

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460959

研究課題名(和文) アリル特異的DNAメチル化解析による炎症性腸疾患感受性遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of allele specific DNA methylation of the susceptibility genes to inflammatory bowel disease

研究代表者

木内 喜孝 (KINOUCHI, Yoshitaka)

東北大学・高度教養教育・学生支援機構・教授

研究者番号：20250780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は炎症性腸疾患疾患感受性領域に存在するゲノム変異が近傍のDNAメチレーション変化を引き起こし、遺伝子発現に影響を与え、疾患発症を引き起こしていると予想している。そこで200の疾患感受性領域を中心にアリル特異的にDNAメチレーションの変化が認められるか、T cellから精製したゲノムDNAを検体とし、ジャポニカアレイを用いて解析した。その結果、インプリンティング領域を除いた218ヶ所のSNP周囲にアリル特異的メチル化を確認し、そのうちの2ヶ所が炎症性腸疾患感受性領域に存在していた。またそのうちの1ヶ所でアリル間で発現差を認めた。これらの結果は前述の仮説の傍証となるものであった。

研究成果の概要(英文)：We expect that SNPs in the susceptibility loci for inflammatory bowel disease (IBD) affect the DNA methylation around the SNPs in a cis manner and alter the gene expression. We also expect that this alteration is one of the mechanisms how associated SNPs affect the susceptibility to multifactorial diseases. In this study, allele specific DNA methylations of the genome DNA of lamina propria T cell were examined using Japonica array. We determined 218 sites of allele specific DNA methylation in the genome except imprinting regions. Among 218 regions, two are in the IBD susceptibility loci. In one of the two region, differences of the m-RNA expression between alleles were determined. In this study, we showed, for the first time, that the allele specific DNA methylation and allele specific expression exist in the susceptibility gene for IBD.

研究分野：消化器病学

キーワード：エピゲノム アリル特異的DNAメチル化 炎症性腸疾患 疾患感受性遺伝子

1. 研究開始当初の背景

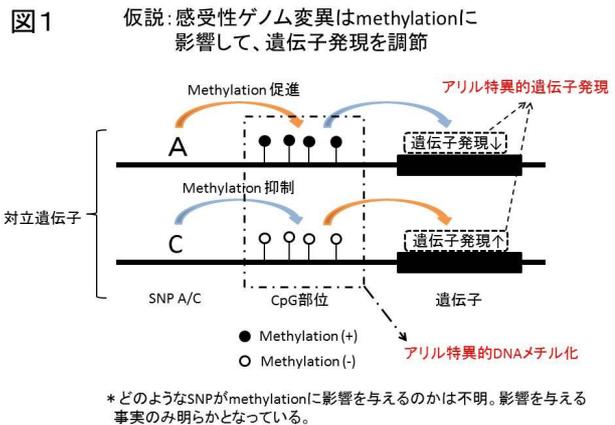
炎症性腸疾患は(クローン病と潰瘍性大腸炎の総称)原因不明の慢性腸炎で、日本でも発症が激増しており、病因解明が待たれている。また炎症性腸疾患は、疫学調査より発症に遺伝的要因が強く関与する多因子疾患とされ、遺伝因子を特定するため、genome wide association study (GWAS) が精力的にこの10 数年間行われ、本申請者からの報告 (Nat Genet, 2009. 41:1325-1329) を含め既に10 編以上の論文がある。その結果、現在ゲノムの200ヶ所に有意に炎症性腸疾患と相関する領域が同定されている。一方 GWAS は統計学的に感受性遺伝子の存在する広範な領域を示すだけであり、その領域内で感受性遺伝子を確定するためには、相関を認めたゲノム変異が代表するアリルが、どのようにして炎症性腸疾患の感受性を亢進させるかというメカニズムを明らかにしなければならない。GWAS で同定された遺伝子多型のほとんどは、遺伝子をコードしていない領域に存在しており、どのようなメカニズムで疾患発症に関与するのか解明できていない。

