1 of IL12B with Japanese CD. The demonstrated allelic expression imbalance supports the idea that the risk haplotype of IL12B confers susceptibility to CD through increasing expression of IL12B-mRNA.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード： クロウン病、感受性遺伝子、IL12b、allelic imbalance

## 1. 研究開始当初の背景

1) クロウン病は若年者に好発する原因不明の慢性腸炎であり、近年日本でもその発症が激増してきており、その病因解明が待たれている。クロウン病は疫学調査よりその発症に遺伝的要因が強く関与する多因子疾患とされ、その遺伝因子を特定するため、genome wide association study (GWAS) が、精力的にこの3年間で行われ、既に本申請者施設からの報告(投稿中)を含め10件以上の研究が行われ報告されている。その結果、現在ゲノムの約32ヶ所に有意に相関する領域、すなわちクロウン病感受性遺伝子が存在する領域が同定されている。(Nat Genet, 2008. 40(8): p. 955-62.)

2) GWASの次は機能解析: GWASは統計学的に感受性遺伝子の存在する広範な領域を示すだけであり、その領域内で感受性遺伝子を確定するためには、①更なる詳細なSNP相関解析で最も強く相関するリスクハプロタイプを同定し、②そのリスクハプロタイプが生物学的効果(最終的には疾患感受性)を生むことを示さなければならない。一般的に、リスクハプロタイプ上にアミノ酸置換を起こすような遺伝子多型が存在する場合、その変異蛋白の機能解析を行うことになるが、IL23R, NOD2の稀な例を除いて存在していないことより、遺伝子発現に与える影響を解析することが重要となる。

3) IL12Bは日本人クロウン病でも感受性遺伝子候補: IL12Bは、GWASメタ解析で示された相関tag-SNP(rs6887695)近傍に位置する遺伝子であり、現在感受性遺伝子候補として挙げられている32領域の一つに存在する遺伝子である(Nat Genet, 2008. 40(8): p. 955-62.)。IL12B遺伝子は、GWASメタ解析以前より既に感受性遺伝子候補と考えられていた遺伝子であり、IL12とIL23両サイトカインの共通subunit p40をコードしている。このIL12, IL23の両サイトカインが、Th1, Th17のヘルパーTリンパ球の分化、増殖、維持を促進することにより、クロウン病病態に強く関与していることが、ヒト、モデル動物の解析で示されている(Gut, 2009. 58(8): p. 1152-67.)。また最近、抗IL12B/IL23 p40抗体治療がクロウン病に対して良好な治療効果を示すことも報告された(Gastroenterology, 2008. 135(4): p. 1130-41.)。なお日本人クロウン病とrs6887695が相関することも既に理研より報告されている(Gut, 2009. 58(2): p. 228-32.)。(日本人クロウン病を対象とした

詳細な解析は未だない)

4) IL12Bの機能解析は従来法では困難: これだけの感受性遺伝子である可能性を示す証拠が揃っている遺伝子であるが、従来の研究では感受性遺伝子と確定できなかった。最大の要因が、相関した多型(ハプロタイプ)と生物学的効果との関連を明らかにできなかったことにある。例えば、IL12B 3' UTR rs3212227 SNPについては、従来よりm-RNA発現量に影響を与えることが、in vivoで報告されているが、まったく相反する結果が複数出ており、結論がでていない。このように結果が大きく食い違う原因として、第一に、調査したい対立遺伝子を野生ホモ接合体、ヘテロ接合体、変異ホモ接合体の3群でそのmRNA 或いはタンパク発現量を比較することにあると考えられている。サイトカインは、小さな刺激で大きく発現量が変化する性質があり、個体間での刺激をコントロールし、群間比較する際にその影響を消去するように(内部コントロールをおくように)実験計画を立てなければならないが、従来の方法では、その弱点を理解していても克服が困難であった。第二に、従来の解析法は集団遺伝学的手法で最初に責任SNPを同定し、その後機能解析を行わなければならないため、責任SNPが同定できないと、次の機能解析ができなかった。(実際は連鎖不平衡のため、責任SNPを同定することは困難であった。)

