

令和元年6月3日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10535

研究課題名(和文) クローン病長期寛解維持のための薬剤反応性予測マーカーの解明

研究課題名(英文) Biomarker of drug responsiveness as the predictive factor for Crohns disease remission

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：小腸型、小腸大腸型クローン病においてIL-6 IN/CO ratio手術的再発ハイリスク群同定の有用なpredictive markerであり、術後寛解維持療法選択の一助となる可能性が示唆された。Agingに関わるmiR124, miR137, miR9のmethylationの検討では、miR137は、炎症部と非炎症部で差は認められたものの、再狭窄や瘻孔形成などのpredictorにはならなかった。プロテオミクスとmiRNAのメチル化解析を統合した結果、有意な関連性を示すことはできなかった。またT細胞受容体レパトア解析での検討には進めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クローン病における術後の抗TNF抗体製剤抵抗性の因子が同定されることによって、他の治療薬選択の一助となる可能性が示唆され、これによってクローン病の予後はさらに改善されることが期待できる。また、このことは手術を受ける前の病変にも応用できる可能性があり、通常の内科的治療選択の際の指標となるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：IL-6 IN/CO ratio could be used as a predictive biomarker to identify high risk population in crohn disease. Furthermore, miR-137 methylation wss significantly changed between inflammatory and non-inflammatory tissues of crohn disease. Unfortunately, findings of proteomics was not significantly associated with DNA methylation analysis, and could not progress T-cell analysis.

研究分野：消化器外科

キーワード：クローン病 再発 抗TNF抗体 サイトカイン IL-6 手術 マイクロRNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

クローン病はいまだ原因不明で難治性腸管障害をきたす疾患である。若年者に発症することが多い疾患であり、慢性的に腸管に炎症を引き起こすことから不可逆的な障害を生じ、栄養吸収障害や永久的人工肛門などに至り、患者の生涯を通して QOL に大きな影響を与えることとなり、社会的な問題ともなっている。その治療においては短期的な寛解のみならず、長期的な寛解の維持が非常に重要である (Pariente B. *Inflamm Bowel Dis* 2011)。

近年、これまで行われていた栄養療法やメサラジン内服、あるいはステロイド療法に加え、免疫調節薬や抗 TNF- $\alpha$  抗体製剤が治療に導入されるようになり治療成績は以前より向上してきているものの、長期成績を見ると手術率が大きく減少したとはいえない状態である。

そして、これまで様々な内科的治療による術後寛解維持療法が試みられてきたが再手術にいたる症例は少なくなかった。しかしながら近年、術後の抗 TNF- $\alpha$  抗体製剤維持投与が内視鏡的な再発を有意に抑制することが示されている (Regueiro M, et al. *Gastroenterology*. 2009, Yamamoto T, et al. *Inflamm Bowel Dis*. 2009)。また、われわれは再発リスクが高いと考えられる症例に対する術後の抗 TNF- $\alpha$  抗体製剤維持投与によって、長期の再手術抑制も可能であることを明らかにした (Araki T, et al. *Surg Today*. 2014)。

しかしながら、すべての患者において再発の抑制が可能であるわけではなく、一部に抗 TNF- $\alpha$  抗体製剤を術後に維持投与されているにもかかわらず再燃し、再手術を必要とする症例も存在し、その原因は明らかでない。そしてこのような症例に対しては、他の寛解維持療法が適応されるべきであるが、それを予測することは現時点で困難である。また一方で、このような抗 TNF- $\alpha$  抗体製剤の維持療法の抵抗となる患者の決定は、臨床経過や病態から推測されるリスク因子によって決定されている。しかしそれが正確かどうかの検討は十分であるとは言えず、実際に投与の適応である症例に投与されていなかったり、その逆に不必要な投与が行われていたりすることもあると考えられる。そのため、より正確で客観的な薬剤反応性予測マーカーの開発が強く求められている。

プロテオミクス (Proteomics) とは構造と機能を対象としたタンパク質の大規模な研究を示し (Electrophoresis 1998:Anderson NL, Trends Biotechnol 1999:Blackstock WP), プロテオミクスを用いたクローン病を含む炎症性腸疾患のバイオマーカーの検討は 2001 年に Mann M らが、炎症性腸疾患患者の血清を用いて行って以来 (Annu Rev Biochem 2001)、血清や尿をサンプルとして末梢血単核球蛋白や、炎症、酸化・還元、細胞骨格、細胞内運搬、転写などの蛋白が報告されている。これらは、IBD の診断や、潰瘍性大腸炎とクローン病の鑑別、疾患活動度、そして薬剤感受性をモニタリングするバイオマーカーになりうることを示されている。