エピゲノム制御はゲノムの塩基配列を変えることなく、ゲノムに DNA メチル化、ヒストンアセチル化等の修飾を加えることで、遺伝子発現を変化させる仕組みである。遺伝因子と環境因子がともにエピゲノム修飾を調節することが明らかとなっており、疾患感受性における環境因子と遺伝因子の相互作用の基盤となっていることが推測されている。本研究者は、炎症性腸疾患の GWAS で同定された遺伝子非コード領域の多型は、周囲にエピゲノム変化を引き起こし、遺伝子発現を変化させることで、その疾患感受性に影響を与えているのではないかと考えている(図1)。その理由として1)炎症性腸疾患感受性候補遺伝子の中には、DNA メチル基転移酵素 (DNMT3A) (Nature genetics 2010.42:1118-25)が入っており、炎症性腸疾患発症に DNA メチル化異常が関与していることが疾患感受性遺伝子解析結果から推測されていること、2)癌以外の多因子疾患においてもその発症にエピゲノムの変化が影響していることを示唆する報告がなされていること。例えば全身性エリテマトーデスでは、リンパ球における広範な或いは特異的な遺伝子における脱メチル化が起こり、それが遺伝子発現に影響することで、全身性エリテマトーデスの発症・病態に関与していることが明らかとなりつつある (Adv Exp Med Biol.2011;711:117-36) 3)最近になり、遺伝子多型がその配列周囲の DNA メチル化に対してシスに影響を与えることが示されたこと等 (Am J Hum Genet.2010 12;86(2):196-212) が挙げられる。しかし残念ながらいまのところ、炎症性腸疾患において感受性ゲノム変異がエピゲノム変化を起こしている証拠も、傍証もない状況である。それではゲノム変異がエピゲノム変異を誘

導し、遺伝子発現に影響を与えていることをどのようにして確認すればよいのであろうか。一般的には感受性ゲノム変異をホモ接合、ヘテロ接合、野生型ホモ接合で保有している各群間で、ゲノム変異近傍でのエピゲノム修飾に差が存在するかを確認することになるが、有意差を出すためには多数の症例を必要とする。そこで本研究では、変異型/野生型をヘテロ接合で保有する症例を対象に、両アリル間でエピゲノム修飾 (DNA メチレーション) に差が存在するかを (アリル特異的 DNA メチル化: 図1) 検討することとした。一般的にゲノム変異によるエピゲノムに対する作用はシスに働くからである。(Am J Hum Genet.2010 86:411-9) (なお、インプリンティング遺伝子領域の解析は除外する: 初めからアリル特異的 DNA メチル化が存在するため)

2. 研究の目的

以下の点について明らかにする。1)炎症性腸疾患手術標本より調製した CD4 memory T cell を検体として、アリル特異的 DNA メチル化ゲノム領域を、全ゲノム領域を対象としてスクリーニングする。2)アリル特異的 DNA メチル化領域を示した近傍の遺伝子発現が、アリル特異的遺伝子発現を示しているか確認する。3)アリル特異的 DNA メチル化とアリル特異的遺伝子発現をともに示す領域で200ヶ所の炎症性腸疾患感受性領域と重なる領域を特定する。以上の解析から、炎症性腸疾患において感受性ゲノム変異がエピゲノム変化を起こし、遺伝子発現を変化させていることの傍証を示すことである。



3. 研究の方法

(1) 対象: クローン病もしくは潰瘍性大腸炎の診断で腸管切除術を施行し、遺伝子解析を含む研究に同意を文書で取得したクローン病 (CD) 10 例、潰瘍性大腸炎 (UC) 5 例を対象とした。

(2) 試料の調製:

腸管粘膜固有層単核球 (LPMC) の分離: Fiocchi C (Dig Dis Sci. 1979) の方法で手術

標本の一部を切除し、collagenase 処理により LPMC を分離した。

CD4 陽性 T 細胞の分離： で分離した LPMC を Easy Sep Human CD4+ T cell Enrichment Kit を使用して Easy Sep Magnet (STEM CELL) で CD4 陽性 T 細胞を分離した (negative selection)。

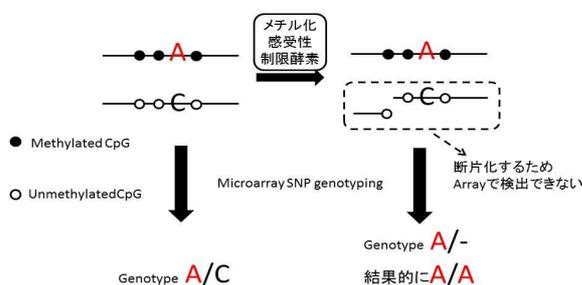
CD4 陽性 effector memory T cell を分離： で分離した CD4 陽性 T 細胞をさらに FACS aria セルソーター (BD バイオサイエンス) を用いて、抗 CD3 (FITC)、抗 CD4 (PE)、抗 CD45RO (APC) 抗体で標識し CD4 陽性 effector memory T cell を分離した。分離できた細胞数は $2.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ 程度であった。分離した CD4 陽性 effector memory T cell を再解析すると純度は平均 88.3% であった。

CD4 effector memory T cell から DNA、RNA を抽出： で分離した CD4 陽性 effector memory T cell から AllPrep DNA/RNA Mini (QIAGEN) を使用し DNA、RNA を抽出した。

