

学 位 論 文 要 約

博士論文題目クローン病と潰瘍性大腸炎における腸管粘膜固有層 CD4⁺ effector memory T cell の

DNA メチル化の比較検討

氏名.....松下 勝則.....

【背景・目的】炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease : IBD) は、主として消化管に原因不明の炎症を起こす慢性疾患の総称であり、狭義ではクローン病 (Crohn's disease : CD) と潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis : UC) の異なる 2 疾患を指す。本 2 疾患は遺伝因子と環境因子が相互に関与しながら発症してくる多因子疾患と考えられている。近年、環境因子と遺伝因子の相互作用を仲介するメカニズムの一つとして、或いは CD と UC の疾患表現型の差異を生み出すメカニズムとして、エピゲノム制御 (特に DNA メチル化) が注目を集めている。本研究では、CD と UC の病態に重要な役割を担っている腸管局所の CD4⁺ effector memory T cell (Tem) を対象に、DNA メチル化の CD と UC における差異を明らかにし、さらに CD と UC の Tem におけるアポトーシス感受性の差が、エピゲノム制御 (特に DNA メチル化) により調節を受けている可能性を示すことを目的とした。

【方法】活動期 CD 13 例、活動期 UC 5 例の手術標本を対象とし、lamina propria mononuclear cells を分離後、さらに MACS にて腸管局所の Tem を分離した。Illumina 450K を使用して CD と UC の Tem の網羅的 DNA メチル化比較解析を行い、有意差を認めたプローブが位置する遺伝子リストを抽出し、そのリストに対して GO 解析と Pathway 解析を行った。また、CD と UC の Tem におけるアポトーシス感受性の差異と DNA メチル化との関連を検討するために、脱メチル化剤 (5-AZA) による脱メチル化誘導が Tem のアポトーシス感受性にどのように影響を与えるかについて検討した。なお、アポトーシスの検出は FACS を用いた Annexin V Assay で、遺伝子発現解析には Agilent Expression Array を使用した。

【結果】CD と UC の Tem の網羅的 DNA メチル化比較解析 (probe-wise analysis) では、4086 のプローブで有意差を認め、そのうち 3073 のプローブで CD の方が高メチル化されており、1013 のプローブで UC の方が高メチル化されていた。また遺伝子をもとにした解析 (gene-wise analysis) では、有意差を示したプローブの存在する遺伝子は 2169 であり、そのうち 1450 の遺伝子で CD の方が高メチル化されており、719 の遺伝子で UC の方が高メチル化されていた。それらの遺伝子リストを用いた GO 解析では、T cell activation、immune response、T cell differentiation、apoptosis に関わる遺伝子が有意に多く含まれていた。Pathways 解析では、T cell receptor signaling、T helper cell differentiation、death receptor signaling に関わる遺伝子が有意に多く含まれていた。アポトーシス感受性に関する検討では、5-AZA による脱メチル化誘導にて CD の Tem のアポトーシス抵抗性が解除された。その際、メチル化に差を認め、かつ発現にも差を認めたアポトーシス関連遺伝子群の中で、脱メチル化誘導にて遺伝子の発現上昇を確認することができたのは、25 のアポトーシス関連遺伝子であった。

【結論】本研究の網羅的な DNA メチル化比較解析により、①CD と UC の Tem における DNA メチル化の差異について明らかにし、②その差異を示した遺伝子リストをもとに、特徴的な生物学的プロセスやシグナル経路を抽出した。さらに③抽出された生物学的プロセスのひとつであるアポトーシス関連遺伝子群の DNA メチル化とアポトーシス感受性との関連を示し、④DNA メチル化で制御され、かつ CD のアポトーシス抵抗性を規定する可能性のある 25 の候補遺伝子を抽出した。以上の 4 点を本研究により明らかにした。