microRNA (miRNA) は、細胞内に存在する長さ 20-25 塩基ほどの一本鎖 RNA であり、ほかのタンパク質をコードする遺伝子の発現を調節する機能を持つ。現在、すでに多種の miRNA が同定されデータベースに登録されているが、それぞれの miRNA は、相補的な塩基配列をもつ標的 mRNA に特異的に作用し、その mRNA の分解または翻訳阻害という二様式で機能する。とくに最近の研究から、miRNA のさまざまな生物学的プロセスへの関与が明らかになり、新たに疾患を誘発する要因として miRNA の変異なども視野に入れる必要性が指摘されている。miRNA はこれまでに明確な指標、マーカーが存在しない疾患の同定だけでなく、疾患の予防薬または治療薬としての応用まで期待されている。異常な miRNA の発現は、慢性関節リウマチ、全身性エリマトーデス、炎症性癌などをはじめ、クローン病でも関連していることが明らかにされている。クローン病に関連する miRNA を網羅的に検索することは、これまでの研究で target としてきた遺伝子の関連のみならず、これまでとは異なるメカニズムを明らかにし、新たな薬剤反応性のマーカーを同定できる可能性が考えられている。

また、クローン病には自己免疫が大きく関与していることがこれまで示されている。これまでに特に腸粘膜における腸管抗原の認識が増加し、T 細胞が活性化されることが示されている (Sarrabayrouse G, et al. *PLoS Biol*. 2014)。近年、非バイアス遺伝子増幅技術と専用ソフトを備えた次世代 T 細胞受容体 (TCR) レパトア解析技術が開発され、これまでより定量性 (10 万-1000 万遺伝子配列の決定が可能) にすぐれ、免疫療法の有効性評価に有効であることが示されている。すなわち、クローン病に対してこの新しい解析方法を応用することによって、これまで明らかにされてきていない新しい結果が導き出せることが予想される。

### 2. 研究の目的

クローン病は初回手術後の再手術率は高率であることから、初回手術後の再燃・再発予防を目的とした術後寛解維持療法が重要となる。クローン病は術後寛解維持療法としては、栄養療法のほか、抗 TNF- $\alpha$  モノクローナル抗体薬などの薬物療法が推奨されているが、治療抵抗性症例には薬物治療の選択に難渋することが多い。最近、TNF- $\alpha$  以外に IL-12/-23 などを標的とした新たな分子標的剤が登場し、さらに最近の報告では抗 TNF- $\alpha$  抗体抵抗性クローン病症例を対象とした phase II study において、IL-6 抗体薬の有用性が示唆され、大きな注目を集めている。このような術後治療薬の選択肢が増加しつつあるにもかかわらず、各症例に応じた適切な術後寛解維持療法選択の指標がないのが現状である。今回、クローン病における回腸病変部/非病変部におけるさまざまな炎症性サイトカイン発現を解析し、再狭窄や瘻孔形成等における predictive marker としての有用性を検討したので報告する。また複数の miRNAs をコードして

いる DNA メチル化を定量し、クローン病におけるその臨床的意義を評価した。

### 3. 研究の方法

対象患者：

2006年2月から2015年12月までに当院でクローン病に伴う小腸病変に対して小腸部分切除術を施行した116例

方法：

IL-6, -12, -23, TNF- $\alpha$ , HSP47, CXCL16 に着目し、それらの発現量を quantitative real-time PCR にて測定した。

これらの組織中発現量と臨床病理学的因子との関連を検討し、手術的再発（術後合併症による再手術や肛門病変に対する再手術を除く）に対する predictive marker としての有用性について検討した。

クローン病における回腸病変部/非病変部における複数の miRNAs のメチル化を解析し、再狭窄や瘻孔形成等における predictive marker としての有用性を検討した。

回腸の病変部ならびに非病変部の手術標本の genomic DNA を Bisulfite 処理を行い miR124, miR137, miR9 を target として QIAGEN 社の PyroMark を用いて methylation 割合の評価を行った。

これらの methylation 割合の手術的再発（術後合併症による再手術や肛門病変に対する再手術を除く）に対する predictive marker としての有用性について検討した。

