

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590711

研究課題名（和文） 新規炎症性腸疾患モデルマウスの樹立と解析

研究課題名（英文） Establishment of model mice for Inflammatory Bowel Disease

研究代表者

高橋 成一（TAKAHASHI SEIICHI）

東北大学・病院・助教

研究者番号：40312574

研究成果の概要：

新しい炎症性腸疾患のモデルマウスを樹立するために、ヒト HLA-B52 遺伝子を単離し、遺伝子構造、塩基配列を解析した。また、DNA マイクロインジェクション用の導入ベクターを作成した。さらに、日本人炎症性腸疾患と ATG16L1 遺伝子、MYO9B 遺伝子、IRGM 遺伝子について相関解析を施行し、欧米人とは異なりこれらの遺伝子は日本人の炎症性腸疾患の発症に関わらないことを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：炎症性腸疾患 モデルマウス

## 1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎とクローン病は、原因不明の慢性炎症性腸疾患で、比較的若年で発症し再燃と緩解を繰り返すため、罹患すると学業、就職、結婚などに少なからず影響を及ぼし、生活の質の低下を余儀なくされる。また、根本的治療法は未だ確立されておらず、しばしば、入院手術療法を必要とし、手術後に全く医療が全く不要となるケースも極めて稀である。さらに、近年日本では、潰瘍性大腸炎とクローン病の罹患患者数が増加し、医療財政の面からも早急な対策が求められている。さらに本研究者は、潰瘍性大腸炎とクローン病の遺伝的因子について以下の知見を報告してきた。

(1) 日本人潰瘍性大腸炎の疾患感受性遺伝子が、第 6 染色体短腕の HLA 領域内でクラス I セントロメア側～クラス III テロメア側にあり、中でもマイクロサテライトマーカー C-2-4-4 アリル 239 と HLA-B52 ハプロタイプが最も強い連鎖不平衡を示す。

(2) 日本人クローン病が、HLA-B と非常に近い領域に位置する TNF 遺伝子プロモーター多型と相関する。

(3) 日本人クローン病の大腸型が、HLA-B52 遺伝子と相関する。

以上より、日本人の潰瘍性大腸炎とクローン

病の病態形成に、HLA-B52 遺伝子が重要な役割を果たしていることが推察された。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、HLA-B52 遺伝子が炎症性腸疾患の病態に関わる分子であることを、モデルマウスを用いて証明することである。また、炎症性腸疾患の分野の研究は目覚ましく、常に新知見が報告されるため、当初の目的に拘泥することなく、将来臨床応用に結びつくよう新たに着想したテーマも適宜進行させることを念頭に研究を開始した。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト HLA-B52 遺伝子の単離

ヒト HLA-B52 遺伝子ホモ接合のリンパ芽球様細胞株より genomic DNA library を作成する。HLA-B52 遺伝子プロモーター領域と全エクソンを含む入ファージクローンを単離し、制限酵素 EcoR I -Pst I フラグメント 4.3kb を切り出す。

### (2) 導入ベクターの作成

EcoR I -Pst I フラグメント 4.3kb を pUC 系プラスミドに組み込み、SV40 のポリ配列を付加する。プラスミドベクターをコンピテントセルにトランスフェクションし、対数増殖期の大腸菌から QIAGEN Plasmid Kit を用いてプラスミドを抽出する。制限酵素でベクターを直線化し、アガロースゲル電気泳動と Gene Clean II Kit により DNA 断片を精製する。最終濃度を 500DNA 分子/pl になるよう調整する。

### (3) マウス受精卵の調整

雌マウスに性腺刺激ホルモンを腹腔内投与し、過排卵を誘導する。実体顕微鏡下に BWW-Hepes 培地中で受精卵を取り出し、卵丘細胞を取った後、ミネラルオイルで覆われた BWW 培地の中に入れ、37°C、5%CO<sub>2</sub> で培養する。

### (4) DNA のマイクロインジェクション

ガラス管をピペット作製機で引き伸ばし、インジェクションピペットを作製する。また、ホールディングピペットとトランスファーピペットも各々作製する。作製したピペットをマイクロマニピュレーターシステムに取り付け、マウス受精卵雌性前核に、顕微鏡下に DNA 溶液を注入する。

### (5) 受精卵の卵管への移植

あらかじめ精管結紮雄マウスと交配し、交尾を確認した偽妊娠雌マウス (ICR 系) に、ネンブータルによる麻酔をかける。後背部を切開し、卵管開口部を同定した後、トランスフ

