

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710225

研究課題名(和文)潰瘍性大腸炎関連遺伝子多型の機能解析と治療効果への応用

研究課題名(英文)Functional analysis of ulcerative colitis susceptibility genes and implementation for clinical practice

研究代表者

浅野 光一 (Asano, Kouichi)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：40593893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、これまで、潰瘍性大腸炎という難病の原因遺伝子(FCGRをはじめSLC26A3, JAK2遺伝子)を同定してきましたが、本研究は潰瘍性大腸炎のさらなる病態究明と臨床経過にどのように影響しているかを調べたものです。疾患関連遺伝子多型の解析では、FCGR遺伝子領域にはコピー数多型(CNV)が存在しFCGR3A遺伝子上のSNPのアレルのコピー数が潰瘍性大腸炎と関連がありました。次に、これらの遺伝子多型の臨床経過に及ぼす影響を検討し、FCGR2A遺伝子上の多型と13q領域の多型が寛解維持に影響することが判明し、潰瘍性大腸炎の発症とともに病気の経過にも遺伝子の影響があることが明らかになっています。

研究成果の概要(英文)：We have previously identified ulcerative colitis (UC), an intractable disease, susceptibility genes, and we aimed to investigate further precise pathogenesis of the disease and to analyse effects of UC susceptibility genes on the clinical course. Analyses of UC susceptibility genes revealed that a copy number variation region exist at FCGR3A gene and that allele copy number of FCGR3A located in this CNV region is associated with UC susceptibility. Next, we investigated effect of UC susceptibility genes on the relapse status of the disease. As a result, SNPs at FCGR2A gene and 13q region were associated with the risk of relapse of the disease. Thus, UC susceptibility genes revealed to not only play a role in the pathogenesis of the disease, but also have effects of the clinical course.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：ゲノム医科学

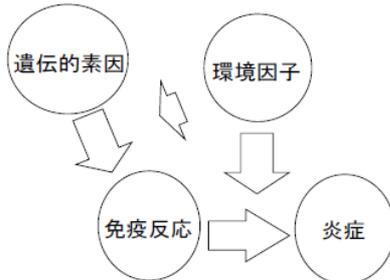
キーワード：疾患関連遺伝子 潰瘍性大腸炎 遺伝子発現解析 予後予測

### 1. 研究開始当初の背景

本症は遺伝的因子と環境因子の双方が関連する多因子疾患と考えられており(図1)過去の疫学研究の結果から潰瘍性大腸炎の発症には明らかな遺伝的要因があることが示されていた1)。

最近、申請者は本邦での潰瘍性大腸炎の全ゲノム関連研究において、FCGR2A、SLC26A3、13q12の

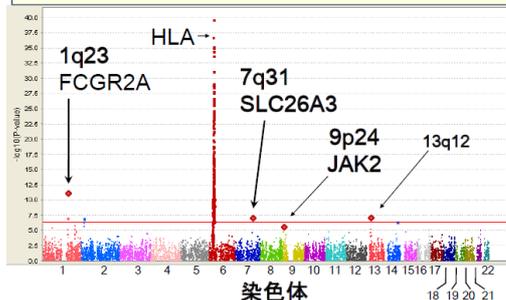
図1. 潰瘍性大腸炎の病態



3つの新規の遺伝子領域を本症の関連遺伝子座として同定した(図2; Asano K et al. Nature Genetics 2009)。

世界的にみると21世紀初頭から、遺伝子上に密に存在する単塩基多型(single nucleotide polymorphism: SNP)を用いた患者・対照関連研究により疾患関連遺伝子が同定されてきている。本症でも2008年からは全ゲノム関連研究により多数の新規の疾患関連遺伝子が同定されてきた。現在までに、本症では20程度の疾患関連遺伝子・遺伝子領域が同定されている。これらの遺伝子の中には機能的にサイトカインシグナル、ないし細胞構造維持に参与する遺伝子群に分類されており、それぞれの群でのdisease pathwayが想定されている。上述のように加速するゲノム研究の一方で、大部分の候補遺伝子領域では詳細な解析がなされておらず、原因遺伝子多型はもとより原因遺伝子の同定にも至っていないものも多い。また、候補となった遺伝子多型がどのように疾患発症に関わっているのかも多くが未解明である。さらに、現在同定されている遺伝子多型では疾患の遺伝的要因の20%程

図2 ゲノムワイド関連研究の結果



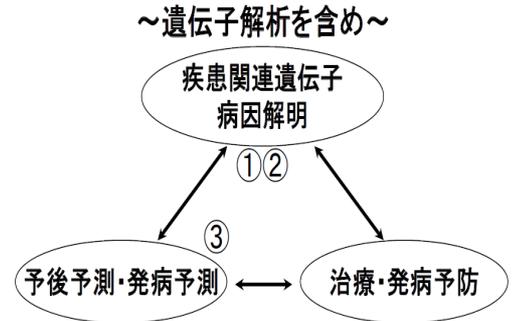
度しか説明できず、残りは稀な遺伝子多型や環境要因との相互作用の影響が存在すると考えられている。

### 2. 研究の目的

申請者らは最近、全ゲノム関連研究において3つの新規の疾患関連遺伝子座を同定

した。本研究はこれらの遺伝子多型の機能解析を進めて疾患の病態を解明するとともに、遺伝的要因と環境的要因の相互作用、及び、臨床経過や治療経過との関連を解析することにより、治療効果や予後予測因子の検討を行うことを目的としている。具体的には疾患関連遺伝子多型の解析、疾患関連遺伝子の発現解析、遺伝子多型別の各種薬剤の治療効果や予後の予測因子の検索、の3つです。

### 図3. 疾患関連遺伝子と臨床への応用



- A 潰瘍性大腸炎の病態解明( )
  - ・ 遺伝子多型別の各組織での遺伝子発現の関連の検討
  - ・ 遺伝子多型、遺伝子発現の腸管炎症との関連の検討
- B 遺伝子多型別の臨床経過や予後の予測因子の検索( )
  - ・ 遺伝子多型別の各種治療における効果の検討
  - ・ 個人の遺伝情報に基づいた予後予測や治療法の検討

### 3. 研究の方法

対象者は九州大学医学部付属病院病態機能内科の潰瘍性大腸炎患者と炎症性腸疾患と診断されていない者とする。解析は次の3段階から構成されています。潰瘍性大腸炎関連遺伝子について、遺伝子多型を解析する。免疫組織学的染色とmRNAの発現解析を行う。これらを用い遺伝子多型とmRNA、あるいは、蛋白質の組織での発現パターンの関連を調べる。これらの結果を基に、遺伝子多型が腸管炎症に及ぼす影響を調べる。遺伝子多型や遺伝子の腸管粘膜における発現量の差が、臨床病型、罹患範囲や、ステロイド、免疫調整剤、血球除去療法などの治療効果にどのような影響があるかを解析し、疾患の病態を解明するとともに、治療効果の予測を行う。

#### 研究対象者:

患者:九州大学医学部付属病院病態機能内科に入院中、あるいは、通院中の潰瘍性大腸炎患者

(サンプル数 約 150 名)

対照群：九州大学医学部付属病院病態機能内科に入院中、あるいは、通院中の患者のうち炎症性腸疾患と診断されていない者 (サンプル数 約 30 名)

#### 研究段階

潰瘍性大腸炎患者と対照群の大腸粘膜 (盲腸、直腸、炎症部、非炎症部) また、血中の免疫系細胞 (T,B 細胞、マクロパージ、樹状細胞など) において潰瘍性大腸炎関連遺伝子である *FCGRs*、*SLC26A3*、および *JAK2* 遺伝子産物 (mRNA と蛋白質) の発現が遺伝子多型毎に上昇あるいは減少しているかを調べる。それらにより、遺伝子多型が腸管炎症に及ぼす影響を調べる。

#### 実験

##### 1. 遺伝子多型解析 (研究段階)

患者および対照群から採取した血液からゲノム DNA を抽出し、*FCGRs*、*SLC26A3*、および *JAK2* 遺伝子多型を TaqMan 法、Invader 法、あるいは direct sequence 法により解析する。

##### 2. 遺伝子発現解析 (研究段階)

患者および対照群から血液、大腸組織 (直腸、盲腸、炎症部、非炎症部) を採取し、以下の実験を行う。遺伝子多型と遺伝子発現の関連についての検討項目 (研究段階)

###### A. 免疫組織学的染色

生検組織、あるいは切除組織のパラフィンブロックを使用し、*FCGRs*、*SLC26A3*、および *JAK2* 蛋白を特異抗体により免疫組織学的染色を行う。

###### B. 分子発現解析

凍結材料から RNA を抽出し、*FCGRs*、*SLC26A3*、および *JAK2* 遺伝子の mRNA の発現を real-time PCR 法により定量解析する。

