

## 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24年4月28日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890019

研究課題名（和文）潰瘍性大腸炎感受性遺伝子NKX2.3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）Functional analysis of SNPs associated with ulcerative colitis in the NKX2.3 gene.

研究代表者

志賀 永嗣 (Shiga Hisashi)

東北大学・病院・医員

研究者番号：20583355

研究成果の概要（和文）：炎症性腸疾患を対象とした Genome wide association study (GWAS) のメタ解析によって、NKX2.3 が潰瘍性大腸炎感受性遺伝子候補であることが示された。NKX2.3 が感受性遺伝子であることを確定するために①NKX2.3 遺伝子領域の Tag SNP を用いて、日本人潰瘍性大腸炎と相関するハプロタイプを同定した。②同定したリスクハプロタイプは、潰瘍性大腸炎炎症局所において非リスクハプロタイプと比較し高発現していることが確認された。③NKX2.3 は少なくとも、血管内皮培養細胞にて発現していた。

研究成果の概要（英文）：NKX2.3 is a promising candidate for susceptibility genes to inflammatory bowel disease (IBD). The aim of this study was to perform a candidate gene analysis of NKX2.3 in Japanese IBD and to examine how the risk allele (haplotype) affects susceptibility to IBD using allelic expression ratios of NKX2.3 mRNA in the involved colonic mucosa. Two SNPs (rs10883365 and rs888208) were significantly associated with UC and 1 SNP (rs10883365) was associated with CD. Haplotype B formed by the 3 SNPs demonstrated a significant association with UC. Subgroup analyses indicated that rs10883365 was significantly associated mainly with colonic CD. The allelic expression ratios of NKX2.3 mRNA transcribed from haplotype B (risk haplotype) to haplotype A (non-risk haplotype) in the involved mucosa from 10 IBD patients were significantly higher than the allelic ratio of respective genomic DNA. We confirmed the association of SNP rs10883365 located in the 5' flanking region of NKX2-3 with Japanese UC and colonic CD and determined the risk haplotype (haplotype B) for UC. The demonstrated allelic expression imbalance supports the idea that the risk haplotype of NKX2.3 confers susceptibility to UC through increasing expression of NKX2.3 mRNA in the colonic mucosa.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2011年度	1,130,000	339,000	1,469,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

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：潰瘍性大腸炎、クローン病、感受性遺伝子、NKX2.3

1. 研究開始当初の背景  
潰瘍性大腸炎は原因不明の慢性大腸炎であ

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。潰瘍性大腸炎を含

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3年間で行われ、本申請者施設からの報告 (Nat Genet, 2009. 41:1325-1329) を含め既に10件以上の論文が報告されている。その結果、現在ゲノムの約32ヶ所に有意に相関する領域が同定されている。(Nat Genet, 2008. 40:955-62) その中でも NKX2.3 遺伝子領域の Tag SNP (rs10883365) は人種を超えて潰瘍性大腸炎との相関が確認され、NKX2.3 が有力な潰瘍性大腸炎の感受性遺伝子候補とされている。なお日本人潰瘍性大腸炎と rs10883365 が相関することも既に報告されている (Inflamm Bowel Dis, 2009 15:918-25)。

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、NKX2.3 にはアミノ酸置換を伴う多型が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。(すなわちこの場合、感受性 SNP は regulatory SNP として働いていることになる)

NKX2.3 は、homeodomain を有する転写因子である。マウスでの検討では脾臓と消化管 (上皮細胞以外) に発現を認め、消化管では特に血管内皮細胞と粘膜下層の平滑筋細胞、一部のリンパ球に発現していることが示されている。NKX2.3 ノックアウトマウス (生後数日で死亡) の解析では、脾臓・小腸におけるリンパ球の数、リンパ球分布異常 (特にパイエル板の形成不全) が指摘されている。また、NKX2.3 ノックアウトマウスでは、消化管血管内皮細胞の MAdCAM-1 の発現が消失していることが確認されている。MAdCAM-1 はリンパ球が発現する接着因子  $\alpha 4 \beta 7$  integrin と結合し、リンパ球の腸管へのホーミングに関わることから、NKX2.3 がリンパ球のホーミングに関与する遺伝子発現の調節をしているのではないかと予想されている。しかし、ヒトにおける発現部位や機能についてはまったく解析されておらず、不明である。