(2) 網羅的 SNP タイピング：解析対象者のゲノム DNA を用いてゲノムワイドに SNP タイピングをジャポニカアレイ®を用いて行った。

(3) アリル特異的発現定量：アリル特異的発現を示す遺伝子を同定するために、CD4 memory T cell から m-RNA 抽出し、外部業者に委託しトランスクリプトーム解析を施行した。RNA 検体を TapeStation (アジレントテクノロジー社) で品質評価後、SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit (Clontech 社) のプロトコルに従い cDNA 合成・増幅およびライブラリ作製を行い、イルミナ社 HiSeq2500 を用いてシーケンシング施行した。なお品質評価は RIN 値 7.7 以上、total RNA 20ng 以上と設定した。

図2 Methylation sensitive SNP analysis (MSNP) 法の原理



アリル特異的 DNA メチル化があると、メチル化感受性制限酵素処理前後で、array の Genotyping がヘテロ接合からホモ接合に変化する。

(4) Methylation sensitive SNP analysis 法 (MSNP 法, 図 2): アリル特異的メチル化部位 (対立遺伝子間でメチル化の分布に差の

ある領域) を同定するために、CD4 memory T cell のゲノム DNA を用い、MSNP 法にて (ジャポニカアレイ®を使用) 解析した。その原理は、例えば SNP A/C がゲノム上にあり、A アリル周囲の CpG がメチル化され、C アリル周囲の CpG がメチル化されていないとする (アリル特異的 DNA メチル化)。その状態で、メチル化感受性制限酵素である HpaII (5-CCGG-3), HhaI (5-GCGC-3), AciI (5-CCGC-3) で消化した場合、約 40% 弱の確率で近傍の CpG 配列が 3 つの制限酵素の認識配列である可能性があり、認識配列があった場合、メチル化されていない C アリルは切断され、メチル化されている A アリルは切断されないことになる。この消化後の DNA を SNP array で解析すると、消化前の genotype は A/C と判定されるが、消化後の genotype は A/A と判定され、この SNP 周囲にアリル特異的 DNA メチル化が存在することがわかる。(Nature Genetics 2008,40:904-8)

(5)(2)(3)(4) でスクリーニングして選択された領域について、個別に realtime PCR, pyrosequencing にて、アリル特異的発現・アリル特異的メチル化を確認した。

4. 研究成果

ジャポニカアレイに搭載されている 659636 個の SNP のうち、HpaII (5-CCGG-3), HhaI (5-GCGC-3), AciI (5-CCGC-3) の 3 つのメチル化感受性制限酵素の認識配列を 1 つでも有するものは 34155 個 (5.2%) であった。このうち、全ゲノム増幅した DNA+制限酵素では全ゲノム増幅することで非メチル化されるためシグナルは減弱するはずだが、シグナルが減弱しなかった 5123 SNP を解析から除外した。ヘテロの SNP であり、制限酵素での消化前後のシグナル値が 10% 以上変化し、アリル特異的メチル化が予測される SNP (図 3) を 223 個同定した。その中からインプリンティング領域にある SNP を除外すると 218 SNP が残った。現在同定されている 200 の IBD 疾患感受性 SNP の周辺にあたるものはその中で 2 SNP 同定された。それぞれについて、pyrosequencing を用いて、アリル特異的メチル化とアリル特異的遺伝子発現を確認した。

以上より炎症性腸疾患感受性遺伝子にアリル特異的メチル化とアリル特異的遺伝子発現が確認された。今後、このアリル特異的メチル化とアリル特異的遺伝子発現の因果関係を検討しなければならないと考えられたが、アリル特異的メチル化を介して疾患感受性を制御している可能性を本研究で初めて示した。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Yokoyama N, Kakuta Y, Kuroha M, Kimura T, Kanazawa Y, Endo K, Kinouchi Y, Shimosegawa T. ROR alpha gene may be associated with bone mineral density in Japanese patients with inflammatory bowel disease. The 4th annual meeting of Asian organization for Crohn's & Colitis. July 7 2016, Kyoto Japan.

Matsushita K, Kakuta Y, Kinouchi Y, Negoro K, Endo K, Shiga H, Shimosegawa T. DNA methylation profiles of CD4+ effector Memory T-cells show distinct differences between Crohn's disease and ulcerative colitis. Digestive Disease Week 2015. May 17 2015. Washington DC, USA.

〔図書〕(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

木内 喜孝 (KINOUCHI Yoshitaka)
東北大学・高度教養教育・学生支援機構・
教授
研究者番号：20250780

(2)研究分担者

角田 洋一 (KAKUTA Yoichi)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：50509205