

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460965

研究課題名(和文)炎症性腸疾患の免疫応答異常とエピゲノム機構

研究課題名(英文)Epigenetic dysregulation of immune responses in inflammatory bowel disease

## 研究代表者

河村 由紀 (Kawamura, Yuki I.)

国立研究開発法人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・消化器病態生理研究室長

研究者番号：10392391

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎、クローン病)は近年著しい増加傾向にある若年発症の慢性疾患で、消化管局所の免疫応答異常を特徴とする。本研究ではエピゲノムの視点から炎症の重症化機構の解明を目指した。炎症局所より分離した少数の細胞を用いてクロマチン免疫沈降(ChIP)を行う条件を確立し、ヒストンメチル化修飾(H3K4me3、H3K9me3、およびH3K27me3)を次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析した。バイオインフォマティクス解析の結果、炎症細胞において疾患特異的異常を見出した。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory bowel disease (IBD), including ulcerative colitis and Crohn's disease, are characterized by relapsing/remitting nature of the inflammatory process. The aim of this study was to find out key epigenetic alterations in IBD. We established the methods for epigenomic analysis for small number of isolated cells from patients with IBD. Immune cells isolated from lamina propria mononuclear cells were subjected to a chromatin immunoprecipitation (ChIP) with anti-H3K4me3, anti-H3K9me3 and anti-H3K27me3 antibodies, and ChIPed DNA was analyzed by the next generation sequencer system. Bioinformatic analysis identified the IBD-specific epigenetic dysregulation in immune cells.

研究分野：消化管免疫学

キーワード：炎症性腸疾患 エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患(クローン病および潰瘍性大腸炎)は近年著しい増加傾向にある慢性炎症性疾患である。消化管局所の免疫応答異常を特徴とし、長期にわたり再燃と寛解を繰り返すが、根治療法がないため、炎症が制御不能に陥る重症化症例が出現する。

消化管は食餌や病原体等外界からの刺激に常に曝されているにもかかわらず、通常状態では炎症応答は起きない。このような特殊な環境下における恒常性を維持するために、消化管には特有な免疫抑制機構が存在すること、また炎症性腸疾患症例では免疫抑制機構の破綻が見られることを申請者はこれまでに報告してきた。炎症性腸疾患の発症には疾患感受性遺伝子による遺伝的素因と、食事や生活環境等の環境因子の双方が関与していると考えられている。食事内容や喫煙などの環境因子は、DNAメチル化や種々のヒストン修飾等のエピジェネティック変化を引き起こし、遺伝子発現に変化を及ぼすことが知られており、食事や生活習慣の欧米化に伴う環境要因の変化が、エピジェネティック機構を介して近年の急激な炎症性腸疾患患者数の増加に寄与している可能性が考えられたが、その発症・遷延化との関連について詳細は不明であった。

## 2. 研究の目的

炎症性腸疾患の炎症局所でみられるエピゲノム異常の網羅的探索により、環境要因によるエピジェネティック修飾の蓄積から疾患の発症・遷延化に至る機構を明らかにすることで、分子基盤に基づいた疾患の慢性化・重篤化の予測法ならびに予防法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 炎症性腸疾患組織由来マクロファージ/樹状細胞およびCD3<sup>+</sup>T細胞の網羅的エピゲノム解析: 正常大腸粘膜および炎症性腸疾患組織より、マクロファージ/樹状細胞画分およびT細胞画分をセルソーターMoFloを用いて分離する。各細胞群におけるエピゲノム変化を抗ヒストンメチル化(H3K4me3, H3K9me3 and H3K27me3)抗体を用いたクロマチン免疫沈降(ChIP)法により、次世代シーケンサーSOLiDを用いて網羅的に解析する。各々のエピジェネティック修飾は相互に関連して遺伝子発現に影響を及ぼすことが知られているので、それぞれの修飾変化をバイオフィーマティクスにより統合的に解析し、発現プロファイルと比較することで遺伝子発現に影響を及ぼす変化を抽出する。

(2) 炎症性腸疾患でみられるエピゲノム異常の誘因探索:(1)で見出したエピゲノム

異常を引き起こす誘因となる、エピジェネティック修飾関連遺伝子(H3K4me3 writers、H3K9me3 writers、H3K27me3 writes、H3K4me3 erasers、H3K9me3 erasers、H3K27me3 erasers などの)発現を、正常大腸粘膜および炎症性腸疾患組織より分離したマクロファージ/樹状細胞画分およびT細胞画分において調べ、病的なエピジェネティック修飾との関連を明らかにする。

