

炎症性腸疾患感受性遺伝子の同定と機能解析

●石井 直人 ◆小野 栄夫 ◆木内 喜孝
東北大学大学院医学系研究科

<研究の目的と進め方>

炎症性腸疾患 (IBD) は近年急激な患者数の増大が見られる重篤な疾患である。しかしながら、その原因は不明であり有効な治療法も確立されていない。我々はT細胞活性化機構の解析過程で作製した OX40L 遺伝子導入マウスが C57BL/6 系統依存的に IBD を自然発症することを見出した。そこで、同マウスの系統依存的 IBD 発症を利用した遺伝子連鎖解析を行い、有力な IBD 感受性遺伝子座をマウス第 4 番染色体上に同定した。同部位の疾患発症との相関は QTL 解析で Lod score = 7.9 と極めて有意であった。さらに、同部位はヒト IBD 感受性遺伝子座として報告されている部位、IBD7 と syntenic であった。解析を続けた結果、候補遺伝子を 65 個にまで限定した。その中には膜型蛋白や細胞周期制御蛋白をコードする遺伝子が多く含まれている。本研究では、同遺伝子座に含まれる IBD 発症感受性遺伝子を同定し、IBD 発症との関連性を明らかにする。さらに同定された遺伝子の欠損マウスまたは遺伝子導入マウスを作製の上、OX40L 遺伝子導入マウスと交配し、その遺伝子の IBD 発症関与機構を個体レベルで明らかにする。また、同定されたマウス IBD 発症感受性遺伝子について IBD 患者のホモログ遺伝子変異および多型を検討し、IBD7 に位置するヒト IBD 感受性遺伝子の同定を試みる。

<2007 年度の研究の当初計画>

1) マウス IBD 感受性遺伝子の同定と機能解析

前年度の研究により同定した IBD 発症感受性遺伝子座に位置する候補遺伝子の中で、機能が明らかにされているものを中心として C57BL/6 系統と BALB/c 系統ゲノム配列と各遺伝子の発現量の差異を検索し、その結果により、候補遺伝子を特定する。既に、それら遺伝子中で、感受性系統 (C57BL/6) でのみ発現量が強く減弱している遺伝子を見出した。さらに同遺伝子の発症感受性系統と発症抵抗性系統間の遺伝子多型と IBD 発症との相関は χ^2 検定で $p = 1.2 \times 10^{-8}$ と極めて有意であった。その遺伝子は TNF 受容体型タンパク質 HVEM (herpes virus entry mediator; TNFRSF14) をコードしていた。従って、C57BL/6 系統特異的にみられる IBD の発症には OX40 刺激増強と HVEM 発現低下の少なくとも 2 つの条件が必要であることが分かった。そこで、同遺伝子を C57BL/6 系統に遺伝子導入し、HVEM 発現を回復した HVEM 遺伝子導入マウスを作製し、OX40L-Tg マウス (炎症性腸疾患発症マウス) と交配することにより、OX40L-Tg マウスにおける IBD 発症が抑制されるかどうかを検討する。また、同分子に対する単クローン抗体を作製し、HVEM の腸炎発症における機能を明らかにする。同遺伝子座に位置する他の候補遺伝子についても同様の手法で解析する。また、HVEM の受容体である BTLA が T 細胞活性化抑制分子であることから、炎症性発症機序のひとつとして、BTLA シグナルの減弱が考えられる。そこで、BTLA に対する単クローン抗体を作製し、マウスに投与することに

より炎症性腸疾患発症における HVEM-BTLA 系の関与機序を解析する。

2) ヒト IBD 感受性遺伝子の検索

興味深いことに、マウスで同定された IBD 発症関連遺伝子 HVEM (TNFRSF14) および OX40 (TNFRSF4) は共に、TNF 受容体型分子であり、ヒト IBD 感受性遺伝子座 IBD7 に位置する。これまで、我々は邦人クローン病発症と TNFSF2 や TNFSF15 の遺伝子多型との関連性を報告しており、TNF (受容体) 型分子と IBD 発症との関連性は強く示唆されている。さらに、OX40L の受容体である OX40 や制御性 T 細胞機能制御に関与するとされる GITR 遺伝子も同一遺伝子座に位置し、HVEM、OX40、GITR などの TNF 受容体型分子が IBD7 にクラスターを形成している。従って、ヒトにおいても HVEM 自身か、OX40 などのファミリー分子の遺伝子多型あるいは変異が IBD 発症に関与する可能性が想定される。そこで、ヒト IBD 患者のそれら遺伝子の塩基配列を決定し、それら遺伝子の多型 (変異) と IBD 発症との関連性を検討する。

