

論文の内容の要旨

論文題目

炎症性腸疾患の感受性遺伝子の同定：腸管ムチン遺伝子 MUC3A の多型が
潰瘍性大腸炎と Crohn 病の発症リスクに与える効果について

指導教官 名川弘一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 姜 建宇

炎症性腸疾患はさまざまな遺伝的要因や環境要因が複雑に絡み合って発症する多因子性疾患であると考えられている。186 対の炎症性腸疾患の兄弟発症例を用いて行った連鎖解析では、マーカーD12S83、D7S669 そして D3S1573 の近傍に炎症性腸疾患の感受性遺伝子が存在する可能性が高いことが示されている（ロッド・スコアはそれぞれ 5.47、3.08、2.69）。このマーカーD7S669 の近傍に主に腸管に発現しているムチン遺伝子‘MUC3’が存在することから、‘MUC3’が実際に炎症性腸疾患の発症に関与するかどうか調べるのがこの研究の目的である。

ムチンは分泌型と膜結合型に分けられ、粘膜の保護・潤滑剤としての機能の他に、特に膜結合型では上皮細胞の接着や増殖、細胞内シグナル伝達、免疫機能の調整などに関しても重要な役割を持つ。ここでは‘MUC3’の3’領域の構造を明らかにすることによって、これがこれまで考えられていたような分泌型のムチンをコードする単一の遺伝子ではなく、ともに膜結合型のムチンをコードする2つの遺伝子 MUC3A と MUC3B から成ることを示し、このうち MUC3A が潰瘍性大腸炎と Crohn 病の発症に異なったメカニズムで関与する可能性があることを示す。

実験と結果

1. 3'領域の構造解析

‘MUC3’の報告されている分子量から推定される遺伝子の大きさとこれまでに報告された‘MUC3’の塩基配列との対比から‘MUC3’は2つの遺伝子から成ると考え、Human Gene Nomenclature Committeeの提案に従ってこれらをMUC3A、MUC3Bと命名した。これまでに報告された‘MUC3’の塩基配列を基に制限酵素 PvuII を用いた Southern 解析を行った結果、MUC3A と MUC3B の3'領域の塩基配列は相同性が高いと考えられた。このことから PvuII フラグメント内に含まれる MUC3A と MUC3B の3'領域の塩基配列を明らかにし、これを基に RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法と PCR (polymerase chain reaction) により両遺伝子の3'領域の cDNA 配列とゲノム配列を調べた。この2つの遺伝子の3'領域は cDNA 配列で 94.1%、ゲノム配列で 91.3%一致し、推定アミノ酸配列は 94.9%一致していた。両遺伝子とも3'領域は2つの epidermal growth factor (EGF) モチーフと1つの膜貫通領域を含む11個のエクソンから成っていた。細胞内領域にはチロシン残基を1つ認め、これは YVAL というアミノ酸配列をとっていた。これが Src homology 2 (SH2) ドメインを持つ蛋白に認識され細胞内シグナル伝達に関与する特異的なモチーフであることから、このモチーフを介した細胞内シグナル伝達が両遺伝子の機能にとって重要であると思われた。

2. MUC3A と潰瘍性大腸炎との関連

制限酵素 PvuII を用いた Southern 解析により、MUC3A が翻訳領域内に含む 51 bp リピートの VNTR (variable number of tandem repeats) 多型と潰瘍性大腸炎との関連について調べた。ここでは HRAS1 VNTR の多型解析法に従って、コントロールに於いて5%以上の頻度で見られたアレルを common allele、5%未満のアレルを rare allele と定義し、rare allele を持つ人の頻度を患者群とコントロールで比べた。まず、日本人で潰瘍性大腸炎患者 75 人とコントロール 168 人について解析を行った。日本人では3種類の common allele と14種類の rare allele を認め、rare allele を持つ人はオッズ比 2.72 (95%信頼区間 1.17-6.32, $p=0.0308$) で潰瘍性大腸炎を発症するリスクが高かった。この結果を確認するために白人のサンプルを用いてさらに2段階の試験を行った。コントロール 171 人と、潰瘍性大腸炎患者は第1段階で 72 人、第2段階で 85 人について調べ、4種類の common allele と9種類の rare allele を認めた。rare allele を持つことによる潰瘍性大腸炎発症のオッズ比は第1段階で 2.80 (1.36-5.75, $p=0.0079$)、第2段

階で 2.43 (1.20-4.92, p=0.0196)、併せて 2.60 (1.41-4.80, p=0.0024) であった。日本人と白人でオッズ比は統計学的に同等であることから ($\chi^2 = 0.006$) Mantel-Haenszel 法により両者を併せると、オッズ比は 2.64 (1.60-4.33, p=0.0001) で rare allele を持つ人は潰瘍性大腸炎を発症するリスクが有意に高かった。