(3)(1)で見出したエピゲノム異常や(2)で見出したその誘因因子が、潰瘍性大腸炎とクローン病の鑑別に有用か否かを評価する。

## 4. 研究成果

(1) 臨床検体を用いた研究においては研究目的に使用できる標本量に制限があり、このことが研究推進のネックになる場合が多々あるが、これまでは1千万~1億細胞は必要とされていた網羅的エピゲノム解析のためのChIP法を施行する際の条件を詳細に検討することにより、10万個以下の非常に少数の細胞で遂行可能となった。炎症性腸疾患(クローン病、潰瘍性大腸炎)および対象として正常大腸粘膜より分離したマクロファージ/樹状細胞およびT細胞を、申請者らが確立したスモールスケールChIP法に適した条件で固定後、抗ヒストンメチル化抗体を用いたChIP法を行い、得られたDNAから作製したライブラリーを次世代シーケンサーを用いた網羅的シーケンスにより解析した。また同一検体より抽出したRNAを用い、serial analysis of gene expression(SAGE)-seq法によるトランスクリプトーム解析を施行した。各々のエピジェネティック修飾の網羅的プロファイル、遺伝子発現の網羅的プロファイルをバイオフィーマティクス手法を用いて統合解析した結果、潰瘍性大腸炎ではプロモーター領域においてH3K4me3またはH3K27me3修飾を受ける遺伝子数が顕著に増加していた。特に、マクロファージ/樹状細胞において、H3K4me3とH3K27me3両方の修飾をプロモーター部に有する遺伝子数の増加が著名であり、H3K4me3(活性化マーカー)+H3K27me3(発現抑制マーカー)のいわゆる二価修飾と疾患の関連を見出した。疾患特異的H3K4me3+H3K27me3二価修飾と遺伝子発現変化とは関連しなかったことから、潰瘍性大腸炎では特定の遺伝子の発現制御領域にエピゲノム異常が生じるといふより、エピジェネティック修飾機構そのものが病的であると考えられた。

(2) エピジェネティック修飾関連遺伝子の発現を、次世代簡易シーケンサーIon Protonを用いたAmpli-seq法を用いて測定する系を確立した。潰瘍性大腸炎においては、H3K4me3 writers、H3K27me3 writesの発

現亢進と、一部の H3K27me3 erasers の発現低下が顕著であり、これらが疾患に関連する病的エピジェネティック修飾機構の原因と考えられた。

(3)(2) で確立した Ampli-seq 法を用いて、クローン病におけるエピジェネティック修飾関連遺伝子の発現を検討した。(2) で得られた正常と潰瘍性大腸炎の発現プロファイルと比較し、両者の間で発現が有意に異なる遺伝子を抽出した。正常と潰瘍性大腸炎で発現が有意に異なる遺伝子の発現プロファイルを用い、潰瘍性大腸炎とクローン病のクラスター解析を行ったが、両者に違いは認められず、潰瘍性大腸炎とクローン病の鑑別は不可能であった。

#### 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3件)

Kudo F, Ikutani M, Seki Y, Otsubo T, Kawamura YI, Dohi T, Oshima K, Hattori M, Nakae S, Takatsu K, Takaki S, Interferon- constrains cytokine production of group 2 innate lymphoid cells, *Immunology*, 147(1), 21-29, 2016、査読有

Otsubo T, Okamura T, Hagiwara T, Ishizaka Y, Dohi T, Kawamura YI, Retrotransposition of long interspersed nucleotide elements-1 is associated with colitis but not tumors in a murine colitis cancer model, *PLoS One*, 10(2), e0116072, 2015、査読有

Obata Y, Furusawa Y, Endo TA, Sharif J, Takahashi D, Atarashi K, Nakayama M, Onawa S, Fujimura Y, Takahashi M, Ikawa T, Otsubo T, Kawamura YI, Dohi T, Tajima S, Masumoto H, Ohara O, Honda K, Hori S, Ohno H, Koseki H, Hase K, The eoigenetic regulator Uhrf1 facilitates the proliferation and maturation of colonic regulatory T cells, *Nature Immunology*, 15(6), 571-579, 2014、査読有

[学会発表](計4件)

河村由紀、大坪武史、大島健志朗、豊田哲郎、萩原輝記、河村裕、小西文雄、矢野秀朗、斉藤幸夫、服部正平、土肥多恵子、潰瘍性大腸炎における粘膜固有層免疫細胞のエピゲノム異常、日本消化器免

疫学会総会、2015年、口演(シンポジウム)

河村由紀、消化器疾患で見られる糖鎖異常とエピジェネティックな遺伝子サイレンシング、日本糖質学会年会、2015年、招待講演

Kawamura YI, Maeyashiki C, Hagiwara T, Otsubo T, Akiyama J, Dohi T, Sialic-acid-binding Ig-like lectins, potential peripheral markers for mucosal damage of inflammatory bowel disease、欧州消化器免疫病週間年会、2014年、示説

大坪武史、河村由紀、土肥多恵子、Cell type-specific, genome-wide epigenetic analysis for lamina propria cells isolated from the colon with ulcerative colitis、日本免疫学会総会、2014年、口演

[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  
なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

河村 由紀 (KAWAMURA I. YUKI)  
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  
消化器病態生理研究室長  
研究者番号：10392391

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者  
なし