アーピペットで卵を注入する。切り口を縫合し、19 日後に仔が産まれるのを待つ。

### (6) トランスジェニックマウスのスクリーニング

生まれて 4 週間後の離乳時に、マウスの耳にパンチ法で個体番号を付け、同時に尾部より DNA を抽出する。各個体について、ドットプロットハイブリダイゼーションと PCR 法で導入遺伝子の有無を同定する。さらに数ラインについて、F1 マウスに導入遺伝子が伝達されるか否か、ドットプロットハイブリダイゼーションと PCR 法で確認する。

### (7) 発現解析

HLA-B52 遺伝子トランスジェニックマウス諸臓器より HighPure PNA isolation kit を用いて、トータル RNA を抽出し、HLA-B52 cDNA をプローブとし、Northern blotting による発現解析を施行する。また、トランスジーンを発現量を、内因性 H-2 class I 抗原と比較する。特に発現量の多い 2 ラインを、以降の実験に供する。また、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  投与下における諸臓器の HLA-B52 と H-2 class I 抗原の発現量を、無刺激時と比較する。

研究の目的の項で記載した新知見に基づく新たな研究として、日本人炎症性腸疾患の感受性遺伝子解析を、以下の方法で施行した。

### (8) 日本人 ATG16L1 遺伝子、MYO9B 遺伝子タイピング

日本人クローン病患者 284 例、潰瘍性大腸炎患者 186 例、健常人ボランティア 282 例の末梢血単核球から DNA を抽出し、欧米人を対象とした検討で強い相関を認めた ATG16L1 rs2241880 A/G SNP と MYO9B rs2305764 A/G SNP について、polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism 法を用いてタイピングを施行した。

### (9) 日本人 IRGM 遺伝子タイピング

日本人クローン病患者 284 例、潰瘍性大腸炎患者 186 例、健常人ボランティア 282 例の末梢血単核球から DNA を抽出し、欧米人を対象とした検討で強い相関を認めた IRGM rs13361189 T/C SNP と rs4958847 A/G SNP について PCR-RFLP 法でタイピングを施行し、さらに HapMap Project で検索し得た TagSNPs についても、網羅的にタイピングを行い、相関を解析する。

## 4. 研究成果

### (1) ヒト HLA-B52 遺伝子の単離

ヒト HLA-B52 遺伝子をホモに持つリンパ芽球培養細胞から、プロモーター領域を含む HLA-B52 遺伝子フラグメントを得た。また、

ヒト HLA-B52011\*cDNA プラスミドクローンを入力し、遺伝子構造、塩基配列を比較検討し、後者を導入ベクター作成に用いることに決定した。

#### (2) 導入ベクターの作成

HLA-B52011\*cDNA プラスミドクローンに対し、両端にリンカーを付加した PCR プライマーを設計した。PCR 産物をベクターに組み込み、ウサギのβグロビン遺伝子ポリ A シグナルと、非古典的な HLA class I 分子である T3b 遺伝子のプロモーター領域有する遺伝子導入ベクターを作成した。また、310 Genetic Analyzer で塩基配列を確認し、制限酵素でベクターを切断・直鎖化し、精製を行った。

#### (3) マウス受精卵の調整と DNA のマイクロインジェクション

過排卵を誘導したマウスから受精卵を取り出し、マイクロマニピュレーターシステムを用いて、マウス受精卵雄性前核に、顕微鏡下に DNA 溶液を注入した。しかし目的とする胎仔は得られず、培養、注入、移植条件を検討・変更し試みたものの結果は同様であった。高度な専門性を要する手技のため、この点に関し現在外注委託への切り替えを検討している。

#### (4) 日本人炎症性腸疾患と ATG16L1 遺伝子との相関について

ATG16L1 遺伝子 rs2241880 A/G SNP については、A アリルの頻度が、健常人ボランティア 75.4% に対し、クローン病症例 75.3%

( $p=0.967$ )、潰瘍性大腸炎症例 78.6%

( $p=0.264$ ) であった。すなわち、欧米人を対象とした検討で有意差を認めた ATG16L1 遺伝子に関しては、日本人炎症性腸疾患との相関を認めなかった。

