

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293180

研究課題名(和文)全ゲノム・エピゲノム解析を用いた炎症性腸疾患の包括的解析および治療戦略の確立

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of inflammatory bowel disease using by genome-wide genetic and epigenetic association studies

研究代表者

山崎 慶子 (YAMAZAKI, Keiko)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：50415329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究計画はゲノム・エピゲノム両分野から炎症性腸疾患の病態を解明することを目的とする。癌を除く多因子疾患では大規模エピゲノム解析の構築が難しいことから、炎症性腸疾患の治療薬である抗TNF抗体製剤の薬剤応答性に着目した。同薬の新規導入患者から継続的に検体を収集し、全ゲノムバイセーラルファイトシークエンスを含むメチル化解析のアッセイ系を検討した。また国際共同研究を行い、多人種間全ゲノム関連解析を行った。欧米と東アジア集団間で多くの炎症性腸疾患関連領域は共通していること、遺伝子多型のアレル頻度や影響の強さであるオッズ比が人種間で異なることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project is to clarify the pathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD) using by analysis of genome-wide genetic and epigenetic association. Since it is difficult to design using whole-genome epigenetic analysis for multifactorial disease except cancer, we focus the response of anti TNF- $\alpha$  monoclonal antibody in IBD. We have rescruted patients with IBD who were treated with anti TNF- $\alpha$  antibody for the first time and examined methylation assays including whole-genome bisulfite sequencing.

Furthermore, we collaborated with the International IBD Genetics Consortium and conducted transancestry association study of IBD. Our trans-ethnic genome-wide association study clarified that the direction and magnitude of effect are consistent in European and non-European cohorts in spite of the genetic heterogeneity between divergent populations at several established risk loci driven by differences in allele frequency or effect size.

研究分野：疾患遺伝学

キーワード：炎症性腸疾患 全ゲノム関連解析 薬剤応答性

### 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease; IBD) はクローン病 (Crohn's disease; CD)、潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis; UC) に分類される難治性疾患である。IBD は多因子疾患の中でも遺伝的因子が強く関与することから、全ゲノム関連解析 (genome-wide association study; GWAS) をはじめとする遺伝学的研究が欧米を中心に行われている。2011年にイムノチップを用いた大規模解析が行われ、163のIBD関連領域が報告された。しかし疾患説明分散はCD 13.6%、UC 7.5%に過ぎず、"missing heritability(失われた遺伝率)"の問題は残されている<sup>①</sup>。IBDの遺伝学的背景の解明には頻度の低い変異やエピゲノムなどの複合的な解析が必要である。中でもエピジェネティックな変化は遺伝子発現量の調節や環境要因との相互作用を示すことから、注目されている。しかし癌以外の多因子疾患では、適切なスタディデザインが確立しておらず、めざましい成果は得られていない。

そこで申請者は大規模エピゲノム解析の先駆けとして、前向きコホートを用いた解析を計画した。現在、IBD治療薬として抗TNF $\alpha$ モノクローナル抗体製剤(インフリキシマブやアダリムマブ)が広く用いられ、卓越した臨床効果を示している。その一方で初回投与に反応しない症例(一次無効)や、繰り返し投与による投与時反応の増悪、臨床効果の減弱(二次無効)が問題となっている。血中の抗TNF $\alpha$ 抗体製剤濃度が下がると二次無効をおこしやすい<sup>②</sup>ため、緩解維持必要量をモニターできる薬剤反応性マーカーが望まれている。本研究計画では抗TNF $\alpha$ 抗体製材新規導入患者の投与前、および同薬投与時(6か月ごと)に採血を行い、エピゲノム・発現解析を行う。同一個人内で比較を行うことで投薬によるエピゲノム変化領域の同定が可能である。

また、申請者らは欧米より報告されているIBD関連領域と日本人集団の関連を検討を行い、アジアと欧米間でCDの遺伝的背景に人種差があることを明らかにしてきた<sup>③④</sup>。日本以外のアジア諸国でもIBD患者数は増加傾向であり、今後のアジア諸国IBD患者を対象とした研究が必要不可欠である。アジア諸国のIBD有病率は欧米に比べて低く、同等の検体収集は不可能である。しかしアジア人IBD関連領域数は少なく、遺伝的寄与率の高い未同定領域があると考えられる。CD、UCともにimputation(ジェノタイプの推測)を用いた候補領域を選出しており、追加検体を用いた検討を行い新たな関連領域を同定する。

