

機関番号：11301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590735

研究課題名 (和文) クローン病感受性遺伝子 *TNFSF15* の遺伝子多型機能解析研究課題名 (英文) Functional analyses of *TNFSF15* as a susceptibility gene for Crohn's disease.

研究代表者

木内 喜孝 (KINOUCHI YOSHITAKA)

東北大学・高等教育開発推進センター・准教授

研究者番号：20250780

研究成果の概要 (和文) : クローン病発症に影響を与える *TNFSF15* 遺伝子多型について、どのような機序で影響を与えるのか解析した。その結果、-358T/C 多型が活性化 T 細胞において *TNFSF15* 遺伝子の転写活性に影響を与えることを確認した。またその機序として、-358T/C における転写因子結合の差が関与していることを示した。当初その転写因子は GATA3 と予想していたが、GATA3 ではないことを確認した。

研究成果の概要 (英文) : *TNFSF15* is a susceptibility gene for Crohn's disease (CD). We speculated that one or more of the SNPs associated with CD may act as cis-regulatory SNPs. To reveal the effects of the SNPs on the transcriptional activity of *TNFSF15*, we first examined the allelic expression imbalance of *TNFSF15* in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). When PBMCs stimulated by phytohemagglutinin (PHA) were examined, the allelic ratio of mRNA transcribed from the risk haplotype to the non-risk haplotype increased, compared with the ratio without stimulation. When peripheral blood T cells and Jurkat cells stimulated by phorbol 12-myristate 13-acetate + ionomycin were examined, an allelic expression imbalance similar to that observed in PBMCs stimulated by PHA was confirmed. The promoter assay in stimulated Jurkat cells showed that the luciferase activity of the promoter region (-979 to +35) of the risk haplotype was significantly higher than that of the non-risk haplotype, and deletion and mutagenesis analysis demonstrated that this difference resulted from the -358T/C SNP. The promoter activity of -358C (risk allele) was higher than that of -358T (non-risk allele) in stimulated T cells. This effect of -358T/C on the transcriptional activity in stimulated T cells may confer susceptibility to CD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：消化器内科

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：クローン病、感受性遺伝子、*TNFSF15*、allelic expression imbalance

1. 研究開始当初の背景
クローン病は消化管を冒す特発性炎症性疾

患であり、未だ病因は不明である。一卵性双生児研究、高家族内発症率から、遺伝的要因

の発病への関与が明らかな多因子疾患と考えられている。この遺伝的要因を明らかにするため或いは感受性遺伝子を特定するために、主に2つの遺伝学的方法を用いて解析がなされてきた。一方が連鎖解析であり、他方が相関解析である。欧米において罹患同胞対を用いた連鎖解析及び、ポジショナルクローニングが施行され、現在までクローン病感受性遺伝子として *CARD15 (NOD2)* 遺伝子、*OCTN1/2* 遺伝子が報告されている。しかし申請者らの検討で、*CARD15* (Gastroenterology, 2002)、*OCTN1/2* 遺伝子 (Scand J Gastroenterol, 2006) とともに、日本人クローン病においては感受性を規定していないことが明らかとなった。そこで、日本人クローン病の感受性遺伝子を同定するために、本申請者らも含め多数の感受性候補遺伝子解析(相関解析)が行われ、いくつかの日本人クローン病感受性遺伝子を同定し報告してきた。その中で、日本と欧米人共通に感受性を示した遺伝子が、*TNF α* 遺伝子である。本申請者らは、まず日本人クローン病と *TNF α* 遺伝子の5'領域多型が相関すること、英国においてもクローン病と相関すること、さらに相関する多型の機能解析を行い、報告してきた (Gastroenterology, 1999, Hum molecular Genetics, 2002)。また臨床的にも、*TNF α* に対する中和抗体を投与することで短期間に緩解を導入できることがわかり、その分子の重要性については既にコンセンサスができています。