3. MUC3A と Crohn 病との関連

1) MUC3A・MUC3B 遺伝子の 3'領域の一塩基多型の解析

MUC3A・MUC3B 遺伝子の 3'領域の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) が炎症性腸疾患の感受性と関連しているかどうか調べるため、まず、潰瘍性大腸炎患者 30 人と Crohn 病患者 30 人についてエクソン領域の SNP をスクリーニングし、ここで認めた各 SNP に対してコントロールに於ける各アレルの頻度を ASO (allele-specific oligonucleotide hybridization) 法または direct sequencing 法により調べた。

2) MUC3A と Crohn 病との関連

1)で認めた MUC3A と MUC3B の各 SNP に対して、72 人の潰瘍性大腸炎弧発例と 59 人の Crohn 病弧発例、42 対の Crohn 病兄弟発症例 (84 人) について、1) と同様に各アレルの頻度を調べた。MUC3A の nt 2557 では T/A/C という多型が見られ、2557T (853Y) の場合には SH2 ドメインを持つ蛋白を介したシグナル伝達に関与するモチーフを形成するが、このモチーフを形成しないアレル (A/C) の頻度 [f(A,C)] がコントロールで 0.43 に対し Crohn 病兄弟発症例の年少者のグループでは 0.61 (オッズ比 2.07, 95%信頼区間 1.26-3.40, p=0.0042)、年長者のグループでは 0.60 (1.97, 1.20-3.23, p=0.0075) と Crohn 病兄弟発症例で有意に高かった。潰瘍性大腸炎弧発例および Crohn 病弧発例では各アレルの頻度はコントロールと差がなかった。MUC3B の nt 2560 でも同様の多型を認めたが関連は全く見られず、MUC3A と Crohn 病兄弟発症例との関連は信頼性が高いと思われた。次に MUC3A が小腸に多く発現していることからこの関連を疾患部位別に別けて解析すると、小腸型では f(A,C)は 0.66 (2.59, 1.40-4.81, p=0.0026)、小腸・大腸型では 0.59 (1.95, 1.19-3.19, p=0.0077)、大腸型では 0.44 であり、小腸型でもっとも強い関連を認めた。また、genotype 別に発症年齢を比べると、アレル A または C を持つ場合には発症年齢が早くなる傾向があった。

考察

‘MUC3’は翻訳領域内に含む長い反復配列のためにクローニングが非常に困難だが、ここでは RACE 法と PCR によって 3’領域の cDNA 配列とゲノム配列を解析し、‘MUC3’が 2 つの膜結合型ムチン MUC3A、MUC3B から成ることを明らかにした。そして、MUC3A・MUC3B が存在する染色体 7q22 においてクラスターを形成するムチン遺伝子の構造的な類似性から、これらは共通の遺伝子に由来し、その EGF モチーフから SH2 ドメインを持つ蛋白を介した細胞内シグナル伝達がこれらの遺伝子に共通する特徴であると考えられた。

MUC3A の 51bp リピートの反復単位の数通常と異なる rare allele を持つ人はオッズ比 2.64 で潰瘍性大腸炎に罹患する危険性が高いことを示した。翻訳領域の VNTR 多型によって蛋白の構造が変化する例が知られているが、ここでも MUC3A の rare allele によってコードされるムチン蛋白はその構造が変化していることが考えられる。そして、このような構造異常がこれまでに報告されている潰瘍性大腸炎患者にみられる異常（ムチンの易分解性、大腸ムチン組成の変化、大腸粘膜細胞表面の糖蛋白に対する抗体の存在など）に關与する可能性が考えられた。

Crohn 病兄弟発症例では、SH2 ドメインを持つ蛋白を介したシグナル伝達機構を持たないと思われる MUC3A のアレルの頻度が有意に高かった。Crohn 病では小腸での透過性が亢進していることが知られているが、傍細胞経路の透過性は tight junction によって制御される。これは多くのサイトカインや成長因子、複数のシグナル伝達、さらにさまざまな環境要因に影響されるが、この関連が小腸型で最も強く見られたことや MUC3A が EGF モチーフを持つことなどから、MUC3A が tight junction の機能に影響する因子のひとつである可能性が考えられる。

MUC3A は潰瘍性大腸炎と Crohn 病の発症に異なったメカニズムで關与すると考えられた。そして、Crohn 病兄弟発症例では兄弟間で感受性遺伝子を多く共有することで疾患感受性が高くなるものと思われた。