#### (5) 日本人炎症性腸疾患と MYO9B 遺伝子との相関について

MYO9B 遺伝子 rs2305764 A/G SNP については、A アリルの頻度が、健常人ボランティア 71.9% に対し、クローン病症例 74.4%

( $p=0.353$ )、潰瘍性大腸炎症例 73.4%

( $p=0.635$ ) であった。すなわち、これも欧米人を対象とした検討で有意差が認められたが、日本人炎症性腸疾患との相関を認めなかった。

#### (6) 日本人炎症性腸疾患と IRGM 遺伝子との相関について

IRGM 遺伝子 rs13361189 T/C SNP と rs4958847 A/G SNP については、前者が C アリルの頻度が、健常人ボランティア 26.9% に対し、クローン病症例 33.1% ( $p=0.025$ )、潰瘍性大腸炎症例 28.5% ( $p=0.609$ ) で、後者が G アリル

の頻度が、健常人ボランティア 49.4% に対し、クローン病症例 49.3% ( $p=0.962$ )、潰瘍性大腸炎症例 48.9% ( $p=0.874$ ) であった。

IRGM 遺伝子の前後 100kbp の領域について、HapMap Project の Tagger Multimer を用いて Tag SNPs を抽出した。抽出時の設定は、 $r^2$  cut-off 値を 0.8、Minor Allele Frequency cut-off 値は 0.05 とした。その結果、前記 SNPs 以外に、以下の 8 つの SNP が抽出された。

- ① T/C rs4452545
- ② C/T rs10075846
- ③ C/T rs6868496
- ④ T/C rs2278396
- ⑤ A/C rs10074976
- ⑥ T/C rs12652859
- ⑦ A/G rs1277603
- ⑧ A/C rs2434688

これら SNPs の日本人健常者と炎症性腸疾患患者 Minor Allele Frequency は、いずれも統計学的有意差を認めなかった。

すなわち、少数検体での検討ではあるが、日本人と欧米人の炎症性腸疾患感受性遺伝子は異なることが確認された。

#### 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 4 件)

① Y. Matsumura, Y. Kinouchi, E. Nomura ほか 7 名 (9 番目)、*HLA-DRB1* alleles influence clinical phenotypes in Japanese patients with ulcerative colitis, *Tissue Antigens*, 71, 447-452, 2008、査読有

② 角田洋一、木内喜孝、植木紳夫 ほか 5 名 (7 番目)、クローン病感受性遺伝子 TNFSF15 遺伝子多型における機能解析、消化器疾患における Translational Research, 127-131, 2008、査読無

③ 角田洋一、木内喜孝、高橋成一、下瀬川徹、炎症性腸疾患の分子医学「遺伝子変異による発症メカニズム」、*Bio Clinica*, 23 (13), 18-21, 2008、査読無

④ 木内喜孝、角田洋一、野村栄樹、高橋成一、下瀬川徹、疾患関連遺伝子はどこまで明らかにされたか、*IBD Research*, 2 (2), 149-154, 2008、査読無

[学会発表] (計 5 件)

①H. Aizawa, Y. Kinouchi, K. Negoroほか 5 名 (7 番目)、Lack of association between IRGM and Crohn's disease in Japanese patients demonstrates population-specific differences in inflammatory bowel disease、Digestive Disease Week、平成 20 年 5 月 19 日、San Diego U. S. A

②N. Ueki, Y. Kinouchi, Y. Kakutaほか 5 名 (7 番目)、The -360t/c Polymorphism in the Tnfsf15 Gene Influences the Transcriptional Activity in Activated T Lymphocytes、Digestive Disease Week、平成 20 年 5 月 19 日、San Diego U, S, A

③遠藤克哉、木内喜孝、荒井壮ほか 14 名 (16 番目)、クローン病感受性遺伝子TL1Aの発現制御に関する検討、日本消化器病学会総会、平成 20 年 5 月 9 日、福岡

④相澤宏樹、木内喜孝、荒井壮ほか 14 名 (16 番目)、日本人クローン病とATG16L1、IL23R、MYO9B、IRGM遺伝子との相関について、日本消化器病学会総会、平成 20 年 5 月 9 日、福岡

⑤松浦真樹、野村栄樹、木内喜孝、日本人クローン病感受性遺伝子 (TNFSF15、HLA-DQ $\beta$ 1、TNF $\alpha$ ) と長期予後との関連について、日本消化器病学会総会、平成 20 年 5 月 8 日、福岡

[その他]

ホームページ等

<http://www.gastroente.med.tohoku.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 成一 (TAKAHASHI SEIICHI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：40312574

### (2) 研究分担者

木内 喜孝 (KINOUCHI YOSHITAKA)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：20250780

高木 承 (TAKAGI SHOU)

東北大学・病院・助教

研究者番号：50400346