一方、*TNF α* だけに限らず、*TNF ligand/receptor family* は、腸管を含む粘膜免疫に強く関与することが多数の遺伝子改変マウスを用いた解析より確認されている。このような *TNF ligand/receptor family* の炎症性腸疾患との関連が蓄積されていくなかで、2005年になり *TNF ligand superfamily 15 (TNFSF15)* 遺伝子多型とクローン病との間で相関を示すことが報告された。その後申請者らの施設においても、*TNFSF15* 遺伝子多型と日本人クローン病と相関が認められることを、確認し報告した (Gut, 2006)。*TNFSF15* は、主にマクロファージ・樹状細胞等の抗原提示細胞にて産生され、抗原刺激を受けたTリンパ球の (Death receptor 3 を介して) γ インターフェロンの産生を亢進させ、Th1優位の免疫反応を促進する作用を有する分子であり、既にクローン病の炎症局所でm-RNAレベル、蛋白レベルで高発現されていることが確認されている。本申請者らの検討では、*tnfsf36* (-640A/G) と *tnfsf35* (-358T/C) の5'領域に存在する多型において、 $p=1.84 \times 10^{-6}$ 、odds ratio=1.85 と最も強い相関を認めた。(なお、*tnfsf36* と *tnfsf35* は完全連鎖しており、 p 値や odds ratio は両多型で同じ値を示している)。

引き続きこの遺伝子周囲の多型についても相関解析を行い、相関マッピングを行ったが、これ以上の相関を示す遺伝マーカーは認められなかった。以上より、*tnfsf36* と *tnfsf35* の両多型が集団遺伝学的に、日本人クローン病の感受性を左右していることが本申請者らの結果により示された。

それでは、どのようにこの両多型がクローン病感受性を左右しているのかが問題となる。一般的に SNP が疾患感受性に影響を与えるメカニズムとして、①アミノ酸置換による変異蛋白が機能異常を示す場合、②転写開始部位の変更あるいはスプライシング異常による変異蛋白の出現或いは蛋白発現異常、③転写活性或いはm-RNAの安定性への影響等が考えられる。一方、日本人が保有する多型でアミノ酸置換を起こす多型は存在しないこと、予備実験として、スプライシング異常と思われるm-RNAがクローン病患者より検出されないことより、①と②の可能性は低いと考えている。一方、最も相関が強い *tnfsf36* は -640A/G、*tnfsf35* は -358T/C の多型であり、両多型ともに5'領域に存在し、この多型が転写活性に影響を与えて感受性に影響を与えている可能性が考えられた。また、配列を転写因子結合部位予測ソフトで解析すると、-358T (クローン病に抵抗性を示す対立遺伝子) で GATA3 転写因子の結合配列が、-358C (クローン病に感受性を示す対立遺伝子) でその結合配列が消失することが予測された。また GATA3 転写因子は、Th2 へのリンパ球分化のマスター転写因子と考えられていること、クローン病の炎症は Th1 優位の炎症であることより、以下のメカニズムを通して感受性を左右しているのではないかと考えている。

Th1 免疫反応を促進する *TNFSF15* 遺伝子は、-358T の対立遺伝子の場合、Th2 マスター転写因子である GATA3 が -358 周辺に結合し、*TNFSF15* の転写活性を抑制し Th1 への分化を制御しているが、-358C の対立遺伝子の場合、GATA3 の結合配列が消失するため、GATA3 による転写活性抑制がかからなくなるため、*TNFSF15* が過剰産生され、結果的に Th1 優位の炎症がおき、クローン病になりやすくなる。

2. 研究の目的

-358T/C 或いは、-640A/G の多型により転写活性が影響を受けることを示すこと。さらに、転写活性がどのようなメカニズムで、各対立遺伝子間で差がでるのか解析する。

3. 研究の方法

(1) プロモーターアッセイ

対立遺伝子毎に、転写活性に差が生じていないか luciferase をレポーターとしたプロモーターアッセイを行った。

① plasmid の作成 : reporter plasmid として pGL4 vector (Promega) を使用。+35~-991 までの範囲を、既に遺伝子型が判明されている

検体を使いPCRで増幅し、*KpnI*, *SmaI*にて切断したpGL4 vectorに挿入しsubcloningした。多型部位は-640A/Gと-358T/Cの2ヶ所で、それぞれ2つの対立遺伝子が存在するため、2 X 2の4種類のハプロタイプが存在するが、実際には-640A/Gと-358T/Cは完全連鎖しているために、ゲノムDNAからのPCR増幅では2種類のハプロタイプしか得られないため、他2種類のハプロタイプは、既存のハプロタイプをもとにして、site directed mutagenesis kit (TaKaRa) を用いて作成した。