### 2. 研究の目的

IBDはCDとUCに分類される難治性疾患であり、病態は不明なところが多い。近年開発された抗TNF $\alpha$ 抗体製剤はIBDに卓越した治療効果を持つ一方、薬効や不適応性等に

個人差があり、オーダーメイド医療の確立が求められている。

我々はGWASを用いて、IBD関連遺伝子を同定してきた。本研究では従来法に加え、次世代シーケンサーを用いた全ゲノムエピゲノム解析を行い、薬剤応答性関連マーカーを探索する。両解析を比較することで、環境要因と遺伝的要因の相互作用を含めた包括的検討を行い、IBDの病態解明、オーダーメイド医療確立へと繋げる。

### 3. 研究の方法

本研究ではゲノム・エピゲノム両分野を用いた包括的IBD病態解明を目的とする。遺伝的要因の探索には一塩基多型(single nucleotide polymorphism; SNP)を用いたGWASを主軸とする。エピゲノムは全ゲノムバイサルファイトシーケンス法(whole-genome bisulfite sequencing; WGBS)を施行し、遺伝・環境要因を探索する。

(1) 新規抗TNF $\alpha$ モノクローナル抗体製剤導入患者検体を用いた前向き研究

**A. 患者の臨床診断および治療効果の判定:** 研究分担者の所属機関である東邦大学、九州大学、札幌厚生病院と連携し、前向きに調査する。文書にて同意を得られた抗TNF $\alpha$ 抗体製剤新規導入患者の治療開始前および6ヶ月毎に採血し、最大36ヶ月間フォローする。一次・二次無効例と判定された症例は、判断時採血を行い、追跡終了とする。採血検体より、ゲノム・エピゲノム解析用ゲノム検体、血中抗TNF $\alpha$ 抗体濃度測定のための血清、発現解析のためのRNAを抽出する。個人情報保護には最新の注意をし、匿名記号化を行い、臨床情報を取得する。

**B. ゲノム・エピゲノム関連領域の同定:** Aにて得られた検体でWGBSを行うための条件検討を行う。PBAT法(Post-Bisulfite Adaptor Tagging<sup>⑤</sup>)にて作成したテストライブラリーの調整、データ取得のほか、解析方法、HiSeq2500のラン条件を検討した。また、精度を保証するシーケンス深度の検討やメチル化率を比較するため、同一検体をイルミナ社 Human Methylation450k BeadChipを用いて、検討した。

(2) 推測(imputation)ジェノタイプを用いた新規IBD関連領域同定

報告済みのGWAS(CD 372名、UC 371名、対照群 3,321名)<sup>⑥⑦</sup>から推定(imputation)ジェノタイプを算出し、GWASを行った。

また、「国際IBDジェネティクス・コンソーシアム」に参加し、多人種間GWAS(trans-ethnic GWAS)を行った。同検討は欧米人集団(CD 5,956名、UC 6,968名、対照群 21,770名)を用いたGWASを行い、同定された関連遺伝子をイムノチップを用いて追試した。追試には欧米人集団(CD 14,594名、UC 10,679

名、対照群 26,715 名)と非欧米人集団(CD 2,025 名、UC 2,770 名、対照群 5,051 名)が用いられ、日本人検体は CD 1,312 名、UC 724 名、対照群 3,331 名であり、非欧米人集団の中でもっとも多かった。

#### 4. 研究成果

(1) 新規抗 TNF $\alpha$ モノクローナル抗体製剤導入患者検体を用いた前向き研究

**A. 患者の臨床診断および治療効果の判定:** 抗 TNF $\alpha$ モノクローナル抗体製剤の新規導入患者数が少ないことが本研究遂行の妨げになっていた。原因として IBD の患者数が少なく、患者の多くがすでに導入済みであること、またエントリー患者の転居等により追跡不可能な事例が生じたことが挙げられる。また課題期間中に 2 年を超える長期寛解群を収集が時間的に難しい点も問題であった。

