

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10136

研究課題名(和文) DNAメチル化の網羅的解析による潰瘍性大腸炎術後回腸嚢炎発症の機序解明

研究課題名(英文) Comprehensive analyses of DNA methylation for the development of pouchitis after surgery in patients with ulcerative colitis

研究代表者

川村 幹雄 (Kawamura, Mikio)

三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト

研究者番号：00722589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：潰瘍性大腸炎患者に対する大腸全摘・J型回腸嚢肛門吻合術後の回腸嚢炎発症について、手術時回腸粘膜中のInterferon gamma高発現、FK506 binding protein 高発現が術後回腸嚢炎発症の予測マーカーとなりえることを示した。DNAメチル化の解析に関しては、回腸嚢炎発症リスク探索のみならず潰瘍性大腸炎の慢性炎症、発癌リスクの研究に範囲を拡大し、とくに直腸粘膜の複数のmicroRNAの高メチル化が潰瘍性大腸炎関連癌の発症リスクを同定しうる可能性を報告した。

研究成果の概要(英文)：Comprehensive microRNA and mRNA expression patterns related to pouchitis were analyzed using ileal mucosa at the time of colectomy. Interferon gamma and FK506 binding protein mRNA levels in ileal mucosa could be predictive for the onset of pouchitis after surgery. Using epigenomic analysis, we found specific microRNAs to be methylated in rectal mucosal samples from patients with ulcerative colitis associated cancer, and could be used to identify patients with ulcerative colitis at high risk for developing neoplasia.

研究分野：消化器外科

キーワード：回腸嚢炎 潰瘍性大腸炎 DNA methylation

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎(Ulcerative colitis: UC)は主として大腸粘膜を侵し、しばしばびらんや潰瘍を生じる原因不明の大腸のびまん性炎症である。従来我が国の罹患率は欧米に比し低率であったが、近年増加の一途をたどり、年間約5000人が発病し総患者数は12万人を超える。ステロイド、5-ASA、免疫調節薬、生物学的製剤など、内科的治療の進歩により手術に至る症例は以前ほど多くないものの、内科的治療抵抗性、劇症例、癌合併症例に対しては外科治療が選択される。UCの外科治療において大腸全摘、J型回腸囊肛門吻合(Ileal pouch anal anastomosis: IPAA)は現在標準治療としての地位を確立した。しかしながら、術後、回腸囊炎、骨盤内膿瘍などの回腸囊関連合併症により回腸囊としての機能不全に陥り著しく患者の全身状態およびQOLの低下を招くため、これらの回腸囊関連合併症は早急に解決すべきUCの外科治療における大きな問題点である。特に回腸囊炎は手術症例の15-50%に生じ、術後QOLを大きく損なうためUC外科治療において解決すべき問題となっている。しかしながら回腸囊炎の診断においては簡便かつ低侵襲な診断法が存在せず、さらに治療についても、個々の病態に応じた予防法および治療方法の選択について確立された指標が今のところ存在しないのが現状である。

UCの成因として腸内細菌叢と宿主の免疫応答および、食生活を含めた生活環境の欧米化があげられる。これらの変化による慢性炎症はepigenomeの変化によるDNA不安定性をもたらすことが知られる。Epigenomeの変化としてDNA methylation(CpG island methylation)が知られている。近年、UCの成因、重症化、癌化の研究手法としてDNA methylation statusの検討が新知見をもたらすことが示されてきた。一方で回腸囊炎の診断、治療についてはDNA methylationの関与はいまだ明らかではない。

2. 研究の目的

回腸囊炎の発症には宿主と腸内細菌叢の免疫応答、炎症の成立・持続の各過程に多数の促進、抑制因子の関与が予測されるがいまだ未解明な部分が多い。そこで我々はまず回腸囊炎発症の機序解明のため、回腸囊炎発症、重症化に関与する可能性がある獲得性DNA methylation、および同時に不活化される遺伝子を網羅的に解析し、そののちに候補CpG island methylation、候補遺伝子の妥当性を検証することとした。まずCpG island methylation array, DNA arrayにより候補遺伝子、および候補となるCpG island methylationを同定し、回腸囊炎発症におけるbiomarkerを検索する。つぎにこれらの候補について患者から採取した、回腸囊粘膜を用いてmethylation status、関連する

miRNAやmRNAの発現状況を測定する。CpG island methylation, miRNA, mRNAと、患者背景、関連遺伝子の相関を検討することによりその発症、重症化、治療抵抗性のbiomarkerとしての臨床的意義を検証する。またこれらの経時的変化をとらえることで、disease monitorとしての意義を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

回腸囊作成時の回腸囊粘膜、回腸囊発症時の回腸囊粘膜を用いてCpG island methylation arrayならびにmiRNA arrayを施行し、回腸囊炎発症に関わるCpG island methylationと制御されるmiRNA, mRNAを網羅的に解析する。

により同定されたCpG island methylationまたは制御されるmiRNA, mRNAをtargetとし、IPAA後の臨床経過が判明している患者のIPAA時の回腸囊作成時の回腸囊粘膜と回腸囊炎発症時の回腸囊粘膜をpyrosequencingによりmethylation statusを測定、またmiRNA, mRNAの発現状況をreal time PCRで測定し臨床病理学的因子、回腸囊炎発症との関連を検証する。

回腸囊炎発症患者におけるIPAA時の回腸囊粘膜、回腸囊炎時回腸囊粘膜、寛解期回腸囊粘膜を用いて、これらtargetの発現の経時的な変化と、回腸囊炎発症との関連をprospectiveに検討し、disease monitorとして意義を確認する。

4. 研究成果

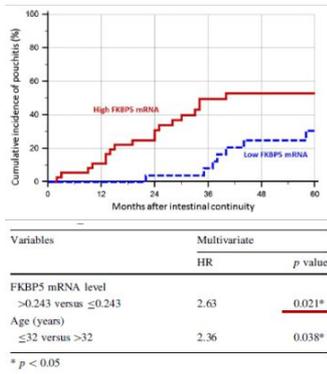
DNAメチル化の網羅的解析とmiRNA網羅的解析を行い、その統合解析では重複する有意な候補miRNAの同定は、困難であったため、まずはmiRNA発現に注目し、回腸囊炎発症群と非発症群のmiRNA網羅的解析をおこなった。

miRNA	MIMAT ID	一群	二群	Ratio(+/-Log2Ratio)	P-value
hsa-miR-1343-3p	MIMAT0019776	78.92753	83.10014	1.179565	0.238255
hsa-miR-4724-5p	MIMAT0019841	6.44964	8.939523	1.38605	0.470979
hsa-miR-6795-5p	MIMAT0027490	48.35097	61.77594	1.277657	0.3535
hsa-miR-3677-5p	MIMAT0019221	6.77096	11.13109	1.643945	0.717162
hsa-miR-3121-3p	MIMAT0014983	9.319121	13.01066	1.396126	0.481429
hsa-miR-8075	MIMAT0031002	7.12761	15.08472	2.116379	1.081598
hsa-miR-8052	MIMAT0030979	51.94166	64.32987	1.238502	0.308597
hsa-miR-139-3p	MIMAT0004552	26.1248	35.76068	1.36884	0.452954
hsa-miR-4713-5p	MIMAT0019820	23.26992	26.83487	1.1532	0.205643
hsa-miR-127-5p	MIMAT0004604	5.013346	7.400315	1.476123	0.561813
hsa-miR-6812-3p	MIMAT0027525	13.43221	18.23152	1.357298	0.440737
hsa-miR-4685-5p	MIMAT0019771	53.26236	64.42307	1.209542	0.274461
hsa-miR-6856-5p	MIMAT0027613	4.120717	11.64568	2.826129	1.498927
hsa-miR-3616-3p	MIMAT0017996	47.06794	59.25701	1.258968	0.332241
hsa-miR-3130-3p	MIMAT0014994	6.248254	11.51325	1.842835	0.88177
hsa-miR-6743-3p	MIMAT0027388	35.52591	45.35984	1.27681	0.352544
hsa-miR-766-5p	MIMAT0022714	8.321034	16.17804	1.944235	0.959202
hsa-miR-4465	MIMAT0018992	31.03725	39.83844	1.283569	0.360161
hsa-miR-6865-3p	MIMAT0027631	20.91777	26.0997	1.247729	0.319304
hsa-miR-4691-5p	MIMAT0019781	17.98288	23.40731	1.301644	0.380335
hsa-miR-1250-5p	MIMAT0005902	9.213221	15.17633	1.647234	0.720046
hsa-miR-6739-5p	MIMAT0027379	8.635131	11.51442	1.333439	0.415152

上記の候補miRNA発現を回腸断端粘膜からRNA抽出をmiRNeasy RNA extraction kit(Qiagen)を用いて行い、Taqman primerとmiRNA RT kit (Invitrogen)を用いて定量的qPCRをおこなったものの、残念ながら有意な結果を得ることができなかった。

しかし本研究に付随して、治療薬タクロリム

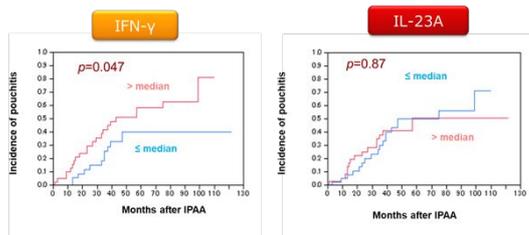
**FK506-binding protein発現による
回腸囊炎発症リスク解析**



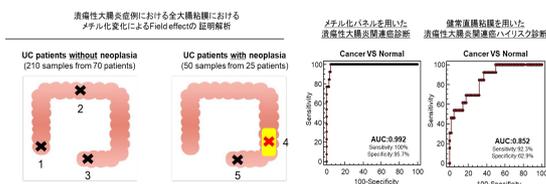
スの結合蛋白である FK506-binding protein の発現解析を miRNA と同様に行うと興味深いことに、回腸末端における FK-506 binding protein 高発現が、回腸囊炎発症高リスク患者群を予測することが可能であるととも、FK506-binding protein 高発現は、回腸囊炎発症の独立リスク因子となることが明らかとなった(上図、Araki T, Kawamura M, et al. Dig Dis Sci. 2015 Jun;60(6):1617-23)。

またさらに炎症性サイトカインに特に着目して解析をすすめるととくに Interferon-gamma の回腸末端高発現が、術後回腸囊発症の予測マーカーとなりうるということが明らかとなった(下図)。

IFN-gamma発現による回腸囊炎発症リスク解析



DNA メチル化解析に関しては、回腸囊炎リスクのみならず潰瘍性大腸炎の慢性炎症、さらには発癌リスクに至るまで研究範囲を進めており、DNA メチル化解析を行うと潰瘍性大腸炎の全大腸において回腸末端から直腸に向かうにつれ、いくつかの miRNA のメチル化は高頻度におこり、特に直腸粘膜の高メチル化が、罹病期間と相関するほか、潰瘍性大腸炎関連癌発症リスクを同定しうる可能性を報告した(下図)。



さらにそのほかにも潰瘍性大腸炎術後回腸囊炎発症、潰瘍性大腸炎発症、さらには発癌リスクにかかわる様々なバイオマーカー研究を現在も継続中である。

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 4 件)

1) Colonic Histological Criteria Predict Development of Pouchitis after Ileal Pouch: Anal Anastomosis for Patients with Ulcerative Colitis.

Araki T, Hashimoto K, Okita Y, Fujikawa H, Kondo S, Kobayashi M, Ohi M, Toiyama Y, Inoue Y, Uchida K, Mohri Y, Kusunoki M. Dig Surg. 2018;35(2):138-143. (査読有)

2) Clinical Characteristics of Stoma-Related Obstruction after Ileal Pouch-Anal Anastomosis for Ulcerative Colitis.

Okita Y, Araki T, Kondo S, Fujikawa H, Yoshiyama S, Hiro J, Inoue M, Toiyama Y, Kobayashi M, Ohi M, Inoue Y, Uchida K, Mohri Y, Kusunoki M. J Gastrointest Surg. 2017;21(3):554-559 (査読有)

3) A Panel of Methylated MicroRNA Biomarkers for Identifying High-Risk Patients With Ulcerative Colitis-Associated Colorectal Cancer.

Toiyama Y, Okugawa Y, Tanaka K, Araki T, Uchida K, Hishida A, Uchino M, Ikeuchi H, Hirota S, Kusunoki M, Boland CR, Goel A. Gastroenterology. 2017;153(6):1634-1646. (査読有)

4) FK506-Binding Protein 5 mRNA Levels in Ileal Mucosa Are Associated with Pouchitis in Patients with Ulcerative Colitis.

Araki T, Kawamura M, Tanaka K, Okita Y, Fujikawa H, Uchida K, Toiyama Y, Inoue Y, Mohri Y, Kusunoki M. Dig Dis Sci. 2015 Jun;60(6):1617-23. (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

1) 大北 喜基, 荒木 俊光, 近藤 哲, 浦谷 亮, 奥川 喜永, 藤川 裕之, 安田 裕美, 重盛 恒彦, 廣 純一郎, 吉山 繁幸, 井上 幹大, 間山 裕二, 小林 美奈子, 大井 正貴, 田中 光司, 井上 靖浩, 内田 恵一, 毛利 靖彦, 楠 正人. 潰瘍性大腸炎術後慢性回腸囊炎の臨床像. 第 103 回日本消化器病学会総会. 2017 年 4 月 20 日-22 日. 京王プラザホテル.

2) 荒木 俊光, 大北 喜基, 近藤 哲, 浦谷 亮, 重盛 恒彦, 藤川 裕之, 安田 裕美, 奥川 喜永, 廣 純一郎, 吉山 繁幸, 間山 裕二, 小林 美奈子, 大井 正貴, 田中 光司, 井上 靖浩, 内田 恵一, 毛利 靖彦, 川村

幹雄, 楠 正人 . 潰瘍性大腸炎大腸全摘時回腸粘膜における回腸嚢炎予測因子発現の検討 . 第 117 回 日本外科学会定期学術集会 . 2017 年 4 月 27 日 -29 日 . パシフィコ横浜 .

3) 川村 幹雄, 荒木 俊光, 大北 喜基, 近藤 哲, 長野 由佳, 市川 崇, 三枝 晋, 廣純一郎, 問山 裕二, 小林 美奈子, 大井 正貴, 田中 光司, 井上 靖浩, 内田 恵一, 毛利 靖彦, 楠 正人 . 大腸全摘時回腸粘膜における Th1, Th2, Th17 cytokine profile と回腸嚢炎発症の関連性 . 第 102 回 日本消化器病学会総会 . 2016 年 4 月 21 日 -23 日 . 京王プラザホテル .

4) 川村 幹雄, 荒木 俊光, 大北 喜基, 近藤 哲, 長野 由佳, 市川 崇, 三枝 晋, 廣純一郎, 小林 美奈子, 問山 裕二, 大井 正貴, 田中 光司, 井上 靖浩, 内田 恵一, 毛利 靖彦, 楠 正人 . 潰瘍性大腸炎術後回腸嚢炎発症と大腸全摘時回腸粘膜中 Interferon- γ の発現との関連性 . 第 116 回 日本外科学会定期学術集会 . 2016 年 4 月 14 日 -16 日 . リーガロイヤルホテル大阪 .

5) 大北 喜基, 川村 幹雄, 荒木 俊光, 長野 由佳, 近藤 哲, 三枝 晋, 問山 裕二, 田中 光司, 井上 靖浩, 井上 幹大, 小林 美奈子, 大井 正貴, 内田 恵一, 毛利 靖彦, 楠 正人 . 潰瘍性大腸炎術後回腸嚢炎と回腸嚢粘膜における inflammatory cytokine 発現との関連性 . 第 115 回 日本外科学会定期学術集会 . 2015 年 4 月 16 日 -18 日 . 名古屋国際会議場 .

〔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: 該当なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

川村 幹雄 (KAWAMURA, Mikio)
三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト
研究者番号 : 00722589

(2) 研究分担者

問山 裕二 (TOIYAMA, Yuji)
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号 : 00422824

大北 喜基 (OKITA, Yoshiki)
三重大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 20378342

荒木 俊光 (ARAKI, Toshimitsu)
三重大学・医学系研究科・准教授
研究者番号 : 70343217

楠 正人 (KUSUNOKI, Masato)
三重大学・医学系研究科・教授
研究者番号 : 50192026

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし