

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790677

研究課題名(和文) クローン病難治化と粘膜内リンパ球におけるエピジェネティクス制御異常

研究課題名(英文) DNA methylation profiles of CD4+ effector memory T cells show distinct differences between Crohn's disease and ulcerative colitis

研究代表者

志賀 永嗣 (SHIGA, Hisashi)

東北大学・大学病院・特任助手

研究者番号：20583355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：クローン病(CD)と潰瘍性大腸炎(UC)の腸管局所のCD4+ effector memory T cell (Tem)を対象に、DNAメチル化のCDとUCにおける差異を明らかにした。Temの網羅的DNAメチル化比較解析では、有意差を示した遺伝子は2169あり、そのうち1450の遺伝子でCDの方が高メチル化されており、719の遺伝子でUCの方が高メチル化されていた。Pathways解析では、T cell receptor signaling、T helper cell differentiation、death receptor signalingに関わる遺伝子が有意に多く含まれていた。

研究成果の概要(英文)：The comprehensive DNA methylation analysis comparing CD4+ effector memory T cell (Tem) from patients with CD and UC revealed significant differences in 2169 genes (gene-wise analysis), of which 1450 and 719 genes showed hypermethylation in CD- and UC-derived Tem, respectively. In pathway analysis, genes associated with T-cell receptor signaling, helper T-cell differentiation, and death receptor signaling were significantly more common. Furthermore, apoptosis resistance in Tem in CD was eliminated with 5-AZA-induced demethylation. Here we clarified following three points: (1) Differences in DNA methylation in Tem in CD and UC were confirmed. (2) The characteristic biological processes and signaling pathways were identified based on the list of genes exhibiting the difference. (3) Apoptosis susceptibility was suggested to be regulated by DNA methylation.

研究分野：消化器病学

キーワード：エピゲノム クローン病 アポトーシス バイサルフェート 潰瘍性大腸炎 炎症性腸疾患 DNAメチル化 脱メチル化剤

1. 研究開始当初の背景

(1) Genetic variants だけでは説明できない病態：クローン病 (CD) は原因不明の慢性腸炎であり、日本でもその発症が激増しており、その病因解明が待たれている。CD を含む炎症性腸疾患は、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 5 年間で行われ、本申請者施設からの報告を含め既に多数の論文が報告されている。その結果、現在ゲノムの約 71 ケ所に有意に相関する領域が同定されている。しかし、多因子疾患の中で最も遺伝子解析が成功した CD においても、遺伝因子で直接説明できる病態は多くて 30% 程度であり、残り 70% は不明のままとなっている。

(2) CD の病因・病態に epigenetics 制御が関与：疾患病因・病態に影響を与える因子として genetic factor 以外に、epigenetics factor が注目を集めている。特に癌におけるがん抑制遺伝子の不活化に epigenetics 制御が関与することが多数報告されている。機器の進歩により DNA methylation の定量が可能となったことで、自己免疫疾患における epigenetics 制御の影響が報告されるようになってきた。特に SLE では、ヒト疾患においても、動物モデルにおいてもリンパ球における広範な或いは特異的な遺伝子における脱メチル化が、発症・病態に関与していることが明らかとなっている。日本人 CD においては、環境の欧米化にとともに、ここ 30 年間でその有病率は約 30 倍となり、環境因子と遺伝因子との相互作用すなわち epigenetics 制御に注目が集まっている。また前述した CD 感受性遺伝子の中に、DNA メチル基転移酵素 (DNMT3A) が入っており、CD の発症に DNA メチル化異常が関連していることが推測されている。

(3) CD の病態で epigenetics 制御が関与しそうな病態とは：そこで、炎症性腸疾患においても epigenetic (主に DNA methylation) な変化が、遺伝子発現に影響を与えることで、病因・病態に関与しないかどうか検討したいと考えた。epigenetics 制御による修飾が想定される現象の特徴としては、1) 後天的に獲得された CD に特異的な現象で、2) その現象は、細胞分裂を経ても長期に維持される、という 2 点が挙げられる。これらに合致した現象として、CD の炎症粘膜における Lamina propria T cell (LPT) におけるアポトーシス抵抗性が挙げられる¹⁾。CD 炎症部の LPT は、培養を継代していてもアポトーシス抵抗性は維持され、LPT の BAX 発現低下が特徴である。このことは、後天的に獲得され、獲得後はその表現型は長く継続されるという、epigenetics 制御の特徴に一致する変化である。