予想を下回ったものの、本研究期間に 137 検体(11 名)を九州大学・大阪大学より提供を受け、長期寛解群の判定が可能となった。

**B. ゲノム・エピゲノム関連領域の同定:** WGBS ライブラリーを調整し、複数回ランを行い、各ラン毎のデータを比較した。深度 10 以上のデータでは各ランごとにばらつきが出るが、深度 20 以上のデータはほぼ一致したことから、必要なデータ量は深度 20 以上と結論した(データ非公開)。また、同じライブラリーを複数レーン流して取得データ量を増やしても全ゲノムをカバーすることはできない一方で、マッピングされない領域はサンプルリポート領域に集中していることが得られた結果からわかった(データ非公開)。また、Human Methylation450 と比較したところ、メチル化率が 0%、100%付近で WGBS のデータと乖離することがわかった(データ非公開)。以上から、本試験は標的バイサルファイトシーケンスを用いることを検討している。

(2) 推測(imputation)ジェノタイプを用いた新規 IBD 関連領域同定

GWAS データを元に imputation(ジェノタイプの推測)を行い、新たな IBD 関連領域の探索をした(*J Gastroenterol.* 51:672-681)。候補領域を別検体を用いて検証し、*ATG16L2-FCHSD2*(染色体 11q13)、*SLC25A15-ELF1-WBP4*(染色体 13q14)が関連領域であることがわかった。また欧米の大規模メタ解析により報告された 163 SNP と日本人検体の関連を検証した。その結果、日本人集団の発症にはオートファジー関連遺伝子よりも *IL23R-Th17* 経路が強く関連を示すことがわかった。

「国際 IBD ジェネティクス・コンソーシアムに参加し、複数の人種を対象とした GWAS(trans-ethnic GWAS)を行い、炎症性腸疾患の発症に関わるゲノム領域を新たに 38 カ所発見した(*Nat Genet.* 47:979-86)。38 カ所のゲノム領域には、自食作用(オートファ

ジー)や細菌やウイルスなどの侵入を防ぐ腸管上皮バリア、免疫細胞の 1 つである T 細胞の応答性など、炎症性腸疾患発症のメカニズムを知る上で重要な遺伝子が多数含まれていた。また、遺伝子多型のアレル頻度や影響の強さであるオッズ比が人種ごとに異なっても、炎症性腸疾患の発症に関わるゲノム領域は欧米人と非欧米人で共通していることが分かった(図 参照)

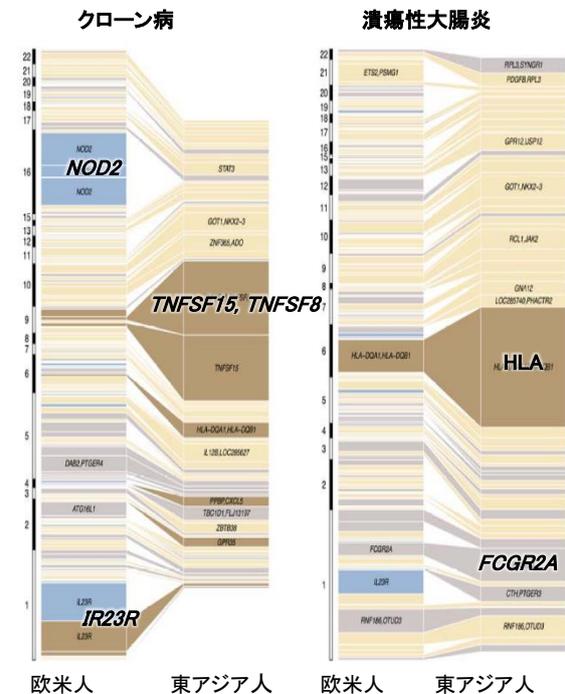


図 CD と UC の発症に関わる遺伝的影響を人種間で比較

また、糖鎖関連遺伝子が IBD に与える影響を調べるため、GWAS の結果から *MAN2A1* を候補遺伝子として選択した。デキストランサルフェートによる大腸炎モデルで、腸管上皮細胞特異的に *MAN2A1* 欠損マウスが大腸炎抵抗性を示した(*Cell Struct Funct.* 43:25-39)。GWAS の結果を利用することで、新たな腸炎のモデルマウスを開拓できることを示した。