<2007 年度の成果>

1) マウス IBD 感受性遺伝子の同定と機能解析

HVEM 遺伝子の発現低下が IBD 発症に直接関与することを証明するために C57BL/6 系統下に 2 種類の HVEM 遺伝子導入マウスを作製した。 β アクチンプロモータ下に全身組織に可溶性 HVEM タンパクを発現するマウスと、lck プロモータ下に T 細胞特異的に膜型 HVEM タンパクを発現するマウスである。これらのマウスを OX40L 遺伝子導入マウスと交配した。その結果、可溶性 HVEM 発現遺伝子導入マウスでは OX40L 遺伝子導入マウスの IBD 発症は抑制できなかったが、膜型 HEM 発現遺伝子導入マウスでは IBD 発症が抑制する傾向が得られた (投稿準備中)。現在、OX40 と HVEM の IBD 発症における関与機構を解析中である。また、HVEM と BTLA の結合を阻害する抗 BTLA 単クローン抗体を作製した。同抗体をマウス GVHD モデルに投与したところ、GVHD を有意に抑制した (第 37 回日本免疫学会で発表)。従って、HVEM-BTLA 結合は GVHD などの炎症反応に強く関与することが示唆された。HVEM-BTLA 結合の IBD 発症への関与についても抗 BTLA 単クローン抗体を用いて検討中である。

2) ヒト IBD 感受性遺伝子の検索

公表されているデータベース情報に基づいて 8 ヶ所の HVEM (TNFRSF14) 遺伝子多型と IBD (クローン病、潰瘍性大腸炎) 発症との関連を各 300 例の患者ゲノム検体と健常人コントロール 300 例を用いて解析した。その結果、TNFRSF14 遺伝子の個々の多型、多型ハプロタイプと IBD 発症との有意な関連は証明できなかった。現在 OX40 (TNFRSF4) および TNFRSF14 リガ

ンド (LIGHT = TNFSF14: ヒト IBD 発症感受性遺伝子座 IBD5 に存在する) の遺伝子多型・変異について解析中である。

<国内外での成果の位置づけ>

同定された IBD 関連分子の機能を直接解析できる動物モデルを有する点が、他の類似研究に対して大きな優位性を有すると考えられる。実際に、膜型 HEM 発現遺伝子導入マウスでは IBD 発症が抑制する傾向を得ており、疾患感受性分子の疾患発症関与機構まで解析可能である点が本研究の最も優れた点である。本研究が完遂できれば、IBD 発症機構の解明のみならず HVEM を標的とした分子標的治療の開発が可能になると考えられる。他方、我々は潰瘍性大腸炎患者ゲノム検体を 300 例以上有しておりその検体数は国内最大規模であると思われる。これまで潰瘍性大腸炎の妥当な発症感受性遺伝子は報告がないことから、今後の我々の研究により、同分野の研究が大きく進展する可能性が期待される。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

1) マウス IBD 感受性遺伝子の同定と機能解析

順調に遺伝子導入マウスが作製され、交配も順調であった。しかし、マウスが IBD を発症するのに少なくとも 25-30 週を要し、さらに十分な疾患発症率を得るためには 40 週以上を必要とした。従って、年度内に十分な交配マウスを解析することができず、次年度への課題として残った。他方、HVEM の新たな受容体として CD160 が同定され、BTLA とともに T 細胞免疫反応に抑制的に機能することが示された (Nat Immunol 9, 86, 2008)。しかしながら CD160 は GPI アンカー型分子であり、細胞内にシグナルを伝達できる構造を有していない。従って、IBD 発症制御と CD160 との関連性は全く不明である。今後、IBD 発症における CD160 と BTLA の機能的相違・冗長性について解析する必要がある。IBD 発症機構の理解がより複雑となった。