(4) LPT のアポトーシスは治療反応性に直結：epigenetics 制御による修飾が想定される現象として、LPT アポトーシス抵抗性を挙げたが、LPT アポトーシスは臨床的に非常に重要な現象である。CD の代表的な寛解導入薬であるグルココルチコイド、抗 TNF α 製剤は LPT のアポトーシスを誘導することが治療効果発現メカニズムであり、LPT のアポトーシス抵抗性の出現により、治療抵抗性となることが既に知られている。

2. 研究の目的

本研究では、CD と潰瘍性大腸炎 (UC) の病態に重要な役割を担っている腸管局所の CD4+ effector memory T cell (Tem) を対象に、DNA メチル化の CD と UC における差異を明らかにし、さらに CD と UC の Tem におけるアポトーシス感受性の差が、エピゲノム制御 (特に DNA メチル化) により調節を受けている可能性を示すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 対象

東北大学病院胃腸外科にて手術を施行した活動期 CD13 例、活動期 UC 5 例 (対照者群) を対象とした。CD、UC の診断は臨床症状、内視鏡所見、X 線写真所見、組織所見を基にそれぞれクローン病の診断基準案 (2012)、潰瘍性大腸炎の診断基準案 (2012) に従った。対象は全員日本人である。この研究は、科学技術会議「ヒトゲノム研究に関する基本原則」、厚生労働省「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応する指針」及び文部科学省「大学等における遺伝子解析研究に関わる倫理問題への対応について」に基づいて施行され、東北大学医学部倫理委員会の承認 (倫理承認番号：2013-1-185) のもと、遺伝子解析である旨を対象者に説明し文書で同意を得た上で行った。

(2) 粘膜固有層単核球細胞 (lamina propria mononuclear cells; LPMCs) の分離

手術により摘出した小腸もしくは大腸から、Fiocchi C.らの方法により LPMCs を分離した。

(3) Tem の分離

CD4+ Effector Memory T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を使用して、negative magnetic activated cell sorting (MACS) (Miltenyi Biotec) にて、LPMCs から腸管局所の Tem を分離した。分離過程で APC 標識抗 CD197 (CCR7) (Miltenyi Biotec) モノクローナル抗体はすでに標識されており、追加で FITC 標識抗 CD4 モノクローナル抗体 (Miltenyi Biotec) と PE 標識抗 CD45RO モノクローナル抗体 (Miltenyi Biotec) で標識した後に Tem の純度の確認を、フローサイトメトリー

(FACS) (BD Biosciences) にて行った。

(4) Tem の培養と刺激、DNA/RNA の抽出
Tem を 1×10^6 個/ml に調製し、T 細胞の活性化と増殖に Dynabeads Human-T-Activator CD3/CD28 (Life Technologies) を使用し、5%CO₂ 存在下 37 °C の湿式インキュベーターで培養した。培養 5 日目に細胞を回収した。DNA/RNA の抽出には、AllPrep DNA/RNA Mini (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて、細胞から DNA および total RNA を抽出した。

(5) 網羅的 DNA メチル化プロファイリングとバイオインフォマティクス

網羅的な DNA メチル化解析には、Illumina 450K (Illumina) を使用した。DNA メチル化解析に関して、CD の Tem 13 サンプル (比較群) と UC の Tem 5 サンプル (対照群) で比較検討を行った。メチル化に差を認めたプロンプの遺伝子に関して、DAVID bioinformatics database (version 6.7) を使用して gene ontology (GO) 解析と KEGG PATHWAY 解析を、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Qiagen) を使用して Canonical Pathway 解析を行った。

(6) 5-aza-2'-deoxycytidine による Tem の脱メチル化

脱メチル化剤として 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA) (Sigma-Aldrich) を phosphate buffered saline (PBS) (Wako) に溶解して使用した。培養 7 日目、9 日目に、5-AZA を 0.5 μ M の終濃度で培養液に添加し、培養 11 日目に細胞を回収した。