#### <引用文献>

- ① Jostins et al. *Nature* (2012) 491:119-124
- ② Hibi et al. *Inflamm Bowel Dis* (2012) 18:1480-7
- ③ Yamazaki et al. *Gut* (2009) 58:228-32
- ④ Hirano et al. *Inflamm Bowel Dis* (2013) 19:526-33
- ⑤ Miura et al. *Nucleic Acids Res* (2012) 40:e136.
- ⑥ Asano et al. *Nat Genet* (2009) 41:1325-9
- ⑦ Yamazaki et al. *Gastroenterology* (2013) 144:781-8

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件) [すべて査読あり]

- ① Suzuki K, Yamada T, Yamazaki K *et al.* (計 9 名) "Intestinal Epithelial Cell-specific Deletion of  $\alpha$ -Mannosidase II Ameliorates Experimental Colitis" *Cell Struct Funct.* (2018) 43:25-39, DOI: 10.1247/csf.17022
- ② Gupta A, Juyal G, Sood A *et al.* (計 9 名 研究代表者 5 番目, 分担研究者 7 番目) "A cross-ethnic survey of *CFB* and *SLC44A4*, Indian ulcerative colitis GWAS hits, underscores their potential role in disease susceptibility" *Eur J Hum Genet.* (2016) 25:111-122, DOI: 10.1038/ejhg.2016.131
- ③ Fuyuno Y, Yamazaki K, Takahashi A *et al.* (計 14 名 研究代表者 2 番目, 分担研究者 4・11 番目) "Genetic characteristics of inflammatory bowel disease in a Japanese population" *J Gastroenterol.* (2015) 51:672-681, 査読あり, DOI: 10.1007/s00535-015-1135-3
- ④ Liu JZ, van Sommeren S, Huang H *et al.* (計 43 名 研究代表者 31 番目) "Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations" *Nat Genet.* (2015) 47:979-86, 査読あり, DOI: 10.1038/ng.3359
- ⑤ Aiba Y, Yamazaki K, Nishida N *et al.* (計 19 名 研究代表者 2 番目, 分担研究者 12・15 名) "Disease susceptibility genes shared by primary biliary cirrhosis and Crohn's disease in the Japanese population" *J Hum Genet.* (2015) 60:525-31, 査読あり, DOI:10.1038/jhg.2015.59

[学会発表] (計 2 件)

- ① Yamazaki K *et al.* (計 16 名 研究代表者 1 番目, 分担研究者 6・12 番目) "Whole-genome imputation identified 3 suggestive loci for inflammatory bowel disease in a Japanese population" The American Society of Human Genetics 61th Annual Meeting (2014)
- ② 山崎 慶子 "炎症性腸疾患関連遺伝子解明の現状と将来展望" 第 6 回 日本炎症性腸疾患研究会学術集会 (2014)

[その他]

- 研究成果「炎症性腸疾患の発症に関わる 38 カ所のゲノム領域を発見」(Nat Genet. (2015) 47:979-86) [http://www.riken.jp/pr/press/2015/20150721\\_1/](http://www.riken.jp/pr/press/2015/20150721_1/)
- 山崎 慶子、梅野 淳嗣、江崎 幹宏 (計 7 名 研究代表者 1 番目, 分担研究者 2・3・5 番目) "全ゲノム・エピゲノム解析を用いた炎症性腸疾患の包括的解析および治療戦略の確立" 厚生労働科学研究 難治性疾患克服研究事業「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」平成 26 年度第 2 回総会 (2015)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 慶子 (Yamazaki, Keiko)

日本大学・医学部・助教

研究者番号: 5 0 4 1 5 3 2 9

(平成 28 年度まで独立行政法人理化学研究所・多型解析技術開発チーム・研究員)

(2) 研究分担者

① 鈴木 康夫 (SUZUKI, Yasuo)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号: 4 0 2 6 1 9 1 1

② 江崎 幹宏 (ESAKI, Motohiro)

九州大学・大学病院・講師

研究員番号: 5 0 3 3 5 9 5 7

③ 梅野 淳嗣 (UMENO, Jyunji)

九州大学・大学病院・助教

研究員番号: 7 0 6 2 1 7 0 4

④ ロー シューキー (LOW, Siewkee)

独立行政法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員

研究者番号: 4 0 6 3 4 7 2 0

(平成 27 年度より転出)

(3) 研究協力者

本谷 聡 (MOTOYA, Satoshi)

冬野 雄太 (FUYUNO, Yuta)