5) 対立遺伝子特異的 mRNA 定量を用いた新しい機能解析: 本申請者は、その点を克服するために、比較したい対立遺伝子をヘテロ接合体で保有する個体を対象にして、対立遺伝子特異的 mRNA 定量を行うことにした。このアッセイでは、お互いの対立遺伝子由来のmRNA が内部コントロールとなるようにすることで、SNPの遺伝子発現に与える影響を正確にアッセイすることを可能にした。また対立遺伝子の単位を相関した最少ハプロタイプとし、責任SNPが同定されていなくても解析可能にした。(詳しくは研究計画に記述した)

## 2. 研究の目的

1) 日本人クロウン病を対象にして、GWASで相関を確認されたtag-SNP(rs6887695)を中心に、前後200 kbの範囲のTag SNP約40ヶを用いて、最も強く相関するリスクハプロタイプを同定する。2) そのリスクハプロタイプと非リスクハプロタイプをヘテロ接合体に持つ個体を対象にして、対立遺伝子特異的 mRNA 定量を行い、リスクハプロタイプがIL12B 遺伝子発現に与える影響を確定する。

3) リスクハプロタイプを構成する SNP のどの SNP が発現に影響を与えるか、in vitro のプロモーターアッセイ、EMSA、CHIP で解析する。以上の3つの検討を行い、IL12B がクローン病の感受性遺伝子であることを確定する。

### 3. 研究の方法

目的を達成するため、次の3つの研究を順次行っていくことになる。日本人クローン病と関連するハプロタイプを決定するために、GWAS で関連が確認された tag SNP rs6887695 を中心に (IL12B を含む) 前後約 100kb の間に存在する 40 ケの tag SNP をタイピングする。次に決定された、リスクハプロタイプ、非リスクハプロタイプの IL12B 発現に与える影響を確認するため、対立遺伝子特異的 mRNA 定量を行う。さらに発現に影響を与えるハプロタイプのなかで、どの SNP が発現に影響を与える責任 SNP であるか、promoter assay, CHIP, EMSA で解析する。

#### 1) リスクハプロタイプを決定する

対象 SNP: GWAS で関連が確認されている tag SNP rs6887695 を中心に、前後 100kb から 40 ケ Tag SNP を、Tagger software (Nat Genet, 2005. 37(11): p. 1217-23.) を用いて選び、タイピングを行う。対象: 日本人クローン病患者 364 名、日本人健常対照者 445 名である。サンプル DNA は既に、倫理審査で承認を受け、施設に保存されている状態である。タイピング方法: PCR-restriction fragment length polymorphism で行う。統計解析: HAPLOVIEW (Bioinformatics, 2005. 21(2): p. 263-5) で、予測ハプロタイプ頻度を算出し、chi-square test で関連解析を行う。

#### 2) 対立遺伝子特異的 mRNA 定量

日本人にも IL12B 遺伝子の exon 領域に SNP が複数存在している。その SNP は、mRNA に転写される領域に存在するため、ある exon 領域の SNP (例えば C/A) をヘテロ接合体で保有する個体で検出される mRNA は、その SNP に対応する塩基配列を調べることで、C 対立遺伝子由来なのか、A 対立遺伝子由来なのか判別できる。一般的には、C 対立遺伝子由来と A 対立遺伝子由来の mRNA は等しく発現することが多い。しかし、例えば、C 対立遺伝子を含むハプロタイプ上に転写を促進するような cis 配列が存在した場合 (例えばクローン病リスクハプロタイプ)、その発現比は、C 対立遺伝子由来 mRNA > A 対立遺伝子由来 mRNA となる。逆に、その比を定量し、由来対立遺伝子によって mRNA 量に差がある場合、その対立遺伝子を含むハプロタイプ上に cis-regulatory 配列が存在していることが予測される。予備実験にて、日本人 IL12b 遺伝子を含む領域には、2つのメジャーハプロタイプ (A, B) が存在していることが分かっ

ている。(たぶん片方が、日本人クローン病リスクハプロタイプで、もう一方が非リスクハプロタイプと考えられる) ハプロタイプ A には exon8 に存在する SNP rs3212227 の C 対立遺伝子が、ハプロタイプ B には A 対立遺伝子が連鎖している。このことより、mRNA の C 対立遺伝子由来と A 対立遺伝子由来の mRNA の量比を測定することで、どちらのハプロタイプがより多くの転写物を産成しているか確認できる。(転写活性、mRNA の安定性等、すべてまとめた形で判定される)。その mRNA の量比の測定は、SNaPshot 法を用いる。(ABI Prism SNaPshot™ Multiplex Kit) 対象サンプル: クローン病リスクハプロタイプ、非リスクハプロタイプをヘテロ接合体で保有する健常者から、末梢血単球を Monocyte isolation kit II (Miltenyi Biotec) を用いて調製する。RNA は、illustra RNASpin Mini RNA isolation Kit (GE Healthcare) を用いて精製。その後、cDNA を作成し、SNaPshot 法にて測定する。