② plasmid導入細胞およびその条件：

*TNFSF15*遺伝子の発現は、リンパ球系、マクロファージ系で認められることより、Jurkat細胞、U937細胞を用いて検討した。Jurkat細胞の刺激剤としては、PMA, Ionomycinを、U937細胞の刺激剤としてLPSを用いて、適当な濃度、時間を検討し、条件を決めた。なお、トランスフェクション試薬は、Jurkatでは、X-treameGENE Q2(Biochemica), U937とHeLaについてはFuGENE6(Roche)を用いて施行した。また内部コントロールとして、Renilla luciferaseを用いたreporter vectorをコトランスフェクションした。

③ Luciferaseの測定：Dual-Luciferase Reporter Assay System(Promega)を用いて、発光を定量した。なお本システムは、培養細胞の蛋白抽出から一連の作業がキット化されており、添付文書に従い測定した。

(2) 対立遺伝子特異的m-RNAの定量法を用いたin vivoでの対立遺伝子特異的転写活性予測：SNPによる転写活性への影響を解析する場合、前記のin vitroにおけるプロモーターアッセイが一般的であるが、最近必ずしもプロモーターアッセイが、in vivoの状態を反映するとは限らないことが報告されており、今回の検討においては、SNaPshot法を用いた対立遺伝子特異的m-RNAの定量法（組織中或いは細胞内）にて、in vitroと同様の結果がin vivoで確認できるか検討した。この方法の原理は、問題となっているtnfsf36

(-640A/G)、tnfsf35 (-358T/C) の両多型とexon4に存在するTNFSF15_26の多型とが完全連鎖不平衡であることを利用し、m-RNAのTNFSF15_26部位の塩基を確認することで、どちらのプロモーターから転写されたm-RNAであるかを特定し、定量する手法である。

(3) Gel shift assay

①プローブの設計：-640A/G或いは-358T/Cを含む約20~25bpを合成しプローブとした。DNAの検出系としてNon-RI系を用いるためプローブの5'末端にビオチンラベルをしたhotプローブとラベルをしないcoldプローブを作成し、Gel shift assayに用いた。

②培養細胞からの核蛋白質の抽出：Jurkat細胞、U937細胞、HeLa細胞の無刺激、刺激下条件それぞれの、核蛋白質を既法により抽出し、

-80℃で実験まで保存とした。

③ Gel shift assay：各多型毎のプローブにより、多型特異的に（対立遺伝子特異的に）シフトバンドが出現しないかどうか、確認する。また予測された転写因子に対しては、抗体を用いてスーパーシフトしないかどうか、確認する。特に今回の場合、GATA3が-358Tのプローブのみに結合し、-358Cでは結合しないことが予測されているので、そのようなシフト、スーパーシフトがおこるかどうか、またGATA3の発現している細胞（Jurkat細胞、U937細胞）の核蛋白でシフトし、GATA3の発現していない細胞の核蛋白でシフトが認められないかどうかあわせて確認した。

4. 研究成果

(1) 刺激下 Jurkat 細胞では *TNFSF15*-mRNA 発現量が著明に増加する：未刺激の Jurkat 細胞 *TNFSF15*-mRNA 量を 1 とした時、PMA+ionomycin で 6 時間刺激すると *TNFSF15*-mRNA 量は 780.93 倍、12 時間刺激では 5325.73 倍に増加を認めた。Jurkat 細胞は、PMA+ionomycin 刺激下では著明に *TNFSF15* を発現する事が示された。

(2) 刺激下 Jurkat 細胞では、クローン病リスクアレル優位の allelic imbalance を認める：未刺激時の *TNFSF15*-mRNA は、ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit の検出感度以下であり、測定できなかった。リスクアレル由来の *TNFSF15*-mRNA 量は、非リスクアレル由来に比べて、刺激 1 時間後 51.2%、3 時間後 68.5%、6 時間後 68.3%、12 時間後 59.7%と増加率が高かった。

(3) 刺激下 Jurkat 細胞では、-358 SNP C allele は T allele に比較し転写活性が高い：Jurkat 細胞にトランスフェクションを行ったのち無刺激の状態では、plasmid GC (-640G と-358C の組み合わせハプロタイプが挿入されているプラスミドの意味)、plasmid AC、plasmid GT、plasmid AT のいずれの間にも relative promoter activity (RPA) に有意差を認めなかった (t 検定、 $P>0.05$)。一方、トランスフェクション後に PMA+ionomycin で刺激を与えた Jurkat 細胞では、-358 SNP に C allele を持つ plasmid GC と plasmid AC が他のプラスミドに比べ、有意に RPA が高値を示した。さらに、-640 SNP を deletion した plasmid C と plasmid T での比較では plasmid C の RPA が有意 (t 検定、 $P=0.006$) に高値を示した。少なくとも-358 SNP がリスクアレル由来の C アレルである場合、PMA+ionomycin 刺激下の Jurkat 細胞では他のプラスミドに比べ RPA 値が有意に高値を示した。U937 細胞では、plasmid C と plasmid T 間で比較した場合、無刺激 (t 検定、 $P=0.77$)、刺激 (t 検定、 $P=0.81$) のいずれでも RPA 値に有意な差を認めなかった。HeLa 細胞でも同様に plasmid C と plasmid T 間で RPA 値に有意差

は認めなかった (t 検定, P =0.18)。
(4) -358 SNP 部に結合する核蛋白が存在する: Gel shift assay の結果、未刺激 Jurkat 細胞核蛋白では-358 C allele を含むプローブではシフトバンドを認めず、-358 T allele を含むプローブでは弱いシフトバンドを認めた。刺激 Jurkat 細胞核蛋白では-358 C allele を含むプローブでは弱いシフトバンドを、-358 T allele を含むプローブでは明瞭なシフトバンドを認めた。それぞれのシフトバンドの特異性は cold probe を加えると消失することで確認された。少なくとも-358 SNP 部に-358 T allele に優位に結合する核蛋白の存在が示された。また、HeLa と K562 の核蛋白を用いた結果では、どちらのプローブでもシフトバンドは認めなかった。また抗 GATA3 抗体にてスーパーシフトを観察できなかったことより、結合する核蛋白は転写因子 GATA3 ではないことを確認した。

以上の結果より、*TNFSF15* 遺伝子多型の中で、少なくとも rs6478109 (-358T/C) が regulatory SNP として働いている事が強く示唆された。-358C アリル (リスクアリル) は -358T アリル (非リスクアリル) と比較して、刺激時 T リンパ球において *TNFSF15* の転写活性が高いことにより、疾患感受性を高めていることが示唆された。

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 11 件)

- ① Kakuta Y, Ueki N, Kinouchi Y, Negoro K, Endo K, Nomura E, Takagi S, Takahashi S, Shimosegawa T. *TNFSF15* transcripts from risk haplotype for Crohn's disease are overexpressed in stimulated T cells. Hum molecular Genetics 査読有 18(6), 2009, 1089-98
- ② Aizawa H, Kinouchi Y, Negoro K, Nomura E, Imai G, Takahashi S, Takagi S, Kakuta Y, Tosa M, Mochida A, Matsumura Y, Endo K, Shimosegawa T. HLA-B is the best candidate of susceptibility genes in HLA for Japanese ulcerative colitis. Tissue Antigens 査読有 73(6), 2009, 569-74.

[学会発表] (計 5 件)

- ① Kinouchi Y. The -360t/C Polymorphism in the Tnfsf15 Gene Influences the Transcriptional Activity in Activated T Lymphocytes. 109th annual meeting of American Gastroenterological Association. 19/May, 2008, San Diego, USA.
- ② 木内喜孝、日本人クローン病感受性遺伝

子 *TNFSF15* の機能解析、第 95 回日本消化器病学会総会、平成 21 年 5 月 7 日、札幌。

[その他]
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木内 喜孝 (KINOUCHI YOSHITAKA)
東北大学・高等教育開発推進センター・准教授
研究者番号: 20250780

(2) 研究分担者

角田 洋一 (KAKUTA YOICHI)
東北大学・医学系研究科・非常勤講師
研究者番号: 50509205