感受性遺伝子である可能性を示唆する所見が揃っている遺伝子であるが、従来の研究手法では感受性遺伝子と確定することは困難と考えられた。最大の要因が、相関した多型 (regulatory SNP) と生物学的効果との関連を明らかにできないことである。その理由の第一として、責任 SNP の cis-acting factor

の効果をみる研究手法に限界があることが挙げられる。NKX2.3 のリスク対立遺伝子が NKX2.3 の発現量に影響を与えていないかどうか検討する場合、通常では野生型ホモ接合体、ヘテロ接合体、変異型ホモ接合体の3群間でその mRNA あるいはタンパク発現量を比較することになる。しかし個体間での trans-acting factor をコントロールすることが困難であり、差が得られても責任 SNP による cis-acting factor による影響なのか、trans-acting factor をコントロールできなかった結果なのか解釈できなかった。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、単一の責任 SNP を同定することは困難であった)

本申請者は、前述2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。(個体間での trans-acting factor のコントロールを可能にした) また対立遺伝子の単位を相関した最小ハプロタイプとし、責任 SNP が同定されていなくても解析可能にした。

## 2. 研究の目的

(1) 日本人潰瘍性大腸炎を対象にして、GWAS で相関を確認された tag-SNP (rs10883365) を中心に、NKX2.3 遺伝子領域の Tag SNP 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 NKX2.3 遺伝子発現に影響を与える細胞種を特定する。(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で解析する。

## 3. 研究の方法

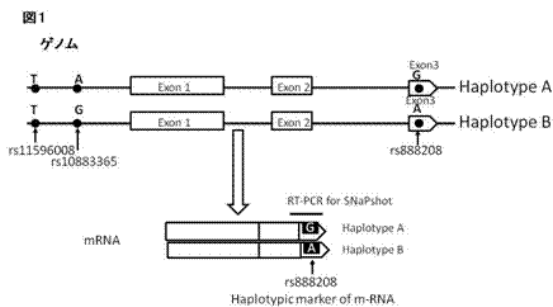
(1) リスクハプロタイプを決定する。対象 SNP は、GWAS で相関が確認されている tag SNP rs10883365 を中心に、前後 30kb から Tag SNP を、Tagger software (Nat Genet, 2005 37: 1217-23) を用いて選び、タイピングを行う。対象は、日本人潰瘍性大腸炎患者 250 名、日本人クローン病患者 350 名、日本人健常対照者 250 名である。タイピング方法は PCR-restriction fragment length polymorphism で行う。統計解析: HAPLOVIEW で、予測ハプ

ロタイプ頻度を算出し、 $\chi^2$  test で相関解析を行う。

(2) 対立遺伝子特異的 mRNA 定量。

①対立遺伝子(リスク・非リスクハプロタイプ)特異的 mRNA 定量法の原理を説明する。日本人にも NKX2.3 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 G/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、G 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、G 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、G 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、その発現比は、G 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。

②対立遺伝子(リスク・非リスクハプロタイプ)特異的 mRNA 定量法の実際(図1)。予備実験にて、日本人 NKX2.3 遺伝子を含む領域には、3つのメジャーハプロタイプ(A, B, C)が存在していることが分かっている。(おそらくハプロタイプ B が、日本人潰瘍性大腸炎リスクハプロタイプで、ハプロタイプ A が非リスクハプロタイプと考えられる)ハプロタイプ B には exon3 に存在する SNP rs888208 の A 対立遺伝子が、ハプロタイプ A には G 対立遺伝子が連鎖している。このことより、mRNA の G 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生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)。



③責任 SNP の同定と多型が発現に影響を与えるメカニズム解析については、プラスミドを用いたプロモーターアッセイによる行う。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 NKX2.3 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。