2) ヒト IBD 感受性遺伝子の検索

HVEM (TNFRSF14) 遺伝子の個々の多型と多型ハプロタイプと IBD (クローン病、潰瘍性大腸炎) 発症との関連を各患者ゲノム検体で解析したが有意な結果が得られなかった。しかし、JSNP で公開されていない多型の関与や、遺伝子変異の存在を否定できておらず、可能であれば、HVEM (TNFRSF14) の全ゲノム配列を全ての患者で決定すべきであったと考えられる。また、OX40 や LIGHT ゲノム解析の進行が遅れ、終了できなかった。次年度までに終了させる予定である。

<今後の課題>

1) マウス IBD 感受性遺伝子の同定と機能解析

交配マウスの IBD 発症頻度と組織炎症強度の解析を継続して行い、HVEM 発現回復による IBD 発症抑制を証明する。同時に、HVEM の受容体である BTLA の遺伝子欠損マウスと OX40L 遺伝子導入マウスを BALB/c 系統 (発症抵抗性) で交配し、HVEM-BTLA シグナル欠損により抵抗性系統で IBD 発症を誘導できるかを検討し、HVEM-BTLA 系の IBD 発症における関与機構を明らかにする。さらに、抗 BTLA 抗体による GVHD などの in vivo 炎症反応抑制効果が確認されたことから、抗体を用いることにより、HVEM-BTLA 系を標的とした IBD 治療法を開発を目指す。他方、新たに同定された HVEM の受容体である CD160 の IBD 発症への関与の有無を検討し、同分子を標的とした IBD 治療法開発の可能性も検討する。

2) ヒト IBD 感受性遺伝子の検索

ヒト IBD 患者の HVEM (TNFRSF14) 遺伝子多型検索が終了したが、有意な結果は得られなかったが、希少多型や遺伝子変異の関与を否定されていない。そこで、それらを同定する目的で、HVEM (TNFRSF14) の全ゲノム配列を全ての患者で決定する予定である。同様に IBD7 遺伝子座に存在する OX40、GITR などの他の TNFR 型 (TNFRSF) 遺伝子の多型・変異についても解析を行い、IBD7 の IBD 感受性遺伝子の同定を継続して行う。他方、HVEM のリガンドの 1 つである LIGHT がヒト IBD 感受性遺伝子座 IBD5 に存在し、IBD5 には TNF リガンド型 (TNFSF) 遺伝子が数個存在することから、IBD5 に存在する TNFSF 型遺伝子の多型・変異を検索し、ヒト IBD 発症感受性遺伝子の同定を試みる。

<成果公表リスト>

- 0801281107
Zaini, J., Ishii, N., Kikuchi, T. (5/10): OX40 ligand in dendritic cells can costimulate NKT and CD4⁺ helper T cell antitumor immunity.,
J. Clin. Invest. 117: 3330-3338 (2007)
- 0801281105
Soroosh, P., Ine, S., Sugamura, K., and Ishii, N.: Differential requirements for OX40 signals on generation of effector and central memory CD4⁺ T cells.
J. Immunol. 179: 5014-5023 (2007)
- 0801281103
Onoda, T., Ishii, N., Asao, H. (8/12): Human CD4⁺ central and effector memory T cells produce IL-21: effect on cytokine-driven proliferation of CD4⁺ T cell subsets.
Int. Immunol., 19: 1191-1199 (2007)
- 0801281058
Vu, MD, Xiao, X., Gao, W., Degauque, N., Chen, M., Kroemer, A., Killen, N., Ishii, N., and Li, X.C.: OX40 costimulation turns off FOXP3⁺ TREGS.
Blood, 110: 2511-2519 (2007)
- 0801281100
Jenkins, S.J., Perona-Wright, G., Worsley, A.G.F., Ishii, N, and MacDonald, A.S.: Dendritic cell expression of OX40 ligand acts as a costimulatory, not polarizing, signal for optimal Th2 priming and memory induction in vivo.
J. Immunol. 179: 3515-3523 (2007)
- 0801281055
Toyoshima, M., Tanaka, N., Ishii, N., Sugamura, K. (8/10): Inhibition of tumor growth and metastasis by depletion of vesicular sorting protein Hrs: its regulatory role on E-Cadherin and β -Catenin.
Cancer Res, 67: 5162-5171 (2007)
- 0705071048
Nakano, M., Satoh, K., Fukumoto, Y., Ito, Y., Kagaya, Y, Ishii, N., Sugamura, K., and Shimokawa, H.: Important role of erythropoietin receptor to promote VEGF expression and angiogenesis in peripheral ischemia in mice.
Circ. Res., 100: 662-669 (2007)