

平成 30 年 4 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19311

研究課題名(和文) 腸管粘膜内 T 細胞のエピゲノム修飾異常は炎症性腸疾患内科治療抵抗性の主要因子である

研究課題名(英文) DNA methylation of CD4+ effector memory T cells of the intestinal tract is one of the major factors mediating resistance to therapy in patients with inflammatory bowel disease

研究代表者

遠藤 克哉 (ENDO, KATSUYA)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：40509197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000 円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患(クローン病・潰瘍性大腸炎)の多くは時間経過とともに治療抵抗性となることが知られている。その治療抵抗性のメカニズムについては未だ明らかになっていない。そこでステロイド抵抗性、Infliximab抵抗性がCD4+ Effector Memory T CellのDNA methylation分布と関連があるか検討した。手術を施行された活動期CD13例、活動期UC 5例を対象とした。解析対象である61遺伝子領域のDNA methylationをarrayを用いて定量し比較を行った。ステロイド抵抗性、抗TNF 製剤抵抗性との関連について、有意な関連を認めることができなかった。

研究成果の概要(英文)：The mechanisms of resistance to steroid, infliximab therapy are still unknown in patients with inflammatory bowel diseases. To unravel the mechanisms, the relation between the resistance and the distribution of DNA methylation was examined in CD4+ effector memory T cells (TEM) of the intestinal tract. TEM were obtained from the resected intestines of 13 patients with Crohn's disease and 5 patients with ulcerative colitis. Distribution of DNA methylation in 61 genes was examined using DNA array. The results showed that there were no significant relationship between steroid/infliximab resistance and distribution pattern of DNA methylation in TEM.

研究分野：消化器病学

キーワード：炎症性腸疾患 エピゲノム 治療抵抗性 クローン病 潰瘍性大腸炎

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患治療抵抗性獲得のメカニズムは未解明

炎症性腸疾患はクローン病と潰瘍性大腸炎からなる原因不明の慢性腸炎であり、若年者に好発し治癒させる治療法は存在しない。潰瘍性大腸炎の寛解導入治療として、ステロイド剤、免疫調整剤、抗 TNF 製剤が、またクローン病の寛解導入療法として、抗 TNF 製剤、ステロイド剤等の薬物治療が挙げられるが、経過中に薬剤に対する治療抵抗性を獲得することが多々あり、臨床的に問題となっている。本申請者は以前より、本施設からの報告 (Nat Genet 2009, 41:1325-1329) を含め genome wide association study (GWAS) で同定された約 163 ケ所の疾患感受性ゲノム領域と治療効果との関連や機能解析を行い、治療効果・治療抵抗性を genetic variants から予測することは困難であることを示してきた (Immunogenetics 2013)。

炎症性腸疾患治療抵抗性はエピゲノム修飾による可能性がある

疾患病因・病態・治療感受性に影響を与える因子として genetic factor 以外に、エピゲノム修飾 (DNA methylation, histone acetylation, mi-RNA etc) 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エピゲノム修飾が関与していることが多数報告されるとともに、その治療薬への感受性をも規定していることが明らかにされている (Epigenetics 2014 9:896)。一般的にエピゲノム修飾により制御される現象の特徴としては、1) 後天的に獲得される現象であること、2) その現象は、細胞分裂を経ても比較的長期に維持されること、という2点が挙げられる。炎症性腸疾患における治療抵抗性を考えた場合、主に後天的に獲得される現象であること、また前述の薬剤の治療ターゲットの主要部分は CD4 effector memory T cell と考えられ、経過中細胞分裂を繰り返した上で治療抵抗性を維持していることが想定されていることから、炎症性腸疾患における治療抵抗性はエピゲノム修飾により制御されている可能性がある。

本申請者が行った先行研究

本申請者は平成 24 年度より、炎症性腸疾患の病因・病態にエピゲノム修飾が関与しているかを解明することを目的に、クローン病、潰瘍性大腸炎の手術標本より CD4 Effector memory T cell を精製し、Infinium HumanMethylation450 BeadChip array を用いた網羅的 DNA メチル化比較解析を行った。その結果、クローン病特異的、潰瘍性大腸炎特異的な DNA メチレーション変化を同定した。すなわち従来より指摘されている Th1, Th2, Th17 の分化に關与する転写因子及びサイトカイン群が疾患特異的に脱メチル化していること以外に、潰瘍性大腸炎では T cell receptor シグナル経路及び副シグナルである iCOS シグナル経路が高度に脱メ

チル化していること、クローン病ではアポトーシスを正にコントロールする遺伝子群が高度に DNA メチル化されていることを確認し、現在結果を投稿中である。また面白いことに、Th1, Th2, Th17 の分化に關与する転写因子及びサイトカイン群の DNA メチレーション分布は、Effector memory T cell の中でもその分化状態により異なっていたが、T cell receptor シグナル経路、iCOS シグナル経路、アポトーシスを正にコントロールする遺伝子群における DNA メチル化分布異常については、Effector memory T cell 内で均一に出現していた。

先行研究より推測された治療抵抗性に関するエピゲノム修飾

先行研究の解析対象は手術症例であり、潰瘍性大腸炎では約 7 割がステロイド抵抗性、クローン病の約 5 割が抗 TNF 製剤抵抗性 (トラフ 1 µg/mL 以上の二次無効) であった。各データをもとにクラスタリング解析を行うと、潰瘍性大腸炎において T cell receptor シグナル経路及び iCOS シグナル経路の DNA メチレーション分布異常の有無により、ステロイド治療抵抗性とそれ以外の 2 群に分かれ、クローン病においては、アポトーシスを正にコントロールする遺伝子群の DNA メチレーション分布異常の有無により抗 TNF 製剤抵抗性とそれ以外の 2 群に分かれることが示された。症例数が少なく、検定で統計学的な有意差は認めなかったが、DNA メチレーション分布と治療抵抗性が関連する傾向を示した。

2. 研究の目的

(1) 治療抵抗性と特異的 DNA メチレーションとの関連を確認

ステロイド抵抗性と T cell receptor シグナル経路及び iCOS シグナル経路の脱メチル化 (36 遺伝子領域) 抗 TNF 製剤抵抗性とアポトーシスを正にコントロールする遺伝子群の高度メチル化 (25 遺伝子領域) について、臨床検体 (Lamina propria T cell; LPT) を用いて関連を確認する。その後、以下の 2 点を解析する。

(2) 特異的 DNA メチレーションがその領域遺伝子の発現を制御しているか確認

(3) 特異的 DNA メチレーションが LPT 機能 (薬剤耐性) に与える影響を確認

3. 研究の方法

以下の研究は「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に基づき、東北大学医学研究科の研究倫理審査で承認されている。

(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クローン病 13 例、活動期潰瘍性大腸炎 5 例を対象とした。クローン病、潰瘍性大腸炎の診断は臨床症状、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)、潰瘍性大腸炎診断基

準 (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。18名のうちステロイド抵抗性が11名、抗TNF製剤抵抗性が10名である。

(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 CD4 Effector memory T cell の分離、精製

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) CD4 Effector memory T cell の培養と刺激、DNA/RNA の抽出

CD4 Effector memory T cell 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 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) DNA メチル化の定量

Array による DNA メチル化解析: 61 遺伝子領域の約 2000CpG 部位が DNA メチル化解析対象となるため、網羅的な DNA メチル化解析を行い、必要なデータを抽出して解析する。網羅的な DNA メチル化解析には Illumina 450K (Illumina) を使用した。蛍光定量値より 0.5 μ g の genome DNA を EZ DNA Methylation Kit (ZYMO RESEARCH, United States) を用いて bisulfite 変換処理を行った後、Illumina 450K を使用してハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後に洗浄後、一塩基伸長反応によってプローブ末端に一塩基の標識ヌクレオチドを取り込ませて、それに対する蛍光色素標識抗体を用いて染色を行った。染色を行っ

た BeadChip から iScan を用いて蛍光イメージを取得した。

データ解析: 取得した蛍光イメージを Genome Studio methylation package (Illumina) に取り込み、100%メチル化されているアリルと 100%メチル化されていないアリル間のシグナ強度比として値を算出するとともに、同ソフトウェアにてデータの標準化を行った後に、統計解析を行った。

アレイデータの検証: Array データが正しいことを確認するために、10ヶ所の CpG をランダムに選択し、PyroMarkQ24 (QIAGEN) を使用したパイロシークエンス法にて確認を行った。Epitect PCR Control DNA (QIAGEN) を使用して、0-100%のメチル化 DNA 標品を作成し、定量を行う。それぞれの CpG サイトのプライマー設計には、PyroMark Assay Design 2.0 (QIAGEN) を使用し、パイサルファイト処理には Epitect bisulfite conversion Kit (QIAGEN) を使用する。解析の対象となった遺伝子領域は下記の通りである。

T cell receptor シグナル経路及び iCOS シグナル経路: CD247, GAB2, CD3E, PLEKHA4, NFATC1, PTPRC, CD28, LCK, NFAT5, HLADRB1, PIK3CG, HLADMB, ITK, IL2RB, AKT2, PRKCQ, CSK, ITPR1, PPP3CC, CD3D, INPP5D, CD3G, GRAP2, ICOS, LAT, ZAP70, PIK3R6, NFATC2, VAV1, IL2RA, PIK3CD, PLEKHA1, PLEKHA2, LCP2, HLA-DRB5
アポトーシスを正にコントロールする遺伝子群: PARP10, ZC3HAV1, APAF1, TNFSF10, MAP3K5, PARP9, ARHGDI1B, PARP1, LIMK1, TANK, CRADD, TIPARP, TNFRSF25, BID, CASP8, TNFRSF1B, TNFRSF10A, CASP7, FASLG

4. 研究成果

先行研究で認められた、潰瘍性大腸炎では T cell receptor シグナル経路及び副シグナルである iCOS シグナル経路が高度に脱メチル化していること、クローン病ではアポトーシスを正にコントロールする遺伝子群が高度に DNA メチル化されていることについて、それぞれ、ステロイド抵抗性、抗 TNF 製剤抵抗性との関連について、種々の統計による比較を行ったが、有意な関連を認めることができなかった。さらに症例数を増やして検討が必要と考えられた。

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 1 件)

Chiba H, Kakuta Y, Kinouchi Y, Kawai Y, Watanabe K, Nagao M, Naito T, Onodera M, Moroi R, Kuroha M, Kanazawa Y, Kimura T, Shiga H, Endo K, Negoro K,

Nagasaki M, Unno M, Shimosegawa T. Allele-specific DNA methylation of disease susceptibility genes in Japanese patients with inflammatory bowel disease. PLoS One. 2018 Mar 16;13(3):e0194036.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 克哉 (ENDO Katsuya)
東北大学・医学系研究科・非常勤講師
研究者番号：40509197