#### 4. 研究成果

(1) リスクハプロタイプを決定する。NKX2-3 遺伝子上流の SNP(rs10883365) G 対立遺伝子で日本人 UC、CD ともに正の相関が確認された(UC:p=0.00078、オッズ比 1.54、CD:p=0.037、オッズ比 1.29)。他の 2つの SNP に関してもタイピングを行った。そのうち 3' UTR 領域の SNP(rs888208) A 対立遺伝子で、UC との正の相関が認められたが(p=0.0028、オッズ比 1.65)、CD との相関は認められなかった。また、NKX2-3 遺伝子上流の SNP(rs11596008)では UC、CD ともに相関は認められなかった。3つの SNP は連鎖不平衡の関係にあった。Haploview ソフトウェアを用いた解析では日本人 NKX2.3 遺伝子は主要な 3つのハプロタイプ(A, B, C)で構成されており、これらで 99%を占めていた。UC においてはハプロタイプ B がリスクハプロタイプ(p=0.0006、オッズ比 1.56)、ハプロタイプ A が非リスクハプロタイプ(p=0.0093、オッズ比 0.72)であると考えられた。ハプロタイプ C では有意差は認められなかった。

NKX2-3 遺伝子上流の SNP(rs10883365) G 対立遺伝子が UC、CD で正の相関を認めたため、UC、CD 病型別の対立遺伝子頻度について検討した。その結果、UC 病型に関しては HC との比較で左側大腸炎型(p=0.0075、オッズ比 1.62)、全大腸炎型(p=0.014、オッズ比 1.55)で相関が認められたが、病型間に有意差は認められなかった。CD における対立遺伝子頻度は、大腸型 CD が HC 及び大腸型以外の CD (小腸大腸型+小腸型)に比し有意に高かった。3' UTR 領域の SNP(rs888208) A 対立遺伝子では HC との比較で左側大腸炎型 UC で有意差が認められたが(p=0.0070、オッズ比 1.65)、病型間で有意差は認められなかった。

(2) 対立遺伝子特異的 mRNA 定量。

標品での検討では、その標品濃度比対数と測定される対立遺伝子比対数は標品濃度比 0.25~8 倍まで直線性を示し、濃度比の定量が可能な測定系であることを確認した。この方法を用いて UC リスク/非リスクハプロタイプをヘテロ接合体で保有する IBD 患者 10 例(標準サンプル)のゲノム DNA を測定したところ、リスク対立遺伝子濃度測定値/非リスク対立遺伝子濃度測定値は  $0.72 \pm 0.057$  であった(リスクと非リスク対立遺伝子を検出するプローブの蛍光色素が違うため測定値の比は 1 にはならない)。一方、IBD 患者から得

られた直腸粘膜 mRNA のリスク対立遺伝子由来 mRNA 濃度測定値/非リスク対立遺伝子由来 mRNA 濃度測定値は  $1.14 \pm 0.114$  と有意に対応する標準サンプル値より高く ( $p=3.54 \times 10^{-7}$ )、リスク対立遺伝子由来 mRNA 発現優位の allelic expression imbalance の状態にあった。

(3) 責任 SNP の同定と多型が発現に影響を与えるメカニズム解析について。NKX2.3 遺伝子 5' 上流に存在するリスクと非リスクハプロタイプで配列の異なる (SNP) 領域をプロモーターアッセイ用プラスミドに挿入し測定したが、少なくとも上流 6 kb までの範囲では、発現に差が生じる SNP を確認できなかった。

## 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)

①木内喜孝、高橋成一、遠藤克哉、志賀永嗣、下瀬川徹. 炎症性腸疾患の遺伝的要因・疾患感受性遺伝子. 日本臨床 70: 増刊号 2012 1:66-71. 査読無

②木内喜孝、荒井壮、金澤義丈、角田洋一、遠藤克哉、志賀永嗣、高橋成一、下瀬川徹. IBD の遺伝子異常 —GWAS がもたらした病態研究の糸口— Intestine 2011 15: 415-421. 査読無

③Arai T, Kakuta Y, Kinouchi Y, Kimura T, Negoro K, Aihara H, Endo K, Shiga H, Kanazawa Y, Kuroha M, Moroi R, Nagasawa H, Shimodaira Y, Takahashi S, Shimosegawa T. Increased expression of NKX2.3 mRNA transcribed from the risk haplotype for ulcerative colitis in the involved colonic mucosa. Hum Immunol. 2011 Jul;72 (7):587-91. 査読有

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

志賀 永嗣 (SHIGA HISASHI)

東北大学・病院・医員

研究者番号: 2 0 5 8 3 3 5 5