(7) Annexin V アッセイによるアポトーシス解析

CD、UC の Tem と脱メチル化剤処理後の CD の Tem に、アポトーシス誘導剤として抗 Fas モノクローナル抗体/CD95 (CH11) (MBL, Nagoya, Japan) 0.5 μ g/ml を負荷後、0 時間、4 時間、8 時間、12 時間後で、それぞれの細胞を回収した。次に、Annexin V Assay Kits (MBL) を用いて、Annexin V (AV) と propidium iodide (PI) で陽性となった細胞数を、FACSCanto (BD Biosciences) フローサイトメーターを用いて計測し、FlowJo ソフトウェア (BD Biosciences) を用いてデータの解析を行った。

4. 研究成果

(1) Illumina 450K による DNA メチル化の CD と UC での比較検討

DNA メチル化頻度に差を認めた遺伝子は 2,169 あり、その中で CD の方が高メチル化を示した遺伝子は 1,450 (66.8%)、低メチル化を示した遺伝子は 719 (33.1%)であった。

(2) GO 解析

DAVID software を使用して、GO 解析を行った。その結果 1) cell activation (GO:0001775)、leukocyte activation (GO:0045321)、lymphocyte activation (GO:0046649)、T cell activation (GO:0042110) などの細胞の activation に関わる GO Term、2) immune response (GO:0006955)、positive regulation of immune system process (GO:0002684) などの免疫反応に関わる GO Term、3) leukocyte differentiation (GO:0002521)、T cell differentiation (GO:0030217) などの細胞の分化に関わる遺伝子、4) apoptosis (GO:0006915)、programmed cell death (GO:0012501)、positive regulation of apoptosis (GO:0043065) などのアポトーシスに関わる GO Term が抽出された。

(3) Pathway 解析

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) PATHWAY を利用すると、natural killer cell mediated cytotoxicity、T cell receptor signaling pathway、chemokine signaling pathway、regulation of actin cytoskeleton、endocytosis、cell adhesion molecules (CAMs)、cytokine-cytokine receptor interaction に関する pathway が抽出されてきた。

Pathway 解析として IPA を利用した Canonical Pathways 解析を行うと、T cell receptor signaling、iCOS-iCOSL signaling in T helper cells、T helper cell differentiation、death receptor signaling、CD28 signaling in T helper cells、CTLA4 signaling in cytotoxic T lymphocytes、natural killer cell signaling、IL-2 signaling に関する pathway が抽出されてきた。

(4) 脱メチル化剤によるアポトーシス抵抗性解除

CD と UC 由来の Tem のアポトーシス感受性を評価するために、CH11 を負荷し誘導されるアポトーシス細胞数を計測した。3 回の平均でみると、UC から精製された Tem は、0 時間、4 時間、8 時間ではアポトーシス細胞はそれぞれ 11%、37%、72%であったのに対して、CD から精製された Tem は、それぞれ 13%、23%、57% であり、UC と比較してアポトーシス細胞の比率は減少していた ($p < 0.005$ Student-t 検定)。この結果より、CD の Tem は、UC と比較してアポトーシス抵抗性であることが確認された。

CD の Tem のアポトーシス抵抗性とエピゲノム制御との関連を示すために、脱メチル化剤である 5-AZA を投与して脱メチル化を誘導し、アポトーシス抵抗性について検討した。3 回の平均でみると、脱メチル化剤を投与された CD 由来の Tem は、0 時間、4 時間、8 時間でのアポトーシス細胞はそれぞれ 11%、42%、81% であり、脱メチル化の誘導により

アポトーシス抵抗性が解除されることが示された

(5) 考察

本研究の網羅的な DNA メチル化比較解析により、CD と UC の Tem における DNA メチル化の差異について明らかにし、その差異を示した遺伝子リストをもとに、特徴的な生物学的プロセスやシグナル経路を抽出した。さらに抽出された生物学的プロセスのひとつであるアポトーシス関連遺伝子群の DNA メチル化とアポトーシス感受性との関連を示した。

<引用文献>

Ina KI, Itoh J, Fukushima K et al. Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. J Immunol 1999. 163:1081-90.

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)

[学会発表](計 1 件)

Katsunori Matsushita, Yoichi Kakuta, Yoshitaka Kinouchi, Kenichi Negoro, Katsuya Endo, Hisashi Shiga, Tooru Shimosegawa. DNA methylation profiles of CD4+ effector memory T cell show distinct differences between Crohn's disease and ulcerative colitis. Digestive Disease Week 2015, 18 May 2015 Washington (USA).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

志賀 永嗣 (SHIGA, Hisashi)

東北大学・大学病院・特任助手

研究者番号：20583355