###### C. 血液中の免疫細胞の *FCGRs*、および *JAK2* 遺伝子の発現

血液から各種免疫細胞を抽出し、フローサイトメトリーにより遺伝子の発現を解析する。

### 3. 遺伝子多型、遺伝子発現と臨床経過との関連の検討 (研究段階)

潰瘍性大腸炎患者約 150 名の臨床経過を調査、集計し、潰瘍性大腸炎関連遺伝子 (*FCGRs*、*SLC26A3*、および *JAK2* 遺伝子) について、遺伝子多型や各遺伝子の大腸粘膜、および、免疫細胞における発現量の差が臨床経過へどのように影響を及ぼしているか調べる。

#### 検討する臨床項目

患者背景 1.潰瘍性大腸炎の臨床病型、  
2.罹患範囲、3.重症度

治療効果 1.ステロイドの効果、2.免疫調整剤の効果、3.血球除去療法の効果、4.タクロリムスの効果、5.インフリキシマブの効果

予後因子 1.手術の有無、2.ステロイド依存性の有無、3.合併症発生の有無

これらの結果を用いてリスクモデルを作成する。

#### 4. 研究成果

本研究は次の 3 つの研究から構成されており、各研究での実施状況を以下に記載していた。

##### 潰瘍性大腸炎関連遺伝子多型の解析

ゲノム DNA の収集については、752 例の潰瘍性大腸炎患者のゲノム DNA をすでに収集した。実験と解析に関しては、上記の 752 例のサンプルを用いて *FCGR2A*、*SLC26A3*、*JAK2* 遺伝子領域の遺伝子多型の解析を行っている。*FCGR* 遺伝子領域にはコピー数多型 (CNV) の影響が存在し、single nucleotide polymorphism (SNP) の解析のみでは不十分であることが判明した。そのため、その領域の CNV の影響の詳細な解析を行い、その結果、*FCGR2A* 遺伝子上の SNP とほかの *FCGR* 遺伝子の CNV のハプロタイプが潰瘍性大腸炎と非常に強い関連があった。また、*FCGR3A* 遺伝子上の SNP のアレルのコピー数が潰瘍性大腸炎と関連があることが判明し、この結果は現在論文化し投稿している。

##### 疾患関連遺伝子のヒト組織での発現解析 (遺伝子多型や腸管炎症との関連) :

潰瘍性大腸炎患者 30 名と対照群 25 名の血液と大腸組織からのゲノム DNA、mRNA の抽出、および腸管各所からの組織を採取した。さらに、現在、*SLC26A3* 遺伝子についてはジェノタイプ毎に発現量に差があることを大腸組織の免疫染色で確認して

おり,FCGRをはじめ SLC26A3,JAK2 遺伝子の mRNA レベルでの発現解析を進めているところであり,今後有用な知見が得られた時点で論文化を行う予定である.

遺伝子多型、および、遺伝子発現の臨床経過との関連解析:

既採取のゲノム DNA サンプル 109 名を用いてその臨床経過との関連を解析した.その結果,二つの遺伝子の多型が,潰瘍性大腸炎の寛解維持期間に影響していることが判明した.この成果は学会報告を予定しており,その後論文化する予定である.また,さらにサンプル数を増やして,他の遺伝子多型についても解析を行い,研究を継続していく予定である.

以上、潰瘍性大腸炎の発症とともに病気の経過にも遺伝子の影響があることが明らかになった。我々は、これまで、潰瘍性大腸炎という難病の原因遺伝子(FCGRをはじめ SLC26A3,JAK2 遺伝子)を同定してきたが、本研究は潰瘍性大腸炎のさらなる病態究明と臨床経過にどのように影響しているかを調べたものである。今後さらに研究を進めれば、潰瘍性大腸炎の治療ターゲットを見つけたり、診療方針決定の指標を作成したりすることが可能になると考えられる。

#### 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 1 件)

Kouichi Asano, Takayuki Matsumoto, Junji Umeno, Atsushi Hirano, Motohiro Esaki, Naoya Hosono, Toshiyuki Matsui, Yutaka Kiyohara, Yusuke Nakamura, Michiaki Kubo, and Takanari Kitazono. Impact of Allele Copy Number of Polymorphisms in FCGR3A and FCGR3B Genes on Susceptibility to Ulcerative Colitis. Inflammatory Bowel Diseases. 2013 Sep;19(10):2061-2068.

〔学会発表〕(計 1 件)

Asano K, Esaki M, Umeno J, Maehata Y, Moriyama T, Nakamura S, Kitazono T. Ulcerative colitis susceptibility variants at FCGR2A and 13q12 predict disease course. Digestive Disease Week 2014, Chicago, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:

種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者  
浅野光一 (九州大学病院)

研究者番号: 40593893

(2)研究分担者  
なし ( )

研究者番号:

(3)連携研究者  
なし ( )

研究者番号: