

# 炎症性腸疾患の発症に関与する疾患感受性遺伝子の同定とbiomarkerとして遺伝子診断への応用

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 佐藤 加代子

## [背景・目的]

炎症性腸疾患は潰瘍性大腸炎(ulcerative colitis: UC)とクローン病(Crohn's disease: CD)に大別され、共に免疫応答における防御機構の異常と制御機構の破綻が原因と考えられている。また、難治性、易再発性、治療効果の個人差、QOLの低下および癌化といった諸問題を有することから、発病の分子機序の解明と共に高リスク群の患者を検出できる遺伝子診断法が求められている。高い家族集積性と一卵性双生児における一致率から遺伝因子の関与が大きい疾患の一つで、この遺伝因子(疾患感受性遺伝子)を同定するために、全ゲノムを対象とした相関解析や候補遺伝子アプローチ法による症例-対照研究が盛んに行われている。

本研究では、自己抗体産生を担うB細胞のシグナルに関連している遺伝子(B細胞活性化シグナル関連遺伝子や抑制遺伝子)や、免疫応答において重要な役割を果たしている炎症性サイトカイン(特にIL-6やIL-12ならびにIL-23)により活性化される細胞内シグナル伝達分子を候補遺伝子とした。そして、これらの遺伝子多型の出現頻度を患者群と健常者群間で有意差検定を行うことで、疾患感受性遺伝子を同定した。次に、同定した感受性遺伝子の多型が発症を予測できるバイオマーカーとなりうるかを検証した。

## [実験方法]

UC患者114名をUC群、CD患者83名をCD群、健常者200名をコントロール群とした。B細胞活性化機序や炎症性サイトカインの細胞内シグナル伝達分子の中から10の候補遺伝子(*TACI/BCMA/APRIL/BAFF/STAT3/TYK2/FCGR2B/SHIP/CD72/SHP-1*)を選出した。候補遺伝子内に存在するsingle nucleotide polymorphisms (SNPs)を、(1) PCR-restriction fragment length polymorphism法(22 SNPs)、(2) PCR-direct DNA sequencing法(6 SNPs)、および(3) high-resolution melting curve analysis (HRMC)分析法(2 SNPs)で検出した。また、1つのrepeat多型をsimple PCR法で解析した。次に、有意差を示したSNPsを組み合わせ、haplotypes および diplotypes を構築した。そして、疾患群とコントロール群間で、多型の出現頻度を有意差検定した。最後に、同定した疾患感受性遺伝子の多型をbiomarkersとして遺伝子診断に用いた場合の感度と特異度を算出した。

## [結果]

- (1) *BAFF* の Hap 1/Hap 2 diplotype を持つヒトは CD 群に有意に少なかった( $P = 0.023$ )。
- (2) *BAFF* の Hap 2/Hap 2 diplotype を持つヒトは CD 群に有意に多かった ( $P = 0.008$ )。

- (3) *STAT3* の rs2293152 SNP で、C allele と C/C genotype の出現頻度が CD 群で有意に高かった ( $P = 0.007$  と  $P = 0.001$ )。
- (4) *TYK2* の Hap 1/Hap 1 diplotype を持つヒトは CD 群に有意に多く、Hap 1/Hap 2 diplotype を持つヒトは CD 群に有意に少なかった ( $P = 0.024$  と  $P = 0.045$ )。
- (5) *FCGR2B* の rs1050501 SNP の T/T genotype の出現頻度は UC 群で有意に低く、T/C genotype の出現頻度は UC 群で有意に高かった ( $P = 0.015$  と  $P = 0.003$ )。
- (6) *CD72* の rs2095858 SNP の T/T genotype の出現頻度は UC 群で有意に高かった ( $P = 0.038$ )。
- (7) UC 発症を予測する biomerker (遺伝子多型の組み合わせ)として用いた場合、「*CD72 + APRIL*」が最もバランスのよい組み合わせであった ( $P = 0.025$ , OR = 2.353, 感度 15.1%, 特異度 93.0%)。(Table 12-3 参照)
- (8) CD 発症を予測するために、「*BAFF + TYK2*」の biomerker は特異度は高かったが、感度が極めて低かった ( $P = 0.026$ , OR = 3.449, 感度 9.6%, 特異度 97.0%)。(Table 12-4 参照)

Table 12-3. The combination effect of *FCGR2B* genotype, *CD72* genotype, *APRIL* genotype and *BAFF* genotype for susceptibility to

| Factor                       | Factor comparison *  |         | sensitivity (%) | specificity (%) |
|------------------------------|----------------------|---------|-----------------|-----------------|
|                              | OR (95% CI)          | P value |                 |                 |
| FCGR2B                       | 2.344 (1.422-3.866)  | 0.001†  | 46.1            | 71.0            |
| CD72                         | 2.611 (1.138-5.989)  | 0.023†  | 29.8            | 80.5            |
| APRIL                        | 1.847 (1.116-3.057)  | 0.017†  | 69.3            | 44.5            |
| BAFF                         | 2.032 (1.164-3.546)  | 0.013†  | 13.2            | 94.0            |
| FCGR2B + CD72                | 3.682 (0.903-15.018) | 0.069   | —               | —               |
| FCGR2B + APRIL               | 2.012 (1.112-3.639)  | 0.021†  | 23.9            | 86.5            |
| FCGR2B + BAFF                | —                    | —       | —               | —               |
| CD72 + APRIL                 | 2.353 (1.112-4.976)  | 0.025†  | 15.1            | 93.0            |
| CD72 + BAFF                  | —                    | —       | —               | —               |
| APRIL + BAFF                 | 2.269 (0.597-8.626)  | 0.229†  | 4.4             | 98.0            |
| CD72 + APRIL + BAFF          | 1.777 (0.110-28.682) | 0.685†  | 0.8             | 99.5            |
| FCGR2B + APRIL + BAFF        | 3.633 (0.655-20.155) | 0.14    | —               | —               |
| FCGR2B + CD72 + BAFF         | —                    | —       | —               | —               |
| FCGR2B + CD72 + APRIL        | 1.012 (0.290-3.534)  | 0.985†  | 3.5             | 96.5            |
| FCGR2B + CD72 + APRIL + BAFF | —                    | —       | —               | —               |

\* Factors were statistically analyzed by multivariate logistic regression analysis.

Abbreviation: OR, odds ratio; CI, confidence interval

†  $P < 0.05$  as compared with control subjects

Table 12-4. The combination effect of *BAFF* diplotype and *TYK2* diplotype for susceptibility to CD

| Factor      | Factor comparison *  |         | sensitivity (%) | specificity (%) |
|-------------|----------------------|---------|-----------------|-----------------|
|             | OR (95% CI)          | P value |                 |                 |
| BAFF        | 3.030 (1.400-6.557)  | 0.005†  | 19.3            | 92.0            |
| TYK2        | 3.483 (1.672-7.257)  | 0.001†  | 44.6            | 69.5            |
| BAFF + TYK2 | 3.449 (1.158-10.274) | 0.026†  | 9.6             | 97              |

\* Factors were statistically analyzed by multivariate logistic regression analysis.

Abbreviation: OR, odds ratio; CI, confidence interval

† P < 0.05 as compared with control subjects

## [考 察]

日本人における UC の疾患感受性遺伝子として 4 つの遺伝子 *FCGR2B*, *CD72*, *APRIL* および *BAFF* を、CD の疾患感受性遺伝子として 3 つの遺伝子 *BAFF*, *STAT3* および *TYK2* を同定した。同定した疾患感受性遺伝子のうち、遺伝子診断の biomarkers として用いることができたのは、UC で 4 つ、CD で 2 つであった。今後も、複数の疾患感受性遺伝子多型を組み合わせ、高感度で高特異度な遺伝子診断法を確立し、多くの患者を用いた cohort 研究へと進めていきたい。そしてテーラーメイド医療の実現に繋げたい。家族集約性を認める疾患だけに<sup>7-9)</sup>、家族や親類内で発症しやすい人を検出する発症前診断に応用できるであろう。

また、これらの遺伝子産物の機能解析が進めば、IBD の発症機序や UC と CD の発症の違いを分子レベルで解明できる手掛かりとなるかもしれない。さらに、分子機序から標的となる分子に着目したゲノム創薬によって本疾患の治療薬の開発に繋がる可能性も高い。

## [基礎となった学術論文]

1. Sato K, Shiota M, Fukuda S, Iwamoto E, Machida H, Inamine T, Kondo S, Yanagihara K, Isomoto H, Mizuta Y, Kohno S, Tsukamoto K. Strong evidence of a combination polymorphism of the tyrosine kinase 2 gene and the signal transducer and activator of transcription 3 gene as a DNA-based biomarker for susceptibility to Crohn's disease in the Japanese population. *J Clin Immunol* 29:815-825, 2009.
2. Sato K, Tsukamoto K *et al.* Polymorphisms of *CD72* is associated with susceptibility to ulcerative colitis in the Japanese population. In preparation.
3. Sato K, Tsukamoto K *et al.* Haplotypes of the B cell activating factor gene are associated with susceptibility to inflammatory bowel disease in the Japanese population. In preparation.
4. Sato K, Tsukamoto K *et al.* Single nucleotide polymorphism of *FCGR2B* is associated with susceptibility to ulcerative colitis in the Japanese population. In preparation.