#### 3) 責任 SNP の同定。

プロモーターアッセイによるスクリーニング: 最初に、特定されたリスクハプロタイプは通例 10kb 以上の長さを有するため、どの位置に発現に影響を与える cis element が存在するか、スクリーニングする。そのため、in vitro の pGL4 を用いたプロモーターアッセイを行う。すなわち、luciferase 遺伝子 5' 直前に日本人 IL12B 遺伝子のプロモーター (500bp) を挿入したアッセイプラスミドを最初に作成し、調べたい領域を 1kb 毎、PCR で増幅して、そのアッセイプラスミドのさらに 5' 上流に挿入して、リスクハプロタイプ、非リスクハプロタイプとの転写活性を比較する。なお、用いる培養細胞はヒト単球系培養細胞 U937 を予定している。

### 4. 研究成果

1) IL12B 上流の SNP (rs6887695) で、日本人 CD との関連が確認された (オッズ比 1.39、 $p=3.40 \times 10^{-4}$ )。他の多型についても引き続いてタイピングを行った結果、5' 領域の insertion/deletion (オッズ比 1.34、 $p=0.01$ )、exon8 の SNP (rs3212227) (オッズ比 1.28、 $p=0.03$ ) の 2 箇所の多型で対立遺伝子頻度に有意差を認めた。その他の Tag-SNP およびアミノ酸置換をもたらす SNP では関連を認めなかった。関連を認めた 3 箇所の多型は連鎖不平衡の関係にあった。すべてのハプロタイプのうち、70%以上は 2 つのハプロタイプ (A, B) に限定されていた。クローン病においてはハプロタイプ A がリスクハプロタイプ (オッズ比 1.79、 $p=3.86 \times 10^{-5}$ )、ハプロタイプ B が非リスクハプロタイプ (オッズ比 0.57、 $p=0.01$ ) であった。

2) ボランティアの単球から採取された

IL12B-mRNA において、無刺激のものは計測値が低く、解析が困難であった。LPS 刺激後では、非リスク対立遺伝子由来に比べてリスク対立遺伝子由来の mRNA が  $1.431 \pm 0.114$  倍であり、標準サンプルとして用いたゲノム DNA で測定した対立遺伝子比と比較し有意に高く ( $p=6.89 \times 10^{-4}$ )、allelic expression imbalance の状態にあった。

3) プロモーターアッセイによる責任 SNP スクリーニングを行った。上流 10kb をカバーする plasmid (14 種類) をそれぞれハプロタイプ A/B 毎に解析を行ったが、有意差を示す plasmid は確認できなかった。

4) 本研究において日本人クローン病に対する IL12b リスクハプロタイプを同定した。また IL12B の SNP 機能解析を初めて allelic expression imbalance を用いて示し、IL12B が最も発現すると考えられる単球にて、リスク対立遺伝子の mRNA の発現量が非リスク対立遺伝子に比較し、刺激後に増加することが確認された。IL12B のリスクハプロタイプでの発現量の増加が、クローン病の病態に関わっている可能性がある。引き続き責任 SNP を同定するために plasmid を用いたプロモーターアッセイを行ったが、有意な SNP を同定することはできなかった。このことは、さらに範囲を拡大して今後プロモーターアッセイを行うか、方法を変更するべきと考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

Kakuta Y, Kinouchi Y, Shimodaira Y, Moroi R, Nagasawa H, Kuroha M, Arai T, Kanazawa Y, Shiga H, Endo K, Takahashi S, Shimosegawa T. The IL12B gene is associated with the clinical course of Crohn's disease in Japanese patients. 18th United European Gastroenterology Week (23-27, Oct 2010, スペイン Barcelona)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

国内外の別:

[その他]

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

遠藤 克哉 (Endo Katsuya)

東北大学・高等教育開発推進センター・助教

研究者番号: 40509197