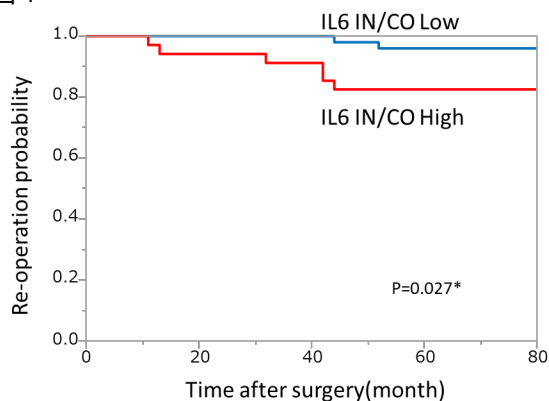
### 4. 研究成果：

患者は初発時平均年齢 25.8 歳で、男性 85 人、女性 31 人であった。

臨床病理学的因子との検討において IL-6, -12, -23, TNF- $\alpha$ , HSP47, CXCL16 いずれにおいてもその回腸病変部/非病変部発現比（IN/CO ratio）は性別、モンリオール分類（A1/A2/A3, B2/B3, L1/L3）、喫煙、手術歴、腹腔鏡下手術、累積手術的再発率と有意差は認めなかった。

IL-6 のみ IN/CO ratio 高値群が、累積手術的再発率に関して有意に予後不良であった（図 1、 $p=0.03$ ）。

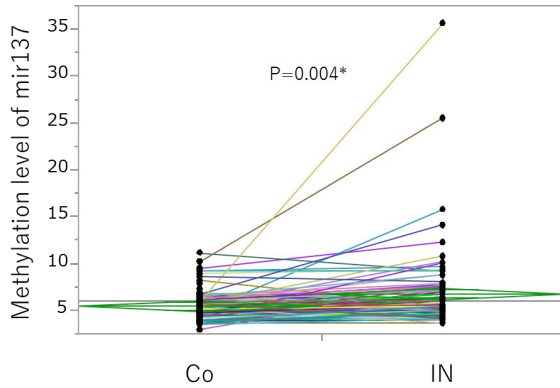
図 1



また多変量解析においても IL6 IN/CO ratio 高値群は独立した予後不良因子であった（HR:4.77, 95%CI: 1.09-32.53,  $p=0.04$ ）。

miR137 に関して、炎症部は非炎症部に対して優位に hypermethylation であった（図 2、 $p=0.004$ ）が、miR124, miR9 では有意な所見は得られなかった。また、再狭窄や瘻孔形成等における predictive marker としての有用性のあるモンリオール分類（A1/A2/A3）に関しては、miR124 CO/IN, miR9 CO と有意な相関を認めたと、miR137 CO/IN, miR9 IN では有意な所見は得られなかった。

図 2



#### 成果のまとめ

小腸型、小腸大腸型クローン病において IL-6 IN/CO ratio 手術的再発ハイリスク群同定の有用な predictive marker であり、術後寛解維持療法選択の一助となる可能性が示唆された。

Aging に関わる miR124, miR137, miR9 の methylation の検討では、miR137 は、炎症部と非炎症部で差は認められたものの、再狭窄や瘻孔形成になどの predictor にはならなかった。プロテオミクスと miRNA のメチル化解析を統合した結果、有意な関連性を示すことはできなかった。また T 細胞受容体レパトア解析での検討には進めなかった。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 小腸型、小腸大腸型クローン病における回腸の炎症部と非炎症部のインターロイキン6 発現量の比の臨床的意義 楠蔵人、問山裕二、奥川喜永、藤川裕之、安田裕美、大北喜基、廣純一郎、大井正貴、荒木俊光、楠正人 第 74 回日本消化器外科学会

〔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：

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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：なし

#### 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名： 内田 恵一  
ローマ字氏名：(UCHIDA, KEIICHI)  
所属研究機関名：三重大学  
部局名：医学部附属病院  
職名： 准教授  
研究者番号（8桁）：30293781

研究分担者氏名： 井上 幹大  
ローマ字氏名：(INOUE, MIKIHIRO)  
所属研究機関名：三重大学  
部局名： 医学部附属病院  
職名： 講師  
研究者番号（8桁）：30422835

研究分担者氏名： 大竹 航平  
ローマ字氏名：(OTAKE, KOHEI)  
所属研究機関名：三重大学  
部局名：医学系研究科  
職名： リサーチアソシエイト  
研究者番号（8桁）：40378344

研究分担者氏名： 大北 喜基  
ローマ字氏名：(OKITA, YOSHIKI)  
所属研究機関名：三重大学  
部局名：医学系研究科  
職名： 助教  
研究者番号（8桁）：20378342

研究分担者氏名： 楠 正人  
ローマ字氏名：(KUSUNOKI, MASATO)  
所属研究機関名：三重大学  
部局名：医学系研究科  
職名： 教授  
研究者番号（8桁）：50192026

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。